

ارزیابی و مقایسه توانایی باکتری‌های سودوموناس بومی منطقه خور موسی در حذف ترکیبات آروماتیک حلقوی

علیرضا صفاهیه^۱، فاطمه موجودی^{۲*}، حسین ذوالقرنین^۳

۱- استادیار، گروه بیولوژی دریا و معاونت آموزشی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. Safahieh@hotmail.com

۲- کارشناسی ارشد بیولوژی دریا گرایش آلودگی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.

۳- استادیار، بیوتکنولوژی، گروه بیولوژی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. zolgharnein@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۲

چکیده

اغلب هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در محیط دریا پایداری زیادی داشته و در صورت ورود به بدن آبزیان در بافت‌های چربی تجمع می‌یابند. سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ایجاد اختلالات جنینی از جمله آثار سمی این ترکیبات است. از این رو تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفتالن و مقایسه توانایی آنها در حذف این ماده انجام شد. به این منظور پس از نمونه‌برداری از رسوبات آلوده نفتی و انجام مراحل غنی‌سازی باکتری‌های مقاوم به ماده فوق، جداسازی و سپس خالص‌سازی شدند. از ۸ گونه باکتری به دست آمده ۲ گونه که پس از سه روز از تلقیح از جذب نوری بالاتر و pH محیط کشت کمتری برخوردار بودند، به عنوان توانمندترین گونه‌های تجزیه‌کننده برای ادامه آزمایش‌ها برگزیده شدند. با مطالعه ویژگی‌های مورفولوژیکی و انجام یک سری آزمایش‌های بیوشیمیایی مشخص شد که گونه‌های فوق سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا هستند. اندازه‌گیری کاهش میزان سوبسترا به وسیله دستگاه HPLC نشان داد میزان تجزیه پس از ۱۲۰ ساعت برای گونه‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا به ترتیب 0.662 ± 0.14 و 1.1501 ± 0.9148 بوده است که این مقادیر با مقایسه 3.735 ± 1.4598 تجزیه‌ای که در شرایط مشابه ولی در عدم حضور این باکتری‌ها صورت گرفت نتیجه چشمگیری است. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های جدا شده در حذف این آلاینده از محیط کشت توانا بوده و بنابراین می‌توان این گونه‌ها را برای انجام آزمایش‌های میدانی پیشنهاد کرده و در شرایط آلودگی بالا، از آنها استفاده کرد.

کلید واژه

خور موسی، پاک‌سازی زیستی، نفتالن، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس پوتیدا

سرآغاز

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای گروهی از ترکیبات آروماتیک با حلقه‌های به هم پیوسته بنزنی هستند که به صورت خطی، زاویه‌دار یا خوشه‌ای به هم متصل شده‌اند. رسوبات و خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی معمولاً شامل مخلوطی از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و سایر ترکیبات آروماتیک هستند (Seo, et al., 2009).

این ترکیبات در چربی حل شده و در بافت‌های چربی بدن تجمع می‌یابند (Poeton, et al., 1999) و به علت گسترش محیطی زیاد، سمی بودن، سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ایجاد اختلالات جنینی از اهمیت خاصی برخوردارند. (Holt, et al., 2005). هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی کم، بیش از

آن که برای انسان مضر باشند برای ماهی‌ها و سایر حیوانات دریایی که در معرض این ترکیبات قرار دارند خطرناک هستند (Sanghvi, 2005). این ترکیبات همچنین بر فعالیت‌های تولید مثلی و توانایی ماهی‌ها در واکنش به استرس اثر منفی دارد. به‌علاوه در بسیاری از موارد، برخی عملکردهای فیزیولوژیکی ماهی مثل متابولیسم انرژی، رشد و سیستم ایمنی را مختل می‌کند (Gesto, et al., 2006).

پاک‌سازی مواد نفتی و سایر منابع آلوده‌کننده دریاها می‌تواند در کاهش آلودگی آب دریا و جلوگیری از نابودی موجودات این اکوسیستم بزرگ مؤثر واقع شود.

برای پاک‌سازی روش‌های زیادی وجود دارد که یکی از کم‌هزینه‌ترین و مؤثرترین این روشها استفاده از میکروارگانیسم‌هایی است که قادرند از مواد نفتی به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده

برای جداسازی گونه های فوق، ۱ میلی لیتر از محیط حاصل از آخرین مرحله غنی سازی بر روی تعدادی پتری دیش حاوی محیط MSM جامد به صورت پور پلیت کشت داده شد. محیطها در دمای 30°C در انکوباتور گرماگذاری شدند. پس از رشد باکتری ها کلنی هایی که از لحاظ ظاهری با هم متفاوت بودند با انجام چندین کشت متوالی خالص سازی شدند.

جدول شماره (۱): ترکیبات محیط کشت MSM

مقدار	ترکیبات
۲gr	KH ₂ PO ₄
۰/۸gr	NH ₄ NO ₃
۰/۸gr	MgSO ₄
۰/۸gr	NaCl
۰/۸gr	FeSO ₄ .7H ₂ O
۲/۴gr	Na ₂ HPO ₄
۰/۰۱۳gr	CaCl ₂ .2H ₂ O
۱/۴gr	ZnSO ₄ .7H ₂ O
۱/۲gr	MnSO ₄ .7H ₂ O
۰/۲۵gr	CuSO ₄ .5H ₂ O
۱۰۰۰ml	آب مقطر

انتخاب توانمندترین گونه ها در تجزیه نفتالن

برای انتخاب بهترین نمونه در تجزیه نفتالن، کدورت سنجی در ۶۰۰nm و اندازه گیری pH محیط کشت پس از ۳ روز از تلقیح باکتری ها انجام گرفت. باکتری هایی که از رشد بیشتر و نیز توان بهتری در تجزیه نفتالن برخوردار بودند، جذب نوری بالاتر و pH محیط کشت کمتری داشتند، از این رو برای ادامه آزمایش ها انتخاب شدند (Nnamchi, et al., 2006).

شناسایی باکتری

اولین مشخصه شناسایی، مورفولوژی باکتری هاست. به این دلیل خصوصیات ظاهری باکتری ها به صورت میکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر آن برای شناسایی دقیق تر باکتری ها از تست های معمول بیوشیمیایی و کتاب راهنمای نظام مندی برجی استفاده شد.

بازده تجزیه نفتالن به وسیله گونه های منتخب

محیط MSM با غلظت ۶۰ppm نفتالن تهیه و تلقیح باکتریایی در آن صورت گرفت. برای هر باکتری سه تکرار در نظر گرفته شد.

کنند و آنها را به مواد بی ضرر یا موادی با آلودگی کمتر تبدیل کنند (Vidali, 2001).

پاک سازی هیدروکربن های نفتی به وسیله باکتری های تجزیه کننده از موضوعات حایز اهمیت است که اگرچه مطالعات متعددی را به خود اختصاص داده است لیکن پژوهش کامل در مورد بررسی وجود سویه های باکتریایی نفت خوار بومی هر منطقه و عملکرد آنها در تجزیه هیدروکربن های نفتی از اهمیت بسزایی برخوردار است. تجزیه زیستی هیدروکربن های آروماتیک در محیط دریا به طور طبیعی صورت می پذیرد ولی سرعت آن بسیار کند است، از این رو به منظور رسیدن به هدف توسعه پایدار می توانیم با استفاده از روش های بیوتکنولوژی نو، این روش زیستی را تقویت کنیم. به طور کلی این گونه بررسی های آزمایشگاهی به دلیل افزایش بازده کار و کاهش هزینه های اجرایی برای استفاده از باکتری ها در مقیاس صنعتی تعیین کننده است.

از این رو هدف از مطالعه حاضر تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده نفتالن بومی منطقه خور موسی و مقایسه توانایی آنها از نظر پاک سازی زیستی است.

مواد و روشها

۳ ایستگاه در منطقه خور موسی بر اساس نزدیک بودن به تأسیسات نفتی و پتروشیمی انتخاب شدند. نمونه برداری با ۳ بار تکرار، به وسیله گرب و از سطح رسوبات انجام گرفت. نمونه های رسوب در شیشه های استریل ریخته شد و پس از قرار گرفتن در محفظه حاوی یخ، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد.

غنی سازی، جداسازی و خالص سازی

ابتدا محیط کشت MSM^۱ حاوی املاح معدنی، عناصر کمیاب و نفتالن به عنوان یگانه منبع کربن در تعدادی ارلن تهیه شد. ترکیبات این محیط کشت در جدول شماره (۱) ذکر شده است (Mukred, et al., 2008).

پس از تهیه رقت های متوالی از رسوب و سانتریفیوژ در ۲۰۰۰rpm مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به محیط های کشت اضافه شد (Coral & Karagöz, 2005). محیطها به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار در دمای 30°C و با دور ۱۵۰rpm نگهداری شدند. پس از گذشت این زمان و با مشاهده کدورت، ۱۰ میلی لیتر از آن به محیط کشت جدید انتقال داده شد.

این عمل تا ۳ بار تکرار شد. به این ترتیب جمعیت باکتری های تجزیه کننده نفتالن افزایش پیدا کرد (Nnamchi, et al., 2006).

نفتالن به وسیله گونه های باکتریایی، باعث افت محسوس PH محیط کشت ها شد.

نتایج بررسی ها و تست های بیوشیمیایی دو گونه فوق در جدول شماره (۳) ارائه شده است.

جدول شماره (۲): باکتری های ایزوله شده از مرحله جداسازی

نام باکتری	ایزوله
سودوموناس	MB10
آکالیجنز	MB20
سودوموناس	MB30
سودوموناس	MB40
باسیلوس	MB50
سودوموناس	MB60
میکروکوکوس	MB70
سودوموناس	MB80

جدول شماره (۳): مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ۲ گونه

باکتری منتخب

MB10	MB30	تست یا بررسی
-	-	رنگ آمیزی گرم
+	+	تست KOH
میله ای	میله ای	سلول
گرد، شفاف و	گرد، مسطح با بوی	خصوصیات ظاهری کلنی
صیقلی	شیرین و سایز متوسط	
کرمی	سبز آبی	رنگ کلنی
+	+	کاتالاز
+	+	اکسیداز
متحرک	متحرک	حرکت
-	+	احیای نیترا
+	-	تولید H ₂ S
K/K	K/K	TSI
-	-	اوره
+	+	سیمون سیترا
-	-	تولید اندول
+	-	متیل رد
-	-	VP
-	+	ژلاتین
-	+	فنیل آلانین
اکسیدکننده	اکسیدکننده	اکسیداسون و تخمیر
-	-	لازین
+	+	رشد روی محیط مک کانکی

با استفاده از نتایج به دست آمده و با کمک کتاب راهنمای برجی مشخص شد که گونه MB10 و MB30 به ترتیب شباهت

با توجه به این که نفتالن ماده ای فرار است سه نمونه شاهد نیز بدون تلقیح باکتری با همان غلظت در نظر گرفته شد تا اثر سایر عوامل از حذف زیستی نفتالن متمایز شود. برای بررسی کاهش نفتالن در محیط کشت ابتدا می باید نفتالن موجود در محیط کشت از فاز آبی جدا و وارد فاز آلی شود. به این منظور در فواصل زمانی معین ۵ میلی لیتر از هر محیط کشت به همراه ۲ میلی لیتر هگزان به عنوان حلال به لوله های آزمایش منتقل و بخوبی هم زده شد و پس از برداشت مایع رویی و تیخیر حلال، ۵ میلی لیتر استونیتریل به آن اضافه شد (Coral and Karagöz, 2005). برای اندازه گیری میزان نفتالن از دستگاه HPLC KNAUER استفاده شد. حلال های دستگاه آب و استونیتریل به نسبت ۳۰ به ۷۰ با شدت جریان ۱ ml/min بود.

برای استفاده از دستگاه ابتدا چند محلول با غلظت های معین نفتالن در استونیتریل تهیه و به دستگاه تزریق شد تا هم زمان بازیابی نفتالن به دست آید و همچنین با داشتن غلظت مشخصی سطح زیر پیک منحنی استاندارد نفتالن مشخص شود. نمونه های حاصل از مرحله استخراج با سرنگ به دستگاه تزریق شدند. نرم افزار دستگاه غلظت ماده مجهول را بر مبنای نسبت مساحتها محاسبه کرد (kang, et al., 2007).

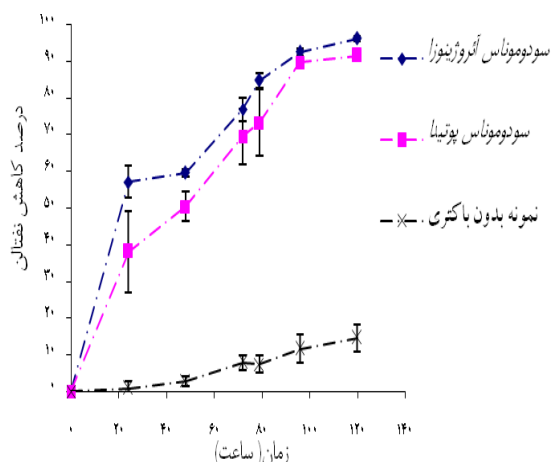
از نرم افزار Excel برای رسم کردارها و نرم افزار spss برای تحلیل داده ها استفاده شد. از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه^۲ برای بررسی اختلاف معنی دار بین غلظت نفتالن ارلن های حاوی باکتری و بدون باکتری استفاده شد.

نتایج

با انجام آمایش ها معمول میکروبیولوژی مجموعاً ۸ باکتری جداسازی و خالص سازی شد. مطابق جدول شماره (۲) این باکتری ها MB10 تا MB80 نام گذاری شدند. اکثر ایزوله ها جزء باکتری های گرم منفی، غیر تخمیری، اکسیداز و کاتالاز مثبت (سودوموناس) بودند.

در مرحله بعدی بر اساس میزان کدورت حاصل از رشد آنها در محیط MSM و کاهش pH محیط کشت ها طی مدت ۳ روز باکتری های MB30 و MB10 به ترتیب به عنوان توانمندترین باکتری ها در تجزیه نفتالن، برای ادامه مطالعات انتخاب شدند.

رشد باکتری در محیط مایع با کدر شدن محیط مشخص می شود، همچنین ایجاد متابولیت های اسیدی حاصل از تجزیه



شکل شماره (۳): درصد کاهش نفتالن در ارلن‌های حاوی

باکتری و ارلن‌های بدون باکتری

در این آزمایش‌ها از نفتالن و فنانتن به عنوان منبع کربن استفاده شد. Khalid و همکارانش (۲۰۰۴) نیز برای ارزیابی تجزیه زیستی ۳ ترکیب از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (فنانتن، پابرن و فلورانتن)، گونه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده را از رسوبات ۳ ایستگاه آلوده نفتی دریای اگزامین و سترن، جداسازی کردند.

گونه‌های فوق متعلق به جنس‌های آئروباکتریوم، رودوکوکوس و آرتروباکتر بودند. این گونه‌ها از توانایی بالایی در تجزیه ترکیبات مذکور داشتند. Taoufik و همکاران (۲۰۰۴) گونه‌های کلبسیلا پنومونیا، پروتئوس میرابیلیس و نیز دو گونه سودوموناس و استافیلوکوکوس را از رودخانه‌ای آلوده به ترکیبات هیدروکربنی در مورکو، جداسازی و خالص‌سازی کردند. Kayode و همکاران (۲۰۰۸) ۱۲ گونه باکتری را که قادر به رشد بر نفت دیزل بودند و توانایی تجزیه آن را به عنوان یگانه منبع کربنی داشتند، از آب و رسوبات آلوده نفتی رودخانه‌ای در ابرک چین، جداسازی کردند.

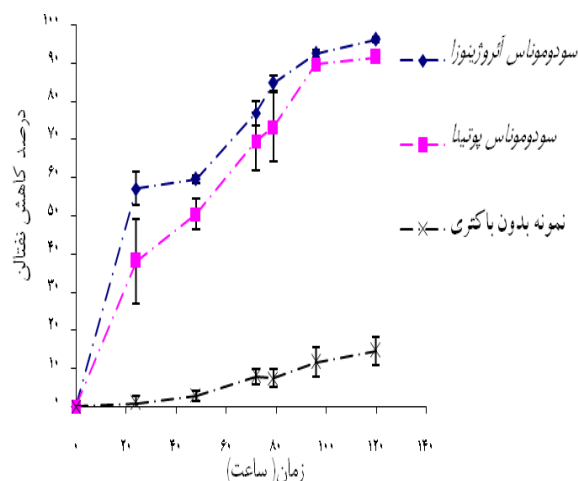
در ایران نیز زهرا یعقوبزاده و همکاران (۱۳۸۵) باکتری‌های جنس باسیلوس (*Bacillus sp.*) و سودوموناس (*Pseudomonas sp.*) و ویبریو (*Vibrio sp.*) را به عنوان گونه‌های شاخص در تجزیه نفتالن نمونه‌های آب دریای خزر (بنادر نوشهر و امیرآباد) جداسازی کردند. نتایج مطالعات گویای آن است که جوامع میکروبی تجزیه‌کننده در مناطق آلوده، توسعه بیشتری نسبت به مناطق غیرآلوده دارند (Geiselbrecht, et al., 1996).

در این ارتباط کارگر و همکاران (۱۳۸۵)، طی آزمایش‌هایی که بر باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت‌ها و کاربرد آنها در حذف

زیادی به گونه‌های سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) و سودوموناس آئروژینوزا (*P. aeruginosa*) دارند.

نتایج آزمایش‌ها کاهش بیولوژیکی نفتالن در محیط مایع MSM، توسط دو باکتری منتخب در شکل شماره (۲) ذکر شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود بیشترین درصد حذف نفتالن از محیط کشت، مربوط به ساعات اولیه پس از تلقیح است و پس از آن کاهش نفتالن از محیط روند تقریباً ثابتی به خود گرفت. همچنین کاهش چشمگیری در سطح نفتالن موجود در محیط کشت بدون باکتری (نمونه شاهد)، مشاهده نشد، به طوری که پس از ۱۲۰ ساعت، یگانه $14/598 \pm 3/735$ از نفتالن محیط کشت حذف شد.

از این رو می‌توان نتیجه گرفت که عوامل غیرزیستی تأثیر چندانی در حذف نفتالن ندارند. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری ANOVA یکطرفه، بین تیمارهای هر دو باکتری با تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری) از نظر میزان نفتالن باقیمانده در سطح خطای ۰/۰۵ و تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی بین دو گونه منتخب تفاوت معنی‌داری از نظر کاهش نفتالن مشاهده نشد.



شکل شماره (۲): کاهش نفتالن توسط دو گونه جدا شده

بحث و نتیجه‌گیری

طی مطالعات بسیاری که در گذشته انجام شده، تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها در رسوبات دریایی به اثبات رسیده است. Dann و همکاران (۲۰۰۲) باکتری‌های جنس پائنی‌باسیلوس را از رسوبات آلوده به هیدروکربن‌های نفتی جداسازی کردند.

اغلب گزارش‌های مربوط به تجزیه زیستی وجود دارد (Minui, et al, 2009 & Tekorienè, 2008 & Taoufik, et al., 2004 & Guieysse, et al., 2004 & Ilori and Amund, 2000 & Hedlund, et al., 1999 & Magdalena, et al., 1995).

در واقع گونه‌های بسیاری در تجزیه ترکیبات نفتی جداسازی شده‌اند، ولی گونه‌های سودوموناس به عنوان توانمندترین گونه‌های برجسته و شاخص شناخته شده‌اند و حضور آنها در اغلب شرایط محیطی، عامل مهمی است که استفاده از آنها را در اغلب محیط‌ها ممکن می‌سازد (Okoh, 2003). نتایج مطالعات تجزیه زیستی و کاهش نفتالن در محیط‌کشت پایه معدنی حاوی باکتری‌های فوق گوئیای کاهش چشمگیر نفتالن بود. به طوری که پس از ۱۲۰ ساعت از تلقیح باکتری‌ها $۹۶/۱۴۷ \pm ۰/۶۶۳$ ، $۹۱/۴۸۵ \pm ۱/۵۰۲$ درصد کاهش در میزان نفتالن اولیه به ترتیب در محیط‌کشت‌های حاوی سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس پوتیدا اتفاق افتاد.

اهمیت نتایج این تحقیق زمانی آشکار می‌شود که بدانیم نیمه عمر تجزیه زیستی کامل نفتالن ماهها به طول می‌انجامد (Nnamchi, et al., 2006).

نتایج حاکی از آن است که بیشترین میزان تجزیه‌کنندگی، به‌وسیله گونه‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا پس از گذشت ۲۴ ساعت از حضور باکتری در محیط‌کشت رخ می‌دهد، به طوری که در این مدت، گونه سودوموناس پوتیدا $۳۸/۰۳۸ \pm ۱۱/۰۹۵$ درصد و گونه سودوموناس آئروژینوزا $۵۷/۰۹۹ \pm ۴/۳۲$ درصد، از نفتالن موجود در محیط‌کشت را تجزیه کردند.

همان طور که ملاحظه می‌شود، گونه سودوموناس آئروژینوزا در همان ۲۴ ساعت ابتدایی انکوباسیون، بیش از نیمی از نفتالن را مورد تجزیه قرار داده است. با توجه به کردارهای اشکال ۳-۸ و ۳-۹، این میزان تجزیه نفتالن، تنها در این زمان (۲۴ ساعت اول) دیده می‌شود و با گذشت زمان، از میزان درصدکاهش سوبسترا کم می‌شود.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سرعت تجزیه آلاینده با غلظت آن رابطه مستقیم داشته و با کم شدن غلظت آلاینده، زیست دسترس‌پذیری آن کاهش یافته و عمل تجزیه کندتر صورت می‌گیرد. محققان دیگر نیز عملکرد باکتری‌های جدا شده بر تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را مورد بررسی قرار داده‌اند از جمله Abou Seoud و Maachi (۲۰۰۳)، که میزان تجزیه نفتالن توسط

هیدروکربن‌های نفتی انجام دادند، نتیجه گرفتند که تعداد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده در نمونه‌های آب آلوده ارتباط زیادی با درجه آلودگی نفتی دارد.

از این رو در مطالعه حاضر از رسوبات آلوده‌ای که به مدت طولانی در معرض هیدروکربن‌های نفتی قرار داشتند نمونه‌برداری شد، چون احتمال وجود باکتری‌های تجزیه‌کننده در آن مناطق بیشتر بود. در این میان اکثر ایزوله‌ها در این پژوهش، از باکتری‌های گرم منفی از جنس سودوموناس (باکتری‌های میله‌ای، غیرتخمیری، اکسیداز و کاتالاز مثبت) و یک گونه هم از جنس آکالیجنز بود. این گونه‌ها توانایی استفاده از نفتالن را به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی دارا بودند.

توانایی این گونه‌ها را در تجزیه زیستی آلاینده‌ها به دفعات توسط محققان مختلف گزارش کرده‌اند و بسیاری از مطالعات قبلی منجر به جداسازی گونه‌های فوق از محیط‌های آبی و خاکی شده است. در تمامی این موارد توانایی آنها در استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی تأیید شده است و امروزه بیشتر از آنها در مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود (Chakrabarty, 1972 & Chakrabarty, et al., 1973). بخصوص جنس سودوموناس که از باکتری‌های همه جا حاضر است که به باکتری‌های زیر رده گاما از پروتوباکترها تعلق دارند، این باکتری‌ها نقش بسیار مهمی در فعالیت‌های متابولیکی محیط زیست، مانند چرخه عناصر و تجزیه آلاینده‌های ناشی از فعالیت‌های زیستی و غیرزیستی را بازی می‌کنند. توانایی سودوموناس‌ها در زمینه عملیات و فعالیت‌های بیوتکنولوژی بویژه در زمینه تجزیه زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Nelson, et al., 2002).

مشخص شده که باکتری‌های جنس سودوموناس، توانایی بسیار بالایی در استفاده از ترکیبات آروماتیک دارند. از این رو این باکتری‌ها، به دفعات از انواع اکوسیستم‌های آلوده به ترکیبات نفتی جدا شده‌اند و علاوه بر نفتالن توانایی تجزیه ترکیبات پلی‌آروماتیک با تعداد حلقه‌های بیشتر را نیز دارا هستند (Nnamchi, et al., 2006). این باکتری‌ها در حضور اکسیژن (به عنوان پذیرنده الکترونی) و از راه‌های بیوشیمیایی تجزیه هوازی، مواد آلی را تجزیه می‌کنند.

چرخه تنفسی این باکتری‌ها شامل سیتوکروم‌های مختلف و انواع گوناگون اکسیدازهای انتقالی متصل به اکسیژن است (Minui, 2008). جنس سودوموناس از معمول باکتری‌هایی است که در

Mukred و همکاران (۲۰۰۸)، هم ۴ گونه باکتریایی را از فاضلاب پالایشگاه نفت ترنگانو بر اساس توانایی در رشد و تجزیه، برای آزمایش‌ها تجزیه زیستی جدا کردند. سودوموناس پوتیدا یکی از این ایزوله‌ها بود که ۹۶٪ از هیدروکربن موجود در محیط کشت را مورد تجزیه قرار داد.

Singh و Mittal (۲۰۰۹)، ۲۰ گونه تجزیه‌کننده نفت را از خاکهای آلوده مناطق نفتی لینگالا و توقفگاه هاردوار، جداسازی کردند که ۲۷ درصد ایزوله‌ها از جنس سودوموناس شناسایی شدند. در مقایسه با سایر ایزوله‌ها، سویه سودوموناس PS-1، تواناترین باکتری در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی شناخته شد. این باکتری ۵۷/۱۳٪ نفت را طی مدت ۶۰ روز مورد تجزیه قرار داد. همان طور که ملاحظه می‌شود، نتایج حاصل از این تحقیق گویای آن است که باکتری‌های ایزوله شده، دارای نتایج برابر و حتی بهتر از گونه‌های مشابه به دست آمده در تحقیقات ذکر شده توسط سایر محققان است.

همان طور که در اشکال شماره (۱۲ تا ۳) مشاهده می‌شود، توانایی ایزوله‌های منتخب در تجزیه نفتان، اندکی با هم متفاوت است. به طوری که کاهش زیستی نفتان پس از ۱۲۰ ساعت از تلقیح باکتری‌ها، توسط سودوموناس آئروژینوزا بیشتر از دو باکتری دیگر است. در محیط کشت حاوی باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیشترین میزان و درصد حذف در تمامی ساعات، دیده می‌شود.

توانایی سودوموناس آئروژینوزا را در تجزیه ترکیبات نفتی از جمله نفتان، بسیاری از محققان گزارش کرده‌اند. نتایج کار Thavasi و همکاران (۲۰۰۷)، در جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی از مناطق آلوده محیط‌های دریایی نشان داد که باکتری سودوموناس آئروژینوزا با ۸۵/۱۵٪ تجزیه نفت، بهترین توانایی را در حذف این ترکیبات داراست. ادامه آزمایش‌ها، فعالیت خوب امولسیون‌سازی این گونه را در مجاورت نفتان، آنتراسن، روغن روان‌کننده موتور، نفت خام، رنگ‌های روغنی، نفت سفید و گزبلن نشان داد.

نتایج گویای آن بود که گونه سودوموناس آئروژینوزا، گونه‌ای توانا در تجزیه و امولسیون‌سازی نفت خام و انواعی از هیدروکربن‌هاست.

Mukherjee و Das (۲۰۰۷)، نیز دو گونه سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سابتیلیس را از خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی جدا کردند و توانایی آنها را برای مقایسه تجزیه زیستی

گونه‌ای سودوموناس جدا شده از فاضلاب آلوده یک پالایشگاه نفت را اندازه‌گیری کرد.

باکتری فوق، در چهار روز پس از انکوباسیون غلظت ۲۵ میلی‌مول نفتان را به طور کامل تجزیه کرد، ولی فقط ۶۰٪ از غلظت‌های بالاتر را مورد تجزیه قرار داد. Kucerova (۲۰۰۶)، نیز با نمونه‌برداری از نمونه‌های خاک آلوده به ترکیبات پلی‌آروماتیک گونه سودوموناس پوتیدا را جدا سازی کرد و با انجام آزمایش‌ها تجزیه زیستی متوجه شد که این باکتری پس از یک ماه انکوباسیون ۸۱٪ از این ترکیبات را از محیط کشت حذف می‌کند.

در مطالعه‌ای که توسط Kumar و همکارانش (۲۰۰۶)، انجام دادند، گونه‌های سودوموناس پوتیدا سویه *Sal* و سودوموناس آئروژینوزا سویه *DHT-GL* را از نمونه‌های خاک آلوده نفتی از منطقه گوانکو آسفالت بلت در ونزوئلا جداسازی کردند.

توانایی این گونه‌ها در تجزیه نفت، نفتان و چند هیدروکربن نفتی دیگر مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها تجزیه نفت در محیط کشت پایه معدنی مایع حاوی نفت تلقیح شده با سودوموناس پوتیدا و سودوموناس آئروژینوزا و مخلوط دو باکتری، پس از ۲۰ روز از شروع گرماگذاری باکتری‌ها، به ترتیب ۴۴٪، ۲۴٪ و ۹۲٪ بود در حالی که در خاک آلوده به ترتیب ۳۸٪، ۲۰٪ و ۸۰٪ بود. قدرت تجزیه کنندگی این دو سویه به دلیل تولید بیوسورفاکتانت‌هایی بیان شد، که باعث افزایش امولسیونه شدن هیدروکربن‌های نفتی و همچنین تغییر در جاذبه سطحی و اتصال هیدروکربن به سطح سلول باکتری‌ها می‌شود.

همچنین طی مطالعه دیگر این محققان (۲۰۰۶)، باکتری *IRI* را با توانایی تجزیه طیف وسیعی از ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای و تولید بیوسورفاکتانت، از مناطق آلوده نفتی در کاراکاس ونزوئلا جداسازی کردند. این ایزوله توسط توالی *srRNA* ۱۶ سودوموناس پوتیدا شناسایی شد که توانایی تجزیه ترکیبات ۲، ۳ و ۴ حلقه‌ای را دارا بود.

بعد از یک هفته از شروع انکوباسیون این باکتری (۳±۶۹٪)، (۲±۷۲٪)، (۴±۸۲٪) و (۴±۶۰٪)، به ترتیب پابین، نفتان، DBT و فناترن را مورد تجزیه قرار داد. Olo-Artiova و همکارانش (۲۰۰۷)، گونه سودوموناس آئروژینوزا را از آب‌های آلوده پالایشگاهی جداسازی کرد. این باکتری غلظت ۱/۵ میلی‌لیتر نفت در ۷ میلی‌لیتر محیط کشت پایه معدنی را در طول ۲۰ روز به ۰/۷ میلی‌لیتر کاهش داد.

کاهش نفتالن در محیط کشت های تلقیح شده با باکتری، افت نفتالن در محیط کشت بدون باکتری ناچیز است همچنین آزمون همبستگی پیرسون مشخص کرد که بین کاهش نفتالن در ارلن حاوی باکتری و ارلن فاقد باکتری در سطح خطای کمتر از ۰/۰۱ تفاوت قوی و معنی داری وجود دارد. این کاهش جزئی در غلظت اولیه نفتالن، نشان دهنده آن است که عوامل غیربیولوژیکی تأثیر چندانی در حذف نفتالن نداشته اند.

این مقدار اندک کاهش، نیز احتمالاً ناشی از تبخیر یا ماندن نفتالن در جداره های ظرف است. البته احتمال حذف ناشی از فتواکسیداسیون، بسیار کم است، زیرا ارلن ها در شرایط تاریکی کامل، انکوبه می شدند. این مقایسه، نشان می دهد که باکتری ها، در حذف این آلاینده از محیط کشت توانا بوده و در محیط طبیعی، نیز احتمالاً رفتاری مشابه خواهند داشت.

از این رو برای مقاصد پاک سازی محیط زیست به خصوص در منطقه خور موسی، مناسب به نظر می رسند و از آن جا که در عصر حاضر، رویکرد جدید به محیط زیست و در نظر گرفتن آن به عنوان یک جزء از سرمایه ملی کشورها و در نتیجه، لزوم حفظ آن با استفاده از زیست فناوری از مهم ترین دغدغه های بشر است، حذف مؤثر آلاینده های محیطی خطرناک از محیط زیست، با استفاده از این باکتری های پالایشگر آلودگی، بسیار مورد توجه است.

در واقع کاربرد زیست فناوری در پاک سازی مکان های آلوده که منجر به حذف آلاینده ها با صرف هزینه و انرژی کمتر و از همه مهم تر با کمترین اثر مخرب بر محیط زیست می شود، باعث شده که از این فناوری به عنوان یکی از پاک ترین و در عین حال سودآورترین بخش های صنعت یاد شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله لازم می دانیم از آقایان عبدالله پور و لفته پور به دلیل همکاری در نمونه برداری و تمام کارکنان آزمایشگاه های معتمد، شیمی و میکروبیولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر که در تمام مراحل اجرای این پروژه با ما همکاری داشتند قدردانی و تشکر کنیم.

یادداشت ها

1-Mineral Salt Medium

2-One way ANOVA

هیدروکربن های نفت خام در خاک و فلاسک های دوار مورد بررسی قرار دادند. این باکتری ها توانایی استفاده از هیدروکربن های نفتی به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی را دارا بودند. تلقیح زیستی میکروکوسم آلوده به TPH با این دو گونه، کاهش شدید آلاینده ها را نشان داد ولی گونه سودوموناس آئروژینوزا به گونه ای توانا تر عمل کرد. نتایج حاکی از آن بود که این باکتری ها برای تجزیه زیستی درجا بسیار مناسب هستند.

به طور کلی بین سه باکتری انتخاب شده برای آزمایش های تجزیه زیستی، رفتار گونه های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی نفتالن تقریباً با هم مشابه است. پس این طور می توان نتیجه گرفت که گونه های مذکور از نظر ژنتیکی به یکدیگر نزدیک بوده و دارای صفات ژنتیکی مشابهی هستند. این توانایی باکتری های جنس سودوموناس به دلیل وجود تنوع و نیز تولید تعداد زیادی آنزیم های مورد نیاز کاتابولیکی و از آن مهم تر به دلیل توانایی ذاتی بسیار خوب آنها در سازگاری با شرایط مختلف محیطی است.

این اعتقاد وجود دارد که توانایی سازشی بالای جنس سودوموناس به دلیل خصوصیات ذاتی آنهاست که به آنها اجازه القاء تصادفی آنزیم های مورد نیاز تجربه، از راه های مختلف کاتابولیکی می دهد موجب به دست آوردن خصوصیات جدید برای تجزیه زیستی می شود (Okoh, 2003).

طبق یافته های Okoh (۲۰۰۳)، نیز از بین ۴ سویه باکتری سودوموناس آئروژینوز (MT1، OK1، RQ1 و T2) تجزیه کننده نفت MT1، OK1 و T2، نرخ تجزیه نسبتاً یکسانی را در تجزیه ترکیبات نفتی نشان دادند که علت، تشابه ژنتیکی این ایزوله ها با یکدیگر، در تجزیه زیستی نفت گزارش شد.

Oboh و همکارانش (۲۰۰۶) هم در تلاشی برای جداسازی گونه های میکروبی فعال در ارتباط با تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی از رسوبات آلوده نفتی در نیجریه توانایی سه گونه (سودوموناس ستاتزری، سودوموناس مولی و آلکالیجنز) در تجزیه زیستی نفتالن، کروزن و نفت دیزل را مورد مطالعه قرار دادند.

در نتایج حاصل تفاوت معنی دار آماری ($p > 0.05$) در نرخ تجزیه و مصرف هیدروکربن ها دیده نشد (بخصوص در رابطه با گونه های سودوموناس)، از این رو طبق گزارش این محققان گونه های فوق در توانایی تجزیه این هیدروکربن ها، از نظر ژنتیکی با هم شباهت دارند. با توجه به اشکال شماره (۳ و ۲)، در مقایسه با

منابع مورد استفاده

- کارگر، م.، ف. کفیل زاده، ن. گودرزبان، ا. نوحی. ۱۳۸۵. شناسایی باکتری های مولد بیوسورفکتانت و کاربرد آنها در حذف آلاینده های نفتی، علوم و تکنولوژی محیط زیست، شماره ۲۹، صص ۱۰۹-۱۱۸.
- یعقوب زاده، ز. ۱۳۸۵. تجزیه بیولوژیکی نفتالن با استفاده از باکتری های جدا شده از آب دریای خزر، مجله علوم دریایی ایران، دوره پنجم، شماره ۲، صص ۶۸ تا ۷۵
- Abou Seoud, M. and R., Maac. 2003. Biodegradation of naphthalene by free and alginate entrapped *Pseudomonas sp.*, *Z. Naturforsch.* 58c: 726-731.
- Chakrabarty, A.M. 1972. Genetic basis of the bioremediation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 112:815-823.
- Chakrabarty, A.M., G., Chou, and I.C., Gumsalus. 1973. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1973. Vol: 1137-1140
- Coral, G. and S., Karagöz. 2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery. *Soil. Ann. Microbiol.* 55(4): 255-259.
- Daane, L.L., et al. 2002. PAH-degradation by *paenibacillus sp.* and description of *paenibacillus naphthalenovorans*, sp. nov., a naphthalene – degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 : 131 -139.
- Das, k., and K., Mukherjee. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technol.* 98: 1339-1345.
- Garrity, G.M. 2005. In Brenner, D.J. krig, N.R. Staley J.T.(ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Springer, New York. 2c:323-384.
- Geiselbrecht, A.D., et al. 1996. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(9): 3344-3349.
- Gesto, M., et al. 2006. Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 144: 173-183.
- Guieysse, B., et al. 2004. Combined UV-biological degradation of PAHs. *Chemosphere.* 55: 1493-1499
- Holt, J., et al. 2005. Bioremediation and Biodegradation 9,10-Phenanthrenequinone Photoautocatalyzes its Formation from Phenanthrene, and Inhibits Biodegradation of Naphthalene. *J. Environ. Qual.* 34:462-468.
- Ilori, M.O.N., and D.I., Amund. 2000. Degradation of Anthracene by Bacteria Isolated from Oil Polluted Tropical Soils. *Z. Naturforsch.* 55c: 890-897.
- Kang, Y., et al. 2007. Over expressing antioxidant enzymes enhances naphthalene biodegradation in *Pseudomonas sp. strain As1*. *Microbiol.* 153: 3246-3254.

- Kayode, T.M., et al. 2008. Response of Resident Bacteria of a Crude Oil-Polluted River to Diesel Oil. *Am-Euras. J. Agron.* 1 (1): 06-09.
- Khalid, M., et al. 2004. Preliminary study on PAH degradation by bacteria from contaminated sediments in Xiamen Western Sea, Fujian, China. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 22(4): 431 -435.
- Kumar, M., et al. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas sp. IRI*. *Z. Naturforsch.* 61c: 203- 212.
- Kucerova, R. 2006. Application of *pseudomonas putida* and *rhodococcus sp.* By biodegradation of PAH(s), PCB(s) and nel soil samples from the hazardous waste dump in pozd'átky (czech republic). *Rud. Geol. Naft.* 18:97-101.
- Magdalena, G., et al. 1995. Action of a versatile flurene degrading bacteria isolation on poly aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbial.* 61(10):3711-3723.
- Minoui, S., et al. 2009. Change in cytochromes contetn of *pseudomonas sp* in the medium contaning petroleum. *Aust. J. Basic; Appl. Sci.* 3(3): 1512-1516.
- Minoui, S., et al. 2008. Effect of heavy crude oil on the pattern of respiratory chain of *Pseudomonas sp.* *Terr. Aquat. Environm. Toxicol.* 2(1): 34-37.
- Mittal, A. and p., Singh. 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crud oil spills. *Indian J. Exp. Biol.* 47: 760 -765.
- Mukred, A.M., et al. 2008. Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. *OnLine J. Biol. Sci.* 8 (4): 73-79.
- Nelson, K.E., et al. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas Putida KT2440*. *Environ. Microbiol.* 4(12):799-808.
- Nnamchi, C.I., J.A.N., Obeta, L.I., Ezeogu. 2006. Isolation and characterization of some poly aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 3(2): 181-190.
- Oboh, B.O., et al. 2006. Hydrocarbon Degrading Potentials of Bacteria Isolated from a Nigerian Bitumen (Tarsand) Deposit. *Nat. Sci.* 4(3): 51-57.
- Okoh, A.I. 2003. Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 2(5): 104-108.
- Olo-Artiova, O.A., M.O., Aremu, A.O., Alade. 2007. Ex-situ bioremediation of diesel polluted wastewater in tropical hot climate. *Asian J. of Inform. Tech.* 6(9): 961-963.
- Sanghvi, S. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination using *Mycobacterium vanbaalenii*. *Biothechnol. J.* 1: 654-661.
- Seo, J.S., Y.S., Keum, and Q.X., Li. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 6: 278- 309.

Poeton, T.S., H.D., Stensel, and S.E., Strand. 1999. Biodegradation of poly aromatic hydrocarbons by marine bacteria: effect of solid phase on degradation kinetics. Elsevier Science Ltd. 33(3): 868-880.

Taoufik, J., et al. 2004. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*) in fluidized bed bioreactor. Ann. Microbiol. 54 (2): 189-200.

Tekorienè, R. 2008. Distribution of the genus *Pseudomonas* bacteria in oil-polluted soil, water, polymeric materials, plant remnants and food products. Ekol. 54(3): 143-148.

Thavasi, R., et al. 2007. Plasmid incidence in four species of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from oil polluted marine environment. Biotechnol. 6(3): 349-352.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem. 73, 1163-1172