

بررسی توانایی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 جهت تجزیه زیستی نفت خاممعین صفری*^۱، سلمان احمدی اسپچین^۲، ندا سلطانی^۳

دریافت: ۹۳/۰۲/۲۲ پذیرش: ۹۳/۰۵/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: هیدروکربن های نفتی یک دسته از آلاینده های خطرناک محیط هستند. در حال حاضر تجزیه زیستی آلاینده های نفتی یکی از کارآمدترین و مقرون به صرفه ترین روش ها در رفع آلودگی های نفتی از محیط است. هدف اصلی از این مطالعه بررسی توانایی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 جهت تجزیه زیستی نفت خام و اثر نفت خام بر میزان رشد و مقدار کلروفیل و وزن خشک این سیانوباکتر است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 از کلکسیون ریز جلبک ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی (شهر تهران) تهیه شد. ابتدا خالص سازی این سیانوباکتری به روش پلیت آگار بر روی محیط کشت جامد BG۱۱ انجام شد. نرخ رشد، مقدار کلروفیل و وزن خشک این سیانوباکتری با استفاده از روش اسپکتوفتومتری اندازه گیری شد. میزان تجزیه نفت خام به روش آنالیز کروماتوگرافی گازی (GC) محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از اندازه گیری نرخ رشد سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 در تیمار یک درصد نفت خام و نمونه شاهد نشان داد که رشد این سیانوباکتری در حضور نفت خام به عنوان تنها منبع کربن تقریباً مشابه با نمونه شاهد افزایش می یابد. نتایج همچنین نشان داد که با افزایش غلظت نفت خام میزان وزن خشک سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 نسبت به نمونه شاهد افزایش و میزان کلروفیل در تیمار های مختلف نفت خام کاهش می یابد. میانگین تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی در تیمارهای روز ۱۴ نسبت به نمونه شاهد به میزان ۵۴/۸۷ درصد و در روز ۲۸ به مقدار ۹۳/۹۸ بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه مشخص شد که سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 دارای پتانسیل بالایی در تجزیه زیستی نفت خام است. لذا از آنجایی که نفت یک فرآورده سمی برای سیستم های بیولوژیک و یکی از آلوده کننده های اصلی اکوسیستم های زیستی است، نتایج حاصل بیانگر پتانسیل این سیانوباکتری برای استفاده از آن به عنوان شاخصی جهت رفع آلودگی های نفتی در مناطق آلوده است.

واژگان کلیدی: سیانوباکتری، تجزیه زیستی، نفت خام، سرطان زایی، کروماتوگرافی گازی

مقدمه

رشد روز افزون فعالیت های صنعتی از یک سو و عدم رعایت الزامات زیست محیطی از سوی دیگر سبب شده است تا طی چند دهه اخیر مقادیر زیادی از آلاینده های نفتی وارد محیط زیست شوند (۱). هیدروکربن های نفتی یک دسته از این آلاینده های خطرناک محیط هستند که بر اساس فعالیت های مختلف در محیط زیست تجمع می یابند. نفت یک فرآورده سمی برای سیستم های زیستی است و یکی از آلوده کننده های اصلی محیط زیست محسوب می شود (۲). هیدروکربن های موجود در نفت خام با وزن مولکولی کم از قبیل نفتالن و بنزن و مشتقات آن ها انحلال پذیری بالایی دارند. بنابراین موجودات ممکن است بدون تماس مستقیم با نفت، در اثر تماس با آب آلوده شده از این مواد محلول، دچار مسمومیت گردند. در سال های اخیر آلودگی برخی از منابع آبی به هیدروکربن های نفتی به عنوان یکی از عمده ترین معضلات زیست محیطی در ایران مطرح است. آلودگی های نفتی منجر به تجمع و حفظ اجزای تشکیل دهنده نفت خام در انسان و حیوانات دریایی می شوند. تجمع این هیدروکربن ها در بدن انسان به علت سمیت، جهش زاوی و سرطان زاوی منجر به نگرانی های بسیاری شده است (۳ و ۴). هیدروکربن های جذب شده بیشتر در بافت هایی مثل جگر و پانکراس، کیسه صفرا، لیپوپروتئین در پلاسما و تمام بافت های پوستی و عصبی که ذخیره چربی دارند، تجمع می یابند. این هیدروکربن ها از طریق تاثیر گذاردن بر مکانیسم های سلولی، تغییرات پوستی و فساد نسوج زنده را باعث می شوند (۵). اثرات اصلی در معرض قرارگیری با ترکیبات نفتی اثرات سو برسیستم اعصاب مرکزی و پلی نروپاتی است (۶). نفت شامل بسیاری از ترکیبات شیمیایی فرار و سمی دیگر است که استنشاق برخی از آنان توسط زنان باردار می تواند موجبات تولد نارس نوزاد، وزن کم نوزاد و یا سقط جنین را فراهم آورد (۷). مسئله آلودگی های نفتی منتشر شده در محیط زیست از چنان اهمیت ویژه ای برخوردار است که در چند دهه اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران را در رشته های مختلفی چون مهندسی دریا، مهندسی پتروشیمی، مهندسی شیمی، زیست شناسی و مهندسی محیط زیست به خود جلب کرده است. بنابراین امروزه مطالعه بر روی آلودگی های نفتی،

اثرات سو این آلودگی ها و راه های حذف و کاهش آنها از محیط زیست بسیار حائز اهمیت است. روش های مختلفی برای پاک سازی آلودگی های نفتی و مشتقات آن وجود دارد که این روش ها در سه دسته کلی فیزیکی، شیمیایی و زیستی دسته بندی می شود (۸). روش های زیستی که به طور معمول شامل تبدیل آلودگی ها به مواد غیرسمی، با استفاده از فرآیندهای میکروبی است، مؤثرتر و بی ضررتر از روش های فیزیکی و شیمیایی به نظر می رسند (۹) هر چند روش های فیزیکوشیمیایی در کاهش تاثیرات سو ترکیبات نفتی بر اکوسیستم ها سود بخشند ولی قادر به حذف کامل ترکیبات نفتی از محیط نیستند. روش های زیستی ضمن سازگاری با محیط زیست، از نظر اقتصادی نیز نسبت به دیگر روش های پاک سازی برتری دارند (۱۰). در حال حاضر تجزیه زیستی آلاینده های نفتی به عنوان یکی از کارآمدترین و مقرون به صرفه ترین روش ها در رفع آلودگی های نفتی از محیط به حساب می آید (۱۱ و ۱۲). مکانیسم کلی تجزیه زیستی بدین صورت است که میکروب ها و باکتری ها به قطرات نفتی حمله ور شده و پس از در بر گرفتن آنها و یا به اصطلاح خوردن قطرات، تجزیه و هضم اجزاء آغاز شده و در نهایت آب و گازهای بی خطری چون دی اکسید کربن حاصل می شود (۱۳). عوامل متعددی بر روی میزان تجزیه زیستی نفت خام در محیط های دریایی تاثیر می گذارند. از جمله این عوامل می توان به عوامل طبیعی، اکسیژن، موجودات زنده، نیتروژن، فسفر، دما و pH اشاره کرد (۱۴). درک عوامل تاثیرگذار بر میزان تجزیه زیستی برای تعیین راهبردهای اساسی به منظور طراحی سیستم هایی برای رفع آلودگی های محیطی (Bioremediation) و بهبود جمعیت میکروبی دارای اهمیت خاصی است (۱۵). امروزه روش های زیستی در کشورهای صنعتی نظیر آمریکا، ژاپن، آلمان، انگلستان، کره جنوبی و روسیه به طور معمول استفاده می شود و در سایر کشورهای به خصوص حوزه خلیج فارس از جمله ایران در مرحله تحقیقاتی است. در حال حاضر حدود ۷۹ جنس از باکتری ها شناسایی شده اند که توانایی استفاده از هیدروکربن به عنوان منبع کربن و انرژی را دارند، همچنین ۹ جنس سیانوباکتری، ۱۰۳ جنس قارچ و ۱۴ جنس جلبک شناسایی شده اند که توانایی تجزیه یا تبدیل هیدروکربن ها را دارند (۱۰). سیانوباکتری ها در سال

مواد و روش ها

کشت و خالص سازی سیانوباکتری

در این مطالعه تجربی، سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* از کلکسیون ریز جلبک ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی (شهر تهران) تهیه شد. ابتدا جهت اطمینان از خالص بودن نمونه، خالص سازی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* به روش پلیت آگار بر روی محیط کشت جامد BG11 انجام شد (۲۳). محیط کشت BG11 رایج ترین محیط کشت مورد استفاده برای سیانوباکتری ها است که در هر ۱ L حاوی ترکیبات زیر است (۲۴):

- Mg SO₄.7 H₂O (75 mg)
- NaNO₂ (150 mg)
- C₆H₈O₇ (6mg)
- CaCl₂.2H₂O (36 mg)
- EDTA (Triplex III) (1 mg)
- Ferric ammonium citrate(C₆H₅_{4y} Fe_x N_y O₇, 6 mg)
- Trace metal mix solution (1mg)
- Na₂CO₃ (20 mg)

برای تهیه محیط کشت جامد، ۱۵ g آگار به محیط کشت مایع BG11 اضافه شد و ۲۰ min در دمای ۱۲۰°C اتوکلاو شد، سپس به ظروف پتری منتقل شد. پس از سرد شدن محیط کشت جامد، کلنی های سیانوباکتری ها توسط لوپ به صورت زیگزاگی روی آن کشت داده شد. این کار برای به دست آوردن کلنی های خالص سیانوباکتری ها چندین بار تکرار شد و هر بار کلنی هایی که باید دوباره کشت داده شدند، توسط تهیه اسلاید و بررسی میکروسکوپی انتخاب شدند. به منظور افزایش سیانوباکتری مورد نظر و به دست آوردن مقدار کافی از آن برای انجام مراحل آزمایش، بعد از اطمینان از خالص بودن کلنی های موجود در کشت جامد، کلنی ها به محیط کشت مایع BG11 منتقل و در اتاقک رشد تحت هوادهی و تابش نور مداوم و همچنین دمای ۲۸±۲ °C نگهداری شدند (۲۵).

تاثیر نفت خام بر میزان رشد سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108

در این تحقیق، نفت خام تهیه شده از مخازن نفتی نفت شهر کرمانشاه (چاه ۲۵) به مدت ۲۰ min در دمای ۱۲۰°C در

های اخیر به دلیل پتانسیل استفاده آن ها در بیوتکنولوژی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۱۶). ایده استفاده از سیانوباکتری ها در صنعت اولین بار در حدود شش دهه قبل مطرح شد و از آن زمان به بعد گزارش های متعددی در مورد استفاده از آنها در فرآیند پاکسازی زیستی فاضلاب ها و آب ها و خاک های آلوده به آلاینده ها سمی گزارش شده است (۱۷). از جمله مهم ترین کاربردهای سیانوباکتری ها در صنعت نفت است. این موجودات هم در تشکیل و هم در تجزیه این ترکیبات نقش دارند (۱۸). مطالعات اولیه محققان نشان داده است که عموماً سیانوباکتری ها دارای اثرات مفیدی در کاهش آلودگی های ناشی از نشت نفت هستند و مداخله این میکروارگانیسم ها از طریق فرآیندهای فیزیکی و یا شیمیایی خیلی پیچیده نیست (۱۹). Kuritz و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که سیانوباکتری های *Anabaena sp.* و *Nostoc ellipsosporum* دارای توانایی طبیعی در تجزیه ترکیبات آلیفاتیک سمی هستند (۲۰). Raghukumar و همکاران در سال ۲۰۰۱ تجزیه زیستی نفت خام توسط سیانوباکتری های دریایی را بررسی کردند و دریافتند که در حدود ۴۵ تا ۵۵ درصد ترکیبات اصلی نفت خام در حضور سیانوباکتری ها طی ۱۰ روز حذف شده است (۲۱). گونه های سیانوباکتریایی میزان حساسیت های متفاوتی نسبت به آلودگی ها بروز می دهند. در بیشتر موارد حضور آلودگی های نفتی سبب افزایش رشد سیانوباکتری ها می شود، این امر نشان می دهد که این میکروارگانیسم ها به احتمال زیاد قادر به تجزیه و استفاده از این ترکیبات هستند (۱۰). در مطالعات متعددی دیگری در سرتاسر دنیا نشان داده شد که این میکروارگانیسم ها قادر به تجزیه زیستی نفت خام و سایر ترکیبات هیدروکربنی هستند (۱۰ و ۲۲). از این رو، با توجه به گسترش آلودگی های نفتی در نواحی متعددی از دنیا، شناسایی سیانوباکتری های توانمند و همچنین بررسی پتانسیل آنها در حذف آلودگی های نفتی دارای اهمیت خاصی است. با این حال، تا کنون در کشور ایران در زمینه بررسی توانایی این میکروارگانیسم ها در رفع آلودگی های نفتی مطالعات کاربردی فراوانی انجام نشده است. هدف اصلی از این مطالعه بررسی توانایی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 جهت تجزیه زیستی نفت خام و اثر نفت خام بر میزان رشد و مقدار کلروفیل و وزن خشک این سیانوباکتر است.

جایگزین شد. نمونه به مدت یک روز در دمای 4°C قرار داده شد. به منظور جداسازی عصاره متانولی از سانتریفیوژ استفاده شد. سپس جذب نوری این عصاره در طول موج 665 nm اندازه گیری شد و با استفاده از رابطه زیر مقدار کلروفیل بر حسب $\mu\text{g/mL}$ محاسبه شد (۲۶):

$$C_{chl} = 13.14 \times OD_{665}$$

برای اندازه‌گیری وزن خشک مطابق روش Leganes و همکاران (۱۹۸۷)، با استفاده از کاغذ صافی های وزن شده سیانوباکتر از محیط کشت جدا شدند سپس به مدت 24 h در آون با دمای 70°C قرار داده شدند سپس وزن آنها اندازه گیری شد (۲۷).

بررسی توانایی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 جهت تجزیه زیستی نفت خام

برای بررسی توانایی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 در تجزیه زیستی نفت خام محیط کشت BG11 فاقد کربن تهیه شد. پس از تنظیم pH محیط کشت در pH برابر با ۷ توسط pH متر، محیط کشت آماده شده در اتوکلاو به مدت 20 min در دمای 120°C استریل شد. میزان فعالیت تجزیه ای این سیانوباکتری با استفاده از روش آنالیز کروماتوگرافی گازی (GC) تعیین شد (۱۸).

ابتدا برای انجام تیماردهی به ارلن های استریل با حجم 500 mL ، 300 mL از محیط کشت BG11 فاقد کربن اضافه شد. سپس نفت خام با غلظت 1% به ارلن ها افزوده شد. به ارلن حاوی محیط کشت و ۱ درصد نفت خام، 30 mL از سیانوباکتری رشد کرده اضافه شد. سه تیمار نفتی به همراه یک شاهد برای روز ۱۴ و سه تیمار نفتی و یک شاهد برای روز ۲۸ آماده شدند. تیمارهای تهیه شده برای انجام روش کروماتوگرافی گازی (GC) در اتاقک رشد نگهداری شدند و تحت هوادهی و تابش دائمی نور بودند. به منظور آماده سازی تیمارها جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی، تیمارها پس از سپری شدن ۱۴ و ۲۸ روز از پمپ هوا جدا شدند. تمام نمونه ابتدا 15 min در دور 4000 rpm سانتریفیوژ شدند و با 10 mL n-هگزان چندین بار شستشو داده شد و عصاره گیری شد. استخراج با استفاده از کیف دکانتور انجام شد و در نهایت 1 mL از نمونه داخل ویال ریخته و $0.3\ \mu\text{L}$ از آن به دستگاه تزریق شد.

اتوکلاو استریل شد و پس از سرد شدن برای تیماردهی استفاده شد. برای تیماردهی سیانوباکتری مورد بررسی منبع کربن از ترکیبات محیط کشت BG11 که NaCO_3 بود حذف شد و برای جبران کمبود سدیم، $\text{NaCl}_2\text{ g/L}$ به آن افزوده شد. این محیط کشت در pH برابر با ۷ توسط pH متر تنظیم شد و سپس در اتوکلاو استریل شد (۱۰). به منظور بررسی میزان رشد سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 تیمارهایی با غلظت یک درصد نفت خام و همچنین تیمار شاهد (بدون نفت خام) تهیه شد. ارلن های حاوی سیانوباکتری ها تیمار داده شده در اتاق کشت با دمای 28°C و نوردهی دائمی قرار داده شدند و هوادهی انجام شد، سپس جذب نوری این سیانوباکتری در تیمار ۱ درصد نفت خام و تیمار شاهد در طول موج 750 nm با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر، طی ۱۲ روز، هر روز یکبار اندازه گیری و سپس میزان نرخ رشد این سیانوباکتری در تیمار شاهد و تیمار یک درصد مقایسه شد.

تاثیر نفت خام بر مقدار کلروفیل و وزن خشک سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108

به منظور بررسی اثر نفت خام بر میزان وزن خشک و مقدار کلروفیل سیانوباکتری تیمارهایی با غلظت های نفت خام $1/5$ ، 2 ، 4 و 10% درصد تهیه شد. تیماردهی در ارلن های 250 mL استریل صورت گرفت. به هر کدام از این ارلن ها محیط کشت بدون کربن به مقدار 150 mL افزوده شد. نفت خام در غلظت های $1/5$ ، 2 ، 4 و 10% درصد به محیط های کشت اضافه شد. سپس از سیانوباکتری مورد بررسی در شرایط کاملا استریل به محیط کشت افزوده شد. برای افزودن سیانوباکتری به ارلن های حاوی محیط کشت و نفت خام ابتدا ارلن های کشت مایع از پمپ هوادهی جدا شدند تا سیانوباکتری ته نشین و مترکم شود و جداسازی محیط کشت از آنها میسر شود. پس از جدا کردن محیط کشت به هر یک از محیط های کشت محتوی غلظت های مختلف نفت خام و همچنین محیط کشت شاهد که فاقد نفت خام بود 15 mL از سیانوباکتری مورد بررسی بصورت جداگانه افزوده شد.

برای سنجش مقدار کلروفیل از روش Marker و همکاران (۱۹۷۲) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا 1 mL از سوسپانسیون سیانوباکتریایی به مدت 20 min با دور 4000 rpm سانتریفیوژ شد، سپس محلول رویی جدا شده و با 1 mL متانول خالص

جدول ۱: میزان نرخ رشد سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 در تیمار یک درصد نفت خام و نمونه شاهد (۱/d).

نرخ رشد	درصد نفت خام
۰/۳۴ ± ۰/۰۲	شاهد
۰/۴۳ ± ۰/۰۱	یک درصد

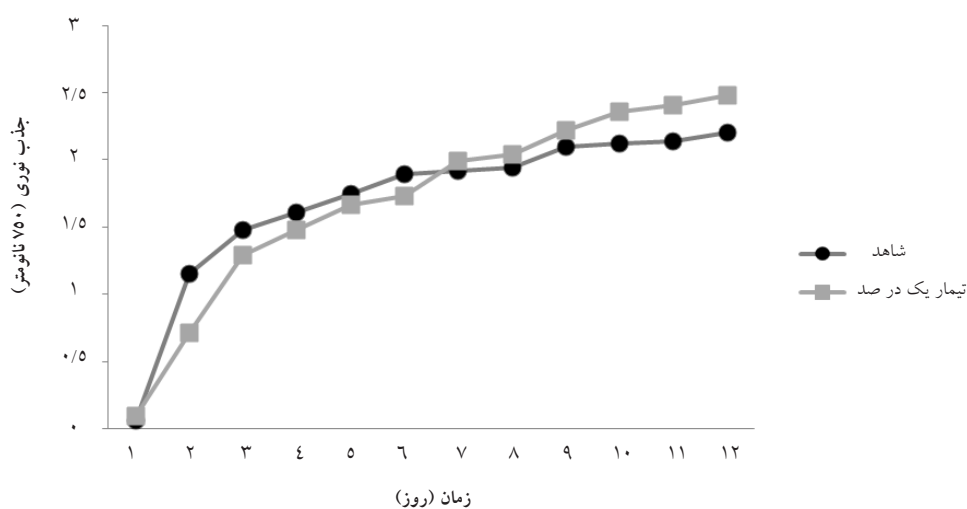
میانگین مقادیر وزن خشک در تیمارهای مختلف سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 در جدول ۲ آمده است. میانگین وزن خشک سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 در نمونه شاهد ۳/۰۷ mg/mL بود، این مقدار در تیمار ۰/۵ درصد افزایش یافت و به ۴/۱۴ mg/mL رسید، این روند افزایشی با افزودن مقادیر بالاتر نفت خام همچنان ادامه یافت تا جایی که به بالاترین میزان خود یعنی ۵/۳۴ mg/mL در تیمار ۲ درصد رسید. میانگین وزن خشک در تیمار ۴ درصد با مقداری کاهش مواجه شد و به ۴/۰۶ mg/mL رسید. نتایج حاصل از اندازه گیری محتوای کلروفیل در نمونه شاهد و نمونه های تحت تیمار با غلظت های مختلف نفت خام سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 نشان داد که، بیشترین میزان کلروفیل با میزان ۰/۵۲۸ µg/mL در نمونه شاهد مشاهده شده است. در تیمار ۰/۵ درصد نفت خام این میزان کاهش یافت و به ۰/۳۷۹ µg/mL رسید. میزان کلروفیل

آنالیزهای آماری

برای آنالیز آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. ابتدا از آزمون مقایسه میانگین چند جامعه (تحلیل واریانس) با فاصله اطمینان ۹۹ درصد استفاده گردید. از آنجا که با توجه به آزمون تحلیل واریانس بین جوامع مورد مطالعه اختلاف معنی داری مشاهده شد، لذا در این مرحله یکی از آزمون های پس از تجربه (دانکن) برای دسته بندی این متغیرها استفاده گردید. همچنین برای توصیف متغیرهای تحقیق از آمار توصیفی چون میانگین و انحراف معیار استفاده شد. نمودار ها نیز با کمک نرم افزار Microsoft Excel ۲۰۱۰ رسم شدند.

یافته ها

نمودار رشد سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 در تیمار یک درصد نفت خام و نمونه شاهد در طی ۱۲ روز نشان داد که رشد این سیانوباکتری در حضور نفت خام به عنوان تنها منبع کربن تقریباً مشابه با نمونه شاهد افزایش می یابد (شکل ۱). حداکثر نرخ رشد محاسبه شده سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 تحت تیمار یک درصد نفت خام ۱/d ۰/۴۳ بود. همچنین نرخ رشد محاسبه شده در نمونه شاهد ۱/d ۰/۳۴ بود. آنالیزهای آماری در سطح یک درصد نشان داد که بین حداکثر نرخ رشد تیمار یک درصد نفت خام این سیانوباکتری و نمونه شاهد اختلاف معنی داری وجود ندارد (جدول ۱).



شکل ۱: مقایسه رشد سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 در تیمار یک درصد و نمونه شاهد

جدول ۳: مقادیر کلروفیل سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* در تیمارهای مختلف نفت خام

درصد نفت خام	مقادیر کلروفیل ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^{**}
شاهد	0.528 ± 0.04^{cd}
۰/۵	0.379 ± 0.02^{bd}
۱	0.277 ± 0.01^{ab}
۲	0.238 ± 0.09^{ab}
۴	0.120 ± 0.01^a

* حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است.

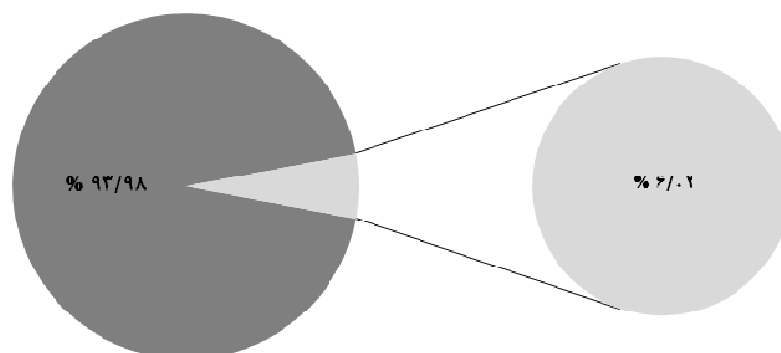
غلظت‌های گوناگون نفت خام سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* نشان داد که، بالاترین مقدار کلروفیل در نمونه شاهد و کمترین مقدار در تیمار ۴ درصد نفت خام مشاهده شد. مقدار کلروفیل در تیمار ۰/۵ درصد نفت خام نسبت به نمونه شاهد کاهش شدیدی داشته است، کاهش مقدار کلروفیل از تیمار ۰/۵ به ۴ درصد نفت خام ملایم‌تر بود. نتایج حاصل از آنالیزهای کروماتوگرافی گازی تیمارهای ۱۴ و ۲۸ روزه سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 نشان داد که، میانگین تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی در تیمارهای روز ۱۴ نسبت به نمونه شاهد به میزان ۵۴/۸۷ درصد بود. از سوی دیگر میانگین تجزیه زیستی نفت خام در روز ۲۸ افزایش شدیدی نشان داد و به مقدار ۹۳/۹۸ درصد رسید. نتایج نشان که با افزایش زمان، میزان تجزیه نفت خام توسط سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (شکل ۲).

جدول ۲: مقادیر وزن خشک سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* در تیمارهای مختلف نفت خام

درصد نفت خام	وزن خشک (mg/mL) ^{**}
شاهد	3.07 ± 0.01^c
۰/۵	4.14 ± 0.02^b
۱	5.24 ± 0.01^a
۲	5.34 ± 0.02^a
۴	4.06 ± 0.01^b

* حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است.

در تیمار ۱ درصد نفت خام نسبت به تیمار ۰/۵ درصد و نمونه شاهد کاهش یافت. کاهش میزان کلروفیل با افزایش غلظت نفت خام ادامه یافت به طوری که در تیمار ۲ درصد میزان کلروفیل به طور تقریبی به نصف این میزان در نمونه شاهد، یعنی به مقدار $0.238 \mu\text{g}/\text{mL}$ رسید. با این وجود، با افزایش غلظت نفت خام به ۴ درصد میزان کلروفیل کاهش محسوسی نشان نداد و به $0.120 \mu\text{g}/\text{mL}$ کاهش یافت (جدول ۳). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که بین میزان کلروفیل در نمونه شاهد و تیمارهای ۱، ۲ و ۴ درصد نفت خام اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج آنالیزهای آماری همچنین نشان داد که با وجود کاهش در میزان کلروفیل در تیمار ۰/۵ درصد نسبت به نمونه شاهد، اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود ندارد. همچنین با وجود کاهش در میزان کلروفیل در تیمارهای ۱، ۲ و ۴ درصد بین آنها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). تفاوت محتوای کلروفیل در



شکل ۲: میزان تجزیه نفت خام توسط سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 بعد از ۲۸ روز (درصد).

بحث

نفت خام بوده است و غلظت بالای نفت موجب مهار رشد سیانوباکتری های مورد بررسی می شود. این نتایج مطابق با یافته های Gaur و همکاران (۱۹۸۱) در بررسی تاثیر نفت خام بر وزن خشک سیانوباکتری *Anabaena doliolum* است که اظهار داشته وزن خشک این سیانوباکتری وابسته به غلظت نفت خام بوده است و با افزایش غلظت نفت خام میزان وزن خشک کاهش یافته است (۳۰). از دلایلی که برای کاهش یافتن وزن خشک در موارد تنش (فیزیکی، شیمیایی و زیستی) برشمرده می شود شکل گیری گونه های فعال اکسیژن تمام تنش های محیطی منجر به تولید گونه های فعال اکسیژن در ریز جلبک ها می شود. تولید گونه های فعال اکسیژن موجب تنش اکسیداتیو می شود. سپس تعادل بین گونه های اکسیژن فعال و فعالیت تجزیه کنندگی آنتی اکسیدان ها مختل می شود، این پدیده ای است که نتیجه آن نابودی اکسیداتیو است (۳۱). بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش میزان کلروفیل در تیمار های مختلف نفت خام، میزان این رنگیزه با افزایش نفت خام کاهش یافته است، بیشترین میزان رنگیزه در میان تیمارها در نمونه ۰/۵ درصد وجود داشت و تیمار ۴ درصد نفت خام کمترین محتوای کلروفیل را داشت. پس می توان نتیجه گرفت افزودن نفت خام به محیط کشت سیانوباکتری *Schizothrix vaginata ISC108* منجر به کاهش محتوای کلروفیلی در این سیانوباکتری شده است. کاهش در محتوای کلروفیل به دلیل تنش های مختلف می تواند به دلیل مهار بیوستز کلروفیل بوده که با مهار آلفا آمینولونیک اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز ایجاد شده است (۳۲). همچنین بر اساس نتایج Sundaram و همکاران (۲۰۱۱) آلاینده های محیطی از قبیل بنزن و تولوئن در غلظت های بالا منجر به کاهش مقدار کلروفیل و غیر فعال شدن فرآیندهای حیاتی از قبیل فتوسنتز و جذب نترات شوند (۳۳). این نتایج با تحقیقات El-Sheekh و همکاران (۲۰۱۳) و Pimda و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارند که نشان دادند با افزایش غلظت نفت خام و روغن موتور میزان کلروفیل موجود در تیمارها پس از ۱۵ روز کاهش می یابد (۳۴ و ۳۵).

بر اساس نتایج بدست آمده سیانوباکتری *Schizothrix vaginata ISC108* توانایی بالایی در تجزیه زیستی نفت

در این پژوهش به بررسی تغییرات ایجاد شده در پاسخ های فیزیولوژیک (میزان رشد، وزن خشک و مقدار کلروفیل) سیانوباکتری *Schizothrix vaginata ISC108* تحت تاثیر تیمار های مختلف نفت خام و بررسی توانایی این سیانوباکتری ها جهت تجزیه زیستی نفت خام پرداخته شده است، که یکی از محدود مطالعات صورت گرفته در زمینه استفاده صنعتی از این میکروارگانیسم ها در ایران است که با همکاری پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی (شهر تهران) انجام شده است.

بر اساس نتایج بدست آمده از اندازه گیری میزان رشد سیانوباکتری *Schizothrix vaginata ISC108* در تیمار نفت خام مشخص شد که، میزان رشد این سیانوباکتری در حضور نفت خام افزایش می یابد، به طوری که این افزایش نرخ رشد تقریباً مشابه با نمونه شاهد است، که این امر نشان دهنده مقاومت هر سه گونه سیانوباکتری نسبت به حضور نفت خام است. در مطالعه مشابه ای، Abed و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که میزان رشد سیانوباکتری *Synechocystis PCC6803* در حضور هیدروکربن های نفتی افزایش می یابد، در حالی که این افزایش رشد اختلاف معنی داری با رشد در نمونه شاهد ندارد. آنها همچنین بیان کردند که رشد خوب سیانوباکتری ها در حضور هیدروکربن ها نشان دهنده مقاومت آنها به هیدروکربن بود و بیان کردند که احتمالاً این سیانوباکتری ها قادر به حذف هیدروکربن های نفتی از محیط هستند (۲۸). Ali-Gamila و همکاران (۲۰۰۳) نیز در تحقیق خود نشان دادند که میزان رشد سویه های سیانوباکتری *Anabaena* و *Oscillatoria* در حضور نفت خام ۰/۱ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش می یابد، ولی این سویه های رشد بیشینه متفاوتی نشان دادند (۲۹).

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نفت خام میزان وزن خشک سیانوباکتری *Schizothrix vaginata ISC108* نسبت به نمونه شاهد افزایش می یابد به طوری که میزان وزن خشک در تیمارهایی با غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ درصد افزایش یافت ولی در تیمار ۴ درصد این میزان دچار کاهش می شود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که کاهش وزن خشک وابسته به غلظت

هیدروکربن ها که در حضور نور فعالیت آنها کاهش می یابد، قادر به رشد بوده و فعالیت تجزیه کنندگی آنها افزایش می یابد (۳۹). Abed و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند که سیانوباکتری ها با باکتری های تجزیه کننده نفت همکاری می کنند و توسط پلی ساکاریدهای خارج سلولی خود از شسته شدن آنها جلوگیری می کنند، همچنین آنها گزارش کردند سیانوباکتری ها برای این باکتری ها اکسیژن و نیتروژن تثبیت شده را فراهم می کنند (۴۰). این نقش غیر مستقیم سیانوباکتری ها در موفقیت مراحل پاک سازی زیستی بسیار مهم است. با این حال نتایج این مطالعه به خوبی نشان می دهد که سیانوباکتری ها قادرند به طور مستقیم نفت را تجزیه نمایند، زیرا کشت خالص سیانوباکتری *Schizothrix vaginata ISC108* در طی ۲۸ روز ۹۳/۹۸ درصد تجزیه زیستی نفت خام را نشان داد.

نتیجه گیری

در ایران در سال های اخیر، رویکرد پژوهش های جدید به سمت مسائل زیست محیطی و استفاده از میکروارگانیسم ها در صنعت داروسازی و اهداف پزشکی بوده است. با این حال، بیشتر این تحقیقات متمرکز بر میکروارگانیسم های خاصی بوده و سیانوباکتری ها با وجود تنوع فراوان در فعالیت های زیستی به جهت شناخت کمی که نسبت به این میکروارگانیسم ها وجود دارد، کمتر مورد توجه قرار گرفته اند. مطالعات در زمینه استفاده از سیانوباکتری ها به عنوان منابع طبیعی برای تجزیه زیستی آلاینده های نفتی در کشور بسیار کم بوده است و مطالعه حاضر، جزو اولین تحقیقات انجام گرفته در ایران است. در این مطالعه مشخص شد که سیانوباکتری *Schizothrix vaginata ISC108* دارای توانایی بالایی جهت تجزیه زیستی نفت خام است، به طوری که براساس نتایج حاصل می تواند ۹۳/۹۸ درصد نفت خام را تجزیه کند. مشاهدات فیزیولوژیکی و بررسی های گاز کروماتوگرافی، این نظر را تایید می کند که سیانوباکتری مورد مطالعه قادر است از هیدروکربن های نفتی به عنوان منبع کربن استفاده کند و آنها را به ترکیبات ساده تر تجزیه نماید. لذا از آنجایی که نفت یک فرآورده سمی برای سیستم های بیولوژیک و یکی از آلوده کننده های اصلی اکوسیستم های زیستی محسوب می شود و آلودگی های نفتی اثرات مضر بر روی انسان و سایر

خام دارد، به طوری که قادر است بیش از ۹۳ درصد از نفت خام را تجزیه کند. در مطالعات مشابهی در مورد تجزیه زیستی نفت خام و هیدروکربن های نفتی توسط سیانوباکتری ها El-Sheekh و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی تجزیه زیستی نفت خام توسط سیانوباکتری ها نشان دادند که دو گونه سیانوباکتری *Nostoc punctiforme* و *Spirulina platensis* قادرند نفت خام را تجزیه نمایند به طوری که حداکثر رشد و تجزیه نفت را در غلظت ۰/۵ درصد نشان دادند (۳۴). آنها بیان کردند که این سیانوباکتری ها قادرند ترکیبات آلیفاتیک را به ترکیبات آروماتیک تجزیه نمایند. در مطالعه دیگری El-Sheekh و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند سیانوباکتری *Scenedesmus obliquus* و ریزجلبک *Chlorella vulgaris* دارای پتانسیل بالایی در تجزیه زیستی نفت خام در غلظت های ۰/۵ و ۱ درصد هستند. آنها بیان کردند که این ریز جلبک ها قادرند n-آلکان ها و سایر هیدروکربن های نفتی و ترکیبات آروماتیک مثل فنول را به ترکیبات ساده تری تجزیه نمایند (۱۰).

با این حال، امروزه نقش سیانوباکتری ها در تجزیه هیدروکربن های نفتی مورد بحث قرار گرفته است. برخی از مطالعات نشان می دهد که این میکروارگانیسم ها دارای پتانسیل فراوانی در تجزیه هیدروکربن های نفتی هستند (۲۱ و ۳۶)، در حالی که برخی از تحقیقات نیز به این نتیجه رسیده اند که ممکن است باکتری های هتروتروف با مشارکت فعال سیانوباکتری ها تجزیه هیدروکربن های نفتی را انجام دهند (۳۷ و ۳۸). برای مثال Chaillan و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه خود در مورد نقش سیانوباکتری ها در تجزیه زیستی نفت خام با استفاده از توده های میکروبی نشان دادند که توده های تشکیل شده توسط سیانوباکتری *Phormidium animale* مستقیماً توانایی تجزیه هیدروکربن های نفتی را ندارند، با این حال، سایر میکروارگانیسم های موجود در این توده ها قادر به تجزیه زیستی نفت خام هستند (۱۸). Hoehler و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که سیانوباکتری ها در این توده ها با مشارکت در چرخه های اسیدهای آلی و هیدروژن انرژی لازم برای میکروارگانیسم های تجزیه کننده هیدروکربن ها را فراهم می کنند. آنها همچنین بیان کردند که با وجود سیانوباکتری ها در این توده ها، برخی از میکروارگانیسم های تجزیه کننده

موجودات زنده دارد، نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر پتانسیل سیانوباکتری *Schizothrix vaginata ISC108* برای استفاده از آن به‌عنوان شاخصی جهت رفع آلودگی‌های نفتی در مناطق آلوده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان «بررسی اثرات ضد میکروبی و تجزیه زیستی نفت خام توسط سیانوباکتری‌ها» در مقطع کارشناسی ارشد مصوب سال ۱۳۹۰ و کد ۱۰۶۵۸۳۹ است که با حمایت دانشگاه ایلام و همکاری گروه میکروبیولوژی نفت پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی (شهر تهران) اجرا شده است.

منابع

- 1- Hassanshahian M, Emtiazi G, Kermanshahi RK, Cappello S. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. *Soil and Sediment Contamination*. 2010;19(3):277-91.
- 2- Cappello S, Crisari A, Hassanshahian M, Genovese M, Santisi S, Yakimov M. Effect of a bioemulsificant exopolysaccharide (EPS2003) on abundance and vitality of marine bacteria. *Water, Air and Soil Pollution*. 2012;223(7):3903-09.
- 3- Ma F, Shi SN, Sun TH, Li A, Zhou JT, Qu YY. Biotransformation of benzene and toluene to catechols by phenol hydroxylase from *Arthrobacter* sp. W1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(11):5097-103.
- 4- Almasi A, Pirsaeheb M, Dargahi A. The efficiency of anaerobic wastewater stabilization pond in removing phenol from Kermanshah oil refinery wastewater. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2012;5(1):41-50 (in Persian).
- 5- Kästner M. Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. In: Rehm HJ, Reed G, Pühler A, Stadler P, editors. *Biotechnology Set, Part XIb: Environmental processes, II - I General aspects*. 2nd ed. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2008.
- 6- Rashid Ashmogh F, Rezaei Kalantary R, Farzadkia M, Joneidy Jafari A, Nabizadeh R. Survey of Phenanthrene Biodegradations Model in Contaminated Soils by *Acinetobacter* SP. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2009;2(3):196-203 (in Persian).
- 7- Di Gennaro P, Franzetti A, Bestetti G, Lasagni M, Pitea D, Collina E. Slurry phase bioremediation of PAHs in industrial landfill samples at laboratory scale. *Waste Management*. 2008;28(8):1338-45.
- 8- Talaie Khozani AR, Jafarzadeh-Haghighi Fard N, Talaie Khozani MR, Beheshti M. The determination of bio-kinetic coefficients of crude oil biodegradation using *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2010; 3(2): 111-122 (in Persian).
- 9- Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 2012;64(1):7-12.
- 10- El-Sheekh MM, Hamouda RA, Nizam AA. Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013;82:67-72.
- 11- Chen B, Ding J. Biosorption and biodegradation of phenanthrene and pyrene in sterilized and unsterilized soil slurry systems stimulated by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*. 2012;229:159-69.
- 12- Chackoshian Khorasani A-R, Mashreghi M, Yaghmaei S. Investigating biodegradation of heavy fuel oil by kinetic models and new third parametric equation. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2014;6(3):307-18 (in Persian).
- 13- Erdogan EE, Karaca A. Bioremediation of crude oil polluted soils. *Asian Journal of Biotechnology*. 2011;3(3):206-13.
- 14- Xu R, Obbard JP. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments. *Journal of Environmental Quality*. 2003;32(4):1234-43.
- 15- Hassanshahian M, Hassanshahian O, Emtiazi G. Optimization of biodegradation of crude oil by *Acinetobacter calcoacticus* BS and *Pseudomonas aeruginosa* AS bacteria isolated from Persian Gulf. *Petroleum Research*. 2010;20(63):72-82 (in Persian).
- 16- Abed RM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;106(1):1-12.
- 17- Patel A, Pawar R, Mishra S, Tewari A. Exploitation of marine cyanobacteria for removal of color from distillery effluent. *Indian Journal of Environmental Protection*. 2001;21(12):1118-21.
- 18- Chaillan F, Gugger M, Saliot A, Coute A, Oudot J. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere*. 2006;62(10):1574-82.
- 19- Ellis BE. Degradation of phenolic compounds by freshwater algae. *Plant Science Letters*. 1977;8(3):213-16.
- 20- Kuritz T. and Wolk CP. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic

- pollutants. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61(1):234-38.
- 21- Raghukumar C, Vipparty V, David JJ, Chandramohan D. Degradation of crude oil by cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;57(3):433-36.
- 22- Ibraheem IBM. Biodegradation of hydrocarbons by cyanobacteria. *Journal of Phycology*. 2010;46(4):818-24.
- 23- Andersen RA. *Algal Culturing Techniques*. Oxford: Elsevier Academic Press; 2005.
- 24- Allen MM, Stanier RY. Growth and division of some unicellular blue-green algae. *Journal of General Microbiology*. 1968;51(2):199-202.
- 25- Soltani N, Khavari-Nejad RA, Yazdi MT, Shokravi S, Fernández-Valiente E. Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. *Pharmaceutical Biology*. 2005;43(5):455-59.
- 26- Marker AFH. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*. 1972;2(4):361-85.
- 27- Leganés F, Sánchez-Maeso E, Fernández-Valiente E. Effect of indoleacetic acid on growth and dinitrogen fixation in cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology*. 1987;28(3):529-33.
- 28- Abed RM. Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2010;64(1):58-64.
- 29- Gamila HA, Ibrahim M, El-Ghafar HA. The role of cyanobacterial isolated strains in the biodegradation of crude oil. *International Journal of Environmental Studies*. 2003;60(5):435-44.
- 30- Gaur J, Kumar H. Growth response of four micro-algae to three crude oils and a furnace oil. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*. 1981;25(1):77-85.
- 31- Kumar S, Habib K, Fatma T. Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen-fixing cyanobacteria. *Science of the Total Environment*. 2008;403(1):130-38.
- 32- Ouzounidou G. Effect of copper on germination and seedling growth of *Minuati*, *Silene*, *Alyssum* and *Thlaspi*. *Biologia Plantarum*. 1995;37(3):411-16.
- 33- Sundaram S, Soumya K. Study of physiological and biochemical alterations in cyanobacterium under organic stress. *American Journal of Plant Physiology*. 2011;6:1-16.
- 34- El-Sheekh M, Hamouda R. Biodegradation of crude oil by some cyanobacteria under heterotrophic conditions. *Desalination and Water Treatment*. 2014;52(7-9):1448-54.
- 35- Pimda W, Bunnag S. Biodegradation of used motor oil by *Nostoc piscinale* TISTR 8401. *African Journal of Microbiology Research*. 2012;6(10):2367-72.
- 36- Abed RM, Köster J. The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2005;55(1):29-37.
- 37- Hoehler TM, Bebout BM, Des Marais DJ. The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature*. 2001;412(6844):324-27.
- 38- vAbed RM, Safi NM, Köster J, de Beer D, El-Nahhal Y, Rullkötter J, et al. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(4):1674-83.

The potential of cyanobacterium *Schizothrix vaginata* ISC108 in biodegradation of crude oil

M. Safari^{1*}, S. Ahmady-Asbchin², N. Soltani³

¹Department of biology, Faculty of Basic Science, Ilam University, Ilam, Iran

²Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Science, Mazandaran University, Babolsar, Iran

³Department of petroleum microbiology, Research Institute of applied science, ACECR, Tehran, Iran

Received; 12 May 2014

Accepted; 9 August 2014

Abstract

Background and Objective: Petroleum hydrocarbons are a bunch of pollutants hazardous to the environment. Nowadays, biodegradation of petroleum contaminants is considered as one of the most efficient and most cost effective methods of removing oil contamination from the environment. The main objective of this study is to investigate the potential of cyanobacterium *Schizothrix vaginata* ISC108 in the biodegradation of crude oil and to evaluate oil effects on growth rates, dry weight, and chlorophyll content.

Material and Methods: In this experimental study, the cyanobacterium *Schizothrix vaginata* ISC108 was obtained from the algal culture collection of Research Institute of Applied Science, ACECR, Tehran, Iran. First, purification of the cyanobacterium was performed using agar plate method on solid medium of BG11. Growth rate, chlorophyll content and dry weight of cyanobacteria was measured using spectrophotometry method. The biodegradation rate of crude oil was calculated using gas chromatography (GC) analysis.

Results: Measuring the growth rate of cyanobacterium *Schizothrix vaginata* at 1% treatment of crude oil and control samples showed that the growth of cyanobacterium in the presence of crude oil as the sole carbon source increases at the same rate as the control sample. Moreover, it was found that increasing the concentration of crude oil will result in increasing dry weight of *Schizothrix vaginata*; however, and the chlorophyll content reduced in various crude oil treatments. The average biodegradation of petroleum hydrocarbon after 14 and 28 days of treatment was 54.78 and 93.98% respectively.

Conclusions: It was found that cyanobacterium *Schizothrix vaginata* ISC108 has great potential in biodegradation of crude oil. Therefore, since oil is a product toxic to biological systems and is one of the main pollutants of bioecosystem, it has a great potential to be used as an indicator to eliminate pollution in contaminated areas.

Keywords: Cyanobacteria, Biodegradable, Crude oil, Carcinogenicity, Gas chromatography

*Corresponding Author: m.safari@mail.ilam.ac.ir

Tel: +989367263245