



عظیم

علوم محیطی سال پنجم، شماره سوم، بهار ۱۳۸۷
ENVIRONMENTAL SCIENCES Vol.5, No.3, Spring 2008

۱۰۷-۱۱۲

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

علی ابوالحسنی سورکی^{۱*}، غلامحسین ابراهیمی پور^۲ و حسین کرمانیان^۳

۱- پژوهشکده نفت، جهاد دانشگاهی شهید بهشتی تهران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

۳- گروه صنایع خمیر و کاغذ دانشکده مهندسی فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران

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

Ali Abolhasani^{1*}, Gholamhosein Ebrahimiopour² and
Hosein Keranian³

1- Research Institute of Petroleum, ACECR, Shahid Beheshti
Branch, Tehran

2- Department of Biology, Faculty of Biological Sciences,
Shahid Beheshti University

3- Department of Pulp and Paper Technology Faculty of New
Technologies and Energy, Shahid Beheshti University

Abstract

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

Keywords: coal solubilization, coal tailing, biofuel.

چکیده

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

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

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

مقدمه

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

تعدادی از گونه‌های باکتریایی و قارچی از راسته دوترومایست‌ها و بازیدیومایست‌ها یافت شده‌اند که قادرند ذغال سنگ با کیفیت پایین را به یک فراورده مایع با ترکیب‌های شیمیایی پیچیده شامل humic acid و fulvic acid تبدیل نمایند (Cohen & Gabriele, 1982; Willmann & Fakoussa, 1999). قارچ *Trichoderma atroviride* قادر است بر روی پلیت‌های حاوی منبع نیتروژن و کربن مناسب، ذغال سنگ را محلول سازی نماید (Hoolker et al., 1997).

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

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

نمونه گیری از معادن متروکه ذغال سنگ و همچنین چوب‌های جنگلی در حال فساد در شهرستان سوادکوه استان مازندران صورت گرفت. نمونه‌ها که شامل آب و لجن در مورد معادن متروکه و چوب‌های پوسیده جنگلی بودند درون ظروف شیشه‌ای در پیچ‌دار استریل بر روی یخ، سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان ایزوله کردن باکتری‌ها در یخچال (4°C) نگهداری شدند. نمونه‌هایی از آب و خاک محل نمونه گیری نیز به منظور بررسی pH، مقدار نمک، و دیگر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن به آزمایشگاه منتقل شد.

مواد و محیط‌های کشت

کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این پژوهش از درجه خلوص آنالیتیکی بوده و از شرکت مرک خریداری شدند، به جز Tris Base (Tris hydroxymethyl amino methane) که مربوط به شرکت Sigma بود. ذغال سنگ و ضایعات ذغال شویی از شرکت ذغال سنگ البرز مرکزی تهیه شد. ترکیب محیط پایه معدنی شامل ۱/۹۵ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۲۴ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن (II)، ۰/۰۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزوم، ۱۰ گرم کلرید سدیم، ۰/۰۱ گرم کلرید کلسیم و ۱ میلی‌لیتر محلول میکرو عناصر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود (ابراهیمی پور و ابوالحسنی، ۱۳۸۳). 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 ولفرامات سدیم، ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲۵ درصد در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. pH محیط‌ها با استفاده از بافر tris روی ۷/۵ تنظیم کردید.

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

جداسازی سویه‌های باکتریایی

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

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

اندازه‌گیری پروتئین

از اندازه‌گیری میزان پروتئین کل سنتز شده، به عنوان شاخص دقیقی از مصرف هیدروکربن‌های ذغال سنگی بوسیله باکتری‌ها استفاده شد. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت در داخل لوله اپندورف در $10000 \times g$ سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی توسط محلول استریل NaCl ۱ درصد شستشو داده شد و مجدداً در $10000 \times g$ سانتریفیوژ شد. به رسوب سلولی حاصل ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از هم زدن، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH اضافه شد و به هم زده شد. لوله‌ها سپس به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند. رنگ آمیزی پروتئین به روش لاری صورت گرفت (Sueszmuth et al., 1987).

محلول سازی ذغال سنگ

به منظور تعیین میزان محلول‌سازی ذغال سنگ، مخلوط

تست تجزیه ذغال سنگ بوسیله ایزوله‌ها

تک تک باکتری‌های ایزوله شده، در لوله آزمایش

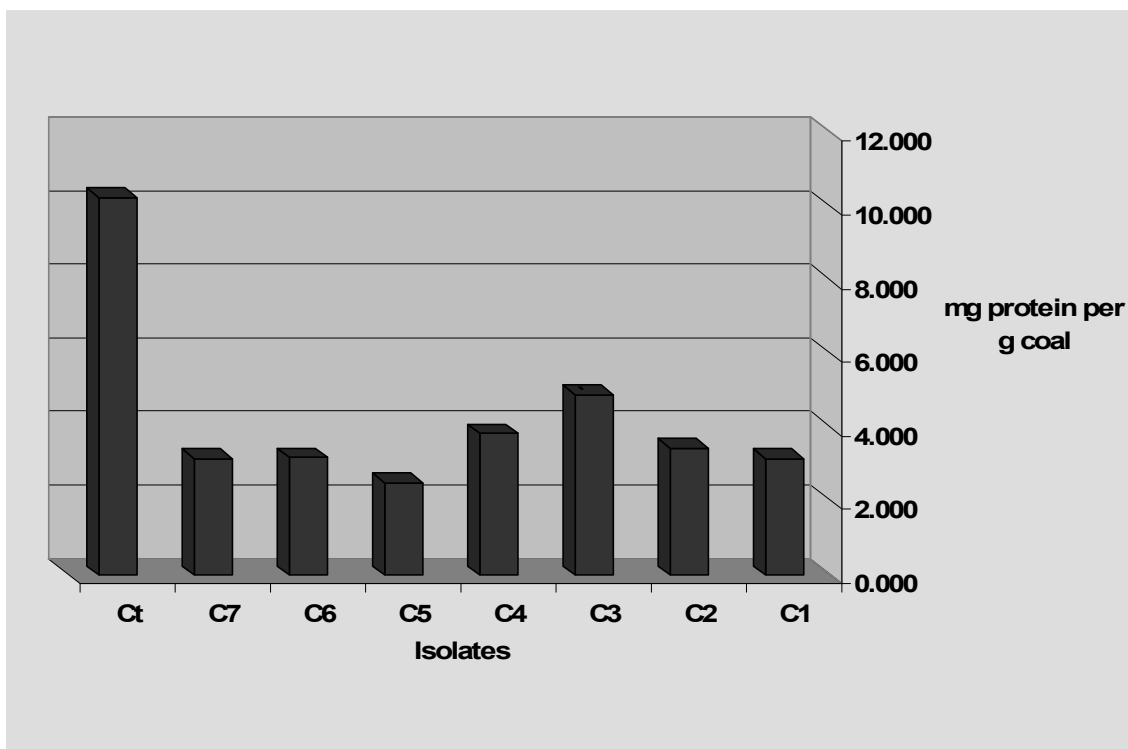
اندازه گیری وزن خشک ذغال سنگ باقی مانده بعد از ۱۲ ساعت قرار گرفتن در ۱۰۰ درجه سانتی گراد، صورت گرفت.

نتایج و بحث

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

شکل ۱ تولید پروتئین توسط ایزوله ها را بر روی سوبسترای ذغال سنگ نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود زمانی که مخلوط ایزوله ها کشت داده شده بودند تولید پروتئین، که به عنوان شاخصی از تجزیه و مصرف شدن ذغال سنگ توسط باکتری ها می باشد، بالاترین میزان را نشان می دهد. مشاهدات چشمی و میکروسکوپی نیز این موضوع را تأیید نمودند.

باکتریایی در محیط پایه معدنی با افزودن مکمل عصاره مخمر (۱ گرم در لیتر)، جداگانه با دو سوبسترای ذغال سنگ پودر شده و پس مانده های ذغال شویی کشت داده شدند (Mester et al., 1995). غلظت ذغال سنگ در این آزمایش (w/v) ۱ درصد و تعداد باکتری های تلقیح شده حدود 10^6 باکتری در میلی لیتر بود. کشت ها به مدت ۱۵ روز بر روی شیکر rpm ۲۰۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس کشت ها سانتریفوژ شدند (۱۵ دقیقه در $10000 \times g$)، محلول رویی فیلتر گردید و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-120-02) اندازه گیری شد. با در نظر گیری یک شاهد بدون باکتری، محلول سازی ذغال سنگ با افزایش جذب نور در ۴۵۰ نانومتر سنجیده شد. همچنین آزمایش وزن سنجی نیز، با



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

بود. وزن سنجی ذغال سنگ باقی مانده در پایان دوره رشد ۱۵ روزه کنسرسیونم باکتریایی برای ذغال سنگ و پس ماند ذغال شویی به ترتیب ۱۲ و ۹ درصد بود. ذغال سنگ محلول سازی شده می تواند به عنوان سوپسترای بالقوه ای برای تولید میکروبی سوخت های بیولوژیکی مانند اتانول، متانول و متان و همچنین محصولات بیوتکنولوژی دیگر مورد استفاده قرار گیرد. مکانیسم دقیق تجزیه ذغال سنگ و محلول سازی آن همچنان ناشناخته باقی مانده است ولی این گونه تصور می شود که این فرایندها تحت تأثیر همزمان متابولیت های متعدد سلولی (Laborda et al., 1999)، آنزیم های لیگنولیتیک (Strandberg & Lewis, 1988)، بیوتنسیدها (Willmann & Fakoussa, 1997)، عوامل چلات کننده و ترکیبات قلیایی (Fakoussa, 1994 و Quigley et al., 1989) می باشند.

شکل ۲ ذغال سنگ محلول شده را بعد از سانتریفوژ و فیلتر شدن نشان می دهد. در این تصویر، مایع حاصل از محلول سازی ضایعات ذغال شویی در مقایسه با ذغال سنگ پودر شده و شاهد بدون باکتری نشان داده شده است. سوبه های باکتریایی ضایعات ذغال شویی را بیشتر از ذغال سنگ پودر شده محلول سازی نمودند. به نظر می رسد علت این افزایش تأثیر pH و همچنین تبدلات کاتیونی ترکیبات همراه در ضایعات ذغال سنگی باشد. آزمایش اسپکتروفتومتری و وزن سنجی نیز نتایج فوق را تأیید می نماید (جدول ۱). همان طور که مشاهده می شود محلول حاصل از کشت کنسرسیونم باکتریایی بر روی ضایعات ذغال شویی ۱/۴۷۵ اختلاف جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر را نسبت به شاهد نشان می دهد در صورتی که این نتایج در مورد پودر ذغال سنگ ۰/۸۳۲



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

جدول ۱- اسپکتروفتومتری و وزن سنجی کشت کنسرسیونم باکتریایی بر روی ذغال سنگ و پس ماند ذغال شویی

سوبسترا	اختلاف جذب ۴۵۰ نانومتر نسبت به شاهد	درصد کاهش وزن سوبسترا
	شاهد	نمونه
ذغال سنگ	۰,۰۸۶	۱,۵۶۱
پس ماند ذغال شویی	۰,۰۸۱	۰,۹۱۳

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

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

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



تقدیر و تشکر

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

منابع

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

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

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

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

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

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

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