Archive of SID

علـوم محـیـطی سال پنجم ، شماره چهارم، تابستان ۱۳۸۷
ENVIRONMENTAL SCIENCES Vol.5, No.4 , Summer 2008
۱۴۵-۱۵۰

# تأثیر غلظت ازت و فسفات معدنی بر تجزیه نفت خام بوسیله دو سویه باکتری نفت خوار جدا شده از رسوبات خلیج فارس

**غلامحسین ابراهیمی‌پور[۱]، علی ابوالحسنی سورکی[۲*]**

*۱- گروه میکروبیلوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران*
*۲- دانشکده مهندسی فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران*

## چکیده

میزان مصرف نفت خام توسط دو سویه باکتریایی PG01 و PG02 جدا شده از رسوبات خلیج فارس در غلظت‌های مختلف ازت و فسفات معدنی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین غلظت‌های بهینه ازت و فسفات در مصرف هیدروکربن‌های نفتی، باکتری‌ها در محیط پایه معدنی حاوی نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و با غلظت‌های مختلف کلرید آمونیوم (منبع ازت) و دی سدیم فسفات (منبع فسفات) کشت داده شدند. گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بر روی شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۵ روز صورت گرفت. میزان پروتئین کل تولید شده، به عنوان شاخص مصرف نفت، نشان داد که غلظت‌های بهینه ازت و فسفات برای تجزیه هیدروکربن‌های نفتی توسط سویه PG01 به ترتیب معادل ۰/۱۴۶ گرم کلرید آمونیوم و ۰/۰۲۴ گرم دی سدیم فسفات و برای سویه PG02 معادل ۰/۲۴۴ گرم کلرید آمونیوم و ۰/۰۲۴ گرم دی سدیم فسفات به ازای یک گرم نفت خام بود.

*کلیدواژه‌ها:* نفت خام، باکتری نفت خوار، خلیج فارس، ازت، فسفات.

**Effect of Mineral Nitrogen and Phosphate Concentration on Oil Degradation by Two Bacterial Isolates from Persian Gulf Sediments**

**Ali Abolhasani[1]*, Gholamhosein Ebrahimipour[2]**

*1- Research Institute of Petroleum, ACECR, Shahid Beheshti University*
*2- Department of Microbiology Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University*

**Abstract**

The effect of nitrogen (N) and phosphate (P) concentrations on crude oil biodegradation by two bacterial strains PG01 and PG02, previously isolated from Persian Gulf, was assessed. In order to determine the optimum concentration of N and P sources for oil consumption bye the isolates, bacteria were cultured in mineral salt medium containing crude oil as sole carbon source and with different concentrations of ammonium chloride (N source) and di-sodium hydrogen phosphate (P source). Culture flasks were incubated at 30 degree centigrade agitating 150 rpm for 5 days. Measuring total protein, as an indicator of petroleum biodegradation, revealed that the optimum N and P concentrations for oil consumption by strain PG01 are equal to 0.146 gram ammonium chloride and 0.024 gram di-sodium hydrogen phosphate per gram crude oil. The other strain, PG02, needed more N source for optimum growth and the results were 0.146 gram ammonium chloride and 0.024 gram di-sodium hydrogen phosphate per gram crude oil.

*Keywords:* crude oil, biodegradation, persian Gulf, nitrogen, phosphate.

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

www.SID.ir

Archive of SID

## مقدمه

در فعالیت‌های مرتبط با نفت خام مانند اکتشاف، استخراج، حمل و نقل و پالایش نفت، مقادیر زیادی از پساب‌های روغنی تولید می‌گردد. پساب‌های روغنی تهدیدی بسیار جدّی برای محیط‌های دریایی و به‌ویژه مناطق ساحلی به حساب می‌آیند. روش‌های فیزیکوشیمیایی مقابله با این آلودگی‌ها نظیر جمع آوری مواد روغنی بوسیله لوله‌های لاستیکی شناور و یا جذب آنها به مواد طبیعی و سنتزی، هرچند در کاهش تأثیرات سوء ترکیبات نفتی بر اکوسیستم‌ها سودبخشند ولی قادر به حذف کامل ترکیبات نفتی از محیط نیستند. در حال حاضر تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی کارآمدترین و مقرون به صرفه‌ترین روش برای حذف ترکیبات نفتی از محیط می‌باشند (Atlas, 1995; Atlas *et al.*, 1995; Eriksson *et al.*, 1999; Guerin, 1999; Venosa *et al.*, 1996).

مطالعه تأثیر عوامل محیطی و بهینه‌سازی آنها، به‌ویژه نقش غلظت مواد معدنی ازته و فسفاته بر کارکرد باکتری‌های تجزیه کننده نفت، از موضوعات حائز اهمیت می‌باشد، که اگرچه مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است، لیکن پژوهش کامل در مورد سویه‌های باکتری‌های نفت‌خوار بومی هر منطقه از اهمیت بسزایی برخوردار است (Guerin, 2000; Atlas, 1981). از این جهت خلیج فارس که یکی از مناطق مهم نفت‌خیز جهان به شمار می‌رود در معرض آلودگی‌های نگران کننده نفتی می‌باشد و مطالعات همه جانبه برای مقابله با این آلودگی‌ها را می‌طلبد.

در این پژوهش تأثیر فاکتورهای غلظت ازت و فسفات معدنی در تجزیه نفت بوسیله دو سویه باکتریایی نفت‌خوار جداسازی شده از آب و رسوبات خلیج فارس، در مقیاس آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و غلظت بهینه این ترکیبات به منظور بالا بردن توانایی آنها در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی تعیین گردید.

## مواد و روش‌ها

### سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

سویه‌های باکتریایی PG01 و PG02، که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند قبلاً از رسوبات و آب دریا در سواحل جزیره قشم جداسازی شده بودند (ابراهیمی‌پور و ابوالحسنی، ۱۳۸۳). ویال‌های فریز شده باکتری‌ها پس از ذوب شدن، بر روی پلیت‌های تریپتیکاز سوی آگار که به آن ۳۲ گرم در لیتر NaCl و ۱۴ گرم در لیتر $MgSO_4, 7H_2O$ اضافه شده بود، کشت داده شدند و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. از کشت ۷۲ ساعته این کلنی‌ها در لوله‌های حاوی آب نمک (۴درصد)، استاندارد ۱ مک فارلند (حدود $10^9$ cell/ml) تهیه گردید و از آن به عنوان مایع تلقیح در آزمایشات تجزیه نفت استفاده شد.

نفت خام مورد استفاده در این مطالعه از شرکت ملی نفت ایران تهیه گردید. ترکیب محیط پایه معدنی که در طول این پژوهش بکار برده شد شامل ۱/۹۵ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۲۴ گرم دی سدیم 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 ۱۰۰۰میلی‌لیتر آب مقطر بود. محلول میکرو عناصر نیز شامل ۷۰ میلی‌گرم کلرید روی، ۱۰۰ میلی‌گرم 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 و لفرامات سدیم، ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲۵ درصد در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. pH محیط‌ها با استفاده از بافر tris روی ۸/۴ تنظیم گردید و 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 (ابوالحسنی، ۱۳۸۱). در مواردی که ذکر خواهد شد



www.SID.ir

Archive of SID

غلظت کلرید آمونیوم (منبع ازت) و دی‌سدیم هیدروژن فسفات (منبع فسفات) تغییر داده شد.

## بررسی تجزیه نفت در مقادیر مختلف ازت ($NH_4Cl$) و فسفات ($Na_2HPO_4$)

برای تعیین مقادیر بهینه ازت و فسفات جهت تجزیه نفت توسط سویه‌های PG01 و PG02، از ارلن‌های شیاردار حاوی ml ۱۰۰ محیط پایه معدنی استفاده شد. غلظت‌های ازت به‌کار رفته شامل ۰/۰۴۹، ۰/۰۹۷، ۰/۱۴۶، ۰/۱۹۵ و ۰/۲۴۴ گرم $NH_4Cl$ و برای فسفات ۰/۰۰۶، ۰/۰۱۲، ۰/۰۱۸، ۰/۰۲۴ و ۰/۰۳۰ گرم $Na_2HPO_4$ به ازای هر گرم نفت خام بود. ارلن‌ها سپس با ۱ میلی‌لیتر باکتری‌های استاندارد شده تلقیح (حدود $10^7$ باکتری در میلی لیتر) و نفت خام استریل اضافه شد (۱ گرم)، و ارلن‌ها در دمای ۳۰°C بر روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند. روزانه فاکتور پروتئین کل به عنوان شاخصی از رشد و مصرف نفت اندازه‌گیری شد.

## اندازه گیری پروتئین

میزان پروتئین کل سنتز شده، به عنوان شاخص دقیقی از مصرف نفت بوسیله باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت در داخل لوله اپندورف در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب سلولی توسط محلول استریل NaCl ۴ درصد شستشو داده شد و مجددا در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. به رسوب سلولی حاصل ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از به هم زدن، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH اضافه شد و مخلوط گردید. لوله‌ها سپس به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند. اندازه‌گیری پروتئین به روش لاری صورت گرفت (Suezmuth *et al.*, 1987) و از آلبومین سرم جنین گاو (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد.

## نتایج و بحث

تخلیه هیدروکربن‌ها به محیط‌های آبی و خاکی که حاوی مقادیر ناچیزی از ازت و فسفات معدنی هستند، اغلب نسبت کربن به ازت و کربن به فسفر را بسیار بالا می‌برد که برای رشد میکروارگانیسم‌ها مناسب نمی‌باشد. به نظر می‌رسد که در دسترس بودن مواد مغذی به‌ویژه ازت و فسفات، مهم‌ترین عامل محدود کننده در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در محیط‌های طبیعی است (Hamme *et al.*, 2003; Leahy *et al.*, 1990) بر اساس مطالعات گسترده دانشمندان، به وضوح مشخص شده است که میزان تجزیه زیستی نفت در محیط‌های دریایی شدیداً به غلظت ازت و فسفات معدنی موجود در محیط بستگی دارد و در این رابطه افزودن کودهای ازتی و فسفاتی مناسب می‌تواند تجزیه زیستی هیدروکربنهای نفتی توسط میکروارگانیسم‌ها را به میزان زیادی افزایش دهد (Atlas & Bartha, 1993; Guerin, 2000; Prince, 1993).

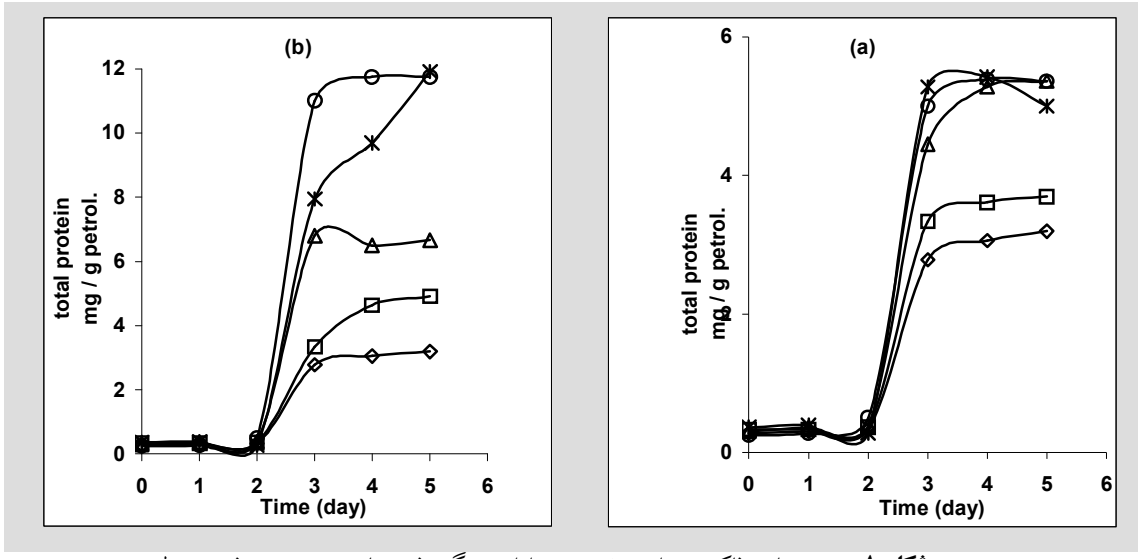
بررسی تأثیر فاکتورهای ازت و فسفات بر تجزیه نفت خام توسط سویه‌های باکتریایی PG01 و PG02 به منظور یافتن حداقل غلظت مکمل‌های ازته و فسفاته که با آن بالاترین میزان فعالیت تجزیه‌کنندگی باکتری‌های مورد نظر حاصل شود، صورت گرفت. شکل ۱ نتایج تأثیر مقادیر مختلف ازت را بر رشد و تجزیه نفت خام نشان می‌دهد. در تمام آزمایشات هر دو سویه در روز دوم رشد وارد فاز لگاریتمی شدند که تا روز سوم ادامه می یافت، ولی میزان مصرف نفت خام موجود و در نتیجه تولید پروتئین توسط باکتری‌ها در شرایط مختلف، متفاوت بود. حداقل مقدار بهینه ازت برای رشد و تجزیه ۱ گرم نفت خام توسط سویه PG01، معادل ۰/۱۴۶ گرم NH4Cl انتخاب شد (شکل a -۱). باکتری نامبرده در حضور ۰/۱۹۵ و ۰/۲۴۴ گرم NH4Cl نیز بطور مشابهی قادر به رشد بود، ولی در مقادیر ۰/۰۴۹ و ۰/۰۹۷ گرم NH4Cl رشد کم تری مشاهده شد. در مورد سویه PG02 مقدار بهینه ازت، ۰/۲۴۴ گرم NH4Cl به ازای یک گرم نفت



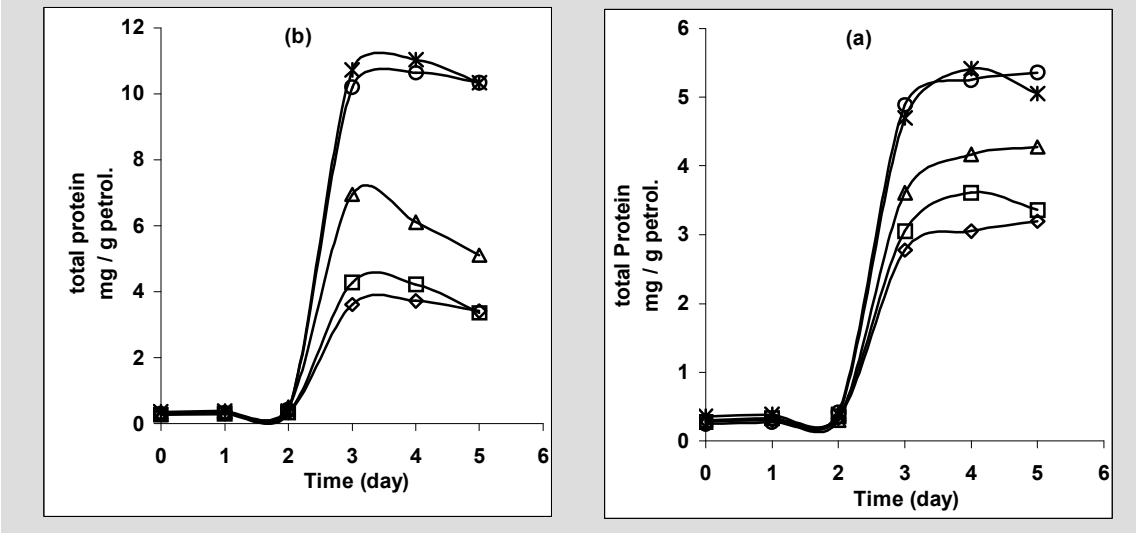
www.SID.ir

Archive of SID

خام بود و در بقیه موارد یعنی هم غلظت بالاتر (۰/۲۴۴ گرم NH4Cl) و هم غلظت‌های پائین‌تر، رشد نسبتاً کمتری حاصل شد (شکل b-۱). حداقل مقدار بهینه فسفات برای مصرف ۱ گرم نفت خام در مورد هردو سویه معادل ۰/۰۲۴ گرم $Na_2HPO_4$ بود (شکل a,b-۲). در غلظت‌های دیگر به‌کار برده شده نیز رشد صورت گرفت ولی در غلظت‌های پائین‌تر رشد کمتری حاصل شد و در غلظت بالاتر یعنی ۰/۰۳۰ گرم نیز رشد مشابه ۰/۰۲۴ گرم $Na_2HPO_4$ بود و چون حداقل مقدار فسفات لازم برای تجزیه نفت خام موجود، مورد نظر می‌باشد، مقدار ۰/۰۲۴ گرم $Na_2HPO_4$ به عنوان غلظت بهینه P انتخاب شد.




**شکل ۱** – بهینه سازی فاکتور میزان N (NH4Cl) به ازای هر گرم نفت خام، جهت تجزیه نفت توسط سویه‌های باکتریایی PG01 (a) و PG02 (b) در محیط نفت بعنوان تنها منبع دهنده الکترون. = ۰/۰۴۹ گرم، = ۰/۰۹۷ گرم، = ۰/۱۴۶ گرم، = ۰/۱۹۵ گرم، = ۰/۲۴۴ گرم NH4Cl




**شکل ۲** – بهینه سازی فاکتور میزان P (Na2HPO4) به ازای هر گرم نفت خام، برای سویه‌های باکتریایی نفت خوار PG01 (a) و PG02 (b) در محیط نفت بعنوان تنها منبع دهنده الکترون. = ۰/۰۰۶ گرم Na2HPO4، = ۰/۰۱۲ گرم Na2HPO4، = ۰/۰۱۸ گرم Na2HPO4، = ۰/۰۲۴ گرم Na2HPO4 و = ۰/۰۳۰ گرم Na2HPO4



www.SID.ir

Archive of SID

بـر طبـق گـزارش گیـبس، حـداقل مقـدار ازت و فسفات مورد نیاز برای تجزیه زیستی هر گرم نفت خـام در دریـا معـادل ۰/۱۹۵ گـرم $NH_4Cl$ و ۰/۰۲۴ گـرم $Na_2HPO_4$ بـود (Gibbs, 1975). بـا ایـن وجـود بررسـی‌هـای دقیـق در مـورد بـاکتری‌هـای بـومی هـر منطقـه ضـروری بـه نظـر مـی‌رسـد و باعـث افـزایش رانـدمان کـار و کـاهش هزینـه‌هـای اجرایـی جهـت اسـتفاده از بـاکتری‌هـا در مقیـاس صـنعتی مـی‌شـود. در ایـن تحقیـق مقـادیر بهینـه فسفات بـرای هـر دو سـویه مـشابه میـزان پیـشنهاد شـده توسـط گیـبس بـود ولـی مقـادیر بهینـه ازت بـرای سـویه‌هـای PG01 و PG02 بـه ترتیب ۰/۱۴۶ و ۰/۲۴۴ به‌دست آمد.

## تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت معاونـت پژوهـشی دانـشگاه شـهید بهشتی و پردیس ۲ دانشگاه شهید بهشتی انجام گردیـد. از شرکت ملی نفت ایران به خاطر فـراهم نمـودن نفـت خـام تشکر می‌شود.

## منابع

Abolhasani, A. (2002). Isolation and optimization of hallophile petroleum degrading bacteria from Persian Gulf. M.Sc. thesis. Shahid Beheshti University.

Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev*. 45:180–209.

Atlas, R. M. (1995). Bioremediation. Chemical and Engineering News, 73(14), 32–42.

Atlas, R. M., F. Laborda, I. B. Beech, and M. Sylvestre (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *Biosorption and bioremediation*, 35:317–327.

Atlas, R.M., and N. Bartha (1993). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 3rd ed. Amsterdam. Addison Wesley Longman Publishers.

Ebrahimipour, G., and A. Abolhasani (2004). Isolation of biosurfactant producing oil degrading bacteria from Persian Gulf, and evaluation of effect on oil consumption by isolates. 34: 7-14.

Eriksson, M., G. Dalhammar, and A.-K. Borg-Karlson (1999). Aerobic degradation of a hydrocarbon mixture in natural uncontaminated potting soil by indigenous microorganisms at 20°C and 6°C. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 51:532–535.

Gibbs, C. F. (1975). Quantitative studies on marine oil biodegradation of crude oil. I. Nutrient limitation at 14ºC. *Proc. Roy. Soc. London*. 188:61-82.

Guerin, T. F. (1999). Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *Journal of Hazardous Material*, 65: 305–315.

Guerin, T. F. (2000). Long term performance of a land treatment facility for bioremediation of non-volatile oily wastes. *Resources, Conservation and Recycling*, 28:105–120.

Leahy, J. G. and R. Colwell (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev*. 54:305–315.

Loehr, R. C., and M. T. Webster (1996). Performance of long-term, field-scale bioremediation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 50:105–128.

Prince, R.C. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol*. 19: 217-242.



www.SID.ir

Archive of SID

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

Van Hamme, J. D., A. Singh, O.P. Ward (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. Microbiol. *Mol. Biol. Rev*., 67:503–549.

Venosa, A. D., M. T. Suidan, J. R. Haines, B. A. Wrenn, K. L. Strohmeir, B. L. Eberhart Looye, M. Kadkhodayan, E. Holder, D. King, and B. Anderson (1996). Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environ. Sci. Technol*. 30:1764–1775.

www.SID.ir