غربالگری و خالص‌سازی اختصاصی باکتری‌های تالاسواسپیرا و کروموهالوباکتر از لجن‌های نفتی از طریق کموتاکسی به نفت

معصومه‌السادات شهیدی[۱و۴]، مریم‌السادات میرباقری[۲*]، گیتی امتیازی[۲] و عباس اخوان‌سپهی[۳]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

۲-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، ایران

۴- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف‌آباد، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۴

چکیده

مقدار زیادی ضایعات در حین جابجایی و پالایش نفت خام برجا می‌ماند که این ضایعات یک لجن نفتی غلیظ ایجاد می‌کنند که حاوی مقدار زیادی هیدروکربن‌های مشتق شده از نفت هستند. پاک‌سازی زیستی مواد نفتی فرآیندی است که در طی آن میکروارگانیسم‌ها قادرند مواد نفتی را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند و آن را به موادی با سمیت کمتر و یا غیرسمی و بی‌خطر تبدیل کنند. در این مطالعه لجن نفتی از مناطق آلوده منطقه بهرگان واقع در خلیج فارس ایران به‌دست آمد. با توجه به آن که لجن‌های نفتی از کنسرسیوم میکروبی تشکیل یافته است، غالبا در اثر خالص‌سازی، از آنها باکتری‌های مختلفی نظیر سودوموناس و باسیلوس جداسازی می‌گردد. در این روش ساده و ارزان جهت جداسازی باکتری غالب کنسرسیوم از روش جدید شیمیوتاکسی استفاده شد. با استفاده از شیمیوتاکسی به نفت، باکتری غالب و نفت دوست در یک بار جداسازی در روی محیط اختصاصی نفت آگار حاوی ۱۰٪ آب دریا جداسازی گردید. بر اساس نتایج آنالیز لجن نفتی از ترکیبات آلیفاتیک، اکتادکان(C_{18}) و هگزادکان(C_{16}) و از ترکیبات آروماتیک، نفتالن و آنتراسن به عنوان منبع هیدروکربن برای باکتری‌ها انتخاب شد و به همراه گلوکز و نفت خام در شیمیوتاکسی استفاده شد. از طریق روش‌های تشخیصی و بررسی مولکولی باکتری‌های خالص شده تالاسواسپیرا و کروموموهالوباکتر تشخیص داده شد. هر دو باکتری از خانواده پروتئوباکتر و گرم منفی هستند که قادربه هیدرولیز ترکیبات آروماتیک وخطی نفت هستند.

کلمات کلیدی: خالص‌سازی، لجن نفتی، تالاسواسپیرا، کروموهالوباکتر، شیمیوتاکسی.

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی m.mirbagheri@ashrafi.ac.ir
شناسه دیجیتال (DOI: 10.22078/pr.2018.2849.2322)

مقدمه

نفت به عنوان یک منبع مهم انرژی در جهان است و هنوز هیچ منبع انرژی مناسب، در دسترس و قابل اطمینانی جایگزین آن نشده است [۱]. مقدار زیادی از لجن‌های نفتی در مراحل مختلف استخراج و پالایش نفت خام تولید می‌شوند [۲]. نفت خام حاوی هزاران هیدروکربن است و مهمترین ترکیبات آن شامل هیدروکربن‌های اشباع، آروماتیک، پلی سیکلیک آروماتیک هیدروکربن‌ها، رزین و آسفالتن است[۳-۵].

با وجود منافع بسیار زیاد نفت، لجن نفتی تولید شده در هنگام استخراج و یا پالایش آن باعث آلودگی خاک و آب و به طور کلی محیط، زیست خواهد شد. پس از رها شدن لجن نفتی در محیط مقداری از ترکیبات با وزن مولکولی پایین آن از طریق تبخیر وارد فضا می‌شوند و باقی‌مانده آن که قسمت اعظم آن است باعث آلودگی محیط می‌شود. وجود نفت خام در سطح زمین سبب آتش‌سوزی، آلودگی آب‌های زیرزمینی و آلودگی هوا می‌شود و باعث ایجاد تغییرات فیزیکی و شیمیایی در ویژگی‌های زیستگاه‌های طبیعی می‌گردد و ترکیبات آن برای محیط زیست به شدت مضر و سرطان‌زا است [۳، ۶، ۷].

به دلایل ذکر شده پاک‌سازی این آلودگی‌ها از محیط منطقه بهرگان امری ضروری است. بهرگان در منطقه خلیج‌فارس واقع شده است. تولید ۳ نوع نفت سنگین و یکی از بزرگترین ترمینال‌های صادرات دریایی از شاخصه‌های منطقه بهرگان است. این منطقه و نوع نفت آن ویژگی خاص و ممتازی دارد و این منطقه پس از خارک بیشترین میزان تولید را در فلات قاره دارد. به همین دلیل در بررسی حاضر نمونه‌های لجن نفتی و خاک‌های آلوده به لجن نفتی از منطقه بهرگان تهیه شد. برای پاک‌سازی لجن نفتی از محیط، روش‌های استاندارد و معمول فیزیکی و شیمیایی زیادی وجود دارد که از جمله این روش‌ها می‌توان روش سوزاندن و دفن لجن‌های نفتی را نام برد که به علت هزینه بالا و پایین بودن کارایی و گاهی تولید ترکیباتی با سمیت بیشتر استفاده از این روش‌ها را محدود کرده است. در مقایسه با این روش‌ها، روش‌های بیولوژیک وجود دارند که ارزان‌تر و مقرون به صرفه‌تر هستند. پاک‌سازی بیولوژیک مواد نفتی فرآیندی است که در طی آن در نتیجه فعالیت میکروارگانیسم‌هایی که قادرند مواد نفتی را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند و آن را به موادی با سمیت کمتر و یا غیرسمی و بی‌خطر تبدیل کنند [۱، ۳، ۸].

در لجن نفتی و نفت خام میکروارگانیسم‌هایی وجود دارند که بومی آن محل بوده و به مرور زمان خود را با آن وفق داده‌اند همچنین حضور رسوبات نفتی در خاک باعث رشد جنس‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نفت در آن خاک آلوده می‌شود، که این میکروارگانیسم‌ها خود را با شرایط محیط سازش داده‌اند. از میان جمعیت بسیار زیاد میکرو ارگانیسم‌های تجزیه کننده نفت در محل‌های آلوده شده باکتری‌ها نقش بسزایی در تجزیه بیولوژیک نفت دارند [۱، ۶]. به همین دلیل در این مطالعه تنها به جداسازی و بررسی باکتری‌های لجن نفتی و خاک آلوده به لجن نفتی منطقه بهرگان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

شیمیوتاکسی: در این قسمت ابتدا محیط کشت پایه معدنی بدون منبع کربن با ۱۰٪ آب دریای خلیج فارس در منطقه بهرگان و به شکل نیمه جامد با ۰/۷۵٪ آگار ساخته شد و بعد از استریل شدن محیط در اتوکلاو داخل پلیت‌های استریل توزیع گردید. در مرحله بعد به کمک پیپت پاستور استریل در ژل بسته شده چاهک‌هایی ایجاد گردید و ته چاهک‌ها نیز مجدد با همان محیط بسته شد. سپس در چاهک مرکزی نمونه‌های جمع‌آوری شده که لجن

نفتی و یا خاک آلوده به لجن نفتی است قرار داده شد. براساس نتایج آنالیز لجن نفتی از ترکیبات آلیفاتیک، اکتادکان (C_{18}) و هگزادکان (C_{16}) و از ترکیبات آروماتیک، نفتالن و آنتراسن به عنوان منبع هیدروکربن برای باکتری‌ها انتخاب شد و به همراه گلوکز و نفت خام در شیمیوتاکسی استفاده شد. سپس محیط کشت‌های تهیه شده به منظور حرکت باکتری‌های موجود در لجن نفتی به سمت منابع کربنی مختلف و انجام شیمیوتاکسی در دمای محیط قرار داده شد. به مدت ۲ هفته مرتب محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت و هاله‌های ایجاد شده در اثر شیمیوتاکسی باکتری ها به سمت منابع کربنی بررسی گردید.

جداسازی و خالص‌سازی جمعیت‌های میکروبی ناشی از شیمیوتاکسی

به این منظور جمعیت‌های میکروبی ناشی از شیمیوتاکسی که به سمت منابع کربنی مختلف حرکت کرده‌اند و به صورت توده‌ای ما بین نمونه تزریق شده در چاهک وسط و چاهک‌های حاوی منابع کربنی دیده شدند برداشته شد و در محیط کشت پایه معدنی جامد حاوی ۱۰٪ آب دریا و ۱٪ نفت خام کشت داده شد و سپس خالص گشت[۹].

رنگ آمیزی

بررسی خصوصیات میکروسکوپی هر باکتری با توجه به شکل و آرایش آنها مورد بررسی قرار گرفت. ضمن اینکه به لحاظ ساختار دیواره سلولی و وجود لایه‌های مختلف در باکتری‌ها که باعث بروز واکنش‌های مختلف در هنگام رنگ‌آمیزی گرم می‌گردد، از این ویژگی می‌توان برای شناسایی باکتری‌ها استفاده نمود.

بررسی رشد در محیط کشت فاقد آگار

باکتری‌های دارای ژن‌های alk جدا شده از آلودگی‌های لجن نفتی منطقه بهرگان در محیط اختصاصی پایه معدنی[1] در حضور ۱۰٪ آب دریا و ۱٪ نفت خام و در دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱۵۰ rpm کشت داده شد و توانایی رشد این باکتری‌ها در محیط مایع به مدت ۲ هفته، هر ۴۸ hr از طریق اندازه‌گیری کدورت محیط و OD600 با دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد [۱۰].

بررسی رشد در حضور درصدهای مختلف آب دریا

بررسی رشد باکتری‌های انتخاب شده از مرحله قبل در محیط کشت اختصاصی پایه معدنی در حضور ۱٪ نفت خام و درصدهای مختلف ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰٪ در دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱۵۰ rpm انجام شد و به منظور بررسی توانایی رشد این باکتری‌ها در محیط مایع به مدت ۲ هفته، هر ۴۸ hr، OD600 محیط کشت اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد [۱۰].

بررسی رشد بر روی لجن نفتی

بررسی رشد در محیط کشت اختصاصی پایه معدنی در حضور ۱٪ لجن نفتی و ۱۰٪ آب دریا برای bac1 و ۲۰٪ آب دریا برای bac2 انجام شد. سپس باکتری مورد نظر از یک پیش کشت دارای OD600 برابر ۰/۸ به میزان ۵٪ به محیط کشت اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱۵۰ rpm قرار گرفت. نمونه کنترل از همان محیط اما بدون باکتری آماده گردید. OD600 محیط کشت به مدت ۲ هفته، هر ۴۸ hr اندازه گیری شد. در نهایت بر اساس نتایج بدست آمده نمودار رشد آنها رسم شد [۱۱، ۱۲].

شناسایی مولکولی باکتری‌ها از طریق تکثیر تعیین توالی ژن 16S rRNA

به منظور استخراج DNA باکتریها از روش کلونی PCR استفاده شد[۱۰].

PCR ۲ بار و از طریق ۲ جفت پرایمر انجام شد. توالی پرایمرها برای ژن 16S rRNA از طریق پرایمرهای 27F و 1492R به شرح زیر است:

1. Mineral Medium

Forward primer(27F):(5′-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3′)

Reverse primer (1492R):(5′-TACGYTACCTTGTTAC-GACTT-3′)

توالی پرایمرها برای ژن 16S rRNA از طریق پرایمرهای RW01F و DG74 R به شرح زیر است:

Forward primer (RW01F): (5′-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3′)

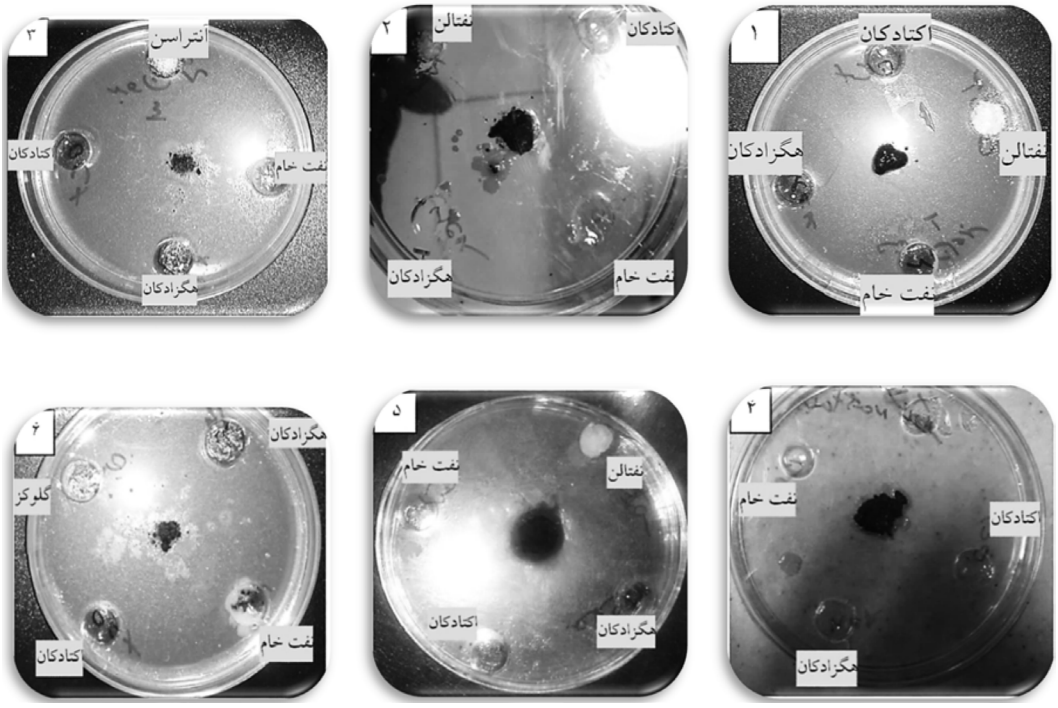
Reverse primer (DG74 R): (5′ -AGG AGGTGA TCC AAC CGC A-3′)

باند مربوط به 27F و 1492R دارای اندازه ۱۵۰۰ bp و باند مربوط به RW01F و DG74 R دارای اندازه ۳۷۰ bp است. محصول PCR نمونه‌های دارای باندهای مربوطه به منظور توالی یابی فرستاده شد. سپس نتیجه توالی یابی در NCBI در قسمت Nucleotide Blast مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص شود ژن مربوط به طور دقیق به کدام باکتری و با چه درصدی شباهت دارد.

بحث و نتایج

جداسازی باکتری‌ها از طریق شیمیوتاکسی

در بررسی حاضر براساس ۶ نمونه جمع‌آوری شده از لجن نفتی و خاک‌های آلوده به لجن نفتی منطقه بهرگان و همچنین منابع کربنی انتخاب شده، شیمیوتاکسی در محیط کشت پایه معدنی نیمه جامد طراحی شد. بعد از گذشت مدت زمان ۲ هفته گرم خانه‌گذاری و انجام شیمیوتاکسی مشاهدات به صورت زیر صورت گرفت. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است نمونه‌های شماره ۱ و ۲ لجن نفتی هستند که شیمیوتاکسی به ترتیب به سمت اکتادکان و هگزادکان دارد و نمونه‌های شماره ۳، ۴، ۵ و ۶ خاک آلوده به لجن نفتی هستند که به ترتیب شیمیوتاکسی به سمت نفت خام و هگزادکان و نفت خام و گلوکز دارد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از شیمیوتاکسی ۶ باکتری‌ها جداسازی شد که همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، این نتیجه حاصل شد که باکتری‌های لجن نفتی تمایل بیشتری به سمت آلکان‌ها و نفت خام دارند.



شکل ۱ نتایج شیمیوتاکسی باکتری‌ها از نمونه‌های جمع‌آوری شده به سمت منابع کربنی

نتیجه رنگ‌آمیزی سویه‌های جدا و خالص شده

در این مرحله به منظور بررسی مورفولوژیک ۳ باکتری جدا و خالص‌سازی شده رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و نتایج به صورت زیر مشاهده شد: bac1 دارای واکنش گرم منفی و به شکل میله‌ای کوتاه و کمی خمیده، bac2 دارای واکنش گرم منفی و به شکل میله‌ای کوتاه، bac4 دارای واکنش گرم مثبت و به شکل میله‌ای بلند که در شکل ۲ آورده شده است.

بررسی توانایی رشد سویه‌های جدا شده در محیط کشت فاقد آگار

۳ سویه جدا شده به طور جداگانه در محیط کشت پایه معدنی مایع حاوی ۱۰٪ آب دریا و ۱٪ نفت خام به عنوان منبع کربن در دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱۵۰ rpm کشت داده شد و به مدت ۲ هفته هر ۴۸ hr OD600 محیط کشت با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و نمودار رشد آنها رسم گشت. نتایج حاصل در شکل ۳ آورده شده است. همانطور که در نمودارها نیز مشاهده می‌گردد، bac4 توانایی بسیار کمی برای رشد در محیط کشت فاقد آگار و حاوی نفت خام داشت بنابر این توانایی کاربرد در حد صنعتی برای حذف آلودگی‌های نفتی را ندارد و به همین دلیل به منظور مطالعات بیشتر از بین ۳ باکتری نام برده حذف گردید اما باکتری‌های bac1 و bac2 دارای رشد خوب و مناسبی در محیط کشت مایع حاوی نفت خام هستند و در نتیجه برای ادامه مطالعات انتخاب گردیدند.

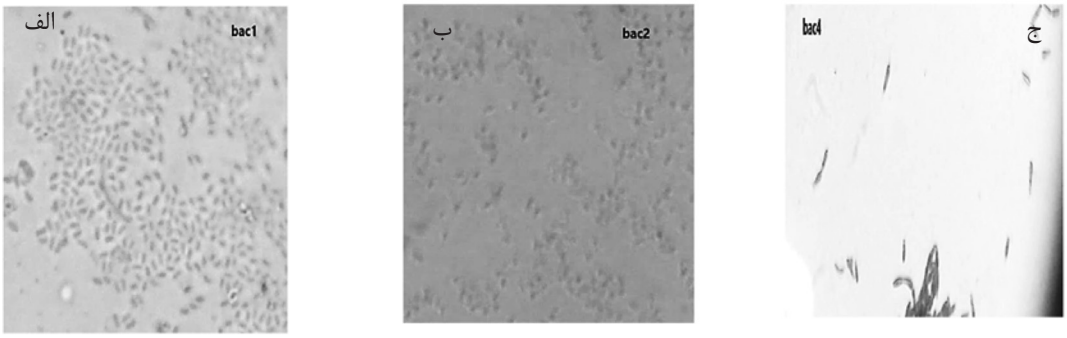
بررسی اثر غلظت‌های مختلف آب دریا بر رشد باکتری‌ها

در این مرحله باکتری‌های bac1 و bac2 در محیط کشت پایه معدنی مایع حاوی ۱٪ نفت خام به عنوان منبع کربن و غلظت‌های مختلف آب دریا شامل: ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰٪ کشت داده شدند. تمامی ارلن‌ها به مدت ۲ هفته در دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱۵۰ rpm کشت داده شد. سپس OD600 محیط کشت هر ارلن هر ۴۸ hr ساعت اندازه‌گیری شد و نمودار رشد آنها رسم گشت. نتایج آن در شکل ۴ آورده شده است.

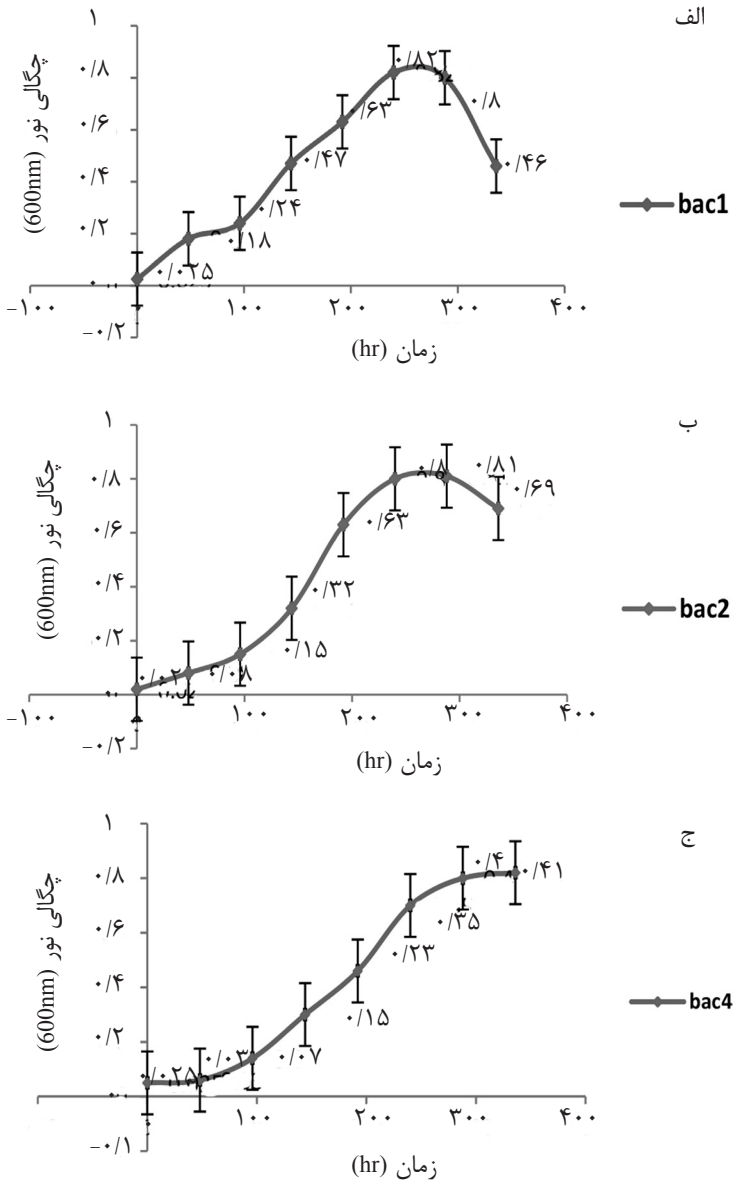
به دلیل این که در اکثر مناطق نفتی منطقه خلیج فارس استخراج نفت در حضور آب دریا انجام می‌شود، لجن‌های نفتی این مناطق نیز دارای درصدی آب دریا هستند. به همین دلیل هر چه باکتری مورد استفاده در حذف این لجن‌ها نمک دوست‌تر باشد توانایی بیشتری در رشد و تجزیه آلاینده‌ها خواهد داشت. از این رو باکتری‌های انتخاب شده در این مطالعه از لحاظ تحمل درصدهای مختلف آب دریا مورد بررسی قرار گرفتند. به همین دلیل باکتری‌های انتخاب شده در حضور درصدهای مختلف آب دریا کشت داده شدند تا به غلظت بهینه آب دریا که در آن باکتری بهترین میزان رشد را دارد، پی ببریم. مشخص شد که bac1 در ۱۰٪ آب دریا بهترین میزان رشد را دارد و bac2 نیز یک باکتری نمک دوست است که توانایی رشد در درصدهای مختلف آب دریارا دارا بود. در نتیجه همان‌طور که در نمودارهای بالا مشاهده می‌شود، bac1 بیشترین رشد را در حضور ۱۰٪ آب دریا دارد. اما باکتری bac2 شور پسندتر بوده و در غلظت‌های مختلف آب دریا رشد خوبی داشت.

بررسی میزان رشد باکتری‌ها در حضور لجن نفتی و تجزیه بیولوژیک آن

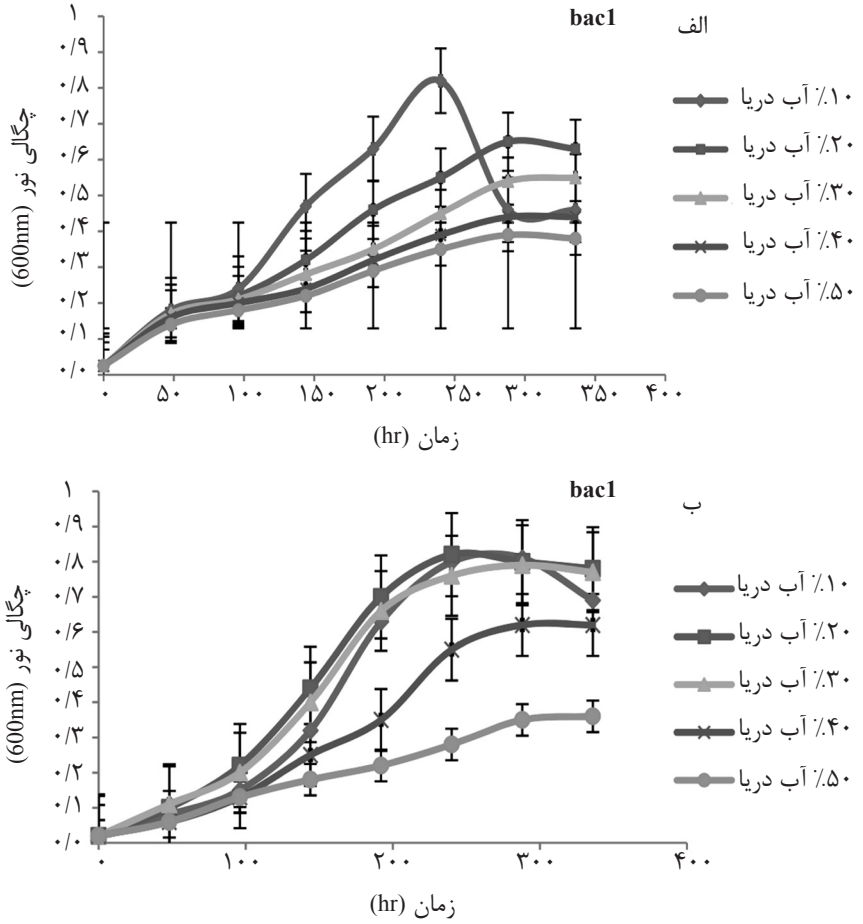
در این مرحله به منظور بررسی تجزیه لجن نفتی توسط باکتری‌های انتخاب شده، باکتری‌های bac1 و bac2 در محیط کشت پایه معدنی مایع حاوی ۱٪ لجن نفتی به عنوان منبع کربن و غلظت ۱۰٪ آب دریا برای bac1 و ۲۰٪ آب دریا برای bac2 کشت داده شد. ارلن‌های کنترل نیز به همین شکل اما بدون باکتری تهیه شد. سپس ارلن‌ها به مدت ۲ هفته در دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱۵۰ rpm کشت داده شدند. در این مدت زمان OD600 محیط کشت هر ارلن هر ۴۸ hr دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و نمودار رشد آنها رسم گردید و نتایج آن در شکل ۵ آورده شده است.



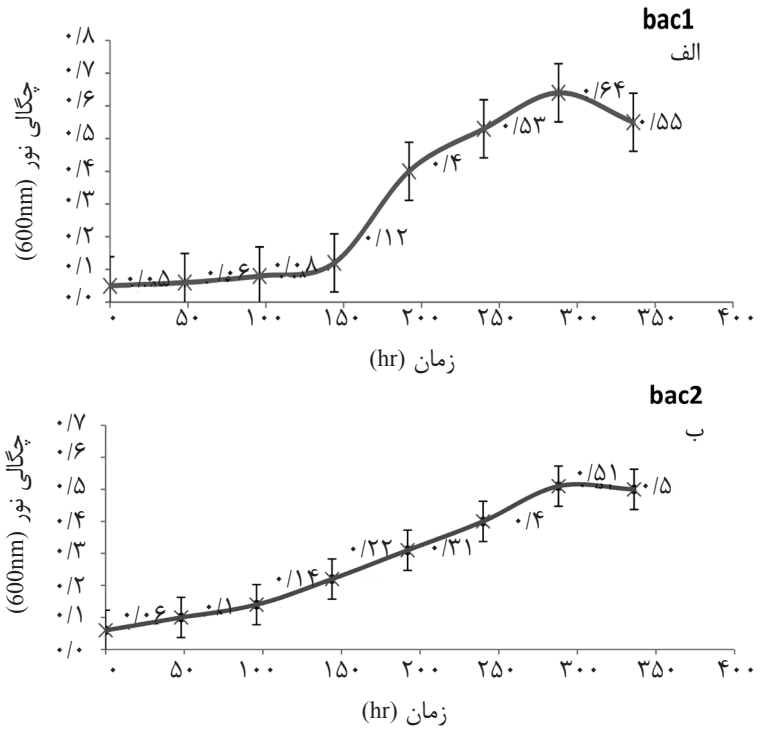
شکل ۲ شکل میکروسکوپی الف bac2 ب ،bac1 و ج bac4 در نتیجه رنگ‌آمیزی گرم



شکل ۳ رشد الف bac1، ب bac2 و ج bac4 در محیط کشت پایه معدنی مایع حاوی ۱٪ نفت خام. شکل‌ها با ۳ تکرار رسم شده است



شکل ۴ رشد الف bac1 و ب bac2 در حضور درصدهای مختلف آب دریا در محیط کشت پایه معدنی مایع حاوی ۱٪ نفت خام



شکل ۵ رشد الف bac1 و ب bac2 در محیط کشت پایه معدنی مایع حاوی ۱٪ لجن نفتی (نمودارها با ۳ تکرار رسم شده‌اند)

همان‌طور که در نمودارها مشاهده می‌شود هر دو باکتری تقریبا بیشترین میزان رشد را در روز ۱۲ یا بعد از ۳۰۰ hr دارا هستند.

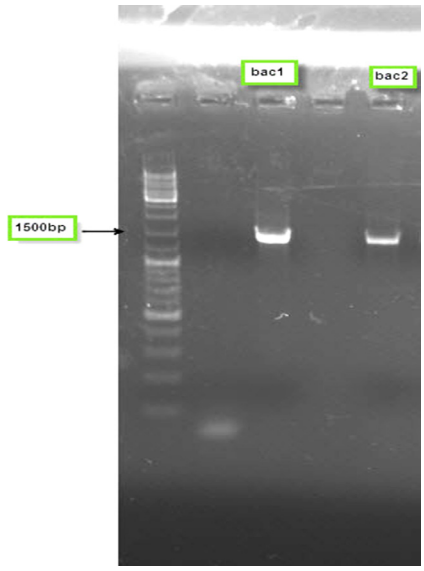
شناسایی مولکولی باکتری‌های انتخاب شده

در این مرحله باکتری‌های bac1 و bac2 ابتدا در محیط کشت پایه معدنی همراه با ۱٪ نفت خام کشت داده شدند. سپس کلنی‌های هر باکتری به طور جداگانه به درون ۱ میکروتیوب حاوی ۵۰ µL آب مقطر استریل است، برده شد. سپس بعد از ۱۰ min قرارگیری در ترموشیکر در دمای ۹۵°C از آن به عنوان الگو در PCR استفاده گردید. بعد از آماده سازی ترکیبات لازم برای انجام PCR ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمر عمومی این ژن، شامل یکبار با پرایمرهای 27F-1492R و یکبار هم با پرایمرهای RW01F و DG74 R بر طبق برنامه توضیح داده شده انجام شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR این ژن‌ها در شکل‌های ۷ و ۶ آورده شده است.

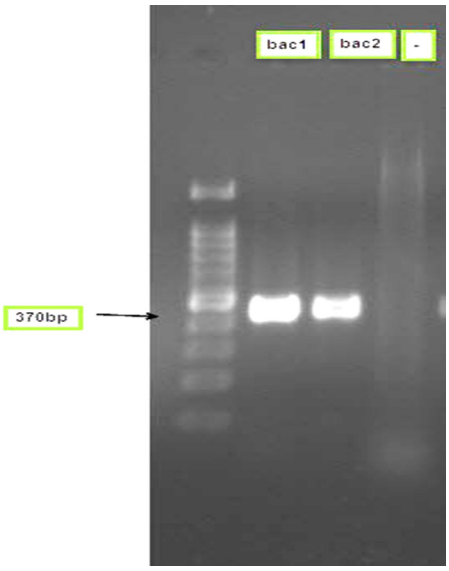
درنتیجه Nucleotid blast توالی ژن 16S rRNA مربوط به bac1 در سایت NCBI این باکتری بیشترین شباهت را به میزان ۹۹٪ به ژن 16S rRNA باکتری Thalassospira sp. MCCC 1A01288 داشت. در نتیجه Nucleotide blast توالی 16S rRNA مربوط به bac2 در سایت NCBI این باکتری بیشترین شباهت را به میزان ۹۹٪ با 16S rRNA باکتری Chromohalobacter israelensis داشت.

لجن نفتی حاوی هیدروکربن‌های مختلف می باشد که میکروارگانیسم‌ها به منظور تجزیه زیستی باید بتوانند از این منابع کربنی به عنوان سوبسترا استفاده نمایند. که در این مکانیسم کاتابولیسم لجن نفتی به وسیله باکتری‌ها از طریق اکسیداسیون سوبسترا به وسیله آنزیم اکسیژناز انجام می‌شود و به همین دلیل وجود اکسیژن و شرایط هوازی ضروری می‌باشد. در نتیجه در این مطالعه به منظور جداسازی باکتری‌ها شرایط هوازی فراهم شد و باکتری‌های هوازی جداسازی گردیدند.

مطالعات در زمینه نواحی آلوده به نفت و هیدروکربن‌های نفتی نشان داده حضور آلفا و گاما پروتیو باکتری‌ها شامل: Halomonas ،Chromohalobacter ،Alcanivorax Thalassospira ،Idiomarina ،Marinobacter که این میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه نفت خام و چندین پلی آروماتیک هیدروکربن شامل: پیرن، فلورانتن، آنتراسن، فنانترن، نفتالن، بنزوپیرن، بنزآنتراسن هستند و می‌توانند این ترکیبات را به عنوان منبع کربن در حضور ۱ تا ۱۵٪ نمک استفاده نمایند.



شکل ۶ محصول PCR ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمر 27F -1492R



شکل ۷ محصول PCR ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمر RW01F و DG74 R

اغلب محیط‌های دارای آلودگی‌های نفتی نمکی بوده و دارای میزانی از آب دریا هستند و از طرفی فرآیندهای میکروبیولوژیکی در غلظت بالای نمک به خوبی عمل نمی‌کنند، از این رو به منظور تجزیه بیولوژیک آلودگی‌های این نواحی استفاده از میکروارگانیسم‌های تحمل کننده نمک و یا دوستدار نمک مناسب است. میکروارگانیسم‌های نامبرده قادرند در حضور ۱ تا ۱۵٪ نمک به خوبی رشد نمایند [۱۳].

Thalassospira یک جنس گرم منفی و دارای حرکت و شکل ویبریو یا اسپیرال است. هالوتولرانت و شیمیوهتروتروف است. این باکتری در کلاس *Alphaproteobacteria*، راسته *Rhodospirillales* و در خانواده *Rhodospirillaceae* قرار دارد. این باکتری در محیط‌های مختلف یافت شده است. این باکتری به دلیل تجزیه ترکیبات نفتی و پلی آروماتیک هیدروکربن‌ها مورد توجه هستند [۲ و ۱۴].

Chromohalobacter در گروه میکروارگانیسم‌های هالوفیل قرار دارد. این باکتری در کلاس *Gammaproteobacteria*، راسته *Oceanosoirillales*، خانواده *Halomonadaceae* قرار دارد. باکتری‌های متعلق به این جنس گرم منفی، هتروتروف، میله‌ای، هوازی، مزوفیل هستند [۱۵].

دو گونه *H. Canadensis* و *H. israelensis* که متعلق به جنس *Halomonas* بودند به دلیل ویژگی‌های فیلوژنتیک در جنس *Chromohalobacter* قرار گرفته‌اند و *Chromohalobacter Canadensis* و *Chromohalobacter israelensis* نام گرفتند. *Chromohalobacter israelensis* دارای پیگمان کرمی هستند [۱۶].

بیهاری و همکارانش توانستند یک باکتری تجزیه کننده آلکان با نام *Acinetobacter haemolyticus* AR-46 جداسازی نمایند که قادر به تجزیه آلکان‌های با زنجیره بلند هست و قادر است از هگزادکان به عنوان تنها منبع کربن استفاده نماید. شیری و همکارانش توانست از ضایعات نفتی پالایشگاه یک گونه *Acinetobacter baumannii* را جداسازی نماید که قادر است در محیط کشت حاوی هگزادکان به عنوان منبع کربن به خوبی رشد نماید و قادر به حذف ۶۲٪ هگزادکان در ۶ روز بود [۱۷].

نتیجه‌گیری

در روش شیمیوتاکسی می‌توان با استفاده از توانایی باکتری‌ها در انجام شیمیوتاکسی و افزایش در تجزیه زیستی، در مدت زمان کوتاه‌تر بهترین باکتری که بیشترین قدرت حرکت و رقابت با سایر باکتری‌ها برای حرکت به سمت منابع کربنی دارد را جداسازی نمود. در بررسی حاضر نتایج آنالیز لجن نفتی بهرگان نشان داد که بیشترین حجم آن آلکان‌ها هستند. در نتیجه باکتری‌های تجزیه کننده آلکان از طریق روش شیمیوتاکسی جداسازی شدند. این باکتری‌ها علاوه بر توانایی در تجزیه ترکیبات نفتی، توانایی آن در استفاده از یک یا چند هیدروکربن بیشتر است. با پی بردن به بهترین منبع هیدروکربن برای یک باکتری می‌توان از این باکتری علاوه بر استفاده در پاکسازی لجن‌های نفتی، در پاکسازی آلودگی‌های پتروشیمی‌ها و مناطق آلوده به یک هیدروکربن خالص نیز استفاده نمود.

مراجع

[1]. Akhavan Sepahi A., Dejban G., Emami M. and Nakhoda A., "*Isolation and characterization of crude oil degrading Bacillus spp*," Iran J. Environ Health Sci. Eng., Vol. 5, No. 3, pp.149-154, 2008.

[2]. Liu W., Luo Y., Teng Y., Li Z. and Ma L., "*Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes*," Env. Geochem. Health., Vol. 32, No. 1, pp. 23–29, 2010.

[3]. Diaz-Ramirez I., Ramirez-Saad H., Gutierrez-Rojas M. and Favela-Torres., "*Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from Cyperus laxus rhizsphere soil in a*

contaminated site," .J. Microbiol., Vol. 49, pp. 755-461, 2003.

[4]. Perezsilva R., Rodrigues A., Gomez Montest deoca J. and Moreno D., "*Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa AT18 strain*," Technologia Quimica., Vol. I8, No. 81, pp. 70-77, 2006.

[5]. Vinas M., Grifoll M., Sabate J. and Solana›s A., "*Biodegradation of a curde oil by three microbial consorta of different origins and metabolic capabilities*," J. Indus Mmicrobial Biotechnol., Vol. 28, pp. 252-260, 2002.

[6]. Khan K., Naeem M., Arshed M. and Asif M., "*Extraction and characterization of oil degrading Bacteria*," J. Appl Sci., Vol. 6, No. 10, pp. 2302-2306, 2006.

[7]. Jasmine J. and Mukherji S., "*Characterization of oily sludge from a refinery and biodegradability assessment using various hydrocarbon degrading strains and reconstituted consortia*," J. Env. Manage., Vol. 149, pp. 118-125, 2015.

[8]. Rahman K., Banat I., Thahira J., Thayumanavan T. and Lakshmanaperumalsamy P., "*Bioremediation of gasoline cont aminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coirpith and rhamnolipid Biosurfactant*," Bioresour Technol., Vol 1. No 81, pp. 25-32, 2002.

[9]. Ionescu R., Tanase A., Vassu T., Pelinescu D., Chiciudean I., Csutak O. and Stoica I., "*Characterization of Pseudomonas strains with hydrocarbons-degrading potential*," Rom Biotechnol Lett., Vol. 18, pp. 8372-8380, 2013.

[10]. Tebyanian H., Hassanshahian M. and Kariminik A., "*Degradation by Teskumurella and Stenotrophomonas strains isolated from hydrocarbon contaminated soils*," JJM., Vol. 6, No. 7, pp. 1-7, 2013.

[11]. Hou D., Shi Z., Shen, X., He Y., Sun M., luo Q. and Wang Q., "*Full Length Research Paper Isolation, identification and alkane hydroxylase genes detection of a marine diesel-degrading bacterial strain (F9)*," Africacn J. Microbiol Res., Vol. 7, No. 22, pp. 2794-2802, 2013.

[12]. Sierra-Garc I., Correa Alvarez J., Pantaroto de Vasconcellos S., Pereira de Souza A., dos Santos Neto E.V. and Maia de Oliveira V.R., "*New Hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian Petroleum Reservoirs*", PLoS ONE, Vol. 9 ,No. 2, pp. 1-13, 2014.

[13]. Fathepure B., "*Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments*," Front Microbiol., Vol. 5, pp. 173 -186, 2014.

[14]. Kappell A., Wei Y., Newton R., Van Nostrand J., Zhou J., McLellan S. and Hristova K., "*The polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential of Gulf of Mexico native coastal microbial communities after the Deepwater Horizon oil spill*," Front Microbiol., Vol. 5, PP.13-25, 2014.

[15]. Arahal D., Garc M., Ludwig W., Schleifer K. and Ventosa A., "*Transfer of Halomonas canadensis and Halomonas israelensis to the genus Chromohalobacter as Chromohalobacter canadensis comb. nov. and Chromohalobacter israelensis comb*," Nov., Int. J. Sys. Evo. Microbiol., Vol. 51, pp. 1443–1448. 2001.

[16]. Biharia,Z., Pettko-Szandtner,A., Csanadi, G., Balazsa,M., Bartosa,P., Kesseru,P., Kissa,I. and Mecsa,I., "*Isolation and characterization of a novel n-alkane-degrading strain, acinetobacter haemolyticus AR-46*," Vol. 62, pp. 285-295, 2007.

[17]. Shiri Z., Kermanshahi R., Soudi M. and Farajzadeh D., "*Isolation and characterization of an n-hexadecane degrading Acinetobacter baumannii KSS1060 from a petrochemical wastewater treatment plant*," Int. J. Environ Sci. Technol., Vol. 12, pp. 455–464, 2015.

Petroleum Research

Petroleum Research 2018(July-September), Vol. 28, No. 100. 49-51

DOI: 10.22078/pr.2018.2849.2322

Specialized Screening and Purification of Thalassopiria and *Chromohalobacter* Bacteria from Oil Sludge using Chemotaxi to Petroleum

Masumeh sadat Shahidi[1,4], Maryam sadat Mirbagheri*[2], Giti Emtiazi[2], and Ali Akhavan Sepahi[3]

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

2. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran

3. Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

4. Department of Biology, Islamic Azad University, Najafabad Branch, Isfahan, Iran

m.mirbagheri@ashrafi.ac.ir

DOI: 10.22078/pr.2018.2849.2322

Received: June/22/2017 Accepted: February/03/2018

Abstract

Large amounts of waste from various stages in the process of refining crude oil are produced in the Persian Gulf in Iran. This waste is a viscous oil sludge containing high amounts of petroleum derived hydrocarbons. So oil sludge is environmental concerns and should be treated. Biological treatment (bioremediation) to deal with a wide range of organic pollutants and petroleum hydrocarbons is useful. In this study, the oil sludge has been obtained from the contaminated site from Bahregan area in the Persian Gulf of Iran. Some oil sludge containing bacterial consortium, Chemotaxis in synthetic Mineral semisolid agar medium was used for the isolation of alkane degrading bacteria from oil sludge biodegradation of octadecane, hexadecane, naphthalene, and anthracene were determined. Strains isolated in this study were identified by 16S rRNA gene sequencing as Thalassospira and Chromohalobacter. They are Gram negative and belonged to Rodospiracea which could hydrolyzed aromatic and linear oil compound.

Keywords: Purification, Oil Sludge, Thalassospira, *Chromohalobacter*, Chemotaxi.

Introduction

Oil is an important source of energy in the world, and it has not yet been replaced by any suitable, accessible and reliable energy source [1]. A large amount of oil sludge is produced at various stages of the extraction and refining of crude oil [2].Large amounts of waste from various stages in the process of refining crude oil are produced in the Persian Gulf in Iran. This waste is a viscous oil sludge containing high amounts of petroleum derived hydrocarbons. So oil sludge is environmental concerns and should be treated. Biological treatment (bioremediation) to deal with a wide range of organic pollutants and petroleum hydrocarbons is useful. In oil sludge and crude oil, there are microorganisms that are native to that location and adapted over time. Also, the presence of oil deposits in the soil causes the growth of different degrading microorganisms in the contaminated soil, [1, 3]. Therefore, in this study only isolation and analysis of oil sludge and soil contaminated with oil sludge in the region of Behregan were investigated.

Methodology

In this study, the oil sludge has been obtained from the contaminated site from Bahregan area in the Persian Gulf of Iran. Some oil sludge containing bacterial consortium, Chemotaxis in synthetic Mineral semisolid agar medium was used for the isolation of alkane degrading bacteria from oil sludge biodegradation of octadecane, hexadecane, naphthalene, anthracene were determined. The microscopic characteristics of each bacterium were studied, then growth of bacteria in sea water and oil sludge and medium without agar investigated. Molecular identification of bacteria done by 27F and 1492R primers.

Discussion and Results

In chemotaxis, using the ability of bacteria to perform chemotaxis and increasing bio-degradation, it is possible to isolate, in a shorter time, the best bacteria that have the greatest ability to move and compete with other bacteria to move toward carbon sources. In the present study, the results of the analysis of the Bahrgan oil sludge showed the highest volume of alkane. In some isolated strains, Three strains selected by microscopic studies. Strains isolated in this study were identified by 16S rRNA gene sequencing as Thalassospira and Chromohalobacter. They are Gram negative and belonged to Rodospiracea that could hydrolyzed aromatic and linear oil compound. Selected bacteria were cultured in presence of different percentages of seawater to determine the optimal concentration of seawater in which the bacteria had the best growth. It was found that as Thalassospira has the best growth rate in 10% of seawater, and Chromohalobacter is a salt-loving bacterium which has the ability to grow in various percentages of water. An alkaline decomposer bacterium called Acinetobacter haemolyticus AR-46 was isolated by Bihari et al in 2007 [4]. This alkaline decomposer bacterium is capable of decomposing long-chain alkanes; moreover, it is able to use hexadecane as the sole source of carbon [4]. The petroleum refineries of a species of Acinetobacter baumannii which could grow well in a culture medium containing hexadecane as a carbon source was isolated by Shiri and his colleagues in 2015; moreover, 62% hexadecane were eliminated by them in 6 days [4, 5].

Conclusions

Alcan decomposing bacteria were isolated by chemotaxis. In addition to its ability to decompose petroleum compounds, these bacteria are more capable of using one or more hydrocarbons. By finding the best source of hydrocarbons for a bacterium, this bacterium can be used to clean up petrochemicals and contaminated areas with pure hydrocarbons in addition to cleaning up oil spills.

References

[1]. Akhavan Sepahi A., Dejban G., Emami M. and Nakhoda A., "*Isolation and characterization of crude oil degrading Bacillus spp*," Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering, Vol. 5, No. 3, pp. 149-154, 2008.

[2]. Liu W., Luo Y., Teng Y., Li Z. and Ma L., "*Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes*," Journal of Environmental of Geochemistry and Health, Vol. 32, No. 1, pp. 23–29, 2010.

[3]. Khan K., Naeem M., Arshed M. and Asif M., "*Extraction and characterization of oil degrading Bacteria*," Journal of Applied Science, Vol. 6, No. 10, pp. 2302-2306, 2006.

[4]. Biharia,Z., Pettko-Szandtner,A., Csanadi, G., Balazsa,M., Bartosa,P., Kesseru,P., Kissa,I. and Mecsa,I., "*Isolation and characterization of a novel n-alkane-degrading strain, acinetobacter haemolyticus AR-46*," Zeitschrift für Naturforschung C, Vol. 62, pp. 285-295, 2007.

[5]. Shiri Z., Kermanshahi R., Soudi M. and Farajzadeh D., "*Isolation and characterization of an n-hexadecane degrading Acinetobacter baumannii KSS1060 from a petrochemical wastewater treatment plant*," International Journal of Environmental Science and Technology, Vol. 12, pp. 455–464, 2015.