فصلنامه پژوهش در علوم، مهندسی و فناوری
دوره ۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸
صفحات ۳۲-۴۲
ISSN: 2476-5082
www.uctjournals.com

جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده تولوئن در خاک های آلوده به نفت پالایشگاه تهران و بررسی سینتیک رشد آن

مرتضی خانی۱، ندا کاظمی۲

1باشگاه پژوهشگران جوان واحد مرودشت،دانشگاه آزاد اسلامی،مرودشت،ایران

۲دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران (فارس)، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

چکیده

تولوئن با فرمول شیمیایی C7H8 یا C6H5-CH3 و با اسامی مترادف فنیل متان و متیل بنزن، مایع شفاف و بی رنگ بوده و در گروه هیدروکربن های آروماتیک با سرگروهی بنزن قرار دارد. نمونه برداری از خاک های آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران صورت گرفت. جداسازی باکتری های تجزیه کننده ی تولوئن به وسیله ی کشت نمونه ها در محیط پایه ی نمکی نوترین براث و MSMآگار انجام شد. با کشت باکتری های ایزوله در غلظت های ۰/1، 2/، ۰/3، و0/4 گرم برلیتر تولوئن توانایی رشد باکتری ها ارزیابی گردید. مهمترین باکتری های تجزیه کننده ی فرمالدئید جدا شده از خاک های آلوده به نفت پالایشگاه تهران باسیلوس لیکنی فورمیس ، سودوموناس استودزری، سودوموناس sp، باسیلوس sp، آکروباکتریوم کا تی بودند.همه ی باکتری های جدا شده قدرت تجزیه ی بالایی در حذف فرمالدئید از خود نشان دادند. یکی از بهترین و کم هزینه ترین روشهای تجزیه آلاینده های محیطی می باشد.چنین استنباط می شود که باکتری های تجزیه شده توانایی تحمل و رشد در حضور تولوئن را دارا هستند و میزان تجزیه باکتری های منفی نسبت به مثبت بیشتر است و در حداقل غلظت مهارکنندگی سودوموناس رتبه اول و باسیلوس رتبه دوم را به خود اختصاص دادند و حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری ها به ترتیب ۴,۶ مول بر لیتر و ۴,۲ مول بر لیتر است.در کل میتوان گفت که تنوع باکتری ها ی جداسازی شده از خاک اطراف پالایشگاه تهران و همچنین کارایی تجزیه کنندگان از نظر زیستی بالا می باشد.

واژه‌های کلیدی: تولوئن، تجزیه‌ی زیستی، سودوموناس، فلاووباکتریوم، پالایشگاه تهران،

۱. مقدمه

گستره جغرافیایی کشورمان ایران از نظر احتمال وقوع حوادث بویژه زلزله، از آسیب پذیرترین بخش های کره زمین است که هرساله شاهد خسارت های جانی و مالی فراوان ناشی از وقوع این حوادث در آن هستیم. یکی از مهمترین موضوعات در زمینه تولوئن با فرمول شیمیایی C7H8 یا C6H5-CH3 و با اسامی مترادف فنیل متان و متیل بنزن، مایع شفاف و بی رنگ بوده و در گروه هیدروکربن های آروماتیک با سرگروهی بنزن قرار دارد.با جایگزین نمودن یک گروه متیل به یکی از هیدروژن‌های بنزن میتوان تولوئن را تولید نمود. تولوئن به عنوان یک ماده شیمیایی حدواسط و حلال، در صنعت از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است (Anita and Wilfried , 2006). و در صنایع نظامی برای ساخت تی ان تی یا تری نیترو تولوئن و در صنایع شیمیایی به عنوان حلال در ساخت رنگ، براق کننده های رنگ، لاک ناخن، لاک الکل، چسب پلاستیک، لاستیک، مواد چاپ کننده و چرم مصنوعی استفاده می شود(Hajimiragha 1989). نکته جالب اینکه تولوئن به عنوان داروی استنشاقی برای دفع سموم نیز می باشد.

تاکنون راههای متفاوتی مانند روش های شیمیایی، مکانیکی (فیزیکی)و بیولوژیکی(پاکسازی زیستی) به منظور پاکسازی ترکیبات PAH و سایر آلاینده ها از محیط به کار گرفته شده است. دو روش اول علاوه بر هزینه بر بودن، آلاینده را بطور کامل تخریب نمی کنند و موجب انتقال آلودگی از محیطی به محیط دیگر می گردند(Haritash and Kaushik ,2009). زیست پالایی فرآیندی است که کمترین مقدار انرژی، ماده شیمیایی و زمان را لازم دارد و موجب تغییر شکل آلاینده از فرم خطرناک به فرم کم خطر یا بی خطر می گردد(Niel , 1995).

روشهای زیستی دارای مزایایی نسبت به روشهای فیزیکی و شیمیایی در حذف نشت نفت هستند بطوریکه آنها تجزیه زیستی درونی بخش های نفت به وسیله میکروارگانیسم‌ها را میسر می‌سازند(Luis *et al.*, 2000 and Vinas *et al.*, 2002).روش پاکسازی زیستی نسبت به سایر روش های پاک سازی مواد زائد خطرناک، ارزان تر و ایمن تر هستند و به جای انتقال آلاینده ها از محیطی به محیط دیگر، تخریب کامل آلاینده امکانپذیر می باشد(Arun *et al.*, 2011).Evansوهمکارانش در سال ۱۹۹۱ در مطالعه‌ای که بر روی تجزیه بیهوازی تولوئن توسط باکتری‌های دنیتریفیکاسیون انجام دادند، باکتری دنیتریفیکه کننده سوش T1را با روشهای مولکولی شناسایی کردند که قادر بود از تولوئن به عنوان تنها منبع کربن استفاده کرده و بیش از ۵۰ درصد کربن تولوئن را به CO_2 تبدیل کند(Evans, 1991et al).در زمینه پاکسازی زیستی, شیلدز وهمکاران (۱۹۹۱) لی و همکاران (۱۹۹۵) , لی و گیبسون (۱۹۹۶)، طی پژوهشهای خود تاثیر مثبت حضور باکتری سودوموناس را در زدودن آلاینده های آلی گزارش کرده اند. Munroو Lindsay با مطالعه ای که بر روی باکتری۷۴ Bacterium EX-DG در سال ۱۹۹۶ انجام دادند نشان دادند که توانایی بالای این سویه در پاکسازی زیستی آلاینده های مختلف علاوه بر وجود آنزیمهای پراکسیدازی به علت فعالیت سیتوکروم P450 است. این پروتئین با فعالیت اکسیژنازی خود از عوامل مهم در تجزیه حلالهایی مانند تولوئن و سورفکتانتهایی نظیر اسید اولئیک و غیره محسوب می-شود(Munro and Lindsay 1996).

روش انجام آزمایش:

معرفی مکان نمونه برداری

پالایشگاه تهران

شرکت پالایش نفت شهید تندگویان تهران در ۱۵ کیلومتری جنوب تهران (کیلومتر ۷ شهر ری در نزدیکی نیروگاه گازی ری)واقع گردیده و یکی از قدیمی‌ترین پالایشگاههای فعّال ایران است که در سال ۱۳۴۴ با ظرفیّت ۸۵ هزار بشکه در روز راه اندازی شد.این پالایشگاه مشتمل بر دو پالایشگاه جنوبی (شماره ۱) و شمالی(شماره ۲) است.(شکل۱)

شکل ۱- موقعیت جغرافیایی پالایشگاه تهران(https://earth.google.com)

روش غنی سازی باکتری های مقاوم به تولوئن:

برای غنی سازی باکتری های مقاوم به تولوئن به منظور افزایش جمعیت میکروبی سازگار با این منبع هیدروکربنی ۱۰ گرم از خاک هر ایستگاه که حاوی انواع باکتری های سازگار با محیط نفتی بود با ۹۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی مایع MSMمخلوط شد سپس این محیط پایه نمکی که محتوی خاک و ترکیب تولوئن بود به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با هوا دهی در گرم خانه شیکردار قرار داده شد.

روش جداسازی و خالص سازی باکتری های مقاوم به تولوئن

پس از گرمخانه گذاری 1میلی لیتر از محیط های مایع نمک معدنی به محیط های جامد نمک معدنی حاوی تولوئن منتقل و با گلس اسپیدر سواب کشت داده شد. پلیت های حاوی محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد.

کلونی هایی که از نظر ریخت شناسی با هم متفاوت بودند به منظور خالص سازی روی بلاد آگار کشت داده شدند. کشت روی بلادآگار تا زمان خالص سازی کامل همه سویه ها تکرار گردید(Abd – elsalam *et al*., 2009).

غربالگری سویه های برتر

افزایش مرحله به مرحله غلظت تولوئن به منظور سازگاری سویه های تحمل کننده در غلظت های بالاتر و جداسازی سویه های برتر با تلقیح جدایه ها به محیط کشت پایه معدنی همراه با سوبسترای مورد نظر (تولوئن) در محدوده غلظت های Mol/L ۰/۰۹، ۱/۸۶، ۲/۳، ۲/۸۰، ۳/۲۶، ۳/۷۳، ۴/۲، ۴/۶۷ صورت گرفت. پس انجام غربالگری، سویه هایی که بیشترین میزان تحمل نسبت به تولوئن را از خود نشان دادند انتخاب گردیدند

تست حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی تولوئن توسط باکتریهای بدست آمده ابتدا به تعداد هر باکتری ۸ لوله حاوی LB-Broth و غلظت های مختلف تولوئن Mol/L ۲/۳، ۲/۸۰، ۳/۲۶، ۳/۷۳، ۴/۲، ۶/۰، ۵/۶۰، ۵/۱۳، ۴/۶۷ تهیه شد. سپس از هر یک از باکتری ها و همچنین مخلوطی از آنها سوسپانسیون باکتریایی مطابق با استاندارد نیم مک فارلند تهیه گردید.

۱ میلیتر از سوسپانسیون میکروبی به ۱ میلی لیتر از هر کدام از لوله ها ی حاوی تولوئن و LB- Broth تلقیح شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۲۸ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. این کار برای تمامی باکتری های بدست آمده در مرحله قبل انجام گردید. در ضمن یک لوله به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که فقط LB- Broth و باکتری مورد نظر درآن ریخته شد. در نهایت کدورت هر یک از لوله ها بررسی و حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید. کمترین غلظتی)اولین لوله (که در آن رشد دیده نشد به عنوان MIC گزارش شد.

مطالعه سینتیک رشد باکتری های تجزیه کننده تولوئن

به منظور ارزیابی رشد باکتری های جدا شده، به تعداد باکتریها و همچنین مخلوطی از آنها محیط کشت پایه نمکی به میزان ۹۰ میلی لیتر در ارلن تهیه گردید و غلظت های مختلف از تولوئن(Mol/L، ۲,۸، ۳,۲، ۳,۷، ۴,۲) به آن اضافه گردید. سپس سوسپانسیون باکتری برطبق استاندارد نیم مک فارلند تهیه شده و از آن به نسبت ۱ به ۱۰ به هر کدام از ارلن ها اضافه گردید. برای هر کدام از باکتری ها ۴ ارلن در نظر گرفته شده و در هر ارلن تولوئن اضافه گردید. همچنین برای هر باکتری یک ارلن به عنوان شاهد در نظر گرفته شد در محیط شاهد فقط محیط کشت پایه بدون ترکیب نفتی تولوئن با سویه مشخص وجود داشت و یک ارلن هم شامل میکس باکتریها و تولوئن بود.محیط ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد و در نهایت اندازه گیری جذب در ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدلMilton Roy) به صورت روزانه قرائت و یادداشت گردید این کار تا هفت روز پس از تلقیح انجام شد.

روش انجام آنالیز آماری

آنالیز آماری نتایج به دست آمده از میزان رشد جدایه های برتر در غلظت های مختلف با استفاده از نرمافزار spssانجام شد.

نتایج آزمایش:

جداسازی و خالص سازی

در مرحله جداسازی جدایه های متفاوت بر اساس خصوصیات ریخت شناسی، رنگ و شکل ونوع کلنی ها روی محیط جامد نمک معدنی و بلاد آگار و با استفاده از میکروسکوپ(مدل OLYMPUS)، جداسازی و خالص سازی شدند. در این مرحله 23باکتری به عنوان باکتری های بومی مقاوم به تولوئن جداسازی شدند.

غربالگری و انتخاب جدایه های برتر

در پایان این مرحله، سویه های برتر که شامل 5سویه مقاوم به تولوئن بودند انتخاب گردیدند. این سویه ها بیشترین میزان تحمل را نسبت به تولوئن از خود نشان دادند. جدایه های برتر تا غلظت 45درصد تولوئن تحمل را نشان دادند و برای انجام مراحل بعدی انتخاب گردیدند.

MIC سویه های مقاوم به تولوئن

در این مرحله میزان تحمل جدایه های برتر نسبت به غلظت های متفاوت تولوئن با انجام آزمایش MIC برای اندازه گیری مقدار حداقل غلظت بازدارندگی بررسی شد.

بر طبق نتایج حاصل(جدول ۱) سویه های باسیلوس لیکنی فورمیس و آکروباکتریوم بیشترین میزان MIC ۴/۶ مول بر لیتر) و سویه سودوموناس۱(۳/۲) نیز کمترین میزان MIC را نشان دادند.

جدول ۱- نتایج MIC سویه های مقاوم

سویه ها	غلظت MIC(mol/l)
باسیلوس لیکنی فورمیس	۴/۶
سودوموناس استودزری	۴/۲
سودوموناس sp	۴/۲
باسیلوس sp	۴/۲
آکروباکتریوم کا تی ۵۱	۴/۶

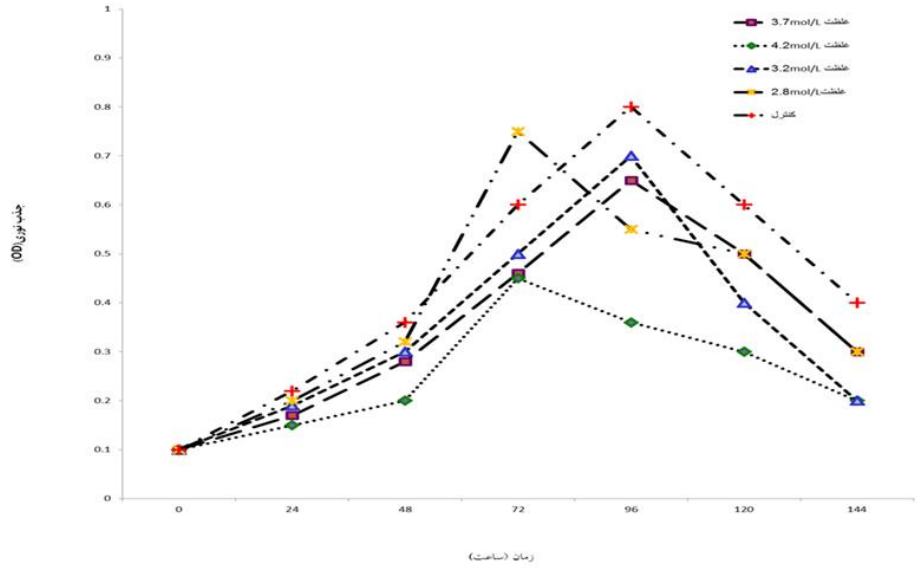
کینتیک رشد

نتایج به دست آمده از میزان رشد جدایه‌های برتر و مخلوط باکتریایی در دمای ۳۰ درجه و غلظت های ۲,۸ مول بر لیتر، ۳,۲ مول بر لیتر، ۳/۷ مول بر لیتر،۴,۲ مول بر لیتر تولوئن نمودارهای (۴-۱) تا (۴-۶) بیان شده است.

۴-۴-۱ منحنی رشد باکتری باسیلوس sp

با توجه به نمودار (۴-۱) رشد باکتری باسیلوس sp در محیط کشت پایه معدنی حاوی غلظت های مختلفی از تولوئن نشـان داد باکتری مذکور تا ۴۸ ساعت اول پس از تلقیح رشد کمی داشته ولی پس از آن وارد فاز لگاریتمی شده و درنتیجه جـذب نـوری بتدریج افزایش یافت و منحنی رشد روندی صعودی به خود گرفت. فاز لگاریتمی در غلظت های ۲,۸ مول بر لیتـر و ۴,۲ مـول بر لیتر تولوئن تا ۷۲ ساعت از شروع اینکوباسیون و برای غلظت های ۳,۲ مول بر لیتر و ۳,۷ مول بر لیتر تولوئن تا ۹۶ ساعت از شروع اینکوباسیون ادامه و به نقطه پیک خود رسید ولی از آن ساعت به بعد سرعت رشد آن کاهش یافتـه و از اینـرو جـذب نوری نیز کاهش یافت و منجر به این شد که منحنی رشد سیر نزولی به خود بگیرد.

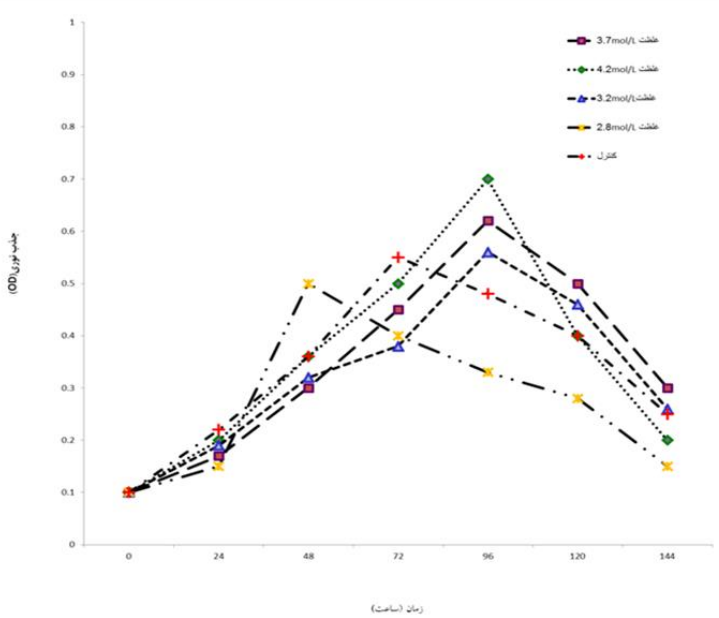
ر شد باکتری باسیلوس sp در مقایسه با نمونه شاهد بیشترین رشد را در غلظت ۳,۷ مول بر لیتر و کمترین رشـد را در غلظـت ۴,۲ مول بر لیتر تولوئن نشان داد .منحنی این باکتری نشان می دهد با افزایش غلظت تولوئن در محـیط میـزان رشـد بـاکتری کاهش می یابد و این میتواند نشانگر اثر معکوس کنندگی غلظت تولوئن برای این باکتری باشد.



نمودار ۱- منحنی کینتیک رشد باسیلوس sp در غلظت های مختلف تولوئن

منحنی رشد باکتری اکروموباکتر

با توجه به نمودار ۲ رشد باکتری اکروموباکتر در محیط کشت پایه معـدنی حـاوی غلظـت هـای مختلفـی از تولـوئن نشـان داد باکتری مذکور تا ۲۴ ساعت اول پس از تلقیح رشد کمی داشته ولی پس از آن وارد فاز لگاریتمی شده و درنتیجه جـذب نـوری بتدریج افزایش یافت و منحنی رشد روندی صعودی به خود گرفت. فاز لگاریتمی در غلظت های ۲,۸ مول بر لیتـر و ۴,۲ مـول بر لیتر تولوئن تا ۴۸ ساعت از شروع اینکوباسیون و برای غلظت های ۳,۲ مول بر لیتر و ۳,۷ مول بر لیتر تولوئن و ۴,۲ مـول بر لیتر تولوئن تا ۹۶ ساعت از شروع اینکوباسیون ادامه داشته و به نقطه پیک خود رسید ولی از آن ساعت به بعد سرعت رشـد آن کاهش یافته و از اینرو جذب نوری نیز کاهش یافت و منجر به این شد که منحنی رشد سیر نزولی به خـود بگیـرد. منحنـی رشد این باکتری نشان میدهد که با افزایش غلظت تولوئن میزان رشد باکتری افزایش مـی یابـد و ایـن بیـانگر مصـرف تولـوئن بعنوان منبع کربن توسط باکتری می باشد.

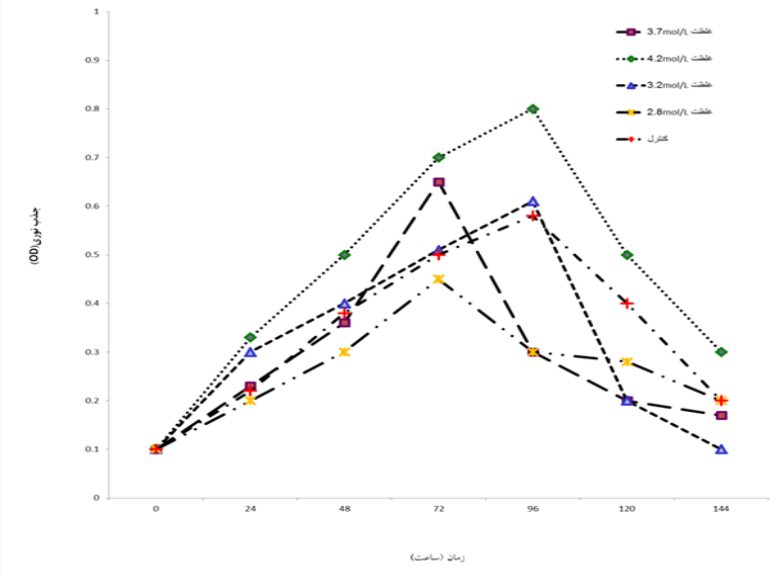


نمودار ۲- منحنی کینتیک رشد اکروموباکتردر غلظت های مختلف تولوئن

رشد باکتری اکروموباکتر در مقایسه با نمونه شاهد بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول بر لیتر و کمترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول بر لیتر تولوئن نشان داد.

منحنی رشد باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس

با توجه به نمودار (۳) رشد باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس در محیط کشت پایه معدنی حاوی غلظت های مختلفی از تولوئن نشان داد زمان فاز تاخیری باکتری مذکور بسیار کوتاه بوده و این باکتری در مدت زمان کمی پس از تلقیح وارد فاز لگاریتمی شده و درنتیجه جذب نوری بتدریج افزایش یافت و منحنی رشد روندی صعودی به خود گرفت. فاز لگاریتمی در غلظت های ۲,۸ مول بر لیتر و ۳,۷ مول بر لیتر تولوئن تا ۷۲ ساعت از شروع اینکوباسیون و برای غلظت های ۳,۲ مول بر لیتر و ۴,۲ مول بر لیتر تولوئن تا ۹۶ ساعت از شروع اینکوباسیون ادامه داشته و به نقطه پیک خود رسید ولی از آن ساعت به بعد سرعت رشد آن کاهش یافته و از اینرو جذب نوری نیز کاهش یافت و منجر به این شد که منحنی رشد سیر نزولی به خود بگیرد.



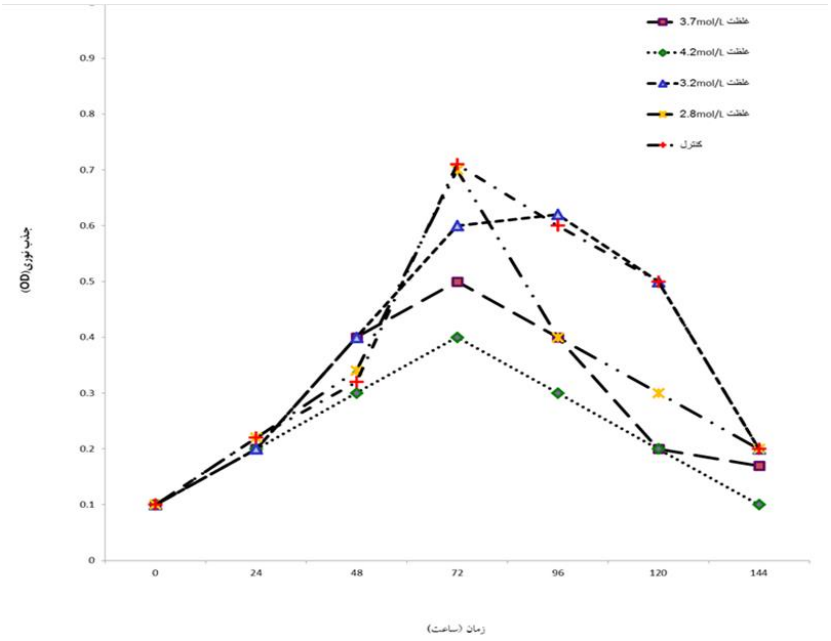
نمودار۳- منحنی کینتیک رشد باسیلوس لیکنی فورمیس در غلظت های مختلف تولوئن

رشد باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس در مقایسه با نمونه شاهد بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول بر لیتر و کمترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول بر لیتر تولوئن نشان داد.منحنی رشد این باکتری نشان میدهد که با افزایش غلظت تولوئن میزان رشد باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس افزایش می یابد و این بیانگر مصرف تولوئن بعنوان منبع کربن توسط باکتری می باشد.

منحنی رشد باکتری سودوموناس استودزری

با توجه به نمودار (۴) رشد باکتری سودوموناس استودزری در محیط کشت پایه معدنی حاوی غلظت های مختلفی از تولوئن نشان داد باکتری مذکور تا ۴۸ ساعت اول پس از تلقیح رشد کمی داشته ولی پس از آن وارد فاز لگاریتمی شده و درنتیجه جذب نوری بتدریج افزایش یافت و منحنی رشد روندی صعودی به خود گرفت. فاز لگاریتمی در تمامی غلظت های تولوئن تا ۷۲ ساعت از شروع اینکوباسیون ادامه داشته و به نقطه پیک خود رسید ولی از آن ساعت به بعد سرعت رشد آن کاهش یافته و از اینرو جذب نوری نیز کاهش یافت و منجر به این شد که منحنی رشد سیر نزولی به خود بگیرد

رشد باکتری سودوموناس استودزری در مقایسه با نمونه شاهد بیشترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول بر لیتر و کمترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول بر لیتر تولوئن نشان داد.با بررسی منحنی رشد این باکتری مشاهده میشود که با افزایش غلظت تولوئن در محیط رشد باکتری نیز کم میشود و این میتواند نشاندهنده سمی بودن تولوئن و اثر معکوس کنندگی غلظت تولوئن برای باکتری را نشان دهد.

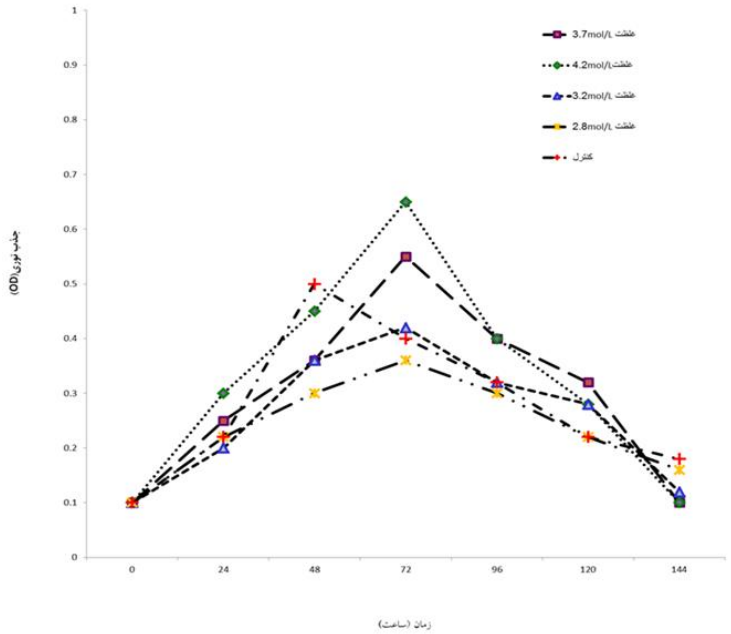


نمودار ۴- منحنی کینتیک رشد سودوموناس استودزری در غلظت های مختلف تولوئن

منحنی رشد باکتری سودوموناس sp

با توجه به نمودار (۵) رشد باکتری سودوموناس sp در محیط کشت پایه معدنی حاوی غلظت های مختلفی از تولوئن نشان داد زمان فاز تاخیری باکتری مذکور بسیار کوتاه بوده و این باکتری در مدت زمان کمی پس از تلقیح وارد فاز لگاریتمی شده و درنتیجه جذب نوری بتدریج افزایش یافت و منحنی رشد روندی صعودی به خود گرفت. فاز لگاریتمی در تمامی غلظت های تولوئن تا ۷۲ ساعت، از شروع اینکوباسیون ادامه داشته و به نقطه پیک خود رسید ولی از آن ساعت به بعد سرعت رشد آن کاهش یافته و از اینرو جذب نوری نیز کاهش یافت و منجر به این شد که منحنی رشد سیر نزولی به خود بگیرد

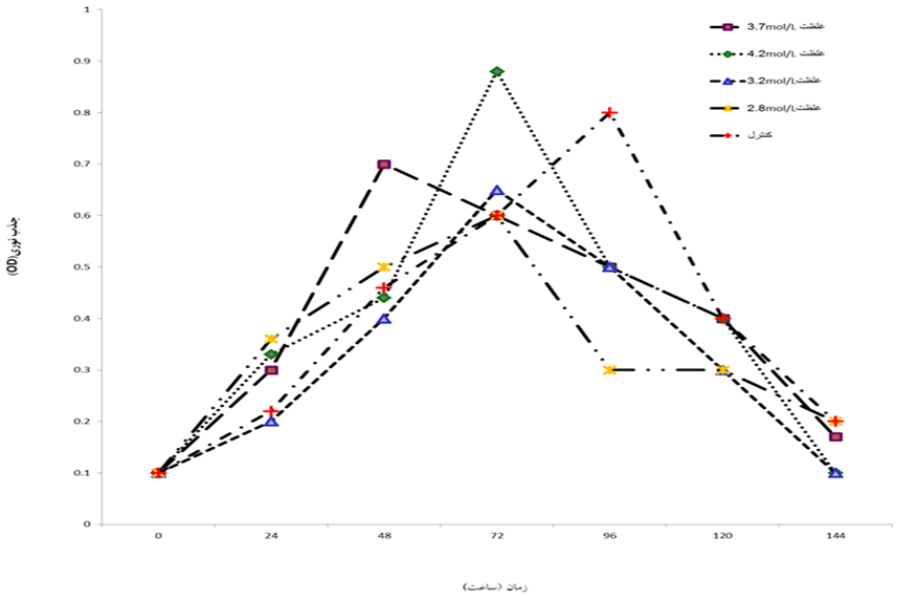
رشد سودوموناس sp در مقایسه با نمونه شاهد بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲مول بر لیتر و کمترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول بر لیتر تولوئن نشان داد.افزایش غلظت تولوئن افزایش رشد را در این باکتری نشان میدهد.



نمودار ۵- منحنی کینتیک رشد سودوموناس sp در غلظت های مختلف تولوئن

منحنی رشد مخلوط باکتری ها

با توجه به نمودار (۴-۶) رشد مخلوط باکتری ها در محیط کشت پایه معدنی حاوی غلظت های مختلفی از تولوئن نشان داد زمان فاز تاخیری باکتری مذکور بسیار کوتاه بوده و این باکتری در مدت زمان کمی پس از تلقیح وارد فاز لگاریتمی شده ه و درنتیجه جذب نوری بتدریج افزایش یافت و منحنی رشد روندی صعودی به خود گرفت. فاز لگاریتمی در غلظت های ۳,۷ مول بر لیتر تولوئن تا ۴۸ ساعت،در غلظت ۳,۲,۳,۷ ۴,۲ مول بر لیتر لوئن تا ۷۲ ساعت از شروع اینکوباسیون ادامه داشته و به نقطه پیک خود رسید ولی از آن ساعت به بعد سرعت رشد آن کاهش یافته و از اینرو جذب نوری نیز کاهش یافت و منجر به این شد که منحنی رشد سیر نزولی به خود بگیرد



نمودار ۶- منحنی کینتیک رشد مخلوط باکتری ها در غلظت های مختلف تولوئن

رشد مخلوط باکتری ها در مقایسه با نمونه شاهد بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲مول بر لیتر و کمترین رشد را در غلظت ۳,۲ مول بر لیتر تولوئن نشان داد. منحنی رشد مخلوط باکتری ها نشان میدهد که با افزایش غلظت تولوئن میزان رشد افزایش می یابد و این بیانگر مصرف تولوئن بعنوان منبع کربن توسط مخلوط باکتری ها می باشد.

مقایسه منحنی رشد باکتری های جدا شده تجزیه کننده تولوئن

پس از بررسی منحنی رشد ۵ باکتری جدا شده از محیط کشت پایه معدنی حاوی غلظت های تولوئن و همچنین مخلوط باکتری ها مشاهده گردید که همگی سویه ها دارای قدرت تجزیه کنندگی بالا می باشند و به عنوان سویه های غالب در تجزیه تولوئن انتخاب شدند.نتایج بررسی سینیتیک رشد باکتری های انتخاب شده نشان داد که طبق نمودار (۴-۴) سودوموناس استودزری بیشترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر دارد. طبق نمودار (۴-۵) سودوموناس sp بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول برلیتر دارد. طبق نمودار (۴-۳) باسیلوس باسیلوس لیکنی فورمیس بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول برلیتر دارد. طبق نمودار (۴-۱) باسیلوس sp بیشترین رشد را در غلظت۳,۷ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر دارد. طبق نمودار (۴-۲) آکروموباکتر بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول برلیتر دارد. طبق نمودار (۴-۶) مخلوط باکتری ها بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۳,۲ مول برلیتر دارد.

بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین میزان رشد مربوط به سویه های باسیلوس لیکنی فورمیس ، آکروموباکتر و مخلوط باکتریایی و کمترین میزان رشد مربوط به سویه سودوموناس استودزری گزارش شد. مخلوط باکتریایی به دلیل دارا بودن چندین سویه باکتریایی بیشترین میزان رشد را نشان داد.

با افزایش غلظت تولوئن رشد سویه های سودوموناس sp, اکروموباکتریوم , باسیلوس لیکنی فورمیس ومخلوط باکتری ها افزایش و رشد باسیلوس sp و سودوموناس استودزری کاهش می یابد .

به طور کلی کمترین میزان رشد در غلظت۳,۲ مول بر لیترتولوئن، به وسیله باسیلوس لیکنی فورمیس و مخلوط باکتری ها، در غلظت ۴,۲ مول بر لیترتولوئن به وسیله سودوموناس استودزری مشاهده گردید.

و بیشترین میزان رشد در غلظت۴,۲ مول بر لیترتولوئن، به وسیله مخلوط باکتری ها و باسیلوس لیکنی فورمیس و در غلظت ۲,۸ مول بر لیتر تولوئن به وسیله باسیلوس sp مشاهده گردید.

همچنین از مقایسه نمودارها مشاهده می شود که باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس و مخلوط باکتری ها زمان فاز تاخیری آنها بسیار کوتاه بوده ، بعلاوه باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس ظرف۹۶ ساعت به پیک خود رسیده و در این مدت در فاز رشد لگاریتمی قرار داشته است.این نکته بیان کننده آن است که باکتری های مذکور سازگاری و رشد خوبی در محیط حاوی هیدروکربن های نفتی دارند و توانایی و نرخ رشد باکتری های منتخب در گزارش حاضر ، در محیط کشت پایه معدنی حاوی تولوئن زیاد می باشد.

بیشترین میزان رشد به وسیله مخلوط باکتری ها وباسیلوس لیکنی فورمیس و اکروموباکتر دیده شد.

نتیجه گیری و بحث:

آلودگی ناشی از فعالیت های نفتی در یک کشور تولید کننده نفت اجتناب ناپذیر است. آلودگی های نفتی، سمی، جهش زا و سرطان زا هستند و علاوه بر تأثیر گسترده بر اکوسیستم منطقه، با گذشت زمان و ورود به چرخه غذایی، به جوامع انسانی نیز راه می یابند و به این ترتیب سلامت انسان، گیاهان، جانوران، رودخانه ها، آبهای زیرزمینی و تولیدات کشاورزی را تهدید می کنند(Anigboro and Tonukari , 2008).آلودگی خاک به هیدروکربن های نفتی مختص نقطه یا نقاط آلوده نبوده و هیدروکربن های نفتی می توانند در خاک حرکت کرده و خود را به منابع آب زیرزمینی برسانند که این مشکلات در سالهای اخیر بوضوح در کشور قابل مشاهده است(نظیر مناطق اطراف پالایشگاه تهران)(رنگ زن و لندی ۱۳۸۵). تجمع این ترکیبات شیمیایی در محیط زیست، تهدیدی جدی برای سلامت انسان، موجودات و اکوسیستم های زنده است(میرسال، ۲۰۰۴).

پاکسازی آلودگی نفتی خاک به روشهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی انجام می پذیرد . روشهای متعددی برای کاهش آثار زیست محیطی آلودگی نفتی توسعه یافته است،ولی مطالعه بر روی روشهای ساده، سریع و ارزانقیمت در این زمینه ضروری است. یکی از بهترین روشهای احیا ی خاکهای آلوده استفاده

از توانایی میکروارگانیسم ها در تجزیه ترکیبات سمی، طی فرایند، پاکسازی بیولوژیکی است . از طریق فرایند طبیعی تجزیه زیستی ,میکروارگانیسم های طبیعی موجود در محیط در همان شرایط طبیعی حذف آلودگی ها را تا سطح قابل قبولی انجام می دهند به طور کلی این اولین انتخاب برای حذف آلودگی به روش زیستی است به این دلیل که هیچ مداخله ای در آن صورت نمی گیرد و فقط روند طبیعی کار دنبال می شود(Vidali et al., 2001).

در این پژوهش با نمونه گیری از خاکهای آلوده به مواد نفتی در پالایشگاه نفت تهران و استفاده از تکنیکهای غنی سازی و خالص سازی، بهترین و توانمندترین باکتری های تجزیه کننده تولوئن، با بررسی رشد جدایه ها بر روی محیط کشت های مایع و جامد نمک معدنی حاوی غلظت های مختلف تولوئن طی مرحله غربالگری انجام شد.در این راستا ۵ سویه به عنوان سویه های برتر مقاوم به تولوئن جداسازی و شناسایی شدند.Pseudomonas sp . طبق نمودار (۴-۵) بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول برلیتر تولوئن وPeseudomonas Stutzeri ، طبق نمودار (۴-۴) بیشترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر از خود نشان دادند.

اخوان (Akhavan) وهمکاران در سال ۲۰۱۰ دو سویه تولید کننده بیوسورفکتانت به نام های باسیلوس لیکنی فورمیس (Bacillus licheniformisBCRC و) باسیلوس سوبتیلیس (Bacillus subtilis HAZ2) را از مناطق آلوده به نفت در مسجد سلیمان و پالایشگاه نفت تهران جداسازی کردند.

در پژوهش حاضر نیز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس به عنوان باکتری توانا در تجزیه تولوئن شناسایی شد که طبق نمودار (۴-۳) بیشترین رشد را در غلظت ۴,۲ مول برلیتر و کمترین رشد را در غلظت ۲,۸ مول برلیتر تولوئن از خود نشان داد.منحنی رشد این باکتری نشان از توانایی رشد باکتری با افزایش میزان غلظت تولوئن بود .

در تحقیق حاضرباکتری های جداسازی شده از خاک اطراف پالایشگاه تنوع زیادی را نشان دادند بطوریکه هر دو گروه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده شدند که توانایی استفاده از این ماده سمی را دارا بودندو هر دو سویه سودوموناس و باسیلوس لیکنی فورمیس به عنوان باکتری های توانا در تجزیه تولوئن شناسایی شدند.

در این تحقیق منحنی رشد باکتری های قویتر مورد بررسی قرار گرفت که الگوی رشد باکتری ها شامل ۴ مرحله رشد تاخیری، لگاریتمی، ایستا ودر نهایت مرگ می باشد.. در این پژوهش باکتری های تجزیه کننده تولوئن از نظر قدرت تجزیه زیستی با هم مقایسه شدند که باکتری لیکنی فورمیس و مخلوط باکتری ها و اکروموباکتر بالاترین قدرت تجزیه را به خود اختصاص دادند

در این زمینه تحقیقی صورت گرفته است که نشان می دهد پیمودن مسیر بیوشیمیایی تجزیه توسط یک باکتری به دشواری انجام می شود و گاه غیر ممکن است اما با حضور مخلوط چند باکتری، ترکیبات واسطه ای که در مسیر تجزیه تولید میشوند،توسط باکتری های دیگر تجزیه می شوند(Leblond JD).

بطور کلی ، نتایج آزمایشات تجزیه زیستی در این تحقیق نیز گویای آن است که در بین جوامع میکروبی منطقه ی پالایشگاه تهران، باکتری هایی وجود دارند که قادر به تجزیه و مصرف تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی می باشند.پس اینطور میتوان نتیجه گرفت که تجزیه میکروبی یکی از مسیرهای حذف آلاینده های هیدروکربنی نظیر تولوئن در پالایشگاه تهران می باشد.در نتیجه باکتری های بومی تجزیه کننده ترکیبات آروماتیک حلقوی در پالایشگاه تهران نقش مهمی در خود پالایی این منطقه دارند. هیدروکربن های نفتی با ایجاد پیوند با ترکیبات مختلف در اختیار باکتری های موجود در خاک قرار می گیرند.

با توجه به جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن از خاک این پالایشگاه کاملا محرز است که مقداری از فرآیند پالایش به عهده باکتری های بومی منطقه می باشد و این میکروارگانیسمها از تجزیه کنندگان فعال این ترکیبات می باشند.در این تحقیق تأثیر باکتری های جدا شده از خاک پالایشگاه تهران در تجزیه تولوئن نشان داد که میتوان دیدگاهی مثبت در جهت استفاده از میکروارگانیسم ها در حذف موثر این هیدروکربن های نفتی در مناطق آلوده نفتی به عنوان یک روش با توانایی متفاوت در

تکنیک های تجاری پدید آورد.باکتری هایی که به طور انتخابی از مناطق نفت خیز ایزوله می شوند عمدتا برای درمـان زیسـتی مناطق آلوده به نفت در آینده به کار گرفته خواهند شد(Lazer,1999) .همچنین استفاده از باکتری های بـومی کـه بعلـت در معرض قرارگیری با هیدروکربن های نفتی توانایی تجزیه و استفاده از آنها را به دسـت آورده انـد بـه عنـوان روشـی همگـام بـا طبیعت بیشتر از سایر روشهایی مانند استفاده از میکروارگانیسم های بیگانه وکود شـیمیایی ، بـه هـدف توسـعه پایـدار کمـک میکند.

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه کشور ما یک کشور نفت خیز و دارای پالایشگاه های در حال توسعه اسـت بـا توجـه بـه نتـایج حاصـل از ایـن مطالعه و سایر مطالعات تجربی میتوان نتیجه گیری کردکه فن آوری درمان زیستی به دلیل ساده بودن و عدم نیاز بـه سـرمایه گذاری بالا و همچنین وجود میکروارگانیسم های بومی سازگار با محیط های نفتی یکی از بهترین و کم هزینه تـرین روشـهای تجزیه آلاینده های محیطی می باشد.چنین استنباط می شود که باکتری های تجزیه شـده توانـایی تحمـل و رشـد در حضـور تولوئن را دارا هستند و میزان تجزیه باکتری هـای منفـی نسـبت بـه مثبـت بیشـتر اسـت و در حـداقل غلظـت مهارکننـدگی سودوموناس رتبه اول و باسیلوس رتبه دوم را به خود اختصاص دادند و حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری هـا بـه ترتیـب ۴,۶ مول بر لیتر و ۴,۲ مول بر لیتر است.در کل میتوان گفت که تنوع باکتری ها ی جداسازی شده از خاک اطراف پالایشگاه تهـران و همچنین کارایی تجزیه کنندگان از نظر زیستی بالا می باشد.

منابع:

Zhaohui Xu,Ashok Mulchandani, and Wilfred Chen.2003.Detection of Benzene, Toluene,Ethyl benzene,and Xylenes (BTEX) Using Toluene Dioxgenase - Peroxidse Coupling Environmental Microbiology, p 1911_1918

Sudarat Boonchan, Margaret L, and Stanly G. A., 2000. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Co cultures Applied and Environmental Microbiology., p. 1007–1019

Marcelo Henrique Otenio, Maria Teresa Lopes da silva, 2005. Benzene, Toluene and Xylene Biodegradation by Pseudomonas PutidaCCMI 852. Brazilian Journal of Microbiology 36:258-261.

Kyung-Suna, Akio Kuroda, 2004. Isolation and Characterization of Benzene tolerant RhodococusopacusStrains. Journal of Bioscience and Bioengineering. 4.278_382

Vidali M, 2001. Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem 73(7): 1163–1172.

Lee JY, Jung KH, Kim HS, 1995. Amplification of Toluene dioxygenase gene in a Hybrid Pseudomonas Strain to enhance the Biodegradation of benzene, Toluene , and p-Xylene mixture. Biotechnology and Bioengineering 45: 488-494.

Jeroh, E., N.J. Tonukari and A. Anigboro, 2011. Glucose level and amylase activity in crude oil contaminated soil bioremediated with poultry manure and sawdust. Asian J. Biol. Sci., 4: 369-374