علوم محیطی ۸ ، تابستان ۱۳۸۴
ENVIRONMENTAL SCIENCES 8 , Summer 2005
۶۵-۷۴

جداسازی یک باکتری هالوتولرانت نفت خوار و بررسی اثر فاکتورهای محیطی در تجزیه زیستی نفت خام به منظور حفظ محیط زیست

غلامحسین ابراهیمی پور
دکترای میکروبیولوژی، استادیار دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی
مریم امینیان
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی
علی ابوالحسنی سورکی
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، مربی دانشکده مهندسی فن آوریهای نوین، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

آلودگی‌های نفتی رودخانه‌ها، چشمه‌های آب شیرین و خاک‌ها که می‌تواند ناشی از ترکیدن لوله‌های نفت، پساب کارخانجات مرتبط با صنایع نفتی و غیره باشد، یکی از مشکلات عمده تهدیدکننده محیط زیست و همچنین بهداشت عمومی شده است. تلاش‌های زیادی در جهت رفع این آلودگی‌ها به روش‌های مختلفی در کشورهای جهان صورت گرفته است. یکی از این روش‌ها که هم از لحاظ اقتصادی کم هزینه و هم از لحاظ زیست محیطی بسیار مناسب می‌باشد، استفاده از باکتری‌ها در جهت رفع آلودگی‌های نفتی است. در این مطالعه یک سویه باکتریایی گرم مثبت هالوتولرانت از یک چشمه آب شیرین واقع در اطراف دزفول جداسازی شد که قادر است ترکیبات نفتی را به‌طور مؤثری مینرالیزه نماید. این سویه در طول رشد در ارلن‌های حاوی محیط نفت به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، ابتدا تولید بیوسورفاکتانت نموده که موجب امولسیونه کردن نفت در فاز آبی محیط شده و سپس نفت خام موجود را با تولید بیوماس مصرف می‌کند که به تدریج رنگ محیط‌ها از تیره به روشن تغییر می‌کند. تأثیر فاکتورهای PH، غلظت نمک و غلظت‌های مختلف نیتروژن و فسفر در تجزیه زیستی نفت خام توسط این سویه مورد بررسی قرار گرفت. دو شاخص کدورت سنجی در طول موج ۶۵۰ nm و سنجش پروتئین کل تولید شده، به عنوان شاخص‌های رشد و مصرف نفت در نظر گرفته شد. نتایج حاکی از آن بود که باکتری، اپتیمم رشد و فعالیت تجزیه کنندگی خود را در PH ۸/۵ غلظت نمک صفر تا پنج درصد، حداقل غلظت منبع نیتروژن ۰/۲۹۲ گرم NH_4Cl، و حداقل غلظت منبع فسفر ۰/۰۳۶ گرم Na_2HPO_4، جهت مصرف یک گرم نفت خام دارا می‌باشد.

کلید واژه‌ها: آلودگی‌های نفتی، تجزیه زیستی، بیوسورفاکتانت، هالوتولرانت.

Isolation of a Petroleum-degrading Halo Tolerant Bacterium and Study the Effects of Environmental Factors in Biodegrading for Environmental Protection

Gholamhossein Ebrahimipour, Ph.D.
Assistant Professor, Faculty of Science, Shahid Beheshti University
Maryam Aminian, M.Sc.
Faculty of Science, Shahid Beheshti University
Ali Abolhasani Soorki, M.Sc.
Instructor, Faculty of New Technologies Engineering, Shahid Beheshti University

Abstract

Soil and water petroleum pollution threatens living organisms in the environment. This pollution can be removed by an economically cheap and environmentally safe method using bacteria. In this study, a halo tolerant bacterium was isolated from a spring near Dezful in Khuzestan which could effectively degrade petroleum. During growth in a mineral-base medium containing 1 gram per liter of crude oil as the sole carbon source, this strain produced biosurfactants that emulsified oil in the aquatic phase of the medium. The effects of different pH and salinity conditions on petroleum biodegradation were also studied and the minimum amounts of nitrogen and phosphorus sources needed for the optimal degradation of 1-gram crude oil was determined. For obtaining growth curves of bacterium in a mineral-base medium and evaluating oil consumption, both the spectrophotometry (650 nm) method and the Lowry method of total protein determination were performed daily. Results showed that the optimal conditions for petroleum biodegradation were pH 8.5 and a salinity of 0-5 % NaCl. Also, the minimum N and P sources needed for degrading 1 gram crude oil were equal to 292 mg NH_4Cl and 36 mg Na_2HPO_4, respectively.

Keywords: Biodegradation, Biosurfactant, Halo tolerant and Oil Pollution.

مقدمه

هر ساله مقادیر معتنابهی نفت و ترکیبات نفتی از راه‌های مختلف نظیر جنگ، نشت لوله‌های نفتی، فعالیت‌های حفاری و اکتشاف نفت، پالایشگاه‌ها و صنایع مرتبط با نفت خام وارد محیط زیست می‌شود، که این مقدار تقریبا ۳۲۰ میلیون تن تخمین زده می‌شود (Etkin *et al.*, 1998). مناطق نفت خیز جهان به‌طور یکنواخت بر روی کره زمین پراکنده نشده‌اند بلکه به نواحی ویژه‌ای نظیر منطقه خلیج فارس محدود شده‌اند، لذا این مناطق در معرض بیشترین آلودگی نفتی قرار دارند. به‌عنوان مثال حدود ۹ میلیون بشکه نفت خام فقط در اثر جنگ خلیج فارس در سال ۱۹۹۱ میلادی وارد محیط دریا شد که با ایجاد لکه نفتی به بزرگی ۶۰۰ مایل مربع، باعث بروز مشکلات بسیاری گردید (Canby, 1991). همچنین باران‌های سیاه ناشی از سوختن ناقص نفت خام، مقادیر زیادی از ترکیبات هیدروکربنی را وارد زیستگاه‌های طبیعی و ارزشمند منطقه کرد.

این آلودگی‌های نفتی تحت تأثیر عوامل طبیعی مختلفی مانند تبخیر شدن، فتواکسیداسیون و تجزیه زیستی برطرف می‌شوند (Rheinheimer, *et al.*, 1994;1981). تخریب زیست محیطی از جانب این آلودگی‌های نفتی، نیاز به استراتژی‌های سازگار با محیط زیست را برای برطرف کردن آنها مطرح کرده است. در این بین، تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها، نقشی اساسی را به خصوص در حذف اجزای غیر فرار نفت از محیط زیست ایفا می‌کند (Cunningham *et al.*, Harayama *et al.*, 1999 2001). تاکنون تعداد زیادی از باکتری‌های تجزیه کننده اجزای نفتی جداسازی شده‌اند، ولی با این وجود تعداد کمی از آنها به نظر می‌رسد که در تجزیه زیستی نفت در محیط‌های طبیعی حائز اهمیت باشند. در این مطالعه، یک سویه باکتریایی از چشمه آبی واقع در شمال دزفول جداسازی شد که قادر است ترکیبات نفتی را به‌طور بسیار موثری مینرالیزه نماید و ترکیبات سمی نفت را به بیوماس میکروبی، گاز کربنیک و آب تبدیل کند که نه تنها برای محیط زیست بی‌خطر می‌باشد، بلکه می‌تواند به‌عنوان شروع کننده یک زنجیره غذایی برای آبزیان به حساب آید.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

نمونه گیری از چشمه سربیشه در شمال دزفول واقع در استان خوزستان صورت گرفت. نمونه‌ها تا زمان ایزوله کردن باکتری‌ها در یخچال (۴ °C) نگهداری شدند و به منظور هوادهی، درب آنها به صورت نیمه باز گذاشته شد. فاکتورهای PH، درصد نمک و دمای آب چشمه نیز به ترتیب بوسیله PH متر، رفرکتومتر و ترمومتر در زمان نمونه برداری تعیین شدند.

محیط‌های کشت

محیط ۱: محیط YP- آگار که از ۵ گرم عصاره مخمر (Merck)، ۳ گرم باکتوپپتون (Difco)، ۱۲ گرم آگار آگار (Merck) و ۳۰ گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر تشکیل شده بود.

محیط ۲: محیط YP- براث که از ۱/۲۵ گرم عصاره مخمر(Merck) و ۰/۷۵ گرم باکتوپپتون (Difco) در یک لیتر آب مقطر تشکیل شده بود.

محیط ۳: محیط پایه که در تست‌های تجزیه زیستی نفت خام مورد استفاده قرار گرفت دارای ترکیبات زیر بود: ۰/۱۹۵ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۰۲۴ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ۰/۰۰۱ گرم سولفات آهن (II)، ۰/۰۰۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۰۱ گرم سولفات منیزیوم، ۰/۰۰۱ گرم کلرید کلسیم، ۳ گرم کلرید سدیم و ۰/۱ میلی لیتر محلول عناصر میکرو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود (Schlegel, 1992). مقادیر نامبرده دی سدیم هیدروژن فسفات (منبع P) و کلرید آمونیوم (منبع N)، بر اساس روش گیبس (Gibbs, 1975) برای تجزیه ۱ گرم نفت خام

به‌کار برده شد. محلول میکرو عناصر نیز شامل ۷۰ میلی گرم کلرید روی، ۱۰۰ میلی گرم کلرید منگنز، ۲۰۰ میلی گرم کلرید کبالت، ۱۰۰ میلی گرم کلرید نیکل، ۲۰ میلی گرم کلرید مس II، ۵۰ میلی گرم مولیبدات سدیم، ۲۶ میلی گرم سلنیت سدیم، ۱۰ میلی گرم وانادات سدیم، ۳۰ میلی گرم ولفرامات سدیم، ۱ میلی لیتر اسید کلریدریک درصد۲۵ در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود.

PH محیط‌ها قبل از اتوکلاو بر روی ۷/۹ تنظیم شد. نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن به میزان (w/v) درصد۱ در محیط‌های مایع به‌کار برده شد. کلیه آزمایش‌ها در شرایط استریل انجام شدند.

جداسازی باکتری‌ها

رقّت‌هایی از نمونه آب تهیه گردید و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به‌وسیله میله شیشه‌ای سرکج (دریگالسکی)[۲] بر روی پلیتهای YP- آگار کشت داده شد و در دمای ^{o}C ۲۵±۵ انکوبه شدند. سپس کلنی‌های با مورفولوژی متفاوت برداشته شدند و با کشتهای متوالی بر روی YP- آگار خالص سازی شدند. باکتریهای ایزوله شده، از لحاظ توان تولید بیوسورفاکتانت و تجزیه نفت مورد آزمایش قرار گرفتند.

تست تجزیه زیستی نفت خام

بررسی مینرالیزه کردن نفت خام توسط ایزوله‌های خالص سازی شده، با تلقیح حدود 10^{8} باکتری به ارلن‌های شیار دار حاوی ۱۰۰ ml محیط پایه صورت گرفت. یک ارلن شاهد بدون باکتری نیز تهیه شد. ارلن‌ها پس از افزودن یک گرم نفت خام استریل در دمای آزمایشگاه (^{o}C ۲۵±۵) بر روی شیکر (۱۴۰rpm) قرار داده شدند و از جهت تولید بیوسورفاکتانت (بر اساس مشاهده ایجاد امولسیون نفت در آب) و مصرف کردن نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی (روشن شدن رنگ محیط) مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از این تکنیک از بین ۱۵ سویه جداسازی شده، یک سویه که از لحاظ مینرالیزه کردن نفت خام بسیار سریع و مؤثر بود به عنوان سویه برتر در تجزیه زیستی نفت خام انتخاب گردید که PDO1 نامگذاری شد. این سویه قادر بود که در مدت ۵ روز نفت خام را به‌طور قابل توجهی مینرالیزه نماید.

تست هالوفیلیته

برای بررسی توانایی رشد باکتری مذکور در درصدهای مختلف نمک و بررسی اینکه آیا سویه هالوتولرانت است، این آزمایش انجام شد. برای این منظور از محیط YP- براث استفاده شد. سپس باکتری در محیط کشت مذکور، با غلظتهای صفر تا ۷ درصد نمک تلقیح شد و در ^{o}C ۳۰ انکوبه گردید. رشد باکتری‌ها از نظر ایجاد کدورت در محیط کشت بررسی گردید.

بررسی اثر PH و غلظت نمک و تعیین حداقل مقدار مورد نیاز N و P برای مینرالیزه کردن نفت خام توسط سویه PDO1

برای این منظور باکتری در ارلن‌های شیار دار ml ۲۵۰ حاوی ml ۱۰۰ محیط پایه کشت داده شد و به ترتیب مقادیر اپتیمم PH، نمک، N و P تعیین شدند. در ابتدا به منظور تعیین PH اپتیمم، PH محیط‌ها توسط بافر Tris/HCl قبل از اتوکلاو بر روی ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵، ۹، ۹/۵، ۱۰، ۱۰/۵، ۱۱، ۱۱/۵ و ۱۲ تنظیم شد. با درنظر گرفتن PH اپتیمم، به منظور تعیین مقدار اپتیمم نمک، مقادیر مختلف صفر تا هفت درصد کلرور سدیم به محیط‌ها افزوده شد. سپس با درنظر گرفتن مقادیر اپتیمم دو فاکتور PH و نمک، برای تعیین حداقل مقدار اپتیمم N برای تجزیه یک گرم نفت خام توسط سویه غربال سازی شده، مقادیر متفاوت یک چهارم تا هفت چهارم مقدار N ارائه شده توسط گیبس یعنی ۰/۰۴۹، ۰/۰۹۷، ۰/۱۴۶، ۰/۱۹۵، ۰/۲۴۴، ۰/۲۹۲ و ۰/۳۴۱ گرم NH_4Cl در محیط‌ها بکار برده شد. در نهایت، برای تعیین حداقل مقدار اپتیمم P

برای تجزیه یک گرم نفت خام نیز مقادیر متفاوت یک چهارم تا هفت چهارم مقدار P ارائه شده توسط گیبس یعنی ۰/۰۰۶، ۰/۰۱۲، ۰/۰۱۸، ۰/۰۲۴، ۰/۰۳ ۰/۰۳۶ و ۰/۰۴۲ گرم Na_2HPO_4 در محیط‌ها استفاده شد.

ارلن‌ها پس از تلقیح حدود 10^8 باکتری و افزودن یک گرم نفت خام استریل، در دمای آزمایشگاه ($25\pm5\ ^oC$) بر روی شیکر (۱۴۰ rpm) قرار گرفتند و روزانه به منظور بررسی رشد با استفاده از تعیین OD ۶۵۰ nm و پروتئین کل، نمونه برداری صورت گرفت.

اندازه گیری پروتئین

در این مطالعه اندازه گیری میزان پروتئین کل سنتز شده، یکی از شاخص‌های دقیق تجزیه زیستی نفت، محسوب می‌شود. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت در داخل لوله اپندورف در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب سلولی توسط سود ۰/۳ مولار به مدت ۹۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد لیز شد. رنگ آمیزی پروتئین به روش لاری (Sueszmuth *et al.*, 1987) صورت گرفت و با استفاده از منحنی خطی استاندارد از آلبومین سرم گاوی، مقدار پروتئین کل تولیدی، به‌طور روزانه تعیین شد.

نتایج و بحث

اتفاقات ناگوار تانکرهای نفتکش در دریاها از اواسط دهه ۱۹۸۰ میلادی، مقامات مسئول محیط زیست بین المللی را متوجه اثرات زیست محیطی ناشی از این آلودگی‌ها و تلاش در جهت یافتن راه‌حل‌هایی برای رفع آنها کرده است. بررسی‌های میکروبیولوژیکی نشان داد که طبیعت خود قادر به رفع این آلودگی‌های نفتی، با روندی آهسته ولی مؤثر می‌باشد، و با فراهم آوردن شرایط اپتیمم می‌توان این فرآیندهای طبیعی را از نظر زمانی شتاب داد (Gibbs, 1975; Atlas, 1977). حضور هیدروکربن‌های نفتی در محیط، طی دوره‌های تکاملی میکروارگانیسم‌هایی را در جهت استفاده از این ترکیبات به‌عنوان منبع کربن و انرژی تکامل داده است. این پژوهش نیز در راستای دستیابی به همین هدف، یعنی جداسازی یک باکتری هالوتولرانت که قادر باشد با تولید بیوسورفاکتانت نفت را تجزیه کند، صورت گرفت که امکان استفاده از آن در اکثر مناطق ایران وجود دارد. باکتری‌هایی که بطور انتخابی از میکروارگانیسم‌های بومی مناطق نفت‌خیز ایزوله می‌شوند، عمدتاً برای درمان زیستی مناطق آلوده به نفت در آینده به‌کار خواهند رفت (Lazar *et al.*, 1997). عموماً در میکروبیولوژی صنعتی به‌منظور یافتن میکروارگانیسمی با فعالیت خاص، مکان‌هایی مد نظر قرار می‌گیرند که با داشتن شرایط محیطی ویژه، القاء این فعالیت خاص را موجب گردند (Korda *et al.*, 1997). لذا با همین فرض، جهت یافتن یک باکتری هالوتولرانت نفت‌خوار، از چشمه‌ای واقع در دزفول در استان خوزستان نمونه‌گیری شد، که به‌طور طبیعی در معرض این آلاینده قرار دارد. همچنین درصد نمک این چشمه در معرض تغییرات بسیار شدید قرار دارد به‌طوریکه در تابستان که تبخیر آب بیشتر است، بیش از ۷ درصد بوده و در زمستان که میزان بارش بیشتر است، این مقدار تا حدود صفر می‌رسد. با آگاهی به این مطالب، احتمال حضور یک باکتری هالوتولرانت نفت‌خوار در این منطقه بسیار بالاست و هدف از این انتخاب، امکان استفاده از این سویه در اکثر آبها و خاک‌های شور و شیرین کشور می‌باشد. جدول ۱ برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی چشمه مورد نمونه گیری را نشان می‌دهد.

در این مطالعه با استفاده از تکنیک غربال سازی، ۱۵ سویه باکتریایی جداسازی شد که ۵ سویه قادر به تولید بیوسورفاکتانت در محیط نفت بودند. از بین این سویه‌ها، PDO1 به عنوان سویه برتر در تولید بیوسورفاکتانت و تجزیه زیستی نفت خام انتخاب شد. به‌طوریکه در کمتر از ۵ روز نفت خام موجود را تقریباً به‌طور کامل مصرف

کرد و رنگ محیط کشت کاملاً روشن گردید و دیگر هیچ نفتی در محیط مشاهده نشد. در شکل ۱ به ترتیب مراحل قبل از شروع رشد باکتری، تولید بیوسورفاکتانت و پس از مصرف شدن نفت توسط سویه PDO1 مشاهده می‌گردد. باکتری مذکور با تولید بیوسورفاکتانت نفت خام را امولسیونه می‌نماید که با این عمل نسبت سطح به حجم نفت بسیار افزایش می یابد (Schlegel, 1992) و کارآیی باکتری در میرالیزه کردن نفت به‌طور قابل توجهی بالا می‌رود. شکل ۲ اتصال باکتری‌های سویه PDO1 به قطره‌های ریز معلق نفت را نشان می‌دهد. تولید بیوسورفاکتانت توسط میکروارگانیسم‌های میرالیزه کننده ترکیبات نفتی و یا افزودن سورفاکتانت‌ها به محیط آنها کارایی آنها را در مصرف نفت، بسیار افزایش می‌دهد (Moran *et al.*, Desai *et al.*, *1997*; Bardi, 2000; Rahman *et al.*, 2002 ; 2000;). به دام افتادن سلول‌های باکتری درون قطرات نفت باعث غیر فعال شدن سلول می‌شود و پوشیده شدن محیط توسط لایه نفتی، مانع از نفوذ اکسیژن مورد نیاز برای متابولیسم باکتری‌ها به‌درون محیط می‌شود که بیوسورفاکتانت با امولسیونه کردن نفت از این اثرات ممانعت به عمل می‌آورد (Schlegel, 1992; Rheinheimer, 1981).

در بررسی اثر فاکتورهای محیطی در تجزیه نفت توسط باکتری ایزوله و انتخاب شده در این پروژه دو شاخص کدورت سنجی در طول موج ۶۵۰ nm و سنجش پروتئین کل تولید شده، به عنوان شاخص‌های رشد و مصرف نفت مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۳ نتایج حاصل از این بررسی را در مورد فاکتور PH نشان می دهد. همانطور که مشخص است، سویه PDO1 قادر است در دامنه وسیعی از PH ۷ تا ۱۱ فعالیت کند و نفت خام موجود را میرالیزه نماید که منحنی رشد سلولی و پروتئین کل تولیدی نشان دهنده این مطلب می‌باشد (شکل ۳- الف و ب). باکتری در PH ۸/۵ و ۹ نسبت به سایر PHها سریع‌تر وارد فاز رشد لگاریتمی شده یا به عبارتی دیگر فاز تاخیر کوتاه‌تری دارد. در PH ۸/۵ میزان پروتئین کل تولیدی پس از ۵ روز، ۵/۷ و در محیط با PH۹، ۵ میلی گرم بود. در PHهای ۶ و ۶/۵ رشد بسیار کمی مشاهده شد درحالیکه در PHهای ۱۱/۵ و ۱۲ هیچ‌گونه رشدی صورت نگرفت (شکل ۳- الف و ب). گزارش شده است که تولید بیوسورفاکتانت‌های آنیونی و همچنین متابولیسم ترکیبات نفتی توسط باکتری‌ها که باعث ایجاد مواد حد واسط اسیدی می شود، سبب کاهش PH محیط، به‌ویژه در سطح آزمایشگاهی می‌شود و از این لحاظ بررسی و کنترل PH محیط کشت بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی میرالیزه کردن نفت توسط سویه PDO1 در غلظت‌های مختلف نمک در شکل ۴ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج باکتری هالوتولرانت PDO1 قادر است در غلظت‌های صفر تا هفت درصد کلرور سدیم (تقریباً معادل صفر تا ۱/۲ مول NaCl) رشد نموده و نفت خام را میرالیزه نماید؛ هرچند در شوری‌های ۶ و ۷ درصد کلرور سدیم میزان میرالیزه کردن کاهش یافته است (شکل ۴- الف و ب). بنا به اظهارات Gilmor (1990)، Marquez *et al.*, (1987) و Rheinheimer (1981)، میکروارگانیسم‌هایی که با آب شیرین و شور قادر به رشد هستند هالوتولرانت نامیده می‌شوند. Gilmor مقدار نمک برای این باکتری‌ها را بین صفر تا ۱ مول NaCl (بین صفر تا حدود ۶ درصد) بیان کرده است. همچنین نتایج تست هالوفیلیته موید هالوتولرانت بودن سویه مذکور می‌باشد (جدول ۲) .

این‌طور به نظر می‌رسد که به‌دلیل آنکه چشمه محل نمونه برداری در طول سال دارای تغییرات زیاد شوری می‌باشد، باکتری جداسازی شده نسبت به این تغییرات سازگار شده و قادر به فعالیت در دامنه تغییرات مربوطه می‌باشد. هالوتولرانت بودن سویه PDO1 مزیت آن محسوب می‌گردد، چرا که می‌توان از آن در رفع آلودگی‌های نفتی اکثر آبها، رسوبات و خاک‌های شیرین و شور (تا ۷

درصد نمک) کشور استفاده کرد. به عنوان مثال از سویه مذکور می‌توان در خلیج فارس (حدود ۳/۵ درصد نمک) و علی‌الخصوص دریای خزر (حدود ۱ درصد نمک)، که امروزه از لحاظ وجود مخازن نفتی در آن مورد توجه قرار گرفته و بطور ناخواسته در معرض آلودگی اتفاقی ناشی از این مواد می‌باشد، استفاده نمود.

به‌دلیل آنکه چشمه محل نمونه برداری نسبت به دریا حجم نسبتاً محدودی دارد، شرایط محیطی تاثیر نسبتاً زیادی بر روی آن دارند و در طول سال دستخوش تغییرات زیاد فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مانند نمک و غیره می‌گردد و این تغییرات در اکولوژی میکروبی آب اثر می‌گذارد. طبیعتاً، باکتری جداسازی شده از این چشمه به این تغییرات سازگار شده و قادر به فعالیت در دامنه تغییرات مربوطه می‌باشد. این خصوصیت مزیتی را فراهم می‌نماید که بتوان از سویه جداسازی شده در رفع آلودگی‌های نفتی در شرایط محیطی مختلف از نظر نمک بهره برد.

در مطالعات وسیعی که بر روی تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری‌ها در محیط‌های طبیعی صورت گرفته است، گزارش شده که مقدار مواد مغذی معدنی شامل منابع N و P موجود در محیط، از فاکتورهای مهم تعیین کننده سرعت و میزان مینرالیزه شدن هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد (Atlas & Bartha, 1993). گیبس مقدار N و P لازم برای تجزیه یک گرم نفت خام را به ترتیب معادل ۰/۱۹۵ گرم NH_4Cl و ۰/۰۲۴ گرم Na_2HPO_4 گزارش کرده است. از آنجاییکه در مطالعات تجزیه زیستی نفت خام، تعیین حداقل مقدار مورد نیاز N و P، جهت حفظ محیط زیست و همچنین کاهش هزینه‌های کاربردی لازم می‌باشد، در این مطالعه مقادیر یک چهارم تا هفت چهارم موارد گزارش شده توسط گیبس انتخاب گردید و مینرالیزه شدن نفت خام در شرایط نامبرده مورد بررسی قرار داده شد که نتایج آن در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل‌ها مشخص است حداقل مقدار موثر N و P برای تجزیه ۱ گرم نفت خام توسط سویه PDO1 به ترتیب معادل ۰/۲۹۲ گرم NH_4Cl و ۰/۰۳۶ گرم Na_2HPO_4 تعیین شد که نسبت به موارد گزارش شده توسط گیبس بالاتر می‌باشد.

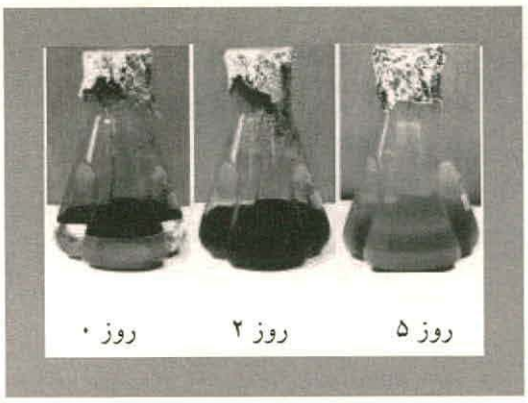
جدول ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی چشمه سریشه در زمان نمونه برداری

دمای آب	شوری	pH
۲۹ درجه سانتی گراد	۳۰ ‰	۷/۹

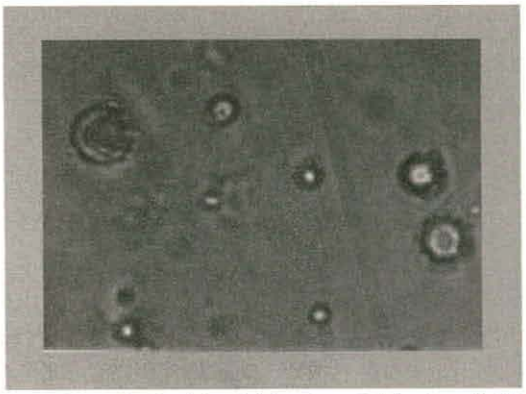
جدول ۲- نتایج تست هالوفیلیته: رشد بر روی محیط پپتون- عصاره مخمر براث (PH 7.9) به اضافه مقادیر نامبرده کلرید سدیم، پس از ۷ روز

غلظت NaCl	٪۰	٪۱	٪۲	٪۳	٪۴	٪۵	٪۶	٪۷	٪۸	٪۹	٪۱۰
رشد	++	++	++	++	++	++	+	+	+	(+)	-

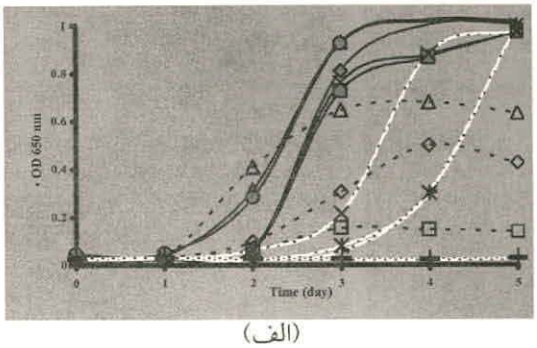
++ : خیلی خوب، + : خوب ، (+) : ضعیف و - : فاقد رشد



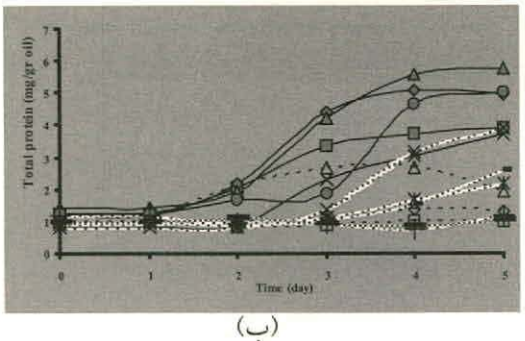
شکل ۱- مراحل تولید بیوسورفاکتانت و تجزیه نفت توسط باکتری PDO1.



شکل ۲- میکروارگانیسم‌ها در اطراف ذرات امولسیونه شده نفت خام در محیط مایع. فلش‌ها، باکتری‌ها را دور ذرات نفت خام نشان می‌دهد.

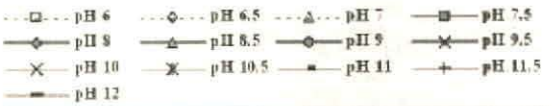


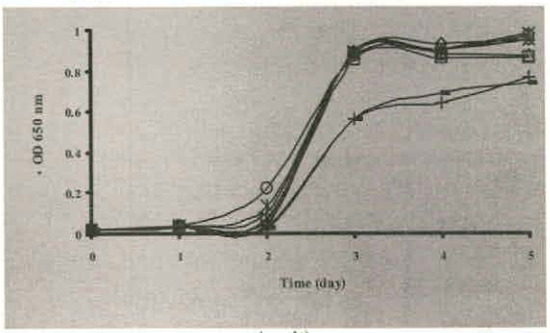
(الف)



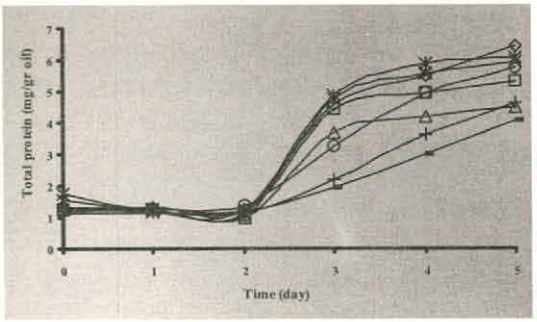
(ب)

شکل ۳- بررسی اثر فاکتور PH در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری هالوتولرانت PDO1.
در محیط پایه با دور شیکر ۱۴۰ rpm و دمای ۲۵ ± ۵ °C.
الف) منحنی رشد سلولی به روش کدورت سنجی
ب) منحنی پروتئین کل تولید شده



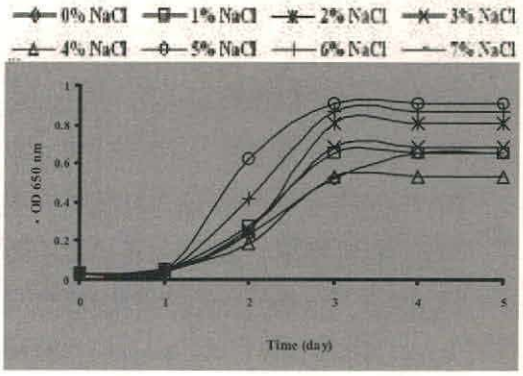


(الف)

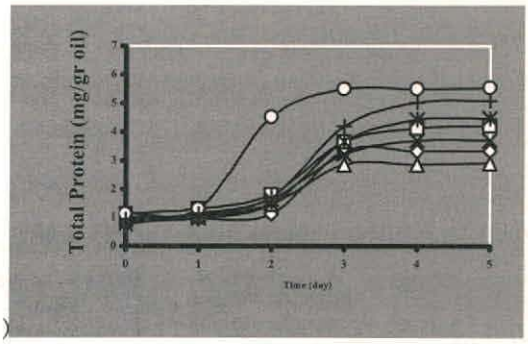


(ب)

شکل ۴- بررسی اثر غلظت نمک در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری هالوتولرانت PDO1.
در محیط پایه با PH ۸/۵، دور شیکر ۱۴۰ rpm و دمای ۲۵ ± ۵ °C.
الف) منحنی رشد سلولی به روش کدورت سنجی
ب) منحنی پروتئین کل تولید شده



(الف)



ب)

شکل ۵- بررسی اثر غلظت منبع نیتروژن (NH_4Cl) در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری هالوتولرانت PDO1. در محیط پایه با PH ۸/۵، غلظت نمک صفر در صد، دور شیکر ۱۴۰ rpm و دمای ۲۵ ± ۵ °C.

الف) منحنی رشد سلولی به روش کدورت سنجی

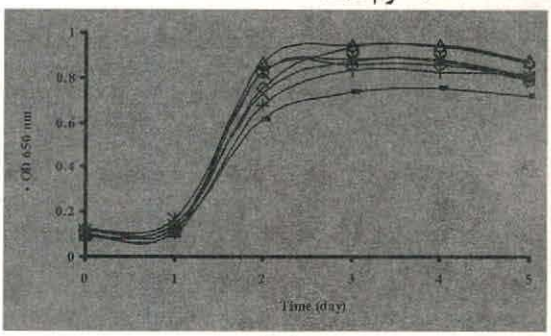
ب) منحنی پروتئین کل تولید شده

NH_4Cl ۰/۰۴۹ گرم = — ◇ — NH_4Cl ۰/۰۹۷ گرم = — ✳ —

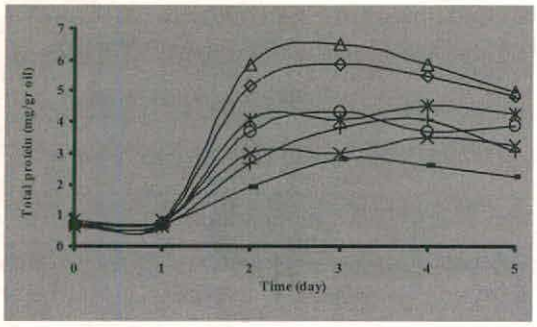
NH_4Cl ۰/۱۴۶ گرم = — □ — NH_4Cl ۰/۱۹۵ گرم = — ✳ —

NH_4Cl ۰/۲۴۴ گرم = — ○ — NH_4Cl ۰/۲۹۲ گرم و NH_4Cl

۰/۳۴۱ گرم NH_4Cl = —



(الف)



(ب)

شکل ۶- بررسی اثر غلظت منبع فسفر (Na_2HPO_4) در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری هالوتولرانت PDO1. در محیط پایه با PH ۸/۵، غلظت نمک صفر در صد، ۰/۲۹۲ گرم NH_4Cl دور شیکر ۱۴۰ rpm و دمای ۲۵ ± ۵ °C.

الف) منحنی رشد سلولی به روش کدورت سنجی

ب) منحنی پروتئین کل تولید شده

Na_2HPO_4 ۰/۰۰۶ گرم = — ، Na_2HPO_4 ۰/۰۱۲ گرم = — ✳ —

Na_2HPO_4 ۰/۰۱۸ گرم = — + — Na_2HPO_4 ۰/۰۲۴ گرم = — ✳ —

Na_2HPO_4 ۰/۰۳۰ گرم = — ○ — Na_2HPO_4 ۰/۰۳۶ گرم = — △ — و

Na_2HPO_4 ۰/۰۴۲ گرم = — ◇ —

پی نوشت ها

1- Biodegradation
2- Drigalski

منابع

Atlas, R. M. (1977). Stimulated petroleum biodegradation. *CRC Crit Rev Microbiol.* Sep 5(4): 371-86.

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

Bardi, L., A. Mattei, S. Steffan, and M. Marzona, (2000). Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with beta-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme Microb Technol.* Nov 15; 27(9): 709-713.

Canby, T. (1991). The Persian Gulf After the Storm. *National Geographic.* 180, 2, pp.2-32

Cunningham, J. A., H. Rahme, G. D. Hopkins, C. Lebron, and M. Reinhard (2001). Enhanced in situ bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. *Environ Sci Technol.* Apr 15, 35(8): 1663-70.

Desai, J. D., and I. M. Banat (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 61:47-64.

Etkin, D. S., P. Wells, M. Nauke, J. Campbell, C. Grey, J. Koefoed, T. Meyer, and S. Reddy (1998). *In: Proceeding of the 21th arctic and marine oil spill program technical seminar.* Environment, Canada, Edmonton, Alberta., pp. 903-910.

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

Gilmour, D. (1990). Halotolerant and halophilic microorganism. In: Edwards, C. (ed). Microbiology of extrem environments. *Open University pres*. 147-177.

Harayama, S., H. Kishira, Y. Kasai, and K. Shutsubo (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. J Mol Microbiol Biotechnol. Aug; 1(1): 63-70.

Korda, A., P. Santas, A. Tenente, & R. Santas, (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commerical microorganisms currently used. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 48: 677-686.

Lazar, I., S. Doborta, A. Voicu, M. Stefanescu, L. Sandulescu, & I. G. Petrisor (1997). Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. *J. Petroleum Sience & Engineering*. 22: 151-160.

Marques, M. C., A. Ventosa, A. & F. Ruiz-Berraquero, (1987). A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. *J. Gen. Microbiol.* 133: 45-56.

Moran, A. and C., N. Olivera, M. Commendatore, J. Esteves, L., F. Sineriz, (2000). Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from Bacillus subtilis O9. *Biodegradation*. 11(1): 65-71.

Rahman, K. S., I. M. Banat, Thahira, J. Thayumanavan, and P. Lakshmanaperumalsamy (2002). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresour Technol. Jan.* 81(1): 25-32.

Rheinheimer, G. (1981). Mikrobiologie der gewaesser. 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag.

Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag

Smibert, R. M., and N. R. Krieg, (1981). General characterization. In Manual of methods for general bacteriology. *Edited by* P. Gerhardt. American Society for Microbiology, Washington, DC. Pp. 409-443.

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

Wolfe, D. A., M. J. Hameedi, Galt, J. A. Watabayashi, G. Short, J. O'Claire, C. Rice, S. Michel, J. Payne, J. R. Braddock, J. Hanna, S. and D. Sale (1994).The fate of oil spilled from Exxon Valdz. Environ. Sci. Technol., 28, 560-A-568A.