جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پنجم، شماره سوم و چهارم (پیاپی ۱۳) زمستان ۱۳۹۱
صفحات ۱۱۴-۱۰۵

Original Article

شناسایی ژن آلکان هیدروکسیلاز در باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک جدا شده از پساب های نفتی

حمید تبیانیان*[۱]، مهدی حسن شاهیان[۲]، اشرف کریمی نیک[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، [۳] دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: امروزه آلودگی های هیدروکربنی یکی از مهم ترین معضلات زیست محیطی به شمار می آیند. روش های بیولوژیک می توانند نقش مهمی در حذف این آلاینده های محیطی ایفا نمایند. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک و نیز شناسایی بهترین سویه تجزیه کننده انجام شد.

مواد و روش ها: نمونه برداری از پساب انبار نفت در شهرهای کرمان، تهران و خاک های آلوده به هیدروکربن صورت گرفت. با استفاده از روش های غنی سازی در محیط بوشنل هاس حاوی هگزادکان (به عنوان منبع کربن) باکتری های تجزیه کننده جداسازی شدند. به منظور شناسایی سویه های برتر قسمتی از ژن 16SrDNA با روش PCR تکثیر و سپس تعیین توالی گردید. همچنین حضور ژن آلکان هیدروکسیلاز در سویه های یاد شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تأیید شد.

یافته ها: در مجموع ۱۵ سویه باکتریایی تجزیه کننده جداسازی گردید که از این میان ۸ مورد از آن ها به عنوان سویه های برتر شناخته شدند. این سویه ها متعلق به گونه های: *Rhodococcus jostii*، *Achromobacter piechaudii*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas fluorescens*، *Rhodococcus erythropolis*، *Tsukamurella tyrosinosolvens*، *Stenotrophomonas maltophilia strain* M2 و *Stenotrophomonas maltophilia strain* Q1 بودند. در این مطالعه بیشترین میزان رشد سویه ها در غلظت ۲/۵ درصد هگزادکان و کمترین آن در غلظت ۷ درصد مشاهده گردید. همچنین تمامی باکتری های تجزیه کننده دارای ژن آلکان هیدروکسیلاز بودند.

نتیجه گیری: در مجموع نتایج این تحقیق نشان دهنده تنوع بالای باکتری های تجزیه کننده در اکوسیستم ایران و نیز توانایی آن ها در تخریب پساب های نفتی است. بنابراین با یک مدیریت مناسب می توان با استفاده از این باکتری ها، آلودگی های ناشی از پساب صنایع نفتی را به حداقل رساند.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، آلکان هیدروکسیلاز، واکنش زنجیره ای پلیمراز.

دریافت مقاله: خرداد ۹۱ پذیرش برای چاپ: شهریور ۹۱

مقدمه

امروزه یکی از مهم ترین مسائلی که بشر با آن مواجه است، آلودگی محیط زیست می باشد. به ویژه در ۵۰ سال اخیر که میزان و تنوع آلاینده های نفتی به شدت افزایش یافته است. از آنجایی که انتقال فرآورده های مختلف نفت خام به وسیله کشتی ها انجام می پذیرد در نتیجه امروزه یکی از اصلی ترین عوامل آلاینده در اقیانوس ها و دریاها نیز به شمار می روند (۱ و ۲). از میان روش های مختلف حذف آلاینده های نفتی

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۹۸۰۴۵۷۴۳ پست الکترونیک: Tebyan.hamid@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

روش های بیولوژیک نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه تر می باشند. در حال حاضر اطلاعات مفیدی در مورد تجزیه میکروبی هیدروکربن ها به صورت جداگانه در دسترس است. اما اطلاعات چندانی در مورد تجزیه محصولات نفتی مانند بنزین، نفت سفید و گازوییل وجود ندارد (۳).

سویاما (Suyama) و همکاران در سال ۱۹۹۸ باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک را از رودخانه Labraki prefecture واقع در ژاپن جداسازی و شناسایی نمودند. مطالعه آن ها نشان داد که بیشتر این باکتری ها از جنس های *سودوموناس* (*Pseudomonas*) و *واریو وراکس* (*Variovorax*) می باشند (۴). شارما (Sharma) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ موفق به جداسازی باکتری از جنس *رودوکوکوس* (*Rhodococcus*) با قابلیت تجزیه ۵۰ درصد از بخش آلیفاتیک نفت خام شدند (۵). از آنجایی که مواد زاید نفتی حاوی ترکیبات سمی و خطرناک می باشند، لذا مدیریت این دسته از زائدات باید به صورت ایمن و کنترل شده انجام گیرد. با وجود حجم بالای فعالیت های نفتی و متعاقب آن تولید انبوه مواد زائد نفتی در کشور، امروزه دفع این مواد معمولاً بدون انجام پیش تصفیه و به صورت کنترل نشده انجام می گیرد. یکی از روش های دفع مواد زائد نفتی دفن و یا تلنبار کردن آن ها می باشد. اگرچه این روش در کشورهای پیشرفته ممنوع است، اما در بسیاری از کشورهای در حال توسعه به صورت گسترده ای در حال انجام می باشد (۶ و ۷). پاکسازی زیستی تکنیکی است که می تواند با استفاده از فعالیت طبیعی میکروارگانیسم ها برای جابجایی روغن و نفت زاید در شرایط محیطی و جغرافیایی مختلف به کار برده شود (۸). این مطالعه با هدف جداسازی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک و نیز شناسایی بهترین سویه تجزیه کننده انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری: به منظور جداسازی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات هیدروکربنی آلیفاتیک نمونه برداری از پساب انبار نفت در شهرهای کرمان، تهران و خاک های آلوده به هیدروکربن صورت گرفت. نمونه های خاک از عمق ۱۲cm-۱ سطح خاک های آلوده به ترکیبات نفتی با استفاده از چاقوی استریل به دست آمدند. نمونه های پساب نیز از عمق ۱۵ cm در بطری های ۱۰۰ میلی لیتری جمع آوری و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

ب) جداسازی و غربالگری باکتری های تجزیه کننده هگزادکان: محیط سنتزی پایه نمکی بوشنل - هاس (Bushnell Hass Mineral Salt) (BHMS) برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت خام استفاده شد. محیط BHMS حاوی ترکیبات زیر است (گرم بر لیتر): ۱ گرم KH_2PO_4، ۱ گرم K_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲ گرم $CaCl_2$، ۱ گرم NH_4NO_3 و ۱۰۰ میکرولیتر از $FeCl_3$ ۶۰ درصد. همچنین هگزادکان (۱٪) به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در این محیط استفاده شد.

در ابتدا یک گرم از نمونه خاک یا یک میلی لیتر از نمونه پساب به ارلن حاوی محیط BHMS (۱۰۰ میلی لیتر) اضافه و به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بر روی شیکر با دور ۱۸۰rpm گرما گذاری گردید. سپس ۵ میلی لیتر از این محیط به محیط جدید BHMS منتقل شد. پس از ۴ بار کشت مجدد، کلنی های باکتریایی بر روی محیط BHMS آگار خالص سازی گردیدند. شناسایی باکتری های تجزیه کننده به کمک تست های بیوشیمیایی و بر اساس منبع کتاب برگی انجام شد (۹).

ج) شناسایی باکتری های جدا شده: شناسایی مقدماتی سویه های جدا شده بر اساس رنگ آمیزی گرم، هوازی یا بی‌هوازی بودن، شکل کلنی، ویژگی های میکروسکوپی و حرکت انجام گرفت.

به منظور شناسایی مولکولی سویه ها از پرایمرهای Uni1492-R (5′-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3′) و Bac27-F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)، بر اساس ژن 16SrDNA، استفاده گردید. واکنش PCR با شرایط دمایی یک دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد منتقل گردید. باند ۱۴۰۰ جفت بازی از ژل آگاروز مطابق با دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و به منظور تعیین توالی ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک های ژنی بلاست و همولوژی آنها بررسی گردید. قرابت بالاتر از ۹۸ درصد به عنوان جنس و گونه باکتری مجهول در نظر گرفته شد (۱۰ و ۱۱).

د) سنجش رشد و حذف هگزادکان: منحنی رشد ایزوله ها به طور غیر مستقیم با اندازه گیری کدورت به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. میزان حذف هگزادکان با حل کردن مقدار نفت باقی مانده محیط کشت در دی کلرو متان و سپس خواندن کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گردید.

ه) قابلیت تجزیه زیستی هیدروکربن هگزادکان: به منظور بررسی رشد باکتری ها، سویه های جداسازی شده به لوله حاوی هیدروکربن هگزادکان اضافه و پس از گذشت ۷ روز میزان رشد در ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد (۱۲).

و) سنجش هیدروفوبیسیته سطح سلولی: ابتدا سوسپانسیون میکروبی در بافر تهیه شد. ترکیبات بافر به شرح زیر است (گرم بر لیتر): ۲۲ گرم K_2HPO_4، ۲۲ گرم KH_2PO_4، ۷/۲۶ گرم اوره و ۰/۲ گرم $MgSO_4$. سپس ۲۰۰ میکرولیتر هیدروکربن اکتان به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. مخلوط حاصل پس از ۲ دقیقه همزنی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا فاز هیدروکربنی جدا گردد. نتایج به صورت درصد جذب فاز آبی پس از تیمار نسبت به جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۳).

ز) فعالیت آمیزندگی (E_{24}): باکتری های تجزیه کننده ابتدا در محیط نفت براث کشت داده شدند. پس از رسیدن به رشد لگاریتمی، ۴ میلی لیتر از محیط کشت به لوله آزمایش حاوی ۶ میلی لیتر نفت سفید استریل اضافه و با سرعت بالا مخلوط گردید. ترکیب حاصل به مدت ۲۴ ساعت به صورت ساکن در دمای محیط قرار داده شد. سپس فعالیت آمیزندگی (Emulsification) محاسبه گردید (۱۴).

ح) شناسایی مولکولی باکتری های تجزیه کننده هگزادکان: از پرایمرهای Alk3-F (5′-TCGAGCACATCCGCGGCCACCA-3′) و Alk3-R (5′-CCGTAGTGCTCGACGTAGTT-3′) (سیناژن، ایران) برای شناسایی ژن آلکان هیدروکسیلاز استفاده گردید (۱۵). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) حاوی KCl (500 mM) و Tris-HCl (100 mM)، ۲ میلی مول $MgCl_2$ (50 mM)، ۲۰۰ میکرومول dNTPs (10 mM)، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۰/۱۲ پیکومول از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر از نمونه DNA و ۱۹/۲ میکرولیتر آب مقطر دی یونیزه انجام گردید. واکنش PCR با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل اتصال در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت.

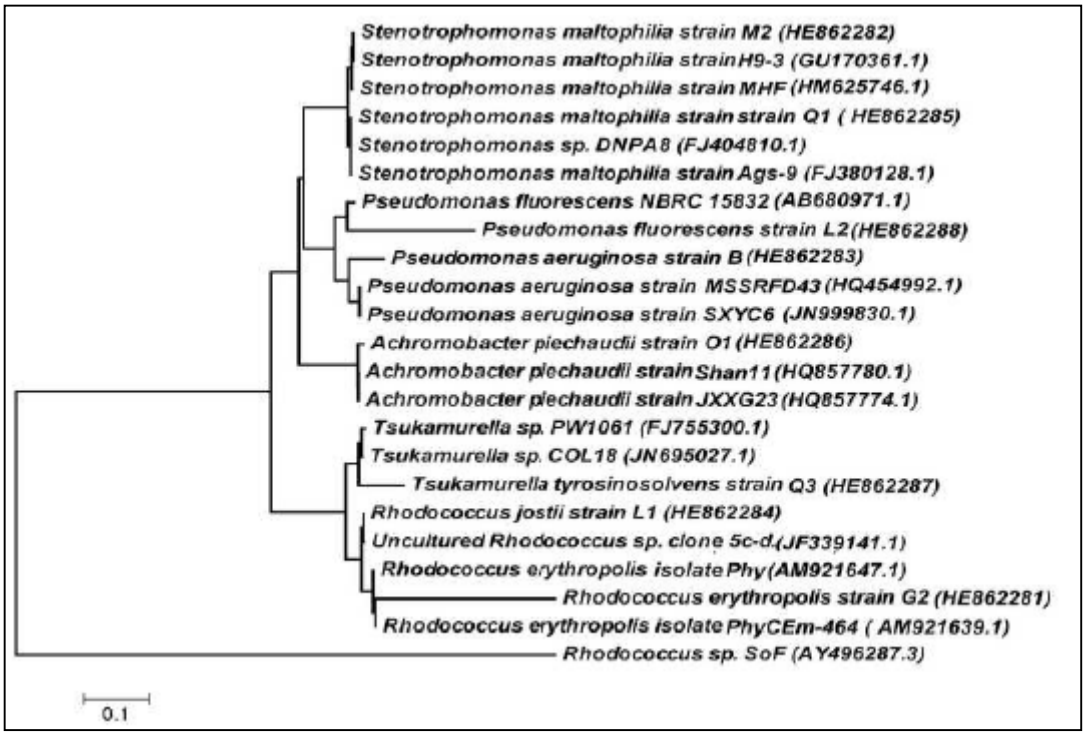
یافته‌ها

الف) جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده هگزادکان: در این مطالعه ۱۵ سویه باکتریایی تجزیه کننده هگزادکان از نمونه های خاک و پساب جداسازی گردید. اما با توجه به ویژگی های رشد در محیط حاوی هیدروکربن آلیفاتیک، برخی از سویه های باکتریایی جداسازی شده دارای رشد اندک در این شرایط حذف گردیدند. معیار دیگر غربالگری جهت انتخاب سویه های برتر در تجزیه هیدروکربن های آلیفاتیک، شباهت های مورفولوژیک و فیزیولوژیک سویه های باکتریایی نزدیک به هم بود. در مجموع با چند مرحله غربالگری ۸ سویه G2، L1، L2، M2،

O1، Q1، Q3 و B به عنوان سویه های برتر انتخاب شدند. جداسازی نمایند (۱۴). در مطالعه حاضر باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک از اکوسیستم های خاک و آب آلوده به پساب انبار نفت (کرمان و تهران) و نیز خاک هایی که به مدت طولانی در معرض آلاینده های هیدروکربنی بودند جداسازی شدند. اکوسیستم های انتخاب شده در این پژوهش با اکوسیستم های به کار رفته در مطالعات یاد شده هم خوانی دارد. زیرا بر اساس اصل تطابق، باکتری های تجزیه کننده در مکان هایی یافت می شوند که در تماس با آلاینده های هیدروکربنی یا نفتی باشند. در این پژوهش از همین اصل به منظور دستیابی به این باکتری ها استفاده گردید. با مقایسه جنس های شناسایی شده در مطالعه حاضر و نتایج به دست آمده از سایر مطالعات انجام شده بر روی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک مشخص می گردد که شباهت های زیادی بین سویه های باکتریایی جدا شده وجود دارد. به عنوان نمونه در مطالعه حاضر جنس های *رودوکوکوس* و *سودوموناس* به عنوان باکتری تجزیه کننده ترکیبات آلکان شناسایی شدند. این یافته با نتایج حاصل از مطالعه سانگ (Song) و همکاران در سال ۲۰۱۱ و نیز هویا (Huaa) و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد (۱۶ و ۱۷).

اما نکته قابل توجه در پژوهش حاضر شناسایی جنس های *Tsukamurella* و *Stenotrophomonas* برای اولین بار به عنوان سویه های تجزیه کننده های ترکیبات آلیفاتیک (هگزادکان) می باشد. در حالی که این دو جنس در مطالعات دیگر به عنوان باکتری تجزیه کننده ترکیبات آروماتیک شناخته شده بودند. این سویه ها متعلق به گونه های: *Achromobacter piechaudii*، *Rhodococcus jostii*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas fluorescens*، *Rhodococcus erythropolis*، *Tsukamurella tyrosinosolvens*، *Stenotrophomonas maltophilia* M2 و *Stenotrophomonas maltophilia* O1 بودند (شکل ۱).

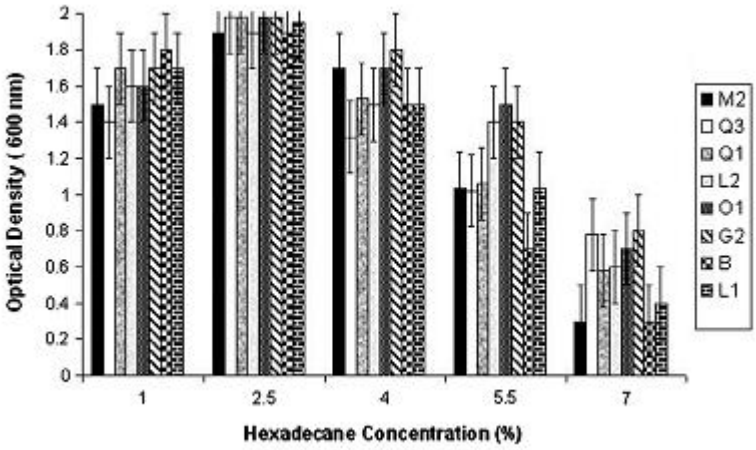
درخت فیلوژنیک با استفاده از توالی های منطقه مقایسه ای از توالی ژن 16SrDNA و ژن های موجود در پایگاه داده های عمومی، ساخته شده است. نوار این درخت فیلوژنیک نیز اختلاف ۰/۱٪ از سکانس را نشان می دهد. اطلاعات سکانسی نشان دهنده محل های انتخابی از جداسازی



شکل ۱: درخت فیلوژنتیکی باکتری های جداسازی شده

جدول ۱: میزان رشد، درصد هیدروفوبیسیته سطح سلولی و فعالیت آمیزندگی باکتری های تجزیه کننده هگزادکان

نام سویه باکتریایی تجزیه کننده	میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر	درصد هیدروفوبیسیته سطح سلولی(٪ BATH)	فعالیت آمیزندگی (E24 %)
B	۰/۸۱۳	۲۲	۱/۴۲
G2	۱/۶	۲/۳	۳۰/۸
Q3	۱/۹۵	۲۹	۷/۱۴
L1	۱/۹	۲۲	۲۸/۷
L2	۱/۹	۳۱	۲۸/۶
M2	۱/۸۹	۶	۲۹
O1	۱/۷	۳۲	۳۵/۷
Q1	۱/۹۶	۲۴	۶/۱۲



نمودار ۱: اثر غلظت های مختلف هگزادکان بر روی رشد باکتری های برتر تجزیه کننده

سویه ها می باشد.

ب) رشد سویه های باکتریایی تجزیه کننده در محیط حاوی هگزادکان: بیشترین میزان رشد مربوط به سویه های باکتریایی G2، L1، L2، M2، O1، Q3 و B بود. از بین سویه های O1 و Q3 بیشترین و B کمترین میزان رشد را داشتند (جدول ۱).

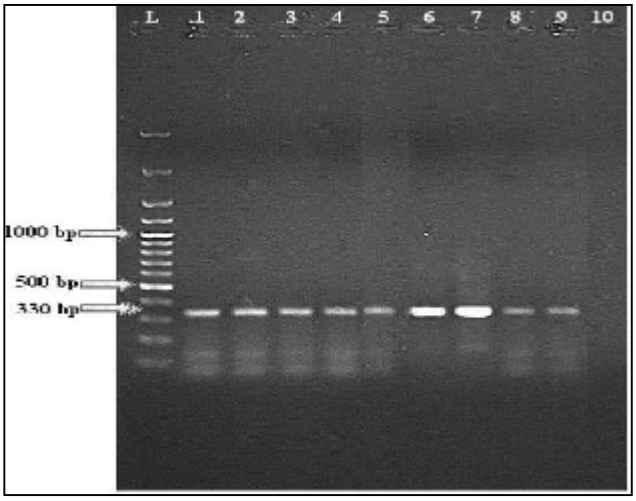
ج) هیدروفوبیسته سطح سلولی سویه های تجزیه کننده هگزادکان: از آنجایی که آب گریز بودن سطح سلولی به اتصال باکتری ها به ترکیبات هیدروکربنی (هیدروفوب) کمک می کند. از این رو سویه هایی که درصد بالاتری از این ویژگی ها را داشته باشند در تجزیه زیستی موثرتر هستند. در این مطالعه سویه های Q1، L2، Q3، L1 و B به ترتیب دارای بالاترین هیدروفوبیسته بودند (جدول ۱).

د) فعالیت آمیزندگی سویه های تجزیه کننده هگزادکان: باکتری هایی که قادر به تولید امولسیون بالاتری باشند به دلیل دسترسی به منبع انرژی بیشتر، قابلیت تجزیه بالاتری نیز خواهند داشت. همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است در مطالعه حاضر سویه های Q1، G2، M2، L1 و L2 به ترتیب دارای بالاترین فعالیت آمیزندگی بودند (جدول ۱).

ه) اثر غلظت های مختلف هگزادکان بر روی رشد باکتری های تجزیه کننده: در این مطالعه بیشترین میزان رشد سویه ها در غلظت ۲/۵ درصد هگزادکان و کمترین آن در غلظت ۷ درصد مشاهده گردید (نمودار ۱). در غلظت ۱ درصد هگزادکان سویه

های B بیشترین و Q3 کمترین میزان رشد را داشته اند. اما در غلظت ۴ و ۵/۵ درصد هگزادکان سویه های G2 و Q1 بیشترین میزان رشد را به خود اختصاص دادند. همچنین کمترین میزان رشد در غلظت ۷ درصد مربوط به سویه های M2 و B بوده است.

و) شناسایی ژن آلکان هیدروکسیلاز: از بین سویه های جداسازی شده ۸ سویه به دلیل دارا بودن ژن آلکان هیدروکسیلاز پس از PCR بر روی ژل آگاروز یک باند ۳۳۰ جفت بازی را نشان دادند (شکل ۲).



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز حاصل از PCR ژن آلکان هیدروکسیلاز. ۱) DNA مارکر bp ۱۰۰، ۲) کنترل مثبت (*P. aeruginosa AS*)، ۳) سویه G2، ۴) سویه M2، ۵) سویه B، ۶) سویه O1، ۷) سویه L1، ۸) سویه Q1، ۹) سویه Q3، ۱۰) کنترل منفی.

بحث

تاکنون باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک از محیط های گوناگون جداسازی شده اند. در بازنگری اخیر ۷۹ جنس باکتریایی شناسایی شده است که می توانند از هیدروکربن ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند. حسن شاهیان (Hassanshahian) و همکاران در سال ۲۰۱۲ موفق به جداسازی ۲۵ سویه باکتریایی تجزیه کننده ترکیبات هیدروکربنه نفت خام از محل های آلوده به ترکیبات نفتی در خلیج فارس و دریای خزر شدند. در این بین ۱۱ باکتری به جنس های *Cobetia*، *Alcanivorax*، *Marinobacter*، *Microbacterium*، *Acinetobacter*، *Gordonia*، *Pseudomonas*، *Rhodococcus* و *Halomonas* تعلق داشتند (۹).

باتیستا (Batista) و همکاران در سال ۲۰۰۶ توانستند ۱۷ باکتری تخریب کننده ترکیبات هیدروکربنه نفتی و تولید کننده بیوسورفاکتانت را از ترکیبات نفتی در نواحی ساحلی برزیل جداسازی نمایند (۱۴). در مطالعه حاضر باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک از اکوسیستم های خاک و آب آلوده به پساب انبار نفت (کرمان و تهران) و نیز خاک هایی که به مدت طولانی در معرض آلاینده های هیدروکربنی بودند جداسازی شدند. اکوسیستم های انتخاب شده در این پژوهش با اکوسیستم های به کار رفته در مطالعات یاد شده هم خوانی دارد. زیرا بر اساس اصل تطابق، باکتری های تجزیه کننده در مکان هایی یافت می شوند که در تماس با آلاینده های هیدروکربنی یا نفتی باشند. در این پژوهش از همین اصل به منظور دستیابی به این باکتری ها استفاده گردید. با مقایسه جنس های شناسایی شده در مطالعه حاضر و نتایج به دست آمده از سایر مطالعات انجام شده بر روی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک مشخص می گردد که شباهت های زیادی بین سویه های باکتریایی جدا شده وجود دارد. به عنوان نمونه در مطالعه حاضر جنس های *رودوکوکوس* و *سودوموناس* به عنوان باکتری تجزیه کننده ترکیبات آلکان شناسایی شدند. این یافته با نتایج حاصل از مطالعه سانگ (Song) و همکاران در سال ۲۰۱۱ و نیز هویا (Huaa) و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد (۱۶ و ۱۷).

اما نکته قابل توجه در پژوهش حاضر شناسایی جنس های *Tsukamurella* و *Stenotrophomonas* برای اولین بار به عنوان سویه های تجزیه کننده های ترکیبات آلیفاتیک (هگزادکان) می باشد. در حالی که این دو جنس در مطالعات دیگر به عنوان باکتری تجزیه کننده ترکیبات آروماتیک شناخته شده بودند.

داس (Das) و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که *Bacillus subtelis* بیوسورفاکتانت بیشتری نسبت به *سودوموناس* تولید می کند (۱۸). حسن شاهیان و همکاران

نیز در سال ۲۰۰۸ گزارش نمودند که ارتباط مستقیمی بین تولید بیوفیلم، تولید بیوسورفکتانت و تجزیه زیستی نفت خام وجود دارد (۱۹).

نتایج ارزیابی هیدروفوبیسیته سطح سلول و میزان فعالیت امولسیون کنندگی در این پژوهش نشان داد که باکتری های دارای سطح آب گریز بالاتر، به دلیل اتصال بیشتر به هیدروکربن های غیر قطبی، قابلیت تجزیه آلکان و فعالیت امولسیون کنندگی بیشتری دارند. بنابراین می توان نتیجه نمود که ارتباط مستقیمی بین هیدروفوبیسیته سطح سلولی و فعالیت امولسیون کنندگی در باکتری های جداسازی شده وجود دارد. همچنین یافته های تحقیق جاری نشان داد که بین میزان حذف آلکان ها و افزایش رشد در حضور هیدروکربن ارتباط مستقیمی وجود دارد. این مساله به نوعی با نتایج به دست آمده در مطالعه حسن شاهیان و همکاران در سال ۲۰۰۸ همخوانی دارد (۱۹). ون بیلن (Van beilen) و همکاران در سال ۲۰۰۳ موفق به شناسایی ژن *alkB* در باکتری های جداسازی شده از محیط هایی چون رسوبات آلاسکا، خاک های آلوده، اکوسیستم های سرد، محل آلوده به سوخت های نفتی، خاک فله، قطب شمال و جنوب و آب دریا شدند. همچنین محققین یاد شده نشان دادند که می توان از ژن *alkB* به عنوان یک مارکر برای پیش بینی پتانسیل تخریب نفتی از محیط های مختلف استفاده نمود (۲۰). در پژوهش حاضر، حضور ژن آلکان هیدروکسیلاز در ۱۵ باکتری جداسازی شده با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ژن در میان تمامی باکتری های جداسازی شده (به جز یک سویه) وجود دارد. این امر نشان دهنده ضرورت وجود این ژن در باکتری های تجزیه کننده آلکان ها می باشد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش تنوع بالای باکتری های تجزیه کننده در اکوسیستم ایران و نیز توانایی آن ها در تخریب پساب های نفتی را نشان داد. بنابراین با یک مدیریت مناسب می توان با استفاده از این باکتری ها آلودگی های ناشی از پساب صنایع نفتی را به حداقل ممکن رساند.

تشکر و قدرانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی کرمان به دلیل حمایت های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Fan CY, Krishnamurthy S. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. J Air Waste Manage Assoc. 1995; 45(6): 453-460.

2. Hua J. Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy. Ocean Engineering. 2006; 33(1): 52-67.

3. Gholizadeh H, Mohebatzadeh H. Unique to the study of the effects of gasoline kerosene and gasoline on the growth of several bacteria. The second of the National Congress of Biotechnology, Karaj, Iran 2011: 78370.

4. Suyama T, Hiroyuki H, Yutaka T. Bacterial isolates degrading aliphatic polycarbonates. FEMS Microbiol Letters. 1998; 161(2): 255-261.

5. Sharma S, Pant A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by amarine

Rhodococcus sp. Biodegradation. 2000; 11(5): 289-294.

6. Abbasi M, Abduli M, Nasrabadi T, Hoveidi H, Razmkhah N. Solid waste management in Tabriz petrochemical complex. J Environ Health Sci Eng. 2006; 3(1): 185-192.

7. Carpenter D, Genovese C. The generation use and disposal of waste crankcase oil in developing countries. Uganda J. 2009; 161(6): 835-841.

8. Muslimsphy V, Sadatnouhi A. The role of bacteria isolated from oil contaminated soil in cleaning the environment. J Biol Sci Res. 2007; 33(2): 154-163.

9. Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bull. 2012; 64(14): 7-12.

10. Cappello S, Caruso G, Zampino D Monticelli L, Maimone G, Denaro R, Tripodo B, Troussellier M, Yakimov M, Giuliano L. Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation, a microscale simulation study. J Appl Microbiol. 2007; 102(1): 184-194.

11. Cappello S, Denaro R, Genovese M, Giuliano L, Yakimov M. Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on "oil spill bioremediation" in mesocosms. Microbiol Res. 2007; 162(99): 185-190.

12. Subarna R, Dipak H, Debabrata B, Dipa B, Ranajit K. Survey of petroleum degrading bacteria in coastal waters of Sunderban biosphere reserve. World J Microbiol Biotechnol. 2002; 18(1): 575-581.

13. Pruthi V, Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. Biotechnol Tech. 1997; 11(3): 671-674.

14. Batista SB, Mounteer A, Amorim FR, Totola MR. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. Bioresource Tech. 2006; 97(1): 868-875.

15. Kohno T, Sugimoto Y, Sei K, Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection alkane-degrading bacteria. Microbiol Environ. 2002; 17(3): 114-212.

16. Huaa Z, Song R, Dua G, Li H, Chen J. Effects of EDTA and Tween 60 on biodegradation of n-hexadecane with two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem Eng J. 2007; 36(3): 66-71.

17. Song X, Xu Y, Li G, Zhang Y, Huang T, Hu Z. Isolation, characterization of *Rhodococcus sp. P14* capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. Marine Pollution Bull. 2011; 62(10): 2122-2128.

18. Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and

Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India: Bioresource Tech. 2007; 98(7): 1339-1345.

19. Hassanshahian M, Emtiazi G. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. Int Biodeterioration Biodegradation. 2008; 62(1): 170-178.

20. Van Beilen J, Li Z, Duetz W, Smits T,Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil Gas Sci Tech. 2003; 58(4): 427-440.

Journal of Microbial World
Volume 5, No. 3 & 4, January 2013

Original Article

Identification of alkane hydroxylase gene in aliphathic-degrading bacteria isolated from waste oil

Hamid Tebyanian[1], **Mehdi Hassanshahian**[2], **Ashraf Karimi nik**[3]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

[3] Ph.D. Student, Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Kerman, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Today hydrocarbon pollution is the most important environmental problem. Biological methods can play an important role in removing these contaminants to the environment. This study was aimed to isolate aliphatic compounds degrading bacteria and identify the best degrading strain.

Materials and Methods: Sampling of waste oil depot took in the city of Kerman, Tehran and hydrocarbon-contaminated soils. Alkane degrading bacteria were isolated by using enrichment Bushnel-Hass medium containing hexadecane (as source carbon). In order to identify superior strains, a part of 16SrDNA gene was amplified by PCR and then sequenced. Also, the presence of alkane's hydroxylase gene in these strains was confirmed by using specific primers.

Results: A total of fifteen alakne degrading bacteria were isolated which 8 strains were selected as superior strains. These strains belonged to the genus of *Rhodococcus jostii,Stenotrophomonas maltophilia strain M2, Achromobacter piechaudii, Tsukamurell atyrosinosolvens, Pseudomonas fluorescens, Rhodococcus erythropolis,Stenotrophomonas maltophilia strain Q1, Pseudomonas aeruginosa.* In this study, the highest growth rate of strians was in concentrations 2.5 percent of hexadecane and the lowest was found in 7 percent. Also, all of the strains have alkane hydroxylase gene.

Conclusion: Our results indicated that threre is a high diversity of degradative bacteria in Iran ecosystem and their ability to degrade petroleum wastewater. So, with a proper management of these bacteria can be used to minimize pollution caused by waste oil industries.

Keywords: Biodegradation, Alkane hydrolase, PCR.

Correspondance to: Hamid Tabyanian

Tel: +989198045743

E-mail: Tebyan.hamid@yahoo.com

Journal of Microbial World 2012, 5(3): 105-114.