

بررسی کارایی میکروارگانیسم‌های خالص‌سازی شده از محیط‌های حاوی ترکیبات نفتی در تولید مواد زیست فعال سطحی

نادر مختاریان^۱ امیررضا طلائی^۲ نعمت‌ا... جعفرزاده^۳ محمدرضا طلائی^۴ مسعود بهشتی^۵

(دریافت ۸۷/۱۲/۱۸ پذیرش ۸۹/۱/۱۲)

چکیده

آلودگی خاک با نفت خام منجر به ضایعات شدید زیست‌محیطی در اکوسیستم می‌گردد. از میان روش‌های گوناگونی که برای حذف نفت خام از خاک مورد بررسی قرار گرفته است، شستشوی خاک با کمک ترکیبات زیست فعال سطحی یک روش سریع و اقتصادی است که علاوه بر حذف ترکیبات نفتی از خاک، منجر به حذف فلزات سنگین نیز می‌گردد. در این مطالعه از پنج منطقه که مدت‌ها در تماس با ترکیبات نفتی بوده‌اند برای به‌دست آوردن میکروارگانیسم‌هایی که توانایی زیستن در مجاورت نفت خام و تولید بیوسورفکتانت‌ها را دارا باشند، نمونه‌برداری شد. در این مطالعه ۱۶ میکروارگانیسم، جداسازی و خالص‌سازی گردید. این میکروارگانیسم‌ها پس از افزایش تعداد و کشت در محیط معدنی، مورد آزمایش پراکندگی نفت و آزمون شاخص امولسیون سازی (E24) قرار گرفتند. میکروارگانیسمی که A-12 نامیده شد و یک باکتری گرم منفی میله‌ای بود دارای بیشترین شاخص امولسیون‌سازی معادل ۳۶ درصد بود. در این مطالعه به ازای هر لیتر محیط کشت معدنی حاوی ۳۵۶ میلی‌گرم میکروارگانیسم، ۳ گرم پودر خشک بیوسورفکتانت از محیط کشت، خالص‌سازی گردید. از میکروارگانیسم مذکور به‌طور مستقیم و یا پس از تولید و خالص‌سازی بیوسورفکتانت تولیدی می‌توان برای تصفیه خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: نفت خام، بیوسورفکتانت، بیوآمولسیفایر، E24

Producing Biosurfactants from Purified Microorganisms Obtained from Oil-contaminated Soil

Nader Mokhtarian¹

Amir Reza Talaie²

Nematollah Jaafarzadeh³

Mohammad Reza Talaie⁴

Masoud Beheshti⁵

(Received March 9, 2009 Accepted Apr. 1, 2010)

Abstract

Contamination of soil by crude oil can pose serious problems to ecosystems. Soil washing by solutions containing biosurfactants is one of the most efficient methods for the remediation of contaminated soil by crude oil because it removes not only the crude oil but also heavy metals. In this study, five soil samples were taken from fields exposed to oil compounds over the years in order to produce biosurfactants from microorganisms that were capable of degrading oil compounds. Sixteen such microorganisms were isolated. After cultivation, their emulsification strength was examined using E24 test. From among the experimental microorganisms, a gram-negative and rod-shape microorganism called A-12 showed the greatest value of the E24 test index (36%). For each liter of the culture medium containing 365 mg of microorganisms, 3 gr of the biosurfactant compound was produced and separated as dried powder. The purified biosurfactant was used in the soil washing process. Also, the insulated microorganisms were capable of degrading crude oil floating on wastewaters.

Keywords: Crude Oil, Biosurfactant, Bioemulsifier, E24.

1. M.Sc. and Academic Member of Chemistry Eng. Dept., Azad University, Branch of Shahreza
2. M.Sc. and Academic Member of Civil and Environmental Eng., Jami Institute of Tech., Delijan (Corresponding Author) (+98 866) 4225678 atalaie@ami.ac.ir
3. Assoc. Prof. of Environmental Health Eng., Faculty of Public Health, Ahwaz University of Medical Sciences, Ahwaz
4. Assoc. Prof. of Chemical Eng., Dept. of Eng., Isfahan University, Isfahan
5. Assist. Prof. of Chemical Eng., Dept. of Eng., Isfahan University, Isfahan

۱- کارشناس ارشد و عضو هیئت علمی گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا

۲- کارشناس ارشد و عضو هیئت علمی گروه مهندسی عمران و محیط زیست، مؤسسه آموزش عالی جامی، دلیمان (نویسنده مسئول) ۴۲۲۵۶۷۸ (+۹۸۶۶) atalaie@ami.ac.ir

۳- دانشیار گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

۴- دانشیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اصفهان

۵- استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اصفهان

پرداختند [۱۵]. همچنین آنها در مطالعه دیگری نیز قدرت امولسیون سازی برخی میکروارگانیزم‌های به‌کار گرفته شده در تجزیه گازوئیل در حالت کشت خالص را نیز مورد بررسی قرار دادند [۱۶ و ۱۷]. یوروم و همکاران^۴ در مطالعه‌ای برای حذف نفت خام در خاکهای آلوده از سدیم دودسیل سولفات (SDS)^۵ که یک سورفکتانت ترکیبی مصنوعی است و رامونولپید^۶ که ترکیب اصلی بیوسورفکتانت‌های تولیدی توسط میکروارگانیزم‌ها را تشکیل می‌دهد، استفاده کردند [۹]. یوروم متوجه شد که رامونولپید کارایی نسبتاً برابری با SDS دارد و نتایج تحقیقات وی حاکی از این حقیقت بود که کاربرد میکروارگانیزم‌ها در تولید بیوسورفکتانت می‌تواند رقیبی سرسخت و جدی برای سورفکتانت‌های مصنوعی باشد.

هدف از این مطالعه به‌دست آوردن گونه‌هایی از میکروارگانیزم‌ها بود که توانایی تولید این ترکیبات را برای کاربردهای زیست‌محیطی دارا باشند. در این مطالعه از پنج منطقه که میکروارگانیزم‌ها در آن با ترکیبات نفتی در تماس بوده‌اند، نمونه‌برداری شد و میکروارگانیزم‌های موجود در آنها که قادر به ادامه حیات در مجاورت نفت خام بودند، جداسازی و خالص‌سازی گردیدند. این میکروارگانیزم‌ها برای تولید ترکیبات زیست‌فعال سطحی مورد آزمایش قرار گرفتند و بهترین میکروارگانیزم پس از کشت در محیط معدنی شناسایی گردید. در نهایت مواد تولیدی توسط میکروارگانیزم انتخابی خالص‌سازی شد. در این مطالعه با توجه به محدود نمودن دسترسی میکروارگانیزم‌ها به منبع کربن، میکروارگانیزم‌ها مجبور به مصرف نفت خام به‌عنوان منبع کربن خود شدند، بنابراین میکروارگانیزم‌های به‌دست آمده در این مطالعه علاوه بر تولید بیوسورفکتانت، توانایی مصرف و تجزیه مستقیم نفت خام را نیز داشتند.

۲- مواد و روشها

۲-۱- نمونه برداری و آزمایش‌ها

در این مطالعه از پنج نقطه شامل فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران، خاک آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران، فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران، خاک اطراف محل تخلیه بنزین و گازوئیل در یک پمپ بنزین در شهر اهواز و نفت خام ورودی پالایشگاه اصفهان نمونه‌برداری شد. نمونه‌برداری خاک از عمق پنج سانتی متری صورت گرفت و تمام نمونه‌ها تا رسیدن به آزمایشگاه در ظروف شیشه‌ای استریل در کنار یخ نگهداری شدند [۱]. در حین

آلاینده‌های گوناگون ورودی به محیط‌زیست، باعث ایجاد خطرات جدی گردیده و محققان بسیاری را بر آن داشته است که روشهای گوناگونی را برای تصفیه محیط‌های آلوده به‌کاربرند. نفت و مشتقات آن یکی از آلاینده‌های مهمی است که امروزه محیط زیست را به چالش کشانده است. نفت ترکیبی از هزاران ماده آلی می‌باشد که بخش اعظم آن را ترکیبات هیدروکربنیک^۱ تشکیل می‌دهد [۱].

از میان روشهای گوناگونی که برای تصفیه نفت خام از خاک مورد بررسی قرار گرفته‌اند، شستشوی خاک با کمک سورفکتانت‌ها^۲ یک روش سریع و گاه اقتصادی است که علاوه بر حذف ترکیبات نفتی از خاک منجر به حذف فلزات سنگین نیز می‌گردد [۲ و ۳]. شستشوی خاک در مقایسه با روشهای بیولوژیکی تجزیه ترکیبات نفتی در خاک که به‌طور بالقوه به تغییرات آب و هوایی وابسته است، بسیار سریع‌تر بوده و تقریباً در هر شرایطی قابل کاربرد است. روشهای سنتی شستشوی خاک به‌طور وسیعی توسط محققان مختلف در سالهای اخیر مورد بررسی قرار گرفته است [۴ و ۵]. مطالعات نشان داده است که ترکیبات فعال سطحی قادر به جمع‌آوری و تغلیظ نفت خام در یک محیط آبی و بدون هیچ‌گونه تغییر شیمیایی بر روی آن می‌باشند [۶]. با کمک مطالعات صورت گرفته توسط محققان مختلف، رفتار محلولهای حاوی سورفکتانت‌ها در محیط‌های گوناگون شناخته شده است [۷ و ۸].

مواد فعال سطحی که در طبیعت تولید می‌گردند تحت عنوان بیوسورفکتانت‌ها^۳ طبقه‌بندی می‌شوند [۹]. این مواد در مقایسه با ترکیبات مصنوعی دارای فعالیت بسیار عالی می‌باشند و از ارگانیزم‌های زنده تولید می‌شوند، در نتیجه هم منابع تجدیدپذیری هستند و هم سمیت کمتری را ایجاد می‌نمایند [۱۰ و ۱۱]. در استفاده از این مواد نیاز به حذف ترکیبات شیمیایی از خروجی سیستم نیست و این امر موجب بی‌خطر بودن و طبیعی بودن این ترکیبات می‌گردد. تولید این ترکیبات در سطح تجاری و استفاده از آنها در حذف فلزات سنگین و ترکیبات نفتی توسط بعضی از محققان به انجام رسیده است [۱۲، ۱۳ و ۱۴].

تأثیرات مثبت مواد زیست‌فعال سطحی در تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی و همچنین در شستشوی خاکهای آلوده به نفت نیز گزارش شده است [۱۲]. طلائی و همکاران در مطالعه خود به بررسی رفتار امولسیون‌سازی میکروارگانیزم‌های خالص‌سازی شده در هنگام تصفیه بیولوژیکی فاضلابهای حاوی نفت خام شناور

⁴Urum et al.

⁵ Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)

⁶ Rhamnolipid

¹ Hydrophobic

² Surfactants

³ Biosurfactants

نمونه برداری نیز دمای خاک با کمک یک دماسنج الکلی اندازه گیری شد. pH و رطوبت خاک نیز پس از رسیدن نمونه به آزمایشگاه مورد سنجش قرار گرفت [۱۵].

۲-۲-۲- جداسازی میکروارگانیسم ها

۱-۲-۲- جداسازی میکروارگانیسم ها از خاک

۵ گرم از دو نمونه خاک جمع آوری شده در دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری جداگانه حاوی ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک^۱ ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یک شیکر با دور ۱۶۰ rpm قرار گرفت تا میکروارگانیسم های موجود در خلل و فرج موجود در خاک نیز در سرم فیزیولوژیک معلق شوند [۱۵]. پس از این مدت ارلن مایرها به مدت ۱۵ دقیقه در یک محیط ساکن، نگهداری شدند. سپس دو میلی لیتر از محتویات آنها به دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی محیط کشت معدنی بود، اضافه شد و pH نمونه به کمک محلول هیدروکسید سدیم بر روی ۷/۲ تنظیم شد [۱۸]. لازم به ذکر است که محیط کشت معدنی شامل ۰/۱ گرم در لیتر $MgSO_4 \cdot 0/5$ ، KH_2PO_4 ، $0/01$ گرم در لیتر $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ، $0/01$ گرم در لیتر $FeSO_4$ ، 1 گرم در لیتر $NaNO_3$ و $0/5$ گرم در لیتر K_2HPO_4 بود [۱۹]. یک میلی لیتر نفت خام به عنوان تنها منبع کربن نیز به محیط اضافه گردید. ارلن مایرها به مدت ۷۲ ساعت در یک شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شدت هوادهی ۱۶۰ rpm قرار گرفتند. پس از گذشت این مدت مجدداً دو میلی لیتر از محتویات آنها به دو ارلن مایر مشابه دیگر انتقال داده شد و به مدت ۷۲ ساعت دیگر در همان شرایط نگهداری گردید [۱۵].

۲-۲-۲- جداسازی میکروارگانیسم ها از فاضلاب و نفت خام

یک میلی لیتر از فاضلابهای فرایندی و بهداشتی پالایشگاه تهران و یک میلی لیتر از نفت خام خوراک ورودی پالایشگاه اصفهان را به سه ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری جداگانه حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی انتقال داده و به دو ارلن مایر حاوی فاضلاب فرایندی و بهداشتی، یک میلی لیتر نفت خام استریل به عنوان تنها منبع کربن اضافه شد. ارلن مایر سوم که برای جداسازی اسپرهای^۲ احتمالی موجود در نفت خام به کار گرفته شد، به دلیل استفاده از نفت خام غیر استریل به عنوان منبع جداسازی میکروارگانیسم، حاوی ترکیبات نفتی بود و نیازی به اضافه کردن منبع کربن نداشت. هر سه ارلن مایر در یک شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت و پس از آن مجدداً دو

^۱ Serum Physiologic

^۲ Spore

میلی لیتر از آن به سه ارلن مایر دیگر با همان محتوای قبل منتقل شد و با همان شرایط قبلی مورد انکوباسیون قرار گرفت [۱۵، ۱۷].

۳-۲- خالص سازی میکروارگانیسم ها

برای خالص سازی هر یک از میکروارگانیسم های رشد کرده در مراحل قبل با کمک لوپ آزمایشگاهی مقداری از محتویات هر یک از این محیطها به دو محیط کشت PDA^۳ برای مخمرها و قارچها و نوترینت آگار^۴ برای باکتریها انتقال داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت برای محیط نوترینت آگار و ۱۲۰ ساعت برای محیط PDA، کلنی هایی با شکلهای و رنگهای مختلف روی آنها تشکیل گردید. به منظور خالص سازی، با کمک لوپ آزمایشگاهی هر کلنی به محیط های مشابه دیگر منتقل شد و مجدداً در همان شرایط نگهداری شد. این عمل تا به دست آمدن کلنی های خالص ادامه پیدا کرد. در نهایت از میکروارگانیسم های خالص شده، اسلنت تهیه شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای نگهداری طولانی مدت نمونه ها، هر ۴ ماه یک بار این میکروارگانیسم ها به اسلنت های جدید انتقال یافتند [۱۵ و ۱۶].

۴-۲- تعیین میزان تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم ها

برای تعیین میزان تولید بیوسورفکتانت توسط هر میکروارگانیسم در کشت خالص، از کشت در محیط معدنی استفاده گردید. در این بخش از مطالعه برای افزایش تعداد هر یک از باکتریها، مقداری از کلنی آنها توسط لوپ آزمایشگاهی به ارلن مایری ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات^۵ استریل منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در یک شیکر انکوباتور با شدت هوادهی ۱۶۰ rpm قرار داده شد. پس از این مدت ۱۰ میلی لیتر از محتویات هر ارلن مایر در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و میکروارگانیسم های آن از محیط نوترینت برات جدا گردیدند. میکروارگانیسم ها توسط ورتکس^۶ با دور پایین مجدداً در سرم فیزیولوژیک به حالت معلق در آمدند. با کمک رقیق سازی سرم فیزیولوژیک حاوی میکروارگانیسم ها میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر در آنها به ۱ رسید [۱۵]. به این ترتیب کلیه میکروارگانیسم ها با یک غلظت واحد در دسترس بودند.

یک میلی لیتر از هر میکروارگانیسم معلق در سرم فیزیولوژیک با غلظت واحد، به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰

^۳ Potato Dextrose Agar (PDA)

^۴ Nutrient Agar

^۵ Nutrient Broth

^۶ Vortex

میلی لیتر محیط کشت معدنی انتقال داده شد و ۱ میلی لیتر نفت خام به عنوان تنها منبع کربن به ارلن مایرها اضافه شد. ارلن مایرها در یک شیکرانکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شدت هوادهی rpm ۱۶۰ به مدت ۷ روز قرار گرفتند. اکسیژن مورد نیاز برای حفظ حالت هوازی در ارلن مایرها به واسطه حرکت شیکرانکوباتور تأمین گردید. پس از گذشت ۷ روز، نمونه‌ها از شیکرانکوباتور خارج و برای آزمایش‌های تعیین میزان بیوسورفکتانت تولیدی، مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به ذکر است که نفت خام مورد استفاده در این آزمایش در ظروف مقاوم به فشار قرار گرفت و با کمک دستگاه اتوکلاو استریل شد. البته این روش استریلیزاسیون منجر به شکستن برخی از ترکیبات موجود در نفت خام می‌گردد که این امر به دلیل کوچک تر شدن برخی ملکول‌های نفتی، مصرف آسان تر آن توسط میکروارگانیسم‌ها را در پی دارد [۱۵]. لازم به ذکر است که استفاده از صافی میلی پور برای استریلیزاسیون نفت خام، به دلیل گرانیروی بالای آن تقریباً غیر ممکن بود و استفاده از اتوکلاو علی‌رغم ایجاد برخی معضلات، یکی از ساده‌ترین و مؤثرترین راههای استریل نمودن نفت است [۱۵].

۲-۴-۱- آزمون پراکنندگی نفت

برای انجام آزمایش پراکنندگی نفت^۱، ابتدا سویه‌ها^۲ در داخل محیط کشت مایع یعنی محیط معدنی تلقیح شدند. پس از گذشت زمان لازم و رشد سویه‌ها، ۱۰ میکرو لیتر از محیط کشت برداشته شد. ۵۰ میلی لیتر آب مقطر در داخل یک پلیت بزرگ ریخته شد و سپس ۲۰ میکرو لیتر نفت خام به سطح آن افزوده گردید. در ادامه نمونه ۱۰ میکرو لیتری برداشته شده از محیط کشت، بر روی سطح نفت ریخته شد. پخش شدن محیط کشت بر روی سطح روغن معیاری از وجود ترکیبات فعال سطحی در محیط کشت است. برای این آزمون یک محیط شاهد با آب مقطر نیز در نظر گرفته شد که با مقایسه نمونه محیط کشت و نمونه شاهد می‌توان به وجود سورفکتانت‌ها در محیط پی برد [۱۵ و ۱۶]. نمونه‌های مثبت در این آزمون برای انجام مرحله بعد یعنی آزمون E24 انتخاب گردیدند.

۲-۴-۲- آزمون E24

شاخص امولسیفیکاسیون^۳ معیاری از توانایی ترکیبات حاصل از متابولیسم سویه‌ها در امولسیفیکاسیون ترکیبات هیدروکربنی است. لذا شاخص امولسیفیکاسیون سویه‌های مثبت در آزمایش پراکنندگی نفت اندازه‌گیری شد. به این منظور دو میلی لیتر نفت سفید به همراه دو میلی لیتر از سویه‌های رشد کرده در محیط معدنی به یک لوله

آزمایش اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه تحت لرزش^۴ شدید قرار گرفت. این لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یک مکان ساکن قرار گرفته و پس از این مدت، نسبت بخش امولسیون شده به کل محتوای لوله‌ها محاسبه شد و به عنوان شاخص E24 گزارش گردید [۱۵ و ۱۶].

۲-۴-۳- آزمون شمارش قطره

تولید بیوسورفکتانت در محیط کشت می‌تواند منجر به کاهش کشش سطحی آب گردد که این امر نیز به نوبه خود منجر به تولید قطراتی ریز تر می‌شود. بنابراین تعداد قطراتی که توسط یک حجم مشخص از آب خالص تولید می‌شود نسبت به آبی که حاوی بیوسورفکتانت است کمتر خواهد بود. با شمارش تعداد قطرات تولیدی توسط یک حجم خاص از هر نمونه توسط یک پیپت و مقایسه آن با همان حجم از آب مقطر به راحتی می‌توان به نتایج کمی درباره سورفکتانت تولیدی دست یافت.

۲-۴-۴- استخراج و تخلیص بیوسورفکتانت

استخراج بیوسورفکتانت به روش استخراج مایع-مایع و پس از رشد سلول‌ها در فاز آبی (محیط معدنی) و حذف آنها با استفاده از سانتریفوژ انجام گرفت. چون افزایش دما می‌تواند موجب تخریب ترکیب گردد، سانتریفوژ در دمای ثابت ۴ درجه سلسیوس انجام شد. به منظور استخراج بیوسورفکتانت، ابتدا مقدار pH محیط کشت فاقد سلول با افزودن اسیدکلریدریک بر روی ۲ تنظیم شد و سپس محلول در طول شب در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. محلول حاوی رسوب در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب حاصله به وسیله آب مقطر حل شد و سپس pH به وسیله سود بر روی ۷ تنظیم گردید. پس از خشک کردن انجمادی^۵، نمونه حاصله توزین شد [۴]. با اضافه نمودن مقدار اندکی از سورفکتانت تخلیص و خشک شده به آب مقطر و انجام مجدد آزمون پراکنندگی نفت با آن و مقایسه نتایج حاصله که به صورت کیفی بود، مشخص گردید که سورفکتانت تولیدی مؤثرتر از کاربرد محیط‌های کشتی بود که میکروارگانیسم‌های تولید کننده بیوسورفکتانت در آنها رشد نموده‌اند.

۳- نتایج و بحث

در این مطالعه از ۵ نقطه که برای مدت طولانی در تماس با ترکیبات نفتی بوده‌اند، نمونه برداری صورت گرفت. نفت خام

⁴Vortex

⁵ Freeze Drying

¹ Oil Spreading

² Strain

³ Emulsification Index

جدول ۱- مشخصات باکتری‌های به دست آمده در مطالعه

شماره	محل برداشت نمونه	نوع محیط کشت	شکل باکتری	رنگ کلنی	آزمون گرم
۱	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	PDA	میله ای	زرد	-
۲	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	صورتی	+
۳	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	PDA	میله ای	سبز	-
۴	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	میله ای	قرمز کم رنگ	+
۵	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	قهوای باز	-
۶	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	سفید	-
۷	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	کروی	سبز فسفری	-
۸	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	کروی	نارنجی	-
۹	خاک پمپ بنزین	PDA	کروی	قهوای کم رنگ	+
۱۰	خاک پمپ بنزین	PDA	میله ای	قهوای با کلنی بزرگ	-
۱۱	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	سفید	-
۱۲	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	سفید	-
۱۳	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	زرد	+
۱۴	خاک پمپ بنزین	PDA	میله ای	قهوه ای پر رنگ	-
۱۵	نفت خام	محیط معدنی	کروی	خاکستری	-
۱۶	نفت خام	PDA	کروی	کرم	-

می‌تواند به سه شکل مختلف توسط میکروارگانیسم‌ها به مصرف برسد: ۱- توده‌های بزرگ نفت خام ۲- قطرات بسیار کوچکی از نفت خام که در اثر تولید بیوسورفکتانت‌ها ایجاد می‌گردند ۳- نفت خام که به صورت محلول در آب وجود دارد. با توجه به این امر و همچنین با توجه به حلالیت کم نفت در آب و سطح اندک ایجاد شده توسط توده‌های بزرگ نفت، میکروارگانیسم‌های موجود در این مناطق، عموماً برای مصرف ترکیبات نفتی با کمک آنزیم‌های تولیدی یا بیوسورفکتانت‌ها، این ترکیبات را به قطرات کوچک‌تر تقسیم می‌نمایند و سپس مورد استفاده قرار می‌دهند [۱۹]. بنابراین در این مناطق احتمال یافتن میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تولید بیوسورفکتانت‌ها را داشته باشند، وجود دارد. مطالعه نمونه‌های خاک برداشت شده نشان داد که میزان رطوبت خاک مورد نمونه برداری ۳۲ درصد بود. همچنین pH خاک اندکی اسیدی و حدود ۶ بود. مقدار pH نمونه‌های فاضلاب نیز ۶/۵ محاسبه شد. دمای نمونه خاک آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران ۱۷ درجه سلسیوس و نمونه خاک اطراف محل تخلیه بنزین و گازوئیل در شهر اهواز ۳۲ درجه بود. میزان رطوبت خاک آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران ۳۳ درصد و مقدار رطوبت خاک اطراف پمپ بنزین ۱۹ درصد بود.

برخی از باکتری‌ها قادرند بیوسورفکتانت زیاد و با کارایی کم تولید کنند. بنابراین شاخص امولسیون سازی نمی‌تواند معیاری مناسب برای تعیین مقدار بیوسورفکتانت تولیدی باشد و تنها برای

میکروارگانیسم از منابع مورد نمونه برداری، جداسازی گردید. تمامی میکروارگانیسم‌های رشد کرده بر روی محیط‌های PDA و نوترینت آگار از نوع باکتری بوده و تمامی آنها از نوع کروی^۱ و میله‌ای^۲ بودند. در جدول ۱ مشخصات هر باکتری و کلنی آن که از منابع گوناگون مورد نمونه برداری در مطالعه به دست آمده، نمایش داده شده است. ۱۲ گونه از باکتری‌های جدا شده در این مطالعه گرم منفی و ۴ گونه دیگر گرم مثبت بودند. برخی از گونه‌های جداسازی شده در این مطالعه به شدت متحرک بودند و برخی دیگر تحرک کمی داشتند. این میکروارگانیسم‌ها ابتدا با کمک آزمون پراکندگی نفت برای تعیین احتمال تولید بیوسورفکتانت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند که کلیه میکروارگانیسم‌های به دست آمده در این مطالعه در این آزمون موفق بودند. پس از آن برای تعیین میزان بیوسورفکتانت تولیدی و تعیین قابلیت امولسیون سازی آن، آزمون شاخص امولسیون سازی E24 انجام گرفت. که در این آزمون باکتری ۱۲-A بیشترین میزان را نشان داد. باید توجه نمود که بیشتر بودن میزان آزمون E24 همیشه نشان دهنده بیشتر بودن تولید بیوسورفکتانت‌ها نیست بلکه همچنین می‌تواند به دلیل بالاتر بودن کارایی بیوسورفکتانت تولیدی باشد.

برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از محیط حاوی نفت خام، به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده گردید. به این ترتیب تنها میکروارگانیسم‌هایی در این مطالعه رشد نمودند که توانایی استفاده از نفت خام را دارا بودند. البته در برخی از مطالعات، منابع کربن دیگری همچون گلوکز نیز به کار گرفته شده است. در این مطالعه ۱۶

¹ Cocci

² Bacillary

نام باکتری	A-۱۴	A-۱۳	A-۱۲	A-۱۱	A-۱۰	A-۹	A-۸	A-۷	A-۶	A-۵	A-۴	A-۳	A-۲	A-۱
شاخص امولسیون سازی	۱۲٪	۲۸٪	۳۶٪	۴٪	۱۱٪	۲۴٪	۱۶٪	۲۰٪	۲۰٪	۱۲٪	۸٪	۱۶٪	۱۲٪	۱۶٪

خاک استفاده نمود و یا ابتدا بیوسورفکتانت را تولید کرده و از آن برای شستشوی خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی استفاده نمود.

میزان و شیوه استفاده از بیوسورفکتانتها در تصفیه خاکها وابستگی شدیدی به میزان آلودگی خاک دارد [۹]. برای تصفیه خاکهای آلوده به نفت خام می توان بیوسورفکتانت را پس از تولید خالص سازی با کمک روشهای مختلف به خاک اضافه نمود و عملیات شستشوی خاک را انجام داد. بنابر این می توان از اضافه نمودن باکتری A-۱۲ به طور مستقیم به خاک نیز استفاده کرد. در استفاده مستقیم از A-۱۲ در خاک، علاوه بر تولید بیوسورفکتانت، تجزیه بیولوژیک ترکیبات نفتی نیز توسط این باکتری انجام خواهد شد زیرا در تمام آزمایش های انجام شده در طول این مطالعه از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن استفاده گردید. این امر نشان می دهد که A-۱۲ قادر به استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن خود است و پس از استفاده عملی در خاک نیز خواهد توانست با مصرف نفت خام موجود در خاک، تولید بیوسورفکتانت نماید.

لیانگ و همکاران^۱ در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که برای شروع تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی، نیاز به اضافه نمودن سورفکتانت های سنتزی و یا یک منبع کربن سریع تجزیه شونده مانند گلیسیرول است [۲۰]. اما همان طور که در این مطالعه مشاهده شد تنها منبع کربن مورد استفاده، نفت خام بود. بنابراین A-۱۲ توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را نیز داشت ولی برای شروع تجزیه بیولوژیکی و افزایش تعداد خود، نیازی به افزودن منابع سریع تجزیه شونده و یا سورفکتانت سنتزی نداشت.

مولکینز^۲ در مطالعه خود به این نتیجه رسید که حضور سورفکتانت منجر به افزایش میزان تجزیه بیولوژیک نفت خام می شود [۲۱]. بنابراین می توان برای تجزیه زیستی مواد نفتی از A-۱۲ به همراه سایر میکروارگانسیمها که توانایی مصرف ترکیبات نفتی با نرخ زیاد را دارا بوده اما توانایی تولید بیوسورفکتانت را ندارند، استفاده نمود. این امر منجر به افزایش میزان تجزیه ترکیبات

اندازه گیری کارایی بیوسورفکتانت به کار می رود [۱۵]. در جدول ۲ شاخص امولسیون سازی کلیه میکروارگانسیمها نمایش داده شده است.

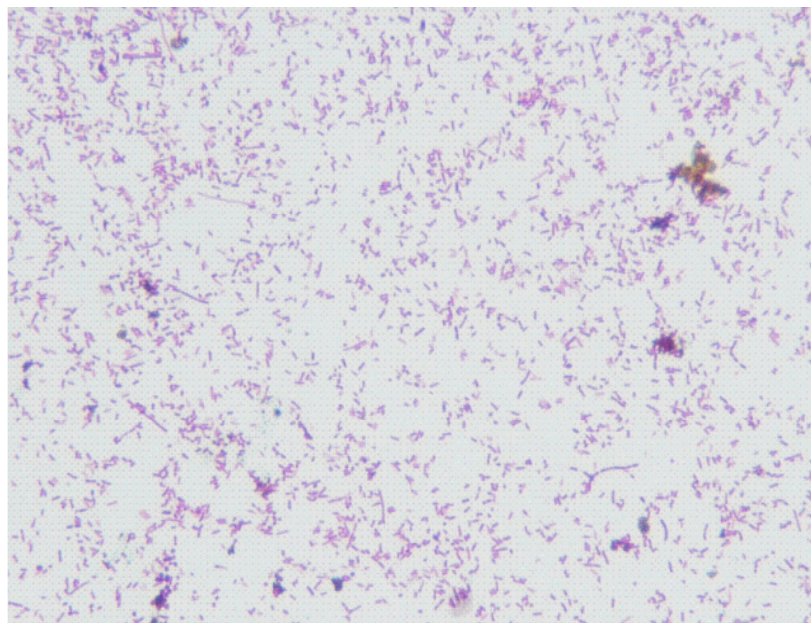
با توجه به این که شاخص امولسیون سازی باکتری A-۱۲ از دیگر گروهها بیشتر بود، این باکتری برای ادامه مطالعات انتخاب گردید. همچنین طبق آزمون شمارش قطره همه میکروارگانسیمها قادر به تولید قطرات بیشتری از یک حجم مشخص از محیط کشت خود نسبت به آب مقطر بودند. در شکل ۱ تصویر باکتری A-۱۲ پس از رنگ آمیزی گرم و با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر نمایش داده شده است. همان طور که در این شکل مشخص است، این باکتری گرم منفی و میله ای شکل است. مشخصات بیشتر این باکتری در جدول ۱ نشان داده شده است.

پس از کشت A-۱۲ در محیط معدنی، از هر لیتر محیط کشت مورد تلقیح میکروارگانسیمها، ۳ گرم پودر بیوسورفکتانت خشک استخراج شد در حالی که میزان جامدات معلق فرار (VSS) برابر با ۳۵۹ میلی گرم در لیتر بود. پس از استخراج، تخلیص و خشک سازی انجمادی بیوسورفکتانت، مقداری از آن در آب مقطر حل گردید و آزمون پراکندگی نفت و آزمون شمارش قطره بر روی آن صورت گرفت. با مقایسه آزمون پراکندگی نفت با شرایطی که از آب مقطر بدون بیوسورفکتانت استخراجی استفاده شد، مشخص گردید که پخش شدن قطره حاوی بیوسورفکتانت بر روی نفت خام در آزمایش پراکندگی نفت بسیار بیشتر از قطره آب مقطر خالص است. میزان پخش شدن قطره در این حالت حتی از کلیه حالاتی که از محیط های کشت نیز برای آزمون پراکندگی نفت استفاده شد، بیشتر بود.

همچنین نتایج آزمون شمارش قطره مشخص نمود که میزان قطرات تولیدی ۱۰ میلی لیتر از آب مقطر حاوی بیوسورفکتانت، یک و نیم برابر همان میزان آب مقطر بود. این نتایج بیانگر این است که ماده استخراج و تخلیص شده در این مطالعه بیوسورفکتانت است. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان از باکتری A-۱۲ به طور مستقیم برای تولید بیوسورفکتانتها در خاک و شستشوی

¹ Liang et al.

² Mulkins



شکل ۱- تصویر باکتری گرم منفی A-۱۲ با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر

بیوسورفکتانت‌ها، توانایی رشد در محیطی که تنها منبع کربن آن نفت خام باشد را داشتند. بنابراین با استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در حذف آلودگی‌های نفتی از خاک، علاوه بر تأثیر بیوسورفکتانت تولیدی، فرایند تجزیه بیولوژیک ترکیبات نفتی نیز به طور هم زمان انجام می‌پذیرد که این امر منجر به افزایش تأثیر این میکروارگانیسم در پاک‌سازی خاکهای آلوده به نفت می‌گردد.

۳- در این مطالعه از هر لیتر محیط کشت با مواد جامد فرار برابر با ۳۵۹ میلی‌گرم در لیتر، ۳ گرم پودر خشک بیوسورفکتانت استخراج گردید.

۴- از میکروارگانیسم‌های به دست آمده می‌توان به طور مستقیم در تصفیه خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی استفاده کرد و یا با کشت آنها در محیط‌های مایع و خالص سازی بیوسورفکتانت تولیدی، از آن برای شستشوی خاک استفاده نمود.

نفتی در محیط به واسطه تولید بیوسورفکتانت توسط A-۱۲ می‌گردد.

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه با کمک میکروارگانیسم‌های جدا شده از محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی، بیوسورفکتانت تولید و از محیط کشت جدا شد و میزان تولید آن توسط میکروارگانیسم‌ها تعیین شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که:

۱- ۱۶ میکروارگانیسم از مناطقی که سالها در معرض آلودگی‌های نفتی بودند جداسازی شد که همگی آنها کم و بیش توانایی تولید بیوسورفکتانت را داشتند. تمام میکروارگانیسم‌های جدا شده از نوع باکتری بودند و بیشترین تعداد آنها گرم منفی بودند.

۲- میکروارگانیسم‌های جدا شده علاوه بر تولید

۵- مراجع

- 1- Dibble, J. T., and Bartha, R. (1979). "Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge." *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 729-739.
- 2- William, C., Anderson W.C., and Dee, P. E. (1993). *Innovative site remediation technology: Soil washing/soil flushing*, EPA, USA.
- 3- Anderson, R., Rasor, E., and Van Ryn, F. (1999). "Particle size separation via soil washing to obtain volume reduction." *J. of Hazard Mater*, 66 (1-2), 89-98.
- 4- Tobia, R.J., Camacho, J.A.M., Augustin, P. Griffiths, R. A., and Frederick, R. M. (1994). "Surfactant treatment of crude oil contaminated soils." *J. of Hazard Mater*, 38 (1), 145-161

- 5- Khodadoust, A. P., Lei, L., Antia, J. E., Bagchi, R., Suidan, M. T., and Tabak, H. H. (2005). "Adsorption of PAHs in aged harbor sediments." *ASCE J. of Environmental Engng.*, 131 (3), 403-409.
- 6- Mann, M. J. (1999). "Full-scale and pilot-scale soil washing." *J. Hazard. Mater.*, 66 (1-2), 119-136.
- 7- Kosaric, N. (1987). *Biosurfactants and biotechnology*, Marcel Dekker, New York.
- 8- Hunter, R.J. (1993). *Introduction to modern colloid science*, Oxford Science Publications, UK.
- 9- Urum, K., Pekdemir T., and Copur, M. (2004). "Surfactants treatment of crude oil contaminated soils." *J. of Colloid and Interface Science*, 276, 456-464.
- 10- Francy, D. S., Thomas, J. M., Raymond, R. L., and Ward, C. H. (1991). "Emulsification of hydrocarbons by surface bacteria." *J. Ind. Microbiol.*, 8, 237-246.
- 11- Van Dyke, M. I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., and Trevors, J. T. (1993). "*Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil." *J. Microbiol.*, 39, 1071-1078.
- 12- Hamme, J. D., and Ward, O. P. (1999). "Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed-bacterial culture." *Can J. of Microbiol.*, 45, 130-137.
- 13- Maier, R. M., and Sorberon-Ghavaz, G. (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosynthesis and potential environmental applications." *Appl. Microbiol. Biotech.*, 54, 625-633
- 14- Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (1998). "Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*." *J. of Indus. Microb. and Biotech.*, 20, 48-52.
- 15- Talaie, A. R. (2008). "Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms," M.Sc. Thesis, Science and Research Azad University Branch-Ahvaz.
- 16- Talaie, A. R., Talaie, M., and Jafaarzadeh, N. (2009) "Optimization of biodegradation of wastewater contaminated floating diesel fuel by Taguchi method." *J. Water and Wastewater*, 71, 57-68.
- 17- Talaie, A. R., Jafaarzadeh, N., Talaie, M., and Beheshti, M. (2009). "Optimization of floating crude oil biodegradation by isolated microorganisms via experimental design method." *J. of Koomesh*, 11 (1), 41-54.
- 18- Qingxin, Li, Kang, C., and Zhang, C. (2005). "Wastewater produced from an oilfield and continuous treatment with an oil-degrading bacterium." *Process Biochemistry*, 40, 873-877.
- 19- Choi, H. D., Hori, K., Tnji, Y., and Unno H. (1974). "Microbial degradation kinetics of solid alkane dissolved in nondegradable oil phase." *J. of Biochemical Engineering*, 3, 71-78.
- 20- Liang, Z. G., Yue-ting, W. U., Xin-ping Q., and Qin, M. (2005). "Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids." *J. of Zhejiang University Science*, 8, 725-730.
- 21- Mulkins-Philips, G. J., and Stewart J. E. (1974). "Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil." *Applied Microbiology*, 28(4), 547-552.