فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۱ ، بهار ۱۳۹۱، صفحه ۳۱-۴۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۴/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۷/۱۸

جداسازی، شناسایی مولکولی *Alcanivorax dieselolei* از خلیج فارس و بررسی قابلیت تجزیه زیستی آن برای پاک‌سازی آلودگی نفتی

مهدی حسن شاهیان: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کرمان، ایران، mshahi@uk.ac.ir
گیتی امتیازی: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، emtiazi@yahoo.com*

چکیده

مقدمه: آلودگی نفتی در محیط‌های دریایی، مسأله‌ای جهانی است. میکروب‌های تجزیه کننده هیدروکربن دریایی اجباری اخیراً شرح داده شده اند. یک عضو اصلی از این خانواده *Alcanivorax* بوده که در محیط‌های دریایی پس از دو هفته از نشت نفت غالب می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، ابتدا از مناطق آلوده به نفت در خلیج فارس نمونه برداری شد. باکتری‌ها در محیط ONR7a غنی سازی شدند و کلنی‌ها روی محیط مارین اگار خالص‌سازی شدند. تمام کلنی‌ها برای قابلیت تجزیه نفت خام غربال‌گری شدند. شناسایی مولکولی با تکثیر ژن 16S rDNA و تعین توالی انجام شد.

نتایج: در مجموع ۱۱ کلنی که قادر به تجزیه نفت خام بودند، جداسازی شدند. سویه‌های PG-24 و PG-12 رشد بالاتری روی نفت خام نشان دادند. شناسایی مولکولی همسانی ۹۹ درصد با *Alcanivorax dieselolei* از این دو سویه را نشان داد. این دو سویه قادر به رشد روی هیدروکربن‌های الیفاتیک بودند و بالاترین رشد روی C_{16} و C_{18} مشاهده شد. تجزیه نفت خام به‌وسیله این دو سویه ۸۵ درصد پس از پنج روز بود.

بحث و نتیجه‌گیری: این اولین گزارش از جداسازی جنس *Alcanivorax* در خلیج فارس است. مطالعه بیشتر این باکتری‌ها و بهینه سازی تجزیه آلودگی‌های نفتی می‌تواند نقش مهمی در تعدیل آلودگی نفتی خلیج فارس ایفا نماید.

واژه‌های کلیدی: تجزیه زیستی، *Alcanivorax*، بهینه سازی، آلودگی نفتی، خلیج فارس

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

هیدروکربن‌های نفتی ذخایر انرژی مهمی هستند که کاربردهای زیادی در صنعت و حتی در زندگی روزانه ما دارند. در عین حال، نفت منشأ آلودگی مهم محیط است. متعاقب رهاسازی نفت در محیط، تبدیل آن به ترکیبات سازنده خیلی سریع شروع می‌شود. روش‌های مرسوم برای جلوگیری از نشت نفت عمدتاً روش‌های فیزیکی شیمیایی هستند که عبارتند از: استفاده از مواد منعقد کننده، رویه برداری و غیره. روش‌های زیستی دارای مزایایی نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی در حذف نشت نفت هستند؛ به‌طوری‌که آن‌ها تجزیه زیستی درونی بخش‌های نفت به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها را میسر می‌سازند. (۱، ۲ و۳).

تجزیه زیستی مشتقات نفتی در محیط‌های آلوده مؤثرتر، قوی‌تر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر از روش‌های فیزیکی شیمیایی است. میزان تجزیه زیستی وابسته به غلظت، طول آلکان‌ها، بیوسورفکتانت و نوع میکروارگانیسم است. ترکیبات اشباع نفت خام و بویژه آلکان‌های با طول زنجیره متوسط، سریع‌تر تجزیه می‌شوند (۴). میزان تجزیه و معدنی شدن ترکیبات آلی وابسته به غلظت ترکیبات است، به‌طوری‌که غلظت بالایی از هیدروکربن به‌وسیله محدود کردن مواد غذایی و اکسیژن یا از طریق تأثیرات سمی ایجاد شده به‌وسیله هیدروکربن‌های فرار از تجزیه زیستی ممانعت می‌کند. رشد میکروارگانیسم‌ها روی هیدروکربن‌ها اغلب با انحلال منابع کربن نامحلول در محیط کشت همراه است و در بیشتر موارد، با تولید عوامل انحلال کننده خارج سلولی در طی شکست هیدروکربن‌ها همراه است. این فرایندها به رشد میکروارگانیسم روی نفت خام و شکست آن به اجزای کوچک‌تر کمک می‌کند (۵ و ۶).

طی چند سال اخیر، تلاش‌هایی برای جداکردن میکروب‌های دریایی با کشت آب دریا بر روی سوبستراهای هیدروکربنی صورت گرفته و باکتری‌های جدیدی از بیشتر نواحی جهان جدا شده است. چنین باکتری‌هایی الیگوتروف‌های کند رشد هستند و از نظر ماده غذایی مورد مصرف، محدود بوده، تنها قادر به استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی هستند. این باکتری‌ها را باکتری‌های دریایی تجزیه کننده نفت اجباری یا هیدروکربنوکلاستیکوس می‌نامند که نقش مهمی در حذف بیولوژیک هیدروکربن‌های نفتی از آب‌های دریای آلوده دارند. *Alcanivorax borkumensis* در سال ۱۹۹۸ از رسوبات دریای شمال که در مرز هلند- آلمان واقع است، جدا شد (۷). *Borkum* جزیره کوچکی است که در بندر Elms درنزدیکی دریای شمال واقع است. بعدها این باکتری در بسیاری از نواحی ساحلی و دریایی جهان، مثل دریای مدیترانه، اقیانوس آرام، دریای ژاپن و چین نیز مشاهده شد. *A. borkumensis* یک باکتری دریازی است که قادر به رشد بر روی طیف محدودی از سویستراهاست، که عمدتاً سوبسترای آن آلکان‌ها هستند (۸).

هدف از این تحقیق، بررسی وجود جنس *Alcanivorax* در خلیج فارس و جداسازی آن است. پس از جداسازی، هدف این است که قابلیت تجزیه زیستی آن برای حذف و پاک‌سازی آلاینده‌های نفتی سنجیده شود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام، رسوبات آلوده و نمونه‌های آب دریا از خلیج فارس جمع آوری شد. نمونه‌های رسوبات از عمق ۱ تا ۱۲ سانتی‌متر سطح ساحل با استفاده از چاقوی استریل به‌دست آمد. نمونه‌های آب دریا از عمق ۱۵ سانتی‌متر در بطری‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری جمع آوری شد و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد (۹).

جداسازی *Alcanivorax* از آب و رسوبات دریا

برای جداسازی جنس *Alcanivorax* میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب دریا و پنج گرم از رسوبات با ۳ میلی‌لیتر از نفت خام همراه با ۵۵/. گرم از گرانولر نیتروژن و ۱/. گرم از گرانولر فسفات در محیط ONR مخلوط شد. ارلن‌ها روی شیکر با دور ۶۰rpm و دمای ۱۵ درجه سانتیگراد به مدت یک ماه انکوبه شدند. پس از یک ماه میزان یک میلی‌لیتر از این محیط به محیط ONR جدید منتقل شده، پس از دو پاساژ متوالی کلنی‌ها روی محیط مارین آگار (MA) خالص سازی شدند. ترکیبات محیط ONR در یک لیتر به شرح زیر است: به‌علت ایجاد رسوب باید این محیط در دو محلول جداگانه ساخته شود و پس از اتوکلاو با همدیگر مخلوط شوند. منبع کربن محیط نفت با غلظت (یک درصد) است. محلول اول شامل: NaCl (۲۳ گرم)، Na_2SO_4 (۳/۸ گرم)، KCl (۰/۷۲)، NaBr (۸۳ میلی گرم)، $NaHCO_3$ (۳۱ میلی گرم.)، H_3BO_3 (۲۷ میلی گرم)، NaF (۲/۶ میلی گرم)، NH_4Cl (۲۷/. گرم)، Na_2HPO_4 (۸۹ میلی گرم) محلول دوم شامل: $MgCl_2$ (۱۱/۱۸ گرم)، $CaCl_2$ (۱/۴۶ گرم)، $SrCl_2$ (۲۴ میلی گرم)، $FeCl_2$ (۲ میلی گرم)، TAPSO (۱/۳ گرم). اسیدیته محیط برابر با ۷/۶ تنظیم شد (۱۰).

شناسایی *Alcanivorax*

کلنی‌های جداسازی شده بر روی محیط مارین آگار ابتدا با روش‌های بیوشیمیایی غربال‌گری اولیه شدند. آزمایش‌های بیوشیمیایی که برای شناسایی این جنس استفاده شدند، عبارتند از: رنگ آمیزی گرم، آزمایش احیای نیترات، اکسیداز، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین و آزمایش استفاده از قندهایی از جمله مانیتول، مانوز و ساکاروز.

کلنی‌های غربال‌گری شده با روش مولکولی مورد شناسایی دقیق‌تر قرار گرفتند. بدین منظور، ابتدا استخراج DNA از باکتری‌ها با استفاده از کیت شرکت کیاژن طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن 16S rDNA انجام گردید. توالی این پرایمرها عبارت است از: پرایمر برگشتی Uni_1492R 5′ -TACGYTACCTTGTTACGACTT- 3′ و پرایمر رفت Bac27_F 5′ -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3′ واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. غلظت مواد مصرف شده در PCR شامل بافر PCR (۲۰mM Tris و ۵۰mM KCl)، $MgCl_2$ (۲ mM)، پرایمر رفتی و برگشتی ۰/۱۲ µM، آنزیم Taq (۱ U)، dNTP (۲۰۰µM) و DNA الگو میزان ۳۰ نانوگرم بود. برنامه PCR شامل دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ است. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس باند bp ۱۴۰۰ از ژل آگاروز

طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست[1] شده، همولوژی آن‌ها بررسی شد و قرابت بالاتر از ۹۸ درصد به‌عنوان جنس و گونه باکتری مجهول لحاظ شد (۱۱).

سنجش رشد و حذف نفت خام

منحنی رشد ایزوله‌ها به‌طور غیرمستقیم با اندازه‌گیری کدورت در ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتری سنجش شد. میزان حذف نفت خام به‌وسیله حل کردن مقدار نفت باقیمانده محیط کشت در دی کلرومتان و سپس خواندن کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین شد (۱۲). هر یک از آزمایش‌های دارای سه تکرار بوده اند و اعداد گزارش شده میانگین سه عدد هستند.

سنجش میزان تجزیه نفت با روش گاز کروماتوگرافی

قبل از آغاز آزمایش و تلقیح باکتری‌ها به محیط نفت براث میزان ۱/. میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از Epta MetilNonano به‌عنوان استاندارد درونی به نفت خام اضافه شد. در انتهای دوره انکوباسیون (۷ روز) میزان ۵۰ میلی‌لیتر دی کلرو متان[2] (DCM) به ارلن حاوی کشت باکتری و نفت اضافه گردید. DCM بخوبی با محیط نفت براث مخلوط شد و درون قیف جداکننده ریخته شد تا دو فاز آلی و آبی از هم جدا شوند. سپس فاز آلی که حاوی نفت حل شده در DCM بود، درون ارلن ریخته و سه گرم سدیم سولفات برای جذب آب باقیمانده به ارلن اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد. سپس محتویات ارلن از کاغذ واتمن شماره ۲ عبور داده شد و درون تبخیر کننده گردشی برای تبخیر DCM قرار گرفت. پس از تبخیر DCM میزان ۱۰ میلی‌لیتر هگزان نرمال به نفت اضافه شد و توسط دستگاه GC (در کشور ایتالیا) تحلیل شد. برنامه GC بدین صورت بود: ستون: Hewlett Packard Rona Fused Silica Capillary (30 m × 0.32 mm × 0.25 mm)، دتکتور: FID، گاز حامل: هلیم، دمای اولیه:

۱۰۰ درجه سانتیگراد برای سه دقیقه، دمای انتقال: ۳۰۰ درجه سانتیگراد، دمای تزریق: ۳۳۰ درجه سانتیگراد، دمای نگهداری ستون: ۲۴۰ درجه سانتیگراد برای ۵۰ دقیقه، دمای نهایی: ۳۲۰ درجه سانتیگراد و جریان عبوری ۷/. میلی‌لیتر بر دقیقه، پیک‌های حاصل از GC با استاندارد درونی مقایسه شد و درصد تجزیه برای هر سویه محاسبه شد (۱۳ و ۱۴).

نتایج

جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام

۲۵ سویه باکتریایی تجزیه‌کننده نفت خام از رسوبات و آب خلیج فارس جداسازی شد. در بین آن‌ها چهار کلنی که به خصوصیات باکتری *Alcanivorax* شباهت زیادی داشتند، برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. این چهار کلنی شامل سویه‌های PG-12, PG-11, PG-24 و PG-31 بودند. خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی این چهار سویه در جدول ۱ آمده است. همه این سویه‌ها گرم منفی، میله‌ای، با قابلیت بالای رشد در غلظت نمک بالا، اکسیداز مثبت و احیای نیترات مثبت بودند. شباهت بیوشیمایی دو سویه PG-24 و PG-12 به همدیگر بیشتر از PG-11 و PG-31 بود.

جدول ۱- نتیجه تست های بیوشیمیایی برای سویه های PG-12, PG-11, PG-31, PG-24

PG-12	PG-11	PG-31	PG-24	نوع تست بیوشیمیایی
Negative	Negative	Negative	Negative	Gram Staining
Rod	Rod	Rod	Rod	Morphology
+	+	+	-	Growth at 4°C
-	-	-	+	Growth at 45°C
3–5	3–8	3–8	3–6	Optimal NaCl (%)
15	32.5	32.5	20	Maximal NaCl (%)
+	+	+	+	Nitrate reduced to nitrite
+	+	+	+	Oxidase test
-	-	-	-	Arginine dihydrolase
-	+	+	-	Ornithine decarboxylase
-	-	-	-	Gelatin liquefaction
-	-	-	-	Starch hydrolysis
-	+	+	-	Lysine decarboxylase
-	+	+	-	Urease activity
-	+	+	-	Utilization as sole carbon source:
-	+	+	-	L-Alanine
-	+	+	-	L-Arginine
-	+	+	-	Aspartate
-	+	+	-	D-Glucose
-	+	+	-	L-Glutamate
-	+	+	-	Glycerol
-	+	+	+	Hexadecane
-	+	+	-	d-Mannitol
+	+	+	+	d-Mannose
-	-	-	-	Succinate
+	-	-	-	Sucrose

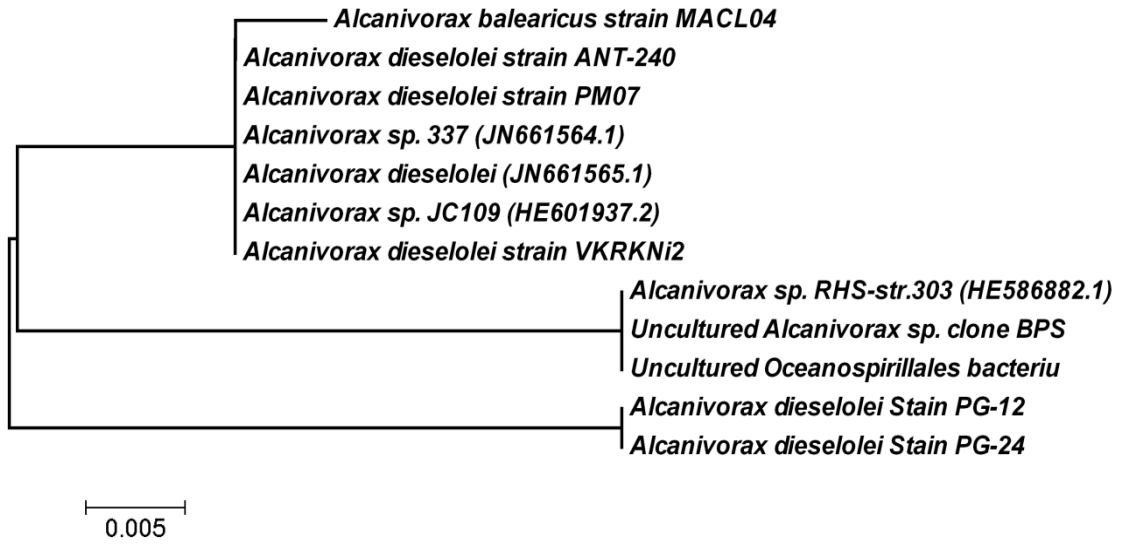
شناسایی مولکولی جنس *Alcanivorax*

شناسایی مولکولی سویه‌های انتخاب شده در غربال‌گری بیوشیمیایی با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی 16S rDNA با پرایمرهای ویژه این ژن انجام شد. سپس محصول ۱۴۰۰ bp حاصل از PCR از ژل استخراج، خالص‌سازی و تعیین توالی شد. توالی حاصله در بانک‌های ژنی بلاست شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از ۹۸ درصد) به‌عنوان جنس و گونه باکتری تعیین شد.

نتایج حاصل از شناسایی مولکولی با توالی حاصل در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که در جدول دیده می‌شود، دو سویه PG-24 و PG-12 به‌عنوان *Alcanivorax dieselolei* از بین چهار سویه انتخابی شناسایی شدند. فیلوژنی و قرابت این دو سویه در شکل ۱ آمده است.

جدول ۲- شناسایی مولکولی سویه های جداسازی شده

نام سویه	توالی	شناسایی سویه	شماره دستیابی	درصد شباهت
PG-12	TACACACGTGCTACAATGGcTAGTACAGAGGGT TGCGAAGTCGCGACGCGGAGCTATCTCTTAA GCCAATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG CGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG CCTTGTACACACCGCCCGTCACaCCATGGG AGTGGAGGgaCACCAGAAGTccTTAGTGTAAC	*Alcanivorax dieselolei* Strain PG-12	FM957534	۹۹
PG-24	TGGTGCTTTCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGT GTGTACAAGGCCCGGCAACGTATTCACCGTG ACATTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGAC TTCACGGAGTCTAGTTGCAGACTCCGATCCGG ACTGAGACCGGGCTTTATGAAATTTAGCTCCAC CTTGGGGGTTGCCACCCTTGTACTAGCCATCG GACACAGGTTGCAGGAGTGGGGA	*Alcanivorax dieselolei* Strain PG-24	FM957534	۹۸



شکل۱- فیلوژنی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده در مقایسه نزدیکی آن‌ها با سویه استاندارد.

این درخت با استفاده از توالی‌های مناطق قابل مقایسه منطقه ژنی 16S rRNA موجود در بانک ژنی ساخته شده است. مقیاس نشان داده شده بیانگر تفرق توالی‌ها است. اطلاعات توالی موقعیت *A. dieselolei* PG-12 و *A. dieselolei* PG-24 را نشان می‌دهد.

رشد و حذف نفت خام به‌وسیله ایزوله‌ها

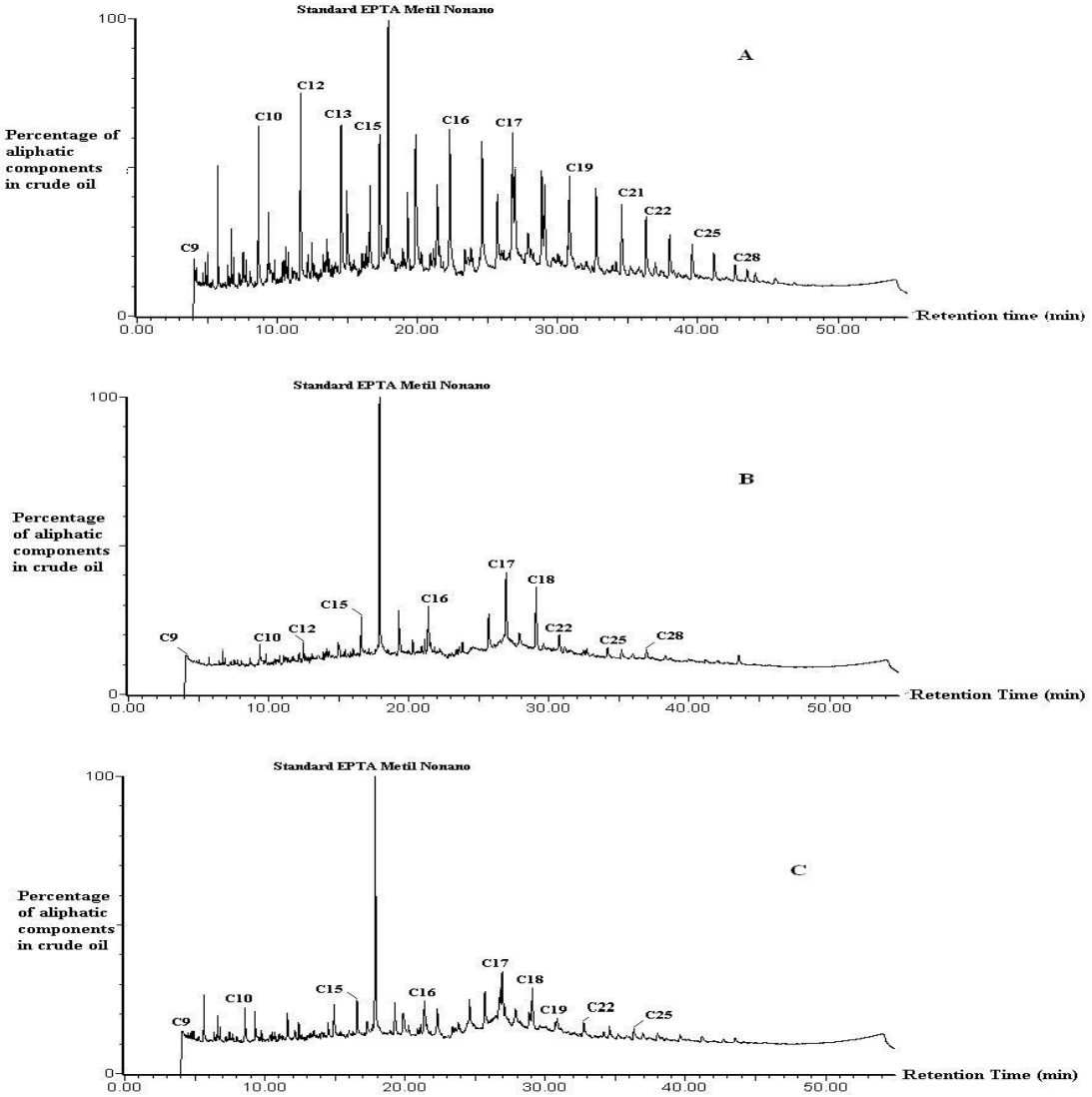
هر چهار سویه بر روی غلظت‌های (یک درصد) نفت خام رشد داده شدند. پس از یک هفته میزان رشد و حذف نفت خام به‌وسیله سویه‌ها به روش اسپکتروفتومتری سنجش شد. نتایج حاصله در جدول ۳ آمده است. سویه‌های PG-24 و PG-12 قابلیت رشد و حذف نفت بالاتری نسبت به سویه‌های PG-11 و PG-31 داشتند.

جدول ۳- میزان رشد و حذف نفت خام بوسیله سویه های جداسازی شده

نام سویه	میزان رشد (جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر)	میزان حذف نفت
PG-11	./۵۴	۵۲ درصد
PG-12	./۷	۷۱ درصد
PG-31	./۴	۶۱ درصد
PG-24	/۴۸۲	۶۸ درصد

نتایج حاصل از میزان حذف نفت خام به‌وسیله دو سویه *Alcanivorax dieselolei* جداسازی شده با روش گاز کروماتوگرافی

برای اینکه معین شد که چه بخشی از نفت به‌وسیله هر سویه مصرف شده است و چه ترکیباتی کاهش بیشتری پس از دوره انکوباسیون تجزیه زیستی داشته‌اند، تحلیل گاز کروماتوگرافی از نفت باقیمانده در محیط کشت برای هر سویه انجام شد. نتایج حاصله در شکل ۲ آمده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، سویه *A. dieselolei* PG-12 قابلیت حذف نفت بیشتری نسبت به سویه *A. dieselolei* PG-24 دارد و طیف گاز کروماتوگرافی نیز نسبت به شاهد کاهش بیشتری داده است.



شکل ۲- طیف‌های گاز کروماتوگرافی حاصله از تجزیه زیستی نفت خام به‌وسیله دو سویه *A. dieselolei* جداسازی شده . نمونه (A): شاهد بدون حضور باکتری تجزیه کننده نمونه (B): *A. dieselolei* PG-24 نمونه (C): درصد تجزیه هر یک از آلکان‌ها حاضر در نفت خام توسط سویه‌های *A. dieselolei*

با محاسبه سطح زیر منحنی از طیف‌های گاز کروماتوگرافی حاصل شده برای هر سویه و کسر نمودن هر پیک آلکانی از استاندارد درونی (Epta Metil Nonano) درصد تجزیه هر یک از آلکان‌ها حاضر در نفت خام توسط سویه‌های تجزیه کننده به‌دست آمد. نتایج در جدول ۴ نشان داده شده است. اعداد موجود در جدول درصد تجزیه هر یک از آلکان‌ها را بر حسب سویه بازگو می‌کند. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود، با افزایش عدد کربن آلکان میزان تجزیه کاهش یافته است و از طرف دیگر، سویه *A. dieselolei* PG-12 قابلیت حذف آلکان‌ها را به‌صورت بهتری نسبت به سویه *A. dieselolei* PG-24 دارد.

جدول۴- درصد تجزیه آلکان‌های موجود در نفت خام به وسیله دو سویه *Alcanivorax* جداسازی شده

باکتری‌ها به مدت یک هفته در محیط ONR7a در دمای ۳۰ درجه و با سرعت همزنی ۱۵۰ RPM انکوبه شدند. میزان تجزیه آلکان‌ها با روش گاز کروماتوگرافی تعین شد.

آلکان / سویه	کنترل	سویه PG-24	سویه PG-12
C9	20	100	100
C10	22	100	100
C11	18	100	100
C12	20	100	100
C13	17	100	100
C14	15	100	100
C15	10	100	100
C16	7	100	100
C17	6	64	79
C18	0	60	77
C19	0	54	79
C20	0	42	68
C21	0	51	62
C22	0	41	60
C23	0	40	55
C24	0	38	43
C25	0	35	40

بحث و نتیجه‌گیری

میلیون‌ها لیتر نفت از منابع طبیعی و ساخت دست بشر هر ساله وارد محیط می‌شوند. ورودی از تراوش نفت به محیط دریایی به تنهایی کافی است که همه اقیانوس‌های جهان را با لایه ای به ضخامت ۲۰ مولکول نفت بپوشاند. باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی حدود یک قرن قبل جداسازی شدند. در بازنگری اخیر ۷۹ جنس باکتریایی شناخته شده‌اند که می‌توانند از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند. همین‌طور ۹ سیانوباکتری، ۱۰۳ قارچ و ۱۴ جنس جلبک یافت شده‌اند که قادر به تجزیه هیدروکربن‌ها هستند (۱۵). پژوهشگران متعددی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام را از محیط‌های گوناگون اعم از محیط‌های خشکی و دریایی جداسازی نمودند. از جمله اکوسیستم‌های خشکی می‌توان به تحقیق ایجاه[3] اشاره کرد (۱۶). آن‌ها در تحقیق خود ۲۰ باکتری تجزیه کننده نفت خام و ۱۰ سویه مخمری را از خاک‌های آلوده به نفت در نیجریه جداسازی نمودند. تحقیق آن‌ها اثبات‌کرد که میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده محدود به خاک‌های آلوده به نفت نیستند (۱۶).

مثال دیگر از محیط‌های خشکی مربوط به تحقیق چایلان[4] و همکاران است. این محققان از خاک‌های آلوده به نفت و توده سیانوباکتری در اندونزی تعداد ۸ باکتری، ۲۱ قارچ و ۴ مخمر تجزیه کننده نفت جداسازی نمودند. جنس‌های باکتریایی جدا شده عمدتاً متعلق به جنس‌های *Gordonia, Brevibacterium, Burkholderia* و *Mycobacterium* و جنس‌های مخمری شامل *Candida, Yarrowia* و *Pichia* بودند (۱۷).

علی‌رغم فراوانی هیدروکربن‌ها در سیستم‌های دریایی که از نشت نفت و تخلیه گاز طبیعی و از حوادث اشتعال نفت در دریا نشأت می‌گیرد، باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های دریایی به میزان کمی بررسی شده‌اند (۱۷). در این‌جا به برخی تحقیقات که بر روی محیط‌های دریایی انجام شده است، اشاره می‌شود.

روی[۵] و همکاران باکتری‌های تجزیه کننده نفت را در آب‌های ساحلی منطقه Sunderban هند شرح دادند (۱۸). سنجش‌های باکتریولوژیک روی نمونه‌های آب سطحی از این منطقه نشان داد که دو درصد از باکتری‌های هتروتروف قابل کشت در روی محیط مارین آگار قادر به استفاده از هیدروکربن‌ها به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی هستند. آن‌ها در تحقیق خود ۷ سویه باکتریایی از این محیط دریایی جداسازی نمودند که به جنس‌های *Pseudomonas, Mycobacterium, Acinetobacter, Micrococcus, Nocardia* تعلق داشتند (۱۸).

برخلاف تجزیه کننده‌های هیدروکربن خشکی زی که از نظر متابولیکی قوی بوده، دامنه سوبسترایی وسیعی را نشان می‌دهند، تجزیه کننده‌های دریازی، به‌ویژه نوع شورپسند (HCB) بسیار اختصاصی بوده، به‌شکل اجباری تنها از هیدروکربن‌ها استفاده می‌کنند (۱۸). مفهوم باکتری‌های HCB ابتدا به‌وسیله یاکیمو[۶] و همکاران با جداسازی *A. borkumensis* از جزیره Borkum آلمان ارایه شد (۷). پس از شرح این باکتری گونه‌های دیگری از آن در سایر نقاط جهان شرح داده شدند و مشخص شد که باکتری *Alcanivorax* یک باکتری جهانی است. جنس‌های دیگری از باکتری‌های HCB در سال‌های بعد شرح داده شدند، به‌طوری که گلیشین[۷] و همکاران جنس *Oleiphilus* (از لنگرگاه مسینا، ایتالیا)، مرکوز[۸] و همکاران جنس *M. hydrocarbonoclasticus* (از منطقه نفتی دریایی جنوب ویتنام) و یاکیمو و همکاران جنس *Thalassolituus* را از منطقه نفتی میلازو (ایتالیا) جداسازی نمودند (۱۹، ۲۰ و ۲۱).

در تحقیق حاضر، چهار سویه باکتری شورپسند تجزیه کننده نفت (HCB) از خلیج فار س جداسازی شد که دو سویه در جنس *Alcanivorax* قرار گرفتند. این سویه‌ها قادر به تجزیه نفت خام، تنها در حضور NaCl بودند که با خصوصیات شرح داده شده برای باکتری‌های HCB به‌وسیله سایر محققان همخوانی دارد.

گونه باکتری *Alcanivorax* جداسازی شده در این تحقیق پس از تعیین توالی مشخص شد که متعلق به *A. dieselolei* است. این اولین گزارش از جداسازی جنس *Alcanivorax* در خلیج فارس و ایران است. این گونه ابتدا به‌وسیله لیو[۹] و همکاران شرح داده شد. این محققان باکتری *A. dieselolei* را از آب‌های آلوده به نفت دریای Bohai چین جداسازی نمودند (۲۲).

References

(1) Ijah UJJ. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Manage* 1998; 18(5): 293–9.

(2).Luis Y, Mara E, Corbella M, Turie¨gano UK, Antonio P, Fernando R. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbio Ecol* 2000, 32(1): 69-75.

(3). Vinas M, Grifoll M, Sabate J, Solanas A. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *J Indus Microbiol & Biotech* 2002; 28(5): 252 –60.

(4). Hanson KG, Anuranjini N, Madhavi K, Anjana JD. Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp A3. *Curr Microbiol* 1997; 35(3): 191–193.

(5).Burns KA, Codi S, Swannell RJP, Duke NC. Assessing the oil degradation potential of endogenous microorganisms in tropical marine wetlands. *Mangr Salt Marsh* 1999; 3, 67-83.

(6).Manee P, Prayad P, Edward S, Upatham A, Ladda T. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodeg* 1998; 9: 83–90.

(7).Yakimov M, Peter N, Siegmund L. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant- producing marine bacterium. *Inter J System Bacteriol* 1998; 48: 339–48.

(8) Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotech* 2007; 18(3): 257-66.

(9) Hasanshahian M, Emtiazi G. Investigation of alkane bipdegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *Int Biodeter Biodegr* 2008; 62(2): 170-178.

(10). Hasanshahian M, Emtiazi G. Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar Pollut Bull* 2012a; 64(1): 7–12.

(11).Hassanshahian M, Emtiazi G, Kermanshahi R, Cappello S. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. *Soil Sediment Contam* 2010 19(3): 277-91.

(12).Emtiazi G, Hassanshahian M, Golbang N. Development of a microtiter plate method for determination of phenol utilization, biofilm formation and respiratory activity by environmental bacterial isolates. *Int Biodeter Biodegr* 2005; 56: 231-5.

(13) Emtiazi G, Saleh T, Hassanshahian M. The effect of bacterial glutathione S-transferase on morpholine degradation. *Biotech* J 2009 ; 4: 202–5.

(14) Ghanavati H, Emtiazi G, Hassanshahian M. Synergism effects of phenol degrading yeast and Ammonia Oxidizing Bacteria for nitrification in coke wastewater of Esfahan Steel Company. *Waste Manage Res* 2008; 26(2): 203-8.

(15).Head IM, Jones DM, Roling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Natu Rev Microbio* 2006; 4(3): 173–182.

(16).Watanabe K, Hamamura N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *CurrOpin Biotech* 2003; 14(3): 289-95.

(17).Chaillan F, Le FA, Bury E, Phantavong YH, Grimont P, Saliot A, Oudot j. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbio* 2004; 155(7): 587-95.

(18).Roy S, Dipak H, Debabrata B, Dipa B, Ranajit K. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of sunderban biosphere reserve World *J Microbio Biotechno* 2002; 18: 575–581.

(19).Golyshin P, Tatiana N, Chernikova W, Abraham H, Timmis K, Yakimov MM. Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Inte J System Evol Microbio* 2002; 52: 901–911.

(20).Marquez MC, Ventosa A. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier et al. 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms. *Inter J System Evol Microbio* 2005; 55: 1349–51.

(21) Yakimov MM, Giuliano L, Denaro R, Crisafi E, Chernikova T, Abraham W, Timmis K, Golyshin, P. *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligatory utilizes hydrocarbons. I*nter J System Evol Microbio* 2004; 54: 141–8.

(22) Liu C, Zongze S. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *Inter J System Evol Microbio* 2005; 55: 1181–86.

---

1 . BLAST
2. Dichloromethane
3 . Ijah
4 . Chaillan
5 . Roy
6 . Yakimov
7 . Golyshin
8 . Merquez
9 . Liu

Isolation, and molecular detection of *Alcanivorax dieselolei* in the Persian Gulf and the study of biodegradation ability for remediation of oil pollution

Mehdi Hassanshahian
Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, mshahi@uk.ac.ir
Giti Emtiazi*
Professor of Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, emtiazi@yahoo.com

Abstract

Introduction: Oil pollution in marine environments is a global problem. The Persian Gulf is a specific region because over than 60 % of world crude oil transports through the strait of Hormoz. Obligate marine hydrocarbon-degrading microbes have been recently reported. *Alcanivorax*, a member of this family is predominant in oil polluted sea.

Materials and Methods: In this survey, seawater samples were collected from oil contaminated regions in the Persian Gulf. Bacteria were enriched in ONR7a medium and colonies were purified in marine agar and ONR7a media. All colonies were screened for ability to degrade crude oil. Molecular identification was carried out by amplification of 16S rDNA gene and sequencing analysis. Also, biodegradation of some hydrocarbon and crude oil were analyzed.

Results: Totally, eleven different colonies were isolated that were able to degrade crude oil. Two strains (PG-24 and PG-12) showed higher growth rates on crude oil than other strains. Molecular identification showed 99% homology of these two strains with *Alcanivorax dieselolei*. These two strains could grow on aliphatic hydrocarbon and the highest growth rates were observed on C_{16} and C_{18} substrates, also 80 % of crude oil was degraded.

Discussion and Conclusion: This article is the first report on isolation of *Alcanivorax* genus from the Persian Gulf, thereby further studies and optimization of biodegradation of oil pollution by these bacteria are important for modulate oil pollution in the Persian Gulf.

Key words*:* Biodegradation, *Alcanivorax*, Optimization, Oil pollution, Persian Gulf

* Corresponding Author