



## جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام از اکوسیستم جنگل‌های حرا بندر خمیر و میناب، شمال خلیج فارس

ایمان فخرزادگان، مهدی حسن شاهیان\*، مجید عسکری حصنی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

### نوع مقاله:

پژوهشی

### تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۰۳/۳۱

اصلاح: ۹۴/۰۶/۱۲

پذیرش: ۹۴/۰۶/۱۶

### کلمات کلیدی:

آلودگی نفتی

تجزیه زیستی

باکتری

جنگل‌های حرا

### چکیده

جنگل‌های حرا اکوسیستم‌های ساحلی هستند که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری سراسر دنیا یافت می‌شوند. نشت نفت باعث وارد شدن صدماتی به این اکوسیستم‌های دریایی می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی باکتری‌های تجزیه‌کننده در اکوسیستم برخی جنگل‌های حرا واقع در خلیج فارس بود. در این تحقیق از رسوبات، حرا و آب دریای مجاور جنگل‌های میناب و بندر خمیر واقع در خلیج فارس نمونه برداری به عمل آمد. باکتری‌های تجزیه‌کننده با روش کشت اختصاصی، غربالگری و با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. در این تحقیق ۹ جدایه باکتریایی تجزیه‌کننده از جنگل‌های مورد بررسی جداسازی شد. پس از کشت جدایه‌ها درون محیط ONR7 و ۱ درصد نفت خام ۳ جدایه BP14، NP16 و NP19 که بیشترین رشد را در نفت خام داشتند، انتخاب گردیدند. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که این جدایه‌ها به جنس و گونه‌های *Vibrio azureus* و *Pseudomonas salomonii* تعلق داشتند. این جدایه‌ها در طی ۱۵ روز بیش از نیمی از نفت را حذف نمودند. بالاترین میزان حذف نفت مربوط به جدایه NP19 با میزان ۶۶ درصد بود. با تکثیر این باکتری‌ها در مقیاس میدانی می‌توان از آن‌ها جهت پاکسازی اکوسیستم جنگل‌های حرا آلوده به نفت استفاده نمود.

### مقدمه

جنگل‌های حرا اکوسیستم‌های ساحلی هستند که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری سراسر دنیا یافت می‌شوند (Kathiresan and Bingham, 2001). از نظر جغرافیایی، در قاره‌های آسیا، آمریکا، آفریقا و استرالیا وجود دارند. برخلاف سایر جنگل‌های مناطق استوایی، حراها ترکیبی از تعداد کمی گونه‌های درختی و درختچه‌ای هستند. گونه‌های گیاهی موجود در این جنگل‌ها نسبت به شرایط کمبود اکسیژن و غلظت نمک بالا سازگاری پیدا کرده‌اند. ترکیب پوشش گیاهی این جنگل‌ها را در درجه اول هیدرولوژی، جغرافیا و آب و هوای یک منطقه کنترل می‌کند (Schaeffer-Novelli et al., 2000). اگرچه این جنگل‌ها از نظر گونه‌های گیاهی فقیر هستند اما از نظر گونه‌های جانوری بسیار غنی بوده و جانوران ساکن در آنها شامل بندپایان، نرم تنان، دوزیستان، انواع ماهی‌ها، پرندگان و پستانداران می‌باشد که ممکن است همه یا بخشی از دوران حیات خود را در این اکوسیستم سپری کنند. بسیاری از جانوران در طول دوره‌ی تولید مثل و یا جهت پیدا کردن غذا وارد این جنگل‌ها می‌شوند؛ از این رو این اکوسیستم محل صید بسیاری از گونه‌های تجاری ماهی و میگو محسوب می‌شود (Kathiresan and Bingham, 2001).

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [mshahi@uk.ac.ir](mailto:mshahi@uk.ac.ir)

[hasanshahi@gmail.com](mailto:hasanshahi@gmail.com)

این اکوسیستم با عملکرد طبیعی که دارد، از نظر اکولوژیکی و اقتصادی دارای اهمیت بالایی است. به عنوان مثال، محلی برای نوزادگاه بسیاری از ماهیان، نرم‌تنان، خزندگان، پرندگان و پستانداران؛ محلی برای تجمع کربن و مواد غذایی؛ محلی برای نوسازی بیومس دریایی و همچنین سدی برای محافظت سواحل در برابر امواج و طوفان می باشد (Alongi, 2002).

در ایران این جنگل‌ها در چندین منطقه در بین طول جغرافیای  $25^{\circ}11'$  و  $27^{\circ}52'$  قرار دارند. تنها دو گونه‌ی *Avicennia marina* و *Rhizophora mucronata* در ایران رویش دارند که گونه‌ی *Avicennia marina* گونه‌ی غالب بوده و در ۹۰٪ زیستگاه‌های حرا دیده می‌شود. همچنین گونه‌ی *Rhizophora mucronata* به صورت محدود در منطقه‌ی سیریک رویش دارد (Neinavaz et al., 2012). جنگل‌های حرای ایران آخرین حد پراکنش جنگل‌ها در آسیای جنوب غربی به شمار می‌آید. پراکنش حرا در ایران از شرقی‌ترین بخش دریای عمان در کشور، از خلیج گواتر شروع می‌شود و با حرکت به غرب خلیج فارس و زیاد شدن عرض جغرافیای در استان بوشهر پایان می‌یابد. به طور کلی رویشگاه‌های حرا در جنوب کشور و در سواحل خلیج فارس و دریای عمان در مناطق متعددی گسترش یافته‌اند که ساحل سه استان هرمزگان، سیستان و بلوچستان و بوشهر از خلیج گواتر در سیستان و بلوچستان تا بوشهر را شامل می‌شود. به عبارتی از مجموع ۴/۱۲ میلیون هکتار وسعت جنگل‌های ایران، تنها ۲۲ هزار هکتار آن را جنگل‌های حرا تشکیل می‌دهد که در این میان حدود ۲۱ هزار هکتار آن فقط در استان هرمزگان واقع شده که بیشترین سطح آن با گستره‌هایی به وسعت ۱۴ هزار هکتار در جزیره قشم رویش دارد. تمام جنگل‌های حرا در ایران به دلیل اهمیت اکولوژیکی و حساسیت به آلاینده‌ها جزو مناطق حساس دریایی محسوب می‌شوند (نوری و همکاران، ۱۳۹۰).

نفت خام و برخی از فراورده‌های آن به عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های زیست محیطی به حساب می‌آیند و نشت نفت باعث وارد شدن صدماتی به اکوسیستم‌های دریایی و زمینی می‌شود. آلودگی نفتی ممکن است به صورت تصادفی یا عملیاتی و در هنگام تولید، انتقال، ذخیره و یا فراوری کردن یا استفاده در دریا و یا خشکی روی دهد. نشت نفت به عنوان یک تهدید جدی برای اکوسیستم‌های ساحلی محسوب می‌شود (Head et al., 2006; Bayat et al., 2015). برخی از محققان جنگل‌های حرا را حساس‌ترین اکوسیستم ساحلی نسبت به آلودگی نفتی برمی‌شمارند (Hayes and Gundlach, 1979). تحقیقات میدانی و آزمایشگاهی نشان داده است که در اکثر موارد، نفت باعث صدمه دیدن یا مرگ حراها می‌شود. چگونگی آسیب و مکانیسم سمیت کمتر واضح است؛ اگر چه عموماً مشخص شده که نفت باعث خفگی فیزیکی و اثرات سمی و فیزیولوژیکی می‌شود. محققان در مورد سهم نسبی هر مکانیسم اختلاف نظر دارند، که ممکن است با نوع نفت و زمان نشت متفاوت باشد. حتی اگر یک فراورده نفتی به خودی خود سمی نباشد، زمانی که به صورت فیزیکی گیاهان و جانوران را می‌پوشاند، ممکن است باعث ایجاد خفگی، گرسنگی یا دخالت در دیگر عملکردهای فیزیولوژیکی معمول و مرگ جاندار شود. این اثرات فیزیکی به سازگاری فیزیولوژیکی حراها وابسته و اما مستقل از سمیت شیمیایی ذاتی نفت است. علاوه بر این مسمومیت‌های حاد یا مزمن ناشی از نفت می‌تواند اثرات فیزیکی را تشدید کند (Proffitt, 1997; Hassanshahian et al., 2013).

یکی از راه‌های موجود برای رفع آلودگی‌های نفتی تجزیه زیستی است. تجزیه زیستی فرآیندی است که طی آن عوامل زیستی از قبیل باکتری، قارچ و یا گیاه، هیدروکربن‌ها و ترکیبات زئوبیوتیک را طی یک سری واکنش‌های پیچیده به موادی ساده‌تر تبدیل می‌کنند. تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها فرآیند اولیه در حذف هیدروکربن‌ها و مواد زئوبیوتیک است. در تجزیه زیستی، باکتری‌ها و قارچ‌ها عمدتاً تجزیه هیدروکربن‌ها را بر عهده دارند و گیاهان وظیفه هوارسانی به خاک و رسوب و همچنین جذب و جمع‌آوری نمک‌ها و فلزات سنگین را از خاک و رسوبات بر عهده دارند. باکتری‌ها و قارچ‌ها از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی به منظور رشد استفاده می‌کنند و آنها را به موادی همچون اسیدها، الکل‌ها، فنل‌ها، هیدروپراکسیدها، ترکیبات کربونیل، استرها و در نهایت دی‌اکسید کربن و آب تبدیل می‌کنند (Eglinnton, 1975). با وجود مطالعات فراوان بر روی اکوسیستم حرا، در مورد تجزیه زیستی نفت خام در این اکوسیستم مطالعات نسبتاً کمی صورت گرفته است (Brito et al., 2006). Ramsay و همکاران (۲۰۰۰)، تعداد زیاد و متنوعی از باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی را در رسوبات حرای کشور استرالیا گزارش کردند. Bayoumi و El-Nagar (۲۰۰۹)، سویه‌های *Bacillus*

*Bacillus polymyxa* و *subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas pseudomallei* را به عنوان سویه های برتر تولیدکننده بیوسورفاکتانت تجزیه کننده نفت خام، از جنگل های حرای دریای سرخ جداسازی نمودند. در ایران Kafilzadeh و همکاران (2013a) سویه های باکتریایی برتر تجزیه کننده برخی از هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای همانند، Fluoranthene و Phenanthrene را از رسوبات حرا منطقه نایبند جداسازی کردند.

همانطور که گفته شد اکوسیستم جنگل های حرا، یکی از مهمترین و حساس ترین اکوسیستم های ساحلی در برابر آلاینده ها به ویژه نفت خام است. همچنین با توجه به آلودگی نفتی وسیع نفت خام در خلیج فارس و آسیب گسترده حراها در نتیجه آلودگی های نفتی، نقش میکروارگانیسم ها به ویژه باکتری ها برای تجزیه زیستی این اکوسیستم بسیار اهمیت دارد و می توان از آنها برای احیا زیستی این اکوسیستم استفاده نمود. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده نفت خام از جنگل های حرا میناب و بندر خمیر و همچنین بررسی کارایی تجزیه زیستی باکتری های جداسازی شده بود.

## مواد و روش ها

### نمونه برداری

به منظور جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت خام، نمونه های رسوب از کنار درخت حرا، آب دریا و نمونه های گیاهی شامل برگ و ریشه های هوایی (به منظور جداسازی باکتری های سطحی نمونه های گیاهی)، از جنگل های حرای بندر خمیر (۲۶ درجه شمالی و ۵۴ درجه شرقی) و میناب (۳۷ درجه شمالی و ۴۹ درجه شرقی) جمع آوری شدند (شکل ۱). نمونه رسوبات با استفاده از چاقوی استریل از عمق ۱۲-۰ cm، نمونه آب دریا از عمق ۵ cm و نمونه های گیاهی نیز با چاقوی استریل از حراهای این مناطق مختلف جمع آوری و در ظروف استریل و در ظرف یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا انجام آنالیزهای بعدی قرار داده شدند (Bayoumi and El-Nagar, 2009).



شکل ۱. جنگل های حرا میناب و بندر خمیر که با علامت مثلث مشخص شده اند

### جداسازی و غربالگری باکتری های تجزیه کننده نفت

برای جداسازی و غربالگری باکتری های تجزیه کننده نفت از محیط کشت اختصاصی ONR با ۱٪ نفت خام استفاده شد. جهت غنی سازی اولیه، ۱۰ میلی لیتر از نمونه های آب، ۱۰ گرم از رسوبات و ۱۰ گرم محلول گیاهی به داخل این محیط تلقیح شد و به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰°C قرار داده شد. پس از گذشت یک هفته میزان ۵ میلی لیتر از این محیط برداشته و به محیط جدید تلقیح شد. پس از گذاشتن در انکوباتور شیکردار با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰°C به مدت یک هفته، رقت ۱۰<sup>-۴</sup> از محیط تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت مارین آگار انتقال داده شد. پس از ۴۸ ساعت، کلنی های منحصر به فرد از هر محیط کشت انتخاب و روی محیط کشت مارین آگار جدید جهت تهیه کلنی خالص کشت خطی داده شد (Hassanshahian et al., 2014).

## تولید بیوسورفاکتانت، فعالیت امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی

فعالیت امولسیون کنندگی از طریق اضافه کردن ۴ میلی لیتر باکتری در محیط براث به ۶ میلی لیتر نفت سفید بررسی شد. به این صورت که مخلوط نفت سفید و کشت باکتری ۲ دقیقه درون لوله آزمایش ورتکس شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت به صورت ساکن در دمای محیط قرار داده شدند. درصد امولسیون براساس فرمول زیر محاسبه گردید (Maneerat and Kulnaree, 2007).

$$\text{ارتفاع ناحیه امولسیون شده} = 100 \times E24 = \text{کل ارتفاع مایع}$$

به منظور بررسی میزان هیدروفوبیسیته سطح سلولی از روشی که قبلاً توسط Pruthi و Cameotra (۱۹۹۷)، توضیح داده شده بود، استفاده شد.

## بررسی میزان رشد و حذف نفت خام

سویه های باکتریایی برتر جداسازی شده از مراحل قبل، درون ارلن حاوی محیط ONR7a حاوی ۱ درصد نفت به مدت ۱۰ روز بر روی انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ °C گرمخانه گذاری شدند. پس از آن میزان OD<sub>600</sub> سویه ها برای بررسی میزان رشد در مقایسه با شاهد بررسی شد. در این تحقیق برای بررسی میزان حذف نفت خام از دو روش استفاده گردید. به این صورت که ابتدا نفت باقیمانده درون ارلن با حلال آلی دی کلرومتان استخراج شد و سپس میزان OD<sub>420</sub> آن در مقایسه با شاهد مورد بررسی قرار گرفت. روش دوم که برای بررسی میزان حذف نفت خام استفاده شد روش FTIR بود. این روش به عنوان روشی پر قدرت و توسعه یافته برای تعیین ساختار و اندازه گیری گونه های شیمیایی به کار می رود. همچنین این روش عمدتاً برای شناسایی ترکیبات آلی به کار می رود زیرا طیف های این ترکیبات معمولاً پیچیده هستند و تعداد زیادی پیک های ماکسیمم و مینییم دارند که می توانند برای اهداف مقایسه ای به کار گرفته شوند (Rahman et al., 2004; Neinavaz et al., 2012). به منظور آنالیز ترکیبی مانند نفت خام، آنالیز مادون قرمز در منطقه ی طیفی ۴۰۰۰-۵۰۰ cm<sup>-1</sup> در رزولوشن ۵۰ cm<sup>-1</sup> و از سل های NaCl و یا KBr استفاده شد. همچنین شرایط دمایی ۲۵ °C بود (Ramadha et al., 2013; Hasanshahian et al., 2008).

## شناسایی بیوشیمیایی

برای شناسایی اولیه سویه های جداسازی شده از تست های بیوشیمیایی از قبیل رنگ آمیزی گرم، احیای نیترات، SIM، سیمون سیترات، کاتالاز، اکسیداز و TSI استفاده شد (Holt et al., 1998).

## شناسایی مولکولی

شناسایی مولکولی باکتری های برتر تجزیه کننده با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی 16S rDNA انجام شد. پرایمرها

Uni\_1492R (5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3') و Bac27\_F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3')

روش PCR به منظور تکثیر ناحیه ی ژنی مذکور استفاده شد. واکنش تکثیر با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱ میکرولیتر mgcl<sub>2</sub> (غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10XPCR، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Bac27\_F، ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA polymerase 5U، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (غلظت ۱۰ میکرو مولار)، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Uni\_1492R، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱۹/۲ میکرولیتر آب مقطر تزریقی انجام گردید (Sambrook and Russell, 2001). سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمای دناتوراسیون ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ °C به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل ها ۳۵ انجام شد.

محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس باند bp ۱۴۰۰ از ژل آگارز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و جهت تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست شده و همولوژی آنها بررسی گردید (Hassanshahian et al., 2010).

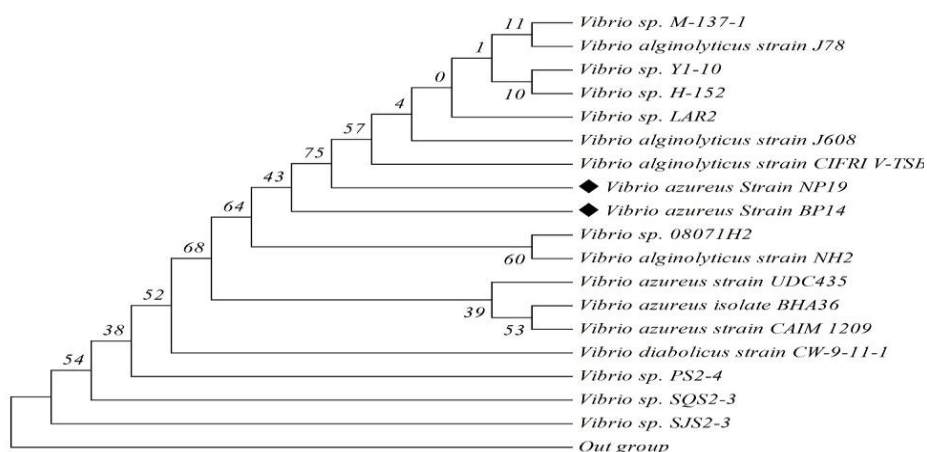
## نتایج

### جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

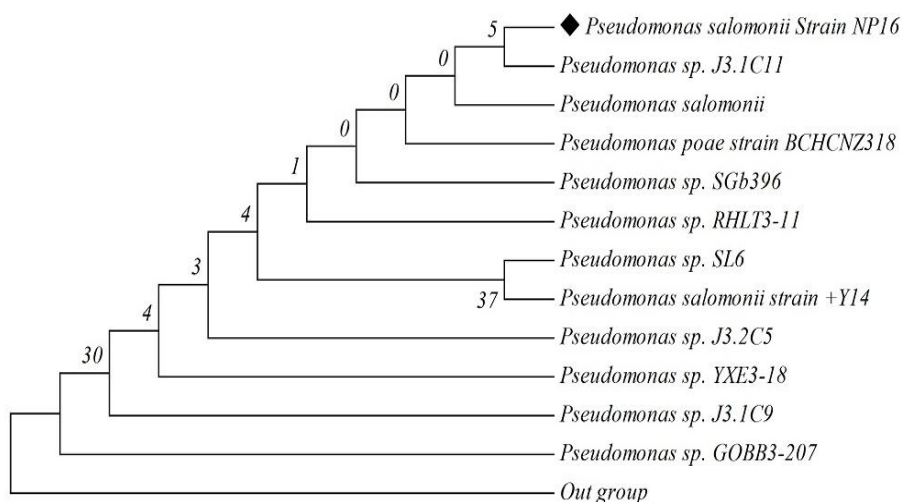
در این تحقیق ۹ جدایه باکتریایی تجزیه کننده جداسازی شد. از این ۹ جدایه تعداد ۵ جدایه از بندر خمیر و ۴ جدایه از بندر میناب جداسازی گردید. برخی از مشخصات این باکتری‌ها در جدول (۱) آمده است. پس از کشت جدایه‌ها درون محیط ONR7a حاوی ۱٪ نفت خام ۳ جدایه BP14، NP16 و NP19 که بیشترین رشد را در نفت خام داشتند از بین ۹ جدایه جداسازی شده انتخاب گردیدند. برای شناسایی این جدایه‌ها ابتدا از تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد. که نتایج به دست آمده در جدول (۱) آمده است. توالی‌های حاصله در بانک‌های ژنی بلاست شدند و مشخص شد که دو جدایه BP14 و NP19 متعلق به گونه‌ی *Vibrio azureus* می‌باشند و جدایه NP16 متعلق به گونه‌ی *Pseudomonas salomonii* بود که درخت فیلوژنی این جدایه‌ها در شکل‌های (۲) و (۳) آمده است. شماره‌های دستیابی این جدایه‌ها در بانک ژنی NCBI به صورت، جدایه BP14 با شماره: LN866607، جدایه NP16 با شماره LN866608 و جدایه NP19 با شماره: LN866609 می‌باشند.

جدول ۱. خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های برتر و سایر جدایه‌های تجزیه کننده نفت خام

| نام تست<br>نام جدایه | O/F | اکسیداز | کاتالاز | حرکت | تولید<br>H <sub>2</sub> S | اندول | احیا نیترات | سیترات | TSI       | رنگ آمیزی گرم           |
|----------------------|-----|---------|---------|------|---------------------------|-------|-------------|--------|-----------|-------------------------|
| BP14                 | +/+ | +       | +       | +    | +                         | -     | -           | +      | قلیا/اسید | ویبریو، گرم منفی        |
| NP16                 | +/- | +       | +       | -    | -                         | -     | +           | -      | قلیا/قلیا | میله ای کوتاه، گرم منفی |
| NP19                 | -/+ | +       | +       | +    | +                         | -     | +           | +      | قلیا/اسید | ویبریو، گرم منفی        |
| NP66                 | -/+ | -       | +       | -    | -                         | -     | +           | +      | قلیا/قلیا | کوکو باسیل، گرم منفی    |
| NP67                 | +/- | -       | +       | -    | -                         | -     | -           | -      | قلیا/قلیا | کوکو باسیل، گرم منفی    |
| NP69                 | -/- | +       | +       | -    | -                         | -     | -           | +      | قلیا/قلیا | باسیل کوتاه، گرم منفی   |
| BP9                  | +/+ | -       | -       | -    | -                         | -     | +           | -      | قلیا/قلیا | کوکو باسیل، گرم منفی    |
| BP21                 | -/- | +       | +       | -    | +                         | -     | -           | +      | قلیا/قلیا | باسیل بلند، گرم منفی    |
| BP64                 | +/- | +       | +       | -    | -                         | -     | +           | +      | قلیا/اسید | کوکو باسیل، گرم منفی    |



شکل ۲. درخت فیلوژنی جدایه‌های NP19 و NP14



شکل ۳. درخت فیلوژنی جدایه‌ی NP16

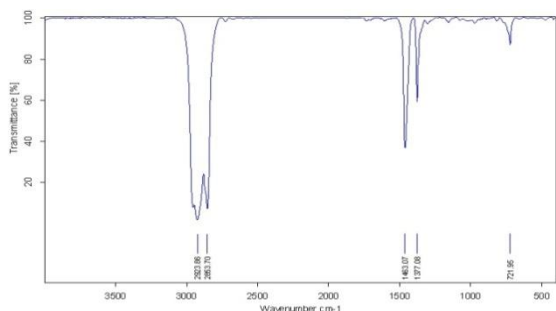
### میزان رشد و حذف نفت خام جدایه‌ها

با کشت ۳ جدایه برتر درون محیط ONR7a برآث حاوی ۱٪ نفت خام به مدت دو هفته، میزان رشد و حذف نفت خام با روش اسپکتوفتومتری بررسی شد. نتایج به دست آمده در جدول (۲) ارائه شده است. همانطور که در این جدول دیده می‌شود جدایه NP16 بالاترین میزان حذف را در بین جدایه‌های مورد بررسی دارا می‌باشد.

جدول ۲. درصد حذف و رشد جدایه‌های برتر جداسازی شده

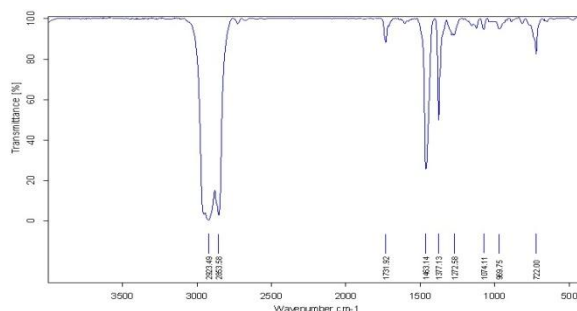
| نام جدایه | درصد حذف نفت خام | میزان رشد (OD <sub>600</sub> ) |
|-----------|------------------|--------------------------------|
| BP14      | ۶۰/۲۰            | ۱/۱۵۰                          |
| NP16      | ۶۶/۳۲            | ۰/۹۷۹                          |
| NP19      | ۶۵/۹۱            | ۱/۳۴                           |

روش دیگری که در این تحقیق استفاده شد، روش FTIR بود که این روش براساس طیف سنجی مادون قرمز صورت می‌گیرد. آنالیز نفت خام حاصل از این روش این ترکیب پیچیده آلی را به دلیل وجود ترکیبات فراوان در آن به صورت پیک‌های ماکسیمم و مینیمم زیادی نشان داد (شکل ۴). با توجه به اندازه پیک‌های نفت خام و اندازه پیک‌های حاصل از تجزیه نفت خام توسط جدایه‌های برتر (شکل‌های ۵، ۶ و ۷)، مشخص می‌شود که جدایه‌های مذکور، بسیاری از ترکیبات موجود در نفت خام را تجزیه کرده‌اند.



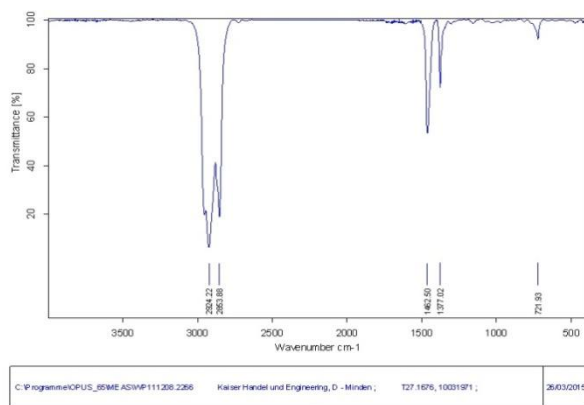
C:\Programme\CPUS\_6\ME AG\WP111208-2255 Kaiser Handel und Engineering, D - Minden ; T27 1476, 10031971 ; 36403208 5  
Page 1/1

شکل ۵. طیف FTIR جدایه BP14

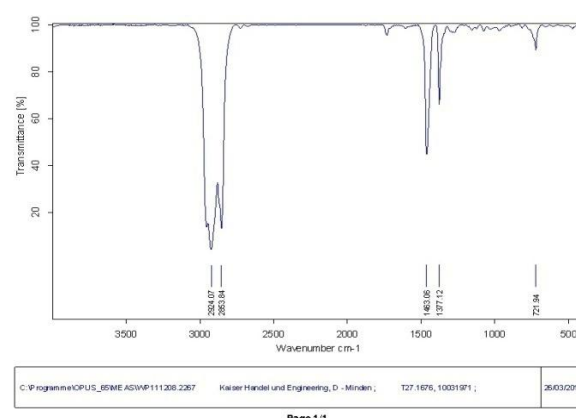


C:\Programme\CPUS\_6\ME AG\WP111208-2255 Kaiser Handel und Engineering, D - Minden ; T27 1476, 10031971 ; 36403208 5  
Page 1/1

شکل ۴. طیف FTIR نفت خام بدون باکتری (شاهد)



شکل ۷. طیف FTIR جدایه NP16



شکل ۶. طیف FTIR جدایه NP19

### تولید بیوسورفاکتانت، فعالیت امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی

براساس نتایج به دست آمده (جدول ۳) مشخص شد که، جدایه‌ی NP16 دارای بیشترین فعالیت امولسیون کنندگی و همچنین جدایه‌ی BP14 دارای بیشترین هیدروفوبیسیته سطح سلولی بود. براساس نتایج به دست آمده جدایه‌های NP16، BP14 و NP19 از بین جدایه‌های دیگر دارای بیشترین میزان حذف نفت خام بودند که این موضوع ارتباط مستقیمی با تولید بیوسورفاکتانت، فعالیت امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی این جدایه‌ها دارد. این موضوع در پژوهش‌های قبلی نیز اثبات شده است.

جدول ۳. میزان امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی جدایه‌ها

| نام جدایه | درصد امولسیون<br>(E <sub>24</sub> ) | درصد هیدروفوبیسیته سطح سلولی<br>(Bath) |
|-----------|-------------------------------------|--|
| NP66      | ۰                                   | ۰                                      |
| NP67      | ۷                                   | ۰                                      |
| NP16      | ۳۱                                  | ۰                                      |
| NP69      | ۰                                   | ۰                                      |
| NP19      | ۷                                   | ۲۰                                     |
| BP9       | ۰                                   | ۰                                      |
| BP21      | ۰                                   | ۰                                      |
| BP64      | ۷                                   | ۳۳                                     |
| BP14      | ۲۴                                  | ۴۵                                     |

### بحث

بسیاری از محققان بر این موضوع تأکید دارند که جنگل‌های حرا حساس‌ترین اکوسیستم ساحلی در برابر آلودگی نفتی به حساب می‌آیند. تاکنون پژوهش‌های زیادی در مورد تجزیه زیستی نفت خام صورت گرفته است، به طوری که مشخص شده است ۷۹ جنس باکتریایی، توانایی استفاده از هیدروکربن‌های نفتی را به عنوان منبع کربن دارند. همچنین ۱۰۳ جنس قارچ، ۹ جنس سیانوباکتری و ۱۴ جنس جلبک از خود توانایی تجزیه و تبدیل هیدروکربن‌ها را نشان داده‌اند. اما در مورد تجزیه زیستی نفت خام در جنگل‌های حرا مطالعات نسبتاً کمی انجام شده است.

باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی دارای تنوع بسیار بالایی است. در سالهای اخیر چندین گروه از محققین بر روی تنوع میکروارگانیسم‌های موجود در این اکوسیستم به منظور کاربرد سیستم‌های تصفیه زیستی به ویژه در شرایط آزمایشگاهی مطالعاتی را انجام داده اند. Brito و همکاران (۲۰۰۶)، گروهی از باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام به نام هیدروکربنوکلاسیک شامل جنس‌های، *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*، *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, *Gordonia* را از جنگل‌های حرا کشور برزیل جداسازی نمودند. Ramsay و همکاران (۲۰۰۰)، تعداد زیاد و متنوعی از باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی را در رسوبات حرا کشور استرالیا گزارش کردند. Kafilzadeh و همکاران (2013b)، باکتری‌های برتر تجزیه کننده برخی از ترکیبات آروماتیک را از جنگل‌های حرا منطقه نایبند واقع در خلیج فارس جداسازی نمودند. در این تحقیق نیز با توجه به تعداد نمونه‌ها تنوع خوبی از باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام مشاهده شد. به طوری که ۹ جدایه باکتریایی از جنگل‌های حرا میناب و بندر خمیر جداسازی شد. سه جدایه توانایی رشد و تجزیه بیشتری از خود نشان دادند و برای مراحل بعد انتخاب شدند که پس از شناسایی مولکولی این ۳ جدایه مشخص شد که، ۲ جدایه متعلق به گونه *Vibrio azureus* و یک جدایه متعلق به گونه *Pseudomonas salomonii* بودند. به منظور بررسی میزان حذف نفت خام توسط باکتری‌ها از روش‌های گوناگونی استفاده می‌شود. Rahman و همکاران (۲۰۰۴) از روش جذب اسپکتروفتومتری در ۴۲۰ نانومتر برای تخمین میزان تجزیه استفاده کردند. این محققین تعداد ۱۳۰ جدایه باکتریایی را از خاک‌های آلوده کشور انگلستان جداسازی کردند سپس میزان حذف نفت خام توسط سویه‌های برتر را مورد آنالیز قرار دادند. در این پژوهش نیز به منظور بررسی میزان حذف نفت خام از این روش استفاده شد و مشخص شد که ۲ جدایه متعلق به گونه *Vibrio azureus* و جدایه متعلق به گونه *Pseudomonas salomonii* پس از گذشت ۱۰ روز بیش از نیمی از نفت خام را حذف کردند.

روش دیگر استفاده شده به منظور بررسی میزان حذف نفت خام روش FTIR بود. Ramadha و همکاران (۲۰۱۳)، از این روش به منظور بررسی میزان حذف نفت خام و سوخت دیزل استفاده نمودند. براساس نتایج این روش در تحقیق فعلی مشخص شد که ۳ جدایه برتر بسیاری از طیف‌ها (ترکیبات) موجود در نفت خام را در مقایسه با شاهد حذف نمودند. بیوسورفاکتانت‌ها، یکسری ترکیبات هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند تنش موجود در سطح خارجی و داخلی سلول باکتریایی را کاهش دهند و باعث می‌شوند که باکتری بتواند هیدروکربن‌های نفتی را راحت‌تر در محیط آبی تجزیه کند Batista و همکاران (۲۰۰۶)، ۱۷ جدایه باکتریایی تولید کننده بیوسورفاکتانت و تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی را از سواحل آلوده کشور برزیل جداسازی کردند. Bayoumi و El-Nagar (۲۰۰۹)، ۲۹ جدایه باکتریایی را از مانگروهای دریای سرخ جداسازی کردند که از میان آنها ۴ جدایه متعلق به گونه‌های *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas pseudomallei*، *Bacillus polymyxa* بالای نفت خام را داشتند و برای تصفیه زیستی مکان‌های آلوده پیشنهاد شدند. در این تحقیق نیز باکتری‌های جداسازی شده از نظر تولید بیوسورفاکتانت دارای فراوانی بالایی بودند، که از میان آنها ۳ جدایه که توان تولید بیوسورفاکتانت بیشتری داشتند توانایی بالاتری در تجزیه نفت خام نسبت به سایر جدایه‌ها نشان دادند.

با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که، ۳ جدایه برتر جداسازی شده شامل ۲ جدایه *Vibrio azureus* و یک جدایه *Pseudomonas salomonii* توان تولید بیوسورفاکتانت را دارند و در نتیجه کارایی بالایی در تجزیه بیش از نیمی از نفت خام در مدت زمان نسبتاً کوتاه دارند. پیشنهاد می‌شود که با تکثیر این باکتری‌ها و بهینه‌سازی شرایط، از آنها در مقیاس میدانی جهت پاکسازی آلودگی‌های نفتی جنگل‌های حرا استفاده شود.

## منابع

نوری، غ.، عرفانی، مو احسان زاده، ن. ۱۳۹۰. کارکردهای اکولوژیکی و اقتصادی جنگل‌های مانگرو (مطالعه موردی: خلیج گواتر استان سیستان و بلوچستان). همایش منطقه‌ای جهاد اقتصادی رهیافت‌ها و راهبردها. چابهار.



- Alongi, D.M. 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environmental Conservation*. 29 (3): 331-349.
- Batista, S.B., Mounteer, A., Amorim, F.R., Totola, M.R. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*. 97: 868-875.
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., Askeri Hesni, M. 2015. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*. 101 (1): 85-91.
- Bayoumi, R.A., El-Nagar, A.Y. 2009. Safe control methods of petroleum crude oil pollution in the mangrove forests of the Egyptian Red Sea coast. *Journal of Applied Sciences Research*. 5(12): 2435-2447.
- Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., Wasserman, J.C.A., Duran, R. 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in guanabara bay, brazil. *Research in Microbiology*. 157(8): 752-762.
- Eglinnton, G. 1975. *Environmental chemistry*. Vol.1. Specialist periodical reports. The Chemical Society, Burlington House, ISBN 0851867553, London.
- Hasanshahian, M., Emtiazi, G. 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *International Biodeterioration Biodegradation*. 62: 170-178.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Kermanshahi, R., Cappello, S. 2010. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. *Soil and Sediment Contamination*. 19 (3): 277-291.
- Hassanshahian, M., Tebyanian, H., Cappello, S. 2012a. Isolation and characterization of two crude-oil degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32 from Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*. 64: 1386-1391.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S. 2012b. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 64: 7-12.
- Hassanshahian, M., Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., Kariminik, A. 2013. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Marine Pollution Bulletin*. 73: 300-305.
- Hassanshahian, M., Zeynalipour, M.S., Hosseinzadeh, Musa, F. 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine Pollution Bulletin*. 82(1-2): 39-44.
- Hayes, M.O., Gundlach, E.R. 1979. *Coastal processes field manual for oil spill assessment*. Prepared for NOAA, Office of Marine Pollution Assessment, Boulder, Colorado. Research Planning Institute, Inc., South Carolina.
- Head, I.M., Jones, D.M., Roling, W.F. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*. 4: 173-182.
- Holt, S.G., Kriey, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1998. *Bergey's manual of determinative for Bacteriology*. Williams and Wilkins, New York.
- Kafilzadeh, F., Amiri, P., Rezaeian Jahromi, A., Mojoodi, N. 2013a. Isolation and molecular identification of fluoranthene degrading bacteria from the mangrove sediments in South of Iran. *International Journal of Biosciences*. 3(5): 60-67.
- Kafilzadeh, F., Rezaei, A., Nowrooz Nejad, M.J. 2013b. Evaluation of phenanthrene biodegradation by indigenous bacteria isolated from mangrove sediments in the Persian Gulf. *Advances in Environmental Biology*. 7(9): 2218-2224.
- Kathiresan, K., Bingham, B.L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*. 40: 81-251.
- Maneerat, S., Kulnaree, P. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Applied Microbiology*. 29: 783-791.
- Neinavaz, E., Khalilzadeh Shirazi, E., Emami, B., Dilmaghani, Y. 2012. Investigation of reproductive birds in Hara Biosphere Reserve, threats and management strategies. In: *The biosphere*. Natarajan, I. (ed.). In Tech Publishing Group. 542 p.

- Proffitt, C.E. 1997. Managing oil spills in mangrove ecosystems: effects, remediation, restoration, and modeling. OCS Study MMS 97-0003. New Orleans: U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region. 76 p.
- Pruthi, V., Cameotra, S.S. 1997. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Technique*. 11: 671-674.
- Ramsay, M.A., Swannell, R.P.J., Shipton, W.A., Duke, N.C., Hill, R.T. 2000. Effect of bioremediation community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 41: 413-419.
- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M. 2004. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*. 85: 257-261.
- Ramadha, B., Rehab, S., Jabbar, D., Rebah, N., NourAbdulatif, S. 2013. Isolation, identification, and assessment the ability of local *Streptomyces* isolate from Iraq to utilize crude oil and diesel fuel. *Scientific Research and Impact*. 2(1): 9-28.
- Sambrook, J., Russell, D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. 652 p.
- Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Soares, M.L.G., De-Rosa, T. 2000. Brazilian Mangroves. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 3: 561-570.
- Vanmathy, K., Nithya, N. 2014. Production and biodegradation potentials of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from oil polluted water samples. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 1(1):149-161.