مجله محیط شناسی، شماره ۳۴، تابستان ۱۳۸۳، صفحه ۱۴-۷

جداسازی باکتری های نفت خوار تولید کننده بیوسورفاکتانت(+) از خلیج فارس و بررسی اثر pH بر مصرف نفت

دکتر غلامحسین ابراهیمی پور *

علی ابوالحسنی سورکی **

چکیده

امروزه آلودگی های نفتی ناشی از تصادفات تانکرهای نفتکش، جنگ، صنایع وابسته به نفت و غیره مشکلات زیادی را در زمینه محیط زیست کشورهای جهان به وجود آورده است. تلاش برای رفع این آلودگی های نفتی با استفاده از روشهای مختلف، بخصوص به وسیله میکروارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات نفتی، وسیع و روزافزون است. از آب خلیج فارس در این مطالعه دوسویه باکتریایی غربال سازی شد، نتیجه به دست آمده حاکی از آن است که این باکتریها قادرند ترکیبات نفتی را به طور موثری معدنی نمایند. سویه های مذکور، باسیل کوتاه گرم مثبت متحرک بدون اسپور دریایی، هوازی اجباری، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بوده و تحت عنوان PG01 و PG02 نامگذاری شدند. در طول رشد در ارلن های تکان خورده (۱۵۰ دور در دقیقه) حاوی محیط پایه معدنی حاوی نفت به عنوان تنها منبع کربن (محیط نفت)، باکتری های مذکور ابتدا تولید بیوسورفاکتانت(۱) نموده، نفت را در آب امولسیونه کرده و سپس سلول های باکتریایی به قطره های ریز نفت چسبیده و ترکیبات آن را به درون خود جذب کردند. تولید بیوسورفاکتان های آنیونی، یا متابولیت های حد واسط اسیدی در زمان رشد در محیط نفت باعث کاهش pH محیط شد. بررسی اثر pH بر روی رشد باکتری ها نشان داد که هر دو سویه جداسازی شده، در pHهای ۸ و ۸/۴ قادر به رشد و تجزیه نفت بودند و نسبت به تغییرات pH حساس می باشند. سویه های نامبرده در محیط کشت های عصاره مخمر و ملاس چغندرقند نیز قادر به رشد بوده ولی تولید بیوسورفاکتانت مشاهده نشده است.

کلید واژه

تجزیه زیستی نفت خام، خلیج فارس، بیوسورفاکتانت، pH.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۱/۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۲/۳/۷

(+) این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است.

* استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی.

** کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی.

سرآغاز

نفت یک مخلوط ویسکوز[۲] از هزاران ترکیب مختلف است که اساساً از کربن و هیدروژن تشکیل شده اند. هر ساله مقادیر زیادی نفت و ترکیب های نفتی از راه های مختلف نظیر حوادث دریایی و جنگ، تانکرهای نفتکش، نشت لوله های نفتی، فعالیت های حفاری و اکتشاف نفت، پالایشگاه ها و صنایع مرتبط با نفت خام وارد محیط دریا می شود، که این مقدار تقریباً ۳۲۰ میلیون تن تخمین زده می شود (Etkin, 1998). مناطق نفت خیز جهان به طور یکنواخت بر روی کره زمین پراکنده نشده اند بلکه به نواحی ویژه ای نظیر منطقه خلیج فارس محدود شده اند. بنابراین این مناطق در معرض بیشترین آلودگی نفتی، بویژه از جانب تخلیه آب توازن تانکرهای نفتکش، و همچنین در اثر جنگ های منطقه ای، قرار دارند. به عنوان مثال حدود ۹ میلیون بشکه نفت خام فقط در اثر جنگ خلیج فارس (سال ۱۹۹۱ میلادی) وارد محیط دریا شد که با ایجاد لکه نفتی به بزرگی ۶۰۰ مایل مربع، باعث بروز مشکلات بسیاری گردید (Canby, 1991).

خوشبختانه این آلودگی های نفتی تحت تاثیر عوامل طبیعی مختلفی مانند تبخیر شدن، پراکنده شدن، رسوب کردن، تجزیه زیستی، فتواکسیداسیون، و غیره از محیط دریا برطرف می شوند (Wolfe, 1994 و Rhienheimer, 1981). تخریب محیط زیستی از جانب این آلودگی های نفتی، نیاز به راهبردهای سازگار با محیط زیست را برای برطرف کردن آنها مطرح کرده است. در این بین، تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم ها، نقشی اساسی را بخصوص در حذف اجزای غیر فرار نفت از محیط زیست ایفا می کند (Harayama et al., 1999 و Cuningham et al., 2001) تاکنون تعداد زیادی از باکتری های تجزیه کننده اجزای نفتی جداسازی شده است. ولی با وجود این، به نظر می رسد که تعداد کمی از آنها در تجزیه زیستی نفت در محیط های طبیعی حائز اهمیت باشند. در این مطالعه، دوسویه باکتری دریایی PG01 و PG02 از سواحل خلیج فارس جداسازی شده اند که قادرند ترکیبات نفتی را به طور بسیار مؤثری معدنی نموده و تولید بیوماس میکروبی کنند که برای محیط زیست بی خطر است.

مواد و روشها

نمونه گیری

نمونه گیری در سواحل قشم در پنج ایستگاه مختلف صورت گرفت. نمونه ها تا زمان جداسازی باکتری ها به مدت یک روز در یخچال (۴ ^{0}C) نگهداری شدند و به منظور هوادهی در آنها به صورت نیمه باز گذاشته شد.

تجهیزات، مواد و محیط های کشت

دستگاه های مورد استفاده، شیکر اوربیتال مدل Heidolph Unimax 2010 ساخت آلمان، دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu UV-120-02 ساخت ژاپن، دستگاه pH-meter مدل Satorius PB-20 ساخت آلمان، و همچنین دستگاه سانتریفوژ مدل Sigma 2K15C ساخت آلمان بودند. کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک خریداری شدند، بجز Tris Base (Hydroxymethyl amino methane tris) که مربوط به شرکت Sigma بود و باکتو پپتون از شرکت دیفکو. نفت خام مورد استفاده در این پروژه، از نوع نفت خام سنگین بود که از شرکت ملی نفت جمهوری اسلامی ایران تهیه شد.

کلیه محیط کشت های مورد استفاده در این مطالعه به منظور جلوگیری از رسوب دادن منیزیوم آب دریا با فسفات در حین اتوکلاو بود. محیط کشت در آب دریای مصنوعی شامل ۱۴ گرم سولفات منیزیوم و ۳۷ گرم کلرید سدیم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شدند (Grasshoff, 1976). محیط ۱ شامل ۵ گرم عصاره مخمر، ۳ گرم پپتون، ۱۲ گرم آگار آگار در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب دریای مصنوعی بود. محیط ۲ همانند محیط ۱ بدون آگار آگار، و محیط ۳ (محیط پایه) شامل ۱/۹۵ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۲۴ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن II، ۰/۰۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ گرم کلرید کلسیم، ۱ میلی لیتر محلول میکرو عناصر در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب دریای مصنوعی بود. محلول میکرو عناصر نیز شامل ۷۰ میلی گرم کلرید روی، ۱۰۰ میلی گرم کلرید منگنز، ۲۰۰ میلی گرم کلرید کبالت، ۱۰۰ میلی گرم کلرید نیکل، ۲۰ میلی گرم کلرید مس II، ۵۰ میلی گرم مولیبدات سدیم، ۲۶ میلی گرم سلنیت سدیم، ۱۰ میلی گرم وانادات سدیم، ۳۰ میلی گرم ولفرامات سدیم، ۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲۵٪ بود که در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. محیط ۴ یا محیط ملاس شامل ۱۰ گرم ملاس چغندرقند (کارخانه چغندرقند دزفول) در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب دریای مصنوعی بود. pH محیط های ۱، ۲ و ۴ توسط سود ۱ مولار به ۸/۴ رسانده شد. محیط ها در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. سولفات منیزیوم و سولفات آهن جداگانه اتوکلاو شده و پس از سرد شدن به محیط ها افزوده گردیدند.

جداسازی باکتریهای تولید کننده بیوسورفاکتانت با قابلیت مصرف نفت

از هر نمونه حدود ۵ گرم رسوب و ۲۰ ml آب دریا برداشته و داخل یک ارلن ۲۵۰ ml ریخته شد. به هر ارلن Tween 80 با غلظت نهایی ۰/۰۱٪ افزوده شد. ارلن ها به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند. با این روش معمولاً میکروارگانیسم ها از ذرات رسوب جدا می شوند؛ سپس به مدت ۵ دقیقه در محل ساکن قرار داده شد. از محلول رویی، رقت های 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه شد و از هر کدام ۱۰۰µl به وسیله میله شیشه ای سرکج بر روی پلیت های حاوی محیط ۱ کشت شد (از هر رقت دو تکرار). از پلیت هایی که دارای حدود ۱۰۰-۸۰ کلنی مجزا بودند تمام کلنی ها و همچنین کلنی های موجود در پلیت های دیگر با مرفولوژی متفاوت به منظور تست تولید بیوسورفاکتانت و تجزیه نفت استفاده شد.

آزمایش تجزیه زیستی نفت خام

تک تک باکتری های ایزوله شده در لوله آزمایش حاوی محیط ۲، کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور $35^{0}C$ قرار گرفت. پس از رشد مناسب، لوله ها سانتریفوژ شدند (10000 × g). رسوب سلولی با ۴٪ NaCl استریل، شست و شو داده شد و مجدداً در 10000 × g سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل به وسیله محلول ۴٪ NaCl استریل به کدورت ۳ مک فارلند رسانده شد. از هر لوله، ۱ میلی لیتر به ارلن های شیاردار ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط ۳ که pH آن توسط بافر tris/HCL بر روی ۸/۴ تنظیم شده بود اضافه شد، سپس ۱ میلی لیتر نفت خام استریل بر روی آن افزوده گردید. ارلن ها در دمای آزمایشگاه بر روی شیکر (150rpm) قرار داده شدند. ارلن ها به مدت یک ماه از جهت تولید بیوسورفاکتانت (براساس مشاهده چشمی ایجاد سوسپانسیون هموژن نفت در آب) و مصرف کردن نفت خام به عنوان تنها منبع کربن (روشن شدن رنگ محیط) مورد بررسی قرار گرفتند. از محیط هایی که تولید بیوسورفاکتانت کرده بودند، بررسی میکروسکوپی به روش قطره معلق نیز صورت گرفت.

بررسی رشد و تجزیه نفت در pH های متفاوت

شرایط بهینه تجزیه نفت توسط باکتری ها از نظر pH مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور هر یک از باکتری ها، در ارلن های شیاردار ۲۵۰ ml حاوی ۱۰۰ ml محیط ۳ کشت داده شدند. pH محیط ها توسط بافر tris/HCl قبل از اتوکلاو بر روی ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۴ و ۹ تنظیم شد. pH محلول های سولفات منیزیوم و سولفات آهن نیز تنظیم و پس از اتوکلاو و سرد شدن به محیط ها اضافه گردید. ارلن ها پس از تلقیح باکتری (تقریباً 10^{7} باکتری در ml) و افزودن نفت خام استریل (۱ ml)، در دمای آزمایشگاه بر روی شیکر (۱۵۰ rpm) قرار گرفتند و روزانه به منظور تعیین OD 650 nm, pH و پروتئین، نمونه گیری صورت گرفت.

اندازه گیری پروتئین

از اندازه گیری میزان پروتئین کل سنتز شده، به عنوان شاخص دقیقی از مصرف نفت به وسیله باکتری ها استفاده شد. برای این منظور ۱ میلی لیتر از محیط کشت در داخل لوله اپندورف در 10000 × g سانتریفوژ گردید. رسوب سلولی توسط محلول استریل ۴٪ NaCl شست و شو داده شد و مجدداً در 10000× g سانتریفوژ گردید. به رسوب سلولی حاصل، ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از به هم زدن، ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH اضافه و با هم مخلوط شد. لوله ها سپس به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا سلول ها کاملاً لیز شوند. سنجش پروتئین به روش لاری صورت گرفت. (Sueszmuth et al., 1987).

بررسی رشد باکتری ها در محیط ملاس

برای این منظور هر کدام از باکتری ها در لوله های آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر ملاس (محیط ۴) کشت داده شده و در دمای $35^{0}C$ انکوبه شدند. رشد باکتری از لحاظ ایجاد کدورت، در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ایجاد بیوسورفاکتانت در محیط های ۲ و ۴

تولید بیوسورفاکتانت در محیط های عصاره مخمر/ پپتون (محیط ۲ و ملاس محیط ۴) نیز بررسی شد. به این ترتیب که پس از رشد مناسب باکتری در داخل لوله آزمایش حاوی ۱۰ ml محیط کشت، ۱ ml نفت خام به هر لوله اضافه گردید و به وسیله همزن لوله کاملاً به هم زده شد. تولید بیوسورفاکتانت به صورت مشاهده چشمی ایجاد امولسیون نفت در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

تست هالوفیلیته (۳)

باکتری ها از نظر هالوفیل، دریایی یا هالوتولرانت بودن و همچنین غلظت بهینه نمک تست شدند. برای این منظور تک تک

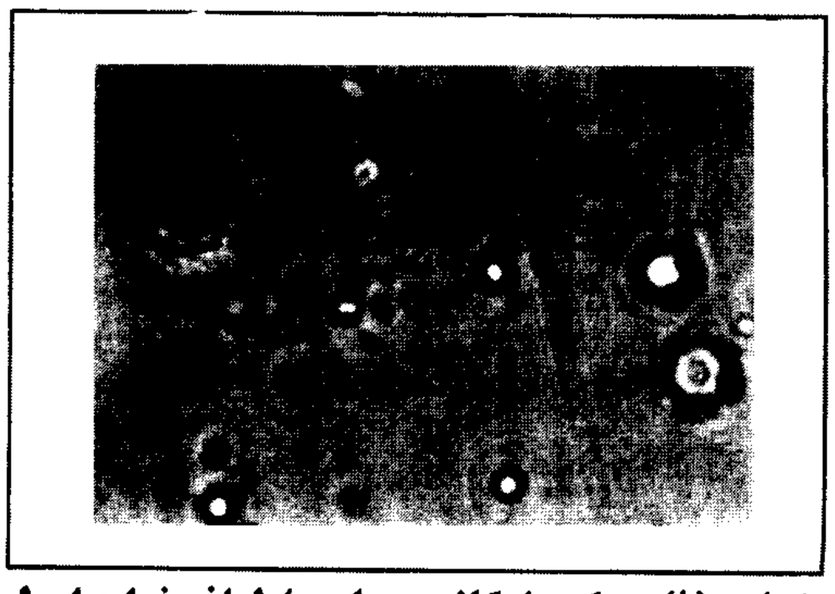
باکتری ها در محیط ۱ حاوی صفر تا ۱۵۰ گرم در لیتر کلرید سدیم، با و بدون کلرید منیزیوم (۱۲ گرم در لیتر) کشت داده شده در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. رشد باکتری‌ها از نظر ایجاد کدورت در محیط کشت در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، و ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت.

تست حرارت

تست حرارت به منظور تعیین دامنه دمای رشد باکتری ها انجام شد. به این ترتیب که هر یک از باکتری ها در لوله های آزمایش حاوی ml ۱۰ محیط ۲ کشت داده شدند و در دماهای ۴، ۲۰، ۳۰، ۳۵، ۳۷ و ۴۱ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. رشد باکتری ها از نظر ایجاد کدورت در محیط کشت، در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، و ۲۱ به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

با استفاده از تکنیک غربال سازی و آزمایش تجزیه زیستی نفت خام، ۱۲ سویه باکتریایی جداسازی شده دو سویه که از نظر سرعت عمل در تولید بیوسورفاکتانت برتر بوده و نفت خام را به طور مؤثری معدنی می کردند، انتخاب شده و تحت عنوان PG01 و PG02 نامگذاری شدند. شکل شماره (۱) اتصال باکتری های سویه PG02 به قطره های ریز نفت معلق را نشان می دهد. هر دو سویه، میله ای کوتاه (0.5-0.7 ×1-1.5 µm)، گرم مثبت و دریایی بوده که علاوه بر NaCl، به غلظت بالای منیزیوم نیز نیاز دارند. سویه های PG01 و PG02 به ترتیب در غلظت های ۱۰ تا ۱۱۰ و ۳۰ تا ۱۲۰ گرم در لیتر NaCl و ۱۴ گرم در لیتر $MgSO_4, 7H_2O$ قادر به رشد بودند. این سویه ها مزوفیل بوده و در دمای ^0C ۲۰ تا ^0C ۳۷ تست شده، رشد صورت گرفته و در دمای ^0C ۴ و ^0C ۴۱ قادر به رشد نبودند.

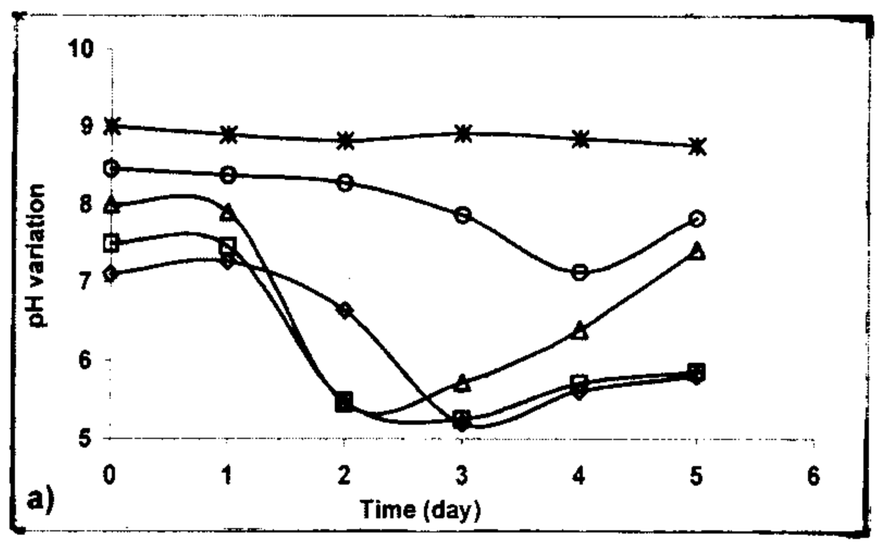


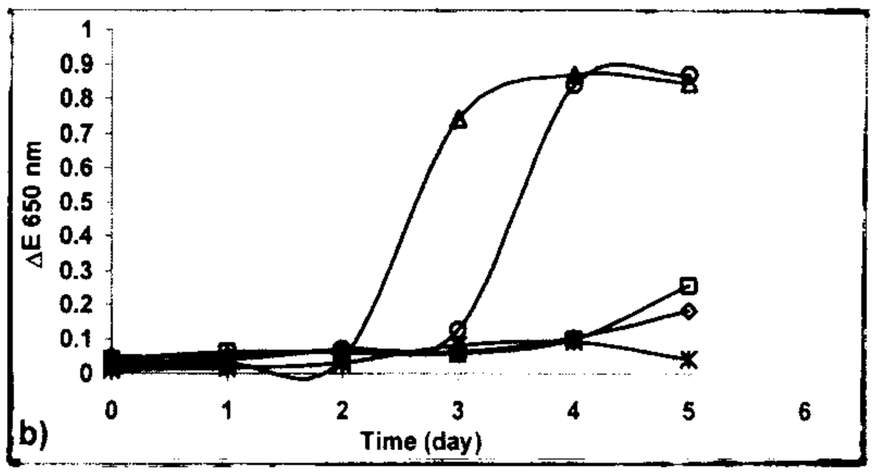
شکل شماره (۱): میکرو ارگانیسم ها در اطراف ذرات امولسیونه شده نفت خام در محیط مایع

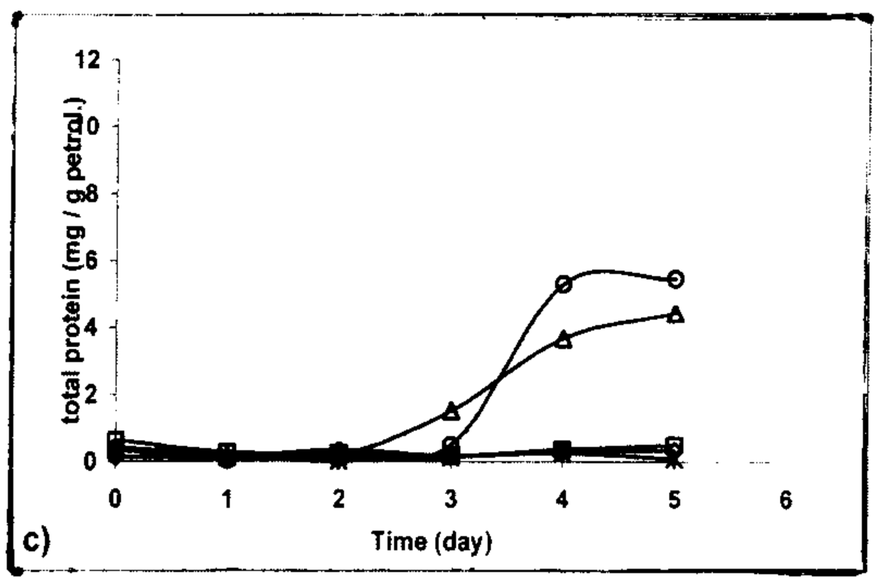
(فلشها، باکتری های PGO_2 را دور ذرات نفت خام نشان می دهد.)

بررسی رشد و تجزیه نفت در pH متفاوت

شرایط بهینه رشد و تجزیه نفت باکتری ها با بررسی سه شاخص تغییرات روزانه Cell-OD, pH و پروتئین تولیدی مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی اثر pH بر تجزیه نفت به وسیله دو سویه باکتری PG01 و PG02 در شکلهای شماره (۲) و (۳) نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود pH بهینه در مورد هر دو سویه ۸/۴-۸ است.







شکل شماره (۲): بهینه سازی عامل pH در مورد باکتری PG01 در محیط پایه (محیط ۳) حاوی نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و با تنظیم اولیه pH ها به وسیله بافر tris/ HCL

a: تغییرات روزانه pH

b: بررسی رشد سلولی به روش کدورت سنجی

c: بررسی رشد با اندازه گیری پروتئین تولیدی

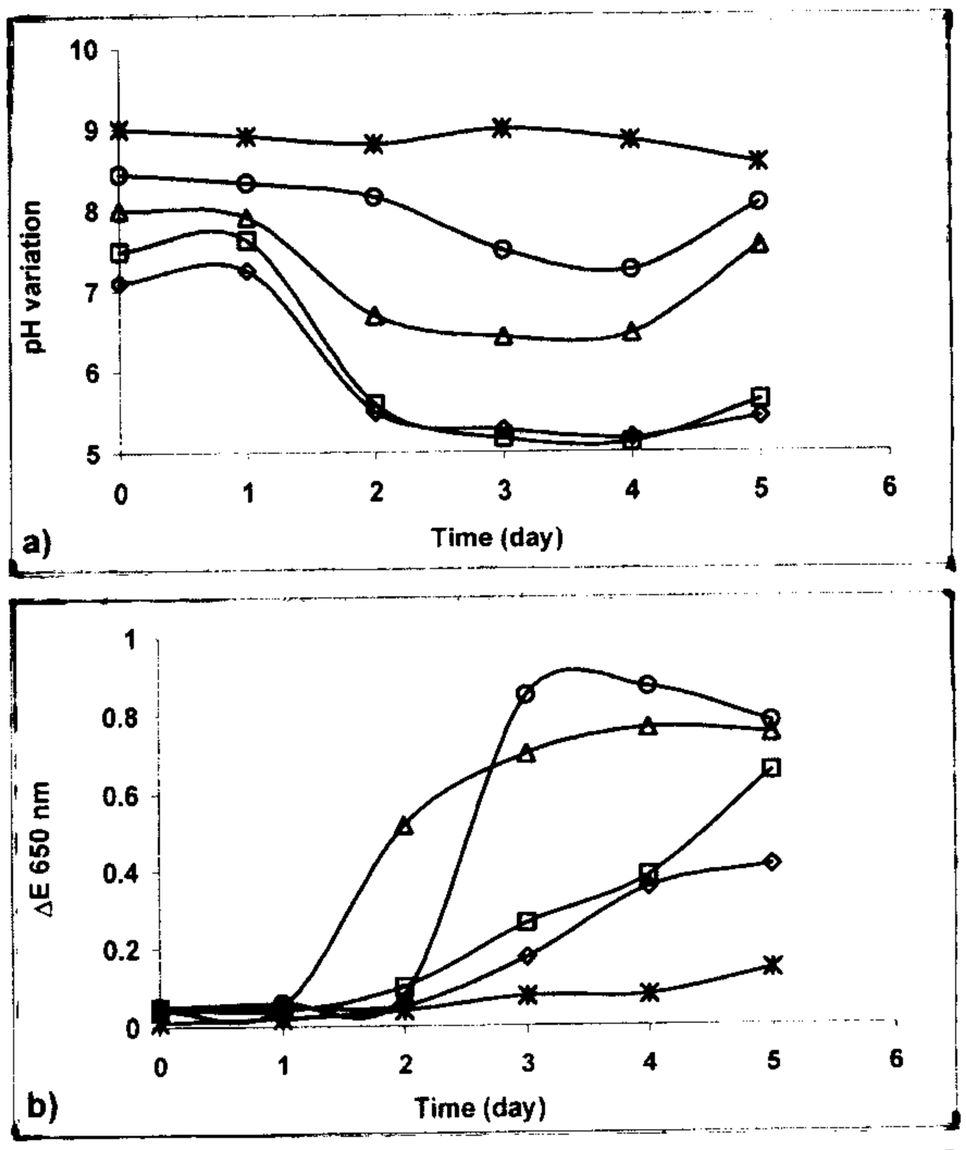
pH=7 محیط با =

pH=7.5 محیط با =

pH=8 محیط با =

pH=8.4 محیط با =

pH=9 محیط با =



شکل شماره (۳): بهینه سازی عامل pH در مورد باکتری PG02 در محیط پایه (محیط ۳) حاوی نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و با تنظیم اولیه pH ها به وسیله بافر tris/ HCL

a: تغییرات روزانه pH

b: بررسی رشد سلولی به روش کدورت سنجی

c: بررسی رشد با اندازه گیری پروتئین تولیدی

= محیط با pH=7، = محیط با pH=7.5،

= محیط با pH=8، = محیط با pH=8.4،

= محیط با pH=9

رشد باکتری ها با ملاس

هر دو سویه PG01 و PG02 در محیط ۱٪ ملاس چغندرقند بدون افزودن هیچ گونه ماده مکمل دیگری رشد مناسبی را دارا می باشند و می توان از سوبسترای ارزانقیمت در تولید صنعتی این باکتری ها بهره برد. ولی هیچ یک از باکتری های نامبرده در محیط های ملاس مخمر تولید بیوسورفاکتانت نکرده اند.

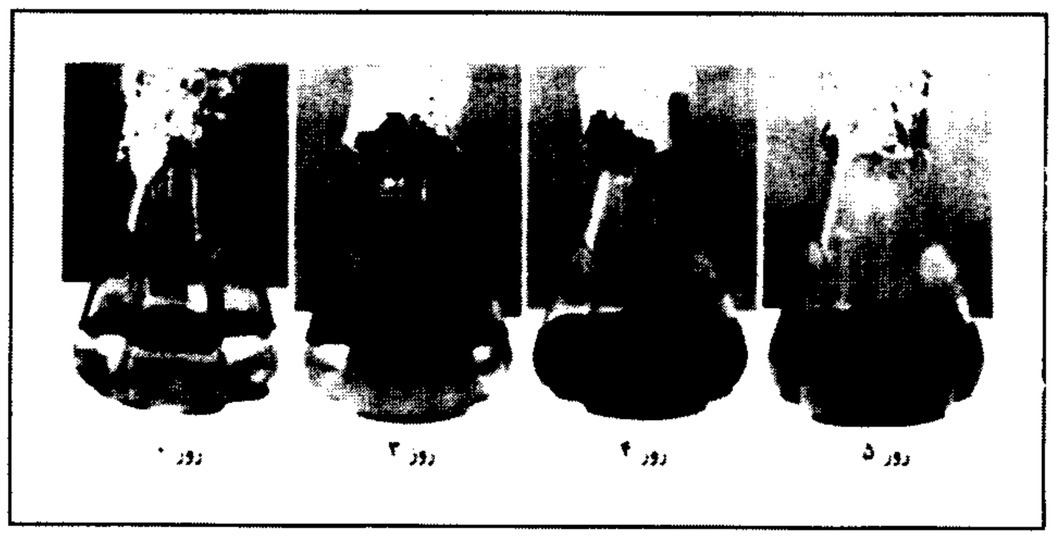
بحث و نتیجه گیری

اتفاقات ناگوار تانکرهای نفتکش در دریاها از اواسط دهه ۱۹۸۰ میلادی، مقامات مسئول محیط زیست بین المللی را متوجه آثار محیط زیستی ناشی از این آلودگی ها و تلاش در جهت یافتن راه حل هایی برای رفع آنها کرده است. بررسی های میکروبیولوژیکی نشان داد که طبیعت خود قادر به رفع این آلودگی های نفتی، با روندی آهسته ولی مؤثر است و با بهینه سازی این فرایندهای طبیعی می توان از نظر زمانی به آنها شتاب داد (Atlas, 1977 و Gibs, 1975).

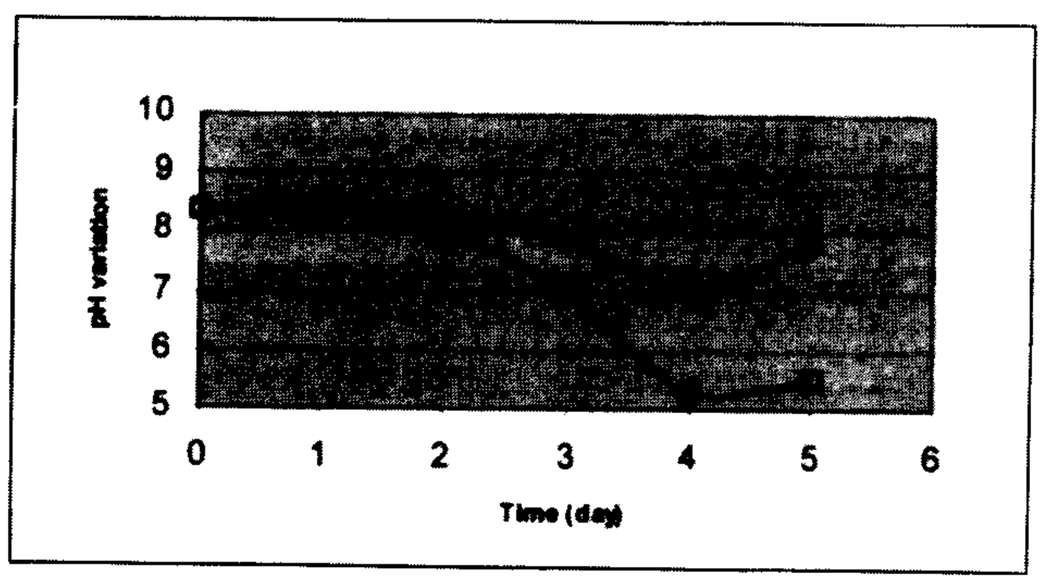
تحقیقات در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری هایی که قادر به مصرف ترکیبات نفتی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی باشند، وسیع و روز افزون است (Atlas & Bartha, 1972, Bosecker et al., 1989 Harayama et al,. 1999, Margesin & Schinner 2001, (Van Hamme & Ward, 1999, 2001, Van Stempvoort et al. 2002 در این مطالعه ما موفق به جداسازی ۱۲ سویه باکتریایی از آبهای خلیج فارس شدیم که قادر به رشد بر روی نفت خام به عنوان تنها منبع انرژی و کربن بودند. از بین این سویه ها دو مورد قادرند تمام ترکیبات نفتی را به طور قابل توجهی معدنی نمایند. این سویه ها تحت عنوان PG01 و PG02 نامگذاری شدند. انتخاب منطقه خلیج فارس برای نمونه‌برداری به دو منظور صورت گرفت. نخست‌اینکه میلیون‌ها سال است که در این اکوسیستم، ترکیبات نفتی وجود داشته است و تعدادی از میکروارگانیسم های این منطقه کاملاً خود را با این شرایط سازگار کرده و قادرند از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند. ثانیاً از آن جایی که هدف از این تحقیق استفاده صنعتی از باکتری‌های جداسازی شده به منظور رفع آلودگی‌های نفتی، بخصوص در خلیج فارس است، بالطبع این سویه ها با شرایط فیزیکی و شیمیایی آن مانند pH، دما، غلظت املاح و غیره کاملاً سازگار می باشند.

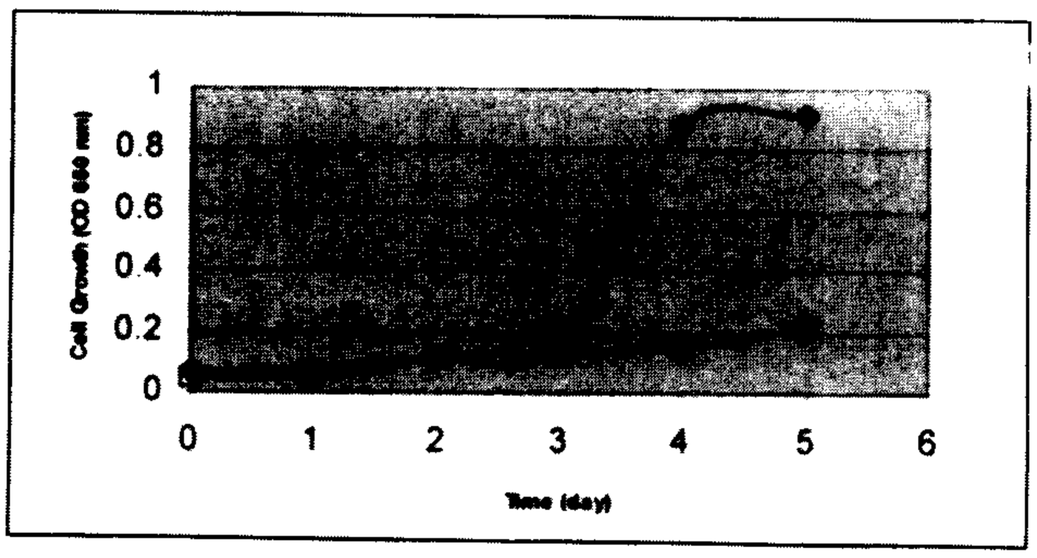
سویه های مذکور، در محیط معدنی حاوی نفت، ابتدا تولید بیوسورفاکتانت نموده و همان طور که در شکل شماره (۴) مشاهده می‌گردد، باعث امولسیونه شدن نفت در فاز آبی محیط کشت می شوند. سپس باکتری ها به دور قطره های ریز نفت نشسته که این

عمل موجب افزایش قابل توجهی در جذب ترکیبات نفتی توسط باکتری ها می گردد (شکل شماره ۱) و با اکسیده کردن آن تولید انرژی و بیوماس می نمایند. تولید بیوسورفاکتانت پس از حدود یک روز آغاز شده و با شروع فاز لگاریتمی (روز ۳) نفت خام را کاملاً امولسیونه می کند (شکل های شماره ۴ و ۵ مشاهده گردند) در روز پنجم، نفت خام ناپدید شده و رنگ محیط کشت تقریباً روشن می گردد که نشان دهنده مصرف مؤثر باکتری ها در ترکیبات نفتی است.



شکل شماره (۴): مراحل تولید بیوسورفاکتانت و تجزیه نفت توسط باکتری PG02





شکل شماره ۵- تغییرات pH و منحنی رشد سلولی باکتری PG02 با و بدون بافر (pH=8.4)

= محیط حاوی بافر

= محیط بدون بافر

تولید بیوسورفاکتانت توسط میکروارگانیسم‌های معدنی کننده ترکیبات نفتی و با افزودن سورفاکتانت ها به محیط آنها، کارایی آنها را در مصرف نفت بسیار افزایش می دهد (Rahman, 2002; Moran et al.,2000 Harayama et al., 1999). البته گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر منفی سورفاکتانت ها بر جمعیت میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده نفت و غیره ارائه شده است (Van Hamme & Ward, 1999; Rheinheimer,1981; Hoepner,1987 و Deschenes et al., 1996) بیوسورفاکتانت ها با امولسیونه کردن نفت در فاز آبی محیط کشت باعث افزایش نسبت سطح به حجم قطره های نفتی می شوند (Schlegel, 1992). به دام افتادن سلول های باکتری درون قطرات نفت موجب غیر فعال شدن سلول می شود (Rheinheimer,1981). و پوشیده شدن محیط توسط لایه نفتی مانع از نفوذ اکسیژن مورد نیاز برای متابولیسم باکتری‌ها بدرون محیط می‌گردد (Schlegel, 1992) که بیوسورفاکتانت با امولسیونه کردن نفت مانع از این اثر می شود. شایان ذکر است که هیچ کدام از سویه های جداسازی شده در محیط های حاوی سوبسترای هیدروفیل ملاس و عصاره مخمر، تولید بیوسورفاکتانت ننموده اند. برای تولید رامنولیپید توسط *Pseudomonas* spp. منابع کربن محلول در آب مانند گلیسرول، گلوکز، مانیتول، و اتانول همگی استفاده می شوند. ولی با وجود این، محصول بیوسورفاکتانت در مقایسه با آنچه توسط سوبستراهای غیرمحلول در آب مانند n-آلکان‌ها و روغن زیتون به دست می آید، در درجه دوم اهمیت قرار می گیرند (Desai & Banat, 1997). *Corinebacterium lepus* در زمان رشد بر روی گلوکز، مقادیر زیادی از بیوسورفاکتانت متصل به سطح تولید می کند و افزودن هگزادکان موجب آزاد شدن سورفاکتانت از سلول ها می شود (Desai & Banat, 1997). این نتایج نشان دهنده این است که تولید و یا ترشح بیوسورفاکتانت توسط سوبسترای هیدروفوب القا می گردد.

تولید بیوسورفاکتانت های آنیونی و همچنین متابولیسم ترکیبات نفتی توسط باکتری ها که باعث ایجاد مواد حد واسط اسیدی می شود، سبب تغییرات pH محیط، بویژه در سطح آزمایشگاهی می گردد (Passeri et al., 1991, Long & Aelion, 1999) و از این لحاظ بررسی و کنترل pH محیط کشت حائز اهمیت بسیار است. شکل شماره (۵) تغییرات روزانه pH محیط کشت و منحنی رشد سویه های جداسازی شده را در طول دوره رشد نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود زمانی که pH محیط کشت کنترل نگردد (تنظیم

اولیه بـدون اسـتفاده از بـافر)، pH محـیط در حـدود ۳ واحـد کـاهش می یابد و این موضوع باعث غیر فعال شدن و سپس مردن باکتری ها می گردد و در نتیجه آنها نمی توانند وارد فاز لگاریتمی رشد شوند، ولی وقتی به محیط کشت، بافر tris/ HCL (30mM) اضـافه شـود، ایـن تغییرات کمتر از ۱ واحد pH است که سویه‌های مورد نظر این تغییرات را تحمل نموده و منحنی طبیعی رشد باکتری حاصل می‌شود. کـاهش ناگهانی pH محیط فاقد بافر به دلیل تولید بیوسورفاکتانت‌های آنیـونی است و در محیط حاوی بافر که رشد مناسب سلولی نیز مشاهده گردیده، ایجاد متابولیت‌های حدواسط اسیدی نیز به این مسئله کمک می کنـد (Schlegel, 1992). در ادامه، با پیشرفت منحنی رشد به فاز سُـکون، pH محیط نیز بتدریج شروع به افزایش مـی کنـد کـه احتمـالاً نشـان دهنده مصرف شدن این متابولیت هاست. بنابر آنچه در بالا ذکـر شـد، بررسی میزان رشد سویه های جداسازی شده، در محیط نفت با pH های متفاوت و یافتن شرایط pH بهینه آنها ضروری به نظر می رسد.

با بررسی انجام شده مشخص گردید که pH اپتیمم رشد و تجزیه نفت توسط دو سویه نامبرده حدود ۸ تا ۸/۴ مـی گردیـد شـکل هـای شماره (۲) و (۳) که با pH منطقه نمونه برداری (خلیج فارس) شباهت دارد. pH سـطح دریـا بـه طـور متوسـط ۸/۲ گـزارش شـده اسـت (Rahman et al., 2002) و دامنه تغییرات جزء pH بیست ایستگاه از سواحل قشم در خلیج فارس از تاریخ ۱۳۷۸/۷/۱۴ تا ۱۳۷۹/۵/۴، ۷/۹۵ تا ۸/۸۰ اندازه گیری شده است (اطلاعات منتشر نشده). بنـابراین ایـن طور به نظر می رسد، از آنجایی کـه pH محـیط دریـا در طـول سـال دارای تغییرات بسیار کمی است، باکتری های بومی دریایی نسبت بـه آن سازگار شده اند و قادر به تحمل تغییرات زیاد pH نمی باشند.

در اینجـا ایـن توضـیح لازم اسـت کـه در اسـتفاده صـنعتی از باکتری‌های نفت‌خوار نامبرده، به منظـور رفـع آلـودگی هـای نفتـی در محیط های طبیعی، با توجه به مقدار نفت به حجم آب و همچنین خاصیت بافری رسوبات، معمولاً تغییرات فاحش pH صورت نخواهد گرفت.

در پایان، شایان ذکـر اسـت بـه منظـور اسـتفاده از سـویه هـای جداسازی شده برای رفع آلودگی های نفتی، نیاز به بهینه سازی دیگـر شرایط محیطی مؤثر بر رشد باکتری ها، شـامل دمـا، مقـدار N و P و غیره است. همچنین مقایسه استفاده مخلوط باکتری ها بـا تـک تـک آنها، به منظور رفع آلودگیهای نفتی، نیز می تواند مفید باشد.

یادداشت ها

1. Biosurfactant
2. Viscous
3. Halophility – Test

منابع مورد استفاده

Atlas, R. M. 1977. Stimulated petroleum biodegradation. CRC Crit. Rev. Microbiol. 5(4): 371-86.

Atlas, R. M. and Bartha, R.1972. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. Can. J. Microbiol. 18(12): 1851-5.

Bosecker, K. et al., 1989. Biodegradation of crude oils. Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg. 80: 91-117.

Canby, T. 1991. The Persian Gulf After the Storm. National Geographic. 180, 2, pp. 2-32. National Geographic Society, Washington, DC.

Cunningham, J. A. et al., 2001. Enhanced in situ bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. Environ. Sci. Technol. 15, 35(8): 1663-70.

Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64.

Deschenes, L. et al., 1996. Adding sodium dodecyl sulfate and Pseudomonas aeruginosa UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. Appl Microbiol biotechnol. 46(5-6): 638-46.

Etkin, D. S. et al., 1998. In: Proceeding of the 21th arctic and marine oil spill program technical seminar. Environment, Canada, Edmonton, Alberta: 903-910.

Gibbs C. F. 1975. Quantitative studies on marine oil biodegradation of crude oil. Nutrient limitation at 14^0C. I. Proc. Roy. Soc. London. 188: 61-82.

Grasshoff, K. 1976. Methods of Seawater Analysis. Verlag chemie.

Rheinheimer, G. 1981. Mikrobiologie der gewaesser. 3 ueberarbeitete Auflage. Gustav fischer. Verlag. Shtuttgart, Germany.

Schlegel, H. G. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage. George Thieme Verlag. Stuttgart. New York.

Sueszmuth, R. et al., 1987. Biochemisch – mikrobiologisches praktikum. Georg Theime Verlag.

Van 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 Microbiol. 45(2): 130-7.

Van Hamme, J. D.and Ward, O. P. 2001.: Physical and metabolic interactions of Pseudomonas sp. strain JA5-B45 and Rhodococcus sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. Appl Environ. Microbiol. 67(10): 4874-9.

Van Stempvoort, D. R. 2002. Humic acid enhanced remediation of an emplaced diesel source in grounwater. 1. Laboratory-based pilot scale test. J. Contam. Hydrol. 54(3-4): 249-76.

Wolfe, D. A. 1994. The fate of oil spilled from Exxon Valdz. Environ. Sci. Tech., 28, 560-A-568A.

Harayama, S. et al., 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1(1): 63-70.

Hoepner, Th. 1987. Forschungsbericht Umwelttechnologie und Umwelttechnologie-Bekaempfung der Meeresverschmutzung.

Long, S. C. and Aelion, C. M. 1999. Metabolite formation and toxicity measurements in evaluating bioremediation of a jet-fuel-contaminated aquifer. Appl Biochem Biotechnol. 76(2):79-97.

Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl Microbiol Biotechnol. 56(5-6): 650-63.

Moran, A. C. et al., 2000. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from Bacillus subtilis 09. Biodegradation. 11(1): 65-71.

Passeri, A. et al., 1991. Marine biosurfactants, II. Production and characterization of an anionic trehalose tetraester from the marine bacterium arthrobacter sp. EK 1. Z Naturforsch [C]. 46(3-4): 204 - 9.

Rahman, K. S. 2002. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. Bioresour Technol. 81(1): 25-32.