

## جداسازی و خالص سازی باکتری های تجزیه کننده مواد نفتی از خاک های آلوده و شناسایی ترکیبات حاصل از تجزیه این مواد

سید افشین حسینی بلداجی<sup>۱\*</sup>، حامد سلطانی<sup>۲</sup>، مریم تیموری<sup>۳</sup>

### چکیده

**مقدمه:** روش های مختلفی جهت حذف آلودگی های نفتی از منابع طبیعی وجود دارد که از این بین روش های زیستی به دلیل ارزان بودن، پایداری و زیست تخریب پذیر بودن، روش های مناسب تری به نظر می رسند. بر همین اساس هدف از تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی باکتری های دارای توانایی تجزیه نفت از خاک های آلوده به منظور بدست آوردن شرایط بهینه تجزیه کنندگی این باکتری ها در مطالعات تکمیلی بود. **روش ها:** نمونه برداری از خاک های مناطق آلوده در اطراف پالایشگاه تهران صورت گرفت و پس از جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت در محیط کشت دارای ۲ درصد نفت سفید (به عنوان تنها منبع کربن)، توانایی این ایزوله ها در تجزیه نفت با استفاده از دو تکنیک *FT-IR* و *GC-MS* ارزیابی شد. در نهایت این ایزوله ها با استفاده از روش های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. **نتایج و بحث:** نتایج حاصل نشان داد که سه ایزوله ی تجزیه کننده نفت، قادر بودند ترکیبات آروماتیک نفت را کاهش داده و یا کاملاً از بین ببرند. آن ها آلکان های پیچیده ی نفت را به آلکان های ساده تر تجزیه کرده و در محیط کشت آن ها، موادی با گروه های عاملی آمین و کربوکسیل (ترکیبات آلی) نیز مشاهده شد. شناسایی این سه جدایه نشان داد که آن ها به گونه های نوکاردیا، باسیلوس سوبتیلیس و اسینتوباکتر بومانی تعلق دارند. به عنوان نتیجه گیری می توان عنوان نمود استفاده از روش پالایش زیستی با استفاده از گونه های مذکور جایگزین مناسبی برای روش های فیزیکی و شیمیایی می باشد. جداسازی باکتری های بومی خاک که با مواد نفتی موجود در خاک سازش پیدا کرده اند می تواند در زمینه ی پالایش زیستی کمک کننده باشد.

**واژه های کلیدی:** آلودگی نفتی، باکتری های تجزیه کننده، پالایش زیستی، هیدروکربن های آروماتیک.

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. (\* ایمیل نویسنده مسئول: [Afshin.h.b@gmail.com](mailto:Afshin.h.b@gmail.com))

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار پژوهشی، موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

## مقدمه

نگران‌کننده‌ترین آلاینده‌های محیط زیست، هیدروکربن‌ها در فرم‌های مختلف هستند. نفت به محیط زیست بدلیل استفاده از حجم بالای نفتی به عنوان ماده خام مورد، تولید انرژی و مواد شیمیایی از مواد نفتی و همچنین حوادث در طول فرآیندهای عملیاتی، حمل و نقل، پالایش، ذخیره‌سازی و مصرف صورت می‌گیرد (Gerhardt *et al.* 2009; Nogales *et al.* 2011). نفت در تعارض با محیط زیست به دلیل برهم‌کنش با عوامل فیزیکی و بیولوژیکی، دچار تغییراتی در ویژگی‌های اصلی خود می‌شود. ماندگاری هیدروکربن‌های نفت در محیط به دلیل سرعت تجزیه زیستی آهسته آنهاست و می‌تواند کیفیت آب را به خطر بیندازد و نیز ممکن است در خاک، مواد غذایی مانند سبزیجات، ماهیچه‌ها و بدن موجودات آبزی انباشته شود (Abdel-Shafy & Mansour 2016). پالایش زیستی یکی از فناوری‌های حذف آلودگی می‌باشد که در آن از سیستم‌های زیستی برای تخریب یا تغییر شکل مواد شیمیایی زیان‌بار استفاده می‌شود. هدف پالایش زیستی نفت، تجزیه کامل هیدروکربنها به آب و دی‌اکسیدکربن توسط ریز جانداران است. این تکنیک نسبت به سایر روشهای حذف آلودگی نفتی مزایایی متعددی از جمله تبدیل مواد سمی به محصولات نهایی بی‌خطر، هزینه پایین، کاهش اثرات جانبی بر سلامت انسان و محیط زیست، تأثیر طولانی مدت و بالاخره توانایی حذف آلودگی به صورت درجا و بدون ایجاد اختلالی در اکوسیستم دارد. در میان روشهای زیستی، استفاده از باکتریها در حذف آلودگیها بازدهی بسیار خوبی دارد (Khosravinodeh *et al.* 2012). باکتریها و قارچها تنها گونه‌های بیولوژیکی دارای توانایی متابولیکی برای استفاده از کربن نفت در سنتز سلولی خود هستند. هیدروکربنهای نفتی به طور متوسط به میزان ۱۳ تا ۵۰ درصد توسط باکتریها و نیز ۶ تا ۸۲ درصد توسط قارچها تجزیه می‌شوند. اما به دلایلی مانند فراوانی زیاد، افزایش سریع در سرعت رشد و توان استفاده از طیف وسیعی از هیدروکربنها، از باکتریها برای پاکسازی خاکهای آلوده استفاده می‌گردد (Doostaki *et al.* 2012). فرآیند پالایش زیستی بر عملکرد آنزیم‌های میکروبی جهت تبدیل یا تجزیه‌ی آلاینده‌های مضر استوار است و به‌وفور در کاهش آلودگی‌های هیدروکربنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wolicka *et al.* 2009). پالایش زیستی، به ویژه زمانی

که بتوان آن را در محل آلودگی انجام داد، ابزاری مقرون به صرفه و مؤثر جهت پاکسازی آلودگی است. این فرآیند یک راه حل سازگار با محیط زیست برای رفع مشکل آلودگی با تأثیر اکولوژیک اندک است. محصولات نهایی تجزیه‌ی زیستی (کانی سازی) مثل آب و دی اکسید کربن برای انسان و محیط زیست بی‌ضرر هستند. طی روند پالایش زیستی آلاینده‌های هیدروکربنی، چندین شاخص جهت ارزیابی اثربخشی پالایش در نظر گرفته می‌شوند. آنالیز شیمیایی پایه‌ای برای شناسایی آلاینده‌ها و تکنیک‌های استاندارد میکروب‌شناسی جهت سنجش کمی جمعیت‌های زنده‌ی میکروبی، از جمله‌ی این شاخص‌ها هستند. ابتدا ماهیت آلاینده‌ها باید از لحاظ غلظت و ماهیت شیمیایی و ماهیت ماتریکس آلوده تعیین شود. شاخص حیاتی دیگر در پایش، سنجش جمعیت‌های میکروبی در گیر در تجزیه و عوامل محیطی مؤثر بر نرخ متابولیسم میکروبی است (Kumar & Khanna 2010).

با افزایش حجم آلاینده‌های زیست محیطی، حفظ و حراست از محیط زیست و منابع طبیعی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. ترکیبات هیدروکربنی موجود در نفت خام یکی از انواع آلاینده‌هایی هستند که به طور متناوب، در حجم زیاد و از راه‌های متعدد وارد محیط زیست می‌شوند. آزادسازی این آلاینده‌ها در محیط زیست یا سوزاندن آن‌ها بدون فرآوری مشکلات بسیاری برای اکوسیستم ایجاد می‌کند. در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن روش‌های مؤثر جهت حذف آلودگی‌های نفتی انجام شده است. یکی از این روش‌ها تجزیه‌ی زیستی مواد نفتی به کمک باکتری‌ها است (Sarkar et al. 2016). تجزیه زیستی هیدروکربن نفتی در محیط زیست فرآیندی پیچیده است. جنبه‌های کمی و کیفی بستگی به ماهیت و مقدار روغن یا هیدروکربن موجود و ترکیب جوامع میکروبی بومی دارد. باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن به طور گسترده در آب دریا و همچنین در زیستگاه‌های خاکی وجود دارند و استفاده از آن‌ها در پالایش زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن، که حاصل توانایی آن‌ها در تجزیه و یا سم‌زدایی آلاینده‌های آلی است، ثابت شده است که راهبردی مؤثر، مقرون به صرفه، کارا و سازگار با محیط زیست است (Greer & Juck 2017). در ایران نیز در سال‌های اخیر

تحقیقاتی در خصوص جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی انجام شده است. در مطالعه پاپی و همکاران که به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از خاک‌های آلوده مناطق مختلف خوزستان انجام گرفت، ۴ گونه باکتری تجزیه‌کننده نفت به نام‌های *Kocuria Polar*، *Delfita lacutris*، *Planomicrobium chinense* و *Ochrobactrium ciceri* بر اساس توالی یابی ژن 16S rRNA شناسایی گردیدند، بر اساس نتایج بدست آمده باکتری *Planomicrobium chinense* بیشترین میزان تخریب/قدرت رشد و باکتری *Delfita lacutris* کمترین میزان تخریب/قدرت رشد را نشان دادند (Papi *et al.* 2016). در مطالعه کوجوری و اردستانی که به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های آلوده سروستان استان فارس انجام شد، ۴ گونه باکتری تجزیه‌کننده *Enterobacter sp.* SA711، *Acinetobacter sp.* SA172، *Bacillus sp.* SA212، *Pseudomonas sp.* SA75، *Bacillus sp.* SA23 دارای بیشترین قدرت تخریب مواد نفتی معرفی شدند (Kojouri & Ardestani 2018). با توجه به مطالعاتی که به آنها اشاره شد، گونه‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی در مناطق مختلف متعلق به جنس‌های مختلف می‌باشند. هدف از تحقیق حاضر یافتن سویه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده نفت و ارزیابی توانایی باکتری‌های جداسازی شده در تجزیه نفت، از خاک‌های آلوده اطراف تهران بوده است.

## مواد و روش‌ها

- **نمونه برداری:** از آنجایی که استخراج بلند مدت و تولید مشتقات نفتی متنوع باعث گسترش این آلودگی‌ها در خاک‌های اطراف مکان‌های استخراج و پالایش نفت می‌شود، نمونه برداری از زمین‌های آلوده به مواد نفتی اطراف پالایشگاه تهران جمع‌آوری شد. تعداد ۲۰ نمونه خاک سطحی (۳۰-۱۰ سانتی‌متر) تهیه گردید. این کار با مته نمونه برداری استریل انجام و نمونه‌ها در کیسه پلاستیکی و در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شدند.

- **جداسازی و تخلیص ایزوله‌های باکتریایی:** نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده پس از رقیق شدن در سرم فیزیولوژی (۰/۹٪ کلرید سدیم)، روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. از کلنی‌های مختلفی که بر روی محیط کشت رشد یافتند کلنی‌های کاملاً خالص و عاری از آلودگی تهیه شد.

- **جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت:** به منظور جداسازی سویه‌هایی که دارای توانایی تجزیه‌ی نفت بودند، از محیط کشت حداقل بدون کربن CFMM با ۲ درصد نفت سفید استفاده شد. ترکیبات تشکیل دهنده‌ی این محیط کشت شامل ۳ گرم  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ، ۰/۸ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۵/۵ گرم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱ گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۵ گرم  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  و ۰/۰۵ گرم  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب بود. به این محیط کشت مقدار ۲٪ نفت سفید اضافه شد و پس از تنظیم pH (۷/۵)، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. از هر یک از کلنی‌های تخلیص شده مقداری با لوپ استریل برداشته شده و در این محیط کشت تلقیح شد. لوله‌های آزمایش تلقیح شده روی انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته محیط‌هایی که کدر شده بودند به عنوان سویه‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت گزارش شدند، چرا که این سویه‌ها قادر بودند از مواد نفتی به عنوان منبع کربن استفاده کرده و رشد یابند (Okerentugba & Ezerony 2003).

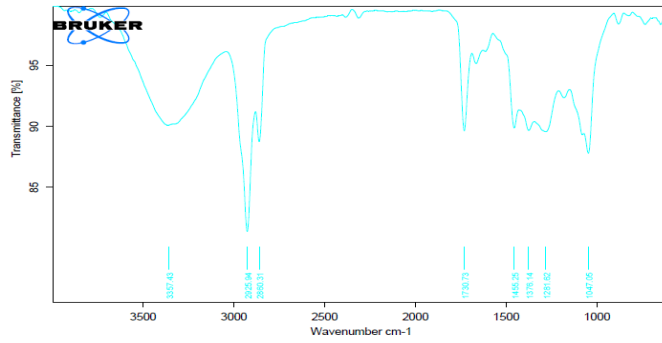
- **ارزیابی توانایی ایزوله‌ها در تجزیه‌ی نفت:** برای ارزیابی توانایی تجزیه‌ی نفت در ایزوله‌ها، سویه‌های انتخاب شده به مدت دو هفته در محیط کشت CFMM حاوی ۲٪ نفت سفید کشت داده شدند و بعد از انجام سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه و جداسازی محیط کشت، از این محیط کشت‌ها برای بررسی توانایی تجزیه‌ی سویه‌ها و هیدروکربن‌های حاصل از فعالیت آن‌ها استفاده شد. از محیط کشت فاقد باکتری به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. توانایی تجزیه‌ی نفت توسط ایزول‌ها با دو

روش طیف‌سنجی مادون قرمز (Agilent Cary 670, FTIR) و کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) (Shimadzu-GCMS-TQ8040 NX) ارزیابی شد (Weisman & Group 1998).

- **شناسایی ایزوله‌ها:** ایزوله‌های دارای توانایی تجزیه نفت با استفاده از روش‌های مورفولوژیک (بررسی شکل ظاهری کلنی‌ها و رنگ آمیزی گرم)، بیوشیمیایی (تست‌های اکسیداز، کاتالاز، سیترات، TSI، SIM و اوره‌آز) و همچنین مولکولی شناسایی شدند. به منظور شناسایی مولکولی، DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت تکاپوزیست-ایران و مطابق دستورالعمل استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی گردید. سپس از تکثیر ژن 16SrRNA برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده شامل CAGGCCTAACACATGCAAGTC برای پرایمر فوروارد و GGGCGGTGTGTACAAGGC برای پرایمر ریورس بود (Hongoh *et al.* 2003). واکنش PCR با یک سیکل دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شد و با ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه اتصال در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ ثانیه گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. در نهایت با یک سیکل گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت محصول PCR به ترتیب با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪، برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن ارسال گردید. نتایج حاصل از توالی‌یابی محصول PCR ژن 16SrRNA برای هر سه جدایه در پایگاه داده NCBI بلاست شد تا توالی جدایه‌های مورد نظر با توالی‌های ثبت شده در این پایگاه مقایسه شده و شناسایی گردد. درخت‌های فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7.0.26 با روش Maximum Likelihood (ML) رسم شدند.

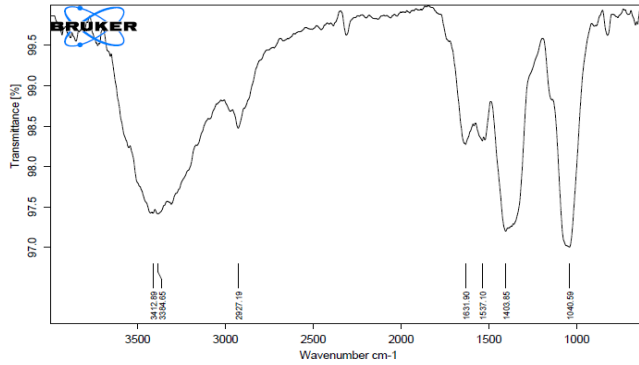
## نتایج

- **جداسازی ایزوله‌های موجود در نمونه‌های خاک:** کلنی‌های باکتریایی که در محیط کشت نوترینت آگار رشد کرده بودند با دقت بررسی شدند و در نهایت ۱۷ کلنی که از نظر ظاهری با هم تفاوت داشتند، انتخاب و تخلیص شدند.
- **جداسازی ایزوله‌های تجزیه کننده نفت:** ارزیابی توانایی تجزیه‌ی نفت در ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از محیط کشت CFMM حاوی ۲٪ نفت سفید صورت گرفت. این محیط کشت فاقد منبع کربنی بوده و تنها میکروارگانسیم‌هایی می‌توانند در آن رشد کنند که قادر به استفاده از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن هستند. از میان ایزوله‌های مورد آزمایش، سه جدایه محیط کشت را کاملاً کدر کرده که نشان دهنده توانایی آنها در استفاده از نفت سفید به عنوان منبع کربن بود. این سه ایزوله، به صورت HS1 تا HS3 نامگذاری شده و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند.
- **نتایج طیف‌سنجی FTIR:** پیک‌های موجود در طیف‌های حاصل از FTIR (شکل‌های ۴-۱) با استفاده از نرم‌افزار IRPal 2.0 آنالیز شدند و نتایج حاصل در جدول ۱ ذکر شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، پیک‌های مربوط به O-H آروماتیک در حضور هر سه سویه، کاهش چشمگیری نسبت به نمونه‌ی شاهد داشته است حتی ایزوله‌ی HS2، O-H آروماتیک را کاملاً از بین برده است. همچنین هر سه جدایه توانسته‌اند C-C آروماتیک را به طور کامل از بین ببرند. آلکان‌های پیچیده مانند  $RCH_2CH_3$  در حضور ایزوله‌های HS1 و HS3 به  $CH_2$  تبدیل شده و در حضور HS2 به طور کامل از بین رفته‌اند. اسیدهای کربوکسیلیک و ترکیبات آمینی نیز از دیگر ترکیبات ساده و آلی هستند که در حضور سویه‌های باکتریایی تولید شده‌اند.



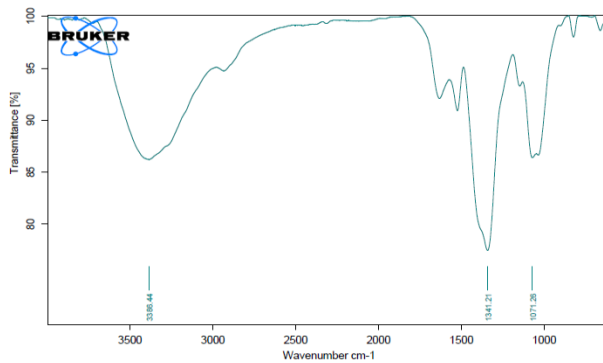
شکل ۱- طیف FTIR محیط حاوی نفت (نمونه شاهد)

Figure1. FTIR spectrum of petroleum containing medium (control)



شکل ۲- طیف FT-IR محیط حاوی نفت در حضور ایزوله‌ی HS1

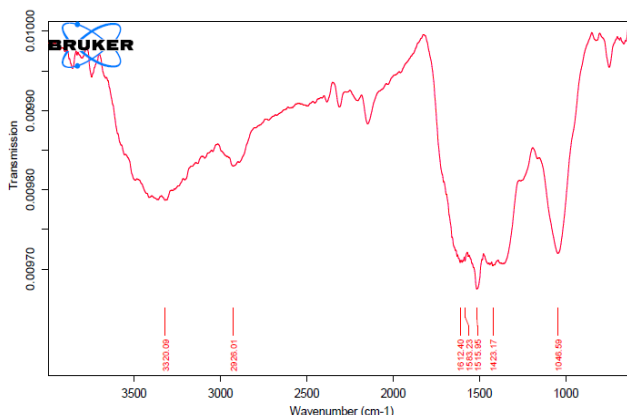
Figure2. FTIR spectrum of petroleum containing medium in presence of HS1 isolate



شکل ۳- طیف FTIR محیط حاوی نفت در حضور ایزوله‌ی HS2

Figure3. FTIR spectrum of petroleum containing medium in presence of HS2 isolate





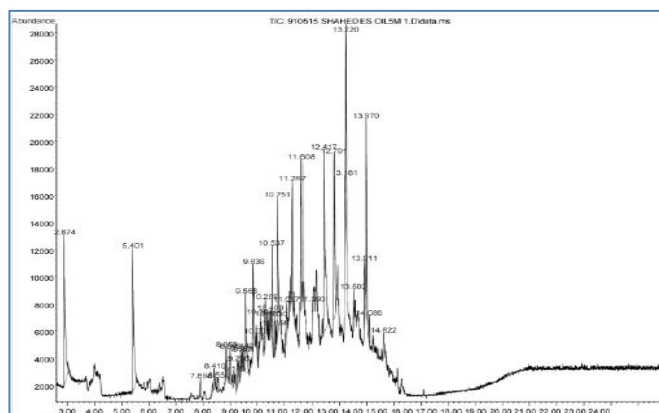
شکل ۴- طیف FTIR محیط حاوی نفت در حضور ایزوله‌ی HS3

Figure4. FTIR spectrum of petroleum containing medium in presence of HS3 isolate

جدول ۱- تجزیه و تحلیل پیک‌های طیف FT-IR با استفاده از نرم‌افزار IRPal  
Table1. Analysis of peaks of FTIR spectrum by IRPal software

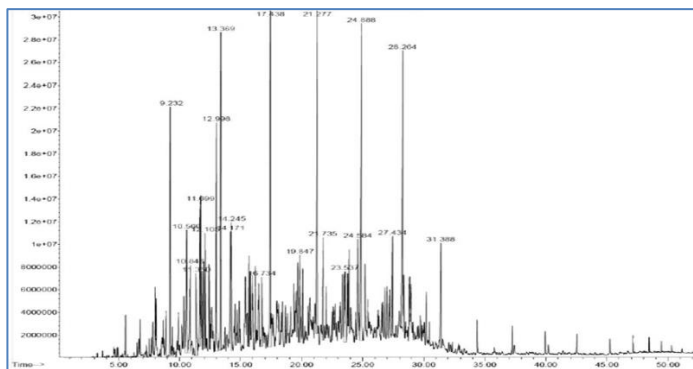
| جدایه HS1                     |         | نمونه شاهد                        |         |
|-------------------------------|---------|-----------------------------------|---------|
| گروه عاملی                    | پیک     | گروه عاملی                        | پیک     |
| $\text{RNH}_2$ آمین           | ۳۴۱۲/۸۹ | O-H آروماتیک                      | ۳۳۵۷/۴۳ |
| $\text{RNH}_2$ آمین           | ۳۳۸۴/۶۵ | O-H آروماتیک                      | ۲۹۲۵/۹۴ |
| O-H آروماتیک                  | ۲۹۲۷/۱۹ | $\text{RCH}_2\text{CH}_3$ آلکان   | ۲۸۶۰/۳۱ |
| آلکان $\text{CH}_2$           | ۱۶۳۱/۹۰ | اتر $\text{RCOOR}$ -6Ring         | ۱۷۳۰/۷۳ |
| امید $\text{RCONHR}$          | ۱۵۳۷/۱۰ | حلقه C-C آروماتیک                 | ۱۴۵۵/۲۵ |
| $\text{RCOO}$ اسید کربوکسیلیک | ۱۴۰۳/۸۵ | $\text{RCH}_2\text{CH}_3$ آلکان   | ۱۳۷۶/۱۴ |
| $\text{RNH}_2$ آمین           | ۱۰۴۰/۵۹ | $\text{CH}_2\text{X}$ آلکیل هالید | ۱۲۸۱/۶۲ |
| -                             | -       | $\text{RCH}_2\text{CH}_3$ آلکان   | ۱۰۴۷/۰۵ |
| جدایه HS3                     |         | جدایه HS2                         |         |
| گروه عاملی                    | پیک     | گروه عاملی                        | پیک     |
| آلکان $\text{CH}_2$           | ۳۳۲۰/۰۹ | $\text{RNH}_2$ آمین               | ۳۳۸۶/۴۴ |
| O-H آروماتیک                  | ۲۹۲۶/۰۱ | R-F آلکیل هالید                   | ۱۳۴۱/۲۱ |
| آلکن ۵ حلقه‌ای                | ۱۶۱۲/۴۰ | $\text{RCOO}$ اسید کربوکسیلیک     | ۱۰۲۷/۲۶ |
| $\text{RCOO}$ اسید کربوکسیلیک | ۱۵۸۳/۲۳ | -                                 | -       |
| N-O                           | ۱۵۱۵/۹۵ | -                                 | -       |
| $\text{RCOO}$ اسید کربوکسیلیک | ۱۴۲۳/۱۷ | -                                 | -       |
| R-F آلکیل هالید               | ۱۰۴۶/۵۹ | -                                 | -       |

- نتایج طیف‌سنجی GC/MS: با استفاده از تکنیک GC-MS، ترکیبات هیدروکربنی حاصل از فعالیت سه ایزوله‌ی مورد مطالعه، بررسی شد و نتایج حاصل بر اساس مقایسه‌ی طیف به دست آمده با کتابخانه‌ی GC/MS libraries Adams آنالیز شدند (شکل‌های ۸-۵). نتایج حاصل از آنالیز دیاگرام‌ها در جداول ۲ تا ۵ درج شده است. هرچه ارتفاع و سطح زیر پیک بیشتر باشد، مقدار ترکیب بیشتر است. در این شکل‌ها، ستون افقی نشان دهنده‌ی زمان ماند<sup>۱</sup> و ستون عمودی نشان دهنده‌ی غلظت فرآورده می‌باشد. شرایط دمایی ستون ابتدا از دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد شروع شده و ۳ دقیقه بر روی این دما متوقف شد و بعد با سرعت ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بر دقیقه تا دمای ۲۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بالا رفته و به مدت ۶ دقیقه نیز در این دمای باقی ماند. با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه داده، مشخص شد که هر طیف مربوط به چه ماده‌ای می‌باشد و ترکیبات موجود با نمونه‌ی شاهد مقایسه شدند.



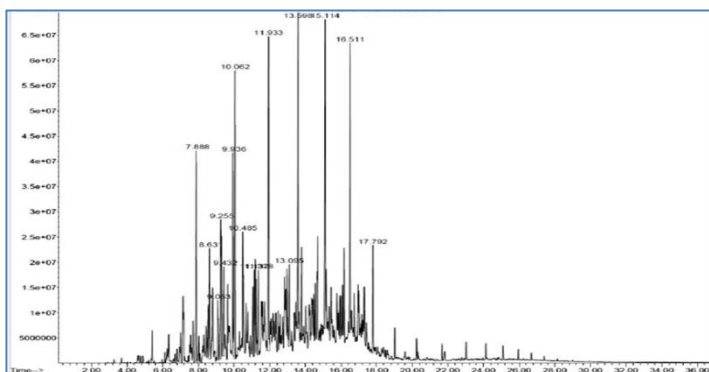
شکل ۵- کروماتوگرام حاصل از GC/MS محیط حاوی نفت (نمونه شاهد)

Figure 5. GC/MS chromatogram of petroleum containin medium (control)



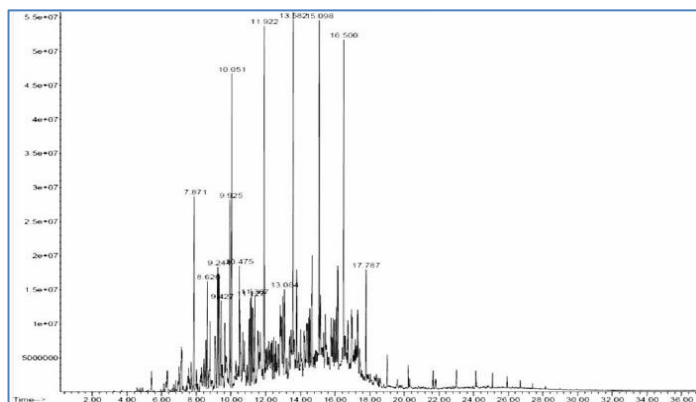
شکل ۶- کروماتوگرام حاصل از GC/MS محیط حاوی نفت در حضور ایزوله ی HS1

Figure6. GC/MS chromatogram of petroleum containin medium in presence of HS1



شکل ۷- کروماتوگرام حاصل از GC/MS محیط حاوی نفت در حضور ایزوله ی HS2

Figure7. GC/MS chromatogram of petroleum containin medium in presence of HS2



شکل ۸- کروماتوگرام حاصل از GC/MS محیط حاوی نفت در حضور ایزوله ی HS3

Figure6. GC/MS chromatogram of petroleum containin medium in presence of HS3

جدول ۲- ترکیبات موجود در نمونه شاهد بر اساس طیف GC/MS

Table2. Chemical composition of control sample according GC/MS spectrum

| ردیف | ترکیب مربوطه                        | زمان ماند<br>(دقیقه) | سطح زیر منحنی |
|------|-------------------------------------|----------------------|---------------|
| ۱    | متیل-دی-۳-۱-دی-دوتریو-۲-پروپنیل اتر | ۲/۸۷                 | ۳۶۹۲۰         |
| ۲    | اکسیم متوکسی فنیل                   | ۵/۴۰                 | ۳۴۹۳۹         |
| ۳    | هپتادکان آمین (CAS)                 | ۸/۸۵                 | ۷۷۳۰          |
| ۴    | ۱۹-متیل ایکوزان                     | ۸/۸۹                 | ۷۵۰۱          |
| ۵    | دودکان، ۱، ۱'-آکسی بیس-(CAS)        | ۹/۴۴                 | ۲۴۰۶          |
| ۶    | تتراتراکونتان                       | ۱۰/۷۵                | ۲۶۲۶۶         |
| ۷    | پنتادکان، ۲، ۶، ۱۰، ۱۴-تترامتیل     | ۱۲/۷۹                | ۲۷۲۸۹         |
| ۸    | هگزادکان ۱                          | ۱۳/۹۷                | ۲۷۳۸۵         |

جدول ۳- ترکیبات موجود در نمونه مربوط به جدایه HS1 بر اساس طیف GC/MS

Table3. Chemical composition of HS1 isolate according GC/MS spectrum

| ردیف | ترکیب مربوطه              | زمان ماند (دقیقه) | سطح زیر منحنی |
|------|---------------------------|-------------------|---------------|
| ۱    | ۲-متیل دکان               | ۹/۲۳              | ۱۹۸۳          |
| ۲    | هپتادکان                  | ۱۰/۵۰             | ۱۵۹۳۴         |
| ۳    | ۳-تترادکان                | ۱۱/۶۹             | ۱۳۰۵۲         |
| ۴    | نونان-۲-متیل              | ۱۲/۹۰             | ۱۱۴۷۲         |
| ۵    | تترادکان                  | ۱۳/۳۶             | ۹۴۲۵          |
| ۶    | هپتادکان                  | ۱۷/۴۳             | ۹۴۲۰          |
| ۷    | اکتان-۳، ۴، ۵، ۶-تترامتیل | ۱۹/۸۴             | ۹۱۶۳          |
| ۸    | دودکان-۲، ۶، ۱۱-تری متیل  | ۲۱/۲۷             | ۴۴۰۲          |
| ۹    | سیس-۹-اوکتادکان           | ۲۱/۷۳             | ۵۷۴۳          |
| ۱۰   | اگزیران                   | ۲۴/۸۸             | ۴۱۳۱          |
| ۱۱   | هگزاتری اکونتان           | ۲۸/۲۶             | ۲۸۵۳          |
| ۱۲   | اوکتادکان                 | ۳۱/۸۸             | ۲۳۴۱          |

جدول ۴- ترکیبات موجود در نمونه مربوط به جدایه HS2 بر اساس طیف GC/MS

Table4. Chemical composition of HS2 isolate according GC/MS spectrum

| ردیف | ترکیب مربوطه  | زمان ماند (دقیقه) | سطح زیر منحنی |
|------|---------------|-------------------|---------------|
| ۱    | آن دکان       | ۷/۸۸              | ۶۲۴۴          |
| ۲    | هپتادکان آمین | ۸/۶۳              | ۶۰۳۲          |
| ۳    | ۲-متیل دکان   | ۹/۲۵              | ۱۸۵۳          |
| ۴    | تترادکان      | ۱۰/۰۶             | ۱۶۳۳۹         |
| ۵    | ۳-تترادکان    | ۱۱/۹۳             | ۱۵۹۷۷         |
| ۶    | هگزادکان      | ۱۳/۵۹             | ۱۸۴۳۵         |
| ۷    | تری دکان      | ۱۶/۵۱             | ۱۶۴۲۸         |
| ۸    | هپتادکان      | ۱۷/۷۹             | ۱۶۳۸۹         |

جدول ۵- ترکیبات موجود در نمونه مربوط به جدایه HS3 بر اساس طیف GC/MS

Table5. Chemical composition of HS3 isolate according GC/MS spectrum

| ردیف | ترکیب مربوطه     | زمان ماند (دقیقه) | سطح زیر منحنی |
|------|------------------|-------------------|---------------|
| ۱    | آن دکان          | ۷/۸۷              | ۶۴۸۶          |
| ۲    | ۲-متیل دکان      | ۹/۹۲              | ۲۲۵۳          |
| ۳    | تترادکان         | ۱۰/۰۵             | ۲۱۵۷۳         |
| ۴    | ایکوزان          | ۱۱/۹۲             | ۱۴۷۳۶         |
| ۵    | هگزادکان         | ۱۳/۵۸             | ۲۴۶۲۴         |
| ۶    | تری دکان         | ۱۶/۵۰             | ۱۸۵۳۲         |
| ۷    | ۱-آن دکان-۴-متیل | ۱۷/۷۸             | ۱۷۴۸۲         |

همان طور که مشاهده می شود، ترکیبات آروماتیک و ترکیبات پیچیده‌ی هیدروکربنی که در نمونه‌ی شاهد وجود داشتند، در حضور سویه‌های باکتریایی به شدت کاهش یافته‌اند (سطح زیر منحنی کاهش داشته است). همچنین در حضور سویه‌های باکتریایی، ترکیبات ساده‌ای مانند تری دکان و تترادکان ایجاد شده که در نمونه‌ی شاهد وجود نداشته و حاصل تجزیه‌ی نفت توسط باکتری می باشد.

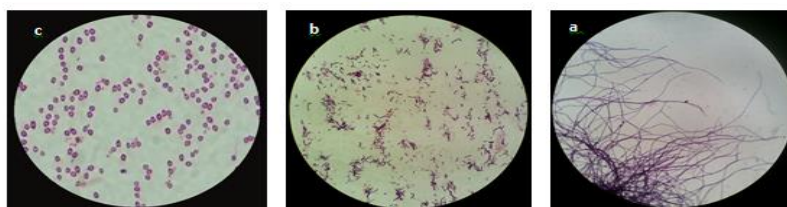
- **شناسایی ایزوله‌ها:** شناسایی مورفولوژیک: شناسایی مورفولوژیک بر اساس کلید شناسایی Bergey انجام گرفت (Bergey et al. 1984). نمای ظاهری کلنی‌ها در شکل ۹ و فرم سلول‌های باکتری پس از رنگ آمیزی گرم در شکل ۱۰ نشان داده شده است. بر اساس این ویژگی‌های مورفولوژیک، ایزوله‌ی HS1 به عنوان اکتینومیست و

ایزوله‌ی HS2 به عنوان باسیلوس شناسایی شد. در مورد ایزوله‌ی HS3 نیاز به آزمایشات دیگری برای شناسایی وجود داشت.



شکل ۹- شکل ظاهری کلنی ایزوله‌ها. a: جدایه HS1، b: جدایه HS2، c: جدایه HS3

Figure9. The colony morphology of isolates, a: HS1; b: HS2; c: HS3



شکل ۱۰- تصاویر جدایه‌ها زیر میکروسکوپ پس از رنگ‌آمیزی گرم. a: جدایه HS1، b: جدایه HS2، c: جدایه HS3

Figure10. The gram staining of isolates, a: HS1; b: HS2; c: HS3

- شناسایی بیوشیمیایی: با بررسی نتایج حاصل از تست مورفولوژیک همراه با تستهای بیوشیمیایی مطابق با کلید شناسایی (Bergey et al. (1984)، ایزوله‌ها در سطح جنس شناسایی شدند (جدول ۶).

جدول ۶- نتایج حاصل از شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی بر اساس کلید شناسایی Bergey و همکاران (۱۹۸۴)

Table6. The results of morphological and biochemical identification according to Bergey et al. (1984)

| نتیجه کلید شناسایی   | اسپور | شکل | گرم | اوره آز | سیترات | گاز | اندول | حرکت | TSI | اکسیداز | کاتالاز | تست جدایه |
|----------------------|-------|-----|-----|---------|--------|-----|-------|------|-----|---------|---------|-----------|
| <i>Actinomyces</i>   | -     | R   | +   | -       | -      | -   | -     | -    | A/A | -       | -       | HS1       |
| <i>Bacillus</i>      | +     | R   | +   | -       | +      | -   | -     | +    | A/A | +       | +       | HS2       |
| <i>Acinetobacter</i> | -     | R   | -   | -       | +      | -   | -     | -    | A/A | -       | +       | HS3       |

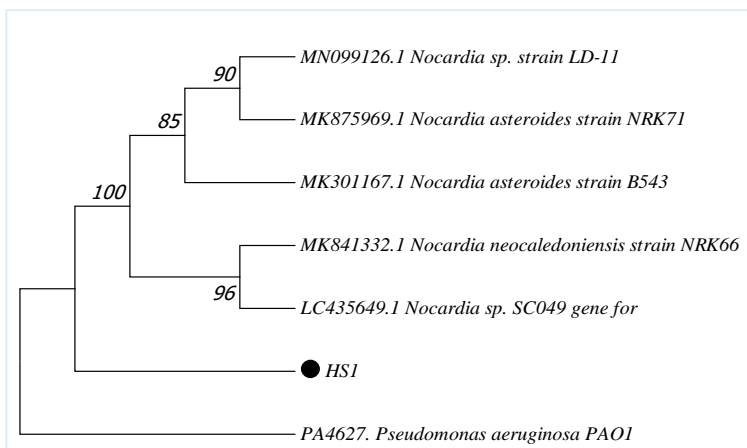
**R:** میله ای شکل، **A:** زرد (اسیدی)، **K:** قرمز (قلیایی)، **NC:** بدون تغییر (**No change**).

**A/A:** دارای توان تخمیر گلوکز و لاکتوز، **K/A:** تنها توان تخمیر گلوکز را دارد

**R:** Rods shape; **A:** Yellow (Acidic); **K:** Red (Alkaline); **NC:** Not change; **A/A:** able to use Glucose and Lactose as Fermentation source; **K/A:** Only can use Glucose as fermentation source

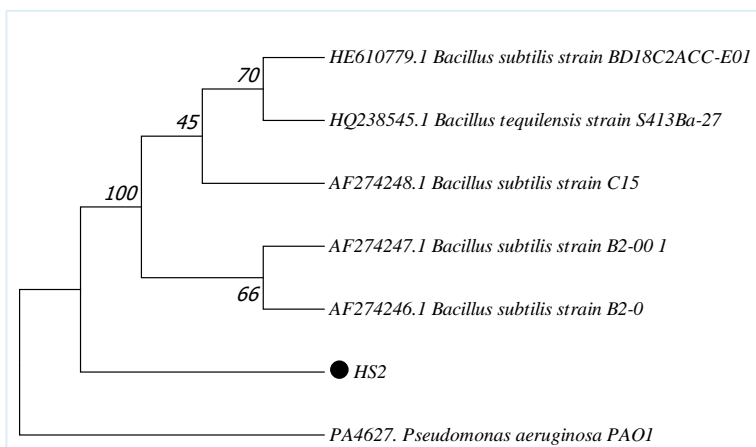
نتایج آزمایشات بیوشیمیایی نیز مانند بخش مورفولوژیک، تایید کننده آن بود که ایزوله‌ی HS1، از اکتینومیسیت‌ها و ایزوله‌ی HS2 از باسیلوس‌ها می‌باشد. ایزوله‌ی HS3 نیز به عنوان اسینتوباکتر شناسایی شد.

- **شناسایی مولکولی:** نتایج حاصل از توالی‌یابی محصول PCR ژن 16SrRNA برای هر سه جدایه در پایگاه داده NCBI بلاست شد تا توالی جدایه‌های مورد نظر با توالی‌های ثبت شده در این پایگاه مقایسه شده و شناسایی گردد. درخت‌های فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA 7.0.26 با مدل Maximum Likelihood (ML) رسم شدند. سویه *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 به عنوان برون گروه انتخاب شد. جدایه‌ی HS1 با ۱۰۰٪ شباهت به عنوان *Nocardia* sp. جدایه‌ی HS2 با ۹۵/۴۴٪ شباهت به عنوان *Bacillus subtilis* و جدایه‌ی HS3 با ۹۸/۹۹٪ شباهت به عنوان *Acinetobacter baumannii* شناسایی شدند.

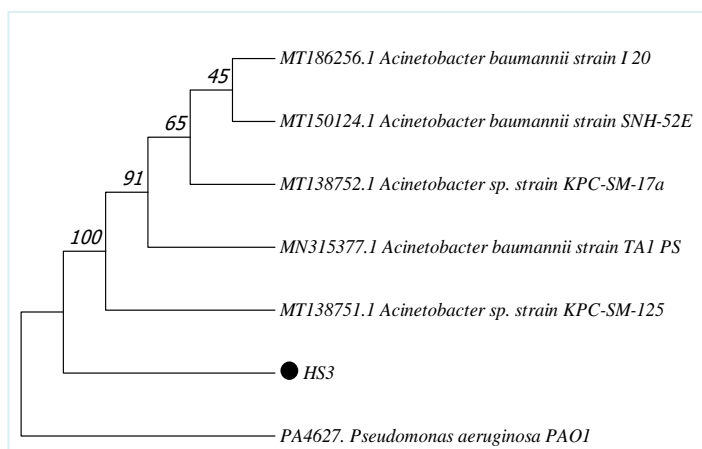


شکل ۱۱- درخت فیلوژنی ایزوله‌ی HS1

Figure11. Phylogenetic tree of HS1 isolate



شکل ۱۲- درخت فیلوژنی ایزوله‌ی HS2  
Figure12. Phylogenetic tree of HS2



شکل ۱۳- درخت فیلوژنی ایزوله‌ی HS3  
Figure13. Phylogenetic tree of HS3

### بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق از خاک‌های مناطق آلوده‌ی نفتی، نمونه‌برداری انجام شد و از طریق کشت باکتری‌های موجود، در محیط کشتی که تنها منبع کربن آن نفت سفید بود، سویه‌هایی که قادر به استفاده از آن به عنوان تنها منبع کربن بودند، جداسازی شدند. در



این مرحله از نظر کیفی نشان داده شد که سه جدایه توانسته بودند با استفاده از هیدروکربن‌های نفتی رشد کنند. در مرحله‌ی بعد با استفاده از دو تکنیک FTIR و GC/MS تلاش شد نوع ترکیبات حاصل از تجزیه‌ی نفت سفید پس از فعالیت باکتری‌ها مشخص شود.

یکی از مهم‌ترین آلودگی‌های نفتی، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای<sup>۱</sup> PAH است که با توجه به مضرات فوق‌العاده‌ی این مواد و امکان تجمع آن‌ها در گیاهان و جانوران، می‌تواند زمینه‌ساز بروز مشکلات عمده‌ای گردد (Jain *et al.* 2011). آنالیز طیف‌های حاصل از FTIR نشان داد که نمونه‌ی شاهد دارای پیک‌های مرتبط با گروه‌های عاملی آروماتیک بوده که در حضور سویه‌های باکتریایی میزان این ترکیبات کمتر شده و هیدروکربن‌های ساده جایگزین آن شده‌اند. نکته‌ی مهم دیگر حضور گروه عاملی کربوکسیلیک اسید و آمین در نمونه‌های حاوی سویه‌ی باکتریایی بود. این مساله نشان می‌دهد که این باکتری‌ها ترکیبات معدنی نفت را به ترکیب آلی تبدیل کرده‌اند، که از مشخصه‌های پالایش زیستی نفت می‌باشد. شناسایی هیدروکربن‌های آروماتیک توسط روش GC/MS امکان‌پذیر است. در واقع این روش قادر به تفکیک آلکان‌ها، آروماتیک‌ها، نفتن‌ها، بنزن‌های آلکیل و سایر ترکیبات هیدروکربنی می‌باشد (De Carvalho Rocha & Sheen 2019). آنالیز طیف‌های حاصل از GC/MS نشان داد که در نمونه‌ی شاهد ترکیبات هیدروکربنی پیچیده حضور دارند اما در حضور سویه‌های باکتریایی این ترکیبات یا کاملاً از بین رفته و یا کاهش بسیاری داشته‌اند. همچنین هیدروکربن‌های ساده‌تر در حضور سویه‌های باکتریایی مشاهده شدند. در نهایت پس از مشاهده‌ی توانایی قابل قبول ایزوله‌ها در تجزیه‌ی نفت، این ایزوله‌ها شناسایی شدند که نتایج حاصل نشان داد که شامل یک سویه نوکاردیا *Nocardia sp.*، باسیلوس سابتیلیس *Bacillus subtilis* و اسینتوباکتر بومانی *Acinetobacter baumannii* بودند.

میکروارگانیزم‌ها توانایی تبدیل ضایعات هیدروکربنی را به دی‌اکسید کربن، آب و توده‌ی سلولی دارند و در صورتی که در اثر پالایش زیستی، آلاینده‌ها به طور کامل حذف

---

1. Polycyclic Hydrocarbon Aromatics (PAH)

نشوند، عمدتاً به مواد کم‌ضررتر تبدیل می‌شوند (Souza et al. 2014). در تحقیق حاضر نتایج حاصل از FTIR و GC/MS نشان داد که در حضور سویه‌های باکتریایی ترکیبات آروماتیک نفتی کاهش چشمگیری داشته و همچنین ترکیبات پیچیده‌ی هیدروکربنی، به ترکیبات آلی تبدیل شده بودند.

در تحقیق حاضر یکی از سویه‌های جداسازی شده، اکتینومیست نوکاردیا بود. اکتینوباکترها متعلق به خانواده اکتینومایستاسه می‌باشند. این گروه از باکتری‌ها به دلیل توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه متعدد در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، به خوبی شناخته شده‌اند. این باکتری‌ها بیشتر از منابع خاکی استخراج شده‌اند. این گروه از باکتری‌های رشته‌ای با محیط زیست و خاک به خوبی سازگاری یافته‌اند و می‌توانند پلیمرهای پیچیده زیستی را تجزیه نمایند (Shahaby et al. 2015). در منابع مختلفی نشان داده شده است که اکتینومیست‌ها قادر به تولید بیوسورفکتانت هستند (Thampayak et al. 2008; Lakshmipathy et al. 2010; Chakraborty et al. 2015) و همانطور که می‌دانیم، تولید بیوسورفکتانت به تجزیه‌ی مواد نفتی کمک می‌کند و سویه‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت این ماده را جهت پیشبرد واکنش‌های تجزیه‌ای تولید می‌کنند (Kumari et al. 2012). در مورد سویه‌ی TSH1 نوکاردیا اوتیتی‌دیسکاوایاروم (*Nocardia otitidiscaviarum*)، Zeinali و همکاران بیان کرده‌اند که این سویه قادر است ترکیبات فنانترن و آنتراسن را تجزیه کند (Zeinali et al. 2008). آن‌ها همچنین بیان داشتند که سویه‌ی *Nocardia* قادر به رشد بر روی محیط حاوی هیدروکربن‌های آروماتیک چندقلعه‌ای (PAH) هستند (Zeinali et al. 2007). Kalme و همکاران نیز گزارش کرده‌اند که نوکاردیا می‌تواند بنزین و کروزن را تجزیه کند (Kalme et al. 2008). این یافته‌های با نتایج حاصل از آزمایش حاضر همسو بود و در آزمایش حاضر نیز نشان داده شد که سویه‌ی نوکاردیا (ایزوله‌ی HS1) ترکیبات آروماتیک دارای حلقه‌ی C-C را کاملاً حذف کرده و ترکیبات دارای O-H آروماتیک را نسبت به نمونه شاهد کاهش می‌دهد. در طیف FTIR حاصل از محیط کشت این سویه، ترکیبات آمینی و کربوکسیلی و

همچنین آلکان‌های ساده مشاهده شدند که حاصل تجزیه‌ی مواد نفتی بودند. همچنین در آنالیز GC/MS آلکان‌های ساده‌تری نسبت به نمونه‌ی شاهد، در حضور نوکاردیا مشاهده شد. بنابراین در آزمایش حاضر هم‌راستا با تحقیقات مشابه نشان داده شد که نوکاردیا قادر به تجزیه‌ی مواد نفتی به مواد ساده‌تر و نیز مواد آلی می‌باشد.

سویه‌ی دیگری که در آزمایش حاضر به عنوان سویه‌ی تجزیه‌کننده‌ی نفت شناسایی شد، باسیلوس سوبتیلیس (جدایه‌ی HS2) بود و نشان داده شد که در حضور این سویه ترکیبات آروماتیک نفتی کاملاً تجزیه شده و ترکیبات آلی دارای گروه عاملی آمین و کربوکسیل جایگزین آن‌ها شده است. همچنین در طیف GC/MS نمونه‌ی حاوی این سویه، آلکان‌های ساده جایگزین ترکیبات هیدروکربنی پیچیده‌ی موجود در نمونه‌ی شاهد شده بودند. توانایی باسیلوس سوبتیلیس در تجزیه‌ی ترکیبات نفتی در تحقیقات بسیاری گزارش شده است (Das & Mukherjee 2007; Montagnoli *et al.* 2015; Darsa *et al.* 2014). باسیلوس‌ها از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده‌ی انواع بیوسورفکتانت هستند (Arjes *et al.* 2020). در تحقیقات بسیاری تولید بیوسورفکتانت توسط باسیلوس سوبتیلیس نشان داده شده است، از جمله Arjes و همکاران بیان کردند که یک مکانیسم وابسته به بیوسورفکتانت در باسیلوس سوبتیلیس سبب پابرجا ماندن قطبیت غشا در شرایط تخلیه‌ی اکسیژن می‌گردد (Arjes *et al.* 2020). Parthipan و همکاران نیز گزارش کردند که بیوسورفکتانت همراه با آنزیم‌های تجزیه‌ای موجب تجزیه‌ی روغن خام توسط باسیلوس سوبتیلیس می‌شود (Parthipan *et al.* 2017). در تحقیق حاضر نیز هم‌راستا با تحقیقات ذکر شده، نشان داده شد که باسیلوس سوبتیلیس قادر به تجزیه‌ی نفت سفید می‌باشد که احتمالاً به دلیل توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط این باکتری است.

سومین ایزوله‌ی شناسایی شده، سویه‌ی /اسینتوباکتر بومانی بود. سویه‌های بسیاری از /اسینتوباکترها توانایی تجزیه ترکیبات آروماتیک و استفاده از آن‌ها به عنوان تنها منبع کربن را دارند به طوری که با تولید بیوسورفکتانت باعث افزایش حلالیت و سرعت تجزیه‌ی زیستی می‌شوند. بنابراین می‌توان از اسینتوباکترها در تجزیه و پاکسازی زیستی ترکیبات

PAH استفاده کرد (Vanbroekhoven *et al.* 2004). Mishra و همکاران در سال ۲۰۰۱، گونه‌های مختلفی از *اسینتوباکتر* را از خاک‌های آلوده به نفت جداسازی کردند (Mishra *et al.* 2001). Gallego و همکاران نیز طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که با تلقیح میکروبی حاوی سویه‌ی *اسینتوباکتر بومانی* بیشترین میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده مشاهده می‌شود (Gallego *et al.* 2007). قابلیت استفاده از تولوئن و آسفالتن، بنزن-الکل و هگزادکان به عنوان منبع کربن و انرژی توسط باکتری *اسینتوباکتر بومانی* به اثبات رسیده است (Nakamura *et al.* 2014). در این تحقیق نیز مشاهده شد که سویه‌ی *اسینتوباکتر بومانی* (ایزوله‌ی HS3) ترکیبات آروماتیک موجود در نفت را به خوبی کاهش داده و ترکیبات پیچیده را آلکان‌های ساده تبدیل کرده است. گروه‌های عاملی آمین و کربوکسیل در نمونه‌ی حاوی این سویه نیز مشاهده شدند که همه‌ی این یافته‌ها هم‌راستا با سایر مطالعات مشابه، تایید کننده‌ی نقش *اسینتوباکتر بومانی* در تجزیه‌ی ترکیبات نفتی است.

یکی از ویژگی‌های مهم سویه‌های تجزیه‌کننده نفت، دسترسی آسان به آن‌ها می‌باشد. سویه‌های باسیلوس و اکتینومیست از فراوان‌ترین جوامع میکروبی موجود در خاک هستند که در شرایط مختلف قادر به ادامه‌ی بقا می‌باشند. استفاده از این سویه‌ها به دلیل فراوانی آن‌ها و زیست‌دسترس‌پذیری بالا، می‌تواند فرایند زیست‌پالایی را تسهیل نماید. با توجه به این که ایران یکی از بزرگ‌ترین کشورهای دارای ذخایر نفتی می‌باشد، آلودگی‌های ناشی از نفت و هیدروکربن‌های آن یکی از مشکلات اصلی حاصل از بهره‌برداری از این منبع ارزشمند است که در موارد بسیاری منجر به بروز مشکلات متعددی شده است. شناسایی سویه‌های باکتریایی بومی با توانایی تجزیه نفت و هیدروکربن‌های نفتی و همچنین افزایش دانش و آگاهی ما در مورد قابلیت‌های مختلف این سویه‌ها و تنوع میکروبی اکوسیستم‌های آلوده به نفت، گام بسیار مهمی در جهت استفاده از این باکتری‌ها برای مقاصد مختلف صنعتی و زیست محیطی است. از آن‌جا که میزان آلودگی‌های نفتی در ایران بسیار بالا است، قابل پیش‌بینی است که با منبعی غنی از

باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن‌های نفتی روبرو هستیم. در این پژوهش نیز سه سویه‌ی نوکاردیبا، باسیلوس سوبتیلیس و اسینتوباکتر بومانی به عنوان سویه‌های بومی از خاک محل‌های آلوده جداسازی شدند و توانایی آن‌ها در تجزیه‌ی مواد نفتی با آزمایشات FTIR و GC/MS نشان داده شد. امید می‌رود به توانایی‌های بالقوه‌ی منابع زیستی و میکروارگانیسم‌ها بیش از پیش توجه شود و از آن‌ها در جهت حذف آلودگی‌های نفتی و حفظ محیط زیست، بدون آسیب به سایر موجودات زنده، با هزینه‌ی اندک و پایداری بیشتر نسبت به سایر روش‌ها استفاده گردد. این مهم نیازمند مطالعات بیشتر و آزمایشات گسترده‌تر بوده که شایسته است سایر محققین به آن‌ها بپردازند تا بتوان از زیست‌پالایی نفت در مقیاس بزرگ استفاده نمود.

### سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد آقای حامد سلطانی می‌باشد. بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از تمامی افرادی که در انجام این پایان نامه همکاری نمودند، اعلام می‌دارند.

### تعارض منافع

بدینوسیله اعلام می‌دارد در ارائه نتایج این پژوهش تعارض منافی وجود ندارد.

## منابع

- Abdel-Shafy H.I. and Mansour M.S.M.A. (2016). Review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 25: 107–123.
- Arjes H.A. Vo L. Dunn C.M. Willis L. DeRosa C.A. Fraser C.L. Kearns D.B. and Huang K.C. (2020). Biosurfactant-mediated membrane depolarization maintains viability during oxygen depletion in *Bacillus subtilis*. *Current Biology*. 30(6): 1011-1022.
- Bergey D.H. Hendricks D. Holt J.G. and Sneath P.H. (1984). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 2: Williams & Wilkins.
- Chakraborty S. Ghosh M. Chakraborti S. Jana S. Sen K.K. Kokare C. and Zhang L. (2015). Biosurfactant produced from *Actinomyces nocardiformis* A17: characterization and its biological evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79: 405-12.
- Darsa K. Thatheyus A.J. and Ramya D. (2014). Biodegradation of petroleum compound using the bacterium *Bacillus subtilis*. *Science International*. 2(1): 20-25.
- Das K. and Mukherjee A.K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource*. 98(7): 1339-1345.
- De Carvalho Rocha W.F. and Sheen D.A. (2019). Determination of physicochemical properties of petroleum derivatives and biodiesel using GC/MS and chemometric methods with uncertainty estimation. *Fuel*. 243:413-22.
- Doostaki M. Ebrahimi S. Movahdei Naini S.A. and Olamaei M. (2012). Optimizing conditions for biodegradation of petroleum hydrocarbons by native and non-native microorganisms. *Water and soil conservation researches*. 20(4): 165-181. (In Persian).
- Gallego J.L.R. García-Martínez M.J. Llamas J.F. Belloch C. Peláez A.I. and Sánchez J. (2007). Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation*. 18(3):269-281.
- Gerhardt K.E. Huang X. Glick B.R. and Greenberg B. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science*. 176: 20–30.

- Greer C.W. and Juck D.F. (2017). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Spills in Cold Terrestrial Environments. Pages 645-660 in Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology: Springer.
- Hongoh Y. Ohkuma M. and Kudo T. (2003). Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiology Ecology*. 44(2):231-42.
- Jain P. Gupta V. Gaur R. Lowry M. Jaroli D. and Chauhan U. (2011). Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Research Journal of Environmental Toxicology*. 5(1):1-26.
- Kalme S. Parshetti G. Gomare S. and Govindwar S. (2008). Diesel and kerosene degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. *Current Microbiology*. 56(6): 581-586.
- Khosravinodeh M. Abbaspour A. Ebrahimi S.S. and Asghar H.R. (2012). Phytoremediation of a fuel oil-contaminated soil using alfalfa and grass with *pseudomonas putida* bacterium. *Water and soil conservation researches*. 20(4): 219-234. (In Persian).
- Kojouri M. and Ardestani F. (2018). Isolation, identification and evaluation of oil hydrocarbon decomposing bacteria from contaminated areas of oil fields. *Advances in Environmental Technology*. 3:139-147
- Kumari B. Singh S.N. and Singh D.P. (2012). Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. *Process Biochemistry*. 47(12): 2463-2471.
- Kumar M. and Khanna S. (2010). Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal-tar-contaminated site undergoing active bioremediation. *Journal of applied microbiology*. 108(4):1252-62.
- Lakshmiathy T.D. Prasad A.A. and Kannabiran K. (2010). Production of biosurfactant and heavy metal resistance activity of *Streptomyces* sp. VITDDK3-a novel halo tolerant actinomycetes isolated from saltpan soil. *Biological Research*. 4(2):108-15.
- Mishra S. Jyot J. Kuhad R.C. and Lal B. (2001). Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied Environmental Microbiology*. 67(4): 1675-1681.
- Montagnolli R.N. Lopes P.R.M. and Bidoia E.D. (2015). Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental monitoring and assessment*. 187(1): 4116-4118.

- Nakamura F.M. Germano M.G. and Tsai S.M. (2014). Capacity of aromatic compound degradation by bacteria from Amazon Dark Earth. *Diversity*. 6(2):339-353.
- Nogales B. Lanfranconi M.P. Piña-Villalonga J. and Bosch R. (2011). Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*. 35(2):275-98.
- Okerentugba P.O. and Ezerony O.U. (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2(9): 288-292.
- Papi Z. Ghasemi Ghojani S. Shafeinia A.R. Alami-saeed K. and Khalili moghadam B. (2016). Isolation and Identification of crude oil degrading bacteria from oil-contaminated soil areas in Khuzestan, Iran, (Thesis).
- Parthipan P. Preetham E. Machuca L.L. Rahman P.K. Murugan K. and Rajasekar A. (2017). Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-14.
- Sarkar J. Kazy S.K. Gupta A. Dutta A. Mohapatra B. Roy A. Bera P. Mitra A. and Sar P. (2016). Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Frontiers in microbiology*. 7:1407.
- Shahaby A.F. Alharthi A.A. and Tarras A.E. (2015). Bioremediation of petroleum oil by potential biosurfactant-producing bacteria using gravimetric assay. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(5): 390-403.
- Souza E.C. Vessoni-Penna T.C. and de Souza Oliveira R.P. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 89: 88-94.
- Thampayak I. Cheeptham N. Pathom-Aree W. Leelapornpisid P. and Lumyong S. (2008). Isolation and identification of biosurfactant producing Actinomycetes from soil. *Research Journal of Microbiology*. 3(7): 499-507.
- Vanbroekhoven K. Ryngaert A. Wattiau P. De Mot R. and Springael D. (2004). *Acinetobacter* diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR–DGGE fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology*. 50(1):37-50.
- Weisman W. and Group TPHCW. (1998). Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media. Vol. 1. Amherst Scientific Publishers 98 Pp. Massachusetts.
- Wolicka D. Suszek A. Borkowski A. and Bielecka A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*. 100(13):3221-7.



Zeinali M. Vossoughi M. and Ardestani S. (2007). Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Letters in Applied Microbiology*. 45(6): 622-628.

Zeinali M. Vossoughi M. and Ardestani S. (2008). Degradation of phenanthrene and anthracene by *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic bacterium. *Journal of applied microbiology*. 105(2): 398-406.

## Isolation and purification of petroleum-decomposing bacteria from contaminated soils and identification the resulted compounds of degradation of such compounds

S.A Hosseini Boldaji<sup>1\*</sup>, H. Soltani<sup>2</sup>, M. Teimouri<sup>3</sup>

Received: 2022.5.16

Accepted: 2022.4.10

### Abstract

**Introduction:** There are various methods to remove oil pollution from natural sources, which biological methods seem to be more appropriate methods due to their cheapness, sustainability and biodegradability. So, the aim of the present study was to isolate and identify the bacteria which able to degrade oil from contaminated soils to determine the optimal conditions for decomposition of these compounds in complementary studies. **Methods:** Soil sampling was performed from contaminated areas around the Tehran refinery and after isolating oil-degrading bacteria in a culture medium containing 2% kerosene (as the only carbon source), the ability of separated isolates to oil degradation were evaluated using FTIR and GC-MS. Finally, these isolates were identified using morphological, biochemical and molecular methods.

**Results and conclusion:** The results showed that, three oil decomposing isolates were able to reduce or eliminate the aromatic compounds from the oil. They decomposed oil complex alkanes into simpler alkanes. So in their culture medium, substances with amine and carboxyl functional groups (organic compounds) were observed. The identification of these three isolates showed that they belong to the species *Nocardia sp.*, *Bacillus subtilis* and *Acinetobacter baumannii*. As conclusion, the use of this biological method can be a good alternative for physical and chemical ones. Isolation of native soil bacteria that have adapted with petroleum products in the soil can be helpful for bioremediation.

**Keywords:** *Aromatic hydrocarbons, Bioremediation, Decomposing bacteria, Oil pollution.*

---

1. Department of Biology, Yadegare Imam Khomeini (Rah) Shehre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. (\*Corresponding author: Afshin.h.b@gmail.com)

2. Graduated student of MSc. In Biochemistry, Department of Biology, Yadegare Imam Khomeini (Rah) Shehre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, Research Institute of Forest and Rangeland, Agricultural Research, Education and Extension organization, Tehran, Iran.