علـــوم محـــیـــطی ۸ ، تابستان ۱۳۸٤
ENVIRONMENTAL SCIENCES 8 , Summer 2005
۹-۲۰

جداسازی و تعیین خصوصیات یک آرکی باکتری اکستریم هالوفیل نفت خوار مولد بیوسورفاکتانت و بررسی تاثیر غلظت نمک در تجزیه نفت خام توسط این سویه

غلامحسین ابراهیمی‌پور
دکترای میکروبیولوژی، استادیار دانشکده علوم، دانشگاه شهیدبهشتی
جمشید فولادی
دکترای میکروبیولوژی، استادیار دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا
آتوسا فردوسی
دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا

چکیده

در این تحقیق یک باکتری اکستریم هالوفیل نفت خوار تولید کننده بیوسورفاکتانت از دریاچه نمکدان، واقع در جزیره قشم جداسازی شد. تعیین خصوصیات اولیه نشان داد که این باکتری متعلق به گروه آرکی باکتری‌ها بوده و علاوه بر آنکه فوق العاده نمک دوست می‌باشد، قادر است با تولید بیوسورفکتانت نفت خام را به عنوان تنها منبع انرژی و کربن مصرف نماید. همچنین این باکتری بر روی ملاس چغندر قند به عنوان تنها منبع انرژی و کربن قادر به رشد می‌باشد، لیکن در این شرایط تولید بیوسورفکتانت جهت امولوسیونه شدن نفت خام مشاهده نشد. اما در حضور گلیسرین به عنوان تنها منبع انرژی و کربن، رشد و تولید بیوسورفکتانت بسیار چشمگیر بوده است. همچنین تاثیر غلظت نمک در رشد و تجزیه نفت خام توسط این سویه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده این باکتری، بهترین تجزیه نفت خام را در محدوده غلظت ۱۵ تا ۲۱ درصد NaCl انجام می‌دهد.

کلیدواژه‌ها : آرکی باکتری، تجزیه زیستی، بیوسورفکتانت، نفت خام، هالوفیل، ملاس

Isolation and Characterisation of Crude Oil Biodegrading Extreme Halophilic Biosurfactant-producing Bacterium and an Examination of the Effect of Salt Concentrations on Crude Oil Biodegradation by this Strain

Gholamhossein Ebrahimpour, Ph.D.
Assistant Professor, Faculty of Science, Shahid Beheshti University
Jamshid Fooladi, Ph.D.
Assistant Professor, Faculty of science, Al-Zahra University
Atoosa Ferdosi
Ph.D. Student in Microbiology, Faculty of science, Al-Zahra University

Abstract
In this research, an extreme halophilic bacterium was isolated from Namakdan Lake (with around 28% salt) on Qeshm Island, Iran. Its characterisation revealed that this bacterium belongs to the Archea family and is an extreme halophil which can utilise crude oil as its sole source of carbon and energy by producing biosurfactants. Pars Q_2 also grew on molasses as the sole source of carbon and energy, but did not then produce biosurfactants for emulsifying crude oil. The growth and production of biosurfactants was very noticeable when glycerin was used as the sole source of carbon and energy. The effect of salt concentration on the growth of Pars Q2 and the biodegradation of crude oil was also examined. The results showed that the best biodegradation occurred within the range of 15% to 21% NaCl .

Keywords: Archea, Biodegradation, Biosurfactant, Crude oil, Halophilic and Molasses.

مقدمه

در سال‌های اخیر برای حل مسئله آلودگی‌های نفتی و پیامدهای آن، راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است که در آن بین روش تجزیه زیستی بوسیله میکروارگانیسم‌ها به خاطر امتیازات خاص و نیز سازگاری این روش با طبیعت، بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. معمولاً میکروارگانیسم‌های مناسب برای تجزیه زیستی را می‌توان از محیط آلوده و یا محیطی که شرایطی مشابه داشته باشد جدا نمود. جداسازی این میکروارگانیسم‌ها از محیط بومی آنها و فراهم آوردن شرایط بهینه برای کشت و تکثیرشان در آزمایشگاه، کار دشواری می‌باشد. ولی مشاهده شده، تلقیح مجدد این میکروارگانیسم‌ها به محیط آلوده‌ای که از آنجا جدا سازی شده اند، برای حذف آلودگی‌ها موفقیت‌آمیز بوده است (Korda *et al.*, 1997). در این مورد استفاده از باکتری‌های نمک دوست تجزیه کننده نفت، فوائد دیگری نیز دارد، زیرا آنزیم‌ها وسایر عوامل تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها، ازجمله بیوسورفکتانت‌های تولید شده، درمناطق با شوری بالا پایداراست، و از آنجا که اکثر مخازن نفتی در مناطق با دمای بالا و شوری فراوان واقعند، استفاده ازاین میکروارگانیسم‌ها یا بیوسورفکتانت‌های آنها درچاه‌های نفتی به ظاهر تخلیه شده برای استخراج ثالثیه نفت نیز بسیار کارآمد می‌باشد (Glanski *et al.*, 1992). در این تحقیق باکتری اکستریم هالوفیل $ParsQ_2$ که قادر به تجزیه نفت خام می‌باشد از جزیره قشم جداسازی شد. پس از بررسی‌های اولیه تاثیر غلظت نمک به عنوان یکی از فاکتورهای محیطی حائز اهمیت در تجزیه زیستی نفت خام توسط این باکتری مورد آزمایش قرار گرفت. دو شاخص کدورت سنجی سلولی در طول موج ۶۲۳ nm و سنجش میزان پروتئین تولید شده (Sueszmuth *et al.*, 1987) به عنوان شاخص‌های رشد و مصرف نفت در نظر گرفته شد و مناسب‌ترین محدوده غلظت نمک برای تجزیه زیستی نفت خام توسط این سویه تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

وسائل و دستگاه‌ها

اسپکتروفوتومتر ساخت شرکت Philips PU 8620

سانتریفوژ ساخت شرکت Mueller – Scherr

انکوباتورشیکردار ساخت شرکت Titec BR –3001

پی اچ متر ساخت شرکت Metrohm

مواد و محیط‌های کشت

محیط کشت ۱: عصارهٔ مخمر ۵ گرم، پپتون ۳ گرم، آمونیوم استات ۴ گرم، کلرید سدیم ۲۱۰ گرم، آگار۱۵ گرم، در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر.

محیط کشت ۲: همانند محیط کشت ۱ ولی فاقد آگار.

محیط کشت ۳: سدیم هیدروژن فسفات ۴٫۴۲ گرم، پتاسیم‌دی‌هیدروژن فسفات ۴٫۳ گرم، سولفات آمونیوم ۲ گرم، کلرید کلسیم ۰٫۴ گرم، سولفات منیزیم ۰٫۴ گرم، کلرید سدیم ۲۱۰ گرم، ومحلول نمک‌های کمیاب ۱میلی‌لیتر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر (Matulovic, 1987).

محلول نمک‌های کمیاب: سولفات آهن(II) ۴۰ گرم، سولفات منگنز ۵ گرم، مولیبدات آمونیوم ۱٫۲ گرم، سیترات ـ۱ـ هیدرات ۴۰۰ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر (Matulovic, 1987).

کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده از محصولات شرکت Merck بوده، به استثنأ سولفات آهن(II) که از تولیدات شرکت BDH، و عصارهٔ مخمر که ساخت شرکت Difco بوده است. نفت‌خام مورد استفاده، از شرکت ملی نفت جمهوری‌اسلامی ایران تهیه شد. همچنین ملاس چغندر قند، مربوط به کارخانهٔ چغندر قند دزفول بوده است.

نمونه برداری

نمونه برداری درمنطقهٔ نمکدان، دریاچه ای واقع در جزیره قشم انجام شد. نمونه شامل رسوبات وآب این دریاچه بوده که به منظور حفظ قابلیت‌های زیستی، تا رسیدن به آزمایشگاه روی یخ حمل گردید. همچنین اقدامات لازم برای هوادهی مناسب به عمل آمد.

ایزوله کردن باکتری‌های اکستریم هالوفیل تولید کننده بیوسورفکتانت با قابلیت مصرف نفت:

ابتدا نمونه را که شامل ۲۰ گرم رسوب و ۳۵۰ میلی لیتر آب دریاچه نمکدان بود، در یک ارلن مایر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر ریخته، و سپس به ارلن مزبور tween 80 باغلظت نهائی ۰/۰۱ درصد اضافه شد. pH محیط را بر روی ۷/۲ (نزدیک به PH طبیعی دریاچهٔ نمکدان) تنظیم کرده، و سپس ارلن به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر با دور ۱۵۰rpm قرار گرفت. با این روش میکروارگانیسم‌ها از ذرات رسوب جدا می‌شوند. پس از اینکه ارلن را به مدت ۵ دقیقه درمحل ثابتی قرار دادیم، ازمحلول روئی یک سریال رقتی از 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه کرده و از هررقت ۱۰۰ میکرولیتر به وسیله میله شیشه‌ای سرکج (دریگالسکی) بر روی پلیت حاوی محیط پپتون ـ عصارهٔ مخمر(محیط کشت شماره یک) تلقیح شد. برای هررقت دو پلیت درنظر گرفتیم که در دمای ۳۵ درجه‌سانتی گراد گرما گذاری شدند. سپس باکتری‌های ایزوله شده از لحاظ توان تجزیه نفت خام مورد آزمایش قرار گرفتند. به این ترتیب که تک تک کلنی‌های خالص به دست آمده در محیط کشت ۲ تلقیح ودر دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته گرماگذاری شدند. پس از رشد در دور g ×۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شده و رسوب حاصله با آب نمک ۱۵ درصد شستشو داده شد. سپس مجدداً در همان دور سانتریفوژ شدند، آنگاه رسوب با محلول NaCl ۱۵ درصد به کدورت ۰/۵ مک‌فارلند رسانده شد و ۱ میلی‌لیتر (در حدود 15×10^{6} باکتری در هر میلی لیتر) به ارلنهای شیار دار ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰میلی لیتر از محیط کشت استریل شدهٔ شمارهٔ ۳ با PH ۷/۲ تلقیح گردید. سپس یک میلی لیتر نفت خام استریل شده، به عنوان تنها منبع انرژی و کربن به آن اضافه گردید و آنگاه در دور rpm ۱۲۰ و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. سویه‌ها از لحاظ قابلیت مصرف نفت خام، بر اساس روشن شدن رنگ محیط و سرعت عمل در تجزیه نفت خام مورد مقایسه قرار گرفتند. در این مطالعه یک سویه که آن را $ParsQ_2$ می‌نامیم، به عنوان سویه برتر در تجزیه زیستی نفت خام انتخاب شد.

مرفولوژی و خصوصیات بیوشیمیائی

مرفولوژی کلنی از لحاظ رنگ، فرم، بزرگی و قوام آن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ابعاد سلولی و برخی ویژگی‌های بیوشیمیائی باکتری ازجمله واکنش به رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز، تست OF، تست احیا نیترات به نیتریت، آزمایش نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و تست آنتی بیوگرام به منظور تعیین این که آیا باکتری متعلق به گروه آرکی باکتری‌ها و یا باکتری‌های حقیقی می‌باشد، نیز انجام شد.

تست هالوفیلیته

برای بررسی توانایی رشد در درصدهای مختلف نمک و بررسی اینکه آیا باکتری $ParsQ_2$ هالوفیل قوی، متوسط، ضعیف یا هالوتولرانت است، تست هالوفیلیته انجام گرفت. برای این منظور از محیط کشت ۲ با غلظت یک چهارم و فاقد کلرید سدیم استفاده شد. سپس یک سریال ازمحیط کشت مذکور با غلظت‌های نمک صفر تا ۳۰ در صد تهیه شد. ارلن‌های کشت پس از تلقیح در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و در دور rpm ۱۲۰ گرما گذاری شدند. رشد باکتری‌ها از نظر ایجاد کدورت در محیط

کشت در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۱ مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی توانایی رشد و تولید بیوسورفکتانت با ملاس و گلیسیرین به عنوان تنها منبع انرژی و کربن:

باکتری $ParsQ_2$ (در حدود 10^6 تا 10^7 باکتری در هر میلی لیتر)، در شرایط بهینه، به محیط کشت ۳ تلقیح شد. یکبار ملاس و بار دیگر گلیسیرین به عنوان تنها منبع انرژی و کربن به محیط اضافه گشت. ارلن‌ها دردمای ۳۵ درجه سانتی گراد و دور rpm ۱۴۰ به مدت یک هفته گرما گذاری شدند. بعد از ۷ روزمحیط کشت، سانتریفوژ شد و با مشاهدهٔ بیوماس حاصله، توان رشد با استفاده از این منابع کربنی تخمین زده شد. همچنین مایع روئی محیط کشت جهت بررسی وجود بیوسورفکتانت یا عدم وجود بیوسورفاکتانت تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها با استفاده از دو تکنیک گسترش نفت (Morikawa *et al.*, 2000) و نیز انتشار و تجزیه زیستی نفت خام (Youssef *et al.*, 2004) بررسی گردید.

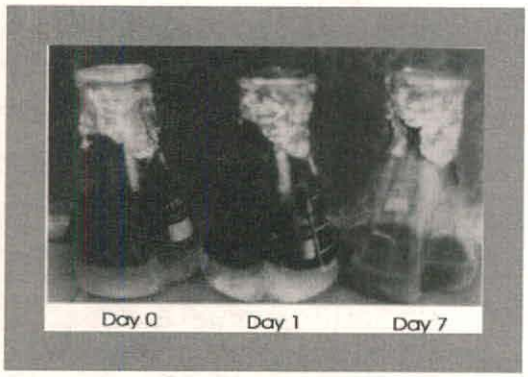
بررسی اثر غلظت نمک در تجزیه زیستی نفت‌خام

یازده ارلن شیار دار ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر ازمحیط کشت ۳ با غلظت‌های نمک ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۷ و ۳۰ درصد تهیه شد. PHمحیط‌ها بر روی ۷٫۲ (نزدیک به PH طبیعی دریاچه نمکدان) تنظیم و باکتری ParsQ2 (تقریبا" 10^6 _ 10^7 باکتری در هر میلی لیتر) به محیط‌ها تلقیح شد. یک میلی لیتر نفت خام استریل به ارلن‌ها افزوده و سپس برای مدت یک هفته در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۲۰ گرماگذاری شدند. برای سنجش دو فاکتور کدورت سلولی، میزان پروتئین تولید شده و نیز ثبت تغییرات PH، نمونه‌برداری در روزهای۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۱ صورت گرفت. پروتئین سنجی به طریق روش لاری صورت گرفت(Sueszmuth *et al.*, 1987) . تغییرات PH، روزانه توسط سود یک نرمال بر روی میزان اولیه تنظیم شد.

نتایج

نتایج جداسازی، مرفولوژی ، تستهای بیوشیمیائی و آنتی بیوگرام

با استفاده از روش‌های کلاسیک، جداسازی یک باکتری گرم منفی اکستریم هالوفیل نفت خوار بر روی محیط کشت شماره ۱، انجام شد. رشد اولیه باکتری بسیار بطئی بود و ظهور اولین کلنی‌ها، زمانی قریب به یک ماه را به خود اختصاص داد. با تهیه کشت‌های مکرر ضمن خالص سازی سویه، این زمان به کمتر از یک هفته تقلیل یافت. این باکتری از نظر توان تولید بیوسورفکتانت و تجزیه نفت خام مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این باکتری قادر است با تولید بیوسورفکتانت، نفت خام را به عنوان تنها منبع انرژی و کربن به مصرف برساند. مراحل تجزیه نفت در شکل ا نشان داده شده است. همچنین در جداول ۱ تا ۳ ویژگی‌های باکتری از لحاظ میزان نمک دوستی و سایر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی ذکر شده است. نتایج تست آنتی بیوگرام، بر اساس قطر هالهٔ عدم رشد، در جدول ۱ نشا ن داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، باکتری نسبت به پنی سیلین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم بوده، و نسبت به باسیتراسین حساس است. همچنین یک حساسیت جزئی در مقابل اریترومایسین مشاهده می‌شود.



شکل ۱- مراحل تولید بیوسورفاکتانت و تجزیه نفت خام توسط باکتری باستانی اکستریم هالوفیل ParsQ2. 10^8 _ 10^{10} باکتری در ۱۰۰میلی لیتر محیط کشت شمارهٔ ۳ با PH ۷٫۲ به همراه یک میلی لیتر نفت خام، به عنوان تنها منبع انرژی و کربن و انکوباسیون در دور rpm ۱۲۰ ودمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد.

جدول ۱ - نتایج آنتی بیوگرام بر اساس قطر هاله عدم رشد باکتری $ParsQ_2$ بر روی محیط شماره ۱ در دمای $35^{\circ}C$

پنی سیلین	تتراسایکلین	کلرامفنیکل	ازیترومایسین	باسیتراسین
-	-	-	۴ میلی‌متر	۸ میلی‌متر

++ رشد بسیار خوب، + رشد خوب، (+) رشد ضعیف، - فاقد رشد

جدول ۲- بررسی خصوصیات مورفولوژیکی ، فیزیولوژیکی و بیو شیمیائی باکتری $ParsQ_2$

خصوصیات مورد آزمایش باکتری Pars Q		نتایج
شکل و قوام کلنی		لبه صاف-قوام خشک
رنگ کلنی		قرمز روشن
شکل سلول باکتری		میله ای کوتاه(کوکوباسیل)
ابعاد سلولی(µm)		۰,۵× ۱ – ۱,۲
رنگ آمیزی گرم		گرم منفی
تست OF با قند گلوکز	اکسیداتیو	مثبت، همراه با تولید گاز
	فرمنتاتیو	منفی
کاتالاز		مثبت
اکسیداز		مثبت ضعیف
احیای نیترات به نیتریت		مثبت
دنیتریفیکاسیون		منفی
نیتریفیکاسیون		مثبت
تحرک		مثبت
هالوفیلیته		هالوفیل قوی

جدول ۳- نتایج تست هالوفیلیته در مورد باکتری $ParsQ_2$ در محیطی با ۱,۲۵ گرم عصاره مخمر و ۰,۷۵ گرم در لیتر پپتون. دمای $35^{\circ}C$. ۳ تکرار برای هر غلظت.

Culture	Day	H2O	۳% NaCl	۶% NaCl	۹% NaCl	۱۲% NaCl	۱۵% NaCl	۱۸% NaCl	۲۱% NaCl	۲۴% NaCl	۲۷% NaCl	۳۰% NaCl
$Pars Q_2$	۱	-	-	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)
	۳	-	-	-	-	(+)	+	++	++	++	+	(+)
	۵	-	(+)	(+)	(+)	+	++	++	++	++	++	+
	۷	-	(+)	(+)	+	+	++	++	++	++	++	++
	۱۱	-	(+)	(+)	+	++	+	++	++	++	+	+

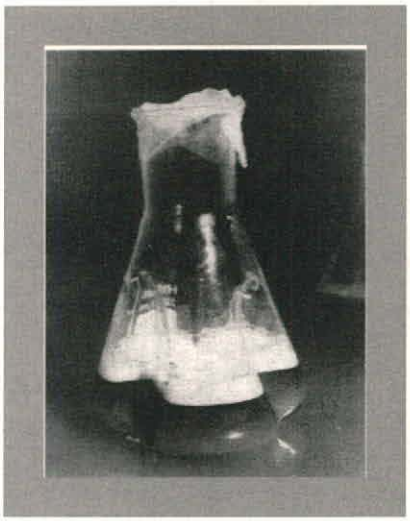
++ رشد بسیار خوب، + رشد خوب، (+) رشد ضعیف، - فاقد رشد

نتایج تست هالوفیلیته

نتایج آزمایش نشان داد که باکتری ParsQ2 در محیط پیتون- عصاره مخمر بهترین رشد را در ۱۵ تا ۲۷ درصد نمک، داشته است.

نتایج رشد و تولید بیوسورفکتانت با استفاده از ملاس وگلیسرین به عنوان تنها منبع انرژی و کربن

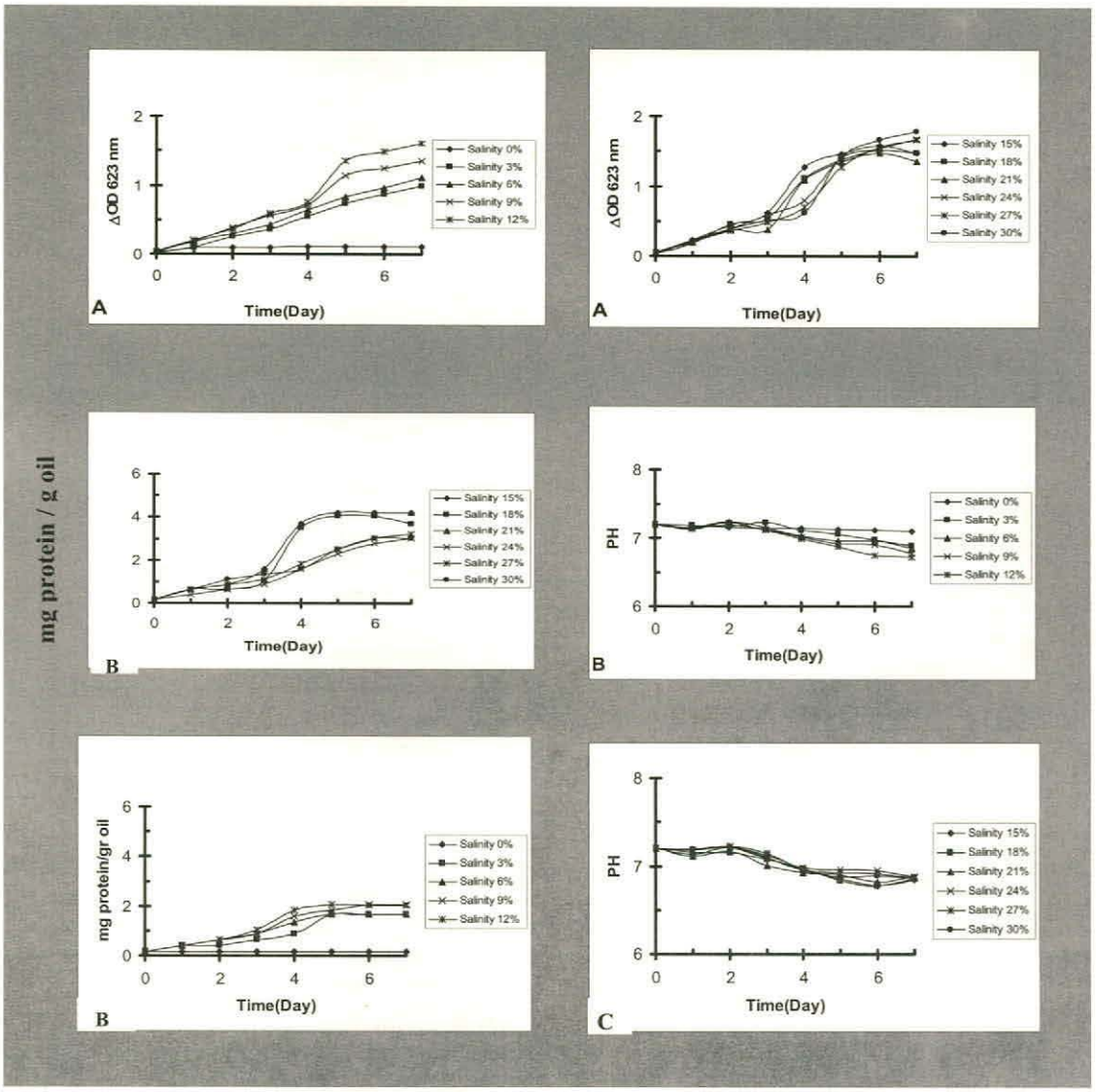
نتایج کشت باکتری در محیط ۳، حاوی ۱ درصد ملاس نشان داد که باکتری $ParsQ_2$ ، با استفاده از ملاس به عنوان تنها منبع انرژی و کربن قادر به رشد است، ولی تولید بیوسورفکتانت مشاهده نشد. لیکن با کشت این باکتری در محیط ۳ حاوی گلیسرین به عنوان تنها منبع انرژی و کربن، باکتری‌علاوه بر رشد مقدار زیادی بیوسورفکتانت با توان بالا در امولسیونه کردن نفت تولید کرده است(شکل ۲).



شکل ۲- رشد باکتری باستانی اکستریم هالوفیل ParsQ2 بر روی گلیسرین به عنوان تنها منبع کربن و انرژی جهت تولید بیوسورفاکتانت. 10^{8} - 10^{10} باکتری در ۱۰۰میلی لیتر محیط کشت شمارهٔ ۳ با PH ۷/۲ به همراه یک میلی لیتر گلیسیرین، انکوباسیون در دور rpm ۱۲۰ ودمای ۳۵ درجه سانتی گراد.

نتایج بررسی اثر غلظت نمک در تجزیه زیستی نفت خام

نتایج بررسی اثرغلظت نمک درمینرالیزه شدن نفت خام توسط باکتری ParsQ2 در شکل شماره ۳ به صورت منحنی نشان داده شده است. بهینه رشد در محدوده ۱۵ تا ۲۱ در صد نمک واقع است. دراین محدوده از غلظت نمک باکتری تقریباً از روز سوم وارد فاز لگاریتمی می شود و این رشد تا روز پنجم ادامه دارد، و سپس وارد فاز سکون می‌شود. سنجش پروتئین کل نشان داد که در انتهای فاز لگاریتمی در حدود ۴/۲ میلی گرم پروتئین در ازاء یک میلی‌لیتر نفت خام تولید شده است. در کل با شروع فاز لگاریتمی نسبتا کاهشی در حدود۰/۲ تا ۰/۵ واحد، در PH ارلن‌ها به چشم می‌خورد که با وجود تنظیم روزانه این تغییر درPH، جزئی ولی محسوس است، که احتمالا به‌خاطر تولید بیوسورفکتانت‌های آنیونی و یا متابولیت‌های حد واسط می‌باشد. در ادامه فاز لگاریتمی و با وارد شدن به فاز سکون، PH محیط خیلی جزئی افزایش می‌یابد، که می‌تواند به دلیل مصرف این متابولیت‌های حد واسط باشد. در غلظت‌های نمک ۲۴ تا۳۰ درصد، باکتری از روز چهارم وارد فاز لگاریتمی می‌شود و با شیب تندتری تا روز هفتم ادامه می‌یابد، به طوریکه دراین دوره حدوداً ۳ میلی گرم پروتئین تولید شده است. منحنی رشد در غلظت‌های نمک ۳، ۶، ۹و۱۲ درصد هم تقریباً از روز چهارم وارد فاز لگاریتمی رشد شده و بعد با شیب کندتری تا روز هفتم ادامه دارد. بررسی منحنی پروتئین نشان می‌دهد که در غلظت‌های نمک ۳ و۶ درصد حدوداً ۱/۶ میلی گرم پروتئین تولید شده است. این مقدار در مورد غلظت‌های نمک‌های ۹ و ۱۲ درصد به ترتیب ۲/۰۷و ۲/۳ میلی گرم پروتئین می‌باشد. در غلظت صفر درصد چون رشدی صورت نگرفته، پروتئینی تولید نشده و تغییری در PH ارلن‌ها نیز مشاهده نمی‌شود. بنابراین چنین نتیجه گیری می‌شود که در محدودهٔ نمک ۱۵ تا ۲۱ درصد، علاوه بر این که باکتری فاز لگاریتمی را سریع‌تر آغاز کرده، میزان پروتئین تولید شده نیز بیشتر بوده است. به عبارتی دیگر در این محدوده از غلظت نمک، باکتری نفت را سریع‌تر و به میزان بیشتری مصرف کرده است.



شکل ۳- بررسی اثرغلظت نمک در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری آرکی اکستریم هالوفیل ParsQ2 تولید کننده بیوسورفاکتانت.. PH محیط ۷/۲، دور شیکر ۱۲۰ rpm و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری صورت گرفت.

A : بررسی رشد سلولی به روش کدورت سنجی

B : بررسی رشد با اندازه گیری پروتئین تولیدی

ادامه شکل ۳: بررسی اثرغلظت نمک در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری آرکی اکستریم هالوفیل ParsQ2 تولید کننده بیوسورفاکتانت.. pH محیط ۷/۲، دور شیکر ۱۲۰ rpm و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری صورت گرفت.

B : بررسی رشد با اندازه گیری پروتئین تولیدی

C : تغییرات pH با تنظیم روزانه

بحث

با توجه به شرایط منطقه نمونه برداری، از لحاظ مقدار شوری و سایر خصوصیات ، احتمال حضور باکتری‌های اکستریم هالوفیل در آن ناحیه بسیار بالا بود. اورلانا و همکاران در آزمایش‌های خود خاک بیش از چهل منطقه با شوری فراوان ، نظیر دریاچه‌های نمکی را بررسی و چهل سویه مختلف از آرکی باکترهای اکستریم هالوفیل را جداسازی نمودند که همه سویه‌ها قادر به تجزیه ترکیبات آروماتیک نفتی بودند. ایشان در نتایج تحقیق خود ذکر کرده‌اند که قابلیت تجزیه هیدروکربورهای نفتی احتمالا صفتی مشترک در میان هالوارکی باکترها می باشد(Orellana *et al*., 2006). هدف در این پژوهش، ایزوله باکتری‌های اکستریم هالوفیل نفت خوار به منظور تجزیه زیستی نفت خام بود. برای این منظور در ابتدا باکتری $ParsQ_2$ از منطقه مذکور جداسازی شد، که با تولید بیوسورفکتانت نفت خام را به نحو موثری تجزیه می‌کرد. به طور مشابه (Muller *et al*., 1990)، عنوان کردند که سویه EpA505 باکتری Pseudomonas paucimobilis قادر است از فلورانتن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده نماید و حذف فلورانتن از محیط با افزایش بیوماس باکتریائی و تولید متابولیت‌های مسیر تجزیه مشخص می‌شود. باکتری $ParsQ_2$ نیز در محیط کشت معدنی (محیط شماره۳)، حاوی نفت به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، ابتدا از روز دوم نفت را به صورت ذرات پراکنده و امولسیونه در می‌آورد، سپس با اکسیده کردن نفت، تولید انرژی و بیوماس می‌نماید. بعد از حدود ۶ روز رنگ محیط کشت کاملاً روشن می‌شد که حاکی ازمینرالیزه شدن موثر نفت به وسیله باکتری می‌باشد. علت امولسیونه شدن نفت، تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری می‌باشد. در همین رابطه گزارشات متعددی وجود دارد که حاکی از تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت می‌باشد (; Passeri *et al*., 1992; Schulz *et al*., 1990) Sego *et al*., 1990 به طورمعمول میکروارگانیسم‌هائی که سوبستراهای نامحلول درآب را تجزیه می‌کنند، باتولید بیوسورفکتانت، سطح تماس ودسترسی به این مواد را برای تجزیه افزایش می‌دهند و این امر کارائی میکروارگانیسم‌ها را در مصرف سوبستراهای هیدروفوب و نامحلول بالا می برد (Desai *et al*., 1997 ; Rahman *et al*., 2002). باکتری $ParsQ_2$ برروی ملاس که یک منبع کربن هیدروفیل بوده است رشد کرده، ولی مایع روئی محیط کشت توان امولسیونه کردن نفت خام را نداشته، که احتمالاً به علت عدم تولید بیوسورفکتانت قابل توجیه است. اما پس از رشد در محیط حاوی گلیسرین، محیط حاصل از آن بدلیل وجود بیوسورفاکتانت تولید شده، قابلیت امولسیونه کردن نفت خام به طور چشمگیری مشاهده شد. در این مورد می‌توان گفت که با وجود اینکه گلیسرین یک سوبسترای هیدروفیل و محلول در آب می‌باشد، باکتری با مصرف آن به عنوان تنها منبع انرژی و کربن بیوسورفکتانت تولید نموده و بیوسورفکتانت تولیدی، نفت خام را امولسیونه نموده است. Cameotra & Makker (1998) به نقش منابع کربنی مختلف در القاء و مهار سنتز بیوسورفکتانت اشاره کرده‌اند.

برای ایزوله کردن باکتری‌ها می‌بایست محیط مناسبی انتخاب می‌شد که بتواند نیازهای غذائی باکتری‌های هالوفیل قوی را تأمین نماید. برای این منظور محیط‌های گوناگونی مورد آزمایش قرار گرفت. به عنوان مثال محیط‌های حاوی انواع قندها واسیدهای آمینه، انواع آلکان‌ها، محیط حاوی پارافین و ... مورد بررسی قرار گرفتند. اما در نهایت محیط پپتون -عصاره مخمر حاوی استات (محیط شماره ۱) و تقریباً ۲۱ درصد نمک، مناسب‌ترین محیط موجود برای ایزولهٔ باکتری‌ها بود.

درتحقیق حاضر رشد اولیه کلنی‌ها نزدیک به ۲۷ روز طول کشید و سپس با کشت‌های مکرر ضمن خالص سازی سویه‌ها، این زمان به ۶ روز کاهش پیدا کرد. بنا

به اظهار Guerin & Boyed (1995) میکروارگانیسم های تجزیه کننده نفتالن، برای سازش یافتن به سوبستراهای ناشناس، نیازمند زمان می باشند. این سازش ممکن است در برگیرنده ایجاد تغییرات در سیستم‌های آنزیمی موجود و یا سنتز آنزیم‌های جدید به وسیله میکروارگانیسم‌ها باشد. باکتری ایزوله شده در این تحقیق نیز، پس از انتقال از محیط طبیعی، به محیط پپتون- عصاره مخمر، برای سازش یافتن با سوبسترای جدید، احتیاج به زمان داشت و به تدریج با پیدایش این سازش، زمان رشد و تکثیر آن کاهش یافت. سولاناس و همکاران ضمن تحقیق بر رور جمعیت‌های باکتریائی تجزیه کننده نفت اظهار داشته‌اند که ارتباط بسیار نزدیکی بین ترکیبات محیط کشت و توان تجزیه زیستی در میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (Solanas, 2005). در همین راستا این باکتری درمحیط کشت معدنی (محیط شماره ۳)، از نظر توان تجزیه زیستی نفت خام مورد آزمایش قرار گرفت. روزلین و همکاران در تحقیقات خود عنوان کرده اند که سویه RM6 برای تجزیه دی بنزوتیوفن نیاز به ویتامین B12 دارد که به صورت مکمل می‌بایست به محیط کشت اضافه گردد، در مقایسه ، سویه Pars Q2 برای تجزیه نفت خام احتیاجات غذایی ساده تری دارد که صرفا توسط نمک‌های معدنی محیط کشت شماره ۳ تأمین می‌شود (Rozlyn *et al* ., 2006). مهنا و همکاران گزارش می کنند سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO1 در محیط حاوی نمک‌های معدنی، مشابه محیط کشت شماره ۳ در این پژوهش، قادر به تجزیه هیدروکربورهای نفتی است اما اظهار نموده که علاوه بر نمک‌های معدنی می بایست در حدود ۰/۵ گرم گلوکز نیز به محیط کشت سودوموناس آئروژینوزا بیافزایند (Mohana *et al*., 2006). ولی در مورد سویه ایزوله شده در این پژوهش یعنی ParsQ2 نیازی به افزودن گلوکز نیست و این باکتری نفت خام را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بکار می‌برد.

در کل، سویه‌های نفت‌خوار و تولید کننده بیوسورفکتانت، با امولسیونه کردن نفت و سپس اکسیداسیون ترکیبات نفتی، نفت خام را مینزالیزه می کنند. دراین میان باکتری ParsQ2 نفت خام را در مدت نسبتا کوتاهی به مصرف رسانده و از آنجائی که رنگ محیط کشت پس از مصرف نفت توسط این باکتری در مقایسه با سایر سویه‌های نفت خوار جدا شده، بسیار روشن می گردد، این نتیجه حاصل می‌شود، که باکتری مذکور علاوه بر سرعت عمل، از لحاظ کمی نیز میزان بیشتری از ترکیبات نفتی را میزالیزه کرده است. برای تعیین اثر غلظت نمک در این تجزیه زیستی، بررسی‌های انجام شده نشان داد که غلظت‌های نمک ۱۵تا ۲۱ درصد (تقریباً معادل ۲/۵ تا ۳/۵ مولNaCl) برای تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری $ParsQ_2$، غلظت‌های بهینه نمک می‌باشند. براساس گزارش Wever و همکاران (1997)، باکتری Rhodococcus rhodocorous که قادر به تجزیه هیدروکسی بنزوتیازول می‌باشد، تنها در محدودهٔ نمکی ۱ تا۳ درصد قادر به رشد و تکثیر است، حال آنکه باکتری $ParsQ_2$ در محدوده وسیع‌تر و غلظت بالاتری از نمک قادر به رشد و تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشد. Yakimov (1995) و همکاران اظهارکردند که باکتریBacillus lichiniformis سویه BAS 50، با استفاده از منابع کربنی گوناگون قادر به رشد و تولید بیوسورفکتانت در شوری بالاتر از ۱۳ درصد بوده است. Oren و همکاران (1991) گزارش کردند، که باکتری Halobacterium parevalens بیشترین میزان تجزیه ترکیبات آروماتیک نیتروژن‌دار را در شوری ۱۳ تا ۱۴ درصد می‌تواند انجام دهد. ریو و همکاران سویهYHLT-2 باکتری رودوکوکوس را از خاک‌های آلوده به نفت جداسازی نمودند که قادر بود ترکیبات نفتی را در شوری حداکثر ۷ درصد تجزیه نماید(Ryu *et al*., 2006) . با توجه به این گزارشات مزیت باکتری $ParsQ_2$ در تجزیه نفت خام در شوری بالا محرز می‌شود. لازم به ذکر است

که باکتری $ParsQ_2$ ایزوله شده در این تحقیق، از دریاچه نمکدان، واقع در قشم با شوری ۲۸ درصد ایزوله شده است. در مورد این باکتری، مشاهده می‌شود که در غلظت‌های نمک زیر ۱۵ درصد و نیز بالای ۲۱ درصد فاز تأخیری به نسبت غلظت‌های بهینهٔ نمک یک روز بیشتر ادامه می‌یابد. بنا بر مطالعات Brown & Saiv (1992) باکتری Halobacterium halobium بهترین رشد را درغلظت ۴ مول NaCl دارد و تا غلظت ۲ مول NaCl نیز رشد باکتری همانند رشد آن در غلظت ۴ مول NaCl می‌باشد، ولی با کاهش غلظت نمک به کمتر از ۲ مول NaCl، فاز تأخیری طولانی‌تر می‌شود. برای تعیین این نکته که آیا باکتری $ParsQ_2$ جزء آرکی باکتری‌ها و یا جزء یوباکتری‌ها می باشد روش‌های مختلفی وجود دارد. جاور برای این منظور از تست حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها استفاده کرده است. او این طور مطرح می‌کند که باکتری‌های اکستریم هالوفیل در حضور پنیسیلین قارد به رشد هستند ولی هالوفیل‌های متوسط در حضور این آنتی بیوتیک نمی‌توانند رشد کنند. بالعکس آنتی بیوتیک باسیتراسین از رشد باکتری‌های اکستریم هالوفیل جلوگیری می‌کند، در حالیکه هالوفیل‌های متوسط به راحتی در حضور این آنتی بیوتیک رشد می‌نمایند (Javor, 1984). در مورد باکتری $ParsQ_2$ نیز مشاهده می‌شود که میکروارگانیسم نسبت به پنیسیلین حساسیتی ندارد و در مورد این آنتی بیوتیک هیچ گونه هاله عدم رشدی تشکیل نمی‌شود. اما در مورد آنتی بیوتیک باسیتراسین قطر هاله عدم رشد به ۸ میلی متر می‌رسد. به طور جزئی نیز حساسیت به اریترومایسین مشاهده می‌شود. با توجه به این نتایج می‌توان باکتری $Pars\ Q_2$ را جزء آرکی باکتری‌ها به حساب آورد. البته روش‌های دیگری مثل آنالیز لیپیدی نیز برای تعیین آرکی باکتری بودن میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (Javor, 1984) که انجام آن در حیطه امکانات این تحقیق مقدور نبود. همچنین برای شناسائی دقیق این باکتری‌ها نیاز به انجام تست‌های مولکولی دقیق نظیر 16 S rRNA و بیوشیمیائی دقیق می‌باشد. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که باکتری $ParsQ_2$ دارای پتانسیل فراوانی برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی و زیست محیطی است و به خاطر رشد این باکتری بر روی ملاس می‌توان با استفاده از این سوبسترای ارزان قیمت باکتری را در اشل صنعتی تکثیر کرد. به علاوه به طور بالقوه این امکان هست که بتوان از این میکروارگانیسم برای رفع آلودگی‌های نفتی در رسوبات، آبها و خاک‌های با میزان نمک بالا (شوره‌زارها) بهره برد. همچنین بیوسورفکتانت تولید شده توسط این سویه، می‌تواند برای مقاصد صنعتی از جمله افزایش بازیافت میکروبی نفت در مخازن نفتی به ظاهر تخلیه شده و... مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

Brown, J.N. and L.M. Saliv (1992). Salt stress in halophilic bacterium: alterinons in oxidative metabolism and oxy-intermediate scavaging systems. *Can. J. Microbiol.* 40:1057-1063.

Cameotra S.S. and R.S. Makkar (1998). Synthesis of biosurfactant in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:520-529.

Desai D.J. and M.I. Banat (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61:47-64.

Galinski E. A. and B. J. Tindall (1992). Biotechnological prospects for halophiles and halotelorant microorganisms, Molecular Biology and Biotechnology of extremophiles, ed R.J. Harbentsharp, pp:77-114.

Guerin W.F. and S.A. Boyed (1995). Maintance and induction of naphthalene degradation activity in Pseudomonas putida and an Alcaligenes sp. Under different culture conditions. *Appl. Environ. Microb.* 61:4061-4068.

Javor J. B. (1984). Growth potential of halophilic bacteria isolated from solar salt environments: carbon sources and salt requirements. *Appl.Environment. Microbiol.* 48:325-360.

Ryu, H. wook, H. yang, Y. jooan, and k. sukcho (2006). isolation and characterization of psycrophilic and halotolerant Rhodococcus Sp. YHLT-M. *Microbiol biotechnol* vol 16 4: 605-612

Schulz D. , A. Passeri, M. Schmidt, S. Lang, F. Wagner, V. Waray V. And W. Gunkel (1990). Marine biosurfactants , 1. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from north sea, Z. Naturforsch. 46c:197-203.

Sego Kim J. , M. Powalla, S. Lang , F. Wagner, H. Luensdorf, H., and V. Wary (1990). Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *J. Biotechnol.* 13:257-266.

Solanas M., V. Marc, and M. Espuny (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation during bioremediation of heavily creosote- contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol 71 no 11 pp: 7008-7018

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

Wever H.D. , S.D. Cort, I. Noots I. and H. Verachtert (1997). Isolation and characterization of Rhodococcus rhodochorous for the degradation of the wastewater component 2-hydroxybenzothiozol, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 47:458-461.

Yakimov et al. (1995). in Cameotora S.S. and R.S. Makkar (1998).Synthesis of biosurfactant in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:520-529.

Youssef N.H, K. E. Duncan, D. P. Nagle, K. N. Savage, R. M. Knapp, and M.J. McInerrney (2004). Comparizon of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J.Microbiol.Meth.* 56:339-347.

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

Matulovic U. (1987). Dissertation in Technische Universitaet braunschweig.

Mohana D. chirayu and data madamwar (2006). Biodegradation and decolourization of anaerobically treated Distillery spent wash by a novel bacterial consortium. Bioresource Technology vol 98 issu 2 pp: 333-339

Morikawa M., Y. Hirata Y and T Imanaka (2000). A study on structure- fraction relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochemica et biophysica Acta. 1488:211-218.

Muller et al. (1991). in Kanaly R.A. and S Harayama (2000).Biodegradation of highmolecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *Journal of bacteriology* 182:2059-2067.

Orellana – sara cuadros , P. Metchild and R. Durrantr (2006). isolation and characterization of halophilic archaea abel to grow in aromatic compounds. *Intrenational biodeterioration & biodegradation*. Vol 57 Issue 3 pp:151-154

Oren et al (1991). in Ventosa A. and J.J. Nieto (1995). Biotechnological application and potentialities of halophilic microorganisms. *World journal of microbiology and Biotechnology* 11: 85-94.

Passeri A. , M. Schmidt, T. Haffner, V. Wray, S. Lang and F. Wagner (1992). Marine biosurfactants IV. production, Characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from marine bacterial strain MM1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:281-286.

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

Rozlyn F., C. stephane, M. and M. fedroak (2006). Aerobic biodegradation of 2-2-dithiodibenzoic acid produced from dibenzothiophene methabolite . *Appl. Environ. Microbiol*. Vol 72 no 1 pp:491-496.