Isolation and Identification of Crude Oil Degrading Bacteria from Oil-polluted Areas in Masjed Soleyman

Taybeh Saberi
Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, tsaberiiiii@gmail.com
Mehdi Hassanshahian*
Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, mshahi@uk.ac.ir

Abstract

Introduction: Today, one of the main environmental problems is hydrocarbon pollution due to the activities of oil and petrochemical industries. Accidental oil spills occur in the environment during the exploration, production, transportation, and storage of petroleum products. Technologies commonly used for soil remediation are expensive and can lead to the incomplete degradation of pollutants. Biodegradation is a cost-effective technology for the recovery of oil-contaminated areas.

Materials and methods: This study was conducted to isolate crude oil degrading bacteria, soil, and sludge from seven oil-contaminated areas in Masjed Soleyman. To determine the frequency of heterotrophic and degrading bacteria, the bacteria were counted by the serial dilution and MPN methods. Twenty-four strains were isolated by the culture enrichment method in Bushnell-Haas broth medium containing 0.5% crude oil. Then, based on warm staining and colonial characteristics, oil spreading test, cell surface hydrophobicity, and the emulsion activity of the strains were examined for initial screening. Finally, the top 10 strains were screened by spectrophotometric and gravimetric methods with a concentration of 0.5% crude oil. Also, Gas Chromatography (GC) was performed on the superior strain.

Results: The identified strains belonged to the genus *Rhodococcus jostii* strain D3 and *Arthrobacter citreus* strain E3. The top two strains were studied to investigate the effects of different concentrations of crude oil, nutrient effects, time effects, and mixed culture. The highest oil expansion was related to F3 strain and the highest emulsion activity rate was related to E3 strain. D3 strain with 41% degradation at the concentration of 4.5 and E3 strain with 73.5% degradation at the concentration of 1.5 showed the best results in response to different crude oil concentrations. The results of gas chromatography analysis confirmed that strain D3 can degrade 95 percent of crude oil at the concentration of 0.5%.

Discussion and conclusion: The identified strains have a great potential in removing hydrocarbon pollution and can be used at the field level to reduce and eliminate oil pollution in the contaminated areas in the future.

Key words: Oil pollution, Masjed soleyman, Crude oil, Bacteria, Biodegradation

* Corresponding author
Received: May 13, 2020 / **Accepted:** August 15, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال دهم ، شماره ۳۸، تابستان ۱۴۰۰، صفحه ۱ – ۱۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۵
doi: 10.22108/BJM.2020.122842.1299

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام از مکان‌های آلوده به مواد نفتی در مسجدسلیمان

طیبه صابری: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، tsaberiiiii@gmail.com
مهدی حسن شاهیان*: استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، mshahi@uk.ac.ir

چکیده

مقدمه: امروزه یکی از اصلی‌ترین مشکلات زیست‌محیطی آلودگی هیدروکربنی ناشی از فعالیت‌های صنعت نفت و پتروشیمی است. نشت تصادفی نفتْ در محیط در طول اکتشاف، تولید، حمل‌ونقل و ذخیرهٔ فرآورده‌های نفتی اتفاق می‌افتد. فناوری‌هایی که معمولاً برای اصلاح خاک استفاده می‌شوند، گران هستند و ممکن است به تجزیهٔ ناقص آلاینده‌ها بینجامند. تجزیهٔ زیستیْ فناوریِ مقرون‌به‌صرفه‌ای برای احیای مناطق آلوده به نفت است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خامْ نمونه‌برداری از خاک و لجن نفتی از ۷ منطقهٔ آلودهٔ نفتی در مسجدسلیمان انجام گرفت. برای تعیین فراوانی باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کننده، شمارش باکتری‌ها با روش سریال رقت و MPN انجام شد. ۲۴ سویه با روش غنی‌سازی کشت در محیط بوشنل هاس براث حاوی نیم‌درصد نفت خام جداسازی شدند. سپس براساسِ رنگ‌آمیزی گرم و خصوصیات کلنیْ تست گسترش نفت، هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی و فعالیت امولسیون‌کنندگی سویه‌ها برای غربال‌گری نخستین بررسی شدند. در مرحلهٔ نهایی، غربال‌گری ۱۰ سویهٔ برتر با روش اسپکتروفتومتری و گراویمتری با غلظت نیم‌درصد نفت خام صورت گرفت. برای تأیید نهایی، تجزیهٔ آنالیز کرماتوگرافی گازی (GC) روی سویهٔ برتر انجام شد.

نتایج: سویه‌های شناسایی‌شده، متعلق‌به جنس‌های *Rhodococcus jostii* strain D3 و *Arthrobacter citreus* strain E3 بودند. دو سویهٔ برتر برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف نفت خام، اثر مواد مغذی، اثر زمان و کشت مخلوط بررسی شدند. بیشترین میزان گسترش نفت مربوط‌به سویهٔ F3 و بیشترین میزان امولسیون‌کنندگی مربوط‌به سویهٔ E3 بود. سویهٔ D3 با ۴۱درصد تجزیه در غلظت ۴/۵ و سویهٔ E3 با ۷۳/۵درصد تجزیه در غلظت ۱/۵ بهترین نتایج را در پاسخ به غلظت‌های مختلف نفت خام نشان دادند. آنالیز گاز کرماتوگرافی تأیید کرد که سویهٔ D3 قابلیت حذف بیش از ۹۵درصد نفت در غلظت نیم‌درصد را دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: سویه‌های شناسایی‌شده، ظرفیت زیادی در حذف آلودگی‌های هیدروکربنی دارند و در آینده می‌توان از آنها در سطح میدانی برای کاهش و حذف آلودگی‌های نفتی در مناطق آلوده بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، مسجدسلیمان، نفت خام، باکتری، تجزیهٔ زیستی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

مسئلهٔ هیدروکربن‌های نفتی[1] و آلودگی خاک و اکوسیستم‌های آبزی، مسئلهٔ جدی جهانی است. آلودگی‌های ناشی از هیدروکربن‌های نفتی، خطری جدی برای سلامت همهٔ موجودات زندهٔ دنیا هستند و باتوجه‌به ویژگی‌های بازدارندهٔ خود، جزء آلاینده‌های اولویت‌دار و در حال ظهور طبقه‌بندی می‌شوند (۱). تجزیهٔ زیستی آلاینده‌ها فرایندی اساسی و طبیعی برای حذف قسمت غیرفرار آلاینده‌های آلی از محیط توسط میکروارگانیسم‌هاست (۲). قرارگرفتن یک جمعیت میکروبی در معرض هیدروکربن‌های نفتی در تعیین سرعت تجزیهٔ آلاینده‌های هیدروکربنی بسیار مهم است.

آلاینده‌های هیدروکربنی نفت، ترکیباتی هیدروفوب هستند و محلول‌سازی آنها پیش از تجزیه توسط میکروارگانیسم‌ها ضرورت دارد. ماهیت هیدروفوبیک سطح سلول‌های باکتریایی نقش مهمی در تجزیهٔ زیستی دارد؛ ازاین‌رو وجود سورفکتانت‌ها می تواند موجب افزایش تجزیهٔ هیدروکربن‌های نفتی شود. افزودن سورفاکتانت‌ها تنش سطحی آلاینده‌های هیدروفوبیک را کاهش می‌دهد و و با ایجاد امولسیون، حلالیت هیدروکربن‌ها را بهبود می‌بخشد (۳، ۴). آلکان ها به‌طور کلی اجزائی در نظر گرفته می‌شوند که به راحتی در ترکیب نفت تجزیه می‌شوند. آلودگی‌های هیدروکربنی ممکن است به‌طور کامل یا جزئی در طی چند ساعت، چند روز یا چند ماه با فعالیت میکروارگانیسم‌ها از مسیرهای مختلفی تجزیه شوند (۵).

میکروارگانیسم‌های متابولیزه کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی به‌طور گسترده در محیط‌زیست توزیع می‌شوند و برای درک بهتر فراوانی و توزیع میکروبی در محیط های طبیعی، ابزارهایی توسعه یافته‌اند. شناخته‌شده‌ترین روش‌های مرسوم، روش‌های مبتنی‌بر کشت براساس شاخص‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی شامل جداسازی و کشت با استفاده از محیط‌های جامد و مایع است. با پیشرفت سریع روش‌های مولکولی مبتنی‌بر PCR روش های شناسایی و مطالعه برای میکروارگانیسمی خاص و یا گروه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها و همچنین ژن های خاصی که برای ارزیابی کلی جوامع میکروبی، مثلا مطالعهٔ میکروارگانیسم‌های غیرقابل‌کشت به کار گرفته شود، گسترش یافته‌اند (۶).

شهرستان مسجدسلیمان در شمال شرقی استان خوزستان و در ۱۲۵کیلومتری شهرستان اهواز واقع شده است. مسجدسلیمان ازلحاظ اقلیمی دارای آب‌وهوای نیمه‌صحرایی است. مسجدسلیمان یکی از نخستین مناطق نفت‌خیز ایران است و مکان‌های با آلودگی نفتی زیادی در این شهر وجود دارد که به محیط‌زیست آن صدمات جبران‌ناپذیری وارد کرده است (۷). از این مکان‌های نفتی می‌توان پالایشگاه LDU را نام برد. تولید این پالایشگاه ۵۰۰ تا ۵۸۰ بشکه نفت خام در روز بوده است که از این مادهٔ خام روزانه ۳۰ هزار لیتر گازوئیل، ۲۵ هزار لیتر بنزین معمولی و ۲۵ هزار لیتر نفت کوره تولید می‌شد. همچنین می‌توان به کارخانهٔ تقطیر اشاره کرد. این پالایشگاه شامل سه واحد A، B و C است (۷). هم‌اکنون چاه نفت فعال و در حال بهره‌برداری، چاه نفت شمارهٔ ۹ است. مسجدسلیمان حوزهٔ نفتی بسیار گسترده و بزرگی را با شهرهای هم‌جوار خود مانند لالی و هفتگل دارد که همگی فعال هستند. استخراج نفت و گاز از ده‌ها چاهی که در حومهٔ شهر مسجدسلیمان قرار دارند، آلودگی و آلاینده‌های

زیست‌محیطی را در این شهرستان ایجاد کرده است و هم‌اکنون، پس از گذشت بیش از یک‌صد سال از اکتشاف نخستین چاه نفت آثار این آلاینده‌ها همچنان پابرجاست (۷). هدف از این پژوهش، بررسی پراکندگی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام در مناطقی از مسجدسلیمان است که آلودگی نفتی زیادی دارند. همچنین غربال‌گری و به‌دست‌آوردن سویه‌های بومی با قابلیت زیاد تجزیهٔ نفت خام از دیگر اهداف این پژوهش است. درنهایت، سنجش اثر عوامل محیطی بر میزان تجزیه‌پذیری نفت خام توسط بهترین سویه‌های به‌دست‌آمده، هدف نهایی این پژوهش است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌های خاک (۵ نمونه) و لجن نفتی (۲ نمونه) از پنج منطقهٔ آلوده به مواد نفتی در شهرستان مسجدسلیمان به فواصل ۵-۳کیلومتری از یکدیگر جمع‌آوری شدند. مناطق نمونه‌برداری شامل پالایشگاه نفت بی‌بیان در محل لولهٔ نفت خام عبوری چاه شمارهٔ ۹، محلهٔ کوی نفت‌خیز (چاه نفتی)، محلهٔ سی‌برنج (کمپ کرسنت)، محلهٔ مدرسه‌خارجی‌ها (هشت‌بنگله) در محل لولهٔ نفت خام عبوری چاه شمارهٔ ۳۴ و محلهٔ نمره‌یک در محل لولهٔ نفت خام عبوری چاه شمارهٔ یک قدیم انتخاب شدند. نمونه‌برداری از عمق ۱۰-۵سانتی‌متری خاک به‌میزان ۵۰۰ گرم در شرایط کاملا استریل انجام گرفت و در کیسه‌های پلاستیکی پلی‌اتیلن‌استریل[۲] در دمای ۴ سانتی‌گراد تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شدند (۸). در جدول ۱، مناطق نمونه‌برداری با ذکر نام اختصاری نشان داده شده است. طول و عرض جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری بدین صورت بود: N"۶۱۳ '۲۶°۳۲ و " ۶۳۴ '۵۵°۵۲ E

جدول ۱- مناطق نمونه‌برداری با ذکر نام اختصاری

نام اختصاری	منطقهٔ نمونه‌برداری
A	خاک منطقهٔ نمرهٔ یک
B	خاک منطقهٔ کوی نفت‌خیز
C	خاک منطقهٔ سی‌برنج
D	خاک پالایشگاه بی‌بیان
E	خاک منطقهٔ مدرسه‌خارجی‌ها
F	لجن نفتی منطقهٔ سی‌برنج
G	لجن نفتی پالایشگاه بی‌بیان

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها در خاک‌های آلوده با روش سریال رقت: تجزیه و تحلیل نخستین خاک، با شمارش تعداد کل باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کننده در خاک‌های آلوده انجام شد. ابتدا ۱۰ گرم از خاک‌های آلوده در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی حل شد و به‌مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۶۰ و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس درون لوله‌های آزمایش به‌میزان ۹ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی ریخته شد. برای شمارش باکتری‌های هتروتروف پس از رقت‌سازی‌های متوالی ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده در رقت‌های $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ در لولهٔ آزمایش تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها در پلیت‌های حاوی نوترینت آگار کشت سفره‌ای داده شد و برای شمارش باکتری‌های تجزیه‌کننده رقت $۱۰^{-۱}$ و $۱۰^{-۲}$ تهیه شد. در مرحلهٔ بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها در پلیت‌های بوشنل هاس آگار حاوی نیم‌درصد نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن محیط، کشت سفره‌ای داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی گراد و پس از گذشت زمان ۴۸-۲۴ ساعت شمارش کلنی باکتری‌های هتروتروف و پس از گذشت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد شمارش کلنی باکتری‌های تجزیه‌کننده انجام شد و طبق فرمول زیر تعداد کلنی در هر گرم خاک محاسبه شد (۹).

۱۰×عکس رقت×میانگین تعداد کلنی‌های شمارش‌شده= Cfu/gram[۳]

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها در خاک‌های آلوده با روش MPN[۴]: برای شمارش باکتری‌ها با استفاده از روش بیشینهٔ تعداد احتمالی (MPN)، ابتدا ۱۰ گرم از خاک‌های آلوده در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات حل شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه‌شده به درون لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر بافر فسفات منتقل شد. برای شمارش باکتری‌های هتروتروف رقت‌های 10^{-7}-10^{-5} ایجاد شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها در میکروپلیت‌های ۲۴خانهٔ حاوی ۱۸۰۰ میکرولیتر نوترینت براث ریخته شد و برای شمارش باکتری‌های تجزیه‌کننده، رقت‌های 10^{-4}-10^{-2} تهیه شد و در میکروپلیت‌های حاوی ۱۸۰۰ میکرولیتر بوشنل هاس براث دارای نیم‌درصد نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی در شرایط کاملا استریل ریخته شد. هر رقت ۳ تکرار داشت و MPN به‌صورت ۳تایی انجام شد. سپس میکروپلیت‌ها برای شمارش هتروتروف‌ها به‌مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و میکروپلیت‌ها برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها به‌مدت ۴ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، ایجاد کدورت در مقایسه با شاهد، شاخص مثبت آزمایش MPN به حساب آمد و با استفاده از نرم‌افزار MPN calculator version 23 تعداد باکتری‌ها در هر گرم خاک محاسبه شد (۱۰، ۱۱).

جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام: برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام از محیط بوشنل هاس براث حاوی نیم‌درصد نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده شد. ابتدا برای غنی‌سازی باکتری‌ها ۱۰ گرم از نمونه‌های خاک به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط بوشنل هاس براث حاوی نیم‌درصد نفت خام در فلاسک‌های ارلن مایر[۵] در شرایط کاملا استریل اضافه شد. سپس در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۶۰ و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ روز قرار داده شدند. پس از ۱۰ روز باتوجه‌به غلظت‌های خاک در نمونه‌های مختلف به‌میزان ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر از محیط برداشته و به محیط بوشنل هاس براث تازه حاوی نیم‌درصد نفت خام منتقل شد. از پاساژ پایانی (پاساژ سوم)، پس از رقت‌سازی‌های متوالی باتوجه‌به غلظت نمونه‌ها، از رقت‌های 10^{-6}-10^{-3} میزان ۱۰۰ میکرولیتر به محیط NA تلقیح شد و به‌صورت کشت سفره‌ای پخش شد و پس از رشد در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های متفاوتی ازنظر مورفولوژی مشاهده شدند که هرکدام از این کلنی‌ها در پلیت‌های NA جدید خالص‌سازی و در دمای ۴ نگهداری شدند. ذخیره‌سازی باکتری‌ها نیز در گلیسرول با غلظت ۳درصد در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد برای توصیفات بعدی قرار گرفت (۱۲، ۱۳). برای غربال‌گری باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ به‌دست‌آمده از روش‌های سنجش فعالیت امولسیون‌کنندگی (E_{24}) استفاده شد و تست گسترش قطرهٔ نفت براساس پروتکل‌های شرح‌داده‌شده انجام شد.

شناسایی باکتری‌های جداشده

شناسایی بیوشیمیایی: برای شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام جداشده از منابع فوق، آزمایش‌های نخستین بیوشیمیایی رنگ‌آمیزی گرم، شکل کلنی، شکل میکروسکوپی،

اکسیداسیون/فرمانتاسیون (O/F)، تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، حرکت، تولید سولفید هیدروژن، اندول (SIM) و سیمون سیترات آگار استفاده شد (۱۴).

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی با تکثیر قسمتی از ژن *16S rDNA* توسط پرایمرهای *Primer Forward: 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3* و *Reverse: 5-TACGYTACCTTGTTACGACTT -3 Primer* انجام شد. برنامهٔ PCR برای تکثیر ژن بدین صورت بود: دمای دناتوراسیون ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ است. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز ۱درصد بارگذاری شد و سپس باند bp ۱۴۰۰ از ژل آگاروز طبق شیوه‌نامهٔ کیت فرمنتاژ (K0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست شد و همولوژی آنها بررسی شد و قرابت بیشتر از ۹۸درصد به‌عنوان جنس و گونهٔ باکتری مجهول لحاظ شد (۱۵).

سنجش میزان حذف نفت توسط باکتری با روش اسپکتروفتومتری و گراویمتری[۶]: ابتدا یک کشت ۲۴ساعته از باکتری در محیط NB در لوله‌های آزمایش به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر تهیه شد. در مرحلهٔ بعد، وزن ارلن‌های خشک اندازه‌گیری شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط بوشنل هاس براث تهیه شد و در شرایط استریل، سوسپانسیون باکتری به ارلن‌های حاوی محیط BHB اضافه شد. در مرحلهٔ بعد، به هر ارلن نیم‌درصد نفت خام اضافه شد و در ارلن‌ها با استفاده از فویل آلومینیومی و پنبهٔ استریل بسته شد و در دستگاه شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد در شرایط استریل به‌مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. پس از طی دورهٔ ۱۵روزه ابتدا جذب کمی و کیفی نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر محلول دی‌کلرومتان[۷] (DCM) به ارلن‌های حاوی محیط کشت و نفت اضافه شد و با یکدیگر مخلوط شدند. سپس محتویات ارلن به درون قیف جداکننده منتقل شدند و به‌آرامی هم زده شدند تا فاز آبی (بالا) و آلی (پایین) به‌خوبی از یکدیگر جدا شوند. سپس فاز آلی (DCM و نفت) به درون ارلن‌هایی ریخته شد که وزن خشک آنها ازپیش اندازه‌گیری شده بود. پس از آن، ۱ میلی‌لیتر از محلول با ۲ میلی‌لیتر DCM مخلوط شد و کدورت نفت استخراج‌شده در مقابل شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین شد (روش اسپکتروفتومتری). سپس فاز آلی در معرض هوا قرار گرفت تا دی‌کلرومتان آن تبخیر شود. نفت مصرف‌شده با کم‌کردن هیدروکربن‌های باقی‌مانده از وزن اصلی هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان شاهد محاسبه شد و از فرمول زیر برای محاسبهٔ درصد حذف نفت خام (نفت باقی‌مانده) استفاده شد (۱۶).

۱۰۰× میزان جذب شاهد/ میزان جذب نمونه-میزان جذب شاهد = درصد حذف نفت خام

سنجش حذف نفت خام با روش گاز کروماتوگرافی (GC[۸]): برای تأیید حذف نفت با روش‌های اسپکتروفتومتری و گراویمتری، سنجش حذف با روش گاز کروماتوگرافی نیز انجام شد؛ بدین منظور، یکی از سویه‌های برتر به‌مدت پانزده روز در محیط کشت ONR حاوی یک‌درصد نفت خام و در دمای ۳۰°C روی شیکر با دور ۱۸۰ rpm انکوبه شد. پس از استخراج نفت باقی‌مانده با دی‌کلرومتان، درصد تجزیهٔ نفت توسط هر

سویه با استفاده از آنالیز گاز کروماتوگرافی از نفت باقی‌مانده در محیط کشت برای هر سویه انجام شد. ستون GC به‌کاررفته با دکتور FID بود. حلال به‌کاررفته، دی‌کلرومتان و دمای نگهداری ستون برای ۱۷ دقیقه بود. گاز حامل هلیوم و جریان عبوری ۳ میلی‌لیتر بر دقیقه بود.

تأثیر برخی شرایط در تجزیهٔ نفت خام توسط باکتری‌های برتر تجزیه‌کننده: آثار غلظت، زمان، مواد مغذی (منبع نیتروژن و کربن) و کشت مخلوط بر تجزیهٔ نفت خام توسط سویه‌های برتر بررسی شد و از غلظت‌های ۱/۵، ۳، ۴/۵ و ۶درصد نفت خام استفاده شد. برای بررسی اثر مواد مغذی توسط باکتری‌ها ۱ گرم پپتون (منبع نیتروژن)، ۱ گرم گلوکز (منبع کربن) و ۱ گرم پپتون + ۱ گرم گلوکز (منبع نیتروژن و کربن) به ارلن‌ها اضافه شد و کشت تازهٔ باکتری به ارلن‌ها اضافه شد. برای بررسی اثر کشت، مخلوط کشت تازهٔ باکتری های مختلف همراه با هم به ارلن‌های حاوی محیط کشت اضافه شدند. برای بررسی اثر زمان باکتری‌ها بدون اضافه‌کردن، مواد مغذی به ارلن‌های حاوی محیط کشت اضافه شدند. در مرحلهٔ آخر نیم‌درصد نفت خام فیلترشده به ارلن‌ها اضافه شد و در ارلن‌ها با درپوش استریل بسته شد. سپس ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۶۰ و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۳۰ روز، نتایج اثر زمان و پس از گذشت زمان ۱۵ روز، سایر شرایط مؤثر بر رشد کمی (OD_{600}) و کیفی باکتری‌ها و میزان حذف نفت خام توسط آنها (OD_{420}) بررسی شد. میزان حذف نفت خام با روش اسپکتروفتومتری و گراویمتری مشخص شد (۱۷). آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد و آنالیز آماری دانکن انجام گرفت.

نتایج

کمیت باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کننده در نمونه‌ها با استفاده از روش سریال رقت و MPN: نتایج حاصل از شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده های نفت خام با دو روش سریال رقت و شمارش بیشینهٔ احتمالی در مناطق مختلف نمونه‌برداری در جدول ۲ نشان داده شده است. باتوجه‌به جدول ۲ بیشترین تعداد باکتری‌های هتروتروف در روش سریال رقت مربوط‌به نمونهٔ A (خاک منطقهٔ نمرهٔ یک) و کمترین تعداد مربوط‌به نمونهٔ D (خاک پالایشگاه بی‌بیان) است و بیشترین تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده مربوط‌به نمونهٔ F(لجن نفتی منطقهٔ سی‌برنج)، و کمترین تعداد مربوط‌به نمونهٔ G (لجن نفتی پالایشگاه بی‌بیان) است. در روش شمارش بیشینهٔ احتمالی، ایجاد کدورت در رقت‌های تهیه‌شده شاخص مثبت MPN در نظر گرفته شد. نتایج حاصل‌شده نشان داد بیشترین تراکم باکتری‌های هتروتروف مربوط‌به نمونهٔ B (خاک منطقهٔ کوی نفت‌خیز) و نمونهٔ C (خاک منطقهٔ سی‌برنج) و کمترین تراکم مربوط‌به نمونهٔ G است. بیشترین تراکم باکتری‌های تجزیه‌کننده مربوط‌به نمونهٔ E (خاک منطقهٔ مدرسه‌خارجی‌ها) و کمترین تراکم مربوط‌به نمونهٔ G است.

غربال‌گری باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام: در این پژوهش، ۲۴ سویهٔ باکتری تجزیه‌کنندهٔ نفت خام از نمونه‌های خاک آلوده به نفت جداسازی شد. این سویه‌ها براساس رشد در محیط حاوی نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن، حذف کیفی نفت، فعالیت امولسیونه‌کنندگی (E_{24}) و گسترش نفت غربال‌گری شدند. نتایج حاصل از غربال‌گری در جدول ۳ آمده است. باتوجه‌به نتایج، ۱۰ سویه که در همهٔ شاخص‌ها ارزش بیشتری داشتند، برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

جدول ۲- شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها

نمونه	تعداد کل هتروتروف‌ها برحسب cfu/g	تعداد کل تجزیه‌کننده‌ها برحسب cfu/g	تعداد کل هتروتروف‌ها MPN cell/g	تعداد کل تجزیه‌کننده‌ها MPN cell/g
A	۱/۶۳×۱۰^۹	۴/۳۲×۱۰^۴	۰/۲ × ۱۰^۶	۲ × ۱۰^۴
B	۴/۴×۱۰^۷	۵/۲۵×۱۰^۳	۲/۹ × ۱۰^۶	۴/۶ × ۱۰^۶
C	۲/۷×۱۰^۷	۳/۹×۱۰^۳	۲/۹ × ۱۰^۶	۱/۵ × ۱۰^۶
D	۱/۷×۱۰^۷	۱/۷۵×۱۰^۳	¾ × ۱۰^۵	۷/۵ × ۱۰^۵
E	۲/۲۵×۱۰^۷	۵/۲۵×۱۰^۳	۱/۵ × ۱۰^۶	۱/۱ × ۱۰^۸
F	۱/۴۰×۱۰^۹	۱/۴۶×۱۰^۵	۱/۱ × ۱۰^۶	۱/۱ × ۱۰^۴
G	۰/۹۱×۱۰^۹	۱/۴۵×۱۰^۳	۴/۶ × ۱۰^۴	۲/۱ × ۱۰^۳

جدول ۳- نتایج رشد، فعالیت امولسیون‌کنندگی (E_{24}) و تست گسترش نفت توسط سویه‌های جداسازی‌شده

نام سویه	OD=$_{600}$	E_{24} (درصد)	گسترش نفت (میلی‌متر)	نام سویه	OD= 600	E_{24} (درصد)	گسترش نفت
A_1	۱/۹۵	–	۴	E_3	۰/۸۳۷	۳۰/۷۶	۱۰
A_2	۰/۰۵۸	–	–	F_1	۱/۴۷۵	۳۲/۳۰	۷
A_3	۰/۳۴۲	۱۳/۸۴	۵	F_2	۰/۴۹۴	۲۶/۱۵	۱۲
B_1	۱/۸۲۱	–	–	F_3	۰/۵۲۹	–	۱۹
B_2	۰/۳۵۵	–	–	G_1	۰/۲۵۳	۴۶/۱۵	–
B_3	۰/۱۹۰	–	۵	G_2	۰/۲۹۱	۴۴/۶۱	۱۵
B_4	۰/۵۴۱	–	۵	G_3	۰/۵۷۹	۴۳	۱۱
B_5	۰/۱۰۵	۴/۶۱	–	D_2	۱/۶۷۲	–	۳
C_1	۱/۰۹۷	–	–	D_3	۰/۷۰۶	۳۸/۴۶	۱۴
C_2	۰/۵۳۷	۹/۲۳	۳	D_4	۰/۸۳۰	–	۲
C_3	۰/۱۶۴	–	–	E_1	۰/۲۳۳	۱۵/۳۸	۱۰ mm
D_1	۰/۳۴۰	–	۵ mm	E_2	۱/۰۳۰	–	–

شناسایی بیوشیمیایی: پس از غربال‌گری نخستین، تست‌های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه‌های برتر انجام شد. در جدول ۴، نتایج حاصل از این تست‌ها برای هر سویه آمده است. این نتایج نشان می‌دهد سویه‌ها در برخی صفات بیوشیمیایی با یکدیگر تفاوت دارند و برخی با یکدیگر مشابه هستند.

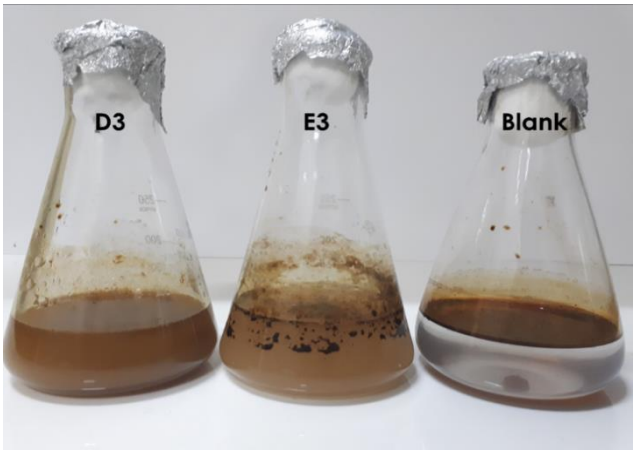
میزان رشد و حذف نفت خام توسط سویه‌های برتر: میزان رشد سویه‌های برتر با خواندن جذب نوری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. در جدول ۵، میزان رشد به‌صورت کمی و کیفی و درصد حذف نفت خام با هردو روش توسط هر سویه آمده است. نتایج حاصل از این جدول نشان داد نمونه‌های E_3 و D_3 با بیشترین درصد تجزیه برترین سویه‌های تجزیه شناخته شدند و برای تعیین توالی انتخاب شدند. شکل ۱ نیز تجزیهٔ نفت توسط این دو سویه در ارلن را نشان می‌دهد.

جدول ۴- نتایج تست‌های بیوشیمیایی ۱۰ سویهٔ برتر

نام سویه	TSI	O/F	سیمون‌سیترات	حرکت	H_2S	تولید اندول
A_1	اسید/قلیا	−/−	+ تأخیری	+	−	−
B_1	اسید/قلیا	−/−	+ تأخیری	−	−	−
C_1	اسید/اسید	−/−	−	+	−	−
C_2	قلیا/قلیا	−/−	+	+	−	−
D_2	اسید/قلیا	−/−	+	+	−	−
D_3	اسید/قلیا	+/+	−	−	−	−
E_2	قلیا/قلیا	−/−	+ تأخیری	+	−	−
E_3	اسید/قلیا	+/+	−	+	−	−
F_1	قلیا/قلیا	+/+	+	+	−	−
G3	اسید/قلیا	−/−	−	−	−	−

جدول ۵- میزان رشد و درصد حذف نفت خام توسط سویه‌های برتر پس از ۱۵ روز

نام سویه	OD_{600}	رشد کیفی	نوع امولسیون	درصد تجزیهٔ نفت (OD_{420})	درصد تجزیهٔ نفت (گراویمتری)
A_1	۰/۵۶	+	−	۱۲/۸۷	۷۰
B_1	۰/۶۷	+++	امولسیون ناقص	۵۵/۶۸	۹۰
C_1	۰/۶۶	++	−	۱۵/۵۳	۷۰
C_2	۰/۶۷	+	میکروگلوله	۱۳/۲۵	۶۲/۸۵
D_2	۰/۵۱	++	میکروگلوله	۲۴/۶۲	۷۱/۴۲
D_3	۲/۵۳	+++	امولسیون کامل	۶۸/۱۸	۹۱/۴۲
E_2	۰/۴۸	++	میکروگلوله	۷/۹۵	۵۷/۱۴
E_3	۱/۴۴	+++	امولسیون کامل	۶۰/۲۲	۹۷/۱۴
F_1	۰/۱۹	++	گلولهٔ نفتی	۱۰/۹۸	۴۷/۱۴
G_3	۰/۳۸	++	گلولهٔ نفتی	۲۰/۴۵	۵۵/۷۱

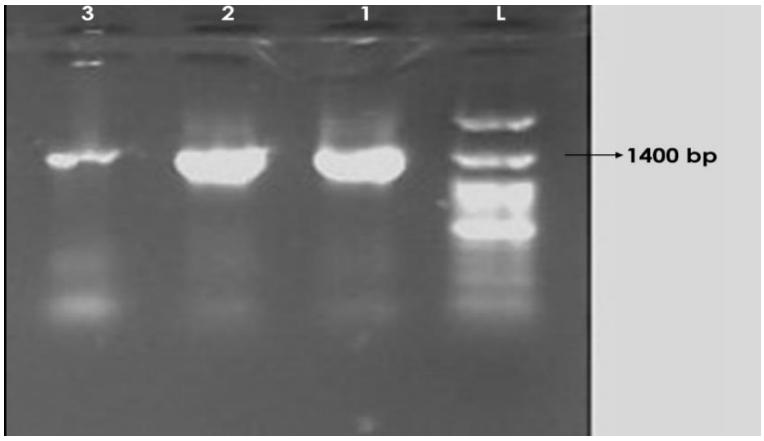


شکل ۱- تجزیهٔ نفت خام توسط برترین سویه‌های تجزیه‌کننده در ارلن

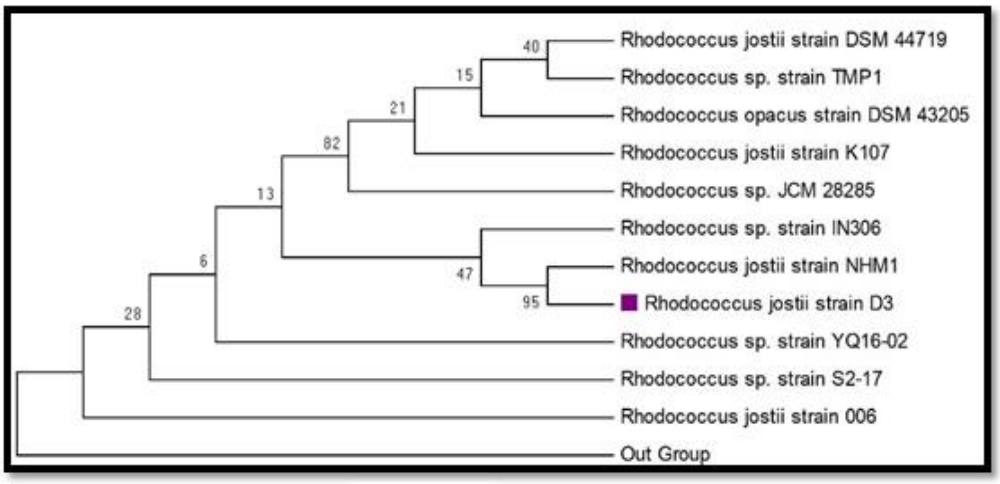
شناسایی مولکولی برترین سویه‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام: دو سویهٔ E3 و D3 که بهترین سویهٔ تجزیه‌کنندهٔ نفت خام در آزمایش‌های پیشین بودند، با تکثیر ژن *16S rRNA* شناسایی مولکولی شدند. در شکل ۲ نتیجهٔ حاصل از PCR آمده است که هردو سویه واجد باند ۱۴۰۰ جفت بازی بودند. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد بیشترین همسانی سویهٔ D_3 پس از بلاست‌کردن با جنس و گونهٔ *Rhodococcus jostii* تطابق دارد. شمارهٔ دستیابی توالی این سویه در پایگاه EMBL، LN856587 است. همچنین توالی به‌دست‌آمده برای سویهٔ E_3 نشان داد بیشترین همسانی این سویه پس از بلاست‌کردن با جنس و گونه *Arthrobacter citreus* تطابق دارد. شمارهٔ دستیابی توالی این سویه در پایگاه EMBL، LK391634 است. درخت فیلوژنی این دو سویه در شکل ۳ نشان داده شده است.

آنالیز گاز کروماتوگرافی میزان تجزیهٔ نفت در سویهٔ برتر D3: در شکل ۴، نتایج حاصل از گاز کروماتوگرافی به‌همراه طیف مربوط به سویهٔ D3 و شاهد آمده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، طیف‌های کروماتوگرافی سویهٔ D3 نسبت به شاهد کمتر شده‌اند که نشان‌دهندهٔ تجزیه و حذف ترکیبات نفتی است. درصد تجزیهٔ نفت خام توسط سویهٔ D3 با محاسبهٔ سطح زیرمنحنی طیف‌های گاز کروماتوگرافی حاصل از هر سویه با کسرکردن پیک حلال به دست آمد. نتیجه نشان داد این سویه توان حذف ۹۵درصد نفت خام را دارد؛ بنابراین، با این آنالیز نتایج به‌دست‌آمده از دو روش گراویمتری و اسپکترومتری، حذف نفت تأیید می‌شود؛ چون این سویه در این دو روش به‌ترتیب میزان ۹۱ و ۶۸درصد نفت خام را تجزیه کرده بودند.

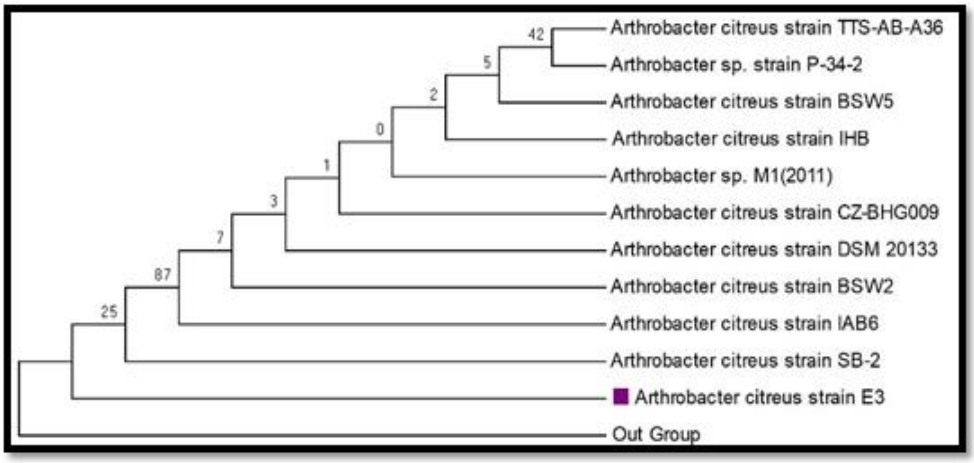
نتایج حاصل از اثر عوامل بر میزان تجزیهٔ نفت خام توسط سویه‌های برتر E3 و D3: اثر چهار غلظت نفت بر تجزیهٔ نفت خام به‌وسیلهٔ دو سویهٔ برتر بررسی شد. نتیجهٔ حاصل در شکل ۵ آمده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نفت خام از ۱/۵درصد به ۶/۵درصد، تجزیه به‌طور محسوسی کاهش یافته است. سویهٔ E3 تجزیهٔ بهتری نسبت‌به سویهٔ D3 در همهٔ غلظت‌ها داشت. بهترین غلظتی که هردو سویه می‌توانستند تجزیه کنند، غلظت ۱/۵درصد نفت بود. نتایج حاصل از سایر عوامل بررسی‌شده، در شکل ۶ آمده است. باتوجه‌به این شکل، تقریبا تمامی سویه‌ها رشد درخورتوجهی را در حضور منابع اضافی کربن از خود نشان دادند و رشد در حضور پپتون و گلوکز به‌خوبی صورت گرفته و تقریبا تجزیه به‌طور کامل انجام گرفته است. سویهٔ *R. jostii* strain D3 در تمامی شرایط نفت را به‌طور کامل تجزیه کرد. سویهٔ *A. citreus* strain E3 با اضافه‌کردن پپتون، تجزیهٔ بیشتری انجام داد و زمان تجزیه از ۱۵ روز به ۳ روز کاهش یافت و همچنین در این سویه اثر ترکیب منبع پپتون و گلوکز در تجزیه کمتر از اثر پپتون مشاهده شد. اثر کشت مخلوط، زمان تجزیه را از ۳۰ روز به ۳ روز کاهش داد که برتری کشت مخلوط دو سویهٔ D_3 و E_3 را در تجزیهٔ نفت خام نشان می‌دهد.



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول PCR سویه‌های برتر؛ چاهک L: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱: سویهٔ E3، چاهک ۲: سویهٔ D3، چاهک ۳: کنترل مثبت

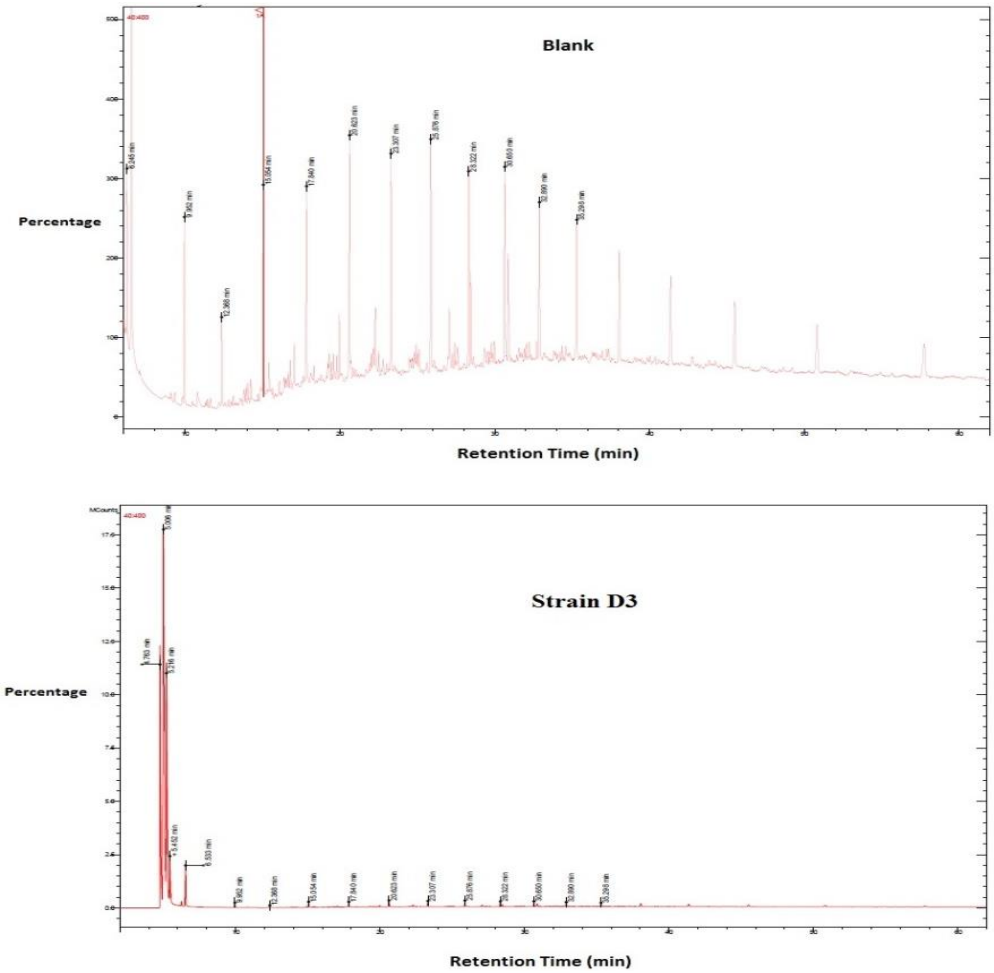


الف

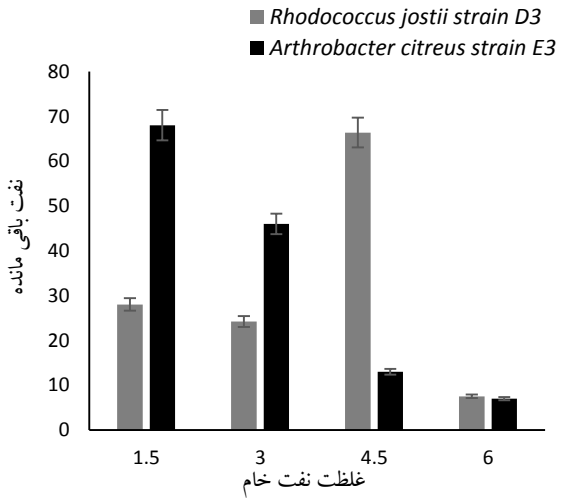


ب

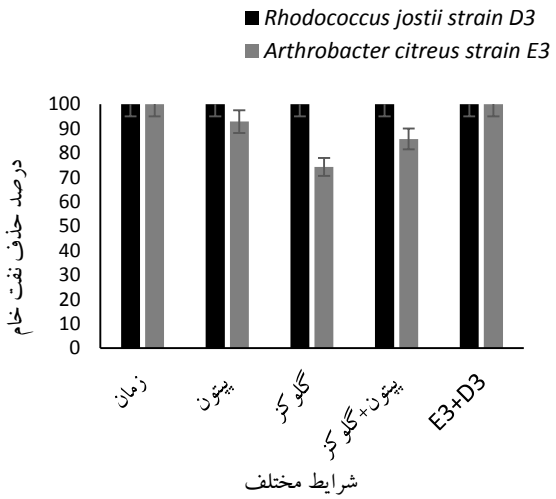
شکل ۳- درخت فیلوژنی دو سویهٔ برتر؛ این درخت فیلوژنی با نرم‌افزار مگا و از روش Neighbor-Joining رسم شده است. الف. درخت فیلوژنی سویهٔ D3، ب. درخت فیلوژنی سویهٔ E3



شکل ۴- پیک‌های گاز کرماتوگرافی حاصل از تجزیهٔ نفت خام به‌وسیلهٔ سویهٔ D3



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف نفت خام بر میزان تجزیهٔ نفت خام در دو سویهٔ E3 و D3



شکل ۶- اثر برخی عوامل بر میزان تجزیهٔ نفت خام توسط دو سویهٔ E3 و D3

بحث و نتیجه‌گیری

براساس گزارش‌های منتشرشده در سال ۲۰۰۳ مصرف جهانی نفت بیش از ۶۳/۵ میلیون بشکه در روز بود و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۳۰ به ۱۱۸ میلیون بشکه در روز برسد. ارزش سالانهٔ نفت خام طبیعی ۶۰۰,۰۰۰ تن در هر سال گزارش شده است. در چنین مواردی، استفاده از تکنیک‌های بیولوژیکی برای اصلاح سایت‌های آلوده روشی سازگار با محیط‌زیست، مقرون‌به‌صرفه و خودگردان شناخته شده و توجه دانشمندان محیط‌زیست را به خود جلب کرده است. باتوجه‌به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیطی حاد در محیط‌زیست های آلوده توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند (۱۸).

استفادهٔ گسترده از فرآورده‌های نفتی به آلودگی خاک و محیط آبزی می‌انجامد؛ درنتیجه تهدیدی جدی ازنظر سلامتی بر همهٔ اشکال زندگی ازجمله انسان به شمار می‌آید. اصلاح زیستی روشی مقرون‌به‌صرفه و بی‌خطر ازنظر زیست‌محیطی برای اصلاح سایت‌های آلودهٔ نفتی در نظر گرفته شده است؛ بنابراین، جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت و بهینه‌سازی شرایط برای فرایند تجزیه از جنبه‌های مهم میکروبیولوژی است (۱۹). در این پژوهش کمیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام و هتروتروف در مکان‌های مختلف آلوده به نفت مسجدسلیمان ارزیابی شد. این نتیجه به دست آمد که باکتری‌های هتروتروف نسبت‌به تجزیه‌کننده، کمیت بیشتری در همهٔ خاک‌ها داشتند. این نتیجه را این‌طور می توان تفسیر کرد که باکتری‌های هتروتروف موجود در خاک از سایر منابع کربنی موجود در خاک استفاده می‌کنند؛ ولی باکتری‌های تجزیه‌کننده فقط از نفت به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده می‌کنند؛ بنابراین، کمیت هتروتروف‌ها بیشتر از تجزیه‌کننده‌ها خواهد شد. سایر پژوهش‌گران نیز نتیجهٔ مشابهی از تعیین کمیت این دو گروه از باکتری‌ها در خاک گزارش کرده‌اند؛ مثلا اوبافمی[9] و همکاران کمیت باکتری‌ها را در خاک‌های قدیمی آلوده به مواد نفتی در ایستگاه نفتی اوگان[10] در جنوب غربی نیجریه بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد تعداد باکتری‌های هتروتروف در محدودهٔ cfu/g $۴/۵\times۱۰^{۷}$ – $۲/۶\times۱۰^{۷}$ و تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده cfu/g $۱/۲$–$۱/۵\times۱۰^{۴}$ بود. این مطالعه نشان داد نسبت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن به باکتری‌های هتروتروف، زیر نیم‌درصد بود و چنین مشاهده شد که در خاک‌های غیرآلوده معمولا فراوانی باکتری‌های مصرف‌کنندهٔ هیدروکربن نسبت‌به باکتری‌های هتروتروف کمتر از یک‌درصد است؛ بنابراین، آلودگی نفتی خاک می‌تواند باکتری‌های هتروتروف عادی را به باکتری‌های مصرف‌کنندهٔ هیدروکربن تبدیل کند (۲۰). در این پژوهش از خاک‌های بررسی‌شده ابتدا ۲۴ باکتری تجزیه‌کنندهٔ نفت خام جداسازی شد. پس از انجام آزمایش‌های غربال‌گری تعداد ۱۰ باکتری انتخاب شدند که توانایی بیشتری در تجزیهٔ نفت خام داشتند. میزان رشد و حذف نفت خام توسط این ۱۰ سویهٔ برتر انجام شد و دو سویه به‌عنوان برترین سویه‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام مشخص شدند. این سویه‌ها متعلق‌به دو جنس *Arthrobacter* و *Rhodococcus* بودند. گزارش‌های زیادی دربارهٔ جداساز باکتری‌های تجزیه‌کننده از خاک‌های آلوده به نفت در ایران و سایر مناطق دنیا وجود دارد که در اینجا برای مقایسه با این پژوهش چند نمونه ذکر می‌شود. چیکر[11] و همکاران یک سایت آلوده به نفت در نیجریه را بررسی کردند. آنها نتیجه گرفتند فراوانی باکتری‌های گرم‌منفی تجزیه‌کننده در مناطق آلوده معمولا نسبت‌به باکتری‌های گرم‌مثبت بیشتر است و

باکتری‌های گرم‌مثبت در طول تجزیه هرگز متنوع و غالب نبوده‌اند و معمولا در طی زمان و با انطباق با شرایط خاص متابولیکی حاکم می‌شوند. آنها جنس‌های مختلفی از اکتینومیست‌های گرم‌مثبت مؤثر در حذف هیدروکربن های نفتی را جداسازی کردند. باکتری‌ها مربوط به جنس های *Gordonia*، *Rhodococcus*، *Corynebacterium*، *Nocardia*، *Mycobacterium* و *Arthrobacter* بودند. این مطالعات اثبات کرد اکتینومیست‌هایی مانند *Rhodococcus*، *Gordonia*، *Nocardia* و *Mycobacterium* به‌دلیل توانایی‌های کاتابولیکی گسترده، انعطاف‌پذیری در محیط‌های خشک و گرمسیری و تولید بیوسورفکتانت اهمیت زیستی زیادی دارند (۲۱).

در این پژوهش، مطابق با پژوهش پیشین، فراوانی باکتری‌های گرم‌منفی از باکتری‌های گرم‌مثبت بیشتر بود و نیز سویه‌های جداسازی‌شده از یک منطقهٔ گرم‌وخشک و با شرایط بدون آب و تقریبا بیابانی جداسازی شدند و درصد زیاد تجزیه تا ۷۰درصد در سویهٔ *Arthrobacter citreus* و تولید بیوامولسیفایر پایدار، نشان‌دهندهٔ توانایی زیاد سویه‌ها در تجزیهٔ نفت و تولید مواد شبه‌بیوسورفکتانت در محیط‌های با خشکی بسیار زیاد است. شینی[۱۲] و همکاران ۱۰ سویهٔ باکتریایی از لجن نفتی چاه شمارهٔ ۹ مسجدسلیمان جداسازی کردند. میزان حذف نفت و میزان نفت باقی‌مانده با استفاده از روش گراویمتری انجام شد که ۲ سویهٔ *Arthrobacter aurescens* MIS1 و *Pseudomonas aeruginosa* MIS2 تجزیهٔ نفت را در مدت ۷ روز به‌ترتیب با بازدهی ۶۲ و ۷۲درصد انجام دادند (۲۲). در این پژوهش، باکتری *Rhodococcus jostii* برای نخستین‌بار از خاک‌های آلوده نفتی اطراف چاه شمارهٔ ۹ مسجدسلیمان (بی‌بیان) و باکتری *Arthrobacter citreus* از منطقهٔ مدرسه‌خارجی ها (چاه شمارهٔ ۳۴) جداسازی شد. میزان نفت باقی‌مانده نیز با روش گراویمتری بررسی شد و باکتری *Rhodococcus jostii* رشد بسیار زیادی را در غلظت ۳ و ۴/۵درصد نفت خام نشان داد و میزان تجزیه در غلظت ۴/۵درصد نفت خام ۴۱درصد بود که باتوجه‌به شرایط خشک منطقه و آلودگی‌های بسیار قدیمی در نوع خود کم‌نظیر است. همچنین باکتری‌ها ازنظر فعالیت امولسیون‌کنندگی و گسترش قطره نیز بررسی شدند. کورال[۱۳] و همکاران سویهٔ *Arthtobacter sp.* K1 را از یک خاک آلوده به نفت خام در پالایشگاه مرسین[۱۴] ترکیه جداسازی کردند که توان تجزیهٔ دی‌نیتروتولوئن به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی را داشت. زوکل[۱۵] و همکاران *Rhodococcus erythropolis* CCM2595 و *Rhodococcus jostii* را باکتری‌هایی معرفی کردند که به‌طور مؤثر توان تجزیهٔ فنل و دیگر ترکیبات آروماتیک را دارند. در پژوهش آنها ژن‌های کامل درگیر در مسیر تجزیه شناسایی و تعیین توالی شدند. آنها دریافتند آنزیم اصلی در مسیر تجزیهٔ فنل ترکیب فنل‌هیدروکسیلاز است و زمانی که فنل و سوکسینات در محیط حضور داشته باشند، این آنزیم فعال می‌شود (۲۳، ۲۴). باتوجه‌به آلودگی‌های نفتی گسترده در شهرستان مسجدسلیمان، به‌کارگیری روش‌های تجزیهٔ زیستی در کاهش و حذف لکه‌های نفتی از خاک بسیار مهم است. باتوجه‌به اینکه روش‌های فیزیکی و شیمیایی در ازبین‌بردن آلودگی‌های هیدروکربنی ازنظر اقتصادی بسیار پرهزینه است و ممکن است موجب تجزیهٔ ناقص آلاینده‌ها شود، روش‌های زیستی و استفاده از باکتری‌های جداسازی‌شدهٔ بومی راهبردی معقول و مقرون‌به‌صرفه برای حذف آلودگی های نفتی محسوب می‌شود. باتوجه‌به ویژگی‌های اقلیمی

شهرستان مسجدسلیمان که در ناحیه‌ای گرم‌وخشک قرار دارد، تنوع باکتری‌های مختلف تجزیه‌کننده در خاک زیاد بود و سویه‌ها قابلیت زیادی در حذف غلظت‌های مختلف نفت خام و با حداقل مواد مغذی نشان دادند. این ویژگی باکتری‌های جداسازی‌شده، ظرفیت زیاد سویه‌ها را در استفاده در سطح میدانی برای احیا و پاک‌سازی خاک نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

نویسندگان از شرکت ملی مناطق نفت‌خیز جنوب، شرکت بهره‌برداری نفت‌وگاز مسجدسلیمان، جناب آقای مهندس کریم سوارنژاد، متصدی واحد تجهیزات اختصاصی و مواد ناریهٔ شرکت بهره‌برداری نفت‌وگاز مسجدسلیمان و افسر آموزش سازمان حراست وزارت نفت برای همکاری در مراحل مختلف نمونه‌برداری پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

(1) Xia M., Fu D., Chakraborty R., Singh RP., Terry N. Enhanced crude oil depletion by constructed bacterial consortium comprising bioemulsifier producer and petroleum hydrocarbon degraders. *Bioresource technology* 2019; 282: 456- 463.

(2) Cameotra SS., Singh P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2008; 62 (3): 274- 280.

(3) Hassanshahian M., Tebyanian H., Cappello S. Isolation and characterization of two crude-oil degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32 from Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin* 2012; 64 (7): 1386- 1391.

(4) Hassanshahian M., Emtiazi G., Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletion* 2012; 64 (1): 7- 12.

(5) Hassanshahian M., Ahmadinejad M., Tebyanian H., Kariminik A. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Marine Pollution Bulletion* 2013; 73 (1): 300- 305.

(6) Shen T., Pi Y Bao M., Xu N., Li Y., Lu J. Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. *Environmental Science Processes & Impacts* 2015; 17 (12): 2022-2033.

(7) Abbasi shehni D. *The History of Masjed Soleyman from ancient to today* (*The history of the oil industry*). 4rd ed. Tehran: Hirmand; 2015.

(8) Hesham AE., Alrumman SA., Al-Amari JA. 16S rDNA Phylogenetic and RAPD–PCR Analyses of Petroleum Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Degrading Bacteria Enriched from Oil-Polluted Soils. *Arabian Journal for Science and Engineering* 2016; 41 (6): 2095-2106.

(9) Balba MT., Al-Awadhi N., Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological methods* 1998; 32 (2): 155-164.

(10) Hassanshahian M., Emtiazi G., Kermanshahi RK., Cappello S. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. *Soil and Sediment Contamination* 2010; 19 (3): 277- 291.

(11) Wrenn BA., Venosa AD. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian journal of microbiology* 1996; 42 (3): 252-258.

(12) Wrenn BA., Venosa AD. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian journal of microbiology* 1996; 42 (3): 252- 258.

(13) Russel M., Li X., Qu M., Wu M., Liu L., Alam MM. Exploring the novel indigenous strains for degrading the crude oil contaminants in soil sample. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2018; 16: 1- 12.

(14) Sun W., Dong Y., Gao P., Fu M., Ta K., Li J. Microbial communities inhabiting oil-contaminated soils from two major oilfields in Northern China: Implications for active petroleum-degrading capacity. *Journal of microbiology* 2015; 53 (6): 371- 378.

(15) Hassanshahian M., Zeynalipour MS., Hosseinzadeh Musa F. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine Pollution Bulletion* 2014; 82: 39- 44.

(16) Hassanshahian M., Yakimov MM., Denaro R., Genovese M., Cappello, S. Using Real-Time PCR to assess changes in the crude oil degrading microbial community in contaminated seawater mesocosms. *International Biodeterioration Biodegradation* 2014; 93: 241- 248.

(17) Latha R., Kalaivani R.. Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. *Advances in Applied Science Research* 2012; 3 (5): 2789- 2795.

(18) Hassanshahian M. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Marine Pollution Bulletion* 2014; 86 (1): 361- 366.

(19) Dadrasnia A., Usman MM., Wei KS., Velappan RD., Jamali H., Mohebali N., Ismail S. Native soil bacterial isolate in Malaysia exhibit promising supplements on degrading organic pollutants. *Process Safety and Environmental Protection* 2016; 100: 264- 271.

(20) Bell KS., Philp JC., Aw DW., Christofi N. The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 1998; 85 (2): 195- 210.

(21) Obafemi YD., Taiwo OS., Omodara OJ., Dahunsi OS., Oranusi S. Biodegradation of crude petroleum by bacterial consortia from oil-contaminated soils in Ota, Ogun State, South-Western, Nigeria. *Environmental technology & innovation* 2018; 12: 230- 242.

(22) Chikere CB., Okpokwasili GC., Chikere BO. Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. *African Journal of Biotechnology* 2009; 8 (11): 2535- 2540.

(23) Sheyni Y., Motammadi H., Pourbabai A. Isolation and identification of crude oil degrading bacteria from oil waste of nine reservoir in Masjed Soleyman. *Biological Journal of Microrganisms* 2014; 3 (10); 13- 26.

(24) Küce P., Coral G., Kantar Ç. Biodegradation of 2, 4-dinitrotoluene (DNT) by *Arthrobacter sp*. K1 isolated from a crude oil contaminated soil. *Annals of microbiology* 2015; 65 (1): 467- 476.

(25) Szőköl J., Rucká L., Šimčíková M., Halada P., Nešvera J., Pátek M. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Applied microbiology and biotechnology* 2014; 98: 8267- 8279.

[1]- Petroleum Hydrocarbon
[2]- Sterile Polythene Bags
[3]- Colony Forming Unit
[4]- Most Probable Number
[5]- Erlenmeyer Flasks
[6]- Gravimetric Analaysis
[7]- Dichloromethane
[8]- Gas Chromatography
[9]- Obafemi
[10]- Ogun
[11]- Chikere
[12]- Sheyni
[13]- Coral
[14]- Mersin
[15]- Szőköl