محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی تولید بیوفیلم سودوموناس جدا شده از خاک آلوده به هیدروکربن بر روی حامل‌های آلی و معدنی

مریم ترکاشوند*[۱]، امیر لکزیان[۲]، امیر فتوت[۲]، مهدی محمدی[۳]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲]استاد علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳]دانشیار گروه بیوتکنولوژی دریا، دانشگاه خلیج فارس

چکیده

فرم بیوفیلمی باکتری‌ها کارآمدی قابل توجهی در تجزیه هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای دارند. سودوموناس ها از جمله باکتری‌های غالب خاک هستند که همچنین در تولید بیوفیلم و تجزیه هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای شناخته شده‌اند. این در حالی است که در زمینه تولید بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس بومی خاک‌های ایران که در تجزیه هیدروکربن‌ها توانمند باشند، اطلاعات کمی در دسترس است. هدف این پژوهش، بررسی توان تولید بیوفیلم جدایه‌های سودوموناس از خاک‌های آلوده به نفت و گازوئیل بود. ۶۳ جدایه سودوموناس از خاک‌های آلوده جدا و خالص‌سازی شدند و سپس جدایه‌ها از نظر تولید بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس آزمایشات انتخابی، ۴ جدایه برتر انتخاب و کارایی تجزیه نفت توسط آن‌ها در دو محیط کشت پایه نمکی (با و بدون نفت) با آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل بررسی گردید. توانمندترین جدایه، برای شناسایی دقیق، با روش تعیین ردیف بازهای آلی ژن 16SrRNA آنالیز و این جدایه سودوموناس آئروژینوزا JCM 5962 تشخیص داده شد. در آخر توان تولید بیوفیلم جدایه برتر روی حامل‌های پومیس و باگاس نیشکر بررسی شد. نتایج نشان داد تمامی جدایه‌های سودوموناس مورد بررسی توانمند به تولید بیوفیلم در تست میکروتیتر پلیت بودند. جدایه برتر در تست تجزیه نفت، همچنین توانمندی در تولید بیوفیلم فعال بر سطح حامل‌های پومیس و باگاس نیشکر را نیز نشان داد. به نظر می‌رسد که فرم بیوفیلمی سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند برای افزایش کارایی روش‌های زیست‌پالایی خاک مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، پومیس، نفت خام

مقدمه

بیوفیلم‌ها (زیست‌لایه‌های میکروبی) به عنوان جوامع میکروبی ساختارمندی تعریف می‌شوند که به سطوح طبیعی متصل شده و در ماتریکسی از مواد پلیمری برون سلولی جای می‌گیرند. سلول‌های باکتریایی، جلبکی، قارچی یا پروتوزوئرها قادر به تولید بیوفیلم هستند و در این حالت به سطوح مختلف در محیط‌های خاکی و آبی، بافت‌های زنده، ابزارهای پزشکی و سیستم‌های لوله‌کشی آب متصل می‌شوند (Lynch و همکاران ۲۰۰۸). پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که بیوفیلم‌ها در مقایسه با اشکال پلانکتونی یا شناور فرم غالب و رایج‌تری از حیات ریزجانداران به حساب می‌آید (Al-Azizi و همکاران ۲۰۰۴). بیوفیلم دارای مزایای چندگانه‌ای است که از آن جمله می‌توان به افزایش تحمل باکتریایی در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی و امکان تولید بیشتر آنزیم‌ها و سازمان‌دهی سلول‌ها به زیرمجموعه‌های کارکردی اشاره کرد. گزارش‌های پرشماری در رابطه با بیوفیلم‌های میکروبی در دسترس است اما اطلاعات اندکی در مورد تشکیل آن توسط ریزجانداران مهم خاک از دید کشاورزی و برهم‌کنش‌های آن‌ها در اکوسیستم منتشر شده است. درک و شناخت جوامع باکتریایی به ویژه از نظر زیست-محیطی و کشاورزی و اثرات متقابل آن‌ها می‌تواند مزایای بسیاری در زمینه تغییر اقلیم، کیفیت خاک، تغذیه گیاه، حفاظت گیاه، کشاورزی و پاک‌سازی خاک از آلاینده‌های آلی و غیر آلی داشته باشد (Velmourougane و همکاران ۲۰۱۷). نتایج پژوهش‌ها به روشنی نشان می‌دهد که بیوفیلم‌های باکتریایی نقش چشم‌گیری در تجزیه هیدروکربن‌های تک حلقه‌ای و چند حلقه‌ای دارند. از این گونه پژوهش‌ها می‌توان به پژوهش شیمادا و همکاران (۲۰۱۲) اشاره کرد که نشان دادند بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس نقش چشم‌گیری در تجزیه نفتالین داشته‌اند (Shimada و همکاران ۲۰۱۲). از آنجا که موضوع بیوفیلم میکربی بیشتر در حوزه پزشکی و صنایع غذایی مورد بررسی قرار گرفته است و به کاربرد آن‌ها در زمینه کشاورزی و حفاظت محیط زیست کمتر پرداخته شده است و همچنین با توجه به اینکه بررسی تولید بیوفیلم روی حامل‌های دوست‌دار محیط زیست و ارزان قیمت گام نخست در این مسیر می‌باشد، در این پژوهش توانایی تولید بیوفیلم و تجزیه نفت خام در

*ایمیل نویسنده مسئول: Maryam.Tarkashvand@wsu.edu

باکتری‌های سودوموناس بومی خاک‌های آلوده به نفت بررسی شد. توانمندترین جدایه از این نظر مورد شناسایی ژنتیکی قرار گرفت. در ادامه از این جدایه در تهیه بیوفیلم‌های باکتریایی بر حامل‌های آلی و معدنی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و انتخاب باکتری

دو نمونه خاک کشاورزی آلوده به منابع مختلف هیدروکربنی برای جداسازی باکتری‌های سودوموناس انتخاب شدند. جداسازی به روش تهیه سری‌های رقت انجام شد و جدایه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت کینگ بی و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. تک کلنی‌های خالص‌شده در زیر نور فرابنفش بررسی و کلنی‌های باکتریایی با ویژگی فلورسنتی برای ادامه آزمایش انتخاب شدند. توان تولید بیوفیلم ۶۳ جدایه باکتریایی با استفاده از روش O'Toole (۲۰۱۱) بررسی و غربال شدند. در این روش بیوفیلم‌ها با کریستال ویوله ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی و جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر درطول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد.

جدایه‌های انتخاب شده از تست قبل در آزمایشی از نظر توان رشد در محیط آلوده و همچنین توانمندی در تجزیه نفت خام مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل و سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل چهار جدایه انتخاب شده، دو نوع محیط کشت پایه نمکی (Xia و همکاران، ۲۰۱۷و Bushnell Hass و همکاران، ۱۹۴۰) و دو سطح نفت خام بودند. زادمایه جدایه-های باکتریایی با OD600 یکسان به دو نوع محیط کشت حاوی صفر و ۲ درصد نفت خام اضافه شدند. ارلن‌مایرها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر با ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ روز نگه‌داری شدند. پس از ۱۰ روز مقدار رشد جدایه‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری و شمارش واحد تشکیل کلنی ارزیابی شدند. مقدار هیدروکربن باقیمانده با استفاده از روش رحمان و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از حلال تولوئن عصاره‌گیری و از طریق جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر بررسی شد. در نهایت جدایه باکتریایی برتر مورد شناسایی ژنتیکی قرار گرفت.

به منظور تهیه بیوفیلم باکتریایی دو حامل پومیس (معدنی) و باگاس نیشکر (آلی) ابتدا در دامنه اندازه ۸ میلی‌متر - ۱ سانتیمتر انتخاب، دو مرتبه با آب مقطر جوشیده شسته و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک و نهایتا حامل‌ها اتوکلاو شده و در دمای اتاق نگه‌داری شدند. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه نمکی به ۵ گرم از حامل‌های سترون شده در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر شیشه‌ای اضافه و با زادمایه یکسان مایه‌زنی شد. ارلن‌مایرها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر دورانی گرماگذاری شدند (Nie و همکاران، ۲۰۱۶). با هدف بررسی تولید بیوفیلم‌های باکتریایی حامل‌ها پیش و پس از مایه‌زنی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی‌های میکروسکوپی قرار گرفتند. در نهایت به منظور بررسی زنده‌مانی باکتری بر روی هر یک از حامل‌ها، حامل در حجم مشخصی بافر فسفات به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و نمونه تهیه شده روی محیط کشت اختصاصی در دمای ۳۰ درجه گرماگذاری و تا زمان ظهور کلنی‌ها نگهداری شد.

نتایج و بحث

باکتری‌های سودوموناس فلورسنت از دو نمونه خاک با شماره ۱ و ۲ جداسازی شدند. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک-ها در جدول ۱ آورده شده است. بافت هر دو خاک رسی بود. قابلیت هدایت الکتریکی خاک‌ها تقریبا یکسان و حدود ۳ دسی زیمنس بر متر بود و خاک‌ها پهاش خنثی داشتند. از دو خاک روی‌هم رفته تعداد ۶۳ جدایه سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی شد. ۵۸ و ۴۲ درصد جدایه ها به ترتیب از خاک شماره ۱ و ۲ جداسازی شدند.

جدول۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد آزمایش

نمونه خاک	شن درصد	سیلت درصد	رس درصد	پهاش	نیتروژن کل درصد	کربن کل درصد	قابلیت هدایت الکتریکی $dS.m^{-1}$	فسفر قابل دسترس $mg.Kg^{-1}$
۱	۵/۳	۴۱/۹	۵۲/۸	۶/۷	/۱۷	۱/۹	۳/۳	۸۱/۱
۲	۴/۵	۳۹/۸	۵۵/۷	۶/۶	/۱۵	۱/۸۷	۳/۱	۷۹/۷

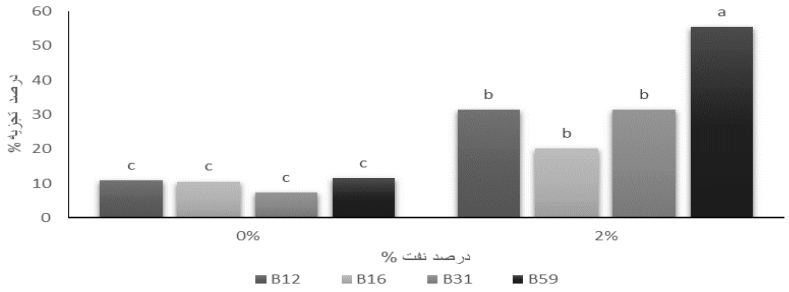
توانایی تولید بیوفیلم جدایه‌های باکتریایی در سه زمان ۹، ۱۵ و ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. ۴ جدایه باکتریایی با شماره‌های ۱۲،۱۶،۳۱و ۵۹ که بیشترین میزان جذب را در طول موج ۵۵۰ نانومتر نشان دادند به عنوان جدایه‌های مولد بیشترین میزان بیوفیلم برای مرحله بعدی آزمایش‌ها انتخاب شدند. چهار جدایه انتخابی باکتری‌های سودوموناس از نظر رشد در محیط حاوی صفر و ۲ درصد نفت خام بررسی شده و مقدار تجزیه نفت پس از ده روز در انتهای دوره آزمایش مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس چهار جدایه انتخابی بر تجزیه نفت در دو محیط کشت پایه نمکی و دو سطح نفت خام در جدول ۱ نشان داده شده است. اثر همه فاکتورهای آزمایشی بر تجزیه نفت در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲ تجزیه واریانس تجزیه نفت و رشد باکتری‌های مختلف در طی دوره آزمایش

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value
نوع باکتری	۳	۶۰۸/۵۷۲	۰/۰۰۹۳**
درصد نفت	۱	۶۴۸۱/۵۸۴۴	<۰/۰۰۰۱**
نوع محیط کشت	۱	۵۴۸/۲۵۱۰	<۰/۰۰۰۱**
نوع باکتری × درصد نفت	۳	۷۸۰/۳۸۶۲	۰/۰۰۰۲**
نوع محیط کشت × درصد نفت	۱	۲۷۳۳/۴۳۶۲	<۰/۰۰۰۱**
نوع باکتری × نوع محیط کشت	۳	۲۵۵/۲۳۰۸	<۰/۰۰۰۱**
نوع باکتری × درصد نفت × نوع محیط کشت	۳	۳۴۳/۰۳۲۴	<۰/۰۰۰۱**
خطا	۳۲	۲۲/۰۳	-
ضریب تغییرات	۷	-	-

**: معنی‌دار در سطح یک درصد.

شکل ۱ تاثیر متقابل جدایه‌های انتخابی بر درصد تجزیه نفت خام را نشان می‌دهد. جدایه شماره ۵۹ با حذف بیش از ۵۰ درصد نفت موجود در محیط توانمندترین جدایه در تجزیه نفت خام بود. جدایه‌های ۳۱، ۱۶ و ۱۲ به ترتیب با ۳۴/۷، ۱۶/۳۷، ۱۳/۷۸ درصد تجزیه در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (شکل ۱). Log CFU (رشد) در جدایه‌های ۱۲،۱۶،۳۱ و ۵۹ پس از یک دوره آزمایشی ده روزه برابر ۱۱/۱۵، ۱۱، ۱۰/۹۴، ۱۰/۹۲ بود. نتایج حاصل از توالی‌خوانی ژن 16S rRNA نشان داد سویه باکتریایی مورد نظر با ۱۳۸۲ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰٪ با سویه Pseudomonas aeruginosa JCM 5962(T) به شماره دسترسی BAMA01000316 قرابت فیلوژنی داشت.

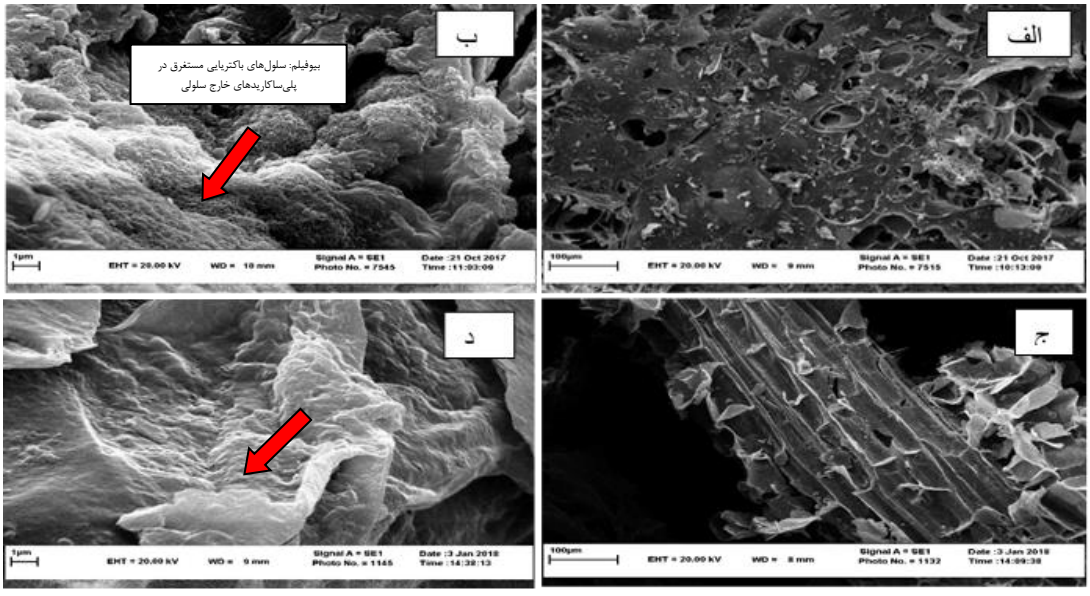


شکل ۱- مقایسه میانگین درصد تجزیه نفت ۴ جدایه انتخابی سودموناس

در ادامه تولید بیوفیلم باکتری سودموناس آئروژینوزا بر روی حامل‌های معدنی و آلی برای اولین بار در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۲ تصاویر SEM حامل آلی و معدنی را پیش و پس از تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد. از آنجایی که سلول‌های باکتری تنها در فیلم نازک آب روی سطوح قادر به تحرک بوده لذا دستیابی به مناطق مختلف محیط برای باکتری‌ها سخت و گاها انجام شدنی نیست. ایجاد مکانیسمی که بتواند باکتری‌ها را به مناطق مختلف محیط برساند در حصول نتایج مورد نظر اعم از اهداف کشاورزی (حل فسفات‌های نامحلول، تثبیت

نیتروژن و ...) و همچنین اهداف زیست‌محیطی نظیر (سمیت‌زدایی ترکیبات آلاینده آلی و غیر آلی) به ویژه در محیط خاک بسیار حائز اهمیت است.

پژوهشگران مختلفی بیوفیلم سودوموناس‌ها را بر حامل پومیس بررسی کرده‌اند. از جمله آن‌ها می‌توان به تحقیقات Pazarlioglu و همکاران (۲۰۰۵) اشاره کرد. نتایج آنها نشان داد که بیوفیلم سودوموناس پوتیدا تشکیل شده بر روی ذرات پومیس در مقایسه با فرم پلانکتونی، فنل را به مقدار معناداری بیشتر تجزیه کرد. همچنین Lorenzo و همکاران (۲۰۰۵) نیز در تحقیقی مشابه موفق به تولید بیوفیلم کنسرسیوم باکتری‌های توانا در تجزیه تولوئن روی گرانول‌های پومیس شده و از آن در تجزیه زیستی فاضلاب بهره بردند. استفاده از ریزجانداران پلانکتونی برای زیست‌پالایی غالبا به واسطه رشد سلول، تقسیم سلولی و حساسیت به فاکتورهای محیطی نظیر نوسان غلظت و کیفیت اجزاء سیستم محدود می‌گردند. اما استفاده از روش‌های غیرمتحرک سازی سلول برای اصلاح آلاینده‌ها در مقایسه با استفاده از سلول‌های پلانکتونی مزایای بسیاری در پی دارد (Mollaei و همکاران،۲۰۱۰). این تکنولوژی راهکاری موثر و اقتصادی در رفع محدودیت‌های ذکر شده است. غیر متحرک شدن علاوه بر ایجاد تراکم سلولی بالاتر، دوره فعال شدن کوتاه‌تر، پایداری و ماندگاری بیشتر را به واسطه‌ی محافظت سلول‌ها در برابر تماس مستقیم با ترکیبات سمی نسبت به سلول‌های آزاد فراهم می‌آورد (El-Naas و همکاران، ۲۰۰۹). در سال‌های اخیر پژوهش‌های بسیاری بر زیست‌پالایی آلاینده‌ها با استفاده از سلول‌های غیرمتحرک شده متمرکز شده است. ماتریس بیوفیلم نسبت به سلول‌های پلانکتونی مقاومت بیشتری نسبت به تنش‌های محیطی، تنش برشی، تنش اسید، عوامل ضد میکروبی، آسیب‌های ناشی از اشعه فرابنفش، خشکی، آفت-کش‌ها، حلال‌ها، غلظت بالای مواد شیمیایی سمی و آلاینده نشان می‌دهد (Chandran و همکاران، ۲۰۱۱). در مقابل، سلول‌های پلانکتونی آزاد، آلاینده‌های زیست‌محیطی را بواسطه فعالیت متابولیک پاک‌سازی می‌کنند. اما چنین سلول‌هایی ثابت و ساکن نیستند و تحت شرایط تنش‌های مکانیکی و محیطی، پایدار و ماندگار نیستند. در مقابل، میکروب‌های تشکیل دهنده‌ی بیوفیلم، به خصوص در زیست‌پالایی تواناترند چرا که سلول‌ها در پلی ساکاریدهای برون سلولی غیر متحرک و ثابت شده‌اند. تحقیقات نشان می‌دهد که بیوفیلم‌ها برای مقاصد زیست پالایی در محیط‌های مختلف همانند آب، خاک و رسوبات مناسب هستند زیرا زیست توده میکروبی بالایی تولید کرده و توان غیرمتحرک کردن آلاینده‌ها را دارا می‌باشند (Das و همکاران، ۲۰۱۲).



شکل ۲ تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی از حامل‌های آلی و معدنی. (الف) پومیس پیش از مایه‌زنی سودوموناس آئروژینوزا -(ب) بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر سطح حامل پومیس - (ج) باگاس نیشکر پیش از مایه‌زنی سودوموناس آئروژینوزا - (د) بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر سطح باگاس نیشکر

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سودوموناس‌های جداشده از خاک‌های آلوده به منابع مختلف هیدروکربنی توانایی تولید بیوفیلم را نشان دادند. جدایه سودوموناس آئروژینوزا با توان بالای تولید بیوفیلم، رشد حداکثری در محیط حاوی ۲ درصد نفت و همچنین بیشترین میزان تجزیه نفت در طی دوره انکوباسیون به عنوان جدایه برتر شناخته شد. استقرار موفقیت‌آمیز بیوفیلم باکتریایی بر روی سطوح حامل‌های آلی (باگاس نیشکر) و معدنی (پومیس) با بررسی نتایج عکس‌برداری SEM و تست زنده‌مانی باکتری تایید شد. با توجه به مزایای بی‌شمار استفاده از میکروارگانیسم‌ها در فرم رشدی بیوفیلمی برای اهداف کشاورزی و زیست‌محیطی متعدد، استفاده از جدایه باکتریایی بومی مولد بیوفیلم و توانمند در تجزیه نفت مسیری امید بخش را در بهبود کارآمدی فعالیت‌های زیست پالایی در خاک‌های آلوده به منابع مختلف هیدروکربنی کشور فراهم خواهد ساخت.

منابع

Bushnell, L.D. and Haas, H.F.1940. “The Utilization of Certain Hydrocarbons By Microorganisms’.” J Bacteriol, no. 199, 653–73.

Chandran, P. and Das, N. 2011. Degradation of diesel oil by immobilized Candida tropicalis and biofilm formed on gravels. Biodegradation 1181-1189, 22.

Das, Nilanjana, Basak, Lakshmi V. Geetanjali, Salam, Jaseetha Abdul, Abigail, Evy Alice 2012. Application of biofilms on remediation of pollutants – an overview. Journal of Microbiology and Biotechnology Research .2; 55; 783-790.

Di Lorenzo, Alessandra, et al. 2005. “Characterization and Performance of a Toluene-Degrading Biofilm Developed on Pumice Stones.” Microbial Cell Factories, vol. 4, pp. 1–7.

El-Azizi, MA., Starks, SE., and Khardori, N. 2004. Interactions of Candida albicans with other Candida spp. and bacteria in the biofilms. J Appl Microbiol 96, 1067–1073.

El-Naas, M. H., Al-Muhtaseb, S. A., and Makhlouf, S. 2009. Biodegradation of phenol by Pseudomonas putida immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. Journal of Hazardous Materials, 164, 720- 725.

Nie, H., He, M., Lin, Y., Wang, L., Jin, P. Zhang, S.Y. 2016.“Immobilization of Biofilms of Pseudomonas Aeruginosa NY3 and Their Application in the Removal of Hydrocarbons from Highly Concentrated Oil-Containing Wastewater on the Laboratory Scale.” Journal of Environmental Management, vol. 173, pp. 34–40.

Lynch, A.S., and Robertson, G.T. 2008. Bacterial and fungal biofilm infections. Annu Rev Med 59, 415 - 428.

Mollaei, M., S. Abdollahpour, S., Atashgahi, H., Abbasi, F., Masoomi, I., Rad, A. S., Lotfi, H. S., Zahiri, H. V., and Noghabi, K. A. 2010. Enhanced phenol degradation by Pseudomonas sp. SA01: gaining insight into the novel single and hybrid immobilizations. Journal of hazardous materials, 175, 284-292.

O’Toole, George A. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. ” Journal of Visualized Experiments, no. 47, pp. 10–11.

Pazarlioğlu, Nurdan Kaşikara, and Azmi Telefoncu. 2005. Biodegradation of Phenol by Pseudomonas Putida Immobilized on Activated Pumice Particles. Process Biochemistry, vol. 40, no. 5, pp. 1807–14.

Rahman, K. S.M., Banat, I. M., Thahira, J., Thayumanavan, Tha. and Lakshmanaperumalsamy., P. 2002. Bioremediation of Gasoline Contaminated Soil by a Bacterial Consortium Amended with Poultry Litter, Coir Pith and Rhamnolipid Biosurfactant. Bioresource Technology, vol. 81, no. 1, pp. 25– 32.

Shimada, K., Itoh, Y., Washio, K. and Morikawa, M. 2012. Efficacy of Forming Biofilms by Naphthalene Degrading Pseudomonas Stutzeri T102 toward Bioremediation Technology and Its Molecular Mechanisms. Chemosphere, vol. 87, no. 3, Elsevier Ltd, pp. 226–33.

Velmourougane, K., Prasanna., R. Saxena., AK. Singh., SB. Chawla., G. Kaushik., R. Ramakrishnan., B. Nain., L. 2017. Modulation of growth media influences aggregation and biofilm formation between Azotobacter chroococcum and Trichoderma viride. Applied biochemistry and microbiology. Sep 1; 53(5):546-56.

Xia, Mingqian, Liu, Y., Taylor, A. A., Fu, D., Khan, A.R., Terry, N. 2017. Crude Oil Depletion by Bacterial Strains Isolated from a Petroleum Hydrocarbon Impacted Solid Waste Management Site in California. International Biodeterioration and Biodegradation, Elsevier Ltd,123 ,70–77

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizer

Investigating the biofilm establishment of Pseudomonas strain isolated from hydrocarbon contaminated soil on organic and mineral carriers

Tarkashvand*[1], M., Lakzian[2], A., Fotovat, A.[2] Mohammadi, M. [3]

[1] PhD. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[2] Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[3] Assistant Prof., Marin Biotechnology Department, Persian Gulf University, Iran

Abstract

Biofilm form of bacteria has considerable efficacy in degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). One of the well-studied bacteria which is dominant in soil and also well known to form biofilms and degrade PAHs are pseudomonas. However, there is little knowledge about biofilm establishment by native Pseudomonas bacteria of Iranian soils that are capable to degrade hydrocarbons. The goal of this study was to assess the biofilm formation potential of Pseudomonas isolates from oil-contaminated soil. Sixty-three Pseudomonas strains were isolated from the soil, purified, and were studied for their biofilm characteristics. Based on screening tests, four (superior) isolates were chosen to investigate their ability to degrade crude oil in mineral salt medium supplemented with crude oil. The experiments were performed by a randomized design with a factorial arrangement. The most effective strain was identified by 16S rRNA gene sequencing method and this strain recognized as Pseudomonas aeruginosa JCM 5962. Then, the ability of the identified isolate to grow as a biofilm on sugarcane bagasse and pumice carries was investigated. Result support that all Pseudomonas isolates had the ability to form biofilm in microtiter plate test. The superior isolate of Pseudomonas (Pseudomonas aeruginosa) in degrading test, also showed the tendency to form active biofilm on the surfaces of sugarcane bagasse and pumice carries. It seems that Pseudomonas aeruginosa in biofilm form can be used to enhance soil bioremediation efficiency.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Biofilm, Pumice, Crude oil

* Corresponding author Email: Maryam.Tarkashvand@wsu.edu