



## جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده تولوئن از مناطق آلوده به نفت رودخانه قره سو در کرمانشاه

نرگس شمسی<sup>۱</sup>، رؤیا مروج<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، <sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج.

### چکیده

**سابقه و هدف:** اصلاح زیستی یکی از روش های پاکسازی آلودگی های نفتی است که به دلیل مزایایی مانند هزینه اندک، کارایی بالا و سازگاری با محیط زیست، در سال های اخیر بسیار مورد توجه بوده است. رودخانه قره سو نیز یکی از مناطقی است که به دلیل مجاورت با پالایشگاه نفت کرمانشاه، در سال های اخیر دچار آلودگی نفتی شده است. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده تولوئن از مناطق آلوده به نفت رودخانه قره سو در کرمانشاه انجام شد.

**مواد و روش ها:** این مطالعه به صورت تجربی بر روی نمونه های آب، خاک و لجن فعال مناطق آلوده انجام شد. دو جدایه تجزیه کننده تولوئن با استفاده از غنی سازی بر روی محیط کشت انتخابی حاوی تولوئن به دست آمدند. این جدایه ها با روش های ریخت شناسی کلنی، رنگ آمیزی گرم، آزمون های بیوشیمیایی و توالی یابی ژن *16S rRNA* شناسایی شدند. همچنین میزان حذف تولوئن توسط جدایه ها با روش کروماتوگرافی گازی ارزیابی گردید.

**یافته ها:** هر دو جدایه متعلق به گونه باکتریایی *سودوموناس پوتیدا* بودند. با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی ثابت شد که جدایه ها توانستند تولوئن موجود در محیط کشت (با غلظت ۰/۵ v/v درصد) را در مدت ۷۲ ساعت به ترتیب به میزان ۸۹٪ و ۸۷٪ تجزیه نمایند. همچنین این جدایه ها قادر بودند شرایط نامساعد دمایی، pH و اسمولاریته را تحمل نمایند. همچنین اثبات گردید که این جدایه ها قادرند در حضور دیگر آلاینده های نفتی (بنزن، اتیل بنزن، زایلن) نیز به طور کارآمد به فعالیت و رشد خود ادامه دهند. **نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که این جدایه ها به دلیل توانایی رشد در غلظت بالای تولوئن و تجزیه طیف وسیعی از آلاینده ها می توانند کارایی بالایی برای حذف آلاینده های نفتی از محیط زیست داشته باشند.

**واژگان کلیدی:** تجزیه زیستی، تولوئن، پساب پالایشگاه نفت، رودخانه قره سو، *سودوموناس پوتیدا*.

پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۵

دریافت مقاله: دی ماه ۹۴

### مقدمه

نفت خام یا فراورده های آن از طریق تانکرها، سکوها، نفتی، پالایشگاه ها، کشتی های نفت کش یا مراحل حفاری باشد که معمولاً نتیجه سوء مدیریت و یا حوادث پیش بینی نشده هستند. آلودگی های نفتی اثرات اقتصادی و زیست محیطی زیان باری دارند و حذف آن ها بسیار دشوار است (۱).

سالیانه در جهان حدود ۵ میلیون تن نفت خام و فراورده های آن به صورت آلودگی نفتی وارد محیط زیست می شود (۲).

یکی از مهمترین انواع آلودگی های تهدید کننده محیط زیست، آلودگی های نفتی هستند. آلودگی نفتی عبارت است از وارد شدن هیدروکربن های نفتی به محیط زیست (به ویژه نواحی دریایی مانند اقیانوس ها و آب های ساحلی) در اثر فعالیت های انسانی. ورود این آلودگی ها می تواند در اثر نشت

(\* آدرس برای مکاتبه: کردستان، سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، گروه زیست شناسی.

جداسازی باکتری هایی که بتوانند به صورت اختصاصی و کارآمد این ترکیبات را هدف قرار دهند می تواند در این زمینه بسیار مفید واقع گردد (۶ و ۷).

از آنجایی که فرآیند پاکسازی زیستی در محیط زیست آزاد انجام می شود و دشوار بودن و حتی غیرممکن بودن کنترل شرایط محیطی، بهتر آن است که از باکتری های مقاومی استفاده شود که بتوانند شرایط نامساعد محیطی مانند دماهای گوناگون و گستره های مختلف pH و اسمولاریته های شدید را تحمل نمایند (۸). میکروارگانیسم های مختلف مسیرهای تجزیه ای متفاوت و اختصاصی را با توجه به شرایط هوازی یا بی هوازی محیط کسب نموده اند و به خوبی با محیط مورد نظر سازگار شده اند. بنابراین، بهتر آن است که برای هر آلودگی نفتی از باکتری های همان محل برای پاکسازی و تجزیه زیستی استفاده شود (۹). تا کنون مطالعات متعددی برای یافتن باکتری های کارآمد جهت پاکسازی آلودگی های نفتی و ترکیبات BTEX از محیط زیست انجام شده است. وانگ (Wang) و شائو (Shao) در سال ۲۰۰۶ توانستند ۴ سویه باکتریایی متعلق به جنس های *آسیتوباکتر* و *سودوموناس* را از لجن فعال پساب مزارع جداسازی نمایند. این جدایه ها قادر به تجزیه بنزن و تولوئن بودند (۱۰). موکرچی (Mukherjee) و همکاران در سال ۲۰۱۰ باکتری *سودوموناس آیروچینوزا* را از خاک یک میدان نفتی واقع در ایالت آسام هندوستان جداسازی نمودند. این باکتری قادر بود انواعی از ترکیبات هیدروکربنی نفت را تحت شرایط محیطی مختلف تجزیه نماید (۱۱). همچنین، الوصیفی (Al-Wasify) و همکاران در سال ۲۰۱۴ ضمن این که نشان دادند طیفی از باکتری های متعلق به جنس های *سودوموناس*، *باسیلوس* و *اسیتوباکتر* قادر به تجزیه کارآمد ترکیبات موجود در نفت خام هستند، اثبات نمودند که استفاد از باکتری های بومی محل آلودگی نفتی برای پاکسازی زیستی می تواند بسیار مفید و پربازده باشد (۹).

از این رو هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده تولوئن از مناطق آلوده به نفت رودخانه قره سو واقع در شهر کرمانشاه بود.

این آلودگی ها آسیب های غیرقابل جبرانی به زیست بوم های طبیعی، سلامت جوامع انسانی و چرخه اقتصاد وارد می کنند.

از این رو، در هنگام وقوع آلودگی نفتی در یک ناحیه باید هرچه سریعتر برای پاکسازی و حذف آلودگی اقدام شود. اصلاح زیستی یکی از روش های پاکسازی آلودگی نفتی است که مزایای متعددی نسبت به سایر روش های پاکسازی دارد. استفاده از اصلاح زیستی نسبتاً ارزان است. به طور مثال، در طول پاکسازی آلودگی آگزون والدز که در سواحل آلاسکا اتفاق افتاد، هزینه اصلاح زیستی ۱۲۰ کیلومتر از ساحل کمتر از هزینه یک روز شستشوی فیزیکی بود (۳). اصلاح زیستی همچنین یک تکنولوژی سازگار با محیط زیست است. زیرا از تجزیه زیستی نفت محصولات بی خطری مانند دی اکسیدکربن، آب و توده زیستی سلولی تولید می شود. در حالی که روش های فیزیکی و شیمیایی آلودگی را از بخشی از محیط به بخش دیگر منتقل می کنند.

از آنجایی که اصلاح زیستی بر مبنای فرایندهای طبیعی است، آسیب کمتری به ناحیه آلوده می رساند و در صورت استفاده صحیح فاقد اثرات جانبی نامطلوب است (۴ و ۵). در سال های اخیر، رودخانه قره سو به دلیل مجاورت با پالایشگاه نفت کرمانشاه دچار آلودگی نفتی شدیدی شده است. به طوری که حیات انسانی، جانوری و محیط زیست را در این منطقه با تهدید جدی مواجه ساخته است و نیازمند یک روش کارآمد برای پاکسازی می باشد. تاکنون باکتری های زیادی با قابلیت تجزیه اجزای نفتی جداسازی شده اند. اما بیشتر آن ها به تنهایی نمی توانند تمام اجزای نفت را تجزیه نمایند. بنابراین جداسازی باکتری هایی که بتوانند به طور اختصاصی و کارآمد تجزیه یکی از آلاینده های نفت را هدف قرار دهند و همچنین بتواند کمک به تجزیه دیگر آلاینده های نفتی نیز نماید، بسیار مطلوب به نظر می رسد. سمی ترین آلاینده های موجود در نفت خام که تهدید کننده جدی برای محیط زیست محسوب می شوند شامل هیدروکربن های آروماتیک به ویژه بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن می باشند. این چهار ترکیب را به اختصار BTEX (حروف ابتدای نام این ترکیبات) می نامند. بنابراین،

## مواد و روش ها

مدت ۵ روز در دمای °C ۳۰ در انکوباتور شیکردار (rpm ۱۲۰) انکوبه گردید (۱۲). سپس ۲ میلی لیتر از محتوای هر ارلن برداشته شده و به ارلن های حاوی محیط کشت تازه انتخابی منتقل گردید. این مرحله دو بار تکرار گردید تا جمعیت باکتری های تجزیه کننده تولوئن به مقدار کافی افزایش یابد. در این مطالعه از کشت هایی حاوی نمونه هایی که در °C ۱۲۱ اتوکلاو شده بودند، محیط کشت هایی بدون افزودن نمونه و کشت های فاقد تولوئن خام به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

د) خالص سازی کلنی ها: ابتدا فرم جامد همان محیط غنی سازی با استفاده از آگار (۱۰ گرم در حجم نهایی یک لیتر) تهیه گردید. پیش از جامد شدن محیط کشت، در شرایط استریل در داخل پلیت ها آلیکوت شد. سپس از هر یک از کشت های غنی شده، با استفاده از سرم فیزیولوژیک رقت های  $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$  و  $10^{-4}$  تهیه گردید. از هر کدام از رقت ها ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به روش کشت چمنی بر روی پلیت های جداگانه کشت داده شدند. پلیت ها هر روز صبح و عصر به منظور بررسی رشد یا عدم رشد کلنی ها بازدید شدند. به طور معمول پس از ۳ روز تک کلنی ها برداشته و جداگانه در پلیت های جدید به صورت خطی (چهار قسمتی) کشت داده شدند. این مرحله سه بار تکرار گردید تا اطمینان از خالص سازی کلنی ها حاصل شود (۱۳).

به منظور حفظ سویه های خالص سازی شده به منظور تکرار آزمون ها و مطالعات تکمیلی در آینده، ذخایری از جدایه های تجزیه کننده تولوئن تهیه شد. برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته (محیط کشت نوترینت براث فاقد تولوئن) به ویال های انجمادی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول ۶۰ درصد اضافه گردید. پس از چند ثانیه ورتکس شدن آرام (به منظور پخش شدن سلول ها) نمونه ها برای استفاده های بعدی در دمای °C ۸۰- نگهداری شدند (۱۴). دلیل استفاده از محیط کشت نوترینت براث به جای محیط کشت انتخابی در مرحله تهیه ذخایر انجمادی این است که فرایند انجماد به خودی خود برای سلول ها بسیار تنش زا بوده و از این رو باید

الف) جمع آوری نمونه ها: در آذرماه سال ۱۳۹۳ نمونه برداری از خاک، آب و لجن فعال در محل ورود پساب پالایشگاه نفت کرمانشاه به رودخانه قره سو با استفاده از ظروف جمع آوری استریل صورت گرفت. بر روی ظرف هر یک از نمونه ها تاریخ نمونه برداری، محل و منبع نمونه ثبت گردید. سپس نمونه ها به منظور انجام آزمایش های بعدی به آزمایشگاه منتقل و در دمای °C ۴ نگهداری شدند (۱۲).

ب) آماده سازی محیط کشت انتخابی: ترکیبات محیط کشت انتخابی برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن در جدول ۱ آورده شده است. اسیدیته محیط کشت قبل از انجام اتوکلاو بر روی ۷ تنظیم شد. کلیه مواد محصول شرکت سیگمای آمریکا بودند. همانگونه که ملاحظه می شود، تنها منبع کربن در محیط کشت تولوئن بود (۱۲). در این مطالعه اجزاء تشکیل دهنده عناصر کمیاب شامل ۲۰ میلی گرم کلرید مس II، ۱۰۰ میلی گرم کلرید نیکل، ۲۰۰ میلی گرم کلرید کبالت، ۲۶ میلی گرم سلنیت سدیم، ۵۰ میلی گرم مولیبدات سدیم، ۳۰ میلی گرم ولفرامات سدیم، ۱۰ میلی گرم وانادات سدیم و ۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲۵٪ در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر بود.

ج) غنی سازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن در محیط کشت انتخابی: مقدار ۲ گرم از هر یک از نمونه های خاک و لجن و ۲ میلی لیتر از هر یک از نمونه های آب در لوله های آرمایش جداگانه در حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت استریل در ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی لیتری اضافه شد و به جدول ۱: ترکیبات محیط کشت انتخابی برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن (در ۱۰۰ میلی لیتر).

مواد	مقدار
کلرید آمونیوم	۲۹/۴ میلی گرم
دی سدیم مونوهیدروژن فسفات	۳/۶ میلی گرم
سولفات آهن	۰/۱ میلی گرم
سولفات منیزیم	۲ میلی گرم
کلرید پتاسیم	۰/۵ میلی گرم
عصاره مخمر	۵۰۰ میلی گرم
تولوئن	۰/۵ میلی لیتر
عناصر میکرو	۱ میلی لیتر

با دیگر توالی های مشابه موجود در GenBank مقایسه شد و درخت فیلوژنتیکی جدایه های باکتریایی با استفاده از نرم افزار Mega 6 رسم گردید.

(ز) بررسی میزان تجزیه تولوئن با روش کروماتوگرافی گازی: میزان حذف تولوئن توسط جدایه ها با روش کروماتوگرافی گازی ارزیابی شد. برای این منظور از دستگاه Avondale Agilent Technologies 6890N (محصول شرکت آمریکا) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله ای (flame ionization detection=FID) و تزریق کننده و ستون HP1 استفاده شد. گاز حامل مورد استفاده گاز هلیوم با فشار ۳۴ پوند بر اینچ مربع (psi) در مدخل تزریق بود. دمای آشکارساز بر روی ۲۴۰ °C حفظ شد. درجه حرارت ستون از ۶۰ تا ۱۳۰ °C تنظیم شد، به طوری که به ازای هر دقیقه ۷ °C دما افزایش می یافت (۱۶). مشخصات ستون ۱۰۰٪: HP1 از جنس دی متیل پلی سیلوکسان، با طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر بود.

(ح) ارزیابی میزان مقاومت و شرایط بهینه رشد باکتری: اثر اسیدیته بر میزان رشد جدایه ها، با استفاده از محیط های کشت انتخابی با استفاده از دامنه های pH، ۵ تا ۱۱ اندازه گیری شد. دمای بهینه رشد نیز با کشت باکتری ها در محیط کشت انتخابی در دامنه دمایی ۴ °C تا ۵۰ °C تعیین شد. اثر غلظت نمک بر روی رشد نیز در دامنه شوری بین ۱٪ تا ۲۰٪ سنجش شد. برای اندازه گیری میزان رشد باکتری ها از روش کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید (۱۶).

(ط) تجزیه سایر ترکیبات نفت خام: برای بررسی توان تجزیه ای جدایه ها در مواجهه با دیگر آلاینده های نفتی، ۱۰۰ میکرولیتر، سوسپانسیون باکتریایی دارای غلظت ۰/۵ مک فارلند به ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت انتخابی افزوده شد. به طوری که در هر آزمایش به جای تولوئن از یک آلاینده نفتی دیگر استفاده شد. این آلاینده ها شامل: نفت خام، گازوئیل، بنزن، اتیل بنزن، زایلن بودند. به منظور اندازه گیری میزان رشد باکتری ها از روش کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید (۱۶).

از یک محیط غنی و دارای منابع کربن مغذی استفاده شود. (ه) شناسایی جدایه های تجزیه کننده تولوئن: جدایه ها به وسیله روش های مشاهده مورفولوژی کلنی ها، رنگ آمیزی گرم، آزمون های بیوشیمیایی (کاتالاز، احیای نیترات، شرایط بی هوازی، آزمون اکسیداز-فرمتاز، SIM، MR-VP، TSI، سیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین و اوره آز) مطابق با استانداردهای شناسایی میکروبی ارزیابی شدند (۱۵). کتاب سیستماتیک باکتری شناسی برگی به عنوان مرجع شناسایی جدایه ها مورد استفاده قرار گرفت.

(و) آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی *16S rDNA*: در ابتدا استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation (محصول شرکت Roche، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. سپس به منظور تکثیر قطعه *16S rDNA* در نمونه ها از کیت Taq PCR Master Mix Kit (شرکت کیاژن، هلند) استفاده شد. از دو پرایمر عمومی با توالی های 16S F27: 5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3' و R1492: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3' واکنش PCR استفاده شد (۱۲). واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه و اسرشت در ادامه ۳۵ چرخه شامل و اسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و محصولات به صورت باندهایی در زیر نور ماورای بنفش دستگاه ژل داک (بیوراد، آمریکا) مرئی شدند. در ادامه محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت سیناژن ارسال شدند. در نهایت، پس از ویرایش توالی های نوکلئوتیدی به وسیله نرم افزارهای BioEdit و SeqMan، این توالی ها به کمک نرم افزار Blast در پایگاه داده NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. میزان همولوژی این توالی ها

میله ای شکل و گرم منفی می باشند. نتایج آزمون های بیوشیمیایی برای ۲ جدایه تجزیه کننده تولوئن در جدول ۲ آمده است. دو جدایه به دست آمده در این مطالعه، در تمامی آزمون های بیوشیمیایی کاملاً بر هم منطبق بودند. (د) نتیجه استخراج DNA و تکثیر قطعه *16S rDNA*: کیفیت DNA استخراج شده و نیز محصول PCR (قطعه *16S rDNA*) با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و سپس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند. همانگونه که ملاحظه می شود، گسترش (اسمیر) DNA واضح و پررنگ نشان دهنده کیفیت بالای استخراج است (شکل ۲-الف). همچنین باندهای پر رنگ با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز (طول مورد انتظار) نشان دهنده کمیت و کیفیت بالای مرحله PCR می باشد (شکل ۲-ب).

ه) آنالیز فیلوژنتیکی *16S rDNA*: درخت فیلوژنتیکی جدایه ها با توجه به نتایج به دست آمده از بلاست توالی های *16S rDNA* مورد نظر در پایگاه داده NCBI، با استفاده از نرم افزار MEGA6 رسم شد (شکل ۳). درصدهایی که در محل گره ها مشاهده می شود نشان دهنده احتمال صحت درخت فیلوژنتیکی است. بر این اساس، به احتمال بسیار بالا جدایه های ۱ و ۲ سویه های باکتری سودوموناس پوتیدا (*Pseudomonas putida*) می باشند. (و) میزان تجزیه تولوئن با روش کروماتوگرافی گازی: با توجه به کروماتوگرام زیر، جدایه های ۱ و ۲ قادر به کاهش معنی دار میزان تولوئن در محیط کشت بودند. این مساله توان بالای این

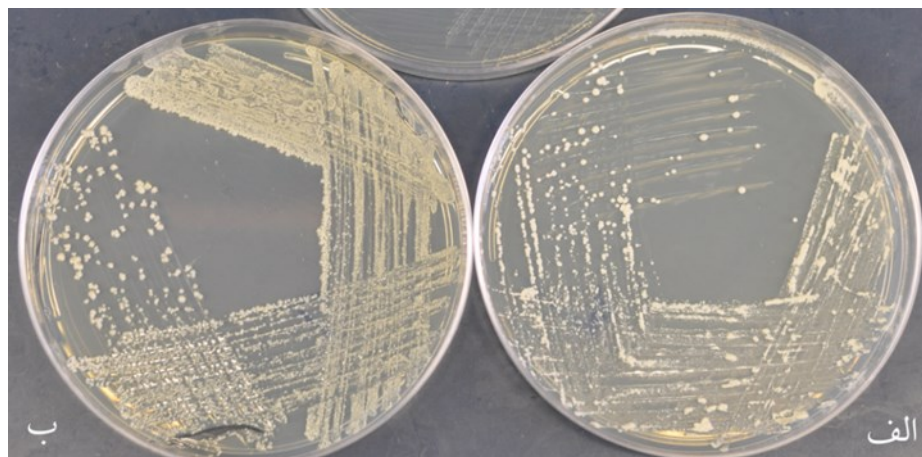
ی) آنالیز آماری داده ها: تمامی آزمون ها با سه بار تکرار انجام شد. به منظور مقایسه میانگین مقادیر به دست آمده از داده های حاصل، از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey's Test در نسخه بیست و یکم نرم افزار SPSS استفاده گردید. مقدار  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شدند.

### یافته ها

الف) جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن: به طور کلی با روش غنی سازی در محیط حاوی تولوئن (به عنوان تنها منبع کربن) ۲ جدایه از نمونه های گرفته شده از محل ورود پساب پالایشگاه به رودخانه قره سو به دست آمد. هر دو نمونه از نمونه های لجن فعال به دست آمدند و از نمونه های آب و خاک هیچ باکتری تجزیه کننده تولوئن به دست نیامد.

ب) مورفولوژی جدایه های تجزیه کننده: دو جدایه تجزیه کننده تولوئن به مدت ۴۸ ساعت بر روی محیط نوترینت آگار (فاقد تولوئن) کشت داده شدند. کلنی هایی گرد، گرم رنگ و با حاشیه صاف حاصل شدند که در مجموع نشان دهنده هوای بودن این باکتری ها بود (شکل ۱).

ج) نتایج رنگ آمیزی گرم و آزمون های بیوشیمیایی: نتایج رنگ آمیزی گرم نشان داد که هر ۲ جدایه باکتری هایی



شکل ۱: کشت جدایه های تجزیه کننده تولوئن بر روی محیط نوترینت آگار. الف) جدایه ۱ ب) جدایه ۲.

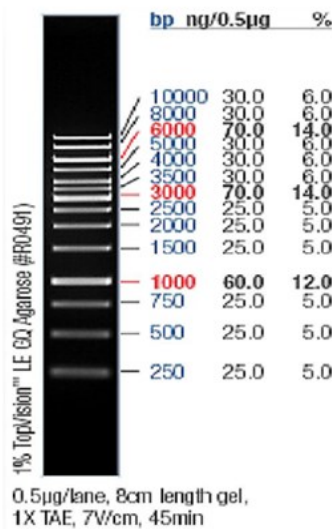
جدایه‌ها در تجزیه تولوئن را نشان می‌دهد (شکل ۴). مقادیر کمی شده از پیک‌های تولوئن در نمودار ۱ نشان داده شده است. در این نمودار مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد برای سه تکرار ارائه شده اند.  $p < 0/05$  به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.  $p^{***} < 0/001$  نشان دهنده

اختلاف معنی دار جدایه‌های ۱ و ۲ با کنترل ۱ هستند. اختلاف معنی داری بین کنترل ۱ و ۲ از لحاظ سطح تولوئن وجود نداشت.

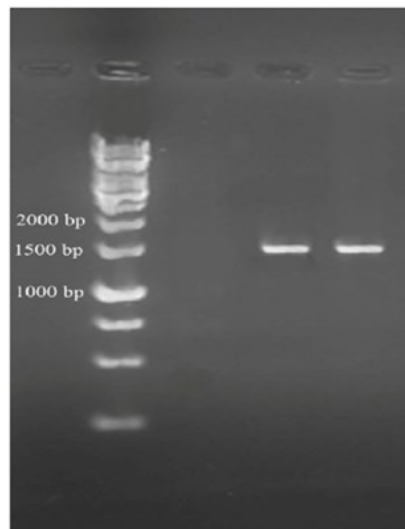
ز) تعیین میزان مقاومت و شرایط بهینه رشد باکتری: نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک طعام بر روی جدایه ۱ نشان داد که بهترین غلظت نمک برای رشد غلظت ۱٪ بود. هر چند، این جدایه قادر بود در غلظت ۱۵٪ نیز تا حدودی به رشد خود ادامه دهد (شکل ۵). شایان یادآوری است که در این آزمون و تمامی آزمون‌های بعدی به دلیل کارایی نسبتاً بالاتر و نیز نتایج بسیار مشابه، تنها به ارائه نتایج جدایه ۱ بسنده شد. همچنین نتایج بررسی اثر دامنه‌های مختلف pH محیط کشت بر روی رشد جدایه ۱ نشان داد که میزان pH بهینه برای رشد و فعالیت آن pH خنثی (۷) است. به علاوه، این جدایه قادر بود در دو سوی دامنه pH ۵ تا ۱۱ فعالیت و رشد خود را (هر چند به میزان محدودتر نسبت به pH بهینه) حفظ نماید. هرچند، نتایج حاکی از آن بود که جدایه مورد نظر نسبت به دامنه‌های pH اسیدی بسیار حساس است. به طوری که با تغییر pH از ۷ به ۵، رشد و فعالیت باکتری دچار افت بسیار شدیدی شد (شکل ۶). نتایج بررسی اثر دماهای مختلف کشت بر روی رشد

جدول ۲: آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های تجزیه‌کننده تولوئن.

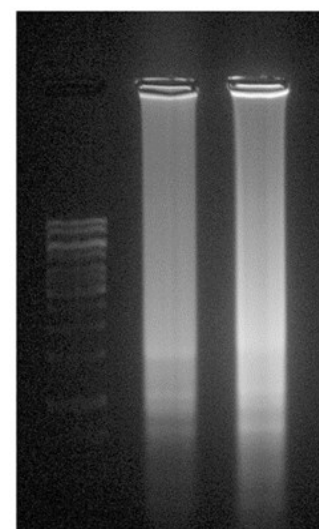
آزمون‌های بیوشیمیایی	جدایه ۱	جدایه ۲
کاتالاز	+	+
احیای نیتрат	-	-
رشد در شرایط بی‌هوازی	-	-
اکسیداز-فرمتاز	اکسیداتیو	اکسیداتیو
SIM	-	-
سولفید	-	-
اندول	-	-
حرکت	+	+
MR	-	-
VP	-	-
TSI	-	-
گلوکز	+	+
ساکارز	-	-
لاکتوز	-	-
سیترات	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+
هیدرولیز ژلاتین	-	-
اوره آز	-	-



ج

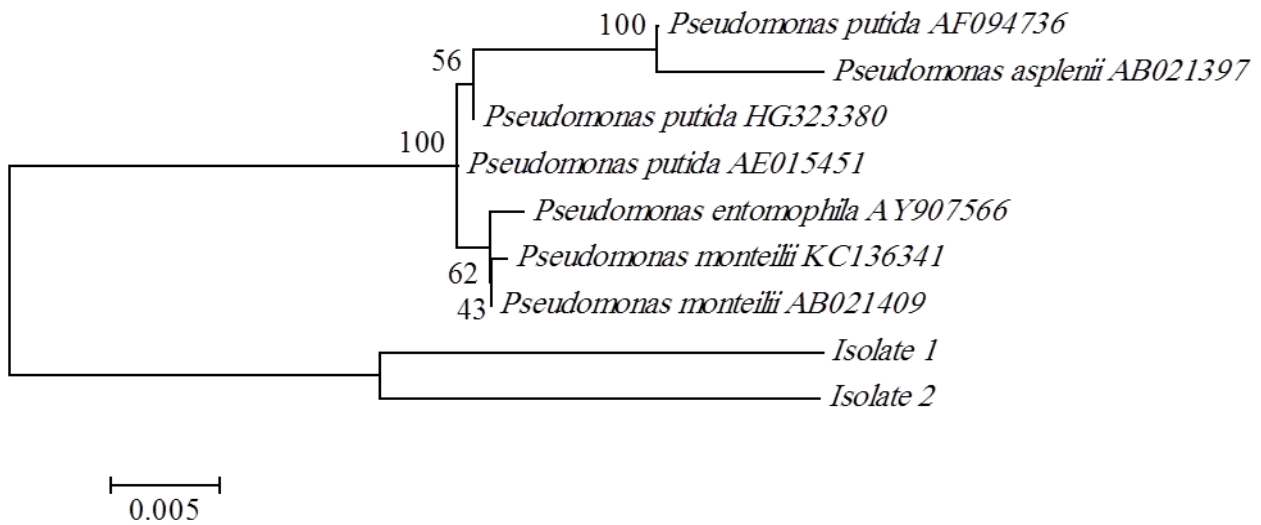


ب

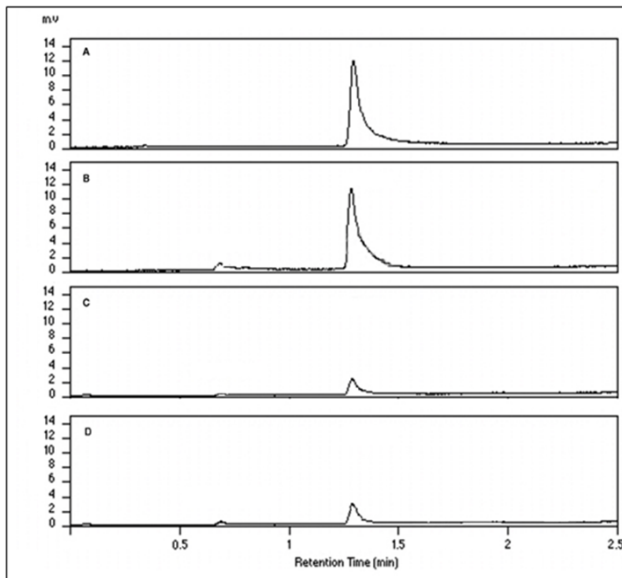


الف

شکل ۲: نتایج الکتروفورس بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. الف) اسمیر DNA‌های استخراج شده از جدایه‌ها، ب) محصولات PCR جدایه‌ها، ج) مشخصات مارکر وزن مولکولی مورد استفاده شده در ژل محصولات PCR.



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی جدایه‌ها بر اساس نتایج بلاست توالی 16S rDNA با توالی‌های مشابه موجود در سایت NCBI با استفاده از نرم‌افزار Mega 6.



الف

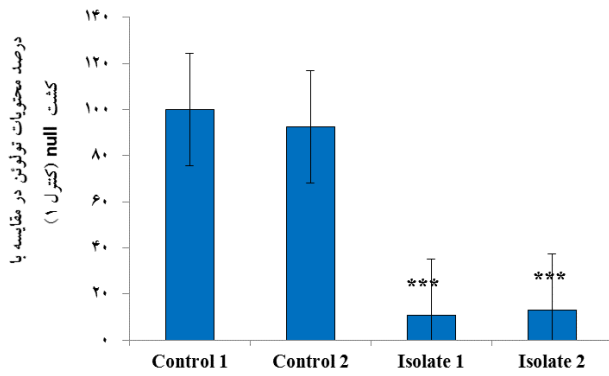
شکل ۴: نتایج روش کروماتوگرافی. پیک‌های A تا D حاصل از تولوئن در ثانیه ۸۰ که به ترتیب نشان‌دهنده سطح تولوئن کنترل ۱ (محیط کشت مایع انتخابی عاری از باکتری)، کنترل ۲ (کشت مایع انتخابی حاوی باکتری *E. coli*)، کشت مایع حاوی جدایه ۱ و کشت مایع انتخابی جدایه ۲ پس از ۷۲ ساعت هستند.

سمی، روشی کارآمد، کم‌هزینه و مؤثر در نظر گرفته می‌شود (۴ و ۵). از این رو، هدف ما در پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی بود که علاوه بر تجزیه کارآمد تولوئن، بتوانند شرایط سختی همچون دماهای بالا، دامنه نسبتاً وسیع pH و غلظت‌های یونی بالا را تحمل نمایند.

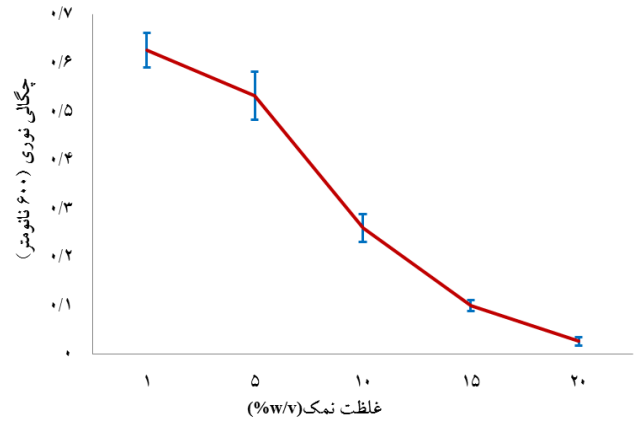
جدایه ۱ نیز نشان داد که دمای بهینه رشد برای آن ۲۸ °C است. همچنین، جدایه ۱ قادر بود در دو سوی دامنه دمایی ۴ تا ۵۰ °C فعالیت و رشد خود را به میزان محدودتری در مقایسه با دمای بهینه حفظ نماید (شکل ۷).  
ح) ارزیابی تجزیه سایر ترکیبات نفت خام توسط جدایه ۱: نتایج نشان داد که جدایه ۱ قادر به استفاده از آلاینده‌های نفتی مختلف (نفت خام، گازوئیل، بنزن، اتیل بنزن، زایلن) به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده و تجزیه قابل توجه آن‌ها می‌باشد (شکل‌های ۸ و ۹).

### بحث

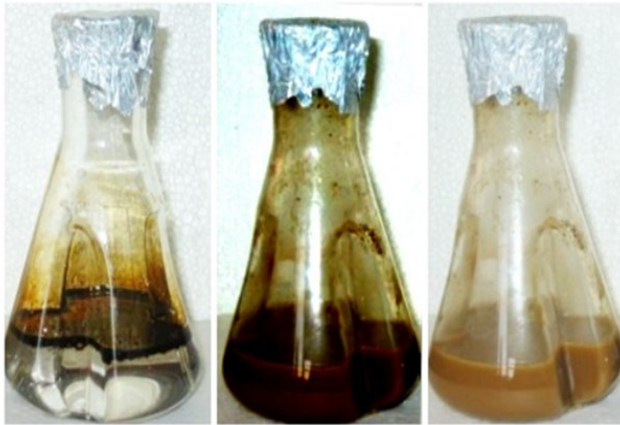
هیدروکربن‌های نفتی (به ویژه هیدروکربن‌های آروماتیک نفت) از رایج‌ترین آلاینده‌های زیست محیطی هستند که طی فعالیت‌های مختلفی مانند اکتشاف، حمل و نقل، ذخیره‌سازی و فرآوری نفت خام، وارد محیط زیست شده و تهدید بزرگ برای اکوسیستم‌های آبی و خشکی به وجود می‌آورند (۱۷ و ۱۸). بدین ترتیب رها شدن نفت به مقدار زیاد به محیط‌های آبی و تخریب محیط زیست، نیاز روزافزون به فناوری‌های پاکسازی سازگار با محیط زیست را برای رفع آلاینده‌های هیدروکربنی برجسته تر می‌سازد. در مقایسه با سایر فناوری‌ها، استفاده از میکروارگانیسم‌ها در تجزیه ترکیبات



نمودار ۱: مقادیر کمی شده از پیک‌های تولوئن.

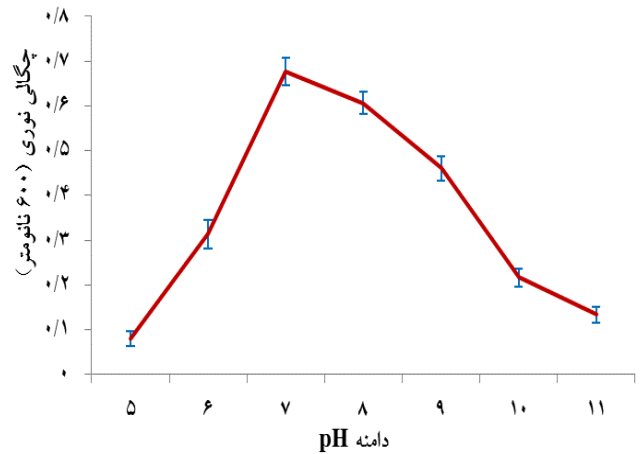


شکل ۵: اثر غلظت نمک محیط کشت بر روی رشد جدایه ۱.

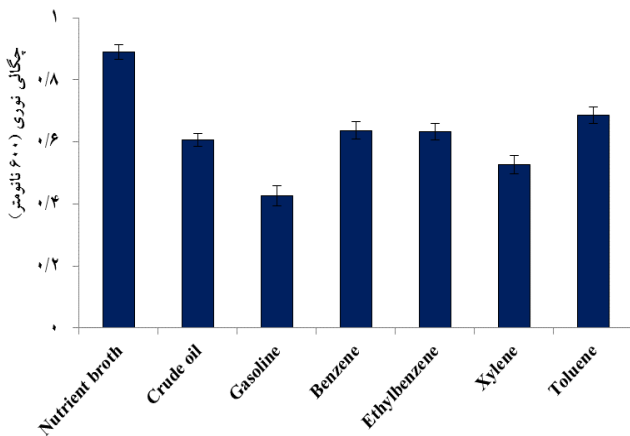


روز صفر      روز ۲      روز ۴

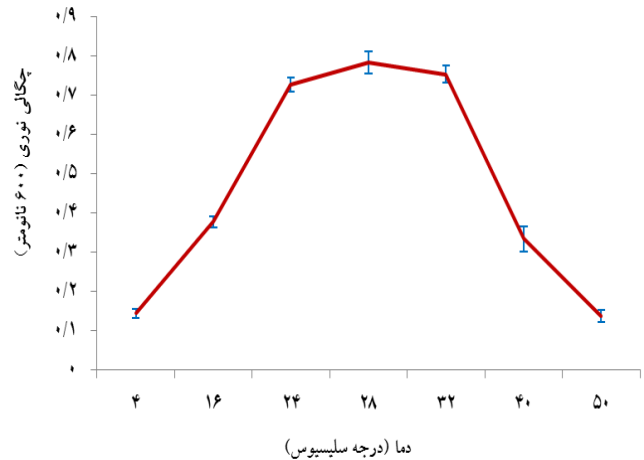
شکل ۸: مصرف نفت خام توسط جدایه ۱ پس از چهار روز.



شکل ۶: میزان رشد جدایه ۱ در دامنه‌های pH، ۵ تا ۱۱ بر اساس کدورتسنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر.



شکل ۹: میزان رشد جدایه ۱ بر روی آلاینده‌های نفتی. محیط کشت نوترینت برات و تولوئن به منظور مقایسه در دو سوی نمودار قرار داده شده است.



شکل ۷: میزان رشد جدایه ۱ در دامنه دمایی ۴ °C تا ۵۰ °C بر اساس کدورتسنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر.



کارایی جدایه‌ها در تجزیه تولوئن، میزان مقاومت آن‌ها در شرایط نامساعد دما، pH و اسمولاریته ارزیابی شد. در تمام این بررسی‌ها به دلیل کارایی نسبتاً بالاتر و نیز نتایج بسیار مشابه، تنها به ارائه نتایج جدایه ۱ بسنده شد.

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک طعام نشان داد که جدایه ۱ قادر است تا غلظت ۲۰٪ نمک را در محیط کشت تحمل نماید. نتایج بررسی اثر دماهای مختلف کشت بر روی رشد جدایه ۱ نیز نشان داد این جدایه قادر است دامنه دمایی ۴°C تا ۵۰°C را تحمل نماید. در همین زمینه همالتا (Hemalatha) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که گونه‌های سودوموناس قادرند در دمای ۴۰°C تا ۴۵°C فعالیت مطلوبی داشته باشد (۲۴). این یافته با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در نهایت، نتایج بررسی اثر pH‌های مختلف محیط کشت بر روی رشد جدایه ۱ نشان داد که این جدایه می‌تواند دامنه pH معادل ۵ تا ۱۱ تحمل نماید. هرچند میزان حساسیت این جدایه به pH اسیدی بیشتر بود. این یافته با نتایج مطالعات پیشین همخوانی داشت. این امر می‌تواند به دلیل حساسیت ذاتی این باکتری به تغییر pH درون سلولی باشد. به طوری که بیان ژن‌های آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۵).

اما می‌توان گفت در مجموع جدایه ۱ توان قابل قبولی در مواجهه با شرایط نامساعد محیطی دارد که آن را برای استفاده در پاکسازی زیستی مناسب می‌کند. میزان کارایی این باکتری برای تجزیه دیگر آلاینده‌های نفتی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، جدایه ۱ به جای تولوئن، بر روی محیط‌های کشت انتخابی واجد سایر آلاینده نفتی رشد داده شد. این آلاینده‌ها عبارت بودند از: نفت خام، گازوئیل، بنزن، اتیل بنزن، زایلن. همچنین، جدایه ۱ بر روی محیط کشت نوترینت براث و محیط کشت انتخابی حاوی تولوئن رشد داده شد و به عنوان کنترل و جهت مقایسه قرار داده شد. برای اندازه‌گیری میزان رشد باکتری‌ها از روش کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید.

مشاهده شد که جدایه ۱ به طور کارآمدی قادر به رشد بر روی تمام آلاینده‌های یاد شده بود و در مقایسه با محیط‌ها کشت

میکروارگانیزم‌های مختلف مسیرهای تجزیه‌ای متفاوت و مختص به خود را با توجه به شرایط هوایی یا بی‌هوازی محیط کسب نموده‌اند و به خوبی با محیط مورد نظر سازگار شده‌اند. بنابراین، بهتر است که برای هر آلودگی نفتی از باکتری‌های همان محل برای پاکسازی و تجزیه زیستی استفاده شود (۹).

در پژوهش حاضر جهت پاکسازی آلودگی نفتی رودخانه قره سو، از همان محل باکتری‌های تجزیه‌کننده تولوئن جداسازی گردید. با استفاده از روش غنی‌سازی بر روی محیط کشت انتخابی حاوی تولوئن، دو جدایه باکتریایی تجزیه‌کننده تولوئن به دست آمد. شناسایی جدایه‌های یاد شده با روش‌های مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم، آزمون‌های بیوشیمیایی و در نهایت آنالیز *16S rDNA* صورت گرفت. در مجموع نتایج نشان دادند که جدایه‌های ۱ و ۲ با قطعیت مربوط به گونه باکتریایی سودوموناس پوتیدا بودند.

هرچند، با توجه به میزان هومولوژی ۱۰۰٪ توالی *16S rDNA* این جدایه‌ها با توالی مشابه در دیگر سویه‌های سودوموناس پوتیدا موجود در سایت NCBI، احتمال جدید بودن سویه‌ها بعید به نظر می‌رسد. شایان یادآوری است که نتایج آنالیز *16S rDNA* کاملاً با نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی گرم سازگار و همسو بود. شایان ذکر است که در همین زمینه، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که باکتری سودوموناس پوتیدا یکی از کارآمدترین باکتری‌ها در تجزیه تولوئن هستند (۱۹) و (۲۰). نتایج کروماتوگرافی گازی پیک‌های مربوط به تولوئن را در ثانیه ۸۰ نشان داد و حاکی از آن بود که جدایه‌های ۱ و ۲ قادر هستند به ترتیب در حدود ۸۹٪ و ۸۷٪ از تولوئن موجود در محیط کشت را مدت ۷۲ ساعت تجزیه نمایند. این نتایج، علاوه بر همخوانی با مطالعات مشابه پیشین (۲۱)، حاکی از کارایی بالای گونه سودوموناس پوتیدا در تجزیه تولوئن در مقایسه با دیگر گونه‌های باکتریایی بودند (۲۲).

این برتری را می‌توان به وجود ژن‌های اپرون *tod*، پلاسمید Tol و نیز کارایی بالای ژن‌های کاتالاز و اکسیداز آن نسبت داد. هرچند، این امر نیاز به بررسی‌های بیشتر و اثبات از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک دارد (۱۹، ۲۱ و ۲۳). پس از اثبات

می‌تواند به شناخت بهتر مزایا و معایب جدایه‌های ۱ و ۲ کمک نماید. در این صورت، افزایش میزان کارایی و نیز مقاومت جدایه‌های ۱ و ۲ توسط روش‌های مهندسی ژنتیک نیز می‌تواند راهکار مؤثری به منظور تقویت نقاط قوت و برطرف نمودن نقاط ضعف این دو سویه باشد. همچنین شناسایی دقیق مسیرهای آنزیمی و ژن‌های دخیل در متابولیسم ترکیبات نفتی جدایه‌های ۱ و ۲ نیز می‌تواند در این زمینه می‌تواند راهگشا باشد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان از این مطالعه چنین نتیجه گرفت که جدایه‌های ۱ و ۲ با توجه به توانایی رشد در غلظت بالای تولوئن و تجزیه طیف وسیعی از آلاینده‌های نفتی گزینه‌های مناسبی برای پاکسازی آلودگی‌های نفتی محیط زیست هستند. به ویژه اینکه جدایه‌های ۱ و ۲ علاوه بر کارایی بالا در تجزیه آلاینده‌های نفتی، دارای توان سازگاری نسبتاً بالایی با شرایط مختلف اسمزی، دمایی و اسیدیته نیز می‌باشند. این امر آن‌ها را به گزینه‌های مطلوبی برای استفاده در شرایط اقلیمی و محیط‌های گوناگون تبدیل می‌نماید.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی کمال امتنان را دارند.

کنترل افت قابل توجهی نشان نداد. بنابراین، جدایه ۱ قادر است در حضور دیگر آلاینده‌ها نیز عملکرد و فعالیت خود را حفظ نماید و حساسیت خاصی نسبت به این آلاینده‌ها ندارد. این بخش از مطالعه حاضر نیز با پژوهش‌های پیشین که به بررسی توان باکتری *Sudomonas putida* در تجزیه ترکیبات نفتی پرداخته بودند همسو بود.

به عنوان نمونه، یو (You) و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سویه YNS1 باکتری *Sudomonas putida* که از خاک آلوده به نفت جداسازی شده بود، قادر است تجزیه زیستی ترکیبات BTEX را به نحو کارآمدی انجام دهد (۲۶). کمترین میزان رشد در حضور آلاینده‌های نفتی مورد آزمایش مربوط به گازوئیل بود. هرچند، که گازوئیل حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات آروماتیک است و این امر در ابتدا کمی عجیب به نظر می‌رسد؛ اما احتمالاً این امر ناشی از وجود مقادیر بالای سرب در گازوئیل مورد استفاده بوده است. هرچند، این امر نیازمند بررسی‌های بیشتر است که در مطالعه حاضر امکان بررسی آن وجود نداشت. در ادامه، پیشنهادهایی برای انجام مطالعات آینده در این زمینه ارائه می‌گردد که می‌توانند مفید واقع شوند. در اولین گام، بررسی میزان حذف دیگر آلاینده‌های نفتی توسط جدایه‌های ۱ و ۲ ضروری به نظر می‌رسد. همچنین، بررسی کارایی جدایه‌های ۱ و ۲ در میدان عمل (آلودگی نفتی رودخانه قره سو و دیگر آلودگی‌های نفتی) باید آزموده شود. به علاوه، مقایسه جدایه‌های ۱ و ۲ با دیگر باکتری‌های تجزیه‌کننده تولوئن به صورت دقیق‌تر و تحت شرایط یکسان

## References

1. Atlas RM. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bull.* 1995; 31(4): 178-182.
2. Hinchee RE, Kittel JA, Reisinger HJ. *Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons.* Battelle Press, Columbus, OH (United States), 1995.
3. Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K. Petroleum biodegradation in marine environments. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1999; 1(1): 63-70.
4. Mohajeri L, Aziz HA, Isa MH, Zahed MA. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresource Technol.*

- 2010;101(3):893-900.
5. Zhou J, Yu X, Ding C, Wang Z, Zhou Q, Pao H. Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology. J Environ Sci. 2011; 23(1): 22-30.
  6. Jin HM, Choi EJ, Jeon CO. Isolation of a BTEX-degrading bacterium, *Janibacter* sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. Bioresource Technol. 2013;145: 57-64.
  7. Weelink SB, van Eekert MA, Stams AM. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. Rev Environ Sci Biotechnol. 2010; 9(4): 359-385.
  8. Margesin R, Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 56(5-6): 650-663.
  9. Al-Wasify RS, Hamed SR. Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. Int J Bacteriol. 2014. Doi: 10.1155/2014/863272
  10. Wang L, Shao ZZ. Isolation and characterization of 4 benzene/toluene-degrading bacterial strains and detection of related degradation genes. Acta Microbiologica Sinica. 2006; 46(5): 753-757.
  11. Mukherjee S, Bardolui NK, Karim S, Patnaik VV, Nandy RK, Bag PK. Isolation and characterization of a monoaromatic hydrocarbon-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* from crude oil. Journal of environmental science and health Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering. 2010; 45(9): 1048-1053.
  12. Wang L, Qiao N, Sun F, Shao Z. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. Extremophiles : life under extreme conditions. 2008; 12(3): 335-342.
  13. Kim JM, Jeon CO. Isolation and characterization of a new benzene, toluene, and ethylbenzene degrading bacterium, *Acinetobacter* sp. B113. Current microbiology. 2009; 58(1): 70-75.
  14. Afrouzossadat HA, Giti E, SeyedMahdi G. The role of exopolysaccharide, biosurfactant and peroxidase enzymes on toluene degradation by bacteria isolated from marine and wastewater environments. Jundishapur J Microbiol. 2012; 3: 479-485.
  15. Slepecky RA, Hemphill HE. The genus *Bacillus*- nonmedical. The prokaryotes: Springer; 2006; pp: 530-562.
  16. Abari AH, Emtiazi G, Ghasemi SM, Roghanian R. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading bacterium exhibiting potential application in bioremediation. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(3): 256-261.
  17. Eghtesadi-Araghi P, Haffner P, Drouillard K, Maghsoudlou W. Polycyclic aromatic hydrocarbons contaminants in Black-lip (Pearl) Oyster *Pinctada margaritifera* from Kish Island (Persian Gulf). Iran J Fisheries Sci. 2011; 10(1): 25-34.
  18. Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bull. 2012; 64(1): 7-12.

19. Inoue A, Yamamoto M, Horikoshi K. *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. Appl Environ Microbiol. 1991; 57(5): 1560-1562.
20. Robledo-Ortíz JR, Ramírez-Arreola DE, Pérez-Fonseca AA, Gómez C, González-Reynoso O, Ramos-Quirarte J. Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites. Int Biodeterioration Biodegradation. 2011; 65(3): 539-546.
21. Worsey MJ, Williams PA. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. J Bacteriol. 1975; 124(1): 7-13.
22. Rahman RN, Mahamad S, Salleh AB, Basri M. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. J Indust Microbiol Biotechnol. 2007; 34(7): 509-517.
23. Zylstra GJ, McCombie WR, Gibson DT, Finette BA. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the tod operon. Appl Environ Microbiol. 1988; 54(6): 1498-1503.
24. Hemalatha S, Veera Manikandan P. Characterization of aromatic hydrocarbon rading bacteria from petroleum contaminated sites. J Environ Protection. 2011; 2(03): 243.
25. Reva ON, Weinel C, Weinel M, Böhm K, Stjepandic D, Hoheisel JD. Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. J Bacteriol. 2006; 188(11): 4079-4092.
26. You Y, Shim J, Cho CH, Ryu MH, Shea PJ, Kamala-Kannan S. Biodegradation of BTEX mixture by *Pseudomonas putida* YNS1 isolated from oil-contaminated soil. J Basic Microbiol. 2013; 53(5): 469-475.



## Isolation and identification of toluene-degrading bacteria from oil spills of Gharehsoo River located in Kermanshah city

Narges Shamsi<sup>1</sup>, Roya Moravej<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MS.c., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Biodegradation is one of the most useful methods for elimination of oil spills and is recently considered as a promising approaches due to numbers of advantages, including low costs, high efficiency and being environment friendly. Gharehsoo river is one of those regions which have been contaminated by oil spills during recent years due to its vicinity to Kermanshah Oil Refining Company. This study was aimed to isolate and identify the toluene-degrading bacteria from oil spills in Gharehsoo river located at Kermanshah city.

**Materials & Methods:** In this experimental study, the samples were collected from water, soil and active sludge of the contaminated areas. Two isolates were achieved by enrichment of the samples into a selective medium containing toluene. Then, the isolates were identified using morphology, Gram staining, biochemical methods and *16S rRNA* sequencing. Also, the ability of isolates to eliminate toluene was testes based on Gas chromatography.

**Results:** Both isolates were identified as *Pseudomonas putida* strains. Gas chromatography tests showed that the isolates 1 and 2 were able to degrade toluene into the selective medium (0.5% v/v) 89% and 87%, at 72 C, respectively. The isolates were also able to resist and grow under harsh conditions of temperature, pH and osmolality. It was proved that the isolates were able to continue their activity and growth in the presence of other crude oil pollutants (benzene, xylene, ethyl-benzene).

**Conclusion:** Our results showed that these isolates were very efficient for elimination of oil pollutants due to their high growth rate in the presence of relatively high toluene concentration and to the ability to degrade a wide range of oil toxic compounds.

**Keywords:** Biodegradation, Toluene, Oil refinery sewage, Gharehsoo river, *Pseudomonas putida*.

---

Correspondence to: Roya Moravej

Tel: +98 8713288684

E-mail: [roya.sanandaj@gmail.com](mailto:roya.sanandaj@gmail.com)

Journal of Microbial World 2016, 9(2): 156-168.