Archive of SID

علوم و تکنولوژی محیط زیست، شماره ۲۹، تابستان ۸۵

شناسایی باکتری های مولد بیوسورفاکتانت و کاربرد آنها در حذف آلاینده های نفتی

محمد کارگر
Mkaragarmicro418@ yahoo.com
فرشید کفیل زاده
گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم‌نجمه نوری
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
نورالدین گودرزیان
گروه شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
اشرف السادات نوحی
گروه میکروبیولوژی دانشگاه تهران

چکیده
گروه گسترده ای از میکروارگانیزم ها ترکیبات فعال کننده سطحی به نام بیوسورفاکتانت ترشح می نمایند . ترشح این ترکیبات توسط سلول های میکروبی باعث تسهیل در جذب سوبستراهای غیر قابل حل می شود. ارزشمند ترین جنبه کاربردی بیوسورفاکتانت ها مربوط به صنعت نفت می باشد که جهت بهبود کیفیت ، تسهیل در استخراج ، تقلیل گرانروی ، مهار نشت نفت و پاکسازی لجن نفتی در تانکرها از آنها استفاده می شود . هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های مولد بیوسورفاکتانت و ارزیابی پتانسیل کاربردی آنها در حذف آلاینده های نفتی است. برای این منظور ، از ۸۶ محل مختلف مشتمل بر چاه های نفت و محل های آلوده به ترکیبات نفتی نمونه گیری شد و ۱۵۸ سویه باکتریایی ، ۱۰ سویه آکتینومیست ، ۹ سویه قارچ و ۲ سویه مخمر جداسازی گردید . سپس با انجام تست‌های امول سیفیکاسیون ، خصیصه آمیزندگی سویه های جداشده، بررسی گردید . در مرحله بعد با اندازه گیری کشش سطحی ترشح بیوسورفاکتانت توسط سویه ها، به اثبات رسید. در پایان از بین سویه های جداشده ۹ سویه باکتریایی انتخاب گردید که همگی بالاتر از $dyn/cm^{۲}$ ۲۰کاهش در کشش سطحی ایجاد می نمودند . همچنین اثر القایی ترشح بیوسورفاکتانت در مورد سویه های جداشده ارزیابی گردید. از ویژگی های مهم سویه های جدا شده ، تحمل غلظت بالای نمک و ترشح موفق بیوسورفاکتانت در دامنه گسترده pH می باشد. بدین ترتیب در شرایط آزمایشگاهی ویژگی‌های مناسب سویه ها جهت حذف آلاینده های نفتی و کاربرد در افزایش میکروبی بازیافت نفت(MEOR) نشان داده شد و بررسی های بیشتر در حد صنعتی پیشنهاد می گردد. با توجه به پراکنش بیشتر باسیلوس نسبت به کورینه باکتریوم می توان آن را به عنوان گونه شاخص تجزیه کننده فنانترن در نظر گرفت. تاثیر فاکتورهای مختلف زیستی و غیر زیستی بر روند تجزیه فنانترن و بررسی سیستماتیک رشد این باکتری لازم و ضروری می باشد.

واژه های کلیدی: بیوسورفاکتانت ، آمیزندگی ، زیست – درمانی ، آلودگی های نفتی

مقدمه

بیوسورفاکتانت ها ترکیبات آمفی پاتیک میکروبی هستند که باعث کاهش کشش سطحی و کشش بین دو سطح می‌شوند. غالباً بیوسورفاکتانت ها ترکیبات لیپیدی هستند و ویژگی های آنها به بنیان های قطبی و غیر قطبی موجود در یک مولکول بستگی دارد (**۱** ، **۶** ، **۹** ، **۱۷**) . بیوسورفاکتانت ها از نظر نوع و ویژگی کاربردی،گستردگی بیشتری را نسبت به انواع سنتزی دارند . همچنین از طریق بیولوژیک قابل تجزیه می باشند و بدین صورت با استفاده از آنها دیگر مشکل دیر پا بودن بیوسورفاکتانت های سنتزی و آلودگی های محیطی را نخواهیم داشت . از طرفی می توان با استفاده از منابع ارزان قیمت این ترکیبات را تولید و یا با تغییر در مواد اولیه کارایی و ساختمان بیوسورفاکتانت های حاصله را تغییر داد (**۶** ، **۱۰**، **۱۵**، **۱۶**) .

www.SID.ir

Archive of SID

بیشترین کاربرد و میزان فروش بیوسورفاکتانت ها در صنعت نفت می باشد(**۸**). چون در تولید و فورمولاسیون نفت نقش دارند. از میکروارگانیزم های مولد بیوسورفاکتانت می توان جهت زیست ـ درمانی[۱] و یا اصلاح زیستی[۲] استفاده نمود(**۴**). پاکسازی نشت نفت در محیط های آبی و خاکی با افزودن ارگانیزم های تولید کننده بیوسورفاکتانت سرعت بیشتری پیدا می نمـــایند (**۱۲**) . یکی از جنبه های بسیار جدید و کاربردی بیوسورفاکتانت ها مســاله افزایش بازیافـــت میـــکروبـــی نفـــت[۳] است. در اثر استخراج مکرر نفت به علت کاهش نیروهای موئینگی و اتصال محکم نفت به صخره ها ، حرکت نفت از عمق به سطح کند می شود . در این موارد می توان این میکروارگانیزم ها را به چاه های نفت افزود که بدین وسیله اتصال محکم نفت به صخره ها به دلیل کاهش کشش سطحی سست و باعث افزایش سرعت استخراج نفت می‌گردد. امروزه دامنه گسترده ای از ارگانیزم های مولد بیوسورفاکتانت شناسایی شده اند و لیست این ارگانیزم ها روز به روز در حال افـــزایش است (**۲ ، ۵ ، ۹ ، ۱۴ ، ۲۱**).

با جداسازی سویه های مناسب و بررسی ویژگی های فیزیولوژیکی و متابولیسمی آنها و بهره وری از سوبستراهای خام ارزان قیمت به کمک دانش بیوتکنولوژی می توان به تولید صنعتی بیوسورفاکتانت ها در آینده امیدوار بـــود (**۷ ، ۹ ، ۱۰**). هدف از این پژوهش جداسازی باکتری های مولد بیوسورفاکتانت و ارزیابی پتانسیل کاربردی آنها جهت حذف آلاینده های نفتی است .

مواد و روش ها

نمونه گیری : برای انجام این پژوهش از ۸۶ محل مختلف شامل : خاک ها و آب های آلوده به ترکیبات نفتی ، نفت خام سبک و سنگین ، محل های نشت دائمی خطوط انتقال ترکیبات نفتی و خاک ها و آب های غیرآلوده به ترکیبات نفتی نمونه‌گیری شد .

محیط های کشت : برای جـــداسازی بـــــاکـــتری هـــــا از آب، خـــاک و نفـــت خـــام ازمـــحـــیط کشت SNA [۴]و برای جداسازی قارچ از محیط P.D.A وS.D.A و برای جداسازی اکتینومیست ها از محیط هایStarch Agar و محیط Woodruff استفاده گردید. از محیط کشت M.S.S[۵] جهت تهیه محیط کشت SNA ، انجام تست های امولسیفیکاسیون و اندازه گیری کشش سطحی استفاده شد. برای اندازه گیری کشش سطحی و انجام تست های آمیزندگی ، ۰/۰۳ درصد عصاره مخمر و ۰/۰۳ درصد گلوکز به محیط کشت M.S.S اضافه شد. محیط M.S.S شامل ترکیبات : ، ۲ گرم ؛ ، ۵ گرم ؛ ، ۳ گرم ؛ ، ۰/۱ گرم ؛ ، ۰/۲ گرم ؛ ، ۰/۰۱ گرم ؛ ، ۰/۰۰۲ گرم ، بر حسب گرم در لیتر آب مقطر (pH ۷) بود .

کشت میکروبی: پس از انجام نمونه گیری و ارسال به آزمایشگاه به کمک فسفات بافر سالین (P.B.S) از آنها رقت‌های متوالی تهیه گردید . همچنین برای ایجاد سوسپانسیون مناسب در مورد نمونه های خاک ، از تیمار تتراسدیم پیروفسفات ($Na_4P_2O_7,10H_2O$) استفاده گردید. در تمامی موارد برای جداسازی میکروارگانیزم ها از روش Pour Plate استفاده شد . برای جداسازی باکتری ها از آب ، خاک آلوده و نفت خام از محیط S.N.A و حرارت گرمخانه گذاری ۲۸ درجه به مدت سه روز ، برای جداسازی آکتینومیست ها از محیط Woodruff و حرارت گرمخانه گذاری ۲۸ درجه به مدت ۷ روز و برای جداسازی کپک ها و مخمرها از محیط S.D.A ، P.D.A و حرارت گرمخانه گذاری ۲۲ درجه به مدت هفت روز استفاده و سپس از تمامی کلنی ها کشت خالص تهیه گردید.

تست آمیزندگی (Emulsification): تست های آمیزندگی بر اساس روش پیشنهادی Francy و همکاران در سال ۱۹۹۱ انجام گرفت (**۱۱**) .

۱- Bioremediation
۲- Biorestoration
۳- Mircrobial Enhanced oil Recovery = MEOR
۴- Strengthed Nutrient Agar
۵- Mineral Salt Solution

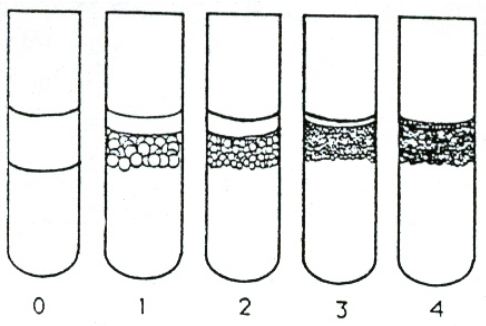
www.SID.ir

Archive of SID

در این مرحله هر کدام از کلنی جداشده در شش محیطM.S.S کشت داده شد پس از تلقیح دو کلنی در هر محیط ، به میزان ۰/۵ میلی لیتر هیدروکربن نفت برای دو لوله اول ، ۰/۵ میلی لیتر بنزین برای دو لوله دوم و ۰/۵ میلی لیتر گازوئیل بـرای دو لوله سوم اضافه و پس از مخلوط کردن با دستگاه Vortex در دمای ۳۰ درجه ۳ روز گرمخانه گذاری گردید . برای تمامی کلنی های جداشده این کار تکرار شد . در هر سری آزمایش برای هر کدام از هیدروکربن ها (بدون تلقیح میکروبی) یک لوله به عنوان کنترل در نظر گرفته شد . پس از گرمخانه گذاری لوله ها را خوب با Vortex مخلوط و دو ساعت دیگر در دمای ۳۰ درجه گرمخانه گذاری و با توجه به شکل شماره ۱ ، میزان آمیزندگی از ۰ تا ۴ گزارش گردید. سپس با بررسی متوسط میانگین آمیزندگی در شش لوله، کلنی های دارای میانگین آمیزندگی بین ۲/۵ تا ۴ برای انجام مرحله بعد انتخاب شد . جداسازی سویه هایی که مایع رویی عاری از سلول آنها توانایی آمیزندگی دارد ، با افزودن القـاکننده(مخلوط هیدروکربن ها) و بدون القا کننده انجام شد . در هر دو مورد ، باکتری های انتخاب شده در مرحله قبل به ۱۰۰ میلی لیتر محیط M.S.S واجد گلوکز و عصاره مخمر تلقیح و سه روز در درون انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm و حرارت ۲۸ درجه گرمخانه گذاری شد . زمان و حرارت گرمخانه گذاری برای قارچها و آکتینومیست ها مانند مرحله قبل در نظر گرفته شد ، اما پس از گرمخانه گذاری تمامی مراحل برای باکتری ها ، قارچ ها و آکتینومیست ها مشابه بود . پس از گرمخانه گذاری در هر دو حالت(دارای القا کننـــده و بدون القا کننده) ، محتویات محـیط کشتM.S.S در دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ و پس از جداسازی مایع رویی درست مانند مرحله اول تست های آمیزندگی انجام شد. در مورد نمونه هایی که در مرحله قبل قدرت آمیزندگی بالایی داشتند ، علاوه بر هیدروکربن های نفت ، بنزین و گازوئیل از بنزین بدون سرب وبنزین هواپیما هم برای بررسی امولسیفیکاسیون استفاده گردید . در این مرحله پس از دو ساعت گرمخانه گذاری در ۳۰ درجه نتایج قرائت می شد . سویه هایی که میانگین آمیزندگی مایع رویی عاری از سلول آنها با افزودن القا کننده بیشتر از۲/۵ بود ، جهت اندازه گیری کشش سطحی انتخاب شدند .

تائیدترشح بیوسورفاکتانت با اندازه‌گیری کشش ســـطحی :

برای اندازه گیری کشش سطحی از دستگاه Tensiometer-Kruess klot استفاده شد. چون کشش سطحی تابع درجه حرارت محیط است. کشش سطحی تمامی نمونه ها در شرایط دمایی یکسانی (۲۲ درجه) اندازه گیری شد. ابتدا کشش سطحی نمونه کنترل (بدون تلقیح میکروبی) و بعد کشش سطحی نمونه های تست اندازه گیری شد. برای هر نمونه باکتری ، چهارده ارلن مختلف واجد محیط کشت M.S.S تهیه شد . شرایط اختصاصی هر کدام از ارلن ها به شرح زیر بود : ارلن اول توسط سویه مورد نظر تلقیح و پس از سه روز گرمخانه گذاری در حرارت ۳۰ درجه کشش سطحی مایع کامل (Whole Broth) اندازه گیری گردید. شرایط ارلن دوم مانند ارلن اول بود با این تفاوت که پس از سه روز کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول اندازه گیری شد. در ارلن‌های سوم ، چهارم و پنجم ، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری به ترتیب القا کننده های نفت ، بنزین و گازوئیل اضافه شد و سپس مخلوطی از ۲۸ هیدروکربن مختلف به عنوان القا کننده اضافه شد .



شکل -۱ : نحوه گزارش میزان آمیزندگی از صفر تا چهار

www.SID.ir

Archive of SID

در ارلن های هفتم تا دهم غلظت‌های (۵ ، ۱۰ ، ۱۵ و ۲۰ درصد) نمک به محیط M.S.S اضافه و پس از ۳ روز گرمخانه گذاری کشش سطحی مایع کامل اندازه گیری گردید . به منظور ارزیابی مناسب ترین pH برای تولید بیوسورفاکتانت در ارلن های یازدهم تا چهاردهم به ترتیب محیط های دارای pH : ۴/۵ ، ۵/۶ ، ۷/۸ و ۸/۶ تهیه و پس از تلقیح میکروبی کشش سطحی مایع کامل آن اندازه گیری گردید .

نتایج

در این پژوهش به طور کلی : ۱۵۸ سویه باکتری ، ۱۰ سویه آکتینومیست ، ۹ سویه کپک و دو سویه مخمر از ۸۶ محل مختلف جداسازی گردید . در بین کلنی های جداشده فقط ۵۷ سویه آمیزندگی بالاتر از صفر داشتند . از این تعداد تنها ۲۶ سویه که میانگین آمیزندگی بالاتر از ۲/۵ داشتند ، برای مرحله بعد انتخاب شدند . هیچ کدام از کپک های جداشده قدرت آمیزندگی بالاتر از ۲/۵ را نداشتند . از بین دو سویه مخمر فقط یکی از آنها (Candida . sp) قدرت آمیزندگی برابر با ۲/۸ داشت . از ۱۰ کلنی آکتینومیست دو کلنی جزء ۲۶ سویه انتخاب شده برای مرحله دوم بود . در این مرحله جمعاً حدود ۱۲۰۰ بار تست آمیزندگی انجام شد . در مرحله دوم تست آمیزندگی با استفاده از ۲۶ سویه باکتریایی و یک سویه مخمر انجام شد . در این مرحله ، گذشته از سه هیدروکربن اولیه ، آمیزندگی با بنزین بدون سرب و بنزین هواپیما نیز انجام شد . اما تقریبا در همه موارد متوسط میزان آمیزندگی ، با نتایج آمیزندگی با هیدروکربن های نفت ، بنزین و گازوئیل برابر بود . هیچ کدام از آکتینومیست ها مجموع آمیزندگی آنها در حضور القا کننده بیشتر از ۱/۸ نبود . متوسط آمیزندگی (Candida.sp) نیز ۲/۳ بود . از بین تمامی میکروارگانیزم های مورد بررسی تنها ۹ سویه باکتری (که مجموع آمیزندگی آنها در حضور القا کننده بیشتر از ۲/۵ بود) برای اندازه گیری کشش سطحی انتخاب شدند . در این مرحله حدود ۲۸۰ بار تست آمیزندگی با پنج هیدروکربن انجام شد .از بین باکتری ها، سویه های : A,E,F,e,l,a,S,G,M جهت اندازه‌گیری کشش سطحی انتخاب شدند . سپس در مورد هر باکتری، کشش سطحی نمونه های کنترل و چهار نمونه تست اندازه گیری شد. جهت دقت بیشتر در هر مورد سه بار کشش سطحی اندازه‌گیری و میانگین آنها در نظر گرفته شد . در شکل های ۲ تا ۴ ، کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول محیط های واجد القا کننده های گوناگون ، محیط های دارای pH و غلظت‌های مختلف نمک باکتری های جداشده با یکدیگر مقایسه شده‌اند. در این مرحله حدود ۵۰۰ بار کشش سطحی نمونه های مختلف اندازه گیری شد. در انتها بر اساس طبقه‌بندی ارائه شده در چاپ هشتم کتاب برگی، سویه های جدا شده تا حد ممکن تعیین هویت شدند. محل جداسازی مشخصات ظاهری و تعیین هویت نهایی سویه ها در جدول شماره -۱ مشخص شده است . با توجه به نتایج و بررسی نمودارها، ویژگی های مناسب سویه‌های جداشده به شرح زیر است :

۱- سویه A (B.subtilis) : اختلاف کاهش کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول تست و کنترل برابر با ۲۴ دین بر سانتی متر مربع بود . این سویه تحمل نمکی خوبی داشت و بهترین pH برای ترشح بیوسورفاکتانت ۷/۸ بود . از این سویه می توان در شرایط فاقد القا کننده استفاده نمود .

۲- سویه E (B.megaterium): اختلاف کاهش کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول تست و کنترل ۲۲ دین بر سانتی متر مربع بود . یکی از ویژگی های مهم این سویه اثر مثبت بنزین روی ترشح بیوسورفاکتانت بود، اما القا کننده های دیگر اثر مثبتی در ترشح بیوسورفاکتانت نداشتند . بنابراین امکان استفاده از این سویه برای حذف آلاینده های بنزین وجود دارد. قدرت تحمل نمکی سویهE در غلظت های ۵ تا ۱۰ ٪ نمکی بسیار خوب بود و بهترین pH برای ترشح بیوسورفاکتانت ۷/۸ اندازه‌گیری شد .

۳- **سوی F (P.aeruginosa)** : اختلاف کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول تست و کنترل ۲۶ دین بر سانتی متر مربع بود و القا کننده های مختلف نیز تاثیر منفی در ترشح بیوسورفاکتانت داشتند . همچنین تحمل نمکی آن بسیار خوب بود و بهترین pH برای ترشح بیوسورفاکتانت ۵/۶ بود.

۴- سویه e (C.xerosis): اختلاف کاهش کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول تست و کنترل ۲۴ دین بر سانتی متر مربع بود . افزودن نفت و بنزین در ترشح بیوسورفاکتانت تاثیر منفی داشت . اما مخلوط هیدروکربن ها اثر مثبتی در ترشح بیوسورفاکتانت داشت . تحمل نمکی و pH های اسید و قلیایی این سویه نیز بسیار خوب بود .

۵- سویه I (corynebacterium.sp): اختلاف کاهش کشش سطحی مایع روی عاری از سلول تست و کنترل ۲۱/۵ دین بر سانتی متر مربع بود . افزودن القا کننده های مختلف در کاهش کشش سطحی اثر منفی داشت . همچنین تحمل نمکی بسیار خوبی داشت و بهترین pH برای ترشح بیوسورفاکتانت ۷/۸ بود .

۶- سویه a (Pseudomonas.sp): اختلاف کاهش کشش سطحی مایع روی عاری از سلول تست و کنترل ۲۳ دین بر سانتی متر مربع بود . افزودن تمامی القا کننده ها در ترشح بیوسورفاکتانت اثر منفی داشت.

جدول ۱- محل های جداسازی و تعیین هویت نهایی سویه های باکتری های جداشده

نام سویه	محل جداسازی	مشخصات ظاهری کلنی	تعیین هویت نهایی
A	خاک آلوده به نفت	باسیلوس گرم مثبت ، واجد اسپور ، کلنی های صاف و شفاف ،واجد همولیز	Bacillus subtilis
E	نفت خام سنگین	باسیلوس گرم مثبت ، اسپوردار ، کلنی خاکستری ، حاشیه صاف ، همولیز بتا	Bacillus megaterium
F	نفت خام سبک	کوکوباسیل گرم منفی ، کلنی های محدب و گر	Pseudomonas aeruginosa
e	خاک آلوده به نفت	باسیلوس نامنظم ، گرم مثبت ، فاقد اسپور ، کلنی ریز و به هم چسبیده	Corynebacterium xerosis
I	آب نفت (پالایشگاه)	باسیلوس نامنظم ، گرم مثبت ، فاقد اسپور ، کلنی های ریز و به هم چسبیده صاف ، همولیز آلفا	Corynebacterium .sp
a	خاک آلوده به گازوئیل	کوکوباسیل های گرم منفی ، کلنی های شفاف و محدب ، فاقد همولیز	Pseudomonas .sp
S	خاک آلوده به نفت	کوکسی گرم مثبت ، پیگمان زرد بدون همولیز ،کلنی ها گرد و کوچک	Micrococus varians
G	خاک آلوده به گازوئیل	کوکسی های گرم مثبت ، شکل نامنظم و Pleomorph ، کلنی های ریز و صاف	Arthrobacter.sp
M	خاک آلوده به گازوئیل	باسیل های نامنظم ، گرم مثبت ، کلنی ها محدب ریز با حاشیه صاف ، همولیز بتا	Corynebacterium.sp

www.SID.ir

Archive of SID

تحمل نمکی این سویه نیز بسیار خوب بود و ویژگی جالب توجه آن ترشح موفق بیوسورفاکتانت در pH ، ۵/۶ بود .

۷- **سویه S (M.varians)** : اختلاف کاهش کشش سطحی تست و کنترل ۱۱ دین بر سانتی متر مربع بود . افزودن القا کننده های مختلف تاثیر مثبتی در کاهش کشش سطحی نداشت . اما با کاربرد مخلوط هیدروکربن ها کاهش در کشش سطحی قابل توجه بود . یکی از ویژگی های منحصر به فرد این سویه کاهش موفق کشش سطحی در شرایط هالوفیلیک بود . بهترین pH برای ترشح بیوسورفاکتانت ۷/۸ بود .

۸- سویه **G (Arthrobacter.sp)** : اختلاف کاهش کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول تست و کنترل ۱۹ دین بر سانتی متر مربع بود . یکی از ویژگی های قابل توجه سویه G تاثیر دیواره سلولی به میزان ۱۸ دین بر سانتی متر مربع در کاهش کشش سطحی بود . این چنین تاثیری در هیچ کدام از باکتری های مورد بررسی به این شدت نبود . تحمل نمکی این سویه بسیار خوب و بهترین pH برای ترشح بیوسورفاکتانت ۸/۶ بود .

۹- **سویه M (Corynebacterium.sp)** : اختلاف کاهش کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول تست و کنترل ۲۱ دین بر سانتی متر مربع بود . افزودن القا کننده های مختلف در کاهش کشش سطحی اثر منفی داشت . در غلظت ۵٪ نمک بهترین کاهش در کشش سطحی مشاهده شد . ویژگی جالب توجه این باکتری کاهش موفق کشش سطحی در گستره pH بین ۴/۵ تا ۴/۶ بود.

بحث و نتیجه گیری

در یک دیدگاه کلی نتایج بدست آمده حاکی از این است که برای افزایش کیفیت اصلاح زیستی (Biorestoration) میکروارگانیزم های تولید کننده بیوسورفاکتانت ، تشابه ارگانیزم های تجزیه کننده آلاینده ها ضرورتی ندارد . آلاینده ها در مناطق آلوده به ترکیبات نفتی ، باعث انتخاب یک گونه خاص و در نتیجه کاهش تنوع توده های میکروبی می شوند (**۱۹ ، ۲۰**) . یکی از دلایل تحمل ارگانیزم های یاد شده به دلیل توانایی در پخش کردن(Disperse) آلاینده‌ها و در نتیجه کاهش سمیت ناشی از آنها است (**۲۱**) . با توجه به نمونه گیری از هر دو مناطق آلوده و غیر آلوده به ترکیبات نفتی ، نتایج نشان می دهد که ، میکروارگانیزم های مناطق آلوده به ترکیبات نفتی امولسیفایرهای بهتری نسبت به میکروارگانیزم های غیرآلوده می باشند. آنچه مسلم است تعداد ارگانیزم های تجزیه کننده هیدروکربن در مناطق آلوده ارتباط زیادی با درجه آلودگی نفتی دارد . این چنین نتیجه ای توسط Fiorenza و همکارانش در سال ۱۹۹۰ نیز تایید شده است (**۱۱**) . محققین نامبرده با مطالعه نشت سوخت هواپیما در شهر تراورس[1] در ایالت میشیگان آمریکا ثابت نمودند که ، تعداد باکتری های هتروتروف ها و ارگانیزم های تجزیه کننده آلاینده ها در مناطق آلوده یک تا دو برابر بیشتر ازسایر مناطق است . همچنین Thomas و Francy (**۱۱**) در سال ۱۹۹۱ و Okerentugba و Eneronye (**۷**) در سال ۲۰۰۳ ، ثابت نمودند که توانایی آمیزندگی توده های میکروبی مناطق آلوده ، در مقایسه با مناطق غیرآلوده بیشتر است. نتایج پژوهش ها نشان می دهد که هیدروکربن های با زنجیره های طویل‌تر نسبت به هیدروکربن های سبک تر توانایی آمیزندگی بهتری دارند، زیرا، که با کاهش تعداد کربن، سمیت هیدروکربن ها افزایش می یابد . به همین دلیل اغلب سویه ها کمتر قادر به آمیزندگی بنزین معمولی و بنزین بدون سرب بودند، در حالی که اغلب باکتری‌های مورد بررسی توانایی آمیزندگی هیدروکربن‌های طویل‌تر مانند : نفت و گازوئیل را بیشتر داشتند . همچنین Roy و همکارانش در سال ۱۹۷۹ با کشت مخمر Endomycopsis lipoytica بر روی هیدروکربن های مختلف مشاهده نمودند که با وجود آمیزندگی انواع هیدروکربن، اما توانایی امولسیفیکاسیون در هیدروکربن‌های با زنجیره های کوتاه تر کمتر وجود داشت (**۱۱ ، ۱۸**) . در مرحله اول این پژوهش

۱- Traverse

www.SID.ir

Archive of SID

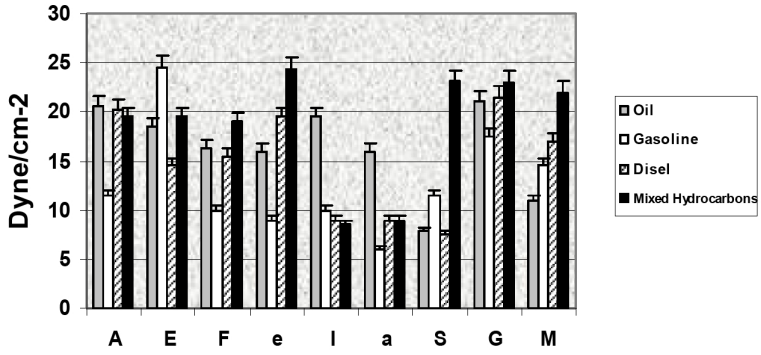
هدف جداسازی میکروارگانیزم های دارای توانایی آمیزندگی هیدروکربن های گازوئیل ، نفت و بنزین بود. اما آمیزندگی هیدروکربن ها در این روش می توانست متاثر از مکانیسم های دیگری علاوه بر ترشح بیوسورفاکتانت خارج سلولی باشد. یکی از مکانیسم های شناخته شده ساختمان دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی خود باکتری است. بنابراین ما در مرحله اول توانایی آمیزندگی سویه‌ها را در حضور سلول میکروارگانیزم و در مرحله دوم آمیزندگی مایع رویی عاری از سلول را بررسی نمودیم. در مرحله آخر نیز با اندازه گیری کشش سطحی ترشح بیوسورفاکتانت سویه ها تایید گردید. Barathi و Vasudevan در سال ۲۰۰۱ و Emtiazi و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که اندازه گیری کشش سطحی می تواند نشان دهنده تولید بیوسورفاکتانت در هنگام تجزیه میکروبی هیدروکربن ها باشد (۳) . به همین دلیل اندازه گیری کشش سطحی می تواند نشان دهنده تولید بیوسورفاکتانت و ویژگی مناسب سویه های میکروبی مورد بررسی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی باشد . اندازه گیری کشش سطحی در هر دو حالت واجد القا کننده و فاقد آن انجام شد . علت افزودن القا کننده هیدروکربنی به دلیل اثری بود که Duvnjak در سال ۱۹۸۳ به اثبات رسانید . وی نشان داد که باکتری Corynebacterium.sp در محیط کشت واجد گلوکز ، بیوسورفاکتانت متصل به دیواره سلوی ترشح می نماید و با افزودن القا کننده هگزادکان به محیط کشت ، مشاهده گردید که هیدروکربن باعث ترشح بیوسورفاکتانت متصل به دیواره سلولی به داخل محیط می شود(۱۱، ۱۸) .

اکثر سویه های مورد بررسی در این پژوهش ، قادر به کاهش کشش سطحی کمتر از ۱۰ دین بر سانتی متر مربع بودند . این سویه ها به عنوان ارگانیزم های مولد بیوسورفاکتانت تعیین هویت نشدند. برای ما این سوال مطرح بود که آیا این امکان وجود دارد که سویه هایی که قادر به کاهش کشش سطحی در مرحله آخر نیستند با بهینه سازی محیط کشت قادر به کاهش موفق کشش سطحی باشند؟ برای پی بردن به این سوال یکی از باکتری هایی که قادر به کاهش موفق کشش سطحی نبود را مورد ارزیابی قرار دادیم . جهت بررسی با تغییر نسبت های گلوکز ، فسفر ، عصاره مخمر و نمک های موجود محیطM.S.S به ۱۶ صورت مختلف تهیه شد و سویه مورد بررسی به هر ۱۶ محیط کشت و همچنین به محیط کشت M.S.S استاندارد تلقیح و سپس کشش سطحی تمامی محیط‌ها اندازه‌گیری گردید . نتایج نشان داد که در حالتی که نسبت گلوکز ۰/۱ ، فسفر ۱۰ برابر ، عصاره مخمر ۰/۱۲۵ و نمک‌های محیط کشت ۳ برابر محیط استاندارد باشد . اختلاف کشش سطحی محیط استاندارد و کنترل از ۰/۵ به ۱۱ دین بر سانتی متر مربع افزایش می یابد . این چنین نتیجه‌ای توسط Zajic و Gerson در سال ۱۹۷۸ نیز بدست آمده است . محققین نامبرده نشان دادند که افزودن مواد غذایی تکمیلی به محیط رشد Corynebacterium lepus منجر به افزایش تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری می‌شود (۱۱ ، ۱۳) . این مساله پیشنهاد کننده این مهم است که با بهینه سازی محیط کشت ، امکان فراهم ساختن شرایط مناسب تر برای ترشح بیوسورفاکتانت وجود دارد . Francy و همکاران سویه‌هایی که بیشتر از ۱۰ دین بر سانتی متر مربع کاهش در کشش سطحی ایجاد می نمودند را به عنوان سویه های مناسب تولید کننده بیوسورفاکتانت معرفی کردند (۱۱) . مهمترین ویژگی تمامی باکتری های جداشده در این تحقیق ، کاهش کشش سطحی بیشتر از ۲۰ دین بر سانتی متر مربع بود که می تواند نشان دهنده قابلیت مناسب سویه های جداشده در تولید بیوسورفاکتانت باشد.

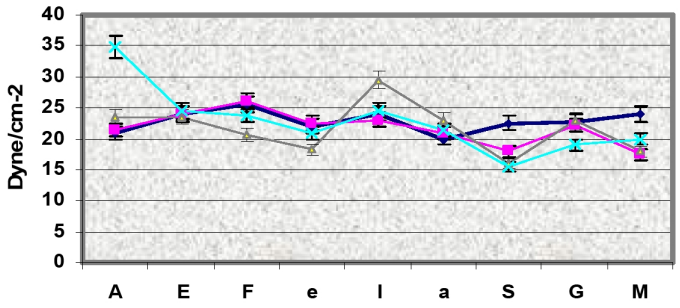
به طور کلی ، با توجه به اطلاعات بدست آمده مشخص شد که در شرایط فاقد القا کننده بهترین سویه F (P.aeruginosa)، در شرایط واجد هیدروکربن های نفت و گازوئیل بهترین سویهe (C.xerosis)، در شرایط دارای القا کننده بنزین بهترین سویه (B.megaterium) E و در شرایط وجود هیدروکربن های نفت و گازوئیل بهترین سویه G (Arthrobacter)بود . هر چند در اکثر

www.SID.ir

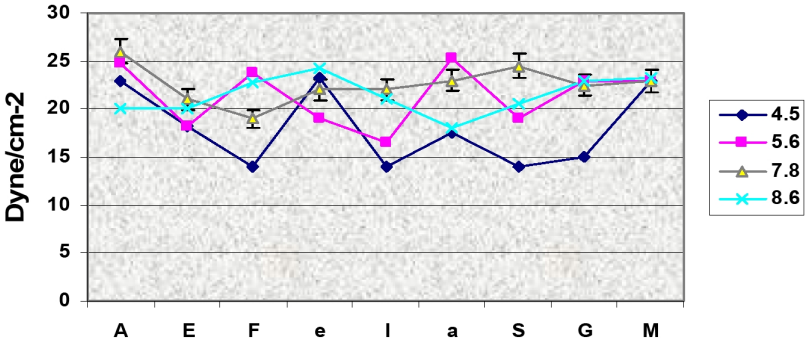
Archive of SID



شکل ۲- مقایسه کاهش کشش سطحی مایع رویی عاری از سلول محیط کشت باکتری های جداشده با افزودن القا کننده



شکل ۳-: مقایسه تاثیر غلظت های مختلف نمک در کاهش کشش سطحی محیط کشت باکتری های جداشده



شکل ۴- مقایسه تاثیر pH در کاهش کشش سطحی محیط کشت باکتری های جداشده

www.SID.ir

Archive of SID

موارد ترشح بیوسورفاکتانت احتیاج به القا کننده دارد ، اما این مساله در همه موارد عمومیت ندارد. مکانیسم این پدیده در باکتری‌های مختلف ناشناخته است .همچنین این امکان وجود دارد که افزودن القا کننده های هیدروکربنی به محیط کشت باعث تحریک بیشتر تولید بیوسورفاکتانت در باکتری با مکانیسم حساسیت جمعیتی (Quarum sensing) گردد. تنوع باکتری های جداشده ، تحمل نمکی بالا ، تحمل گسترده وسیع pH و کاهش موفق کشش سطحی از ویژگی های مهم اغلب سویه های جداشده بود . بنابراین بررسی پتانسیل کاربردی این سویه ها در حد بالاتر پیشنهاد می گردد. با بررسی های فیزیولوژیکی و شناسایی ژن های موثر در تولید بیوسورفاکتانت اطلاعات مناسب برای تهیه محیط های کشت مناسب و ارزان به منظورکاربردهای گسترده تر صنعتی فراهم می گردد .

سپاسگزاری

از استاد گرامی سرکار خانم دکتر نسرین معظمی ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به دلیل حمایت های اجرایی و مشاوره علمی صمیمانه قدردانی می‌گردد .

Refrences

1- Abu-Ruwaid, A.S . (1991) Isolation of Biousurfactant Producing Bacteria, Biotechnol (4) . 315-324 .

2- Banat Ibrahim, M. (1995). Biosutfactant production and possible uses in MEOR and oil pollution remediation Bioresource technology ,(51)1-14 .

3- Emtiazi, G., Shakarami, H., (2005). Utilization of petroleum hydrocarbons by pseudomonas sp. and transformed E.coli , African Journa of Biotechnology , 4(22) 172-176 .

4- Broderick, L.S. (1997). Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems . Dev. Indus Microbiol, (24) . 425-438.

5- Broun, M (1985). MEOR: Prograss & Products CRC Crit, Rev. Biotechnol 3(2), 159-197.

6- Cooper, D.G. (1980). Surface Active Compound from microorganisms. Adv. Applied Microb. V(26). 229-253.

7- Okerentugba, P.O., Ezerony , O.U , (2003) .Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria , ,African Journa of Biofechnology , 2(9) , 288-292 .

8- Dyde, M. (1993). Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil,J. of industrial Microb. 163-170.

9- Fiechter, A. (1992). Biosurfactant moving toward industrial application. BIOTECH. V(10) 208-217.

10- Finnerty, W.R. (1984). A Microbial biosurfactant, Physiology, Biochemistry & Application, Dev. Indus Microb, (25), 31-40.

11- Francy, D.S. (1991). Emulsification of hydrocarbons by Subsurface Bacteria, J.. of Industrial Microb (8) 237-246.

12- Geogion, G. (1992). Surface Active Compound from Microorganisms, Bio/ Technology, V(10). 60-65.

13- Jain, D. K. (1992). Effect of addition of P.aeruginosa. UG2 inocula of biosurfactants on Biodegradation of Selected hycrocarbons in soil. J. of industrial Microb (10) . 87.93.

14- Koch, A.(1991).Hydrocarbon Assimilation & Biosurfactant Production in P.aeruginosa. J. of Bact 4212-4219.

15- Kosaric, N. (1985). Microbial Emulsifier & De-emulsifier. Biotechnology V(3). Chapter 31, 573-591.

www.SID.ir

Archive of SID

16- Mattel, G. (1985). Production of Biosurfactant by Mixed bacteria grown in continuous culture on crude oil, Biotech & Bioeng(7). 217-222.

17- Muligan, C. (1989). Enhanced Biosurfactant production by a mutant B.subtilis strain , Applied Microbiol. Biotechnol, (31) 486-489.

18- Neu, T. R. (1990). Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cell with hydrophobic surfaces, Applied. Microbiol. Biotechnol, (32), 521-525.

19- Reddy, P. (1983). Isolation & Functional characterization of Hydrocarbon Emulsifying & solubilizing factors Produced by a Psendomonas. sp, Biotech & Bioeng, V(15), 387-401.

20- Rocha, C. (1992). Biosurfactant Production by two isolated of P.aeruginosa, World. Journal of Microb & Biotech, (8), 125-128.

21- Vandyke, M. (1991). Application of Microbial surfactants. Biotech, Adv. (9), 241-252.

www.SID.ir