بررسی کارایی میکروارگانیسم های خالص سازی شده از خاکهای حاوی گازوئیل در تولید بیوسورفکتانت

نویسندگان: امین گلی[۱]، مریم زارعی[۲]، امیررضا طلایی[۳]

۱.کارشناس گروه مهندسی تکنولوژی تاسیسات حرارتی و برودتی، موسسه آموزش عالی جامی، فولادشهر

۲.کارشناس گروه مهندسی تکنولوژی صنایع شیمیایی، موسسه آموزش عالی جامی، فولادشهر

۳.نویسنده مسئول: دانشجوی دکتری مرکز تحقیقات محیط زیست و منابع آب، دانشکده عمران دانشگاه تکنولوژی مالزی

تلفن تماس: ۰۹۳۸۱۴۹۲۷۹۸ Email: amirtkh@yahoo.com

طلوع بهداشت

دو ماهنامه علمی پژوهشی
دانشکده بهداشت یزد
سال سیزدهم
شماره: ششم
بهمن و اسفند ۱۳۹۳
شماره مسلسل: ۴۸

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۱/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲۲

چکیده

مقدمه: آلودگی خاک با گازوئیل منجر به ضایعات شدید زیست محیطی در اکوسیستم می گردد. لذا محققان در سراسر دنیا روش های گوناگونی را برای حذف گازوئیل از خاک مورد بررسی قرار داده اند. هدف از انجام این مطالعه استخراج مواد بیوسورفکتانت به منظور کاربرد در تصفیه خاک های آلوده به گازوئیل بود.

روش بررسی: در این مطالعه از چهار منطقه که مدتها در تماس با ترکیبات گازوئیلی بوده اند نمونه برداری شد. نمونه ها برای یافتن میکروارگانیسم هایی که قابلیت تولید بیوسورفکتانت و مصرف گازوئیل را داشته باشند مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد توانایی میکروارگانیسم ها در تولید بیوسورفکتانت توسط آزمون امولسیون سازی (E24) مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت بیوسورفکتانت محلول در محیط کشت مغذی استخراج و اندازه گیری شد.

یافته ها: در این مطالعه چهار گونه باکتری خالص سازی شد. تمام باکتریهای جدا شده گرم منفی بودند. بیشترین شاخص امولسیون سازی معادل ۶۶ درصد بود که از باکتریهای جدا شده از خاک پمپ بنزین بدست آمد. در این مطالعه به ازای هر یک لیتر محیط کشت معدنی ۱/۱ گرم بیوسورفکتانت خالص سازی گردید.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که برخی باکتری ها قادر به تولید مقدار کافی بیوسورفکتانت هستند که قابلیت کاربرد در فرایند شستشوی خاک آ لوده به گازوئیل را دارا می باشند.

واژه های کلیدی: گازوئیل، بیوسورفکتانت، E24، بیوامولسیفایر، خاک

مقدمه

آلاینده های گوناگون ورودی به محیط زیست، باعث ایجاد خطرات جدی گردیده و محققان بسیاری را بر آن داشته است که روشهای گوناگونی را برای تصفیه محیط های آلوده به کار برند نفت و مشتقات آن یکی از آلاینده های مهمی است که امروزه محیط زیست را به چالش کشیده ا ست (۱،۲) از میان روش های ارائه شده برای تصفیه گازوئیل، شستشوی خاک با کمک سورفکتانت ها (Surfactants) یک روش سریع و اقتصادی می باشد که علاوه بر حذف ترکیبات نفتی از خاک منجر به حذف فلزات سنگین نیز می گردد (۲،۳). شستشوی خاک در مقایسه با روش های بیولوژیک تجزیه ترکیبات نفتی در خاک که بطور بالقوه به تغییرات آب و هوایی وابسته است، بسیار سریع تر بوده و تقریباً در هر شرایطی قابل کاربرد است. روشهای سنتی شستشوی خاک به طور وسیعی توسط محققان مختلف در سال های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است (۴،۵). مطالعات نشان داده است که ترکیبات فعال سطحی قادر به جمع آوری و تغلیظ نفت خام در یک محیط آبی و بدون هیچ گونه تغییر شیمیایی بر روی آن می باشد (۶). با کمک مطالعات صورت گرفته توسط محققان مختلف، رفتار محلول های حاوی سورفکتانت در محیط های گوناگون شناخته شده است (۷،۸). مواد فعال سطحی که در طبیعت تولید می گردند تحت عنوان بیوسورفکتانت ها (Bio-surfactants) طبقه بندی می شوند (۸). این مواد در مقایسه با ترکیبات مصنوعی دارای فعالیت بسیار عالی می باشند و از میکروارگانیسم های زنده تولید می شوند، در نتیجه هم منابع تجدید پذیر هستند و هم سمیت کمتری را ایجاد می نمایند (۹). در استفاده از این مواد نیاز به حذف ترکیبات شیمیایی از خروجی سیستم نیست و این امر موجب بی خطر بودن و طبیعی بودن این ترکیبات می گردد. تولید این ترکیبات در سطح تجاری و استفاده از آنها در حذف فلزات سنگین و ترکیبات نفتی توسط بعضی از محققان به انجام رسیده است (۱۰). تأثیرات مثبت مواد زیست فعال سطحی در تجزیه ترکیبات نفتی و همچنین در شستشوی خاک های آلوده به گازوئیل نیز گزارش شده است (۱۰،۱۱). از جمله طلایی و همکاران در مطالعه خود به بررسی رفتار امولسیون سازی میکروارگانیسم های خالص سازی شده در هنگام تصفیه بیولوژیکی فاضلاب های حاوی نفت خام شناور پرداختند (۱۲). همچنین آنها در مطالعه دیگری نیز قدرت امولسیون سازی برخی میکروارگانیسم های به کار گرفته شده در تجزیه گازوئیل در حالت کشت خالص را نیز مورد بررسی قرار دادند (۱۲،۱۳). دیبل (Dibble) و بارتا (Bartha) نیز در مطالعه خود دریافتن حضور فسفر و نیتروژن منجر به افزایش راندمان ترکیبات نفتی در دریا می گردد ولی حضور آهن به دلیل غلظت بالای آن در آب دریا تأثیری بر راندمان حذف ندارد (۲).ویرا و همکاران(Vieira et al) در مطالعه ای به مقایسه تجزیه بیولوژیک گازوئیل توسط دو دسته از میکروارگانیسم های جدا شده از خاک دریاچه ای که حاوی مقادیر زیادی از گازوئیل بود پرداختند. آنها در ادامه کار بهینه سازی شرایط رشد این میکروارگانیسم ها را انجام دادند. در مطالعه مذکور در مدت زمان ۴۹ روز ۹۰ درصد گازوئیل موجود در محیط تجزیه شد (۱۱). لینگ و همکاران (Liang Et al) نیز

مطالعه ای را بر روی تجزیه بیولوژیک نفت خام توسط باکتری سودوموناس آئروژنوزا انجام دادند آنها به این نتیجه رسیدند که برای شروع تجزیه بیولوژیکی نفت خام به مقادیر اندکی سورفکتانت و یا منابع کربن سریع تجزیه شونده نیاز است (۱۴). کریستوز و همکاران (Polymerase Change Reaction) نیز به بررسی تجزیه بیولوژیکی نفت خام به کمک باکتری های گرمادوست جدا شده از آتشفشان، پرداختند. آنها ۱۵۰ باکتری گرما دوست را از محیط جدا سازی نمودند. ایشان اعتقاد داشتند که امکان تجزیه ترکیبات نفتی در باکتری ها به واسطه وجود یک ژن با نام alkj امکان پذیر می گردد. به همین دلیل به کمک یک دستگاه PCR که دستگاهی برای توالی ژنتیکی می باشد، کلیه باکتری ها برای شناسایی با این دستگاه مورد بررسی قرار گرفته در نهایت ده گونه از میکروارگانیسم هایی که دارای این ژن خاص بودند بدست آمدند. این ژن در گونه سودوموناس آئروژنوزا یافت شده که تجزیه کننده ترکیبات نفتی می باشد (۱۵).

روش بررسی

خالص سازی و بررسی میکروارگانیسم ها: برای یافتن این میکروارگانیسم ها از نقاطی که برای مدت ها به ترکیبات نفتی آلوده بودند، نمونه برداری شد. در ادامه میکروارگانیسم های موجود در نمونه های برداشت شده که قادر به ادامه حیات در مجاورت گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن بودند، جداسازی و در نهایت خالص سازی شدند. بطوری که از چهار نقطه شامل پمپ بنزین های سطح شهر فولادشهر خاک های آلوده به گازوئیل، از عمق ۵ سانتی متری توسط ابزار استریل شده نمونه برداری شد و تمام نمونه ها در کنار یخ در دمای ۴ درجه سانتی گراد در مدت زمان کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید . در حین نمونه برداری با کمک یک دماسنج دمای خاک محیط اندازه گیری گردیده و pH خاک پس از رسیدن به آزمایشگاه مورد سنجش قرار گرفت (۱۳). در ادامه برای جدا سازی میکروارگانیسم های بدست آمده ۱۵ گرم از هر نمونه خاک آورده شده را در داخل ارلن مایر ۳۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک (Serum Physiologic) استریل شده ریخته شد و به مدت نیم ساعت بر روی یک شیکر با شدت ۱۶۰rpm قرار گرفت تا میکروارگانیسم های موجود در خلل و فرج موجود در خاک نیز در سرم فیزیولوژیک معلق شوند (۱۵). پس از این مدت ارلن مایر ها برای مدت زمان ۲۰ دقیقه در یک محیط رها شدند تا مواد معلق موجود در آن ته نشین گردد. سپس دو میلی لیتر از مایع داخل ارلن مایر ها را به ارلن مایر های محتوی محیط کشت معدنی وارد کرده و pH نمونه به کمک محلول هیدروکسید سدیم بر روی هفت تنظیم گردید (۱۲). لازم به ذکر است که فرمولاسیون محیط کشت معدنی به صورت زیر می باشد: ۱۷۰ میلی گرم $(NH_4)CL$، ۲۳۰ میلی گرم KH_2PO_4، ۱۰ میلی گرم $MgSO_4$، ۴/. میلی گرم $FeSO_4$ و یک میلی لیتر گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن نیز در یک لیتر آب مقطر. محیط کشت معدنی به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های ناخواسته توسط اتوکلاو گندزدایی گردید(۱۲).

ارلن مایرهای حاوی محیط کشت معدنی و میکروارگانیسم ها به مدت ۷۲ ساعت در داخل شیکر انکوباتور در دمای ۴۰ درجه

سانتی گراد با ۱۶۰rpm قرار گرفتند(۱۴). برای خالص سازی میکروارگانیسم ها ی رشد کرده در این مراحل از روش کشت خطی استفاده شد. برای کشت خطی در ابتدای کار از نمونه های ارلن مایر بعد از ۷۲ ساعت نمونه برداری گردید و به روش کشت خطی آن ها را با لوپ استریل شده در شرایط کاملاً استریل در کنار شعله بر روی محیط نوترینت آگار انتقال داده و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت عمل انکوباسیون انجام گرفت . پس از این مدت زمان میکروارگانیسم هایی که دارای رنگ و مورفولوژیکی مختلفی بر روی محیط کشت بودند مجدداً به محیط های کشت جدید انتقال یافتند. این عمل بطور متوالی ادامه یافت تا در نهایت میکروارگانیسم هایی خالص بر روی محیط نوترینت آگار تشکیل گردید (۱۶). در تمام طول این مدت مشاهدات میکروسکوپی به کمک لام مرطوب نیز انجام می گرفت تا از بدست آمدن گونه های خالص اطمینان حاصل گردد. بعد از بدست آوردن باکتری های ایزوله شده از آنها اسلنت تهیه گردید و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد برای نگهداری بلند مدت نمونه ها هر ۴ ماه یک بار این میکروارگانیسم ها به اسلنت جدید انتقال یافتند (۱۲،۱۳).

بعد از بدست آوردن باکتری های خالص سازی شده آزمون گرم بر روی آنها انجام شد تا گرم منفی بودن یا گرم مثبت بودن میکروارگانیسم ها مشخص گردد. لازم به ذکر است که رنگ آمیزی گرم به روش استاندارد انجام گرفت و مشاهده میکروارگانیسم ها نیز با استفاده از یک میکروسکوپ با بزرگ نمایی صد برابر و روغن امرسیون صورت پذیرفت (۱۶).

برای سنجش کارایی میکروارگانیسم ها، مقداری از آنها را از اسلنت های تهیه شده به دو ارلن مایر ۳۰۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت معدنی انتقال داده و در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۶۰rpm قرار گرفتند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت مقداری از محیط مذکور برداشت شد و میکروارگانیسم های آن به کمک روش ارائه شده توسط طلایی و همکاران از محیط کشت جدا شده و نهایتاً در سرم فیزیولوژیک معلق گردیدند (۱۵). برای اینکه میکروارگانیسم ها با غلظت یکسان در آزمایش ها بکار روند غلظت آنها به کمک روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد(۱۳).

میکروارگانیسم های خالص سازی شده در این مطالعه با غلظتی یکسان به ارلن مایرهای ۳۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی اضافه شد. همچنین مخلوطی از میکروارگانیسم های فوق نیز برای بررسی استفاده از کشت مخلوط در محیطی مشابه مورد استفاده قرار گرفت.

به ارلن مایر ۱ میلی لیتر گازوئیل استریل افزوده شد هر چهار ارلن مایر در یک شیکر انکوباتور با شدت ۱۶۰ rpm و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز قرار گرفتن پس از این مدت، میزان گازوئیل باقی مانده در محیط اندازه گیری شد(۱۳).

آزمون شاخص امولسیون سازی(E24): برای تعیین امکان تولید بیوسورفکتانت در محیط و تعیین کارایی آن از آزمون E24 استفاده گردید. در این آزمون پس از کشت میکروارگانیسم ها در محیط کشت معدنی به مدت ۷ روز، ۲ میلی لیتر از هر یک از محیط های کشت معدنی به ۴ لوله آزمایش حاوی ۲ میلی لیتر گازوئیل اضافه گردید و به مدت ۳ دقیقه تحت لرزش شدید قرار

گرفت سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در یک محیط ساکن رها گردید پس از این مدت نسبت ارتفاع لایه امولسیون ایجاد شده به کل مایع موجود در لوله محاسبه شد و به عنوان شاخص امولسیون سازی گزارش گردید (۱۷).

آزمون شمارش قطره : تولید بیوسورفکتانت در محیط کشت می تواند منجر به کاهش کشش سطحی گردد که این امر نیز به نوبه خود منجر به تولید قطراتی ریز تر می گردد. بنابراین تعداد قطراتی که توسط یک حجم مشخص از آب خالص تولید می شود نسبت به آبی که حاوی بیوسورفکتانت است کمتر خواهد بود. با شمارش تعداد قطرات تولیدی توسط یک حجم خاص از هر نمونه توسط یک بورت و مقایسه آن با همان حجم از آب مقطر به راحتی می توان به نتایج کمی در باره سورفکتانت تولیدی دست یافت (۱۸).

استخراج و تخلیص بیوسورفکتانت :استخراج بیوسورفکتانت به روش استخراج مایع- مایع و پس از رشد سلولها در محیط آبی (محیط معدنی) و حذف آنها توسط روش ت ه نشین سازی انجام گرفت برای استخراج کردن بیوسورفکتانت ابتدا مقدار pH محیط کشت فاقد سلول با افزودن اسید سولفوریک بر روی ۲ تنظیم گردید و سپس محلول برای مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت بعد از آن دوبار با استفاده از روش ته نشین کردن رسوب حاصله توسط آب مقطر حل شد و سپس pH محلول توسط NaOH بر روی ۷ ثابت گردید پس از خشک کردن انجمادی، نمونه حاصله توزین شد (۱۹).

نحوه استخراج گازوئیل :برای استخراج گازوئیل باقی مانده در نمونه ها و سنجش میزان آن پس از تجزیه بیولوژیکی از حلال تتراکلرید کربن استفاده گردید به این منظور ۲۵ میلی لیتر تتراکلرید کربن به هر نمونه اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه با مگنت در دور ۷۰۰ دور در دقیقه به شدت به هم زده شد پس از این مدت دو فاز تتراکلرید کربن و محیط معدنی حاوی میکروارگانیسم ها با کمک قیف جدا کننده از یکدیگر جدا شدند(۲۰).

روش های آنالیز :اندازه گیری میزان غلظت گازوئیل موجود در محیط، توسط سنجش میزان جذب در طول موج ۴۰۰nm از نمونه استخراج شده انجام شد (۹). روش رسم منحنی کالیبراسیون در مطالعه طلایی و همکاران گزارش شده است (۲۰). کلیه نمونه ها برای جلوگیری از کمپلکس و خطا ۱۰۰ بار رقیق گردید(۲۲).

یافته ها

مشخصات میکروارگانیسم های خالص سازی شده در این مطالعه شامل میکروارگانیسم هایی می باشد که از منابع نمو نه برداری شده بدست آمده است. نتایج بررسی های میکروسکوپیک و آزمایش گرم بر روی آنها در جدول ۱ نمایش داده شده است.

در این مطالعه از آزمون E24 به عنوان شاخصی برای تولید بیوسورفکتانت استفاده گردید. کلیه میکروارگانیسم ها توسط آزمون کمی E24 برای تعیین شاخص امولسیون سازی تحت بررسی قرار گرفتند که نتایج آنها در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۱: مشخصات باکتری های بدست آمده در مطالعه

نمونه ها	محل برداشت نمونه
نمونه۱ بودویسیا اکواتیکا بوتیااگزلا سدسیا	خاک آغشته به گازوئیل اطراف پمپ بنزین شهرستان فولاد شهر
نمونه۲ سیتروباکتر امالوناتیکوس ستروباکتر دایورسوز	خاک آغشته به گازوئیل باغچه اطراف پمپ بنزین
نمونه ۳ انتروباکترتیلورا (ای. کنسروجنس)	خاک آغشته به گازوئیل پارکینگ ماشین های سنگین در فولاد شهر
نمونه۴ انتروباکتر امنیجنس بیوگروپ ۲	خاک آغشته به گازوئیل پارکینگ ماشین های سنگین در اتوبان فولاد شهر- اصفهان

جدول ۲: میزان شاخص امولسیون سازی میکروارگانیسم ها

نمونه ها	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴
شاخص امولسیون سازی	٪۶۶	٪۶۴	٪۶۵	٪۶۰

با توجه به بررسی های انجام گرفته میزان مصرف گازوئیل بعد از ۱۰ روز هوادهی میکروارگانیسم ها با شدت ۱۶۰rpm از ۰/۰۵ تا ۰/۵ میلی گرم بر لیتر افزایش یافته است.

نتایج حاصل از آزمون تست قطره: در این مطالعه برای بررسی کمی بیوسورفکتانت از تست قطره استفاده گردید در این راستا ۵ میلی لیتر از نمونه هوادهی شده به مدت ۱۰ روز را از بورت عبور داده و نمونه ای با همین حجم از آب مقطر به عنوان نمونه شاهد قرار داده تا تغییرات تعداد قطرات را بدست آورد.

تعداد قطرات بدست آمده از آب مقطر ۶۵ عدد و میزان قطرات حاصل از تولید بیوسورفکتانت در جدول ۳ نمایش داده شده است.

جدول ۳: تعداد قطرات در آزمون قطره

نمونه ها	نمونه	نمونه	نمونه	نمونه
آزمون کشش سطحی (□□۵ از نمونه)	۷۵	۷۷	۷۸	۷۷

جرم بیوسورفکتانت تولید شده

در این مطالعه جرم بیوسورفکتانت تولید شده بعد از انجام تمامی آزمایشات مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل از آن در جدول ۴ نمایش داده شده است.

جدول ۴: جرم بیوسورفکتانت تولید شده

نمونه ها	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴
جرم بیوسورفکتانت تولید شده	□/□ ۱/۱	□/□ ./۸۳	□/□ ./۹۲	□/□ ./۸۷

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه از چهار نقطه که برای مدت طولانی در تماس با ترکیبات نفتی از جمله گازوئیل بوده اند نمونه برداری صورت گرفت. گازوئیل می تواند در شکل های مختلف توسط باکتری ها مصرف گردد:

۱- توده های بزرگ گازوئیل ۲- قطرات بسیار کوچک از گازوئیل که در اثر تولید بیوسورفکتانت ها ایجاد می گردد. با توجه به حلالیت کم گازوئیل در آب و سطح اندک ایجاد شده توسط توده

های بزرگ گازوئیل، میکروارگانیسم های ایجاد شده در این مناطق عموماً برای مصرف ترکیبات نفتی با کمک آنزیم های تولیدی یا بیوسورفکتانت ها، این ترکیبات را به قطرات کوچک تر تقسیم می نمایند و سپس مورد استفاده قرار می دهند.

بنابراین در این مناطق احتمال وجود میکروارگانیسم هایی که توانایی تولید بیوسورفکتانت ها را داشته باشند وجود دارد. برای جداسازی میکروارگانیسم ها از محیط های کشت معدنی حاوی گازوئیل، به عنوان تنها منبع کربن استفاده گردید. به این ترتیب تنها میکروارگانیسم هایی در این مطالعه رشد نمودن که توانایی استفاده از گازوئیل را داشتند. تمامی میکروارگانیسم های رشد کرده بر روی محیط های کشت از نوع باکتری بوده و تمامی آنها از نوع کروی و میله ای بوده اند. سه گونه از باکتری های جدا شده در این مطالعه کوکسی و یک گونه دیگر آن باسیل و اکثراً متحرک بودند. این میکروارگانیسم ها ابتدا تحت آزمون قطره قرار گرفتند. پس از آن میکروارگانیسم ها برای تعیین میزان بیوسورفکتانت تولیدی و تعیین قابلیت امولسیون سازی (E24) مورد بررسی قرار گرفتند. که در این آزمون میکروارگانیسم شماره ۱ بیشترین میزان را نشان داد. باید توجه کرد که بیشتر بودن میزان آزمون E24 همیشه نشان دهنده بیشتر بودن تولید بیوسورفکتانت ها نیست بلکه همچنین می تواند به دلیل بالا بودن کارایی بیوسورفکتانت تولیدی باشد. برخی از باکتری ها قادرند بیوسورفکتانت زیاد با کارایی کم تولید کنند. بنابراین شاخص امولسیون سازی نمی تواند معیاری مناسب برای تعیین مقدار بیوسورفکتانت تولیدی باشد و تنها برای اندازه گیری کارایی بیوسورفکتانت به کار می رود. با توجه به این امر که شاخص امولسیون سازی تمامی باکتری های نمونه های بالا به هم نزدیک بودند. لذا از تمامی نمونه ها برای ادامه مطالعات استفاده گردید. پس از استخراج، تخلیص و خشک سازی بیوسورفکتانت ها مقداری از آنها در آب مقطر حل گردید و آزمون شمارش قطره بر روی آن انجام گرفت و نتایج آزمون شمارش قطره مشخص نمود که میزان قطرات تولیدی در نمونه حاوی سورفکتانت بیشتر از همان حجم آب مقطر می باشد. این نتایج بیانگر این است که ماده استخراج و تخلیص شده در این مطالعه خاصیت بیوسورفکتانتی را داراست. میزان و شیوه استفاده از بیوسورفکتانت ها در تصفیه خاک ها وابستگی شدیدی به میزان آلودگی خاک دارد. برای تصفیه خاک های آلوده به گازوئیل می توان بیوسورفکتانت را پس از تولید و خالص سازی با کمک روش های مختلف به خاک اضافه نمود و عملیات شستشوی خاک را انجام داد. بنابراین می توان از نمونه های تولید کننده بیوسورفکتانت برای پاک سازی خاک ها یا محیطهای آلوده به گازوئیل استفاده نمود زیرا در تمام آزمایشات صورت گرفته در این زمینه از گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن استفاده گردید. لیانگ و همکاران در مطالعه خود به این نتیجه رسیدن که برای شروع تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی، نیاز به اضافه نمودن سورفکتانت های سنتزی و یا یک منبع کربن سریع تجزیه شونده مانند گلیسیرول است (۲۰). اما همانطور که در این مطالعه مشاهده شد تنها منبع کربن مورد استفاده گازوئیل بود. بنابراین تمام نمونه ها توانایی تجزیه ترکیبات گازوئیلی را نیز داشتند ولی برای شروع تجزیه بیولوژیکی و افزایش تعداد خود نیازی به افزودن منابع سریع

تجزیه شونده و یا سورفکتانت سنتزی نداشتند. مولکینز در مطالعه خود به این نتیجه رسید که حضور سورفکتانت منجر به افزایش تجزیه بیولوژیک نفت خام می گردد (۲۱). بنابراین می توان برای تجزیه زیستی گازوئیل از تمام نمونه های موجود در این پژوهش استفاده نمود.

در این مطالعه با کمک میکروارگانیسم های جدا شده از محیط های آلوده به ترکیبات نفتی، بیوسورفکتانت تولید و از محیط کشت جدا گردید و میزان آن توسط میکروارگانیسم ها تعیین گردید. یافته های این مطالعه نشان می دهد که : میکروارگانیسم هایی که در مناطق آلوده به ترکیبات نفتی زندگی می کنند به احتمال زیاد توانایی تولید بیوسورفکتانت و مصرف ترکیبات نفتی را دارند. لذا از آنها می توان به منظور تجزیه بیولوژیکی خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی استفاده نمود. نتایج این مطالعه مشخص نمود که باکتریهای خالص سازی شده در پژوهش دارای توانایی مصرف گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن خود هستند.

همان طور که نتایج این مطالعه نشان داد امکان استخراج بیوسورفکتانت از محیط کشت میکروارگانیسم ها جهت کاربرد در فرایند شستشوی خاکها نیز وجود دارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از موسسه آموزش عالی جامی که با حمایت های مادی و معنوی خود موجبات انجام این پژوهش را فراهم نموده ابراز می دارد. همچنین لازم به ذکر است که این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی در گروه مهندسی شیمی موسسه آموزش عالی جامی بوده است.

References

1- Hua J. Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy. Ocean Engineering 2006; 33 (2): 152-67.

2- Dibble J, Bartha R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Applaied and Enviromental Microbiology 1979; 37(4): 729-39.

3- Gogoi BK, Dutta NN, Goswami P, and Krishna mohan TR. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. ADV. Environ. Res 2003; 7: 767-82.

4- TObia RJ, Camacho JA, Augustin P, Griffiths R A, and Frederick R. M. Surfactant treatment of crude oil contaminated soil. J. of Hazad Mater 1994; 38 (1): 145-61.

5- Khdadoust A P, Lei L, Antia E, Bagchi R, suidan M T, Tabak H H. Adsorption of PAHs in aged harbor sediments. ASCE J. of Environmental Egn 2005; 131 (3): 403-09. [Persian]

6- Man M. Full-scale pilot-scale soil washing. J. Hazard. Mater 1999; 66 (1-2): 119-36.

7- Kosaric N. Biosurfactants and biotechnology. Marcel Dekker, 1987; New York.

8- Hunter R. J. Introduction to modem colloid science. Oxford Science Publications 1993; UK.

9- Urum K, Pekdemir T, Copur M. Surfactants treatment of crud oil contaminated soils. J of Colloid and Interface Science 2004; 276: 456-64.

10- Francy D. S, Thomas J. M, Raymond R.L, Ward C.H. Emulsification of hydro carbons by surface bacteria. J. Microbiol 1991; 8: 237-46.

11- Hamme JD, ward OP. Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed- bacterial culture. Can j of microbial 1999; 45: 130-37.

12- Vieira PA, Vieira RB, France F.P, Cardoso VL. Biodegradation of effluent contaminated With diesel fuel and gasoline. Journal of hazardous Materials 2007; 140 (1-2): 52-69.

13- Talaei AR, Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms, [M.Sc. Thesis], Scince and Research Azad university branch-ahvaz 2008. [Persian]

14- Talaie A , Talaei M, jafarzadeh N. Ootimization of biodegradation of wastewater contaminated floating diesel fuel by taguchy method. J. Water and wastewater 2009; 71: 57-68. [Persian]

15- Qingxin Li, kang C, zhang. Wastwater produced from an oilfield and continuous treatment with and oil-degrading bacterium. Process biochemistry 2005; 40: 873-77.

16- Kabiri K. Biodegradation of petroleum pollutant from soil. [MSc thesis] Esfehan university. 2008

17- Urum K, pekdemir T, Copur M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. Journal of colloid and interface science 2004; 276 (2): 456_64

18- Andeson R, Rasor E, Van Ryn F. Particle size separation via soil washing to obtain volume reduction. J. of Hazard Malter 1999; 66(1-2): 89-98.

19- Choi H, Hori K, Tnji Y, Unno H. Microbial degradation kinetics of solid alkane dissolved in nondegradable oil phase. J. of Biochemical Engineering 1974; 3: 71-78.

20- Liang ZG, Yue-ting WU, Xin-ping Q, and QIN M. Biodegradation of crude oil by pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids. J. of Zhejiang university Scince 2005; 8: 725-30.

21- Mulking GJ -Philips, stewart J E. Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil. Applaied Microbiology 1974; 28(4): 574-52.

22- Goli A, Talaei AR. Microbiological Studies of Delijans EmamSagegh Hospital, Iranian Journal 2011; 868 - 80.

23- Talaie A, Beheshti M, Talaie MR. Screening and batch treatment of wastewater containing fl oating oil using oil-degrading bacteria. Desalination and Water Treatment. 2011; 28: 1–7.

Producing Bio-surfactants Using Purified Microorganisms Isolated from Soils Contaminated with Diesel Fuel

Goli A(BS)[1], Zareei M (BS)[2], Tallaie AR (M.Sc)[3]

1.BS, Department of Mechanical Engineering, Jami Institute of Technology , Foulad shahr, Iran
2.BS, Department of chemical Engineering, Jami Institute of Technology,Iran
3.Corresponding Author: Ph.D Student of Civil Engineering, Institute of Environmental and Water Resources Management, Water Research Alliance, University Technology Malaysia

Abstract

Introduction: Contamination of soil by diesel fuel can pose serious problems to ecosystems. For this reason some ways to remove diesel fuel from soil were developed by a number of researchers. The aim of this research is to extract bio-surfactant for treating soil contaminated with diesel fuel.
Methods: In this study, 4 soil samples were taken from fields that had been exposed to diesel fuel over the years. The microorganisms that were able to produce bio-surfactant and remove diesel fuel were isolated from these samples. Ability of microorganisms to produce bio-surfactant was evaluated by emulsification test (E24). Finally solved bio-surfactant into nutrients culture was extracted and measured.
Results: Four strains of bacteria were isolated in this study. Results indicated that all bacteria were gram negative. The highest emulsification index was obtained from bacteria isolated from gas fuel station soil. In this study 1.1 gram of bio-surfactant was extracted per one liter of nutrients culture containing bacteria.
Conclusion: The results showed that, some special bacteria are able to product enough bio-surfactant to treat soil contaminated diesel fuel.

Keywords: Diesel Fuel, Biosurfactant, E24, Bioenmulsifier, soil.