



تجزیه و سولفورزدایی زیستی نفت خام توسط باسیلوس ها

دکتر عباس اخوان سپه‌ی^{۱*}، ایثار دژبان گلپاشا^۱، دکتر مسعود امامی^۱، ارژنگ محمد ناخدا^۱

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای حذف آلاینده‌های نفتی از محیط زیست بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. زیرا روش‌های یا از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند یا باعث به وجود آمدن ترکیبات سمی دیگری در محیط می‌شوند. هدف از این پژوهش، ارزیابی و تأیید حذف زیستی نفت خام به وسیله‌ی باسیلوس‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش پانزده گونه باسیلوس تجزیه‌کننده نفت خام از مناطق آلوده به نفت جدا شد و شرایط بهینه رشدشان در محیط پایه نمکی واجد ۱ تا ۳٪ نفت خام مورد ارزیابی گردید. سپس با ارزیابی کشتش سطحی و میزان کربن کل، نیتروژن و هیدروژن موجود در نفت خام در قبل و پس از تیمار با باکتری با روش ASTM D5291 اندازه‌گیری شد. همچنین سولفورزدایی زیستی با روش IP 242 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از گونه‌های مورد بررسی دو گونه که بهترین رشد در محیط پایه نمکی واجد نفت داشتند، انتخاب گردیدند. اما بیشترین افزایش در چگالی نوری و شمارش سلول‌های زنده و کاهش pH محیط کشت در روز پنجم از دوره آزمایش برای باسیلوس‌های S6 بدست آمد. زمان تجدید نسل بر روی محیط نمکی حاوی ۱٪ نفت خام برای باسیلوس S6 و S35 به ترتیب ۱۸ و ۲۵ ساعت محاسبه شد. باسیلوس‌ها قادر به کاهش کشتش سطحی محیط به ترتیب از ۶۲ (mN/m) به ۳۱ و ۳۸ بودند که بیانگر آن است که این گونه‌ها قادر به تولید میزان قابل توجهی بیوسورفکتانت هستند. نتایج نشان داد که میزان کلی کربن از ۸۵ (در صد جرمی) به ۴۱ و ۴۸ (در صد جرمی) به ترتیب برای باسیلوس S6 و S35 کاهش یافته است. همچنین مشخص شد که پس از گذشت یک ماه ۴۲ درصد و ۸۰ درصد از میزان کلی سولفور موجود در نفت به ترتیب توسط باسیلوس S6 و S35 حذف شده و مورد استفاده قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری: آنالیزهای آماری بر روی هیدروکربن‌های موجود در نفت خام با استفاده از گاز کروماتوگرافی (C13 - C30) نشان دهنده اثر تخریب زیستی باسیلوس‌ها بر روی هیدروکربن‌های نفتی و توانایی آنها در استفاده از نفت به عنوان تنها منبع کربن و انرژی می‌باشد.

واژگان کلیدی: نفت خام، باسیلوس، تخریب زیستی، بیوسورفکتانت

پدیرش برای چاپ: تیر ۸۷

دریافت مقاله: فروردین ۸۷

مقدمه

محیط زیست مانند سوزاندن، خاکستر کردن، شستشو با سورفکتانت‌ها و استفاده از مواد شیمیایی وجود دارد. اما این روش‌ها یا از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند یا باعث به وجود آمدن ترکیبات سمی دیگری در محیط می‌شوند (۳۲، ۳۵). از این رو پاکسازی زیستی به عنوان یک روش مقرون به صرفه و بی‌خطر برای محیط زیست مورد توجه قرار گرفت (۲۱، ۲۴، ۳۱). امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها یا فراورده‌های آنها در پاکسازی این آلاینده‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته و مطالعات زیادی در این زمینه در داخل و خارج کشور انجام شده است که از بین آنها می‌توان

امروزه نفت خام به عنوان یکی از منابع اصلی انرژی است و از آنجایی که جایگزین مناسبی برای آن یافت نشده، طی چند دهه آینده نیز به عنوان یکی از اصلی‌ترین منابع انرژی مطرح خواهد بود. با توجه به استفاده‌های روزافزون از نفت و فرآورده‌های نفتی، آلودگی‌های ناشی از آن رو به فزونی گذارده و تبدیل به امری نگران‌کننده شده است. روش‌های مختلفی برای حذف این آلودگی‌ها از

* آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال Bioabbas@tco.ir

میکروارگانیزم های موجود در نمونه خاک و باقی ماندن اسپور باسیلوس ها در محیط گردد. باسیلوس های موجود به روش پورپلیت بر روی محیط پلیت کانت آگار جدا شدند و به طور مقدماتی ویژگی هایی مانند خصوصیات ریخت شناسی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. سپس سویه های باسیلوس به دست آمده که دارای فعالیت همولیتیک بودند، از نظر توانایی استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن بررسی شدند.

توانایی رشد باسیلوس های جدا شده بر روی نفت خام: در این آزمایش توانایی رشد باسیلوس ها در غلظت ۱-۳٪ (v/v) از نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی در محیط نمک های معدنی مورد بررسی قرار گرفت. ترکیب محیط پایه نمکی مورد استفاده در این تحقیق به صورت زیر بود (g/l):

$\text{NaNO}_3 (2.0 \text{gl}^{-1})$, $\text{NaCl} (0.8 \text{gl}^{-1})$, $\text{KCl} (0.8 \text{gl}^{-1})$,
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} (0.1 \text{gl}^{-1})$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 (2.0 \text{gl}^{-1})$,
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} (2.0 \text{gl}^{-1})$, $\text{MgSO}_4 (2.0 \text{gl}^{-1})$,
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (0.001 \text{gl}^{-1})$;

سپس میزان ۲ میلی لیتر از عناصر کمیاب به ترکیب یاد شده به شرح زیر اضافه گردید (g/l):

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} (0.08 \text{gl}^{-1})$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} (0.75 \text{gl}^{-1})$
 $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} (0.08 \text{gl}^{-1})$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} (0.075 \text{gl}^{-1})$
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} (0.75 \text{gl}^{-1})$, $\text{H}_3\text{BO}_3 (0.15 \text{gl}^{-1})$
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} (0.05 \text{gl}^{-1})$

pH ابتدایی محیط نمکی پایه به ۶/۸ رسانده شد. سپس محیط نمکی به میزان ۵۰ میلی لیتر در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری پخش شد و ارلن ها در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ درجه و دور rpm ۲۰۰ قرار داده شدند. پس از کشت باکتری در زمان های معین در طی دوره آزمایش، چگالی نوری (OD=۶۰۰ nm)، شمارش سلول های زنده باکتریایی، غلظت کلی پروتئین موجود در محیط کشت و pH مایع درون ارلن مایر اندازه گیری گردید.

تجزیه نفت خام توسط باسیلوس ها: تایید توانایی تجزیه نفت خام توسط باسیلوس های جدا شده با کشت این سویه ها بر روی محیط آگار دار نمک های پایه معدنی به همراه ۱٪ از نفت خام در دمای ۳۰ درجه انجام گرفت. ظاهر شدن کلنی این باسیلوس ها در طی دوره انکوباسیون (۱۴ روز) نشان دهنده توانایی آن ها در استفاده از نفت خام بود (۱۴).

شمارش سلول های زنده باکتریایی: این روش یک روش مستقیم برای شمارش تعداد باسیلوس های زنده و فعال در محیط

به مطالعات Prince و همکارانش اشاره کرد. تعداد زیادی از باکتری ها و قارچ ها دارای توانایی تجزیه زیستی آلاینده های نفتی) هستند (۳۱،۱۷،۱۶). این ارگانیزم ها به طور گسترده ای در اکوسیستم های آبی و خاکی پراکنده می باشند (۱۱،۱۴،۲۴). ولی با این وجود، دانشمندان گزارش کرده اند که ارگانیزم های سازگار و بومی مناطق آلوده به ترکیبات نفتی در تجزیه زیستی آلاینده های نفتی محیط زیست بسیار موثرتر از سایر ارگانیزم ها می باشند. سرعت تجزیه زیستی در مناطق آلوده به عواملی مانند جمعیت میکروبی موجود در منطقه آلوده، میزان و نوع آلودگی، شرایط شیمیایی و زمین شناسی منطقه آلوده بستگی دارد (۳۲ و ۳۰،۲۳). همچنین روش های زیادی برای افزایش میزان تجزیه زیستی در خاک ها و مناطق آلوده به نفت و ترکیبات نفتی وجود دارد که مهمترین آنها عبارتند از:

۱- تحریک میکروارگانیزم های موجود در محیط با اضافه کردن اکسیژن و مواد غذایی به خاک و منطقه آلوده (Biostimulation) (۲،۲۰).

۲- تلقیح خاک و منطقه آلوده با میکروارگانیزم هایی که توانایی تجزیه زیستی را دارا می باشند (Bioaugmentation)، در نتیجه بهبود بخشیدن جمعیت میکروبی خاک آلوده به نفت و افزایش میزان تخریب زیستی در منطقه آلوده می گردد (۳،۱۷،۲۲).

با توجه به مطالب یاد شده، ضرورت جداسازی و غربالگری میکروب هایی که توانایی تجزیه زیستی را دارا می باشند و اضافه کردن آنها به مناطق آلوده می تواند در حذف این آلاینده ها از محیط زیست وجود دارد. هدف از این پژوهش جداسازی این گروه از میکروارگانیزم ها و تایید توانایی آنها در حذف این آلاینده ها از محیط زیست می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه خاک: نمونه های خاک از مناطق آلوده به نفت و ترکیبات نفتی در نزدیک مراکز توزیع نفت و مخازن نفتی در پالایشگاه تهران و جزیره سیری جمع آوری شد. تمام نمونه های جمع آوری شده به صورت دوتایی بوده و به سرعت به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جداسازی باسیلوس های تجزیه کننده نفت خام: ۱ گرم از خاک الک شده در ۹ میلی لیتر آب مقطر ریخته شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد در داخل بن ماری قرار داده شد تا شوک حرارتی حاصل موجب از بین رفتن شکل رویشی

میلی لیتری برداشته شد. سپس ۵۰ میلی لیتر محیط نمکی پایه به همراه ۱٪ (v/v) نفت خام به هر نمونه اضافه گردید، پس از تلقیح باکتری، نمونه ها در داخل انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و با دور ۲۰۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از گذشت هر دو روز از دوره آزمایش یک ارلن برداشته شد و میزان pH محیط درون آن توسط دستگاه pH متر اندازه گیری گردید و منحنی تغییرات pH محیط در طی دوره آزمایش (۱۰ روز) ارزیابی گردید.

اندازه گیری کشتش سطحی: برای اندازه گیری کشتش سطحی، ۲/۵ میلی لیتر باکتری از محیط نوترینت برات به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت نمکی پایه حاوی ۱٪ نفت تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباسیون شیکر دار با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۲ روز قرار داده شد. سپس کشتش سطحی با استفاده از روش Ring Method و Du Nouy و با استفاده از دستگاه تنسیومتر اندازه گیری شد (۴).

فعالیت آنزیماتیک باسیلوس های جدا شده: از کشت ۲۴ ساعته باسیلوس ها بر روی محیط نمک های پایه آگار دار و ۱٪ نفت خام برداشته و سویه های جدا شده از نظر وجود آنزیم های لیپاز، پروتاز، اوره آز و نیتروژناز بررسی شدند.

اندازه گیری میزان کلی کربن، نیتروژن و هیدروژن: بدین منظور ارلن مایر هایی با حجم یک لیتر برداشته و به هر کدام ۲۵۰ میلی لیتر محیط نمک های پایه اضافه گردید. سپس به هر یک میزان ۱٪ نفت خام استریل شده اضافه شد. پس از تلقیح باکتری (۱۲/۵ میلی لیتر) به محیط های کشت، محیط ها به مدت یک ماه در داخل انکوباتور گرما گذاری شدند. سپس محتویات موجود در ارلن مایر در داخل دکانتور برای جدا سازی اولیه ریخته شد. پس از جدا کردن مقدماتی فاز آلی (نفت) از فاز آبی، نفت جدا شده با سانتریفیوژ های دور بالا به طور کامل از آب جدا شد تا نمونه برای آزمایش های بعدی آماده گردد. پس از آن، نفت به دست آمده به سه بخش تقسیم و هر بخش به ترتیب برای اندازه گیری کربن کل، نیتروژن کل، و هیدروژن کل استفاده گردید. برای اندازه گیری N، H و C نفت از روش ASTM-D-5291 استفاده شد و نتایج به دست آمده به صورت درصد جرمی (MASS %) محاسبه گردید. فعالیت سولفور زدایی: پس از فرایندهای آماده سازی (مطابق آنچه در آماده سازی مربوط به میزان کلی کربن، نیتروژن و هیدروژن بیان شد)، میزان گوگرد کل موجود در نفت با روش IP-242 توسط دستگاه های مربوطه اندازه گیری شد و نتایج به صورت درصد جرمی (MASS %) به دست آمد. این آزمایش

کشت است. نمونه ها با پی پت در داخل ظروف استریل ریخته و سپس محیط کشت پلیت کانت آگار دار اضافه شد. پس از گرمخانه گذاری هر کلنی بیانگر یک باکتری می باشد. علاوه بر آن چگالی نوری محیط کشت مایع نیز برای تایید رشد اندازه گیری و سپس منحنی رشد باسیلوس ها در محیط نمکی حاوی نفت خام ترسیم گردید (۱۴، ۱۶، ۲۹).

تخمین غلظت کلی پروتئین محیط کشت: برای مشخص کردن غلظت پروتئین ۱ میلی لیتر از محیط کشت برداشته شد و پس از اضافه کردن لیزوزیم به آن، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور گرما گذاری گردید. سپس ۹ میلی لیتر آب به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحله به پلاک های جمع شده، ۱ میلی لیتر NaOH (۳ نرمال) اضافه و به مدت ۳ دقیقه جوشانده شد تا میزان حلالیت پروتئین ها افزایش یابد. بعد از سرد شدن در دمای اتاق ۱ میلی لیتر از H_3PO_4 (۱ مولار) اضافه شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر از آن برداشته و به آن ۹۵۰ میکرو لیتر معرف coomassie protein assay اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و سپس چگالی نوری آن در ۵۹۵ nm اندازه گیری و غلظت کلی پروتئین با توجه به منحنی استاندارد آلبومین (Bradford 1976)، محاسبه گردید (۹).

تعیین فعالیت امولسیفیه کنندگی: برای اندازه گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی از روش پیشنهادی Cooper و Goldenberg استفاده شد (۱۰). ۴ میلی لیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط نمک های پایه به همراه ۶ میلی لیتر از هیدروکربن مورد بررسی (نفت خام) در یک لوله آزمایش در پیچ دار مدرج ریخته شد. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ دقیقه در دور بالا با شیکر لوله به هم زده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط سکون قرار گرفته شد. پس از این مدت، طول کل ستون مایع و طول لایه امولسیفای شده اندازه گیری شد و با استفاده از فرمول زیر EC محاسبه گردید:

$$EC = \frac{\text{طول لایه امولسیفیه شده}}{\text{طول کل ستون مایع}} \times 100$$

بررسی تغییرات pH در محیط آزمایشگاهی: در طی دوره آزمایش هر دو روز یک بار تغییرات pH محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. برای این اندازه گیری برای هر سویه ۵ ارلن مایر ۲۵۰

کشت (OD) و شمارش تعداد سلول های زنده نشان دهنده این است که باسیلوس های جدا شده (S6-S35) قادر به استفاده از نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی هستند. در مورد باسیلوس S6 بیشترین میزان سلول شمارش شده $5/7 \log 10 \text{ cfu/ml}$ در روز پنجم از دوره آزمایش بوده در بیشترین میزان سلول شمارش شده مربوط به باسیلوس S35 در روز ششم از دوره آزمایش و برابر با $4/8 \log 10 \text{ cfu/ml}$ بود که این نتایج نشان می دهد باسیلوس S6 رشد بهتری نسبت به S35 بر روی نفت خام دارد (نمودار ۳). تخمین غلظت کلی پروتئین: تخمین غلظت کلی پروتئین با روش Bradford انجام شد که این روش یک روش دقیق، در بررسی وضعیت جمعیت میکروبی در محیط مورد آزمایش می باشد. افزایش غلظت پروتئین در طی دوره آزمایش بیانگر توانایی رشد باسیلوس های مورد آزمایش در محیط کشت حاوی نفت خام بوده و نتایج حاصل از OD و شمارش سلول های زنده را تأیید می کند (۹) (نمودار ۴).

تعیین فعالیت امولسیفیه کنندگی: فعالیت امولسیفیه کنندگی برای باسیلوس های جدا شده اندازه گیری شد و در طی ۳۲ تا ۴۸ ساعت به بیشترین میزان خود رسید و پس از آن ثابت ماند. این نتایج نشان دهنده آن است که سنتز بیوسورفکتانت در مورد باسیلوس های جدا شده در فاز لگاریتمی صورت می گیرد و همزمان با تولید توده سلولی بیوسورفکتانت هم سنتز می شود. فعالیت امولسیفیه کنندگی بعد از ۲۴ ساعت برای باسیلوس S6 و S35 به ترتیب ۷۱٪ و ۸۵٪ محاسبه شد.

اندازه گیری کثرت سطحی: باسیلوس های جدا شده قادر به کاهش کثرت سطحی بودند و این نشان دهنده آن است که این گونه ها قادر به تولید میزان قابل توجهی بیوسورفکتانت هستند. کثرت سطحی ابتدایی در محیط کشت شاهد در دمای ۲۳ تا ۲۵

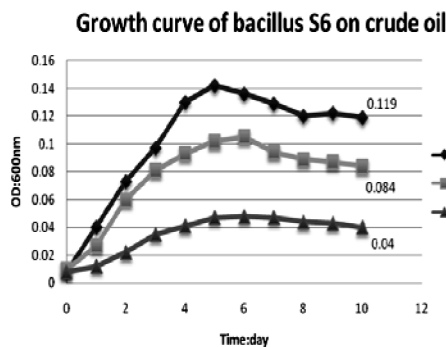
برای نمونه شاهد (فاقد باکتری) نیز انجام شد تا میزان تغییرات گوگرد قبل و بعد از دوره آزمایش به دست آید.

تأثیر بر روی هیدروکربن های نفت خام: با استفاده از گاز کروماتوگرافی آلکان های بین (C13-C30) که قابل حل در Hexane بودند مورد سنجش قرار گرفتند. از آنجایی که تجهیزات لازم برای گاز کروماتوگرافی نفت خام در ایران موجود نمی باشد لذا از نمونه مربوط به آنالیز هیدروکربنی در ابتدا به روش SARA (Saturated- Aromatics- Resines- Asphaltenes) برش تهیه شد و سپس برش های مربوطه جداگانه وارد دستگاه گاز کروماتوگرافی (Pepkin - Elmer - مدل 7800) گردید و اطلاعات مربوط به برش ها جمع آوری و با نرم افزارهای مربوطه تغییرات کلی مربوط به هیدروکربن ها در نمونه های مجهول به دست آمد.

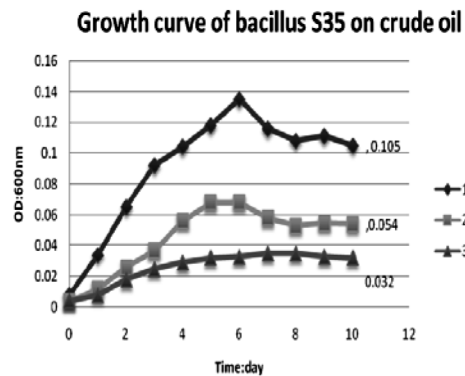
نتایج

جداسازی باسیلوس های تجزیه کننده نفت خام: پانزده گونه مختلف باسیلوس از نمونه های آلوده به نفت جدا شد که همه آنها رشد خوبی بر روی محیط پایه نمکی آگار دار حاوی ۱٪ نفت خام از خود نشان دادند. ۲ گونه باسیلوس که بهترین رشد را داشتند برای آزمایش های بعدی انتخاب شدند. کلنی این باسیلوس ها تنها در طی ۴۸-۷۲ ساعت بر روی محیط پایه نمکی آگار دار حاوی ۱٪ نفت خام ظاهر گردید که این امر بیانگر توانایی آنها در استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود (نمودار ۱ و ۲).

توانایی رشد باسیلوس های جدا شده بر روی نفت خام: افزایش تعداد سلول های باکتری در محیط کشتی که تنها منبع کربن آن نفت خام بود بیانگر توانایی تجزیه نفت خام توسط باسیلوس ها می باشد. مشاهده نتایج مربوط به کدورت محیط



نمودار (۲): منحنی رشد باسیلوس S6 بر روی محیط نمکی به همراه ۱ تا ۳٪ نفت خام



نمودار (۱): منحنی رشد باسیلوس S35 بر روی محیط نمکی به همراه ۱ تا ۳٪ نفت خام

جدول ۱: توانایی آنزیمی باسیلوس های جدا شده						
نیتراژ ردوکتاز	لستیناز	اوره آز	پروتئاز بر روی ژلاتین	آمیلاز	پروتئاز بر روی Skim milk	سویه
+++	-	-	+	+++	+++	<i>Bacillus.S6</i>
+++	-	-	+	-	-	<i>Bacillus.S35</i>

(فاقد رشد)، + (دارای رشد)، +++ (رشد بسیار زیاد)

اندازه گیری میزان کلی کربن، نیتروژن، هیدروژن و گوگرد: این روش برای اثبات و تأیید توانایی استفاده باسیلوس ها از نفت انجام شد که در آن میزان کلی کربن، نیتروژن، هیدروژن موجود در نفت خام در نمونه شاهد (فاقد باکتری) و نمونه تیمار شده با باکتری اندازه گیری گردید. در این روش میزان کلی کربن موجود در نفت خام قبل از تیمار با باکتری و بعد از تیمار با باکتری (پس از یک ماه) سنجیده شد. نتایج به دست آمده بیانگر توانایی سویه کشت داده شده در استفاده از نفت خام (تجزیه آن و تبدیل آن به بیوماس سلولی) می باشد (جدول ۲).

تأثیر بر روی هیدروکربن های موجود در نمونه نفت خام: برای تأیید توانایی باسیلوس ها در تجزیه و استفاده از نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی از روش گاز کروماتوگرافی استفاده شد. در نمودارهای ۶ تا ۸ به ترتیب کروماتوگرام های مربوط به آنالیز هیدروکربن های موجود در نمونه شاهد (بدون باکتری)، تیمار شده با S6 و تیمار شده با S35 و نمودارهای ۹ و ۱۰ به ترتیب میزان تجزیه نفت خام توسط سویه های S6 و S35 نشان داده شده است.

بحث

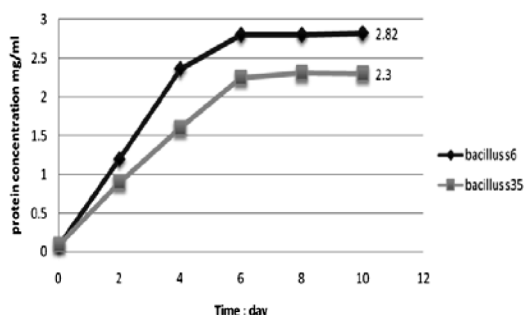
تعداد زیادی از باکتری ها و قارچ ها قادر به تجزیه زیستی آلاینده های نفتی هستند (۲۸). این ارگانیزم ها به طور گسترده ای

درجه سانتی گراد برابر با ۶۲ (mN/m) بود که این میزان به ۳۱ و ۳۸ (mN/m) به ترتیب برای S6 و S35 کاهش یافت. نتایج، وجود یک رابطه مثبت میان میزان رشد باکتری و کاهش کشش سطحی را نشان می دهد زیرا که بیوسورفکتانت با خواص خود میزان دسترسی زیستی باکتری را به نفت خام افزایش داده و موجبات رشد بیشتر را فراهم می کند.

ارزیابی فعالیت آنزیماتیک: آنزیم های خارج سلولی و فعالیت آنها در حذف آلودگی ها از محیط زیست نقش مهمی را ایفا می کنند. نتایج نشان می دهد که باسیلوس S6 نسبت به S35 از سیستم آنزیمی پیچیده تری برخوردار است (جدول ۱).

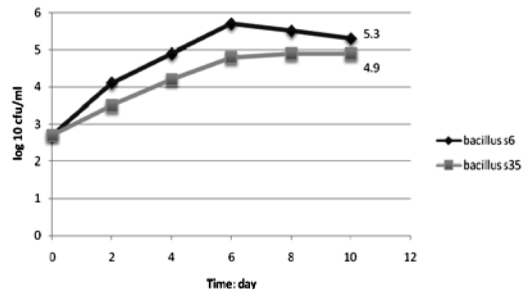
اثر تجزیه زیستی بر روی pH محیط کشت: در این آزمایش pH ابتدایی محیط کشت برابر ۶/۸ بود. اندازه گیری pH در طی دوره انکوباسیون کاهش pH را نشان داد و این امر بیانگر تغییرات شیمیایی بر روی نفت خام می باشد که توسط آنزیم های باکتریایی صورت می پذیرد. تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی توسط باکتری ها موجب تولید محصولات جانبی و یا گاهی اسید های آلی می شود که این ترکیبات موجب کاهش pH محیط شده و کاهش pH محیط تأیید کننده توانایی رشد و فعالیت باسیلوس های جدا شده در محیط کشت حاوی ۱٪ نفت خام می باشد (نمودار ۵).

Total protein estimation of bacillus S6 and S35 on 1% crude oil-MSM



نمودار (۴): مقایسه غلظت کلی پروتئین باسیلوس S6 و S35 بر روی محیط نمکی به همراه ۱٪ نفت خام

Bacterial growth during degradation of crude oil (1%)



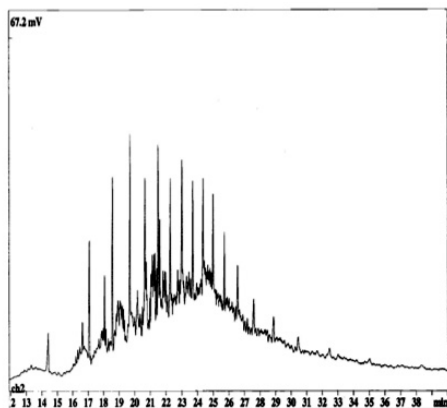
نمودار (۳): مقایسه شمارش سلول های باسیلوس S6 و S35 بر روی محیط نمکی به همراه ۱٪ نفت خام

جدول (۲): نتایج مربوط به سولفورزادایی باسیلوس های جدا شده و نتایج C.H.N						
شماره	Test Name	Test Method	S35	S6	شاهد	
۱	S Content	mass%	IP 242	۰/۳۸	۱/۱	۱/۸۱
۲	C Content	mass%	ASTM D529	۴۸/۸	۴۱	۵۸/۶
۳	H Content	mass%	ASTM D5291	۱۰/۵	۱۰/۲	۱۲/۴
۴	N Content	mass%	ASTM D5291	<۰/۵	<۰/۵	<۰/۵

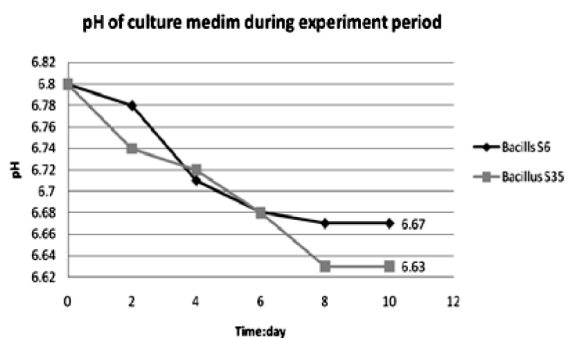
می کردند (۸). این باکتری ها بیشتر از جنس *Pseudomonas* بودند. از آنجایی که باکتری های مولد بیوسورفکتانت در تجزیه نفت موثرتر عمل می کنند، لذا از بین باسیلوس های جدا شده سویه های مولد بیوسورفکتانت جدا شدند. در مطالعاتی که با هدف جداسازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت انجام شده معمولاً از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان معیاری برای جداسازی اولیه سویه های مولد بیوسورفکتانت استفاده شده است. به طوری که در مطالعاتی مشابه که توسط Banat در سال ۱۹۹۵ برای جداسازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت انجام شد از فعالیت همولیتیک برای جداسازی اولیه استفاده کرد (۴). همچنین Ruwaida- Abu نیز در سال ۱۹۹۱ از همین روش استفاده نمود (۱). از آنجایی که کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهم ترین و اصلی ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت محسوب می شود به همین دلیل در این تحقیق پس از غربالگری اولیه (با بررسی فعالیت همولیتیک) و کاهش تعداد باسیلوس های انتخاب شده، از این آزمایش برای بررسی و تأیید توان این سویه ها در تولید بیوسورفکتانت استفاده شد. قوی ترین بیوسورفکتانتی که تا به امروز گزارش شده سورفاکتین است که به وسیله *Bacillus subtilis* تولید می شود. این باکتری قادر است کشش سطحی محیط رشد را

در اکوسیستم های آبی و خاکی پراکنده می باشند (۵،۱۲،۱۷). بررسی ها نشان داده است اگر چه امکان وجود باکتری با توان تجزیه کنندگی بالا در آب ها و خاک های بدون سابقه آلودگی قبلی با ترکیبات نفتی وجود دارد، ولی در اکثر پژوهش های مشابه، به خاک ها و مناطق آلوده به نفت توجه می شود. چون که امکان یافت میکروارگانیسمی با توان تجزیه کنندگی بالا در این مناطق بیشتر از مناطق غیر آلوده به ترکیبات نفتی می باشد. در مطالعه ای که توسط Margesin در سال ۲۰۰۰ به منظور جداسازی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات نفتی انجام شد، تمامی نمونه های محیطی استفاده شده از مناطق آلوده شده به نفت جدا گردید. در مطالعه دیگری که در بلغارستان توسط Naturforsch در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت نیز جداسازی میکروارگانیسم ها از مناطق آلوده (آب های آلوده به پساب های نفتی) گزارش گردیده است (۲۳). در سال ۲۰۰۳ در مطالعه ای که توسط Ezeronye و Okerentugba در نیجریه انجام شد باکتری های تجزیه کننده نفت از آب های آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه ها جدا شد (۲۵).

در تحقیقی دیگر Bola در سال ۲۰۰۶ در نیجریه از ترکیبات ماسه ای همراه با نفت سنگین که به صورت کلوخ در آمده بودند باکتری هایی جداسازی شد که در تجزیه نفت خام بسیار موثر عمل



نمودار (۶): کروماتوگرام مربوط به آنالیز هیدروکربن های موجود در نمونه شاهد (بدون تیمار باکتری)

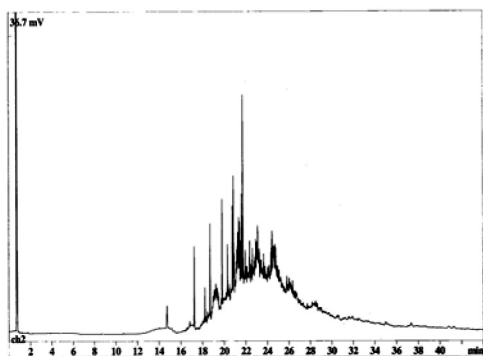


نمودار (۵): مقایسه pH محیط نمکی به همراه ۱٪ نفت خام در باسیلوس های S6 و S35 در طول دوره آزمایش

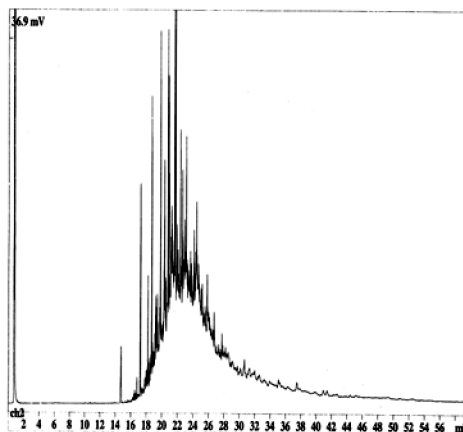
اختلاف تمایل آنها برای امولسیفیه کردن این نوع هیدروکربن دانست. برای بررسی توان باسیلوس های جدا شده در استفاده از نفت خام شمارش سلول های زنده در طی دوره آزمایش انجام شد. در مطالعه ای مشابه در سال ۲۰۰۲ توسط Rahman و Street در انگلیس بر روی تجزیه لجن های نفتی انجام شد (۲۹) و همچنین در تحقیقی مشابه توسط Bola در نیجریه در سال ۲۰۰۶ از روش شمارش سلول های زنده به عنوان معیاری برای تأیید توانایی باکتری ها در استفاده و تجزیه نفت خام استفاده شد (۸). در این تحقیق علاوه بر شمارش سلول های زنده، افزایش کدورت محیط کشت در (۶۰۰ nm) مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی های مشابه که توسط Emtiazi و Shakarami در سال ۲۰۰۴ در ایران بر روی تجزیه ترکیبات نفتی صورت گرفت از این روش برای نشان دادن توانایی باکتری ها در تجزیه ترکیبات نفتی استفاده شد (۱۳). در مورد باسیلوس S6 بیشترین میزان سلول شمارش شده برابر بود با 10^7 cfu/ml در روز پنجم از دوره آزمایش، در حالی که بیشترین میزان سلول شمارش شده مربوط به باسیلوس S35 در روز ششم از دوره آزمایش شمارش شد و برابر با 10^7 cfu/ml در $4/8$ بود، که این نتایج، قابل قیاس با نتایج به دست آمده توسط AL-Saleh و Obuekwe در سال ۲۰۰۵ می باشد (۲). در این آزمایش pH ابتدایی محیط کشت برابر $6/8$ بود که اندازه گیری pH در طی دوره انکوباسیون کاهش در pH را نشان می داد که این امر بیانگر تغییرات شیمیایی بر روی نفت خام می باشد که توسط آنزیم های باکتریایی صورت می پذیرد. تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی توسط باکتری ها موجب تولید محصولات جانبی و یا گاهی اسید های آلی می شود که این ترکیبات موجب کاهش pH محیط

از 70 mN/m تا مقادیر کمتر از 26 mN/m کاهش دهد (۹). مطالعات مشابهی در این زمینه توسط Banat در سال ۱۹۹۱ برای جدا سازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت انجام شد (۴). همچنین سویه مولد بیوسورفکتانت که توسط Abu-Ruwaida و همکاران در سال ۱۹۹۱ در انستیتو مطالعات علمی کویت جداسازی شد توانست کشتش سطحی محیط رشد را از 69 mN/m تا 27 mN/m کاهش دهد. در این تحقیق باسیلوس سویه S6 قادر به کاهش کشتش سطحی از 62 mN/m به 31 mN/m بود. همچنین باسیلوس سویه S35 نیز قادر به کاهش این میزان تا 38 mN/m بود که نتایج این پژوهش قابل قیاس با مطالعات مشابه می باشد (۱).

با توجه به بررسی های انجام شده می توان گفت که فعالیت امولسیفیه کنندگی یک امولسیفایر (بیوسورفکتانت) به تمایل آن نسبت به سوپسترای هیدروکربنی استفاده شده برای اندازه گیری EC بستگی دارد. نتایج (E24) به دست آمده برای باسیلوس سویه S6 و S35 به ترتیب ۷۱ و ۸۵٪ بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق، از نتایج گزارش شده در مطالعات مشابه توسط Bodour و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۷)، Francy و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۱۵) و Bicca و همکارانش در سال ۱۹۹۹ (۶)، بهتر و چشمگیر تر می باشد. نتایج مربوط به باسیلوس سویه S6 در کاهش کشتش سطحی بسیار بهتر از نتایج به دست آمده از S35 بود اما نتایج به دست آمده از فعالیت امولسیفیه کنندگی حاکی از این بود که S35 تمایل بیشتری به امولسیفیه کنندگی نفت خام نسبت به S6 از خود نشان داده است که علت این امر را می توان اختلاف در نوع بیوسورفکتانت های تولیدی توسط این باکتری ها و همچنین

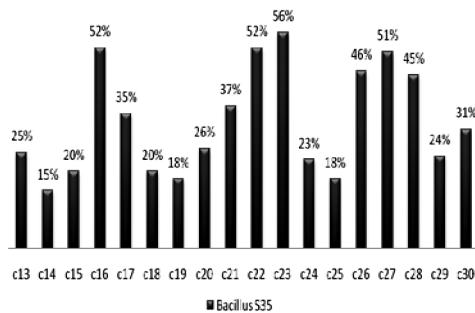


نمودار (۸): کروماتوگرام مربوط به آنالیز هیدروکربن های موجود در نمونه تیمار شده با *Bacillus S35*



نمودار (۷): کروماتوگرام مربوط به آنالیز هیدروکربن های موجود در نمونه تیمار شده با *Bacillus S6*

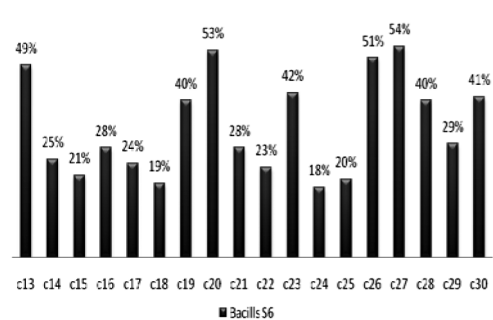
n-Alkane degradation in experimental medium



نمودار (۱۰): میزان تجزیه نفت خام به وسیله *Bacillus S35* پس از گذشت یک ماه در محیط حاوی ۱٪ نفت خام

در بررسی دیگری که توسط Naturforsch در سال ۲۰۰۲ در بلغارستان صورت گرفت از تکنیک گاز کروماتوگرافی برای تأیید توانایی باکتری ها در استفاده از نفت خام استفاده شد (۲۳). علاوه بر این در تحقیقات انجام شده توسط Wagner و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز از این روش استفاده گردید (۳۴). در تحقیق انجام شده توسط Rahman و Street (۲۹) و Banat (۴) از تکنیک گاز کروماتوگرافی برای آنالیز هیدروکربن های موجود محیط کشت استفاده شد و آلکان های بین (C12-C40) را بررسی کردند. در این پژوهش آلکان های (C13-C30) مورد قرار گرفت که نتایج بدست آمده بیانگر توانایی باسیلوس های جدا شده در استفاده از نفت خام بود. بررسی های انجام شده بیانگر آن است که باسیلوس های جدا شده قادر به حذف نفت خام از محیط بوده و از بین رفتن لایه نفتی در محیط های مورد آزمایش تأیید کننده این موضوع می باشد. بررسی نوع فعالیت و عوامل موثر و چرخه های متابولیکی این میکروارگانیسم ها که قادر به رشد بر روی نفت و هیدروکربن های نفتی می باشند این امکان را فراهم می سازد که روش هایی نوین و با کارایی بیشتر برای حذف آلاینده های نفتی از محیط زیست پدید آید و همچنین از باسیلوس های جدا شده در این تحقیق می توان برای بهبود بخشیدن جمعیت میکروبی مناطق آلوده به نفت و ترکیبات نفتی استفاده نمود.

n-Alkane degradation in experimental medium



نمودار (۹): میزان تجزیه نفت خام به وسیله *Bacillus S6* پس از گذشت یک ماه در محیط حاوی ۱٪ نفت خام

شده و کاهش pH محیط تأیید کننده توانایی رشد و فعالیت باسیلوس های جدا شده در محیط کشت حاوی ۱٪ نفت خام می باشد. در مطالعات مشابه انجام شده توسط Bola، در سال ۲۰۰۶، pH محیط کشت آزمایش اندازه گیری شد و pH محیط کشت کاهش نشان داد که علت این امر را می توان به دلیل ترکیبات ناشی از تجزیه نفت خام دانست (۸). در مطالعات مشابه که توسط Rahman و Street در انگلیس انجام شد، نتایج قابل قیاسی در مطالعه انجام شده توسط Clark و Prince در سال ۱۹۹۴ به دست آمد (۲۸). در این آزمایش نیز pH محیط کشت اندازه گیری شد که نتایج حاکی از کاهش pH محیط کشت بود. میزان کلی کربن، نیتروژن، هیدروژن موجود در نفت خام را در محیط کشت مورد آزمایش (نمک های معدنی پایه به همراه ۱٪ نفت خام) که تنها منبع کربن و انرژی قابل استفاده نفت خام می باشد اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده حاکی از کاهش در این میزان (میزان کربن Total) بود، که این کاهش بیانگر توانایی سوبیه کشت داده شده در استفاده از نفت خام (تجزیه آن و تبدیل آن به بیوماس سلولی) می باشد. این روش برای تأیید توان باکتری ها در استفاده از نفت خام مناسب می باشد.

در مطالعات مشابه ای که در سال ۲۰۰۲ توسط Rahman و Street در انگلیس بر روی تجزیه لجن های نفتی انجام شد از روش گاز کروماتوگرافی به عنوان معیاری برای تأیید توانایی باکتری ها در استفاده و تجزیه نفت خام استفاده شد (۲۹).

References

1. Abu-Ruwaida A S, Banat I M, Haditirto S, Salem A and Kadri M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and evaluation. *Biotechnologica*, 1991; 4: 315-24
2. AL-Saleh_ES and Obuekwe C . Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. *Intl. Biodeter. Biodegrad*, 2005; 56: 1-7
3. Balba, M.T., Al-Shayji, Y., Al-Awadhi, N. and Yateem, A, Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil-contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination*, 2002;11:41-55

4. Banat I M. Biosurfactant production and possible uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: review. *Biores Tech*, 1995; 51: 1-12.
5. Barathi S and Vasudevan N Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from petroleum contaminated soil. *Environ. Intl.* 2001; 26: 413-416.
6. Bicca F C, Fleck L C, Zachio M A. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev Microbiol*, 1999; 30:3.
7. Bodour A A, Gerrero-Barajas C and Maier M. Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by *Flavolipid sp.* *Strain MTN11. App and Env Microbiol*, 2004; 10(6): 1114-20.
8. Bola O, (2006). Hydrocarbon Degrading Potentials Of Bacteria Isolated From a Nigerian Bitumen (Transand) Deposit, *Nature science* 4(3) 51-57.
9. Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72, 248-254.
10. Cooper D. G. and B. Goldenberg. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 1999; 189:224-229.
11. Da Cunha CD (1996). Avaliacao da Biodegradac, ao de Gasolina em Solo. Tese M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Qumica, Rio de Janeiro, Brazil, 97p.
12. Del Arco JP and De Franca FP. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. *Environ. Pollut.* 2001;110: 515-519.
13. Emtiazi, G. and Shakarami, H., Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas. sp.* and transformed *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*. 2004; Vol. 4 (2), pp. 172-176.
14. Fiocco, R.J. and Lewis, A. Oil spill dispersants. *Pure and Applied Chemistry*, 71, 27-42.
15. Francy D S, Thomas J M, Raymond R L and Ward C H (1991). Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. *J Industrial Microbiol.* 1999; 8: 237-46.
16. Head IM and Swannell RP. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999;10: 234-239.
17. Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K. and Harayama, S . Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrientsupplemented sea water. *Environmental Microbiology*. 2002; 4, 141-147.
18. Kim H S, Young B, Lee C H et al (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactants .
19. Korda A, Santas P, Tenente A and Santas R. Petroleum hydrocarbon bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997;48: 677-689.
20. Lessard, R.R. and DeMarco, G. The significance of oil spill dispersants. *Spill Science & Technology Bulletin*. 2000; 6:59-68.
21. Margesin R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. *Intl. Biodeter. Biodegrad.* 2000;46: 3-10.
22. Matthew O. Ilori. Hydrocarbon Degrading Potentials of Bacteria Isolated from a Nigerian Bitumen (Tarsand) Deposit .*Nature and Science.* 2006;4(3):51-57.
23. *Naturforsch Z Hydrolytic Enzymes and Surfactants of Bacterial Isolates from Lubricant-Contaminated Wastewater; Z. Naturforsch.* 58c, 87-92 (2003).
24. Ojo OA. Petroleum-hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal Southwest Nigeria *African Journal of Biotechnology* 2006; Vol. 5 (4), 333-337.
25. Okerentugba PO and Ezeronye OU. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluents in Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 2003; 2(9):288-292.
26. Prince, R.C. Petroleum and other hydrocarbons, biodegradation of. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (G. Bitton, G., ed.) John Wiley, New York, 2002;2402-2416.
27. Prince, R.C. and Bragg, J.R. Shoreline bioremediation following the Exxon Valdez oil spill in Alaska. *Bioremediation Journal*, 1997; 1, 97-104.
28. Prince, R.C. and Clark, J.R., Bioremediation of the Exxon Valdez oil spill: monitoring safety and efficacy. In *Hydrocarbon Remediation* (R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoeppe and R.N. Miller, eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1994;107-124.
29. Rahman K and Street G(2002). Bioremediation Sludge Using Bacterial Consortium With Biosurfactant, *Clean Environment Management -TS13BA*
30. Prince, R.C and Lessard, R. *Oil & Gas Science and Technology-Rev. IFP*, 2003;Vol. 58, No. 4, pp. 463-468
31. Thomas, R. and Lunel, T. The Braer incident; dispersion in action. In: *Proceedings of the Sixteenth Arctic Marine Oilspill Program Technical Seminar*, Edmonton, Alberta, 1993;843-859.
32. Trindade PVO, Sobral LG, Rizzo ACL, Leite SGF and Soriano AU. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere.* 2005;58: 515-522.
33. Urum, K., Pekdemir, T. and Gopur, M., (2003). Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil. With biosurfactant solutions. *Process Safety and Environm. Protect. Transact. of the Institut. of Chem. Engin.*, 81:203-209.
34. Wagner-Dobler I., Bennisar A., Vancanneyt M Strompl C., Brummer I. and Eichner C. Microcosm enrichment of biphenyl degrading microbial communities from soils and sediments. *Appl. Environ Microbiol.* 1998;64, 3014-3022
36. Zhang XX, Cheng SP, Zhu C-J and Sun S-L. Microbial PAH Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. *Pedosphere.* 2006;16(5): 555-565.



Utilization and biodesulfurization of crude oil by *Bacillus* spp.

Akhavan Sepahi, A^{1*} Dejban Golpasha I, Nakhoda, AM¹

¹Science Faculty, Azad University North Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background and objectives: Today use of microorganisms for removing crude oil pollution from contaminated sites (bioremediation) was considered by scientists because other methods such as surfactant washing and incineration lead to production of more toxic compounds and they are non-economic.

Materials and methods: Fifteen crude oil degrading *Bacillus* spp. were isolated from contaminated sites. Two isolated showed best growth in liquid media with 1-3% (v/v) crude oil and mineral salt medium.

Results: The results show maximal increase in optical densities, total viable count and total protein concomitant with decrease in pH on fifth day of experiment period for *Bacillus* S6. Typical generation time on mineral salt with 1% crude oil is 18h and 25-h respectively for *Bacillus* S6 and S35. These bacilli reduce surface tension from 60 (mN/m) to 31 and 38 (mN/m) it means that these bacilli can produce sufficient surfactant. Total of carbon, nitrogen and hydrogen was measured before and after of treatment by using ASTM D5291 method. The results reflect that total of carbon was decreased from 85.6 (mass %) to 41 and 48.8 (mass %) respectively by *Bacillus* S6 and S35. Biodesulfurization of crude oil was investigated by using IP 242 method. After one month of treatment at 30°C, 42% and 80% of total sulfur content was removed respectively by *Bacillus* S6 and S35.

Conclusion: Quantitative analysis using gas chromatography carried out to demonstrate the effect of biodegradation on n-alkanes (C13-C30). In our study the amounts of hydrocarbons lost by biological processes. The results confirm that isolated *Bacillus* can use crude oil as source of carbon and energy.

Keywords: Crude oil, *Bacillus*, Biodegradation, Biosurfactant