پاکسازی زیستی آب های آلوده به نفت خام توسط باسیلوس های جدا شده ازحوضچه های نفتی

نویسندگان : فریده محمدی* عباس اخوان سپهی فائزه محمدی *** مصطفی امینی*****

* نویسنده مسئول: دانشجوی کارشناسی ارشد ،گروه میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

Email: Faridemohammadi2010@yahoo.com تلفن :۶۵۰۲۷۴۶- ۰۳۱۱

**دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

***دانشجوی دکتری قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

****کارشناس علوم دامی، گروه کشاورزی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان

طلوع بهداشت

فصلنامهٔ علمی پژوهشی
دانشکده بهداشت یزد
سال یازدهم
شماره: دوم
تابستان ۱۳۹۱
شماره مسلسل: ۳۵

تاریخ وصول: ۱۳۹۰/۸/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۷

چکیده

سابقه و اهداف:آب های آلوده به نفت خام یا ترکیبات نفتی یکی از معضلات محیط زیست اند. پاکسازی زیستی یک روش ساده و اقتصادی برای تصفیه آب های آلوده به این آلاینده هاست. هدف از این تحقیق بررسی قدرت تجزیه نفت خام توسط باسیلوس های جداسازی شده از آب های آلوده به نفت خام پالایشگاه نفت اصفهان می باشد.

روش بررسی:برای این منظور از آب های آلوده به نفت خام در پالایشگاه نفت اصفهان استفاده شد. نمونه های برداشت شده بر روی محیط MSM کشت داده شده و به آن 10000 ppm نفت به عنوان تنها منبع کربنی باکتری ها اضافه شد.این محیط کشت بر روی تکان دهنده ای با دور 150 rpm و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان اولین معیار جداسازی و غربالگری استفاده شد. برای بررسی قدرت تجزیه نفت خام هر۳ سویه خالص شده و کنسرسیوم این۳ سویه تست های IR(مادون قرمز) وGC-MS(گاز کروماتوگرافی-اسپکترومتر)گذاشته شد. باسیلوس های خالص شده با روش های تشخیصی بیوشیمیایی و ملکولی شناسایی شدند.

یافته ها:از بین ۱۲ سویه جداسازی شده، ۸ سویه قادر به لیز نمودن اریتروسیت‌های گوسفند و تولید هاله همولیز برروی محیط بلاد آگار بودند. سویه‌های دارای فعالیت همولیتیک برای مطالعات بعدی انتخاب گردیدند. کشش سطحی ۳ سویه قابل پذیرش بود.کنسرسیوم این ۳ سویه نیز از نظر تولید بیوسورفکتانت بررسی شد ومقادیر ۳۸، ۳۴،۳۰ mN/m برای ۳ سویه خالص شده و mN/m۲۸ برای کنسرسیوم این ۳ سویه بدست آمد. هنگامی‌که توا لی فوق در برنامه BLAST قرار گرفت، نتایج نشان دهنده تشابه ۹۹/۸ درصد باکتری های جدا شده با Bacillus subtilis و Bacillus cereus بودند.دو سویهBacillus subtilis شناسایی شده تنها در ۶ نوکلئوتید با هم تفاوت داشتند.

نتیجه گیری:بررسی های انجام شده نشان داد، عملکرد کنسرسیوم در تجزیه زیستی بسیار مؤثرتر از کشت باسیلوس ها به تنهایی بوده، در واقع کنسرسیوم باسیلوس ها با قدرت بیشتری نسبت به باسیلوس ها به تنهایی در تجزیه زیستی نفت خام در آب های آلوده عمل کرده است.

واژه های کلیدی :بیوسورفکتانت، کشش سطحی، کنسرسیوم، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مصوب دانشگاه آزاد تهران شمال می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آلودگی محیط زیست به دلیل فعالیت های انسانی وصنعتی مشکلات جدی را در سراسر دنیا ایجادکرده است. اختراع موتورهای سوخت داخلی ونیازگسترده آن ها به نفت خام و محصولات نفتی موجب رشدقابل توجه صنعت نفت، پتروشیمی وصنایع جانبی آن شده و باعث شده هیدروکربن های نفتی درردیف گسترده ترین آلاینده های محیط قرارگیرند(۱).

بسیاری ازترکیبات آروماتیکی بااثرشدیددرسیستم هورمونی تأثیرات خطرنا ک خود را اعما ل می کنند،که در مقدار کم می توانندااثرات بسیارعمیقی دربدن بگذارند. پلی برمینیتد دی فنیل اتر ها و متابولیت هایشان وفنل دارای خاصیت مختل کننده غددمترشحه داخلی(اندوکرین) هستند. بنزن، تولوئن، نفتالین وفنانترین اثرات سمی وترکیبات چندحلقوی اثرات سرطانزایی دارند. باوجودآنکه نفت باعث کاهش تعدادمیکروارگانیسم هاوپلانکتون هامی شوند ولی درکف دریااثرات مهمی به جا می گذارد(۲).

یکی از روش های پاکسازی زیستی بدین صورت است که، میکروارگانیسم هایی به محیط افزوده می شوندکه آلاینده های نفتی را به عنوان تنهامنبع انرژی وکربن مصرف می کنندودربهینه ترین حالت آنرابه دی اکسیدکربن وآب تبدیل می کنند، هرچندکه درواقعیت ازتجزیه ترکیبات نفتی همراه آب ودی اکسیدکربن مواددیگری که اغلب اکسیدشده وقابل حل هستند نیز به دست می آیند. پاکسازی زیستی سالهاست دردنیا به صورت میدانی به کارگرفته می شود. روش های زیستی ضمن سازگاری بامحیط زیست، ازنظراقتصادی نیز برتری محسوسی نسبت به دیگرروش های پاکسازی (فیزیکی وشیمیایی)دارند.

دراین میان برخلاف بسیاری ازروش های متداول که مشکل آلودگی را به گونه ای دیگر تبدیل و یا آلاینده را به بستر دیگری منتقل می کنند، پالایش زیستی با صرف کمترین هزینه، توانایی حذف دائم آلاینده ها با تبدیل آن ها به مواد بی خطر را دارد (۲).

به دلیل این که بیشترین قسمت نفت را هیدروکربن ها تشکیل می دهند تجزیه آن ها از لحاظ کمی مهم ترین فرآیند حذف نفت از محیط است.

لازم به ذکر است با این که ترکیبات آروماتیک و قطبی درصد کمتری از نفت خام را تشکیل می دهند اما پایدارتر و سمی تر بوده و به زمان بیشتری برای تجزیه نیاز دارند(۲).

A.Akhavansepahi و همکارانشان، ۱۵ گونه باسیلوس تجزیه کننده نفت خام جدا شده از مناطق آلوده به نفت و شرایط بهینه رشدشان را مورد ارزیابی قرار دادند. سپس کشش سطحی و میزان کربن کل، نیتروژن و هیدروژن موجود در نفت خام در قبل و پس از تیمار با باکتری را اندازه گیری کردند. نتایج نشان دهنده اثر تخریب زیستی باسیلوس ها بر روی هیدروکربن های نفتی و توانایی آنها در استفاده از نفت به عنوان تنها منبع کربن و انرژی می باشد(۳).

F.NaimpoorوA.Partoinia ازدانشگاه علم و صنعت نیز زیست سالم سازی خاک آلوده به هیدروکربن نفتی نرمال هگزادکان در فازدوغابی وپارامترهای مؤثر بر آن را بررسی کردند و نشان دادند باکتری جداشده ازخاک آلوده به نفت توانایی چشمگیری درتجزیه زیستی هگزادکان جذب شده درخاک مورد نظرداشته است(۱).

Archive of SID

www.SID.ir

E.Rismani و همکارانشان طی تحقیقی قدرت تولید بیوسورفکتانت را در Bacillus Licheniformis جدا شده از آب های خلیج فارس با انجام تست های همولیتیک و کشش سطحی بررسی کردند(۴).

C.Calvo و همکارانش نیز اثر سورفکتانت را بر تجزیه naphthalene با Bacillus pumilusجدا شده از سطوح نفتی بررسی کردند(۵).

تاکنون زیست سالم سازی آب های آلوده که جایگاه ویژه ای دارند کمتر بررسی شده است.در این تحقیق، هدف بررسی زیست سالم سازی آب آلوده به نفت خام با باکتری های جدا شده از آب های آلوده در پالایشگاه نفت اصفهان است.

روش بررسی

نوع مطالعه در این تحقیق میدانی و جامعه پـژوهش ۴ منطقه آبی مختلف در پالایشگاه نفت اصفهان بوده است، بدین صورت که از آب آلوده به نفت خام از مناطق لجن فعال – پوند۵ – (شناور کننده های هوایی Dissolved Air FloataionDaf(و API A/B توسط شیشه هایی که به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شده بودند نمونه برداری شد. نمونه های جمع آوری شده در کوتاهترین زمان به آزمایشگاه منتقل و در یخچال قرار داده شدند سپس برای خالص سازی باکتری ها به صورت زیر عمل کرده شد.

در این تحقیق باکتری از آب های آلوده به نفت با میکروسکوپ به شکل باسیل دیده و پس از تثبیت و رنگ آمیزی گرم از نوع گرم منفی شناخته شد. برای تقویت و احتمال جداسازی باکتری ابتدا نمونه را به محیط MSM تلقیح کرده و بر روی شیکر با دور 150rpm در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد، سپس یک لوپ از باکتری را با سوزن تلقیح برداشته و روی پلیت نوترینت آگار کشت خطی داده و ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. با پاساژ دادن های متعدد بر روی محیط های نوترینت آگار و بلاد آگار ۱۲ سویه خالص باسیلوس یافته شد. برای انجام تست های مادون قرمز و گاز کروماتوگرافی-اسپکترومتر، این ۱۲ سویه بر روی محیط MSM با ۱٪ نفت کشت داده شدند و بر روی شیکر با دور 150 rpm و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند.

مواد این محیط کشت عبارتند از(۳) :

$Na_2HPO_4.12\ H_2O$ = 2 g/l, K_2HPO_4 = 2 g/l, $MgSO_4$= 0.2 g/l, Nacl = 0.8 g/l, $CaCl_2.2H_2O$ = 0.1 g/l, $NaNO_3$=2g/l, KCl=0.8 g/l, $FeSO_4$.

$7H_2O$=0.001g/l, Trace element =2 ml

Trace element: $ZnSO_4$. H_2O=0.75 g/l, $CuSO_4.5H_2O$ = 0.075 g/l, $NaMoO_4.2H_2O$ = 0.05 g/l, $COCl_2.6H_2O$ = 0.08 g/l, H_3BO_3 = 0.15 g/l, $Fecl_3.6H_2O$=0.08 g/l, $MgSO_4.H_2O$=0.75g/l, The pH should be 6.8 after sterilization

بررسی فعالیت همولیتیک به دلیل سرعت بالا و سادگی به عنوان معیار انتخاب باسیلوس های مولد بیوسورفکتانت استفاده شد. برای انجام این تست از محیط بلاد آگار استفاده شد. تمام کشت های باسیلوس که در مرحله قبل ایزوله شده بودند، بر روی بلاد آگار کشت خطی داده شدند و بعد از ۷۲-۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، نتایج بررسی شدند. از بین این تعداد سویه جداسازی شده ۸ سویه قادر به لیز نمودن

Archive of SID

www.SID.ir

اریتروسیت‌های گوسفند و تولید هاله همولیز برروی محیط بلاد آگار بودند.کنسرسیوم این ۸ سویه نیز از نظر تولید بیوسورفکتانت بررسی شد. سویه‌های دارای فعالیت همولیتیک برای مطالعات بعدی انتخاب گردیدند. کشش سطحی سویه هایی که توانایی همولیز بر روی بلاد آگار را داشتند بررسی شد. (۶،۷)کاهش کشش سطحی که به روش Du Nouy Rind Methodو با استفاده از دستگاه تنسیومتر (Tensiometer) اندازه گیری شد به عنوان معیار اصلی تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد. بدین منظور هر یک از سویه ها به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط پایه نمکی به همراه ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر (Yeast Extract 1gr/lit + MSM) و ۱ درصد نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی اضافه شد و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بر روی شیکر با دور 150 rpm قرار داده شد. مقدار ۲۵ میلی لیتر از کشت ۴۸ ساعته هر یک از نمونه ها را در ظرف نمونه دستگاه ریخته شد.دمای نمونه قبل از اندازه گیری کشش سطحی به ۲۵ درجه سانتی گراد رسانده شد و آزمایش برای هر نمونه سه مرتبه تکرار شد. برای هر بار اندازه گیری به همراه نمونه ها کشش سطحی آب مقطر و محیط کشت فاقد باکتری به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. اندازه گیری کشش سطحی نشان داد که ۳ سویه از سویه های دارای فعالیت همولیتیک، در حد قابل قبولی بیوسورفکتانت تولید می کنند(۲،۸). برای تشخیص اولیه باسیلوس هایی که در حد قابل قبولی بیوسورفکتانت تولید کردند تست های بیوشیمیایی انجام شدو برای بررسی قدرت تجزیه نفت در بین ۳ سویه باسیلوس خالص شده و کنسرسیوم این ۳ سویه تست مادون قرمز(IR) انجام شد. برای انجام این تست، سویه های باسیلوس در محیط MSM با ۱٪ نفت خام کشت داده شدند و برای مشخص نمودن بهترین عملکرد در تجزیه نفت خام از این گاز کروماتوگرافی-اسپکترومتر(GC-MS) استفاده شد. برای انجام این تست، سویه های باسیلوس در محیط MSM با ۱٪ نفت خام کشت داده شدند. در نهایت DNA باکتری ها جدا شده و خالص شده به روش DNA FAST استخراج گردید.

PCR با پرایمر های fD_1وrD_1 انجام شد.شرایط PCR در جدول زیر ذکر شده است.توالی پرایمر های فوق به شرح زیر است :

fD1 : 5` ccgaattcgtcgacaacagagtttgatcctggctcag 3`

rD1 : 5` cccgggatccaagcttaaggaggtgatccagcc 3`

پس از استخراج DNAباکتری به روش گفته شده و انجام PCR با پروتکل ذکر شده در زیر، برای شناسایی باکتری های مورد نظر از روش کلنی PCR برای تکثیر ژن 16SrRNA استفاده شد.بدین منظور یک کلنی از باکتری های مورد نظر را در ۵۰ ماکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل سوسپانسیون و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. ۵ ماکرولیتر از سوسپانسیون فوق به عنوان DNA الگو در PCR با پرایمر های fD_1وrD_1 استفاده شد.

محصول PCR درپلاسمید pBleuescript SK کلون و کلنی های سفید انتخاب و پس از تایید حضور قطعه خارجی توسط PCR با استفاده از پرایمر های fD_1وrD_1 تعیین توالی شد. توالی حاصل با توالی های موجود در بانک اطلاعات زیستی NCBI مقایسه شد.

ترکیبات مورد نیاز برای انجام PCR :

www.SID.ir

PCR buffer =1X, $MgCl_2$=1.5mM, $DNTP_s$=2mM, fD_1=10 µM, rD_1=10 µM, DNA=3 µM, TaqDNA Polymerase =1U (۲)

روش آماری استفاده شده در این تحقیق به صورت Map sampling بوده یعنی از مناطق مختلف پالایشگاه نمونه گیری به عمل آمده است. نمونه برداشتی از مناطق آلوده به نفت بوده که به ازای هر منطقه ۱۰ نمونه برداشت شد. شرح روش استفاده در این تحقیق میدانی و ابزار مورد استفاده مشاهده بوده است.

یافته ها

میزان کشش سطحی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و نتایج تست مادون قرمز در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که کنسرسیوم باسیلوس ها در تولید بیوسورفکتانت و در نتیجه تجزیه زیستی نفت خام بسیار مؤثرتر از کشت باسیلوس ها به تنهایی عمل می کند. همانطور که از نتایج تست IR مشخص است بهترین عملکرد در تجزیه نفت خام را در بین ۳ سویه باسیلوس خالص شده باسیلوس sp_2دارد ولی به طور چشمگیری کنسرسیوم باسیلوس ها در تجزیه نفت خام مؤثرتر از کشت باسیلوس ها به تنهایی عمل می کند به طوریکه کنسرسیوم باسیلوس ها ی خالص شده 8350ppm نفت از 10000 ppm را تجزیه کرده اند در واقع کمپلکس باسیلوس های خالص شده باعث حذف ۸۴٪ نفت خام از محیط شده اند.

تست های بیوشیمیایی که در جدول ۲ نشان داده شده است برای شناسایی باسیلوس استفاده شده و هر یک ۳ بار تکرار گردیده است.

جدول ۱:میزان کشش سطحی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

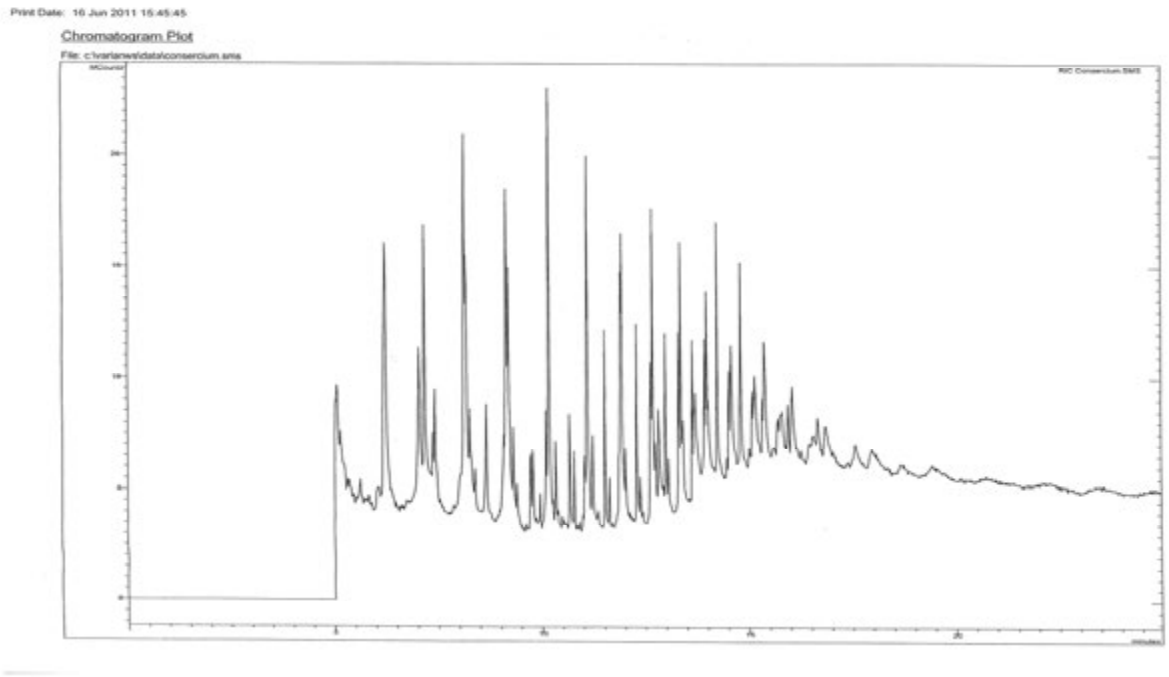
	میزان کشش سطحی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد	نتایج تستIR	
		غلظت اولیه نفت خام	غلظت نفت باقیمانده
Bacillus sp_1	34	10000 ppm	2400ppm
Bacillus sp_2	30	10000 ppm	1850ppm
Bacillus sp_3	38	10000 ppm	3950ppm
Consortium of Bacillus	28	10000 ppm	1650ppm

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲:نتایج تستهای بیوشیمیایی

	Bacillus sp_1	Bacillus sp_2	Bacillus sp_3
کاتالاز	+	+	+
MRVP	+/+	+/-	-/+
مانیتول	+	-	+
اندل	-	-	-
تست لسیتیناز	+	-	+
تست هیدرولیز کازئین	+	+	+
تست آمیلاز	+	+	+
آرابینوز	+	+	+



نمودار ۱: نتیجه گاز کروماتوگرافی - اسپکترومتر

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج گاز کروماتوگرافی-اسپکترومتر در نمودار ۱ با توجه به تعداد بیشتر پیک های مشاهده شده نشان می دهد، در بین باسیلوس ها بهترین عملکرد در تجزیه نفت خام راکنسرسیوم باسیلوس ها دارد در واقع میزان و تنوع متابولیت های حدواسط و راندمان کمی وکیفی طبق نتایج بدست آمده در کنسرسیوم باسیلوس ها بیشتر و بالاتر می باشد. عملکرد چشمگیردر تجزیه نفت خام در کنسرسیوم باسیلوس ها، کاملاً بارز می باشد.

در نتیجه تکثیر و کلونینگ 16SrRNA باسیلوس ها که در شکل ۱ نشان داده شده است:

DNAsize marker-1

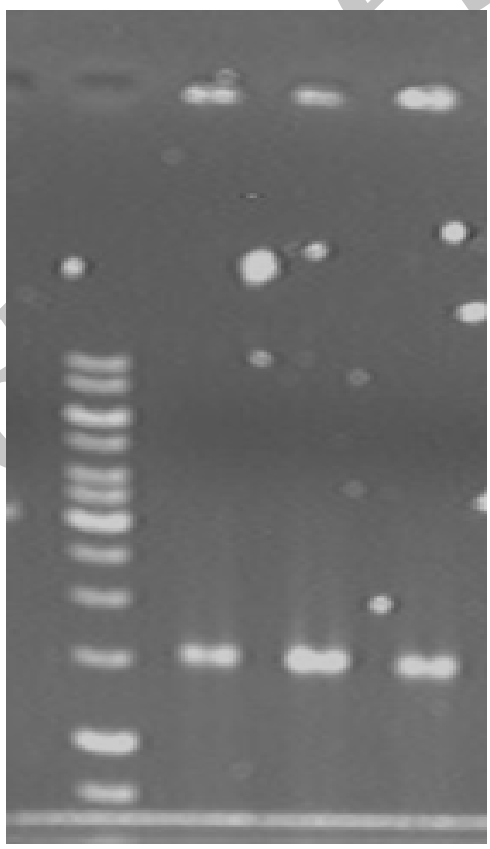
2- محصول PCR باکتری sp_1: باسیلوس سوبتیلیس

3- محصول PCR باکتری sp_2: باسیلوس سوبتیلیس

4- محصول PCR باکتری sp_3: باسیلوس سرئوس

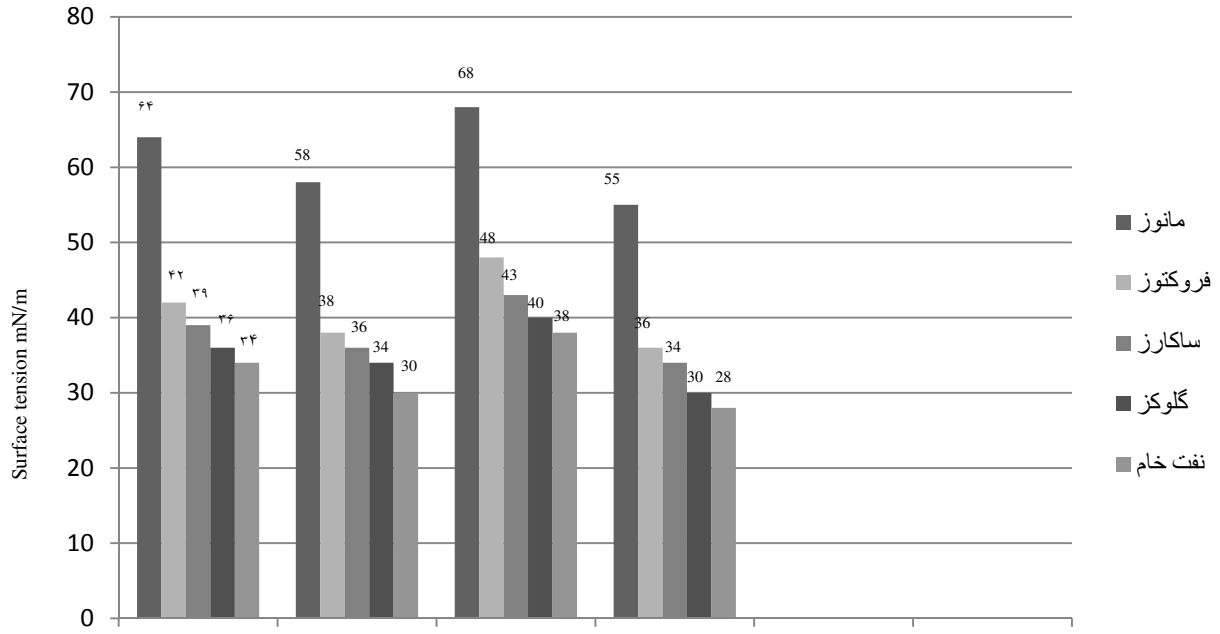
مقایسه توالی 16SrRNA سویه های sp_1 و sp_2 نشان داد که تنها در ۶ نوکلئوتید تفاوت دارند.

همانطور که بر روی نمودار۲ نمایان است پایین ترین کشش سطحی برای باسیلوس های کشت داده شده زمانی است که بر روی نفت کشت داده شدندو در بین باسیلوس هایی که بر روی نفت کشت داده شدند بهترین کشش سطحی را کنسرسیوم باسیلوس ها دارد.



شکل ۱: نتیجه تکثیر و کلونینگ 16SrRNAباسیلوس ها

www.SID.ir



به ترتیب ستون ها از چپ به راست مربوط به :

Consortium of Bacillus-4 Bacillus cereus-3 Bacillus subtilis-2 Bacillus subtilis-1

نمودار ۲:تاثیر منابع مختلف کربن روی کاهش کشش سطحی

بحث و نتیجه گیری

در سال های پیش تصور بر آن بود که میکروارگانیسم ها قادر به رشد بر روی محیط های آلوده به نفت نیستندولی تحقیقات نشان داده که میکروارگانیسم های مصرف کننده نفت گسترش زیادی دارند به طوری که می توان آن ها را از خاک های مزارع، جنگل ها و چمن زار ها جدا نمود(۹). هیدروکربور های سنگین دارای ترکیبات آلیفاتیک و فاقد ساختمان حلقوی می باشند.این قبیل هیدروکربور ها معمولاً به وسیله انواع متعددی از میکروارگانیسم ها مورد استفاده قرار می گیرند. یکی از مهم ترین این میکرو ارگانیسم ها باسیلوس ها هستند(۹). در تحقیقی که توسط Calvo و همکاران انجام شد، عمل نمونه برداری از خاک های آلوده به لجن نفتی صورت گرفت و باکتری جدا شده در این تحقیق باسیلوس پومیلوس شناخته شد که توانایی رشد بسیار خوب در حضور ۱ درصد نفت خام و نفتالن که از آروماتیک های چند حلقه است را تحت شرایط هوازی دارد(۵). دکتر اخوان و همکارانشان تحقیقی برای مشخص کردن بهترین باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت در میدان بی بی حکیمیه در شرایط Exsitu انجام دادند که در آن مشخص

Archive of SID
www.SID.ir

شد در آن ناحیه باسیلوس لیکنی فورمیس بهترین می باشد(۱۰). طی تحقیقی توسط E.Rismani به این نتیجه رسید که Bacillus Licheniformis جدا شده از خلیج فارس قادر است با تولیدبیوسورفکتانت نفت را تجزیه کند(٤).

هیچ میکروارگانیسمی به تنهایی قادر به تجزیه کامل هیدروکربورهای نفتی به آب و دی اکسید کربن به عنوان محصول نهایی نیست. از طرفی برای تجزیه زیستی بهتر علاوه بر روش های فوق الذکر از روش همکاری بین میکروارگانیسم ها نیز می توان بهره گرفت چرا که در این صورت اثر سینرژیستیک وهمکاری دوعامل تجزیه کننده می تواند کارایی بهتری در تجزیه آلاینده ها را باعث شود. مزیت استفاده از کنسرسیوم باکتریایی :

شامل موارد زیر می باشد :(۲)

۱-تقریباً در همه موارد استفاده از کنسرسیوم میکروارگانیسم ها در مقایسه با کشت تک آن ها نتیجه بهتری در تجزیه زیستی آلاینده ها مشاهده شده است.

۲- در نتیجه استفاده از چندین عامل تجزیه کننده و به کار گرفتن انواع راه های متابولیکی شانس تجزیه ی کامل تر بالا می رود.

۳- از بین بردن مواد سمی تولید شده از یک سویه توسط سویه یا سویه های دیگر بدیهی است که حذف ترکیبات سمی راندمان تجزیه را بالاتر می برد.

۴- هنگامی که تجزیه مخلوطی از مواد آلاینده مورد نظر باشد نیز استفاده از کنسرسیوم چند میکروارگانیسم مؤثر است چرا که ممکن است هر یک از اعضای کنسرسیوم در تجزیه یکی یا برخی از مواد آلاینده بیشترین کارایی را داشته باشند.

از آن جایی که کاهش کشش سطحی محیط رشد مهم ترین و اصلی ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت محسوب می شود لذا در این تحقیق پس از غربالگری اولیه با بررسی فعالیت همولیتیک و کاهش تعداد باسیلوس های انتخاب شده، از آزمایش کشش سطحی برای بررسی و تایید توان این سویه ها در تولید بیوسورفکتانت استفاده شد. بیوسورفکتانت های زیادی شناخته شده اند که از میان آن ها سورفاکتین قوی ترین بیوسورفکتانتی است که تا به حال گزارش شده است.سورفکتین یک پپتیدولیپید با فعالیت سطحی قابل توجه است که به وسیله باسیلوس سوبتیلیس و در حضور منابع کربنی محلول در آب تولید می شود.این بیوسورفکتانت قادر است کشش سطحی محیط رشد را از 70mN/m تا مقادیر 20mN/m کاهش دهد.

Banat در طی تحقیقی در سال ۱۹۹۵ برای جداسازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت از فعالیت همولیتیک استفاده کرد(۹). در مطالعاتی که توسطBernheimer and Avigad در سال ۱۹۷۰ صورت گرفت از همولیز بتا در محیط بلاد آگار به عنوان معیار تولید بیوسورفکتانت استفاده شد(۱۱) . طی تحقیقات خانم فرناز افشار ابراهیمی در ارتباط با بررسی اثر کنسرسیوم باسیلوس ها در تجزیه تولوئن خاک های آلوده مجتمع پتروشیمی اصفهان هر سه باسیلوسB3,B6,B12هر کدام به تنهایی و به صورت کشت خالص، کشش سطحی محیط کشت را به ترتیب تا ۳۵ و۳۳/۵ و۳۷ و در حالت کنسرسیوم نیز تا مقدار29mN/m کاهش دادند(۲). در این تحقیق هر سه باسیلوسsp_1,sp_2,sp_3 هر کدام به تنهایی و به صورت کشت خالص، کشش سطحی محیط کشت را به ترتیب تا ۳۴و۳۰و۳۸ و در حالت کنسرسیوم نیز تا28mN/m کاهش دادند. همانطور که انتظار می رفت

Archive of SID

www.SID.ir

کنسرسیوم در تولید بیوسورفکتانت و در نتیجه تجزیه زیستی نفت خام بسیار مؤثرتر از کشت تک میکروارگانیسم ها عمل می کند.

طیف سنجی مادون قرمز، روشی برای شناسایی مولکولها و بخصوص گروه عاملی مولکولهاست. هر ماده‌ای، طیف مادون قرمز مخصوص به خود دارد و همانند اثر انگشت، مختص خود مولکول می‌باشد. دستگاهی که طیف جذبی یک ترکیب را حاصل می کند، یک دستگاه طیف سنج مادون قرمز یا به عبارت دقیقتر یک اسکپتروفتومتر خوانده می‌شود(۲) . با استفاده از این روش تجزیه زیستی نفت توسط باسیلوس ها اندازه گیری شد و همانطور که انتظار می رفت کنسرسیوم باسیلوس ها در تجزیه زیستی عملکرد بهتری داشتند.

برای بررسی میزان تجزیه نفت خام توسط کشت خالص باسیلوس ها و هم چنین کنسرسیوم باسیلوس ها از روش کروماتوگرافی گازی – طیف سنجی جرمی استفاده شد. این روش یکی از دقیق ترین روش ها برای آنالیز هیدروکربنی می باشد و اجزای مخلوط پیچیده را با روش کروماتوگرافی می توان از یکدیگر جدا کرد .

در بسیاری از مطالعات مربوط به تجزیه زیستی از این روش استفاده شده است مثلاًCerniglia و همکارانش برای بررسی اکسیداسیون بیفنیل نیز توسط.Oscillatoria sp (نژاد JCM) از گاز کروماتوگرافی استفاده کردند(۱۲) .

امتیازات به کار گیری کنسرسیوم به جای کشت خالص در زیست درمانی به طور گسترده ای مشخص شده است.این موضوع را می توان به واکنش های سینرژیک میان اعضای باکتری ها نسبت داد. مکانسیم عمل تجزیه کننده های زیستی مواد نفتی و مشتقات آن ها وقتی در واکنش های سینرژیک هستند کمی پیچیده است. ممکن است یک سویه، مواد متابولیکی سمی را که سویه های دیگر قبلاً تولیدش کرده اند را پاکسازی کند. هم چنین ممکن است که سویه های بعدی قادر به تجزیه ترکیباتی باشند که ابتدا فقط تا حد نسبی قادر به تجزیه شان بوده اند(۲) .

از نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز می توان نتیجه گرفت که تجزیه زیستی مواد آلاینده توسط کنسرسیومی از میکروارگانیسم ها که با عنوان کنسرسیوم یا کشت مخلوط در مقالات نام برده شده، بسیار مؤثرتر از کشت خالص یا تکی میکروارگانیسم عمل می کند. این نتایج در بسیاری از تحقیقات دیگر که توسط محققین مختلف انجام شده است نیز به چشم می خوردمثلاً در تحقیقی که توسط خانم فرناز افشار ابراهیمی بر روی کنسرسیوم باسیلوس ها در تجزیه تولوئن انجام شد نشان داده شد که کنسرسیوم باسیلوس ها در تجزیه تولوئن تاثیر چشمگیرتری دارد(۲).

تشکر و قدر دانی

با سپاس فراوان از پالایشگاه نفت اصفهان که در این تحقیق حامی و پشتیبان ما بودند و در هر چه پربارتر شدن این تحقیق ما را یاری نمودندو هم چنین حمایت مالی این تحقیق را بر عهده داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1-Partoinia A, Naimpoor F. Biromidation of contaminated soil with oily normal- hexadacan to Fazdoghabi and scrutiny sensational parameter .Scientific journal of oil 2008; 58 (18):3-10[Persian]

2-Afshar Ebrahimi F.Scruiny effect consortium of Bacillus in degradation on Toloen contaminated soil in Esfahan Petrochemical[MSc thesis]. North Tehran Univercity.2010.[Persian]

3- AkhavanSepahi A, Dejban Golpasha I,Emami M,etal.Isolation and characterization of crude oil degrading Bacillus ssp.Iranianjornal of Enviromental Health science and Engineering2008;5(3):149-154.[Persian]

4-Rismani E,Fooladi J,Ebrahimipor GH.Biosurfactant production in Batch culture by a Bacillus licheniformis isolated from the Persian Gulf.Biological Science2006;9:2498-2502

5- calvo C, Toledo FL , Gonzalez J. Surfactant activity of anaphthalene de grading pacillusPumilus Strain isolated from Oil Sludge.Biotechnol2004;109(3):255-62

6- Abu R,Banat IM,et al.Isolation of biosurfactant production bacteria,product characterization and evaluation.Applid Microbiology1996;25:91-94

7- Abu-Ruwaida, Bannat IM, Haditirtosi S,et al. Isolation of biosarfactant producing bacteria product characterization and evaluation. Biotechno logica1991;4;315-324

8-Cooper , Goldenberg BG.Surface-active agents from two *Bacillus* species. Applied Environ Microbiol1987; 53: 224-229

9- Bannat IM.Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oilpollutionremediation.Bioresource Technology1995;51(1):1-12

10-Akhavan Sepahi A,Mostafai R.Evaluation of Bacillus role in production of biosurfactant in case study and feasibility of using a microbial method recovery in sazandasmari in bibihakimie Square.jornal of Biology2009;(19):107-124 [Persian]

11- Bernhemer AW,Avigod LS. nature and properties of a cytological agent produced by bacillus subtilis. J Gen microbio1970;145:53-56

12- Cerniglia E ,Gibso T.Metabolism of Naphthaleneby the cuanobacteriam oscillation Sp . strain JCM.General Microbiology1979;116:458-494

Archive of SID

www.SID.ir

Bioremedation of water contaminated with crude oil per isolatin Bacillus from oily pound

Mohammadi F(MS.c)[*] AkhavanSepahi A (Ph.D)[**] Mohammadi F(Ph.D)[***] Amini M (BA)[****]

*corresponding Author: MSc student , Department of microbiology, Islamic Azad university north Tehran Branch

**Associate Professor of microbiology, Department of microbiology, Islamic Azad university north Tehran Branch

***PhD student, Tehran University of medical sciences, Medical Mycology, Tehran University

****B.S in animal science,Department of Agriculture , Islamic Azad university Khorasgan

Abstract

Background: Water poluted with crude oil or oil materials are one of the life enviorenment. Bioremedation is a simple method and economical for cleaning poluted water.the aim of this survey is to check the degradation of crude oil power with separated Bacillus from crude oil in Isfahan oil refinery.

Methods: For this purpose polluted water with crude oil is used in Isfahan oil refinery.choosing cases were cultured in the MSM medium and 10000 ppm oil are used in this as an only carbonated bacteries sources.this cultured medium was incubated in a shaker with 150 rpm and 35 tempreture. For separating generating biosurfactant bacterias,checking hemolytic activity as the first norm of separating and isolating.for checking the strength of crude oil degradation purified three strains and this three strain's consortium put IR (infrared rey) test and GC-MS(gas chromatography - spectrometry). Purified Bacillus are reganized with biochemical and molecular diagnostic methods.

Results : Among twelve strains separating,eight strains were been able to lysis sheep erythrocytes and make hemolysis halo on medium blood agar.strains that had hemolytic activity were choosen for later studying.

Surface tension of three strains were acceptable.the consortium of this three strains was surveyed on Biosurfactant out put and purified three strains got numbers of 38,30,34 mN/m and consortium got 28 mN/m.when sequences above put in the BLAST program,the results showed similarity of 99.8 percent of separated bacterias with Bacillus subtilis and Bacillus cereus. Identified two Bacillus were only defferent in to six nucleotid.

Conclusion : The surveys showed that consortium function in the biodegradation is more effective of Bacillus culture was alone,in fact consortium worked effectively in comparison with only Bacillus in the crude oil biodegradation on the polluted waters.

Keyword: Biosurfactantt, surface tension, consortium, Bacillus subtilis, Bacillus cereus

Archive of SID

www.SID.ir