جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی برخی از باکتریهای تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاکهای آلوده در منطقه بوشهر

میترا ابراهیمی[1]، علیرضا فلاح[2]، محمدرضا ساریخانی[3]، محمدطاهر نظامی[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه آزاد واحد کرج

2- استادیار خاکشناسی – بخش بیولوژی خاک – موسسه تحقیقات آب و خاک تهران

3- استادیار گروه خاکشناسی (بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک)- دانشکده کشاورزی- دانشگاه تبریز

4- استاد یار گروه خاکشناسی – دانشکده کشاورزی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
(mtrr_ebrahimi@yahoo.com)

چکیده

در کشور ایران به دلیل مصرف بالای مواد نفتی، آلودگی به مواد نفتی یکی از معضلات اساسی می‌باشد. به محض ورود این آلاینده‌ها به محیط زیست، بخشی از آلاینده‌ها، که از لحاظ ساختاری شبیه به ترکیبات طبیعی هستند، توسط میکروارگانیسم های موجود در آب و خاک تجزیه می‌شوند. با جداسازی، خالص سازی و شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که قادر به تجزیه زیستی می‌باشند راه برای برطرف ساختن این آلاینده‌ها هموار می‌شود. برای این منظور، غربالگری باکتریهای تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی از نمونه‌های آلوده در محیط حداقل عاری از منبع کربن با جایگزین نمودن گازوئیل به عنوان منبع کربن انجام شد و شناسایی جدایه‌ها با استفاده از کیت‌های تشخیصی و روش مولکولی صورت پذیرفت. در این ارتباط 19 جدایه شناسایی شد که شامل جنس‌ها و گونه‌های باکتریایی *Stenotrophomonas maltophilia*، *Ralstonia* sp.، *Vibrio* sp.، *Zymomonas* sp.، *Sphingobacterium* sp.، *Pseudomonas aeruginosa*، *Paracoccus* sp.، *Pantoea* sp.، *Sphingobacterium* sp.، *Achromobacter xylosoxidans*، *Acinetobacter johnsonii*، *Pseudomonas alcaligenes*، *Entrobacter cloacae*، *Pseudomonas stutzeri*، *Serattia odorifera* و *Chryseobacterium* sp. می‌باشند.

کلمات کلیدی تجزیه زیستی، باکتریهای تجزیه‌کننده نفت، شناسایی مولکولی 16S rRNA

مقدمه

نفت علاوه بر آنکه مهمترین ماده تامین‌کننده انرژی می‌باشد، همچنین به عنوان یکی از بزرگترین آلاینده‌های محیط زیست محسوب می‌شود (مینایی‌تهرانی و همکاران، 1384). گسترش علم و دانش بشر و توجه به بهبود شرایط زیست محیطی و نیز استفاده بهینه از امکانات محیطی، محققین را بر آن داشته تا روشهای مناسبی را برای از بین بردن این آلودگیهای مضر ارزیابی کنند.

زیست پالایی به عنوان راهکاری مناسب جهت اصلاح خاکهای آلوده می‌باشد. زیست پالایی یک اصطلاح کلی جهت رفع آلودگی محیط زیست به وسیله فرایندهای بیولوژیکی و توسط میکروارگانیسم‌ها و خصوصاً باکتری، قارچ، مخمر در خاکها و آبهای آلوده می‌باشد (مینایی تهرانی و همکاران، 1384). برای این منظور جداسازی و غربالگری باکتریهای تجزیه‌کننده مواد نفتی و به دنبال آن خالص‌سازی و شناسایی آنها گامهای نخستین در استفاده بیشتر پتانسیل زیستی خاک در رفع آلاینده‌های نفتی است که در این مقاله به آن پرداخته می‌شود.

مواد و روشها

حدود 20 نمونه خاک از عمق 30-0 سانتیمتر مناطق آلوده به مواد نفتی منطقه بوشهر جمع‌آوری شد. به منظور تهیه سوسپانسیون میکروبی و غنی‌سازی باکتریهای موجود در نمونه نفتی از محیط CFMM (Supaka etal., 2001) به

صورتی که در زیر شرح داده می‌شود استفاده شد. 1 گرم خاک آلوده درون 25 میلی لیتر از محیط فوق در شرایط استریل درون ارلن مایر اضافه گردید و در شرایط دمای 28 درجه سانتیگراد و با دور 150 rpm انکوبه شد. بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی اولیه به منظور غنی‌سازی کشت میکروبی و جداسازی باکتریها، تلقیح 5 ml از سوسپانسیون میکروبی به 45 میلی‌لیتر از محیط کشت CFMM با 2 درصد از ماده نفتی (گازوئیل) انجام شد. شرایط شیک و دمای انکوباسیون مطابق شرایط فوق بوده و به مدت یک هفته انکوباسیون انجام پذیرفت. با مشاهده کدورت و رشد باکتری به مدت یک هفته، برای جداسازی و خالص‌سازی باکتریهای بومی تجزیه‌کننده مواد نفتی اقدام به تهیه سری رقت از نمونه‌ها گردید و از رقتهای مناسب بر روی پلیت‌های حاوی محیط جامد CFMM به همراه ماده نفتی انتقال داده شد. سپس با مشاهده رشد کلنی باکتری در درون پلیت‌ها با توجه به نوع، شکل و رنگدانه کلنی‌ها اقدام به خالص‌سازی باکتریها شد. در جریان خالص‌سازی باکتریها و کشت آنها از محیط نوترینت آگار استفاده گردید. و در ادامه تستهای ابتدایی بیوشیمیایی نظیر رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی اسپور، آزمایش ایجاد رنگ فلورسانس، تست اکسیداز، تست کاتالاز و انجام برخی تستهای تکمیلی با کیت‌های تشخیصی شرکت Himedia انجام شد. برای استفاده از کیت تشخیص باکتری از کشت تازه باکتریها استفاده گردید، برای این منظور از تک کلنی باکتری کشت شبانه در محیط NB تهیه شد و سپس تلقیح مجدد از رشد شبانه باکتریها در محیط NB جدید انجام پذیرفت تا در مدت 4-3 ساعت OD حاصل از رشد باکتریها به نزدیک 0/8 برسد. سپس 50-40 میکرولیتر از آن بر روی کیت‌ها قرار گرفت. برای بررسی نتایج به مدت 48-24 ساعت در داخل انکوباتور با دمای 28 درجه سانتیگراد قرار گرفت و نتایج حاصله با جدول موجود در کیت مقایسه گردید.

شناسایی مولکولی باکتریها به روش 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R انجام شد (جدول 1). برنامه PCR اعمال شده دارای 30 سیکل بود که به ترتیب شامل، ابتدا یک سیکل اولیه با دمای 95 درجه سانتیگراد به مدت 4 دقیقه، در ادامه دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 1 دقیقه، دمای 53 درجه سانتیگراد (دمای اتصال آغازگر) به مدت 1 دقیقه و دمای تکثیر 72 درجه سانتیگراد به مدت 1 دقیقه که در پایان یک سیکل اضافی دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه نیز در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است برای انجام PCR از تک کلنی باکتری‌ها استفاده شد و بدین طریق از استخراج DNA ژنومی باکتری صرفنظر شد. باندهای مورد انتظار (تقریباً 1500 جفت باز) بعد از ران شدن محصول PCR بر روی ژل آگاروز ریکاوری شدند و خالص‌سازی DNA به کمک کیت Roche انجام پذیرفت. برای انجام همسانه‌سازی و توالی‌یابی DNA از ناقل pTZR57R/T استفاده شد و واکنش اتصال[1] در حضور این ناقل صورت پذیرفت سپس محصول فوق برای تراریختی سلولهای مستعد[2] *E. coli* DH5α استفاده شد. پس از انجام آزمایش‌های تائیدی نظیر کلنی PCR، استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی توالی‌یابی نمونه‌ها انجام پذیرفت (Sambrook and Russell, 2001). بعد از توالی یابی نمونه‌ها، توالی های مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnological Information) Blastn شدند و به بررسی نتایج پرداخته شد.

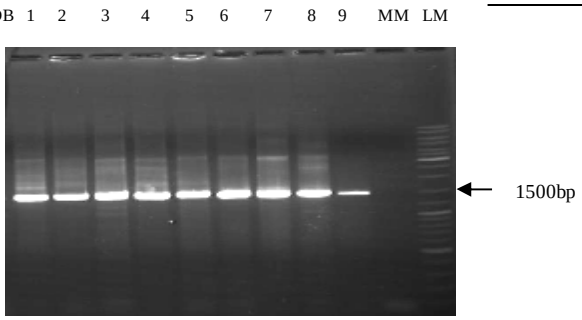
نتایج و بحث

جداسازی و خالص‌سازی باکتریها از 20 نمونه خاک مربوط به خاک‌های‌آلوده منجر به شناسایی 19 جدایه شد. آزمایش‌های اولیه نشان داد که همه باکتریها گرم منفی، بدون اسپور و کاتالاز مثبت هستند و برخی از آنها اکسیداز منفی و مثبت بعلاوه تعدادی دارای قابلیت تولید رنگدانه در محیط king-B می‌باشند. شناسایی مولکولی به روش 16S rRNA انجام پذیرفت که در شکل 1 نمونه‌ای از محصول PCR مربوط به تکثیر ژن رمزکننده این قطعه آورده شده است.

جدول 1- آغازگرهای عمومی به منظور تکثیر بخش 16S rRNA باکتری‌ها.

[1]- Ligation reaction
[2]- Transformation competent cell

نام آغازگر	مشخصات آغازگر	دمای اتصال
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	51Tm:
14		



شکل 1- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن رمزکننده 16S rDNA. نردبان مولکولی با اندازه بین 100 تا 10000 جفت باز (LM)، محلول حاوی تمام اجزاء واکنش به جز DNA باکتریایی (MM) و نمونه‌های باکتری با نام‌گذاری PDB1-9.

علاوه بر روش فوق استفاده از کیت Himedia برای شناسایی باکتریها نیز بهره گرفته شد که در شکل 2 آورده شده است.

شکل 2- نمونه‌ای از کیت شناسایی باکتری Himedia استفاده شده در این آزمایش. تصویر فوقانی قبل از تلقیح و تصویر پائین بعد از تلقیح کشت باکتری می‌باشد.

Supaka و همکاران (2001) با استفاده از محیط کشت CFMM و استفاده از فنانترن به عنوان منبع کربن توانستند باکتری *Sphingomonas* sp. را از خاکهای آلوده به مواد نفتی جداسازی‌نمایند. Heewook و همکاران (2006) با استفاده از محیط کشت حداقل 1BH وگازولین یا روغن دیزل به عنوان منبع کربن در این محیط، باکتری Rhodococcus sp. را از آب‌های زیرزمینی آلوده به مواد نفتی جداسازی نمودند.

Liangli و Hungchen (2009) طی مطالعاتی که داشتند به این نتیجه رسیدند که باکتریهای *Pseudomonas stutzeri* و *Pseudomonas aeruginosa* قادر به تجزیه زیستی فنانترن می‌باشند و باکتریهای *Stenotrophomonas maltophilia* و *Pseudomonas alcaligenes* قادر به تجزیه فلورانتن می باشند. Suseo و همکاران (2009) طی مطالعاتی نشان دادند که باکتری از جنس *Achromobacter* sp. و *Chryseobacterium* sp. قادر به تجزیه زیستی کربازول می‌باشند و باکتری *Pseudomonas stutzeri* قادر به تجزیه پیرن، باکتری *Ralstonia* sp. قادر به تجزیه نفتالین و دی بنزوآنتراسن می‌باشد.

نتیجه‌گیری

[1] Bushnell Hass

اولین گام در بهره‌گرفتن از توان میکروبی خاک برای اصلاح زیستی آلاینده‌های آلی غربالگری و شناسایی آنها می‌باشد. در این تحقیق با اعمال غربالگری باکتریها در محیط حداقل عاری از منبع کربن و جایگزین نمودن آن با مواد نفتی در نهایت موفق به جداسازی و خالص‌سازی 19 سویه شدیم. شناسایی باکتریها به روش مولکولی و تستهای بیوشیمیایی تکمیلی نشان داد که باکتریهای مختلفی جداسازی شده‌اند و شامل طیفی از باکتریهای گرم منفی هستند. در مراحل بعدی مقایسه کارایی آنها در تجزیه مواد نفتی مختلف مورد توجه بوده و بعد از کسب اطمینان از عدم اثرات جانبی منفی آنها (از قبیل بیماریزا بودن) و با در نظر داشتن قابلیت زیست‌پالایی بالای آنها در حذف مواد آلاینده، می‌توان از آنها بهره گرفت.

جدول 2- باکتریهای شناسایی شده و برخی از ویژگیهای آنها.

باکتری	شکل باکتری	تست گرم	تست اسپور	تست اکسیداز	تست کاتالاز	ایجاد Pigment	بعد از تکمیل شناسایی (مولکولی و بیوشیمیایی)
PDB1	کوکوباسیل	-	-	-	+	-	*Stenotrophomonas maltophilia*
PDB2	کوکوباسیل	-	-	+	+	-	*Ralstonia* sp.
PDB3	باسیلی	-	-	+	+	+	*Vibrio* sp.
PDB4	باسیلی	-	-	+	+	-	*Sphingobacterium* sp.
PDB5	کوکسی	-	-	-	+	-	*Zymomonas* sp.
PDB6	باسیلی	-	-	+	+	+	*Pseudomonas aeruginosa*
PDB7	باسیلی	-	-	+	+	-	*Paracoccus* sp.
PDB8	کوکسی	-	-	+	+	-	*Sphingobacterium* sp.
PDB9	باسیلی	-	-	+	+	+	*Pantoea* sp.
PDB10	باسیلی	-	-	+	+	-	*Achromobacter xylosoxidans*
PDB11	باسیلی	-	-	+	+	+	*Pseudomonas aeruginosa*
PDB12	کوکسی	-	-	-	+	-	*Acinetobacter johnsonii*
PDB13	کوکسی	-	-	-	+	-	*Acinetobacter johnsonii*
PDB14	کوکوباسیل	-	-	-	+	-	*Serattia odorifera*
PDB15	کوکوباسیل	-	-	+	+	+	*Pseudomonas alcaligenes*
PDB16	باسیلی	-	-	-	+	-	*Entrobacter cloacae*
PDB17	باسیلی	-	-	+	+	+	*Pseudomonas aeruginosa*
PDB18	باسیلی	-	-	+	+	+	*Pseudomonas stutzeri*
PDB19	کوکوباسیل	-	-	+	+	+	*Chryseobacterium* sp.

منابع

مینایی‌تهرانی د، حرفت منش ع و آذری دهکردی ف. 1384. مطالعه تجزیه زیستی نفت خام سنگین در خاک با مقیاس پایلوت. مجله علوم محیطی، شماره 10، صفحه 82-71.

Heewook R, Joo YH, Youn-Jooan and Sukcho K, 2006. Isolation and characterization of Psychrotrophic and halotolerant ***Rhodococcus*** sp. Yhlt-2. J. Microbiol. Biotechnol. 16 (4): 605-612.

Liangli J and Hungchen B, 2009. Surfactant mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Materials. 2: 76-94.

Sambrook J and Russell DW, 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Supaka N, Pinphanichakam P, Pattaragulwanit K, Thaniyavah S, Omori T and Juntonggjin K, 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene degrading ***sphingomonas*** sp. Strain P2 and its ability to degrade Fluoranthene and Pyrene via cometabolism. Research Article. Science Asia. 27: 21-28.

Suseo J, Sookeum Y and li QX, 2009. Baterial degradation of aromatic compounds, Int.J. Environ. Res. Public health, 6: 278-309.