جداسازی، شناسایی و مقایسه باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده

محسن سلیمانی [1]، مجید فرهودی [2]، سمیرا اکبر [2]
1- استادیار علوم خاک گروه علوم خاک دانشگاه گیلان
2- کارشناسان ارشد بیوتکنولوژی، شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان
آدرس پست الکترونیکی مکاتبه کننده: (soleimani57@yahoo.com)

چکیده
استفاده از میکروب‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی در واقع یکی از راهکارهای اولیه و مهم برای حذف آلودگی‌های نفتی از محیط‌های مختلف به‌شمار می‌رود. شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌های نفتی به ویژه باکتری‌های بومی اولین گام برای زیست پالایی خاکهای آلوده به این ترکیبات است. لذا این پژوهش به منظور شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه کننده هیدروکربن-های نفتی از خاکهای پالایشگاه‌های تهران، اراک و اصفهان و مقایسه توان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی توسط آنها در محیط آزمایشگاه صورت گرفته است. رشد باکتری‌های خالص سازی شده در محیط کشت حاوی نفت و ارزیابی تجزیه ترکیبات نفتی به-وسیله آنها با استفاده از آزمون تجزیه زیستی مونواکسیژناز بررسی شد. نتایج نشان داد که تنوع باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های مورد مطالعه قابل توجه بود. باکتری‌های شناسایی شده در خاک‌های مورد مطالعه، طیف نسبتا وسیعی از جنس‌های باکتریایی مانند باسیلوس، سودوموناس، لیستریا، روتیا، کورینه باکتریوم، نوکاردیفورم و رودوکوکوس را شامل شدند. استفاده از این مجموعه متنوع باکتریایی برای زیست‌سالم‌سازی خاک‌های مورد مطالعه می‌تواند سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌سالم‌سازی، هیدروکربن‌های نفتی،ریزسازواره،آلودگی خاک

مقدمه

مطالعات انجام شده در دهه‌های اخیر نشان داده است که محیط‌های آبی و خشکی دارای ریزسازواره‌های (Microorganisms) بومی هستند که قادرند انواع متعددی از هیدروکربن‌های موجود در نفت خام را تجزیه کنند. تا کنون گونه‌های مختلفی از ریزسازواره‌های (باکتری‌ها، قارچها و مخمرها) دارای قدرت تجزیه هیدروکربن‌ها شناسایی شده اند که از نظر توان بیوشیمیایی متنوعند. این موجودات در محیط‌های آبی و خشکی شامل آب‌های شور دریا، رسوبات دریایی، آب‌های شیرین و رسوبات آن، سطوح رویی و زیرین خاک، آب‌های زیرزمینی و لجن‌های صنعتی و شهری یافت شده‌اند.

استفاده از میکروب‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی در واقع یکی از راهکارهای اولیه و مهم برای حذف آلودگی‌های نفتی از محیط‌های مختلف به‌شمار می‌رود (1،5). گونه های مختلف باکتری‌ها و قارچهای تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن-های نفتی از محیط‌های دریایی و خاک‌های آلوده جداسازی شده اند. علاوه بر باکتری‌ها و قارچها، مخمرها نیز به‌عنوان ریزسازواره‌های دارای توانایی تجزیه‌ی هیدروکربن‌های نفتی معرفی شده‌اند (5).

در محیط‌های دریایی عموماً باکتری‌ها به‌عنوان عوامل اصلی تجزیه‌ی هیدروکربن‌ها در بین جمعیت میکروبی محیط در نظر گرفته می‌شوند و قارچها درصد کمتری از میکروفلور تجزیه‌کننده را در محیط‌های آلوده‌ی دریایی به‌خود اختصاص می‌دهند، در حالی که در محیط‌های خاکی هر دو دسته‌ی باکتری‌ها و قارچها، نسبتاً فراوان بوده و اعضای هر دو گروه در تجزیه‌ی زیستی هیدروکربن‌ها شرکت دارند (5). از آنجایی که جمعیت‌های میکروبی بومی یک منطقه، به‌ویژه در

مناطقی که هیچ پیشینه‌ای از آلودگی با مواد نفتی نداشته‌اند، غالباً قادر به تجزیه‌ی سریع و گسترده‌ی آلودگی‌های نفتی نیستند؛ لذا محققان با جداسازی ریزسازواره‌های دارای قدرت تجزیه‌کنندگی بالا و انتقال آنها به محیط‌های آلوده، تجزیه‌ی هیدروکربن‌های نفتی را افزایش می‌دهند (4،5).

با توجه به این که مهمترین عامل در فناوری زیست‌سالم‌سازی، وجود ریزسازواره‌ها در مکان آلوده می‌باشد و از میان ریزسازواره‌ها، باکتری‌ها مهمترین گروه برای انجام زیست‌سالم‌سازی هستند. لذا این پژوهش به منظور شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن‌های نفتی از خاک‌های پالایشگاه‌های تهران، اراک و اصفهان و مقایسه آنها صورت گرفته است.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری خاک از پالایشگاه‌های تهران، اصفهان و اراک صورت گرفت. به ترتیب از هر منطقه 5، 4 و 3 نمونه مرکب که خود ترکیبی از چند نمونه مخلوط شده در محل نمونه‌برداری بود، از عمق 0-20 سانتیمتری برداشت شد. برای نمونه‌برداری حدود 3 سانتیمتر خاک سطحی کنار زده شد؛ زیرا به علت هوازدگی سریع ترکیبات نفتی در سطح خاک امکان کاهش فعالیت میکروبی وجود داشت. در نمونه‌برداری به این نکته توجه شد که بالا بودن قدمت حضور مادهٔ آلاینده در خاک باعث سازگاری بیشتر ریزسازواره و افزایش جمعیت گونه‌های تجزیه‌کننده خواهد شد و امکان یافتن باکتری‌های سازگار با محیط آلوده و دارای قدرت بالای تجزیه‌ی آلاینده، بیشتر خواهد بود. در مناطق اصفهان و اراک از لجن‌های نفتی نیز نمونه برداری شد تا حضور باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت نیز در آنها بررسی گردد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در دمای کنترل شده‌ی 4 درجه سانتیگراد و در محیط تاریک به آزمایشگاه منتقل و تحت شرایط مذکور و در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری گردید. قبل از شروع آزمایشها، نمونه ها از الک 2 میلی متر عبور داده شدند تا نمونه‌های یکنواخت برای انجام آزمایش‌های بعدی فرآهم گردد. برخی خصوصیات فیزیکی و شمیایی نمونه‌ها نظیر پ‌هاش، هدایت الکتریکی، درصد ذرات رس، سیلت و شن، درصد کربن آلی و عناصر ازت و فسفر به تفکیک برای هر نمونه اندازه گیری شد.

جداسازی باکتری‌ها

ابتدا یک گرم از هر نمونه خاک به دقت توزین و به طور جداگانه در 100 میلی‌لیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون در آمد. سپس ارلن‌های 200 میلی‌لیتری حاوی خاک و آب مقطر در شیکرانکوباتور به مدت 30 دقیقه در 100 rpm قرار داده شد. بعد از این مرحله، نمونه‌ها از 10^{-1} تا 10^{-6} به صورت سریالی (هر بار 10 برابر) رقیق شدند. سپس 100 میکرولیتر از هر نمونه از غلظت‌های مختلف روی سطح محیط نوترینت آگار پخش گردید و به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 30 درجه سانتیگراد نگهداری شد. در مرحله بعد باکتری‌های رشد یافته خالص‌سازی گردید.

خالص‌سازی باکتری‌ها

برای جلوگیری از بروز آلودگی، آزمایش‌های مرحله خالص‌سازی در شرایط کاملاً استریل انجام گرفت. ابتدا باکتری‌ها از محیط کشت مایع به محیط کشت جامد منتقل شدند. در شرایط استریل، یک لوپ نمونه از نمونه‌های رقیق شده گرفته و به روش کشت خطی بر روی پتری دیش حاوی نوترینت آگار کشت داده شد. نمونه‌ها در انکوباتور در دمای 28 درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از گذشت 48 ساعت کلنی‌های باکتریایی به وضوح روی سطح پتری دیش‌ها ظاهر شدند. کشت باکتری بر روی نوترینت آگار تا رسیدن به کلنی‌های تک و خالص سازی باکتری‌ها تکرار شد.

شناسایی باکتری‌ها

خصوصیات مورفولوژیکی باکتری‌ها شامل رنگ، اندازه و خصوصیات کلونی، آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، اکسیداسیون و احیا و سایر آزمون‌های تشخیصی برای شناسایی باکتری‌ها در گروه میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان بررسی شد. باکتریهای خالص شده بر اساس روش Bergey شناسایی شدند (2).

رشد باکتری‌های خالص سازی شده در نفت

رشد باکتریها در محیط کشت مایع MSM تغییر یافته (حاوی نمک‌های فسفات هیدروژن پتاسیم و فسفات دی-هیدروژن پتاسیم به‌جای نمک‌های سدیمی) که دارای نفت خام استریل شده بود، در دمای 28 درجه سانتیگراد در شیکرانکوباتور با 200 دور بر دقیقه به مدت 21 روز بررسی گردید (4). برای کمی کردن رشد باکتری‌ها، OD نمونه‌ها در طول موج 540 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. همچنین رشد باکتری‌ها بر روی نفت با روش پخشیدگی چاهک که برای اولین بار توسط سعدون در سال 2002 (6) گزارش شده است، نیز سنجیده شد. به این صورت که 20 میلی لیتر از محیط MSM که با آگار غنی شده بود، در پتری‌دیش ریخته شد و سطح پتری‌دیش‌ها به صورت یکنواخت برای هر جدایه به صورت مجزا مورد کشت قرار گرفت. چاهک‌هایی به قطر حدود 6 میلی متردر محیط ایجاد شدند و حدود 50 میکرولیتر نفت فیلتر شده در آنها تزریق شد. از آب مقطر استریل نیز (به جای نفت) به عنوان شاهد در چاهک‌های موجود در پتری‌دیش‌های کشت داده شده، استفاده گردید. پتری‌دیش‌های کشت شده به مدت 6 روز در دمای 28 درجه سانتیگراد در انکوباتور نگهداری شد. نتایج کیفی رشد باکتری‌ها در اطراف چاهک‌ها و در سطح پتری‌دیش‌ها به‌صورت روزانه بررسی گردید.

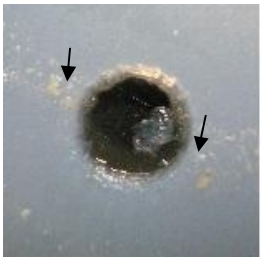
ارزیابی تجزیه‌ی نفت توسط باکتری‌های شناسایی شده

برای ارزیابی تجزیه‌ی زیستی نفت خام از آزمون تجزیه‌ی زیستی مونواکسیژناز استفاده شد (3). آزمون مذکور در لوله-های پلاستیکی حاوی 20 میکرولیتر 2,6-dichlorophenolindophenol با غلظت 0/05 مولار، 35 میکرولیتر محلول 5-methyl-phenazinium methylsulphate با غلظت0/05 مولار، 25 میکرولیتر نفت خام (0/1 درصد حجمی)، 5 میکرولیتر از محلول NAD با غلظت 0/15 مولار و 25 میکرولیتر از محلول سلول‌های باکتریایی شسته شده، صورت گرفت. تغییر رنگ در لوله‌های مورد آزمایش در مقایسه با 4 تیمار شاهد (شاهد فاقد نفت خام (سوبسترای باکتری‌ها)، شاهد فاقد NAD^+ ، شاهد فاقد باکتری و تیمار چهارم حاوی سلول‌های کشته شده باکتری) به مدت1، 2، 6 و12 ساعت بررسی گردید. تیمارهایی که تغییر رنگ آبی به زرد را نشان دادند به عنوان تیمارهای حاوی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت خام درنظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که بیشترین میزان آلودگی نفت در بین نمونه‌های 3 منطقه، متعلق به نمونه‌های پالایشگاه بود. البته دلیل اصلی این امر به نحوه و هدف نمونه برداری برمی‌گشت؛ زیرا در این منطقه به‌علت سابقه‌ی آلودگی، نمونه‌های با آلودگی بالایی انتخاب گردید تا احتمال وجود ریزسازواره‌های سازگار با نفت در آنها بیشتر باشد. پس از طی مراحل جداسازی و خالص سازی، حدود 27 کلونی باکتریایی از نمونه‌های خاک و لجن‌های نفتی جمع آوری شده از 3 منطقه-ی پالایشگاهی (تهران، اصفهان و اراک) شناسایی شد. باکتری‌های شناسایی شده در زیر میکروسکوپ دارای اشکال باسیل، کوکسی و پلی مورف بودند. اکثر باکتری‌های شناسایی شده متعلق به جنس ***Bacillus*** بودند. باکتری‌های

خاک‌های تهران شامل جنس‌های *Bacillus, Pseudomonas, Listeria, Rothia, Corynebacterium, Rhodococcus* و در خاک‌های اراک، جنس‌های *Bacillus, Listeria, Nocardiform, Rothia* و در خاک‌های اصفهان، جنس *Bacillus* بودند. از بین باکتری‌های شناسایی شده، 2 نمونه از خاک تهران، یک نمونه از خاک اصفهان و 2 نمونه از خاک اراک، رشد و فعالیت بیشتری در محیط کشت‌های حاوی نفت خام نشان دادند. توانایی و عدم توانایی رشد باکتری‌ها در محیط کشت MSM حاوی نفت خام در شکل 1 به صورت کیفی نشان داده شده است. رشد کلونی‌های باکتریایی در اطراف چاهک نفت در محیط کشت به توانایی رشد آنها در حضور آلاینده‌های نفتی اشاره دارد. نتایج آزمون OD باکتری‌ها در محیط MSM مایع پس از گذشت 20 روز و همچنین بررسی کیفی رشد کلونی‌ها در محیط کشت MSM و آگار (آزمون پخشیدگی چاهک‌های نفتی) نشان داد که اکثر کلونی‌هایی که در محیط MSM مایع رشد بالایی نشان دادند (OD بالا)، در آزمون پخشیدگی چاهک‌های نفتی نیز از نظر کیفی، توانایی رشد بالاتری داشتند. با توجه به نتایج آزمون‌های مذکور، باکتری‌های فعالتر در محیط کشت حاوی نفت خام شناسایی شدند.

A  B

شکل1- رشد (A) و عدم رشد (B) کلونی‌های باکتریایی در اطراف چاهک‌های نفت تعبیه شده در محیط کشت MSM

نتیجه‌گیری

تنوع باکتری‌های تجزیه کننده‌ی هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های مورد مطالعه قابل توجه بود. باکتری‌های شناسایی شده طیف نسبتاً وسیعی از جنس‌های باکتریایی مانند باسیلوس، سودوموناس، لیستریا، روتیا، کورینه باکتریوم، نوکاردیفورم و رودوکوکوس را شامل شدند. استفاده از این مجموعه متنوع باکتریایی برای زیست‌سالم‌سازی خاک‌های مورد مطالعه می‌تواند سودمند باشد.

قدردانی

از مسوولین محترم بخش تحقیق و توسعه شرکت پالایش و پخش فرآورده‌های نفتی که بخشی از هزینه‌های این طرح را تامین نموده اند، قدردانی می شود.

منابع

1- Capelli SM., Busalmen JP., and Sanchez SR. 2001. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by Indiagenous bacteria. International Biodeterioration & Biodegradation, 47:233-238
2- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T and Williams, S. T. Bergey's Manual of Bacteriology, 9th Edition, 1994. Williams & Wilkins.
3- Jacobs CJ., Prior BA., Dekock MJ. 1983. A rapid screening method to detect ethanol production by microorganisms. J. Microbiol. Methods, 1: 339-342.
4- Leadbetter, E.R., Foster, J.W., 1958. Studies on some methane-utilizing bacteria. Arch. Microbiol. 80: 91-118.

5- Leahy JG., and Colwell RR. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbial Rev. 54(9): 305-315.
6- Saadoun I. 2002. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. J. Basic Microbial. 42(6): 420-428.