Archive of SID

بررسی کارایی میکروارگانیسم‌های خالص‌سازی شده از محیط‌های حاوی ترکیبات نفتی در تولید مواد زیست فعال سطحی

نادر مختاریان[۱] امیررضا طلایی[۲] نعمت‌ا... جعفرزاده[۳] محمدرضا طلایی[۴] مسعود بهشتی[۵]

(دریافت ۸۷/۱۲/۱۸ پذیرش ۸۹/۱/۱۲)

چکیده

آلودگی خاک با نفت خام منجر به ضایعات شدید زیست‌محیطی در اکوسیستم می‌گردد. از میان روشهای گوناگونی که برای حذف نفت خام از خاک مورد بررسی قرار گرفته است، شستشوی خاک با کمک ترکیبات زیست فعال سطحی یک روش سریع و اقتصادی است که علاوه بر حذف ترکیبات نفتی از خاک، منجر به حذف فلزات سنگین نیز می‌گردد. در این مطالعه از پنج منطقه که مدتها در تماس با ترکیبات نفتی بوده‌اند برای به‌دست آوردن میکروارگانیسم‌هایی که توانایی زیستن در مجاورت نفت خام و تولید بیوسورفکتانت‌ها را دارا باشند، نمونه‌برداری شد. در این مطالعه ۱۶ میکروارگانیسم، جداسازی و خالص‌سازی گردید. این میکروارگانیسم‌ها پس از افزایش تعداد و کشت در محیط معدنی، مورد آزمایش پراکندگی نفت و آزمون شاخص امولسیون سازی (E24) قرار گرفتند. میکروارگانیسمی که A-۱۲ نامیده شد و یک باکتری گرم منفی میله‌ای بود دارای بیشترین شاخص امولسیون‌سازی معادل ۳۶ درصد بود. در این مطالعه به ازای هر لیتر محیط کشت معدنی حاوی ۳۵۶ میلی‌گرم میکروارگانیسم، ۳ گرم پودر خشک بیوسورفکتانت از محیط کشت، خالص‌سازی گردید. از میکروارگانیسم مذکور به‌طور مستقیم و یا پس از تولید و خالص‌سازی بیوسورفکتانت تولیدی می‌توان برای تصفیه خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: نفت خام، بیوسورفکتانت، بیوامولسیفایر، E24

Producing Biosurfactants from Purified Microorganisms Obtained from Oil-contaminated Soil

Nader Mokhtarian[1] Amir Reza Talaie[2] Nematolah Jaafarzadeh[3]
Mohammad Reza Talaie[4] Masoud Beheshti[5]

(Received March 9, 2009 Accepted Apr. 1, 2010)

Abstract

Contamination of soil by crude oil can pose serious problems to ecosystems. Soil washing by solutions containing biosurfactants is one of the most efficient methods for the remediation of contaminated soil by crude oil because it removes not only the crude oil but also heavy metals. In this study, five soil samples were taken from fields exposed to oil compounds over the years in order to produce biosurfactants from microorganisms that were capable of degrading oil compounds. Sixteen such microorganisms were isolated. After cultivation, their emulsification strength was examined using E24 test. From among the experimental microorganisms, a gram-negative and rod-shape microorganism called A-12 showed the greatest value of the E24 test index (36%). For each liter of the culture medium containing 365 mg of microorganisms, 3 gr of the biosurfactant compound was produced and separated as dried powder. The purified biosurfactant was used in the soil washing process. Also, the insulated microorganisms were capable of degrading crude oil floating on wastewaters.

Keywords: Crude Oil, Biosurfactant, Bioemulsifier, E24.

۱- کارشناس ارشد و عضو هیئت علمی گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا
۲- کارشناس ارشد و عضو هیئت علمی گروه مهندسی عمران و محیط زیست، مؤسسه آموزش عالی جامی، دلیجان (نویسنده مسئول) ۴۲۲۵۶۷۸ (۰۸۶۶) atalaie@ami.ac.ir
۳- دانشیار گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اهواز
۴- دانشیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اصفهان
۵- استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اصفهان

1. M.Sc. and Academic Member of Chemistry Eng. Dept., Azad University, Branch of Shahreza
2. M.Sc. and Academic Member of Civil and Environmental Eng., Jami Institute of Tech., Delijan (Corresponding Author) (+98 866) 4225678 atalaie@ami.ac.ir
3. Assoc. Prof. of Environmental Health Eng., Faculty of Public Health, Ahwaz University of Medical Sciences, Ahwaz
4. Assoc. Prof. of Chemical Eng., Dept. of Eng., Isfahan University, Isfahan
5. Assist. Prof. of Chemical Eng., Dept. of Eng., Isfahan University, Isfahan

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

آلاینده‌های گوناگون ورودی به محیط‌زیست، باعث ایجاد خطرات جدی گردیده و محققان بسیاری را بر آن داشته است که روشهای گوناگونی را برای تصفیه محیط‌های آلوده به‌کاربرند. نفت و مشتقات آن یکی از آلاینده‌های مهمی است که امروزه محیط زیست را به چالش کشانده است. نفت ترکیبی از هزاران ماده آلی می‌باشد که بخش اعظم آن را ترکیبات هیدروفوبیک[1] تشکیل می‌دهد [۱].

از میان روشهای گوناگونی که برای تصفیه نفت خام از خاک مورد بررسی قرار گرفته‌اند، شستشوی خاک با کمک سورفکتانت‌ها[2] یک روش سریع و گاه اقتصادی است که علاوه بر حذف ترکیبات نفتی از خاک منجر به حذف فلزات سنگین نیز می‌گردد [۲ و۳]. شستشوی خاک در مقایسه با روشهای بیولوژیکی تجزیه ترکیبات نفتی در خاک که به‌طور بالقوه به تغییرات آب و هوایی وابسته است، بسیار سریع‌تر بوده و تقریباً در هر شرایطی قابل کاربرد است. روشهای سنتی شستشوی خاک به‌طور وسیعی توسط محققان مختلف در سالهای اخیر مورد بررسی قرار گرفته است [۴ و ۵]. مطالعات نشان داده است که ترکیبات فعال سطحی قادر به جمع‌آوری و تغلیظ نفت خام در یک محیط آبی و بدون هیچ‌گونه تغییر شیمیایی بر روی آن می‌باشند [۶]. با کمک مطالعات صورت گرفته توسط محققان مختلف، رفتار محلولهای حاوی سورفکتانت‌ها در محیط‌های گوناگون شناخته شده است[۷ و۸].

مواد فعال سطحی که در طبیعت تولید می‌گردند تحت عنوان بیوسورفکتانت‌ها[3] طبقه‌بندی می‌شوند [۹]. این مواد در مقایسه با ترکیبات مصنوعی دارای فعالیت بسیار عالی می‌باشند و از ارگانیسم‌های زنده تولید می‌شوند، در نتیجه هم منابع تجدیدپذیری هستند و هم سمیّت کمتری را ایجاد می‌نمایند [۱۰ و۱۱]. در استفاده از این مواد نیاز به حذف ترکیبات شیمیایی از خروجی سیستم نیست و این امر موجب بی‌خطر بودن و طبیعی بودن این ترکیبات می‌گردد. تولید این ترکیبات در سطح تجاری و استفاده از آنها در حذف فلزات سنگین و ترکیبات نفتی توسط بعضی از محققان به انجام رسیده است [۱۲، ۱۳ و ۱۴].

تأثیرات مثبت مواد زیست فعال سطحی در تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی و همچنین در شستشوی خاکهای آلوده به نفت نیز گزارش شده است [۱۲]. طلایی و همکاران در مطالعه خود به بررسی رفتار امولسیون‌سازی میکروارگانیسم‌های خالص‌سازی شده در هنگام تصفیه بیولوژیکی فاضلابهای حاوی نفت خام شناور پرداختند [۱۵]. همچنین آنها در مطالعه دیگری نیز قدرت امولسیون‌سازی برخی میکروارگانیسم‌های به‌کار گرفته شده در تجزیه گازوئیل در حالت کشت خالص را نیز مورد بررسی قرار دادند [۱۶ و ۱۷]. یوروم و همکاران[4] در مطالعه‌ای برای حذف نفت خام در خاکهای آلوده از سدیم دودسیل سولفات (SDS)[5] که یک سورفکتانت ترکیبی مصنوعی است و رامونولیپید[6] که ترکیب اصلی بیوسورفکتانت‌های تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهد، استفاده کردند [۹]. یوروم متوجه شد که رامونولیپید کارایی نسبتاً برابری با SDS دارد و نتایج تحقیقات وی حاکی از این حقیقت بود که کاربرد میکروارگانیسم‌ها در تولید بیوسورفکتانت می‌تواند رقیبی سرسخت و جدی برای سورفکتانت‌های مصنوعی باشد.

هدف از این مطالعه به‌دست آوردن گونه هایی از میکروارگانیسم‌ها بود که توانایی تولید این ترکیبات را برای کاربردهای زیست‌محیطی دارا باشند. در این مطالعه از پنج منطقه که میکروارگانیسم‌ها در آن با ترکیبات نفتی در تماس بوده‌اند، نمونه‌برداری شد و میکروارگانیسم‌های موجود در آنها که قادر به ادامه حیات در مجاورت نفت خام بودند، جداسازی و خالص‌سازی گردیدند. این میکروارگانیسم‌ها برای تولید ترکیبات زیست‌فعال سطحی مورد آزمایش قرار گرفتند و بهترین میکروارگانیسم پس از کشت در محیط معدنی شناسایی گردید. در نهایت مواد تولیدی توسط میکروارگانیسم انتخابی خالص‌سازی شد. در این مطالعه با توجه به محدود نمودن دسترسی میکروارگانیسم‌ها به منبع کربن، میکروارگانیسم‌ها مجبور به مصرف نفت خام به‌عنوان منبع کربن خود شدند، بنابراین میکروارگانیسم‌های به‌دست آمده در این مطالعه علاوه بر تولید بیوسورفکتانت، توانایی مصرف و تجزیه مستقیم نفت خام را نیز داشتند.

۲- مواد و روشها

۲-۱- نمونه برداری و آزمایش‌ها

در این مطالعه از پنج نقطه شامل فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران، خاک آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران، فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران، خاک اطراف محل تخلیه بنزین و گازوئیل در یک پمپ بنزین در شهر اهواز و نفت خام ورودی پالایشگاه اصفهان نمونه‌برداری شد. نمونه‌برداری خاک از عمق پنج سانتی‌متری صورت گرفت و تمام نمونه‌ها تا رسیدن به آزمایشگاه در ظروف شیشه‌ای استریل در کنار یخ نگهداری شدند[۱]. در حین

[1] Hydrophobic
[2] Surfactants
[3] Biosurfactants
[4] Urum et al.
[5] Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)
[6] Rhamnolipid

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌برداری نیز دمای خاک با کمک یک دماسنج الکلی اندازه‌گیری شد. pH و رطوبت خاک نیز پس از رسیدن نمونه به آزمایشگاه مورد سنجش قرار گرفت [۱۵].

۲-۲- جداسازی میکروارگانیسم‌ها

۲-۲-۱- جداسازی میکروارگانیسم‌ها از خاک

۵ گرم از دو نمونه خاک جمع‌آوری شده در دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری جداگانه حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک[1] ریخته شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه بر روی یک شیکر با دور ۱۶۰ rpm قرار گرفت تا میکروارگانیسم‌های موجود در خلل و فرج موجود در خاک نیز در سرم فیزیولوژیک معلق شوند [۱۵]. پس از این مدت ارلن مایرها به‌مدت ۱۵ دقیقه در یک محیط ساکن، نگهداری شدند. سپس دو میلی‌لیتر از محتویات آنها به دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری که حاوی محیط کشت معدنی بود، اضافه شد و pH نمونه به کمک محلول هیدروکسید سدیم بر روی ۷/۲ تنظیم شد [۱۸]. لازم به ذکر است که محیط کشت معدنی شامل ۰/۱ گرم در لیتر $MgSO_4$، ۰/۵ گرم در لیتر KH_2PO_4، ۰/۰۱ گرم در لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۰۰۱ گرم در لیتر $FeSO_4$، ۱ گرم در لیتر $NaNO_3$ و ۰/۵ گرم در لیتر K_2HPO_4 بود [۱۹]. یک میلی‌لیتر نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن نیز به محیط اضافه گردید. ارلن مایرها به مدت ۷۲ ساعت در یک شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شدت هوادهی ۱۶۰ rpm قرار گرفتند. پس از گذشت این مدت مجدداً دو میلی لیتر از محتویات آنها به دو ارلن مایر مشابه دیگر انتقال داده شد و به‌مدت ۷۲ ساعت دیگر در همان شرایط نگهداری گردید [۱۵].

۲-۲-۲- جداسازی میکروارگانیسم‌ها از فاضلاب و نفت خام

یک میلی‌لیتر از فاضلابهای فرایندی و بهداشتی پالایشگاه تهران و یک میلی‌لیتر از نفت خام خوراک ورودی پالایشگاه اصفهان را به سه ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری جداگانه حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی انتقال داده و به دو ارلن مایر حاوی فاضلاب فرایندی و بهداشتی، یک میلی لیتر نفت خام استریل به‌عنوان تنها منبع کربن اضافه شد. ارلن مایر سوم که برای جداسازی اسپرهای[2] احتمالی موجود در نفت خام به‌کار گرفته شد، به‌دلیل استفاده از نفت خام غیر استریل به‌عنوان منبع جداسازی میکروارگانیسم، حاوی ترکیبات نفتی بود و نیازی به اضافه کردن منبع کربن نداشت. هر سه ارلن مایر در یک شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت و پس از آن مجدداً دو میلی‌لیتر از آن به سه ارلن مایر دیگر با همان محتوای قبل منتقل شد و با همان شرایط قبلی مورد انکوباسیون قرار گرفت [۱۵، ۱۷].

۲-۳- خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها

برای خالص سازی هر یک از میکروارگانیسم‌های رشد کرده در مراحل قبل با کمک لوپ آزمایشگاهی مقداری از محتویات هر یک از این محیط‌ها به دو محیط کشت PDA[3] برای مخمرها و قارچها و نوترینت آگار[4] برای باکتری‌ها انتقال داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت برای محیط نوترینت آگار و ۱۲۰ ساعت برای محیط PDA، کلنی‌هایی با شکلها و رنگهای مختلف روی آنها تشکیل گردید. به‌منظور خالص‌سازی، با کمک لوپ آزمایشگاهی هر کلنی به محیط‌های مشابه دیگر منتقل شد و مجدداً در همان شرایط نگهداری شد. این عمل تا به‌دست آمدن کلنی‌های خالص ادامه پیدا کرد. در نهایت از میکروارگانیسم‌های خالص شده، اسلنت تهیه شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای نگهداری طولانی مدت نمونه‌ها، هر ۴ ماه یک بار این میکروارگانیسم‌ها به اسلنت‌های جدید انتقال یافتند [۱۵ و ۱۶].

۲-۴- تعیین میزان تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها

برای تعیین میزان تولید بیوسورفکتانت توسط هر میکروارگانیسم در کشت خالص، از کشت در محیط معدنی استفاده گردید. در این بخش از مطالعه برای افزایش تعداد هر یک از باکتری‌ها، مقداری از کلنی آنها توسط لوپ آزمایشگاهی به ارلن مایری ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث[5] استریل منتقل شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در یک شیکرانکوباتور با شدت هوادهی ۱۶۰ rpm قرار داده شد. پس از این مدت ۱۰ میلی‌لیتر از محتویات هر ارلن مایر در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و میکروارگانیسم‌های آن از محیط نوترینت براث جدا گردیدند. میکروارگانیسم‌ها توسط ورتکس[6] با دور پایین مجدداً در سرم فیزیولوژیک به‌حالت معلق در آمدند. با کمک رقیق‌سازی سرم فیزیولوژیک حاوی میکروارگانیسم‌ها میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر در آنها به ۱ رسید [۱۵]. به‌این ترتیب کلیه میکروارگانیسم‌ها با یک غلظت واحد در دسترس بودند.

یک میلی‌لیتر از هر میکروارگانیسم معلق در سرم فیزیولوژیک با غلظت واحد، به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰

[1] Serum Physiologic
[2] Spore
[3] Potato Dextrose Agar (PDA)
[4] Nutrient Agar
[5] Nutrient Broth
[6] Vortex

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر محیط کشت معدنی انتقال داده شد و ۱ میلی‌لیتر نفت خام به عنوان تنها منبع کربن به ارلن مایرها اضافه شد. ارلن مایرها در یک شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شدت هوادهی ۱۶۰ rpm به‌مدت ۷ روز قرار گرفتند. اکسیژن مورد نیاز برای حفظ حالت هوازی در ارلن مایرها به‌واسطه حرکت شیکرانکوباتور تأمین گردید. پس از گذشت ۷ روز، نمونه‌ها از شیکرانکوباتور خارج و برای آزمایش‌های تعیین میزان بیوسورفکتانت تولیدی، مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به‌ذکر است که نفت خام مورد استفاده در این آزمایش در ظروف مقاوم به فشار قرار گرفت و با کمک دستگاه اتوکلاو استریل شد. البته این روش استریلیزاسیون منجر به شکستن برخی از ترکیبات موجود در نفت خام می‌گردد که این امر به‌دلیل کوچک‌تر شدن برخی ملکول‌های نفتی، مصرف آسان‌تر آن توسط میکروارگانیسم‌ها را در پی دارد [۱۵]. لازم به ذکر است که استفاده از صافی میلی‌پور برای استریلیزاسیون نفت خام، به‌دلیل گرانروی بالای آن تقریباً غیر ممکن بود و استفاده از اتوکلاو علی‌رغم ایجاد برخی معضلات، یکی از ساده‌ترین و مؤثرترین راههای استریل نمودن نفت است [۱۵].

۲-۴-۱- آزمون پراکندگی نفت

برای انجام آزمایش پراکندگی نفت[1]، ابتدا سویه‌ها[2] در داخل محیط کشت مایع یعنی محیط معدنی تلقیح شدند. پس از گذشت زمان لازم و رشد سویه‌ها، ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت برداشته شد. ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در داخل یک پلیت بزرگ ریخته شد و سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آن افزوده گردید. در ادامه نمونه ۱۰ میکرولیتری برداشته شده از محیط کشت، بر روی سطح نفت ریخته شد. پخش شدن محیط کشت بر روی سطح روغن معیاری از وجود ترکیبات فعال سطحی در محیط کشت است. برای این آزمون یک محیط شاهد با آب مقطر نیز در نظر گرفته شد که با مقایسه نمونه محیط کشت و نمونه شاهد می‌توان به وجود سورفکتانت‌ها در محیط پی برد [۱۵ و ۱۶]. نمونه‌های مثبت در این آزمون برای انجام مرحله بعد یعنی آزمون E24 انتخاب گردیدند.

۲-۴-۲- آزمون E24

شاخص امولسیفیکاسیون[3] معیاری از توانایی ترکیبات حاصل از متابولیسم سویه‌ها در امولسیفیکاسیون ترکیبات هیدروکربنی است. لذا شاخص امولسیفیکاسیون سویه‌های مثبت در آزمایش پراکندگی نفت اندازه‌گیری شد. به‌این منظور دو میلی‌لیتر نفت سفید به‌همراه دو میلی‌لیتر از سویه‌های رشد کرده در محیط معدنی به یک لوله آزمایش اضافه شد و به‌مدت ۳ دقیقه تحت لرزش[4] شدید قرار گرفت. این لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در یک مکان ساکن قرار گرفته و پس از این مدت، نسبت بخش امولسیون شده به کل محتوای لوله‌ها محاسبه شد و به‌عنوان شاخص E24 گزارش گردید [۱۵ و ۱۶].

۲-۴-۳- آزمون شمارش قطره

تولید بیوسورفکتانت در محیط کشت می‌تواند منجر به کاهش کشش سطحی آب گردد که این امر نیز به نوبه خود منجر به تولید قطراتی ریزتر می‌شود. بنابراین تعداد قطراتی که توسط یک حجم مشخص از آب خالص تولید می‌شود نسبت به آبی که حاوی بیوسورفکتانت است کمتر خواهد بود. با شمارش تعداد قطرات تولیدی توسط یک حجم خاص از هر نمونه توسط یک پیپت و مقایسه آن با همان حجم از آب مقطر به‌راحتی می‌توان به نتایج کمّی درباره سورفکتانت تولیدی دست یافت.

۲-۴-۴- استخراج و تخلیص بیوسورفکتانت

استخراج بیوسورفکتانت به‌روش استخراج مایع-مایع و پس از رشد سلول‌ها در فاز آبی(محیط معدنی) و حذف آنها با استفاده از سانتریفوژ انجام گرفت. چون افزایش دما می‌تواند موجب تخریب ترکیب گردد، سانتریفوژ در دمای ثابت ۴ درجه سلسیوس انجام شد. به‌منظور استخراج بیوسورفکتانت، ابتدا مقدار pH محیط کشت فاقد سلول با افزودن اسیدکلریدریک بر روی ۲ تنظیم شد و سپس محلول در طول شب در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. محلول حاوی رسوب در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. رسوب حاصله به‌وسیله آب مقطر حل شد و سپس pH به‌وسیله سود بر روی ۷ تنظیم گردید. پس از خشک کردن انجمادی[5]، نمونه حاصله توزین شد [۴]. با اضافه نمودن مقدار اندکی از سورفکتانت تخلیص و خشک شده به آب مقطر و انجام مجدد آزمون پراکندگی نفت با آن و مقایسه نتایج حاصله که به‌صورت کیفی بود، مشخص گردید که سورفکتانت تولیدی مؤثرتر از کاربرد محیط‌های کشتی بود که میکروارگانیسم‌های تولید کننده بیوسورفکتانت در آنها رشد نموده‌اند.

۳- نتایج و بحث

در این مطالعه از ۵ نقطه که برای مدت طولانی در تماس با ترکیبات نفتی بوده‌اند، نمونه‌برداری صورت گرفت. نفت خام

[1] Oil Spreading
[2] Strain
[3] Emulsification Index
[4] Vortex
[5] Freeze Drying

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات باکتری‌های به‌دست آمده در مطالعه

شماره	محل برداشت نمونه	نوع محیط کشت	شکل باکتری	رنگ کلنی	آزمون گرم
۱	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	PDA	میله ای	زرد	-
۲	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	صورتی	+
۳	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	PDA	میله ای	سبز	-
۴	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	میله ای	قرمز کم رنگ	+
۵	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	قهوای باز	-
۶	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	سفید	-
۷	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	کروی	سبز فسفری	-
۸	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	کروی	نارنجی	-
۹	خاک پمپ بنزین	PDA	کروی	قهوای کم رنگ	+
۱۰	خاک پمپ بنزین	PDA	میله ای	قهوای با کلنی بزرگ	-
۱۱	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	سفید	-
۱۲	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	سفید	-
۱۳	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	زرد	+
۱۴	خاک پمپ بنزین	PDA	میله ای	قهوه ای پر رنگ	-
۱۵	نفت خام	محیط معدنی	کروی	خاکستری	-
۱۶	نفت خام	PDA	کروی	کرم	-

می‌تواند به سه شکل مختلف توسط میکروارگانیسم‌ها به مصرف برسد: ۱- توده‌های بزرگ نفت خام ۲- قطرات بسیار کوچکی از نفت خام که در اثر تولید بیوسورفکتانت‌ها ایجاد می‌گردند ۳- نفت خام که به‌صورت محلول در آب وجود دارد. با توجه به این امر و همچنین با توجه به حلالیت کم نفت در آب و سطح اندک ایجاد شده توسط توده‌های بزرگ نفت، میکروارگانیسم‌های موجود در این مناطق، عموماً برای مصرف ترکیبات نفتی با کمک آنزیم‌های تولیدی یا بیوسورفکتانت‌ها، این ترکیبات را به قطرات کوچک‌تر تقسیم می‌نمایند و سپس مورد استفاده قرار می‌دهند [۱۹]. بنابراین در این مناطق احتمال یافتن میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تولید بیوسورفکتانت‌ها را داشته باشند، وجود دارد. مطالعه نمونه‌های خاک برداشت شده نشان داد که میزان رطوبت خاک مورد نمونه‌برداری ۳۲ درصد بود. همچنین pH خاک اندکی اسیدی و حدود ۶ بود. مقدار pH نمونه‌های فاضلاب نیز ۶/۵ محاسبه شد. دمای نمونه خاک آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران ۱۷ درجه سلسیوس و نمونه خاک اطراف محل تخلیه بنزین و گازوئیل در شهر اهواز ۳۲ درجه بود. میزان رطوبت خاک آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران ۳۳ درصد و مقدار رطوبت خاک اطراف پمپ بنزین ۱۹ درصد بود.

برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از محیط حاوی نفت خام، به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده گردید. به‌این ترتیب تنها میکروارگانیسم‌هایی در این مطالعه رشد نمودند که توانایی استفاده از نفت خام را دارا بودند. البته در برخی از مطالعات، منابع کربن دیگری همچون گلوکز نیز به‌کار گرفته شده است. در این مطالعه ۱۶ میکروارگانیسم از منابع مورد نمونه‌برداری، جداسازی گردید. تمامی میکروارگانیسم‌های رشد کرده بر روی محیط‌های PDA و نوترینت آگار از نوع باکتری بوده و تمامی آنها از نوع کروی[1] و میله‌ای[2] بودند. در جدول ۱ مشخصات هر باکتری و کلنی آن که از منابع گوناگون مورد نمونه‌برداری در مطالعه به‌دست آمده، نمایش داده شده است. ۱۲ گونه از باکتری‌های جدا شده در این مطالعه گرم منفی و ۴ گونه دیگر گرم مثبت بودند. برخی از گونه‌های جداسازی شده در این مطالعه به شدت متحرک بودند و برخی دیگر تحرک کمی داشتند. این میکروارگانیسم‌ها ابتدا با کمک آزمون پراکندگی نفت برای تعیین احتمال تولید بیوسورفکتانت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند که کلیه میکروارگانیسم‌های به‌دست آمده در این مطالعه در این آزمون موفق بودند. پس از آن برای تعیین میزان بیوسورفکتانت تولیدی و تعیین قابلیت امولسیون‌سازی آن، آزمون شاخص امولسیون‌سازی E24 انجام گرفت. که در این آزمون باکتری A-۱۲ بیشترین میزان را نشان داد. باید توجه نمود که بیشتر بودن میزان آزمون E24 همیشه نشان دهنده بیشتر بودن تولید بیوسورفکتانت‌ها نیست بلکه همچنین می‌تواند به‌دلیل بالاتر بودن کارایی بیوسورفکتانت تولیدی باشد.

برخی از باکتری‌ها قادرند بیوسورفکتانت زیاد و با کارایی کم تولید کنند. بنابراین شاخص امولسیون سازی نمی‌تواند معیاری مناسب برای تعیین مقدار بیوسورفکتانت تولیدی باشد و تنها برای

[1] Cocci
[2] Bacillary

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- میزان شاخص امولسیون سازی میکروارگانیسم های مختلف در این مطالعه

نام باکتری	A-۱	A-۲	A-۳	A-۴	A-۵	A-۶	A-۷	A-۸	A-۹	A-۱۰	A-۱۱	A-۱۲	A-۱۳	A-۱۴
شاخص امولسیون سازی	٪۱۶	٪۱۲	٪۱۶	٪۸	٪۱۲	٪۲۰	٪۲۰	٪۱۶	٪۲۴	٪۱۱	٪۴	٪۳۶	٪۲۸	٪۱۲

اندازه‌گیری کارایی بیوسورفکتانت به‌کار می‌رود [۱۵]. در جدول ۲ شاخص امولسیون سازی کلیه میکروارگانیسم‌ها نمایش داده شده است.

با توجه به این که شاخص امولسیون‌سازی باکتری A-۱۲ از دیگر گروهها بیشتر بود، این باکتری برای ادامه مطالعات انتخاب گردید. همچنین طبق آزمون شمارش قطره همه میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید قطرات بیشتری از یک حجم مشخص از محیط کشت خود نسبت به آب مقطر بودند. در شکل ۱ تصویر باکتری A-۱۲ پس از رنگ‌آمیزی گرم و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر نمایش داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشخص است، این باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل است. مشخصات بیشتر این باکتری در جدول ۱ نشان داده شده است.

پس از کشت A-۱۲ در محیط معدنی، از هر لیتر محیط کشت مورد تلقیح میکروارگانیسم‌ها، ۳ گرم پودر بیوسورفکتانت خشک استخراج شد در حالی که میزان جامدات معلق فرار (VSS) برابر با ۳۵۹ میلی‌گرم در لیتر بود. پس از استخراج، تخلیص و خشک‌سازی انجمادی بیوسورفکتانت، مقداری از آن در آب مقطر حل گردید و آزمون پراکندگی نفت و آزمون شمارش قطره بر روی آن صورت گرفت. با مقایسه آزمون پراکندگی نفت با شرایطی که از آب مقطر بدون بیوسورفکتانت استخراجی استفاده شد، مشخص گردید که پخش شدن قطره حاوی بیوسورفکتانت بر روی نفت خام در آزمایش پراکندگی نفت بسیار بیشتر از قطره آب مقطر خالص است. میزان پخش شدن قطره در این حالت حتی از کلیه حالاتی که از محیط‌های کشت نیز برای آزمون پراکندگی نفت استفاده شد، بیشتر بود.

همچنین نتایج آزمون شمارش قطره مشخص نمود که میزان قطرات تولیدی ۱۰ میلی‌لیتر از آب مقطر حاوی بیوسورفکتانت، یک و نیم برابر همان میزان آب مقطر بود. این نتایج بیانگر این است که ماده استخراج و تخلیص شده در این مطالعه بیوسورفکتانت است. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان از باکتری A-۱۲ به‌طور مستقیم برای تولید بیوسورفکتانت‌ها در خاک و شستشوی خاک استفاده نمود و یا ابتدا بیوسورفکتانت را تولید کرده و از آن برای شستشوی خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی استفاده نمود.

میزان و شیوه استفاده از بیوسورفکتانت‌ها در تصفیه خاکها وابستگی شدیدی به میزان آلودگی خاک دارد [۹]. برای تصفیه خاکهای آلوده به نفت خام می‌توان بیوسورفکتانت را پس از تولید و خالص‌سازی با کمک روشهای مختلف به خاک اضافه نمود و عملیات شستشوی خاک را انجام داد. بنابر این می‌توان از اضافه نمودن باکتری A-۱۲ به‌طور مستقیم به خاک نیز استفاده کرد. در استفاده مستقیم از A-۱۲ در خاک، علاوه بر تولید بیوسورفکتانت، تجزیه بیولوژیک ترکیبات نفتی نیز توسط این باکتری انجام خواهد شد زیرا در تمام آزمایش‌های انجام شده در طول این مطالعه از نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده گردید. این امر نشان می‌دهد که A-۱۲ قادر به استفاده از نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن خود است و پس از استفاده عملی در خاک نیز خواهد توانست با مصرف نفت خام موجود در خاک، تولید بیوسورفکتانت نماید.

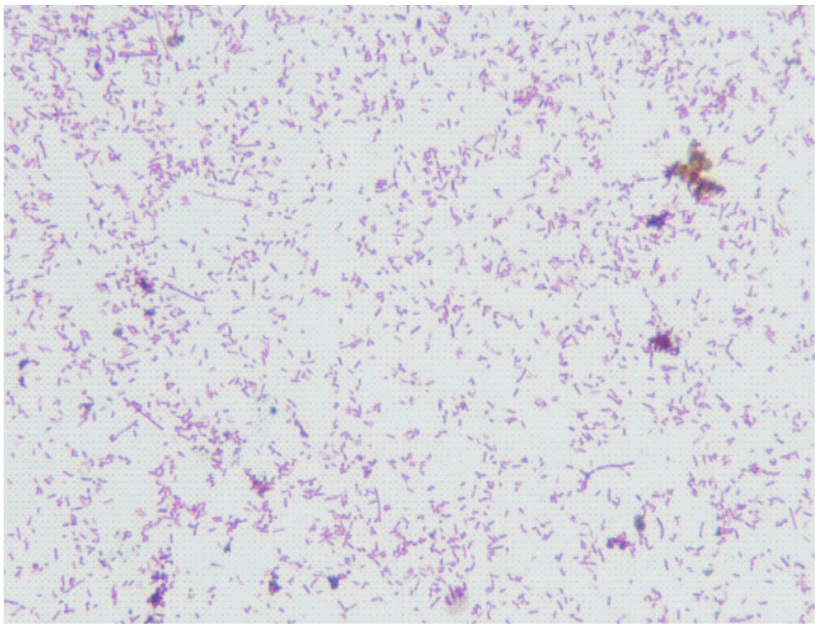
لیانگ و همکاران[1] در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که برای شروع تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی، نیاز به اضافه نمودن سورفکتانت‌های سنتزی و یا یک منبع کربن سریع تجزیه شونده مانند گلیسیرول است [۲۰]. اما همان‌طور که در این مطالعه مشاهده شد تنها منبع کربن مورد استفاده، نفت خام بود. بنابراین A-۱۲ توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را نیز داشت ولی برای شروع تجزیه بیولوژیکی و افزایش تعداد خود، نیازی به افزودن منابع سریع تجزیه شونده و یا سورفکتانت سنتزی نداشت.

مولکینز[2] در مطالعه خود به این نتیجه رسید که حضور سورفکتانت منجر به افزایش میزان تجزیه بیولوژیک نفت خام می‌شود [۲۱]. بنابراین می‌توان برای تجزیه زیستی مواد نفتی از A-۱۲ به‌همراه سایر میکروارگانیسم‌ها که توانایی مصرف ترکیبات نفتی با نرخ زیاد را دارا بوده اما توانایی تولید بیوسورفکتانت را ندارند، استفاده نمود. این امر منجر به افزایش میزان تجزیه ترکیبات

[1] Liang et al.
[2] Mulkins

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تصویر باکتری گرم منفی A-۱۲ با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر

نفتی در محیط به‌واسطه تولید بیوسورفکتانت توسط A-۱۲ می‌گردد.

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه با کمک میکروارگانیسم‌های جدا شده از محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی، بیوسورفکتانت تولید و از محیط کشت جدا شد و میزان تولید آن توسط میکروارگانیسم‌ها تعیین شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که:

۱- ۱۶ میکروارگانیسم از مناطقی که سالها در معرض آلودگی‌های نفتی بودند جداسازی شد که همگی آنها کم و بیش توانایی تولید بیوسورفکتانت را داشتند. تمام میکروارگانیسم‌های جدا شده از نوع باکتری بودند و بیشترین تعداد آنها گرم منفی بودند.

۲- میکروارگانیسم‌های جدا شده علاوه بر تولید بیوسورفکتانت‌ها، توانایی رشد در محیطی که تنها منبع کربن آن نفت خام باشد را داشتند. بنابراین با استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در حذف آلودگی های نفتی از خاک، علاوه بر تأثیر بیوسورفکتانت تولیدی، فرایند تجزیه بیولوژیک ترکیبات نفتی نیز به‌طور هم زمان انجام می‌پذیرد که این امر منجر به افزایش تأثیر این میکروارگانیسم در پاک‌سازی خاکهای آلوده به نفت می‌گردد.

۳- در این مطالعه از هر لیتر محیط کشت با مواد جامد فرار برابر با ۳۵۹ میلی‌گرم در لیتر، ۳ گرم پودر خشک بیوسورفکتانت استخراج گردید.

۴- از میکروارگانیسم‌های به‌دست آمده می‌توان به‌طور مستقیم در تصفیه خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی استفاده کرد و یا با کشت آنها در محیط‌های مایع و خالص سازی بیوسورفکتانت تولیدی، از آن برای شستشوی خاک استفاده نمود.

۵- مراجع

1- Dibble, J. T., and Bartha, R. (1979). “Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge.” *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 729-739.

2- William, C., Anderson W.C., and Dee, P. E. (1993). *Innovative site remediation technology: Soil washing/soil flushing*, EPA, USA.

3- Anderson, R., Rasor, E., and Van Ryn, F. (1999). “Particle size separation via soil washing to obtain volume reduction.” *J. of Hazard Malter*, 66 (1-2), 89-98.

4- Tobia, R.J., Camacho, J.A.M., Augustin, P. Griffiths, R. A., and Frederick, R. M. (1994). “Surfactant treatment of crude oil contaminated soils.” *J. of Hazard Mater*, 38 (1), 145-161

www.SID.ir

Archive of SID

5- Khodadoust, A. P., Lei, L., Antia, J. E., Bagchi, R., suidan, M. T., and Tabak, H. H. (2005). "Adsorption of PAHs in aged harbor sediments." *ASCE J. of Environmental Egn*., 131 (3), 403-409.

6- Mann, M. J. (1999). "Full-scale and pilot- scale soil washing." *J. Hazard. Mater*, 66 (1–2), 119-136.

7- Kosaric, N. (1987). *Biosurfactants and biotechnology*, Marcel Dekker, New York.

8- Hunter, R.J. (1993). *Introduction to modern colloid science*, Oxford Science Publications, UK.

9- Urum, K., Pekdemir T., and Copur, M. (2004). "Surfactants treatment of crude oil contaminated soils." *J. of Colloid and Interface Science*, 276, 456-464.

10- Francy, D. S., Thomas, J. M., Raymond, R. L., and Ward, C. H. (1991). "Emulsification of hydro carbons by surface bacteria." *J. Ind. Microbiol*, 8, 237–246.

11- Van Dyke, M. I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., and Trevors, J. T. (1993). "*Pseudomonas* aeruginosa UG2 rhamnolipid biosurfactants: Structural characterization and their use in removing hydro phobic compounds from soil." *J. Microbiol*., 39, 1071-1078.

12- Hamme, J. D., and ward, O. P. (1999). "Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed- bacterial culture." *Can J. of Micorbiol.*, 45, 130-137.

13- Maier, R. M., and Sorberon-Ghavaz, G. (2000). "*Pseudomona* aeruginosa rhamnolipidisL biosynt hesis and potential environmental applications." *Appl. Microbial. Biotech*., 54, 625-633

14- Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (1998). "Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of Bacillus subtilis." *J. of Indus. Microb. and Biotech*., 20, 48-52.

15- Talaie, A. R. (2008). "Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms," M.Sc. Thesis, Scince and Research Azad University Branch-Ahvaz.

16- Talaie, A. R., Talaie, M., and Jafaarzadeh, N. (2009) "Optimization of biodegradation of wastewater contaminated floating diesel fuel by Taguchy method." *J. Water and Wastewater*, 71, 57-68.

17- Talaie, A. R., Jafaarzadeh, N., Talaie, M., and Beheshti, M. (2009). "Optimization of floating crude oil biodegradation by isolated microorganisms via experimental design method." *J. of Koomesh*, 11 (1), 41-54.

18- Qingxin, Li, Kang, C., and Zhang, C. (2005). "Wastewater produced from an oilfield and continuous treatment with and oil-degrading bacterium." *Process Biochemistry*, 40, 873-877.

19- Choi, H. D., Hori, K., Tnji, Y., and Unno H. (1974). "Microbial degradation kinetics of solid alkane dissolved in nondegradable oil phase." *J. of Biochemical Engineering*, 3, 71-78.

20- Liang, Z. G., Yue-ting, W. U., Xin-ping Q., and Qin, M. (2005). "Biodegradation of crude oil by pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids." *J. of Zhejiang University Science*, 8, 725-730.

21- Mulkins-Philips, G. J., and Stewart J. E. (1974). "Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil." *Applied Microbiology*, 28(4), 547-552.

www.SID.ir