علـــوم محـــیـــطی ۱۰ ، زمستـان ۱۳۸٤
ENVIRONMENTAL SCIENCES 10 , Winter 2006
۵۹-۷۰

بررسی اثر عوامل محیطی موثر در تجزیه نفت خام توسط باکتری اکستریم هالوفیل نفت خوار تولید کننده بیوسورفاکتانت $ParsQ_2$ و وزن سنجی ترکیبات نفتی مصرف شده توسط این باکتری در شرایط بهینه

غلامحسین ابراهیمی پور
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

باکتری اکستریم هالوفیل ParsQ2، جداسازی شده از جزیره قشم با تولید بیوسورفکتانت قادر به امولوسیونه کردن و تجزیه نفت خام می‌باشد. پس از آزمایش‌های لازم اولیه ، این باکتری از لحاظ تاثیر فاکتورهای اساسی محیطی در تجزیه زیستی نفت خام مورد بررسی قرار گرفت. در این مقاله نقش فاکتورهای محیطی حائز اهمیت از جمله شوری، PH، دما و دور دستگاه شیکر به منظور هوادهی محیط ، حداقل مقدار منبع نیتروژن و فسفر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، محدوده غلظت نمک ۱۵ تا ۲۱ درصد ، PH ۸،۲، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، و دور شیکر rpm ۱۴۰ ، حداقل مقدار منبع نیتروژن۰،۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$، و حداقل غلظت منبع فسفر ۰،۱ گرم KH_2PO_4، مناسب‌ترین شرایط برای تجزیه زیستی یک گرم نفت خام توسط این باکتری می‌باشد. سپس با انجام آزمایشات وزن سنجی نفت خام روشن گردید که باکتری در این شرایط بهینه بعد از هفت روز نزدیک به صد در صد نفت خام موجود را به مصرف می‌رساند.

کلیدواژه‌ها: آرکی باکتری، تجزیه زیستی، نفت خام، محیط اکستریم هالوفیل.

Study of Effects of Environmental Factors on Biodegradation of Crude Oil, by Pars Q2, an Extreme Halophilic Archea Bacterium and Gravimetric Determination of Used Crude Oil by this Bacterium under Optimal Conditions

Gholamhossein Ebrahimpour, Ph.D.
Assistant Professor, Faculty of Science, Shahid Beheshti University
Jamshid Fooladi, Ph.D.
Assistant Professor, Faculty of Science, Alzahra University
Atousa Ferdousi
Ph.D. Student in Microbiology, Faculty of Science, Alzahra University

Abstract

Pars Q_2, an extreme halophilic archea bacterium isolated from the Namakdan salt lake on Qeshm Island, was capable producing biosurfactants to emulsify and degrade crude oil. In this article, the effects of salinity, pH, temperature, aeration (shaker speed) and the minimum optimized concentration of nitrogen and phosphate sources were studied on the bioremediation of crude oil. The results showed that 15- 21% NaCl, pH 8.2, 35 C and 140 rpm (shaker speed), 0.2 g of $(NH_4)_2SO_4$ and 0.1 g. of KH_2PO_4 provided optimal conditions for oil biodegradation using this strain. Under such optimal conditions, the bacterium degraded 100% of the available crude oil after seven days of incubation.

Keywords: Archea, Bioremediation, Crude oil, Environmental, Extreme halophilic.

مقدمه

مشکلات ناشی از آلودگی‌های نفتی و تاثیرات ویرانگر آن برحیات موجودات زنده و اکوسیستم، قابل چشم پوشی نیست. مقابله با این مشکلات و برگزیدن راه حل مناسب نیازمند تحقیق و تدبیر فراوان است. در مقایسه با روش‌های حذف فیزیکی و شیمیائی تجزیه زیستی برای حذف آلاینده‌های نفتی، مقرون به صرفه‌تر و در عین حال بی‌ضررتر است (Jain *et al.*, 2005)، از این رو این روش در پاکسازی محیط زیست از اهمیت به سزائی برخودار است (Hanson *et al.*, 1997). اکثرمناطق با شوری فراوان، نظیر دریاچه‌های نمکی، شوره زارها، جلگه‌های نمکی و... جزء مناطقی می‌باشند که آلوده به ترکیبات مضر و سمی هستند(Daane *et al.*, 2001; و Ventosa and Nieto, 1995). بنابراین می‌توان از میکروارگانیسم‌هائی که دراین مناطق قادر به تجزیه چنین ترکیباتی باشند، برای حل این مشکل بهره برد (Ventosa and Nieto,1995). میکروارگانیسم‌های اکستریموفیل، برای زندگی درشرایط اکولوژیکی دشوار، از نظر دما، PH، شوری، و فشار بالا سازگار شده‌اند. این میکروارگانسیم‌ها بیوکاتالیست‌های منحصر به فردی تولید می‌کنند که تحت شرایط اکستریم قادر به عملکرد مناسب می‌باشند (Niehaus *et al.*, 1999). محیط‌های باشوری فوق العاده زیاد مثال عمده‌ای از محیط‌های اکستریم می‌باشند، که در آنها، جمعیت‌های میکروبی نسبتا محدودی وجود دارد (Ventosa and Nieto, 1995). میکروارگانسیم‌هائی که به طور اختصاصی می‌توانند درچنین شرایطی رشد کنند،هالوفیل می‌باشند (Ventosa and Nieto, 1995). دریاچه‌های نمکی بیشتر درمناطق حاره یا تحت‌حاره یافت می‌شوند که در آنها تبخیر آب، بیشتر ازمقدار آب ورودی می‌باشد (Kristjansson and Herggvidsson, 1995). از آنجائی که فاکتورهای محیطی در رشد و عملکرد میکروارگانیسم برای تجزیه نفت بسیار تاثیر گذار است، در این مقاله به بررسی نقش عوامل محیطی پرداخته می‌شود. در تمامی مراحل کار همواره دو شاخص کدورت سنجی سلولی در طول موج ۶۲۳ نانومتر و سنجش میزان پروتئین تولید شده (Sueszmuth *et al.*, 1987) به عنوان معیارهای رشد و مصرف نفت توسط باکتری مد نظر بوده‌اند و به روشنی مراحل رشد و تکثیر باکتری در تداخل با عوامل محیطی را نمایان می‌سازد.

مواد و روش‌ها

وسائل و دستگاه‌ها

اسپکتروفوتومتر ساخت شرکت Philips PU 8620

سانتریفوژ ساخت شرکت Műller – Scherr

انکوباتورشیکردار ساخت شرکت Titec BR –3001

پی اچ متر ساخت شرکت Metrohm

مواد و محیط‌های کشت

محیط کشت M3: سدیم هیدروژن فسفات ۴/۴۲ گرم، پتاسیم‌دی‌هیدروژن فسفات ۴/۳ گرم ، سولفات آمونیوم ۲ گرم ، کلرید کلسیم ۰/۴ گرم، سولفات منیزم ۰/۴ گرم، کلریدسدیم ۲۱۰گرم، ومحلول نمک‌های کمیاب ۱ میلی‌لیتر در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر(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، وعصارهٔ مخمر که ساخت شرکت Difco بوده است. نفت‌خام مورد استفاده، از شرکت ملی نفت جمهوری اسلامی ایران تهیه شد.

باکتری اکستریم‌هالوفیل نفت خوار تولید کننده بیوسورفاکتانت ParsQ2، از منطقه نمکدان دریاچه‌ای واقع در جریزه قشم به روش کلاسیک جداسازی شد.این باکتری در حضور ۱۵ درصد نمک بهترین میزان رشد را دارا بود.

بررسی اثر PH در تجزیه زیستی نفت خام

در این مرحله به بررسی اثر فاکتور PH، در تجزیه زیستی نفت خام، توسط باکتری Pars Q2 پرداخته شد. به این صورت که در ۵ ارلن شیاردار ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت M 3 با غلظت نمک ۱۵ درصد (غلظت نمک بهینه شده)، با کتری Pars Q2 (در حدود 10^6 تا 10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر) تلقیح شد. PH محیط‌ها به ترتیب بر روی ۵٫۲، ۶٫۲، ۷٫۲، ۸٫۲ و ۹٫۲ تنظیم گشته، و یک میلی‌لیتر نفت خام به عنوان تنها منبع انرژی و کربن به محیط افزوده شد. سپس دردمای ۳۵ درجه‌سانتی گراد و دور rpm ۱۲۰ برای مدت یک هفته گرما گذاری شدند. شاخص‌های رشد و مصرف نفت در مورد این مرحله از کشت نیز سنجیده شد و تغییرات PH، قبل از تنظیم روزانه ثبت گردید .

بررسی اثر دما در تجزیه زیستی نفت خام

برای تعیین اثر دما در رشد و تجزیه نفت خام، باکتری Pars Q2، در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری شیاردار، حاوی ۱۰۰میلی لیتر از محیط کشت شمارهٔ M 3 تلقیح گردید. غلظت نمک و PH محیط‌های کشت، در حد بهینه (غلظت نمک ۱۵ درصد، و PH ۸٫۲) تنظیم شده بود. پس از تلقیح باکتری (در حدود 10^6- 10^7باکتری در هر میلی لیتر)، یک میلی لیتر نفت خام به محیط‌ها افزوده شد. ارلن‌ها در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت یک هفته در دورrpm ۱۲۰ گرما گذاری شدند. کدورت سلولی، پروتئین تولید شده و تغییرات PH همراه با تنظیم روزانه، اندازه گیری و سنجیده شد.

بررسی اثر دور شیکر به منظور هوادهی محیط، در تجزیه زیستی نفت خام

پس از تعیین بهینه غلظت نمک، PH، و دما، به بررسی اثر بهینه سازی دور شیکر به منظور هوادهی محیط در تجزیه زیستی نفت خام پرداخته شد. برای این منظور باکتری ParsQ2 را (تقریباً 10^6-10^7 باکتری در هر میلی لیتر)، به ارلن‌های شیاردار ۲۵۰ میلی لیتری، حاوی ۱۰۰ میلی لیتراز محیط کشت M3 (با غلظت نمک بهینه ۱۵ درصد و PH بهینه ۸/۲)، تلقیح گردید. محیط‌های کشت تهیه شده، پس از افزودن یک میلی لیتر نفت خام در دورهای ۱۱۰، ۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰و rpm ۱۵۰ به مدت یک هفته در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. روزانه به منظور تعیین کدورت سلولی و پروتئین کل نمونه‌گیری صورت می‌گرفت. همچنین تغییرات PH قبل از تنظیم روزانه ثبت می‌شد.

بررسی اثر غلظت منبع نیتروژن، در تجزیه زیستی نفت خام

به منظور تعیین حداقل مقدار بهینهٔ نیتروژن برای رشد و تجزیه نفت خام، توسط باکتری Pars Q2 ، این میکروارگانیسم (در حدود 10^6-10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر) به ارلن‌های شیار دار، حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت M 3 تلقیح شد. غلظت نمک، و PH محیط در حد بهینه تنظیم شده، و به هر یک از ارلن‌ها مقادیر متفاوت ۰٫۱، ۰٫۲، ۰٫۵، ۱، و ۲ گرم در لیتر $(NH_4)_2 SO_4$ اضافه شد و سپس یک میلی لیتر نفت خام به محیط افزوده گردید. ارلن‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و دوربهینهٔ rpm ۱۴۰ به مدت یک هفته گرما گذاری شدند و روزانه به منظور ثبت تغییرات PH، تعیین کدورت سلولی و پروتئین کل نمونه گیری صورت می‌گرفت. تغییرات PH به طور روزانه توسط سود یک نرمال بر روی میزان اولیه تنظیم می‌شد.

بررسی اثر غلظت منبع فسفر، درتجزیه زیستی نفت خام

به منظور تعیین حداقل مقدار بهینهٔ فسفر برای رشد و تجزیه نفت خام، توسط باکتری Pars Q2، این میکروارگانیسم(در حدود 10^6-10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر) به ارلن‌های شیاردار حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت M3 تلقیح شد. غلظت نمک، PH محیط و میزان نیتروژن در حد بهینه تنظیم شد. به هر یک از

ارلن‌ها مقادیر متفاوت ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، و ۳ گرم در لیتر KH_2PO_4 به عنوان منبع فسفر و یک میلی لیتر نفت خام اضافه شد. ارلن‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، و دوربهینهٔ rpm ۱۴۰ به مدت یک هفته گرما گذاری شدند و روزانه به منظور ثبت تغییرات PH، تعیین کدورت سلولی و سنجش پروتئین کل نمونه گیری صورت می‌گرفت. تغییرات PH به طور روزانه توسط سود یک نرمال بر روی میزان اولیه تنظیم می‌شد.

تست وزن سنجی ترکیبات نفت خام

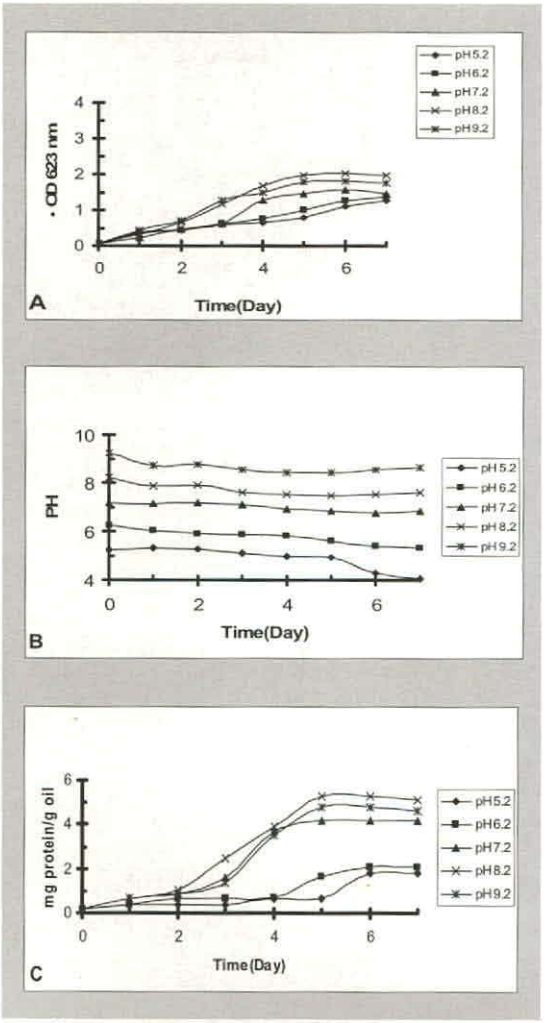
پس از تعیین شرایط بهینه نهائی، برای تعیین نوع و میزان ترکیبات نفتی مینرالیزه شده، از تست وزن سنجی اجزای نفت خام، به روش Thoand *et al.* (1998) عمل شد. برای جداسازی نفت خام از سایر ترکیبات محیط ، محتوای ارلن‌های کشت به طور کامل داخل یک دکانتور(قیف جدا کننده) تخلیه و سپس به وسیلهٔ ۲۰میلی لیتر کلروفرم شستشو داده شد. این شستشو تا سه مرتبه با استفاده ازهمین حجم کلروفرم تکرار گردید. بخش آلی حل شده در کلروفرم فیلتر و سپس به وسیله سدیم سولفات، آبگیری شد. نمونه با تبخیرحلال به کمک پمپ خلأ تغلیظ شد. در حین مراحل کار نباید دما از حدود ۴۰ درجه‌سانتی گراد بیشتر شود، زیرا درغیر این صورت ممکن است بخش‌های سبک نفت خام از دست برود. جهت بررسی وجود یا عدم وجود بیوسورفاکتانت تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها از دو تکنیک گسترش نفت (Morikawa *et al.*, 2000) و نیز انتشار و تجزیه زیستی نفت خام (Youssef *et al.*, 2004) استفاده گردید. پس از این مرحله آنچه ازترکیبات نفتی، درون بالن پمپ خلأ باقی مانده، بوسیله n- هگزان به‌دو بخش تفکیک می‌شود. این دو بخش توسط فیلتر Milipore SC 8 µm از هم جدا می‌شوند. بخش محلول در n-هگزان شامل هیدروکربن‌های اشباع شده، هیدروکربن‌های آروماتیک، و ترکیبات رزینی می‌باشد و بخش غیرمحلول در آن، از آسفالتن‌ها و ترکیبات قطبی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها، تشکیل شده است. این بخش پس از تبخیر کامل هگزان توزین می‌شود و آن را جزء آسفالتن موجود درنفت خام به‌حساب می‌آوریم. بخش محلول در n-هگزان مجدداً به کمک پمپ خلأ تغلیظ می‌شود وپس از توزین در ۲۰۰میلی‌لیتر کلروفرم حل شده و ۷ گرم سیلیکاژل (Geduran si 60, Merck) به آن افزوده می‌شود. این‌مخلوط ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار می‌گیرد، در این زمان نفت جذب سیلیکاژل شده، و کلروفرم تبخیر می‌شود. سپس با استفاده از سیلیکاژل یک ستون کروماتوگرافی به قطر ۰/۵ سانتی متر ساخته شد. ستون مزبور متعاقباً با استفاده از سیکلوهگزان، بنزن، ومتانول شستشو داده می‌شود. لازم به ذکر است که این شستشو با هر حلال سه مرتبه و هر بار با حجم ۲۰میلی لیتر انجام می‌گیرد. بخش‌های استخراج شده به وسیلهٔ حلال‌های سیکلوهگزان، بنزن و متانول به‌ترتیب بخش هیدروکربن‌های اشباع شده(Saturated)، بخش هیدروکربن های آروماتیک (Aromatic) و بخش رزینی (Resin)، تشکیل دهندهٔ نفت خام مو جود به‌حساب می‌آیند. هر یک از این اجزأ پس از تبخیر حلال مربوطه توزین می‌شوند. تمام مراحل مذکور در مورد یک نمونه شاهد بدون باکتری(به عنوان شاهد) نیز انجام شد.

نتایج

بررسی‌اثر PH در تجزیه زیستی نفت خام

با درنظر گرفتن غلظت اپتیمم نمک، فاکتور PH با تنظیم روزانه مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری درمحدودهٔ PHهای مورد آزمایش کمابیش قادر به رشد است، اما PHهای قلیائی را ترجیح می‌دهد. باکتری در PH ۸/۲ تقریباً از روز دوم وارد فاز لگاریتمی رشد شد و این فاز تا روز ششم ادامه داشت و سپس وارد فاز سکون شد. همان طور که مشاهده می‌شود، در این PH، به نسبت PHهای اسیدی و PH ۷/۲، فاز لگاریتمی سریع‌تر آغازشده ومیزان پروتئین تولیدی در این فاز ۵/۳ میلی گرم می‌باشد.۹/۲

PH با میزان پروتئین تولیدی ۴٫۸ میلی گرم، بعد از این PH قرار دارد. هنگام رشد باکتری درPHهای مختلف بدون استثناً PH محیط کشت کاهش می‌یابد، اما این افت PH در PHهای قلیائی در حدی است، که به رشد باکتری لطمه‌ای نمی‌زند وتا زمان نمونه برداری و تنظیم مجدد PH، باکتری آسیبی نمی‌بیند. به این ترتیب مشاهده شد که PH بهینه فاز تأخیری را کوتاهتر کرده است. (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی اثر pH در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری آرکی اکستریم هالوفیل تولید کننده بیوسورفاکتانت و مینرالیزه کننده نفت خام (Pars Q2)، غلظت نمک محیط کشت ۱۵٪، دور شیکر rpm ۱۲۰ و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری صورت گرفت. A : بررسی رشد سلولی به روش کدورت سنجی: B: تغییرات pH با تنظیم روزانه: C : بررسی رشد با اندازه گیری پروتئین تولیدی

بررسی اثر دما در تجزیه زیستی نفت خام

با استفاده از PH بهینه شده و غلظت نمک بهینه، رشد و تجزیه زیستی نفت خام، در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس شاخص‌های رشد، واضح است که باکتری دردمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مراتب رشد بهتری داشته است. دردمای ۳۵ درجه سانتی گراد فاز تأخیری رشد کوتاهتر بوده، و میزان پروتئین تولید شده نیز بیشتر می‌باشد.

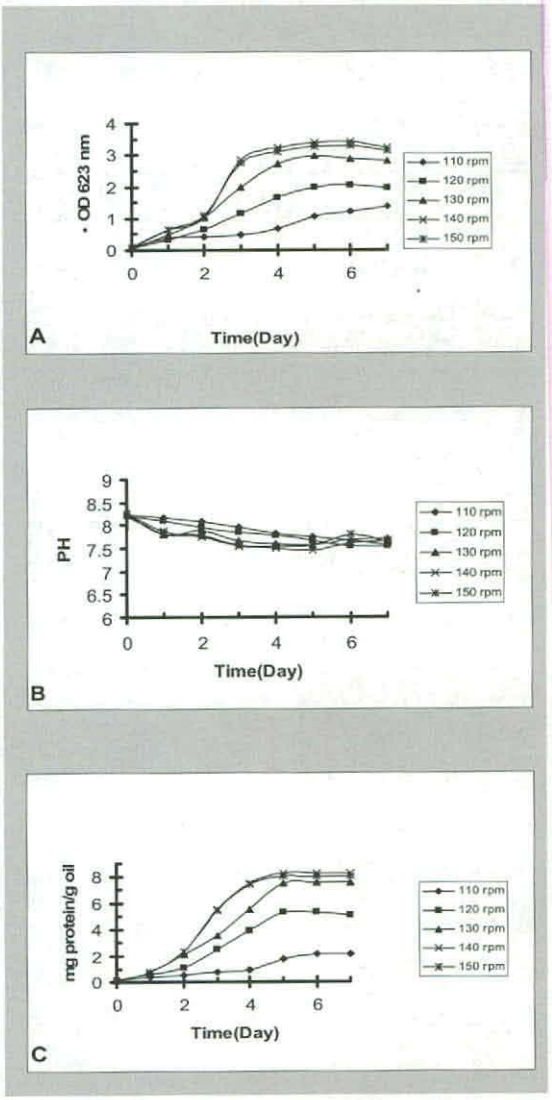
بررسی اثر هوادهی محیط با تنظیم دور شیکر در تجزیه زیستی نفت خام

انتخاب شرایط هوادهی بهینه محیط با تنظیم دور شیکر، با در نظر گرفتن مقادیر بهینهٔ **PH**، دما و غلظت نمک صورت گرفت. با افزایش میزان هوادهی‌محیط، میزان‌پروتئین تولید شده افزایش می‌یابد. دور **rpm** ۱۴۰ برای‌رشد باکتری و مینرالیزه کردن نفت خام بهینه می‌باشد. در این دور، باکتری از روز اول وارد فاز لگاریتمی شده واین فاز تا روز پنجم ادامه دارد، سپس وارد فاز سکون می‌شود و پروتئین تولید شده در این فاز در حدود ۸٫۲ میلی گرم می‌باشد. در دور **rpm** ۱۵۰ نیز رشد و تولید پروتئین تقریباً در همین سطح می‌باشد. در دور **rpm** ۱۱۰ به وضوح ازمیزان پروتئین تولید شده کاسته می‌شود، و فاز تأخیری تقریباً تا روز پنجم به طول می‌انجامد. مشاهده می‌شود که با افزایش دور شیکر به تدریج میزان پروتئین تولید شده افزایش می‌یابد و فاز تأخیری کوتاهتر می‌شود، تا این که در دور **rpm** ۱۴۰ و ۱۵۰ طول زمان فاز تأخیری به یک روز کاهش می‌یابد. (شکل ۲).

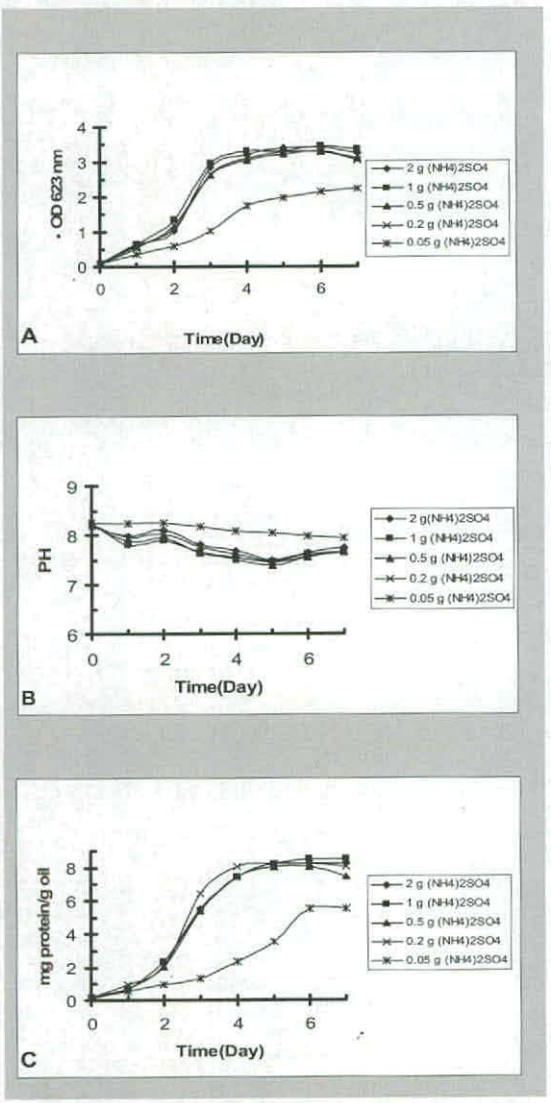
بررسی‌اثرغلظت منبع‌نیتروژن درتجزیه زیستی نفت خام

با مطالعهٔ رشد باکتری $Pars\ Q_2$ در حضور مقادیرمتفاوت نیتروژن، حداقل مقداربهینهٔ N برای رشد و تجزیه یک

میلی‌لیتر نفت خام، توسط سویه مذکور معادل ۰/۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$ درنظر گرفته شد. دراین مقدار و مقادیر بالاتر باکتری از روز اول وارد فاز لگاریتمی می‌شود و این فاز تا روز پنجم ادامه دارد و سپس وارد فاز سکون می‌شود. باکتری در مقدار ۰/۰۵ گرم $(NH_4)_2 SO_4$ نیز قادر به رشد بوده، اما فاز لگاریتمی با حدود یک تا دو روز تأخیر شروع شده، ومیزان پروتئین تولیدی در مقادیر بالاتر آمونیوم سولفات به مراتب بیشتر بوده است (شکل ۳).



شکل ۲-بررسی اثر دور شیکر به منظور هوادهی در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری آرکی اکستریم هالوفیل تولید کننده بیوسورفاکتانت و مینرالیزه کننده نفت خام (Pars Q2)، غلظت نمک محیط کشت ۱۵٪ ، PH برابر ۸/۲ و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری صورت گرفت. A: بررسی رشد سلولی به روش کدورت سنجی B: تغییرات pH با تنظیم روزانه C : بررسی رشد با اندازه گیری پروتئین تولیدی



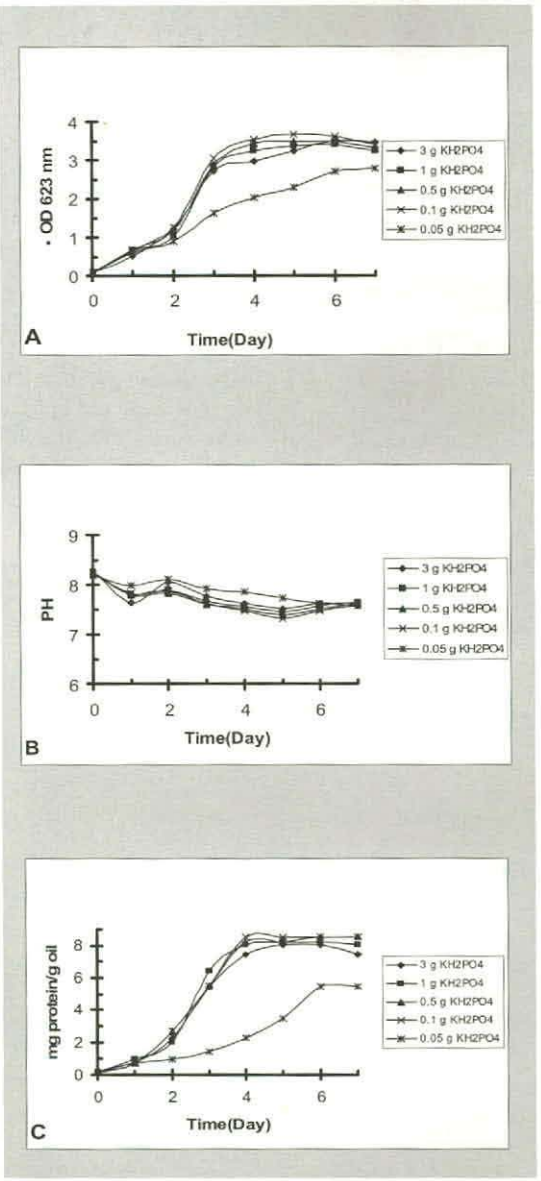
شکل ۳- بررسی اثر غلظت منبع نیتروژن (سولفات آمونیوم) در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری آرکی اکستریم هالوفیل تولید کننده بیوسورفاکتانت و مینرالیزه کننده نفت خام (Pars Q2)، غلظت نمک محیط کشت ۱۵ درصد ، PH برابر ۸/۲ دور شیکر ۱٤۰ rpm و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری صورت گرفت.
A: بررسی رشد سلولی به روش کدورت سنجی: B: تغییرات PH با تنظیم روزانه: C: بررسی رشد با اندازه گیری پروتئین تولیدی

بررسی اثر غلظت منبع فسفر در تجزیه زیستی نفت خام

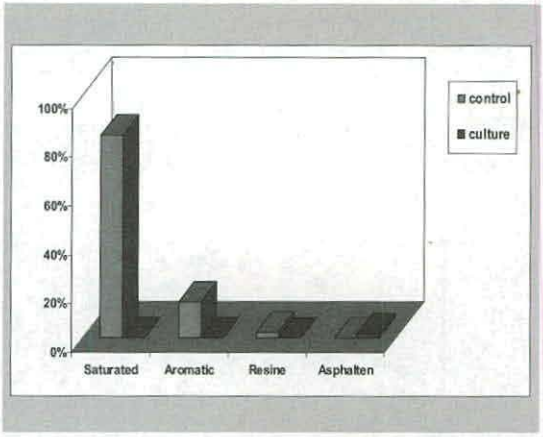
حداقل مقدار بهینهٔ P برای مصرف یک میلی لیتر نفت خام توسط سویه Pars Q 2 در شرایط بهینه از نظر دما، PH، هوادهی محیط، غلظت نمک ، و مقدار N، معادل ۰/۱ گرم KH_2PO_4 در نظر گرفته شد. در مقادیر ۰/۱ تا ۳ گرم KH_2PO_4 باکتری از روز اول وارد فاز لگاریتمی رشد می‌شود و مقدار پروتئین تولید شده نیز تقریباً در این محدوده از غلظت منبع فسفر، یکسان می‌باشد. از آنجائی که حداقل مقدار فسفر لازم برای تجزیه یک میلی لیتر نفت خام موجود مورد نظرمی‌باشد، مقدار ۰/۱ گرم KH_2PO_4 به عنوان مقدار بهینهٔ P انتخاب شد (به شکل ۴ مراجعه شود).

تست وزن سنجی اجزاء نفت خام

همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، میزان اجزاء مختلف درنفت خام مورد استفاده به صورت ذیل می‌باشد: جزء اشباع شده ۸۳ درصد، جزء آروماتیک ۱۵ ردصد ، جزء رزینی ۲ درصد، و جزءآسفالتن ۰ درصد . پس در شرایط بهینه شده نهائی از لحاظ فاکتورهای محیطی که شامل غلظت نمک ۱۵ در صد، PH ۸/۲، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، دور ۱۴۰ rpm , حداقل غلظت منبع نیتروژن ۰/۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$، و حداقل غلظت منبع فسفر ۰/۱ گرم KH_2PO_4 می‌باشد، باکتری Pars Q 2 بعد از یک کشت ۷ روزه، به طور تقریبی در حدود ۱۰۰ درصد نفت خام موجود را به مصرف رسانده است. با توجه به انجام آزمایشات وزن سنجی روی نمونه کنترل، مشخص شد که نمونه نفت مورد استفاده در دمای به کار گرفته شده دچار تبخیر نمی‌شد. نتایج حاصل که از دو تکنیک گسترش نفت و پراکندگی و تجزیه زیستی نفت نشان داد که پس از تبخیر کلروفرم این بخش هیچ فعالیت امولسیون کنندگی از خود نشان نداد در حالیکه بخش آبی واجد این خاصیت بود.



شکل٤- بررسی اثر غلظت منبع فسفر (پتاسیم دی هیدروژن فسفات) در تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری آرکی اکستریم هالوفیل تولید کننده بیوسورفاکتانت و مینرالیزه کننده نفت خام (Pars Q2) غلظت نمک محیط کشت ۱۵٪ ، نیتروژن ۰/۲ گرم، PH بربر ۸/۲، دور شیکر ۱٤۰ rpm و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری صورت گرفت: A: بررسی رشد سلولی به روش کدورت سنجی: B: تغییرات pH با تنظیم روزانه: C: بررسی رشد با اندازه گیری پروتئین تولیدی.



شکل۵- اجزاء موجود در نفت خام، قبل و پس از کشت ۷ روزه باکتری آرکی اکستریم هالوفیل تولید کننده بیوسورفاکتانت و مینرالیزه کننده نفت خام (Pars Q2).
اجزاء تشکیل دهنده نفت خام قبل از کشت باکتری
اجزاء باقیمانده نفت خام پس از کشت۷ روزه باکتری Pars Q2 در شرایط بهینه غلظت نمک ۱۵ درصد , ۸/۲ PH, دمای ۳۵ درجه سانتی گراد, و دور شیکر ۱۴۰ rpm , حداقل غلظت منبع نیتروژن۰/۲ گرم $(NH_4)_2SO$ و حداقل غلظت منبع فسفر ۰/۱ گرم KH_2PO_4

بحث

برطبق تقسیم‌بندی‌های انجام شده، دریاچه‌های نمکی به آن‌دسته از دریاچه‌ها گفته می‌شود، که میزان نمک درآنها بیش از ده درصد باشد (Kristjansson and Heggvidsson, 1995). PH این دریاچه‌ها معمولاً در محدوده ۵ تا ۸ گزارش شده است باشد (Kristjansson and Heggvidsson, 1995). مقدار نمک درمنطقه نمونه برداری شده در این تحقیق(دریاچه نمکدان واقع در جزیره قشم)، در حدود۲۸ درصد و PH آب نمونه برداری شده ازاین دریاچه در حدود ۷/۲ تا ۷/۵ می‌باشد. با توجه به مطالب عنوان شده، این منطقه کاملاً جزء نواحی با شوری بالا و شرایط اکستریم محسوب می‌شود. با نگاهی به نتایج این آزمایشات مشاهده می‌شود که PH بهینه رشد باکتری Pars Q_2 درمحیط معدنی (محیط M3)، ۸/۲ می‌باشد. در کل این باکتری در PH های قلیائی رشد بهتری داشته و تجزیه زیستی نفت را به نحو موثرتری انجام داده است. لازم به ذکر است که باکتری ParsQ 2 از دریاچه نمکدان واقع در جزیرهٔ قشم با PH تقریبی ۷/۵ به دست آمده است. همانطور که در شکل(۱) مشاهده می‌گردد در PH ۸/۲ در مقایسه با PH ۷/۲، فاز لگاریتمی یک روز زودتر شروع شده است ومیزان پروتئین تولید شده در این PH نیز به مراتب بیشتر بوده است. با توجه به این نتایج PH نقش مهمی درتجزیه زیستی نفت خام توسط این سویه ایفا می‌کند. به طوریکه با انتخاب PHبهینه، فاز تأخیری کوتاهتر شد. برخلاف این سویه، برخی باکتری‌ها برای تولید بیوسورفکتانت،PH های اسیدی را ترجیح می‌دهند(Cameotora and Makkar, 1998). Santos (1984) اظهار کردند که سویه‌های باکتری سودوموناس در PH ۶ تا ۶/۵ قادر به تولید بیوسورفکتانت هستند و در PHهای بالاتر از ۷ تولید بیوسورفکتانت کاهش می‌یابد(Cameotoraa and Makkar, 1998). Wever *et al.* (1997) گزارش کردند که باکتری *Rhodococcus rhodochrous* تنها در محدودهٔ PH ۶/۳ تا ۷/۹ ، قادر به رشد و تجزیه هیدروکسی بنزوتیازول می‌باشد. درحالی که باکتری Pars Q_2 در طیف وسیعی از PH، یعنی از حدود PH ۵/۲ تا ۹/۲ قادر به یک رشد نسبی می‌باشد. در کل مشاهده می‌شود که با رشد این باکتری PH محیط کشت کاهش می‌یابد. این کاهش PH می‌تواند به دلیل تولید بیوسورفاکتانت‌های آنیونی و یامتابولیت‌های حدواسط باشد(Rodriguez–Valera, 1988 ;Schelegel, 1992). اسیدی شدن محیط کشت باکتری *H. saccharovorum* وقتی که بر روی هگزوزها رشد می‌کند، می‌تواند به علت تجمع پیرورویک اسید و استیک اسید باشد(Rodriguez–Valera, 1988). Kushner (1965) عنوان کرد که با رشد باکتری‌های اکستریم هالوفیل بر روی کربوهیدرات‌ها محیط اسیدی می‌شود، که اسید تولید شده منجر به مرگ باکتریها می‌شود. بنابراین ضرورت حفظ و تنظیم سطح PH محیط کشت محرز می‌شود. البته باید گفت در کل، تغییرات PH مشاهده شده صرفاً در محیط‌های آزمایشگاهی ایجاد می‌شود. به عنوان مثال در محیط‌های دریائی آلوده به مواد نفتی، اولا

نسبت مقدار نفت خام آلاینده بر حجم آب محیط بسیار پائین است و تولید ترکیبات اسیدی توسط میکروارگانیسم‌ها نمی‌تواند تاثیری در PH محیط داشته باشد و درثانی رسوبات نیز به علت خاصیت تعویض یونی که دارند به محیط خاصیت بافری می‌دهند و مانع از تغییرات شدید PH می‌شوند.

در مورد تاثیر شرایط دمائی نتایج به دست آمده در این مطالعه به وضوح نشان می‌دهد که باکتری Pars Q 2 در دمای $35^{\circ}c$ نسبت به دمای $25^{\circ}c$، رشد بهتری داشته است. براساس گزارش Javor (1984) دمای بهینهٔ رشد گونه‌های مختلف هالوباکتریوم بین ۱۸ تا ۲۲ درجهٔ سانتیگراد واقع است. در مقایسه باکتری Pars Q 2 به مراتب در دمای بالاتری قادر به رشد مطلوب است. Moral & Guesada (1987) اظهار کردند که دما نقش مهمی در غلبه و افزایش تعداد آرکی باکتری‌ها دارد. البته مشاهده شده که تجزیه‌زیستی نفت در دماهای بسیار پائین، حتی در $10^{\circ}c$ نیز امکان پذیر است (Margesin and Schinner, 1997). همچنین تجزیه زیستی نفت خام توسط اسینتوباکتر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به خوبی انجام شده است (Hanson *et al.*, 1997). باکتری Pars Q 2 با افزایش دما به ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشد بهتری دارد و در نتیجه تجزیه زیستی نفت خام نیز بهتر صورت می‌گیرد. در اغلب آنزیم‌های بدست آمده از هالوفیل‌های قوی حساسیت به سرما مشاهده می‌شود (Gibbs, 1975). البته دربرخی دیگر از منابع عدم حساسیت به سرما در مورد آنزیم‌های باکتریهای اکستریم هالوفیل گزارش شده است (Rodriguez–Valera, 1988). روی هم رفته استفاده از ترموفیل‌ها درپاکسازی محیط زیست از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا با افزایش دما تجزیه زیستی با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد، و خود به خود خطرآلودگی‌های جانبی نیز کاهش می‌یابد (Niehaus *et al.*, 1999; Cameotora and Makkar, 1998). همچنین استفاده از میکروارگانیسم‌های ترموفیل درمخازن نفتی، جائی که دما بیش از ۵۰ درجه سانتی گراد می‌باشد، برای بازیافت میکروبی نفت بسیارمناسب می‌باشد (Cameotora and Makkar, 1998). در نتایج به دست آمده مشاهده می‌گردد که اکسیژن درافزایش میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه مورد مطالعه نقش به‌سزائی داشته است. با افزایش دورشیکر از ۱۱۰rpm به ۱۴۰ rpm به وضوح فاز تاخیری کوتاهتر و میزان پروتئین تولید شده بیشتر بوده است. در دور ۱۵۰ rpm طول زمان فاز تاخیری و میزان پروتئین تولید شده ثابت و تقریباً مشابه ۱۴۰ rpm بوده است. تاثیر اکسیژن در تجزیه زیستی نفت خام درجلگه نمکی مصنوعی (mesocosm) مشهود است. در این آزمایشات طغیان و نوسانات جریان آب باعث هوادهی رسوبات آلوده به نفت و در نتیجه بهبود شرایط تجزیه زیستی می‌شود (Wright *et al.*, 1996). به دام افتادن سلول‌های باکتری درون قطرات نفت، باعث غیرفعال شدن سلول‌ها می‌شود. پوشیده شدن‌محیط توسط لایه نفتی، مانع ازنفوذ اکسیژن موردنیاز برای متابولسیم باکتری‌ها به درون محیط می‌شود. با هوادهی‌محیط، افزایش‌رشد، تولید بیوسورفاکتانت و امولسیونه شدن‌نفت، اکسیژن به نحو بهتری در محیط نفوذ پیدا می‌کند (Schelegel, 1992). Sendstate *et al.*, (1982) تجزیه زیستی آلودگی‌های نفتی را در جزیره بافین مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه حاکی از آن بود که نوسانات جزر و مدی میزان تجزیه آلودگی‌های نفتی را افزایش می‌دهد، زیرا به این ترتیب اکسیژن و مواد غذائی به نسبت بیشتری در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرد. Wever *et al.* (1997) اظهار کردند که اکسیژن در تجزیه سریع‌تر بنزو تیازول توسط *Rhodococcus rhodochorous*، تأثیر زیادی داشته است. ناگفته نماند که در این پژوهش به منظور هوادهی بهتر با دور کمتر، جهت جلوگیری از استهلاک دستگاه، از ارلن‌های شیاردار استفاده شد. براساس تحقیقات و آزمایشات انجام شده، میزان تجزیه زیستی در طبیعت تحت تاثیر غلظت منبع نیتروژن و

فسفات می‌باشد (Swanell *et al.*, 1996; Atlas and Bartha, 1993). Sendstate 1976 عنوان کرد که افزودن نیتروژن و فسفات معدنی، فرآیند جبران زیستی را سرعت می‌بخشد، ولی برمیزان کمی تجزیه زیستی تاثیری ندارد. در مطالعه حاضر چنانچه میزان نیتروژن و فسفات جهت تجزیه یک میلی‌لیتر نفت خام به ۰/۰۵ گرم تقلیل یابد، علاوه بر طولانی شدن فاز تاخیری، از میزان پروتئین تولیدی نیز کاسته می‌شود. درمحدوده ۰/۱ تا ۳ گرم KH_2PO_4 و ۰/۲ تا ۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$، سرعت واکنش و میزان پروتئین تولید شده، تغییر چندانی ندارد. براساس گزارش گیبس (۱۹۷۵) حداقل مقدار ازت و فسفر مورد نیاز برای تجزیه هر گرم نفت خام معادل ۰/۱۹۵ گرم (NH_4Cl) و ۰/۰۲۴ گرم (Na_2HPO_4) می‌باشد (Gibbs, 1975). حداقل مقدار ازت و فسفر مورد نیاز برای تجزیه یک میلی لیتر نفت خام توسط سویه Pars Q2 معادل ۰/۱ گرم KH_2PO_4 (فسفر) و ۰/۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$ (نیتروژن) می‌باشد. علاوه بر غلظت منبع نیتروژن و فسفر، نوع منبع نیتروژن و فسفر نیز در روند تجزیه زیستی بسیار تاثیرگذار است(Swanell *et al.*, 1996). Lee (1991) در تحقیقات خود مقایسه‌ای بین منبع نیتروژن و فسفات آلی و معدنی و تاثیر آنها در تجزیه زیستی انجام دادند. نتایج حاکی از آن بود که نیتروژن و فسفات معدنی، میزان رشد باکتری و تجزیه زیستی نفت‌خام را تا حد زیادی افزایش می‌دهد و لیکن کاربرد منبع آلی نیتروژن و فسفات تأثیر بسیار اندکی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دارد. استفاده همزمان از چند منبع نیتروژن و فسفر آلی تجزیه زیستی نفت را کاملاً مهار می‌کند. این امراحتمالاً به این علت است که میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده به جای استفاده از هیدروکربورهای نفتی، ترجیح می‌دهند بخش کربنی منبع آلی نیتروژن و فسفات را به مصرف برسانند (Swanell *et al.*, 1996,). باکتری Pars Q 2 در شرایط بهینه نهائی تقریباً پس از یک دوره کشت ۷ روزه نزدیک به صد در صد نفت خام موجود را مینرالیزه کرده است. در همین رابطه Thoand *et al.* (1998) با استفاده از ۸ محصول صنعتی میکروبی حداکثر ۲۳/۲ درصد از نفت‌خام را طی ۸ روز مینرالیزه کرده بودند. همچنین Tanghe *et al.*, (1999) بعد از کشت ۱۶ روزه یک میکروارگانیسم تجزیه کننده نزدیک به ۷۰ درصد از Nonylphenol موجود در محیط را تجزیه نمودند.

در کل این باکتری مزیت‌های ویژه‌ای برای کاربردهای صنعتی و زیست محیطی دارد. مزیت رشد این باکتری در غلظت‌های بالای نمک، محدوده وسیع PH و بازدهی بسیار بالای تجزیه زیستی نفت خام، این میکروارگانیسم را برای استفاده صنعتی از قبیل آلودگی‌های نفتی در مناطق با شوری بالا و همچنین جهت تولید بیوسورفاکتانت به خصوص برای استفاده در چاه‌های نفتی به ظاهر تخلیه شده جهت تولید نفت ثالثیه بسیار مناسب می‌سازد.

منابع

Atlas, N. M. & N. Bartha (1993). Microbial Echology: fundamentals and applications 3rd ed Addison Wesley Longman, Publishers , Amsterdam.

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

Daane, L.L., I. Harjona, G.J. Zylstra G.J. & M.M. Haegblom (2001). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria accociated with the rhizosphere of salt marsh plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:2683-2691.

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

Hanson, K.G., A. Nigam, M. Kapadia M. & A.J. Desai (1997). Bioremidiation of crude oil contamination with Acinetobacter sp. A3, *Curr. Microbiol.* 35:191-193.

Jain, R. K., M. Kapur, S. Labana, B. Lai, P.M. Sarma, D. Bhattacharya and I.S. Thakur (2005). Microbial diversity: Application of

Sendstate (1982) in Swanell P.J.R. , Lee K. & M. Mcdonagh (1996). Field evaluation of marine oil spill bioremediation, *Microbiol. Rev.* 60:342-365.

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

Swanell, P.J.R., K. Lee & M. Mcdonagh (1996). Field evaluation of marine oil spill bioremediation, Microbiol. Rev. 60:342-365.

Tanghe, T., W. Dhooge & W. Versrtaete (1999). Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:746-751.

Thoand, G., P. Bauda , J. Oudot, G. Krisch, C. Sutton & J.F. Viadalie (1998). Laboratory evaluation of Crude oil Biodegradation with commercial or natural microbial inoclua. *Can. J. Microbiol.*, 45:106-115.

Ventosa, A. & J. J. Nieto (1995). Biotechnological application and potentialities of halophilic microorganisms. *World journal of microbiology and Biotechnology,* 11:85-94.

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

Wright, A.L., R.W. Weaver & J. W. Webb (1996). Oil bioremediation in salt marsh Mesocosms as influenced by N and P fertilization, flooding and season. *Water, Air, and soil pollution*, 95:179.

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

microorganisms for the biodegradation of xenobiotics.

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.

Kristjansson, J.K. & G.O. Herggvidsson (1995). Ecology and habitates of extremophiles, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41:17-25.

Kushner (1965) in Rodriguez–Valera F. (1988). Halophilic bacteria vol. II Pub CRC Press.

Lee (1991) in Swanell P.J.R. , Lee K. & M. Mcdonagh (1996). Field evaluation of marine oil spill bioremediation, *Microbiol. Rev.*, 60:342-365.

Margesin, R. & F. Schinner (1997). Bioremidiation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47:462-468.

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

Moral & Guesada(1987) in Ventosa A. ; Nieto J. J. & A. Oren (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 504 –544.

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

Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kaehler & G. Antranikian (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51:711- 729.

Rodriguez–Valera F. (1988). *Halophilic bacteria* vol. II Pub CRC Press.

Santos (1984) in Cameotora S.S. & R.S. Makkar (1998). Synthesis of biosurfactant in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50:520-529.

Schelegel, H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage, George Thieme Verlag Stuttgart.

Sendstate (1976) in Swanell P.J.R. , Lee K. & Mcdonagh M. (1996), Field evaluation of marine oil spill bioremediation, Microbiol. Rev., 60:342-365.