جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های همراه با اسفنج *Pachychalina* sp. با پتانسیل تصفیه زیستی نفت خام

خانمناز عبادی[۱]، ماندانا زارعی*[۱]، علی محمد صنعتی[۲]

۱. گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
۲. پژوهشکده خلیج فارس، گروه محیط زیست، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۱

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2017.46997

چکیده

هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های همراه با اسفنج با پتانسیل تجزیه زیستی ترکیبات نفت خام می‌باشد. بافت مزوهیل اسفنج *Pachychalina* sp. هموژنیزه شده و رقت‌های مختلف آن در محیط کشت‌های مناسب کشت داده شد. کلنی‌های به دست آمده بر اساس شاخص امولسیون‌سازی و میزان رشد در محیط حاوی ۲٪ نفت غربالگری شدند. از بین باکتری‌های جداسازی شده، ۶ باکتری بالاترین میزان رشد در محیط نفتی را دارا بودند که میزان حذف نفت توسط ۶ سویه مذکور در محیط نمکی حداقل مورد سنجش قرار گرفت. سویه‌ها همچنین بر اساس توالی ژن ۱۶ SrRNA و با انجام PCR مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی درصد حذف نفت بر اساس دو روش جذب در ۴۲۰ نانومتر و میزان وزن خشک تایید کننده یکدیگر بوده و هر دو از یک الگو پیروی نمودند. بر این اساس، سویه‌های KE5 و KE8 بیشترین میزان حذف نفت را نشان دادند که نتایج شناسایی مولکولی این دو سویه مشخص نمود بیشترین شباهت را به ترتیب با سویه های *Staphylococcus aureus subsp.*N315 و *Luteimonas terricola* BZ92r دارا می‌باشند. با توجه به نتایج به دست آمده از همترازی‌های ژنومی، تعیین فاصله ژنتیکی و رسم درخت فیلوژنتیکی، به نظر می‌رسد سویه‌های KE6 و KE7 به ترتیب با داشتن ۸۶٪ و ۹۰٪ شباهت با سویه‌های *Exiguobacterium sp.* AT1b و *Pseudomonas rhodesiae* CIP 104664 پتانسیل قابل توجهی برای انجام مطالعات بیشتر مولکولی و بیوشیمیایی دارا بوده و همچنین احتمال معرفی آنها به عنوان سویه‌های جدید وجود دارد.

واژه های کلیدی: باکتری‌های دریایی، نمک‌دوست، حرارت دوست، خلیج فارس، امولسیون

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: zarei.mandana@yahoo.com

۱. مقدمه

اسفنج‌ها موجوداتی غنی از ترکیبات مفید با پتانسیل کاربردی بالا هستند که بخش قابل توجهی از این ترکیبات توسط میکروارگانیسم‌های همزیست با آنها تولید شده است. برخی از گونه های میکروبی همراه با اسفنج منحصر به فرد بوده و در سایر زیستگاههای دریایی یافت نشده‌اند. این جانوران ابتدایی یکی از قدیمی‌ترین شاخه‌های جانوری هستند و در سالهای اخیر به دلیل استخراج بیشترین ترکیبات طبیعی دریایی از آن‌ها، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Wang, 2006). اسفنج‌های دریایی پناهگاه اجتماعات میکروبی متنوعی از قبیل: باکتری‌ها، آرکئا و یوکاریوت‌ها می‌باشند و علیرغم صافی‌خوار بودن، بعضی باکتری‌ها می‌توانند در بافت اسفنج به ویژه مزوهیل که یک محیط منحصر به فرد برای پناه دادن به اجتماعات میکروبی است، زندگی کنند (Santos *et al*., 2015). دلیل این که اجتماعات باکتری در مزوهیل باقی می‌مانند و توسط فاگوسیتوز حذف نمی‌شوند به طور کامل مشخص نیست اما ممکن است به علت وجود دمین‌های پروتئینی مشابه یوکاریوت‌ها باشد که در طول فرایند همزیستی حاصل آمده است. برخی محصولات طبیعی اسفنج‌ها منشاء باکتریایی دارند و توسط باکتری‌های همراه با اسفنج تولید می‌شوند. این باکتری‌ها می‌توانند منبع آنزیم‌ها و پروتئین‌های جدید با دمین‌های مشابه یوکاریوت‌ها باشند (Fuerst, 2014).

نفت خام قسمت اعظم نیاز انرژی دنیا و ماده خام اولیه در اکثر صنایع شیمیایی را فراهم می‌کند و مهمترین نقش را در توسعه اقتصاد مدرن و همچنین آلودگی محیط زیست دارد (Liu *et al*., 2014). این ماده به دلیل ویژگی‌های شیمیایی خاص خود، آسیب‌های جدی به سلامت انسان و اکوسیستم وارد می‌کند. حضور طولانی مدت و غلظت بالای آن در محیط باعث بروز بیماری‌های کلیه، کبد و انواع سرطان‌ها می‌شود (Latha and Kalaivani, 2012). ترکیبات آروماتیک حلقوی اغلب ترکیباتی مقاوم و پایدار در محیط دریا می باشند، از آثار سمی این ترکیبات می توان به خاصیت سرطانزایی و ایجاد تغییرات ژنتیکی اشاره کرد (Nemati *et al*., 2016). تاثیر آلودگی نفتی در اکوسیستم‌های آبی و موجودات آن، از سطح تولیدکننده‌های اولیه تا ثانویه و سطوح بالاتر می‌باشد. هیدروکربن‌های نفتی با جابه‌جایی ترکیبات لیپید، در نیمه تراوایی غشا تاثیر می‌گذارند و باعث مهار فتوسنتز و اختلال در رشد و تولید مثل فیتوپلانکتون‌ها می‌شوند. این عمل در نتیجه حل شدن هیدروکربن‌های نفتی در فاز لیپیدی کلروپلاست و تداخل در برهم‌کنش مولکول‌های کلروفیل صورت می‌گیرد. اختلال مشابه دیگر در غشای میتوکندری اتفاق می‌افتد و باعث مهار چرخه تری‌کربوکسیلیک‌اسید[۱] و فسفریلاسیون اکسیداتیو[۲] می‌شود. کروزن[۳]باعث انحراف لیپیدهای غشای سلولی و سپس نفوذ عوامل سمی در جلبک های قرمز شده و نفتالین[۴] نیز باعث کاهش سطح پروتئین سلولی می‌شود. نفت همچنین باعث غیرفعال شدن مجرای تغذیه‌ای در خارپوستان، ایجاد توده‌های سرطانی در دهان ماهی‌ها و سوزش چشم و کوری در سیل‌های[۵]دریایی می‌شود (Islam and Tanaka, 2004).

وقتی نفت در دریا ریزش پیدا می‌کند، در طول زمان به دلیل اثر امواج، نور خورشید و فعالیت میکروبی دستخوش تغییراتی شده و برخی ترکیبات نفت در ستون آب پراکنده می‌شوند. در حالی که برخی دیگر از طریق رسوب‌گذاری در اعماق قرار می‌گیرند و می‌توانند بر گیاهان کف‌زی هم تاثیر بگذارند (Sheyni *et al*., 2014). روش‌های طبیعی پاکسازی آلودگی‌های نفتی شامل: تبخیر، اکسیداسیون نوری[۶]، پراکندگی، انحلال،

۱ Tricarboxylic Acid Cycle(TAC)
۲ Oxidative Phosphorylation
۳ Kerosene
۴ Naphthalene
۵ Seals
۶ Photooxidation

امولسیون شدن، جذب و تجزیه زیستی[1] توسط میکروارگانیسم‌های بومی می‌باشد (Mills *et al.*, 2003). پاکسازی یا تصفیه زیستی[2] روش نسبتا جدیدی است که مهمترین ویژگی آن این است که در محیط-های باز غیراستریل و با انواع میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد (Hassanshahian *et al.*,2010 ; Milic *et al.*, 2009 ; Watanabe, 2001). مطالعاتی که در خصوص آلودگی نفتی خلیج فارس و باکتری‌های تجزیه‌کننده صورت گرفته است مرتبط با میکروارگانیسم‌های آزادزی بوده و تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه بر روی باکتریهای همراه موجودات خلیج فارس صورت نگرفته است.

Roozbehani و همکاران در سال 2013 تاثیر بیوسورفاکتانت تولید شده توسط باکتری *Pseudomonas* sp. را در آب‌های آلوده به نفت خام، در خلیج فارس بررسی کردند و تاثیر عواملی مثل شوری، غلظت بیوسورفاکتانت، عوامل مغذی مثل نیترات و فسفر و pH را مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها میزان نفت را قبل و بعد از افزودن سورفاکتانت شیمیایی بررسی کردند و نتایج نشان داد که افزودن سورفاکتانت موجب افزایش تجزیه‌زیستی می‌شود (Roozbehani *et al.*, 2013)

Hassanshahian و همکاران در سال 2014 تعداد ۱۵ باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام را از مناطق آلوده در خلیج‌فارس جداسازی کردند و بر اساس دو عامل رشد روی نفت‌خام و تجزیه هیدروکربن غربالگری کردند. از بین آن‌ها سویه PG-Z که متعلق به جنس *Corynebacterium variabile* بود، قادر به تجزیه ٪۸۲ از نفت خام بعد از یک هفته کشت در محیط ONR7a بود. این سویه فعالیت امولسیون‌کنندگی و تولید بیوسورفاکتانت بالا در بین همه جداشده‌ها داشت و کروماتوگرافی گازی برای این سویه نشان داد که بیشتر قله‌ها در قسمت آلکان‌ها به طور جدی توسط این سویه کاهش یافته بود (Hassanshahian *et al.*, 2014)

Shahaliyan و همکاران در سال ۱۳۹۴ توانایی حذف آنتراسن از محلول های حاوی هیدروکربن توسط باکتری *Bacillus pumilus* جدا شده از رسوبات نفتی بندر امام خمینی را مورد بررسی قرار دادند. این باکتری از گونه های غیر مولد بیوسورفکتانت بود و تجزیه آنتراسن توسط HPLC نشان داد که این باکتری پس از ۵ روز حدود ۴۰ درصد از ترکیبات هیدروکربن را از محیط حذف می‌کند (Shahaliyan *et al.*, 2015) .

با توجه به شرایط اکولوژیک منحصر به فرد خلیج فارس، وجود موجودات دریایی مقاوم به انواع استرس های محیطی و لزوم توجه و شناسایی این ذخایر، در این تحقیق، سویه‌های باکتریایی همراه با اسفنج بومی خلیج فارس با توانایی تصفیه‌زیستی نفت خام، جداسازی و خالص سازی شده و مورد شناسایی مولکولی قرار گرفته اند.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه اسفنج *Pachychalina* sp. از عمق حدود ۱۵ متری خلیج فارس در سواحل بندر دیر با مختصات ۲۷/۸۴ شمالی ۵۱/۹۴ شرقی توسط غواصی جمع‌آوری گردید. نمونه اسفنج پس از انتقال به آزمایشگاه بر روی یخ، به مدت ۲ ساعت در" آب دریای استریل شده قدیمی"[3] نگهداری شدند این امر باعث حذف باکتری-های غیرهمزیست با اسفنج می‌شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در گرم‌خانه استریل در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا خشک شوند. پس از آن در کیسه‌های استریل و در ۲۰- درجه نگهداری شدند. برای جداسازی میکروارگانیسم‌های همراه با اسفنج، ۱سانتی-متر مکعب از بافت اسفنج از قسمت داخلی مزوهیل با استفاده از چاقوی استریل جدا گردید و ۳ بار با آب

[1] Biodegradation
[2] Bioremediation
[3] Sterilized Aged Seawater(SAS)

دریای استریل شده شستشو داده شد تا هرگونه باکتری موجود در بین کانال‌ها حذف شود. در مرحله بعد بافت اسفنج با استفاده از فسفات بافر سالین[1] در هاون چینی استریل، هموژنیزه گردید و بافت هموژنیزه شده با استفاده از ۰/۱ تا ۱ میلی لیتر آب استریل دریا، رقیق گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در گرم خانه قرار داده شد تا سلول‌های در حال کمون فعال شوند. در نهایت رقت‌های مختلف بافت هموژنیزه اسفنج‌در محیط کشت آماده شده، تلقیح گردید و در دمای۳۰ درجه به مدت ۱۰ روز در گرم‌خانه قرار گرفتند (Cheng *et al*., 2008).

ترکیبات محیط کشت مارین آگار تغییر یافته برای جداسازی اولیه باکتری های همزیست با اسفنج بر حسب گرم در لیتر به صورت: پپتون ۵ گرم، پودر عصاره مخمر ۹ گرم، کلرید سدیم ۱۹/۴۵ گرم، کلرید منیزیم ۸/۸ گرم، سولفات سدیم ۳/۲۴ گرم، کلرید کلسیم ۱/۸ گرم، کلرید پتاسیم ۰/۵۵ گرم، کربنات سدیم ۰/۱۶ گرم، برمید پتاسیم ۰/۰۸ گرم، کلرید استرانسیم ۰/۰۳۴ گرم، اسید بوریک ۰/۰۲۲ گرم، فلورید سدیم ۰/۰۰۲۴ گرم، نیترات آمونیوم ۰/۰۰۷۶ گرم، دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۰۰۸ گرم، آگار ۱۵ گرم با pH ۷/۶±۰/۲ تهیه گردید (Kiran *et al*.,2010). پس از رشد، کلنی‌های مختلف و خالص سازی آنها از محیط براث به عنوان محیط پیش‌کشت و از محیط نمکی حداقل با ۱٪نفت خام (تنها منبع کربن محیط کشت) به عنوان محیط غربالگری باکتری های همراه دارای پتانسیل تجزیه زیستی نفت، استفاده گردید برای این منظور ۴ میلی‌لیتر محیط کشت براث حاوی باکتری به محیط کشت نمکی حداقل تلقیح شد. ترکیبات محیط نمکی حداقل بر حسب گرم در لیتر به صورت: کلرید سدیم ۵ گرم، پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات ۵ گرم، دی‌آمونیوم‌سولفات۱ گرم، دی‌پتاسیم هیدروژن‌فسفات ۱ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲۵ گرم، سدیم نیتریت ۲ گرم، کلرید آهن ۰/۰۲۰ گرم، کلرید کلسیم ۰/۰۲۰ گرم و ۱٪ نفت خام سبک آماده گردید و pH نهایی محیط کشت به صورت ۷/۲±۲ بود (Pathak, 2011).

برای اندازه‌گیری شاخص امولسیون سازی، سویه‌های باکتری جداسازی شده، در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت براث به مدت یک هفته در گرم‌خانه شیکردار کشت داده شدند و سپس محیط کشت‌ها سانتریفیوژ گردید و ۶ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۶ میلی‌لیتر نفت خام سبکی که به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفته بود اضافه شد. ارتفاع نفت برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد و پس از اضافه کردن محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، دوباره ارتفاع آن اندازه‌گیری و به مدت ۲ دقیقه و با سرعت زیاد توسط ورتکس مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در مکان ثابت قرار گرفت. در پایان میزان فعالیت امولسیون کنندگی با اندازه‌گیری ارتفاع لایه امولسیون شده تقسیم بر ارتفاع کل و بر حسب درصد محاسبه گردید (Dhail and Jasuja, 2012).

برای شناسایی سویه‌های حرارت‌دوست با توانایی تجزیه زیستی نفت خام، تمامی سویه‌هایی که در محیط کشت مایع نمکی حداقل حاوی ۱٪ نفت خام رشد کرده بودند در محیط کشت نوترینت آگار با دمای۶۰ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. برای جلوگیری از ترک برداشتن محیط کشت، اطراف پلیت‌ها را با لایه نازک از پارافیلم پوشانده و یک ظرف پر از آب مقطر در گرم‌خانه قرار داده شده تا رطوبت مورد نیاز محیط تامین گردد (Ukpaka, 2011). برای شناسایی سویه‌های نمک دوست، نمونه‌های باکتری در محیط نوترینت آگار با غلظت نمک ٪۲ ، ٪۵ ، ٪۱۰ و ٪۱۵ نمک کشت داده شدند (Lanyi, 1974).

برای اندازه‌گیری میزان رشد باکتری‌ها و تجزیه نفت، سویه‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع نمکی حداقل حاوی ٪۱ درصد نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی

[1]Phosphate Buffered Saline

به مدت ۷ روز کشت داده شدند و میزان رشد آن‌ها بر اساس اندازه‌گیری میزان کدورت در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید. پس از ۷ روز میزان نفت باقی مانده در محیط، با استفاده از ۵۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل شد و پس از مخلوط کردن، با استفاده از قیف جداکننده فاز آلی و آبی از هم جدا شدند. فار آبی حاوی میکروارگانیسم‌ها و محیط کشت بود و دور ریخته شد و فاز آلی که حاوی نفت حل شده در دی‌کلرومتان بود، استخراج گردید و در فالکن‌ها ریخته شد. غلظت نفت استخراج شده نسبت به شاهد و در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. برای این منظور میزان ۵۰ میکرولیتر نفت حل شده در دی-کلرومتان را در سل ریخته و با ۴ میلی‌لیتر دی-کلرومتان حل کرده و پس از قرائت میزان جذب، در فرمول زیر قرار داده شد تا درصد تجزیه آن به دست آید.

جذب نمونه–جذب شاهد در ۴۲۰nm =میزان تجزیه نفت
۱۰۰×جذب شاهد در ۴۲۰nm /در ۴۲۰ nm

همچنین پس از خشک شدن نمونه‌های نفت خام، در دمای اتاق و به طور طبیعی، وزن خشک آن‌ها اندازه-گیری گردید(Chand Raza & Nusrt, 2010).

شناسایی سویه‌های تجزیه کننده نفت خام به صورت سیستماتیک و مولکولی صورت گرفت شناسایی سیستماتیک سویه‌ها بر اساس: رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، اکسیداز، کواگولاز، ژلاتین، مانیتول، نیترات، همولیز، گلوکز، لاکتوز، اوره، هیدرولیز نشاسته، ایجاد رنگدانه، کراتین، آرابینوز و تولید هاگ صورت گرفت (Buddingh, 1975). به منظور شناسایی مولکولی ابتدا استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد و سپس ژن ۱۶SrRNAبا استفاده از PCR تکثیر گردید و برای تعیین توالی به شرکت BIONEER کره جنوبی ارسال شد .لازم به ذکر است تعیین توالی بصورت ۲ بار خوانش انجام شد (Porebski *et al.*, 1997).

آغازگر مستقیم با توالی AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG و آغازگر معکوس با توالی TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T مورد استفاده قرار گرفت (Kämpfer *et al.*, 2010). مواد مورد نیاز در واکنش زنجیره ای پلیمراز در جدول ۱ ارایه شده است. به منظور بهینه سازی واکنش از شیب دمایی استفاده شد به این ترتیب که PCR در دمای ۵۹°C-۵۱ انجام شد و دمای بهینه در ۵۵°C به دست آمد. برنامه مورد استفاده به منظور انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز در جدول۲ آورده شده است.

جدول ۱ :مواد مورد نیاز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش‌گرها	حجم (میکرولیتر)	غلظت
DNA الگو	۲	۵۰ میکروگرم
بافر PCR	۵	۱۰ X
پرایمر پیش‌رو	۲	۲۰ پیکومولار
پرایمر پس‌رو	۲	۲۰ پیکومولار
دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات	۲	۱۰ میلی‌مولار
کلرید منیزیم	۳	۵۰ میلی‌مولار
آنزیم Taq پلی‌مراز	۰/۶	۵ u/µl
DMSO	۴	۵۰ میلی‌مولار
آب دوبار تقطیر استریل	۲۹/۴	
حجم کل	۵۰	

جدول ۲: برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

مرحله	نام مرحله	مدت زمان(ثانیه)	دما (درجه سانتیگراد)	تعداد تکرار
اول	واسرشتی‌اولیه	۳۰۰	۹۴	۱
دوم	واسرشتی	۳۰	۹۴	۳۰
	اتصال	۶۰	۵۵	
	طویل شدن	۹۰	۷۲	
سوم	طویل شدن‌نهایی	۳۰۰	۷۲	۱

لازم به ذکر است که بررسی نتایج به دست آمده از توالی‌یابی و بازسازی توالی‌های DNA با استفاده از نرم-

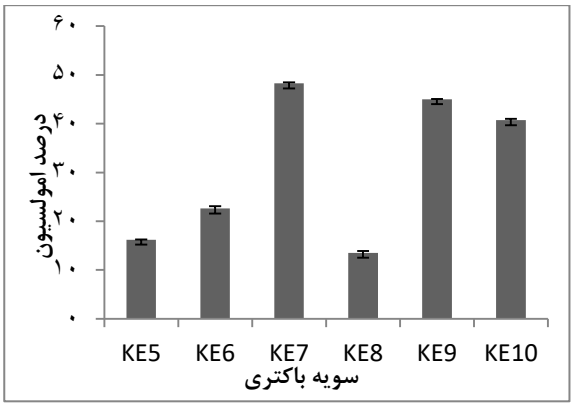
افزارهای Chromas و MAFFT انجام شد. همچنین به منظور تعیین شباهت گونه‌های به دست آمده در این مطالعه با سایر گونه ها، با استفاده از سایت www.ncbi.nlm.nih.gov در برنامه بلاست انجام شد و نرم‌افزار MEGA6 برای محاسبه فاصله‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت.

۳. نتایج

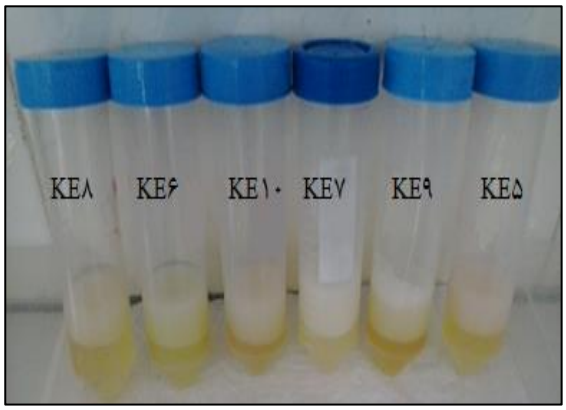
به منظور جداسازی و خالص‌سازی بافت اسفنج پس از هموژنیزه شدن و کشت در محیط مارین آگار به مدت ۱۰ روز در انکوباتور و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. پس از ۱۰ روز کلنی‌های باکتری جدا و در محیط کشت تازه مارین آگارکشت یافتند. کلنی باکتری‌ها پس از حدود ۳ روز به حداکثر رشد خود دست می‌یافتند. برای شناسایی سویه‌های تجزیه کننده نفت خام، باکتری‌ها بر اساس انواع تست‌های بیوشیمیایی بررسی و نیز به لحاظ مولکولی شناسایی شدند. نتایج حاصل از شناسایی سیستماتیک در جدول ۳ و نتایج شناسایی مولکولی و مقایسه توالی ژن ۱۶SrRNA سویه‌های جداسازی شده با سایر سویه‌ها از طریق همترازی ژنومی (بلاست) و فاصله ژنتیکی با نزدیک‌ترین سویه‌ها در جدول ۴ و تصویر ژل الکتروفورز در شکل ۱ آورده شده است.

شکل۱: تصویر الکتروفورز ژن ۱۶rRNA سویه‌های جداسازی شده

پس از ۷ روز از کشت باکتری‌ها در محیط براث، میزان فعالیت امولسیون آن‌ها اندازه‌گیری شد. فعالیت امولسیون به عنوان درصد لایه امولسیون شده برحسب سانتی‌متر تقسیم بر ارتفاع کل ستون مایع تعریف و برای جداسازی باکتری‌های نفت‌خوار انجام می‌شود. در این مطالعه، ارتفاع لایه امولسیون اندازه‌گیری و شاخص امولسیون بر حسب درصد به دست آمد. سویه KE۷ بیشترین و سویه KE۸ کمترین فعالیت امولسیون را دارا بودند. نتایج حاصل از شاخص امولسیون سازی در شکل های ۲ و ۳ آورده شده است.



شکل ۲: نمودار شاخص امولسیون‌سازی ۶ سویه جداسازی شده



شکل ۳: شاخص امولسیون سازی سویه‌ها

جدول ۳: مشخصات سیستماتیک سویه‌های تجزیه کننده نفت خام

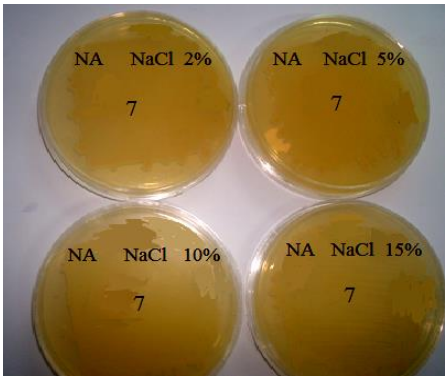
سویه	مشخصات سیستماتیک
KE۵	کوکسی خوشه‌ای گرم مثبت-کاتالاز مثبت-کواگولاز مثبت-همولیز مثبت- نیترات مثبت-ژلاتین مثبت- مانیتول مثبت
KE۶	میله‌ای گرم مثبت-کاتالاز مثبت-نیترات منفی- هیدرولیز نشاسته منفی-تشکیل هاگ
KE۷	میله‌ای گرم مثبت- هیدرولیز نشاسته مثبت-کراتین منفی-آرابینوز منفی- تشکیل هاگ
KE۸	باسیل گرم منفی-همولیز مثبت-اوره مثبت-اکسیداز مثبت-گلوکز منفی- لاکتوز منفی-ایجاد رنگدانه سبز
KE۹	میله‌ای گرم مثبت-هیدرولیز نشاسته مثبت-کراتین منفی-آرابینوز منفی-تشکیل هاگ
KE۱۰	میله‌ای گرم مثبت-سیترات مثبت-هیدرولیز نشاسته مثبت-کراتین مثبت

جدول ۴: نزدیک‌ترین سویه‌های پایگاه داده با توالی ژن SrRNA ۱۶ باکتری‌های توالی‌یابی شده

نام سویه	نزدیک‌ترین سویه	درصد شباهت	فاصله ژنتیکی
KE۵	Staphylococcus aureus subsp. N315	۹۵	۰/۰۴۵
KE۶	Exiguobacterium sp. AT1b	۸۶	۰/۰۱۷
KE۷	Pseudomonas rhodesiae CIP 104664	۹۰	۰/۰۷۲
KE۸	Luteimonasterricola BZ92r	۹۷	۰/۰۲۸
KE۹	[Brevibacterium] frigoritolerans DSM 8801	۹۹	۰/۰۱۶
KE۱۰	Pseudomonas geniculata ATCC 19374	۹۹	۰/۰۱۶

نتایج حاصل از کشت سویه ها در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد نشان داد که فقط سویه KE۵ گرمادوست می‌باشد و در این دما پس از ۳ روز کلنی تشکیل داد.

به منظور شناسایی سویه‌های نمک‌دوست، سویه‌ها در غلظت‌های ٪۲ ، ٪۵ ، ٪۱۰ و ٪۱۵ نمک، در محیط نوترینت آگار کشت داده شد و نتایج حاصل از ۳ بار تکرار آزمایش نشان داد که در غلظت ٪۲ همه سویه ها رشد خوبی داشتند اما رشد سویه شماره KE۵ ضعیف‌تر از بقیه و در حد چند کلنی بود. در غلظت ٪۵ درصد همه سویه‌ها از جمله سویه KE۵ رشد خوبی داشتند ولی رشد سویهKE۱۰ کاهش یافته بود. در غلظت ٪۱۰ سویه‌های KE۶ و KE۷ رشد خوبی داشتند و سویه - KE۵ در حد چند کلنی رشد نموده بود ولی بقیه سویه-ها اصلا رشدی نشان ندادند. در غلظت ٪۱۵ به جز سویه KE۷ که رشد خوبی داشت، هیچ کدام از سویه‌ها رشدی نشان ندادند. شکل شماره ۴ رشد باکتری KE7 را در غلظت‌های مختلف نمک نشان می‌دهد (Oren, 2002).



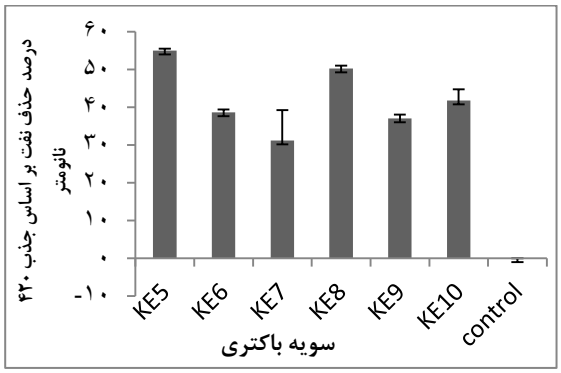
شکل۴: رشد سویه KE7 در غلظت ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد نمک

رشد باکتری‌ها به طور غیر مستقیم از طریق اندازه‌گیری میزان کدورت و میزان حذف نفت خام بر اساس اندازه-گیری غلظت نفت باقی‌مانده در طول موج ۴۲۰ نانومتر و اندازه‌گیری وزن خشک بررسی شد. نتایج حاصل از ۳ بار تکرار آزمایش در جدول ۵ آورده شده است.

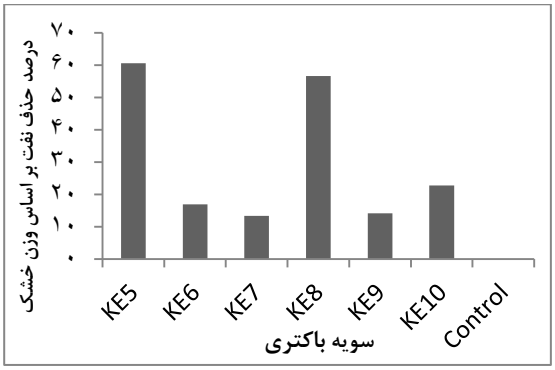
محیط کشت‌هایی که بالاترین میزان تجزیه نفت را داشتند، دارای وزن خشک و جذب پایین‌تری بودند. جذب نمونه‌ها از جذب شاهد کم شد و تقسیم بر جذب شاهد شد و میزان حذف نفت بر حسب درصد به دست آمد. در مورد وزن خشک نمونه‌ها، میزان نفت خشک شده اندازه‌گیری و از وزن نفت خشک شاهد کم شد و میزان خالص تجزیه به دست آمد. نتایج حاصل از ۳ بار تکرار آزمایش در مورد حذف نفت بر اساس جذب آن به صورت میانگین در شکل ۵ و نتایج حاصل از وزن خشک نفت باقی‌مانده در شکل۶ آورده شده است.

جدول ۵: میزان رشد باکتری‌ها و تجزیه نفت

نمونه	میزان رشد درطول موج ۶۲۰ نانومتر	میزان جذب نفت در طول موج ۴۲۰ نانومتر	وزن خشک(گرم)
KE۵	۰/۴۱±۰/۰۱	۰/۸۴±۰/۰۱	۱
KE۶	۰/۵۸±۰/۱۲	۱/۱۴±۰/۰۲	۲/۱۱
KE۷	۰/۲۳±۰/۰۱	۱/۲۷±۰/۱	۲/۲
KE۸	۰/۶۵±۰/۰۱	۰/۹۵±۰/۰۲	۱/۱
KE۹	۰/۳۰±۰/۰۳	۱/۱۹±۰/۰۲	۲/۱۸
KE۱۰	۰/۳۳±۰/۰۳	۱/۰۴±۰/۰۶	۱/۹۶
شاهد	۰	۱/۸۹±۰/۰۲	۲/۵۴



شکل۵: درصد حذف نفت بر اساس جذب ۴۲۰ نانومتر



شکل۶: درصد حذف نفت خام بر اساس میزان وزن خشک

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه باکتری‌های همراه با اسفنج *Pachychalina*sp. جداسازی و در محیط مارین آگار کشت یافتند و از بین سویه های جداسازی شده ۶ سویه که قابلیت تجزیه نفت را دارا بودند برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. فعالیت امولسیون کنندگی در سویه‌های به دست آمده از این تحقیق بالا بود و توانایی تولید بیوسورفاکتانت را دارا بودند که بالاترین شاخص امولسیون‌سازی مربوط به سویه شماره ۷ با ٪۴۸/۲۵ و حداقل شاخص امولسیون‌سازی نیز٪ ۱۳/۵۱ و مربوط به سویه شماره ۸ بود.

کارایی بیوسورفاکتانت تولید شده توسط باکتری‌ها با اندازه‌گیری فعالیت امولسیون بررسی می‌شود که باافزایش دسترسی زیستی هیدروکربن‌ها برای باکتری‌ها، میزان تجزیه‌زیستی را افزایش‌می‌دهد. این شاخص با افزایش رشد باکتری‌ها افزایش و نشان‌دهنده تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده می‌باشد و به طور عمده در مرحله رشد باکتری‌ها تولید شده و از متابولیت‌های اولیه بیومس سلولی می‌باشد (Dhail and

(Jasuja, 2012). Ahmad و همکاران این شاخص را در مورد باکتری *Enterobacter cloacae* E1 که یک باکتری تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی بود، بررسی کردند و نتایج نشان داد که شاخص امولسیون‌سازی این باکتری ٪۶۲ می‌باشد و بیوسورفاکتانت تولید شده توسط این سویه، کشش سطحی را از ۶۴mN/m به ۳۶ کاهش می‌داد(Ahmad *et al.*, 2014) Sepahi و همکاران این شاخص را در مورد ۱۵ گونه *Bacillus* تجزیه‌کننده نفت بررسی کردند که دو سویه *Bacillus* S35 و *Bacillus* S6 به ترتیب دارای بالاترین‌شاخص امولسیون‌سازی ٪۸۵ و ٪۷۱ بودند همچنین مطالعه صورت گرفته توسط آن‌ها نشان داد که میزان E24 با افزایش رشد افزایش و پس از ۴۸-۳۲ ساعت به مقدار ثابت می‌رسید (Sepahi *et al.*, 2008).

بعضی از میکروارگانیسم‌ها در شرایط محیطی مانند شوری بالا، دمای بالا، فشار و pH بالا زندگی می‌کنند و برای زنده ماندن نیاز به این شرایط دارند. چنین میکروارگانیسم‌هایی به علت سازگاری با این شرایط، در فرایند تصفیه‌زیستی می‌توانند مفید واقع شوند. افزایش دما، تاثیر مثبت در تجزیه هیدروکربن‌ها داشته و باعث کاهش گرانروی، افزایش انحلال‌پذیری و انتشار سریع آلودگی‌های آب‌گریز می‌شود. به علت مفید بودن محیط‌های با دمای بالا در تجزیه نفت، باکتری‌های حرارت دوست مورد توجه می‌باشند. این باکتری‌ها در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی پایدار بوده و سرعت رشد بالاتری نسبت به باکتری‌های مزوفیل دارند (Nicholson,2005; Lade, 2014,).

سویه KE۵ در این مطالعه یک سویه حرارت‌دوست بود و در دمای ۶۰ درجه رشد داشت. میزان تجزیه نفت خام توسط این سویه بالا بود و می‌توان از آن برای تصفیه‌زیستی در محیط‌هایی مثل خلیج‌فارس که دمای آن در فصول گرم افزایش می‌یابد، استفاده نمود.

استرس‌های اسمزی برای بیشتر موجودات یک عامل کشنده است. با افزایش میزان شوری، تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌ها به علت کاهش فعالیت میکروبی، کاهش دسترسی زیستی آلاینده‌ها و کمبود میزان اکسیژن محلول، کاهش می‌یابد. همچنین در شوری بالا، آبدوستی سطح سلول میکروارگانیسم‌ها افزایش یافته، اتصال سلول‌های میکروبی به هیدروکربن‌های آبگریز کاهش یافته و سطح سلول‌ها نیز در تنش‌های اسمزی خشک می‌شود. شوری بالا به شدت بر تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌ها تاثیر می‌گذارد و تنها در شرایط شوری کم یا گستره محدودی از شوری، باکتری‌ها توانایی تجزیه هیدروکربن‌ها را دارند و میزان حذف ترکیبات آروماتیک در محیط‌های شور، کاهش می‌یابد (Mehrshad *et al*., 2012).

Bertrand و همکاران در سال ۱۹۹۰ در بررسی‌های خود به این نتیجه دست یافتند که *Archaebacterium* EH4 شورپسند، توانایی تجزیه تعداد زیادی از هیدروکربن‌های آلیفاتیک سیرشده و آروماتیک را دارا بود و در غلظت‌های بالای نمک، ترکیبات نفتی را تجزیه می‌کرد (Bertrand *et al*., 1990). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که سویه KE۷ یک سویه نمک دوست بوده، در غلظت‌های مختلف نمک رشد خوبی داشته و توانایی تجزیه نفت خام را نیز دارا می‌باشد. در محیط‌هایی مثل خلیج فارس که میزان شوری بالاست، با بهینه‌سازی سایر عوامل مثل مواد مغذی، این سویه می‌تواند تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌های نفتی را به خوبی انجام دهد.

در این مطالعه نفت باقی‌مانده در محیط کشت با استفاده از دی‌کلرومتان استخراج و جذب آن در طول موج ۴۲۰nm قرائت شد. نتایج نشان داد که همه سویه-ها، نفت خام را تجزیه کرده بودند و از این بین، سویه-های KE۵ و KE۸ کمترین میزان جذب و بالاترین میزان حذف را داشتند که به ترتیب جذب آن‌ها

۰/۰۱±۰/۸۴و ۰/۰۲±۰/۹۵ بود. نتایج نشان داد که کمترین وزن خشک و بیشترین درصد حذف، مربوط به سویه‌های KE۵ و KE۸ به ترتیب ۱و ۱/۱ گرم بود. بیشترین وزن خشک و کمترین درصد حذف نفت خام مربوط به سویه شماره ۹ و ۲/۱۸ گرم به دست آمد. وزن نمونه شاهد نیز ۲/۵۴ گرم بود. برای اندازه‌گیری میزان حذف ترکیبات نفت خام روش‌های مختلفی وجود دارد. در این مطالعه از روش اسپکتروفتومتری و اندازه‌گیری وزن خشک برای به دست آوردن میزان تجزیه نفت خام استفاده شد. در مطالعه‌ای که توسط Latha و همکاران صورت گرفته بود نفت باقی‌مانده در محیط با استفاده از ان-هگزان استخراج و با استفاده از سدیم‌سولفات بدون آب، آبگیری شده و با استفاده از دستگاه تبخیرکننده در فشار پایین، آن را خشک کردند و نتایج نشان داد که در نمونه‌هایی که وزن خشک پایین‌تری داشتند، میزان حذف نفت بیشتر بود (Latha & Kalaivani, 2012). Santisi و همکاران همچنین Hassanshahian و همکاران در مطالعات آزمایشگاهی که بر روی میکروارگانیسم های جدا شده در خلیج فارس انجام دادند، میزان حذف نفت خام را با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری کردند. در مطالعات صورت گرفته، نفت باقی‌مانده در محیط کشت با استفاده از تولوئن و دی‌کلرومتان استخراج و میزان جذب آن در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه هایی که تجزیه بالایی داشتند، دارای جذب پایین‌تری بودند(Hassanshahian *et al*., 2012 ; Santisi *et al*., 2015).

نزدیک‌ترین سویه به نمونه شماره ۵ با ٪۹۵ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۰۴۵ سویه *Staphylococcus aureus subsp* N315 می‌باشد. این سویه مقاوم به متیسیلین و در سال ۱۹۸۲ جداسازی شد و با استفاده ازهمترازی ژنی (بلاست)، بررسی‌های موتیف، پیش‌بینی جایگاه پروتئین و چهارچوب خواندن شناسایی شد و در سال ۲۰۰۱ توالی ژنوم آن توسط Kuroda و همکاران با استفاده از توالی یابی تصادفی shot-gun تعیین گردید (Kuroda *et al*., 2001).

نزدیک‌ترین سویه به نمونه شماره ۶ با ٪۸۶ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۱۷ سویه *Exiguobacterium sp*. AT1b می‌باشد که یک باکتری حرارت‌دوست، بی‌هوازی اختیاری، گرم مثبت، کاتالاز مثبت، محتوی GC کم و از آب‌های گرم با میزان کربنات کلسیم بالا با خاصیت قلیایی جدا شده بود. Vishnivetskaya و همکاران در سال ۲۰۱۱ توالی کامل ژنوم این سویه را تعیین کردند و حاوی ژن‌های تجزیه‌کننده سلولز و همی‌سلولز بود (Vishnivetskaya *et al*., 2011). نزدیک‌ترین سویه به نمونه شماره ۷ با ٪۹۰ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۰۷۲، سویه *Pseudomonas rhodesiae CIP* 104664 می-باشد. سویه شماره ۷ همچنین ٪۹۰ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۰۷۴ با سویه *Pseudomonas grimontii CFML* 97-514 دارد. این سویه در سال ۲۰۰۲ توسط Baida و همکاران از آب‌های معدنی طبیعی جداسازی شد. بررسی توالی SrRNA ۱۶ این سویه با دیگر سویه-های جنس *Pseudomonas* نشان داد که سویه CFML یک نوع جدید در بین *Pseudomonas fluorescens* است. این سویه جدید دارای یک تاژک قطبی، میله‌ای متحرک، دارای رنگیزه‌های فلورسانس و حاوی GC بالا (٪۵۸) بود و در غلظت نمک پایین (٪۰/۸) و دمای c° ۴ رشد می‌کرد (Baida *et al*., 2002).

نزدیک‌ترین سویه به نمونه شماره ۸ با ٪۹۷ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۰۲۸ سویه *Luteimonas terricola* BZ92r می‌باشد. این سویه در سال ۲۰۱۰ توسط Zhang و همکاران از خاک‌های آلوده به نفت سنگین جداسازی شد که یک باکتری گرم منفی، هوازی، میله-ای، سازگار با سرما، حاوی ٪۷۲ GC و در محدوده دمایی C°۲۵-۱ رشد می‌کرد (Zhang *et al*., 2010).

سویه شماره ۹، ٪۹۸ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۰۱۹ با سویه *Bacillus simplex* LMG 11160 دارد که یک سویه با محتوی GC بین ۳۹/۵ تا ۴۱/۶ می‌باشد و در سال ۲۰۰۵ توسط Heyrman و همکاران از بقایای نقاشی‌های روی دیوار در آلمان و اسپانیا جداسازی شد (Heyrman *et al*., 2005).

نزدیک‌ترین سویه به نمونه شماره ۱۰ با ٪۹۹ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰،/۰۱۶ *Pseudomonas geniculata*ATCC 19374 می‌باشد که یک باکتری، میله‌ای، هوازی و دارای تاژک قطبی می‌باشد و توسط Anzai و همکاران در سال ۲۰۰۰ بر اساس توالی ژن ۱۶SrRNA شناسایی شد (Anzai *et al*., 2000). سویه شماره ۱۰ همچنین ٪۹۸ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۰۲۱ با سویه *Stenotrophomonasmaltophilia* R551-3 دارد که یک باکتری غنی از GC ، بیماری‌زای انسانی، فرصت طلب و مقاوم به آنتی‌بیوتیک است که در بیماری‌های عفونی نقش دارد (Banerjee and Roy, 2009).

با توجه به نتایج به دست آمده از تحلیل های بیوانفورماتیکی به نظر می رسد سویه های شماره ۶ و ۷ پتانسیل قابل توجهی برای انجام مطالعات بیشتر مولکولی و بیوشیمیایی دارا بوده و امکان معرفی آنها به عنوان سویه‌های جدید وجود دارد. این سویه‌ها تجزیه نفت را به صورت کاراتری انجام می‌دهند. افزایش دما، تاثیر مثبت در تجزیه هیدروکربن‌ها داشته و باعث کاهش گرانروی، افزایش انحلال‌پذیری و انتشار سریع آلودگی‌های آب‌گریز می‌شود. به علت مفید بودن محیط‌های با دمای بالا در تجزیه نفت، باکتری‌های حرارت دوست مورد توجه می‌باشند و سرعت رشد بالاتری نسبت به باکتری‌های مزوفیل دارند. سویه شماره ۵ در این مطالعه یک سویه حرارت‌دوست بود و در دمای ۶۰°C رشد داشت. میزان تجزیه نفت خام توسط این سویه بالا بود و می‌توان از آن برای تصفیه-زیستی در محیط‌هایی مثل خلیج فارس که دمای آن در فصول گرم افزایش می‌یابد، استفاده کرد و به علت این که این سویه بومی خلیج‌فارس می‌باشد، می‌تواند شرایط خلیج فارس را تحمل کنند. همچنین شوری بالا به شدت بر تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌ها تاثیر می‌گذارد و تنها در شرایط شوری کم یا گستره محدودی از شوری، باکتری‌ها توانایی تجزیه هیدروکربن‌ها را دارند و میزان حذف ترکیبات آروماتیک در محیط‌های شور، کاهش می‌یابد. اما برخی از باکتری‌ها نسبت به شوری بالا سازگاری یافته‌اند و این شرایط را تحمل می‌کنند. جداسازی و شناسایی چنین باکتری‌هایی، می‌تواند یک راه کار مناسب در پتانسیل استفاده از آن‌ها در محیط-های آلوده و شور باشد. فرایندهای صنعتی می‌تواند باعث افزایش شوری محیط، و کاهش تجزیه هیدروکربن‌ها شود. در چنین مواردی ابتدا باید آلودگی-های نمکی برطرف شده و سپس تصفیه زیستی صورت بگیرد. حذف چنین آلودگی‌هایی هزینه‌بر و در برخی موارد برای محیط آسیب رسان است. استفاده از باکتری‌های شورپسند در این محیط‌ها، می‌تواند باعث کاهش هزینه گردد. نتایج به دست آمده از این طرح توانایی کاربرد در سازمان‌هایی چون محیط زیست و شرکت نفت را دارا بوده و می‌تواند برای حذف آلودگی-های نفتی در محیط‌های دریایی و خشکی به کار برده شود.

منابع

Ahmed AW., Alzubaidi FS. and Hamza SJ. 2014. Biodegradation of Crude Oil in Contaminated Water by Local Isolates of Enterobacter cloacae. Iraqi Journal of Science. 55:1025-1033.

AnzaiY., Kim H., Park JY., Wakabayashi H. and Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 50(4): 1563-1589.

Heyrman J., Logan N A., Rodríguez-Díaz, M., Scheldeman P., Lebbe L., Swings J.and De Vos P. 2005. Study of mural painting isolates, leading to the transfer of 'Bacillus maroccanus' and 'Bacillus carotarum'to Bacillus simplex, emended description of Bacillus simplex, re-examination of the strains previously attributed to 'Bacillus macroides' and description of Bacillus muralis sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 55(1): 119-131.

Islam M S. and Tanaka M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Marine pollution bulletin. 48(7): 624-649.

Kämpfer P., Arun A., Busse H J., Langer S., Young C C., Chen W M. and Rekha, P. 2010. Georgenia soli sp. nov., isolated from iron-ore-contaminated soil in India. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 60(5): 1027-1030.

Kiran G S., Thomas T A., Selvin J., Sabarathnam B. and Lipton A. 2010. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine Brevibacterium aureum MSA13 in solid state culture. Bioresource technology.101(7): 2389-2396.

Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I. and Nagai, Y. 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. The Lancet. 357(9264): 1225-1240.

Lade AT. 2014. Bioremediation of Hydrocarbons via Geobacillus Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. Bacteriological Reviews. 38(3): 272.

Latha R. and Kalaivani, R. 2012. Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. Advances in Applied Science Research. 3(5):2789-2795.

Liu H., Yao J., Yuan Z., Shang Y., Chen H., Wang F. and Blake R. E. 2014. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. International Biodeterioration & Biodegradation. 87: 52-59.

Baïda N., Yazourh A., Singer E. and Izard D. 2002. Pseudomonas grimontii sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 52(5): 1497-1503.

Banerjee R. and Roy D. 2009. Codon usage and gene expression pattern of Stenotrophomonas maltophilia R551-3 for pathogenic mode of living. Biochemical and biophysical research communications. 390(2): 177-181.

Bertrand JC., Almallah M., Acquaviva M. and Mille G. 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaebacterium. Letters in Applied Microbiology. 11(5): 260-263.

Buddingh G. 1975. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition, edited by RE Buchanan and NE Gibbons. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 24(3): 550-550.

Chand Raza A. and Nusrt J. 2010. Evaluation of biodegradation potential of bacteria in crude oil contaminated soil. Biologia. 56:77-85.

Cheng N., Fang Z., Huang H., Fang Z., Wu X. and Bao S. 2008. Phylogenetic diversity of bacteria and Archaea associated with the marine sponge Pachychalina sp. Polish Journal of Ecology.56(3): 505-510.

Dhail S. and Jasuja N D. 2012. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria. African Journal of Environmental Science and Technology. 6(6): 263-266.

Fuerst JA. 2014. Diversity and biotechnological potential of microorganisms associated with marine sponges. Applied microbiology and biotechnology. 98(17): 7331-7347.

Hassanshahian M., Emtiazi G., Kermanshahi R K. and Cappello S. 2010. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. Soil and Sediment Contamination. 19(3):277-291.

Hassanshahian M., Tebyanian H. and Cappello S. 2012. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, Yarrowia lipolytica PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. Marine pollution bulletin. 64(7): 1386-1391.

Hassanshahian M., Zeynalipour MS. and Musa, FH. 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). Marine pollution bulletin. 82:39-44.

Mehrshad M., Amoozegar M., Yakhchali B. and Shahzade-Fazeli, S. 2012. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia Lake. Biol. J. Microorg. 1: 49-70.

Milić JS., Beškoski V P., Ilić M V., Ali S A., Gojgić-Cvijović G. Đ. and Vrvić M M. 2009. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. Journal of the Serbian Chemical Society. 74(4): 455-460.

Mills M A., Bonner J S., McDonald T J., Page C A. and Autenrieth R L. 2003. Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. Marine Pollution Bulletin. 46(7): 887-899.

Nemati Kh., savari A., Safahieh A., and Ghanemi k. 2016. Investigation of the efficiency of tetraselmis sp microalgae in removal of chrysene aromatics hydrocarbons and Benzo (a) pyrene from Imam Khomeini portland petrochemical. Journal of Marine Science and Technology, doi: 10.22113/jmst.2016.39404

Nicholson C A. 2005. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by halophilic and halotolerant microorganisms. Oklahoma State University.

Oren A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 28(1):56-63.

Pathak H. 2011. Alcaligenes-the 4T engine oil degrader. Journal of Bioremediation and Biodegradation.

Porebski S., Bailey LG. and Baum B R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant molecular biology reporter. 15(1): 8-15.

Roozbehani B., Mirdrikvand M., Moqadam SI, and Khalifeh A. 2013. Effect of Pseudomonas Bacteria Biosurfactants on Persian Gulf Crude Oil Water Contamination: Optimized Conditions of Effective Parameters. American Journal of Oil and Chemical Technologies. 1:8-23

Santisi S., Cappello S., Catalfamo M., Mancini G., Hassanshahian M., Genovese L. and Yakimov M M. 2015. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. Brazilian Journal of Microbiology. 6(2): 377-387.

Santos O., Soares A., Machado F., Romanos M., Muricy G., GiambiagideMarval M. and Laport M. 2015. Investigation of biotechnological potential of sponge associated bacteria collected in Brazilian coast. Letters in applied microbiology. 60(2): 140-147.

Sepahi A A., Golpasha I D., Emami M., and Nakhoda A. 2008. Isolation and Characterization of Crude Oil Degrading Bacillus Spp. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering. 5:149-154.

Shahaliyan F., Safahieh A., Salamat N., Mojudi F. and Zaredost M. 2015. Investigating the ability of anthracene biological removal from *Bacillus pumilus* bacteria isolated from Imam Khomeini port sediments . Journal of Marine Science and Technology. 14(3): 35-43

Sheyni Y., Motamedi H. and Pourbabaei A. 2014. Isolation and identification of oil sludge degrading bacteria from production tank Number 9 Masjed Soleiman. Biological Journal of Microorganism. 3(10): 13-26.

Ukpaka C. 2011. The effect of mesophilic and thermophilic temperature on bonny light crude oil degradation in Niger Delta Area of Nigeria using Pseudomonas sp. Journal of Engineering and Technology Research. 3(13): 360-370.

Vishnivetskaya T A., Lucas S., Copeland A., Lapidus A., del Rio T G., Dalin E. and Pitluck S. 2011. Complete Genome Sequence of the Thermophilic Exiguobacterium sp. AT1b. Journal of bacteriology. 193:2880-2881

Wang G. 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.33(7):545-551.

Watanabe K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. Current opinion in biotechnology. 12(3): 237-241.

Zhang D C., Liu H C., Xin YH., Zhou YG., Schinner F. and Margesin R. 2010. Luteimonas terricola sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from soil. International journal of systematic and evolutionary microbiology.60(7), 1581-1584.

Isolation and Molecular Identification of Oil Degrading Bacteria Associated with *Pachychalina* sp. Sponge

Khanomnaz Ebadi[1], Mandana Zarei[1 *], Ali Mohammad Sanati[3]

1. Marine biotechnology, Faculty of Marine Science and Technology, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
2. Persian Gulf Institute, Department of environment, Bushehr, Iran

Abstract

The aim of this study was to isolate and molecular identification of associated bacteria in sponges, with potential ability of biodegrading crude oil. Serial dilutions of homogenized *Pachychalina* sp. mesohyl were cultured in suitable medium for growth of marine microorganism. Obtained colonies were screened based on emulsification index and growth in medium containing 2% oil. Six strains which showed the highest growth rate and emulsification index were tested for the amount of oil removal in the minimal salt medium. Also the molecular identification was done Based on the 16SrRNA sequence and PCR. Removal of oil based on two methods; dry weight and absorption at 420 nm confirmed each other and both followed the same pattern. Accordingly KE5 and KE8 strains showed the highest degree of oil removing and molecular identification results revealed that they were most similar to strains of *Staphylococcus aureus* subsp. N31 and *Luteimonas terricola* BZ92r respectively. Also according to the results of bioinformatics analysis, it seems KE6 and KE7 respectively with 84% and 90% similarity with Exiguobacterium sp. AT1b and *Pseudomonas rhodesiae* CIP 104664 strains, have considerable potential for further molecular and biochemical studies and there is the possibility of introducing them as new strains.

Keywords:*Emulsification, Thermophile, Halophile, Persian Gulf, Marine bacteria*

Table 1: Materials required for polymerase chain reaction
Table 2: Polymerase Chain Reaction Program
Table 3: Systematic Specifications of crude oil degradation strains
Table 4: The closest strain of the database to the sequence of the 16SrRNA gene of the sequenced bacteria
Table 5: Growth rate of bacteria and oil degradation
Figure 1: Image of the 16srRNA gene electrophoresis for isolated strains
Figure 2: Emulsion index chart for 6 isolates
Figure 3: emulsification index
Figure 4: Growth of KE7 strain at concentrations of 2, 5, 10 and 15% salt
Figure 5: The percentage of oil removal based on absorbance at 420 nm
Figure 6: The percentage of crude oil removal based on dry weight

* Corresponding author, E-mail: zarei.mandana@yahoo.com