جداسازی و تشخیص مولکولی یک گونه باکتری تجزیه کننده نرمال هگزادکان از کمپوست و بررسی کارایی آن در حذف هگزادکان

نویسندگان:محمدرضا سمائی[۱] سید باقر مرتضوی[۲] بی‌تا بخشی[۳] احمد جنیدی جعفری[۴]

۱. استادیار گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۲.نویسنده مسئول: دانشیارگروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای دانشگاه تربیت مدرس

تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۸۴۵ Email: mortazav@modares.ac.ir

۳. دانشیار گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۴. دانشیارگروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی ایران

طلوع بهداشت

فصلنامهٔ علمی پژوهشی دانشکده بهداشت یزد

سال دوازدهم

شماره: چهارم

زمستان ۱۳۹۲

شماره مسلسل: ۴۱

تاریخ وصول: ۹۱/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۰

چکیده

مقدمه:یکی از متداول‌ترین آلاینده‌های محیط زیست، هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد. هم‌اکنون یکی از مهم‌ترین و گسترده‌ترین چالش‌های زیست‌محیطی ایران، آلودگی خاک و آبهای زیرزمینی به گازوییل نشت یافته از جایگاه‌های پخش فرآورده‌های نفتی است.هدف از این مقاله جداسازی و شناسایی مولکولی یک باکتری تجزیه‌کننده هگزادکان از کمپوست بوده است.

روش بررسی: در این پژوهش تجربی –آزمایشگاهی نرمال هگزادکان ($C_{16}H_{34}$) به عنوان آلاینده‌ی مدل هیدروکربن‌های گازوییل انتخاب گردید. سپس یک باکتری جدید تجزیه‌کننده‌ی نرمال هگزادکان از کمپوست جداسازی و خالص‌سازی شد. سپس با انجام PCR با روش 16SrDNA باکتری مورد نظر شناسایی شد و توانایی باکتری جهت حذف هگزادکان از محیط معدنی مورد بررسی قرار گرفت.در پایان پاسخ باکتری به غلظت‌های مختلف شوری (۰، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد) بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس مورفولوژی، آزمایش‌های بیوشیمیایی و انجام PCR با روش 16SrDNA این باکتری به نام سراتیا مارسسنس شناسایی شد. پس از ۳۳ روز در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس، ۶۳/۵ درصد از هگزادکان توسط باکتری مورد مصرف قرار گرفت و میزان هگزادکان از ۹۰ میلی‌گرم به ۳۲/۸۴ گرم رسید. همچنین نتایج نشان داد که باکتری مورد نظر در برابر شوری مقاومت بالایی دارد و می‌تواند در غلظت ۵ درصد نمک نیز رشد کند.

نتیجه‌گیری:این پژوهش نشان می‌دهد که در شرایط آب و هوایی گرم و خاک نسبتا شور ایران می‌توان از باکتری سراتیا مارسسنس جهت حذف ترکیبات نفتی به‌ویژه گازوییل استفاده کرد. به دلیل رشد این باکتری در شوری بالا، نتیجه گرفته شد که این باکتری مقاوم به شوری یا هالوتولرانت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، گازوییل، هگزادکان، سراتیا مارسسنس، PCR، 16SrDNA

مقدمه

همیشه دفع پسماندها، چه در هنگام اکتشاف، ذخیره، فرآوری و انتقال و چه در موقع استفاده، یکی از چالش‌های مهم صنعت نفت بوده است(۱). از آنجا که فراورده‌های نفتی به عنوان منبع مواد خام و تامین انرژی در صنایع مختلف مصرف می‌شود، ریزش‌های نفتی نگرانی عمده‌ای در محیط‌های دریایی و ساحلی ایجاد کرده‌اند(۲). همچنین آلودگی آب و خاک به آلاینده‌های هیدروکربنی به یکی از عمده‌ترین مشکلات زیست‌محیطی تبدیل شده است (۳). گاهی غلظت این آلاینده‌ها در خاک کم است، اما مشاهده شده که غلظت هیدروکربن‌های کل در برخی خاک‌ها به ۴۵۰ گرم بر کیلوگرم خاک هم می‌رسد (۵،۴) که ۴۵ تا ۷۰ درصد آن را هیدروکربن‌های آلیفاتیک (آلکان‌ها، آلکن‌ها و آلکین‌ها) تشکیل می‌دهد (۴).

هیدروکربن‌هاترکیباتی متشکل ازاتم‌های کربن وهیدروژنمی‌باشند. تعداد اتـم‌های کربن وجوددر یک هـیدروکربن، مشخص کننده ی خواص فیزیکی آن است (۶). گازوییل مخلوطی پیچیده از آلکان‌ها و ترکیبات آروماتیک می‌باشد(۷). در بین آلکان‌ها، ان-آلکان‌های با زنجیره‌ی متوسط در زمره‌ی مهمترین آلاینده‌های خاک قرار می‌گیرند (۴،۸،۹). در این دسته، نرمال هگزادکان ($C_{16}H_{34}$) توسط بسیاری از پژوهشگران به عنوان آلاینده‌ی مدل به جای گازوییل به کار رفته است(۱۲،۱۱، ۴،۱۰). دلیل این پژوهشگران برای انتخاب هگزادکان به عنوان آلاینده‌ی مدل مواردی همچون حلالیت پایین آن در آب و همچنین به خاطر تجزیه‌پذیری سریع آن توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها بوده است (۴).

روش‌های فیزیکی، حرارتی، شیمیایی و بیولوژیکی مختلفی برای حذف این ترکیبات از آب و خاک پیشنهاد شده است. از میان تمام این روش‌ها فرایندهای بیولوژیکی مورد توجه خاص قرار گرفته است، چون این فرایندها دوستدار محیط زیست بوده و هزینه‌ی کمتری دارند. همچنین تجزیه‌ی زیستی یک فرایند طبیعی است و از این‌رو عموما از آن به عنوان یک فرایند قابل قبول تصفیه‌ی زائدات برای مواد آلوده مثل خاک یاد می‌شود. باقیمانده‌ی تصفیه با این روش معمولا فراورده‌های بی‌ضرر است و شامل آب، دی‌اکسید کربن و توده‌ی زیستی سلولی می‌شود. فناوری‌های زیست‌پالایی در واقع سرعت طبیعی تجزیه‌ی زیستی را تشدید می‌کنند. راندمان زیست‌پالایی بستگی به میکروارگانیسم های بومی تجزیه کننده‌ی هیدروکربن‌های نفتی یا عوامل تقویت زیستی دارد (۱۳). امروزه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شناسایی شده‌اند که می‌توانند ترکیبات نفتی را تجزیه کنند (۱۴). در برخی از پژوهش‌ها از باکتری‌های جداسازی شده (۳) و در برخی دیگر از کنسرسیوم میکروبی جهت حذف ترکیبات نفتی استفاده شده است (۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۳).

حسن‌شاهیان و همکاران ۲۵ گونه‌ی باکتریایی تجزیه‌کننده‌ی نفت خام را از محل‌های آلوده به نفت در خلیج فارس و دریای خزر جداسازی کردند (۲۰). ژوزف و همکاران(۱) در هندوستان به جداسازی تقویت‌شده‌ی میکروب‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت از لجن یک پالایشگاه نفت پرداختند. در این مطالعه دو سویه‌ی باسیلوس از خاک آلوده به نفت خام جداسازی شد. دشتی و همکاران (۲۱) به جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی هگزادکان از

خاک پرداختند. غالب‌ترین باکتری‌ها در تمام نمونه‌ها به گونه‌هایی از میکروکوکوس و سودوموناس تعلق داشته است. در مطالعه‌ی دیگری که هووا و همکاران (۲۲) انجام دادند با استفاده از روش 16SrRNA باکتری تجزیه کننده‌ی نرمال هگزادکان را از خاک جدا کردند. این گونه انتروباکتر کلاسه‌آ بوده است. برخی از محققین از روش 16SrDNA جهت شناسایی گونه‌های باکتریایی استفاده کرده‌اند (۲۳،۲۴،۲۵،۲۶).

هدف اصلی این مطالعه جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی گازوییل از کمپوست بوده است. از آنجا که گازوییل از طیف وسیعی از ترکیبات تشکیل شده و بسته به شرایط تولید و پالایشگاه سازنده‌ی آن دارای ترکیبات مختلفی است و همچنین به دلایل ذکر شده در قسمت قبل، در این پژوهش هگزادکان به عنوان جایگزین و مدل گازوییل انتخاب شد.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی آزمایشگاهی انجام شد.کمپوست رسیده از کارخانه‌ی کمپوست اصفهان تهیه شد. کمپوست از طیف بسیار وسیعی از میکروارگانیسم‌ها تشکیل شده است. در آخرین مرحله از تولید کود کمپوست نیز، قارچ‌ها و کپک‌ها آنتی‌بیوتیک‌هایی ترشح می‌کنند که باکتری‌ها را از بین می‌برد. در این شرایط باکتری‌هایی که مقاومت بالایی نسبت به این مواد دارند زنده می‌مانند. این باکتری‌های مقاوم قادر خواهند بود طیف وسیعی از آلاینده‌های مقاوم و سمی را تجزیه کنند. به همین دلیل در این پژوهش جهت جداسازی باکتری‌های مناسب تجزیه کننده‌ی گازوییل از کمپوست رسیده استفاده شد.

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان خریداری شده است. محیط کشت معدنی مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۲). pH محیط کشت معدنی روی ۷ تنظیم شد. جهت تهیه‌ی محیط معدنی جامد ۱۵ گرم بر لیتر آگار به محیط کشت مایع اضافه شد. پس از اتوکلاو کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و سفت شدن محیط کشت داخل پلیت‌ها، مقدار ۲۰ میکرولیتر هگزادکان روی محیط کشت ریخته شد و با پیپت پاستور به طور کامل پخش شد.

جدول۱. مواد مورد استفاده برای تهیه‌ی محیط کشت معدنی

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم بر لیتر)
NH_4Cl	۴
KH_2PO_4	۲/۵
$NaCl$	۰/۵
$MgSO_4$	۰/۳
$FeCl_3.6H_2O$	۰/۳
$CaCl_2$	۰/۰۱
$MnCl_2.4H_2O$	۰/۰۱

برای جداسازی، در یک لوله‌ی آزمایش ۱ گرم کمپوست به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی حاوی ۰/۵میلی‌لیتر هگزادکان اضافه شد. سپس مخلوط به دست آمده طی چند مرحله به شدت، با دستگاه شیکر، تکان داده شد و در پایان ۲ دقیقه اجازه داده شد تا عمل ته‌نشینی انجام شود. پس از آن با کمک لوپ استریل، از سوسپانسیون بالایی جهت کشت خطی روی محیط کشت معدنی آغشته به هگزادکان استفاده شد. چند پلیت به همین روش تهیه شد و به مدت یک هفته در دمای ۳۲ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. سپس از تک‌کلونی‌های رشد یافته جهت کشت روی پلیت‌های

جدید استفاده شد. این عمل به مدت ۲ ماه انجام شد تا از خالص‌سازی اطمینان حاصل شود.

شناسایی با استفاده از روش 16SrDNA انجام شد. برای این منظور از پرایمرهای عمومی زیر، که توسط سایر پژوهشگران برای اهداف مشابه به کار رفته، استفاده شد (۲۷،۲۸،۲۹،۳۰).

16F27
AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
16R1488
CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC

حجم و غلظت نهایی مواد مورد استفاده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در جدول ۲ آمده است.برنامه‌ی PCRمورد استفاده برای تکثیرDNA در جدول ۳ نشان داده شده است. پس از انجام PCR، DNA تکثیر یافته باکتری روی ژل آگاروز قرار داده شد. پس از گرفتن باند مناسب، نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت مربوطه فرستاده شد. سپس با استفاده از نرم افزار BLAST نزدیک‌ترین سکانس‌های مشابه به گونه‌ی باکتری مشخص گردید و جنس و گونه‌ی باکتری شناسایی شد.

همچنین میزان توانایی باکتری سراتیا مارسسنس در حذف هگزادکان مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۲۸ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی و ۱ میلی‌لیتر ریزمغذی (۲/۵٪) در یک ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. آنگاه۱۱۶/۹ میکرولیتر از آن برداشته شد. سپس درب ارلن با پنبه و فویل پوشانده و اتوکلاو شد. سپس۱۱۶/۹ میکرولیتر (۹۰ میلی‌گرم) هگزادکان (غلظت نهایی ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به آن اضافه شد. آنگاه ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت براث، که به مدت ۲۴ ساعت باکتری در آن کشت داده شده بود، با چگالی نوری ۱ (در ۶۰۰ نانومتر) به آن اضافه شد. نمونه‌های شاهد حاوی باکتری نبوده و ۱ درصد سدیم آزاید به آن اضافه شد.

تمام نمونه‌ها به صورت دوتایی انجام شد و نتایج به صورت میانگین گزارش شد. نمونه‌ها به مدت ۳۳ روز در شیکرانکوباتور (دمای ۳۰ درجه و ۱۲۰ دور بر دقیقه) قرار داده شد. مقدار هگزادکان موجود در روزهای ۲۲ و ۳۳ مورد سنجش قرار گرفت و درصد حذف هگزادکان توسط باکتری سراتیا مارسسنس تعیین شد.

جهت سنجش میزان هگزادکان از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-FID) استفاده شد. دماهای دتکتور و انژکتور به ترتیب روی ۲۷۰ و ۲۵۰ درجه‌ی سلسیوس تنظیم گردید. دمای ستون به مدت ۱ دقیقه روی ۱۲۵ درجه نگه داشته شد، سپس به میزان ۱۵ درجه بر دقیقه افزایش داده شد تا به ۱۸۰ درجه‌ی سلسیوس برسد. میزان توقف دما در ۱۸۰ درجه نیز ۳ دقیقه تنظیم شد.

جهت بررسی تحمل شوری، رشد باکتری در غلظت‌های ۰، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از محیط کشت نوترینت براث استفاده شد. سپس یک کلونی از باکتری را در آن کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه قرار داده شد. چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر پس از این مدت اندازه‌گیری شد و به عنوان معیاری از رشد باکتری درنظر گرفته شد. تمام آزمایش‌ها به صورت دوتایی انجام شد و در نهایت از آنها میانگین گرفته شد.

جدول ۲: حجم و غلظت نهایی مواد تشکیل دهنده واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

ترکیب واکنش	حجم (میکرولیتر)	غلظت
10XPCRbuffer	۲/۵	X10
$MgCl_2$	۰/۶	mM50
dNTPs	۰/۳	mM25
PrimerForward	۰/۲۵	۰pM100
PrimerReverse	۰/۲۵	pM100
D.W.	۱۸	–
TemplateDNA	۰/۲	–
TaqDNApolymerase	۱	U/ µl5
حجم نهایی	۲۵	

جدول ۳: برنامه مورد استفاده برای تکثیر

برنامه	نوع عملیات	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل برنامه
۱	PrimaryDenaturation	۹۵	۲دقیقه	**۱**
۲	Denaturation	۹۴	۳۰ثانیه	**۳۰**
۳	Annealing	۵۸	۳۰ثانیه	**۳۰**
۴	Extention	۷۲	۱	–
۵	FinalExtention	۷۲	۷ دقیقه	**۱**

یافته‌ها

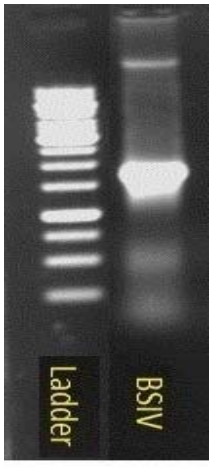
پس از انجام PCR و الکتروفورز قطعه‌ی تکثیر یافته، باند ۱۵۰۱ جفت بازی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مورد تایید قرار گرفت. توالی ژنی مربوط به باکتری جداسازی شده وارد نرم‌افزار Chromas شد. سپس پاسخ پرایمرهای فوروارد و ریورس بررسی شد و در نهایت توالی ژنی کامل گونه به صورت دو رشته‌ی DNA بازسازی شد (شکل ۱). پس از بلاست این گونه در پایگاه اینترنتی pubmed، و مقایسه با گونه‌های ثبت شده در این پایگاه، گونه‌ی مورد نظر با نام سراتیا مارسسنس شناسایی شد. در شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR باکتری سراتیا مارسسنس رول ژل آگاروز ۱/۵ درصد نشان داده شده است.

در نمودار ۱ میزان حذف هگزادکان توسط باکتری سراتیا مارسسنس طی مدت ۳۳ روز نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که میزان هگزادکان پس از ۲۲ روز از ۹۰ میلی‌گرم به ۶۳/۸۵ میلی‌گرم و پس از ۳۳ روز به ۳۲/۸۴ میلی‌گرم رسیده است. به عبارت دیگر ۲۹/۰۵ و ۶۳/۵۱ درصد هگزادکان به ترتیب طی ۲۲ و ۳۳ روز توسط باکتری سراتیا مارسسنس مصرف شده است.

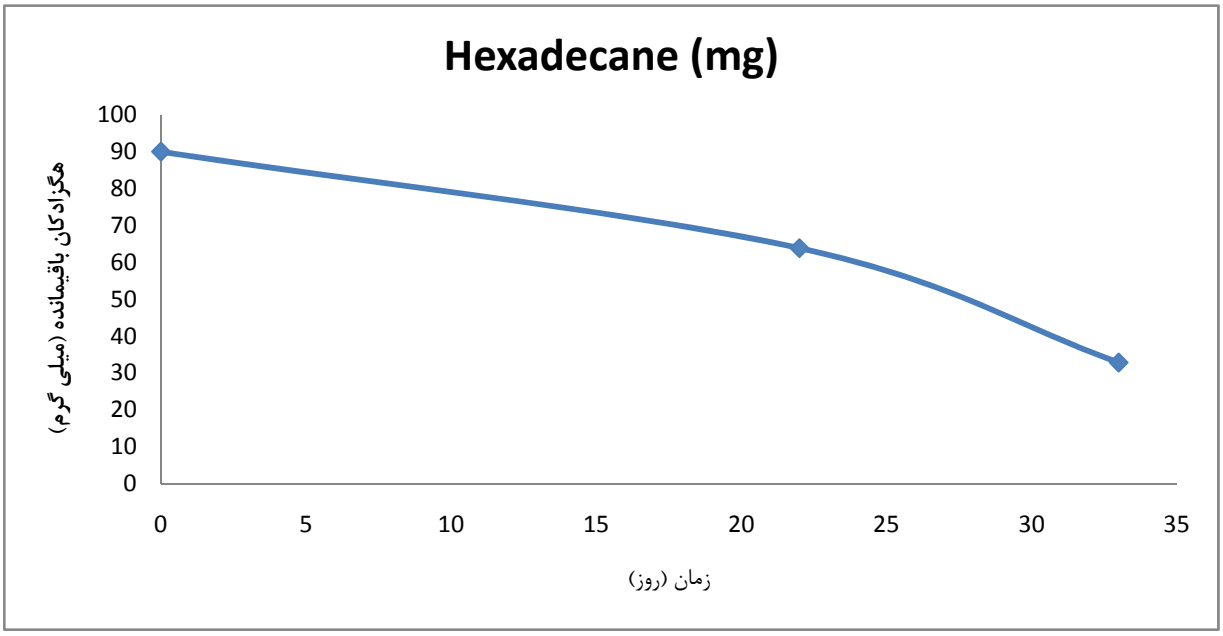
در نمودار ۲ رشد باکتری سراتیا مارسسنس در غلظتهای مختلف نمک نشان داده شده است. رشد باکتری در غلظت‌های ۰، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد نمک کلرید سدیم بررسی شد. رشد باکتری پس از ۲۴ ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و با محاسبه‌ی چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک، رشد باکتری کند می‌شود و چگالی نوری از ۱/۶ در غلظت نمک صفر درصد، به ۰/۳۵۴ در غلظت نمک ۵ درصد می‌رسد. در غلظت‌های بالاتر (۷/۵ و ۱۰) باکتری قادر به رشد نبود.

AGGGGGTAACTCCGGAACCGGTCCTTATCCCTGCAACGTCCCAAGCAAAAGGGGGGACCTTCGG
GCCTCCTCCATCAGAATGCCCAGTGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGAC
GATCCCTACTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGATCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGGTG
AAGAAGGTCCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGTGAGGAGGAAGGTCAGTAAGCTTAATACCGTT
CATCAATTGACGTTACTAGCAGATGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTCAAGTCAG
ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACTGGCAAGCTAGAGTCTGGTAGAG
GGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGAAGGAACACCGGTGGCGAAG
GCGACCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGTGTGGCTTCCGG
AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA
GCCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCT
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
TCCTTAGTTGCCAGCGCCTCGGCCGGGCACTCAAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGAT
ACAAAGAGAAGCCACCTCGCGAGGGCGAGCGGACCTCATAAACTAGGTCGTAGTCCGGATCGCA
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGTCACGGTGAAT
ACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCCCCAGGGGAGGGGGTGGCCCAGGAGGTA
GGTAGCTTACCCTCTACAGGGAGAGCGCTACCCACTATGATCAGCTGTTC

شکل ۱. توالی ژنی باکتری جداسازی شده



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR نمونه‌ی باکتری رول ژل آگاروز ۱/۵ درصد



نمودار ۱: میزان حذف هگزادکان توسط باکتری سراتیا مارسسنس

نمودار ۲: رشد باکتری سراتیا مارسسنس در غلظتهای مختلف نمک

بحث و نتیجه‌گیری

به دلیل نفت‌خیز بودن ایران، هیدروکربن‌های نفتی یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های خاک محسوب می‌شوند. این آلاینده‌ها دارای حلالیت نسبتا کمی بوده و دسترسی باکتری‌ها به آنها کم است. در این مطالعه یک باکتری مقاوم در برابر شوری که می‌تواند به راحتی در محیط معدنی غنی شده با هگزادکان به عنوان تنها منبع کربن رشد کند، از محیط کمپوست جداسازی شد. این باکتری پس از خالص‌سازی با روش 16SrDNAبا نام سراتیا مارسسنس شناسایی شد. سپس میزان حذف هگزادکان توسط این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. پس از ۳۳ روز در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس، ۶۳/۵ درصد از هگزادکان توسط باکتری مورد مصرف قرار گرفت و میزان هگزادکان از ۹۰ میلی‌گرم به ۳۲/۸۴ گرم رسید. پژوهشگران دیگر به میزان حذف ۳۷ و ۸۶/۴ درصد توسط آسپرژیلوس نیجر (۹)و سودوموناس اس‌پی‌پی(۳۱).دست یافته‌اند. بنابراین میزان حذف هگزادکان توسط گونه جداسازی شده از کمپوست خوب بوده است.

گزارش‌های زیادی در مورد جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها از خاک آلوده، رسوبات، لجن و آب ارائه شده است، اما تاکنون گزارشی در مورد جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هگزادکان از محیط کمپوست منتشر نشده است.

در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۴، اسپچ و همکاران (۳۴) انجام داده‌اند گونه‌های مختلف اسینتوباکتر تجزیه کننده‌ی هگزادکان را از یک رودخانه‌ی شهری به شدت آلوده جداسازی کردند. آنها ۳۳ گونه‌ی تجزیه‌کننده را از این رودخانه جداسازی کردند و در نهایت یکی از گونه‌های اسینتوباکتر را انتخاب کرده و تاثیر پارامترهای مختلف مانند تاثیر pH، دما، میزان مایع تلقیح و غلظت هگزادکان را بر آن بررسی کردند. در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس ، pH برابر ۷ و غلظت اولیه‌ی ۰/۵ درصد، ۸۲ درصد از هگزادکان طی ۵۰ ساعت و ۱۰ درصد باقیمانده طی ۱۲۴ ساعت تجزیه شد.

در پژوهش حاضر یک باکتری قادر به تجزیه هگزادکان از کمپوست جداسازی شده و گونه شناسایی شده است. این گونه قابلیت بالاتری نسبت به سایر باکتری‌های شناسایی شده قبلی در حذف هگزادکان از خود نشان داده است. مطابق اطلاعات ما تاکنون گزارشی در مورد جداسازی باکتری سراتیا که قادر به تجزیه هگزادکان باشد منتشر نشده است. این پژوهش نشان می‌دهد که در شرایط آب و هوایی گرم و خشک ایران می‌توان از باکتری سراتیا مارسسنس جهت حذف ترکیبات نفتی به‌ویژه گازوییل استفاده کرد.

نمک می‌تواند تجزیه‌ی زیستی آلاینده‌ها توسط باکتری‌ها را تحت تاثیر قرار داده(۳۲) و با تخریب ساختار سلولی، موجب نابودی آنزیم‌های سلولی گردد (۳۳). بسیاری از خاک‌های ایران شور یا نیمه‌شور می‌باشند. بنابراین یکی از اهداف این پژوهش بررسی تاثیر نمک بر باکتری بود. برای این منظور باکتری به مدت ۲۴ ساعت در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم رشد داده شد و میزان رشد آن بررسی شد. نتایج نشان داد سراتیا مارسسنس می‌تواند در غلظت نمک ۵ درصد نیز رشد کند. بنابراین این باکتری مقاوم به شوری یا

هالوتولرانت می‌باشد. این پژوهش نشان می‌دهد که در شرایط آب و هوایی ایران می‌توان از باکتری سراتیا مارسسنس جهت حذف ترکیبات نفتی به‌ویژه گازوییل استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل حمایت مالی از پروژه‌ی حاضر که در قالب پایان‌نامه دکتری انجام شده است تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1-Joseph PJ, Joseph A. Microbial enhanced separation of oil from a petroleum refinery sludge. Journal of Hazardous Materials 2009;161(1):522-5.

2-Yang L, Lai CT, Shieh WK. Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. Water Research 2000;34(13):3303-14.

3-Partovinia A, Naeimpoor F, Hejazi P. Carbon content reduction in a model reluctant clayey soil: Slurry phase n-hexadecane bioremediation. Journal of Hazardous Materials 2010;181(1-3):133-9.

4-Volke-Sepulveda TL, Gutierrez-Rojas M, Favela-Torres E. Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillusniger*. Bioresource Technology 2003;87(1):81-6.

5-Gallegos Martinez M, Gomez Santos A, Gonzalez Cruz L, et al. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. Water Science and Technology 2000;42(5-6):377-84.

6-BakhshiNejad B. Isoaltion, characterization and molecular identification of the bacteria inhabiting the petroleum-contaminated soil TarbiatModares University, Faculty of Basic Sciences; 2008: 85.[Persian]

7-Gallego JLR, Loredo J, Llamas JF, et al. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. Biodegradation 2001;12(5):325-35.

8-Stroud JL, Paton GI, Semple KT. Linking chemical extraction to microbial degradation of 14C-hexadecane in soil. Environmental Pollution 2008;156(2):474-81.

9-Setti L, Lanzarini G, Pifferi PG, et al. Further research into the aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a Pseudomonas sp. Chemosphere 1993;26(6):1151-7.

10-Bouchez-Naitali M, Rakatozafy H, Marchal R, et al. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. Journal of Applied Microbiology 1999;86:421-8.

11-Noordman WH, Wachter JHJ, de BoerGJ, et al. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by Pseudomonas aeruginosa varies with substrate availability. Journal of Biotechnology 2002;94(2):195-212.

12-Wu J, Ju LK. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by Pseudomonas aeruginosa. Journal of Biotechnology 1998;59(3):193-202.

13-Vidali M. Bioremediation,an overview. Pure and Applied Chemistry 2001;73(7):1163-72.

14-DVasconcellos SP, Crespim E, da Cruz GF, et al. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. Organic Geochemistry 2009;40(5):574-88.

15-Alisi C, Musella R, Tasso F, et al. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. Science of The Total Environment 2009;407(8):3024-32.

16-Binazadeh M, Karimi IA, Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with Rhodococcus sp. Moj-3449. Enzyme and Microbial Technology 2009;45(3):195-202.

17-Margesin R, Schinner F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. Appl Environ Microbiol 2001;67(7):3127-33.

18-Mukherji S, Jagadevan S, Mohapatra G, et al. Biodegradation ofdiesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field. Bioresource Technology 2004;95(3):281-6.

19-Namkoong W, Hwang EY, Park JS, Choi JY. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. Environmental Pollution 2002;119(1):23-31.

20-Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin 2012;64(1):7-12.[Persian]

21-Dashti N, Al-Awadhi H, Khanafer M, et al. Potential of hexadecane-utilizing soil-microorganisms for growth on hexadecanol, hexadecanal and hexadecanoic acid as sole sources of carbon and energy. Chemosphere 2008;70(3):475-9.[Persian]

22-Hua X, Wu Z, Zhang H, et al. Degradation of hexadecane by Enterobacter cloacae strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. Chemosphere 2010;80(8):951-6.

23-Rhee SK, Lee GM, Yoon JH, et al. Anaerobic and aerobic degradation of pyridine by a newly isolated denitrifying bacterium. Appl Environ Microbiol 1997;63(7):2578-85.

24-Wang S, Zhang C, Yan Y. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol by a newly isolated Agrobacterium sp. strain Yw12 .Biodegradation 2012;23(1):107-16.

25-Karamalidis AK, Evangelou AC, Karabika E, et al. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added Pseudomonas aeruginosa strain Spet. Bioresource Technology 2010;101(16):6545-52.

26-Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.Microbiol Rev 1995;59(1):143-69.

27-Samaei MR, Mortazavi SB, Bakhshi B, JonidiJafari A. Isolation, genetic identification, and degradation characteristics of n-Hexadecane degrading bacteria from tropical areas in Iran. Fresenius environmental bulletin. 2013;22(4):

28-Molina M, Gonzalez N, Bautista L, et al. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. Biodegradation 2009;20(6):789-800.

29-Ahire K, Kapadnis B, Kulkarni G, Shouche Y, Deopurkar R. Biodegradation of tributyl phosphate by novel bacteria isolated from enrichment cultures. Biodegradation 2012;23(1):165-76.

30-Garcia MT, Ventosa A, Mellado E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. FEMS Microbiology Ecology 2005;54(1):97-109.

31-Volke-Sepulveda T, Gutierrez-Rojas M, Favela-Torres E. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by Aspergillusniger in a solid-state system: Kinetic analysis. Bioresource Technology 2006;97(14):1583-91.

32- Ulrich A, Guigard S, Foght J, Semple K, Pooley K, Armstrong J, et al. Effect of salt on aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated groundwater. Biodegradation 2009;20(1):27-38.

33-Pollard S, Hrudey S, Fedorak P. Bioremediation of petroleum-and creosote-contaminated soils: a review of constraints. Waste Management & Research 1994;12:173-94.

34-Espeche M. E, MacCormack W. P, Fraile E. R. Factors affecting growth of an n-hexadecane degrader Acinetobacter species isolated from a highly polluted urban river, International Biodeterioration& Biodegradation1994; 33 (2): 187-96.

Isolation and Molecular Detection of a HexadecaneDegradingBacterium from Compost and Evaluation of its Performance in the Removal of Hexadecane

Samaei MR(Ph.D)[1] Mortazavi SB(Ph.D)[2] Bakhshi B(Ph.D)[3] JonidiJafari A(Ph.D)[4]

1.Assistant professor, Department of Environmental Health Engineering, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2.Corresponding author: Associate professor, Department of Occupational Health Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3.Associate professor, Department of Bacteriology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4.Associate professor, Department of Environmental Health Engineering, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Petroleum hydrocarbons are the most frequent environmental pollutants. Contamination of soil and groundwater by diesel released from underground storage tanks is an important and extensive environmental problem in Iran. The aim of this study was to isolate and molecular identification of n-hexadecane-degrading bacteria from compost.

Methods: Hexadecane, $C_{16}H_{34}$, used as a model contaminant of diesel oil. New n-hexadecane degrading bacteria was isolated from compost by using enrichments on n-hexadecane. Then isolated bacterium was identified by PCR with 16S rDNA method. Then n-hexadecane degradation was tested by isolated bacteria. Finally response of strain to different salinity concentrations (0, 1, 2.5 and 5) was determined.

Results: Based on morphology, biochemical tests, 16S rDNA sequence analysis and phylogenetic characteristics, the isolated bacteria were identified as Serratia marcescens. After 33 days, n-Hexadecane concentration decreased from 90 mg to 32.84 mg (63.51%) by isolated bacteria. In addition, the results showed that isolated bacteria can grow on 5% salinity.

Conclusion: The results of this study show that Serratia marcescens can be used in remediation of petroleum products especially diesel oil in tropical area and semisalinity of soils in Iran. Our findings indicate that Serratia marcescens *is* a halotolerant microorganism.

Keywords: Isolation, Diesel oil, Hexadecane, Serratia marcescens, PCR, 16S rDNA