شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از مناطق آلوده پلدختر و بررسی فاکتورهای مؤثر بر کارآیی تجزیه در آنها

Identification of Oil Degrading Bacteria from Poldokhtar Polluted Areas and Investigation of Factors Affecting Their Degradation Performance

سوما نریمانی[۱*]، عیدی بازگیر[۲] و حسین میرزایی نجفقلی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۱

چکیده

آلودگی اکوسیستم‌های طبیعی توسط آلاینده‌های نفتی به‌دلیل پایداری بالا و اثرات زیان‌بار بر محیط‌زیست و سلامت انسان‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. امروزه از روش‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی، حرارتی و زیست پالایی به‌منظور اصلاح محیط‌های آلوده استفاده می‌شود. فناوری زیست پالایی بر پایه‌ی استفاده از ریزجانداران طبیعی و یا تراریخت به‌منظور احیای مجدد مکان‌های آلوده و حفاظت از محیط‌زیست استوار است. در این پژوهش نمونه‌برداری از خاک و آب آلوده منطقه تنگ‌فنی پلدختر به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی صورت گرفت. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه روی محیط‌کشت‌های نوترینت آگار، نوترینت براث و 2xYT کشت گردیدند. بعد از خالص‌سازی، جدایه‌های باکتریایی براساس خصوصیات فنوتیپی - بیوشیمیایی و توالی‌یابی بخشی از ناحیه ژن 16SrDNA به‌عنوان گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Acinetobacter junii*، *Acinetobacter baumannii*، *Delftia tsuruhatensis*، *Sphingobacterium multivorum*، *Stenotrophomonas acidaminiphila*، *Comamonas koreensis* شناسایی شدند. همچنین جدایه‌های باکتریایی از نظر فاکتورهای تشکیل بیوفیلم، تولید سیدروفور و حرکت اسوارمینگ مورد بررسی قرار گرفتند، که بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم و حرکت اسوارمینگ مربوط به گونه *Pseudomonas aeruginosa* بود. در این تحقیق برای نخستین بار باکتری *Comamonas koreensis* به‌عنوان تجزیه‌کننده نفت معرفی گردید.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات نفتی، زیست پالایی، باکتری، *Pseudomonas aeruginosa*، بیوفیلم

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، لرستان
۲. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، لرستان
۳. مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، لرستان
*: نویسنده مسوول Email: Soma_narimany@yahoo.com

مقدمه

خاک یکی از منابع مهم و ارزشمند طبیعت و یک پالاینده طبیعی محسوب می‌شود. اما امروزه ورود ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) به محیط‌زیست در اثر استخراج، حمل‌ونقل، ذخیره‌سازی یا استفاده نادرست سبب آلودگی خاک و منابع آبی شده است. از طرفی دیگر به‌علت سمیت و سرطان‌زا بودن این آلاینده‌ها و امکان ورود آن‌ها به چرخه غذایی انسان به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم، اصلاح خاک‌های آلوده امری ضروری می‌باشد ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.*, 2013). ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای دارای درجات مختلفی از تجزیه‌پذیری، تا غیرقابل تجزیه می‌باشند *تپا* و همکاران (Thapa *et al.*, 2012). زیست تخریبی این ترکیبات بستگی به ساختار شیمیایی و حالت فیزیکی آن‌ها دارد *تایگی* و همکاران (Tyagi *et al.*, 2011). به‌طوری‌که افزایش در اندازه مولکولی (تعداد حلقه‌های آروماتیک) منجر به افزایش خاصیت آب‌گریزی، ثبات الکتروشیمیایی و پایداری بالای آن‌ها می‌شود. روش‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی، تثبیت خاک، تخریب حرارتی و زیستی برای اصلاح خاک‌های آلوده مورد استفاده قرار می‌گیرد. از میان این روش‌ها، روش زیستی یک تکنولوژی نسبتاً مقرون به صرفه و سازگار با محیط‌زیست برای حذف هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده می‌باشد سالانیترو و همکاران؛ *مادونو* و همکاران؛ *تپا* و همکاران (Salanitro *et al.*, 2009; Madueno *et al.*, 2011; Thapa *et al.*, 2012). این تکنولوژی متکی بر تقویت میکروفلور یا مخلوط باکتریایی بومی مکان‌های آلوده می‌باشد، که قادر به انجام فعالیت موردنظر هستند رایندهای آنزیمی *کومار* و همکاران (Kumar *et al.*, 2011). باکتری‌ها از طریق فایندهها را به محصولات بی‌ضررتر تبدیل می‌کنند موهیتی و همکاران (Mohite *et al.*, 2010). هر چند باکتری‌ها در خاک‌های آلوده وجود دارند اما ممکن است جمعیت آن‌ها برای اصلاح زیستی مناسب نباشد، بنابراین باید جمعیت باکتریایی خاک تقویت و فعالیت آنها تحریک شود *کومار* و همکاران (2011). همچنین در روش تجزیه بیولوژیکی، استفاده از چندین گونه باکتریایی به‌جای یک گونه خاص، به طور قابل توجهی تخریب هیدروکربن‌ها موجود در رسوبات دریایی را افزایش داده است *دلانو* و همکاران (Dellanno *et al.*, 2012).

جنس‌های باکتریایی *Pseudomonas*، *Sphingomonas*، *Ochrobactrium*، *Stenotrophomonas*، *Bacillus*، *Corynebacterium*، *Staphylococcus*، *Streptococcus*، *Flavobacterium*، *Klebsiella*، *Escherichia*، *Acinetobacter*، *Alcaligenes*، *Enterobacter*، *Rhodococcus* و *Micrococcus* در پژوهش‌های مختلف به عنوان تجزیه‌کنندگان هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای معرفی شده‌اند. سلول باکتری در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند خشکی، کمبود اکسیژن، دما، pH و مواد سمی تشکیل بیوفیلم می دهد *وان همت* و همکاران (Van Hammet *et al.*, 2003). سلول‌های باکتری در ساختارهای بیوفیلم به دلیل افزایش توان بقای باکتری تحت شرایط تنش و دارا بودن مقدار بالای بیوماس میکروبی برای زیست پالایی مناسب شناخته شده‌اند و با گذشت زمان نسبت به مواد سمی موجود در محیط مقاوم‌تر و توانایی تثبیت آلاینده‌ها را پیدا می‌کنند *داس* و همکاران (Das *et al.*, 2012). طلایی و همکاران در سال ۱۳۸۸، ۱۴ گونه باکتری از خاک‌های مناطق مختلف آلوده به نفت شناسایی کردند. در بین جدایه‌های باکتری، استرین *P. aeroginosa* توانایی تجزیه زیستی ۸۹ درصدی از خود نشان داد. همچنین مشخص شد کلیه جدایه‌ها، قادر به ایجاد ترکیبات زیست فعال سطحی (بیوسورفکتانت) هستند (طلایی و همکاران، ۱۳۸۸).

هدف از این مطالعه جداسازی، شناسایی و معرفی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی از منطقه پلدختر در پاکسازی مناطق آلوده و همچنین بررسی فاکتورهای موثر در افزایش توانایی این باکتری‌ها در تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشد.

مواد و روش

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری

نمونه‌برداری در تابستان ۱۳۹۱ از خاک زراعی، آب و لجن نفتی اطراف تلمبه‌خانه شرکت نفت منطقه پلدختر صورت گرفت. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و بعد از تهیه سری رقت، بر روی محیط‌کشت‌های NA، NB و 2xYT کشت گردید *سامبروک* و همکاران (Sambrook *et al.*, 2001). سپس پرگنه‌های باکتری جداسازی و بعد از خالص‌سازی بر روی محیط‌کشت NA درون گلیسرول ۲۰ درصد در دمای ۸۰- نگهداری گردید (جواهری و همکاران، ۱۳۹۱).

غربالگری باکتری‌ها با استفاده از محیط‌کشت SSM با جایگزینی ۲/۵ درصد نفت سفید

به‌منظور غربالگری اولیه، جدایه‌های باکتری روی محیط‌کشت SSM (Standard Succinate Medium) با

جایگزینی ۲/۵ درصد نفت سفید با سوکسینیک اسید به‌عنوان منبع کربن کشت گردیدند *مایر و عبدالله* (Meyer and Abdallah, 1978). باکتری‌هایی دارای قابلیت رشد بر روی محیط‌کشت SSM، مورد شناسایی قرار گرفتند.

شناسایی باکتری‌ها با استفاده از خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن 16S rDNA باکتریایی جدایه‌هایی که توانایی رشد روی محیط‌کشت SSM را داشتند، به‌عنوان نماینده انتخاب و آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی براساس روش *کواکس*؛ *فهی* و *پرسلی*؛ *شاد* و همکاران (Kovacs, 1956; Fahy and Parsley, 1983; Schaad *et al*., 2001) روی آن‌ها انجام گردید. آزمون‌های انجام شده شامل گرم، اکسیداز، کاتالاز، O/F، تولید H_2S از سیستئین، تولید اسید از گلوکز، لوان و هیدرولیز توئین ۲۰ و ژلاتین می‌باشد.

به‌منظور صحت تشخیص جدایه‌ها توسط آزمون‌های انجام شده، هفت جدایه به‌عنوان نماینده انتخاب شد و با استفاده از آغازگرهای عمومی با ترادف‌های (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) 16s- fDI و (5’- ACGGCTACCTTGTTACGACT -3’) 16s- rP2 به روش *ویسبورگ* و همکاران، قطعه‌ای از ناحیه 16SrDNA تکثیر گردید *ویسبورگ* و همکاران (Weisburg *et al*., 1991). تکثیر در دستگاه PCR مدل (Biometra, Germany) با برنامه حرارتی ۹۴ºC، پنج دقیقه، یک چرخه؛ ۳۰ چرخه ۹۴ºC به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۶۲ºC به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ºC به‌مدت ۲ دقیقه؛ همچنین سنتز نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ºC صورت گرفت. مواد و مقدار مورد استفاده برای واکنش PCR، شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (PCR buffer 10X)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (2/5mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۲۵ *میکرولیتر* *Taq* DNA polymerase (10U/ µl)، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت (10µM)، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت (10µM)، ۳ میکرولیتر DNA و ۱۵/۲۵ میکرولیتر آب سترون. پس از تکثیر و توالی‌یابی ناحیه 16S rDNA توسط شرکت کپنهاگن دانمارک، توالی‌های حاصل در برنامه BLASTn موجود در پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم

جهت بررسی کمی و کیفی تشکیل بیوفیلم از روش میکروپلیت الیزا استفاده گردید جورج (George, 2011). ابتدا جمعیت 10^{10} cfu/ml باکتریایی از کشت ۲۴ ساعته تهیه گردید. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط‌کشت LB درون چاهک‌های پلیت الیزا ریخته شد، سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های مختلف باکتریایی به درون هر چاهک حاوی محیط‌کشت اضافه و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد. بعد از انکوباسیون با استفاده از محلول کریستال ویوله ۱ درصد تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت (جورج ، 2011). همچنین برای سنجش کمی بیوفیلم از محلول اسید استیک ۳۰ درصد در طول موج ۵۵۰ نانومتر استفاده گردید. از هر جدایه باکتریایی سه تکرار استفاده شد و توسط نرم افزار SAS ver.9 نتایج مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت.

بررسی تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی

به‌منظور ارزیابی کیفی تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی از آزمون کروم آزورول-سولفونات (CAS) آگار استفاده شد *سیلوا* و همکاران (Silva-Stenico *et al*., 2005). پس از تهیه محیط‌کشت، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^8 cfu/ml هر باکتری به روش قطره‌گذاری در مرکز تشتک پتری قرار داده شد و سپس تشتک‌های پتری به‌مدت ۵ روز در تاریکی و دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد انکوباسیون شدند. تغییر رنگ محیط‌کشت از آبی تیره به نارنجی روشن (زرد)، نشان‌دهنده‌ی تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی بود.

آزمون حرکت اسوارمینگ باکتری

برای انجام آزمون اسوارمینگ، جدایه‌ها در محیط‌کشت NB به‌مدت ۲۴ ساعت کشت گردیدند. پس از رسوب دادن سلول‌های باکتری، به‌منظور حذف پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی از بافر PBS استفاده شد. سه مرتبه رسوب باکتری درون بافر PBS حل و سپس هر مرتبه به‌مدت ۴ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت سوسپانسیون باکتری تهیه و دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری به سوسپانسیون باکتری آغشته و در وسط تشتک پتری حاوی محیط غذایی با آگار یک درصد در سه تکرار قرار داده شد و میزان تحرک باکتری به‌مدت یک هفته اندازه‌گیری شد. نتایج اندازه قطر حرکت باکتری توسط نرم‌افزار SAS ver.9 مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت. (جواهری و همکاران، ۱۳۹۱).

نتایج و بحث

تنوع میکروبی ساده‌ترین، اقتصادی‌ترین و بهترین راهکار برای کاهش آلودگی‌های محیطی و کمک به تجزیه زیستی ترکیبات نفتی پیشنهاد می‌کند. "زیست پالایی" روشی است که از توانایی موجودات زنده جهت افزایش میزان و سرعت تخریب آلاینده‌ها استفاده می‌کند و یک ابزار مهم جهت کاهش

آلودگی‌های محیط‌زیست می‌باشد. میکروارگانیزم‌های اصلی خاک شامل باکتری‌ها، جلبک‌ها و قارچ‌ها هستند. تاکنون جنس‌های باکتریایی متنوعی شناسایی شده‌اند، که قادر به تجزیه و تغییر رنج وسیعی از ترکیبات نفتی می‌باشند *زانگ و کیائو* (Zhang and Qiao, 2002). میکروارگانیزم‌های باکتریایی از طریق فرایندهای مختلف قادر به تجزیه و استفاده از آلایندهای نفتی هستند. اصلاح خاک‌های آلوده نیازمند مطالعه تنوع میکروارگانیسم‌ها در محیط و تعیین توانایی میکرارگانیسم‌ها مختلف و تعامل آن‌ها در تجزیه آلایندهای نفتی است. از فاکتورهای کلیدی در فرایند تجزیه بیولوژیکی، وجود یک جمعیت میکروبی سازگار با شرایط محیطی می‌باشد، که توانایی تجزیه و استفاده از ترکیبات نفتی را داشته باشند. در این پژوهش باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی از خاک‌های آلوده شرکت نفت منطقه پلدختر جداسازی و شناسایی شدند و همچنین فاکتورهای تشکیل بیوفیلم، تولید سیدروفور و حرکت اسوارمینگ که سبب افزایش بقا و کارایی باکتری‌ها در تجزیه این ترکیبات می‌شوند، مورد بررسی قرار گرفت. وجود گونه‌های مختلف باکتریایی در این مطالعه نشان داد که جمعیت میکروبی خاک منطقه از تنوع مناسبی برخوردار است. این تنوع بالای میکروبی می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور مناسب در تجزیه آلایندهای نفتی منطقه مورد استفاده قرار گیرد. بافت خاک منطقه مورد نمونه‌برداری از نوع لومی‌شنی و میزان ماده آلی آن ۱/۴۴۳درصد بود.

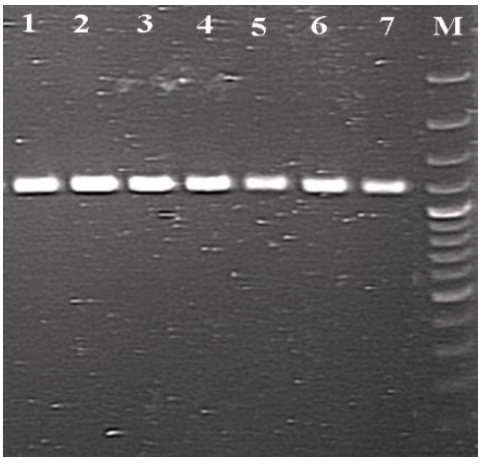
غربالگری باکتری‌ها با استفاده از محیط‌کشت SSM

در جداسازی اولیه باکتری‌ها از نمونه‌های خاک، آب و لجن آلوده به ترکیبات نفتی تعداد ۷۴ جدایه باکتری جداسازی گردید. به‌منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده و یا متحمل به ترکیبات نفتی، روی محیط‌کشت SSM حاوی ۲/۵ درصد نفت سفید به‌عنوان منبع کربن کشت گردید. در نهایت تعداد ۱۰ جدایه که توانایی رشد روی محیط‌کشت SSM را داشتند، انتخاب و مورد شناسایی قرار گرفتند.

بررسی خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و توالی‌یابی ناحیه ژن 16S rDNA باکتریایی

تعداد ۱۰ جدایه از لحاظ خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها با توجه به این خصوصیات در هفت گروه قرار گرفتند. از هر گروه یک جدایه به‌عنوان نماینده انتخاب و ترادف ۱۵۰۰ جفت بازی از ناحیه 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای 16s-FDI و 16s-rP2 تکثیر شد (شکل ۱).

پس از تکثیر، توالی‌یابی و بلاست کردن ناحیه تکثیر شده در پایگاه داده‌ای NCBI و همچنین با توجه به نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها شناسایی شدند (جدول ۱).



شکل ۱: محصول PCR حاصل از استفاده جفت آغازگر 16s-FDI/rP2 در استرین‌های نماینده. مارکر ۳۰۰۰ جفت بازی

Fig. 1: PCR product of 16s-FDI/16s-rP2 primer pairs in Representative strains. Marker 3000 bp

1: *Acinetobacter baumannii*، *2: Stenotrophomonas acidaminiphila*, 3: *Pseudomonas aeruginosa ,4: Acinetobacter junii*, 5: *Delftia tsuruhatensis, 6: Comamonas koreensis, 7: Sphingobacterium multivorum*

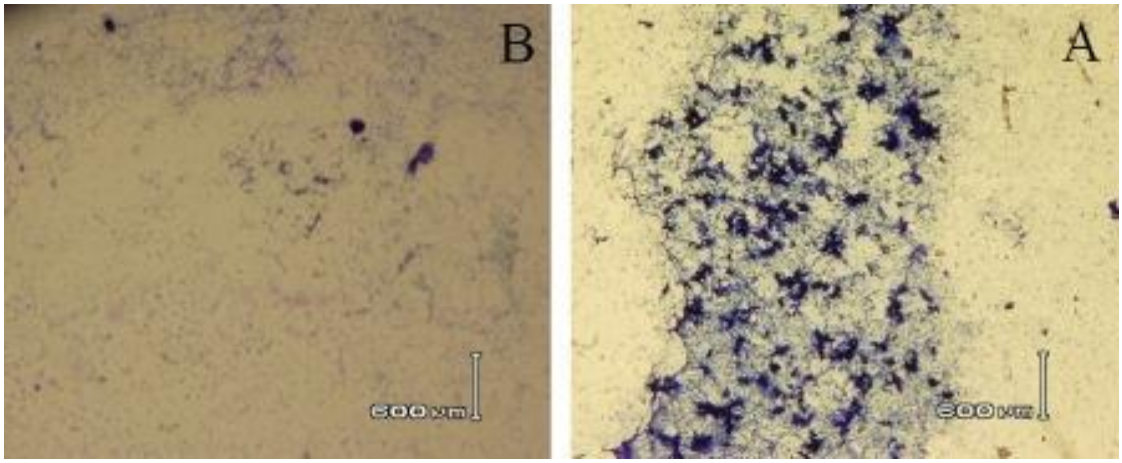
جدول ۱: نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده از مناطق آلوده به ترکیبات نفتی

Table 1: result of phenotypic and biochemical tests of bacteria isolated from petroleum-contaminated regions

جدایه‌های باکتریایی	تولید سیدروفور	هیدرولیز ژلاتین	تولید اسید از دی‌گلوکز	هیدرولیز توئین ۲۰	لوان	تولید H_2S از سیستئین	کاتالاز	اکسیداز	بی‌هوازی اختیاری	هوازی اجباری	گرم
Bacterial isolates	Siderophore production	Gelatin hydrolysis	Acid production from D-glucose	Tween – 80 hydrolsis	Levan	H2S Production from Cysteine	Catalase	Oxidase	Oxidative and fermantative	Oxidative	Gram
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+	−	−	+	+	−	+	−
Acinetobacter baumannii	+	−	+	+	−	+	+	−	−	+	−
Acinetobacter junii	+	−	−	+	−	−	+	−	-	+	−
Sphingobacterium multivorum	−	−	+	-	−	−	+	+	−	+	−
Delftia tsuruhatensis	+	−	+	+	−	+	+	+	−	+	−
Comamonas koreensis	−	−	+	+	−	−	+	+	−	+	−
Stenotrophomonas acidaminiphila	−	−	+	+	−	−	+	+	−	+	−

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم

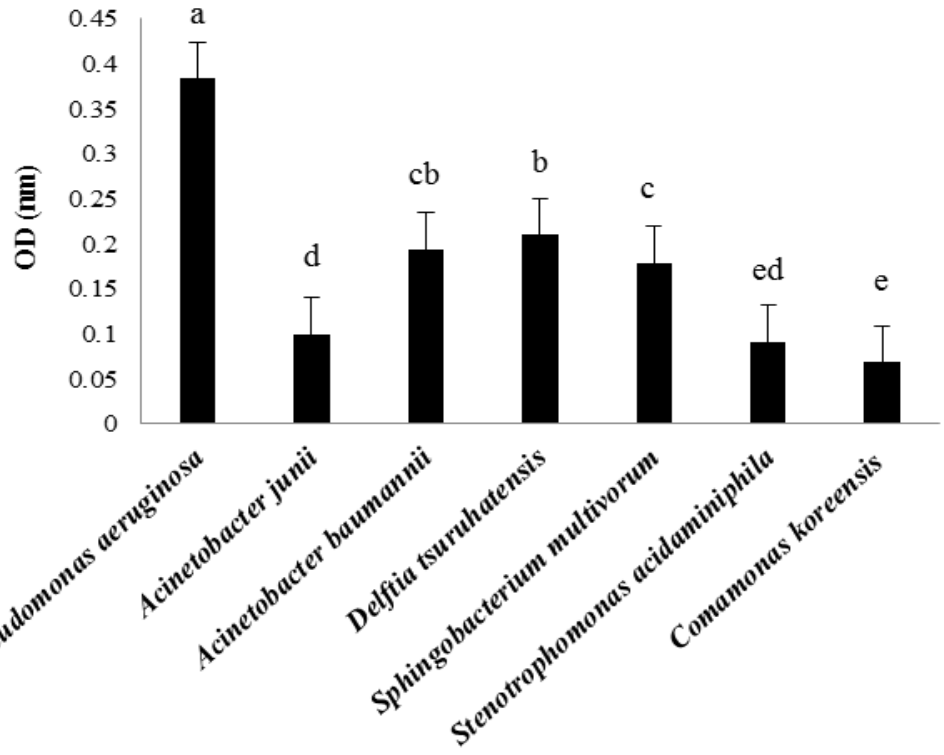
به‌منظور ارزیابی میزان تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌ها از روش میکروپلیت الیزا استفاده شد. ابتدا بعد از رنگ‌آمیزی با استفاده از میکروسکوپ نوری ساختار بیوفیلم مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲). ساختار بیوفیلم در باکتری *P. aeruginosa* دارای بیشترین میزان تراکم و گسترش بود.



شکل ۲: مشاهده ساختار بیوفیلم باکتریایی توسط میکروسکوپ نوری در روش میکروپلیت الیزا. A. باکتری *Pseudomonas aeruginosa*. B. باکتری *Comamonas koreensis*

Fig. 2: Observed by optical microscopy structure of bacterial biofilm in microplate ELISA method. A. *Pseudomonas aeruginosa* B. *Comamonas koreensis*

سپس به‌منظور ارزیابی کمی میزان توانایی جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم از اسیداستیک ۳۰ درصد در طول موج ۵۵۰ نانومتر استفاده شد. با مقایسه میانگین‌ها در بین گونه‌های مورد استفاده، گونه *P. aeruginosa* بیشترین میزان توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا بود. همچنین گونه *C. koreensis* کمترین میزان تشکیل بیوفیلم را نشان داد (نمودار ۱).



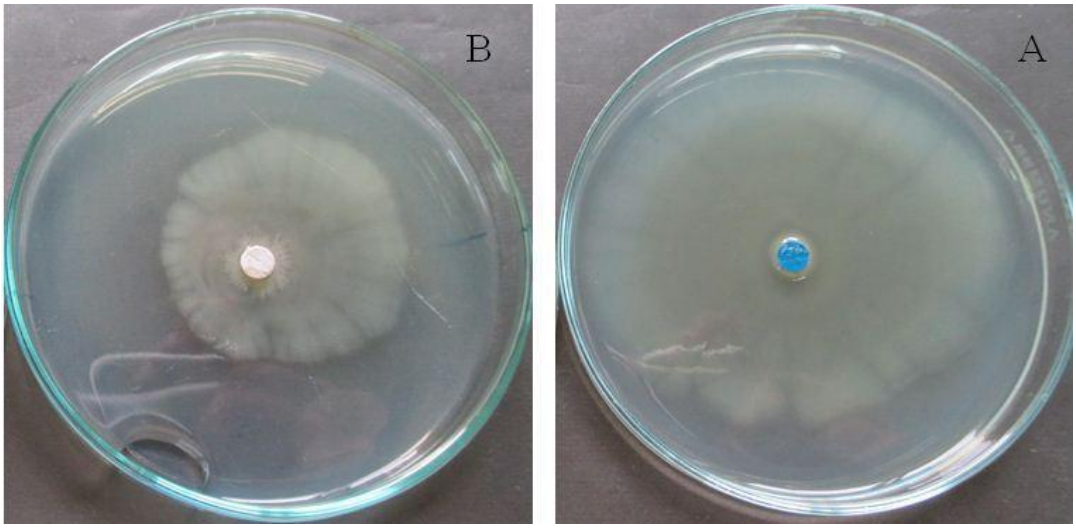
شکل ۳: مقایسه کمی میزان تشکیل بیوفیلم جدایه‌های باکتریایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر

Fig. 3: Quantitative comparison of amount biofilm formation in bacterial isolates wavelength of 550 nm

آزمون حرکت اسوارمینگ باکتری

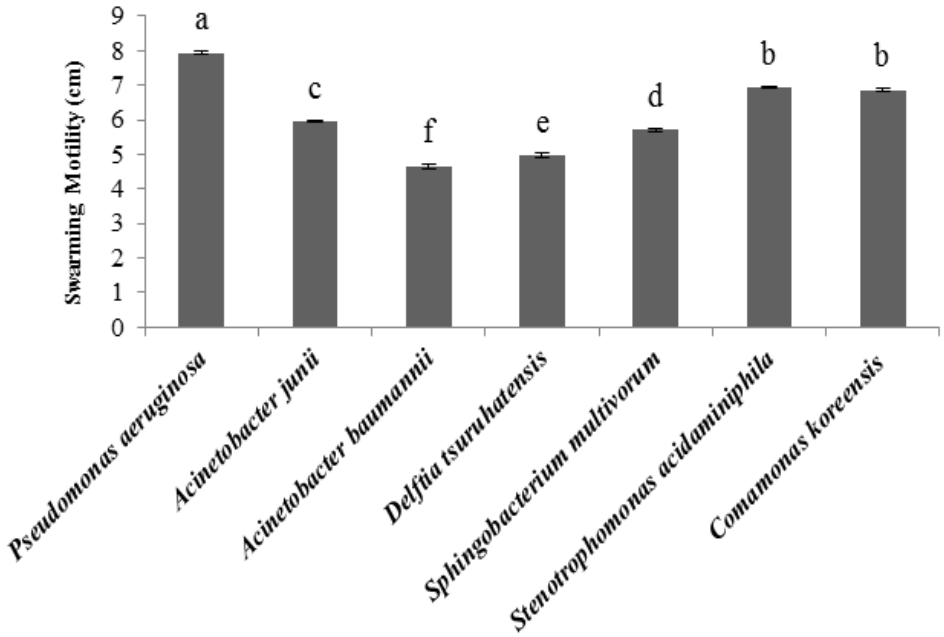
در بررسی میزان حرکت اسوارمینگ جدایه‌ها از محیط NA یک درصد استفاده گردید. جدایه‌ها از نظر سرعت تحرک و نحوه حرکت با هم تفاوت داشتند، به‌طوری‌که اشکال مختلفی از تحرک را نشان دادند (شکل ۳).

همچنین با مقایسه میانگین‌ها بیشترین و کمترین میزان تحرک در بین جدایه‌ها به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های *P. auroginosa* و *A. baumannii* بود (نمودار ۲).



شکل ۴: حرکت اسوارمینگ باکتریایی روی محیط NA یک درصد. A. *Pseudomonas aeruginosa* . B. *Acinetobacter baumannii*

Fig. 4. Swarming bacteria motility in NA medium 0/01. A. *Pseudomonas aeruginosa* B. *Acinetobacter baumannii*



شکل ۵: مقایسه میانگین اندازه قطر حرکت اسوارمینگ جدایه‌های باکتریایی بر روی محیط‌کشت NA یک درصد (میلی‌متر)

Fig. 5: Mean comparison diameter swarming motility of bacteria isolates in NA medium 0/01 (mm)

به‌منظور داشتن محیط‌زیست سالم و پایدار، حذف آلودگی‌های نفتی از منابع آبی و خاک آلوده یک امر ضروری است. یکی از روش‌های مؤثر و کارآمد در این زمینه استفاده از میکروارگانیسم‌ها، به‌خصوص باکتری‌ها می‌باشد. باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی، از سال‌های پیش جداسازی و شناسایی شده‌اند. به‌طوری‌که در بررسی‌های اخیر ۷۹ جنس باکتریایی با قابلیت استفاده از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی شناخته شده است هید و همکاران (Head *et al.*, 2006). در پژوهش حاضر گونه‌های باکتریایی *Pseudomonas aeruginosa*، *Acinetobacter baumannii*، *Acinetobacter junii*، *Delftia tsuruhatensis*، *Sphingobacterium multivorum* و *Stenotrophomonas acidaminiphila* و *Comamonas koreensis* شناسایی شدند، که در این میان فقط گونه *Acinetobacter baumannii* مربوط به نمونه لجن بود. در این بین گونه‌های جنس *سودوموناس* به‌عنوان توانمندترین گونه‌های باکتریایی در تجزیه ترکیبات نفتی معرفی شده‌اند. توانایی سازگاری بالای این جنس در اغلب شرایط محیطی می‌تواند علت غالبیت آن در اغلب مناطق آلوده به ترکیبات نفتی باشد. در اکثر پژوهش‌ها گونه *P. aeruginosa* به‌عنوان تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی گزارش شده است *نوریه* و همکاران؛ *یاراحمدی* و همکاران؛ *کفیلزاده* و همکاران؛ *حمزه* و همکاران؛ سعیدی و همکاران؛ *سرکویر* و همکاران؛ *ماندری و لین*، *ما* و همکاران (Noriyeh *et al*., 2009; Yarahmadi *et al*., 2012; Kafilzadeh *et al*., 2012; Saeedi *et al*., 2013; Hamzeh *et al.*, 2013; Cerqueira *et al.*, 2011; Mandri and Lin, 2007; Ma *et al.*, 2006). قابلیت استفاده از تولوئن، آسفالتن‌تر، بنزن-الکل و هگزادکان به‌عنوان منبع کربن و انرژی توسط باکتری *A. baumannii* به اثبات رسیده است، که این توانایی به‌علت داشتن پلاسمیدهای کاتابولیک و تجزیه‌کننده هگزا دکان است. در پژوهش‌های محققینی نظیر کوردا و همکاران، کوماکی‌ناکارا و همکاران، ناکامورا و همکاران و *مغانلو* و همکاران این باکتری به‌عنوان تجزیه کننده آلایندهای نفتی جداسازی و شناسایی شده است، که با تحقیق حاضر مطابقت دارد *مغانلو* و همکاران؛ *کوموکای-ناکامورا*؛ *کوردا*، *ناکامورا* و همکاران؛ *کوردا* و همکاران (Moghanlou *et al.*, 2012; Komukai-Nakamura *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2014; Korda *et al.*, 1997).

جداسازی، شناسایی و معرفی باکتری *A. junii* به‌عنوان استفاده‌کننده از آلایندهای نفتی توسط *باسوکی* و همکاران، *زهانگ* و همکاران، *لین* و همکاران و *تانکاراج* و همکاران (Basuki *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014, Lin *et al.*, 2010; Thangaraj *et al.*, 2008) صورت گرفته است که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین جدایه‌های باکتریایی *Delftia tsuruhatensis*، *Sphingobacterium multivorum* و *Stenotrophomonas acidaminiphila* توسط محققین مختلف از مناطق آلوده به آلایندهای نفتی جداسازی شده و به‌عنوان تجزیه‌کنندگان ترکیبات نفتی معروفی شده‌اند ابراهیمی و همکاران؛ *جورگنسن* و همکاران؛ *الیسی* و همکاران؛ *گارسیا-دیاز*؛ *بوانسواری*، *اردوگان*، *منگوانی* و همکاران (Jørgensen *et al.*, 2000; Alisi *et al.*, 2009; García-Díaz *et al.*, 2013; Bhuvaneswari, 2013; Erdogan *et al.*, 2014; Mangwani *et al.*, 2014). در این پژوهش باکتری *C.* koreensis برای نخستین بار در دنیا به‌عنوان تجزیه‌کننده نفت معرفی گردید. البته در پژوهشی که توسط وانگ انجام شد باکتری مذکور را به‌عنوان تجزیه‌کننده علف‌کش توفوردی معرفی کرده است *وانگ و همکاران* (Wang *et al.*, 2009).

گونه‌های *P. aeruginosa* و *D. tsuruhatensis* به‌ترتیب بیشترین میزان تولید بیوفیلم را نشان دادند. در باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت تشکیل بیوفیلم به‌منظور ایجاد یک سد فیزیکی برای جلوگیری از ورود هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به درون غشا است *وان همت و همکاران* (2003). همچنین ساختارهای بیوفیلم باکتریایی سبب مقاومت در برابر مواد مضر می‌شود و پس از گذشت مدت زمانی باکتری توانایی مصرف و تجزیه مواد را پیدا می‌کند *فرزادکیا* و همکاران (Farzadkia *et al.*, 2010).

بیشترین میزان تحرک اسوارمینگ مربوط به گونه‌های *P. aeruginosa*، *S. acidaminiphila* و *C. koreensis* بود. باکتری های متحرک قادر به کنترل موقعیت‌های فضایی خود با توجه به محرک‌های شیمیایی، نور، اکسیداسیون و احیا از طریق مکانیسم‌های مختلف هستند. در واقع تحرک می‌تواند اثرات سمی مواد را کاهش و سبب جلب باکتری به سمت مواد غذایی شود. همچنین از فاکتورهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم تحرک باکتری می‌باشد. اگرچه گونه‌های متحرک و غیرمتحرک، توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند، اما به‌طورکلی در گونه‌های متحرک، توانایی حرکت برای اتصال اولیه پلانکتونی به سطح و برای انتشار باکتری‌ها در سراسر سطح بسیار مهم است *جینگ و پاک*، *گولر و رومئو* (Jiang and Pace, 2006; Goller and Romeo, 2008). تحرک نه تنها در آغاز و توسعه‌ی بیوفیلم‌ها نقش دارد بلکه در انتشار و ساز و کاری آن‌ها برای گسترش و کلنیزه‌کردن زیستگاه‌های جدید ضروری است *(جینگ و پاک*، 2008؛ *گولر و رومئو*، 2006). همچنین نتایج کیفی نشان می‌دهد که سه جدایه *Pseudomonas aeruginosa*، *Delftia tsuruhatensis*، *Acinetobacter junii* توانایی تولید سیدروفور

داشتند. علاوه‌بر سه منبع اصلی کربن، نیتروژن و فسفر عناصر دیگر همچون آهن برای رشد باکتری‌ها مورد نیاز است (طلایی و همکاران، ۱۳۸۸). نقش عنصر آهن در تشکیل بیوفیلم به اثبات رسیده است، به‌طوری که افزایش غلظت آهن منجر به افزایش تولید بیوفیلم شده است کمالی، *بانین* و همکاران (Banin *et al*., 2005 ،Kamali *et al*., 2011). آهن در پوسته‌ی زمین به شکل ترکیب شدیداً نامحلول هیدروکسید آهن (III) وجود دارد و برای ریزجانداران خاک و گیاهان غیرقابل استفاده می‌باشد. برخی از باکتری‌ها با ترشح سیدروفورها آهن موردنیاز خود را تأمین می‌کنند *نیلاندس و ناکامورا* (Neilands and Nakamura, 1991). همچنین توانایی باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه تا حدودی وابسته به تولید سیدروفورها می‌باشد *وانگ* و همکاران (1993).

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۳-۵ متن انگلیسی مراجعه شود.