فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۴۰- ۲۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۰

# جداسازی کنسرسیوم‌های میکروبی نمک‌دوست تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل به‌منظور استفاده در پاکسازی زیستی پسماندهای حفاری

**مریم رضایی صومعه:** کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، m_rezaei90@ut.ac.ir
**محمد علی آموزگار *:** دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
**محمود شوندی:** استادیار بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، shavandim@ripi.ir
**سید محمد مهدی دستغیب:** استادیار بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، dastgheibsmm@ripi.ir

## چکیده

**مقدمه:** در عملیات حفاری، حجم بالایی از کنده‌های حفاری با آلودگی هیدروکربنی و شوری بالا به محیط رها می‌شوند که آثار زیان‌باری خواهند داشت. پاکسازی زیستی یک تکنولوژی کارآمد و دوستدار محیط زیست است که در پاکسازی پسماندهای حفاری، کاربرد دارد. به‌دلیل شوری بالا و نبودِ فلور میکروبی فعال در کنده‌های خارج‌شده از عمق زمین، به‌کارگیری کنسرسیوم‌های میکروبی نمک‌دوست تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن می‌تواند کارایی پاکسازی زیستی را افزایش دهد.

**مواد و روش‌ها:** برای دست‌یابی به میکروارگانیسم‌های مناسب برای فرآیند پاکسازی زیستی، از مناطق مختلف ایران چندین نمونه آب و خاک شور آلوده و غیرآلوده به نفت تهیه شد و کنسرسیوم‌های میکروبی تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل، با روش غنی‌سازی چندمرحله‌ای، از آن‌ها جداسازی شدند. سپس توانمندی کنسرسیوم‌های میکروبی از نظر رشد در حضور گازوئیل به‌عنوان تنها منبع کربن به‌روش، پروتئین‌سنجی و شمارش کلنی‌ها روی پلیت سنجیده و منحنی رشد آن‌ها بررسی شد. سویه‌های غالب کنسرسیوم‌های میکروبی منتخب نیز به‌روش مولکولی شناسایی شدند.

**نتایج:** در میان کنسرسیوم‌های میکروبی تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل، حداکثر تعداد باکتری‌ها، مربوط به کنسرسیوم میکروبی جداشده از خاک آلودهٔ قم، با تعداد $۱/۹\times۱۰^{۱۵}$ CFU/mL بر روی محیط کشت مغذی و محیط پایه معدنی حاوی گازوئیل به‌عنوان تنها منبع کربن بود. بررسی منحنی‌های رشد نشان داد که کشت نمونه‌های آلوده به نفت سریع‌تر از نمونه‌های غیرآلوده به فاز لگاریتمی رسیده و مقدار کدورت نهایی آن‌ها نیز بیشتر است. تعیین توالی ژن *16S rRNA* سویه‌های غالب کنسرسیوم‌های میکروبی جداشده از خاک‌های آلوده به نفت، نشان داد که این سویه‌ها متعلق به جنس‌های *Dietzia*، *Microbacterium* و *Salinicola* بودند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** محیط‌های با سابقهٔ آلودگی نفتی، به‌علت سازگاری فلور میکروبی به حضور آلاینده‌ها، در مقایسه با نمونه‌های غیرآلوده ظرفیت بالقوهٔ بیشتری برای جداسازی کنسرسیوم‌های میکروبی تجزیه‌کننده دارند.

**واژه‌های کلیدی:** پاکسازی زیستی، کنده‌های حفاری، کنسرسیوم میکروبی نمک‌دوست، گازوئیل، گل پایه روغنی.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

**مقدمه**

در دنیای صنعتی امروز، نفت خام یکی از مهم‌ترین منابع انرژی است که اکتشاف و استخراج آن، نیازمند فرآیند حفاری است. به‌منظور خنک‌کردن و روان‌کردن سر مته و انتقال کنده‌های حفاری، در طول فرآیند حفر چاه، از سیالات حفاری استفاده می‌شود. سیالات حفاری، به‌طور عمده به سه دستهٔ سیالات پایه روغنی، پایه سنتزی و پایه آبی، تقسیم می‌شوند که در هر یک، ذرات جامد به‌ترتیب در بستری از هیدروکربن‌ها مانند گازوئیل با دامنهٔ ترکیبات ۲۵-۱۱ کربنه (۱)، روغن‌های مصنوعی مانند استرهای گیاهی، و یا آب، معلق هستند. سیالات پایه روغنی، به‌علت فراوانی نسبی هیدروکربن‌های آروماتیک، سمیت بیشتری نسبت به سیالات پایه سنتزی دارند اما به‌علت روان‌کنندگی بهتر و نرخ حفاری بالاتر بر سایر سیالات ترجیح داده می‌شوند (۲ و ۳).

با توجه به حجم بالای تولید و انتقال نفت خام و مشتقات آن، مقادیر بالایی از آلاینده‌های هیدروکربنی، به‌واسطهٔ نشت تصادفی، آزادشدن از خطوط لوله‌ها، نشت از مخازن ذخیره‌سازی زیرزمینی و یا دفع گل‌های حفاری بسیار شور به محیط‌های خاکی و آبی رها می‌شوند (۴-۶).

از طرفی، مخازن نفت تشکیل‌شده اغلب مواقع در نزدیکی محیط‌های آبی شور و تبخیری یافت می‌شود و آبی که در مخازن نفتی وجود دارد، عموماً بسیار شور است (۷). عملیات حفاری نیز احتمال در معرض قرارگرفتن نفت را با شورآب‌ها افزایش می‌دهد. به‌علاوه، غلظت بالایی از نمک، به‌منظور ایجاد سد اسمزی و ممانعت از تورم لایهٔ حفرشده، به گل‌های حفاری پایه روغنی اضافه می‌شود. بنابراین، حجم زیادی از کنده‌های حفاری، با گل بسیار شور نفتی آغشته می‌شود که تحت شرایط بی‌هوازی در استخرهای هرزاب حفاری، تجزیهٔ زیستی آلودگی هیدروکربنی آن‌ها دشوار است (۸).

بنابراین در بسیاری از موارد، همراه با آلاینده‌های هیدروکربنی، غلظت‌های بالایی از نمک نیز در محیط‌های آلوده به نفت وجود دارد که پاکسازی و تجزیهٔ آن‌ها را دشوارتر می‌کند (۹).

با این حال، هیدروکربن‌ها برای اولین بار به‌واسطهٔ فعالیت‌های انسان، وارد محیط زیست نشده‌اند؛ بلکه همواره بخشی از بیوسفر کرهٔ زمین بودند و موجودات زندهٔ مختلفی مانند باکتری‌ها، فیتوپلانکتون‌ها و گیاهان آن‌ها را تولید کرده‌اند (۱۱). درنتیجه میکروارگانیسم‌ها، در طول تکامل برای تجزیهٔ هیدروکربن‌های مختلف، سازگاری کسب کرده‌اند اما ورود بیشتر آن‌ها از طریق آلاینده‌های نفتی، منجر به برهم‌خوردن تعادل فسفر- نیتروژن- کربن محیط می‌شود و از توان خودپالایی طبیعت برای تجزیه خارج می‌شود (۱۰).

در حال حاضر، خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی، با استفاده از سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی، تیمار می‌شوند. بسیاری از روش‌های فیزیکی یا شیمیایی، پرهزینه هستند و یا آلودگی‌ها را به‌طور کامل حذف نمی‌کنند. به نظر می‌رسد که پاکسازی زیستی[1]، روشی امیدبخش و مقرون‌به‌صرفه برای حذف دامنهٔ وسیعی از

ترکیبات آلی به‌ویژه هیدروکربن‌های نفت خام است (۱۱).

دو روش عمده برای تسهیل پاکسازی زیستی وجود دارد: تحریک زیستی[۲]: تحریک رشد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ ذاتی محیط آلوده، از طریق متعادل‌ساختن نسبت‌های فسفر- نیتروژن- کربن (۱۲ و۱۳) و تلقیح زیستی[۳]: افزودن میکروارگانیسم یا میکروارگانیسم‌های خارجی تجزیه‌کنندهٔ آلاینده‌ها به محیط آلوده. درصورتی‌که میکروارگانیسم‌های ذاتی محیط آلوده، علی‌رغم تحریک زیستی، قادر به حذف کامل آلاینده‌ها نباشند، استفاده از روش تلقیح زیستی توصیه می‌شود (۱۴).

اما در این روش (تلقیح زیستی)، استفاده از کنسرسیوم‌های باکتریایی به کشت خالص آن‌ها ترجیح داده می‌شود؛ زیرا توانمندی آنزیمی کنسرسیوم‌ها، به‌دلیل وجود روابط هم‌افزایی[۴] بین جوامع آن‌ها و تولید آنزیم‌های مختلف، بیشتر و کارآمدتر است (۱۵). ازآنجایی‌که ترکیبات آلایندهٔ نفتی اغلب با غلظت‌های بالایی از نمک وارد محیط می‌شوند، استفاده از میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست که در طی تکامل به زندگی‌کردن در شوری سازگار شده‌اند پیشنهاد می‌شود.

هدف از این مطالعه، جداسازی و غنی‌سازی کنسرسیوم‌های میکروبی نمک‌دوست تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل از نمونه‌های خاک و آب شور، به‌منظور استفاده در پاکسازی زیستی پسماندهای حفاری است.

## مواد و روش‌ها

**غنی سازی:** همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، چهار نمونه خاک شور آلوده، سه نمونه خاک شور غیرآلوده و سه نمونه آب شور غیرآلوده، برای غنی‌سازی چندمرحله‌ای استفاده شد. محیط کشت پایهٔ معدنی بوشنل هس[۵] با pH 7، همراه با ۷درصد (وزنی/حجمی) نمک NaCl و ۰/۵درصد گازوئیل استریل‌شده به‌عنوان تنها منبع کربن، به‌منظور غنی‌سازی نمونه‌های خاک و آب در تجزیهٔ گازوئیل استفاده شد. ترکیبات این محیط، عبارت بود از (گرم در لیتر آب مقطر):

$KH_2PO_4$, 1; $K_2HPO_4$, 1; $NH_4NO_3$, 1; $MgSO_4$, 2/0; $CaCl_2$, 02/0; $FeCl_3$, 05/0 .

pH محیط کشت، با استفاده از محلول یک مولار TrisHCl، در ۷/۲-۷ تنظیم شد و در دمای ۱۲۱درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شد. از هر یک از نمونه‌های خاک، یک گرم و از هر یک از نمونه‌های آب، یک میلی‌لیتر برداشته شد و به ارلن‌های ۲۵۰میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بوشنل هس، منتقل شد. ارلن‌ها به‌مدت یک هفته در شیکر انکوباتور در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و دور rpm 120، گرماگذاری شد و رشد میکروبی، با دنبال‌کردن کدورت آن‌ها پس از یک هفته کنترل شد. پس از گذشت یک هفته، ۱ میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های غنی‌شده به محیط جدید دارای ۷درصد NaCl و۰/۵درصد گازوئیل، انتقال داده شد و مانند مرحلهٔ قبل گرمخانه‌گذاری شدند. فرآیند غنی‌سازی چندمرحله‌ای، ۷ بار تکرار شد.

جدول ۱- ویژگی‌های نمونه‌های خاک و آب استفاده‌شده در نمونه‌های خاک شور آلوده

| مکان نمونه‌بردای | موقعیت جغرافیایی | *EC µS/cm | pH | TPH **((mg/g |
|---|---|---|---|---|
| خاک آلودهٔ پوند ۳ پالایشگاه تهران | ۳۵° ۳۱′ ۱۲/۷″ شمالی<br>۵۱° ۲۴′ ۵۶″ شرقی | ۱۲۴۵۰۰ | ۷/۶ | ۸۴ |
| خاک آلودهٔ جزیره خارک | ۲۹° ۱۳′ ۴۰/۹″ شمالی<br>۵۰° ۱۸′ ۱۱/۵″ شرقی | ۶۱۵۰۰ | ۶/۷۵ | ۵۳ |
| خاک آلودهٔ قم | ۳۴° ۴۴′ ۴۳/۵″ شمالی<br>۵۰° ۵۳′ ۴۳/۶″ شرقی | ۶۵۲۵۰ | ۸/۰۵ | ۴۶ |
| خاک آلودهٔ خانگیران | ۵۰° ۳۳′ ۲۰″ شمالی<br>۶۰° ۴۷′ ۵۷″ شرقی | ۷۲۲۰۰ | ۷/۰۴ | ۵۹ |
| نمونه‌های خاک و آب شور غیرآلوده | | | | |
| مکان نمونه‌بردای | موقعیت جغرافیایی | EC µs/cm | pH | |
| خاک شور ارومیه | ۳۷° ۶۰′ ۵۰/۲″ شمالی<br>۴۵° ۴۷′ ۲۳/۶″شرقی | ۳۶۷۰۰ | ۸/۸۶۲ | |
| خاک شور میغان اراک | ۳۴° ۲۲′ ۵۰/۰۲″ شمالی<br>۴۹° ۸۲′ ۴۸/۸″شرقی | ۳۵۱۰۰۰ | ۸/۷۰۱ | |
| خاک شور اشتهارد | ۳۵° ۴۳′ ۲۵/۰۹″ شمالی<br>۵۰° ۲۱′ ۲۸/۰۹″ شرقی | ۷۳۵۰۰ | ۷/۹۲۸ | |
| آب شور ارومیه | ۳۷° ۶۰′ ۵۰/۲″شمالی<br>۴۵° ۴۷′ ۲۳/۶″شرقی | ۴۴۲۰۰۰ | ۸/۵۷۳ | |
| آب شور میغان اراک | ۳۴° ۲۲′ ۵۰/۰۲″ شمالی<br>۴۹° ۸۲′ ۴۸/۸″شرقی | ۲۴۰۰۰۰ | ۸/۱۲۷ | |
| آب شور اشتهارد | ۳۵° ۴۳′ ۲۵/۰۹″ شمالی<br>۵۰° ۲۱′ ۲۸/۰۹″ شرقی | ۵۵۲۰۰ | ۷/۶۴۹ | |

*µS/cm: میکروزیمنس بر سانتی‌متر، نشان‌دهندهٔ هدایت الکتریکی است، **mg/g : میلی‌گرم بر گرم نشان‌دهندهٔ مقدار کل هیدروکربن‌های موجود در محیط است.

**رسم منحنی رشد کنسرسیوم‌های میکروبی:** در مرحلهٔ هشتم غنی‌سازی، به‌منظور بررسی نحوهٔ رشد کنسرسیوم‌های میکروبی حاصل، بار دیگر مانند مراحل قبل ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت غنی‌سازی مرحله هفتم هر یک از نمونه‌ها، بر روی محیط‌های تازه تلقیح شد و رشد و کدورت هر یک از نمونه‌ها پس از تلقیح و گرمخانه‌گذاری، از طریق سنجش مقدار جذب آن‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر، در فواصل زمانی مشخص بررسی شد.

**تخمین تراکم سلولی کنسرسیوم‌های میکروبی:** به‌منظور انتخاب بهترین کنسرسیوم میکروبی در تجزیهٔ گازوئیل، تراکم باکتریایی هر یک از کنسرسیوم‌های میکروبی جداسازی‌شده، از طریق دو روش زیر بررسی شد:

**۱) پروتئین‌سنجی به‌روش بردفورد[۶]**

به‌منظور تهیهٔ معرف بردفورد، ۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بریلینت بلو G-250[۷] در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵درصد حل شد و در حین هم‌زدن به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵درصد اضافه شد و پس از حل‌شدن رنگ، حجم آن به یک لیتر رسانده شد.

پس از هم‌دماشدن معرف بردفورد با محیط، مقدار یک میلی‌لیتر از آن با ۲۵ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های کشت میکروبی، در یک ویال ۱/۵میلی‌لیتری مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب نوری هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. برای تهیهٔ منحنی استاندارد، غلظت‌های مشخصی از سرم آلبومین گاوی[8] (از mg/ml 125/0 تا mg/ml 2) در آب مقطر دیونیزه تهیه شد و همانند مرحلهٔ قبل، میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد. سپس مقدار مجهول پروتئین موجود در هر یک از نمونه‌های کشت میکروبی، با استفاده از نمودار استاندارد تعیین شد (۱۶).

**۲) شمارش باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل**

تراکم سلولی محیط‌های غنی‌سازی‌شده و همچنین نمونه‌های اصلی آب و خاک، با استفاده از این روش در روی دو محیط کشت R2A و بوشنل هس حاوی گازوئیل بررسی شدند.

محیط کشت R2A(۱۷) یک محیط کشت کم‌مغذی، با تنوع بالای منابع کربن است. pH محیط، با استفاده از محلول ۲ مولار NaOH در ۷/۴-۷/۲ تنظیم شد. یک گرم و یا یک میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های آب یا خاک و نیز یک میلی‌لیتر از هر یک از محیط‌های کشت غنی‌شده برداشته شد و در لولهٔ حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط مایع R2A ریخته شد و از هر یک از آن‌ها تا رقت $10^{-12}$ سریال رقت تهیه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت، بر روی پلیت‌های حاوی محیط R2A ریخته شد و با میلهٔ شیشه‌ای پخش شد و سپس پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد.

محیط کشت جامد بوشنل هس (۱/۵درصد آگار) همراه با ۷درصد NaCl و دارای منبع کربن گازوئیل نیز به‌عنوان محیط کشت اختصاصی شمارش باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل استفاده شد. در این مورد نیز مانند مرحلهٔ قبل، از نمونه‌های خاک و آب و محیط‌های غنی‌شده، تا رقت $10^{-12}$ سریال رقت تهیه شد با این تفاوت که این بار به‌جای محیط R2A، از ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی در هر یک از لوله‌ها استفاده شد. پس از پخش‌کردن ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌ها و جذب‌شدن آن‌ها به محیط، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر گازوئیل استریل‌شده به‌عنوان منبع کربن، روی آن‌ها ریخته و پخش شد و در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۶ ساعت، گرماگذاری شد. پس از سپری‌شدن زمان گرمخانه‌گذاری، تعداد کلنی‌های ایجادشده بر روی پلیتی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی داشت، شمارش شد و عدد به‌دست‌آمده در عکس ضریب رقت ضرب شد.

**بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک:** برای سویه‌های غالب هر یک از کنسرسیوم‌های میکروبی جداشده از نمونه‌های آلوده به نفت، تعدادی از تست‌های بیوشیمیایی، ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک انجام شد. رنگ‌آمیزی گرم براساس روش هوکر[9] انجام شد (۱۸). برای تأیید نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم، از تست KOH ۳درصد که بارون[10] توصیه کرده است، استفاده شد. فعالیت پراکسیدازی با استفاده از محلول ۳درصد پراکسید هیدروژن و فعالیت اکسیدازی با استفاده از دیسک‌های اکسیداز آمادهٔ شرکت پادتن طب تعیین شدند. نمک‌دوست‌بودن یا تحمل‌پذیری نمک سویه‌ها نیز از طریق بررسی رشد آن‌ها در محیط‌های جامد و مایع R2A بدون نمک (۰درصد NaCl وزنی/ حجمی) انجام شد.

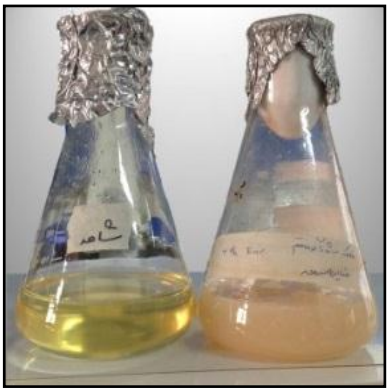
**شناسایی مولکولی سویه‌های غالب کنسرسیوم‌های میکروبی جداشده از نمونه‌های آلوده به نفت:** به منظور شناسایی سویه‌های غالب کنسرسیوم‌های میکروبی منتخب، از طریق توالی ژن *16sr RNA*، DNA کلنی‌های تازه‌رشدکرده بر روی محیط R2A agar با استفاده از روش تغییریافتهٔ مارمور[11]، استخراج شد (۱۹). تأیید استخراج DNA، از طریق بارگذاری ۱۰درصد از نمونه همراه با رنگ بارگذاری (با نسبت ۶ به ۱) بر روی ژل آگاروز (۰/۷درصد) در دستگاه الکتروفورز افقی انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[12]، از پرایمرهای عمومی ۲۷-´5) F ´AGAGTTTGATCMTGGGTCAG-3) و ۱۴۹۲ R ´5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3) برای باکتری‌ها، استفاده شد (۲۰).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای سویه‌های منتخب، به این روش صورت گرفت: واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۶ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد انجام و سپس، مرحلهٔ تکثیر آغاز شد که شامل ۳۰ چرخهٔ تکرارشونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه بود. درانتها، به‌منظور تکمیل نهایی ساختارهای تکثیرشده، یک مرحله سنتز به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به مراحل افزوده شد. پس از تکثیر توالی موردنظر با استفاده از پرایمرهای استفاده‌شده، نمونه محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت Bioneer در کره فرستاده شد و توالی‌های به دست‌آمده با نرم‌افزار Chromas Proبررسی شد و با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعات ژنومیEzTaxon مقایسه شد و نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف *16 SrRNA* مشابه با سویهٔ منتخب تعیین شد.

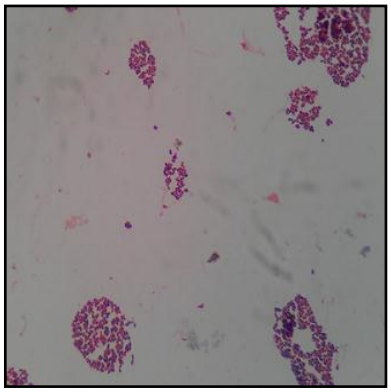
.

## نتایج

**غنی‌سازی و رسم منحنی رشد:** در هر بار غنی‌سازی، پس از یک هفته در هر ۱۰ نمونهٔ شور آلوده و غیرآلودهٔ استفاده‌شده، کدورت ناشی از رشد مشاهده شد و وجود باکتری‌ها از طریق رنگ‌آمیزی گرم، تأیید شد (تصاویر میکروسکوپی تعدادی از نمونه‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است).



۱



۲

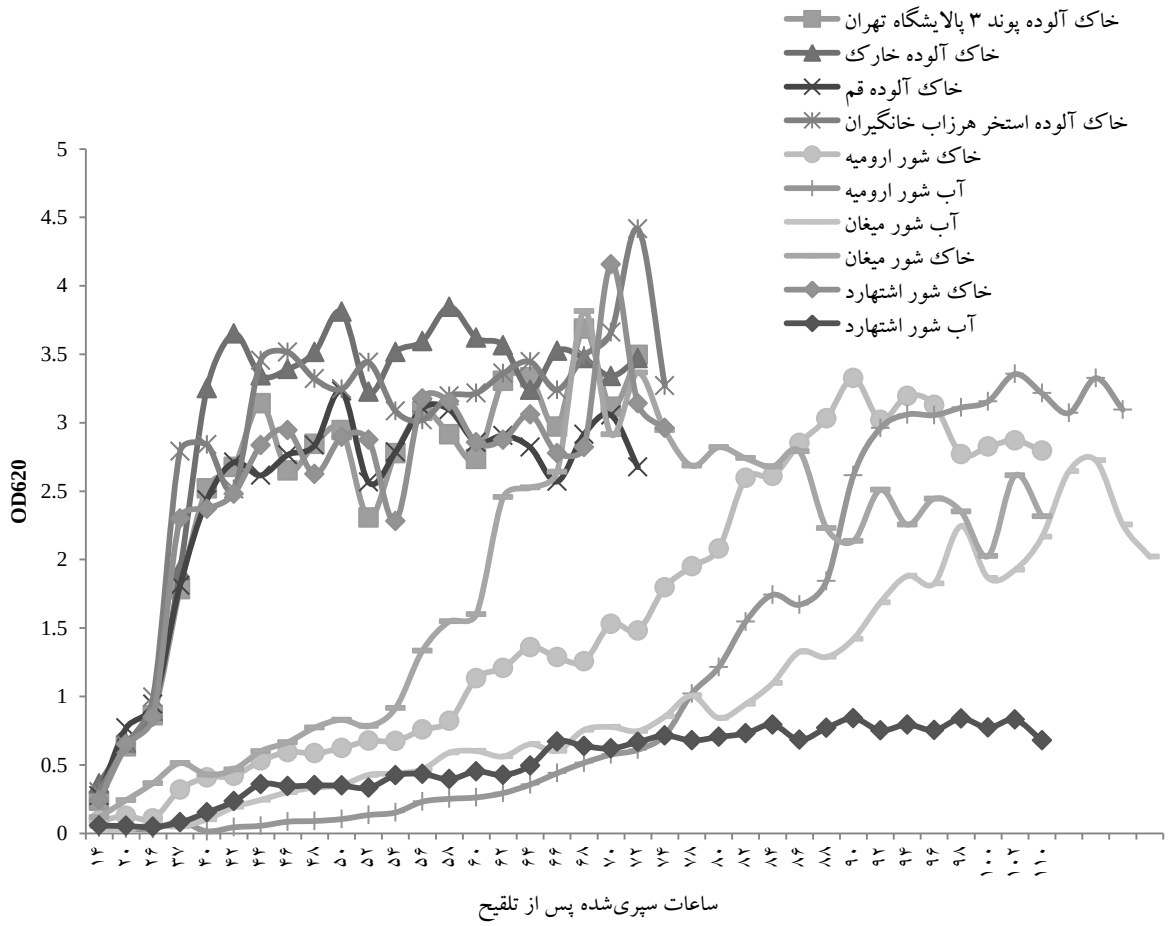
شکل ۱- شماره ۱، تصویری از مقایسهٔ محیط کشت شاهد و محیط نمونهٔ آلودهٔ قم پس از یک هفته غنی‌سازی؛ شماره ۲، تصویر میکروسکوپی رنگ‌آمیزی گرم کنسرسیوم میکروبی نمونهٔ خاک آلودهٔ قم

نحوهٔ رشد هر کنسرسیوم میکروبی بررسی شد و منحنی رشد آن براساس جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر رسم شد. به‌منظور مقایسهٔ سرعت و مقدار رشد کنسرسیوم‌های میکروبی جداسازی‌شده از نمونه‌های آلوده با غیرآلوده، منحنی‌های رشد کنسرسیوم‌های ۴ نمونهٔ خاک آلوده با هر یک از ۶ کنسرسیوم میکروبی نمونهٔ غیرآلوده، در کنار هم در یک نمودار رسم شدند (شکل ۲). همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، کنسرسیوم‌های میکروبی به‌دست‌آمده از نمونه‌های آلوده، سریع‌تر به فاز لگاریتمی رسیده و همچنین مقدار تراکم نهایی آن‌ها (مقدار جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر) بیشتر از نمونه‌های غیرآلوده است (جدول ۲).

**تخمین تراکم سلولی هر کنسرسیوم میکروبی:**

**۱- پروتئین‌سنجی به‌روش بردفورد**

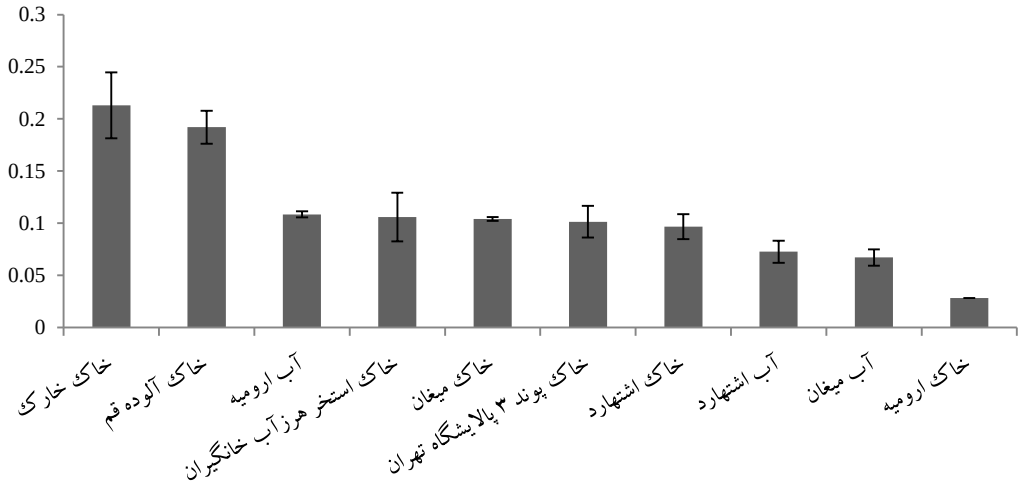
همان‌طور که نشان داده شده‌است، مقدار پروتئین محاسبه‌شده در هر یک از کنسرسیوم‌های میکروبی، با یکدیگر در یک نمودار آورده شد (شکل ۳). در این نمودار می‌توان با مقایسهٔ غیرمستقیم تراکم سلولی هر یک از کنسرسیوم‌های میکروبی، توانمندی آن‌ها برای رشد در حضور گازوئیل به‌عنوان تنها منبع کربن و تجزیهٔ این آلاینده را تخمین زد. در بین کنسرسیوم‌های میکروبی، کشت‌های غنی‌شده از نمونه‌های خاک آلودهٔ خارک و قم، به‌ترتیب با 213/0 mg/ml و mg/ml 192/0 بیشترین مقدار محتوای پروتئین را نشان دادند.




شکل ۲- مقایسهٔ منحنی‌های رشد کنسرسیوم‌های میکروبی غنی‌شده

جدول ۲- نتایج شمارش باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل در کنسرسیوم‌های میکروبی غنی‌شده و نمونه‌های اصلی بر روی محیط R2A و بوشنل هس

| نام نمونه | کنسرسیوم میکروبی | | نمونهٔ اصلی | | $OD_{620}$ نهایی کنسرسیوم‌های میکروبی بر روی محیط مایع بوشنل هس پس از یک هفته |
|---|---|---|---|---|---|
| | (محیط کشت R2A) | (محیط کشت بوشنل هس همراه با گازوئیل) | (محیط کشت R2A) | (محیط کشت بوشنل هس همراه با گازوئیل) | |
| خاک آلودهٔ قم | CFU/mL $10^{15}$×9/1 | CFU/mL $10^{15}$×9/1 | ۱/۹ ×۱۰$^{۳}$ CFU/gram soil | ۴/۵×۱۰$^{۱۲}$ CFU/gram soil | ۳/۱ |
| خاک آلودهٔ استخر هرزآب خانگیران | CFU/mL $10^{13}$×2 | CFU/mL $10^{15}$×6/1 | ۳/۱×۱۰$^{۷}$ CFU/gram soil | ۳/۱×۱۰$^{۷}$ CFU/gram soil | ۴/۴ |
| خاک آلودهٔ خارک | CFU/mL $10^{12}$×9/2 | CFU/mL $10^{14}$×8/1 | ۶/۸×۱۰$^{۴}$ CFU/gram soil | ۳/۳×۱۰$^{۸}$ CFU/gram soil | ۳/۸ |
| خاک شور آلودهٔ پوند ۳ پالایشگاه تهران | CFU/mL $10^{7}$×5/1 | CFU/mL $10^{15}$×9/1 | ۹×۱۰$^{۵}$ CFU/gram soil | ۷/۹×۱۰$^{۸}$ CFU/gram soil | ۳/۵ |
| خاک شور ارومیه | CFU/mL $10^{14}$×7/4 | CFU/mL $10^{10}$×6/2 | ۶×۱۰$^{۵}$ CFU/gram soil | ۴/۴×۱۰$^{۶}$ CFU/gram soil | ۳/۳ |
| خاک شور میغان | CFU/mL $10^{10}$×4/9 | CFU/mL $10^{13}$×3/2 | ۲/۳×۱۰$^{۶}$ CFU/gram soil | ۴/۷×۱۰$^{۵}$ CFU/gram soil | ۳/۸ |
| خاک شور اشتهارد | CFU/mL $10^{14}$×8/1 | CFU/mL $10^{12}$×1/1 | ۴/۳×۱۰$^{۸}$ CFU/gram soil | ۸/۲×۱۰$^{۷}$ CFU/gram soil | ۴/۱ |
| آب شور ارومیه | CFU/mL $10^{7}$×3/1 | CFU/mL $10^{8}$×6/1 | ۳/۵×۱۰$^{۳}$ CFU/mL | ۶×۱۰$^{۳}$ CFU/mL | ۳/۳ |
| آب شور میغان | CFU/mL $10^{10}$×4/1 | CFU/mL $10^{8}$×9/1 | ۵/۳×۱۰$^{۶}$ CFU/ mL | ۱/۸×۱۰$^{۶}$ CFU/mL | ۲/۷ |
| آب شور اشتهارد | CFU/mL $10^{9}$×2/1 | CFU/mL $10^{8}$×3/1 | ۳/۹×۱۰$^{۴}$ CFU/mL | ۸×۱۰$^{۹}$ CFU/mL | ۰/۸ |




شکل۳- مقایسهٔ مقدار پروتئین و $OD_{595}$ نمونه‌های مختلف با یکدیگر براساس پروتئین‌سنجی بردفورد

**۲- شمارش باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل**

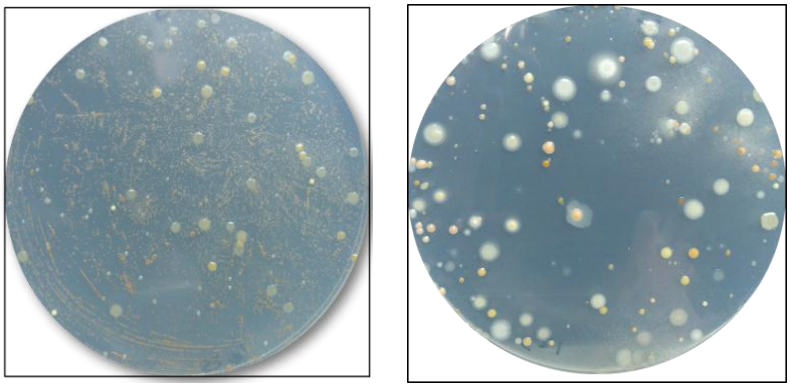
جدول ۲، نتایج حاصل از شمارش باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل در کنسرسیوم‌های میکروبی به‌دست‌آمده را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشخص است تعداد باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل در کنسرسیوم‌های میکروبی حاصل از نمونه‌های آلوده به نفت، در مقایسه با نمونه‌های غیرآلوده، به‌میزان قابلِ‌توجهی بیشتر است. ازآنجایی‌که تراکم باکتریایی نمونه‌های آلوده به نفت، از سایر نمونه‌های آب و خاک بیشتر است، این نمونه‌ها برای بررسی‌های بیشتر در مراحل بعد انتخاب شدند.

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سویه‌های غالب کنسرسیوم‌های میکروبی:

ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی سویه‌های بررسی‌شده و همچنین نتایج حاصل از نمک‌دوستی و تحمل‌پذیری نمک نیز در جدول ۳ آورده شده است.

تنوع کلنی‌های حاصل از رشد رقت‌های مشابه از نمونه‌های اصلی خاک و آب و کنسرسیوم‌های میکروبی غنی‌شده از آن‌ها بر روی محیط R2A نیز بایکدیگر مقایسه شد که تصاویر تعدادی از آن‌ها در شکل ۴ آورده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، تنوع کلنی‌ها در نمونه‌های اصلی آب و خاک بیشتر از تنوع آن‌ها در کنسرسیوم‌های میکروبی غنی‌شده است؛ درحالی‌که تراکم آن‌ها، در کنسرسیوم‌های میکروبی غنی‌شده بیشتر است.

**شناسایی فیلوژنتیکی سویه‌های غالب کنسرسیوم‌های میکروبی جداشده از نمونه‌های آلوده به نفت:** جهت بررسی‌های فیلوژنتیکی، تعیین توالی ژن *16SrRNA* برای هر ۴ سویه، با استفاده از پرایمر رفت (F۲۷)، انجام شد. جدول ۳ نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب و میزان شباهت آن‌ها با نزدیک‌ترین گونه‌های شناخته‌شده را نشان می‌دهد. شکل ۵ درخت فیلوژنی ترسیم‌شده برای باکتری‌های ذکرشده در جدول ۳ را نشان می‌دهد.

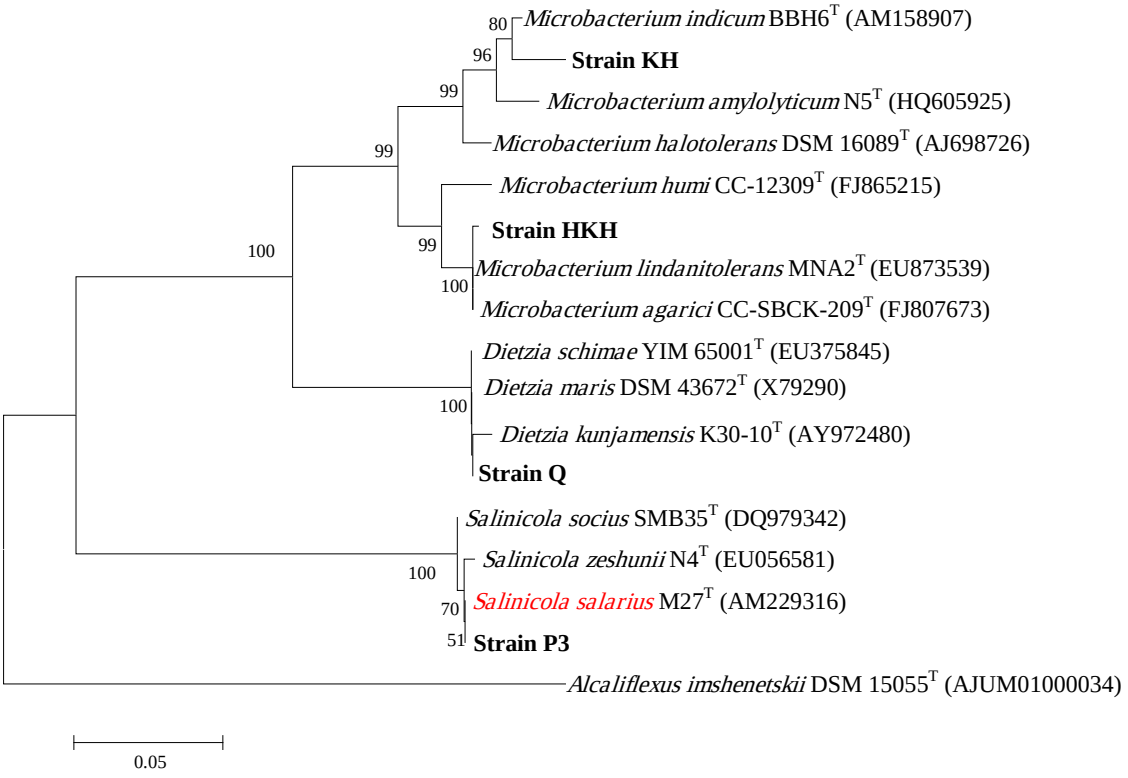


۱ ۲

شکل ۴- شماره‌های ۱ و ۲، به‌ترتیب خاک آلوده و کنسرسیوم میکروبی غنی‌سازی‌شده از نمونهٔ قم، در رقت $10^{-3}$ بر روی محیط R2A

جدول ۳- مقایسهٔ توالی ژن *16 S rRNA* سویه‌های غالب کنسرسیوم‌های میکروبی جداشده از نمونه‌های آلوده به نفت با بانک ژن با استفاده از ابزار BLAST

| نام سویه | نزدیک‌ترین سویه | درصد شباهت | واکنش به رنگ‌آمیزی گرم | تست KOH 3% | تست کاتالاز | تست اکسیداز | نمک‌دوست یا تحمل‌پذیر نمک |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Q (سویهٔ غالب خاک آلودهٔ قم) | *Dietzia schimae* YIM 65001(T( | ۱۰۰ | + کوکوس | − | + | − | تحمل‌پذیر نمک |
| P3 (سویهٔ غالب پوند۳پالایشگاه تهران) | *Salinicola salarius* M27(T( | ۱۰۰ | − باسیلوس | + | + | − | تحمل‌پذیر نمک |
| HKH (سویهٔ غالب استخرهرزاب خانگیران) | *Microbacterium lindanitolerans* MNA2(T( | ۹۸,۵ | + کوکوس | − | + | − | نمک‌دوست |
| KH (سویهٔ غالب خاک آلودهٔ خارک) | *Microbacterium indicum* BBH6(T( | ۹۸ | + کوکوس | − | + | + | تحمل‌پذیر نمک |




شکل ۵- درخت فیلوژنی باکتری‌های تعیینِ‌توالی‌شده با استفاده از روش Neighbour-joining، *Alcaliflexus imshenetskii* DSM 15055T به‌عنوان outgroup در نظر گرفته شده و اعداد ذکرشده در بخش انشعاب، نشان‌دهندهٔ بوت استرپ از ۱۰۰۰ نمونه است. مقادیر بوت استرپ کمتر از ۵۰ نشان داده نشده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

تخلیهٔ کنده‌های حفاری به‌عنوان یکی از آلاینده‌های مهم در طی فعالیت حفاری چاه‌های نفت و گاز به محیط زیست و بدون هیچ تیماری، مشکلات مهمی برای خاک، آب‌های زیرزمینی و سلامت انسان ایجاد می‌کند. پاکسازی زیستی را بسیاری از پژوهشگران، به‌علت هزینهٔ مقرون‌به‌صرفه و ایجادنکردن آلودگی ثانویه، تأیید کرده‌اند و مطالعات زیادی در زمینهٔ پاکسازی پسماندهای حفاری با استفاده از میکروارگانیسم‌ها انجام شده است (۲۱).

در حال حاضر، به‌طور کلی جامعه علمی پذیرفته است که هیچ تک‌گونه‌ای از میکروارگانیسم‌ها، نمی‌تواند به‌طور کامل بخشی از نفت را تجزیه کند. تجزیهٔ نفت خام، نفت تصفیه‌شده و یا مشتقات آن‌ها، نیاز به کنسرسیومی از میکروارگانیسم‌ها دارد (۲۲). از دیدگاه کاربردی، استفاده از یک کنسرسیوم میکروبی به‌جای کشت خالص باصرفه‌تر است؛ زیرا تنوع متابولیکی و توانمندی موردِنیاز برای کاربرد در محیط طبیعی را داراست (۲۳).

استفاده از روش غنی‌سازی انتخابی و جداسازی کنسرسیوم میکروبی نسبت به کشت‌های خالص باکتریایی، به‌منظور کاربرد آن در پاکسازی زیستی، در بسیاری از مطالعات مشابه انجام شده و موفقیت‌آمیز بوده است. به‌عنوان مثال، دستغیب[۱۳] و همکارانش، کنسرسیوم میکروبی نمک‌دوست تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی در غلظت‌های بالای نمک را جداسازی کردند که یک سویهٔ قابلِ‌کشت از جنس *Halomonas* و یک سویهٔ غیرقابلِ‌کشت از جنس *Marinobacter* به‌عنوان اعضای آن، شناسایی شدند و قادر به تجزیهٔ فنانترن در غلظت ۱۵درصد نمک NaCl بودند (۲۴).

ریس[۱۴] و همکارانش، کنسرسیوم‌های میکروبی نمک‌دوست از نمونه‌های خاک شور جداسازی کردند که قادر به تجزیهٔ گازوئیل در غلظت‌های NaCl ۰تا۱۵درصد و متشکل از جنس‌های *Cellulomonas*، *Bacillus*، *Dietzia* و *Halomonas* بود (۲۵).

شارما[۱۵] و همکارانش نشان دادند که کنسرسیوم باکتریایی (متشکل از جنس‌های *Moraxella*، *Alteromonas*، *Klebsiella* و *Pseudomonas*) گازوئیل بیشتری را نسبت به کشت‌های خالص از باکتری‌ها (مانند *Klebsiella*) تجزیه می‌کنند (۲۵).

بنتو[۱۶] و همکارانش، پاکسازی زیستی از طریق سه روش تلقیح و تحریک زیستی و تضعیف طبیعی را بررسی کردند و نشان دادند که تحریک زیستی به‌ویژه با استفاده از کنسرسیومی از باکتری‌ها (در این پژوهش غالباً متشکل از *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Acinetobacter*) بیشترین مقدار تجزیه برای گازوئیل را نشان می‌دهد (۲۶).

در این پژوهش، پس از سپری‌شدن مرحلهٔ غنی‌سازی، همان‌طور که منحنی‌های رشد و همچنین نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم نشان می‌دهند، از هر ۱۰ نمونهٔ آلوده و غیرآلودهٔ شور، کنسرسیوم‌های میکروبی دارای قابلیت تجزیهٔ گازوئیل در غلظت ۷درصد NaCl جداسازی شدند. ازآنجایی‌که هیدروکربن‌ها را پیش از ورود آلاینده‌های نفتی، فیتوپلانکتون‌ها وگیاهان و فرآیندهای مختلف آبی و خاکی در طبیعت تولید می‌کردند، باکتری‌ها در طول تکامل برای تجزیهٔ هیدروکربن‌ها سازگار می‌شدند و درنتیجه جداسازی کنسرسیوم‌های باکتریایی تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل از محیط‌های بدون سابقهٔ آلودگی، تعجب‌آور

نخواهد بود (۲۷).

بررسی منحنی‌های رشد مقایسه‌ای نشان می‌دهد که کنسرسیوم‌های میکروبی جداشده از نواحی آلوده به نفت، سرعت رشد بیشتری نسبت به نمونه‌های غیرآلوده دارند، سریع‌تر به فاز لگاریتمی می‌رسند و می‌توانند تنها منبع کربن موجود در محیط را استفاده کنند. درنهایت کدورت و تراکم سلولی بیشتری نیز در آن‌ها ایجاد می‌شود و همان‌طور که در مطالعات گذشته نیز بررسی شده است، علت این پدیده آن است که جوامع باکتریایی در محیط‌های دارای سابقهٔ آلودگی‌های نفتی، به تجزیهٔ این ترکیبات در طولانی‌مدت سازگار می‌شوند و گروهی از باکتری‌ها که قادر به استفاده از هیدروکربن‌های نفتی هستند، جوامع غالب در این مکان‌ها خواهند شد (۲۸ و ۲۹).

در بین کنسرسیوم‌های میکروبی جداسازی‌شده از نمونه‌های غیرآلوده، مقدار تراکم نهایی و سرعت رشد کنسرسیوم میکروبی جداشده از خاک شور اشتهارد، قابلِ‌رقابت با نمونه‌های آلوده بود که با توجه به تراکم میکروبی بالای آن در ابتدا (جدول ۲)، تا حدودی قابلِ‌توجیه است. از طرفی، با اینکه در این منطقه، آلودگی نفتی وجود ندارد ممکن است به‌علت گستردگی زمین‌های کشاورزی در آن و تردد وسایل نقلیه، آلودگی‌های خفیفی ایجاد شده باشند و این آلودگی‌ها در طولانی‌مدت منجر به سازگاری جوامع باکتریایی محل نمونه‌برداری و درنتیجه حذف ترکیبات هیدروکربنی شود که می‌توانند سریع‌تر از سایر نمونه‌های غیرآلوده، منبع کربن محیط را استفاده کنند.

از طرفی، ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلنی‌های رشدیافته در رقت‌های اولیهٔ کنسرسیوم‌های میکروبی غنی‌شده در مقایسه با نمونه‌های اصلی (شکل ۴)، نشان‌دهندهٔ آن است که تنوع کلنی‌ها در نمونه‌های اصلی خاک و آب، نسبت به تنوع آن در کنسرسیوم‌های میکروبی غنی‌شده، بیشتر است اما تعداد کلی کلنی‌ها (تراکم سلولی) به‌دلیل چندین مرحلهٔ غنی‌سازی، در کنسرسیوم‌های میکروبی جداشده بالاتر بود. با اختصاصی‌کردن منبع کربن و درصد نمک، تنوع باکتری‌های قادر به رشد در این شرایط کاهش خواهند یافت (۳۰).

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، کنسرسیوم میکروبی جداسازی‌شده از خاک آلودهٔ قم، دارای بیشترین تراکم سلولی نسبت به سایر کنسرسیوم‌های میکروبی است. تراکم بالای سلولی این کنسرسیوم در محیط بوشنل هس که تنها منبع کربن آن گازوئیل است، می‌تواند نشان‌دهندهٔ توانمندی بیشتر میکروفلور آن در تجزیهٔ گازوئیل نیز باشد. از طرفی، خود نمونهٔ خاک آلودهٔ قم، بر روی محیط R2A، دارای کمترین تراکم سلولی است. می‌توان چنین نتیجه گرفت که ازآنجایی‌که منشأ آلودگی این محیط، نشت قدیمی نفت در این مکان بوده است، جوامع باکتریایی غالب این نمونهٔ خاک آلوده، همان‌طور که در مطالعهٔ (۳۱) نشان داده شده است، از انواع تجزیه‌کننده‌های اجباری هیدروکربن‌ها هستند که تنها در حضور هیدروکربن‌ها قادر به رشد هستند.

به علاوه، در روش پروتئین‌سنجی که می‌توان به‌طور غیرمستقیم تراکم سلولی باکتری‌ها را سنجید، کنسرسیوم میکروبی حاصل از خاک آلودهٔ قم، دارای غلظت پروتئین قابلِ‌توجهی بود؛ بنابراین، سابقهٔ شوری و آلودگی مکان نمونه‌برداری، در نتایجی که در پاکسازی مشاهده می‌شود، بسیار تأثیرگذار است.

با نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، کنسرسیوم

میکروبی جداسازی‌شده از خاک شور آلودهٔ قم دارای پتانسیل بالایی برای کاربرد در پاکسازی زیستی گل‌های حفاری آلوده به گازوئیل است.

با توجه به بررسی‌هایی که محققان انجام داده اند، شاخص‌ترین باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی که تاکنون گزارش شده‌اند در اغلب موارد ازحوزه‌های نفتی، آب تولیدشده و سایر محیط‌های شور آلوده به نفت جداسازی شده‌اند و متعلق به شاخه‌های *Actinobacteria* و *Gamaproteobacteria* هستند (۷، ۳۲-۳۵). در این پژوهش در بین سویه‌های غالب جداشده از نمونه‌های آلوده به نفت، ۳ سویه متعلق به شاخهٔ *Actinobacteria* بودند که با بررسی‌های پیشین هم‌خوانی دارد. بررسی‌های فیلوژنتیکی هر یک از سویه‌ها و سابقهٔ گزارش آن‌ها در زمینهٔ تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های نفتی و یا گازوئیل، در زیر آمده است.

تعیین توالی ژن *16sr RNA* و شناسایی سویهٔ غالب کنسرسیوم میکروبی قم، نشان داد که این سویه با ۱۰۰درصد شباهت، متعلق به گونهٔ *Dietzia schimae* است. از این گونه، تا کنون چندین گزارش مبنی بر تجزیهٔ نفت مشاهده شده است (۳۶). تاکنون گزارش‌های فراوانی در زمینهٔ جداسازی گونه‌های مختلف این جنس، از محیط‌های خاکی آلوده به هیدروکربن‌های نفتی داده شده است و ازآنجایی‌که گازوئیل نیز ترکیبی متشکل از هیدروکربن‌های بلندزنجیره ($C_{18}$-$C_{25}$) است، جداسازی گونه‌ای از جنس *Dietzia*، از خاک آلوده به نفت قم، با نتایج پژوهش‌های پیشین هم‌خوانی دارد. به‌عنوان مثال، گونهٔ *D. cinnamea* strain P4 (قادر به تجزیهٔ آلکان‌های $C_{11}$-$C_{36}$) و نیز *Dietzia* sp. E1 (تجزیه‌کنندهٔ اجزای آلکان نفت خام ($C_{12}$-$C_{38}$) *D.maris* (۳۶ و ۳۷) از محیط‌های خاکی آلوده به نفت، جداسازی شده‌اند.

سویهٔ غالب کنسرسیوم میکروبی خاک آلودهٔ پوند ۳ پالایشگاه تهران پس از بررسی‌های فیلوژنتیکی، شباهت ۱۰۰درصد با گونهٔ *Salinicola salarius* نشان داد. این گونه را کیم[17] و همکارانش، در سال ۲۰۰۷ با عنوان *Halomonas salaria* از آب شور جداسازی کردند و نام آن را رفائل[18] و همکارانش در سال ۲۰۱۰ به *Salinicola salarius* تغییر دادند (۳۸, ۳۹). الیورا[19] و همکارانش، جداسازی سویه‌ای با ۹۸/۶درصد به *H. salaria* از رسوبات اعماق دریا با سابقهٔ مواجهه با ترکیبات هیدروکربنی گزارش داده‌اند که قادر به تولید امولسیفایر است (۴۰).

سویه‌های غالب جداشده از کنسرسیوم میکروبی خاک آلودهٔ خارک، با ۹۸درصد شباهت، به گونهٔ *Microbacterium indicum* نزدیک است. به‌علاوه، سویهٔ غالب جداشده از کنسرسیوم میکروبی خاک آلودهٔ استخر هرزاب خانگیران نیز با ۹۸/۵درصد شباهت به گونهٔ *Microbacterium lindanitolerans* نسبت داده شد. *M. lindanitolerans* برای اولین بار، از خاک آلوده به هگزاکلروسیکلوهگزان در سال ۲۰۱۰ (۴۱) و *M. indicum* در سال ۲۰۰۷ از رسوبات اعماق دریا جداسازی شده‌اند (۴۲). تا کنون گزارشی در زمینهٔ توانمندی تجزیهٔ نفت یا مشتقات آن توسط *M. indicum* مشاهده نشده است. گونه‌های مختلف جنس *Microbacterium* به‌عنوان اعضایی از کنسرسیوم‌های باکتریایی از خاک‌های آلوده به مواد بیگانه با محیط زیست[20] مانند رنگ‌ها، فلزات مانند روی و کادمیم و نیز آفت‌کش‌ها (*M. oxydans*) جداسازی شده‌اند (۴۱ و ۴۳). به‌علاوه گونه هایی از جنس *Microbacterium* مانند *M. hydrocarbonoxydans* (۴۴)،

*M. aoyamense* و *M. oxydans* (۴۵) و *M. foliorum* (۳۶)، از مناطق مختلفی جدا شده‌اند که قادر به تجزیهٔ PAHها، هیدروکربن‌های نفتی و نفت خام به‌عنوان منبع کربن هستند.

درمجموع، پاکسازی زیستی کنده‌های حفاری به‌عنوان یکی از پسماندهای آلاینده در صنعت نفت، اهمیت زیادی دارد و دست‌یابی به کنسرسیوم‌های میکروبی و سویه‌های توانمند در تجزیهٔ سریع‌تر و بیشتر هیدروکربن‌ها، به پاکسازی مؤثرتر این پسماند کمک خواهد کرد. همان‌طور که در این پژوهش نیز نشان داده شد، محیط‌های با سابقهٔ آلودگی نفتی، به‌علت سازگاری طولانی‌مدت میکروارگانیسم‌ها به حضور آلاینده‌ها، در مقایسه با نمونه‌های غیرآلوده ظرفیت بالقوه بیشتری برای جداسازی کنسرسیوم‌های تجزیه‌کننده دارند و در بین کنسرسیوم‌های غنی‌شده، کنسرسیوم میکروبی جدشده از خاک آلودهٔ قم، می‌تواند در پژوهش‌های بعدیِ پاکسازی زیستی کنده‌های حفاری در مقیاس بالاتر در محیط خاک در استفاده شود.

## References


(1) Kebria DY, Khodadadi A, Ganjidoust H, Badkoubi A, Amoozegar M. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. *International Journal of Environmental Science & Technology*. 2009; 6(3): 435-42.

(2) Agwu OA, Ilori MO, Nwachukwu SU. Utilization of Drilling Fluid Base Oil Hydrocarbons by Microorganisms Isolated from Diesel-Polluted Soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*. 2013; 22(7): 817-28.

(3) Souza F, Salgueiro A, Albuquerque C. Production of bioemulsifiers by Yarrowia lipolytica in sea water using diesel oil as the carbon source. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2012; 29(1): 61-7.

(4) Chandra S, Sharma R, Singh K, Sharma A. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*. 2013; 63(2): 417-31.

(5) van der Heul R. Environmental degradation of petroleum hydrocarbons. *Utrecht University journal*. 2009; 53p.

(6) Gallego JL, Loredo J, Llamas JF, Vázquez F, Sánchez J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*. 2001; 12(5): 325-35.

(7) Dastgheib SMM, Amoozegar MA, Khajeh K, Ventosa A. A halotolerant *Alcanivorax* sp. strain with potential application in saline soil remediation. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011; 90(1): 305-12.

(8) McGenity T. Halophilic hydrocarbon degraders. In: Timmis, Kenneth N. McGenity, Terry J., Meer, Jan Roelof, de Lorenzo, Victor editors. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. *Verlag Berlin Heidelberg: Springer*; 2010: 1939-51.

(9) García MT, Ventosa A, Mellado E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. *FEMS microbiology ecology*. 2005; 54(1): 97-109.

(10) El-Gendy NS, Farah JY. Kinetic modeling and error analysis for decontamination of different petroleum hydrocarbon components in biostimulation of oily soil microcosm. *Soil and Sediment Contamination*. 2011; 20(4): 432-46.

(11) Liu W, Luo Y, Teng Y, Li Z, Ma LQ. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environmental geochemistry and health*. 2010; 32(1): 23-9.

(12) Sarkar D, Ferguson M, Datta R, Birnbaum S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental pollution*. 2005; 136(1): 187-95.

(13) Tsai T, Kao C, Surampalli RY, Chien H. Enhanced bioremediation of fuel-oil contaminated soils: laboratory feasibility study. *Journal of Environmental Engineering*. 2009; 135(9): 845-53.

(14) Wongsa P, Tanaka M, Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H. Isolation and characterization of novel strains of Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Current microbiology*. 2004; 49(6): 415-22.

(15) Mukherjee AK, Bordoloi NK. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. *Environmental Science and Pollution Research*. 2011; 18(3): 471-8.

(16) Burgess RR, Deutscher MP. Guide to protein purification: Academic Press; 2009.

(17) Kleinsteuber S, Riis V, Fetzer I, Harms H, Müller S. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Applied and environmental microbiology*. 2006; 72(5): 3531-42.

(18) Gerhardt P, Wood WA, Krieg NR. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington : American Society for Microbiology; 1994.

(19) Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*. 1-208: (2)3; 961IN1.

(20) Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*. 1998; 64(2): 795-9.

(21) Chang Y, Wang X, Han Y, Wang M, Zheng C, Wang Y, et al., editors. The Removal of Crude Oil in Waste Drilling Muds by a Constructed Microbial Consortium, *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)*. Berlin Heidelberg: Springer; 2014.

(22) Balba M, Al-Awadhi N, Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological methods*. 1998; 32(2): 155-64.

(23) Tyagi M, da Fonseca MMR, de Carvalho CC. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. 2011; 22(2): 231-41.

(24) Dastgheib SMM, Amoozegar MA, Khajeh K, Shavandi M, Ventosa A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012; 95(3): 789-98.

(25) Riis V, Kleinsteuber S, Babel W. Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. *Canadian journal of microbiology*. 2003; 49(11): 713-21.

(26) Bento FM, Camargo FA, Okeke BC, Frankenberger WT. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource technology*. 2005; 96(9): 1049-55.

(27) Marchal R, Penet S, Solano-Serena F, Vandecasteele J. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & gas science and technology*. 2003; 58(4): 441-8.

(28) Okoh AI. Biodegradation alternative in

the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2006; 1(2): 38-50.

(29) Evans FF, Rosado AS, Sebastián GV, Casella R, Machado PL, Holmström C. et al. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS microbiology ecology*. 2004; 49(2): 295-305.

(30) Margesin R, Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied microbiology and biotechnology*. 2001; 56(5-6): 650-63.

(31) Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in biotechnology*. 2007; 18(3): 257-66.

(32) Wang Y-N, Cai H, Chi C-Q, Lu A-H, Lin X-G, Jiang Z-F, et al. *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2007; 57(6): 1222-6.

(33) Mnif S, Chamkha M, Sayadi S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. *Journal of applied microbiology*. 2009; 107(3): 785-94.

(34) Zvyagintseva I, Poglazova M, Gotoeva M, Belyaev S. Effect on the medium salinity on oil degradation by nocardioform bacteria. *Microbiology*. 2001; 70(6): 652-6.

(35) Kuznetsov V, Zaitseva T, Vakulenko L, Filippova S. *Streptomyces-albiaxialis* sp-nov-a new petroleum hydrocarbon-degrading species of thermotolerant and halotolerant *streptomyces*. *Microbiology*. 1992; 61(1): 62-7.

(36) Amirasheva B. Evaluating the destructive activity and phytotoxicity of oil oxidizing strains of microorganisms isolated from oil-contaminated soils in Kyzylorda region. *Микробиология және вирусология*.16.

(37) Pleshakova E, Dubrovskaya E, Turkovskaya O. Efficiencies of introduction of an oil-oxidizing *Dietzia maris* strain and stimulation of natural microbial communities in remediation of polluted soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008; 44(4):389-95.

(38) Kim KK, Jin L, Yang HC, Lee S-T. Halomonas gomseomensis sp. nov., Halomonas janggokensis sp. nov., Halomonas salaria sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2007; 57(4): 675-81.

(39) Rafael R, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A. Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of Halomonas salaria and Chromohalobacter salarius to the genus Salinicola as Salinicola salarius comb. nov. and Salinicola halophilus nom. nov., respectively. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010; 60(4): 963-71.

(40) Olivera NL, Nievas ML, Lozada M, del Prado G, Dionisi HM, Siñeriz F. Isolation and characterization of biosurfactant-producing Alcanivorax strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. *Research in microbiology*. 2009; 160(1): 19-26.

(41) Lal D, Gupta SK, Schumann P, Lal R. *Microbacterium lindanitolerans* sp. nov., isolated from hexachlorocyclohexane-contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010; 60(11): 2634-8.

(42) Shivaji S, Bhadra B, Rao RS, Chaturvedi P, Pindi PK, Raghukumar C. *Microbacterium indicum* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment sample from the Chagos Trench, Indian Ocean. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2007; 57(8): 1819-22.

(43) Dutra ES, Pascon RC, Vallim MA. So Paulo Zoo composting as a source of bacteria with bioremediation potential. *African Journal of Microbiology Research*. 2013; 7(45): 5200-6.

(44) Schippers A, Bosecker K, Spröer C, Schumann P. Microbacterium oleivorans sp. nov. and Microbacterium hydrocarbonoxydans sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2005; 55(2): 655-60.

(45) Wang W, Wang L, Shao Z. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island. *Microbial ecology*. 2010; 60(2): 429-39.

[1]- Bioremediation
[2]- Biostimulation
[3] Bioaugmentation
[4]- Synergistic
[5]- Bushnell Haas (BH)
[6]- Bradford
[7]- Coomassie Brilliant Blue G-250
[8]- Bovine serum albumin (BSA)
[9]- Hucker
[10]- Baron
[11]- Marmur
[12]- Polymerase Chain Reaction (PCR)
[13]- Dastgheib
[14]- Riis
[15]- Sharma
[16]- Bento
[17]- Kim
[18]- Rafael
[19]- Olivera
[20]- Xenobiotic

# Isolation of halophilic microbial consortia capable of degrading diesel oil for the bioremediation of drilling wastes

**Maryam Rezaei Somee**
M.Sc. of Microbial Biotechnology, Extremophiles Laboratory, University of Tehran, Iran, m_rezaei90@ut.ac.ir
**Mohammad Ali Amoozegar** *
Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
**Mahmoud Shavandi**
Assistant Professor of Biotechnology, Microbiology and Biotechnology Group, Research institute of petroleum industry (RIPI), Tehran, Iran, shavandim@ ripi.ir
**Seyed Mohammad Mehdi Dastgheib**
Assistant Professor of Biotechnology, Microbiology and Biotechnology Group, Research institute of petroleum industry (RIPI), Tehran, Iran, mehdi.dastgheib@gmail.com

## Abstract

**Introduction:** drilling for exploration and production of petroleum requires the use of drilling fluid in order to lubricate and cool the drill bit. Oil based muds (OBMs) containing diesel, are the preferred drilling fluids because of their better lubricity. After mixing with drill cuttings, OBMs form complex industrial wastes containing hydrocarbons and brine. Bioremediation can be considered as a promising alternative to physicochemical methods for cleaning up drilling wastes because of its environmental friendly and cost effective properties. Due to high salinity and lack of active microflora in drill cuttings, developing halophilic consortia could be beneficial for enhancing bioremediation efficiency.

**Materials and methods:** different oil-polluted and unpolluted saline soil and water samples have been used to enrich halophilic consortia able to degrade diesel hydrocarbons using a multistep enrichment technique. The growth capability of diesel-degrading consortia was evaluated by Bradford protein assay and standard plate count and growth curves were plotted. Furthermore, dominant strains of the consortia which were isolated from oil polluted saline soils were identified by molecular method.

**Results:** Among 10 microbial consortia isolated from different environments, the best consortium was isolated from Qom oil-polluted soil sample which could grow very well on Bushnell Haas mineral medium containing diesel as the sole source of carbon. The bacterial count of the consortium was increased up to $1.88\times10^{15}$ CFU/ml after 96h of incubation. Comparison of the growth curves indicated that in comparison to unpolluted samples, polluted ones reached the logarithmic phase more quickly and the final turbidity was more. 16S rRNA gene sequencing analysis revealed that the dominant strains of consortia isolated from oil polluted saline soil samples belonged to the genera of *Dietzia*, *Microbacterium* and *Salinicola*.

**Discussion and conclusion:** Due to long term exposure of the polluted samples to oil pollution and high salinity, they have naturally been enriched by bacterial communities capable of degrading oil derivatives such as diesel in extreme conditions.

**Key words:** Halophilic consortia, Oil-based muds, Diesel oil, Bioremediation, Drill cuttings

* Corresponding author
**Received:** March 13, 2016/ **Accepted:** May 31, 2015