

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه لرستان

دانشکده کشاورزی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته گیاهپزشکی

عنوان پایان نامه

جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه کننده هیدروکربن‌ها در منطقه آلوده به نفت خام پلدختر

نگارش:

سوما نریمانی

استاد راهنما:

دکتر عیدی بازگیر

استاد مشاور:

مهندس حسین میرزایی

بهمن ۹۳

همه امتیازات این پایان نامه به دانشگاه لرستان تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب در مجلات، کنفرانس ها یا سخنرانی ها باید نام دانشگاه لرستان و نام دانشجو با ذکر ماخذ و ضمن کسب اجازه کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت، مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

چکیده:

ایران یکی از کشورهای نفت خیز جهان است که هرساله مقادیر زیادی نفت از نقاط جنوبی استخراج نموده و در دیگر مناطق پالایش می‌کند. مرکز انتقال نفت شهدای تنگ فنی شهرستان پلدختر یکی از مراکز مهم انتقال نفت است که فرسودگی خطوط انتقالی سبب آلودگی خاک و آب این منطقه شده است. به دلیل پایداری بالای ترکیبات نفتی در محیط و اثر زیانبار آن‌ها بر روی محیط زیست، تلاش برای پاکسازی و اصلاح ترکیبات نفتی در این منطقه امری ضروری می‌باشد. یکی از روش‌های تجزیه ترکیبات نفتی استفاده از فناوری زیست پالایی می‌باشد. این پژوهش به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه کننده ترکیبات نفتی منطقه تنگ فنی شهرستان پلدختر صورت گرفت. نمونه برداری از خاک و آب مناطق آلوده انجام شد و پس از انتقال به آزمایشگاه روی محیط کشت‌های نوترینت آگار، نوترینت برات و 2XYT کشت گردیدند. بعد از خالص سازی، جدایه‌های باکتریایی براساس خصوصیات فنوتیپی - بیوشیمیایی و توالی‌یابی بخشی از ناحیه ژن 16S rDNA به عنوان گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter baumannii*, *Delftia tsuruhatensis*, *Stenotrophomonas acidaminiphila* و *Comamonas koreensis* شناسایی گردیدند. همچنین جدایه‌های باکتریایی از نظر فاکتورهای تشکیل ساختارهای بیوفیلم باکتریایی، تولید سیدروفور، حرکت اسوارمینگ، توانایی انحلال فسفات و تولید ایندول استیک اسید مورد بررسی قرار گرفتند. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی برای باکتری‌ها تعیین گردید. همچنین توانایی سه گونه *P. aeruginosa*, *C. koreensis* و *A. junii* در تجزیه ترکیبات نفتی با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) بررسی شد. باکتری *P. aeruginosa* بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم، حرکت اسوارمینگ، تولید سیدروفور و تحمل نسبت به نفت را از خود نشان داد. همچنین بیشترین میزان تولید ایندول استیک اسید متعلق به گونه *S. multivorum* بود. دو گونه *Acinetobacter junii* و *Acinetobacter baumannii* بیشترین مقدار توانایی در انحلال فسفات از خود نشان دادند. در بررسی تجزیه ترکیبات نفتی گونه *P. aeruginosa* توانایی بیشتری را از خود نشان داد. در این تحقیق برای نخستین بار باکتری *Comamonas koreensis* به عنوان تجزیه کننده نفت معرفی می‌شود.

واژگان کلیدی: ترکیبات نفتی، باکتری، زیست پالایی، *Pseudomonas aeruginosa*، بیوفیلم.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیز، دلسوز و مهربانم که آرامش روحی و آسایش فکری مرا فراهم نمودند و با حمایت های همه جانبه خود و ایجاد محیطی سرشار از محبت یاریم نمودند تا مراتب تحصیلی را طی نموده و بتوانم پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خود را به نحوی مطلوب به انجام برسانم.

و تقدیم به:

تمام کسانی که دوستان دارم

تقدیر و تشکر

سپاس خدای راکه سخوران، در ستودن او بماند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، بازبان قاصرو دست ناتوان، چیزی بجا نیاوریم. اما از آنجایی که بحلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تا این می کند و سلامت امانت بانی راکه به دستش سپرده اند، از پدر و مادر عزیزم ... این دو معلم بزرگووارم ... که همواره بر کوتاهی و درستی من، قلم عضو کشیده و کریانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یاور بی چشم داشت برای من بوده اند. از استاد با کمالت و وسایسته؛ جناب آقای دکتر سعیدی بازگیر که در کمال سه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از بیچ لگی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛ بر خود لازم می دانم که از زحمات و رهنمودهای ارزشمند استاد مشاورم، جناب آقای مهندس حسین میرزایی که در تمامی مراحل اجرایی این پایان نامه مرایاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم. و از استاد فرزانه و دلسوز؛ جناب آقایان دکتر مصطفی درویش نیا و دکتر جهانشیر ساگر می که زحمت داورمی این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم. در پایان از تمامی کسانی که به نوعی در انجام این پایان نامه به من کمک کردند تشکر و قدردانی می کنم.

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را پاس گوید.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	چکیده
۱	مقدمه
	فصل اول: کلیات
۵	۱-۱- کلیات
۵	۲-۱- ترکیبات نفتی
۷	۳-۱- عوامل موثر در تجزیه ترکیبات نفتی
۷	۱-۳-۱- ترکیب شیمیایی هیدروکربن ها یا مواد نفتی
۸	۲-۳-۱- خواص فیزیکی هیدروکربن ها
۸	۳-۳-۱- غلظت هیدروکربن ها
۸	۴-۳-۱- عوامل محیطی
۸	۱-۴-۳-۱- دما
۹	۲-۴-۳-۱- اکسیژن
۹	۳-۴-۳-۱- عناصر غذایی
۹	۴-۴-۳-۱- رطوبت خاک
۱۰	۴-۱- اثرات سمی هیدروکربن های نفتی
۱۱	۵-۱- روش های مختلف اصلاح خاک های آلوده
۱۱	۱-۵-۱- روش های شیمیایی و فیزیکی
۱۱	۲-۵-۱- روش های حرارتی
۱۱	۳-۵-۱- گیاه پالایی
۱۲	۴-۵-۱- زیست پالایی
۱۳	۶-۱- زیست پالایی و ریزجانداران موثر در تجزیه ترکیبات نفتی
۱۴	۱-۶-۱- باکتری های تجزیه کننده ی آلاینده های نفتی
۱۶	۷-۱- مکانیسم تجزیه

۱۷	۸-۱- روش‌های زیست‌پالایی
۱۷	۱-۸-۱- زیست‌پالایی در محل
۱۸	۱-۱-۸-۱- Bioventing
۱۸	۲-۱-۸-۱- Bioaugmentation
۱۸	۳-۱-۸-۱- Biostimulation
۱۸	۲-۸-۱- زیست‌پالایی خارج از محل
۱۸	۱-۲-۸-۱- Bioreactor
۱۸	۲-۲-۸-۱- Land farming
۱۹	۹-۱- مزایا و محدودیت‌های زیست‌پالایی
۱۹	۱۰-۱- فاکتورهای موثر در افزایش کارایی باکتری‌ها
۲۱	۱-۱۰-۱- تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها
۲۲	۲-۱۰-۱- حرکت اسوارمینگ در باکتری‌ها
۲۲	۳-۱۰-۱- تولید سیدروفور توسط جدایه‌های باکتریایی
۲۳	۴-۱۰-۱- تولید ایندول استیک اسید (IAA) توسط جدایه‌های باکتریایی
۲۳	۵-۱۰-۱- انحلال فسفات
۲۴	۱۱-۱- مروری بر پژوهش‌های انجام شده
	فصل دوم: مواد و روش‌ها
۳۵	۱-۲- نمونه‌برداری
۳۵	۱-۱-۲- نمونه‌گیری از خاک
۳۵	۲-۱-۲- نمونه‌گیری از آب و لجن‌های نفتی
۳۶	۲-۲- جداسازی باکتری‌ها
۳۶	۱-۲-۲- جداسازی پرگنه‌های باکتری از نمونه‌های خاک
۳۶	۲-۲-۲- جداسازی پرگنه‌های باکتری از نمونه لجن و آب
۳۷	۳-۲- نگهداری جدایه‌ها
۳۷	۱-۳-۲- نگهداری باکتری‌ها در آب مقطر سترون
۳۷	۲-۳-۲- نگهداری باکتری‌ها در گلیسرول

- ۳۷ ۴-۲- آزمون جایگزینی منبع کربن با غلظت دو و نیم درصد نفت سفید در محیط SSM
- ۳۸ ۵-۲- بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها
- ۳۸ ۱-۵-۲- آزمون گرم
- ۳۸ ۱-۱-۵-۲- روش KOH سه درصد
- ۳۸ ۲-۱-۵-۲- روش رنگ آمیزی گرم
- ۳۹ ۲-۵-۲- آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی
- ۴۰ ۳-۵-۲- آزمون کاتالاز
- ۴۰ ۴-۵-۲- آزمون اکسیداز
- ۴۰ ۵-۵-۲- آزمون تولید گاز H₂S از سیستمین
- ۴۱ ۶-۵-۲- آزمون لوآن
- ۴۱ ۷-۵-۲- آزمون هیدرولیز توین ۲۰
- ۴۱ ۸-۵-۲- آزمون هیدرولیز ژلاتین
- ۴۲ ۹-۵-۲- تولید اسید از گلوکز
- ۴۲ ۶-۲- شناسایی باکتری‌ها با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rDNA
- ۴۳ ۷-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز
- ۴۳ ۱-۷-۲- مراحل انجام PCR
- ۴۴ ۲-۷-۲- تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز جهت بررسی نتیجه واکنش PCR
- ۴۴ ۸-۲- بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم
- ۴۵ ۹-۲- آزمون حرکت اسوارمینگ باکتری
- ۴۵ ۱۰-۲- ارزیابی تولید ایندول استیک اسید (IAA) توسط جدایه‌های باکتریایی
- ۴۷ ۱۱-۲- ارزیابی تولید سیدروفور جدایه‌های باکتریایی
- ۴۷ ۱۲-۲- بررسی انحلال فسفات توسط باکتری‌ها
- ۴۹ ۱۳-۲- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نفت برای گونه‌های باکتریایی
- ۵۰ ۱۴-۲- بررسی میزان توانایی باکتری‌ها در تجزیه نفت سفید توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی
گازی با طیف سنج جرمی

فصل سوم: نتایج

- ۵۲ ۱-۳- شناسایی باکتری‌های جداسازی شده
- ۵۲ ۲-۳- تشخیص گونه‌های باکتری با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rDNA
- ۵۳ ۳-۳- بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم
- ۵۵ ۴-۳- بررسی حرکت اسوارمینگ جدایه‌های باکتری
- ۵۶ ۵-۳- ارزیابی تولید ایندول استیک اسید (IAA) توسط جدایه‌های باکتریایی
- ۵۶ ۶-۳- ارزیابی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های باکتریایی
- ۵۸ ۷-۳- ارزیابی توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی
- ۶۰ ۸-۳- حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی جدایه‌های باکتریایی
- ۶۰ ۹-۳- بررسی میزان توانایی باکتری‌ها در تجزیه نفت سفید توسط دستگاه گروماتوگرافی
گازی با طیف سنج جرمی

فصل چهارم: بحث

- ۶۲ بحث
- ۷۲ پیشنهادات
- ۷۳ منابع

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۵	جدول ۱-۱- خواص ۱۶ ترکیب هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای تعیین شده توسط USEPA
۹	جدول ۲-۱- شرایط محیطی بهینه برای فعالیت میکروبی در طول تجزیه بیولوژیکی
۱۵	جدول ۳-۱- باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات آروماتیک
۳۵	جدول ۱-۲- نمونه‌های جمع آوری شده از اطراف شرکت نفت پلدختر
۳۶	جدول ۲-۲- مواد تشکیل دهنده محیط 2XYT
۳۷	جدول ۳-۲- مواد تشکیل دهنده محیط SSM
۴۰	جدول ۴-۲- مواد تشکیل دهنده محیط کشت O/F
۴۱	جدول ۵-۲- محیط کشت پایه برای آزمون تویین ۲۰
۴۲	جدول ۶-۲- محیط پایه Dye-C برای یک لیتر
۴۲	جدول ۷-۲- توالی آغازگر الیگونوکلوئوتیدی 16S rDNA
۴۳	جدول ۸-۲- چرخه حرارتی جهت انجام PCR با آغازگرهای 16sR/16sF
۴۳	جدول ۹-۲- مواد لازم برای واکنش PCR با آغازگرهای 16sR/16sF
۴۸	جدول ۱۰-۲- مواد تشکیل دهنده محیط اسپربر آگار
۵۳	جدول ۱-۳- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده از مناطق آلوده به ترکیبات نفتی
۶۰	جدول ۲-۳- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نفت از رشد گونه‌های باکتری

فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۱۷	شکل ۱-۱- مکانیسم تجزیه ترکیبات آروماتیک حلقوی توسط سلول‌های باکتری
۵۲	شکل ۱-۳- محلول PCR حاصل از استفاده جفت آغازگر 16s-F/16s-R در جدایه‌های نماینده. مارکر ۳۰۰۰ جفت بازی
۵۴	شکل ۲-۳- بررسی تشکیل بیوفیلم به روش میکروپلیت الیزا
۵۴	شکل ۳-۳- ساختار تشکیل بیوفیلم باکتریایی در روش میکروپلیت الیزا
۵۶	شکل ۴-۳- حرکت اسوارمینگ باکتریایی روی محیط NA یک درصد
۵۸	شکل ۵-۳- تولید سیدروفور (ظهور هاله نارنجی رنگ) توسط گونه <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
۵۹	شکل ۶-۳- توانایی انحلال فسفات (هاله شفاف اطراف پرگنه باکتری) توسط گونه <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>

فهرست نمودار

صفحه	عنوان
۴۶	نمودار ۱-۲- منحنی کالیبراسیون محلول‌های استاندارد IAA در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ ppm، ۲۰، ۳۰
۴۹	نمودار ۲-۲- منحنی استاندارد فسفر در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴ میکروگرم بر میلی لیتر
۵۵	نمودار ۱-۳- آزمون کمی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های باکتریایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر
۵۶	نمودار ۲-۳- آزمون کمی حرکت اسوارمینگ جدایه‌های باکتریایی روی محیط کشت NA یک درصد
۵۷	نمودار ۳-۳- میزان تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌های باکتریایی
۵۸	نمودار ۴-۳- میزان تولید سیدروفور توسط جدایه‌های باکتریایی
۵۹	نمودار ۵-۳- میزان تولید فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی
۶۱	نمودار ۶-۳- گراف طیف جرمی حاصل از تجزیه نفت توسط باکتری <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
۶۲	نمودار ۷-۳- گراف طیف جرمی حاصل از تجزیه نفت توسط باکتری <i>Comamonas koreensis</i>
۶۲	نمودار ۸-۳- گراف طیف جرمی حاصل از تجزیه نفت توسط باکتری <i>Acinetobacter junii</i>

مقدمه

با پیشرفت سریع تکنولوژی در قرن گذشته، انسان دریافت که با توجه به مزایای فراوان آن، در صورت استفاده و مدیریت نادرست، منابع طبیعی و محیط زیست در معرض آلودگی قرار می‌گیرند. خاک به عنوان یکی از اجزای مهم محیط زیست، دریافت‌کننده آلاینده‌های مختلف مانند هیدروکربن‌های نفتی، پسماندهای صنعتی و کشاورزی است. با وجود انعطاف‌پذیری ذاتی، به علت استفاده و مدیریت نادرست خاک مستعد تخریب و کاهش کیفیت است. در نتیجه آلودگی‌های خاک به عنوان یک مانع عمده در توسعه پایدار مطرح است (Sayara, 2010). فرآورده‌های نفتی یکی از پرمصرف‌ترین مواد شیمیایی در دنیای امروز هستند و به طور جدی به عنوان یک تهدید بالقوه برای محیط زیست محسوب می‌شوند. این مواد در حین تولید، انتقال، استفاده نامناسب و نشت، سبب آلودگی خاک می‌شوند (Xu and Lu, 2010). به علت سمیت و سرطان‌زا بودن این ترکیبات، توسط آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا (USEPA¹)، به عنوان آلاینده‌های دارای تقدم طبقه‌بندی شده‌اند (Sayara, 2010; Tyagi *et al.*, 2010; Madueno *et al.*, 2011; Saxena *et al.*, 2013). این ترکیبات حاصلخیزی، نفوذپذیری، ظرفیت نگهداری آب و ظرفیت اتصال ذرات خاک را کاهش می‌دهند، به طوری که ممکن است خاک غیرقابل استفاده شود (Alam khan and Rizvi, 2011; Gojgic-Cvijovic *et al.*, 2012).

روش‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی، زیستی و گیاه‌پالایی² برای اصلاح خاک‌های آلوده وجود دارد، اما با توجه به هزینه بالا و عوارض جانبی روش‌های فیزیکی-شیمیایی، استفاده از روش‌های زیستی در اولویت قرار گرفته است (Shabir *et al.*, 2008). تجزیه زیستی یک تکنولوژی نسبتاً مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست، برای حذف هیدروکربن‌های نفت در خاک‌های آلوده می‌باشد (Salanitro *et al.*, 2009; Sayara, 2010; Madueno *et al.*, 2011; Thapa *et al.*, 2012). هیدروکربن‌های نفتی بسته به ساختار شیمیایی و حالت فیزیکی درجات مختلفی از زیست تخریبی را نشان می‌دهند (Tyagi *et al.*, 2010). در طول چند دهه گذشته، تجزیه‌زیستی خاک‌های آلوده به عنوان یک موضوع مهم در پژوهش‌های زیست محیطی مطرح بوده و بسیاری از راهکارهای تجزیه‌زیستی، برای کاهش آلودگی این خاک‌ها بهبود یافته است (Xu and Lu, 2010). این روش دربرگیرنده فعالیت میکروبی، برای تبدیل آلاینده‌های سمی به ترکیبات با درجه سمیت کمتر می‌باشد (Sayara *et al.*, 2010).

1. United States Environmental Protection Agency
2. Phytoremediation

2010). در این فرایند، ریزجانداران مانند باکتری‌ها از طریق سیستم‌های آنزیمی، آلاینده‌ها را به محصولاتی با درجات سمیت کمتر تبدیل می‌کنند (Mohite et al., 2010; Sayara et al., 2010). باکتری‌ها علاوه بر اثر مستقیم بر آلاینده‌ها، روی رشد و عملکرد گیاه اثر مثبت دارند و به عنوان ریزوباکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR³) شناخته می‌شوند (Davison, 1988). این باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌هایی مانند افزایش فسفر قابل دسترس، تولید هورمون‌های گیاهی اکسین، سیتوکینین و جیبرلین و افزایش آهن قابل دسترس گیاه باعث افزایش رشد و تحمل گیاه به تنش‌های شوری، خشکی، عناصر سنگین، آلاینده‌های نفتی و آفت‌کش‌ها می‌شوند (Glick et al., 1999). همچنین یکی دیگر از فاکتورهای موثر در افزایش عملکرد تجزیه‌زیستی باکتری‌ها، تولید ساختارهای بیوفیلم است. سلول‌های باکتری در ساختارهای بیوفیلم به دلیل افزایش توان بقا در شرایط تنش و دارا بودن مقدار بالای بیوماس میکروبی برای زیست پالایی مناسب شناخته شده‌اند (Das et al., 2012).

ایران یکی از کشورهای نفت خیز جهان است که هر ساله مقدار زیادی نفت از نقاط جنوبی، استخراج و در مناطق دیگر پالایش می‌شود. در جنوب ایران نفت خام یکی از آلوده کننده‌های مهم خاک به شمار می‌آید. به علت فرسودگی خطوط انتقالی یا مدیریت نادرست در حین انتقال، نفت سبب آلودگی مناطق دیگر می‌گردد. مرکز انتقال نفت شهدای تنگ فنی شهرستان پلدختر یکی از مراکز مهم انتقال نفت کشور محسوب می‌گردد، که به علت فرسودگی خطوط انتقالی و صدمات ناشی از جنگ تحمیلی عراق سبب آلودگی خاک و آب این منطقه شده است. استفاده از باکتری‌های بومی منطقه به دلیل سازگاری با شرایط محیطی می‌تواند در رفع آلودگی منطقه مورد استفاده قرار گیرد. به همین دلیل این تحقیق در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها در منطقه آلوده به نفت خام پلدختر انجام شد.

هدف‌های کلی و عمده در این پژوهش به شرح زیر است:

۱- جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از آب و خاک‌های کشاورزی آلوده به نفت.

۲- بررسی فاکتورهای مهم در بقا و افزایش توانایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت.

۳- بررسی میزان تجزیه نفت توسط باکتری‌ها.

فرضیات پژوهش

۱- در خاک‌های آلوده نفتی شهرستان پلدختر باکتری وجود ندارد.

- ۲- جدایه‌های باکتریایی موجود در خاک‌های آلوده شهرستان پلدختر توانایی استفاده از نفت و مشتقات آن را به عنوان منبع کربن ندارند.
- ۳- جدایه‌های باکتریایی توانایی تجزیه‌زیستی نفت را ندارند.

فصل اول

کلیات

۱-۱- کلیات

۲-۱- ترکیبات نفتی

نفت خام یکی از پیچیده‌ترین ترکیبات آلی است. پیشرفت‌های اخیر در طیف‌سنج جرمی به خوبی نشان داده که نفت خام تقریباً از ۱۷۰۰۰ جزء شیمیایی تشکیل شده است (Head *et al.*, 2006). از بین ترکیبات نفتی، ترکیبات هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH_s) به خاطر پایداری بالا در محیط و اثرات مضر بر سلامت انسان مورد توجه می‌باشند. از جمله ۱۶ ترکیب هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA^۵) به عنوان ترکیبات نفتی با درجه سمیت بالا مشخص شده‌اند، این ترکیبات همراه با تعدادی از خواص آن‌ها در جدول ۱-۱ آورده شده است (Sayara, 2010).

جدول ۱-۱- خواص ۱۶ ترکیب هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای تعیین شده توسط USEPA (Sayara, 2010)

ترکیبات	تعداد حلقه	انحلال پذیری (mg/L)	وزن مولکولی
Naphthalene	۲	۳۱	۱۲۸
Acenaphthylene	۳	۱۶	۱۵۲
Acenaphthene	۳	۳/۸	۱۵۴
Flourene	۳	۱/۹	۱۶۶
Phenanthrene	۳	۱/۱	۱۷۸
Anthracene	۳	۰/۰۴۵	۱۷۸
Pyrene	۴	۰/۱۳	۲۰۲
Flouranthene	۴	۰/۲۶	۲۰۲
Benzo (a) anthracene	۴	۰/۰۱۱	۲۲۸
Chrysene	۴	۰/۰۰۶	۲۲۸

4-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

5- United States Environmental Protection Agency

ادامه جدول (۱-۱)

۲۵۲	۰/۰۰۱۵	۵	Benzo (b) flouranthene
۲۵۲	۰/۰۰۰۸	۵	Benzo (a) pyrene
۲۵۲	۰/۰۰۳۸	۵	Benzo (k) flouranthene
۲۷۸	۰/۰۰۰۶	۵	Dibenzo (a,h) anthracene
۲۷۶	۰/۰۰۰۱۹	۶	Indeno (1,2,3-cd) pyrene
۲۷۶	۰/۰۰۰۲۶	۶	Benzo (ghi) perylene

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، شامل گروه بزرگی از ترکیبات آلی با دو یا چند حلقه آروماتیک با pH نسبتاً خنثی با حلالیت کم در آب، چربی دوست و بسیاری از آن‌ها در فشار کم بخار می‌شوند. خواص شیمیایی این ترکیبات بستگی به وزن مولکولی آن‌ها (به عنوان مثال تعداد حلقه‌های آروماتیک) دارد، افزایش در وزن مولکولی این ترکیبات منجر به افزایش خاصیت آبریزی و ثبات الکتروشیمیایی و در نهایت منجر به پایداری بیشتر در محیط می‌گردد (Kanaly and Harayama, 2000). ترکیبات با وزن مولکولی پایین (شامل دو یا سه حلقه)، فرار می‌باشند، اما ترکیبات با وزن مولکولی بالا بیشتر جذب خاک و رسوبات می‌شوند. همچنین ترکیبات با وزن مولکولی بالا، پایداری بیشتری داشته و کمتر تجزیه می‌گردند (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۱).

به طور کلی هیدروکربن‌های نفتی در چهار گروه طبقه‌بندی می‌شوند:

- ۱- آلیفاتیک‌ها
- ۲- آسفالتن‌ها
- ۳- رزین‌ها
- ۴- آروماتیک‌ها

ترکیبات آلیفاتیک (چربی‌دار) متشکل از آلکان‌های راست زنجیر (ان-آلکانها)، آلکان‌های شاخه‌دار (ایزوآلکانها) و آلکان‌های حلقوی (نفتن) هستند. آسفالتن‌ها شامل فنول‌ها، اسیدهای چرب، کتون‌ها، استرها و پورین‌ها می‌باشند. رزین‌ها، ترکیبات نیتروژن و اکسیژن‌دار هستند که شامل پریدین‌ها، کوئینولین‌ها، کربازول‌ها، سولفوکسیدها و آمیدها می‌باشند. ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای، به عنوان

گروهی از ترکیبات شامل کربن و هیدروژن متشکل از دو یا چند حلقه آروماتیک با ساختار خطی، نامنظم و خوشه‌ای هستند. (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۱; Gojgic-Cvijovic *et al.*, 2012). بعضی از این ترکیبات به راحتی تجزیه می‌شوند، برخی در برابر تجزیه مقاوم و برخی دیگر غیرقابل تجزیه هستند (Thapa *et al.*, 2012). ایزوآلکان‌ها، نفتن‌ها و ترکیبات آروماتیک نسبت به ان-آلکان‌ها درجه کمتری از تجزیه زیستی را نشان می‌دهند و آسفالتن‌ها به طور کلی نامحلول و در برابر تجزیه زیستی مقاوم هستند (Gojgic-Cvijovic *et al.*, 2012). در واقع ان-آلکان‌ها با ۱۰-۵ اتم کربن نسبت به تجزیه‌گرهای هیدروکربن، بازدارندگی نشان می‌دهند، زیرا این ترکیبات توانایی مختل کردن غشای لیپیدی ریزجانداران را دارند. اما هیدروکربن‌های با ۴۰-۲۰ اتم کربن در دمای فیزیولوژیکی جامد و آبگریز در برابر تجزیه زیستی مقاوم باشند (Tyagi *et al.*, 2010). به طور کلی ترکیبات اشباع شده خطی سریع‌تر تجزیه شده و هر چه ترکیب مورد نظر از نظر ساختار و ساختمان پیچیده‌تر می‌شود، نسبت به تجزیه مقاوم‌تر می‌شوند (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۱).

قابلیت تجزیه بیولوژیکی هیدروکربن نفتی به ترتیب زیر کاهش می‌یابد:

ان-آلکان‌ها، آلکان‌های شاخه‌دار و زنجیری، آلکان‌های شاخه‌دار، ان-آلکیل آروماتیک با وزن مولکولی پایین، مونوآروماتیک، آلکان‌های حلقوی، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، آسفالتن‌ها (Tyagi *et al.*, 2010).

۱-۳- عوامل موثر در تجزیه ترکیبات نفتی

کارایی زیست‌پالایی تابع به عملکرد ریزجانداران موجود در ناحیه‌ی ریزوسفر و شرایط محیطی مورد نیاز برای رشد آن‌ها می‌باشد. پیشرفت در زمینه‌ی آگاهی از نقش ریزجانداران در فرآیند زیست‌پالایی، به همراه توانایی تنظیم فعالیت آن‌ها با استفاده از ابزارهای زیست‌شناسی مولکولی، منجر به توسعه‌ی فرآیندهای زیست‌پالایی خواهد شد (Saghir Khan *et al.*, 2009). تجزیه این ترکیبات تحت تاثیر عوامل فیزیکی، شیمیایی و زیستی می‌باشند. فاکتورهای کلیدی در فرآیند تجزیه شامل موارد زیر است (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۱; Sayara, 2010).

۱-۳-۱- ترکیب شیمیایی هیدروکربن‌ها یا مواد نفتی

به طور کلی ترکیبات راست زنجیر یا آلکان‌ها و آلکیل‌ها بسیار آسان‌تر از ترکیبات آروماتیک حلقوی قابل تجزیه هستند (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۱; Sayara, 2010).