

بررسی توانایی حذف زیستی نفت خام توسط باکتری جدا شده از خاک آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه شیراز

سارا شکرانیان^۱، مرتضی یوسفزادی^{۲*}، نرگس امراللهی بیوکی^۳

DOI: 10.22124/japb.2023.24454.1496

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۲

چکیده

امروزه، آلودگی‌های نفتی به یک نگرانی زیست‌محیطی جهانی تبدیل شده است. یکی از روش‌های حذف این آلودگی، استفاده از روش‌های زیستی، بویژه میکروارگانیسم‌ها است که مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست بوده و به همین علت در بین روش‌های دیگر از محبوبیت ویژه‌ای برخوردار است. این مطالعه با هدف بررسی امکان رشد باکتری‌های نفت‌خوار در خاک‌های آلوده به نفت و همچنین توانایی آنها در حذف نفت خام، انجام شد. بر اساس نرخ رشد باکتری در حضور نفت خام و توانایی تجزیه هیدروکربن، دو جدایه Sludge C و SHA از بین ۱۳ جدایه از خاک آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه شیراز جداسازی شدند. سپس برای سنجش نفت‌خواری با روش‌های اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که Sludge C و SHA به ترتیب با ۶۴/۴ و ۸۴/۲ درصد، توانایی نفت‌خواری در ۷ روز را داشتند. همچنین بررسی با کروماتوگرافی گازی مشخص کرد که جدایه SHA توانایی چشمگیری در حذف هیدروکربن‌های زنجیره کوتاه، متوسط و بلند داشت. شناسایی مولکولی نشان داد این جدایه به جنس و گونه *Acinetobacter junii* تعلق دارد. با توجه به توانایی بالای نفت‌خواری این سویه، می‌توان از آن به صورت کارآمد در زیست‌پالایی و صنعت استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آلودگی نفتی، باکتری نفت‌خوار، تجزیه زیستی، نفت خام، هیدروکربن.

۱- کارشناس ارشد زیست‌فناوری صنعت و محیط زیست، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۲- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۴- دانشیار گروه فناوری‌های نوین، پژوهشکده منطقه‌ای جنگل‌های حرا، دانشگاه هرمزگان.

* نویسنده مسئول: morteza110110@gmail.com

مقدمه

معروف‌ترین هیدروکربن‌ها، می‌توان به نفت خام و گاز طبیعی اشاره کرد (Speight, 2019). اما این ماده سیاه رنگ که به طلای سیاه نیز شهرت دارد، در طی سالیان اخیر خسارت‌های جبران ناپذیری را به محیط زیست و موجودات زنده وارد ساخته است. این آلودگی‌ها می‌توانند به روش‌های مختلف از جمله تصادف نفت‌کش‌ها، نشت از خطوط لوله، سکوها‌های دریایی و حفاری، نشت از مخازن قدیمی، نشت کارگاهی و حین حمل و نقل رخ دهد. از سال ۱۹۷۰ تا ۲۰۱۴، حدود ۵/۷۴ میلیون تن نفت، در اثر حوادث نفت‌کش‌ها، آب دریاها را آلوده کرده است. همچنین با توجه به بالا رفتن جمعیت کره زمین و افزایش تقاضا برای استفاده از انواع ماشین‌آلات و خودروها، عرضه انواع روغن موتورها مانند گازوئیل و سوخت جت افزایش یافته که به مرور زمان آسیب‌های جبران ناپذیری به محیط زیست وارد ساخته است (Zavareh et al., 2016; Kalhor et al., 2017; Parach et al., 2017). آلودگی‌های هیدروکربنی نفتی در خاک یک نگرانی زیست محیطی جهانی است که سلامت گیاهان و دیگر جانداران را تهدید می‌کند. نشت نفت و مشتقات دیگر آن می‌تواند آسیب‌های جبران ناپذیری را به محیط زیست،

سوخت فسیلی نفت خام (Petroleum) از دو واژه‌ی لاتین Petra به معنای سنگ و Oleum به معنای نفت برگرفته شده است. این ماده از تجزیه ناقص زیست توده جانوری و گیاهی در طی سال‌های طولانی تشکیل می‌شود (Makut and Ishaya, 2010; Ahmed and Fakhruddin, 2018). نفت خام ترکیبی پیچیده‌ای از هیدروکربن‌های زنجیره کوتاه و بلند است که به چهار دسته اساسی تقسیم می‌شود: هیدروکربن‌های اشباع (Saturated Hydrocarbon)، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAH)، آسفالتین‌ها (Asphaltene)، پورفیرین‌ها، استرها، کتون‌ها، اسیدهای چرب، فنل‌ها و رزین‌ها (Resin)، آمیدها، سولفوکسیدها، کاربازول‌ها، کینولین‌ها، پیریدین‌ها). به طور کلی بالغ بر ۲۳۰ هیدروکربن در نفت شناسایی شده است (Yan et al., 2013). هیدروکربن‌ها یک ترکیب آلی هستند که از هیدروژن و کربن ساخته شده‌اند. حضور هر ترکیبی غیر از هیدروژن و کربن، باعث می‌شود تا آن ترکیب دیگر یک هیدروکربن تلقی نشود. این ترکیب آلی را می‌توان به سه صورت جامد، مایع و گاز در طبیعت یافت و از

مواد زائد زیستی تبدیل می‌شوند که در مورد هیدروکربن‌های نفتی، این مواد زائد زیستی عمدتاً دی‌اکسید کربن، آب و متان هستند (Rahman et al., 2002; Gomes et al., 2018). زیست‌پالایی، روشی سازگار با محیط زیست است که می‌تواند تا حدودی برای حذف سریع آلاینده‌های محیطی موجود در آب و خاک مورد استفاده قرار گیرد (Kalhor et al., 2017). عوامل مختلفی در روند سرعت و کارآمدی زیست‌پالایی نقش دارند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به میزان غلظت و سمیت آلودگی نفتی موجود در محیط و مقاومت جانداران مورد استفاده اشاره کرد. هدف استفاده از روش زیست‌پالایی در رفع آلودگی‌های نفتی، تخریب کامل هیدروکربن‌ها به آب و دی‌اکسید کربن است (Cerqueira et al., 2011).

طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را دارند. دانشمندان در سال‌های اخیر، ۱۴ جنس جلبک، ۱۰۳ جنس قارچ، ۷۹ جنس باکتری و ۹ جنس سیانوباکتری که توانایی تجزیه و تبدیل هیدروکربن‌ها را دارند، معرفی کرده‌اند (Hassanshahian et al., 2020). در این میان، جلبک‌ها و پروتوزوئرها کمتر در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها نقش دارند (Parach et al.,

بویژه در نواحی سردسیر وارد آورد. با ورود آلودگی‌های نفتی به خاک، خواص فیزیکی و شیمیایی خاک تغییر کرده و با تغییر اشکال عناصر در دسترس همچون فسفر و نیتروژن، رشد و نمو گیاهان را محدود می‌کند. ورود این آلاینده‌ها به اعماق خاک، موجب نفوذ آن به آب‌های زیرزمینی می‌شود و زمینه زیان اقتصادی، کاهش بهره‌وری کشاورزی و همچنین انواع مشکلات زیست محیطی را فراهم می‌سازد (Ahmed and Fakhrudin, 2018). از این رو، یافتن روشی موثر در جهت رفع آلودگی‌های نفتی، بسیار حائز اهمیت است.

به طور کلی از سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای رفع آلودگی‌های نفتی محیطی استفاده می‌کنند. روش‌های فیزیکی نیازمند فناوری‌های گران قیمت هستند و گاهی منجر به تجزیه ناقص آلاینده‌ها می‌شوند. از سویی دیگر روش‌های شیمیایی نیز بسیار پرهزینه هستند و آلودگی‌های ثانویه به همراه دارند (Ganesan et al., 2022). بنابراین توسعه یک روش هوشمند، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست برای رفع این‌گونه آلودگی‌ها حائز اهمیت است. زیست‌پالایی فرآیندی است که در آن ترکیبات شیمیایی توسط موجودات زنده به ویژه میکروارگانیسم‌ها، به انرژی، توده سلولی و

دائمی میکروارگانیسیم‌های بومی در معرض غلظت‌های پایین هیدروکربن، اجازه می‌دهد تا باکتری‌های هیدروکربنوکلاست در محیط نگهداری شوند و به راحتی از ترکیبات مشتق شده از نفت به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند. اما باید توجه داشت که باکتری‌ها نیز همچون دیگر میکروارگانیسیم‌ها، ظرفیت مشخصی دارند و اگر غلظت آلاینده موجود از ظرفیت آنها بیشتر باشد، می‌تواند برای باکتری‌ها سمی باشد و آنها را از بین ببرد. بنابراین تخریب به وسیله باکتری‌ها زمانی امکان‌پذیر است که غلظت آلاینده کمتر از آستانه سمیت باشد (Tremblay et al., 2017). از دیگر مزیت باکتری‌ها نسبت به دیگر میکروارگانیسیم‌ها، نسبت بالای سطح به حجم آنها است که موجب تجزیه کارآمدتر نفت توسط این موجودات می‌شود (Parach et al., 2017). تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی اغلب توسط باکتری‌های هوازی انجام می‌گیرد، اما تا سال ۲۰۱۵، در بین ۷۹ جنس باکتری‌های تجزیه کننده نفت‌خوار، بیش از ۵ جنس باکتری‌های بی‌هوازی گزارش شده است (Gao et al., 2015). استفاده از باکتری‌های هوازی، یک روش زیستی مقرون به صرفه است که جایگزین بسیاری از روش‌های موجود است، اما باکتری‌های بی‌هوازی نسبت به

تاریخچه کشف اولین باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن به حدود ۱ قرن پیش باز می‌گردد (Socolofsky et al., 2019). از شناخته شده‌ترین جنس‌های باکتری‌های نفت‌خوار می‌توان به *Halomonas*، *Dietzia*، *Marinobacter*، *Alcanivorax*، *Oleispira*، *Oleiphilus*، *Bacillus*، *Geobacillus*، *Pseudomonas*، *Alcaligenes*، *Micrococcuse*، *Achromobacter*، *Methylomonas*، *Arthrobacter*، *Acinetobacter*، *Flavobacterium*، *Nocardia* و *Methylobacterium*، *Corynebacterium* (Parach et al., 2017; Tremblay et al., 2017; Gomes et al., 2018).

تجزیه زیستی PAH در خاک در مقایسه با حذف این آلاینده‌ها در آب دارای مزایایی است. خاک از ذرات ریزی تشکیل شده است که سطح تماس بیشتری را بین میکروارگانیسیم و آلاینده ایجاد می‌کند و همچنین مقدار مواد مغذی موجود در خاک بسیار بیشتر از مواد موجود در آب است که اجازه رشد و فعالیت بیشتری را به میکروارگانیسیم‌ها می‌دهد (Tirado-Torres et al., 2017). قرار گرفتن

باکتری‌های، به جز کربن را دارد. مقدار یک لیتر از این محیط شامل ترکیبات ۱ گرم KH_2PO_4 ، ۱ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۲ گرم MgSO_4 ، ۰/۰۲ گرم CaCl_2 ، ۱ گرم NH_4NO_3 ، ۰/۰۵ گرم FeCl_3 (Merck، آلمان) بود. در نهایت pH محیط بر روی مقدار تقریبی ۷ تنظیم شد. پس از اتوکلاو، نفت خام به عنوان تنها منبع کربن با نسبت ۱ درصد به محیط کشت افزوده شد. انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۶۰ دور در دقیقه انجام گرفت. پس از این مدت، برای جداسازی سویه‌های نفت‌خوار از یکدیگر، از روش سریال رقت استفاده شد. بدین منظور در محیط نوترینت براث (Nutrient Broth) رقت‌های ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۵} تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت با تکنیک اسپرید پلیت روی پلیت نوترینت آگار (Nutrient Agar: NA) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس پلیت‌هایی که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلونی بودند نگهداری شدند و ریخت‌شناسی کلونی‌های تشکیل شده بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت (Hassanshahian et al., 2012; Socolofsky et al., 2019).

باکتری‌های هوازی محدودیت‌هایی دارند. تجزیه بی‌هوازی اغلب آهسته است، توانایی‌های آنزیمی را کاهش می‌دهد، بیشتر مستعد محدودیت مواد مغذی بوده و مسیرهای متابولیسمی آن به خوبی شناخته نشده است (Wartell et al., 2021). در پژوهش حاضر نیز، باکتری‌های هوازی موجود در خاک آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه نفت شیراز مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از عمق ۱۰ سانتی‌متری خاک نواحی آلوده به نفت، در اطراف پالایشگاه نفت شیراز واقع در عرض جغرافیایی ۲۹ درجه، ۴۴ دقیقه و ۱۱/۲ ثانیه شمالی و ۵۲ درجه، ۳۹ دقیقه و ۴۵/۱ ثانیه غربی انجام شد. نمونه خاک در ظروف شیشه‌ای استریل، بر روی یخ به آزمایشگاه دانشگاه هرمزگان برای بررسی‌های بعدی منتقل شد.

غنی‌سازی و خالص‌سازی

نمونه خاک با نسبت ۱ درصد در محیط کشت Bushnell Hass Mineral Salt (BHMS) غنی‌سازی شد. این محیط کشت، تمامی مواد مغذی مورد نیاز برای رشد و تکثیر

با فاصله‌های زمانی ۲ ساعته تا ۳۶ ساعت اندازه‌گیری و ثبت شد. برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا غلظت‌های مختلف نفت خام در مقدار ۳ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان (Dichloromethane: DCM) حل شده و جذب آن در ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. سپس مقادیر مختلف نفت خامی که در DCM حل شده بود، توزین شد. در نهایت با رسم نمودار وزن-جذب، منحنی استاندارد رسم شده و معادله رگرسیون معین شد (Hassanshahian et al., 2020). این مرحله توسط آزمون‌های اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی گازی- آشکارساز یونش شعله‌ای (Gas Chromatography- With Flame Ionization Detection: GC-FID) انجام شد (Hassanshahian et al., 2012; Parach et al., 2017).

روش اسپکتروفتومتری

در این روش، باکتری‌ها به محیط کشت BHMS حاوی ۱ درصد نفت خام تلقیح شدند. پس از گذشت دوره ۷ روزه انکوباسیون، ابتدا میزان رشد سویه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر DCM به ارلن حاوی کشت باکتری و

غربالگری سویه‌های منتخب نفت‌خوار این مرحله با هدف تعیین بهترین جداکشت‌های نفت‌خوار انجام گرفت. لازمه تعیین جداکشت‌های برتر، سرعت تکثیر و رشد باکتری‌ها و همچنین میزان نفت‌خواری آنان بود. ابتدا جداکشت‌ها به مدت یک شبانه روز در محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth: MHB) تلقیح شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس مقدار جذب آنها با اسپکتروفتومتر (Cecil BioQuest، انگلستان) اندازه‌گیری و بر اساس نیم مک‌فارلند، جذب این باکتری‌ها بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ تنظیم شد. در مرحله بعد انکوباسیون ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت BHMS و نسبت ۱ درصد نفت خام و ۱ درصد از هر کدام از جداکشت‌ها به مدت یک هفته در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۶۰ دور در دقیقه انجام گرفت. در طول یک هفته، سه بار رشد باکتری‌ها در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، ۹۶ ساعت و ۱۶۸ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر مورد پایش قرار گرفت. برای رسم منحنی رشد جدایه برتر، میزان جذب نوری محیط کشت حاوی باکتری در پلیت ۹۶ خانه با دستگاه الیزا ریدر (BioTek, Epoch2، آمریکا) در ۶۰۰ نانومتر

مقایسه و درصد تجزیه برای هر جدایه محاسبه شد.

شناسایی فیلوژنیک جدایه توسط ژن ۱۶SrRNA

پس از شناسایی اولیه جدایه برتر بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناسی و شیمیایی، شناسایی مولکولی آن بر اساس تعیین توالی ژن ۱۶SrRNA صورت پذیرفت. این تکنیک از ۴ مرحله تشکیل شده است که به ترتیب عبارت بودند از: استخراج DNA، تکثیر با استفاده از PCR، تعیین توالی محصول PCR و بررسی همولوژی توالی‌ها در بانک ژن.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش جوشاندن (Boiling) طبق روش Chen و همکاران در سال ۲۰۰۹، استفاده شد. به طور خلاصه در این روش، کشت تازه‌ای از جداکشت‌های مورد نظر در محیط آگار مغذی (NA) تهیه شد و سپس یک لوپ، از هر جداکشت برداشته شد و به یک میکروتیوب حاوی آب مقطر دیونیزه استریل منتقل شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه درون بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. بعد از این مرحله، بلافاصله میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه درون

نفت افزوده شد. DCM به خوبی با نفت و محیط کشت ترکیب شده، سپس به یک قیف جدا کننده منتقل شد تا دو فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا شوند. مقدار ۱ میلی‌لیتر از فاز آلی با ۵ میلی‌لیتر DCM ترکیب شد و کدورت نفت در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه درصد حذف نفت خام (PR)، از رابطه ۱ استفاده شد (Hassanshahian et al., 2012).

رابطه ۱:

$$PR(\%) = [(A_s - A_c) / A_s] \times 100$$

A_s : میزان جذب نمونه؛ A_c : میزان جذب شاهد.

کروماتوگرافی گازی آشکارساز یونش شعله

بخشی از هیدروکربن‌های استخراج شده، به دستگاه کروماتوگرافی GC-FID (CP-3800، Varian، ایران) دارای ستون CP Sil-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر تزریق شد. همچنین از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل، استفاده شد. دمای ابتدایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود و سپس با شیب ۱۰ درجه بر دقیقه به دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید. دمای محل تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای دتکتور ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. نسبت اسپلیت نیز ۲۰ بود. در نهایت پیک‌های به دست آمده از GC با شاهد

درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. در ادامه، از محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز انجام شد. سپس قطعه ژنی با طول ۱۵۰۰ جفت باز الکتروفورز شد و پس از خالص‌سازی برای تعیین توالی به روش سنگر به شرکت ژن فناوران ارسال شد. توالی‌های تعیین شده با استفاده از نرم‌افزار Chromas بازنگری شده، سپس در پایگاه اطلاعاتی NCBI هم‌ردیف‌سازی شدند و درصد همسانی آنها مورد مطالعه قرار گرفت (Dastgheib et al., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی آماری این پژوهش شامل تحلیل واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA One-way) و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) بود که توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ صورت پذیرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 استفاده شد. همچنین برای سنجش تبارزایش سویه مورد نظر، از ژن ۱۶SrRNA توسط مدل دو پارامتری کیمورا با روش Neighbor-joining به کمک نرم‌افزار MEGAX درخت فیلوژنی ترسیم شد (Kimura, 1980; Kumar et al., 2018).

ظرف یخ نگهداری شد. در نهایت مخلوط به دست آمده به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hermle, Fixette II, Labortechnik, آلمان) شد، مایع رویی حاوی DNA به درون یک میکروتیوب استریل منتقل شد و برای مرحله PCR مورد استفاده قرار گرفت (Chen et al., 2009).

فرآیند تکثیر با PCR

آغازگرهای انتخابی برای تکثیر ژن ۱۶SrRNA، 9F و 1541R بودند. توالی‌های این دو آغازگر به ترتیب 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5' بود. اجزای واکنش PCR شامل ۰/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر 9F، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر 1541R و ۱ میکرولیتر DNA الگو بود. این ترکیب با ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. مخلوط واکنش پس از تهیه به میکروتیوب منتقل و تکثیر قطعات در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. دمای واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان آن ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. فرآیند تکثیر در ۳۰ چرخه انجام شد. دمای اتصال آغازگر در مراحل انجام PCR، ۵۹

نتایج

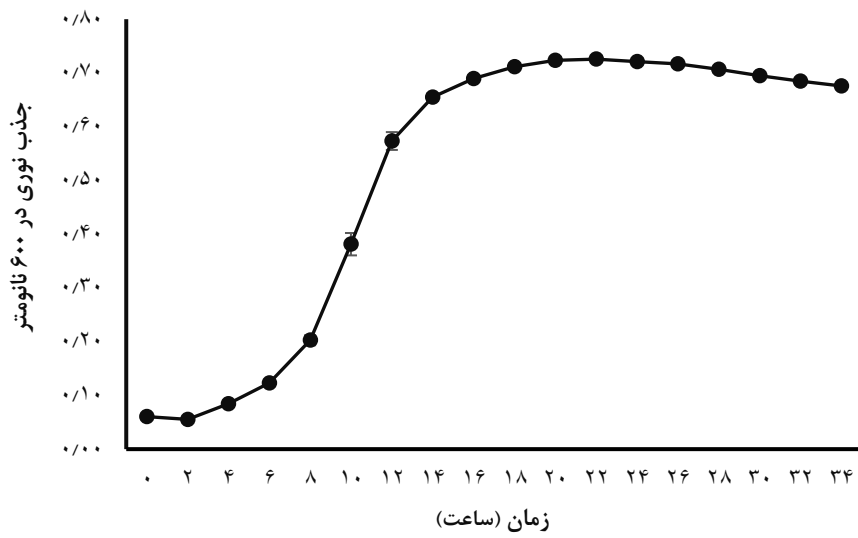
با توجه به جدول ۱، جدایه‌های Sludge C

و SHA بیشترین میزان جذب را نشان دادند. از آنجا که محیط BHMS فاقد هرگونه مواد کربنی بوده و تنها منبع کربن آن، مقدار نفت خام اضافه شده به آن بود، پس می‌توان نتیجه گرفت که این ۲ جدایه توانستند در دوره انکوباسیون، از مشتقات هیدروکربنی نفت به عنوان منبع کربن خود استفاده کرده و بیشترین رشد و تکثیر را داشته باشند. جدایه‌های منتخب برای سنجش‌های بعدی در گلیسرول ذخیره و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ترسیم منحنی رشد باکتری‌ها با هدف به دست آمدن فاز لگاریتمی (فاز رشد) جدایه‌های منتخب انجام گرفت. همان طور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشخص است، تقریباً هر دو جداگشت بعد از ۴ ساعت وارد فاز لگاریتمی شده و فاز لگاریتمی این دو پس از از ۱۲ ساعت به پایان رسید و وارد فاز Lag (فاز سکون) شدند. همچنین بر اساس اطلاعات موجود در جدول ۲، منحنی استاندارد نفت خام نیز رسم شد (شکل ۳).

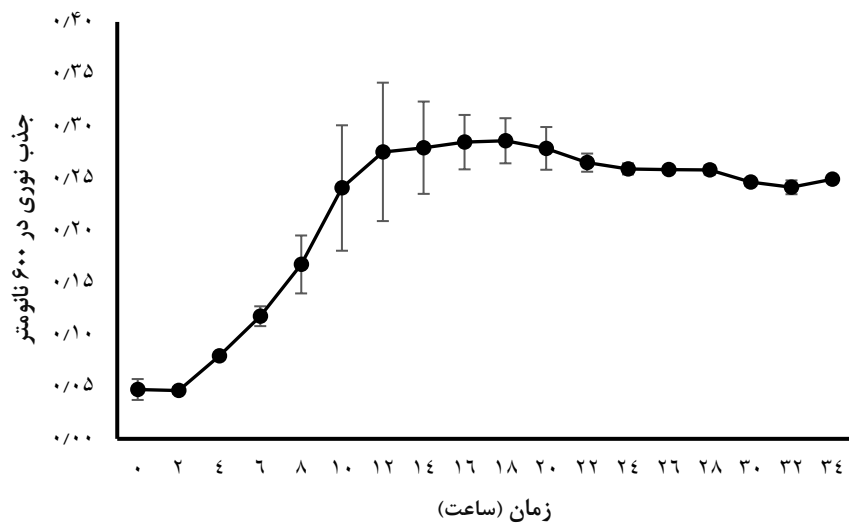
پس از نمونه‌برداری از خاک آلوده به مواد نفتی جمع‌آوری شده از اطراف پالایشگاه شیراز، در مجموع ۱۳ کلونی متفاوت باکتری از لحاظ ریخت‌شناسی، جداسازی و خالص‌سازی شد. نتایج غربالگری جدایه‌های برتر نفت‌خوار در بازه زمانی ۷ روزه، در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱: جذب رشد جداگشت‌های نمونه خاک اطراف پالایشگاه شیراز در ۶۰۰ نانومتر در طول ۷ روز

نام گونه	روز صفر	روز چهارم	روز هفتم
Sludge A	۰/۰۷	۰	۰
Sludge B	۰/۱۲۷	۰/۱۸۳	۰/۴۴۸
Sludge C	۰/۶۵۸	۱/۰۳۸	۱/۱۹۴
Sludge D	۰/۰۵۳	۰/۱۶۲	۰/۰۸۷
Sludge E	۰/۰۶۶	۰/۰۳۵	۰
SLA	۰/۰۵۱	۰	۰
SLB	۰/۰۵۷	۰/۱۰۵	۰
SLC	۰/۱۱۶	۰/۳۰۷	۰/۶۶۷
SLD	۰/۰۹۷	۰/۰۹۹	۰/۰۹۸
SHA	۰/۵۷۴	۱	۰/۹۱۸
SHB	۰/۱۱۵	۰/۱۵۴	۰/۰۱۱
SHC	۰/۱۵۵	۰/۳۶۷	۰/۳۶۸
SHD	۰/۰۴۶	۰/۰۸۷	۰



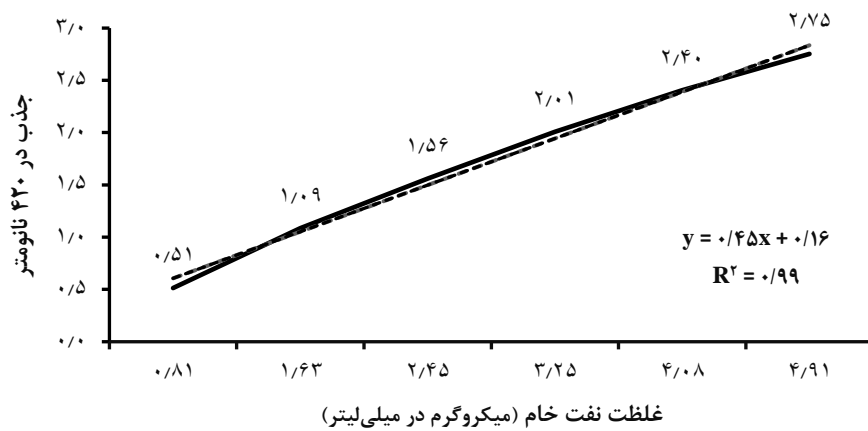
شکل ۱: منحنی رشد جدایه Sludge C در بازه زمانی ۳۶ ساعته (میانگین \pm انحراف معیار)



شکل ۲: منحنی رشد جدایه SHA در بازه ۳۶ ساعته (میانگین \pm انحراف معیار)

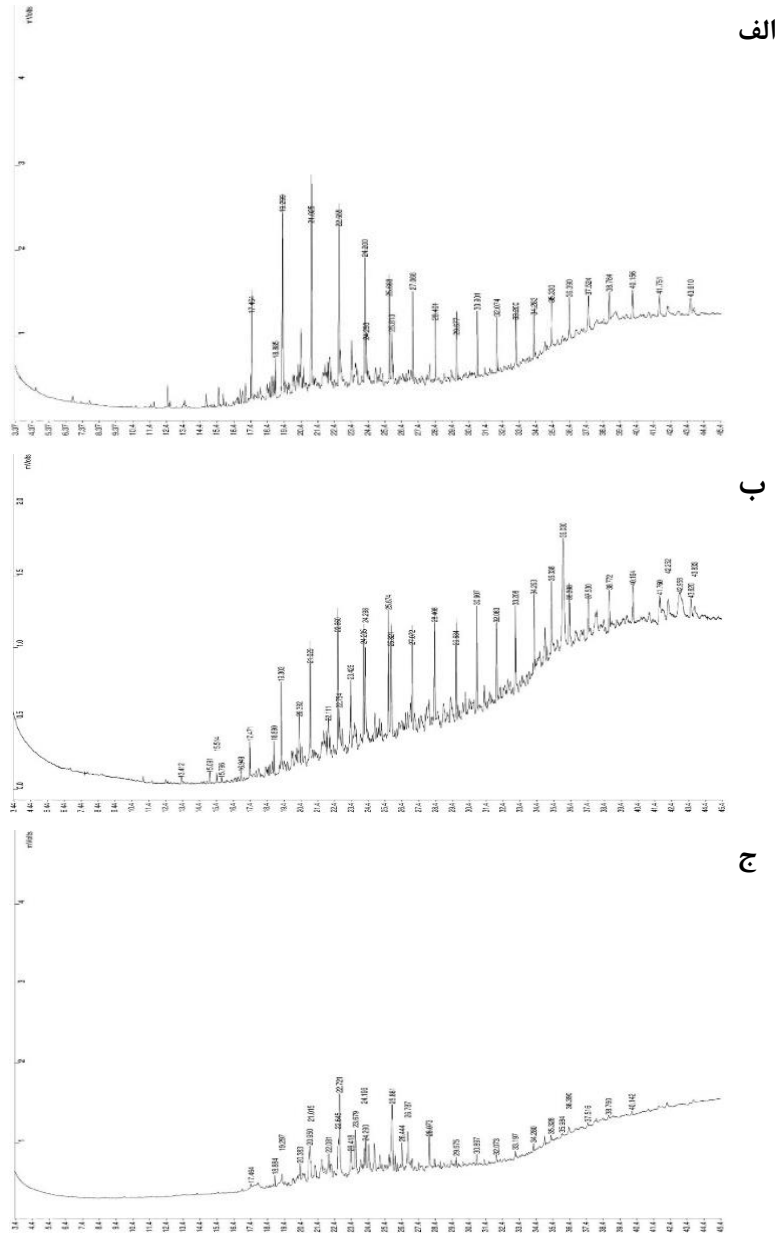
جدول ۲: میزان جذب نفت در غلظت‌های مختلف

مقدار نفت خام (میکرولیتر)	مقدار دی‌کلرومتان (میلی‌لیتر)	وزن نفت خام (میکروگرم)	جذب نفت (در ۴۲۰ نانومتر)
۱	۳	۰/۸۰۷	۰/۴۵۲
۲	۳	۱/۶۳۳	۱/۰۸۵
۳	۳	۲/۴۵۳	۱/۵۶۱
۴	۳	۳/۲۵۲	۲/۰۰۹
۵	۳	۴/۰۸۳	۲/۴۰۴
۶	۳	۴/۹۱۰	۲/۷۵۳



شکل ۳: منحنی میزان جذب نفت در غلظت‌های مختلف (منحنی استاندارد). مقدار ضریب تعیین R^2 بیانگر وجود همبستگی بین متغیرهای میزان جذب و غلظت است، یعنی با افزایش غلظت نفت خام، میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر نیز افزایش می‌یابد.

نتایج سنجش حذف نفت خام توسط جداکشت‌های منتخب
 ۴۱ درصد نفت‌خواری در طول ۷ روز داشتند. همچنین سنجش حذف نفت خام توسط دستگاه GC-FID نشان داد که SHA، ۸۴/۲ درصد و جدایه Sludge C، ۶۴/۴ درصد نفت‌خواری داشتند (شکل ۴).
 نتایج به دست آمده از سنجش حذف نفت خام به روش اسپکتروفتومتری نشان داد که جدایه SHA میزان ۷۲ درصد و Sludge C،



شکل ۴: نمودار آنالیز کروماتوگرافی گازی. الف) شاهد. ب) جدایه Sludge C. ج) جدایه SHA.

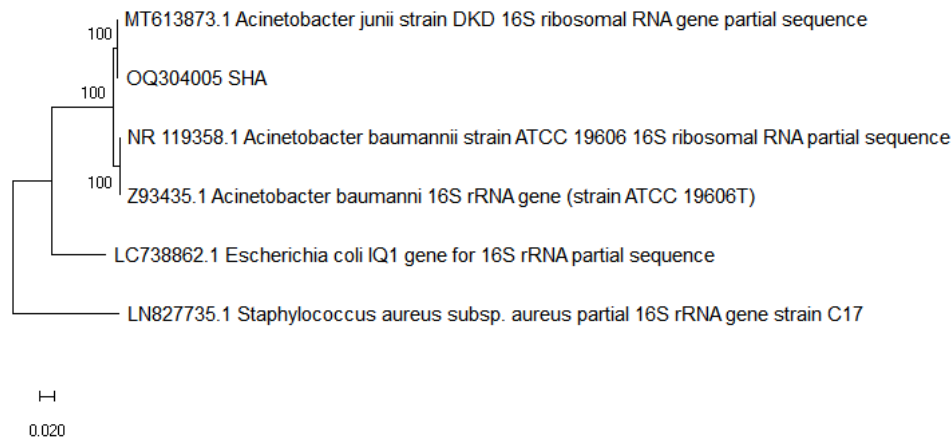
نتایج شناسایی باکتری‌ها

جدایه SHA که بالاترین میزان نفت‌خواری را در بین دیگر جدایه‌ها داشت، مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت. نتایج PCR در شکل ۵ قابل مشاهده است. تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی، نشان دهنده مثبت بودن واکنش است. توالی‌های به دست آمده در بانک ژن بلاست شده و همولوژی آنها مورد بررسی قرار گرفت. قرابت‌های بالای ۹۸ درصد به عنوان جنس و گونه باکتری‌های مجهول گزارش شد. نتایج به دست آمده از بلاست ژن‌ها نشان داد که این باکتری متعلق به جنس و گونه *Acinetobacter junii* است (شکل ۵). در کلاد موجود در درخت تکاملی از جنس *Acinetobacter*، دو زیر کلاد مربوط به دو گونه متفاوت از این جنس هستند. توالی مربوط به باکتری منتخب در پژوهش حاضر، گونه *Acinetobacter junii* از خانواده Moraxellaceae است که با توالی به دست آمده از بانک ژن، در یک زیرکلاد قرار دارند. در این کلاد، از گونه *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* که به ترتیب باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت هستند، به عنوان مقایسه استفاده شد.

بازده حذف ترکیبات نفتی توسط جدایه‌های Sludge C و SHA با دستگاه GC-FID از کربن شماره ۱۳ تا ۳۲ معین شد (جدول ۳).

جدول ۳: تعیین راندمان حذف ترکیبات نفتی توسط جدایه‌های Sludge C و SHA با کروماتوگرافی گازی

SHA	Sludge C	شماره کربن
۹۶/۴۴	۸۵/۸۲	C۱۳
۶۸/۹۰	۶۵/۲۳	C۱۴
۹۵/۴۰	۸۴/۵۳	C۱۵
۹۰/۹۴	۷۳/۳۵	C۱۶
۷۲/۵۰	۶۶/۴۸	C۱۶
۸۱/۲۰	۶۷/۴۳	C۱۷
۹۱/۳۹	۸۴/۶۴	C۱۸
۶۷/۸۱	۳۳/۶۱	C۱۹
۸۸/۱۰	۵۶/۶۹	C۲۰
۸۷/۸۵	۵۴/۷۰	C۲۱
۸۴/۵۸	۵۵/۸۲	C۲۲
۸۰/۷۵	۵۵/۱۳	C۲۳
۸۵/۹۷	۶۱/۶۱	C۲۴
۸۲/۰۲	۵۷/۲۵	C۲۵
۸۸/۱۸	۵۸/۸۶	C۲۶
۷۵/۷۵	۵۸/۶۴	C۲۷
۹۰/۵۶	۶۷/۶۹	C۲۸
۸۶/۲۰	۵۷/۹۳	C۲۹
۸۵/۵۳	۵۸/۹۳	C۳۰
۹۰/۳۶	۶۲/۷۰	C۳۱
۸۹/۵۸	۶۰/۰۳	C۳۲



شکل ۵: درخت ترسیم شده در نرم افزار MEGAX با روش Neighbour-joining. برای رسم این درخت از ۵ ژن ثبت شده در بانک ژن و یک توالی مربوط به باکتری منتخب (SHA) در پژوهش حاضر استفاده شد. اعداد روی خطوط، معرف Boot Strap است.

در محیط کشت BHMS، تنها منبع کربن، هیدروکربن‌های موجود در نفت خام بود و بیان می‌داشت که باکتری‌ها توانسته‌اند از این منبع کربنی استفاده کنند و زودتر به فاز لگاریتمی برسند. سنجش اسپکتروفتومتری نیز مهر تاییدی بر جدایه‌های انتخابی SHA و Sludge C بود که بالاترین میزان نفت‌خواری را در مدت ۷ روز از خود نشان دادند.

بیش از ۸۰ درصد نفت خام را هیدروکربن‌ها تشکیل می‌دهند که حدود ۶۰ درصد ترکیبات این هیدروکربن‌ها مربوط به آلکان‌ها است. به طور متوسط آلکان‌ها، ساده‌ترین شکل هیدروکربن‌های نفتی قابل تجزیه در شرایط

بحث

باکتری‌های نفت‌خوار اغلب در محیط‌هایی که دارای آلودگی‌های نفتی باشند و این آلودگی برای مدت نسبتاً طولانی در آنجا باقی مانده باشد، یافت می‌شوند. به همین دلیل در این پژوهش، ایستگاه نمونه‌برداری انتخاب شد که احتمال می‌رفت مدت زمانی بیش از ۶ ماه از حضور آلودگی‌های نفتی در آنجا گذشته باشد. در مراحل بعدی این پژوهش، مبنای اولیه انتخاب باکتری‌ها، بازدهی بیشتر در کمترین زمان بود. بدین ترتیب اولویت اول گزینش آنها، کوتاه‌ترین زمان رسیدن جداکشت‌ها به فاز لگاریتمی در محیط کشت حاوی نفت بود. زیرا

و غیر قابل انحلال در آب هستند و به همین علت اغلب توسط باکتری‌ها تجزیه نمی‌شوند. اما تجزیه آلکان‌های C₂₁ تا C₃₂ می‌تواند گواهی بر آبریزی بالای باکتری‌ها باشد. همچنین می‌توان استدلال کرد که تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌ها منجر به ایجاد یک پل دی‌سولفیدی، بین دو فاز آلی و آبی می‌شود تا باکتری‌ها بتوانند با انتقال هیدروکربن‌های مورد نیاز خود به فاز آبی، آن را مصرف کنند. در نهایت جدایه SHA با ۸۴/۲ درصد بالاترین میزان نفت‌خواری را نسبت به نمونه شاهد از خود نشان داد.

باکتری‌های جنس *Acinetobacter* از شناخته شده‌ترین باکتری‌های نفت‌خوار هستند که در مطالعات مختلف گزارش شده‌اند (Parach et al., 2017; Gomes et al., 2018). بهبود کیفیت خاک‌های آلوده به نفت (Kai et al., 2020)، افزایش نفت‌خواری به هنگام استفاده در کنسرسیوم باکتریایی (Ma et al., 2021)، تجزیه رنگ آزو به کمک آنزیم‌های باکتری (Krithika et al., 2021)، بیوسنتز نانوذرات طلا با کمک سورفکتانت زیستی (Ohadi et al., 2020)، مقاومت بالا نسبت به فلزات سنگین از جمله سرب (Wang et al., 2020) و کاربرد تجاری به عنوان مولد

هوای و بی‌هوای هستند (Davidova et al., 2019). برای برخی از میکروارگانیسم‌ها، آلکان‌ها با زنجیره کوتاه (C₃-C₁₄) و با زنجیره متوسط (C₁₅-C₂₀) معمولاً راحت‌تر از آلکان‌هایی با طول کربن بیشتر استفاده می‌شوند. برای میکروارگانیسم‌های دیگر، بویژه باکتری‌های احیاکننده سولفات (-Sulfate Reducing Bacteria: SRB) و باکتری‌های احیاکننده نیترات (Nitrate-Reducing Bacteria: NRB)، آلکان‌های زنجیره‌ای کوتاه‌تر (C_{≤17}) می‌توانند سمی باشند و غشای باکتری را در خود حل کنند، به همین علت منجر به مقاومت بیشتر باکتری در تجزیه آنها می‌شوند. همچنین آلکان‌ها با زنجیره بلند اغلب جامد هستند و به دلیل حالیت پایینی که دارند، کمتر توسط باکتری‌ها تجزیه می‌شوند (Wartell et al., 2021). در پژوهش حاضر، درصد تجزیه هیدروکربنی آلکان‌های موجود در نفت خام از C₁₃ تا C₃₂ (جدول ۳) محاسبه شد. داده‌های به دست آمده بیان می‌دارد که هر دو جدایه منتخب توانسته‌اند به میزان چشم‌گیری آلکان‌های زنجیره کوتاه، (C₁₃ و C₁₄) زنجیره متوسط (C₁₅-C₂₀) و زنجیره بلند (C₂₁-C₃₂) را تجزیه کنند. همان‌طور که بیان شد، آلکان‌های زنجیره بلند اغلب جامد بوده

را نشان داد که آنزیم‌های دخیل در متابولیسم فرآورده‌های نفتی را کد می‌کنند و مسیرهای متابولیکی مرتبط را بر عهده دارند (Miles et al., 2023). این یافته‌ها بینش‌های ارزشمندی را برای استفاده از *A. junii* در زیست‌پالایی برای رفع آلودگی‌هایی نفتی ارائه می‌دهد.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که خاک آلوده به نفتی که مدتی در یک مکان باقی مانده باشد، مکان مناسبی برای جداسازی طیف مختلفی از میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار است. از این میکروارگانیسم‌ها می‌توان برای پاکسازی مکان‌های آلوده به نفت در صنعت استفاده کرد که روشی مقرون به صرفه و دوستدار طبیعت است. البته این امر نیازمند مطالعات بیشتر و مشاهدات میدانی در این زمینه است. به صورت کلی در این مطالعه، دو جدایه SHA و Sludge C که نرخ رشد بالاتری نسبت به دیگر جدایه‌ها داشتند، میزان تجزیه نفت خام مناسبی را نیز در بازه زمانی ۷ روزه نشان دادند. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده از نمودار رشد نسبی، هر دو باکتری تقریباً پس از ۴ ساعت به فاز لگاریتمی خود می‌رسند که بهترین زمان برای انتقال به محیط کشت حاوی نفت خام است. نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی نیز نشان داد که جدایه‌های SHA و Sludge C به ترتیب

امولسیفایر زیستی، از جمله مهم‌ترین کارایی گونه *Acinetobacter junii* در مطالعات اخیر است.

در پژوهش انجام شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۴)، دو گونه باکتری *A. junii* و *Sphingomonas sp.* از خاک آلوده به مواد نفتی در شاک‌های جداسازی شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که این دو گونه به ترتیب تا ۸۶/۲ درصد و ۷۵/۸ درصد توانایی تجزیه گازوئیل را به عنوان تنها منبع کربن در مدت ۱۵ روز داشتند. در سال ۲۰۲۳، Sui و همکاران با هدف بررسی تجزیه آلاینده‌های نفتی توسط *A. junii* به مطالعه و پژوهش پرداختند. مطالعه آنها نشان داد که *A. junii* به طور موثری هیدروکربن‌های مختلف از جمله نفت خام، گازوئیل، روغن موتور، فلورن، فنانترن، دوکوسان و تریاکونتان را با بالاترین نرخ‌های تخریب تحت شرایط خاص منبع نیتروژن بهینه و نسبت C/N به دست آوردند. این باکتری کارایی بالایی در تجزیه فراکسیون‌های آلکان و آلکان‌های خاص در نفت‌های خام مختلف نشان داد (Sui et al., 2023). عوامل کلیدی موثر بر توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، مقدار چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر در روز اول و فعالیت آنزیم در روز چهارم شناسایی شد. توالی‌یابی کل ژنوم، ۴۷ ژن

۸۴/۲ درصد و ۶۴/۴ درصد توانایی نفت خواری را در ۷ روز دارند. با بررسی ژن ۱۶SrRNA جدایه SHA که میزان نفت خواری بالاتری را نشان داده بود، مشخص شد که این جدایه متعلق به گونه *Acinetobacter junii* است.

تشکر و قدردانی
نویسندگان از حمایت مالی پارک علم و فناوری هرمزگان قدردانی می نمایند.

منابع

- Ahmed F. and Fakhruddin A.N.M. 2018.** A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. *International Journal of Environmental Sciences and Natural Resources*, 11(3): 1–7. doi: 10.19080/IJESNR.2018.11.555811
- Cerqueira V.S., Hollenbach E.B., Maboni F., Vainstein M.H., Camargo F.A., Maria Do Carmo R.P. and Bento F.M. 2011.** Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102(23): 11003–11010. doi: 10.1016/j.biortech.2011.09.074
- Chen J., Su Z., Liu Y., Wang S., Dai X., Li Y., Peng S., Shao Q., Zhang H., Wen P. and Yu J. 2009.** Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(6): 717–721. doi: 10.1016/j.ijid.2008.11.014
- Dastgheib S.M.M., Amoozgar M., Khajeh K., Shavandi M. and Ventosa A. 2012.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95: 789–798. doi: 10.1007/s00253-011-3706-4
- Davidova I.A., Marks C.R. and Suflita J.M. 2019.** Anaerobic hydrocarbon-degrading Delta-proteobacteria. P: 207–243. In: McGenity T.J. (Ed.). *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. Springer Cham, Switzerland. doi: 10.1007/978-3-030-14796-9_12
- Ganesan M., Mani R., Sai S., Kasivelu G., Awasthi M., Rajagopal K., Azelee P., Selvi Chang S.W. and Ravindran B. 2022.** Bioremediation by oil degrading marine bacteria: An overview of supplements and pathways in key processes. *Chemosphere*, 303: 134956. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134956
- Gao X., Gao W., Cui Z., Han B., Yang P., Sun C. and Zheng L. 2015.** Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. *Marine Pollution Bulletin*, 97(1-2): 373–380. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.05.065
- Gomes M., Gonzales-Limache E., Sousa S., Dellagnezze B., Sartoratto A., Silva L., Gieg L., Valoni E., Souza R. and Torres A. 2018.** Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. *International Biodeterioration and*

- Biodegradation, 126: 231–242. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.08.014
- Hassanshahian M., Amirinejad N. and Askarinejad Behzadi M. 2020.** Crude oil pollution and biodegradation at the Persian Gulf: A comprehensive and review study. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18(2): 1415–1435. doi: 10.1007/s40201-020-00557-x
- Hassanshahian M., Emtiazi G. and Cappello S. 2012.** Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 64(1): 7–12. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.11.006
- Kai T., Okamoto Y., Murakami S. and Tamaki M. 2020.** Phyto-remediation of oil-contaminated soils by combining flowering plant cultivation and inoculation with *Acinetobacter junii* strain M-2. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 9(03): 1–14 (102093). doi: 10.4236/jacen.2020.93010
- Kalhor A.X., Movafeghi A., Mohammadi-Nassab A.D., Abedi E. and Bahrami A. 2017.** Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1-2): 286–290. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.08.045
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111–120. doi: 10.1007/BF01731581
- Krithika A., Gayathri K.V., Kumar D.T. and Doss C.G.P. 2021.** Mixed azo dyes degradation by an intracellular azoreductase enzyme from alkaliphilic *Bacillus subtilis*: a molecular docking study. *Archives of Microbiology*, 203: 3033–3044. doi: 10.1007/s00203-021-02299-2
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. 2018.** MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Ma M., Zheng L., Yin X., Gao W., Han B., Li Q., Zhu A., Chen H. and Yang H. 2021.** Reconstruction and evaluation of oil-degrading consortia isolated from sediments of hydrothermal vents in the South Mid-Atlantic Ridge. *Scientific Reports*, 11(1): 1–15 (1456). doi: 10.1038/s41598-021-80991-5
- Makut M. and Ishaya P. 2010.** Bacterial species associated with soils contaminated with used petroleum products in Keffi town, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16): 1698–1702. doi: 10.5897/AJMR.9000119
- Miles S.M., Gestler R. and Dworatzek S.M. 2023.**

- Bioremediation of petroleum hydrocarbons in the subsurface. P: 479–502. In: Garcia-Rincon J., Gatsios E., Lenhard R.J., Atekwana E.A. and Naidu R. (Ed.). *Advances in the Characterisation and Remediation of Sites Contaminated with Petroleum Hydrocarbons*. Springer Cham, Switzerland. doi: 10.1007/978-3-031-34447-3_14
- Ohadi M., Forootanfar H., Deghannoudeh G., Eslaminejad T., Ameri A., Shakibaie M. and Najafi A. 2020.** Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by lipopeptide biosurfactant derived from *Acinetobacter junii* B6 and evaluation of its antibacterial and cytotoxic activities. *BioNano Science*, 10: 899–908. doi: 10.1007/s12668-020-00782-6
- Parach A., Rezvani A., Assadi M.M. and Akbari-Adergani B. 2017.** Biodegradation of heavy crude oil using Persian Gulf autochthonous bacterium. *International Journal of Environmental Research*, 11(5): 667–675. doi: 10.1007/s41742-017-0059-6
- Rahman K., Banat I., Thahira J., Thayumanavan T. and Lakshmanaperumalsamy P. 2002.** Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*, 81(1): 25–32. doi: 10.1016/s0960-8524(01)00105-5
- Socolofsky S.A., Gros J., North E., Boufadel M.C., Parkerton T.F. and Adams E.E. 2019.** The treatment of biodegradation in models of sub-surface oil spills: A review and sensitivity study. *Marine Pollution Bulletin*, 143: 204–219. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.04.018
- Speight J.G. 2019.** *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes*. Gulf Professional Publishing, USA. 1256P. doi: 10.1016/C2009-0-18464-7
- Sui X., Li Y., Wang X., Yu L., Wang J. and Ji H. 2023.** Genomics and degradation law of *Acinetobacter junii* in response to petroleum pollution. *Process Biochemistry*, 126: 41–50. doi: 10.1128/mra.01076-23
- Tirado-Torres D., Acevedo-Sandoval O., Rodriguez-Pastrana B.R. and Gayosso-Canales M. 2017.** Phylogeny and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation potential of bacteria isolated from crude oil-contaminated site. *Journal of Environmental Science and Health*, 52(9): 897–904. doi: 10.1080/10934529.2017.1316170
- Tremblay J., Yergeau E., Fortin N., Cobanli S., Elias M., King T.L., Lee K. and Greer C.W. 2017.** Chemical dispersants enhance the activity of oil-and gas condensate-degrading marine bacteria. *The*

ISME Journal, 11(12): 2793–2808.
doi: 10.1038/ismej.2017.129

Wang R., Wu B., Zheng J., Chen H., Rao P., Yan L. and Chai F. 2020. Biodegradation of total petroleum hydrocarbons in soil: Isolation and characterization of bacterial strains from oil contaminated soil. Applied Sciences, 10(12): 1–10 (4173). doi: 10.3390/app10124173

Wartell B., Boufadel M. and Rodriguez-Freire L. 2021. An effort to understand and improve the anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons: A literature review. International Biodeterioration and Biodegradation, 157: 1–24 (105156). doi: 10.1016/j.ibiod.2020.105156

Yan S., Wang Q., Qu L. and Li C. 2013. Characterization of oil-

degrading bacteria from oil-contaminated soil and activity of their enzymes. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 27(4): 3932–3938. doi: 10.5504/BBEQ.2013.0050

Zavareh M.S.H., Ebrahimipour G.M., Moghadam S., Fakhari J. and Abdoli T. 2016. Bioremediation of crude oil using bacterium from the coastal sediments of Kish Island, Iran. Iranian Journal of Public Health, 45(5): 670–679.

Zhang Q., Wang D., Li M., Xiang W.N. and Achal V. 2014. Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, *Sphingomonas* sp. and *Acinetobacter junii* from petroleum contaminated soil. Frontiers of Earth Science, 8: 58–63. doi: 10.1007/s11707-013-0415-6



Research Paper

Investigating the bioremoval ability of crude oil by bacteria isolated from oil-contaminated soil around Shiraz refinery

Sara Shokranian¹, Morteza Yousefzadi^{2*}, Narges Amrollahi Biuki^{3,4}

Received: May 2023

Accepted: August 2023

Abstract

Today, oil pollution has evolved into a global environmental concern. One of the methods for mitigating this pollution is the use of biological approaches, especially microorganisms, known for their cost-effectiveness and environmental friendliness, rendering them particularly popular among various methods. This study aimed to explore the potential growth of oil-degrading bacteria in oil-contaminated soils, as well as their ability to remove crude oil. Based on bacterial growth rates in the presence of crude oil and hydrocarbon degradation capabilities, two strains, Sludge C and SHA, were selected from among 13 isolates obtained from oil-contaminated soil near the Shiraz refinery. Subsequently, they were assessed for oil degradation using spectrophotometry and gas chromatography methods. Results indicated that Sludge C and SHA possess oil consumption abilities of 64.4% and 84.2%, respectively, within 7 days. Gas chromatography analysis highlighted SHA's remarkable capability in removing short, medium, and long-chain hydrocarbons. Molecular identification confirmed the affiliation of this strain with the genus and species *Acinetobacter junii*. With its high oil consumption potential, this strain holds promise for efficient utilization in environmental remediation and industry.

Key words: *Oil Pollution, Oil-degrading Bacteria, Biodegradation, Crude Oil, Hydrocarbon.*

1- M.Sc. in Environmental and Industrial Biotechnology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Qom, Qom, Iran.

3- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

4- Associate Professor in Department of Modern Technologies, Mangrove Forest Research Center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding Author: morteza110110@gmail.com