Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

تجزیه زیستی نفت خام توسط سیانوباکتری های فیشرلا (*Fischerella* sp.ISC67) و نوستوک (*Nostoc* sp. ISC101)

لیلا نعمتی[۱]
آرزو طهمورث پور[۲*]
ندا سلطانی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی، واحد اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان (خوراسگان)، ایران
۲. دانشیار گروه علوم پایه دندانپزشکی، واحد اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان (خوراسگان)، ایران
۳. دانشیار، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
atahmoures@khuisf.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۴۰۷۴۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۶
مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

هدف از این پژوهش، تعیین رشد و امکان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه‌های سیانوباکتریایی *فیشرلا* و *نوستوک* بود. در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی (سال ۱۳۹۳) میزان رشد سویه‌های سیانوباکتریایی *فیشرلا (ISC107)* و نوستوک (ISC101) تحت تیمارهای مختلف نفت خام (شاهد، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۶ درصد) با اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a در طول‌موج ۶۶۳ نانومتر بررسی شد. میزان غلظت نفت خام پس از ۲۱ روز به روش کروماتوگرافی گازی (GC-FID) تعیین و میزان تجزیه زیستی محاسبه گردید. نتایج نشان داد با افزایش غلظت نفت خام میزان کلروفیل a به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و نرخ رشد این سیانوباکتری‌ها بر اساس کلروفیل a در حضور نفت خام تقریباً برابر یا کمتر از نمونه شاهد بود. بیشترین و کمترین میزان تجزیه نفت خام پس از ۲۱ روز به ترتیب در تیمارهای ۰/۱ و ۱/۶ درصد نفت خام (*فیشرلا*: ۸۸/۲۷ و ۴۴/۷۲ درصد و *نوستوک*: ۹۱ و ۴۷/۴۶ درصد) مشاهده شد. بین مقادیر تجزیه در تمامی تیمارهای موردبررسی ازنظر آماری اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشته و تمامی تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) داشت. نتایج این پژوهش نشان داد که سیانوباکتری‌های فیشرلا و نوستوک دارای پتانسیل مناسبی در تجزیه بیولوژیکی نفت خام بوده و می‌توانند به‌عنوان ارگانیسم‌هایی ارزشمند جهت حذف یا کاهش آلاینده‌های نفتی در مناطق آلوده مورداستفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: نفت خام، تجزیه زیستی، فیشرلا، نوستوک، کلروفیل a.

مقدمه

آلودگی‌های نفتی یکی از مشکلات زیست‌محیطی است که می‌تواند در اثر فعالیت‌های اکتشاف و حفاری، پساب‌های صنایع نفتی، نشت لوله‌های انتقال نفت و نشت از نفت‌کش‌ها در محیط‌های آبی و خاکی ایجاد شوند. ازاین‌رو نگرانی جامعه بشری از به هم خوردن چرخه طبیعی حیات کره زمین، تخریب و از دست رفتن منابع خاک و آب بیش‌ازپیش افزایش‌یافته است. تجمع هیدروکربن‌های نفتی در بدن انسان به علت سمیت، جهش‌زایی و سرطان‌زایی نگرانی‌های زیادی را ایجاد نموده است. هیدروکربن‌ها معمولاً در بافت‌هایی مانند کبد، پانکراس، کیسه صفرا و بافت‌های پوستی و عصبی تجمع می‌یابند و با تأثیر بر مکانیسم سلولی، باعث تغییرات پوستی و فساد بافت‌های زنده می‌شوند (Jain *et al*., 2011; Kästner, 2000; Xu *et al*., 2018).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

خلیج‌فارس به‌عنوان بزرگ‌ترین قطب تأمین نفت و گاز در ایران و مهم‌ترین آبراه حمل‌ونقل مواد نفتی جهان مطرح است و محیط‌زیست این منطقه به دلیل فرایندهای استخراج و حمل‌ونقل نفت، تعداد زیاد سوانح و حوادث دریایی به یکی از آلوده‌ترین مناطق دریایی در جهان ازنظر زیست‌محیطی تبدیل شده است (Elsagh and Barmaki, 2014). لذا بررسی و یافتن راهکاری مناسب برای پیشگیری و حتی پاک‌سازی چنین محیط‌های آلوده‌ای بسیار دارای اهمیت است.

حذف آلودگی‌های نفتی از محیط‌زیست به‌ویژه محیط‌های دریایی به سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی امکان‌پذیر است (Das and Chandran, 2011). روش‌های فیزیکی و شیمیایی دارای پیامدهای منفی بر محیط‌زیست بوده و پرهزینه می‌باشند و قادر به حذف کامل ترکیبات نفتی از محیط‌زیست نیستند، بنابراین روش‌های زیستی به دلیل سازگاری با محیط‌زیست می‌توانند به‌عنوان جایگزینی جدید و مناسب برای پالایش اکوسیستم‌های آلوده به ترکیبات نفتی به شمار آیند. تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی با میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یکی از کارآمدترین و مقرون به‌صرفه‌ترین روش‌های رفع آلودگی‌های نفتی از محیط‌زیست به‌حساب می‌آید (El-Sheekh *et al*., 2013; Hamouda *et al*., 2016; Koshlaf and Ball, 2017) و امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها در فرایند پاک‌سازی زیستی به یک فنّاوری امیدبخش تبدیل‌شده است (Guerra *et al*., 2018). در فرایند تجزیه زیستی ابتدا میکروارگانیسم‌ها باید قادر به رشد در حضور ترکیبات نفتی باشند. فرایند رشد بر اساس تمایل میکروب به فاز آلی و توانایی تکثیر به‌صورت معلق یا در ساختارهای چند سلولی (بیوفیلم) متفاوت خواهد بود. به‌هرحال در هرکدام از روش‌های رشد سه روش برای جذب ترکیبات هیدروفوب وجود دارد: جذب ترکیبات حل‌شده در فاز آبی، جذب ترکیبات متصل شده به سورفکتانت‌های میکروبی در میسل‌ها و جذب مستقیم از فاز نفتی. بدین‌صورت میکروب قادر خواهد بود که ترکیبات نفتی را به مواد ساده‌تر یعنی آب و گازهای بی‌ضرری چون دی‌اکسید کربن تبدیل نماید(Erdogan and Karaca, 2011; Kapellos, 2017). باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و سیانوباکتری ها به‌عنوان تجزیه‌کنندگان اصلی و مهم هیدروکربن‌ها شناخته‌شده‌اند. تاکنون نقش باکتری‌ها در تجزیه ترکیبات نفتی به‌طور گسترده موردبررسی قرارگرفته است (Miller *et al*., 2019; Purnomo *et al*., 2019; Shishir and Mahbub, 2019) ولی سیانوباکتری ها علی‌رغم پتانسیل بالا کمتر موردتوجه قرارگرفته‌اند (Das and Chandran 2011). سیانوباکتری‌ها یک گروه مهم از میکروارگانیسم‌های پروکاریوت فتوسنتتیک هستند که با توجه به توانایی‌های گسترده فیزیولوژیک و سازشی قادر به رشد و فعالیت به انواع روش‌های هتروتروفی، اتوتروفی و میکسوتروفی در زیستگاه‌های متنوع ازجمله محیط‌های دریایی، آب شیرین، خاک و چشمه‌های آب گرم می‌باشند و می‌توان از آن‌ها در جهت رفع آلودگی به روش زیستی، استفاده نمود. بااین‌وجود، فتوتروف بودن و عدم نیاز به مواد آلی در کشت سیانوباکتری‌ها ازنظر بیوتکنولوژی یک مزیت اقتصادی محسوب می‌شود که آن‌ها را نسبت به میکروارگانیسم‌های دیگر برتری می‌بخشد (Lau *et al*., 2015). سیانوباکتری‌ها در سال‌های اخیر به دلیل پتانسیل استفاده در بیوتکنولوژی ازجمله در صنعت نفت و فرایندهای پاک‌سازی زیستی بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند و در پژوهش‌های متعددی نشان داده‌شده که این میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه زیستی نفت خام و سایر ترکیبات هیدروکربنی هستند (El-Sheekh and Hamouda, 2014; Lau *et al*., 2015; Akoijam *et al*., 2015; Hamouda *et al*., 2016; Miller *et al*., 2019). Amirlatifi و همکاران (۲۰۱۳) نیز به بررسی تأثیر نفت خام بر ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک یک‌سویه سیانوباکتریایی پرداخته و پتانسیل سویه مزبور در استفاده از نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن را نشان داده است. Safari و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که سیانوباکتری‌های Schizothrix vaginata و Fischerella ISC67 دارای پتانسیل بالایی در تجزیه زیستی نفت خام می‌باشند. سیانوباکتری‌های Oscillatoria، Plectonema، Aphanocapsa و Synechococcus هم در تجزیه ترکیبات نفتی گزارش‌شده‌اند (Shishir and Mahbub, 2019; Zinicovscaia and Cepoi, 2016) و به‌ویژه اهمیت آن‌ها در رشد و تولید بیومس در محیط‌های آبی و پاک‌سازی لکه‌های نفتی دریاها گزارش‌شده است (Ban Samary and Al-Mayaly, 2018). به‌هرحال باوجود بررسی‌هایی که درزمینه سیانوباکتری‌ها و ارتباط آن‌ها با رفع آلودگی‌های نفتی در سطح بین‌المللی صورت گرفته است، تحقیقات داخلی هنوز سهم کم‌تری از این بررسی‌ها

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

را به خود اختصاص داده است. لذا، هدف از این مطالعه، بررسی رشد سیانوباکتری‌های فیشرلا ISC107 و نوستوک ISC101 و بررسی توانایی تجزیه زیستی نفت خام به‌وسیله آن‌ها در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، سیانوباکتری فیشرلا (*Fischerella* sp. ISC107) و نوستوک (*Nostoc* sp. ISC101) از کلکسیون ریزجلبک‌ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی تهران و نمونه نفت خام (مارون- شادگان) نیز از پالایشگاه اصفهان تهیه شد. سیانوباکتری‌های مورداستفاده در این تحقیق از راسته استیگونماتال (*Stigonematale*) و نوستوکال (*Nostocale*)، رشته‌ای، دارای هتروسیست و آکاینت می‌باشند. مراحل آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اصفهان و در سه تکرار انجام گرفت.

جهت اطمینان از عدم آلودگی نمونه به باکتری‌ها، قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و یا سایر سیانوباکتری‌ها، یک مرحله خالص‌سازی توسط روش پلیت آگار انجام شد (Andersen, 2005). بدین‌صورت که کلنی‌های سیانوباکتری توسط لوپ به‌صورت زیگزاگ روی محیط کشت جامد کشت داده شدند. این کار برای به دست آوردن کلنی‌های خالص سیانوباکتری چندین مرتبه تکرار شد و هر بار کلنی‌ها توسط تهیه اسلاید بررسی میکروسکوپی شدند. برای انجام مراحل آزمایش، بعد از اطمینان از خالص بودن به‌منظور ازدیاد سیانوباکتری، کلنی‌ها به محیط کشت مایع $BG11_0$ منتقل شد و در شرایط دمایی ۳۰°C –۲۵، تحت نوردهی دائم ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه ($\mu mol\ photon\ m^{-2}s^{-1}$) که با سه لامپ فلورسنت تأمین می‌گشت، هوادهی شدند. پس از ازدیاد سیانوباکتری، سلول‌ها از محیط کشت استوک برداشته و به‌عنوان ماده تلقیحی استفاده شدند.

برای اعمال تیمارها، به ارلن‌های استریل با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر، ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت $BG11_0$ اضافه شد و پس‌ازآن غلظت‌های مختلف نفت خام (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۶ درصد) استریل شده و سپس از سیانوباکتری موردبررسی در شرایط استریل به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر به ارلن‌ها افزوده شدند و برای جلوگیری از تبخیر درب ارلن‌ها بسته شد. علت انتخاب این غلظت‌ها این بود که بیشترین قسمت نفت را هیدروکربن‌ها تشکیل می‌دهند و ازآنجاکه هیدروکربن‌های آروماتیک حلالیت زیادی دارند و ممکن است باعث ایجاد سمیت برای سیانوباکتری ها شود از غلظت‌های پایین نفت خام استفاده می‌شود (Forooghnia *et al*., 2013). تیمارها، تحت شرایط مطلوب کشت در مدت ۲۱ روز با دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد، نور مداوم، هوادهی و pH ۷/۲ قرار گرفتند. نمونه‌های شاهد متشکل از محیط کشت و نفت خام برای هر یک از غلظت‌ها ساخته شد و در شرایط مشابه به مدت ۲۱ روز هوادهی گردید. محیط کشت $BG11_0$ که برای تیماردهی استفاده شد محیط کشتی حداقل و فاقد هرگونه منبع کربن بود تا سیانوباکتری در صورت نیاز مجبور به استفاده از هیدروکربن‌های نفت به‌عنوان تنها منبع کربن برای تغذیه شود.

میزان رشد سیانوباکتری با اندازه‌گیری کلروفیل a در روز اول یک روز بعد از تلقیح و روزهای پنجم، نهم، سیزدهم، هفدهم و بیست و یکم سنجیده شد. بدین منظور، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سیانوباکتریایی برداشته شد و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی خارج و بر روی توده زیستی باقی‌مانده ۱ میلی‌لیتر متانول خالص ریخته شد و در یخچال به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس‌ازآن مجدداً سانتریفیوژ شد و از روی سوپرناتانت، میزان جذب در طول‌موج ۶۶۳ نانومتر با اسپکتروفوتومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر در رابطه ۱ اندازه‌گیری شد (Pinto, 2003).

رابطه ۱: $(Chl\ a\ (\mu g/ml) = Abs\ ۶۶۳ \times ۱۲/۷)$

Abs663: جذب در طول‌موج ۶۶۳ نانومتر

برای تعیین نرخ رشد از مقادیر کلروفیل a به‌وسیله رابطه زیر استفاده شد (Al Obaidy and Lami, 2014)

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

رابطه ۲:

$$\mu(d^{-1})= \ln(x_2/x_1)/(t_2-t_1)$$

x_1 و x_2: مقدار کلروفیل در ابتدا و انتهای فاصله زمانی موردنظر

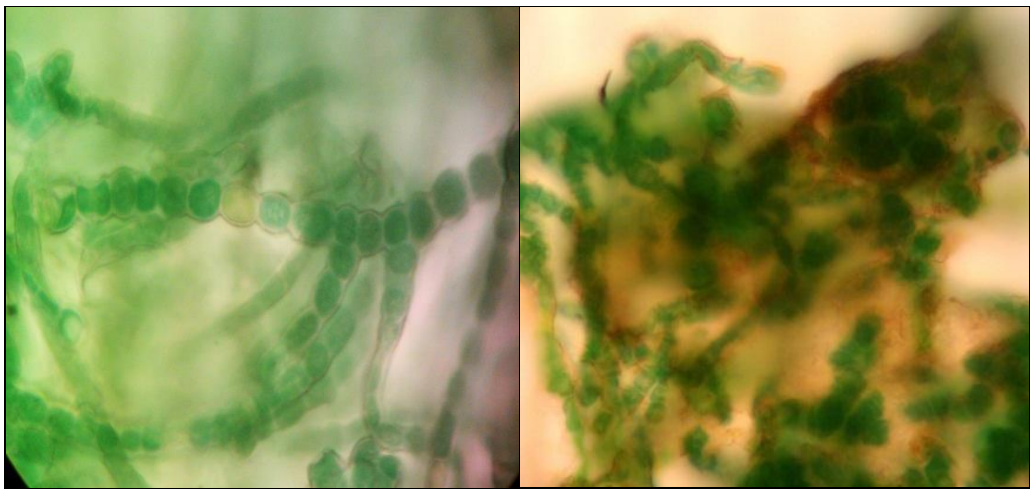
t_1 و t_2: فاصله زمانی موردنظر (فاصله زمانی در این تحقیق ۴ روز است)

بررسی تجزیه زیستی نفت خام پس از ۲۱ روز از افزودن نفت خام به محیط کشت حاوی سیانوباکتری، تجزیه نفت با دستگاه کروماتوگرافی گازی انجام شد (Chaillan *et al.*, 2006). برای این منظور تمام نمونه به قیف جداکننده منتقل شد. ارلن حاوی تیمار با ۱۰ میلی‌لیتر نرمال هگزان شستشو داده شد و درون قیف جداکننده ریخته شد، سپس از آن به مقدار ۱ میلی‌لیتر درون ویال ریخته و از استاندارد داخلی ان-ایکوزان (N-eicosane) با درجه خلوص ۹۸ درصد پس از محلول سازی ۱ میلی‌لیتر به نمونه اضافه و به‌منظور حذف رطوبت نمونه، سدیم سولفات بدون آب به آن افزوده شد. درنهایت ۱ میلی‌لیتر از نمونه را داخل ویال اتو سمپلر ریخته و ۱ میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent GC-FID 7899A/5975C) تزریق گردید. دمای اولیه دستگاه ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سپس افزایش دما با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه ثابت نگه‌داشته شد. جریان گاز حامل نیتروژن ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه، دمای آشکارساز ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد، دمای ورودی ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد و ستون استفاده‌شده HP-5 بود.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۹ و Excel 2010، توسط آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

در شکل ۱ ریسه‌های سیانوباکتری فیشرلا در نمونه‌های شاهد و تیمار مشاهده می‌شود. توده‌های سیانوباکتریایی پس از انتقال به محیط مایع، در محیط کشت غوطه‌ور شده ولی پس از وارد شدن به فاز لگاریتمی این ریسه‌ها در زیر لایه نفتی قرار گرفتند. محل قرارگیری توده‌های سیانوباکتری نوستوک در زیر لایه نفتی در شکل ۲ نشان داده‌شده است.



شکل ۱: ریسه‌های سیانوباکتری فیشرلا (*Fischerella* sp. ISC67).

در نمونه شاهد (سمت چپ) و اطراف نفت خام (سمت راست) توسط میکروسکوپ نوری.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

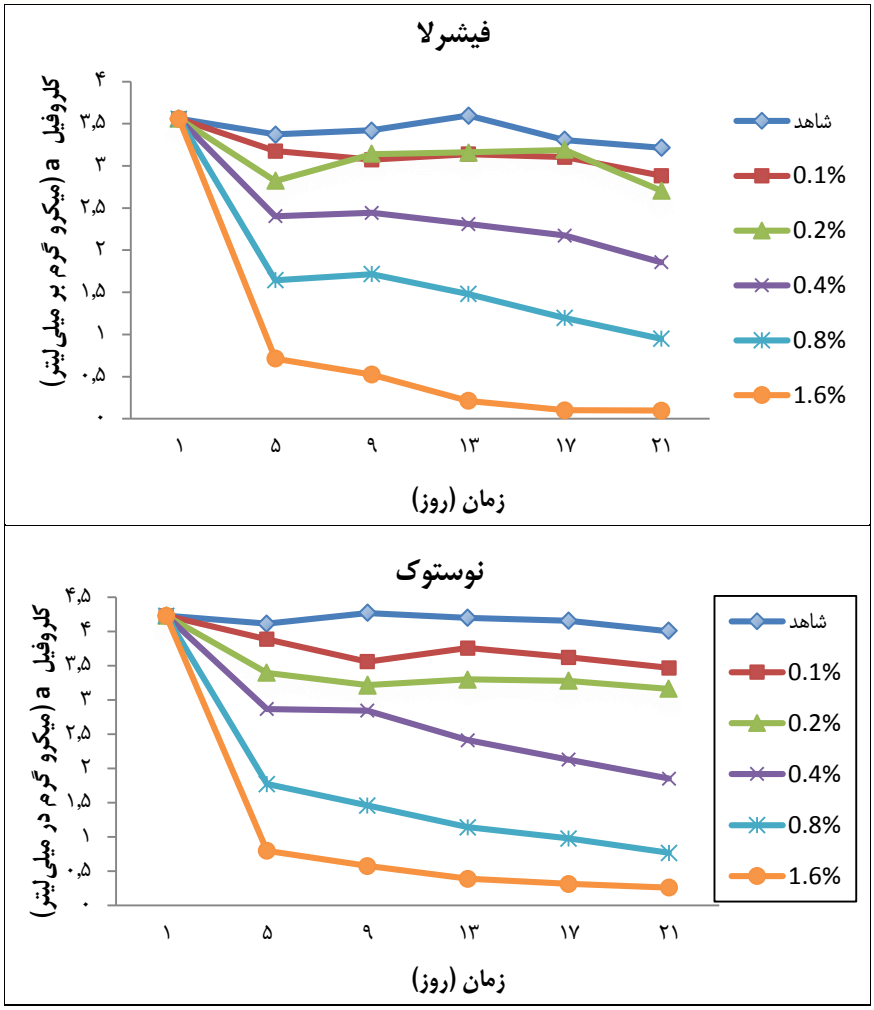
شکل ۲: محل قرارگیری توده‌های سیانوباکتری نوستوک (*Nostoc* sp. ISC101) در زیر لایه نفتی.

تغییرات رشد سیانوباکتری در تیمارهای نفتی مختلف بر اساس کلروفیل a در شکل ۳ ارائه شده است. بر این اساس میزان کلروفیل a در روز اول در نمونه شاهد و تیمارهای مختلف نفت خام یکسان بود. بیشینه رشد *فیشرلا* در نمونه شاهد در روز سیزدهم و در مورد *نوستوک* در روز نهم مشاهده شد، این فرایند تا روز ۲۱ کاهش یافت ولی این کاهش معنی‌دار نبود به این معنی که در طول زمان میزان تولید کلروفیل a تقریباً ثابت بوده است. میزان کلروفیل در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ درصد نفت خام ابتدا روند کاهشی داشت به‌طوری‌که رشد فیشرلا در تیمار ۰/۲ درصد تا روز پنجم کاهش و از روز پنجم تا روز نهم افزایش پیدا کرد. ولی در تیمار ۱/۶ درصد نفت خام این روند کاهشی تا انتهای آزمایش ادامه یافت.

جدول ۱، نرخ رشد (d^{-1}) سیانوباکتری‌ها بر اساس کلروفیل a را در تیمارهای مختلف نفت خام نشان می‌دهد. بیشترین میزان نرخ رشد بر اساس کلروفیل در مورد *فیشرلا* در تیمار ۰/۲ درصد به مقدار d^{-1} ۰/۰۲۷۶ و سپس در مورد *نوستوک* در تیمار ۰/۱ درصد مشاهده شد. افزایش معنی‌دار نرخ رشد فیشرلا در تیمار نفتی ۰/۲ نسبت به ۰/۱ درصد نشان‌دهنده عدم سمیت نفت خام در این غلظت و افزایش رشد بر اساس کلروفیل می‌باشد. در غلظت‌های بالاتر سنتز کلروفیل مهار شده و نرخ رشد بر اساس کلروفیل منفی شده است.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021



شکل ۳: منحنی تغییرات میزان کلروفیل سیانوباکتری‌های فیشرلا (*Fischerella* sp. ISC67) و نوستوک (*Nostoc* sp. ISC101) در تیمارهای مختلف نفت خام از یک تا ۲۱ روز بعد از تلقیح (سال ۱۳۹۳).

جدول ۱: میزان نرخ رشد سیانوباکتری در تیمارهای مختلف نفت خام.

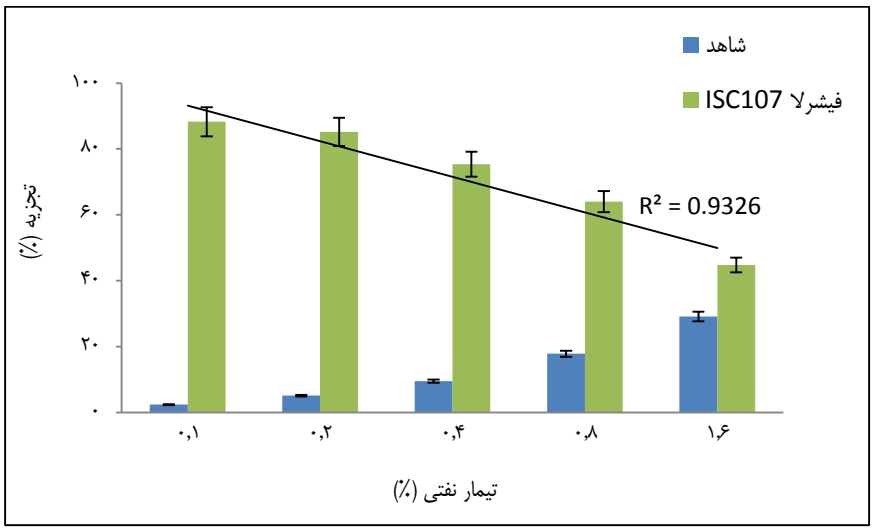
تیمار نفتی (٪)	نرخ رشد (d^{-1}) فیشرلا ISC107	نرخ رشد (d^{-1}) نوستوک ISC101
۰	۰/۰۱۲۸^{a}	۰/۰۰۹۵^{a}
۰/۱	۰/۰۰۳۲^{b}	۰/۰۱۴۹^{a}
۰/۲	۰/۰۲۷۶^{c}	۰/۰۰۶۱^{a}
۰/۴	-۰/۰۱۳۶^{d}	-۰/۰۴۱۰^{b}
۰/۸	-۰/۰۳۷۵^{d}	-۰/۰۶۱۸^{c}
۱/۶	-۰/۲۲۶۶^{e}	-۰/۰۹۴۸^{d}

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

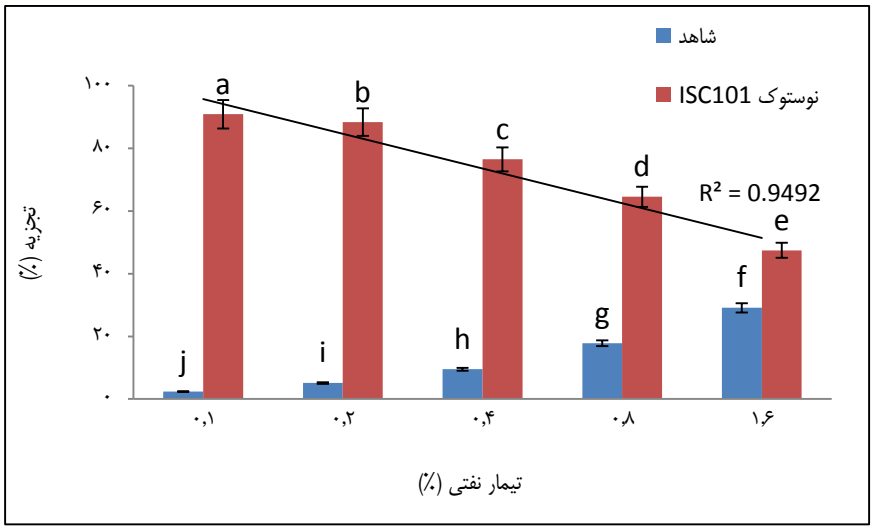
درصد تجزیه مقادیر مختلف نفت خام توسط سیانوباکتری‌ها پس از ۲۱ روز از زمان تلقیح در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده‌شده است. بر اساس نتایج با افزایش مقدار نفت خام میزان تجزیه آن توسط سیانوباکتری ها در محیط کشت کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین و کمترین میزان تجزیه نفت خام توسط فیشرلا به ترتیب در تیمارهای ۰/۱ و ۱/۶ درصد نفت خام (۸۸/۲۷ و ۴۴/۷۲ درصد) و در مورد نوستوک به ترتیب در تیمارهای ۰/۱ و ۱/۶ درصد نفت خام (۹۰/۹ و ۴۷/۵ درصد) مشاهده گردید. این میزان در تیمارهای ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ درصد به ترتیب کاهش یافت. این کاهش در تمام موارد معنی‌دار ($P<0/05$) بود. تجزیه نفت در نمونه‌های شاهد حاوی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۶ درصد نفت خام و فاقد سیانوباکتری به ترتیب ۲/۳۵، ۵/۱۰، ۹/۵۰، ۱۷/۸۰ و ۲۹/۱۱ درصد بود که نشان از تأثیرات اکسیداسیون خود به خودی نفت بدون حضور هرگونه میکروارگانیسمی است. آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری را بین مقادیر تجزیه در تمامی تیمارهای نفتی نشان داد. میزان تجزیه در تمامی تیمارهای نفتی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) داشت.



شکل ٤: درصد تجزیه نفت خام توسط سیانوباکتری فیشرلا (*Fischerella* sp.ISC67) بعد از ۲۱ روز (سال ۱۳۹۳).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021



شکل ۵: درصد تجزیه نفت خام توسط سیانوباکتری *نوستوک*(*Nostoc* sp. ISC101) بعد از ۲۱ روز (سال ۱۳۹۳).

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش به بررسی رشد سیانوباکتری‌های فیشرلا *ISC107* و نوستوک *ISC101* تحت تأثیر تیمارهای مختلف نفت خام و توانایی این سیانوباکتری جهت تجزیه زیستی نفت خام پرداخته شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سیانوباکتری‌های موردنظر در غلظت‌های کم نفت، بیشترین میزان رشد بر اساس کلروفیل را داشتند و افزایش غلظت نفت خام موجب کاهش کلروفیل گردید. میزان نرخ رشد در تیمار ۰/۲ درصد نفت خام بیشتر از شاهد و بقیه تیمارها بود که نشانگر توانایی سویه سیانوباکتری موردبررسی در استفاده از نفت خام به‌عنوان منبع کربن در این غلظت است. به‌طورکلی نرخ رشد در غلظت‌های مختلف نفت خام توانایی مصرف CO_2 و هیدروکربن‌ها را نشان می‌دهد. انواع مختلف نفت خام نیز اثرات متفاوتی بر رشد سیانوباکتری‌ها دارند (Llirós *et al.*, 2008).

در این تحقیق سویه‌های موردنظر غلظت‌های پایین نفت خام (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد) را به‌خوبی تحمل نموده و با افزایش غلظت نفت (۰/۸ و ۱/۶ درصد) میزان تولید کلروفیل آن‌ها کاهش یافت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق Safari و همکاران (۲۰۱۶) با اندازه‌گیری میزان رشد سیانوباکتری فیشرلا امبیگوا *ISC67* (*Fischerella ambigua ISC67*) در تیمارهای مختلف نفت خام نشان داده‌شده که میزان رشد در حضور نفت خام افزایش دارد و افزایش نرخ رشد تقریباً مشابه و گاهی کمتر از نمونه شاهد است و این امر نشان‌دهنده مقاومت سیانوباکتری موردبررسی نسبت به حضور نفت خام است. در مطالعه Amirlatifi و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی تأثیر نفت خام بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک یک‌گونه خاص سیانوباکتریایی (Microchaete tenera) نشان داده شد که محتوای کلروفیل با افزایش غلظت نفت خام کاهش یافت ولی افزایش غلظت تأثیر مخربی بر ویژگی‌های مورفولوژیک سیانوباکتری موردبررسی نداشت که نشان‌دهنده پتانسیل سویه مزبور در استفاده از نفت به‌عنوان منبع کربن بود. از طرفی افزایش غلظت نفت خام باگذشت زمان منجر به کاهش کلروفیل بیشتری شده به‌طوری‌که در پایان روز ۲۱ در غلظت ۱/۶ درصد نفت خام کمترین میزان کلروفیل و به همان نسبت کمترین نرخ رشد (منفی) بر اساس کلروفیل گزارش گردید که دلیل آن تغییر سازوکار تغذیه‌ای سیانوباکتری‌های موردبررسی است.

سیانوباکتری‌ها ارگانیسم‌هایی فتواتوتروف می‌باشند، باوجوداین بسیاری از آن‌ها می‌توانند از اجزای کربن آلی محلول برای رشد هتروتروفی در نور استفاده کنند. همچنین این ارگانیسم‌ها قابلیت زیادی نسبت به تغییرات محیطی دارند و به‌راحتی با عوض شدن شرایط می‌توانند سازوکار تغذیه‌ای

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

خود را تغییر دهند (Zandi *et al*., 2012). بنابراین ازآنجاکه تیمارهای مطالعه حاضر در شرایط وجود نور دائم بوده‌اند، سیانوباکتری‌ها زندگی فتوهتروتروفی را در پیش‌گرفته و از نفت خام به‌عنوان منبع کربن استفاده کرده است. این نتایج مطابق با مطالعاتی است که توسط El-Sheekh and Hamouda (2014) انجام گرفت. آن‌ها میزان رشد *نوستوک پونکتیفرم* (*Nostoc punctiform*) را در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد نفت خام بر اساس جذب نوری بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که بالاترین میزان رشد در غلظت ۰/۵ پس‌ازآن به ترتیب در غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ درصد گزارش شد. آن‌ها در مطالعه دیگری (۲۰۱۳) رشد فوتوهتروتروفی جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* را در غلظت پایین تأیید نمودند که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

در این تحقیق میزان رشد سیانوباکتری مورد آزمایش، بر اساس اندازه‌گیری کلروفیل a در جذب نوری ۶۶۳ نانومتر انجام شد که با توجه به منحنی رشد با افزایش نفت خام در مقایسه با شاهد، میزان کلروفیل سیانوباکتری مذکور کاهش پیدا کرد و کاهش میزان کلروفیل به غلظت نفت خام وابسته بود. در تحقیق دیگری مشخص شد که میزان کلروفیل a با افزایش زمان انکوباسیون در حضور ترکیبات نفتی کاهش می‌یابد (El-Sheekh and Hamouda, 2014). کاهش کلروفیل به علت فشارها یا استرس‌های محیطی مختلف و احتمالاً به دلیل مهار بیوسنتز کلروفیل در اثر مهار آنزیم‌های دهیدروژناز و ردوکتاز دخیل در بیوسنتز کلروفیل است. از طرفی مطالعات نیز نشان داده آلاینده‌های محیطی از قبیل بنزن و تولوئن در غلظت‌های بالا منجر به کاهش کلروفیل و غیرفعال شدن فرایندهای حیاتی از قبیل فتوسنتز و جذب نیترات می‌شوند (Sundaram and Soumya, 2011). Pimda and Bunnag (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که میزان کلروفیل *Nostoc piscinale* در تیمار روغن‌موتور در یک دوره ۱۴ هفته‌ای کاهش پیدا کرد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از کروماتوگرافی گازی، سیانوباکتری‌های فیشرلا ISC107 و نوستوک ISC101 پتانسیل بالایی در تجزیه زیستی نفت خام داشت و ارتباط معکوس خطی (R2=0.93) بین غلظت آلاینده و درصد تجزیه زیستی آن مشاهده گردید. میانگین میزان تجزیه نفت خام در تیمارهای مختلف در روز ۲۱ توسط فیشرلا به حدود ۷۱/۵ درصد (با بیشینه ۸۸/۲۷ درصد) و توسط نوستوک به ۷۳/۵۵ درصد (با بیشینه ۹۰/۹ درصد) رسید این در حالی است که در مطالعه Safari و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی پتانسیل تجزیه زیستی نفت خام سیانوباکتری فیشرلا ISC67 میانگین تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی در تیمارهای مختلف در روز ۱۴ به میزان ۴۲/۳۴ درصد و در روز ۲۸ به ۵۲/۲۱ درصد رسید. Ichor و همکاران (۲۰۱۶) نیز در تحقیقی به بررسی تأثیر مجموعه سیانوباکتریایی جداسازی شده بر تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی پرداختند و پس از ۴۹ روز به ۹۷/۴ درصد تجزیه دست یافتند. در تحقیقی به‌منظور بررسی توان سیانوباکتری آنابنا در پاک‌سازی زیستی نفت توسط Ban Samary and Al-Mayaly (۲۰۱۸) رشد هتروتروفی در حضور ماده نفتی تأیید و درصد تجزیه نفت در محیط کشت‌های حاوی ۱ درصد نفت به‌طور میانگین ۸۹ درصد گزارش شد. در تحقیقات دیگر نیز الگوهای تجزیه زیستی متفاوتی توسط سویه‌های سیانوباکتریایی مختلف ازجمله فیشرلا (Safari *et al*., 2016) و حتی نوستوک (Pimda and Bunnag, 2015) در شرایط و محیط‌های مختلف گزارش‌شده است. در دریای بالتیک هم به حضور گسترده سیانوباکتری‌ها به‌منظور تجزیه زیستی ترکیبات نفتی اشاره‌شده است (Miettinen *et al*., 2019). همچنین بر اساس مطالعه Miller و همکاران (۲۰۱۹) در دریای خزر گزارش‌شده که نقش سیانوباکتری‌ها در تجزیه آلاینده‌ها در قسمت‌های عمقی دریاها برجسته‌تر از نواحی سطحی است. تفاوت بین نتایج حاصل از این تحقیق و سایر پژوهش‌ها مربوط به تفاوت سویه‌ها، شرایط آزمایش و احتمالاً نوع و منبع نفت خام مورداستفاده و همچنین زیستگاه اصلی این ارگانیسم‌ها است. لذا برای تجزیه مؤثر و کارآمد در یک زیستگاه مثل دریا بهتر است سویه‌های بومی همان محیط جداسازی و مورداستفاده قرار گیرند که قطعاً کارایی بالاتری نسبت به سایر سویه‌ها در آن محیط خواهند داشت. از طرفی مطالعات متعدد دیگری نشان داده‌اند که در بین توده‌های سیانوباکتریایی در محیط، انواعی از باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت نیز وجود دارند که اکسیژن و مواد غذایی موردنیاز خود را از سیانوباکتری‌ها به دست می‌آورند. لذا سیانوباکتری‌ها نه‌تنها خود در شرایطی قادر به تجزیه ترکیبات

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

نفتی هستند بلکه می‌توانند به باکتری‌های تجزیه‌کننده نیز در تجزیه نفت و آلاینده‌های نفتی کمک نمایند (Ichor *et al.*, 2016; Abed *et al.*, 2014; Abed, 2010).

با توجه به مطالعات انجام‌شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که سیانوباکتری‌های موردمطالعه با تغییر سازوکار تغذیه‌ای خود، زندگی فوتوهتروتروفی را در پیش‌گرفته از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده نموده و فرایند تجزیه زیستی نفت را به‌طور مؤثری انجام داده‌اند. بیشترین و کمترین میزان تجزیه نفت خام به ترتیب در تیمارهای ۰/۱ و ۱/۶ درصد نفت خام (فیشرلا: ۸۸/۲۷ و ۴۴/۷۲ درصد و نوستوک: ۹۱ و ۴۷/۴۶ درصد) مشاهده و با کروماتوگرافی گازی نیز تأیید گردید. لذا بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان سیانوباکتری های موردنظر را جهت حذف زیستی آلاینده‌های نفتی در محیط‌های آلوده استفاده نمود و با توجه به اینکه این ارگانیسم‌ها توانایی زیست در محیط‌های دریایی را دارند، لذا گزینه مناسبی برای استفاده در فرایندهای پاک‌سازی زیستی نفت و آلاینده‌های نفتی می‌باشند و نسبت به دیگر روش‌ها، به دلیل عدم تأثیرات نامطلوب بر محیط و کم‌هزینه بودن برتری دارند.

منابع

Abed, R. M., 2010. Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. International Biodeterioration & Biodegradation, 64(1): 58-64.

Abed, R. M., Al-Kharusi, S., Prigent, S. and Headley, T., 2014. Diversity, distribution and hydrocarbon biodegradation capabilities of microbial communities in oil-contaminated cyanobacterial mats from a constructed wetland. PLoS One, *9*(12): p.e114570.

Akoijam, C., Langpoklakpam, J. S., Chettri, B. and Singh, A. K., 2015. Cyanobacterial diversity in hydrocarbon-polluted sediments and their possible role in bioremediation. International Biodeterioration & Biodegradation, 103, 97-104.

Al Obaidy, A. H. M. J. and Lami, M. H., 2014. The toxic effects of crude oil in some freshwater cyanobacteria. Journal of Environmental Protection, 5(5): 359-367.

Amirlatifi, F., Soltani, N., Saadatmand, S., Shokravi, S. and Dezfulian, M., 2013. Crude oil-induced morphological and physiological responses in cyanobacterium Microchaete tenera ISC13. International Journal of Environmental Research, 7(4): 1007-1014.

Andersen, R.A., 2005. Algal culturing techniques. First edition, Academic Press, 596 pages.

Ban Samary, A. and Al-Mayaly, I., 2018. Biodegradation of Crude Oil by Anabaena variabilis Isolated from Al-Dora Refinery. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS) 13(3), 5.

Chaillan, F., Gugger, M., Saliot, A., Coute, A. and Oudot, J., 2006. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. Chemosphere, 62(10): 1574-1582.

Das, N. and Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnology research international 2011, 1-13.

El-Sheekh, M. and Hamouda, R., 2014. Biodegradation of crude oil by some cyanobacteria under heterotrophic conditions. Desalination and Water Treatment, 52(7-9): 1448-1454.

El-Sheekh, M. M., Hamouda, R. A. amd Nizam, A. A., 2013. Biodegradation of crude oil by Scenedesmus obliquus and Chlorella vulgaris growing under heterotrophic conditions. International Biodeterioration & Biodegradation, 82: 67-72.

Elsagh, A. and Barmaki, M., 2014. Determination of Pollution Caused by Heavy Metals Cu, Zn, Ni and Pb in the Persian Gulf Coastal Sediments. Journal of Environmental Science and Technology, 15(2): 1-11.

Erdogan, E.E. and Karaca, A., 2011. Bioremediation of crude oil polluted soils. Asian Journal of Biotechnology, 3(3): 206-213.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

Foroogh Nia, F., Desfolian, M., Shokravi, Sh., Harzandi, N., Soltani, N., 2013. Biodegradation effects of five species of isolated Cyanobacteria from oil contaminated areas of the southern part of Iran. Journal of aquatic Ecology, 3(1): 20-28.

Guerra, A. B., Oliveira, J. S., Silva-Portela, R. C., Araujo, W., Carlos, A. C., Vasconcelos, A. T. R., et al., 2018. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. Environmental Pollution, 235: 869–880.

Hamouda, R. A. E. F., Sorour, N. M. and Yeheia, D. S., 2016. Biodegradation of crude oil by Anabaena oryzae, Chlorella kessleri and its consortium under mixotrophic conditions. International Biodeterioration & Biodegradation, 112: 128-134.

Ichor, T., Okerentugba, P. and Okpokwasili, G., 2016. Biodegradation of total petroleum hydrocarbon by a consortium of Cyanobacteria isolated from crude oil polluted brackish waters of bodo creeks in Ogoniland, Rivers State. Research Journal of Environmental Toxicology, 10(1): 16-27.

Jain, P., Gupta, V., Gaur, R., Lowry, M., Jaroli, D. and Chauhan, U., 2011. Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. Research journal of environmental toxicology, 5(1): 1-26.

Kapellos, G., 2017. Microbial strategies for oil biodegradation, Modeling of Microscale Transport in Biological Processes. Elsevier, pp. 19-39.

Kästner, M., 2000. Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. Journal of Biotechnology: Environmental Processes II 11, 211-239.

Koshlaf, E. and Ball, A. S., 2017. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. AIMS microbiology 3(1), 25-49.

Lau, N.-S., Matsui, M. and Abdullah, A. A. A., 2015. Cyanobacteria: photoautotrophic microbial factories for the sustainable synthesis of industrial products. BioMed research international 2015 (Article ID 754934,): 9 pages. doi: 10.1155/2015/754934.

Llirós, M., Gaju, N., de Oteyza, T.G., Grimalt, J.O., Esteve, I., Martínez-Alonso, M., 2008. Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. II. The changes in microbial species. Science of the total environment, 393(1): 39-49.

Miettinen, H., Bomberg, M., Nyyssönen, M., Reunamo, A., Jørgensen, K. S. and Vikman, M., 2019. Oil degradation potential of microbial communities in water and sediment of Baltic Sea coastal area. PloS one, 14(7): 1-31.

Miller, J. I., Techtmann, S. M., Fortney, J. L., Mahmoudi, N., Joyner, D. C., Liu, J., Olesen, S., Alm, E. J., Fernandez, A. and Gardinali, P., 2019. Oil hydrocarbon degradation by Caspian Sea microbial communities. Frontiers in microbiology, 10: 995, 1-15.

Pimda, W. and Bunnag, S., 2015. Biodegradation of waste motor oil by Nostoc hatei strain TISTR 8405 in water containing heavy metals and nutrients as co-contaminants. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 28: 117-123.

Pinto, F. A. L., 2003. Method implementation and technique development for studies with cyanobacteria. Doctoral dissertation, 1-51.

Purnomo, A. S., Rizqi, H. D., Harmelia, L., Anggraeni, S. D., Melati, R. E., Damayanti, Z. H., Shafwah, O. M. A. and Kusuma, F. C., 2019. Biodegradation of crude oil by Ralstonia pickettii under high salinity medium. Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences, 15(3): 377-380.

Safari, M., Ahmadi Asbchin, S., Soltani, N., 2016. The Potential of Cyanobacterium Fischerella Ambigua ISC67 in Biodegradation of Crude Oil. Petroleum Research, 26(86): 108-119.

Shishir, T. and Mahbub, N., 2019. Review on Bioremediation: A Tool to Resurrect the Polluted Rivers. Pollution 5(3): 555-568.

Sundaram, S. and Soumya, K., 2011. Study of physiological and biochemical alterations in cyanobacterium under organic stress. American Journal of Plant Physiology, 6(1): 1-16.

www.SID.ir

Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H. and Yu, H., 2018. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. Frontiers in microbiology 9, 2885, 1-11.

Zandi, f., Hossini, R., Soltani, N., 2012. Comparative Physiological characterization of cyanobacterial micro flora in oil polluted and non-polluted areas. Journal of Science (KHARAZMI UNIVERSITY), 12 (3), 12.

Zinicovscaia, I. and Cepoi, L., 2016. Cyanobacteria for bioremediation of wastewaters. Springer International Publishing, 60 p.

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:40 +0330 on Tuesday February 2nd 2021

www.SID.ir