Archive of SID

مجله دنیای میکروب ها
سال اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۷
صفحات ۱۴_۵

تجزیه و سولفورزدایی زیستی نفت خام توسط باسیلوس ها

دکتر عباس اخوان سپهی*[۱] ، ایثار دژبان گلپاشا[۱]، دکتر مسعود امامی[۱] ، ارژنگ محمد ناخدا[۱]

[۱] دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: امروزه استفاده از میکروارگانیسم ها برای حذف آلاینده های نفتی از محیط زیست بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. زیرا روش های یا از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشند یا باعث به وجود آمدن ترکیبات سمی دیگری در محیط می شوند. هدف از این پژوهش، ارزیابی و تأیید حذف زیستی نفت‌خام به وسیله‌ی باسیلوس‌ها می‌باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش پانزده گونه باسیلوس تجزیه کننده نفت خام از مناطق آلوده به نفت جدا شد و شرایط بهینه رشدشان در محیط پایه نمکی واجد۱ تا ۳٪ نفت خام مورد ارزیابی گردید. سپس با ارزیابی کشش سطحی و میزان کربن کل، نیتروژن و هیدروژن موجود در نفت خام در قبل و پس از تیمار با باکتری با روش ASTM D5291 اندازه گیری شد. همچنین سولفور زدایی زیستی با روش *IP 242* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: از گونه های مورد بررسی دو گونه که بهترین رشد در محیط پایه نمکی واجد نفت داشتند، انتخاب گردیدند. اما بیشترین افزایش در چگالی نوری و شمارش سلول های زنده و کاهش pH محیط کشت در روز پنجم از دوره آزمایش برای باسیلوس های *S6* بدست آمد. زمان تجدید نسل بر روی محیط نمکی حاوی (۱٪) نفت خام برای باسیلوس *S6* و *S35* به ترتیب ۱۸ و ۲۵ ساعت محاسبه شد. باسیلوس ها قادر به‌کاهش کشش سطحی محیط به ترتیب از ۶۲ (*mN*/ m) به ۳۱ و ۳۸بودند که بیانگر آن است که این گونه ها قادر به تولید میزان قابل توجهی بیوسورفکتانت هستند. نتایج نشان داد که میزان کلی کربن از ۸۵ (در صد جرمی) به ۴۱ و ۴۸ (در صد جرمی) به ترتیب برای باسیلوس *S6* و *S35* کاهش یافته است. همچنین مشخص شد که پس از گذشت یک ماه ۴۲ درصد و ۸۰ درصد از میزان کلی سولفور موجود در نفت به ترتیب توسط باسیلوس *S6* و *S35* حذف شده و مورد استفاده قرار گرفته است.

نتیجه گیری: آنالیزهای آماری بر روی هیدروکربن های موجود در نفت خام با استفاده از گاز کروماتوگرافی (C13 - C30) نشان دهنده اثر تخریب زیستی باسیلوس ها بر روی هیدروکربن های نفتی و توانایی آنها در استفاده از نفت به عنوان تنها منبع کربن و انرژی می باشد.

واژگان کلیدی: نفت خام، باسیلوس، تخریب زیستی، بیوسورفکتانت

دریافت مقاله: فروردین ۸۷ پذیرش برای چاپ: تیر ۸۷

مقدمه

امروزه نفت خام به عنوان یکی از منابع اصلی انرژی است و از آنجایی که جایگزین مناسبی برای آن یافت نشده، طی چند دهه آینده نیز به عنوان یکی از اصلی ترین منابع انرژی مطرح خواهد بود. با توجه به استفاده های روز افزون از نفت و فرآورده های نفتی، آلودگی های ناشی از آن رو به فزونی گذارده و تبدیل به امری نگران کننده شده است. روش های مختلفی برای حذف این آلودگی ها از محیط زیست مانند سوزاندن، خاکستر کردن، شستشو با سورفکتانت‌ها و استفاده از مواد شیمیایی وجود دارد. اما این روش‌ها یا از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشند یا باعث به وجود آمدن ترکیبات سمی دیگری در محیط می شوند(۳۵،۳۲). از این رو پاکسازی زیستی به عنوان یک روش مقرون به صرفه و بی خطر برای محیط زیست مورد توجه قرار گرفت (۳۱،۲۴،۲۱). امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها یا فراورده های آنها در پاکسازی این آلاینده ها بسیار مورد توجه قرار گرفته و مطالعات زیادی در این زمینه در داخل و خارج کشور انجام شده است که از بین آنها می‌توان

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال Bioabbas@tco.ir

www.SID.ir

Archive of SID

به مطالعات Prince و همکارانش اشاره کرد. تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها دارای توانایی تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی) هستند (۳۱،۱۷،۱۶). این ارگانیسم‌ها به طور گسترده ای در اکوسیستم های آبی و خاکی پراکنده می‌باشند (۱۱،۱۴،۲۴) . ولی با این وجود، دانشمندان گزارش کرده اند که ارگانیسم های سازگار و بومی مناطق آلوده به ترکیبات نفتی در تجزیه زیستی آلاینده های نفتی محیط زیست بسیار موثرتر از سایر ارگانیسم ها می‌باشند. سرعت تجزیه زیستی در مناطق آلوده به عواملی مانند جمعیت میکروبی موجود در منطقه آلوده، میزان و نوع آلودگی، شرایط شیمیایی و زمین شناسی منطقه آلوده بستگی دارد (۳۰،۲۳و۳۲). همچنین روش‌های زیادی برای افزایش میزان تجزیه زیستی در خاک ها و مناطق آلوده به نفت و ترکیبات نفتی وجود دارد که مهمترین آنها عبارتند از:

۱ـ تحریک میکروارگانیسم های موجود در محیط با اضافه کردن اکسیژن و مواد غذایی به خاک و منطقه آلوده (Biostimulation) (۲،۲۰).

۲ـ تلقیح خاک و منطقه آلوده با میکروارگانیسم هایی که توانایی تجزیه زیستی را دارا می باشند (Bioaugmentation)، در نتیجه بهبود بخشیدن جمعیت میکروبی خاک آلوده به نفت و افزایش میزان تخریب زیستی در منطقه آلوده می گردد(۳،۱۷،۲۲).

با توجه به مطالب یاد شده، ضرورت جداسازی و غربالگری میکروب هایی که توانایی تجزیه زیستی را دارا می باشند و اضافه کردن آنها به مناطق آلوده می تواند در حذف این آلاینده ها از محیط زیست وجود دارد. هدف از این پژوهش جداسازی این گروه از میکروارگانیسم ها و تایید توانایی آنها در حذف این آلاینده ها از محیط زیست می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه خاک: نمونه های خاک از مناطق آلوده به نفت و ترکیبات نفتی در نزدیک مراکز توزیع نفت و مخازن نفتی در پالایشگاه تهران و جزیره سیری جمع آوری شد. تمام نمونه‌های جمع آوری شده به صورت دوتایی بوده و به سرعت به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جداسازی باسیلوس های تجزیه کننده نفت خام: ۱ گرم از خاک الک شده در ۹ میلی لیتر آب مقطر ریخته شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد در داخل بن ماری قرار داده شد تا شوک حرارتی حاصل موجب از بین رفتن شکل رویشی میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه خاک و باقی ماندن اسپور باسیلوس‌ها در محیط گردد. باسیلوس‌های موجود به روش پورپلیت بر روی محیط پلیت کانت آگار جدا شدند و به طور مقدماتی ویژگی هایی مانند خصوصیات ریخت شناسی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. سپس سویه های باسیلوس به دست آمده که دارای فعالیت همولیتیک بودند، از نظر توانایی استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن بررسی شدند.

توانایی رشد باسیلوس‌های جدا شده بر روی نفت خام: در این آزمایش توانایی رشد باسیلوس‌ها درغلظت ۱-۳٪(v/v) از نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی در محیط نمک های معدنی مورد بررسی قرار گرفت . ترکیب محیط پایه نمکی مورد استفاده در این تحقیق به صورت زیر بود (g/l) :

$NaNO_3(2.0gl^{-1})$, $NaCl(0.8gl^{-1})$, KCl $(0.8gl^{-1})$, $CaCl_2.2H_2O$ $(0.1gl^{-1})$, KH_2PO_4 $(2.0gl^{-1})$, $Na_2HPO_4.12H_2O$ $(2.0gl^{-1})$, $MgSO_4$ $(2.0gl^{-1})$, $FeSO_4.7H_2O(0.001gl^{-1})$;

سپس میزان ۲ میلی لیتر از عناصر کمیاب به ترکیب یاد شده به شرح زیر اضافه گردید (g/l):

$FeCl_3.6H_2O$ $(0.08gl^{-1})$, $ZnSO_4.H_2O$ $(0.75gl^{-1})$ $COCl_2.6H_2O(0.08gl^{-1})$, $CuSO_4.5H_2O(0.075gl^{-1})$ $MnSO_4.H_2O$ $(0.75gl^{-1})$, H_3BO_3 $(0.15gl^{-1})$ $Na_2MoO_4.2H_2O(0.05gl^{-1})$

pH ابتدایی محیط نمکی پایه به ۶/۸ رسانده شد. سپس محیط نمکی به میزان ۵۰ میلی لیتر در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری پخش شد و ارلن ها در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ درجه و دور ۲۰۰ rpm قرار داده شدند . پس از کشت باکتری در زمان های معین در طی دوره آزمایش، چگالی نوری (OD=۶۰۰ nm)، شمارش سلول های زنده باکتریایی، غلظت کلی پروتئین موجود در محیط کشت و pH مایع درون ارلن مایر اندازه گیری گردید.

تجزیه نفت خام توسط باسیلوس ها: تایید توانایی تجزیه نفت خام توسط باسیلوس های جدا شده با کشت این سویه ها بر روی محیط آگار دار نمک های پایه معدنی به همراه ۱٪ از نفت خام در دمای ۳۰ درجه انجام گرفت. ظاهر شدن کلنی این باسیلوس ها در طی دوره انکوباسیون (۱۴ روز) نشان دهنده توانایی آن ها در استفاده از نفت خام بود(۱۴).

شمارش سلول‌های زنده باکتریایی: این روش یک روش مستقیم برای شمارش تعداد باسیلوس های زنده و فعال در محیط

www.SID.ir

Archive of SID

کشت است. نمونه ها با پی‌پت در داخل ظروف استریل ریخته و سپس محیط کشت پلیت کانت آگار دار اضافه شد. پس از گرمخانه گذاری هر کلنی بیانگر یک باکتری می باشد. علاوه بر آن چگالی نوری محیط کشت مایع نیز برای تایید رشد اندازه‌گیری و سپس منحنی رشد باسیلوس‌ها در محیط نمکی‌حاوی نفت خام ترسیم گردید (۱۴،۱۶،۲۹).

تخمین غلظت کلی پروتئین محیط کشت: برای مشخص کردن غلظت پروتئین ۱ میلی لیتر از محیط کشت برداشته شد و پس از اضافه کردن لیزوزیم به آن، به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرما گذاری گردید. سپس ۹ میلی لیتر آب به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از این مرحله به پلاک های جمع شده، ۱ میلی لیتر NaOH (۳ نرمال) اضافه و به مدت ۳ دقیقه جوشانده شد تا میزان حلالیت پروتئین ها افزایش یابد. بعد از سرد شدن در دمای اتاق ۱ میلی لیتر از H_3PO_4 (۱ مولار) اضافه شد.سپس ۵۰ میکرو لیتر از آن برداشته و به آن ۹۵۰ میکرولیتر معرف coomassie protein assay اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده و سپس چگالی نوری آن در ۵۹۵ nm اندازه گیری و غلظت کلی پروتئین با توجه به منحنی استاندارد آلبومین (Bradford 1976)، محاسبه گردید(۹).

تعیین فعالیت امولسیفیه کنندگی: برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی از روش پیشنهادی Cooper و Goldenberg استفاده شد(۱۰). ۴ میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط نمک های پایه به همراه ۶ میلی‌لیتر از هیدروکربن‌مورد بررسی (نفت خام) دریک لوله آزمایش درپیچ‌دار مدرج ریخته شد. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ دقیقه در دور بالا با شیکر لوله به هم زده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط سکون قرار گرفته شد. پس از این مدت، طول کل ستون مایع و طول لایه امولسیفای شده اندازه‌گیری شد و با استفاده از فرمول زیر EC محاسبه گردید:

$$EC = \frac{\text{طول لایه امولسیفیه شده}}{\text{طول کل ستون مایع}} \times ۱۰۰$$

بررسی تغییرات pH در محیط آزمایشگاهی: در طی دوره آزمایش هر دو روز یک بار تغییرات pH محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. برای این اندازه گیری برای هر سویه ۵ ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری برداشته شد. سپس ۵۰ میلی لیتر محیط نمکی پایه به همراه ۱٪ (v/v) نفت خام به هر نمونه اضافه گردید، پس از تلقیح باکتری، نمونه ها در داخل انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با دور ۲۰۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از گذشت هر دو روز از دوره آزمایش یک ارلن برداشته شد و میزان pH محیط درون آن توسط دستگاه pH متر اندازه گیری گردید و منحنی تغییرات pH محیط در طی دوره آزمایش(۱۰ روز) ارزیابی گردید.

اندازه گیری کشش سطحی: برای اندازه گیری کشش سطحی، ۲/۵ میلی لیتر باکتری از محیط نوترینت براث به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت نمکی پایه حاوی ۱٪ نفت تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباسیون شیکر دار با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۲ روز قرار داده شد. سپس کشش سطحی با استفاده از روش Ring Method و Du Nouy و با استفاده از دستگاه تنسیومتر اندازه گیری شد (۴).

فعالیت آنزیماتیک باسیلوس‌های جداشده: از کشت ۲۴ ساعته باسیلوس‌ها بر روی محیط نمک های پایه آگار دار و ۱٪ نفت خام برداشته و سویه های جدا شده از نظر وجود آنزیم های لیپاز، پروتئاز، اوره آز و نیتروژناز بررسی شدند.

اندازه گیری میزان کلی کربن، نیتروژن و هیدروژن: بدین منظور ارلن مایر هایی با حجم یک لیتر برداشته و به هرکدام ۲۵۰ میلی لیتر محیط نمک های پایه اضافه گردید. سپس به هر یک میزان ۱٪ نفت خام استریل شده اضافه شد. پس از تلقیح باکتری (۱۲/۵ میلی لیتر) به محیط های کشت، محیط ها به مدت یک ماه در داخل انکوباتور گرما گذاری شدند. سپس محتویات موجود در ارلن مایر در داخل دکانتور برای جدا سازی اولیه ریخته شد. پس از جدا کردن مقدماتی فاز آلی (نفت) از فاز آبی، نفت جدا شده با سانتریفیوژ های دور بالا به طور کامل از آب جدا شد تا نمونه برای آزمایش‌های بعدی آماده گردد. پس از آن، نفت به دست آمده به سه بخش تقسیم و هر بخش به ترتیب برای اندازه گیری کربن کل، نیتروژن کل، و هیدروژن کل استفاده گردید. برای اندازه گیری N، H وC نفت از روش ASTMD-5291 استفاده شد و نتایج به دست آمده به صورت درصد جرمی(% MASS) محاسبه گردید.

فعالیت سولفور زدایی: پس از فرایندهای آماده سازی (مطابق آنچه در آماده سازی مربوط به میزان کلی کربن، نیتروژن و هیدروژن بیان شد)، میزان گوگرد کل موجود در نفت با روش IP-242 توسط دستگاه های مربوطه اندازه گیری شد و نتایج به صورت درصد جرمی (% MASS) به دست آمد. این آزمایش

www.SID.ir

Archive of SID

برای نمونه شاهد (فاقد باکتری) نیز انجام شد تا میزان تغیرات گوگرد قبل و بعد از دوره آزمایش به دست آید.

تاثیر بر روی هیدرو کربن های نفت خام: با استفاده از گاز کروماتوگرافی آلکان‌های بین (C13-C30) که قابل حل در Hexane بودند مورد سنجش قرارگرفتند. از آنجایی که تجهیزات لازم برای گازکروماتوگرافی نفت خام در ایران موجود نمی باشد لذا از نمونه مربوط به آنالیز هیدروکربنی در ابتدا به روش SARA (Satrates- Aromatics- Resines- Asphaltenes) برش تهیه شد و سپس برش‌های مربوطه جداگانه وارد دستگاه گاز کروماتوگرافی (Pepkin - Elmer ـ مدل 7800) گردید و اطلاعات مربوط به برش ها جمع آوری و با نرم افزارهای مربوطه تغییرات کلی مربوط به هیدروکربن ها در نمونه های مجهول به دست آمد.

نتایج

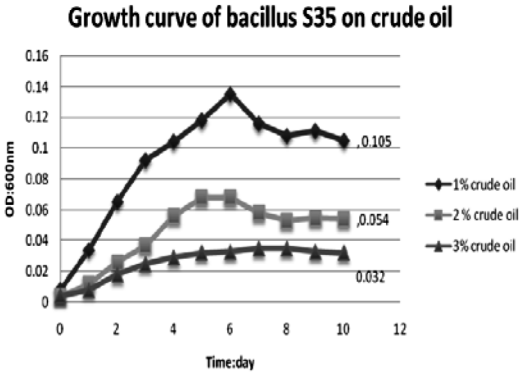
جداسازی باسیلوس های تجزیه کننده نفت خام: پانزده گونه مختلف باسیلوس از نمونه های آلوده به نفت جدا شد که همه آنها رشد خوبی بر روی محیط پایه نمکی آگار دار حاوی ۱٪ نفت خام از خود نشان دادند. ۲ گونه باسیلوس که بهترین رشد را داشتند برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. کلنی این باسیلوس ها تنها در طی ۷۲-۴۸ ساعت بر روی محیط پایه نمکی آگار دار حاوی ۱٪ نفت خام ظاهر گردید که این امر بیانگر توانایی آنها در استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود(نمودار۱ و ۲).

توانایی رشد باسیلوس های جدا شده بر روی نفت خام: افزایش تعداد سلول های باکتری در محیط کشتی که تنها منبع کربن آن نفت خام بود بیانگر توانایی تجزیه نفت خام توسط باسیلوس‌ها می‌باشد. مشاهده نتایج مربوط به کدورت محیط کشت (OD) و شمارش تعداد سلول های زنده نشان دهنده این است که باسیلوس های جدا شده (S35-S6) قادر به استفاده از نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی هستند. در مورد باسیلوس S6 بیشترین میزان سلول شمارش شده ۵/۷ ۱۰ cfu/ml log در روز پنجم از دوره آزمایش بوده در بیشترین میزان سلول شمارش شده مربوط به باسیلوس S35 در روز ششم از دوره آزمایش و برابر با ۴/۸ ۱۰ cfu/ml log بود که این نتایج نشان می‌دهد باسیلوس S6 رشد بهتری نسبت به S35 بر روی نفت خام دارد (نمودار ۳).

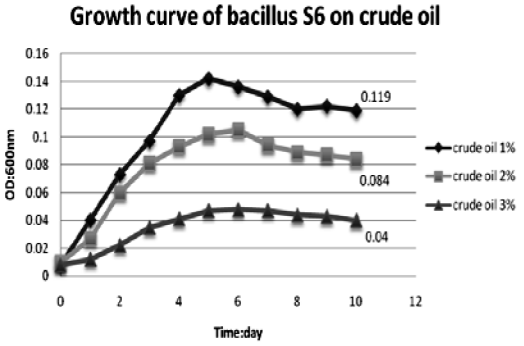
تخمین غلظت کلی پروتئین: تخمین غلظت کلی پروتئین با روش Bradford انجام شد که این روش یک روش دقیق، در بررسی وضعیت جمعیت میکروبی در محیط مورد آزمایش می‌باشد. افزایش غلظت پروتئین در طی دوره آزمایش بیانگر توانایی رشد باسیلوس های مورد آزمایش در محیط کشت حاوی نفت خام بوده و نتایج حاصل از OD و شمارش سلول های زنده را تائید می کند (۹) (نمودار۴).

تعیین فعالیت امولسیفیه کنندگی: فعالیت امولسیفیه کنندگی برای باسیلوس های جدا شده اندازه گیری شد و در طی ۳۲ تا ۴۸ ساعت به بیشترین میزان خود رسید و پس از آن ثابت ماند. این نتایج نشان دهنده آن است که سنتز بیوسورفکتانت در مورد باسیلوس های جدا شده در فاز لگاریتمی صورت می گیرد و همزمان با تولید توده سلولی بیوسورفکتانت هم سنتز می شود. فعالیت امولسیفیه کنندگی بعد از ۲۴ ساعت برای باسیلوس S6 و S35 به ترتیب ۷۱٪ و ۸۵٪محاسبه شد.

اندازه گیری کشش سطحی: باسیلوس های جدا شده قادر به کاهش کشش سطحی بودند و این نشان دهنده آن است که این گونه‌ها قادر به تولید میزان قابل توجهی بیوسورفکتانت هستند. کشش سطحی ابتدایی در محیط کشت شاهد در دمای ۲۳ تا ۲۵



نمودار(۱): منحنی رشد باسیلوس S35 بر روی محیط نمکی به همراه ۱تا۳٪ نفت خام



نمودار(۲): منحنی رشد باسیلوس S6 بر روی محیط نمکی به همراه۱تا۳٪ نفت خام

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: توانایی آنزیمی باسیلوس های جدا شده

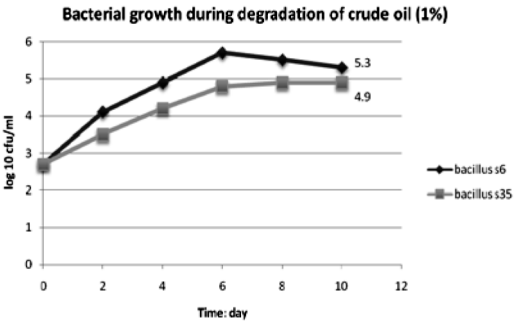
سویه	پروتئاز بر روی Skim milk	آمیلاز	پروتئاز بر روی ژلاتین	اوره آز	لسیتیناز	نیترات ردوکتاز
Bacillus.S6	+++	+++	+	-	-	+++
Bacillus.S35	-	-	+	-	-	+++

(فاقد رشد)، + (دارای رشد)،+++ رشد بسیار زیاد)

درجه سانتی‌گراد برابر با ۶۲ (mN/m) بود که این میزان به ۳۱ و ۳۸ (mN/m) به ترتیب برای S6 و S35 کاهش یافت. نتایج، وجود یک رابطه مثبت میان میزان رشد باکتری و کاهش کشش سطحی را نشان می‌دهد زیرا که بیوسورفکتانت با خواص خود میزان دسترسی زیستی باکتری را به نفت خام افزایش داده و موجبات رشد بیشتر را فراهم می کند.

ارزیابی فعالیت آنزیماتیک: آنزیم‌های خارج سلولی و فعالیت آنها در حذف آلودگی‌ها از محیط زیست نقش مهمی را ایفا می‌کنند. نتایج نشان می‌دهد که باسیلوسS6 نسبت به S35 از سیستم آنزیمی پیچیده تری برخوردار است (جدول۱).

اثر تجزیه زیستی بر روی pH محیط کشت: در این آزمایش pH ابتدایی محیط کشت برابر ۶/۸ بود. اندازه گیری pH در طی دوره انکوباسیون کاهش pH را نشان داد و این امر بیانگر تغییرات شیمیایی بر روی نفت خام می باشد که توسط آنزیم های باکتریایی صورت می پذیرد. تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی توسط باکتری ها موجب تولید محصولات جانبی و یا گاهی اسید های آلی می‌شود که این ترکیبات موجب کاهش pH محیط شده و کاهش pH محیط تائید کننده توانایی رشد و فعالیت باسیلوس‌های جدا شده در محیط کشت حاوی ۱٪ نفت خام می باشد (نمودار۵).



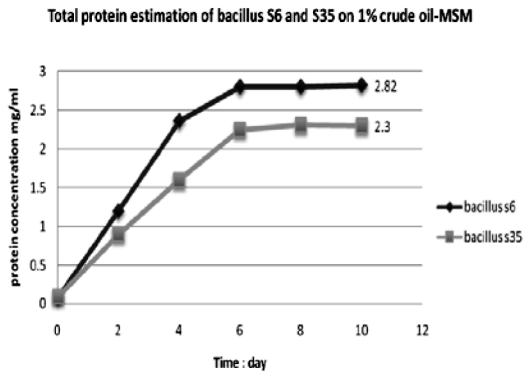
نمودار(۳): مقایسه شمارش سلول های باسیلوس S6 و S35 بر روی محیط نمکی به همراه ۱٪ نفت خام

اندازه گیری میزان کلی کربن، نیتروژن، هیدروژن و گوگرد: این روش برای اثبات و تائید توانایی استفاده باسیلوس ها از نفت انجام شد که در آن میزان کلی کربن، نیتروژن، هیدروژن موجود در نفت خام در نمونه شاهد (فاقد باکتری) و نمونه تیمار شده با باکتری اندازه گیری گردید. در این روش میزان کلی کربن موجود در نفت خام قبل از تیمار با باکتری و بعد از تیمار با باکتری (پس از یک ماه) سنجیده شد. نتایج به دست آمده بیانگر توانایی سویه کشت داده شده در استفاده از نفت خام (تجزیه آن و تبدیل آن به بیوماس سلولی) می‌باشد (جدول۲).

تاثیر بر روی هیدروکربن‌های موجود در نمونه نفت خام: برای تائید توانایی باسیلوس ها در تجزیه و استفاده از نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی از روش گاز کروماتوگرافی استفاده شد. در نمودارهای ۶ تا ۸ به ترتیب کروماتوگرام‌های مربوط به آنالیز هیدروکربن‌های موجود در نمونه شاهد (بدون باکتری)، تیمار شده با S6 و تیمار شده با S35 و نمودارهای ۹ و ۱۰ به ترتیب میزان تجزیه نفت خام توسط سویه‌های S6 و S35 نشان داده شده است.

بحث

تعداد زیادی از باکتری ها و قارچ ها قادر به تجزیه زیستی آلاینده های نفتی هستند(۲۸). این ارگانیسم ها به طور گسترده ای



نمودار(۴): مقایسه غلظت کلی پروتئین باسیلوس S6 و S35 بر روی محیط نمکی به همراه ۱٪ نفت خام

www.SID.ir

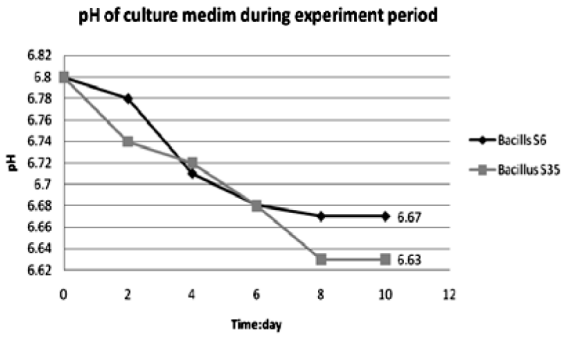
Archive of SID

جدول (۲): نتایج مربوط به سولفورزدایی باسیلوس های جدا شده و نتایج C.H.N

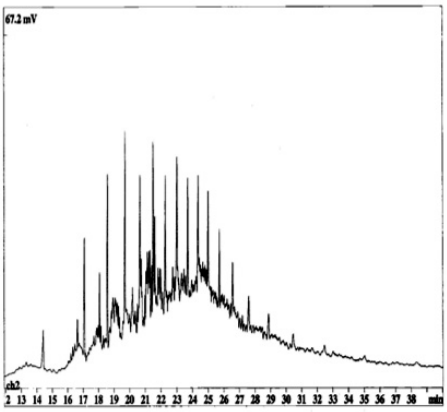
شماره	Test Name		Test Method	S35	S6	شاهد
۱	S Content	mass%	IP 242	۰/۳۸	۱/۱	۱/۸۱
۲	C Content	mass%	ASTM D529	۴۸/۸	۴۱	۵۸/۶
۳	H Content	mass%	ASTM D5291	۱۰/۵	۱۰/۲	۱۲/۴
۴	N Content	mass%	ASTM D5291	<۰/۵	<۰/۵	<۰/۵

در اکوسیستم های آبی و خاکی پراکنده می باشند (۵،۱۲،۱۷). بررسی‌ها نشان داده است اگر چه امکان وجود باکتری با توان تجزیه‌کنندگی بالا در آب ها و خاک های بدون سابقه آلودگی قبلی با ترکیبات نفتی وجود دارد، ولی در اکثر پژوهش‌های مشابه، به خاک ها و مناطق آلوده به نفت توجه می‌شود. چون که امکان یافت میکروارگانیسمی با توان تجزیه‌کنندگی بالا در این مناطق بیشتر از مناطق غیر آلوده به ترکیبات نفتی می باشد. در مطالعه ای که توسط Margesin در سال ۲۰۰۰ به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی انجام شد، تمامی نمونه‌های محیطی استفاده شده از مناطق آلوده شده به نفت جدا گردید. در مطالعه دیگری که در بلغارستان توسط Naturforsch در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت نیز جدا سازی میکروارگانیسم ها از مناطق آلوده (آب های آلوده به پساب های نفتی) گزارش گردیده است (۲۳). در سال ۲۰۰۳ در مطالعه ای که توسط Okerentugba و Ezeronye در نیجریه انجام شد باکتری های تجزیه کننده نفت از آب های آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه ها جدا شد(۲۵).

در تحقیقی دیگر Bola در سال ۲۰۰۶ در نیجریه از ترکیبات ماسه ای همراه با نفت سنگین که به صورت کلوخ در آمده بودند باکتری هایی جداسازی شد که در تجزیه نفت خام بسیار موثر عمل می کردند (۸). این باکتری ها بیشتر از جنس *Pseudomonas* بودند. از آنجایی که باکتری های مولد بیوسورفکتانت در تجزیه نفت موثرتر عمل می کنند، لذا از بین باسیلوس های جدا شده سویه های مولد بیوسورفکتانت جدا شدند. در مطالعاتی که با هدف جداسازی باکتری های مولد بیوسورفاکتانت انجام شده معمولاً از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان معیاری برای جداسازی اولیه سویه های مولد بیوسورفاکتانت استفاده شده است. به طوری که در مطالعاتی مشابه که توسط Banat در سال ۱۹۹۵ برای جدا سازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت انجام شد از فعالیت همولیتیک برای جدا سازی اولیه استفاده کرد (۴). همچنین Ruwaida-Abu نیز در سال ۱۹۹۱ از همین روش استفاده نمود (۱). از آنجایی که کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهم‌ترین و اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفاکتانت محسوب می‌شود به همین دلیل در این تحقیق پس از غربالگری اولیه (با بررسی فعالیت همولیتیک) و کاهش تعداد باسیلوس های انتخاب شده ،از این آزمایش برای بررسی و تائید توان این سویه ها در تولید بیو سورفکتانت استفاده شد. قوی ترین بیوسورفاکتانتی که تا به امروز گزارش شده سورفاکتین است که به وسیله *Bacillus subtilis* تولید می‌شود. این باکتری قادر است کشش سطحی محیط رشد را



نمودار(۵): مقایسه pH محیط نمکی به همراه ۱٪ نفت خام در باسیلوس های S35 و S6 در طول دوره آزمایش



نمودار(۶): کروماتوگرام مربوط به آنالیز هیدروکربن های موجود در نمونه شاهد (بدون تیمار باکتری)

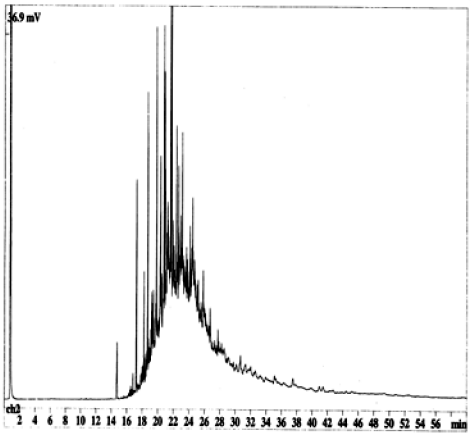
www.SID.ir

Archive of SID

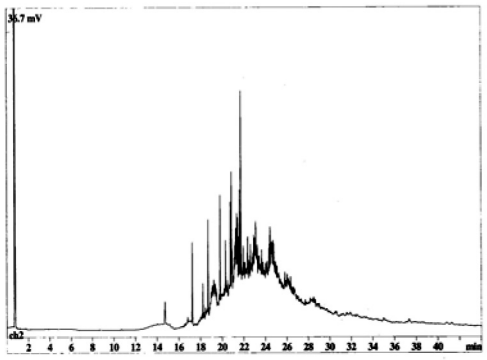
از ۷۰mN/m تا مقادیر کمتر از ۲۶mN/m کاهش دهد(۹).

مطالعات مشابهی در این زمینه توسط Banat در سال ۱۹۹۱ برای جدا سازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت انجام شد (۴). همچنین سویه مولد بیوسورفاکتانت که توسط Abu-Ruwaida و همکاران در سال ۱۹۹۱ در انستیتو مطالعات علمی کویت جداسازی شد توانست کشش سطحی محیط رشد را از ۶۹mN/m تا ۲۷mN/m کاهش دهد. در این تحقیق باسیلوس سویه S6 قادر به کاهش کشش سطحی از ۶۲mN/m به ۳۱ mN/m بود. همچنین باسیلوس سویه S35 نیز قادر به کاهش این میزان تا ۳۸ mN/m بود که نتایج این پژوهش قابل قیاس با مطالعات مشابه می باشد (۱).

با توجه به بررسی‌های انجام شده می‌توان گفت که فعالیت امولسیفیه کنندگی یک امولسیفایر (بیوسورفاکتانت) به تمایل آن نسبت به سوبسترای هیدروکربنی استفاده شده برای اندازه‌گیری EC بستگی دارد. نتایج (E24) به دست آمده برای باسیلوس سویه S6 و S35 به ترتیب ۷۱ و ۸۵ ٪ بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق ،از نتایج گزارش شده در مطالعات مشابه توسط Bodour و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۷)، Francy و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۱۵)و Bicca و همکارانش در سال ۱۹۹۹ (۶)، بهتر و چشمگیر تر می باشد. نتایج مربوط به باسیلوس سویه S6 در کاهش کشش سطحی بسیار بهتر از نتایج به دست آمده از S35 بود اما نتایج به دست آمده از فعالیت امولسیفیه کنندگی حاکی از این بود که S35 تمایل بیشتری به امولسیفیه کنندگی نفت خام نسبت به S6 از خود نشان داده است که علت این امر را می توان اختلاف در نوع بیوسورفکتانت های تولیدی توسط این باکتری‌ها و همچنین اختلاف تمایل آنها برای امولسیفیه کردن این نوع هیدروکربن دانست. برای بررسی توان باسیلوس‌های جدا شده در استفاده از نفت خام شمارش سلول‌های زنده در طی دوره آزمایش انجام شد. در مطالعه ای مشابه در سال ۲۰۰۲ توسط Rahman و Street در انگلیس بر روی تجزیه لجن های نفتی انجام شد (۲۹) و همچنین در تحقیقی مشابه توسط Bola در نیجریه در سال ۲۰۰۶ از روش شمارش سلول های زنده به عنوان معیاری برای تائید توانایی باکتری ها در استفاده و تجزیه نفت خام استفاده شد(۸). در این تحقیق علاوه بر شمارش سلول های زنده، افزایش کدورت محیط کشت در (۶۰۰ nm) مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی های مشابه که توسط Emtiazi و Shakarami در سال ۲۰۰۴ در ایران بر روی تجزیه ترکیبات نفتی صورت گرفت از این روش برای نشان دادن توانایی باکتری‌ها در تجزیه ترکیبات نفتی استفاده شد (۱۳). در مورد باسیلوس S6 بیشترین میزان سلول شمارش شده برابر بود با ۵/۷ log ۱۰ cfu/ml در روز پنجم از دوره آزمایش، در حالی که بیشترین میزان سلول شمارش شده مربوط به باسیلوس S35 در روز ششم از دوره آزمایش شمارش شد و برابر با log ۱۰ cfu/ml ۴/۸ بود، که این نتایج، قابل قیاس با نتایج به دست آمده توسط AL-Saleh و Obuekwe در سال ۲۰۰۵ می باشد(۲). در این آزمایش pH ابتدایی محیط کشت برابر ۶/۸ بود که اندازه گیری pH در طی دوره انکوباسیون کاهش در pH را نشان می داد که این امر بیانگر تغییرات شیمیایی بر روی نفت خام می باشد که توسط آنزیم‌های باکتریایی صورت می‌پذیرد. تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی توسط باکتری ها موجب تولید محصولات جانبی و یا گاهی اسید های آلی می شود که این ترکیبات موجب کاهش pH محیط



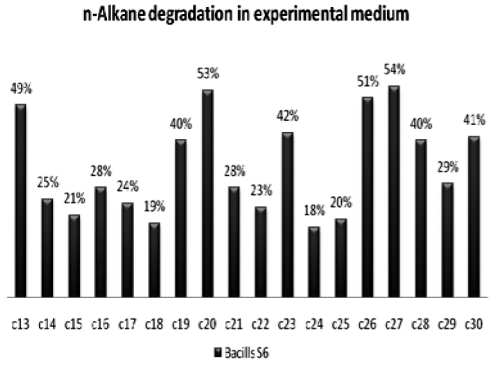
نمودار(۷): کروماتوگرام مربوط به آنالیز هیدروکربن های موجود در نمونه تیمار شده با *Bacillus* S6



نمودار(۸): کروماتوگرام مربوط به آنالیز هیدروکربن های موجود در نمونه تیمار شده با *Bacillus* S35

www.SID.ir

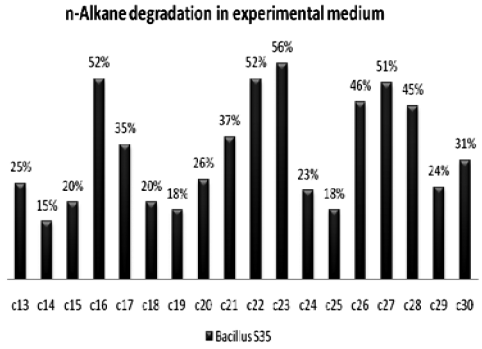
Archive of SID



نمودار (۹): میزان تجزیه نفت خام به وسیله *Bacillus* S6 پس از گذشت یک ماه در محیط حاوی ۱٪ نفت خام

شده و کاهشpH محیط تایید کننده توانایی رشد و فعالیت باسیلوس‌های جدا شده در محیط کشت حاوی ۱٪ نفت خام می‌باشد. در مطالعات مشابه انجام شده توسط Bola، در سال ۲۰۰۶، pH محیط کشت آزمایش اندازه گیری شد و pH محیط کشت کاهش نشان داد که علت این امر را می‌توان به دلیل ترکیبات ناشی از تجزیه نفت خام دانست (۸). در مطالعات مشابه که توسط Rahman و Street در انگلیس انجام شد، نتایج قابل قیاسی در مطالعه انجام شده توسط Prince و Clark در سال ۱۹۹۴ به دست آمد (۲۸). در این آزمایش نیز pH محیط کشت اندازه گیری شد که نتایج حاکی از کاهش pH محیط کشت بود. میزان کلی کربن، نیتروژن، هیدروژن موجود در نفت خام را در محیط کشت مورد آزمایش (نمک های معدنی پایه به همراه ۱٪ نفت خام) که تنها منبع کربن و انرژی قابل استفاده نفت خام می‌باشد اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده حاکی از کاهش در این میزان (میزان کربن Total)بود، که این کاهش بیانگر توانایی سویه کشت داده شده در استفاده از نفت خام (تجزیه آن و تبدیل آن به بیوماس سلولی) می‌باشد. این روش برای تائید توان باکتری ها در استفاده از نفت خام مناسب می باشد.

در مطالعات مشابه ای که در سال ۲۰۰۲ توسط Rahman و Street در انگلیس بر روی تجزیه لجن‌های نفتی انجام شد از روش گاز کروماتوگرافی به عنوان معیاری برای تائید توانایی باکتری‌ها در استفاده و تجزیه نفت خام استفاده شد (۲۹).



نمودار (۱۰): میزان تجزیه نفت خام به وسیله *Bacillus* S35 پس از گذشت یک ماه در محیط حاوی ۱٪ نفت خام

در بررسی دیگری که توسط Naturforsch در سال ۲۰۰۲ در بلغارستان صورت گرفت از تکنیک گاز کروماتوگرافی برای تائید توانایی باکتری ها در استفاده از نفت خام استفاده شد (۲۳). علاوه بر این در تحقیقات انجام شده توسط Wagner و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز از این روش استفاده گردید (۳۴). در تحقیق انجام شده توسط Rahman و Street (۲۹) و Banat (۴) از تکنیک گاز کروماتوگرافی برای آنالیز هیدروکربن های موجود محیط کشت استفاده شد و آلکان های بین (C12-C40) را بررسی کردند. در این پژوهش آلکان‌های (C13-C30) مورد قرار گرفت که نتایج بدست آمده بیانگر توانایی باسیلوس‌های جدا شده در استفاده از نفت خام بود. بررسی‌های انجام شده بیانگر آن است که باسیلوس‌های جدا شده قادر به حذف نفت خام از محیط بوده و از بین رفتن لایه نفتی در محیط های مورد آزمایش تایید کننده این موضوع می باشد. بررسی نوع فعالیت و عوامل موثر و چرخه های متابولیکی این میکروارگانیسم‌ها که قادر به رشد بر روی نفت و هیدروکربن های نفتی می باشند این امکان را فراهم می سازد که روش هایی نوین و باکارایی بیشتر برای حذف آلاینده های نفتی از محیط زیست پدید آید و همچنین از باسیلوس‌های جدا شده در این تحقیق می توان برای بهبود بخشیدن جمعیت میکروبی مناطق آلوده به نفت و ترکیبات نفتی استفاده نمود.

References

1. Abu-Ruwaida A S, Banat I M, Haditirto S, Salem A and Kadri M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and evaluation. Biotechnologica, 1991; 4: 315-24
2. AL-Saleh_ES and Obuekwe C . Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. Intl. Biodeter. Biodegrad, 2005; 56: 1-7
3. Balba, M.T., Al-Shayji, Y., Al-Awadhi, N. and Yateem, A, Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil-contaminated soil. Soil and Sediment Contamination, 2002;11:41-55

www.SID.ir

Archive of SID

4. Banat I M. Biosurfactant production and possible uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: review. Biores Tech, 1995; 51: 1-12.
5. Barathi S and Vasudevan N Utilization of petroleum hydrocarbons by Pseudomonas fluorescens isolated from petroleum contaminated soil. Environ. Intl.2001; 26: 413-416.
6. Bicca F C, Fleck L C, Zachio M A. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcus rubber and Rhodococcus erythropolis. Rev Microbiol,1999; 30:3.
7. Bodour A A, Gerrero-Barajas C and Maier M. Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. App and Env Microbiol, 2004; 10(6): 1114-20.
8. Bola O, (2006). Hydrocarbon Degrading Potentials Of Bacteria Isolated From a Nigerian Bitumen (Transand) Deposit, Nature science 4(3) 51-57.
9. Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72, 248-254.
10. Cooper D. G. and B. Goldenberg. Surface active agents from two Bacillus species. Applied and environmental microbiology, 1999; 189:224-229.
11. Da Cunha CD (1996). Avaliacao da Biodegradac¸ ao de Gasolina em Solo. Tese M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Qumica, Rio de Janeiro, Brazil, 97p.
12. Del Arco JP and De Franca FP. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. Environ. Pollut. 2001;110: 515-519.
13. Emtiazi, G. and Shakarami, H., Utilization of petroleum hydrocarbons by Pseudomonas. sp. and transformed Escherichia coli. African Journal of Biotechnology. 2004; Vol. 4 (2), pp. 172-176.
14. Fiocco, R.J. and Lewis, A. Oil spill dispersants. Pure and Applied Chemistry, 71, 27-42.
15. Francy D S, Thomas J M, Raymond R L and Ward C H (1991). Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. J Industrial Microbiol. 1999; 8: 237-46.
16. Head IM and Swannell RP. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. Curr. Opin. Biotechnol. 1999;10: 234-239.
17. Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K. and Harayama, S . Predominant growth of Alcanivorax strains in oil-contaminated and nutrientsupplemented sea water. Environmental Microbiology. 2002; 4, 141-147.
18. Kim H S, Young B, Lee C H et al (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactants .
19. Korda A, Santas P, Tenente A and Santas R. Petroleum hydrocarbon bioremediation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997;48: 677-689.
20. Lessard, R.R. and DeMarco, G. The significance of oil spill dispersants. Spill Science & Technology Bulletin. 2000; 6:59-68.
21. Margesin R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. Intl. Biodeter. Biodegrad. 2000;46: 3-10.
22. Matthew O. Ilori. Hydrocarbon Degrading Potentials of Bacteria Isolated from a Nigerian Bitumen (Tarsand) Deposit .Nature and Science. 2006;4(3):51-57.
23. Naturforsch Z Hydrolytic Enzymes and Surfactants of Bacterial Isolates from Lubricant-Contaminated Wastewater; Z. Naturforsch. 58c, 87-92 (2003).
24. Ojo OA. Petroleum-hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal Southwest Nigeria African Journal of Biotechnology 2006; Vol. 5 (4), 333-337.
25. Okerentugba PO and Ezeronye OU. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluents in Nigeria. Afr. J. Biotechnol. 2003; 2(9):288-292.
26. Prince, R.C. Petroleum and other hydrocarbons,biodegradation of. In: Encyclopedia of EnvironmentalMicrobiology (G. Bitton, G., ed.) John Wiley, New York, 2002;2402-2416.
27. Prince, R.C. and Bragg, J.R. Shoreline bioremediation following the Exxon Valdez oil spill in Alaska. Bioremediation Journal, 1997; 1, 97-104.
28. Prince, R.C. and Clark, J.R., Bioremediation of the Exxon Valdez oil spill: monitoring safety and efficacy. In Hydrocarbon Remediation (R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoeppel and R.N. Miller, eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1994;107-124.
29. Rahman K and Street G(2002). Bioremediation Sludge Using Bacterial Consortium With Biosurfactant, Clean Environment Management -TS13BA
30. Prince, R.C and Lessard, R. Oil & Gas Science and Technology-Rev. IFP, 2003;Vol. 58, No. 4, pp. 463-468
31. Thomas, R. and Lunel, T. The Braer incident; dispersion in action. In: Proceedings of the Sixteenth Arctic Marine Oilspill Program Technical Seminar, Edmonton, Alberta, 1993;843-859.
32. Trindade PVO, Sobral LG, Rizzo ACL, Leite SGF and Soriano AU.Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soilsfrom Brazil: a comparison study. Chemosphere. 2005;58: 515-522.
33. Urum, K., Pekdemir, T. and Gopur, M., (2003). Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil.
34. Withbiosurfactant solutions. Process Safety and Environm. Protect. Transact. of the Institut. of Chem. Engin., 81:203-209.
35. Wagner-Dobler I., Bennasar A., Vancanneyt M Strompl C., Brummer I. and Eichner C. Microcosm enrichment of biphenyl degrading microbial communities from soils and sediments. Appl. Environ Microbiol. 1998;64, 3014-3022
36. Zhang XX, Cheng SP, Zhu C-J and Sun S-L. Microbial PAH Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. Pedosphere. 2006;16(5): 555-565.

www.SID.ir