مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی باکتری های تجزیه کننده آلکان های بلند زنجیره از خاک های آلوده به نفت

پوپک عزیزی نیکو*[۱]، اعظم حدادی[۲]*، محمود شوندی[۳]، مرضیه سلیمانی[۴]، آذین طبیب[۵]

[۱]کارشناس ارشد میکروبیولوژی ، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ،کرج ، ایران
[۲] استادیارمیکروبیولوژی ، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج ، ایران
[۳]استادیار،دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران ، ایران
[۴]کارشناس ارشد میکروبیولوژی ، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج ، ایران
[۵]کارشناس ارشد میکروبیولوژی ، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج ، ایران

چکیده

سابقه و هدف : پارافینها هیدروکربنهای اشباع شده با وزن مولکولی بالا می باشند که در مخازن، تحت شرایط دما و فشار بالا، درتعادل باقی می مانند. اما هنگامیکه نفت خام در زمان استخراج به سطح زمین آورده شود، حرارت و فشارکاهش می یابد. زیرنقطه ابری شدن ، هیدروکربن های پارافینی به صورت جامد در آمده و رسوباتی را روی سیستمهای تولید نفت ایجاد می کنند. مشکلات ایجاد شده توسط پارافینها، معمولا"از طریق عملیات سیال حرارتی، پیگ رانی، یا استفاده از حلالها و مواد شیمیائی کاهش داده می شود. با وجود استفاده از این تکنیکها، شرکتها همچنان با مشکلاتی مواجه هستند. بعلاوه این عملیات هزینه بالائی را به همراه دارد. استفاده از روشهای میکروبی جهت ممانعت از رسوب پارافین، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و کم خطر می باشد. هدف از این تحقیق، جداسازی یک باکتری با توانایی تجزیه موثر تتراکوزان به عنوان یک آلکان بلند زنجیره بود .

مواد و روش ها : نمونه های خاک آلوده به نفت خام از اطراف پالایشگاه نفت تهران جمع آوری شد. جهت غنی سازی، g۱ از نمونه های خاک به ml۴۰ محیط نمکی حداقل که حاوی تتراکوزان به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود، تلقیح شدند. بوسیله غنی سازی چند مرحله ای و تکنیک غربالگری، درنهایت یک باکتری به عنوان جدایه برتر انتخاب شد و براساس ویژگیهای مورفولوژیکی، تست های بیوشیمیایی و روش های فیلوژنتیکی به عنوان جنس مایکوباکتریوم شناسایی گردید.

یافته ها : این سویه قادر به استفاده از تتراکوزان به عنوان تنها منبع کربن بود. نتایج نشان داد که سویه انتخابی به خوبی در pH محدوده ۴ تا ۹ و درجه حرارت ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس رشد کرد. بهینه رشد آن دمای ۳۵ درجه سلسیوس بود و رشد قابل قبولی را در غلظت ۵٪ نمک نشان داد. همچنین قادر به تجزیه ۸۰٪ تتراکوزان در مدت ۲۴ روز بود.

نتیجه گیری : با توجه به میزان تجزیه تتراکوزان توسط این باکتری تحت شرایط محیطی ذکرشده ، کاربرد آن در جلوگیری از رسوب پارافین می تواند مقرون به صرفه باشد. تایید توانایی این سویه درکاهش رسوب این ترکیبات در چاههای نفت، نیازمند تحقیقات بیشتر در مدل فیزیکی می باشد .

کلمات کلیدی : تتراکوزان ، آلکان بلند زنجیره ، جنس مایکوباکتریوم

مقدمه

رشد روز افزون فعالیت های صنعتی و عدم رعایت قوانین زیست محیطی سبب شده است تا در دهه های اخیر مقادیر هنگفتی از آلاینده های هیدروکربنی به واسطه عواملی نظیر پخش آلاینده توسط پالایشگاهها، نشت آلاینده از مخازن نفتی زیرزمینی و ایستگاه های سوخت گیری، تانکرها ، نفتکش ها و غیره وارد محیط زیست شود. بخشی از این آلاینده ها، توسط

آدرس نویسنده مسئول : تهران- تهران -فلکه ۲ صادقیه-بلوارآیت الله کاشانی-بوستان ۲-گلستان ۱-نجف راده فروتن-پلاک ۳۴-طبقه۴
Email : p.azizinikoo@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۸/۲۳
تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.12.6]

میکروارگانیسم های موجود در آب و خاک و یا تحت تأثیر عوامل فیزیکی و بیولوژیکی تجزیه و حذف می شود. اما بخش عمدهٔ آنها در محیط زیست تجمع یافته و تهدیدی جدی برای سلامت انسان و موجودات زنده بشمار می رود (۱۰) . هیدروکربن های نفتی در خاک نفوذ کرده و منجر به کاهش قابل توجه کیفیت خاک شده و آن را برای استفاده نامناسب می نماید و در صورت عدم پاکسازی ، سبب آلودگی آبهای زیرزمینی نیز می گردد. پاکسازی سایت های آلوده نفتی با دو روش فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی امکانپذیر است. اما با توجه به پیامدهای منفی استفاده از روش فیزیکوشیمیایی، در حال حاضر بهره برداری از گزینه های بیولوژیکی بیشتر مورد توجه است (۹). چرا که میکروارگانیسمها حاوی سیستمهای آنزیمی هستند که هیدروکربن ها را به عنوان منابع کربن و انرژی بکار برده و تجزیه می نمایند (۳) . بررسی تاثیر عوامل محیطی در موفقیت پاکسازی زیستی آلاینده های نفتی، وابسته به توانایی ایجاد و حفظ شرایطی است که در نهایت افزایش میزان تجزیه زیستی در محیطهای آلوده شده را به همراه داشته باشد (۱۴) . از تلاشهای انجام شده و موفقیت آمیز در زمینه پاکسازی زیستی می توان به پاکسازی نشت نفت در نفتکش بزرگ Exxon valdez اشاره کرد (۶) . عوامل محدود کننده متعددی روش حذف بیولوژیکی آلاینده ها توسط میکروارگانیسم ها را تحت تأثیر قرار می دهد و کارآیی این روش را قدری محدود می سازد. برخی از این عوامل محدود کننده عبارتند از : غلظت آلاینده ، دسترسی به مواد آلاینده ، شرایط مناسب برای بقاء و رشد میکروارگانیسم از جمله :pH مناسب، دمای مناسب، رطوبت مناسب، اکسیژن کافی، مواد غذایی مناسب و عدم وجود مواد سمی وکشنده میکروارگانیسم ها، که بدلیل حائز اهمیت بودن آنها مطالعات متعددی نیز در این زمینه انجام شده است (۸ ،۱۲) . لیکن پژوهش کامل در مورد سویه های باکتریهای نفت خوار بومی هر منطقه از اهمیت بسزایی برخوردار است (۱) .

با وجود محدودیتها ، روش های بیولوژیکی حذف آلاینده ها به علت توانایی حذف کامل آلاینده ها و تبدیلشان به ترکیبات معدنی بی ضرر و سازگار با محیط زیست، مانند دی اکسیدکربن و آب و همچنین هزینه های کمتر ، بسیار مورد توجه می باشند (۴) . آلکانها یا پارافین ها از انواع هیدروکربنهای خطی اشباع شده هستند که بسته به منشاء نفت تا ۵۰٪ نفت خام را شامل می شوند ، اما می توانند بوسیله بسیاری از ارگانیسمهای زنده مانند گیاهان، جلبک های سبز، باکتری ها یا حیوانات نیز تولید شوند . آلکانها مولکولهای غیرقطبی هستند که از لحاظ شیمیایی واکنش پذیری کمی دارند ، ولی بیشتر آنها می توانند بوسیله میکروارگانیسمها بطور موثری تجزیه شوند (۱۳) . آلکانها علاوه بر اینکه از عوامل مهم آلودگی خاکها پس از نشت های نفتی می باشند، معضلاتی را نیز در صنعت نفت ایجاد می کنند. رسوب آلکانها با وزن مولکولی بالا، در دیواره داخلی لوله های انتقال نفت منجر به کاهش میزان جریان یا حتی انسداد کلی لوله ها می شود که سبب خسارت در بخش تولید و سرمایه گذاری در صنعت نفت خواهد شد . جداسازی میکروارگانیسمهایی با توانایی تجزیه آلکانهای بلند زنجیره، روشی بهتر و ارزان تر برای پاکسازی محیط زیست از آلاینده ها و حل معضلات مربوط به بخش تولید در صنعت نفت بشمار می رود .

مواد و روش ها

غنی سازی و خالص سازی : از خاکهای آلوده به مواد نفتی استخرهای ۳ و ۴ پالایشگاه نفت تهران، در اردیبهشت سال ۱۳۸۹ نمونه گیری صورت گرفت . نمونه های خاک در محیط نمکهای معدنی غنی سازی شدند . این محیط شامل ترکیبات زیر بود : ۱/۸گرم Na_2HPO_4 ، ۰/۴گرم KH_2PO_4 ، ۰/۰۷۵ گرم$MgSO_4$ ، ۰/۰۴ گرم KCl ، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2$، ۰/ ۵ گرم NH_4NO_3 و ۰/۵ گرم NaCl. در پایان pH محیط نیز روی ۶/۸ تنظیم گردید. پس از اتوکلاو ، ۰/۰۴ میلی لیتر محلول استریل عناصر کم نیاز شامل : ۰،۵ میلی گرم بر لیتر $CuSO_4.5H_2O$ ، ۷میلی گرم بر لیتر $ZnSO_4.7H_2O$ ، ۰،۱ میلی گرم بر لیتر $AlK(SO_4)_2.12H_2O$ ، ۱ میلی گرم بر لیترH_3BO_4 ، ۲۴ میلی گرم بر لیتر $NiCl_2.6H_2O$ ، ۷میلی گرم بر لیتر $MnSO_4.5H_2O$ ، ۰،۱ میلی گرم بر لیتر $Na_2MoO_4.2H_2O$ ، ۱ میلی گرم بر لیتر $FeSO_4.7H_2O$ ، ۱۸میلی گرم بر لیتر $CoSO_4.5H_2O$ و ۲۰۰ میکرولیتر تتراکوزان (C24) حل شده در n- هگزان با غلظت ۰/g/ml۰۶، به عنوان تنها منبع کربن به محیط کشت پایه معدنی اضافه شد و در نهایت غلظت تتراکوزان روی ppm ۳۰۰ تنظیم شد . سپس یک گرم از نمونه خاک به محیط اضافه گردید و انکوباسیون به مدت ۱۴ روز در شرایط دمایی ۳۰ °C و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.12.6]

سرعت چرخش ۸۰ دور در دقیقه انجام گرفت . پس از ۱۴ روز انکوباسیون ، مجددا" در محیط جدید پاساژ داده شدند . این روند تا ۴ مرحله تکرار شد و از آخرین محیط کشت پایه معدنی ، روی محیط نوترینت آگار کشت ایزوله خطی انجام شد . پلیت ها به مدت ۷ روز در انکوباتور ۳۰ °C قرار داده شدند . در پایان از هر تک کلنی متفاوت ، یک کشت ایزوله خطی بر روی نوترینت آگار و بصورت جداگانه تهیه شد . به این ترتیب از هر تک کلنی متفاوت، یک پلیت خالص بدست آمد . در نهایت برای تایید توانایی میکروارگانیسمهای جداسازی شده جهت تجزیه تتراکوزان، مجددا"هر یک از این میکروارگانیسمها به محیط کشت پایه معدنی با غظت ppm۳۰۰ تتراکوزان اضافه شدند و پس از تلقیح عناصر کم نیاز، مانند قبل انکوباسیون انجام شد و بعد از ۱۴ روز، جذب نوری هریک از این محیط ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد . در نهایت جدایه ای که بالاترین میزان رشد را نشان داد ، به عنوان جدایه برتر انتخاب شد .

ارزیابی جدایه برتر : جهت بررسی توانایی تحمل تتراکوزان توسط این جدایه، محیط کشت پایه معدنی با غلظتهای۱۰۰، ۳۰۰ ، ۵۰۰ ،۱۰۰۰ و ppm۵۰۰۰ تتراکوزان تهیه شد و پس از تلقیح جدایه ، انکوباسیون به مدت ۱۴روز ، طبق شرایط قبل انجام گرفت و جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی رشد جدایه برتر نیز، هر ۲۴ ساعت از روز صفر تا روز ۱۴، میزان جذب نوری محیط کشت پایه معدنی با غلظت ppm۳۰۰ تتراکوزان در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. علاوه بر این توانایی رشد جدایه برتر در حضور غلظت های ۵ تا ۱۵ درصد NaCl و محدوده pH ۴ تا ۹ مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از محیط L.B رقیق شده به نسبت ۱ به ۵ استفاده شد و بعد از ۱۴ روز انکوباسیون، در دمای ۳۰ °C و سرعت چرخش ۸۰ دور در دقیقه، جذب نوری نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومترخوانده شد . همچنین توانایی رشد این جدایه در محیط L.B با دماهای ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس نیز مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی توانایی تجزیه سایر آلکانهای بلند زنجیره توسط این جدایه، از محیط کشت پایه معدنی با غلظت ppm ۳۰۰ از آلکان های۳۰ ، ۳۴ و ۴۰ کربن، به جای تتراکوزان استفاده شد. انکوباسیون به مدت ۱۴روز ، در دمای ۳۰ °C و سرعت چرخش ۸۰ دور در دقیقه انجام گرفت و جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت رشد جدایه در حضور گلوکز نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از محیط کشت پایه معدنی با غلظت ppm۳۰۰ تتراکوزان استفاده شد و بعد از ۱۴ روز انکوباسیون ، جذب نوری در ۶۰۰ نانومترخوانده شد. میزان گلوکز استفاده شده ۱ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط کشت پایه معدنی بود .

تعیین غلظت باقی مانده تتراکوزان : جهت رسم منحنی غلظت باقی مانده تتراکوزان بوسیله کروماتوگرافی گازی، از۶ ارلن حاوی محیط کشت پایه معدنی با غلظت ppm۳۰۰ تتراکوزان استفاده شد. سپس باکتری مورد نظر به هر یک از نمونه ها تلقیح شد. یک ارلن نیز طبق شرایط ذکرشده ولی بدون باکتری ، به عنوان نمونه شاهد تهیه گردید. مدت ۲۴ روز و در فواصل زمانی ۴ روزه، یکی از نمونه ها جهت بررسی میزان تتراکوزان باقی مانده در محیط، بررسی گردید و پس از خالص سازی، تست کروماتوگرافی گازی برروی آن انجام شد . **خالص سازی :** به ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت پایه معدنی با غلظت ۳۰۰ ppm تتراکوزان ، ۲۰ میلی لیتر هگزان خطی اضافه گردید و داخل دکانتور ریخته شد تا فازهای آلی و آبی از هم جدا شوند. بر روی فاز آبی مجددا"۲۰ میلی لیتر هگزان خطی ریخته شد و مراحل بالا تا ۳ بار تکرار گردید. سپس فازهای آلی بدست آمده از ۳ مرحله قبل توسط سولفات سدیم بدون آب آبگیری شد. درنهایت محلول سرریز و از سولفات سدیم جدا گردید و تست کروماتوگرافی گازی روی محصول نهایی انجام گرفت.

کروماتوگرافی گازی (GC) : بخشی از هیدروکربن های استخراج شده به ستون مویی CPC sil8/CB (طول ۲۵ m) در دستگاه مربوطه تزریق شدند. درجه حرارت GC از ۵۶ °C شروع شد و به ۱۰۰ °C رسید (با افزایش ۳ °C در دقیقه) . سپس درجه حرارت به ۲۵۰°C افزایش یافت (با افزایش ۱۵ °C در دقیقه) و ۷ دقیقه در این دما نگه داشته شد (۷) .

شناسایی فیلوژنیک جدایه بوسیله توالی ژن 16S rRNA : پس از شناسایی مقدماتی جدایه برتر بر اساس ویژگیهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، شناسایی آن بر اساس تعیین توالی ژن کدکننده 16S rRNA انجام گرفت، بدین منظور ژنوم جدایه استخراج گردید و سپس ناحیه 16S rRNA ژنومی آن با استفاده از PCR تکثیر گردید. پس از خالص

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.12.6]

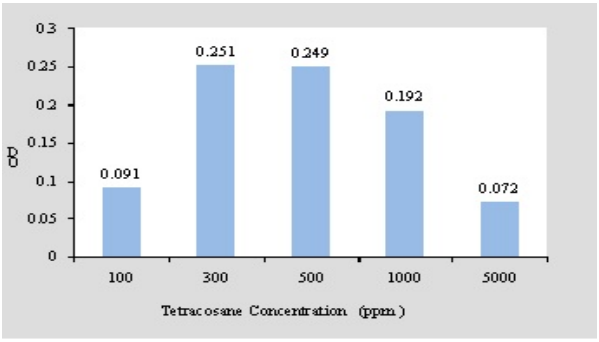
سازی، محصول واکنش تعیین توالی شد و با اطلاعات موجود در بانک ژنومی یوباکتریها مقایسه شد و بدین ترتیب هویت باکتری مشخص گردید.

استخراج DNA : استخراج DNA با استفاده از کیت GenElut Bacterial Genomic DNA تهیه شده از شرکت فرمنتاز ، انجام گرفت. پرایمرهای انتخابی جهت تکثیر ژن 16S rRNA با نامهای F۹ و R۱۵۴۱ ، توسط شرکت فن آوران سنتز شدند که توالی آنها بدین صورت بود (۱۶) :

پرایمر F5́: -GAGTTTGATYMTGGCTCAG-3́ :R پرایمر 5́-AAGGAGGTGWTCCARCC -3́

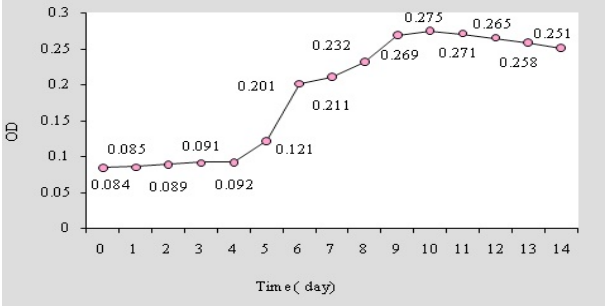
اجزا واکنش PCR شامل ۲: میکرولیتر DNA الگو ، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ، ۰/۷ میکرولیتر از هر پرایمر و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq Polymerase بود. در پایان به وسیله آب مقطر حجم کل به ۲۵ میکرولیتر رسید. همچنین از یک نمونه کنترل منفی نیز استفاده شد که حاوی کلیه اجزاء به غیر از DNA الگو بود. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در ادامه ۳۵ سیکل شامل : دناتوراسیون در دمای ۹۵°C به مدت ۲۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۴°C به مدت ۲۰ ثانیه و سنتز در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. مرحله طویل شدن نهایی نیز در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد . در نهایت محصول PCR به طول ۱۵۰۰bp ، الکتروفورز و پس از خالص سازی ، با واسطه شرکت تکاپوزیست و از طریق شرکت بایونیر کره جنوبی ، بصورت دو طرفه و بدون کلونینگ تعیین توالی گردید (۱۱) . سپس با استفاده از نرم افزار آنلاین Blastnشناسایی شد.

نتایج : از نمونه خاک های آزمایش شده ، ۶ جدایه باکتریایی مختلف جداسازی شدند. از بین این ۶ جدایه ، تنها جدایه برتر قادر به رشد بر روی محیط کشت پایه معدنی با غلظت ppm ۳۰۰ تتراکوزان به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود. این جدایه در محیط نوترینت آگار دارای کلنی های خشک، خشن و به رنگ زرد نخودی بود. نتایج بررسی جدایه برتر در غلظت های مختلف تتراکوزان، رشد کمی را در غلظت ppm ۱۰۰ نشان داد، زیرا در غلظت های پایین، سطح تتراکوزان جهت چسبندگی باکتری به آن کم می باشد. با بالا رفتن غلظت، سطح تماس باکتری با تتراکوزان بیشتر می شود و در نتیجه میزان رشد باکتری افزایش یافت و در غلظت های ppm ۳۰۰ و ppm ۵۰۰ افزایش رشد تقریبا" برابری را نشان داد. اما با افزایش بیش از حد غلظت تا ۱۰۰۰ و ppm۵۰۰۰ ، میزان رشد باکتری مجددا" کم شد ، زیرا در آن غلظت ها تتراکوزان روی باکتری اثر سمی دارد (نمودار۱) .



نمودار ۱ : بررسی رشد در غلظت های مختلف تتراکوزان

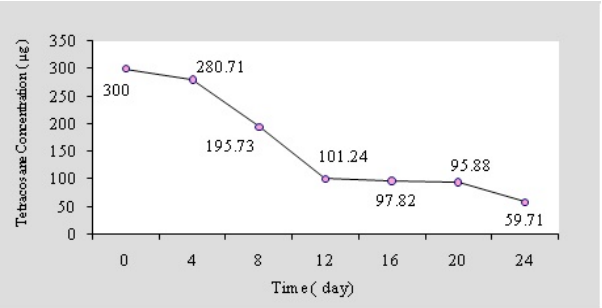
در ادامه، منحنی رشد جدایه برتر در غلظت ppm ۳۰۰ تتراکوزان (نمودار۲) نشان داد که، رشد جدایه در محیط حاوی تتراکوزان با یک وقفه ۴ روزه آغاز شده و پس از آن وارد فاز لگاریتمی می شود. بالاترین میزان رشد جدایه ۱۰ روز پس از تلقیح بدست آمد که با توجه به منحنی تجزیه زیستی (نمودار۳) و مقایسه آن با منحنی رشد (نمودار۴) ، میزان تجزیه زیستی نیز در این روز بالاترین مقدار بود. از روز دهم به بعد جدایه وارد فاز سکون شد و به تدریج سرعت رشد و تجزیه آن کاهش یافت (نمودار۲) .



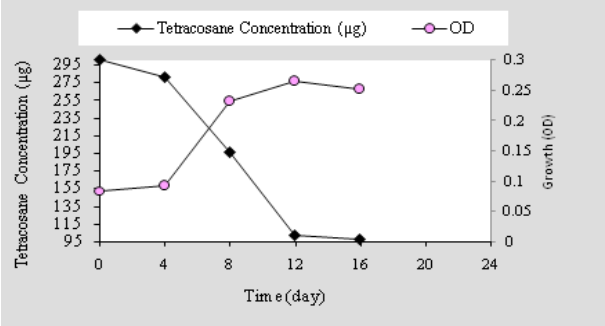
نمودار ۲ : الگوی رشد در حضور غلظت ppm ۳۰۰ تتراکوزان

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.12.6]

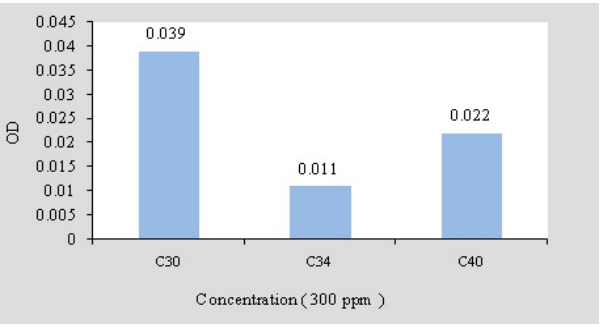


نمودار ۳ : بررسی متابولیسم تتراکوزان با روش GC



نمودار ۴ : مقایسه منحنی رشد و منحنی تجزیه زیستی GC

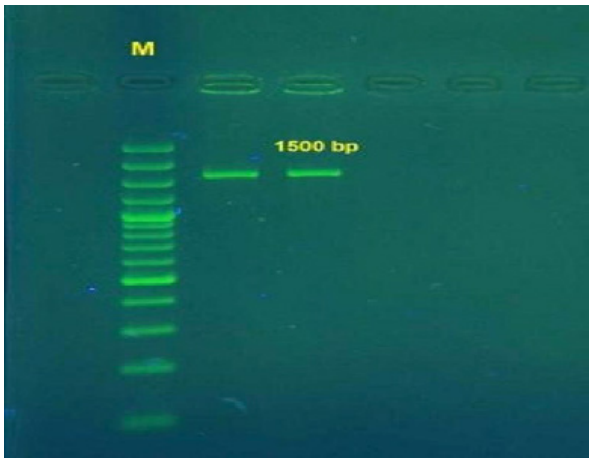
رشد جدایه در محیط های کشت حاوی ppm۳۰۰ از سایر آلکانهای بلند زنجیره ۳۰ ، ۳۴ و ۴۰ کربن نیز مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج بدست آمده ، جدایه قادر به رشد بر روی این آلکانها نبود (نمودار ۵).



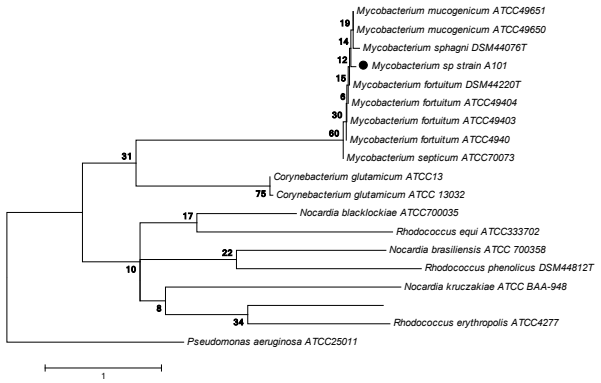
نمودار ۵ : بررسی رشد در حضور سایر آلکانها

در مراحل بعدی میزان تحمل جدایه برتر در غلظت های ۵ تا ۱۵ درصد نمک بررسی گردید و رشد خوبی را در غلظت ۵٪ نشان داد. ولی با افزایش غلظت نمک، رشد باکتری بتدریج کاهش یافت. جدایه در pH ۸ نیز رشد نسبتا" خوبی داشت، ولی در pH های۴ تا ۷ تقریبا" تفاوتی در میزان رشد مشاهده نگردید. تاثیر دماهای مختلف ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس بر رشد جدایه نیز نشان داد که باکتری مورد نظر در این محدوده رشد بسیار خوبی داشت، اما حداکثر فعالیت آن مربوط به دمای ۳۵ درجه سلسیوس بود و با افزایش دما میزان رشد جدایه مورد نظر نیز کاهش یافت. میزان رشد جدایه در حضور گلوکز نیز نشان دهنده تاثیرگلوکز بر افزایش رشد بود .

شناسایی باکتری: الکتروفورز محصول PCR پس از استخراج DNA جدایه مورد نظر (شکل۱) ، تعیین توالی ژن 16S rRNA آن و آنالیز همولوژی این ژن با استفاده از نرم افزار آنلاین Blastn ، بیشترین همولوژی توالی مذکور را با مایکوباکتریوم فورتوئیتوم نشان داد. میزان این همپوشانی و همولوژی ۹۸٪ بود. جهت آنالیز فیلوژنی سویه جداسازی شده، از توالی ژن 16S rRNAو روش نزدیکترین همسایه با کمک نرم افزار MEGA4 استفاده شد و مشخص شد که باکتری مورد نظر عضوی از جنس مایکوباکتریوم است (شکل ۲) .



شکل ۱ : واکنش PCR در جدایه مورد بررسی



شکل۲ : درخت فیلوژنتیکی خویشاوندی مایکوباکتریوم سویه A101 با برخی از گونه های جنس مایکوباکتریوم و برخی دیگر از جنس های گروه اسنیتوباکتر ، اعداد روی شاخه ها ارزش بوت استراپ می باشند و بوت استراپ بیش از ۵۰ ٪ در هر گره نشان داده شده است .

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.12.6]

با توجه به شناسایی اولیه سویه با کمک نرم افزار آنلاین Blastn، توالی ژن 16S rRNA تعدادی از گونه های شاخص جنس مایکوباکتریوم و برخی دیگر از جنس های گروه اکتینوباکتریا و همچنین سودوموناس آئروژینوزا به عنوان گونه ای که قرابت کمتری با این گروه دارد، از بانک ژنی استخراج گردید و با روش نزدیکترین همسایه، درخت فیلوژنتیکی مربوطه رسم گردید. همانگونه که در شکل ۲ نیز نشان داده شده است، مایکوباکتریوم سویه A101 (نامی که برای جدایه برتر انتخاب شد) به همراه گونه های جنس مایکوباکتریوم در یک شاخه مجزا قرار گرفتند (بوت استراپ ۶۰٪) که نشان دهنده خویشاوندی نزدیک این سویه با گونه های جنس مایکوباکتریوم است. قرار گرفتن سودوموناس آئروژینوزا در شاخه مجزا (بوت استراپ زیر ۵۰٪) و جدا از گونه های اکتینوباکتریا، نشان دهنده صحت درخت فیلوژنی رسم شده است .

بحث

با نمونه گیری از خاکهای آلوده به مواد نفتی در پالایشگاه نفت تهران و استفاده از تکنیکهای غنی سازی و خالص سازی ، در نهایت از بین ۶ جدایه جداسازی شده ، تنها جدایه برتر قادر به تجزیه موثر تتراکوزان به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود. همانطور که Ananyina و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند ، در این تحقیق نیز بسیاری از سویه های جداسازی شده با غنی سازی بر روی تتراکوزان، قادر به استفاده موثر از تتراکوزان به عنوان تنها منبع کربن نبودند (۲) . جدایه مورد نظر در محدوده pH ۴ تا ۹ و در محدوده دمایی ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس رشد خوبی داشت. اما بهینه رشد آن در pH۸ و دمای ۳۵ درجه سلسیوس بود . همچنین رشد خوبی را در غلظت ۵٪ نمک نشان داد. در بیشتر مقالات مربوطه ، تجزیه آلکان در pH کمابیش خنثی گزارش شده است . Schaver در مقاله اش اشاره می کند که مقادیر اکسیداسیون هیدروکربنها در محدوده pH ۵ تا ۸ نوسان دارد (۵) . همچنین نتایج یافت شده توسط دستغیب و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که، باکتری آلکانی وراکس دیزللی سویه Qtet در pH های بالا بسیار ناپایدار بود و دامنه محدودی از تحمل pH بین ۶ و ۸ با اپتیمم رشد در pH خنثی را داشت(۷). درجه حرارت نیز از جمله فاکتورهای مهم در تجزیه آلاینده های نفتی است. بیشتر مقالات مربوط به تجزیه هیدروکربن ها ، مبتنی بر آزمایشات انجام شده در درجه حرارت های ۲۰ و۳۰ درجه سانتی گراد می باشند(۵). سورکی و ابراهیمی پور دو سویه مایکوباکتریوم تولید کننده بیوسورفاکتانت را از رسوبات خلیج فارس جدا نمودند که دمای بهینه برای هر دو سویه ۳۵ درجه سانتی گراد بود (۱) . همچنین درجه حرارت بهینه و ماکزیمم جهت رشد باکتری آلکانی وراکس دیزللی سویه Qtet، طبق تحقیقات انجام شده توسط دستغیب و همکاران در سال ۲۰۱۲، به ترتیب ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی گراد تشخیص داده شد (۷) . با توجه به اینکه آلکانها در آب نامحلولند و حلالیت آنها با افزایش وزن مولکولی کاهش می یابد ، این مسئله مانع جذب آنها بوسیله میکروارگانیسمها می شود (۱۳) . در مورد آلکانهای خطی نامحلول در آب ، طبیعت هیدروفوبیک سطح باکتری نقش مهمی را ایفا می کند. آلکانهای با وزن مولکولی پایین ، همیشه به اندازه کافی قابل حل هستند. بنابر این جذب مستقیم آلکان از طریق آب می تواند انتقال کافی سوبسترا را به سلول باکتری امکان پذیر نماید. در مورد آلکانهای خطی متوسط زنجیره و بلند زنجیره ، عموما"دو مکانیسم تماس مستقیم سلول با هیدروکربن یا تماس سلول با هیدروکربنهای امولسیون شده بواسطه بیوسورفاکتانتها، موثر می باشند (۱۵) . همانطور که ذکر شد از قابلیتهای این جدایه نیز، توانایی تجزیه موثر تتراکوزان به عنوان یک آلکان بلند زنجیره بود و با بالا رفتن غلظت، به دلیل افزایش سطح تماس باکتری با تتراکوزان، میزان رشد باکتری نیز افزایش یافت. اما با افزایش بیش از حد غلظت، مجددا" از رشد باکتری مورد نظر کاسته شد . زیرا در غلظت های بالاتر، تتراکوزان روی باکتری اثر سمی داشت . از قابلیت های دیگر این جدایه توانایی تجزیه موثر تتراکوزان به میزان ۸۰ ٪ طی مدت ۲۴ روز پس از تلقیح به محیط بود . با توجه به موارد ذکر شده و مقایسه یافته ها با سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه که به برخی از آنها اشاره شد، نتایج بدست آمده در این تحقیق بسیار منطقی و قابل اتکا می باشد . جدایه مورد بررسی در نهایت با استفاده از روشهای بیوشیمیایی و مولکولی به عنوان جنس مایکوباکتریوم شناسایی گردید ، اما تحقیقات بیشتر در مدل فیزیکی نیازمند تایید توانایی این سویه درکاهش رسوب این ترکیبات در چاههای نفت می باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.12.6]

سپاسگزاری : نویسندگان صمیمانه از همکاری گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و پشتیبانی علمی پژوهشکده صنعت نفت سپاسگزاری نموده و مراتب قدردانی خود را ابراز می دارند .

منابع:

(۱) ابوالحسنی سورکی ع، ابراهیمیپور غ. تجزیه بیولوژیک نفت خام بوسیله دو سویه مایکوباکتریوم جدا شده از خلیج فارس . مجله محیط شناسی . ۱۳۸۸ ؛ سال سی و پنجم ، شماره پنجاه و یک : ۱- ۱۰ .

(2)Ananyina LN, Plotnikova EG, Gavrish EY, Demakov VA, Evtushenko LI . Salinicola socius gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a naphthalene-utilizing microbial association. Microbiologiya , 2007; 76:324–330.
(3)Atlas RM , Bartha N, Microbial Ecology : Fundamental and Applicatipons , 3rd Edition ed. , Amsterdam, Addison Wesley Longman Publishers,1998.
(4) Barry King RB , Long GM , Practical environmental bioremediation , 2nd Ed., USA, Lewis Publishers,1992,9-12.
(5) Berthe CL, Fetzner S.Bacterial Metabolism of n-Alkanes and Ammonia under Oxic-,Suboxic and Anoxic Conditions. Acta Biotechnol, 2002; 299-336 .
(6) Das N, Chandran P . Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants : An Overview . Biotechnology Research International , Article ID 941810, 2010 ; 13 Pages .
(7) Dastgheib SM , Amoozegar MA , Khajeh k , Shavandi M , Ventosa A . Biodegradation of Polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium . Appl Microbiol Biotechnol , 2012; 3: 789-798.
(8) Harayama S , and etal . Petroleum biodegradation in marine environments . J mol Microbiol Biotechnol , 1999 ; 1:63-70.
(9) Malik ZA, Ahmed S. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium . African Journal of Biotechnology , 2012 ; 11: 650-658.
(10) Mirsal Ibrahim A, Soil pollution : origin, monitoring and remediation , 1stEd. , Germany, Springer, 2004, 5-11.
(11) Noruzi j, methods of molecular biology in bacteria, first printing, Tehran, publishing Rafi, 2003, 82-65.
(۱۲) Östberg T, and etal. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. Iternational Biodeterioration and Biodegradation, 2007; 60: 334-341.
(13) Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria : Minireview. Environmental microbiology, 2009; 11(10): 2477-2490.
(14) Vidali M. Bioremediation : An Overview. Pure Appl Chem , 2001; 7: 1163-1172.
(15) Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, Zotchev SB, Throne-Holst M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes: Minireview. Appl Microbiol Biotechnol, 2007;1209-1221 .
(16) Zhang Q, Jun WL, Long XC. Streptomyces yunnanensis sp.nov., a mesophile from soils in Yunnan China. Int J Sys Evol Microbiology, 2003; 53: 217-221.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.12.6]