مجلهٔ محیط شناسی ،سال سی و پنجم، شمارهٔ ۵۱ پاییز ۸۸، صفحهٔ ۱-۱۰

تجزیهٔ بیولوژیکی نفت خام به‌وسیلهٔ دو سویه *مایکوباکتریوم* جدا شده از خلیج فارس

چکیده

میزان مصرف نفت خام به‌وسیلهٔ دو سویه باکتریایی نفت‌خوار تولیدکنندهٔ بیوسورفاکتانت PG01 و PG02، جدا شده از رسوبات خلیج فارس، در غلظت‌های مختلف ازت و فسفات معدنی و دماهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین غلظت‌های بهینه ازت و فسفات و دمای بهینه تجزیهٔ نفت خام، باکتری‌ها در محیط پایه معدنی که به آن به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، نفت خام به میزان ۱۰ گرم در لیتر اضافه شده بود، و با غلظت‌های مختلف کلرید آمونیوم (منبع ازت) و دی-سدیم فسفات(منبع فسفات)کشت داده شدند. میزان پروتئین کل تولید شده، به عنوان شاخص مصرف نفت، نشان داد که حداقل غلظت‌های بهینه ازت و فسفات برای تجزیه یک گرم نفت خام توسط سویه PG01 به ترتیب معادل ۰/۱۴۶ گرم کلرید آمونیوم و ۰/۰۲۴ گرم دی- سدیم فسفات و برای سویه PG02 معادل ۰/۱۹۵ گرم کلرید آمونیوم و ۰/۰۲۴ گرم دی-سدیم‌فسفات بود. دمای بهینه برای هر دو سویه ۳۵ درجه سانتیگراد بود. تست وزن سنجی نشان داد که اجزای اشباع شده، آروماتیک، رزین و آسفالتن نفت خام مورد استفاده به ترتیب ۷۰/۹۰، ۲۲/۳۱، ۳/۹۹ و ۲/۸۰ درصد را تشکیل می‌دهند، و مقادیر باقیمانده این اجزای پس از رشد ۵ روزه باکتری PG01، به ترتیب ۱۲/۵۶، ۱۰/۷۱، ۳/۰۳ و ۲/۸۹ درصد و در مورد باکتری PG02، به ترتیب ۴/۷۰، ۶/۳۲، ۲/۰۹ و ۲/۹۵ درصد بود. زمانی‌که مخلوط دو باکتری همزمان تلقیح شدند این مقادیر به ترتیب ۲/۳۲، ۴/۹۷، ۱۳/۲ و ۲/۹۷ به‌دست آمد. سویه‌های PG01، PG02 و مخلوط این دو باکتری، طی این دورهٔ ۵ روزه در مجموع به ترتیب ۷۰/۸۱، ۸۳/۹۴ و ۸۷/۶۱ درصد نفت خام موجود را مینرالیزه کردند. نتایج تست‌های مرفولوژی، فیزیولوژی و تعیین درصد مولی گوانین+ سیتوزین DNA نشان داد که هر دو سویه بیشترین شباهت را به گونه Mycobacterium obuense دارا هستند.

کلید واژه

نفت خام ، باکتری نفت‌خوار ، خلیج فارس ، تجزیه بیولوژیکی

سرآغاز

در فعالیت‌های مرتبط با نفت خام مانند اکتشاف، استخراج، حمل‌ونقل و پالایش نفت، مقادیر زیادی از پساب‌های روغنی تولید می‌شود. پساب‌های روغنی تهدیدی بسیار جدّی برای محیط‌های دریایی و بویژه مناطق ساحلی به حساب می‌آیند.

روش‌های فیزیکوشیمیایی مقابله با این آلودگی‌ها، نظیر جمع‌آوری مواد روغنی بوسیله لوله‌های لاستیکی شناور، یا جذب آنها به مواد طبیعی و سنتزی، هرچند در کاهش تأثیرات سوء ترکیبات نفتی بر اکوسیستم‌ها سود بخشند، ولی قادر به حذف کامل ترکیبات نفتی از محیط نیستند. در حال حاضر تجزیهٔ زیستی آلاینده‌های نفتی بعنوان یکی از کارامدترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌های رفع آلودگی‌های، نفتی از محیط به حساب می‌آید (Antić, et al., 2006) Atlas and Bartha 1998؛ Harayama, et al., 2004 و Martínková, et al. ,2009).

منطقهٔ خلیج فارس، که حدود ۵۷٪ تا۶۰ ٪ از ذخایر شناخته شدهٔ نفت خام جهان را به خود اختصاص داده است، در معرض آلودگی‌های

نویسنده مسئول:تلفن: ۰۹۱۲۳۷۱۲۷۵۴ E-mail: a_abolhasani@sbu.ac.ir

نگران‌کننده نفتی بوده و مطالعات همه جانبه برای مقابله با این آلودگی‌ها بسیار ضروری است (Nadim, et al., 2008 و Tolosa, et al., 2005). بررسی تأثیر عوامل محیطی، بویژه نقش pH، دما و غلظت مواد ازت و فسفات معدنی بر کارکرد باکتری‌های تجزیه کنندهٔ نفت، از موضوعات حایز اهمیتی است که مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است (Harayama, et al., 1999,Östberg, et al. 2007)، لیکن پژوهش کامل در مورد سویه‌های باکتری‌های نفت‌خوار بومی هر منطقه از اهمیت بسزایی برخوردار است.

در پژوهش قبلی جداسازی دو سویه باکتریایی نفت‌خوار تولید کنندهٔ بیوسورفاکتانت از رسوبات دریایی سواحل قشم در خلیج فارس و تأثیر فاکتور pH در تجزیهٔ نفت خام به‌وسیله باکتری‌ها گزارش شده است (ابراهیمی‌پور و ابوالحسنی سورکی، ۱۳۸۳). در این پژوهش، تأثیر عوامل دما، غلظت ازت و فسفات معدنی در تجزیهٔ نفت به‌وسیله دو سویه باکتریایی مذکور، بررسی شد و با انجام آزمایش وزن‌سنجی، میزان تجزیه اجزای مختلف نفت به‌وسیلهٔ ایزوله‌ها اندازه‌گیری شد.

همچنین برای شناسایی ایزوله‌ها تست‌های مرفولوژیکی و بیوشیمیایی و تعیین درصد مولی گوانین + سیتوزین DNA، انجام گرفت.

مواد و روش بررسی

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

سویه‌های باکتریایی PG01 و PG02، که در این مطالعه استفاده شدند، قبلاً از رسوبات و آب دریا در سواحل جزیره قشم جداسازی شده بودند (ابراهیمی‌پور و ابوالحسنی سورکی، ۱۳۸۳). ویال‌های فریز شده باکتری‌ها، پس از ذوب شدن، بر روی پلیت‌های تریپتیکاز سوی آگار، که به آن ۳۲ گرم در لیتر NaCl و ۱۴ گرم در لیتر $MgSO_4, 7H_2O$ اضافه شده بود، کشت داده شده و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. از کشت ۷۲ ساعته جهت تلقیح در آزمایش‌های تجزیهٔ نفت استفاده شد.

در آزمایش‌های تجزیه بیولوژیکی نفت، از محیط پایه معدنی استفاده شد (ابراهیمی‌پور و ابوالحسنی سورکی، ۱۳۸۳). نفت خام مورد استفاده در این مطالعه از شرکت ملی نفت ایران تهیه شد.

تعیین مقادیر بهینه منابع ازت و فسفات جهت تجزیهٔ بیولوژ یکی نفت خام

برای تعیین مقادیر بهینهٔ ازت و فسفات جهت تجزیه نفت به‌وسیلهٔ سویه‌های PG01 و PG02، از ارلن‌های شیاردار ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ ml محیط پایه معدنی استفاده شد، با این تفاوت که غلظت‌های ازت استفاده شده شامل ۰/۰۴۹، ۰/۰۹۷، ۰/۱۴۶، ۰/۱۹۵ و ۰/۲۴۴ گرم NH_4Cl و برای فسفات ۰/۰۰۶، ۰/۰۱۲، ۰/۰۱۸، ۰/۰۲۴ و ۰/۰۳۰ گرم Na_2HPO_4 به ازای هر گرم نفت خام بود. ارلن‌ها سپس با ۱ میلی‌لیتر باکتری‌های استاندارد شده تلقیح (حدود 10^7 باکتری در میلی‌لیتر) و ۱ گرم نفت خام استریل اضافه شد.

ارلن‌ها در دمای ۳۵°C بر روی شیکر انکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند و روزانه غلظت پروتئین کل به منزلهٔ شاخصی از رشد و مصرف نفت اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها در چهار تکرار انجام شد.

تعیین دمای بهینهٔ تجزیه بیولوژیکی نفت خام

به منظور تعیین دمای بهینه رشد بر روی نفت خام، سویه‌ها در ارلن‌های شیاردار حاوی ۱۰۰ ml محیط پایهٔ معدنی، کشت داده شدند. ارلن‌ها پس از تلقیح باکتری (حدود 10^7 باکتری در میلی لیتر) و ۱ گرم افزودن نفت خام استریل، در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷ و ۴۱ درجه سانتیگراد بر روی شیکر انکوباتور (۱۵۰ rpm) گرماگذاری شدند و روزانه به منظور تعیین پروتئین کل، نمونه‌گیری صورت گرفت. آزمایش‌ها در چهار تکرار انجام شد.

اندازه گیری پروتئین

میزان پروتئین کل سنتز شده، به منزلهٔ شاخص دقیقی از مصرف نفت به‌وسیلهٔ باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت در داخل لوله اپندورف در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب سلولی توسط محلول استریل ۴٪ NaCl شست‌وشو داده شد و مجدداً در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. به رسوب سلولی حاصل ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از به‌هم‌زدن، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH اضافه شد و مخلوط شد.

لوله‌ها سپس به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند. اندازه‌گیری پروتئین به روش لاری صورت گرفت و از آلبومین سرم خون گاو (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد (Sueszmuth, et al., 1987).

تست وزن سنجی اجزای تشکیل دهندهٔ نفت خام

به منظور تعیین نوع و میزان اجزای نفت خام که توسط باکتری‌ها مصرف (مینرالیزه) شده‌اند، از تست وزن سنجی به روش Thouand و همکاران (1999) استفاده شد. برای این منظور هر دو سویه در محیط پایه معدنی و ۱ گرم نفت خام به‌منزلهٔ یگانه منبع کربن، با در نظر

گرفتن مقادیر بهینه pH، دما و غلظت‌های ازت و فسفر معدنی، در چهار تکرار کشت داده شدند و به مدت ۵ روز گرماگذاری در ۳۵ درجهٔ سانتیگراد بر روی شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه صورت گرفت.

تمام حجم ارلن‌های تست‌های تجزیهٔ زیستی توسط کلروفرم عصاره گیری شد (۳ × ۲۰ میلی لیتر). بخش آلی محلول در کلروفرم توسط سولفات سدیم آبگیری و سپس فیلتر شد و به‌وسیلهٔ تبخیر در خلأ تغلیظ شد (دما از ۴۰ درجه سانتیگراد تجاوز نکرد تا بخش سبک نفت خام از دست نرود). عصارهٔ حاصل توسط n–هگزان به دو بخش محلول در n–هگزان (شامل هیدروکربن‌های اشباع شده، هیدروکربن‌های آروماتیک، و رزین‌ها) و غیر محلول در n –هگزان (تشکیل شده از بخش آسفالتن و همچنین ترکیبات قطبی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها) تفکیک شد. بخش غیر محلول در n–هگزان به‌عنوان جزء آسفالتن جدا شده و پس از تبخیر n–هگزان، وزن شد. بخش محلول در n–هگزان تغلیظ شد پس از وزن‌کردن، در ۲۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم حل و ۷ گرم سیلیکاژل G-60 (مرک) به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه به هم زده شد و سپس کلروفرم تبخیر شد تا سیلیکاژل آغشته به نفت، خشک شود. این سیلیکاژل برای ساختن یک ستون کروماتوگرافی (با قطر ۰/۵ سانتیمتر) استفاده شد. ستون حاصل به‌ترتیب با سه حجم ۲۰ میلی‌لیتر از سیکلوهگزان، بنزن، و متانول شسته شد. سه جزء به‌دست آمده پس از تبخیر حلال، وزن شدند که به‌صورت زیر نامگذاری شدند: جزء S استخراج شده با سیکلوهگزان شامل هیدروکربن‌های اشباع شده، جزء A استخراج شده با بنزن شامل هیدروکربن‌های آروماتیک، و جزء R استخراج شده با متانول شامل رزین‌ها (Thouand, et al.,1999).

تست‌های شناسایی ایزوله‌ها

برای شناسایی سویه‌های باکتریایی جداسازی‌شده، تست‌های مرفولوژیکی و بیوشیمیایی شامل مرفولوژی کلنی، مرفولوژی سلولی، ابعاد سلولی، تحرک، رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، تست اکسیداتیو– فرمنتاتیو (OF) گلوکز، تاژک، کپسول، اندوسپور، نیتریفیکاسیون، احیای نیترات به نیتریت، دنیتریفیکاسیون، رشد در شرایط بی‌هوازی، هالوفیلیته و دامنهٔ دمایی قابل رشد انجام گرفت (Sueszmuth, et al. 1987).

تعیین درصد مولی گوانین– سیتوزین با استفاده از HPLC

به‌منظور شناسایی دقیق باکتری‌های PG01 و PG02، علاوه بر روش‌های مرفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی، درصد مولی گوانین– سیتوزین DNAی کروموزومی (mol% G + C) نیز تعیین شد. استخراج DNA به روش رسوب‌دهی با ایزوپروپانول سرد صورت گرفت (Kowalchuk, et al., 2004). برای دستیابی به خلوص بالاتر DNA ، آنزیم پروتئیناز K با غلظت ۰/۲ mg/ml اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C و ۱۰۰ rpm انکوبه شد و مراحل رسوب‌دهی تکرار شد. برای پی بردن به میزان خلوص مولکول استخراج شده، میزان جذب نوری نمونه‌ها به‌وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت DNA در نمونه نیز با تقسیم مقدار جذب نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر عدد ۰/۰۲، با واحد میکروگرم بر میلی‌لیتر، محاسبه شد. درصد مولی گوانین + سیتوزین ژنوم سویه‌ها، به روش (Tamaoka, & Komagata, 1984) با اندکی تغییرات تعیین شد. برای این منظور نمونه DNA توسط نوکلئاز P1 به نوکلئوتید منوفسفات‌ها شکسته شده و سپس با استفاده از دستگاه HPLC (High-performance liquid chromatography) درصد مولی گوانوزین + سیتوزین اندازه‌گیری شد. Kaneko و همکاران (1986) گزارش کردند که فعالیت آنزیم نوکلئاز P1 برای DNA تک‌رشته‌ای ۳۰۰ تا ۳۵۰۰ بار نسبت به دو رشته‌ای بیشتر است. بنابراین نمونه‌های DNA، که در آب مقطر حل شده بود (۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند و سپس به‌سرعت در حمام آب یخ قرار گرفتند (۱۰ دقیقه). این عمل سه بار تکرار شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DNA دناتوره شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم نوکلئاز P1 (۲ واحد آنزیم در ۱ میلی‌لیتر محلول ۱۰ میلی‌مولار بافر استات (pH ۵/۳) حاوی ۰/۲ میلی‌مولار $ZnCl_2$) مخلوط و در دمای ۵۰°C به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. نمونه‌های فوق به همراه نمونه استاندارد که شامل مخلوط هم‌مولار dCMP، dAMP، dGMP، و dTMP بود به‌منظور تزریق به HPLC مورد استفاده قرار گرفت. شرایط HPLC به شرح زیر بود:

Column:	C18, MCH 10
Mobile phase:	10 mM phosphate buffer (pH 7)
Flow rate:	0.5 ml/min
Detector:	UV 260 nm

مقدار درصد مولی گوانین + سیتوزین (G+C mol%) از رابطهٔ زیر محاسبه شد که در آن AS، GS، CS و TS به ترتیب سطح زیر پیک dAMP، dGMP، dCMP، و dTMP در نمونهٔ استاندارد و AX، GX، CX و TX به ترتیب سطح زیر پیک بازهای مربوط در نمونهٔ مجهول است (Tamaoka & Komagata, 1984):

G+C mol% = (GX/GS + CX/CS)/(AX/AS + GX/GS + CX/CS + TX/TS)

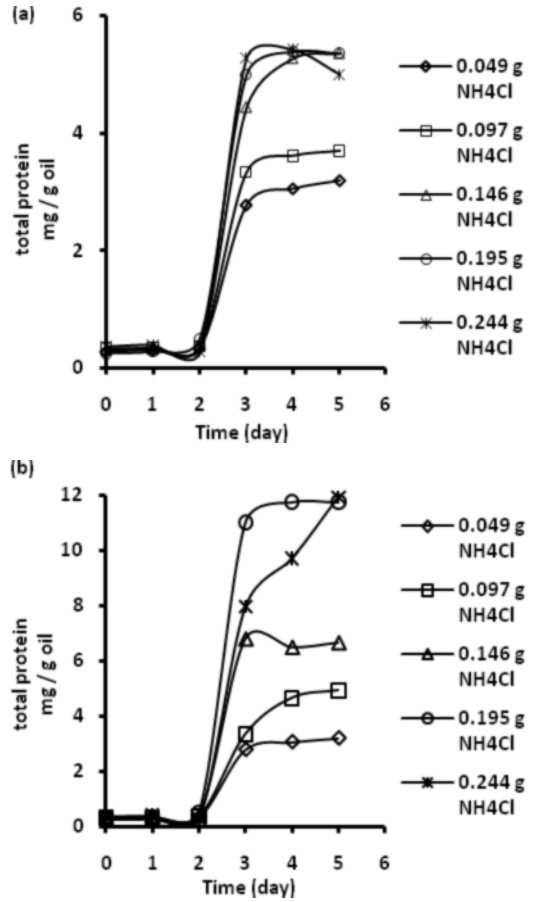
آنالیزهای آماری

به منظور انجام آنالیزهای آماری، از نرم‌افزارهای SPSS 11 و MS Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

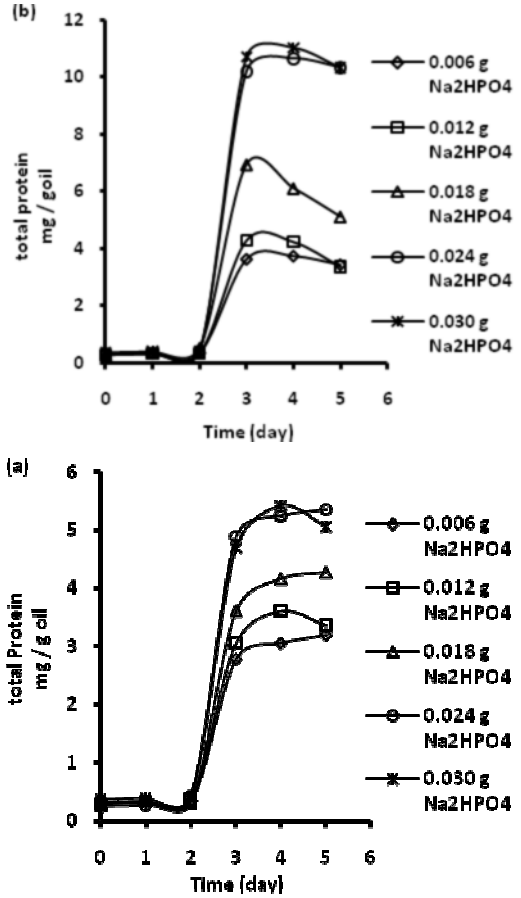
تعیین مقادیر بهینۀ منابع ازت و فسفات جهت تجزیۀ بیولوژیکی نفت خام

بررسی تأثیر عوامل ازت و فسفات بر تجزیۀ نفت خام توسط سویه‌های باکتریایی PG01 و PG02، به منظور یافتن حداقل غلظت مکمل‌های ازته و فسفاته که با آن بالاترین میزان فعالیت تجزیه‌کنندگی باکتری‌های مورد نظر حاصل شود، صورت گرفت. شکل شمارۀ (۱) میانگین نتایج تأثیر مقادیر مختلف ازت را بر رشد و تجزیه نفت خام نشان می‌دهد.



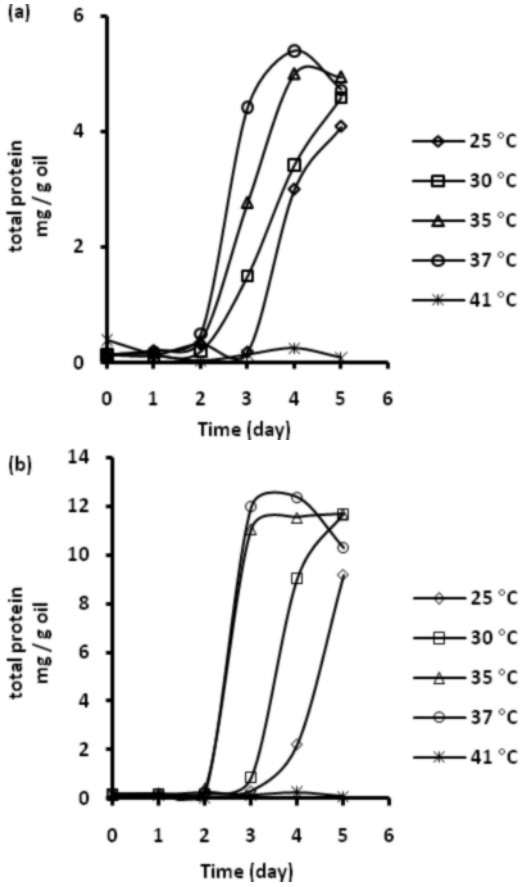
شکل شمارۀ (۱): بهینه‌سازی مقدار منبع ازت در تجزیه بیولوژیکی نفت خام توسط سویه‌های PG01 (a) و PG02 (b)

در تمام آزمایش‌ها، هر دو سویه در روز دوم رشد وارد فاز لگاریتمی شدند و این روند تا روز سوم ادامه یافت، ولی میزان مصرف نفت خام موجود و در نتیجه تولید پروتئین توسط باکتری‌ها در شرایط مختلف، متفاوت بود. باکتری نامبرده در حضور ۰/۱۴۶، ۰/۱۹۵ و ۰/۲۴۴ گرم NH_4Cl به‌طور مشابهی قادر به رشد بود و اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p< ۰/۰۵$)، ولی در مقادیر ۰/۰۴۹ و ۰/۰۹۷ گرم NH_4Cl رشد کمتری مشاهده شد. از این‌رو حداقل مقدار بهینۀ ازت لازم برای تجزیۀ ۱ گرم نفت خام توسط سویه PG01، معادل ۰/۱۴۶ گرم NH_4Cl انتخاب شد (شکل a –۱). در مورد سویۀ PG02 مقدار بهینۀ ازت، ۰/۱۹۵ گرم NH_4Cl به ازای یک گرم نفت خام بود (شکل b–۱) و آنالیز آماری نشان داد که در بقیۀ موارد یعنی غلظت بالاتر (۰/۲۴۴ گرم NH_4Cl) و غلظت‌های پایین‌تر، رشد کمتری حاصل شده است ($p<۰/۰۵$).



شکل شمارۀ (۲): بهینه‌سازی مقدار منبع فسفات در تجزیه بیولوژیکی نفت خام توسط سویه‌های PG01 (a) و PG02 (b)

حداقل مقدار بهینهٔ فسفات برای مصرف ۱ گرم نفت خام در مورد هردو سویه، معادل ۰/۰۲۴ گرم Na_2HPO_4 بود (شکل ۲–a,b). در غلظت‌های دیگر استفاده شده نیز رشد صورت گرفت، ولی در غلظت‌های پایین‌تر رشد کمتری حاصل شد و در غلظت بالاتر یعنی ۰/۰۳۰ گرم نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و رشد مشابه ۰/۰۲۴ گرم Na_2HPO_4 بود ($p< /۰۵$) و چون حداقل مقدار فسفات لازم برای تجزیه نفت خام موجود مورد نظر بود، غلظت ۰/۰۲۴ گرم Na_2HPO_4 به منزلهٔ غلظت بهینهٔ منبع فسفات برای تجزیهٔ ۱ گرم نفت خام انتخاب شد.



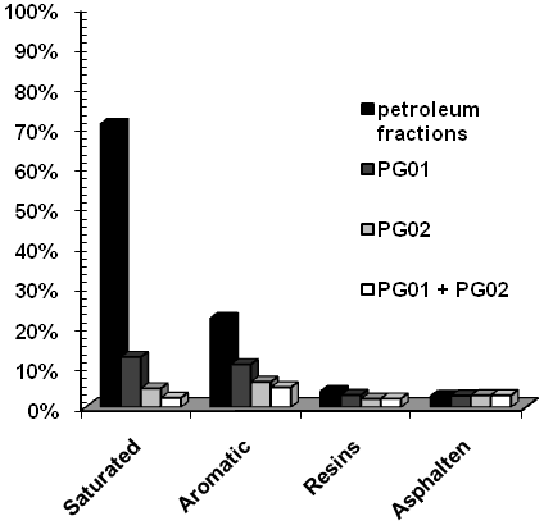
شکل شمارهٔ (۳): بهینه‌سازی مشخصه دما در تجزیهٔ بیولوژیکی نفت خام توسط سویه‌های PG01 (a) و PG02 (b)

تعیین دمای بهینهٔ تجزیهٔ بیولوژیکی نفت خام

در بررسی صورت گرفته به منظور تعیین دمای بهینهٔ تجزیهٔ نفت به‌وسیلهٔ ایزوله‌ها نتایج به‌دست آمده نشان داد که هر دو سویه در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد بیشترین فعالیت را دارا بودند. شکل‌های شمارهٔ (۳) نتایج حاصل را در مورد سویه‌های PG01 و PG02 نشان می‌دهد. سویه‌های نامبرده در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد، قادر به رشد و تجزیه نفت بودند که در دمای ۳۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد رشد بهتری صورت گرفت. اختلاف معنی‌داری بین ۳۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده نشد، بنابراین دمای بهینه برای تجزیهٔ نفت ۳۵ درجه سانتیگراد انتخاب شد. در دمای ۴۱ $\mathring{C}$ باکتری‌ها قادر به رشد نبوده و تغییری در شاخص‌های اندازه‌گیری شده مشاهده نشد.

تست وزن سنجی اجزای تشکیل دهندهٔ نفت خام

به‌دلیل این‌که نسبت اجزای تشکیل دهندهٔ نفت خام بنا به نوع نفت متفاوت است، از تست وزن‌سنجی به منظور تفکیک اجزای نفت خام مورد استفاده و بررسی میزان کاهش در این اجزا، پس از انجام تست تجزیهٔ زیستی، استفاده شد که شکل شمارهٔ (۴) نتایج این تست را نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، اجزای اشباع شده، آروماتیک، رزین و آسفالتن به ترتیب ۷۰/۹۰، ۲۲/۳۱، ۳/۹۹ و ۲/۸۰ درصد نفت خام مورد استفاده را تشکیل می‌دهند، که مقادیر باقیمانده این اجزا پس از رشد ۵ روزه باکتری PG01، به ترتیب ۱۲/۵۶، ۱۰/۷۱، ۳/۰۳ و ۲/۸۹ درصد و در مورد باکتری PG02، به ترتیب ۴/۷۰، ۶/۳۲، ۲/۰۹ و ۲/۹۵ درصد است. زمانی‌که مخلوط دو باکتری همزمان تلقیح شدند این مقادیر به‌ترتیب ۲/۳۲، ۴/۹۷، ۱۳/۲ و ۲/۹۷ به‌دست آمد. سویه‌های PG01، PG02 و مخلوط این دو باکتری، طی این دوره ۵ روزه در مجموع به ترتیب ۷۰/۸۱، ۸۳/۹۴ و ۸۷/۶۱ درصد نفت خام موجود را مینرالیزه کردند.



شکل شمارهٔ (۴): میانگین اجزای تشکیل دهندهٔ نفت خام مورد استفاده و مقادیر اجزای باقیماندهٔ نفت خام پس از دورهٔ رشد ۵ روزه PG01 و PG02 و مخلوط دو سویه

تست‌های شناسایی ایزوله‌ها

نتایج تست‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

نتایج تست‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه‌های PG01 و PG02 در جدول شمارهٔ (۱) نشان داده شده است. باکتری PG01 ایجاد کلنی‌هایی دایره‌ای محدب، با حاشیه صاف، اتصال سست به سطح آگار، به رنگ نارنجی و با قطر ۱ تا ۲ میلیمتر می‌کند. کلنی‌های سویه PG02 مشابه سویه PG01 بوده ولی رنگ آن به قرمز متمایل است. هر دو سویه PG01 و PG02، میله‌ای کوتاه با ابعاد به ترتیب ۱/۲×۰/۷–۰/۵ و ۱/۵×۰/۵ میکرومتر، گرم مثبت، هوازی اجباری، متحرک و مارین هستند. کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بوده و تولید اسید و گاز از قند گلوکز مشاهده نشد. باکتری‌ها مزوفیل بوده و قادر به رشد در دمای آزمایشگاه، ۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد هستند، ولی در ۴ و ۴۱ درجه سانتیگراد رشد مشاهده نشد. سویه‌های نامبرده مارین بوده و در محیط فاقد سولفات منیزیوم رشد مشاهده نشد.

تعیین درصد مولی گوانین + سیتوزین DNA

پس از انجام مراحل خالص‌سازی، OD نمونه DNA به‌دست آمده از سویهٔ PG01 (با رقت ۱:۱۰) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، به‌ترتیب برابر ۱/۳۵۴ و ۰/۷۸۳ به‌دست آمد. نسبت ۲۶۰/۲۸۰ nm در این نمونه ۱/۷۳ شد که حاکی از خلوص DNA مورد آزمایش است و غلظت DNA در این نمونه با احتساب ضریب رقت، ۶۷۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

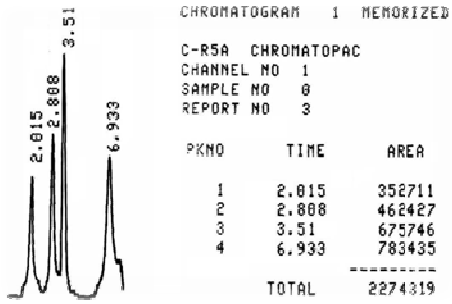
میزان جذب نمونه DNA در مورد سویه PG02 (با رقت ۱:۱۰) در طول موج‌های نامبرده، بترتیب ۱/۱۳۷ و ۰/۶۷۷ به‌دست آمد. نسبت مذکور معادل ۱/۶۸ به‌دست می‌آید که مبین خلوص لازم است. غلظت DNA در این نمونه نیز با احتساب ضریب رقت، ۵۶۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

نسبت جذب نمونه در طول موج ۲۶۰ به جذب در ۲۸۰ نانومتر، برای پی بردن به میزان خلوص مولکول DNA دو زنجیره‌ای از پروتئین استفاده می‌شود و این نسبت در حالت خالص بودن مولکول DNA می‌باید بین ۱/۶۵ تا ۱/۸۵ باشد (Sueszmuth, et al., 1987). شکل شمارهٔ (۵) طیف‌های به‌دست آمده را به همراه سطح زیر پیک[1] در نمونه استاندارد و نمونه‌های شاهد و باکتری‌ها نشان می‌دهد. نمونه استاندارد، مخلوط هم‌مولار ۴ دئوکسی نوکلئوتید منوفسفات بود ولی زمان خروج هریک از آنها با تزریق جداگانه هرکدام، قبلاً مشخص شده بود، که به‌ترتیب پیک‌های دقیقه ۲/۰۱۵، ۲/۸۰۸، ۳/۵۱ و ۶/۹۳۳ متعلق به dCMP، dTMP، dGMP و dAMP هستند (شکل شمارهٔ a–۵).

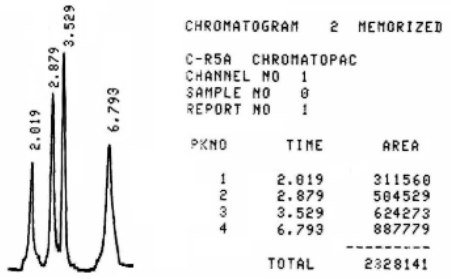
جدول شمارهٔ (۱): بررسی خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه‌های PG01 و PG02

خصوصیات	PG01	PG02
شکل سلول باکتری	میله ای کوتاه	میله ای کوتاه، کمی خمیده
ابعاد سلولی (µm)	۱/۲×۰/۷–۰/۵	۱/۵×۰/۴
رنگ آمیزی گرم	+	+
کاتالاز	+	+
اکسیداز	–	–
اوره آز	–	–
تولید اسید از گلوکز (OF)	–	–
تولید اسید از آرابینوز (OF)	–	–
تولید اسید از زایلوز (OF)	–	–
رشد در شرایط بی هوازی	–	–
تحرک	–	–
تاژک	–	–
کپسول	–	–
اندوسپور	–	–
اسید فست	+	+
نیتریفیکاسیون	–	–
احیای نیترات به نیتریت	–	–
دنیتریفیکاسیون	–	–
هیدرولیز ژلاتین	–	–
هیدرولیز نشاسته	–	–
مارین (نیاز اجباری به غلظت بالای Mg^{2+} و NaCl)	+	+
رشد در حضور ۵٪ NaCl	+	+
رشد در دمای ۴۱ درجه سانتیگراد	–	–
تجزیه سوبستراهای آروماتیک چند حلقه‌ای	+	+
شکل کلنی*	دایره ای محدب با حاشیهٔ صاف	دایره‌ای محدب با حاشیهٔ صاف
رنگ کلنی*	نارنجی	نارنجی قرمز
قطر کلنی*	۱–۰/۵ میلیمتر	۲–۱ میلیمتر

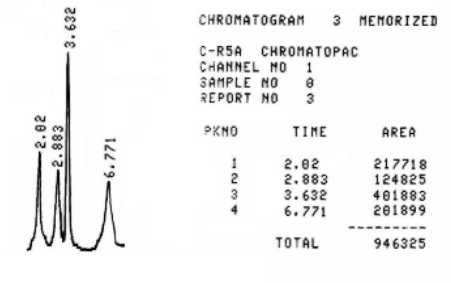
* پس از رشد سه‌روزه بر روی محیط پپتون– عصارهٔ مخمر– آگار



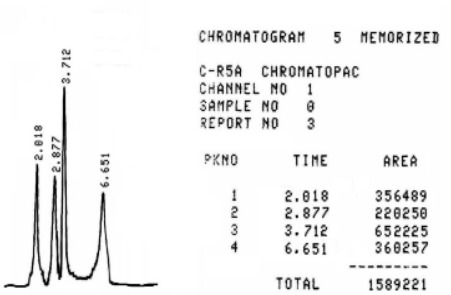
(a)



(b)



(c)



(d)

شکل شمارهٔ (۵): آنالیز HPLC. (a): نمونهٔ استاندارد، (b): نمونهٔ DNA ماهی آزاد، (c): نمونهٔ DNA سویهٔ PG01، و (d): نمونهٔ DNA سویهٔ PG02. پیک‌های شمارهٔ ۱، ۲، ۳ و ۴ به‌ترتیب مربوط به dCMP، TMP، dGMP و dAMP هستند.

این پیک‌ها در مورد نمونه‌های DNA مربوط به اسپرم ماهی آزاد، سویه PG01 و سویهٔ PG02 نیز با اندکی تغییر مشاهده می‌شوند (به‌ترتیب شکل‌های b-۵، c-۵ و d-۵). با استفاده از فرمول ارائه شده، درصد مولی گوانین + سیتوزین در سویهٔ PG01 ۶۹/۶۸۵، در سویهٔ PG02 ۶۷/۸۱۷ و در نمونه شاهد (DNA اسپرم ماهی آزاد) معادل ۴۴/۸ به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری

تخلیه هیدروکربن‌ها به محیط‌های آبی و خاکی که حاوی مقادیر ناچیزی از ازت و فسفات معدنی هستند، اغلب نسبت کربن به ازت و کربن به فسفر را بسیار بالا می‌برد که برای رشد میکروارگانیسم‌ها مناسب نیست.

به نظر می‌رسد که در دسترس بودن مواد مغذی بویژه ازت و فسفات، مهم‌ترین عامل محدودکننده در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در محیط‌های طبیعی است (Prince, 1993 و Van Hamme, et al. 2003).

بر اساس مطالعات گسترده دانشمندان، به وضوح مشخص شده است که میزان تجزیه زیستی نفت در محیط‌های دریایی به‌شدت به غلظت ازت و فسفات معدنی موجود در محیط بستگی دارد و در این رابطه افزودن کودهای ازتی و فسفاتی مناسب می‌تواند تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی توسط میکروارگانیسم‌ها را به میزان زیادی افزایش دهد (Atlas, & Bartha, 1998; Yakimov, et al.,2007). بر طبق گزارش گیبس، حداقل مقدار ازت و فسفات مورد نیاز برای تجزیه زیستی هر گرم نفت خام در دریا معادل ۰/۱۹۵ گرم NH_4Cl و ۰/۰۲۴ گرم Na_2HPO_4 بود (Gibbs, 1975).

با این وجود بررسی‌های دقیق در مورد باکتری‌های بومی هر منطقه ضروری به نظر می‌رسد و باعث افزایش راندمان کار و کاهش هزینه‌های اجرایی برای استفاده از باکتری‌ها در مقیاس صنعتی می‌شود.

در این تحقیق مقادیر بهینه فسفات برای هر دو سویهٔ مشابه میزان پیشنهاد شده توسط گیبس بود ولی مقادیر بهینه ازت برای سویه‌های PG01 و PG02 به ترتیب ۰/۱۴۶ و ۰/۱۹۵ به‌دست آمد. در بررسی تأثیر دما بر تجزیه ترکیبات نفتی توسط هر دو باکتری دمای بهینه ۳۵ درجه سانتیگراد تعیین شد که همان‌گونه‌که انتظار می‌رفت با شرایط دمایی آب خلیج فارس، کاملاً سازگار است.

دامنهٔ تغییرات سالانه دمای آب در ۲۱ منطقه در سواحل قشم بین ۱۵/۷ تا ۴۰ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد.

از آنجایی‌که سویه‌های جداسازی شده با این شرایط سازگار شده‌اند، بنابراین قادر به رشد در دماهای به خصوص بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد نیستند.

بنابراین با توجه به مطالب بالا، از نظر دما نیز از این باکتری‌ها می‌توان جهت رفع آلودگی‌های نفتی در خلیج فارس بخوبی استفاده کرد.

نتایج به‌دست آمده در تست وزن‌سنجی در مقایسه با نتایج به‌دست آمده توسط Thouand و همکارانش (1999)، که با استفاده از ۸ محصول صنعتی میکروبی حداکثر ۲۳/۲ درصد نفت خام را طی مدت ۸ روز مینرالیزه کرده بودند، نشان داد که سویه‌های PG01 و PG02 نفت خام را به میزان بسیار بالاتری مصرف کردند (جدول شمارهٔ ۲). به‌طوری‌که سویه‌های PG01 و PG02 نسبت به حداکثر مقدار به‌دست آمده توسط این محصولات صنعتی، به ترتیب ۴۷/۶۱ و ۶۰/۷۴ درصد بیشتر نفت خام را مینرالیزه کرده‌اند.

این نتایج احتمالاً به‌دلیل شرایط ویژهٔ اقلیمی خلیج فارس و هماهنگ شدن سویه‌های جداسازی شده به این شرایط است.

با مقایسه دو سویه PG01 و PG02 با یکدیگر، مشخص می‌شود سویه PG02 نفت خام را با کارآیی بالاتری تجزیه کرده است.

جدول شمارهٔ (۲): مقایسه تجزیه سوبسترای هیدروکربنی سویه‌های PG01 و PG02 با نتایج ارائه شده در تحقیقات دیگر

باکتری	سوبسترا	زمان رشد	درصد تجزیه سوبسترا	منبع
Mycobacterium sp. strain IFP 2173	گازوئیل	۲۸ روز	۸۶٪	Solano-Serena, et al., 2000
Natural Inocula	نفت خام	۲۸ روز	۲۳/۲٪	Thouand, et al., 1999
Commercial Inocula	نفت خام	۲۸ روز	٪۱۸	Thouand, et al., 1999
PG01	نفت خام	۵ روز	۷۰/۸۱٪	این تحقیق
PG02	نفت خام	۵ روز	۸۳/۹۴٪	این تحقیق
مخلوط دو باکتری	نفت خام	۵ روز	۸۷/۶۱٪	این تحقیق

با در نظر گرفتن خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تعیین درصد مولی G+C، هردو سویه PG01 و PG02 بیشترین شباهت را با جنس *Mycobacterium* دارند (Brenner, et al., 2005).

این تشابهات عبارتند از:

شکل سلول باکتری میله‌ای کمی خمیده؛ گرم مثبت ضعیف (براحتی با رنگ گرم رنگ آمیزی نمی‌شوند)؛

اسید فست در کشت تازه؛ دورهٔ رشد (زمان لازم برای ایجاد کلنی‌های قابل مشاهده) ۲–۳ روز؛

مقاومت به لیز شدن به‌وسیله لیزوزیم؛

غیر متحرک؛ هوازی و کاتالاز مثبت؛

بدون اسپور و کپسول؛ درصد مول G+C (۶۲ – ۷۰ درصد در جنس مایکوباکتریوم)،

کلنی‌های گرد و صاف با پیگمان نارنجی و نارنجی متمایل به قرمز (بترتیب در سویه‌های PG01 و PG02)؛ و مقاومت نسبت به پنی‌سیلین.

در سطح گونه نیز هر دو سویه از لحاظ رشد در حضور ٪۵ نمک (در جنس مایکوباکتریوم گونه‌های سریع- رشد در حضور ٪۵ کلرید سدیم رشد می‌کنند)، تجزیه سوبستراهای آروماتیک چندحلقه‌ای، ایجاد کلنی‌های رنگی، عدم رشد در ۴۲ درجه سانتیگراد (دمای اپتیمم ۲۷ تا ۳۷ درجه سانتیگراد)، منفی بودن احیای نیترات، عدم تولید اسید از آرابینوز و زایلوز به گونه *M. obuense* شباهت داشتند.

با این وجود شناسایی قطعی سویه‌ها مستلزم تعیین توالی ژن 16S rRNA است. به‌نظرمی‌رسد گونه‌هایی از جنس مایکوباکتریوم در حذف ترکیبات هیدروکربنی در محیط‌های طبیعی نقش مهمی را دارا باشند.

تشکر وقدردانی

از شرکت ملی نفت ایران به دلیل فراهم کردن نفت خام تشکر می‌شود.

یادداشت

1-Peak area

منابع مورد استفاده

ابراهیمی‌پور،غ. و ابوالحسنی‌سورکی،ع. ۱۳۸۳. جداسازی باکتری‌های نفت خوار تولیدکننده بیوسورفاکتانت از خلیج فارس و بررسی اثر pH بر مصرف نفت. مجلهٔ محیط‌شناسی، ۱۴:۳۴-۷.

Antić,M. and et al. 2006. Petroleum pollutant degradation by surface water microorganisms. Environ. Sci. Pollut. Res. Inter. 13:320-327.

Atlas,R.M. & N. Bartha .1998. Microbial Ecology: Fundamental and Applicatipons. (3rd Edition ed.). Addison Wesley Longman Publishers, Amsterdam.

Brenner,D., N.,Krieg & J.,Staley .2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition. Springer, New York.

Harayama,S., Y.,Kasai & A.,Hara .2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. Curr. Opin. Biotechnol. 15:205-214.

Harayama,S., and et al. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1:63-70.

Kaneko,T. and et al. ,1986. Determination of the nucleotide composition. J. Microbiol. Methods, 229-240.

Kowalchuk,G. and et al. 2004. Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.

Martínková,L. and et al. 2009. Biodegradation potential of the genus Rhodococcus. Environ. Int. 35:162–177.

Nadim,F. A.,Bagtzoglou & J.,Iranmahboob .2008. Coastal management in the Persian Gulf region within the framework of the ROPME programme of action. Ocean & Coastal Management, 51:556-565.

Östberg,T. and et al. 2007. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation, 60: 334–341.

Prince,R. 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 19:217-242.

Solano-Serena,F. and et al. 2000. A Mycobacterium Strain with Extended Capacities for Degradation of Gasoline Hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 66:2392-2399.

Sueszmuth,R. and et al. 1987. Biochemisch-mikrobiologisches praktikum. Georg Thieme Verlag, Germany.

Tamaoka,J. & K.,Komagata .1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high performance liquid chromatography. FEMS. Microbiol. Lett. 25:125-128.

Thouand, G. and et al. 1999. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. Can. J. Microbiol. 45:106-115.

Tolosa,I. and et al. 2005. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman. *Mar. Pollut. Bull.* 50:1619–1633.

Van Hamme,J., A.,Singh & O.,Ward .2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. Microbiol. Mol. Biol. Rev.67:503–549.

Yakimov,M., K.,Timmis & P.,Golyshin .2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. Curr. Opin. Biotechnol.18:257-266.