پنجمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
5-3 آذر ماه 1386، سالن اجلاس سران
The 5th National Biotechnology Congress of Iran
24-26 Nov, 2007, Summit Meeting Conference Hall, Tehran- Iran

شناسايي باكتريهاي تجزيه كننده آلاينده هاي نفتي در خاك و تاثير شرايط محيطي بر فعاليت آنها

محسن سليماني*، سميرا اكبر**، سيد حسين ميردامادیان، آرش انصاري و محمدعلي حاج عباسي

* دانشگاه صنعتي اصفهان، دانشكده كشاورزي، گروه خاكشناسي
** شهرك علمي-تحقيقاتي اصفهان، پارك علم و فناوري شيخ بهايي، موسسه سفير سبز

چكيده

استفاده گسترده از محصولات مشتق شده از نفت منجر به آلودگي همه بخشهاي محيط زيست شده است. اين مساله بايد در كشورهاي توليد كننده و يا استفاده كننده از اين نوع انرژي مدنظر قرار گيرد. زيست پالايي يكي از روشهاي نوين پاكسازي آلاينده هاي نفتي در محيط است كه از توانايي ميكروارگانيسمهاي بومي و غير بومي براي سميت زدايي و تجزيه اين آلاينده ها بهره مي گيرد. اين مطالعه براي شناسايي ميكروارگانيسمهايي طرح ريزي شده است كه قابليت تجزيه آلاينده هاي نفتي در خاكهاي منطقه پالايشگاه تهران را دارا هستند. بهترين شرايط محيطي مانند نسبت C:N:P ، دما و اضافه كردن سورفكتانت نيز براي فعاليت اين موجودات بررسي شده است. نتايج نشان داد كه باكتريهاي شناسايي شده متعلق به جنسهاي ميكروكوكوس، رودوكوكوس، نوكارديا، كورينه باكتريوم، اسينتوباكتر، سودوموناس و آلكاليجنس هستند. بهترين نسبت C:N:P و دما براي فعاليت اين باكتريها به ترتيب 100:10:5 و 30 درجه سانتيگراد بود. اضافه كردن 0/5 درصد وزني سورفكتانت Tween80 منجر به افزايش تجزيه زيستي كل هيدروكربنهاي نفتي(TPH) گرديد.

مقدمه

با شدت يافتن آلودگيهاي خطرناك در دو دهة اخير، زيست فناوري (Biotechnology) در شاخة محيط زيست، بسيار مورد توجه قرار گرفته و از مهمترين دست آوردهاي آن در جهت كنترل و رفع آلودگي، فناوري زيست سالم سازي (Bioremediation) مي باشد. زيست سالم سازي عبارتست از طراحي فرآيندهاي زيستي با استفاده از ريزسازواره ها (Microorganisms) جهت تجزية زيستي مواد شيميايي آلاينده (Chen et al., 1999). زيست سالم سازي يكي از روشهايي است كه مي تواند در حذف آلودگيهاي نفتي بكار رود و برخلاف برخي از روشها كه بصورت موقت مؤثر هستند، اين روش مي تواند يك راه حل دائمي باشد. مطالعات انجام شده در دهه 1940 نشان داد كه اكوسيستمهاي آبي و خشكي به طور طبيعي داراي ريزسازواره هايي هستند كه قادرند انواع متعددي از هيدروكربنهاي نفتي را تجزيه كنند. از آن زمان تا كنون گونه هاي مختلفي از ريزسازواره ها (باكتريها، قارچها و مخمرها) شناسايي شده اند كه داراي قدرت تجزيه هيدروكربنهاي نفتي مي باشند. اين ريزسازواره ها از نظر توان بيوشيميايي متنوع بوده و در تعداد زيادي از محيطهاي آبي و خشكي شامل آبهاي شور دريا، آبهاي شيرين، رسوبات دريايي، سطوح رويي و زيرين خاك، آبهاي زيرزميني و لجنهاي صنعتي و شهري يافت مي شوند. لذا استفاده از ميكروبهاي تجزيه كننده تركيبات نفتي در واقع يكي از مكانيسمهاي اوليه و مهم براي حذف آلودگيهاي نفتي از محيطهاي مختلف به شمار مي رود (Chailan et al., 2004; Capell et al.,2001). از آنجايي كه جمعيتهاي ميكروبي بومي يك منطقه به ويژه در مناطقي كه هيچ پيشينه اي از آلودگي با مواد نفتي نداشته اند، غالباً قادر به تجزيه سريع و گسترده آلودگي نفتي وارد شده به آن محيط بخصوص سرريزهاي بزرگ نفتي نيستند، لذا محققان با جداسازي ميكروارگانيسمهاي داراي قدرت تجزيه كنندگي بالا و وارد كردن آن

به محيطهاي آلوده، به تجزيه سريع و گسترده هيدروكربنهاي نفتي سرريزشده به آن منطقه كمك مي كنند كه به اين عمل اصطلاحاً Seeding گفته مي شود (Lederberg, 2000; Leahy et al., 1990). اين تحقيق با هدف شناسايي باكتريهاي تجزيه كننده آلاينده هاي نفتي در منطقه پالايشگاه تهران و تاثير عوامل محيطي مانند دما و نسبت عناصر غذايي (C:N:P) بر فعاليت تجزيه اي آنها در آزمايشگاه بيوتكنولوژي شهرك علمي-تحقيقاتي اصفهان انجام گرفت.

مواد و روشها

نمونه‌برداري خاك از 8 نقطة آلوده به هيدروكربنهاي نفتي در محوطه پالايشگاه تهران از عمق 20-0 سانتي متري انجام شد. نمونه هاي خاك در پاكتهاي پلاستيكي ريخته و هر پاكت با ذكر مشخصات مكان و عمق خاك، كدگذاري و تا رسيدن به آزمايشگاه در دماي 4 درجه سانتيگراد نگهداري شد.

به منظور افزايش جمعيت ميكروبي سازگار با مواد نفتي عمليات غني‌سازي با استفاده از محيط كشت پايه معدني (شامل فسفات هيدروژن پتاسيم، فسفات دي‌هيدروژن پتاسيم، سولفات آمونيوم هر كدام به ميزان 1گرم در ليتر، سولفات منيزيم به ميزان 0/04 گرم در ليتر، كلريد آهن به ميزان 0/004 گرم در ليتر و يك سي سي در ليتر محلول عناصر ريزمغذي شامل$MnCl_2.2H_2O$ ، $MnCl_4.H_2O$ ، $CuCl_2.2H_2O$، H_3BO_3، $NiCl_2.6H_2O$، $COCl_2.6H_2O$، $ZnCl_2$، $Na_2MoO_4.2H_2O$ صورت گرفت (Capelli et al., 2001). فلاسكهاي 250 ميلي ليتري حاوي 25 ميلي ليتر محيط كشت پايه معدني و 400 ميكروليتر نفت خام تهيه شد. ده گرم از هر خاك آلوده نمونه برداري شده حاوي انواع باكتري‌هاي سازگار با محيطهاي هيدروكربني، بعنوان منبع ميكروبي به محيط كشت اضافه شد. فلاسكها بر روي هم‌زن با سرعت 130 دور در دقيقه و دماي 30 درجه سانتيگراد بمدت دو روز در تاريكي گرماگذاري شد. پس از گذشت دو روز، 25 ميلي ليتر از حجم محيط كشت هر فلاسك به فلاسك جديد حاوي محيط كشت تازه اضافه شد. اين كار بمدت يكماه ادامه يافت. از آخرين محيط كشت فرآيند غني سازي، رقتهاي مختلف تهيه و از هر يك به صورت پور پليت روي محيط كشت جامد (آگاردار) كشت داده شد. كلني هاي تك ايجاد شده روي محيطهاي جامد را ابتدا روي محيط كامل نوترينت آگار خالص سازي كرده و در نهايت توانايي رشد هر يك از اين باكتريها با كشت در محيطهاي پايه مربوطه (حاوي نفت خام) ثابت گرديد. براي جلوگيري از بروز آلودگي، آزمايش هاي مرحله خالص سازي در شرايط كاملاً سترون انجام گرفت. به منظور شناسائي گونه‌هاي باكتريايي و بررسي صفات مورفولوژيك و فيزيولوژيك آنها آزمايش‌هاي رنگ آميزي گرم، آزمايش كاتالاز، آزمايش اكسيداز، بررسي توانائي حركت، آزمايش OF، توليد گاز، بررسي توليد پيگمان فلوروسانت صورت گرفت (Palleroni, 1984).

به منظور بررسي تاثير تلقيح ميكروبي، عناصر غذايي، دما و سورفكتانت بر تجزيه آلاينده هاي نفتي در خاك نمونه هاي 100 گرمي از يك خاك آلوده كه مخلوطي از خاكهاي منطقه را شامل مي شد به ظروف پلاستيكي منتقل گرديد. تيمارهاي تلقيح شامل 3 مورد (تلقيح با 2

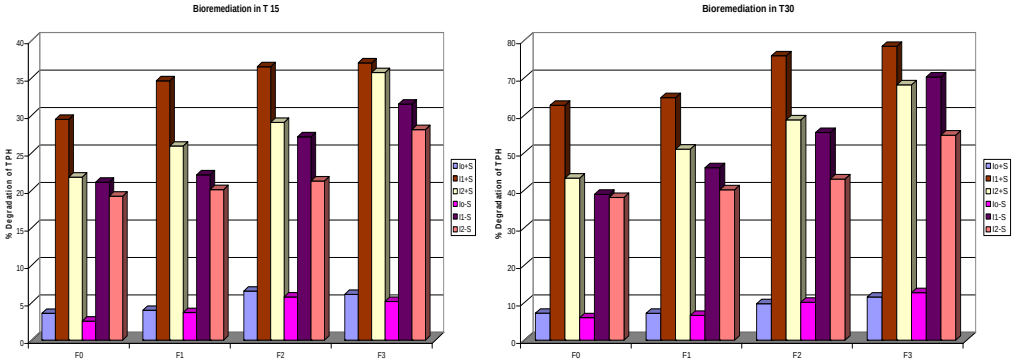
و 10 گونه و شاهد)، عناصر غذايي در 4 سطح (نسبتهاي C:N:P 100:10:1، 100:10:5، 100:5:1و شاهد)، دما در دو سطح (15 و 30 درجه سانتيگراد)، سورفكتانت در دو سطح(مقدار 0/5w/w % Tween80 و شاهد) بود. هر تيمار در 3 سطح تكرار گرديد. منبع مورد استفاده براي تامين ازت و فسفر به ترتيب نيترات آمونيوم و فسفات دي هيدروژن پتاسيم بود. رطوبت نمونه ها در حد 50% رطوبت اشباع خاك حفظ شد. به منظور هوادهي، همه نمونه ها هر 3 روز يكبار زيرورو گرديد. در آغاز و پايان آزمايش (پس از 4 هفته) غلظت كل هيدروكربنهاي نفتي (TPH) تعيين شد. براي عصاره گيري كل هيدروكربنهاي نفتي(TPH) از دستگاه سوكسله و محلولهاي n-هگزان و دي كلرومتان اتر و براي تعيين روند تغييرات از دستگاه GC استفاده شد.

نتايج و بحث

پس از طي مراحل غني سازي و خالص سازي بيش از 40 باكتري شناسايي شد. اين باكتريها متعلق به جنسهاي *Pseudomonas*، *Micrococcus*, *Acinetobacter*، *Corinebacterium*، *Alcaligenes*، *Nocardia* و *Rhodococcus* بودند.

نتايج تجزيه كل هيدروكربنهاي نفتي نشان داد كه اضافه كردن ميكروارگانيسمها به خاك باعث تسريع قابل ملاحظه تجزيه اين مواد در خاك مي گردد. اضافه كردن 10 گونه نسبت به اضافه كردن 2 گونه به طور معني دار باعث افزايش تجزيه TPH در محيط خاك گرديد. ميزان تجزيه هيدروكربنهاي نفتي در دماي 30 درجه بيشتر از دماي 15 درجه بود (شكل1و2). نتايج نشان داد كه افزايش دما از 15 به 30 درجه سانتيگراد باعث افزايش حدود 2 برابر تجزيه هيدروكربنهاي نفتي در خاك مي گردد. اضافه كردن سورفكتانت به خاك باعث افزايش تجزيه هيدروكربنهاي نفتي در همه تيمارها شد.

مقايسه تيمارهاي اعمال شده عناصر غذايي نشان داد كه با افزايش غلظت عناصر نيتروژن و فسفراضافه شده به خاك تجزيه هيدروكربنهاي نفتي در محيط خاك افزايش مي يابد.



شكل 1- روند تجزيه هيدروكربنهاي نفتي در تيمارهاي مختلف شكل 2- روند تجزيه هيدروكربنهاي نفتي در تيمارهاي مختلف

در دماي 30 درجه سانتيگراد
در دماي 15 درجه سانتيگراد
I_0: تيمار شاهد (بدون تلقيح)، I_1: تيمار تلقيح 10 گونه، I_2: تيمار تلقيح 2 گونه، T_1: دماي 15 درجه سانتيگراد، T_2: دماي 30 درجه سانتيگراد
S+: داراي سورفكتانت، S-: بدون سورفكتانت، F_0: تيمار شاهد (بدون اضافه كردن عناصر غذايي)، F_1: تيمار اضافه كردن عناصر غذايي براي ايجاد C:N:P به نسبت 100:5:1، F_2: تيمار اضافه كردن عناصر غذايي براي ايجاد C:N:P به نسبت 100:10:1، F_3: تيمار اضافه كردن عناصر غذايي براي ايجاد C:N:P به نسبت 100:10:5

منابع

Capelli S. M., Busalmen J.P., Sanchez S.R. (2001) Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by Indigenous bacteria. International Biodeterioration & Biodegradation 47:233-238.

Chaillan, F., Fleche A.L., Bury E., Phantavong Y., Grimont P., Saliot A., Oudot J. (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research in Microbiology 155:121-124.

Chen W., Bruhlman F., Richins R.D., Mulchandani A. (1999) Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 10: 137-141.

Leahy J.G., Colwell R.R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbial Rev. 54(9):305-315.

Lederberg J. (2000) Encyclopedia of microbiology. 4 Volume set. Published by Academic press.

Palleroni, N.J. (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. In J.G. Holt, N.R. Krieg, eds. Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, pp 141-199.

Abstract

The extensive use of petroleum products leads to the contamination of almost all compartments of the environment. This problem must be mentioned by countries which produce or use this type of energy. Bioremediation is a new method which has been proposed for remediation of petroleum pollutants using of indigenous or allochthonous microorganisms to detoxify and degrade environmental contaminants. Thus this study conducted to identify and isolate of microorganisms which have the potential for degradation of petroleum pollutants in soil media. The best environmental conditions such as C:N:P ratio, temperature and adding surfactant were also investigated. Results showed that bacterial strains belong to the genus *Micrococcus,Rhodococcus,Nocardia,Corinebacterium, Acinetobacter, Pseudomonas* and *Alcaligenes*. The best temperature and C:N:P ratio for activity of petroleum degrading bacteria were 30^{o}C and 100:10:5 respectively. Adding the 0.5 % w/w surfactant (Tween 80) to the soils increased the total petroleum hydrocarbons (TPH) biodegradation.

Keywords: Bioremediation, Total Petroleum Hydrocarbons, Petroleum pollutants