A Comparative Study on Four Strains of Petroleum Hydrocarbon-degrading Bacteria for the Bioremediation of Petroleum-contaminated Soils

Khosrow Sadighbayan
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran, sadighbayan@yahoo.com
Abbas Farazmand*
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran, farazmand@irost.ir
Mahnaz Mazaheri-Asadi
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran, mxmazaheriassadi@yahoo.com
Alireza Monadi Sefidan
Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, tums.monadi@gmail.com
Nasser Aliasgharzad
Department of Soil Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran, n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

Abstract

Introduction: Pollution caused by oil extraction processing stimulates the growth of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria. Bioremediation, a process that utilizes the capability of microorganisms to degrade petroleum hydrocarbon compounds, is emerging as a promising technology for the treatment of soil and groundwater contamination. This paper aimed to separate petroleum-degrading bacteria and to investigate their applicability in the bioremediation of petroleum-contaminated soils.

Materials and methods: Sampling was done from the soil of a refinery area. A mineral culture-medium environment containing n-hexane was used for isolation. Isolated bacteria were identified by biochemical methods and 16S rRNA sequencing. Phytotoxicity test was performed by measuring the percentage of *Lepidium sativumm* seed germination. Contaminated soil bioremediation was performed using the selected strains in the laboratory and the environment over three months.

Results: A total of 19 bacteria isolates capable of growing on mineral medium containing n-hexane were isolated. Among the isolated strains, four strains had the highest ability to biodegrade the petroleum compounds of anthracene, naphthalene, and phenanthrene. By the molecular identification method, the selected strains were identified as *Stenotrophomonas maltophilia (SB10)*, *Bacillus subtilis subsp.spizizenii (SB7)*, *Streptomyces ambofaciens (SB14)*, and *Cupriavidus respiraculi (SB16)*. The treatment of petroleum-contaminated soils using *S. maltophilia (SB10)* increased the population of petroleum-degrading bacteria from 5.2×10^3 to 1.4×10^4 at the end of the third month. The rate of biodegradation of the total petroleum hydrocarbons reached 80% and the germination power of *Lepidium sativumm* reached 68% at the end of the third month.

Discussion and conclusion: The addition of the selected bacterial strains to soil contaminated with petroleum compounds increased the population of degrading bacteria. The use of degrading bacteria along with sawdust improved the purification of petroleum-contaminated soils.

Key words: Bioremediation, Petroleum hydrocarbon, Contaminated soils, Biodegradation

* Corresponding author
Received: April 6, 2020 / **Accepted:** July 19, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال دهم، شماره ۳۷، بهار ۱۴۰۰ ، ص، ۵۱ - ۶۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۹
doi: 10.22108/BJM.2020.122322.1290

بررسی مقایسه‌ای چهار سویهٔ باکتریایی تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی در زیست‌پالایی خاک آلوده به ترکیبات نفتی

خسرو صدیق‌بیان: پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، sadighbayan@yahoo.com
عباس فرازمند*: استادیار گروه زیست‌فناوری صنعتی و محیط‌زیست، پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، farazmand@irost.ir
مهناز مظاهری اسدی: استاد گروه زیست‌فناوری صنعتی و محیط‌زیست، پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، mxmazaheriassadi@yahoo.com
علیرضا منادی سفیدان: دانشیار دانشکدهٔ پیراپزشکی- علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، tums.monadi@gmail.com
ناصر علی‌اصغرزاد: استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

چکیده

مقدمه: آلودگی ایجادشده از استخراج و فراوری نفت، موجب تحریک رشد باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی شده است. زیست‌پالایی فناوری امیدبخشی برای تصفیهٔ آب و خاک‌های آلوده با بهره‌مندی از میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی است. هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی و بررسی قابلیت استفاده از آن در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از خاک آلودهٔ یک منطقهٔ پالایشگاهی صورت گرفت. از محیط کشت معدنی حاوی **n**-هگزان برای جداسازی استفاده شد. از روش‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی *16S rRNA* باکتری‌های جداسازی‌شده شناسایی شدند. آزمون سمیت خاک با اندازه‌گیری میزان درصد جوانه‌زنی بذر گیاه شاهی صورت گرفت. زیست‌پالایی خاک آلوده با استفاده از سویه‌های منتخب در آزمایشگاه و در محیط، طی یک دورهٔ سه‌ماهه انجام شد.

نتایج: تعداد ۱۹ سویهٔ باکتریایی با قابلیت رشد برروی محیط کشت معدنی حاوی **n**-هگزان جداسازی شدند. از میان سویه‌های جداسازی‌شده، چهار سویه از توانایی بیشتری برای تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفتی آنتراسن، فنانترن و نفتالین برخوردار بودند. با روش شناسایی مولکولی، سویه‌های منتخب با عنوان *Stenotrophomonas maltophilia* (SB10)، *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* (SB7)، *Streptomyces ambofaciens* (SB14) و *Cupriavidus respiraculi* (SB16) شناسایی شدند. تیمار خاک آلودهٔ نفتی با استفاده از سویهٔ *S. maltophilia* (SB10)، موجب افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی از $۵/۲\times۱۰^{۳}$ به $۱/۴\times۱۰^{۴}$ در پایان ماه سوم شد. میزان تجزیهٔ زیستی کل هیدروکربن‌های نفتی در پایان ماه سوم، به میزان ۸۰درصد و قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی در خاک تیمارشده به ۶۸ درصد رسید.

بحث و نتیجه‌گیری: افزودن سویه‌های باکتریایی منتخب به خاک آلوده به ترکیبات نفتی، موجب افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده شد. استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده همراه با خاک‌اره موجب بهبود پاک‌سازی خاک‌های آلوده نفتی شد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌پالایی، هیدروکربن‌های نفتی، خاک‌های آلوده، 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

آلودگی‌های نفتی تقریباً پیامد اجتناب‌ناپذیر افزایش مصرف انرژی و فعالیت‌های صنعتی‌ای است که برپایهٔ مصرف نفت قرار گرفته‌اند. امروزه فناوری زیست‌پالایی میکروبی به‌سرعت توسعه یافته و به دستاوردهای بزرگی رسیده است؛ بااین‌حال، این فناوری متأثر از عوامل محیطی زیادی است که مانع کاربرد عملی آن می‌شوند و استفادهٔ گستردهٔ آن را محدود می‌کنند (۱). به‌علاوه، فعالیت‌های بشر برای تأمین نیازهای انرژی خود به نفت متکی است و همین امر باعث شکوفایی صنعت پتروشیمی شده است؛ بااین‌حال، استفاده از نفت به وخیم‌شدن وضع محیط‌زیست می‌انجامد (۲). توسعهٔ زیست‌فناوری میکروبی و فناوری تعیین توالی با توان بالا مانند روش‌های میکروسیالی برای غربال‌گری و شناسایی میکروارگانیسم‌های عمل‌گرا از محیط‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی مفید است. بسیاری از پژوهش‌ها نشان داده‌اند تعداد زیادی از باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربنی در محیط‌های غنی‌شدهٔ نفتی، مانند مناطق نشت نفتی و مخازن نفتی وجود دارد (۳). فراوانی و نوع میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربنی تا حد زیادی به نوع هیدروکربن‌های نفتی و عوامل محیطی اطراف آن بستگی دارد. لی[1] و همکارانش تجزیهٔ هگزان و سایر ترکیبات هیدروکربن‌های نفتی را با استفاده از یک سویهٔ جدید *Rhodococcus* sp. EH831 بررسی کردند. این باکتری که از محیط کنسرسیوم تجزیه‌کنندهٔ هگزان جداسازی شده است، می‌تواند هگزان و انواع هیدروکربن‌ها شامل الکل‌ها، هیدروکربن‌های کلردار، آلکان‌های حلقوی و هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کند (۴). بررسیِ اثرِ غلظت مواد، دما، pH و غلظت نفت خام موجود در محیط بر تخریب زیستی هیدروکربن‌های نفتی در *Pseudomonas aeruginosa* ثابت کرده است که بیشترین میزان تخریب (۹۱/۵درصد) در pH=۸، دمای $28\,^{\circ}C$ و غلظت ۲-۰/۱درصد نفت خام صورت گرفته است و بیشترین فعالیت این باکتری برروی روغن‌موتور، نفت خام، سوخت دیزل، کروسن، نفتالین، آنتراسن و گزیلن است (۵). سانجت[2] و همکارانش در پژوهش خود در مقیاس واقعی و میدانی با افزودن میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک‌های شهری آلوده به نفت در مدت ۱۲۰ روز مشاهده کردند این تلقیح باعث تخریب هیدروکربن‌های کل نفتی در حدود ۸۹/۷ تا ۹۲درصد و به‌خصوص آلکان‌ها ۹۴/۲درصد و ترکیبات آروماتیک در حدود ۹۱/۹درصد می‌شود و حتی ترکیبات آسفالتن در حد ۸۵/۲درصد در مدت یک سال تخریب شد (۶). در پژوهش‌های انجام‌شده بر پاک‌سازی مجتمع‌های آلوده به مازوت با استفاده از کمپلکس باکتری‌های موجود در مناطق آلوده، نشان داده شده است درصورتِ مناسب‌بودن شرایط جوّی در عرض ۵۳ روز، میزان پاک‌سازی مفید به ۹۵درصد خواهد رسید. معلوم شد در طی پاک‌سازی اراضی مجتمع‌های صنعتی کاغذ و سلولز، استفاده از پسماند این مجتمع می‌تواند به‌عنوانِ تثبیت‌کننده در تجزیهٔ ترکیبات نفتی به کار رود (۷). ماین[3] و همکارانش در پژوهش خود از باکتری‌های مناطق آلوده، کمپوست تهیه کردند و با استفاده از مواد حجیم (تثبیت‌کننده) مانند کاه جو، مواد مغذی، رطوبت و کوسوبستراها ترکیب مناسبی برای زیست‌پالایی تهیه کردند. با سنجش میزان دی‌اکسید کربن و کاهش هیدروکربن باقی‌مانده (هیدروکربن کل تا ۳۰درصد

شامل C15-C30 و هیدروکربن‌های اشباع‌شدهٔ آروماتیک تا دوسومِ میزان اولیه) توانستند حضور فعال میکروب‌های دارای قابلیت تخریب را در خاک‌های آلودهٔ شهری اثبات کنند (۸).

در یکی از پالایشگاه‌های اسپانیا پیشنهاد شده است از کنسرسیوم باکتری‌های مناطق آلوده به ترکیبات نفتی در شهر به‌عنوانِ روشی کم‌هزینه برای افزایش زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت استفاده شود. این طرح در خاک‌های با میزان آلودگی هیدروکربن زیاد (۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم در کیلوگرم خاک) در شرایط نیمه‌خشک انجام شده است و طی سه ماه با استفاده از خاک‌اره، تراشه‌های چوب و کود آلی مایع و فضولات خوک، موفق شدند هیدروکربن‌های اولیه را ۶۰درصد پاک‌سازی کنند (۹).

پژوهش‌ها نشان می‌دهد برای پاک‌سازی زیستی آلودگی‌های نفتی، استفاده از جمعیت میکروبی جداشده از خاک‌های آلوده و صنعتی اهمیت به‌سزایی دارد. پژوهشگران به تثبیت میکروارگانیسم‌های روی حامل‌های مناسب مانند خاک‌اره برای انجام فرایند بهتر پاک‌سازی زیستی توجه کرده‌اند (۱۰).

هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی از خاک‌های آلوده به مواد نفتی و انتخاب و شناسایی سویه‌های با ظرفیت بیشتر برای تجزیه است تا بتوان از آن در آزمایش‌های زیست‌پالایی خاک‌های آلوده استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

غربال‌گری و شمارش باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی: برای غربال‌گری و تعیین تعداد باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن از محیط کشت ریموند[۴] استفاده شد که یک محیط کشت معدنی حاوی n-هگزان (۱درصد v/v) به‌عنوانِ تنها منبع انرژی و کربن است. هگزان ترکیبی شاخص از ترکیبات آلی فرّار است که از اجزای تشکیل‌دهندهٔ گازوئیل محسوب می‌شود. برای تهیهٔ یک لیتر محیط کشت جامد از ترکیبات زیر (بر حسب گرم) استفاده شد:

$CaCl_2,6H_2O$(0.01) Na_2HPO_4(0.7) $MgSO_4$(0.2) NH_4Cl(2) $MnSO_4,5\ H_2O$ (0.02) KH_2PO_4(0.5)
Na_2CO_3 (0.1) آگار آگار (15)

برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌ها، پس از تهیهٔ رقت‌های ۵-۱۰- ۴-۱۰ از سوسپانسیون خاک آلوده از پالایشگاه نفت شهر تبریز در پلیت‌های حاوی محیط کشت معدنی و n-هگزان (به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی) تلقیح انجام شد. کشت در مدت ۷ روز و دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از شمارش تعداد کلنی‌های رشدیافته، جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ n-هگزان محاسبه شد.

شمارش تعداد کل باکتری‌ها در نمونه‌های خاک: با تهیهٔ رقت‌های متوالی از نمونه‌های خاک در آب‌مقطر، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در پلیت استریل ریخته شد و برروی آن از محیط کشت آگار غذایی[۵] ذوب‌شده ریخته شد (برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها از سیکلوهگزامید استفاده شد). پلیت‌های کشت‌شده در انکوباتور ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد برای رشد میکروارگانیسم‌ها قرار داده شدند. پس از رشد کلنی‌های میکروبی، در پلیتی که دارای ۲۰۰-۳۰ کلنی باکتریایی

بود، شمارش انجام گرفت و تعداد کل میکروارگانیسم‌ها باتوجه‌به ضریب رقت محاسبه شد (۱۱).

بررسی تأثیر تجزیه‌کنندگی جدایه‌ها بر انواع هیدروکربن‌های زنجیره‌ای و آروماتیک: به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی مایع، ۵درصد ترکیبات نفتی (آنتراسن، فنانترن و نفتالین به‌صورتِ جداگانه) و دو میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی با کدورتی برابر با استاندارد نیم مک‌فارلند[۶] از باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ جداشده در مرحلهٔ پیش اضافه شد. این محیط کشت مایع به‌مدتِ یک هفته در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد در داخل انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه قرار گرفت و در ساعات مشخص، یک میلی‌لیتر از محلولْ نمونه‌برداری شد و میزان جذب نوری آن با روش نفلومتری و کدورت‌سنجی در طول موج ۶۲۵ نانومتر برای مشخص‌شدن رشد میکروارگانیسم‌ها اندازه‌گیری شد (۱۲).

برای مقایسهٔ میانگین نتایج به‌دست‌آمده، از آزمون تحلیل واریانس استفاده شد. فاصلهٔ اطمینان برای آنالیز واریانس، ۹۵درصد در نظر گرفته شد. تمام اعداد P با ۰/۰۵ مقایسه شدند و نتایج کمتر از ۰/۰۵ عامل مؤثر بر افزایش زیست‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی در نظر گرفته شد.

تیمار خاک‌های آلوده به نفت با باکتری‌های منتخب در شرایط آزمایشگاهی و محیطی: به‌منظورِ ارزیابی حذف آلودگی نفتی از خاک آلوده، باتوجه‌به میزان قابلیت تجزیه‌کنندگی باکتری‌های غربال‌شده، از سویه‌هایی استفاده شد که در مقایسه با سایر جدایه‌ها کارآمدتر بودند.

برای بررسی و مقایسهٔ شرایط محیط آزمایشگاهی (استفاده از گرم‌خانهٔ ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد) بر روند زیست‌پالایی، با استفاده از ظروف آزمایشگاهی حاوی یک کیلوگرم خاک آلوده از پالایشگاه نفت شهر تبریز، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون نمک‌های معدنی[۷] حاوی 1×10^{7} cfu/ml هریک از سویه‌های منتخب به‌طورِ جداگانه اضافه شد. از دو گلدان حاویِ فقط خاک، بدون مکمل باکتریایی (با و بدون افزودن مواد معدنی تقویت‌کنندهٔ رشد میکروارگانیسم‌های موجود در خاک اولیه) به‌عنوانِ کنترل و شاهد استفاده شد. شش گلدان مربوط به هریک از باکتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدتِ ۹۰ روز قرار گرفت. به فاصلهٔ هر ۳۰ روز، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول گلوکز (۰/۱ گرم در لیتر) به آن اضافه شد. تمامی گلدان‌ها هر یک هفته یک بار با آب شهری آبیاری شدند. برای بررسی و مقایسهٔ شرایط محیط طبیعی (دمای محیط) بر روند زیست‌پالایی، تعداد چهار سبد پلاستیکی آماده شد و به هرکدام ۱۰ کیلوگرم خاک آلودهٔ پالایشگاه نفت اضافه شد. یک لیتر محیط حاوی نمک‌های معدنی و 1×10^{7} cfu/mL از هریک از سویه‌های باکتریایی منتخب به‌طورِ مجزا به ظروف آزمایش اضافه شد. در یک سبد دیگر ۱۰ کیلوگرم خاک و یک لیتر محلول معدنی بدون باکتری برای تقویت رشد باکتری‌های موجود در خاک اولیه و در سبد آخر فقط ۱۰ کیلوگرم خاک بدون باکتری و بدون محلول معدنی صرفاً به‌عنوانِ شاهد آماده شد. تمامی نمونه‌ها در شرایط محیطی و محوطهٔ پالایشگاه نگهداری شدند. برای افزایش تکثیر و قدرت میکروارگانیسم‌ها به فاصلهٔ هر ۳۰ روز، یک لیتر از محلول گلوکز (۰/۱ گرم در لیتر) اضافه شد. در هردو حالت آزمایشگاهی و محیطی، میزان رطوبت با آبیاری منظم و هوادهی (با به‌هم‌زدن خاک هر ۱۵ روز یک بار) در محدودهٔ بهینه (تقریباً ۵۰درصد) تنظیم شد (جدول ۱) (۱۳).

تاثیر افزودن خاک‌اره در زیست‌پالایی خاک آلوده به ترکیبات هیدروکربن نفتی: برای بررسی اثر استفاده از خاک‌اره در سرعت و میزان زیست‌پالایی، مطابق روش ذکرشده در بالا، به همان تعداد گلدان و سبد برای شرایط آزمایشگاهی و محیطی محوطهٔ پالایشگاه تهیه شد. در نمونهٔ گلدان‌های آزمایشگاهی، مقدار ۱۰۰ گرم و در سبدهای محیطی، مقدار یک کیلوگرم خاک‌اره اضافه شد و در شرایط مشابه در آزمایشگاه و محیط بیرون قرار داده شدند (جدول ۱) (۱۲).

جدول ۱- تیمار خاک آلوده به نفت با استفاده از سویه‌های منتخب در شرایط آزمایشگاهی و محیطی

ردیف	کد نمونه	سویهٔ باکتری آزمایش‌شده	شرایط تیمار	مقدار خاک (kg)	مواد معدنی (ml)	خاک اره (g)
۱	A1	SB10	آزمایشگاهی	۱	۱۰۰	------
۲	A2	SB10				۱۰۰
۳	B1	SB16				------
۴	B2	SB16				۱۰۰
۵	C1	SB14				------
۶	C2	SB14				۱۰۰
۷	D1	SB7				------
۸	D2	SB7				۱۰۰
۹	E1	-----				------
۱۰	E2	------				۱۰۰
۱۱	E3	------			------	------
۱۲	E4	------			------	۱۰۰
۱۳	a1	SB10	محیطی	۱۰	۱۰۰۰	------
۱۴	a2	SB10				۱۰۰۰
۱۵	b1	SB16				------
۱۶	b2	SB16				۱۰۰۰
۱۷	c1	SB14				------
۱۸	c2	SB14				۱۰۰۰
۱۹	d1	SB7				------
۲۰	d2	SB7				۱۰۰۰
۲۱	e1	------				------
۲۲	e2	------				۱۰۰۰
۲۳	e3	------			------	------
۲۴	e4	------			------	۱۰۰۰

بررسی جمعیت باکتریایی، وضعیت شیمیایی و سمّیت خاک‌های تیمارشده: به‌منظورِ بررسی جمعیت باکتریایی، وضعیت شیمیایی و سمّیت خاک‌های تیمارشده، با نمونه‌برداری در نخستین روز انجام

آزمایش، پایان ماه اول، دوم و سوم پژوهش، شمارش جمعیت باکتری‌های کل و باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتیْ میزان هیدروکربن کل باقی‌مانده و درصد جوانه‌زنی گیاه شاهی[۸] در تمامی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (۱۲).

شناسایی فیلوژنیک جدایه‌های منتخب ازطریقِ تعیین توالی ژن *16S rRNA*: پس از شناسایی مقدماتی جدایه‌ها براساسِ ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی، شناسایی براساسِ تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام گرفت. بدین‌منظور، ژنوم جدایه‌های منتخب استخراج شد (کیت استخراج شرکت سینا کلون) و سپس ناحیهٔ *16S rRNA* ژنومی آنها با انجام واکنش PCR تکثیر شد. محصول واکنش تعیینِ توالی‌شده (شرکت Bioneer) با اطلاعات موجود در بانک ژنومی باکتری‌ها مقایسه شد و هویت باکتری‌ها مشخص شد.

نتایج

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی: در این پژوهش، جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی و قابلیت استفاده از آن در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در شرایط آزمایشگاهی و محیطی بررسی شده است. از خاک آلوده به ترکیبات نفتی، ۱۹ سویهٔ باکتریایی با قابلیت رشد برروی محیط کشت معدنی حاوی n-هگزان به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی جداسازی شد. از میان این باکتری‌های جداشده، چهار سویهٔ باکتریایی SB10، SB7، SB14 و SB16 که توانایی بیشتری در تجزیهٔ ترکیبات نفتی و رشد برروی برخی از ترکیبات شامل نفت خام، بنزین، کروسین، گازوئیل، مخلوط پارافین‌ها، تولوئن و پاراگزیلول داشتند، برای بررسی قابلیت استفاده در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در شرایط آزمایشگاهی و محیطی استفاده شد (جدول ۲).

با استفاده از روش مولکولی مبتنی بر توالی ژن *16S rRNA* سویه‌های منتخب با عنوان *Stenotrophomonas maltophilia* (SB10)، *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (SB7)، *Streptomyces ambofaciens* (SB14) و *Cupriavidus respiraculi* (SB16) شناسایی شدند.

جدول ۲- میزان درصد تخریب هیدروکربن‌های آنتراسن، فنانترن و نفتالین توسط جدایه‌های منتخب

ردیف	سویه‌های منتخب	درصد تخریب آنتراسن	درصد تخریب فنانترن	درصد تخریب نفتالین
۱	SB7	۳۷/۷	۴۰/۱	۳۲/۴
۲	SB10	۸۲/۶	۵۲/۷	۶۳/۶
۳	SB14	۲۰/۹	۳۹/۸	۴۱/۴
۴	SB16	۷۱/۷	۴۳/۷	۶۱/۶

زیست‌پالایی خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی با تلقیح باکتری‌های تجزیه‌کننده: به‌منظورِ بررسی پایش میکروبی خاک‌های آلوده به مواد نفتی از چهار جدایهٔ منتخب استفاده شد. در شکل ۱ نتایج تیمار میکروبی پس از گذشت زمان‌های یک، دو و سه ماه برحسبِ تغییرات جمعت کل باکتری‌ها و باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ

هیدروکربن‌های نفتی نشان داده شده است. شکل ۲ میزان درصد تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های نفتی را برحسب گذشت زمان تیمار نشان می‌دهد. تأثیر کاهش هیدروکربن‌های نفتی خاک بر کاهش سمّیت خاک و افزایش میزان قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی، در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

تیمار خاک آلودهٔ نفتی پالایشگاه با استفاده از جدایهٔ *Stenotrophomonas maltophilia* (SB10) با شرایط آزمایشگاهی، نشان‌دهندهٔ افزایش شمار باکتری‌های خاک از $۳/۱\times۱۰^{۵}$ در شروع آزمایش به $۷/۳\times۱۰^{۵}$ در پایان ماه سوم است. میزان جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی از $۵/۳\times۱۰^{۳}$ در شروع آزمایش به تعداد $۱/۴\times۱۰^{۴}$ در پایان ماه سوم، افزایش یافت. میزان تجزیهٔ زیستی کل هیدروکربن‌های خاک در پایان ماه سوم به میزان ۵۶درصد رسید. با کاهشِ هیدروکربن‌های خاک، قدرت جوانه‌زنی بذر گیاه شاهی به‌دلیلِ کاهش اثر سمّی ترکیبات نفتی موجود در خاک، به ۴۲ درصد افزایش یافت. در نمونهٔ خاک تیمارشده با خاک‌اره و باکتری *Stenotrophomonas maltophilia* (SB10) میزان شمار باکتری‌های خاک در شروع آزمایش از $۳/۸\times۱۰^{۵}$ به $۹/۶\times۱۰^{۵}$ در پایان ماه سوم رسید. در این مدت، باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن نفتی از $۶/۱\times۱۰^{۳}$ به $۱/۷\times۱۰^{۴}$ افزایش یافتند. آنالیز هیدروکربن‌های باقی‌مانده در پایان ماه سوم، نشان‌دهندهٔ تجزیهٔ زیستی آن به میزانِ ۸۰درصد بود. نتایج آزمایش‌های قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی، نشان‌دهندهٔ بهبود نسبی کیفیت خاک تیمارشده و قابلیت جوانه‌زنی تا میزان ۶۸ درصد بود.

تیمار خاک آلودهٔ نفتی پالایشگاه با استفاده از جدایهٔ *Cupriavidus respiraculi* (SB16) با شرایط آزمایشگاهی، موجب افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی در پایان ماه سوم شد. میزان تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های خاک در پایان ماه سوم به میزان ۴۵ درصد رسید. با کاهش میزان هیدروکربن‌های خاک، قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی به ۳۷ درصد افزایش یافت. در نمونهٔ خاک تیمارشده با خاک‌اره و باکتری *Cupriavidus respiraculi* (SB16) نیز جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن نفتی در پایان ماه سوم افزایش یافت. آنالیز هیدروکربن‌های باقی‌مانده در پایان ماه سوم، نشان‌دهندهٔ تجزیهٔ زیستی آن به میزانِ ۸۳ درصد بود. نتایج آزمایش‌های قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی، نشان‌دهندهٔ بهبود نسبی کیفیت خاک تیمارشده و قابلیت جوانه‌زنی تا میزان ۷۱ درصد بود.

تیمار خاک آلودهٔ نفتی پالایشگاه با استفاده از جدایهٔ *Streptomyces ambofaciens* (SB14) با شرایط آزمایشگاهی، نشان‌دهندهٔ افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی در پایان ماه سوم بود. میزان تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های خاک در پایان ماه سوم به میزان ۴۷درصد رسید. با کاهش میزان هیدروکربن‌های خاک، قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی به ۳۸درصد افزایش یافت. در نمونهٔ خاک تیمارشده با خاک‌اره و باکتری *Streptomyces ambofaciens* (SB14) نیز تعداد باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن نفتی افزایش یافت. آنالیز هیدروکربن‌های باقی‌مانده در پایان ماه سوم، نشان‌دهندهٔ تجزیهٔ زیستی آن به‌میزانِ ۶۶درصد بود. نتایج آزمایش‌های قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی، نشان‌دهندهٔ بهبود نسبی کیفیت خاک تیمارشده و قابلیت جوانه‌زنی تا میزان ۴۶ درصد بود.

تیمار خاک آلودهٔ نفتی پالایشگاه با استفاده از جدایهٔ

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* (SB7) با شرایط آزمایشگاهی، نشان‌دهندهٔ افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های باقی‌مانده در پایان ماه سوم بود. میزان تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های خاک در پایان ماه سوم، به میزان ۵۵درصد رسید. با کاهشِ میزان هیدروکربن‌های خاک، قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی به ۳۶درصد افزایش یافت. در نمونهٔ خاک تیمارشده با خاک‌اره و باکتری *Bacillus subtilis* susp. *spizizenii* (SB7) نیز میزان شمار باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن نفتی خاک افزایش یافت. آنالیز هیدروکربن‌های باقی‌مانده در پایان ماه سوم، نشان‌دهندهٔ تجزیهٔ زیستی آن به میزانِ ۸۲درصد بود. نتایج آزمایش‌های قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی، نشان‌دهندهٔ بهبود نسبی کیفیت خاک تیمارشده و قابلیت جوانه‌زنی تا میزان ۷۲ درصد بود.

در نمونهٔ کنترل تیمار خاک آلودهٔ نفتی پالایشگاه بدون استفاده از جدایه و تنها با استفاده از مکمل معدنی، با شرایط آزمایشگاهی تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های خاک در پایان ماه سوم ۲۱درصد بود و قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی تنها ۲۴درصد بود. در نمونهٔ خاک تیمارشده با خاک‌اره نیز تجزیهٔ زیستی به ۲۹درصد رسید و قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی نشان‌دهندهٔ کمی بهبود کیفیت خاک تیمارشده و قابلیت جوانه‌زنی تا میزان ۳۷ درصد بود.

در نمونهٔ کنترل تیمار خاک آلودهٔ نفتی پالایشگاه بدون استفاده از جدایه و مکمل معدنی با شرایط آزمایشگاهی، میزان تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های خاک در پایان ماه سوم ۵درصد بود و به‌دلیلِ کم‌نشدنِ درخورِتوجه میزان هیدروکربن‌های خاک، قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی تنها ۱۴درصد افزایش داشت. در نمونهٔ خاک تیمارشدهٔ فوق با خاک‌اره افزایش کمی در شمار باکتری‌ها وجود داشت و آنالیز هیدروکربن‌های باقی‌مانده در پایان ماه سوم نیز نشان‌دهندهٔ تجزیهٔ زیستی آن به میزانِ ۱۸درصد بود. نتایج آزمایش‌های قدرت جوانه‌زنی گیاه شاهی، نشان‌دهندهٔ بهبود کمتر کیفیت خاک تیمارشده و قابلیت جوانه‌زنی تا میزان ۲۶درصد بود که نسبت به نمونه‌های مشابه با باکتری، کمتر است.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد تیمار، در شرایط محیطی نیز با افزودن سویه‌های باکتریایی منتخب همراه با مکمل‌های معدنی و خاک‌اره موجب افزایش بیشتر جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌ها در نمونه‌ها و افزایش میزان زیست‌پالایی خاک و درصد جوانه‌زنی می‌شود.

با افزودن محیط مواد معدنی حاوی سویه‌های میکروبی *S. maltophilia* (SB10)، *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (SB7)، *S. ambofaciens* (SB14) و *C. respiraculi* (SB16) در اکوسیستم طبیعی، در مقایسه با نمونه‌های شاهد E (بدون سویهٔ میکروبی اضافی) تعداد کل میکروارگانیسم‌ها و میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی افزایش یافته و به‌دنبالِ آن، در میزان تجزیهٔ زیستی مواد نفتی و افزایش درصد جوانه‌های بذر شاهی، افزایشْ مشاهده شده است.

در نمونه‌های آزمایش‌شده در محوطهٔ پالایشگاه نیز با افزودن سویه‌های کارآمد، خاک‌اره و عناصر معدنی، میزان فعالیت خاک افزایش یافته و به افزایش سرعت تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفتی انجامیده؛ درنتیجه، شرایط خاک بهبود یافته و میزان درصد جوانه‌زنی گیاه شاهی با نسبت‌های متفاوتی افزایش یافته است.

نتایج حاصل از تیمار در آزمایشگاه به‌طورِ

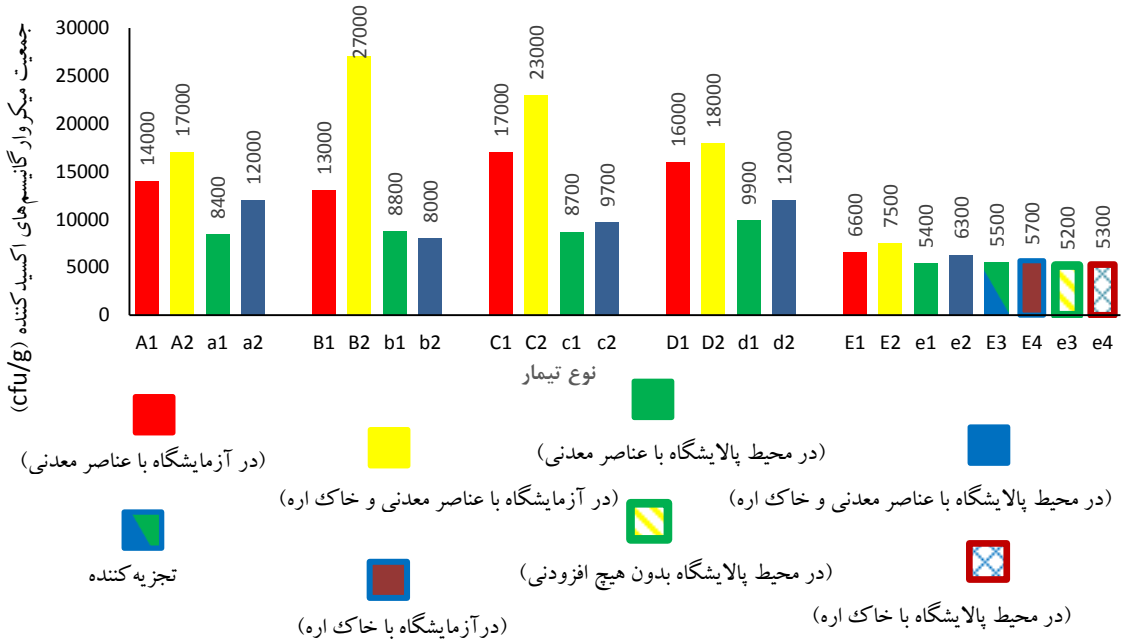
درخورِتوجه و وسیع، بهتر از نتایج تیمار در محیط طبیعی (محوطهٔ پالایشگاه) است. علت این موضوع را می‌توان ثابت‌بودن شرایط دمایی و رطوبت در آزمایشگاه و نوسان این فاکتورها در محیط طبیعی دانست. همچنین، در زمان استفاده از خاک‌اره به‌عنوانِ تثبیت‌کنندهٔ میکروبی و بهبود فرایند هوارسانی به میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده در خاک، نتایج زیست‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی و درصد جوانه‌زنی گیاهی بسیار بهتر از حالت استفاده‌نکردن از خاک‌اره بود.

در طول مدت تیمار نمونه‌های خاک در شرایط آزمایشگاه، با اضافه‌کردن مواد معدنی و سویه‌های میکروبی SB7، SB10، SB14 و SB16 در مقایسه با نمونه‌های شاهد E (بدون افزودن سویهٔ باکتری) تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی از ابتدای آزمایش افزایش یافت و به‌طورِ مرتب با نسبت‌های متفاوتی در نمونه‌های خاک باتوجه‌به سویهٔ خاص اضافه‌شده، سیر صعودی داشت. همچنین در نمونه‌های دارای خاک‌اره، در مقایسه با نمونه‌های بدونِ آن، شمار جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده بیشتر بود.

افزایش تعداد کل باکتری‌ها، به‌خصوص باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی، باعث افزایش نسبت تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های کل نفتی و کاهش میزان ترکیبات نفتی در نمونه‌های خاک شد. درنتیجهٔ کاهش مقدار ترکیبات نفتی در نمونه‌های خاک، خاصیت سمّی و گیاه‌سوزی خاک کاهش یافت و تعداد جوانه‌های بذر گیاه شاهی در نمونه‌ها با درصدهای متفاوت افزایش پیدا کرد. باتوجه‌به نتایج، مشخص شد در نمونه‌های حاوی خاک‌اره، جمعیت باکتری‌های عمومی و تجزیه‌کننده در مقایسه با نمونه‌های بدون خاک‌اره، افزایش معناداری داشت و به دنبالِ آن، درصد تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفتی افزایش یافت و درصد جوانه‌های بذر شاهی نیز افزایش پیدا کرد.

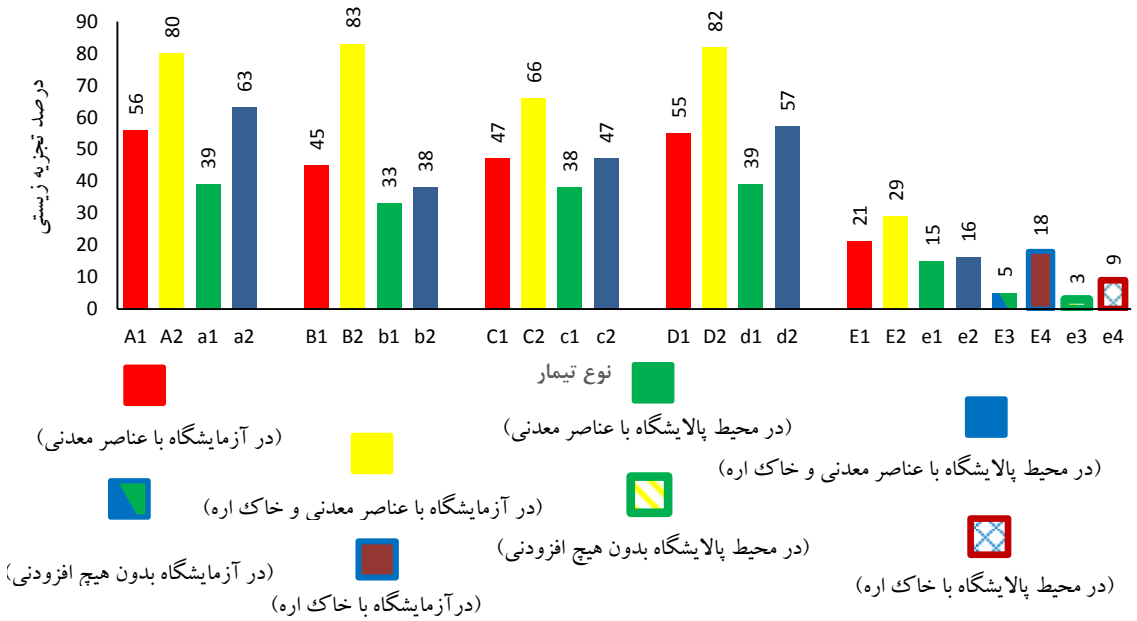
باتوجه‌به نتایج، دربارهٔ نمونهٔ تیمار E می‌توان مشخص کرد اگر خاک پالایشگاه در حالت اولیهٔ خود و بدون افزودن سویه‌های میکروبی تجزیه‌کننده تیمار شود، درکل قابلیت چندانی در تجزیهٔ زیستی آلاینده‌ها و زیست‌پالایی نخواهد داشت.

نمونهٔ تیمار E1 که محتوی خاک پالایشگاه و محیط معدنی اضافه‌شده است، ۲۴درصد جوانهٔ بذر داشت. نمونهٔ تیمار E2 که نمونهٔ خاک پالایشگاه و محیط معدنی و خاک‌اره دارد، ۳۷درصد جوانهٔ بذر داشت. نمونهٔ تیمار E3 که فقط حاوی نمونهٔ خاک پالایشگاه است، فقط ۱۴درصد جوانهٔ بذر داشت و نمونهٔ تیمار E4 که محتوی نمونهٔ خاک پالایشگاه و خاک‌اره است و فقط با آب معمولی آبیاری شده است، ۲۶درصد جوانهٔ بذر شاهی داشت؛ بنابراین، مشخص شد که با افزودن مواد معدنی و خاک‌اره به نمونهٔ خاک پالایشگاه با همان میکروارگانیسم‌های موجود اولیه، می‌توان تاحدودی روند زیست‌پالایی در خاک را افزایش داد.



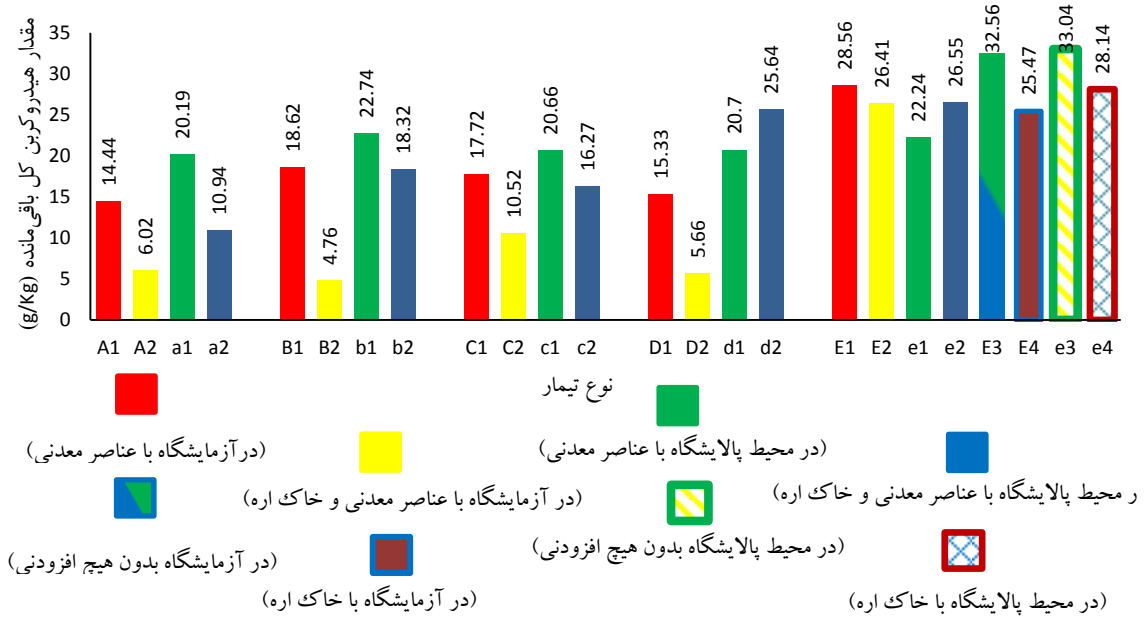
شکل ۱- مقایسهٔ جمعیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی در نمونه‌های خاک پس از سه ماه، طی تجزیهٔ زیستی در شرایط تیمار با *S. maltophilia* (SB10) (حروف A و a)، *C. respiraculi* (SB16) (حروف B و b)، *S. ambofaciens* (SB14) (حروف C و c)، *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (SB7) (حروف D و d) و بدون سویهٔ میکروبی (حروف E و e).

*- حروف بزرگ تیمار در شرایط آزمایشگاه و حروف کوچک تیمار در شرایط محیط طبیعی است.



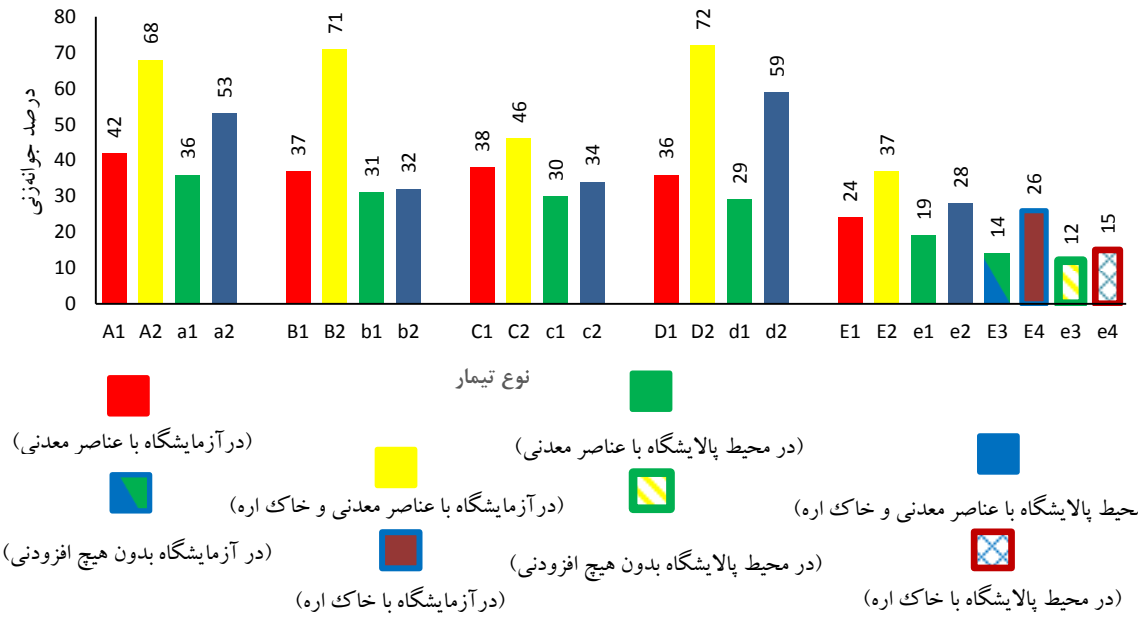
شکل ۲- مقایسهٔ میزان درصد تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های خاک، پس از سه ماه تیمار با *S. maltophilia* (SB10) (حروف A و a)، *C. respiraculi* (SB16) (حروف B و b)، *S. ambofaciens* (SB14) (حروف C و c)، *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (SB7) (حروف D و d) و بدون سویهٔ میکروبی (حروف E و e).

*- حروف بزرگ تیمار در شرایط آزمایشگاه و حروف کوچک تیمار در شرایط محیط طبیعی است.



شکل ۳- مقایسهٔ میزان هیدروکربن‌های باقی‌مانده پس از سه ماه تیمار با *S. maltophilia* (SB10) (حروف A و a)، *C. respiraculi* (SB16) (حروف B و b)، *S. ambofaciens* (SB14) (حروف C و c)، *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (SB7) (حروف D و d) و بدون سویهٔ میکروبی (حروف E و e).

*- حروف بزرگ تیمار در شرایط آزمایشگاه و حروف کوچک تیمار در شرایط محیط طبیعی است.



شکل ۴- مقایسهٔ میزان درصد جوانه‌زنی برروی خاک‌های تیمارشدهٔ سه‌ماهه با *S. maltophilia* (SB10) (حروف A و a)، *C. respiraculi* (SB16) (حروف B و b)، *S. ambofaciens* (SB14) (حروف C و c)، *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (SB7) (حروف D و d) و بدون سویهٔ میکروبی (حروف E و e).

*- حروف بزرگ تیمار در شرایط آزمایشگاه و حروف کوچک تیمار در شرایط محیط طبیعی است.

بحث و نتیجه‌گیری

آلوده‌شدن خاک به مواد نفتی، موجب تحریک فعالیت گروهی از باکتری‌های دارای ظرفیت تجزیه‌کنندگی می‌شود. نمونهٔ خاک آلودهٔ پالایشگاه حاوی مقادیری از ترکیبات نفتی است؛ ازاین‌رو، میزان کربن خاک در مقایسه با سایر عناصرْ بیشتر است. افزودن مواد معدنی موجب افزایش نسبت عناصر معدنی و ضروری مانند نیتروژن، فسفر و سایر مواد مغذی می‌شود و تناسب نسبی میان کربن و نیتروژن برقرار می‌کند که موجب افزایش ظرفیت تکثیر و فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده در خاک می‌شود. ماهیت فناوری زیست‌پالایی استفاده از مواد زیستی و تودهٔ زندهٔ میکروارگانیسم به تجزیهٔ هیدروکربن‌ها می‌انجامد. هیدروکربن‌ها منبع انرژی و غذایی برای برخی از میکروارگانیسم‌ها هستند؛ بنابراین، با افزایش جمعیت آنها به‌تدریج میزان هیدروکربن‌ها کاهش می‌یابد. در دههٔ اخیر، با استفاده از زیست‌پالاییْ گام‌های بزرگی برای حل و رفع مشکل آلودگی برداشته شده است. برای سرعت‌بخشیدن به این فرایند، استفاده از قابلیت بالقوهٔ جمعیت میکروارگانیسم‌های موجود در خاک مناطق آلوده اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است.

در این پژوهش، ۱۹ سویهٔ باکتری تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی جداسازی شد. از میان این سویه‌ها، چهار سویهٔ باکتریایی SB10، SB7، SB14 و SB16 توانایی نسبی بیشتری در تجزیهٔ زیستی داشتند.

سویهٔ SB10 ازنظرِ توالی دارای میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* با ژن مشابه سویهٔ *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 434T، ۹۹/۸درصد است. این جدایه توانست ترکیبات نفتی خاک پالایشگاه تبریز را به میزانِ ۸۰ درصد در مدت ۳ ماه تجزیهٔ زیستی کند. این باکتری، باکتری گرم‌منفی هوازی غیرتخمیری است و در محیط‌های آبی، خاک و گیاهان یافت می‌شود. از این سویه در برنامه‌های کاربردی زیست‌فناوری استفاده شده است؛ مثلاً سویهٔ جداشده از خاک مناطق آلوده به ترکیبات نفتی، توانسته است مواد سمّی نفتی ازقبیلِ بنزوپیرن را تجزیهٔ زیستی کند. گزارش شده سویه‌ای دیگر جداده از نمونهٔ خاک‌های آلودهٔ کارخانهٔ استحصال نفت در کاستاریکا نیز توانسته است فلورن را تخریب زیستی کند. ابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در خاک‌های آلوده به نفت استان بوشهر توانستند چندین سویهٔ کارآمد از این باکتری را جدا کنند. این سویه توانِ تجزیهٔ زیستی تولوئن و نفتالین در شرایط تیمار با درصدهای مختلف را داشت. باتوجه‌به نتایج تجزیهٔ زیستی ترکیبات پلی‌سیکلیک‌آروماتیک همانند تولوئن، نفتالین، فلورن و بنزوپیرن در پژوهش‌های مطرح‌شده و باتوجه‌به میزان زیست‌پالایی (۸۰درصد) سویهٔ جداشدهٔ *Stenotrophomonas maltophilia* در این پژوهش که به تخریب زیستی ترکیبات سنگین با وزن مولکولی بالا انجامیده است، نتایج هم‌خوانی دارد (۱۴).

سویهٔ SB16 ازنظرِ توالی دارای میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* با ژن مشابه سویهٔ *Cupriavidus respiraculi* CCUG 46809T ۹۹/۳۸درصد است. این جدایه توانست ترکیبات نفتی خاک پالایشگاه تبریز را به میزانِ ۸۳درصد در مدت ۳ ماه تجزیهٔ زیستی کند. این باکتری کوکوباسیل گرم منفی است که به‌صورتِ تکی، دوتایی و یا زنجیرهای کوتاه دیده می‌شود و در محیط‌زیست، آب، خاک، گیاهان، میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود و می‌تواند در محیط مرطوب زندگی کند. گزارش‌هایی از جداسازی سویه‌های این باکتری از مناطق آلوده صورت گرفته است.

در مناطق شمال شرقی چین جداسازی *Cupriavidus* انجام شده است که توانایی تجزیهٔ زیستی آلاینده‌های خاک با تثبیت نیتروژن در مدت هشت هفته را داشته است. توانایی این باکتری در تبدیل انواع مختلف ترکیبات سمّی مانند آلکیل‌فنل‌ها و هیدروکربن‌های آروماتیک منو و پلی‌سیکلیک به پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) گزارش شده است. این سویه سبب تجزیهٔ زیستی نفتالین (۱۰۰-۹۴درصد)، فنل(۹۶-۸۹درصد) و کلروفنل (۶۲-۵۶درصد) در طی مدت ۳ ماه می‌شود (۱۶).

سویهٔ SB14 ازنظرِ توالی دارای میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* با ژن مشابه سویهٔ *Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836T ۹۹/۷۲درصد است. این جدایه می‌تواند ترکیبات نفتی خاک پالایشگاه تبریز را به میزانِ ۶۶درصد در مدت ۳ ماه تجزیهٔ زیستی کند.

جنس *استرپتومایسس* هوازی، گرم مثبت و باکتری رشته‌ای و دارای ژنوم GC با محتوای بالاست. عمدتاً در خاک و پوشش گیاهی پوسیده وجود دارد. بیشترِ استرپتومایسس‌ها اسیدوفیل هستند، تولید هاگ می‌کنند و بوی مخصوص خاک از تولید یک متابولیت فرّار به نامِ ژئوسمین، حاصلِ آنهاست. سه جدایهٔ استرپتومایسس AB1, AH4, AM2 را شناسایی کردند که این سویه‌ها توانستند نفتالین ۸۲/۳۶، ۸۵/۲۳ و ۸۱/۰۳درصد را در طی ۱۲ روز گرم‌خانه‌گذاری، تجزیهٔ زیستی کنند. این سویه‌ها با تولید بیوسورفکتانت، توانایی حذف نفت خام ۱درصد (v/v) در محیط کشت معدنی را به‌ترتیب با ۷۵/۸۳، ۷۸/۷۱ و ۸۶/۶۶درصد در مدت ۳۰ روز نشان داده‌اند (۱۷).

در بررسی‌های صورت‌گرفته در خاک آلوده به نفت در هندوستان، سویه از *Streptomyces* شناسایی شده است که توانایی تجزیهٔ ۹۸/۲۵درصد روغن دیزل، ۹۹/۱۴درصد نفتالین و ۱۷/۵درصد فنانترن در ۷ روز در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (با غلظت ۰/۱درصد) را دارد. سویهٔ QWE گزارش‌شده از این باکتری، در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد و pH برابر با ۷ می‌تواند از هیدروکربن نفتالین به‌عنوان تنها منبع انرژی و کربن استفاده کند. این سویه باعث حذف این ترکیب با مقادیر ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در یک لیتر در مدت ۳۲، ۵۶، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت شده است (۱).

سویهٔ SB7 ازنظرِ توالی دارای میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* با ژن مشابه سویهٔ *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* NBRC 101239T ۹۹ درصد است. با استفاده از این جدایه، تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفتی خاک پالایشگاه تبریز به‌میزانِ ۸۲درصد در مدت ۳ ماه مشاهده شد. نواگو[۹] و همکارنش از نمونهٔ خاک آلوده به گازوئیل که مدت شش ماه در آزمایشگاه نگهداری شده بود، یک سویهٔ *B. subtilis* جدا کردند. استفاده از این باکتری برای تجزیهٔ خاک آلوده به گازوئیل (۵درصد v/w) (نفت به خاک) نشان داده است بدون افزودن هیچ مکمل نیتروژن و فسفری، توانایی تجزیهٔ نفت خام در مدت ۱، ۱۲ و ۲۷ ساعت به میزانِ $۵/۸\times۱۰^{-۴}$، $۱/۰۵\times۱۰^{-۳}$ و $۱/۸۳\times۱۰^{-۳}$ گرم در ساعت را دارد (۱۸). در پژوهشی که بر تجزیهٔ خاک آلوده به نفت در نیجریه صورت گرفته، مشاهده شده است سویهٔ *Bacillus* sp. 28A توانایی حذف ۵۰/۴درصد وزن نفت خام را پس از ۲۰ روز گرم‌خانه‌گذاری دارد. افزودن منابع ازت آلی نظیر اوره به محیط نمک‌های معدنی حاوی نفت خام موجب افزایش تجزیهٔ زیستی شده است. توانایی تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفتی در سایر گونه‌های باسیلوس نیز گزارش شده است.

در باکتری *Bacillus cereus* BN66 توانایی هم‌زمان تجزیهٔ زیستی نفت خام و ساخت سورفاکتانت زیستی گزارش شده است. این سویه توانایی تجزیهٔ ۹۳درصد از بخش جزئی خطی نفت خام را طی ۴۸ ساعت دارد (۱۹).

باتوجه‌به نتایج ارائه‌شده می‌توان چنین جمع‌بندی کرد که افزودن سویه‌های باکتریایی *Stenotrophomonas maltophilia* (SB10)، *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (SB7)، *Streptomyces ambofaciens* (SB14) و *Cupriavidus respiraculi* (SB16) به خاک آلوده می‌تواند موجب افزایش جمعیت باکتریایی تجزیه‌کنندهٔ مواد آلایندهٔ نفتی شود؛ علاوه‌بر این، افزودن خاک‌اره به میزانِ ۱۰درصد، به‌دلیلِ افزایش قابلیت هوادهی خاک، موجب افزایش تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفتی می‌شود؛ ازاین‌رو، پیشنهاد می‌شود از باکتری‌های با قدرت تجزیه‌کنندگی به همراهِ پسماندهای صنعتی و کشاورزی استفاده شود که روشی مناسب و اقتصادی برای پاک‌سازی خاک‌های آلودهٔ نفتی است.

References

(1) Xu X., Wenming L., Shuhua T., Wei W., Qige Q. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions. Front Microbiol 2018; 9: 2885.

(2) Xue J., Yu Y., Bai Y., Wang L., Wu Y. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. Curr. Microbiol 2015; 71: 220- 228.

(3) Hazen T. C., Dubinsky E. A., DeSantis T. Z., Andersen G. L., Piceno Y. M., Singh N., et al. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. Science 2010; 330: 204- 208.

(4) Lee EH(1)., Kim J., Cho K.S., Ahn Y.G., Hwang G.S. Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate, Rhodococcus sp. EH831. Environ Sci Pollut Res Int 2010; 17(1):64- 77.

(5) Rengathavasi T., Singaram J., Thangavel, B., Ibrahim M. Effect of salinity, temperature, pH and crude oil concentration on biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa. Biodiversity & Environmental Sciences 2007; 1(2): 51- 57.

(6) Sanjeet M., Jeevan J., Ramesh C.K., Ban W. Evaluation of inoculum addition to stimulate insitu bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. Applied & Environmental Microbiology 2001; 67(4): 1675- 1681.

(7) Onegova T.S. Biotechnology purification of soil and water from oil pollutionin the fields of Bashgirdistan Western Siberia, Dissertation- Ufa: 2006; 193.

(8) Milne B.J., Baheri H.R., Hill G.A. Composting of a heavy oil refinery sludge. Environmental Progressand Sustainable Energy 2006; 17(1): 24-27.

(9) Marin J.A, Moreno J.L, Hernández T., García C. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. Biodegradation 2006; 17(3): 251- 261.

(10) Wang J., Yang H., Lu H., Zhou J., Wang J., Zheng C. Aerobic biodegradation of nitrobenzene by a defined microbial consortium immobilized in polyurethane foam. World Journal of Microbiology & Biotechnology 2009; 25: 875- 881.

(11) Suzelle B., Jin-Woo K. Biodegradation of pentyl amine and aniline from petrochemical wastewater. Environmental Management 2006; 83: 191-197.

(12) Das K., Mukherjee A.K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresour Technol 2007; 98(7):1339- 45.

(13) Salami Abiodun O., Elum Ejiro A. Bioremediation of a crude oil polluted soil with Pleurotus Pulmonarius and Glomus Mosseae using Amaranthus Hybridus as a test plant. Bioremediation & Biodegradation 2010; 1(3): 25-30.

(14) Ebrahimi M., Sarikhani M.R., Fallah R. Assessment of biodegradation efficiency of some isolated bacteria from oilcontaminated sites in solid and liquid media containing oil-compounds. International Research Journal of Applied & Basic Sciences 2012; 3(1): 138- 147.

(15) Sizhong Y., Xi w., Liang Z., Yulan S., Hujun J. Crude oil treatment leads to shift of bacterial communities in soils from the deep active layer and upper permafrost along the China- Russia crude oil pipeline route. Opios One 2014; 9(5).

(16) Venkateswar R., Yuka Y., Yasuteru M., Tamotsu Hand Young C. Degradation and conversion of toxic compounds into useful bioplastics by Cupriavidus sp. CY-1: relative expression of the PhaC gene under phenol and nitrogen stress, Green Chem 2015; 17, 4560- 4569.

(17) Ferradji F., Mnif S., Badis A., Rebbani S., Fodil J., Eddouaouda K., Sayadi S. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing Streptomyces spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). International Biodeterioration & Biodegradation 2014; 86(C): 300- 308.

(18) Nwaogu L.A., Onyeze1 G.O.C., Nwabueze R.N. Degradation of diesel oil in a polluted soil using Bacillus subtilis. African Journal of Biotechnology 2008; 7.

(19) Christova N., Biodegradation of crude oil hydrocarbons by a newly isolated biosurfactant producing strain. Journal Biotechnology & Biotechnological Equipment 2019; 33 (1).

[1]- Lee
[2]- Sanjeet
[3]- Milne
[4]- Raymond
[5]- Nutrient Agar
[6]- Mc Farland standard
[7]- Raymond
[8]- *Lepidium sativum*
[9]- Nwaogu