Iranian Journal of Soil and Water Research ISNN: 2423-7833
Homepage: http://ijswr.ut.ac.ir

Determining sensitivity to heavy metals in surfactant-producing bacteria and their efficiency in removing Total petroleum hydrocarbons

Sahar Karimi[1] | Shayan Shariati[2] | Ahmad Ali Pourbabee[3]✉ | Hossein Ali Alikhani[4] | Reyhaneh Kalami[5]

1. Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: karimi.sahar@ut.ac.ir
2. Department of Environmental Engineering, Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: shayan_shariati@ut.ac.ir
3. Corresponding Author, Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: Pourbabaei@ut.ac.ir
4. Department of Soil Science Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: halikhan@ut.ac.ir
5. Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: reyhaneh.kalami@ut.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: July. 5, 2023

Revised: Nov. 6, 2023

Accepted: Nov. 25, 2023

Published online: Dec. 23, 2023

Keywords:
Bio Surfactant,
Diesel,
Heavy Metals Tolerant Bacteria,
Total Petroleum Hydrocarbons.

ABSTRACT

Due to the association of some heavy metals with petroleum hydrocarbons, the use of native degrading bacteria of surfactant-producing oil that is resistant to heavy metals is one of the priorities of bioremediation technology. For this purpose, in this study, 39 alkane-degrading and biosurfactant-producing strains were used (isolated from saline soils contaminated with oil in the oil-rich areas of southern Khuzestan province) belonging to the soil microbiology laboratory gene bank of Tehran University. Then, the sensitivity of the isolates to different concentrations (40 to 80 ppm) of heavy metals (chromium, lead, copper, nickel, and cadmium) was tested. The results showed that only three strains *Ochrobactrum lupini* strain SH23, *Ochrobactrum lupini* strain SH24, and *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* strain SH34 could grow in the presence of all heavy metals. The effects of different concentrations of heavy metals on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of selected bacteria showed that *Ochrobactrum lupini* strain SH23 had the highest tolerance to heavy metals. The evaluation of the ability to degrade petroleum hydrocarbons in the presence of heavy metals by selected bacteria showed that the microbial consortium (SH23, SH24, and SH34) and *Ochrobactrum lupini* strain SH23 were able to degrade 71 and 64% of crude oil with a concentration of 0.5% (v/v), respectively after 10 days of aeration at 30 0C. The findings of this research proved that by conducting additional environmental studies, the bacterium *Ochrobactrum lupini* strain SH23 can be used in the treatment of water and wastewater contaminated with petroleum hydrocarbons and heavy metals.

Cite this article: Karimi, S., Shariati, S., Pourbabaee, A. A., Alikhani, H. A., & Kalami, R. (2023). Determining sensitivity to heavy metals in surfactant-producing bacteria and their efficiency in removing Total petroleum hydrocarbons, *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 54 (10), 1565-1579. https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.361018.669528

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.361018.669528

مجله تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۴، شماره ۱۰ شاپا: ۷۸۳۳-۲۴۲۳
Homepage: http://ijswr.ut.ac.ir

تعیین حساسیت به فلزات سنگین در باکتری‌های مولد سورفکتانت و کارایی آن‌ها در حذف هیدروکربن های نفتی کل

سحر کریمی[۱]، شایان شریعتی[۲]، احمدعلی پوربابائی[۳]✉، حسینعلی علیخانی[۴]، ریحانه کلامی[۵]

۱. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: karimi.sahar@ut.ac.ir

۲. گروه مهندسی محیطزیست، دانشکده محیطزیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: shayan_shariati@ut.ac.ir

۳. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: Pourbabaei@ut.ac.ir

۴. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: halikhan@ut.ac.ir

۵. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: reyhaneh.kalami@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۰/۱

واژه‌های کلیدی:
باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین،
سورفکتانت زیستی،
گازوئیل،
هیدروکربن‌های نفتی کل.

چکیده

به دلیل همراه بودن برخی از فلزات سنگین با هیدروکربن‌های نفتی، بکارگیری باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده نفت مولد سورفکتانت که مقاوم به فلزات سنگین باشند از اولویت‌های فناوری زیست پالائی محسوب می‌شود. به همین منظور، در این مطالعه از ۳۹ سویه تجزیه کننده آلکان‌ها و تولید کننده سورفکتانت زیستی (جداسازی شده از خاک های شور آلوده به نفت در مناطق نفت خیز جنوب استان خوزستان) متعلق به بانک ژن آزمایشگاه میکروبیولوژی خاک دانشگاه تهران استفاده شد. سپس حساسیت جدایه‌ها در برابر غلظت‌های مختلف (۴۰ تا ۸۰ ppm) فلزات سنگین (کروم، سرب، مس، نیکل، کادمیوم) مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد فقط سه سویه *Ochrobactrum lupini* strain SH23، *Ochrobactrum lupine* strain SH24 و *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* strain SH34 توانایی رشد در حضور همه فلزات سنگین را داشتند. نتایج حاصل تاثیر غلظت‌های مختلف فلزات سنگین بر MBC و MIC باکتری‌های منتخب نشان داد باکتری *Ochrobactrum lupini* strain SH23 بیشترین میزان تحمل به فلزات سنگین را داشت. ارزیابی توانایی تجزیه کنندگی هیدروکربن‌های نفتی در حضور فلزات سنگین توسط باکتری‌های منتخب، نشان داد کنسرسیوم میکروبی (SH23، SH24 و SH34) و باکتری *Ochrobactrum lupini* strain SH23 به ترتیب توانستند ۷۱ و ۶۴ درصد نفت خام با غلظت ۰/۵ درصد (حجمی/حجمی) را بعد از ۱۰ روز هوادهی و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تجزیه کنند. یافته‌های این پژوهش ثابت کرد با انجام مطالعات زیست محیطی تکمیلی می‌توان از باکتری *Ochrobactrum lupini* strain SH23 در تصفیه آب و پساب آلوده به هیدروکربن‌های نفتی و فلزات سنگین استفاده کرد.

استناد: کریمی، سحر؛ شریعتی، شایان؛ پوربابائی، احمدعلی؛ علیخانی، حسینعلی؛ و کلامی، ریحانه (۱۴۰۲). تعیین حساسیت به فلزات سنگین در باکتری‌های مولد سورفکتانت و کارایی آنها در حذف هیدروکربن‌های نفتی کل ، *مجله تحقیقات آب و خاک ایران*، ۵۴ (۱۰)، ۱۵۷۹-۱۵۶۵.
https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.361018.669528

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
© نویسندگان.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.361018.669528

مقدمه

فعالیت‌های انسانی برای تأمین نیازهای انرژی و درآمد خود به نفت وابسته است با این وجود، استفاده از نفت منجر به آلودگی محیط‌زیست می‌شود (Xu et al., 2015; Al-Mur et al., 2021; Behra et al., 2021). نفت مخلوط بسیار پیچیده‌ای حاوی آلکان‌های اشباع شده، آلکان‌های شاخه‌ای، آلکن‌ها، آروماتیک‌ها (از جمله آروماتیک‌های حاوی اتم‌های هترو مانند گوگرد، اکسیژن، نیتروژن و ترکیبات دارای فلز سنگین) و ترکیبات معطر (بزرگ مولکول‌هایی مانند رزین، آسفالتین و هیدروکربن حاوی گروه‌های مختلف عملکردی مانند اسیدهای کربوکسیلیک، اترها و ...) هستند (Chunyan et al., 2023). نفت می‌تواند به‌طور تصادفی یا عمدی در محیط آزاد شده و منجر به بروز آلودگی شود. این آلودگی ممکن است حاصل نشت محصولات نفتی در مرحله‌ی حفاری، استخراج، ذخیره‌سازی، بارگیری، انتقال (از طریق نشت خطوط لوله‌های انتقال) و در نهایت در مرحله بهره‌برداری از پالایشگاه‌ها و پایانه‌های نفتی باشد (Cerqueda-García et al., 2020). ویژگی‌هایی از جمله حلالیت پایین، چربی دوست بودن و آب‌گریزی و پایداری این ترکیبات، موجب ماندگاری بالای آنها در محیط زیست است. این خواص به آلاینده‌های آلی توانایی تجمع در حوزه‌های مختلف محیط را می‌دهد و در نتیجه باعث اثرات سمی در محیط می‌شود (Roszak et al., 2021) هیدروکربن‌های نفتی در سطح دریا و خشکی، به دلیل سمیت و سرطانزایی تهدیدی جدی برای سلامت انسان و سایر موجودات زنده اعم از گیاهان و جانوران و میکروارگانیسم به شمار می‌آیند (Tiwari et al., 2016; Wang et al., 2021).

محققین اثبات کردند که مکان‌های دارای تنش‌های ناشی از آلودگی‌های نفتی اغلب با فلزات سنگین همراه هستند پس در طی افزایش آلودگی طولانی مدت با هیدروکربن‌ها، آلودگی فلزات سنگین در مناطق مربوطه نیز باید در نظر گرفته شود (Li et al., 2020; Kalvandi et al., 2022a). مهم‌ترین ویژگی که فلزات سنگین را از سایر آلاینده‌های سمی متمایز می‌کند این است که قابل تجزیه نیستند و بنابراین اثرات طولانی مدت بر زیست‌بوم دارند. بسیاری از فلزات حتی در غلظت‌های بسیار کم سمی هستند (Margesin et al., 2011; Aljerf and Choukaife, 2018; Singh et al., 2016). غلظت سمی فلزات سنگین ممکن است باعث آسیب آنزیم‌های تجزیه کننده ترکیبات آلی (Bruins et al., 2000)، تغییر پروتئین‌های غشای سلول و اختلال در یکپارچگی غشای سلول میکروبی و یا تخریب کل سلول (Bong et al., 2010) و تداخل واحدهای کدگذاری اطلاعات مانند دئوکسی ریبو نوکلئیک اسید (DNA) یا ریبونوکلئیک اسید (RNA) (Jaishankar et al., 2014; Jadoon and Malik, 2017) در موجودات زنده شود. پژوهش‌ها نشان داده، فلزات سنگین فعالیت میکروبی را در محل آلوده محدود می‌کنند و در نتیجه بر تخریب سایر آلاینده‌های آلی تأثیر می‌گذارند و منجر به تجمع مواد آلی در خاک‌های آلوده به فلز می‌شوند (Chodak et al., 2013; Chen et al., 2015).

بهینه‌سازی و کاهش آلودگی از اکوسیستم‌های آلوده یکی از گام‌های پایه‌ای در داشتن محیط زیست سالم و پایدار است. حذف زیستی با رویکرد پایدار، یک روش استاندارد برای اصلاح و بازسازی محیط‌های آلوده محسوب می‌شود. این روش از فعالیت زیستی طبیعی میکروارگانیسم‌ها یا آنزیم‌ها برای تبدیل اجزای سمی نفت به متابولیت‌های کم سمی یا بی‌ضرر استفاده می‌کند (da Silva et al., 2020; Cui et al., 2020). به‌منظور افزایش دسترسی میکروارگانیسم‌ها به ترکیبات نفتی، یکی از راهکارهای مناسب، استفاده از باکتری‌های تولیدکننده سورفکتانت است. سورفکتانت‌های زیستی گروه ناهمگنی از ترکیبات شیمیایی با فعالیت سطحی هستند که در انواع مختلف موجودات زنده تولید می‌شوند. سورفکتانت‌ها از دو بخش تشکیل شده‌اند، بخش غیرقطبی و آبگریز که به بخش آب‌دوست (که می‌تواند قطبی یا یونی باشد) متصل شده است (da Silva et al., 2020).

اگرچه آلودگی‌های نفتی به سختی از بین می‌روند، اما در این میان باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی و مولد سورفکتانت به دلیل مجاورت با هیدروکربن‌های نفتی موجود در محیط ، تکامل یافته‌اند. میکروارگانیسم‌های بومی در مکان‌های به شدت آلوده، بیشتر با شرایط حاکم سازگار هستند و بنابراین برای استفاده مناسب‌ترین گزینه می‌باشند. چنین میکروارگانیسم‌هایی (بومی) ممکن است به مقدار کم وجود داشته باشند، بنابراین جداسازی کارآمدترین سویه‌ها از مکان‌های آلوده و سپس استفاده از آن‌ها برای تجزیه زیستی می‌تواند به عنوان بهترین راهکار برای افزایش تخریب زیستی نفت در نظر گرفته شود (Pavel et al., 2017; Cui et al., 2020). بنابرین با توجه به تأثیر هیدروکربن‌های نفتی و فلزات سنگین بر زیست‌بوم‌های مختلف و محدودیت‌های تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی در حضور فلزات سنگین، این پژوهش با اهداف ۱- غربالگری باکتری‌های مولد سورفکتانت و مقاوم به فلزات سنگین و ۲- تعیین عملکردشان در تجزیه هیدورکربن‌های نفتی کل[1] (TPH) در حضور غلظت بالایی از فلزات سنگین، انجام شد.

1. Total petroleum hydrocarbons (TPH)

پیشینه پژوهش

نتایج بسیاری از مطالعات نشان داده‌است که تعداد زیادی باکتری تجزیه کننده هیدروکربن در محیط‌های غنی از نفت، مانند مناطق نشت نفت و مخازن نفت وجود دارد (Al-Mur et al., 2021; Yuyin et al., 2015). مطالعات متعددی گزارش کردند که آلودگی فلزات سنگین باعث ایجاد تغییر در جمعیت میکروبی شده (Li et al., 2017; Hemmat-Jou et al., 2018) و تحمل فلز در برخی از گونه‌های میکروبی را افزایش می‌دهند و در میکروارگانیسم‌های خاکزی مکانیسم‌هایی ایجاد شده که می‌تواند منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل بالا نسبت به سمیت فلزات شوند (Sharma et al., 2021; Poszytek et al., 2018). علاوه بر این، خواص سطحی باکتری‌ها و مکانیسم‌های چسبندگی آن‌ها برای تجزیه زیستی روی لایه‌های هیدروکربنی آبگریز از اهمیت بالایی برخوردار است (Zhang et al., 2015). چسبندگی آلاینده‌های آبگریز به سلول‌های باکتریایی عمدتاً مربوط به آبگریزی پروتئین‌های غشاء خارجی و لیپیدها و همچنین برخی از مولکول‌های کوچک موجود در سطوح سلول مانند مانند گرامیسیدین اس[1] و پرودیجیوسین[2] است (Ron and Rosenberg, 2014). Chen et al. (2020) تائید کردند باکتری‌ها با افزایش حلالیت هیدروکربن‌ها به وسیله تولید سورفکتانت‌های زیستی موجب تجزیه نفت در خاک می‌شوند (Chen et al., 2020). Kalvandi et al. (2022b) گزارش کردند ماهیت دوگانه دوستی در سورفکتانت‌ها، باعث کاهش کشش سطحی و افزایش حلالیت می‌شوند و در نتیجه استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن را تسهیل می‌کنند و در نهایت تجزیه زیستی به دلیل افزایش فراهمی زیستی آلاینده‌ها توسط سورفکتانت‌ها افزایش می‌یابد.

محققان Eraky et al. (۲۰۱۴) سویه *Ochrobactrum lupini* را از محیط کشت معدنی حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر BTEX[3] جداسازی کردند. نتایج بررسی حذف TPH در محیط مایع نشان داد، این سویه ۹۴/۶ درصد TPH (۲ درصد) را در مدت ۱۰ روز انکوباسیون تجزیه کرد. Bezza et al. (۲۰۱۵) سورفکتانت زیستی گلیکولیپوپپتیدی پایدار در برابر گرما و شوری را از باکتری *Ochrobactrum intermedium* CN3 جداسازی کردند. باکتری تا ۴۰ درصد از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای و هیدروکربن‌های آلیفاتیک زنجیره بلند آب‌گریز را در محیط مایع با ۴ درصد (حجمی/حجمی) لجن نفت خام تجزیه کرد، در حالی که با اضافه شدن بیوسورفکتانت، ۷۰ درصد از آب‌گریزترین اجزای لجن نفتی در سه هفته تجزیه شدند. Chen et al. (۲۰۱۵) نشان دادند باکتری *Ochrobactrum* sp. PHEOCH مس (II) و کادمیوم (II) را به ترتیب تا غلظت‌های ۴/۳۴ و ۱/۵۲ میلی‌مولار تحمل کرد. بررسی مکانیسم مقاومت باکتری به فلزات سنگین نشان داد در *Ochrobactrum* sp. PHEOCH حداکثر تجمع مس (II) در دیواره سلولی رخ داد. تولید اسید آلی در *Ochrobactrum* sp. PHEOCH به‌طور قابل توجهی بالا بود، که ممکن است در مکانیسم‌های مقاومت نیز نقش داشته و به تحمل بالاتر در برابر کادمیوم (II) کمک کند.عوامل پروتئینی و کربوهیدراتی دخیل در جذب کادمیوم و مس موجود در باکتری با استفاده از FTIR شناسایی شد. همچنین باکتری *Ochrobactrum* sp. PHEOCH به ترتیب ۸۶ و ۶۹ درصد فنانترن را در حضور مس (۳/۹۷–۳/۷۶ میلی‌مولار) و کادمیوم (۰/۸۱–۰/۴۱ میلی‌مولار) تجزیه کرد. پژوهش Sharma et al. (۲۰۲۱) نشان داد دو باکتری *Ochrobactrum intermedium* BPS-20 و *Ochrobactrum ciceri* BPS-26 می‌توانند به ترتیب تا ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سرب و ۸۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل مقاومت کنند. تجزیه و تحلیل نتایج طیف‌سنجی جذب اتمی، تجمع زیستی قابل‌توجهی توسط *O. intermedium* BPS-20 (۸۵/۳۴ و ۷۴/۸۷ درصد) و *O. cicero* BPS-26 (۷۱/۲۰ و ۸۸/۴۸ درصد) را به ترتیب برای سرب و نیکل نشان داد. همچنین، بررسی ژن‌های عملکردی، حضور خانواده‌های انتقال دهنده‌های ATPase، ABC و HoxN/HupN/NixA را تایید کرد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد استفاده

تعداد ۳۹ سویه باکتریایی که توانایی تجزیه آلکان‌ها و تولید بیوسورفکتانت‌ها را داشتند از بانک کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی خاک دانشگاه تهران انتخاب گردیدند. این باکتری‌ها از مناطق مختلف خوزستان جداسازی شدند و خصوصیات مربوط به تولید سورفکتانت زیستی آن‌ها در جدول ۱ نمایش داده شده است. براساس نتایج بدست آمده اکثر جدایه‌ها به جز پنج مورد توانایی تولید بیوسورفکتانت

1. Gramicidin S
2. Prodigiosin
3. Benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes (as BTEX)

داشتند. قطر هاله ایجاد شده در محیط غذایی آگار خون دار، از ۲ میلی‌متر تا ۵۵ میلی‌متر متغیر بودند. قطر هاله ایجاد شده در جدایه‌های SH21، SH31، SH34، SH42 و SH84 ۲۰ میلی‌متر و بیشتر بوده که حاکی از پتانسیل بالای این جدایه‌ها در تولید بیوسورفکتانت می‌باشد. جدایه SH42، که بیشترین قطر هاله را ایجاد نمود ولی رشد متوسط با گازوئیل نشان داد. نتایج شاخص امولسیون کنندگی پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. در ۷۲٪ از جدایه‌ها توانایی امولسیون کنندگی گازوئیل مشاهده شد و شاخص امولسیون کنندگی از صفر تا ۳۳/۳۳٪ متغیر بود. توانایی امولسیون کنندگی در ۱۱ جدایه مشاهده نشد در حالیکه سه جدایه F93، SH24 و SH11 که از نظر تست گسترش نفت (Oil Spreading) مثبت بودند، ولی خاصیت امولسیون کنندگی آنها منفی بود. متغییر بودن این صفت در جدایه های مختلف نشانه تنوع در ویژیگی سورفکتانت تولیدی است. ظرفیت امولسیون کنندگی گازوئیل از آنجایی مهم است که تجزیه را تسهیل می‌کند، زیست فراهمی هیدروکربن‌های نفتی را افزایش داده و در نتیجه تجزیه زیستی را افزایش می‌دهد (Kalami et al., 2021).

آزمون حساسیت باکتری‌ها در برابر فلزات سنگین

جهت پی‌بردن به این که کدام سویه از بین سویه‌های مورد بررسی نسبت به فلزات سنگین حساس و یا مقاوم هستند آزمایشی به این صورت طراحی شد که ابتدا محیط کشت نوترینت براث تهیه و درون لوله‌های آزمایشی تقسیم شدند سپس به هر کدام از لوله‌های آزمایشی برای هر باکتری و هر فلز، نمک فلزات سنگین از جمله ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر کروم (دی‌کرومات‌پتاسیم)، ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر مس (سولفات مس)، ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل (کلرید نیکل)، ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب (نیترات سرب) و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم (کلرید کادمیوم) به لوله‌های آزمایشی به صورت مجزا اضافه گردید و پس از استریل شدن محیط‌کشت، از هرکدام از سویه‌ها به میزان یک درصد حجمی از جمعیت 10^7 باکتری‌ها برداشته و در محیط کشت‌ها تلقیح شدند. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۸-۳۶ درجه سلسیوس با دور ۱۲۰ دور در دقیقه هم‌زده شدند. میزان رشد سویه‌ها بر اساس اندازه‌گیری دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر سنجش و با هم مقایسه شدند.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری‌های منتخب نسبت به فلزات

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی برای سویه‌های باکتری منتخب مطابق با پروتوکل CLSI[1] انجام پذیرفت. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)[2] به عنوان استانداردی مطلوب برای تعیین حساسیت موجودات زنده به فلزات سنگین در نظر گرفته شده است. به ازای هر سویه باکتری، سوسپانسون باکتریایی معادل با استاندارد نیم مک فارلند تهیه و مقدار یک میلی‌لیتر از آن به لوله‌های حاوی محیط کشت نوترینت براث و غلظت‌های مختلف (غلظت‌های مختلف در جدول ۲) از فلزات تلقیح شد. یک محیط مایع تلقیح نشده به عنوان کنترل منفی و یک محیط مایع تلقیح شده و فاقد عناصر سنگین به عنوان کنترل مثبت در کنار سری‌هایی از رقت‌های فلزی اضافه شد. بعد از مدت ۷۲ ساعت گرماگزاری در دمای ۳۸ درجه سلسیوس، نخستین لوله‌ای که شفاف و فاقد رشد میکربی بوده به عنوان کمترین غلظت بازدارنده رشد محسوب گردید. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC)[3]، از همان رقت و رقت‌های بعدی به اندازه ۰/۱ میلی‌لیتر در محیط جامد نوترینت آگار کشت شد و پس از قراردادن در دمای مناسب ۳۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، غلظتی از پلیت که در آن هیچ کلنی رشد نکرده یا تعداد کلنی‌ها نسبت به پلیت کنترل ۹۹/۹٪ کاهش یافته بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی باکتری در نظر گرفته شد (Chen et al., 2015; Sharma et al., 2021).

جدول ۱. ارزیابی صفات تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده (Kalami et al., 2021)

نام جدایه	گسترش نفت[4]	قطر هاله[5] (mm)	شاخص امولسیون کنندگی[6] (E24) (%)	توانایی رشد با گازوئیل
SH11	+	۱۰	-	++
SH12	+	۱۲	۱۳/۳۳	+
Achromobacter mucicolens SH13 (MK494917)	+	۱۳	۱۳/۳۳	+

1. Clinical & Laboratory Standard Institute
2. Minimum Inhibitory Concentration
3. Minimum Bactericidal Concentration
4 . Oil Spreading
5 . Clear zone
6. Emulsification Index

SH14	+	۱۵	۱۰	+++
SH21	+	۳۲	۱۳/۳۳	++++
SH22	+	۱۷	۶/۶۶	++++
Ochrobactrum lupini SH23 (MK493408)	+	۱۲	۱۶/۶۶	++++
Ochrobactrum lupini SH24 (MK453290)	+	۵	-	++++
SH31	+	۲۰	۳/۳۳	++++
SH32	+	۵	۳/۳۳	+++
SH33	+	۱۷	-	+
Bacillus subtilis subsp. Inaquosorum SH34 (MK493409)	+	۲۰	-	+
SH35	+	۱۰	۳/۳۳	+
SH36	+	۹	-	+
SH41	-	-	-	−
Bacillus altitudinis SH42 (MK453293)	+	۵۵	۳/۳۳	+++
SH43	+	۷	۳۳/۳۳	++++
SH44	-	-	-	−
D51	-	-	-	−
D61	+	۱۰	۶/۶۶	++++
D62	+	۶	۳۳/۳۳	++++
Ochrobactrum cytisi D63 (MK453294)	+	۲	۳۳/۳۳	++++
Ochrobactrum anthropi T71 (MK453292)	+	۲	۱۳/۳۳	++++
T72	+	۷	۲۰	++++
T73	-	-	-	+++
Microbacterium oxydans T74 (MK453291)	+	۶	۲۳/۳	++++
F81	+	۲	۲۶/۶۶	++++
F82	+	۴	۲۳/۳۳	++++
F83	+	۴	۱۳/۳۳	++++
Bacillus paralicheniformis F84 (MK493411)	+	۳۵	۶/۶۶	++++
F85	+	۸	۱۳/۳۳	++++
F91	+	۱۵	۳/۳۳	++
F92	+	۷	۳/۳۳	+++
F93	+	۱۴	-	+
F101	+	۹	۱۳/۳۳	++++
F102	+	۲	۲۰	++++
F103	+	۸	۳/۳۳	++++
F104	+	۸	۲۶/۶۶	++++
F105	-	-	-	−

در این جدول (++++)، (+++)، (++)، (+) و (−) نشان دهنده توانایی رشد جدایه‌ها از قوی به ضعیف با گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و براساس اندازه گیری دانسیته نوری[1] در ۶۰۰ نانومتر می‌باشد: رشد (++++) بیانگر (OD_{600} > ۱)، رشد (+++) بیانگر (۱ > OD_{600} > ۰/۶)، رشد (++) بیانگر (۰/۶ > OD_{600} > ۰/۲) ، رشد (+) بیانگر (OD_{600} < ۰/۲) بعد از ۷ روز انکوباسیون در ۳۲ درجه سانتی گراد و (−) بیانگر عدم رشد می‌باشد.

جدول ۲. غلظت‌های مختلفی از هر کدام از فلزات بر حسب میلی‌گرم بر لیتر

کروم	۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰
سرب	۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰
مس	۳۰، ۸۰، ۱۳۰، ۱۸۰، ۲۳۰، ۲۸۰، ۳۳۰، ۳۸۰، ۴۳۰، ۵۰۰
نیکل	۳۰، ۸۰، ۱۳۰، ۱۸۰، ۲۳۰، ۲۸۰، ۳۳۰، ۳۸۰، ۴۳۰، ۴۸۰
کادمیوم	۱۰، ۶۰، ۱۱۰، ۱۶۰، ۲۱۰، ۲۶۰

1. Optical density (OD)

کارایی باکتری‌های منتخب در تجزیه ترکیبات نفتی درحضور فلزات سنگین در محیط مایع

در این بررسی برای تعیین توانمندی گونه‌های باکتریایی در تجزیه مواد نفتی ، از محیط کشت معدنی بوشنل‌هاوس حاوی نفت خام به میزان ۰/۵ درصد (حجمی/حجمی) به عنوان منبع هیدروکربنی استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی بوشنل هاوس که شامل نمک‌های معدنی (۱ گرم بر لیتر KH_2PO_4، ۱ گرم بر لیتر K_2HPO_4، ۰/۲ گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱ گرم بر لیتر $CaCl_2$، ۱ گرم بر لیتر NH_4NO_3، ۰/۰۵ گرم بر لیتر $FeCl_3$، ۰/۲ گرم بر لیتر $K_2Cr_2O_7$، ۰/۰۶ گرم بر لیتر $CdCl_2$، ۰/۱ گرم بر لیتر $NiCl_2$، ۰/۱ گرم بر لیتر $Pb(NO_3)_2$ و ۰/۱ گرم بر لیتر $CuSO_4$) به همراه ۰/۵ درصد (حجمی/حجمی) نفت به عنوان منبع کربن و همچنین نمک فلزات سنگین در ارلن مایر۲۵۰ میلی‌لیتر تهیه شد. بعد از استریل شدن محیط ها در اتوکلاو، به ازای هر باکتری، سوسپانسون باکتریایی معادل با استاندارد نیم مک فارلند تهیه و مقدار یک میلی‌لیتر از آن به فلاسک‌ها حاوی محیط کشت به صورت جداگانه تلقیح شد (۱٪). سپس فلاسک‌ها در دمای ۳۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز داخل شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. یک فلاسک شامل محیط کشت و ۰/۵ درصد (حجمی/حجمی) نفت بدون تلقیح باکتری به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. چون محیط کشت مورد استفاده عاری از هر گونه منبع کربن بود و نفت خام به عنوان تنها منبع هیدروکربنی در این محیط محسوب می‌شد، لذا می‌توان گفت که باکتری‌هایی که قدرت بقاء و بهره‌گیری از نفت در محیط را داشته باشند توانایی رشد را خواهند داشت، بنابراین میزان تیرگی پدید آمده در محیط کشت پس از زمان یاد شده، نمایانگر میزان رشد باکتری است. برای بیان این که باکتری‌ها تا چه اندازه توانایی تجزیه نفت را داشتند، بعد از پایان ۱۰ روز دوره هوادهی، از هرکدام از تیمارها نمونه‌برداری شد و مقدار نفت موجود در هر محیط کشت اندازه‌گیری شد. میزان رشد باکتری‌ها در این محیط با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (USA, Unico 2100) با طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (OD_{600}) (Al-Mur et al., 2021; Bezza et al., 2015). جهت تعیین میزان نفت مورد استفاده توسط سویه ها در محیط کشت معدنی مایع؛۱۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت در دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سلول‌های باکتری رسوب کنند. سپس حجم برابر از ان–هگزان به عنوان حلال به محلول عاری از باکتری اضافه شده و توسط قیف جداکننده عمل عصاره گیری به انجام رسید. در داخل قیف جداکننده دو فاز آلی و آبی از یکدیگر جدا شده، فاز آلی در ظرف دیگری جمع آوری شد سپس دانسیته نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شده (OD_{420}) و غلظت نفت با استفاده از منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد. درصد تجزیه هیدروکربن‌های نفتی کل نیز با استفاده از رابطه ۱ اندازه‌گیری شد (Rahman et al., 2002).

$$\text{درصد تجزیه هیدروکربن‌های نفتی کل} = \frac{\text{غلظت اولیه هیدروکربن‌های نفتی کل} - \text{غلظت نهایی هیدروکربن‌های نفتی کل}}{\text{غلظت اولیه هیدروکربن‌های نفتی کل}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

یافته‌های پژوهش و بحث

حساسیت باکتری‌های بومی جداشده از خاک‌های آلوده به نفت نسبت به فلزات سنگین

همان‌گونه که در جدول ۳ نشان داده‌شده است حدود ۱۰ درصد از جدایه‌ها در مقابل همه فلزات سنگین حساسیت داشته و رشدی نکردند و بیشترین میزان حساسیت در برابر فلزات مختلف برای فلز کادمیوم بود که فقط ۲۰ درصد از جدایه‌ها در برابر کادمیوم توان رشد را از خود نشان دادند که بیان کننده سمیت بالای این فلز برای جدایه‌های مورد آزمایش می‌باشد. اما از میان ۳۹ سویه باکتری جداشده از خاک‌های آلوده به نفت مناطق مختلف خوزستان، تنها سه جدایه SH23، SH24 و SH34 توانایی رشد در همه محیط‌های حاوی فلزات سنگین را از خود نشان دادند.

جدول ۳. آزمون حساسیت باکتری‌ها در مقابل پنج فلز کرم، مس، نیکل، سرب و کادمیوم (میلی‌گرم بر لیتر ppm).

نام سویه‌ها	کروم (60 ppm)	مس (70 ppm)	نیکل (60 ppm)	سرب (60 ppm)	کادمیوم (40 ppm)
SH11	+	+	+	–	-
SH12	+	-	+	+	-
Achromobacter mucicolens SH13 (MK494917)	+	-	+	–	-
SH14	-	+	+	–	-
SH21	+	+	+	–	-
SH22	-	-	-	+	-
Ochrobactrum lupini SH23 (MK493408)	+	+	+	+	+

+	+	+	+	+	*Ochrobactrum lupini* SH24 (MK453290)
-	–	+	+	-	SH31
-	+	+	-	+	SH32
-	+	-	-	+	SH33
+	+	+	+	+	*Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* SH34 (MK493409)
-	+	+	-	+	SH35
-	-	-	-	-	SH36
-	+	-	+	+	SH41
-	–	-	+	-	*Bacillus altitudinis* SH42 (MK453293)
-	-	-	-	–	SH43
+	–	+	-	+	SH44
-	-	-	+	+	D51
-	+	+	-	-	D61
-	-	-	+	+	D62
-	+	-	+	+	*Ochrobactrum cytisi* D63 (MK453294)
-	–	-	+	-	*Ochrobactrum anthropi* T71 (MK453292)
-	-	-	-	+	T72
-	+	+	-	+	T73
-	-	-	-	+	*Microbacterium oxydans* T74 (MK453291)
-	-	-	-	-	F81
+	–	+	+	-	F82
-	–	-	+	-	F83
-	-	+	+	-	*Bacillus paralicheniformis* F84 (MK493411)
-	–	+	+	+	F85
-	+	-	-	+	F91
-	-	-	-	-	F92
-	+	+	-	+	F93
+	–	+	-	+	F101
-	-	-	-	+	F102
-	+	-	+	-	F103
-	+	-	-	-	F104
+	-	-	+	+	F105

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد و حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری‌های منتخب در برابر فلزات

با توجه به نتایج آزمایش قبل سه سویه *Ochrobactrum lupini* strain SH23، *Ochrobactrum lupini* strain SH24 و *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* strain SH34 که نسبت به فلزات سنگین مورد بررسی حساس نبودند، انتخاب شدند. در این بخش از پژوهش هدف تعیین طیف مقاومت/تحمل از طریق اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) می‌باشد تا با استفاده از این ویژگی‌ها، باکتری‌های منتخب برای اصلاح زیستی مناطق آلوده به نفت استفاده شوند (Angle and Chaney, 1989). نتایج حاصل تاثیر غلظت‌های مختلف فلزات سنگین بر MBC و MIC باکتری‌های منتخب در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد باکتری *Ochrobactrum lupini* SH23 بیشترین میزان تحمل به فلزات سنگین را بین باکتری‌های انتخاب شده داشت. البته دو سویه دیگر (*Ochrobactrum lupini* strain SH24 و *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* strain SH34) نیز توانایی بالایی در مقاومت به فلزات سنگین از خود نشان دادند. کادمیوم و سرب آستانه آلودگی ندارند و منظور از حداکثر مجاز برای این فلز، مقدار مطلوب آن نمی‌باشد زیرا برخلاف فلزاتی مانند آهن، مس و حتی کروم و نیکل، کادمیوم (به جز در مورد یک نوع قارچ) و سرب در هیچ موجود زنده‌ای عنصر مورد نیاز به شمار نمی‌رود (Abolahrar et al., 2014). نتایج تحقیقات González-Henao و Ghneim-Herrera (۲۰۲۱) نشان داد، در باکتری‌های مختلف کادمیوم و سرب بیشترین میزان سمیت را نسبت به سایر فلزات ایجاد کردند زیرا کمترین مقدار MIC را داشته‌اند که با نتایج پژوهش حاضر بیان شده در جدول ۴ مطابقت دارد. نتایج این پژوهش مبنی بر برتری سویه‌های جنس‌های *Bacillus* و *Ochrobactrum* در مقاومت به فلزات سنگین توسط سایر محققین نیز به اثبات رسیده است (Syed and Chinthala, 2015; Poszytek et al., 2018). بر اساس مطالعات صورت گرفته به نظر می‌رسد گونه‌های جنس *باسیلوس* توانایی قابل توجهی جهت تحمل فلزات سنگین در محیط را دارند. در تحقیقی باکتری *Bacillus anthracis* از رسوبات آلوده مناطق نفتی خوزستان جداسازی شد و رشد آن در غلظت‌های مختلف نیکل مورد بررسی قرار گرفت که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، بالاترین میزان رشد مشاهده شد اما این باکتری تا غلظت ۲۰۰

میلی‌گرم بر لیتر نیز قادر به رشد بود (شاه‌علیان و همکاران، ۱۳۹۲). Chinthala & Syed (۲۰۱۵) مطالعاتی مبنی بر توان تحمل و جذب سویه‌های *Bacillus* انجام دادند و بیان کردند که سه نوع باکتری *Bacillus licheniformis* NSPA5، *Bacillus cereus* NSPA8 و *Bacillus subtilis* NSPA13 توانایی تحمل در برابر غلظت‌های بالای کادمیوم، سرب و مس را دارند و علاوه بر این می‌توانند غلظت‌های قابل توجهی از این عناصر را نیز جذب کنند. در تحقیقی دیگر نشان داده شد که باکتری *Ochrobactrum anthropi* HM-1 که یک باکتری تجزیه کننده نفت است وجود سرب و کادمیوم را تا محدوده غلظت‌های ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌تواند تحمل کند (Ibrahim, 2016). Poszytek et al. (۲۰۱۸) بیان کردند که سویه باکتری *Ochrobactrum spp* جدا شده از فاضلاب‌های صنعتی با دارا بودن ژن مقاوم به فلزات سنگین توانایی تحمل در برابر فلزات را دارد و همچنین این سویه را به عنوان سویه تجزیه کننده چندین ترکیب آلی معرفی کردند. تحمل باکتری‌ها نسبت به سمیت فلزات می‌تواند به شکل‌های مختلفی انجام گیرد از جمله: انواع انتقال یون فلزی به سلول باکتری، بومی‌سازی ژن‌های مقاوم نسبت به فلزات (کروموزوم، پلاسمید یا ترانسپوزون) و نقش یون فلزی در متابولیسم سلولی (Bruins et al., 2000). سویه‌های جدید باکتریایی جدا شده از خاک‌های آلوده به مخلوط آلاینده‌ها، ممکن است دارای قابلیت کاتابولیک[1] پیشرفته و توانایی تحمل نسبت به مقادیر زیاد فلزات سمی و محدودیت مواد مغذی باشند (Rashid et al., 2016; Sharma et al., 2021).

جدول ٤- توانایی تحمل باکتری‌های منتخب در غلظت‌های مختلف از فلزات سنگین.

نام سویه‌ها		کروم	مس	نیکل	سرب	کادمیوم
Ochrobactrum lupini (SH23)	MIC =	۳۰۰	۳۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۵۰
	MBC =	۴۵۰	۴۵۰	۴۰۰	۴۰۰	۳۰۰
Ochrobactrum lupini (SH24)	MIC =	۳۰۰	۳۰۰	۲۵۰	۲۰۰	۱۰۰
	MBC =	۴۸۰	۴۰۰	۳۵۰	۳۵۰	۳۰۰
Bacillus subtilis subsp. Inaquosorum (SH34)	MIC =	۲۰۰	۲۵۰	۲۰۰	۲۰۰	۱۰۰
	MBC =	۳۵۰	۴۰۰	۳۵۰	۳۰۰	۲۵۰

تخریب زیستی ترکیبات نفتی در محیط مایع در حضور فلزات سنگین توسط سویه‌های منتخب

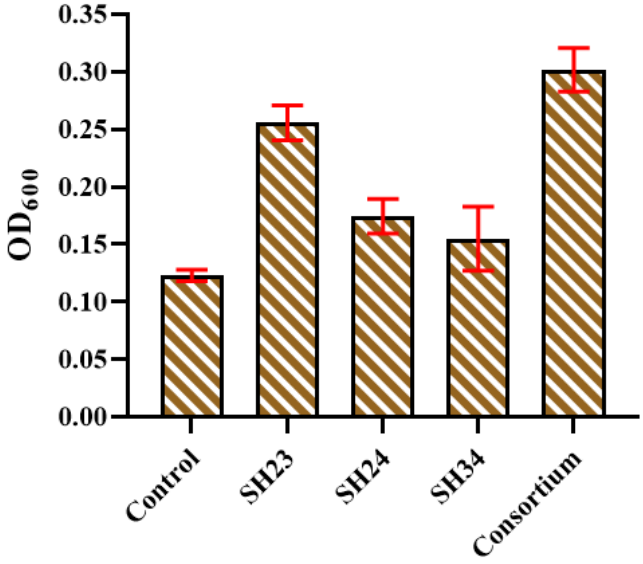
شکل ۱ و ۲ به ترتیب نشان‌دهند میزان رشد باکتری‌ها در تیمارهای مختلف و درصد تجزیه هیدروکربن‌های نفتی کل است. طبق نتایج به دست آمده در شکل ۱ و ۲، تمام تیمارها در مقایسه با نمونه شاهد عملکرد بسیار بهتری داشتند. بیشترین میزان رشد باکتری‌های در تیمارهای کنسرسیوم باکتری‌ها و سویه *Ochrobactrum lupini* SH23 مشاهده شد (شکل ۱). تیمار حاوی سه نوع باکتری با تجزیه ۷۱٪ از مقدار نفت موجود در محیط مایع بهترین کارایی را نسبت به بقیه تیمارها از خود نشان داد و باکتری *Ochrobactrum lupini* strain SH23 = ۶۴٪، *Ochrobactrum lupini* SH24= ۲۷٪ و *Bacillus subtilis subsp. Inaquosorum* SH34= ۲۲٪ از نفت موجود در محیط را تجزیه کردند (شکل ۲).

نتایج آزمون‌های تولید بیوسورفکتانت، مقاومت به فلزات سنگین و حذف نفت در حضور فلزات سنگین نشان داد باکتری *Ochrobactrum lupini* SH23 توانایی بالایی را در تولید سورفکتانت زیستی، مقاومت به فلزات سنگین (سرب، کروم، کادمیوم، نیکل و مس) و حذف هیدروکربن‌های نفتی کل در حضور فلزات سنگین، از خود نشان داد . این نتیجه در تحقیقات سایر محققان نیز مشاهده شده است که از جمله، نتایج آنالیز آماری Batacharya et al. (۲۰۱۵) نشان داد که فاکتور رشد، در نمونه شاهد بدون باکتری و نمونه‌های با تلقیح باکتری در سطح ۰/۵٪ ضایعات روان‌کننده‌ها متفاوت بود. باکتری *Ochrobactrum anthropi* HM-1 در محیط کشت معدنی حاوی ضایعات روان‌کننده‌ها رشد قابل توجهی داشت که دانسیته‌های این باکتری برابر ۰/۲، ۰/۹۵ و ۱/۳ در زمان‌های مختلف بود. پژوهشگران به طور گسترده گزارش کردند که *Ochrobactrum* در تخریب نفت و مشتقات آن (هیدروکربن‌های نفتی کل، پایرن، فلوئورانتن، ضایعات روغن موتور، نفت خام، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای) مهارت دارد (Arulazhagan and Vasudevan, 2011; Bhattacharya et al., 2014; Isaac et al., 2015; Ortega-González et al., 2015; Abou-Shanab et al., 2016; Pugazhendi et al., 2017). از دلایل برتری این باکتری در تجزیه نفت در حضور غلظت بالایی از فلزات سنگین، می‌توان به توانایی بالای آن در تولید سورفکتانت (Bhattacharya et al., 2015; Primeia et al., 2020) و مقاومت به فلزات سنگین (Chen et al., 2015; Peng et al., 2019; Villagrasa et al., 2021) اشاره کرد.

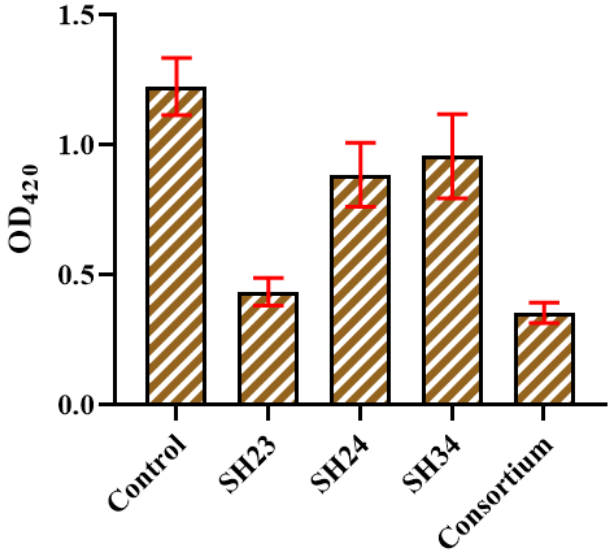
۱. فرایندهای شیمیایی مربوط به تجزیه مواد در موجودات زنده، شکستن ترکیبات

Kumar et al. (۲۰۱۴) بیوسورفکتانت چند منظوره Ochrosin را که توسط *Ochrobactrum* sp. BS-206 تولید می‌شود جداسازی کردند. Bezza et al. (۲۰۱۵) بیان کردند اثر توام استفاده از باکتری *Ochrobactrum intermedium* CN3 و سورفکتانت زیستی گلیکولیپوپپتیدی پایدار در برابر گرما و شوری، موجب حذف ۷۰ درصد آب‌گریزترین اجزای لجن نفتی (۴ درصد الودگی) در سه هفته تجزیه شدند. Eraky et al. (۲۰۱۴) گزارش کردند باکتری *Ochrobactrum lupini* توانست ۹۴/۶ درصد TPH (۲ درصد) را در مدت ۱۰ روز انکوباسیون تجزیه کند. سورفکتانت‌ها ممکن است تجمع هیدروکربن‌ها را با دو مکانیسم تقویت کنند: مکانیسم اول شامل افزایش فراهمی برای میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و مکانیسم دوم تعامل با سطح سلول را افزایش می‌دهد، که باعث کاهش آبگریزی سطح می‌شود و به بسترهای آبگریز اجازه می‌دهد تا راحت‌تر با سلول‌های باکتریایی ارتباط برقرار کنند (da Silva et al., 2020; Kalvandi et al., 2022a).

Chen et al.(۲۰۱۵) نشان دادند باکتری *Ochrobactrum* sp. PHEOCH مس (II) و کادمیوم (II) را به ترتیب تا غلظت‌های ۴/۳۴ و ۱/۵۲ میلی‌مولار تحمل کرد. بررسی مکانیسم مقاومت باکتری به فلزات سنگین نشان داد در *Ochrobactrum* sp. PHEOCH حداکثر تجمع مس (II) در دیواره سلولی رخ داد. تولید اسید آلی در *Ochrobactrum* sp. PHEOCH به‌طور قابل توجهی بالا بود، که ممکن است در مکانیسم‌های مقاومت نیز نقش داشته و به تحمل بالاتر در برابر کادمیوم (II) کمک کند و عوامل پروتئینی و کربوهیدراتی دخیل در جذب کادمیوم و مس موجود در باکتری با استفاده از FTIR شناسایی شد. همچنین باکتری *Ochrobactrum* sp. PHEOCH به ترتیب ۸۶ و ۶۹ درصد فنانترن را در حضور مس (۳/۹۷–۳/۷۶ میلی‌مولار) و کادمیوم (۰/۸۱–۰/۴۱ میلی‌مولار) تجزیه کرد. Poszytek et al. (۲۰۱۸) با بررسی ژنوم باکتری *Ochrobactrum* sp. POC9 جداسازی شده از لجن فاضلاب یک تصفیه‌خانه، بیان کردند که این سویه فعالیت‌های لیپولیتیک، پروتئولیتیک، سلولولیتیک و آمیلولیتیک دارد که از کاربرد آن در تجزیه زیستی ترکیبات آلی پیچیده پشتیبانی می‌کند. تجزیه و تحلیل محتوای ژنوم POC9 بینش عمیق‌تری در مورد پتانسیل بیوتکنولوژیکی این باکتری ارائه کرد که این یک سویه مقاوم به فلزات و یک سویه تولید کننده بیوفیلم است و قادر است از ترکیبات سمی مختلف استفاده نماید. پژوهش Sharma et al. (۲۰۲۱) نشان داد دو باکتری *Ochrobactrum intermedium* BPS-20 و *Ochrobactrum ciceri* BPS-26 می‌توانند به ترتیب تا ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سرب و ۸۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل را تحمل کنند. تجزیه و تحلیل نتایج طیف‌سنجی جذب اتمی، تجمع زیستی قابل توجهی را توسط *O. intermedium* BPS-20 (۸۵/۳۴ و ۷۴/۸۷ درصد) و *O. ciceri* BPS-26 (۷۱/۲۰ و ۸۸/۴۸ درصد) به ترتیب برای سرب و نیکل نشان داد. همچنین، بررسی ژن‌های عملکردی، حضور خانواده‌های انتقال دهنده‌های ATPase، ABC و HoxN/HupN/NixA را تایید کرد. در مورد تاثیر کنسرسیوم‌های مختلف بر تجزیه نفت در محیط مایع، Abou-Shanab et al. (۲۰۱۶) گزارش کردند سویه‌های تولید کننده سورفکتانت زیستی (RAM03) *Ochrobactrum cytisi* و *Ochrobactrum anthropi* (RAM06 و RAM17) توانایی تجزیه بالای ۹۳ درصد از TPH (۴ درصد) را در محیط مایع بعد از ۳۰ روز انکوباسیون داشتند. Behdarvandan et al.(۲۰۲۰) که باکتری *باسیلوس* را از خاک آلوده به نفت مناطق اهواز جداسازی کرده بودند طی آزمایشاتی بیان کردند که این باکتری با تولید بیوسورفکتانت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد توانسته است از ۳٪ نفت موجود در محیط کشت مایع در طول دوره هوادهی ۲ هفته‌ای، حدود ۲۶٪ از آن‌را تجزیه کند. Al-Mur et al. (۲۰۲۱) گزارش کردند استفاده از کنسرسیوم میکروبی اکسترموفیل (قلیادوست، نمک‌دوست و گرما دوست) حاوی باکتری‌های *Ochrobacterum*، *Bacillus*، *Marinobacter*، *Rhodococcus* و *Pseudomonas* توانست هیدروکربن-های نفتی با وزن مولکولی کم (آنتراسن، فنانترن، فلوئورن و نفتالن= هر کدام۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) را در شرایط سخت (پی اچ= ۱۰، دما= ۶۰ درجه سلسیوس و شوری= ۸٪) طی ۸ روز به طور کامل تجزیه نماید. همچنین این کنسرسیوم توانست به ترتیب ۹۳٪، ۶۰٪، ۵۵٪ و ۵۱٪ هیدروکربن‌های نفتی با وزن مولکولی بالا شامل پایرن (۱۰۰ ppm)، بنزو (e) پایرن (۲۰ ppm)، بنزو فلوئورانتن (۲۰ ppm) و بنزو (a) پایرن (۲۰ ppm) را تجزیه کند. نتایج کاربرد این کنسرسیوم در راکتور پیوسته همزن‌دار برای تصفیه زیستی فاضلاب پالایشگاه نفت در شرایط دشوار (پی اچ= ۱۰، دما= ۶۰ درجه سلسیوس و شوری= ۸٪) نشان داد، این کنسرسیوم توانست به ترتیب ۱۰۰ و ۹۱ درصد هیدروکربن‌های نفتی با وزن مولکولی کم و زیاد را طی ۱۶ و ۳۲ روز تجزیه نماید. بنابراین در تجزیه نفت در خاک، حضور کنسرسیوم‌های میکروبی و روابط هم افزایی در میان آن‌ها باعث تصفیه زیستی نفت خام می‌شود و برای توسعه تصفیه زیستی نفت خام، باید از پتانسیل همکاری کنسرسیوم باکتری‌های تخریب کننده نفت خام استفاده شود.



شکل ۱. مقدار دانسیته نوری ناشی از رشد باکتری در طی ۱۰ روز در محیط کشت بوشنل‌هاوس با حضور فلزات سنگین



شکل ۲. مقداردانسیته نوری TPH موجود در تیمارها در محیط مایع در طی ۱۰ روز با حضور فلزات سنگین.

نتیجه‌گیری

مقدار زیادی از گونه‌های باکتریایی با توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی مورد بهره‌برداری قرار گرفته و در پالایش زیستی استفاده شده‌اند. بااین‌حال، مشکلات مختلفی که باعث کاهش سرعت تخریب زیستی می‌شود، در طی روند کاربردهای عملی از این موجودات یافت شده است. بررسی این عوامل محدودکننده، از جمله اثرات سمی سایر آلاینده‌ها مانند فلزات سنگین برای مطالعات تجزیه زیستی لازم و ضروری است. نتایج آزمون‌های تولید سورفکتانت و حساسیت به فلزات سنگین نشان داد از بین ۳۹ سویه باکتری جداشده از خاک‌های آلوده به نفت مناطق خوزستان، ۳۴ سویه توانایی تولید سورفکتانت داشته و فقط سه سویه *Ochrobactrum lupini* SH23، *Ochrobactrum lupini* SH24 و *Bacillus subtilis subsp. Inaquosorum* SH34 توانستند در حضور همه فلزات سنگین رشد کنند. همچنین نتایج نشان داد باکتری *Ochrobactrum lupini* SH23 بیشترین مقدار MBC و MIC را در بین باکتری‌های برتر داشت. سپس توانایی باکتری‌ها در محیط مایع بوشنل هاوس دارای ۰/۵٪ نفت (به عنوان منبع کربن) و حضور فلزات سنگین سنجیده شد، که طبق نتایج به دست آمده کنسرسیوم حاوی هر سه باکتری با تجزیه ۷۱٪ از ۰/۵ درصد (حجمی/حجمی) نفت موجود در محیط مایع بهترین کارایی را نسبت به بقیه تیمارها از خود نشان داد. همچنین باکتری *Ochrobactrum Lupini* SH23 با ۶۴ ٪ تجزیه نفت، بهترین باکتری عملکرد را بین باکتری‌ها به صورت استفاده مجزا داشت. یافته‌های این پژوهش بیانگر این امر است که استفاده از باکتری‌های مولد سورفکتانت و مقاوم به فلزات سنگین نقش

موثری در محیط‌های آبی حاوی آلودگی نفتی و فلزات سنگین دارد که نوید بخش اثرات مثبت کاربرد این باکتری‌ها در جهت رفع آلودگی محیط‌های آبی و پساب در پژوهش‌های آتی است.

" هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

منابع

شاه‌علیان، فاطمه؛ صفاهیه، علیرضا و آبیار، هاجر. ۱۳۹۲. جداسازی و شناسایی گونه باکتریایی مقاوم به نیکل از رسوبات آلوده خورموسی و مطالعه عملکرد آن در جذب زیستی نیکل. *محیط‌زیست*، ۲ (۲): ۱۰۰-۹۳.

REFERENCES

Abolahrar, S., Kafilzadeh, F., & Kargar, M. (2014). Identifying cadmium resistant bacteria and evaluating their resistance spectrum during quarterly monitoring on the Kor River. *Journal of Environmental Science and Technology*, 16 (3), 165-179.

Abou-Shanab, R. A., Eraky, M., Haddad, A. M., Abdel-Gaffar, A. R. B., & Salem, A. M. (2016). Characterization of crude oil degrading bacteria isolated from contaminated soils surrounding gas stations. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97, 684-688.

Al-Mur, B. A., Pugazhendi, A., & Jamal, M. T. (2021). Application of integrated extremophilic (halo-alkalo-thermophilic) bacterial consortium in the degradation of petroleum hydrocarbons and treatment of petroleum refinery wastewater under extreme condition. *Journal of Hazardous Materials*, 413, 125351.

Aljerf, L., & Choukaife, A. E. (2018). Review: assessment of the doable utilisation of dendrochronology as an element tracer technology in soils artificially contaminated with heavy metals. *Biodiversity Int J*, 2 (1), 00037.

Angle, J. S., & Chaney, R. L. (1989). Cadmium resistance screening in nitrilotriacetate-buffered minimal media. *Applied and environmental microbiology*, 55 (8), 2101-2104.

Arulazhagan, P., & Vasudevan, N. (2011). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain Ochrobactrum sp. VA1. *Marine pollution bulletin*, 62 (2), 388-394.

Behdarvandan, P., Jalilzadeh Yengejeh, R., Sabzalipour, S., Roomiani, L., & Payandeh, K. (2020). Bioremediation of crude oil by indigenous species isolated from oil sludge contaminated soil. A case study: Karun Gas Oil Production Company,(IRAN). *Journal of Advances in Environmental Health Research*, 8 (4), 234-241.

Bezza, F. A., Beukes, M., & Chirwa, E. M. N. (2015). Application of biosurfactant produced by Ochrobactrum intermedium CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process biochemistry*, 50 (11), 1911-1922.

Bhattacharya, M., Biswas, D., Sana, S., & Datta, S. (2015). Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated *Ochrobactrum* sp. C1. *3 Biotech*, 5, 807-817.

Bhattacharya, M., Biswas, D., Sana, S., & Datta, S. (2014). Utilization of waste engine oil by *Ochrobactrum pseudintermedium* strain C1 that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4), 167-176.

Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45 (3), 198-207.

Cerqueda-García, D., García-Maldonado, J. Q., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2020). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110775.

Chen, C., Lei, W., Lu, M., Zhang, J., Zhang, Z., Luo, C., ... & Shen, Z. (2016). Characterization of Cu (II) and Cd (II) resistance mechanisms in Sphingobium sp. PHE-SPH and Ochrobactrum sp. PHE-OCH and their potential application in the bioremediation of heavy metal-phenanthrene co-contaminated sites. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 6861-6872.

Chen, W., Kong, Y., Li, J., Sun, Y., Min, J., & Hu, X. (2020). Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 154, 105047.

Chodak, M., Gołębiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K., & Niklińska, M. (2013). Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Applied Soil Ecology*, 64, 7-14.

Bong, C. W., Malfatti, F., Azam, F., Obayashi, Y., & Suzuki, S. (2010). The effect of zinc exposure on the

bacteria abundance and proteolytic activity in seawater. *Interdisciplinary studies on environmental chemistry—biological responses to contaminants. Terrapub, Tokyo*, 57-63.

Chunyan, X., Qaria, M. A., Qi, X., & Daochen, Z. (2023). The role of microorganisms in petroleum degradation: Current development and prospects. *Science of The Total Environment*, 865, 161112.

Cui, J. Q., He, Q. S., Liu, M. H., Chen, H., Sun, M. B., & Wen, J. P. (2020). Comparative study on different remediation strategies applied in petroleum-contaminated soils. *International journal of environmental research and public health*, 17 (5), 1606.

Eraky, M., Abou-Shanab, R. A. I., Salem, A. M., & Abdelgaffer, A. R. B. (2015). Petroleum hydrocarbon degradation potential of Ochrobactrum lupini isolated from BTEX enrichment soil. *International Journal of Environment*. 4 (3)*:* 204-209.

Gonzalez Henao, S., & Ghneim-Herrera, T. (2021). Heavy metals in soils and the remediation potential of bacteria associated with the plant microbiome. *Frontiers in Environmental Science*, 15.

Hemmat-Jou, M. H., Safari-Sinegani, A. A., Mirzaie-Asl, A., & Tahmourespour, A. A. (2018). Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*, 27, 1281-1291.

Ibrahim, H. M. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of Ochrobactrum anthropi HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. *3 Biotech*, 6 (2), 226.

Isaac, P., Martínez, F. L., Bourguignon, N., Sánchez, L. A., & Ferrero, M. A. (2015). Improved PAHs removal performance by a defined bacterial consortium of indigenous Pseudomonas and actinobacteria from Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 101, 23-31.

Jadoon, S., & Malik, A. D. N. A. (2017). DNA damage by heavy metals in animals and human beings: an overview. *Biochem Pharmacol*, 6 (3), 1-8.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 7 (2), 60.

Kalami, R., & Pourbabaee, A.A. (2021). Investigating the potential of bioremediation in aged oil-polluted hypersaline soils in the south oilfields of Iran. *Environmental Monitoring and Assessment*. 193 (8), 517. doi: 10.1007/s10661-021-09304-7. PMID: 34309727.

Kalvandi, S., Garousin, H., Pourbabaee, A. A., & Alikhani, H. A. (2022a). Formulation of a culture medium to optimize the production of lipopeptide biosurfactant by a new isolate of *Bacillus* sp.: a soil heavy metal mitigation approach. *Frontiers in Microbiology*, 214.

Kalvandi, S., Garousin, H., Pourbabaee, A. A., & Farahbakhsh, M. (2022b). The release of petroleum hydrocarbons from a saline-sodic soil by the new biosurfactant-producing strain of *Bacillus* sp. *Scientific Reports*, 12 (1), 19770.

Kumar, C. G., Sujitha, P., Mamidyala, S. K., Usharani, P., Das, B., & Reddy, C. R. (2014). Ochrosin, a new biosurfactant produced by halophilic Ochrobactrum sp. strain BS-206 (MTCC 5720): purification, characterization and its biological evaluation. *Process Biochemistry*, 49 (10), 1708-1717.

Li, X., Meng, D., Li, J., Yin, H., Liu, H., Liu, X., ... & Yan, M. (2017). Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environmental Pollution*, 231, 908-917.

Li, Q., You, P., Hu, Q., Leng, B., Wang, J., Chen, J., ... & Ouyang, K. (2020). Effects of co-contamination of heavy metals and total petroleum hydrocarbons on soil bacterial community and function network reconstitution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, 111083.

Margesin, R., Płaza, G. A., & Kasenbacher, S. (2011). Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. *Chemosphere*, 82 (11), 1583-1588.

Ortega-González, D. K., Cristiani-Urbina, E., Flores-Ortíz, C. M., Cruz-Maya, J. A., Cancino-Díaz, J. C., & Jan-Roblero, J. (2015). Evaluation of the removal of pyrene and fluoranthene by Ochrobactrum anthropi, Fusarium sp. and their coculture. *Applied biochemistry and biotechnology*, *175*, 1123-1138.

Peng, H., Xie, W., Li, D., Wu, M., Zhang, Y., Xu, H., ... & Liu, W. (2019). Copper-resistant mechanism of Ochrobactrum MT180101 and its application in membrane bioreactor for treating electroplating wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 17-26.

Poszytek, K., Karczewska-Golec, J., Ciok, A., Decewicz, P., Dziurzynski, M., Gorecki, A., ... & Dziewit, L. (2018). Genome-guided characterization of Ochrobactrum sp. POC9 enhancing sewage sludge utilization—Biotechnological potential and biosafety considerations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (7), 1501.

Primeia, S., Inoue, C., & Chien, M. F. (2020). Potential of biosurfactants' production on degrading heavy oil by bacterial consortia obtained from tsunami-induced oil-spilled beach areas in Miyagi, Japan. *Journal*

of Marine Science and Engineering, 8 (8), 577.

Pugazhendi, A., Qari, H., Basahi, J. M. A. B., Godon, J. J., & Dhavamani, J. (2017). Role of a halothermophilic bacterial consortium for the biodegradation of PAHs and the treatment of petroleum wastewater at extreme conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 121, 44-54.

Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., & Banat, IM. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource technology*, 85(3), pp.257-261.

Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I. M., & Oves, M. (2016). Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological research*, 183, 26-41.

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in biotechnology*, 27, 191-194.

Roszak, M., Jabłońska, J., Stachurska, X., Dubrowska, K., Kajdanowicz, J., Gołębiewska, M., ... & Karakulska, J. (2021). Development of an autochthonous microbial consortium for enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (24), 13469.

Safahieh, A., Lamoochi, R., Salamat, N., & Abyar, H. (2014) Isolation and Identification of *Bacillus firmus* from the Marine Sediments of Imam Khomeini Port and Study Its Ability in Biosorption of Lead. *Journal of Oceanography*, 5 (17):11-19. (In Persian)

Shahaliyan, F., Safahieh, A. R., & Abyar, H. (2013). Isolation and Identification of Nickel Resistant Bacteria in Khor Mousa Sediments and Study of Bacterial Capability in Nickel Biosorption. *Journal of Environmental Studies*, 39 (2), 93-100. (In Persian).

Sharma, B., & Shukla, P. (2021). A comparative analysis of heavy metal bioaccumulation and functional gene annotation towards multiple metal resistant potential by *Ochrobactrum intermedium* BPS-20 and Ochrobactrum ciceri BPS-26. *Bioresource Technology*, 320, 124330.

Sales da Silva, I. G., Gomes de Almeida, F. C., Padilha da Rocha e Silva, N. M., Casazza, A. A., Converti, A., & Asfora Sarubbo, L. (2020). Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. *Energies*, 13 (18), 4664.

Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in plant science*, 6, 1143.

Slepecky R.A, Hemphill H.E. The Prokaryotes, 3rd Ed.. New York: Springer; 2006

Syed, S., & Chinthala, P. (2015). Heavy metal detoxification by different Bacillus species isolated from solar salterns. *Scientifica*, 2015 (Article ID 319760):1- 8.

Tiwari, B., Manickam, N., Kumari, S., & Tiwari, A. (2016). Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by Stenotrophomonas sp. *Bioresource Technology*, 216, 1102-1105.

Villagrasa, E., Palet, C., López-Gómez, I., Gutiérrez, D., Esteve, I., Sánchez-Chardi, A., & Solé, A. (2021). Cellular strategies against metal exposure and metal localization patterns linked to phosphorus pathways in Ochrobactrum anthropi DE2010. *Journal of Hazardous Materials*, *402*, 123808.

Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015). Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Current microbiology*, 71, 220-228.

Wang, S., Wang, D., Yu, Z., Dong, X., Liu, S., Cui, H., & Sun, B. (2021). Advances in research on petroleum biodegradability in soil. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 23 (1), 9-27.

Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S., & Huang, Y. (2015). Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 1935-1946.

Zhang, X., Zhang, Q., Yan, T., Jiang, Z., Zhang, X., & Zuo, Y. Y. (2015). Quantitatively predicting bacterial adhesion using surface free energy determined with a spectrophotometric method. *Environmental science & technology*, 49 (10), 6164-6171.

Determining sensitivity to heavy metals in surfactant-producing bacteria and their efficiency in removing Total petroleum hydrocarbons

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Petroleum hydrocarbons with a variety of derivatives and varying degrees of toxicity, along with heavy metals, are the most important group of pollutants from oil entering the soil and aquatic environments, which have caused many problems for the environment. Owing to the co-contamination of heavy metals and total petroleum hydrocarbons in the ecosystem, the aim of this study was the isolation and application of native degrading bacteria of surfactant-producing oil and resistance to heavy metals in the degradation of total petroleum hydrocarbon along with heavy metals.

Materials and Methods

Thirty-nine bacterial strains with the ability to break down alkanes and produce biosurfactants (isolated from 10 oil-contaminated saline soils in the oil-rich areas of southern Khuzestan province) were selected from the microorganism gene bank of the soil microbiology laboratory of the University of Tehran.

To investigate the sensitivity of the strains to heavy metals, the growth rate of each strain (inoculation: 10^7 bacteria/mL and 1% v/v) was separately measured by the Spectrophotometer (OD_{600}) in the presence of heavy metals on condition 72 h incubation, 36-38 C^0, and 120 rpm. After selecting the best strains, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of heavy metals chromium, copper, nickel, lead, and cadmium were determined according to the Clinical & Laboratory Standard Institute protocol. Then, the rate of degradation of 0.5% (v/v) crude oil by superior strains and their consortium (1% v/v, OD_{600} = 0.5) was investigated in the presence of heavy metals with three replication during 10 days of incubation, 38 $C^{0,}$ and 120 rpm. The growth rate of bacteria was measured using a spectrophotometer (USA, Unico 2100) at a wavelength of 600 nm (OD_{600}). To measure the amount of crude oil degraded, 10 ml of the culture media was centrifuged at 6000 rpm for 20 minutes to precipitate the bacterial cells. Then, an equal volume of n-hexane was added to the solution as a solvent. Afterward, the extraction was performed by a separatory funnel. Then, the turbidity of the organic phase was measured by a spectrophotometer at a wavelength of 420 nm (OD420).

Results and Discussion

The results of the sensitivity of 39 bacterial strains to heavy metals showed that about 10% of the isolates were sensitive to all heavy metal and the highest level of sensitivity to metals was for cadmium (20%). Among the 39 bacterial strains, only three isolates *Ochrobactrum lupini* SH23, *Ochrobactrum lupini* SH24, and *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* SH34 showed the ability to grow in media containing all heavy metals. The results of the effect of different concentrations of heavy metals on MBC and MIC of selected bacteria showed that *Ochrobactrum lupini* SH23 had the highest tolerance to heavy metals. The results of the crude oil degradation test in the presence of heavy metals showed that the consortium of selected bacteria, *Ochrobactrum lupini* SH23, *Ochrobactrum lupini* SH24, and *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* SH34 were able to degrade 71%, 64%, 27%, and 22% of crude oil respectively, at 10 d on incubation (120 rpm, 38 C^0).

Conclusion

Overall, the results showed that the new bacterial strains isolated from soils contaminated with a mixture of pollutants may have advanced catabolic capabilities and the ability to tolerate extreme conditions of toxic metals and nutrient limitations. *Ochrobactrum lupini* SH23 had a high ability in biosurfactant production, resistance to heavy metals (lead, chromium, cadmium, nickel, and copper), and removal of total petroleum hydrocarbons in the presence of heavy metal in the liquid media. Based on our findings, the bacterium *Ochrobactrum lupini* strain SH23 can be used in the treatment of water and wastewater contaminated with petroleum hydrocarbons and heavy metals.

Keywords: Bio Surfactant, Diesel, Heavy Metals Tolerant Bacteria, Total Petroleum Hydrocarbons.