

بررسی تجزیه ترکیبات هیدروکربنی آلیفاتیک و آروماتیک توسط باکتری های بومی جداسازی شده از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی

- فرهاد گیلاوند^۱، غلامحسین ابراهیمی پور^۱، مریم کارخانه^۲، عبدالرزاق مرزبان^{۳*}
۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۹ : تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت حذف ترکیبات آلاینده هیدروکربنی در طبیعت، این مطالعه توسط دو سویه باکتری بومی که از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی جداسازی شده انجام گرفت.

مواد و روش ها: به منظور جداسازی باکتری های مورد نظر نمونه برداری از خاکهای آلوده به نفت در اطراف چاه های نفتی اهواز انجام شد. غربالگری باکتری های تجزیه کننده مواد هیدروکربنی با ۱ درصد نفت در محیط مایع پایه نمکی بعنوان تنها منبع کربن انجام شد. روش اندازه گیری رشد باکتری ها سنجش پروتئین کل بود. برای سنجش مصرف ترکیبات هیدروکربنی از روش اکسیداسیون کربن آلی با دی کرومات پتاسیم استفاده شد.

یافته ها: آزمایشات شناسایی نشان داد که باکتری ها متعلق به جنس *سودوموناس* و *پلانوکوکوس* هستند. نتایج آزمایشهای توان تجزیه کنندگی ترکیبات هیدروکربنی نشان داد که سویه های S1 و S2 به ترتیب ۳۲ و ۲۶/۱۵ درصد قطران، ۵۹/۶ و ۳۵/۳۳ درصد نفت خام و ۸۰/۸۶ و ۶۵/۶ درصد روغن زیتون را در مدت ۱۴ روز تجزیه کردند، در حالیکه در محیط کشت مخلوط از دو سویه حدود ۵ درصد کارایی تجزیه زیستی را افزایش یافت.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان دهنده توانایی بالای این باکتری های بومی در تجزیه آلاینده های نفتی بخصوص ترکیبات آروماتیک سمی بوده و می توان از آنها در جهت حذف آلاینده های نفتی دیر تجزیه شونده بهره گرفت.

کلمات کلیدی: آلاینده های هیدروکربنی، نفت خام، قطران، تجزیه زیستی

مقدمه

امروزه به دلیل پیشرفت های بشر در زمینه های مختلف نیاز به نفت و فرآورده های حاصل از نفت افزایش چشمگیری داشته است بطوریکه فعالیت هایی که در زمینه اکتشاف، حمل و نقل و فرآوری نفت صورت گرفته آسیب های جدی به محیط زیست وارد آورده است^۱. ورود مواد آلی هیدروکربنی نفتی به سبب سمیت و سرطان زایی آنها تهدید جدی برای حیات انسان و موجودات زنده محسوب می شود^۲. ترکیبات آلی هیدروکربنی به دو نوع آلیفاتیک (Aliphatic) و آروماتیک (Aromatic) تقسیم می شود. به طور کلی ترکیبات آلیفاتیک به آلکان های خطی و آروماتیک ها به آلکان های یک یا چند حلقه ای اطلاق می شود^۳. تحقیقات نشان داده است که اکثر ترکیبات آروماتیک سمیت، سرطانزایی و پایداری بالایی دارند^۴. مدت زمان تجزیه ترکیبات هیدروکربنی خطی در طبیعت نسبت به ترکیبات آروماتیک کوتاهتر است و همچنین سرعت تجزیه آروماتیک ها با افزایش حلقه کاهش می یابد^۵. ترتیب تجزیه پذیری مواد نفتی در طبیعت بدین صورت است که از ساده ترین شکل ترکیبات یعنی آلیفاتیک های ساده شروع شده و سپس آلیفاتیک های شاخه دار، آلکن ها، آروماتیک های با وزن مولکولی کم و در آخر آلکن های حلقوی از محیط حذف می شوند^{۶،۷}.

برای حذف آلاینده های نفتی از محیط های آبی و خشکی روش های مختلفی وجود دارد که پرکاربرد ترین روش استفاده از مواد شیمیایی به منظور رسوب دادن و یا جذب آنهاست^۸. بطور کلی روش های مبتنی بر استفاده از ترکیبات شیمیایی اگرچه سرعت عمل بالایی دارد اما به دلیل اینکه مواد شیمیایی که به محیط اضافه می شود خود نیز می تواند برای طبیعت مضراتی به همراه داشته باشد. روش دیگری که امروزه مورد توجه قرار گرفته است پاکسازی زیستی (Bioremediation)

آلاینده های هیدروکربنی با استفاده از میکروارگانیسم ها می باشد. این روش به خاطر اثرات مخرب زیست محیطی اندک و هزینه های ناچیزی که در مقایسه با سایر روش ها دارند تحت بررسی و مطالعه قرار دارند و پیشرفت های مطلوبی در این زمینه مشاهده شده است. میکروارگانیسم هایی که در فرآیند پاکسازی زیستی تحت بررسی قرار گرفته اند شامل قارچ ها و باکتری های مصرف کننده هیدروکربن های آروماتیک و آلیفاتیک نفتی می باشند^۹. این میکروارگانیسم ها بسیار متنوع بوده و طیف وسیعی از قارچ ها، آرکی باکترها و باکتری های گرم مثبت و منفی را شامل می شود^{۱۰-۱۲}. اگرچه در ایران نیز طرح های تحقیقاتی زیادی انجام شده است و گزارش های متعددی در رابطه با جداسازی میکروارگانیسم های تجزیه کننده نفت منتشر شده است، با این وجود هنوز مناطقی با میکروارگانیسم های بومی با توانایی بالا برای حذف آلاینده های محیطی وجود دارد که نیاز به مطالعه بیشتر و دقیق تری دارد^{۱۳-۱۶}. هدف از این تحقیق یافتن باکتری های تجزیه کننده مواد آلی هیدروکربنی از خاک و شناسایی آنها به منظور ارزیابی توانایی حذف ترکیبات سمی و پایدار نفتی بود.

مواد و روش ها

نمونه برداری از خاک های آلوده به مواد نفتی واقع در اطراف چاه های نفت اهواز صورت گرفت. نمونه ها در ظروف استریل بصورت نیمه باز به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور جداسازی باکتری ها ابتدا حدود ۱۰ گرم از خاک آلوده درون ارلن ۲۵۰ml ریخته شد. سپس ۱۰۰ml آب استریل به آن اضافه شد. آن گاه به مدت یک ساعت نمونه ها در دمای اتاق و دور ۱۰۰rpm تکان داده شدند. پس از اینکه خاک و سایر ذرات رسوب کرد، از سوپرناتانت رقت های مختلف شامل^۱ ۱۰ تا ۱۰^{-۱} تهیه شد و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر روی

کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (McFarland) در نمک ۰/۸٪ تهیه شد و آنگاه ۱ml از هر یک از نمونه ها به ارلن های جداگانه به صورت دو تکرار موازی تلقیح شد. یک ارلن هر ماده آلی بدون باکتری هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به مدت دو هفته با دور شیکر با دور ۱۰۰rpm در pH معادل ۸ در دمای ۳۴ درجه گرما گذاری شدند.

در مدت گرماگذاری به فواصل زمانی ۲ روز میزان رشد باکتری با استفاده از روش پروتئین سنجی به روش برادفورد بررسی گردید. بدین منظور ابتدا ۲ml از نمونه داخل را برداشته و داخل اپندورف ریخته، به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی را که حاوی کربن آلی و ترکیبات حاصل از متابولیسم آنهاست جهت اندازه گیری مقدار کربن باقی مانده در یک لوله آزمایش ریخته و به رسوب سلولی حاصل ۲ml آب مقطر اضافه و پس از به هم زدن ۱ml محلول سود ۰/۳. مولار اضافه و مخلوط شد. لوله ها در حمام آب گرم ۶۰°C به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد تا سلول ها کاملاً لیز شوند سپس رنگ آمیزی به روش برادفورد صورت گرفت. سنجش مقدار کل کربن آلی (Total organic carbon) بر اساس اکسیداسیون کربن آلی به انجام گرفت^{۱۸}. در این روش مایع بالایی بدست آمده از سانتریفوژ با دور ۸۰۰۰rpm که سلول های رسوب کرده برای پروتئین سنجی بکار گرفته شده برای اندازه گیری ترکیبات هیدروکربنی استفاده شد. بدین منظور به فواصل زمانی ۴۸ ساعت گرماگذاری ۲ml از مایع روئی را با ۵ml معرف اکسید کننده (پتاسیم دی کرومات و اسید سولفوریک غلیظ) مجاور کرده تا اینکه تمام کربن آلی موجود اکسید شود و مقدار دی کرومات مصرف نشده توسط یون فریک (بعنوان تیتروکننده) و معرف ۱۰۱- فنانترویلین (بعنوان شناساگر) تیترو شد. لازم به ذکر است که معرف اکسید کننده در ابتدا آبی سبز بوده که پس از مصرف تمامی دی کرومات به رنگ نارنجی تا قهوه ای در می آید. از این طریق مقدار دی کرومات پتاسیم مصرف شده برای

محیط نوترینت آگار به روش گسترده کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۴°C کلنی ها روی سطح آگار ظاهر شدند. جهت شناسایی کلنی های تجزیه کننده مواد آلی هیدروکربنی کلنی های خالص بطور جداگانه در محیطهای پایه نمکی (۱۰۰ml)، حاوی ۵۰۰ میلی گرم نفت خام و قطران به عنوان تنها منبع کربن جهت رشد باکتری ها با pH برابر ۸، درون ارلن های ۲۵۰ml تلقیح شدند و به مدت دو هفته در دمای ۳۴ درجه گرماگذاری شده، سپس با بررسی فاکتور تغییرات پروتئین کل که به عنوان شاخص رشد باکتری و مصرف مواد نفتی در نظر گرفته شد، نمونه های تجزیه کننده مواد آلی هیدروکربنی جداسازی شد.

شناسایی دو سویه انتخاب شده ابتدا به روش آزمایش های تشخیصی بیوشیمیایی با مراجعه به کتاب باکتریولوژی برگئی (1989) و آنالیز فیلوژنی قطعه rDNA ۱۶S انجام شد^{۱۷}. در این بررسی ابتدا DNA ژنومی استخراج شد سپس با پرایمر های ژن rDNA ۱۶S که شامل توالی های (۳'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG forward و (۵'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT Reverse بودند تکثیر ژن rDNA ۱۶S انجام شد و بعد از انجام الکتروفورز روی ژل، محصولات PCR از روی ژل بازیابی وخالص شده به روش اتوماتیک (SEQLAB, Germany) بر اساس Chain Termination Method به سفارش شرکت سیناژن (Tehran, Iran) تعیین توالی شد برای تعیین میزان قرابت با باکتریهای دیگر کاوش هایی در بانک های اطلاعاتی بانک ژنی انجام شد و با استفاده از BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) جستجوهای همولوژی به صورت گرفت.

برای مطالعه تجزیه مواد هیدروکربنی توسط نمونه های جداسازی شده، در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری ۱۰۰ml محیط پایه نمکی ریخته و پس از استریل کردن ۵۰۰ میلی گرم قطران، نفت خام و روغن خوراکی (زیتون) استریل شده به عنوان منبع کربن به ارلن ها اضافه شد، سپس از نمونه های خالص شده

نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت دو سویه تحت مطالعه بصورت نمودار حذف ترکیبات آلی و تولید پروتئین رسم شده است. همانگونه که در شکل ۱ الف مشاهده می شود رشد سودوموناس سویه S1 در طی زمان ۱۴ روز گرماگذاری از طریق تغییرات پروتئین کل نشان دهنده بیشترین رشد در حضور روغن زیتون بعنوان تنها منبع کربن برای رشد آن بوده است. این نکته در شکل ۱ ب که مقدار حذف ۳ ترکیب از محیط توسط سویه S1 بطور مشخص قابل مشاهده است، بطوریکه طی زمان کمتر از ۱۰ روز ۸۰ درصد از روغن زیتون را حذف نموده است و در رابطه با نفت خام و قطران کارایی باکتری S1 در حدود ۶۱/۳ و ۳۴ درصد از کل کربن آلی در دسترس باکتری بوده است.

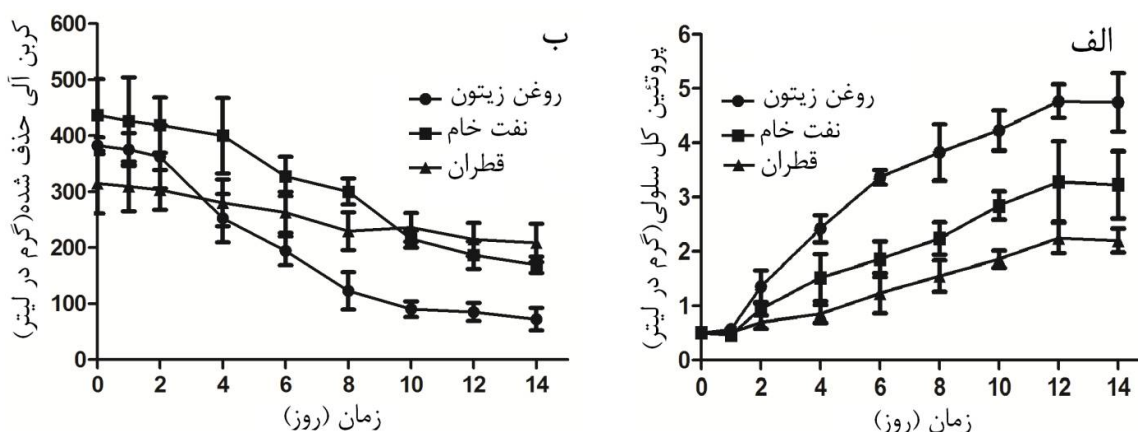
در مورد سویه S2 بیشترین رشد و تولید بیومس در حضور روغن زیتون بود که حدود ۶۸ درصد از آنرا طی مدت ۱۴ روز حذف نمود (شکل ۲ الف). در محیط های حاوی نفت خام بعنوان تنها منبع کربن در دسترس باکتری ها رشد هر دو سویه نسبت به روغن کمتر بود. همانگونه که در شکل ۲ ب مشاهده می شود سویه S2 حدود ۳۸/۸ درصد از هیدرو کربن های نفتی را حذف کردند.

اکسیداسیون کل کربن موجود از کم کردن مقدار کل دی کرومات از مقدار مصرف شده در مرحله تیتراسیون با یون فریک محاسبه شد. مقدار کربن آلی مصرف شده از تفاوت بین مقدار ماده آلی در مقایسه با ۴۸ ساعت قبل و با در نظر گرفتن شاهد بدون باکتری بدست آمد.

نتایج آزمایش ها از طریق آزمون تحلیل واریانس با مقایسه میانگین سه تکرار آنالیز شد و معنی دار بودن اثر منابع کربن بر تولید بیومس و اثر متقابل دو سویه بر روی یکدیگر سطح احتمال ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. پس از آن نمودارهای بدست آمده از آزمایش ها توسط نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ رسم شدند. در ضمن Error bar های رسم شده از انحراف معیار بین سه تکرار محاسبه شده است.

یافته‌ها

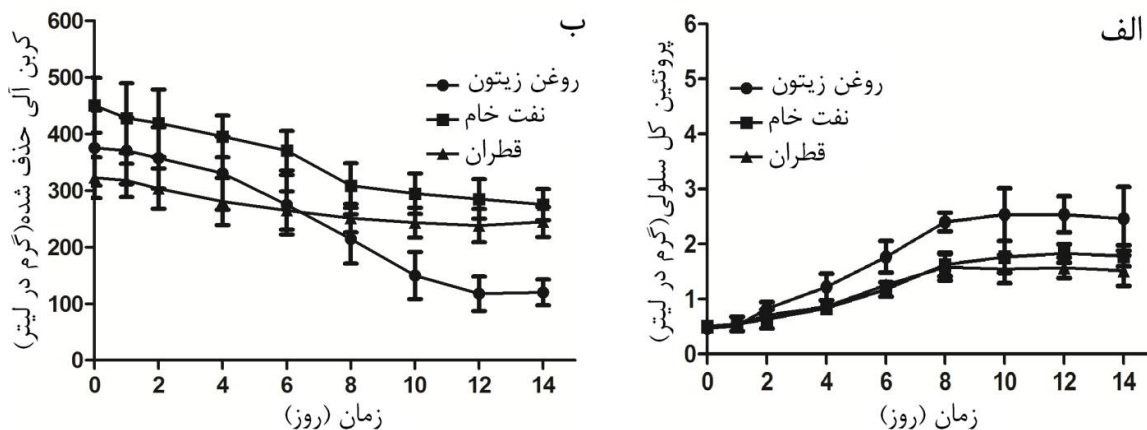
نتایج شناسایی هر دو سویه نشان دهنده شباهت S1 به سودوموناس آئروژینوزا و S2 به جنس پلانوکوکوس بود. آنالیز فیلوژنی قطعه ژن rDNA ۱۶S نیز قرابت سویه S1 را در حد ۹۹ درصد به سودوموناس آئروژینوزا سویه PBCC5 و S2 را با ۹۸ درصد شباهت به پلانوکوکوس سالیناروم سویه-ISL 16 تایید نمود.



شکل ۱: الف) مقدار بیومس بر حسب اندازه گیری پروتئین کل سلولی در حضور ۵۰۰ میلی گرم روغن، نفت خام و قطران بعنوان شاخص رشد باکتری S1 در

بررسی تجزیه ترکیبات هیدروکربنی آلیفاتیک و آروماتیک توسط باکتری های بومی جداسازی شده از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی

واحد زمان ب) کاهش کربن آلی کل (TOC) در واحد زمان بعنوان شاخص مصرف مواد هیدروکربنی روغن، نفت خام و قطران



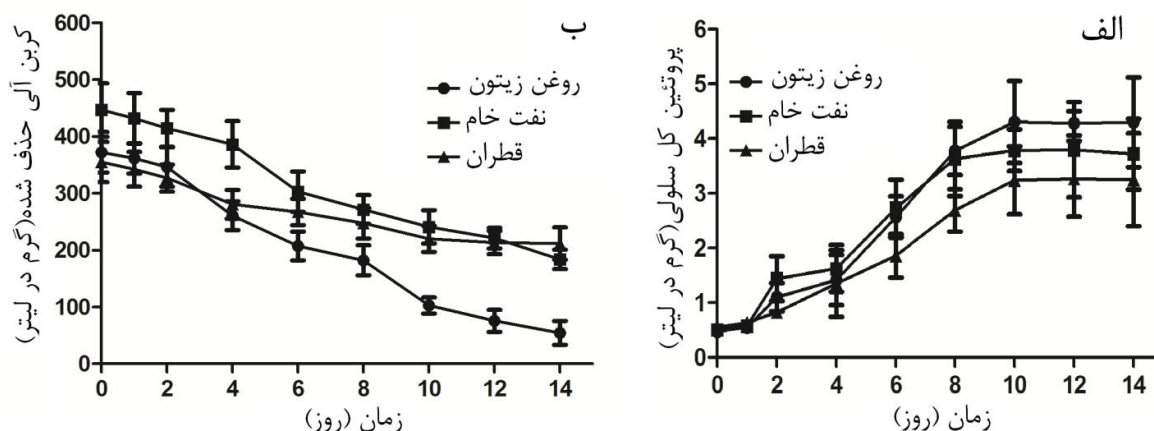
شکل ۲: مقدار بیومس بر حسب اندازه گیری پروتئین کل سلولی در حضور ۵۰۰ میلی گرم روغن، نفت خام و قطران بعنوان شاخص رشد باکتری S2 در واحد زمان ب) کاهش کربن آلی کل (TOC) در واحد زمان بعنوان شاخص مصرف مواد هیدروکربنی روغن، نفت خام و قطران

افزایش کارایی به میزان ۵ تا ۱۰ بود (شکل ۳).

شکل ۴ نشان دهنده کارایی باکتری ها در جهت حذف ترکیبات هیدروکربنی بر حسب درصد می باشد. همانطور که مشاهده می شود سویه S1 توانست روغن زیتون، نفت خام و قطران را به میزان ۸۰/۸۶، ۵۹/۶ و ۳۲ درصد در مدت زمان دو هفته حذف نماید.

همچنین در مورد تجزیه ترکیبات موجود در قطران کمترین مقدار رشد ۲۴/۲ درصد بدست آمد (شکل ۲ب).

رشد دو باکتری در حضور یکدیگر در محیط های دارای روغن همانند آزمایش های قبلی بود و همانطور که برای هر دو سویه بیشترین رشد در حضور روغن بدست آمد در این جا نیز به همین منوال بود. تنها تفاوتی که در این آزمایش دیده شد



شکل ۳: مقدار بیومس بر حسب اندازه گیری پروتئین کل سلولی در حضور ۵۰۰ میلی گرم روغن، نفت خام و قطران بعنوان شاخص رشد باکتری S1 و S2

فرهاد گیلاوند و همکاران

بصورت مخلوط در واحد زمان ب) کاهش کربن آلی کل (TOC) در واحد زمان بعنوان شاخص مصرف مواد هیدروکربنی روغن، نفت خام و قطران



شکل ۴: مقدار ماده آلی حذف شده بصورت درصد در حضور ۵۰۰ میلی گرم روغن، نفت خام و قطران توسط باکتری S1 و S2 و بصورت مخلوط

جدول ۱: آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) اثر ۳ منبع کربن روغن زیتون، نفت خام و قطران بر تولید بیومس برای سویه S1، S2 به تنهایی و با هم

منابع تغییر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F مقدار	مقدار معناداری
اثر روغن زیتون روی تولید بیومس	۱۲۷۴/۰۰۰	۲	۶۳۷/۰۰۰	۱/۹۸۶	۰/۲۱۸
اثر نفت خام بر تولید بیومس	۲۷۲۳۴/۶۶۷	۲	۱۳۶۱۷/۳۳۳	۲۲/۷۶۳	۰/۰۰۲
اثر قطران بر تولید بیومس	۱۱۰۰۹/۸۹۷	۲	۵۵۰۴/۹۴۹	۳۲/۲۲۷	۰/۰۰۱
کل	۱۲۰۳۴/۷۹۴				

معنادار است و کارایی دو سویه در مقایسه با یکدیگر و در حالت کشت با هم قابل توجه می باشد.

بحث و نتیجه گیری

تا کنون گزارش های متعددی راجع به میکروارگانیسم های محیطی که توانایی تجزیه مواد مختلف هیدروکربنی از مولکول های ساده تا پیچیده چند حلقه ای و حتی آفت کش های ارگانوفسفره منتشر شده است. میکروارگانیسم های تجزیه کننده آلاینده های نفتی شامل جنس های مختلف باکتریایی و قارچی مانند سودوموناس، باسیلوس، رودوکوکوس، آلکالی ژنز، آلکانی وراکس، گونه های مختلفی از اتروباکتریاسه ها، کاندیدا، اسپیریلوس و چندین جنس متنوع دیگر می باشند.^{۱۹}

سویه S2 توان حذف ۲۶/۱۵ درصد قطران، ۳۵/۳۳ درصد نفت خام و ۶۵/۶ درصد روغن زیتون را در شرایط مشابه با سویه S1 داشت. در عین حال نتایج مربوط به استفاده از دو باکتری به یکدیگر نشان دهنده افزایش تقریبی ۵ درصدی کارایی آنها با یکدیگر برای حذف هر سه ترکیب بود.

آنالیز آماری نتایج حاصل از آزمایش های ارزیابی رشد هر دو سویه تحت بررسی به روش تحلیل واریانس انجام شده است در جدول شماره ۱ قابل مشاهده است. همانطور که نتایج آماری نشان می دهد در آزمایش حذف روغن زیتون از محیط کشت توسط سویه S1 در مقایسه با سویه S2 و در حالت مخلوطی از هر دو سویه اختلاف معنی دار نیست. در صورتیکه در آزمایش های کشت در حضور نفت خام و قطران اختلاف

در این زمینه Bouwer و همکارانش در سال ۱۹۹۴ باکتری هایی جداسازی کردند که ظرف مدت ۲۸ روز ۴۳-۸ درصد از نفتالن را مصرف می کرد^{۲۵}. در همین رابطه Kom و همکارانش در سال ۲۰۱۲ طی دوره ۳۰ روزه ۹۶ درصد از نفتالن را توسط یک مخلوط باکتریایی تجزیه و حذف نمودند^{۲۶}. Margesin و همکارانش در سال ۱۹۹۹ خاکهای آلوده به گازوئیل را طی یک دوره زمانی ۱۱۶ روزه پاکسازی نمودند^{۲۷}. Kang همچنین در سال ۲۰۰۳ سویه ای از بورخ هولدریا (*Borkholderia*) را از خاک جداسازی نمود که توانایی تجزیه فنانترا را داشت اما قادر به تجزیه نفتالن نبود^{۲۸}. در این مطالعه سویه های جداسازی شده توانایی حذف ترکیبات هیدروکربنی قطران در محیط مخلوط دو سویه در حدود ۴۰ درصد طی مدت زمان ۱۴ روز گرمگذاری را داشتند. این مقدار توانایی در مقایسه با تحقیقات ذکر شده مطلوب تر بوده و به دلیل سرعت عمل بالاتر بسیار بهتر و کارتر می باشد. با توجه به این نکته که قطران ماده ای متشکل از ترکیبات مختلف چند حلقه ای پایدار و سمی است اکثر میکروارگانیسم ها قادر به رشد در حضور این ترکیبات نمی باشند. بنابراین سویه های S1 و S2 به دلیل قابلیت رشد در حضور این ترکیبات و حذف آنها ارزشمند می باشند. همچنین تجزیه نسبتا سریع ترکیبات نفتی و روغن نشان دهنده قابلیت بالای این سویه های بومی در حذف ترکیبات مختلف هیدروکربنی است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پروژه تحقیقاتی در دانشگاه شهید بهشتی اجرا و تامین مالی شده است. نویسندگان این مقاله از دانشجویان و اساتید دانشکده علوم زیستی که لطف زیادی به ما نموده اند کمال تشکر و سپاس را دارند.

^{۲۰} این میکروارگانیسم ها به دلیل اینکه در مناطق آلوده به ترکیبات هیدروکربنی زندگی می کنند، دارای قابلیت های متابولیسمی وسیعی برای بقای خود هستند. بنابراین وجود میکروارگانیسم های بومی یکی از مهم ترین عوامل تجزیه و حذف مواد آلی از محیط می باشد^{۲۱}. در این تحقیق دو گونه باکتریایی شامل *سودوموناس* و *پلانوکوکوس* که از خاک های آلوده به نفت جداسازی شدند، به منظور بررسی حذف زیستی ترکیبات ساده و پیچیده هیدروکربنی به کار گرفته شدند. این باکتری ها توانایی بالایی جهت تجزیه روغن زیتون داشتند. نفت خام نیز به خاطر داشتن انواع ترکیبات هیدروکربنی درصد بالایی از آن توسط باکتری ها تجزیه شد. تنها ترکیبات حلقوی موجود در نفت که دیر تجزیه می شوند، بطور کامل مصرف نشد^۱. قطران به دلیل داشتن انواع ترکیبات چند حلقه ای آروماتیک که غالب آن نفتالن می باشد، تجزیه پذیری خیلی کندی داشته و در نتیجه توسط باکتری به سختی حذف می شود. هر چه پیچیدگی ترکیبات از نظر ساختاری بیشتر می شود بدلیل افزایش سمیت آنها تجزیه آنها نیز مشکل تر می گردد^{۲۲}. با این وجود تحقیقات نشان داده است که برخی از باکتری ها قابلیت حذف ترکیبات هیدروکربنی سمی و پایدار را دارا می باشند. از چند دهه گذشته تا کنون مطالعات زیادی در جهت جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم های تجزیه کننده صورت گرفته است. به عنوان مثال Sathish در سال ۲۰۰۸ بیشترین مقدار تجزیه نفت در مدت ۷ روز توسط باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* سویه BPS1-8 به میزان ۷۷ درصد گزارش داد^{۲۳}. در تحقیق دیگری حسن شاهیان و همکاران در سال ۱۳۸۹ دو سویه باکتری تجزیه کننده ترکیبات نفتی از خلیج فارس جداسازی نمودند که یکی *سودوموناس* و دیگری اسیتوباکتر بود. آنها میزان کارایی *سودوموناس* را در رابطه با مصرف نفت ۴۱ درصد گزارش کردند^{۲۴}.

1. Harayama S, Kishira H, Kasai Y, et al. Petroleum Biodegradation in Marine Environments. *Mol Microbiol Biotechnol* 1999; 1:63-70.
2. Singh C, and Lin J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African J Biotechnol* 2008; 7(12):1927-1932.
3. Plaza GA, Łukasik K, Wypych J, et al. Biodegradation of Crude Oil and Distillation Products by Biosurfactant-Producing Bacteria. *Polish J Environ Study* 2008; 17(1): 87-94.
4. Johnsen AR, Wick LY, and Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* 2005; 133 (1): 71-84.
5. Xu R, and Obbard JP. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated beach sediments treated with nutrient amendments. *Environ Quality* 2004; 33: 861-867.
6. Mohammadi F, AkhavanSepahi A, Mohammadi F, et al. Bioremediation of water contaminated with crude oil per isolation Bacillus from oily pound. *J Toloo-e-Behdasht* 2012;35:107-118 [Persian]
7. Cerniglia CE. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegrad* 1992; 3: 351-368.
8. Husseien M, Amer AA, El-Maghraby A, et al. Availability of barley straw application on oil spill cleanup. *Int J Environ Sci Technol* 2009; 6: 123-130.
9. Delille D, Delille B, Pelletier E. Effectiveness of Bioremediation of Crude Oil Contaminated Subantarctic Intertidal Sediment: The Microbial Response. *Microb Ecol* 2002; 44: 118-126.
10. Hedlund BP, Geiselbrecht AD, Bair TJ, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 251-259.
11. Yesillada O, Sik S, Sam M. Biodegradation of Olive Oil Mill Wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: Effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World J Microbiol Biotechnol* 1998; 14: 37-42.
12. Beek B. Biodegradation and persistence. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 2001.
13. Ebrahimipour G, Marzban A, Karkhane M, et al. Study of crude oil bioremediation by bacterium isolated from soils contaminated with petroleum hydrocarbons. *Microb Biotechnol* 2012; 4:15-22. [In Persian]
14. Ebrahimipour, G, Aminian, M., Abolhasani, SA. Isolation of a Petroleum-degrading Halotolerant Bacterium and Study the Effects of Environmental Factors in Biodegrading for Environmental Protection. *Environ Sci* 2005; 8: 65-74.
15. Hassanshahian M, Cappello S. Hydrophobicity effect on oil degradation by two marine bacterial strains *Alcanivorax borkumensis* and *Thalassolituus oleivorans*. *Iranian J Environ Technol* 2015;1: 9-18.
16. Shokrollahzadeh S, Azizmohseni F, Golmohammad F, et al. Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran. *Biores Technol*, 2008;99:6127-6133.
17. Krieg NR, Holt G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins; 1989.
18. Chaturvedi S, Chandra R, Rai V. Isolation and characterization of *Phragmites australis* (L.) rhizosphere bacteria from contaminated site for bioremediation of colored distillery effluent. *Ecol Engin*, 2006; 27: 202-207.
19. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003; 67(4):503-549.
20. Chikere CB, Okpokwasili GC, Chikere BO. Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. *Afr J Biotechnol*, 2009; 8(11): 2535-2540.
21. Abbasi H, Hamed MM, Bagheri LT, et al. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactants. *Biosci Bioengin*, 2012; 113(2): 211- 219.
22. Barkay T, Navon-venezia S, Ron EZ, et al. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier *Alas an*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 63(1): 151-155.
23. Sathish KM, Binupriya AR, Baik SH, et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *Clean* 2008; 36(1): 92-96.
24. Hasanshahian M, Hasanshahian O, Emtiazi G. Optimization of crude oil degradation by *Pseudomonas aeruginosa* AS and *Acinetobacter calcoaceticus* BS isolated from Persian Gulf. *pet Res* 2010; 63: 72-82. [In Persian]
25. Bouwer B, Durent N, Wilson L, et al. Degradation of xenobiotic compound in situ: Capabilities and limits. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 15: 307-317.
26. Kom RR, Mbawala A, Ngassoum MB. Naphthalene biodegradation by microbial consortia isolated from soils in Ngaoundere (Cameroon). *Int J Environ Sci* 2012; 3:1-10.
27. Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F. Soil lipase activity—a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnol Tech* 1999; 13: 859-863.
28. Kang H, Hwang SY, Kim YM, et al. Degradation of Phenanthrene and Naphthalene by a *Borkholderia* Species Strain. *Can J Microbiol* 2003; 49: 139-144.

Evaluation of Aliphatic and Aromatic Compounds Degradation by Indigenous Bacteria Isolated from Soil Contaminated with Petroleum

Farhad Gilavand¹, Gholamhossein Ebrahimipour¹, Maryam Karkhane², Abdolrazagh Marzban^{3*}

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2. Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

*E-mail: marzban86@gmail.com

Received: 30 Jun 2015 ; Accepted: 22 Sep 2015

ABSTRACT

Background: The major of this study was to isolate oil-degrading bacteria from soil contaminated with petroleum and examining the removal of hydrocarbons by these bacteria.

Methods: Oil-degrading colonies were purified from the samples obtained of around Ahvaz oil wells. Organic matter degradation was investigated with 1 g of crude oil in basal salt medium (BSM) as sole carbon source. The growth rate was determined through total protein assay and hydrocarbon consuming was measured through organic carbon oxidation and titration by dichromate as oxidizing agent.

Results: Two potential isolates named S1 and S2 strains were screened and identified as *Planococcus* and *Pseudomonas aeruginosa*. As results for S1 and S2 could degrade 80.86 and 65.6% of olive oil, 59.6 and 35.33 of crude oil, while 32 and 26.15 % of coal tar were consumed during 14 days incubation.

Conclusion: The results of this investigation showed these indigenous strains high capability to biodegradation at short time and are desirable alternatives for treatment of oil pollutants.

Keywords: Hydrocarbon pollutants, Crude oil, Coal tar, Bioremediation