بررسی توانایی سیانوباکتری *Fischerellaambigua ISC67* در تجزیه زیستی نفت خام

معین صفری [۱]، سلمان احمدی اسبچین [۲] و ندا سلطانی [۳]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، ایران

۳- پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۸

چکیده

هدف اصلی از این مطالعه بررسی توانایی سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در تجزیه زیستی نفت خام و اثر نفت خام بر پاسخ‌های فیزیولوژیک این سیانوباکتر می‌باشد. در این مطالعه تجربی، سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* از کلکسیون ریز جلبک‌ها تهیه شد. نرخ رشد سیانوباکتری در آزمایه ۱٪ نفت خام در طول موج ۷۵۰ nm و مقدار کلروفیل در آزمایه های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴٪ نفت خام در طول موج ۶۶۵ nm با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک، با استفاده از کاغذ صافی‌های وزن شده، سیانوباکتر از محیط کشت جدا گردید و پس از خشک شدن وزن آنها اندازه‌گیری شد. میزان تجزیه نفت خام به روش آنالیز کروماتوگرافی گازی محاسبه گردید. نتایج نشان داد که رشد این سیانوباکتری در حضور نفت خام تقریباً مشابه با نمونه شاهد افزایش می‌یابد، به طوری که این افزایش نرخ رشد تقریباً مشابه و گاهی کمتر از نمونه شاهد می‌باشد. همچنین با افزایش غلظت نفت خام، میزان وزن خشک سیانوباکتری در آزمایه های ۰/۵ و ۲٪ نسبت به نمونه شاهد افزایش و میزان کلروفیل در آزمایه‌های مختلف نفت خام کاهش می‌یابد. میانگین تجزیه زیستی هیدرکربن‌های نفتی در آزمایه های روز ۱۴ نسبت به نمونه شاهد ۴۲/۳۲٪ و در روز ۲۸ به مقدار ۵۴/۲۱٪ بود. در این مطالعه مشخص شد که سیانوباکتری *Fischerella ambigua* دارای توانایی بالایی در تجزیه زیستی نفت خام است. لذا نتایج حاصل، بیان‌گر قابلیت کاربرد این سیانوباکتری به‌عنوان شاخصی جهت رفع آلودگی‌های نفتی در مناطق آلوده می‌باشد.

کلمات کلیدی: سیانوباکتری، تجزیه زیستی، نفت خام، کلروفیل، کروماتوگرافی گازی

*مسؤول مکاتبات

آدرس الکترونیکی safari_moein@yahoo.com

مقدمه

رشد روز افزون فعالیت‌های صنعتی از یک سو و عدم رعایت الزامات زیست محیطی از سوی دیگر موجب شده طی چند دهه اخیر مقادیر زیادی از آلاینده‌های نفتی وارد محیط زیست شوند [۱]. نفت خام اساساً از هیدروکربن‌ها تشکیل شده است. این هیدروکربن ها که تعداد اتم کربن‌شان بین ۱ تا ۵۰ می‌باشد، در سه گروه پارافینی (آلکان‌ها)، نفتنی (سیکلوآلکان‌ها) و آروماتیک قرار می‌گیرند. علاوه بر هیدروکربن‌ها، نفت دارای مقدار کمی ترکیبات آلی گوگرددار، نیتروژن‌دار و اکسیژن‌دار و مقدار بسیار جزئی ترکیبات آلی فلزی با پایه نیکل، وانادیم و آهن می‌باشد. همچنین مقادیری از نمک، آب و سولفید هیدروژن در نفت خام وجود دارد. نفت خام ممکن است در اثر عواملی به رنگ‌های زرد، سبز، قهوه‌ای، قهوه‌ای تیره تا سیاه با ویسکوزیته متغیر مشاهده گردد. نفت خام در سطح زمین دارای ویسکوزیته بیشتری است و در اصطلاح ویسکوزتر است. تعداد ترکیبات مولکولی نفت خام وابسته به عواملی همچون سن زمین‌شناسی، عمق و منشا تشکیل و موقعیت جغرافیایی می‌باشد. ارزش اقتصادی نفت خام بر مبنای وزن مخصوص آن سنجیده می‌شود. لذا نحوه محاسبه وزن مخصوص مهم است. در اکثر کشورهای جهان، وزن مخصوص نفت خام برحسب درجه A.P.I که یک درجه‌بندی آمریکایی است، بیان می‌شود. مشابه همین درجه‌بندی و سنجش، وزن مخصوص نفت خام در کشورهای اروپایی با درجه‌بندی Baume بیان می‌گردد که از لحاظ مقدار اندکی از درجه A.P.I کمتر است. تغییرات دما سبب تغییر در وزن مخصوص نفت خام می‌شود، یعنی با بالارفتن دما، وزن مخصوص کمتر شده و به درجه A.P.I افزوده می‌شود. همچنین افزایش درجه حرارت اثر معکوس بر روی ویسکوزیته نفت خام می‌گذارد. A.P.I. نفت سنگین در محدوده ۱۰-۲۰ درجه، A.P.I. نفت متوسط در محدوده ۲۰-۳۰ درجه و A.P.I. نفت سبک بیش از ۳۰ درجه می‌باشد [۲].

هیدروکربن‌های موجود در نفت خام با وزن مولکولی کم از قبیل نفتالن و بنزن و مشتقات آنها انحلال‌پذیری بالایی در آب دارند. بنابراین موجودات زنده، در اثر تماس با آب حاوی این مواد، دچار مسمومیت می‌شوند. در سال‌های اخیر آلودگی برخی از منابع آبی به هیدروکربن‌های نفتی به عنوان یکی از بزرگ‌ترین معضلات زیست محیطی در ایران مطرح می‌باشد. آلودگی‌های نفتی منجر به تجمع اجزای تشکیل‌دهنده نفت خام در انسان و حیوانات دریایی می‌شود. تجمع این هیدروکربن‌ها در بدن انسان به علت سمیت، جهش‌زایی و سرطان‌زایی منجر به نگرانی‌های بسیاری شده است [۳]. هیدروکربن‌های جذب شده بیشتر در بافت‌هایی مثل جگر و پانکراس، کیسه صفرا، لیپوپروتئین در پلاسما و تمام بافت‌های پوستی و عصبی که ذخیره چربی دارند، تجمع می‌یابند. این هیدروکربن‌ها از طریق تاثیر گذاردن بر مکانیسم‌های سلولی، موجب تغییرات پوستی و فساد نسوج زنده می‌شوند [۴]. ترکیبات نفتی اثرات جبران ناپذیری برسیستم اعصاب مرکزی و پلی‌نروپاتی می‌گذارند [۵]. نفت شامل بسیاری از ترکیبات شیمیایی فرار و سمی است که استنشاق برخی از آنان توسط زنان باردار موجب تولد نوزاد نارس، نوزاد با وزن کم و یا سقط جنین می‌گردد [۶]. مسأله آلودگی‌های نفتی منتشر شده در محیط زیست از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است: به گونه‌ای که در چند دهه اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران را در رشته‌های مختلفی چون مهندسی دریا، مهندسی پتروشیمی، مهندسی شیمی، زیست‌شناسی و مهندسی محیط زیست به خود جلب کرده است. بنابراین امروزه مطالعه بر روی اثرات سوء آلودگی‌های نفتی و راه‌های حذف و کاهش آنها از محیط زیست بسیار حائز اهمیت است.

روش‌های مختلفی برای پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی و مشتقات آن وجود دارد که این روش‌ها در سه دسته کلی فیزیکی، شیمیایی و زیستی

دسته‌بندی می‌شود. روش‌های زیستی که به طور معمول شامل تبدیل آلودگی‌ها به مواد غیرسمی با استفاده از فرآیندهای میکروبی است، مؤثرتر و بی‌ضررتر از روش‌های فیزیکی و شیمیایی به نظر می‌باشد [۷]. هر چند روش‌های فیزیکوشیمیایی در کاهش تاثیرات سوء ترکیبات نفتی بر اکوسیستم‌ها تأثیر گذارند، ولی قادر به حذف کامل ترکیبات نفتی از محیط نیستند. روش‌های زیستی ضمن سازگاری با محیط زیست، از نظر اقتصادی نیز نسبت به دیگر روش‌های پاک‌سازی برتری دارند [۸]. در حال حاضر تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی به عنوان یکی از کارآمدترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌ها در رفع آلودگی‌های نفتی از محیط به حساب می‌آید [۹]. مکانیسم کلی تجزیه زیستی بدین صورت است که میکروب‌ها و باکتری‌ها به قطرات نفتی حمله‌ور شده و پس از در برگرفتن آنها و یا به اصطلاح خوردن قطرات، تجزیه و هضم اجزاء آغاز می‌شود. و در نهایت آب و گازهای بی‌خطری چون دی اکسیدکربن تولید می‌شود [۱۰]. عوامل متعددی بر روی میزان تجزیه‌زیستی نفت خام در محیط‌های دریایی تاثیر می‌گذارد. از جمله این عوامل می‌توان به عوامل طبیعی، اکسیژن، موجودات زنده، نیتروژن، فسفر، دما و pH اشاره کرد [۱۱]. شناخت عوامل تاثیرگذار بر میزان تجزیه‌زیستی برای تعیین راهبردهای اساسی به منظور طراحی سیستم‌های زیست سالم‌سازی و بهبود جمعیت میکروبی دارای اهمیت خاصی است [۱۲]. امروزه روش‌های زیستی در کشورهای صنعتی نظیر آمریکا، ژاپن، آلمان، انگلستان، کره جنوبی و روسیه به طور معمول استفاده می‌شود و در سایر کشورها به خصوص حوزه خلیج فارس از جمله ایران در مرحله تحقیقاتی است. در حال حاضر حدود ۷۹ جنس از باکتری‌ها شناسایی شده‌اند که توانایی استفاده از هیدروکربن به عنوان منبع کربن و انرژی را دارا می‌باشند.، همچنین ۹ جنس سیانوباکتری، ۱۰۳ جنس قارچ و ۱۴ جنس جلبک با توانایی تجزیه یا تبدیل هیدروکربن‌ها شناسایی شده‌اند [۸]. سیانوباکتری‌ها در سال‌های اخیر به دلیل قابلیت استفاده در بیوتکنولوژی بسیار مورد توجه قرارگرفته است [۱۳]. ایده استفاده از سیانوباکتری‌ها در صنعت، اولین بار در حدود شش دهه قبل مطرح شد و از آن زمان به بعد گزارش‌های متعددی در مورد استفاده از آنها در فرآیند پاک‌سازی زیستی فاضلاب‌ها، آب‌ها و خاک‌های آلوده به آلاینده‌ها سمی گزارش شده است [۱۴]. یکی از مهم‌ترین کاربردهای سیانوباکتری‌ها در صنعت نفت است که این موجودات هم در تشکیل و هم در تجزیه این ترکیبات نقش دارند [۱۵]. مطالعات اولیه محققان نشان داده که عموماً سیانوباکتری‌ها دارای اثرات مفیدی در کاهش آلودگی‌های ناشی از نشت نفت می‌باشد و مداخله این میکروارگانیسم‌ها از طریق فرآیندهای فیزیکی و یا شیمیایی چندان پیچیده نیست [۱۶]. کوریتز و ولک در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که سیانوباکتری‌های .Anabaena sp و *Nostoc ellipsosporum* دارای توانایی طبیعی تجزیه ترکیبات آلیفاتیک سمی می‌باشند [۱۷]. راگوکومار و همکاران در سال ۲۰۰۱ تجزیه زیستی نفت خام توسط سیانوباکتری‌های دریایی را بررسی کردند و دریافتند که در حدود ۴۵ تا ۵۵٪ ترکیبات اصلی نفت خام در حضور سیانوباکتری‌ها طی ۱۰ روز حذف می‌شوند [۱۸]. میزان حساسیت گونه‌های سیانوباکتریایی نسبت به آلودگی‌ها متفاوت است. در بیشتر موارد حضور آلودگی‌های نفتی سبب افزایش رشد سیانوباکتری‌ها می‌شود. این امر نشان می‌دهد که این میکروارگانیسم‌ها به احتمال زیاد قادر به تجزیه و استفاده از این ترکیبات می‌باشند [۸]. همچنین مطالعات محققین نشان داده که این میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه زیستی نفت خام و سایر ترکیبات هیدروکربنی می‌باشند [۸ و ۱۹]. از این رو، با توجه به گسترش آلودگی‌های نفتی در نواحی متعددی از دنیا، شناسایی سیانوباکتری‌های توانمند و همچنین بررسی توانایی آنها در حذف آلودگی‌های

نفتی دارای اهمیت خاصی است. با این وجود، در کشور ایران تاکنون مطالعات کاربردی چندانی در زمینه بررسی توانایی این میکروارگانیسم‌ها در رفع آلودگی‌های نفتی، انجام نشده است. هدف اصلی از این مطالعه بررسی توانایی سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در تجزیه زیستی نفت خام و اثر نفت خام بر پاسخ های فیزیولوژیک، میزان رشد، مقدار رنگ دانه‌ها و وزن خشک این سیانوباکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت و خالص‌سازی سیانوباکتری

در این مطالعه تجربی، سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* از کلکسیون ریز جلبک‌ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی تهران تهیه شد. ابتدا جهت اطمینان از خالص بودن نمونه، خالص سازی سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* به روش پلیت آگار بر روی محیط کشت جامد BG11 انجام شد [۲۰]. محیط کشت BG11 رایج ترین محیط کشت مورد استفاده برای سیانوباکتری‌ها است که در هر لیتر حاوی ۱۵۰ mg $NaNO_3$، ۷۵ میلی‌گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۶ میلی‌گرم $CaCl_2\ 2H_2O$، ۶ میلی‌گرم Citric Acid ، ۶ میلی‌گرم Ferric ammonium citrate، ۱ میلی‌گرم EDTA (TriplexIII)، ۲۰ میلی‌گرم Na_2CO_3 و ۱ میلی لیتر محلول trace metal mix می‌باشد [۲۱]. برای تهیه محیط کشت جامد، ۱۵ g آگار به محیط کشت مایع BG11 اضافه شد و پس از ۲۰ min اتوکلاو شدن در دمای ۱۲۰ °C، به ظروف پتری منتقل شد. پس از سرد شدن محیط کشت جامد، کلنی‌های سیانوباکتری‌ها توسط لوپ به صورت زیگزاگی روی آن کشت داده شد. این کار برای به دست آوردن کلنی‌های خالص سیانوباکتری‌ها چندین بار تکرار گردید و هر بار کلنی‌هایی که نیاز به کشت دوباره داشتند، از طریق 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، پس از اطمینان از خالص بودن کلنی‌های موجود در کشت جامد، کلنی‌ها به محیط کشت مایع BG11 منتقل گردید و در اتاقک رشد تحت هوادهی و تابش نور مداوم در دمای ۲۸±۲ °C نگهداری شدند نور سفید با لامپ‌های فلورسانت به میزان نور ۶۰ $\mu mol/m^2\ s$ فوتون تامین شد. دمای اتاق کشت توسط ترموستات در ۲۵ تا ۳۰ °C تثبیت گردید. هوادهی نمونه‌ها توسط پمپ هوای فیلتر دار و از طریق لوله و پیپت اتوکلاو شده انجام شد تا هوای ورودی به ارلن‌ها کاملاً استریل باشد [۲۲].

تاثیر نفت خام بر میزان رشد سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67*

در این تحقیق، نفت خام تهیه شده از مخازن نفتی نفت شهر کرمانشاه (چاه ۲۵) به مدت ۲۰ min در دمای ۱۲۰ °C در اتوکلاو استریل شد و پس از سرد شدن برای تهیه آزمایه استفاده گردید. برای تهیه آزمایه سیانوباکتری مورد بررسی، منبع کربن ($NaCO_3$) از ترکیبات محیط کشت BG11 حذف شد و برای جبران کمبود سدیم، NaCl با غلظت ۴۰ mgL^{-1} به آن افزوده شد. این محیط کشت در pH=۷ توسط pH متر تنظیم گردید و سپس در اتوکلاو استریل شد [۸]. به منظور بررسی میزان رشد سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* آزمایه‌هایی با غلظت ۱٪ نفت خام و همچنین آزمایه شاهد (بدون نفت خام) تهیه شد. ارلن‌های حاوی سیانوباکتری‌های آزمایه داده شده در اتاق کشت با دمای ۲۸ ºC و نوردهی دائمی قرار داده شد و هوادهی انجام گرفت. سپس جذب نوری سیانوباکتری در آزمایه ۱٪ نفت خام و آزمایه شاهد در طول موج ۷۵۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر طی ۱۲ روز به صورت روزانه هر روز یک‌بار اندازه‌گیری شد. در پایان میزان نرخ رشد سیانوباکتری در آزمایه شاهد و آزمایه ۱٪ براساس رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\mu = \frac{\mathrm{Ln(OD8th) - Ln\,(OD6th)}}{t_2 - t_1} \qquad (۱)$$

تاثیر نفت خام بر مقدار کلروفیل و وزن خشک سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67*

به منظور بررسی اثر نفت خام بر میزان وزن خشک و مقدار کلروفیل سیانوباکتری آزمایه هایی با غلظت‌های نفت خام ۰/۵، ۱، ۲ و ۴٪ تهیه شد. آماده‌سازی آزمایه در ارلن‌های ۲۵۰ mL استریل صورت گرفت. به هر کدام از این ارلن‌ها محیط کشت بدون کربن به مقدار ۱۵۰ ml افزوده شد. نفت خام با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴٪ به محیط‌های کشت اضافه شد. سپس سیانوباکتری مورد بررسی در شرایط کاملا استریل به محیط کشت وارد گردید. برای افزودن سیانوباکتری به ارلن‌های حاوی محیط کشت و نفت خام، ابتدا ارلن‌های کشت مایع از پمپ هوادهی جدا گردید تا سیانوباکتری ته نشین و متراکم شده و از محیط کشت جدا نمود. پس از جدا سازی محیط کشت، به هر یک از محیط‌های کشت محتوی غلظت‌های مختلف نفت خام و همچنین محیط کشت شاهد فاقد نفت خام، ۱۵ ml از سیانوباکتری مورد بررسی به صورت جداگانه افزوده شد.

برای سنجش مقدارکلروفیل از روش مارکر [۲۳] استفاده گردید. بدین ترتیب که ابتدا ۱ mL از سوسپانسیون سیانوباکتریایی به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، سپس محلول فوقانی جدا شده و با ۱ mL متانول خالص جایگزین گردید. نمونه به مدت یک روز در دمای ۴ ºC قرار داده شد. به منظور جداسازی عصاره متانول از سانتریفیوژ استفاده شد. سپس جذب نوری این عصاره در طول موج ۶۶۵ nm اندازه گیری گردید و با استفاده از رابطه زیر مقدار کلروفیل بر حسب µg/mL محاسبه شد [۲۳]:

$$C_{chl}=13.14\times OD_{665} \quad (۲)$$

برای اندازه‌گیری وزن خشک مطابق روش لیگانس و همکاران [۲۴]، با استفاده از کاغذ صافی‌های وزن شده، سیانوباکتری از محیط کشت جدا گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ ºC قرار گرفته و وزن آنها اندازه‌گیری شد [۲۴].

بررسی توانایی سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* **در تجزیه زیستی نفت خام**

به منظور بررسی توانایی سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در تجزیه زیستی نفت خام، محیط کشت BG11 فاقدکربن تهیه شد. پس از تنظیم pH محیط کشت در عدد ۷ توسط pH متر، محیط کشت آماده شده در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ °C استریل شد. میزان فعالیت تجزیه‌ای این سیانوباکتری با استفاده از روش آنالیز کروماتوگرافی گازی (GC) تعیین گردید [۱۵].

ابتدا برای تهیه آزمایه به ارلن‌های استریل با حجم ۵۰۰ mL، ۳۰۰ mL از محیط کشت BG11 فاقد کربن اضافه شد. سپس نفت خام با غلظت ۱٪ به ارلن‌ها افزوده شد. به ارلن حاوی محیط کشت و ۱٪ نفت خام، ۳۰ mL از سیانوباکتری رشد کرده اضافه شد. سه آزمایه نفتی به همراه یک شاهد برای ۱۴ روز و سه آزمایه نفتی و یک شاهد برای ۲۸ روز آماده گردید. آزمایه‌های تهیه شده برای انجام روش کروماتوگرافی گازی (GC) در اتاقک رشد نگهداری شد و تحت هوادهی و تابش دائمی نور قرار گرفت. به منظور آماده‌سازی آزمایه‌ها جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی، آزمایه‌ها پس از سپری شدن ۱۴ و ۲۸ روز از پمپ هوا جدا شد. تمام نمونه‌ها ابتدا ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و با ۱۰ mL n-هگزان چندین بار شستشو داده شد و عصاره‌گیری گردید. استخراج با استفاده از قیف دکانتور انجام شد و در نهایت ۱ mL از نمونه داخل ویال اتوسمپلر ریخته شده و ۰/۰۳ µl از آن به دستگاه تزریق شد.

آنالیزهای آماری

برای آنالیزآماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. همچنین برای توصیف متغیرهای تحقیق از پارامترهای آمار توصیفی مانند میانگین و انحراف معیار استفاده گردید.ا

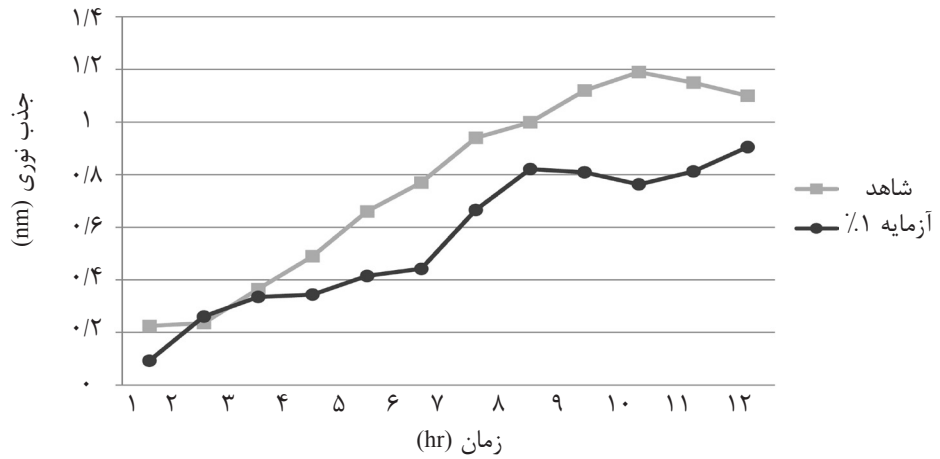
نتایج و بحث

نمودار رشد سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در آزمایه ۱٪ نفت خام و نمونه شاهد طی ۱۲ روز نشان داد که رشد این سیانوباکتری در حضور نفت خام، به عنوان تنها منبع کربن نسبت خوبی داشته است (شکل ۱). حداکثر نرخ رشد محاسبه شده سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* تحت آزمایه ۱٪ نفت خام $0/21\ d^{-1}$ بود. همچنین نرخ رشد محاسبه شده در نمونه شاهد $0/12\ d^{-1}$ بود. مقدار ضریب رشد ویژه آزمایه یک درصد $1/22\ d^{-1}$ به دست آمد. آنالیزهای آماری در سطح ۱٪ نشان داد که بین حداکثر نرخ رشد آزمایه ۱٪ نفت خام این سیانوباکتری و نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۱).

میانگین مقادیر وزن خشک در آزمایه های مختلف سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین وزن خشک سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در نمونه شاهد ۴/۴۳ mg/ml بود. این مقدار در آزمایه ۰/۵٪ افزایش یافت و به بالاترین میزان خود ۵/۴۷ mg/mL رسید. این روند افزایشی با افزودن مقادیر بالاتر نفت خام همچنان ادامه یافت و در آزمایه ۲٪ به ۴/۹۱ mg/mL رسید. میانگین وزن خشک در آزمایه ۱ و ۴ ٪ با مقداری کاهش مواجه شد.

جدول ۱- میزان نرخ رشد سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در آزمایه ۱٪ نفت خام و نمونه شاهد

نرخ رشد (d^{-1})	درصد نفت خام
۰/۰۱۲ ± ۰/۰۱	شاهد
۰/۰۲۱ ± ۰/۰۳	٪۱



شکل ۱- مقایسه رشد سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در آزمایه ۱٪ و نمونه شاهد

جدول ۲- مقادیر وزن خشک سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در آزمایه‌های مختلف نفت خام

وزن خشک ($mg\ mL^{-1}$)	درصد نفت خام
۴/۰۴۳±۰/۳ [a]	شاهد
۵/۴۷ ± ۰/۰۳ [a]	۰/۵
۴/۷۱ ± ۰/۰۱ [a]	۱
۴/۹۱ ± ۰/۰۴ [a]	۲
۴/۷۲ ± ۰/۱۴ [a]	۴

[a] حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است

نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای کلروفیل در نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نفت خام سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل به مقدار ۰/۶۴۲ µg/mL در نمونه شاهد مشاهده شده است. در تیمار ۰/۵٪ نفت خام این میزان کاهش یافت و به ۰/۵۱۱ µg/mL رسید. میزان کلروفیل در تیمار ۱٪ نفت خام نسبت به تیمار ۰/۵٪ و نمونه شاهد کاسته شد که روند کاهش میزان کلروفیل با افزایش غلظت نفت خام، ادامه یافت. به گونه‌ای که در تیمار ۲٪ میزان کلروفیل به طور تقریبی به نصف این میزان در نمونه شاهد، یعنی به مقدار ۰/۳۶۹ µg/mL رسید. با این وجود، با افزایش غلظت نفت خام به ۴٪ میزان کلروفیل کاهش قابل توجهی نسبت به تیمار ۲٪ نشان نداد و به ۰/۲۰۹ µg/mL کاهش یافت (جدول۳).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در سطح ۱٪ نشان داد که بین میزان کلروفیل در نمونه شاهد و تیمارهای ۱، ۲ و ۴٪ نفت خام اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین نتایج آنالیزهای آماری نشان داد که با وجود کاهش میزان کلروفیل در تیمار ۰/۵٪ نسبت به نمونه شاهد، اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود ندارد (جدول ۳). محتوای کلروفیل در غلظت‌های گوناگون نفت خام سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* متفاوت بوده و بالاترین مقدار کلروفیل در نمونه شاهد و کمترین مقدار در تیمار ۴٪ نفت خام مشاهده شد. مقدار کلروفیل در تیمار ۰/۵٪ نفت خام نسبت به نمونه شاهد کاهش شدیدی داشته است در حالی که کاهش مقدار کلروفیل از تیمار ۰/۵ به ۴٪ نفت خام ملایم‌تر است.

نتایج حاصل از آنالیزهای کروماتوگرافی گازی تیمارهای ۱۴ و ۲۸ روزه سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* نشان داد که میانگین تجزیه زیستی هیدرکربن‌های نفتی در تیمارهای ۱۴ روز نسبت به نمونه شاهد به میزان ۴۲/۳۲٪ می‌باشد. از سوی دیگر میانگین تجزیه زیستی نفت خام در ۲۸ روز افزایش شدیدی نشان داد و به مقدار ۵۴/۲۱٪ رسید. مطابق نتایج نشان که با افزایش زمان، میزان تجزیه نفت خام توسط سیانوباکتری Fischerella ambigua ISC67 به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (جدول ۴).

جدول ۳- مقادیر کلروفیل سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در آزمایه‌های مختلف نفت خام

مقادیر کلروفیل ($\mu g\ mL^{-1}$)	درصد نفت خام
۰/۶۴۲ ± ۰/۰۲ [d]	شاهد
۰/۵۱۱ ± ۰/۰۰۴ [c]	۰/۵
۰/۴۱۹ ± ۰/۰ [b]	۱
۰/۳۶۹ ± ۰/۰۰۱ [b]	۲
۰/۲۰۹ ± ۰/۰۰۵ [a]	۴

[a] حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است.

جدول ۴- میزان تجزیه نفت خام توسط سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67*

بخش تجزیه نشده نفت خام (٪)	بخش تجزیه شده نفت خام (٪)	زمان
۵۷/۶۶	۴۲/۳۲	پس از ۱۴ روز
۴۵/۷۹	۵۴/۲۱	پس از ۲۸ روز

براساس نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان رشد سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در تیمار نفت‌خام مشخص شد که میزان رشد این سیانوباکتری در حضور نفت خام افزایش می‌یابد. افزایش نرخ رشد تقریباً مشابه و گاهی کمتر از نمونه شاهد می‌باشد که این امر نشان دهنده مقاومت این گونه سیانوباکتری نسبت به حضور نفت خام است. در مطالعه مشابهی، ابد به این نتیجه رسید که میزان رشد سیانوباکتری Synechocystis PCC6803 در حضور هیدروکربن‌های نفتی افزایش می‌یابد. درحالی که این افزایش رشد اختلاف معنی‌داری با رشد در نمونه شاهد ندارد [۲۵]. این محقق بیان کرد که رشد مناسب سیانوباکتری‌ها در حضور هیدرکربن‌ها نشان دهنده مقاومت آنها به هیدرکربن است و این سیانوباکتری‌ها قادر به حذف هیدروکربن‌های نفتی از محیط می‌باشند [۲۵]. علی- جمیلا و همکاران در تحقیق خود نشان دادند که میزان رشد سویه‌های سیانوباکتری Anabaena و scillatoria در حضور نفت خام ۰/۱٪ نسبت به نمونه شاهد افزایش می‌یابد. ولی این سویه‌های رشد، بیشینه متفاوتی از خود نشان دادند [۲۶].

نتایج حاصل از این پژوهش موید این مطلب است که با افزایش غلظت نفت خام، میزان وزن خشک سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* نسبت به نمونه شاهد افزایش می‌یابد. به گونه‌ای که میزان وزن خشک در تیمارهایی با غلظت ۰/۵٪ افزایش می‌یابد، ولی در تیمار ۴ و ۱٪ از این میزان کاسته می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کاهش وزن خشک وابسته به غلظت نفت خام است و غلظت بالای نفت موجب مهار رشد سیانوباکتری‌های مورد بررسی می‌شود. این نتایج مطابق با یافته‌های گائور وکومار 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 و با افزایش غلظت نفت خام، میزان وزن خشک کاهش می‌یابد [۲۷]. یکی از دلایل کاهش وزن خشک در موارد تنش (فیزیکی، شیمیایی و زیستی)، شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن است. تمام تنش‌های محیطی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن در ریز جلبک‌ها می‌شود. تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب تنش اکسیداتیو شده و تعادل بین گونه‌های اکسیژن فعال و فعالیت تجزیه‌کنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها مختل می‌شود. نتیجه این پدیده نابودی اکسیداتیو می‌باشد [۲۸].

براساس نتایج به دست آمده از سنجش میزان کلروفیل در تیمارهای مختلف نفت خام، میزان این رنگیزه با افزایش نفت خام کاهش می‌یابد. بیشترین میزان رنگیزه در میان تیمارها در نمونه ۰/۵٪ مشاهده می‌گردد و تیمار ۴٪ نفت خام کمترین محتوای کلروفیل را دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که افزودن نفت خام به محیط کشت سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* منجر به کاهش محتوای کلروفیلی در این سیانوباکتری شده است. کاهش محتوای کلروفیل به دلیل تنش‌های مختلف می‌تواند به دلیل مهار بیوسنتز کلروفیل باشد که با مهار آلفا آمینولوولونیک اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز ایجاد می‌گردد [۲۹].

همچنین بر اساس نتایج ساندارام و سومیا آلاینده‌های محیطی از قبیل بنزن و تولوئن در غلظت‌های بالا منجر به کاهش مقدار کلروفیل و غیرفعال شدن فرآیندهای حیاتی از قبیل فتوسنتز و جذب نیترات می‌شوند [۳۰].

این نتایج با تحقیقات ال-شیخ و همودا [۳۱] و پیمدا و باناگ [۳۲] مطابقت دارد. ایشان نشان دادند که با افزایش غلظت نفت خام و روغن موتور، میزان کلروفیل موجود در تیمارها پس از ۱۵ روز کاهش می‌یابد [۳۱ و ۳۲]. بر اساس نتایج به دست آمده، سیانوباکتری *Fischerella ambig ua ISC67* توانایی بالایی

در تجزیه زیستی نفت خام دارد، و قادر است بیش از ۹۳٪ از نفت خام را تجزیه کند. ال-شیخ و همودا در مطالعات مشابهی در مورد تجزیه زیستی نفت خام و هیدروکربن‌های نفتی توسط سیانوباکتری‌ها، نشان دادند که دو گونه سیانوباکتری *Nostoc punctiforme* و *Spirulina platensis* قادرند نفت خام را تجزیه نمایند، و حداکثر رشد و تجزیه نفت در غلظت ۰/۵٪ به دست آمد [۳۱]. آنها بیان کردند که این سیانوباکتری‌ها قادرند ترکیبات آلیفاتیک را به ترکیبات آروماتیک تجزیه نمایند. در مطالعه دیگری ال-شیخ و همکاران نشان دادند سیانوباکتری *Scenedesmus obliquus* و ریزجلبک Chlorella vulgaris توانایی بالایی در تجزیه زیستی نفت خام در غلظت‌های ۰/۵ و ۱٪ دارند. آنها بیان کردند که این ریز جلبک‌ها قادرند n-آلکان‌ها و سایر هیدرکربن‌های نفتی و ترکیبات آروماتیک مثل فنول را به ترکیبات ساده‌تری تجزیه نمایند [۸].

با این حال، امروزه نقش سیانوباکتری‌ها در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی مورد بحث قرار گرفته است. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که این میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی بالایی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند [۱۸ و ۳۲]. در حالی‌که برخی از تحقیقات نیز به این نتیجه رسیده‌اند که ممکن است باکتری‌های هتروتروف با مشارکت فعال سیانوباکتری‌ها تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را انجام دهند [۳۳ و ۳۴]. برای مثال چیلیان و همکاران در مطالعه خود در مورد نقش سیانوباکتری‌ها در تجزیه زیستی نفت خام با استفاده از توده های میکروبی نشان دادند که توده‌های تشکیل شده توسط سیانوباکتری *Phormidium animale* مستقیماً توانایی تجزیه هیدروکربن های نفتی را ندارند، ولی سایر میکروارگانیسم‌های موجود در این توده‌ها قادر به تجزیه زیستی نفت خام می‌باشند [۱۵]. هولر و همکاران بیان کردند که سیانوباکتری‌ها در این توده‌ها با مشارکت در چرخه‌های اسیدهای آلی و هیدروژن، انرژی لازم برای میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها را فراهم می‌کنند. آنها همچنین بیان کردند که با وجود سیانوباکتری‌ها در این توده ها، برخی از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدرکربن‌ها که در حضور نور فعالیتیشان کاهش می‌یابد، قادر به رشد بوده و فعالیت تجزیه کنندگی آنها افزایش می یابد [۳۵]. ابد و همکاران بیان کردند که سیانوباکتری‌ها با باکتری‌های تجزیه کننده نفت همکاری می‌کنند و توسط پلی ساکاریدهای خارج سلولی خود از شسته شدن آنها جلوگیری می‌کنند، همچنین آنها گزارش کردند سیانوباکتری‌ها برای این باکتری ها اکسیژن و نیتروژن تثبیت شده را فراهم می‌کنند [۳۶]. این نقش غیر مستقیم سیانوباکتری‌ها در موفقیت مراحل پاک‌سازی زیستی بسیار مهم است. با این حال نتایج این مطالعه به خوبی نشان می‌دهد که سیانوباکتری‌ها قادرند به طور مستقیم نفت را تجزیه نمایند، زیرا کشت خالص سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* در طی ۲۸ روز ۵۴/۲۱٪ تجزیه زیستی نفت خام را نشان داد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که سیانوباکتری *Fischerella ambigua ISC67* دارای توانایی بالایی در تجزیه زیستی نفت خام است. و می‌تواند ۵۴/۲۱٪ نفت خام را تجزیه نماید. مشاهدات فیزیولوژیکی و بررسی‌های گاز کروماتوگرافی، این نظر را تایید می‌کند که سیانوباکتری مورد مطالعه قادر است از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن استفاده نموده و آنها را به ترکیبات ساده‌تر تجزیه نماید. از آنجایی که نفت یک فرآورده سمی برای سیستم‌های بیولوژیک بوده و یکی از آلاینده‌های اصلی اکوسیستم‌های زیستی محسوب می‌شود، آلودگی‌های نفتی اثرات مضری بر روی انسان و سایر موجودات زنده دارد، نتایج حاصل از این پژوهش بیان‌گر توانایی سیانو باکتری *Fischerella ambigua ISC67* برای کاربرد به‌عنوان شاخصی جهت رفع آلودگی‌های نفتی در مناطق آلوده می‌باشد.

مراجع

[1]. Hassanshahian M., Emtiazi G., Kermanshahi R. and Cappello S., "Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea, Soil and Sediment Contamination," Vol. 19, No. 3, pp. 277–291, 2010.

[2]. Baek K. H., Kim H. S., Oh H. M., Yoon B. D., Kim J. and Lee I. S., "*Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth,"* Journal of Environmental Science and Health, Vol. 39 No. 9, pp. 2465–2472, 2004.

[3]. Ma F., Shi Sh., Sun T. H., Li A., Zhou J. T. and Qu Y. Y., "*Biotransformation of benzene and toluene to catechols by phenol hydroxylase from Arthrobacter sp. W1,".* Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 97, No. 11, pp. 5097-103, 2012.

[4]. Kastner M., "*Degradation of aromatic and polyaromatic compounds, Biotechnology*," Environmental Processes. Germany: Wiley Vch., 2000.

[5]. Rashid-Ashmagh F., Rezaei-Kalantary R., Farzadkia M., Joneidy-Jafari A. and Nabizadeh R., "*Survey of phenantherene biodegradation model in contaminated soils by acinetobacter SP*.," Iran. J. Health & Environ, 2 (3), pp. 196-203, 2009. (in Persian)

[6]. Gennaro P. Di, Franzetti A., Bestetti G., Lasagni M, Pitea D. and Collina E., "*Slurry phase bioremediation of PAHs in industrial landfill samples at laboratory scale*," Waste Management, 28 (8), pp. 1338-1345, 2007.

[7]. Hassanshahian M., Emtiazi G. and Cappello S., "*Isolation and characterization of crude-oil degrading bacteria from the persian gulf and the caspian sea*," Marine Pollution Bulletin, 64, pp. 7–12, 2012.

[8]. El-Sheekh M. M., Hamouda R. A. and Nizam A. A., "*Biodegradation of crude oil by Scenedesmus obliquus and Chlorella vulgaris growing under heterotrophic conditions*," International Biodeterioration and Biodegradation, 82, pp. 67-72, 2013.

[9]. Chena B. and Ding J., "*Biosorption and biodegradation of phenanthrene and pyrene in sterilized and unsterilized soil slurry systems stimulated by phanerochaete chrysosporium*," Journal of Hazardous Materials, 229, pp. 159– 169, 2012.

[10]. Erdogan E., and Karaca A., "*Bioremediation of curd oil polluted soils*," Asian Journal of Biotechnology, 3(3), pp. 206-213, 2011.

[11]. Xu R., and Obbard J. P., "*Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments*," Journal of Environmental Quality, 32, pp. 1234-1243, 2003.

[12]. Hassanshahian M., Hassanshahian O. and Emtiazi G., "*Optimization of biodegradation of crude oil by Acinetobacter calcoacticus BS and Pseudomonas aeroginosa AS bacteria isolated from Persian Gulf*," Petroleum Research, 20 (63), pp. 72-82, 2010.

[13]. Abed R. M. M., Dobretsov S. and Sudesh K., "*Applications of cyanobacteria in biotechnology*," Journal of Applied Microbiology, 106, pp. 1-12, 2009.

[14]. Patel A., Pawar R., Mishra S. and Tewari A., "*Exploitation of marine cyanobacteria for removal of color from distillery effluent*," Indian Journal of Environmental Protection, 21 (12), pp. 1118–1121, 2001.

[15]. Chaillan F., Gugger M., Saliot A., Coute A. and Oudot J., "*Role of cyanobacteria in the biodegradation of*

crude oil by a tropical cyanobacterial mat," Chemosphere, 62, pp. 1574-1582, 2006.

[16]. Ellis B. E., "*Degradation of phenolic compounds by freshwater algea*," Plant Science Letters, 8, pp. 213-216, 1977.

[17]. Kuritz T. and Wolk C. P., "*Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants*," Applied and Enviromental Microbiology, 61 (1), pp. 234-238, 1995.

[18]. Raghukumar C., Vipparty V., David J. J. and Chandramohan D., *Degradation of crude oil by cyanobacteria*, Applied Microbiology and Biotechnology, 57, pp. 433–436, 2001.

[19]. Ibraheem I. B. M., "*Biodegradation of hydrocarbons by cyanobacteria*," Journal of Phycology, 46, pp. 818–824, 2010.

[20]. Andersen R. A., "*Algal culturing techniques,"* Elsevier Academic Press, pp. 16-18, 2005.

[21]. Allen M. M. and Stanierr Y., "*Growth and division of some unicellular blue-green algae,"* Journal of General Microbiology, (51), pp. 199- 202, 1986.

[22]. Soltani N., Khavari-Nejad R. A., Yazdi M.T., Shokravi S. and Fernández-Valiente E., "*Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity*," Pharm Biol. 43, pp. 455-459, 2005.

[23]. Marker A. F. H., "*The use of acetone and methanol in the estimated of chlorophyll in the presence of phaeophytin,"* Freshwater Boil, 2, pp. 361-385, 1972.

[24]. Leganes F., Sanches-Maeso E. and Fernandez-Valiente E., "*Effect of indolacetic acid on growth and dinitrogen fixation in cyanobacteria*," Plant Cell Physiology, 28, pp. 529-533, 1987.

[25]. Abed R. M. M., "*Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons,"* International Biodeterioration & Biodegradation, 64, pp. 58-64, 2010.

[26]. Ali-Gamila H., Ibrahim M. B. M and Abd R. M. and El-Ghafar H. H., "*The role of cyanobacteria isolated strains in the biodegradation of crude oil*," International Journal of Environmental Studies," 60, pp. 435-444, 2003.

[27]. Gaur J. P., and Kumar H. D., "*Growth response of four micro-algae to three crude oils and furnace oil,"* Environmental Pollution, 25, pp. 77-85, 1981.

[28]. Kumar S., Habib K. and Fatma T., "*Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen fixing cyanobacteria*," Science of Total Environment, 403, pp. 130-138, 2008.

[29]. Ouzounidou G., "*Effect of copper on germination and seedling growth of Minuatia, Silene, Alyssum and Thlaspi*," Biology of Plants, 37, pp. 411–416, 1995.

[30]. Sundaram S., and Soumya K. K., "*Study of Physiological Alterations in Cyanobacterium under Organic Stress,"* American Journal of Plant Physiology, 6(1), pp. 1-16, 2011.

[31]. El-Sheekh M. M. and Hamouda R. A., "*Biodegradation of crude oil by some cyanobacteria under heterotrophic conditions,"* Desalination and Water Treatment, 1, pp. 1-7, 2013.

[32]. Pimda W., and Bunnag S., "*Biodegradation of used motor oil by Nostoc piscinale TISTR 8401,"* African Journal of Microbiology Research, 6 (10), pp. 2367-2372, 2012.

[33]. Al-Hasan R. H., Khanafar M., Eliyas M. and Radwan S. S., "*Hydrocarbon accumulation by pcocyanobacteria from Persian Gulf,"* Journal of Applied Microbiology, 91, pp. 533-540, 2001.

[34]. Abed R. M. M. and Koster J., "*The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds,"* International Biodeterioration and Biodegradation, 55, pp. 29-37, 2005.

[35]. Hoehler T. M., Bebout B. M. and Des-Marais D. J., "*The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth*," Nature, 412 (6844), pp. 324–327, 2001.

[36]. Abed R. M. M., Safi N. M. D., Koster J., Beer D., El-Nahhal Y., Rullkotter J. and Garcia Pichel F., "*Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds,"* Applied and Environmental Microbiology*,* 68, pp. 1674–1683, 2002.