Archive of SID

علـوم محیـطی سال پنجم، شماره سوم، بـهار ۱۳۸۷
ENVIRONMENTAL SCIENCES Vol.5, No.3 , Spring 2008
۱۰۷-۱۱۲

جداسازی یک مخلوط باکتریایی تجزیه کننده هیدروکربن‌های ذغال سنگی و محلول سازی ضایعات ذغال سنگ

علی ابوالحسنی سورکی [*۱]، غلامحسین ابراهیمی‌پور [۲] و حسین کرمانیان [۳]

۱- پژوهشکده نفت، جهاد دانشگاهی شهید بهشتی تهران
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۳- گروه صنایع خمیر و کاغذ دانشکده مهندسی فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران

چکیده

به منظور جداسازی باکتری‌های قادر به رشد بر روی ذغال سنگ آزمایشات غربال سازی صورت گرفت که با استفاده از ذغال سنگ به عنوان تنها منبع کربن، در مجموع ۷ سویه باکتریایی جداسازی گردید. نتایج حاصل از بررسی پروتئین کل تولیدی، به عنوان شاخصی از مصرف هیدروکربن‌های ذغال سنگی، در محیط پایه معدنی و ذغال سنگ به عنوان تنها منبع کربن نشان داد که مخلوط باکتریایی نسبت به تک تک ایزوله‌ها دارای کارایی بالاتری برای تجزیه ذغال سنگ می‌باشند. جهت بررسی میزان محلول‌سازی ذغال سنگ به‌وسیله کنسرسیوم باکتریایی بدست آمده در محیط پایه معدنی و ذغال سنگ یا ضایعات ذغال‌شویی به عنوان تنها منبع کربن (۱ درصد وزن به حجم) کشت داده شد و به مدت ۱۵ روز بر روی شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. اسپکتروفتومتری مایع رویی حاصل از سانتریفوژ این کشت ۱۵ روزه، اختلاف میزان جذب نور (طول موج ۴۵۰ نانومتر) نسبت به شاهد بدون باکتری را ۱/۴۷۵ برای ضایعات ذغال شویی و ۰/۸۳۲ برای ذغال سنگ سخت، نشان داد. آزمایشات وزن سنجی نیز محلول سازی ذغال سنگ بوسیله این کنسرسیوم باکتریایی را تأیید نمود.

کلیدواژه‌ها: ذغال سنگ، محلول سازی، پسماند ذغال شویی، سوخت بیولوژیک.

Isolation of a Coal-Degrading Bacterial Consortia and Biosolubilization of Coal Wates.

Ali Abolhasani[1*], Gholamhosein Ebrahimiopour[2] and Hosein Kermanian[3]

1- Research Institute of Petroleum, ACECR, Shahid Beheshti Branch, Tehran
2- Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University
3- Department of Pulp and Paper Technology Faculty of New Technologies and Energy, Shahid Beheshti University

Abstract

Screening experiments were carried out to isolate bacterial strains capable of solubilizing coal tailings for use in biofuel production from these byproduct wastes. Using enrichment in medium containing coal as sole carbon source, seven bacterial strains able to grow on coal hydrocarbons were isolated. The bacterial consortium was then cultured in mineral salt liquid media containing 1% (w/v) hard coal or coal tailings and incubated for 15 days at 25 degree centigrade on an orbital shaker (150 rpm). Spectrophotometric analysis of supernatants resulted from centrifugation of cultures showed 1.475 increases in absorbance at 450 nm for coal tailing and 0.832 for hard coal, compared to blank lacking bacteria. Gravimetric measurements also performed wich confirmed the solubilization of coal by bacteria.

Keywords: coal solubilization, coal tailing, biofuel.

* Corresponding author. *E-mail Address*: a_abolhasani@sbu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ذغـال سـنگ بـا کیفیـت پـایین (low rank coal) و پس‌ماندهای ذغال‌شویی از منابع کربنی ارزان قیمت به شمار می‌آیند که درحجم بالایی در دسترس می‌باشد. استفاده از این پس‌ماندها در صنایع کک سازی و غیره از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد. علاوه بر این، حجم انبوه پس‌ماندهای ذغال‌شویی مشکلات زیست- محیطی را نیز باعث می‌گردد که دفع مناسب آن به گونه‌ای که برای طبیعت و محیط زیست بی‌خطر باشد مستلزم صرف هزینه‌های سنگین است. بنابراین یافتن راهکارهای مناسب می‌تواند علاوه بر جلوگیری از آلودگی خاک و آب، صرفه اقتصادی بالایی را نیز در بر داشته باشد. از جمله این راهکارها تولید سوخت‌های بیولوژیک از این پس‌ماندها است که در چند دهه اخیر تحقیقات بسیاری را متوجه خود ساخته است.

تعدادی از گونه‌های باکتریایی و قارچی از راسته دوتومایست‌ها و بازیدیومایست‌ها یافت شده‌اند که قادرند ذغال سنگ با کیفیت پایین را به یک فراورده مایع با ترکیب‌های شیمیایی پیچیده شامل humic acid و fulvic acid تبدیل نمایند (Cohen & Gabriele, 1982; Willmann & Fakoussa, 19997). قارچ *Trichoderma atroviride* قادر است بر روی پلیت‌های حاوی منبع نیتروژن و کربن مناسب، ذغال سنگ را محلول سازی نماید (Hoolker *et al.*, 1997).

هدف از این پژوهش غربال سازی و جداسازی باکتری‌های بومی ایران است که قادر به محلول‌سازی ضایعات ذغال سنگی باشند. امکان کاربرد صنعتی باکتری‌ها به‌دلیل راندمان بالاتری که نسبت به قارچ‌ها دارند و همچنین به‌دلیل این‌که در شرایط فیزیکوشیمیایی دما، pH، شوری و فاکتورهای دیگر در دامنه گسترده‌تری فعال بوده و نیاز به کنترل کمتری دارند، بسیار ساده‌تر و مقرون به صرفه‌تر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

نمونه گیری از معادن متروکه ذغال سنگ و همچنین چوب‌های جنگلی در حال فساد در شهرستان سوادکوه استان مازندران صورت گرفت. نمونه‌ها که شامل آب و لجن در مورد معادن متروکه و چوب‌های پوسیده جنگلی بودند درون ظروف شیشه‌ای درپیچ‌دار استریل برروی یخ، سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان ایزوله کردن باکتری‌ها در یخچال (۴ ºC) نگهداری شدند. نمونه‌هایی از آب و خاک محل نمونه‌گیری نیز به منظور بررسی pH، مقدار نمک، و دیگر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن به آزمایشگاه منتقل شد.

مواد و محیط‌های کشت

کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این پژوهش از درجه خلوص آنالیتیکی بوده و از شرکت مرک خریداری شدند، به جز Tris hydroxymethyl Tris Base) (amino methane که مربوط به شرکت Sigma بود. ذغال سنگ و ضایعات ذغال شویی از شرکت ذغال سنگ البرز مرکزی تهیه شد. ترکیب محیط پایه معدنی شامل ۱/۹۵ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۲۴ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن (II)، ۰/۰۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیوم، ۱۰ گرم کلرید سدیم، ۰/۰۱ گرم کلرید کلسیم و ۱ میلی‌لیتر محلول میکرو عناصر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود (ابراهیمی‌پور و ابوالحسنی، ۱۳۸۳). محلول میکرو عناصر نیز شامل ۷۰ میلی‌گرم کلرید روی، ۱۰۰ میلی گرم کلرید منگنز، ۲۰۰ میلی‌گرم کلرید کبالت، ۱۰۰ میلی‌گرم کلرید نیکل، ۲۰ میلی‌گرم کلرید مس II، ۵۰ میلی‌گرم مولیبدات سدیم، ۲۶ میلی‌گرم سلنیت سدیم، ۱۰ میلی‌گرم وانادات سدیم، ۳۰ میلی‌گرم ولفرامات سدیم، ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲۵ درصد در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. pH محیط‌ها با استفاده از بافر tris روی ۷/۵ تنظیم گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

محیط‌ها در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. سولفات منیزیوم و سولفات آهن جداگانه اتوکلاو شده و پس از سرد شدن به محیطها افزوده شدند.

جداسازی سویه‌های باکتریایی

به منظور افزایش تعداد سویه‌های قادر به رشد بر روی ذغال سنگ، یک مرحله آداپتاسیون و غنی‌سازی انجام شد، که شامل چهار مرحله کشت پیاپی (subculture) بود. برای این منظور از هر نمونه ۲۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط پایه معدنی و ۰/۵ گرم در لیتر ذغال سنگ پودر شده به عنوان تنها منبع کربن کشت داده شد. در کشت‌های بعدی، ۲۰ میلی‌لیتر از کشت غنی شده قبلی به عنوان تلقیح استفاده شد. ارلن‌ها به مدت ۱۵ روز، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بر روی شیکر ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. از کشت غنی شده نهایی، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه شد و از هرکدام ۱۰۰ µl بوسیله میله شیشه‌ای سرکج بر روی پلیت‌های حاوی محیط تریپتیکاز سوی آگار کشت شد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از پلیت‌های مناسب، با بررسی‌های مورفولوژیکی و میکروسکوپی کلنی‌ها، سویه‌های باکتریایی جداسازی شده و بر روی پلیت‌های مجزا کشت داده شدند و پس از حصول رشد مناسب در یخچال قرار داده شدند. همچنین به منظور نگهداری سویه‌ها، باکتری‌ها در محیط تریپتیکاز سوی براث کشت داده شده و پس از حصول رشد مناسب، به یک میلی‌لیتر از محیط کشت ۰/۱ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه شد و نمونه‌ها درون ویال‌های شیشه‌ای ۲ میلی‌لیتری، در داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Sueszmuth *et al.*, 1987).

تست تجزیه ذغال سنگ بوسیله ایزوله‌ها

تک تک باکتری‌های ایزوله شده، در لوله آزمایش حاوی محیط تریپتیکاز سوی براث کشت داده شدند. پس از رشد مناسب لوله‌ها سانتریفیوژ شدند (10000×g). رسوب سلولی با محلول NaCl ۱ درصد استریل شستشو داده و مجدداً در 10000× g سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل بوسیله محلول NaCl ۱ درصد استریل به کدورت ۳ مک فارلند رسانده شد. از هر سوسپانسیون باکتریایی به‌دست آمده ۷۰۰ میکرولیتر به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط پایه معدنی استریل، حاوی ۰/۵ گرم در لیتر ذغال سنگ پودر شده به عنوان تنها منبع کربن، اضافه شد. در مورد کشت مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به ارلن تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر ۲۰۰rpm (Heidolph Unimax 2010) قرار داده شدند. آزمایشات با سه تکرار انجام شدند. از کشت‌های حاصل جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین کل تولیدی استفاده شد.

اندازه گیری پروتئین

از اندازه گیری میزان پروتئین کل سنتز شده، به عنوان شاخص دقیقی از مصرف هیدروکربن‌های ذغال سنگی بوسیله باکتری‌ها استفاده شد. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت در داخل لوله اپندورف در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب سلولی توسط محلول استریل NaCl ۱ درصد شستشو داده شد و مجدداً در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. به رسوب سلولی حاصل ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از به هم زدن, ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH اضافه شد و به هم زده شد. لوله‌ها سپس به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند. رنگ آمیزی پروتئین به روش لاری صورت گرفت (Sueszmuth *et al.*, 1987).

محلول سازی ذغال سنگ

به منظور تعیین میزان محلول‌سازی ذغال سنگ، مخلوط

www.SID.ir

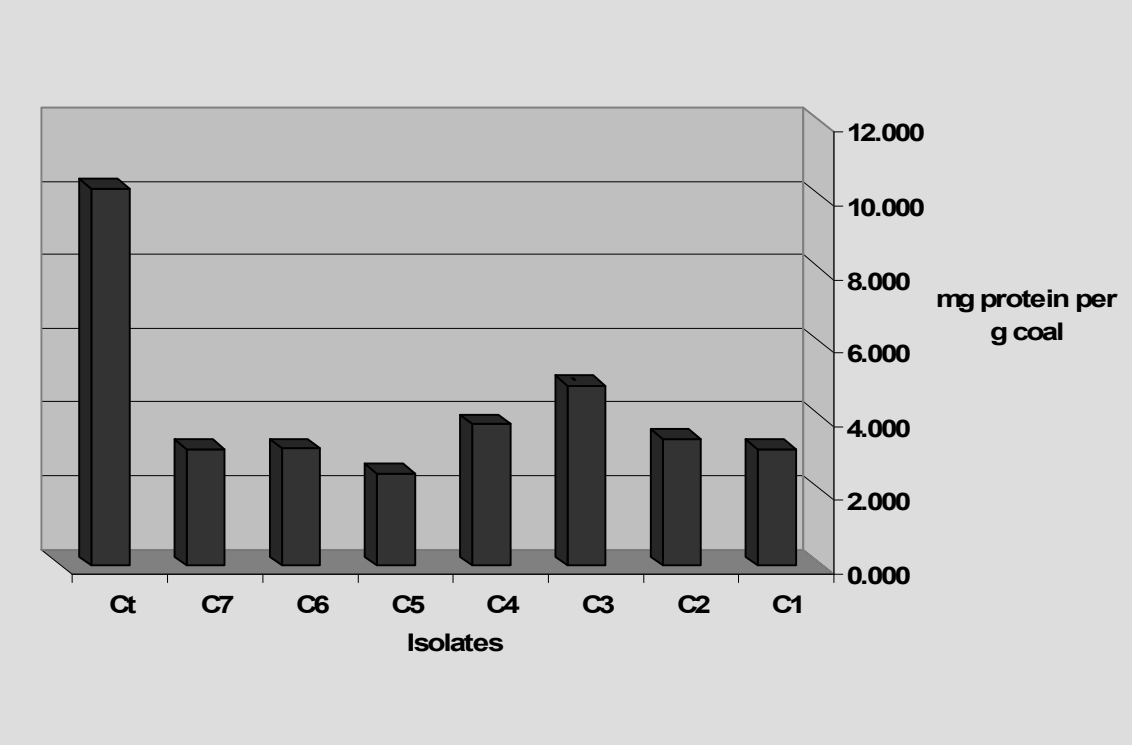
Archive of SID

باکتریایی در محیط پایه معدنی با افزودن مکمل عصاره مخمر (۱ گرم در لیتر)، جداگانه با دو سوبسترای ذغال سنگ پودر شده و پس‌ماندهای ذغال‌شویی کشت داده شدند (Mester *et al.*, 1995). غلظت ذغال سنگ در این آزمایش (w/v) ۱ درصد و تعداد باکتری‌های تلقیح شده حدود 10^6 باکتری در میلی‌لیتر بود. کشت‌ها به مدت ۱۵ روز بر روی شیکر rpm ۲۰۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس کشت‌ها سانتریفوژ شدند (۱۵ دقیقه در g× ۱۰۰۰۰)، محلول رویی فیلتر گردید و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-120-02) اندازه‌گیری شد. با درنظرگیری یک شاهد بدون باکتری، محلول سازی ذغال سنگ با افزایش جذب نور در ۴۵۰ نانومتر سنجیده شد. همچنین آزمایش وزن سنجی نیز، با اندازه‌گیری وزن خشک ذغال سنگ باقی‌مانده بعد از ۱۲ ساعت قرار گرفتن در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، صورت گرفت.

نتایج و بحث

در این تحقیق با استفاده از روش آداپتاسیون و غنی سازی در محیط پایه معدنی که تنها منبع انرژی و کربن آن ذغال سنگ بود، در نهایت ۷ سویه باکتریایی قادر به مصرف هیدروکربن‌های ذغال سنگی جداسازی گردید.

شکل ۱ تولید پروتئین توسط ایزوله‌ها را بر روی سوبسترای ذغال سنگ نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود زمانی‌که مخلوط ایزوله‌ها کشت داده شده بودند تولید پروتئین، که به عنوان شاخصی از تجزیه و مصرف شدن ذغال سنگ توسط باکتری‌ها می‌باشد، بالاترین میزان را نشان می‌دهد. مشاهدات چشمی و میکروسکوپی نیز این موضوع را تأیید نمودند.



شکل ۱- پروتئین کل تولیدی در کشت‌های ۱۵ روزه ایزوله‌ها بصورت تک (C1 تا C7) و مخلوط (Ct) بر روی سوبسترای ذغال سنگ

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲ ذغال سنگ محلول شده را بعد از سانتریفوژ و فیلتر شدن نشان می‌دهد. در این تصویر، مایع حاصل از محلول‌سازی ضایعات ذغال شویی در مقایسه با ذغال سنگ پودر شده و شاهد بدون باکتری نشان داده شده است. سویه‌های باکتریایی ضایعات ذغال شویی را بیشتر از ذغال سنگ پودر شده محلول سازی نمودند. به نظر می‌رسد علت این افزایش تأثیر pH و همچنین تبادلات کاتیونی ترکیبات همراه در ضایعات ذغال سنگی باشد.

آزمایش اسپکتروفتومتری و وزن سنجی نیز نتایج فوق را تأیید می‌نماید (جدول ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود محلول حاصل از کشت کنسرسیوم باکتریایی بر روی ضایعات ذغال شویی ۱/۴۷۵ اختلاف جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر را نسبت به شاهد نشان می‌دهد در صورتی‌که این نتایج در مورد پودر ذغال سنگ ۰/۸۳۲ بود. وزن سنجی ذغال سنگ باقی‌مانده در پایان دوره رشد ۱۵ روزه کنسرسیوم باکتریایی برای ذغال سنگ و پس‌ماند ذغال شویی به ترتیب ۱۲ و ۹ درصد بود.

ذغال سنگ محلول سازی شده می‌تواند به عنوان سوبسترای بالقوه‌ای برای تولید میکروبی سوخت‌های بیولوژیکی مانند اتانول، متانول و متان و همچنین محصولات بیوتکنولوژی دیگر مورد استفاده قرار گیرد. مکانیسم دقیق تجزیه ذغال سنگ و محلول سازی آن همچنان ناشناخته باقی مانده است ولی این‌گونه تصور می‌شود که این فرایندها تحت تأثیر همزمان متابولیت‌های متعدد سلولی (Laborda *et al.*, 1999)، آنزیم‌های لیگنولیتیک (Strandberg & Lewis, 1988)، بیوتنسیدها (Willmann & Fakoussa, 1997)، عوامل چلات کننده و ترکیبات قلیایی (Quigley *et al.*, 1989 و Fakoussa, 1994) می‌باشند.

شکل ۲- محلول سانتریفوژ شده و فیلتر شده حاصل از فرایند محلول سازی ذغال سنگ بوسیله کنسرسیوم باکتریایی. B: شاهد بدون تلقیح باکتری، C: ذغال سنگ پودر شده، و C.T.: پس‌ماندهای ذغال شویی

جدول ۱- اسپکتروفتومتری و وزن سنجی کشت کنسرسیوم باکتریایی بر روی ذغال سنگ و پس‌ماند ذغال شویی

سوبسترا	اختلاف جذب ٤٥٠ نانومتر نسبت به شاهد		درصد کاهش وزن سوبسترا
	شاهد	نمونه	
ذغال سنگ	۰,۰۸۶	۱,۵۶۱	٪۱۲
پس‌ماند ذغال شویی	۰,۰۸۱	۰,۹۱۳	٪۹

www.SID.ir

Archive of SID

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی و پردیس ۲ دانشگاه شهیدبهشتی انجام گردید.

منابع

Cohen M. S. and M.S. Gabriele (1982). Degradation of coal by the fungi Polyporus versicolor and Poria monticola. *Appl Environ Microbiol* 44: 23-27.

Ebrahimipour G. and A. Abolhasani (2004). Isolation of biosurfactant-producing petroleum-degrading bacteria from Persian Gulf and study of pH effect on oil consumption by bacteria. *J. Environ. Studies*. 34:7-14.

Fakoussa, R.M. (1994). The influence of different chelators on the solubilization/liquefaction of different pretreated and natural lignites. *Fuel Process Technol.,* 40: 183-192.

Hoolker U., H. Moonkemann and M. Hoofer (1997). A system to analyze the complex physiological states of solubilizing fungi. *Fuel Process Technol.,* 52: 43-54.

Laborda F., I. F. Monistrol, N. Luna and M. Fernandez (1999). Processes of liquefaction/solubilization of Spanish coals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 52: 49-56.

Mester T., E. De Jong and J. A. Field (1995). Manganese regulation of veratryl alcohol in white-rod fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. *Appl Environ Microbiol*., 61: 1881-1885.

Quigley D.R., B. Ward, D. L. Crawford, H. J. Hatcher, and P. R. Dugan (1989). Evidence that microbially produced alkaline materials are involved in coal biosolubilization. Appl Biochem Biotechnol 21: 753-763.

Strandberg G. W. and S.N. Lewis (1988). Factors affecting coal solubilization by the bacterium Streptomyces setonji 75Vi2 by alkaline buffers. *Appl Biochem Biotechnol* 18: 355-361.

Sueszmuth, R., J. Eberspaecher, R. Haag and W. Springer (1987). *Biochemisch-mikrobiologisches praktikum*. Georg Thieme Verlag. Germany.

Willmann G. and R. M. Fakoussa (1997). Biological bleaching of water-soluble macromolecules by a basidomycete strain. *Appl. Microbiol Biotechnol,* 47: 95-101.

www.SID.ir