بررسی تجزیه زیستی آب آلوده به نفت خام توسط باسیلوس جدا شده ازپساب در پالایشگاه نفت اصفهان

شیما کثیری*[۱]، منیر دودی[۱] و میترا سادات طباطبایی[۲]

۱- گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۷

چکیده

هدف از این پژوهش شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌های نفتی برای زیست پالایی پساب‌های آلوده به نفت است. تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باسیل‌های تجزیه کننده نفت خام انجام شد. به منظور بالا بردن احتمال جداسازی باسیلوس‌ها از نمونه‌های برداشت شده بر روی محیط کشت اختصاصی (MSM) کشت داده شد و به آن ۱٪ نفت خام به عنوان تنها منبع کربن اضافه گردید. با کشت باکتری‌ها روی محیط بلاد آگار باکتری‌های مولد بیو سورفاکتانت جداسازی و خالص شد. تست کشش سطحی بر روی باکتری‌های دارای همولیز بتا که مولد بیوسورفاکتانت هستند، انجام گردید. تست امولسیفیکاسیون برای باسیلوس‌های منتخب به عمل آمد برای شناسایی گونه باسیلوس‌ها از محیط‌های کشت بیوشیمیایی استفاده گردید، سپس گونه باکتری‌ها تعیین گردید. بررسی تجزیه نفت خام از طریق آنالیز نمونه‌ها با GC-MS و اسپکتروفوتومتری صورت پذیرفت. میزان سویه به دست آمده در این پژوهش برابر ۳۵ mN/m و توانایی امولسیفیکاسیون سویه برابر ۷۰٪ بود. سرانجام این سویه توسط روش‌های مولکولی به عنوان باسیلوس سرئوس شناسایی شد.

کلمات کلیدی: کشش سطحی، باسیوس سرئوس، GC-MS، امولسیفیکاسیون

مقدمه

فرآورده‌های نفتی پرمصرف‌ترین مواد شیمیایی در دنیای مدرن امروز محسوب می‌شوند. با توجه به حجم عظیم سوخت مصرفی در اتومبیل‌ها و فراوانی دفعاتی که یک بشکه نفت منتقل و ذخیره می‌شود، تصادف و نشت آن اجتناب‌ناپذیر است [۱]. اعتقاد بر این است که کل میزان نفتی که از طریق فعالیت‌های انسانی و یا طبیعی وارد دریا می‌شود، می‌تواند سطح همه اقیانوس‌های کره زمین را با ضخامت ۲۰ مولکول بپوشاند. با توجه به اینکه نفت، حاوی مواد شیمیایی خطرناکی نظیر بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، زایلن و نفتالن است، می‌تواند

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی: shimakasiri@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

برای سلامت گیاهان، جانوران و انسان مضر باشد. به همین دلیل پاک‌سازی این آلودگی‌ها باید هرچه سریع‌تر انجام گیرد. برای پاک‌سازی مواد نفتی، روش‌های متعددی از جمله فیزیکی، بیولوژیکی و شیمیایی وجود دارد. پاک‌سازی بیولوژیکی از بی‌ضررترین و آسان‌ترین این روش‌ها است که در این روش میکروارگانیسم‌های متنوعی از جمله باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی و قارچ‌ها در حذف آلاینده‌های شیمیایی خاک و بهبود اکوسیستم مؤثر می‌باشند. شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌های نفتی به ویژه باکتری‌های بومی، اولین گام برای پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به این ترکیبات به شمار می‌رود. هرچه میزان حذف آلاینده توسط یک میکرو ارگانیسم بیشتر باشد، آن میکر وارگانیسم از نظر بیوتکنولوژی محیطی ارزنده‌تر است [۲]. هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و شناسایی باسیلوس‌های تجزیه کننده نفت خام از پساب آلوده به نفت در پالایشگاه اصفهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های پساب از مناطق آلوده به نفت در پالایشگاه نفت اصفهان جمع‌آوری گردید. سپس نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای استریل دربدار ریخته شد و برای انجام آزمایش‌های لازم بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید.

غنی‌سازی باسیلوس‌های مولد بیوسورفاکتانت

به منظور ازدیاد باسیلوس‌های مولد بیوسورفاکتانت و بالابردن احتمال جداسازی آنها، تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت (MSM) حاوی ۱٪ نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی کشت داده شد. براساس مطالعات انجام شده، باسیلوس‌ها بهترین رشد را در غلظت ۱ ٪ نفت دارند. به این منظور به هر ارلن مایر ۲۵۰ ml، ۱۰۰ ml محیط کشت تازه MSM اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C استریل شد سپس ۱ ml نفت خام استریل شده با فیلتر غشایی (Gelman Sciences، Pore size=0/45 µ) به آنها اضافه شد. ترکیبات محیط پایه نمکی (MSM) مورد استفاده در این تحقیق به‌صورت زیر می‌باشد [۳]:

K_2HPO_4=2.5g/L, $MgSO_4.7H_2O$=0.3g/L, (NH_4) CL=4 g/L, NaCL=0.05g/lit, $CaCl_2$=0.01g/Lit

سپس میزان ۲ ml از عناصر کمیاب به ترکیب یاد شده به شرح زیر اضافه گردید (gr/lit):

$ZnSO_4.H_2O$= 0. 75g/L ,$MgSO_4.H_2O$=0. 2g / L , $CuSO_4.5H_2O$=0.075g/L,$Na_2MoO_4.2H_2O$=0.05 g/L, $CoCl_2.6H_2O$=0.08g/L, H_3BO_3=0.15g/L, $FeCl_3.6H_2O$=0.027g /L

در ادامه cc ۱ از نمونه پساب به هر یک از ارلن‌ها اضافه شد و به مدت ۳ هفته در دمای ۳۰°C با دور همزن ۱۵۰ rpm، گرماگذاری گردید. هر هفته ml ۱ از محیط کشت هر ارلن برداشته و به لوله آزمایش استریل درب دار منتقل شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۸۰°C قرار داده شد، تا شوک حرارتی حاصل، باعث از بین رفتن شکل رویشی میکرو ارگانیسم‌های موجود در نمونه خاک و باقی‌ماندن اسپور باسیوس‌ها در محیط گردد. پس از آن ml ۰/۵ از مایع میکروبی به پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد MSM اضافه و در انکوباتور ۳۰°C قرار داده شد. برای خالص‌سازی باکتری‌ها، کلنی‌هایی که از نظر ظاهری متفاوت بودند، به‌صورت متوالی بر روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) به روش کشت خطی، کشت داده شدند. کشت نمونه بر روی محیط جامد نوترینت آگار تا رسیدن به کلنی خالص به دفعات متوالی تکرار گردید [۴].

جداسازی سویه‌های دارای همولیز

تمام کشت‌های خالص مرحله قبل بر روی محیط بلاد آگار (BA) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C گرماگذاری شدند. سویه‌های حاوی همولیز بتا (هاله شفاف)، برای تست‌های بعدی انتخاب شدند [۵].

اندازه‌گیری کشش سطحی: کشش سطحی به روش Du Nouy Ring Method و با استفاده از دستگاه تنسیومتر اندازه‌گیری شد. برای این منظور به هر یک از سویه‌های انتخاب شده در ارلن مایرهای ml ۱۰۰، ml ۵۰ محیط کشت تازه MSM ۱٪ عصاره مخمر استریل تلقیح و نفت خام با فیلتر غشایی به میزان ۱٪ به‌عنوان منبع کربن و انرژی به ارلن اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C و دور همزن ۲۰۰ rpm گرماگذاری شد.

Archive of SID
www.SID.ir

پس از اندازه‌گیری با تنسیومتر، سویه‌های دارای کشش سطحی کمتر از ۴۰ mN/m برای مراحل بعدی انتخاب شدند [۴].

اندازه‌گیری فعالیت امولسیفونه کنندگی: برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی از روش Cooper و Goldenberg استفاده شد. برای این منظور ml ۴ از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط پایه نمکی (MSM) به همراه ml ۶ از هیدروکربن مورد نظر (نفت خام) در لوله آزمایش درب دار مدرج ریخته شد. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ دقیقه در دور rpm ۲۰۰ هم زده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط سکون قرار گرفت [۶]. پس از این مدت، فعالیت امولسیفیکاسیون (EC) با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$EC = \frac{\text{طول لایه امولسیفونه شده}}{\text{طول کل ستون مایع}} \quad (۱)$$

شناسایی باکتری‌های جداسازی شده

الف- بررسی میکروسکوپی و بیوشیمیایی: ظاهر باکتری‌ها، اولین مشخصه شناسایی، است. از این رو خصوصیات ظاهری کلنی باکتری‌ها از لحاظ اندازه، شکل، رنگ، لبه، سطح و شفافیت مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی دقیق‌تر از آزمایشات معمول میکروبیولوژی و آزمایش‌های تشخیص بیوشیمیایی براساس کتاب راهنمایی سیستماتیک باکتری‌شناسی برجی از جمله: تست‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره، سیمون سیترات، MR,VP، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز کازئین، فعالیت H_2S و تولید اندول انجام شد [۷ و ۸].

ب- شناسایی مولکولی: از آنجا که خصوصیات ژن 16SrRNA روش مناسبی جهت مطالعه روابط در میان گونه‌های مختلف میکرو ارگانیسم‌ها می‌باشد، به منظور تعیین هویت مولکولی سویه‌های مختلف از روش 16SrRNA gene sequencing استفاده گردید [۹ و ۱۰]. سپس این ژن با استفاده از PCR تکثیر شد و پس از آن محصول PCR تعیین توالی گردید. توالی 16SrRNA باکتری مورد نظر با سایر توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، به کمک نرم‌افزار BLAST مورر بررسی قرار گرفت.

آنالیز متابولیت‌های حاصل از تجزیه زیستی نفت خام توسط دستگاه GC-MS

در ابتدا این سویه باکتری به‌صورت جداگانه در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت، از کشت به‌عنوان مایع تلقیح استفاده گردید. به ارلن مایر ml ۲۵۰، ml ۱۰۰ محیط کشت مایع MSM استریل به همراه ۱٪ نفت خام استریل و میزان ۵٪ از پیش کشت باکتری اضافه شد و سپس ارلن‌ها در انکوباتور ۳۰°C با دور همزن rpm ۱۵۰ به مدت ۷ روز گرماگذاری شد. یک ارلن حاوی محیط کشت MSM و ۱٪ نفت خام بدون تلقیح میکروبی به‌عنوان نمونه شاهد تهیه گردید. در انتهای دوره گرماگذاری (۷ روز) ml ۵۰ دی کلرومتان به ارلن حاوی کشت باکتری و نفت اضافه و دی کلرومتان به خوبی با محیط مخلوط گردید. سپس درون قیف جداکننده ریخته شد تا فاز آلی و آبی از هم جدا شوند سپس فاز آلی که حاوی نفت حل شده در دی کلرو متان بود، درون ارلن جدا ریخته شد و gr ۳ سولفات سدیم، به منظور جذب آب باقی‌مانده به ارلن اضافه گردید. سپس محتویات ارلن از کاغذ واتمن شماره ۲ عبور داده شد و به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از تبخیر DCM، میزان ml ۱۰ هگزان نرمال به آن اضافه شد و توسط دستگاه GC-MS مورد آنالیز قرار گرفت [۱۱ و ۱۲]. برای آنالیز از GC-MS مجهز به ستون HP-5MS به طول ستون m ۳۰ و قطر داخلی mm ۰/۲۵ با گاز حامل هلیم استفاده شد. شرایط دمایی آنالیز به شرح زیر بود: ابتدا ۳ دقیقه در دمای ۵۰°C (دمای شروع) ماند و سپس با سرعت ۱۵°C /min تا دمای ۲۹۰°C بالا رفته و مدت min ۶ روی این دما ماند و سپس تزریق انجام شد.

سنجش حذف نفت خام به روش اسپکتروفتومتری

میزان حذف نفت خام به وسیله حل کردن مقدار نفت باقی‌مانده محیط کشت در دی‌کلرومتان (DCM) و سپس خواندن کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج nm ۴۲۰ تعیین گردید. کلیه مراحل دو بار تکرار شد [۱۳ و ۱۴]. درصد حذف نفت خام از روابط زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{درصد حذف نفت خام} = \frac{\text{میزان جذب نمونه} - \text{میزان جذب شاهد}}{\text{میزان جذب شاهد}} \times 100 \quad (۲)$$

نتایج و بحث

پس از خالص‌سازی، ۱۲ سویه باسیلوس جداسازی گردید که از این میان ۴ سویه دارای فعالیت همولیتیک (همولیز بتا) بود که به‌عنوان باسیلوس‌های مولد بیوسورفاکتانت انتخاب شد.

Archive of SID

www.SID.ir

از بین ۴ سویه که برای تست کشش سطحی انتخاب گردید، ۱ سویه دارای کشش سطحی کمتر از ۴۰ mN/m. با حد قابل قبولی از آمیزندگی (امولسیفیه کنندگی) بود (جدول ۱). میزان کشش سطحی در ۴ باسیل به‌دست آمده به ترتیب برابر با ۳۵، ۴۷، ۴۲، ۴۹ mN/m بود که در این میان باسیل ۱ قابل قبول است. میزان امولسیفیه کنندگی باسیلوس‌ها برابر با ۷۰،۶۰،۶۵ و۵۰ به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول ۱- کشش سطحی باسیلوس پذیرفته شده

کشش سطحی mN/m	سویه‌های جداسازی شده
۶۰ mN/m	شاهد
۳۵ mN/m	نمونه B1

جدول۲- میزان فعالیت امولسیفیه‌کنندگی باسیلوس پذیرفته‌شده

EC	سویه‌های جدا شده
٪۷۰	نمونه B1

شناسایی باکتری‌ها

مشخصات مورفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی

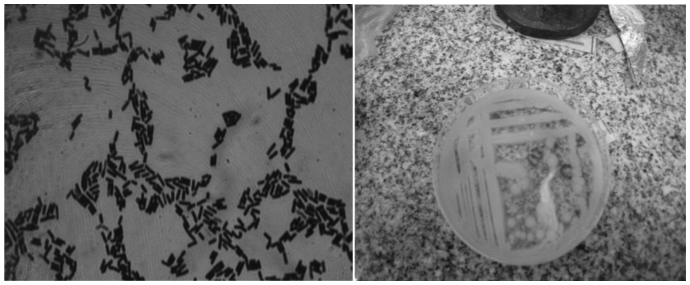
نمونه‌ها بر روی لام برده شد و به روش گرم رنگ‌آمیزی گردید و توسط میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین از آنها عکس تهیه شد. این باکتری زیر میکروسکوپ به شکل باسیل گرم مثبت قابل رویت است. کلنی‌های این باکتری بر روی محیط کشت نوترینت آگار به‌صورت کلنی‌هایی با اندازه متوسط، صاف، گرد، با حاشیه منظم و به رنگ سفید مشاهده گردید (شکل ۱). با توجه به نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی و مشخصات مورفولوژیک این سویه، این باکتری به‌عنوان جنس باسیلوس گزارش شد (جدول ۳).

شناسایی مولکولی

از کشت باسیل مورد نظر در محیط مایع به وسیله سانتریفیوژ، توده سلولی جدا شده و DNA ژنومی به کمک کیت استخراج شد. µm ۱ محلول DNA ژنومی به‌عنوان DNA الگو در PCR با پرایمرهای FD ۱ و FD ۲ استفاده شد. محصول PCR فوق در کنار مارکر مولکولی وزنی با سایز kb ۱ مربوط به شرکت فرمنتاز قرار داده شد (شکل۲)

با به‌دست آوردن نتایج توالی ژن با استفاده از داده‌های موجود در بانک ژنی NCBI، عملیات BLAST انجام گردید. نتایج نشان داد که توالی حاصل از باکتری B1 بیشترین شباهت را با توالی ژن‌های Bacillus cereus، 16SrRNA دارد و به احتمال ۹۹/۶٪، از نوع Bacillus cereus می‌باشد.

در شکل‌های ۳ و ۴، زیر طیف‌های جرمی نفت خام در نمونه شاهد و باسیل به‌دست آمده از طریق کروماتوگرافی گازی طیف‌سنج جرمی نشان داده شده است. نمونه شاهد فاقد باکتری است. از هر یک از مواد جدا شده از پساب آلوده توسط دستگاه GC-MS در زمان مشخصی پیک به‌دست آمده است. هر چه ارتفاع و سطح زیر پیک بیشتر باشد، میزان آلودگی نیز بیشتر است. در این نمودارها ستون افقی نشان‌دهنده زمان و ستون عمودی نشان‌دهنده غلظت فراورده می‌باشد. شرایط دمایی ستون ابتدا از دمای ۵۰°C شروع شد و min ۳ بر روی این دما متوقف شد و بعد با سرعت °C/ min ۱۵ تا دمای °C ۲۹۰ بالا رفته و به مدت ۶ دقیقه در این دما باقی‌ماند.



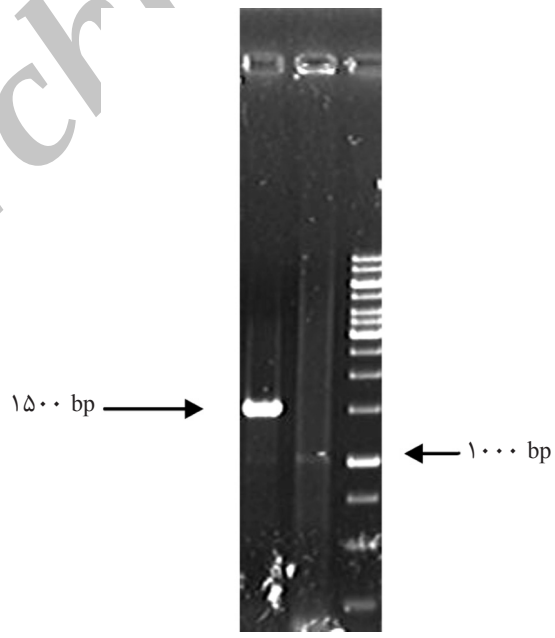
شکل ۱- تصویر میکروسکوپی (راست) و ماکروسکوپی (چپ) سویه B1

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۳- نتایج تست‌های بیوشیمیایی سویه انتخاب شده در اندازه‌گیری کشش سطحی

تست‌های بیوشیمیایی	B1
اسپور	+
VP	+
MR	–
اکسیداز	+
ژلاتیناز	+
اندول	–
H_2S	+
حرکت	+
هیدرولیز نشاسته	+
مصرف سیترات	+
تخمیر گلوکز در شرایط هوازی	+
تخمیر گلوکز در شرایط بی هوازی	+
تخمیر گزیلوز	–
تخمیر آرابینوز	–
اوره آز	–
لیستیناز	+
کاتالاز	+



شکل۲- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪

Archive of SID

www.SID.ir

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\1\data\Es Oil \
Data File : 910515 SHAHED ES OIL5M 1.D

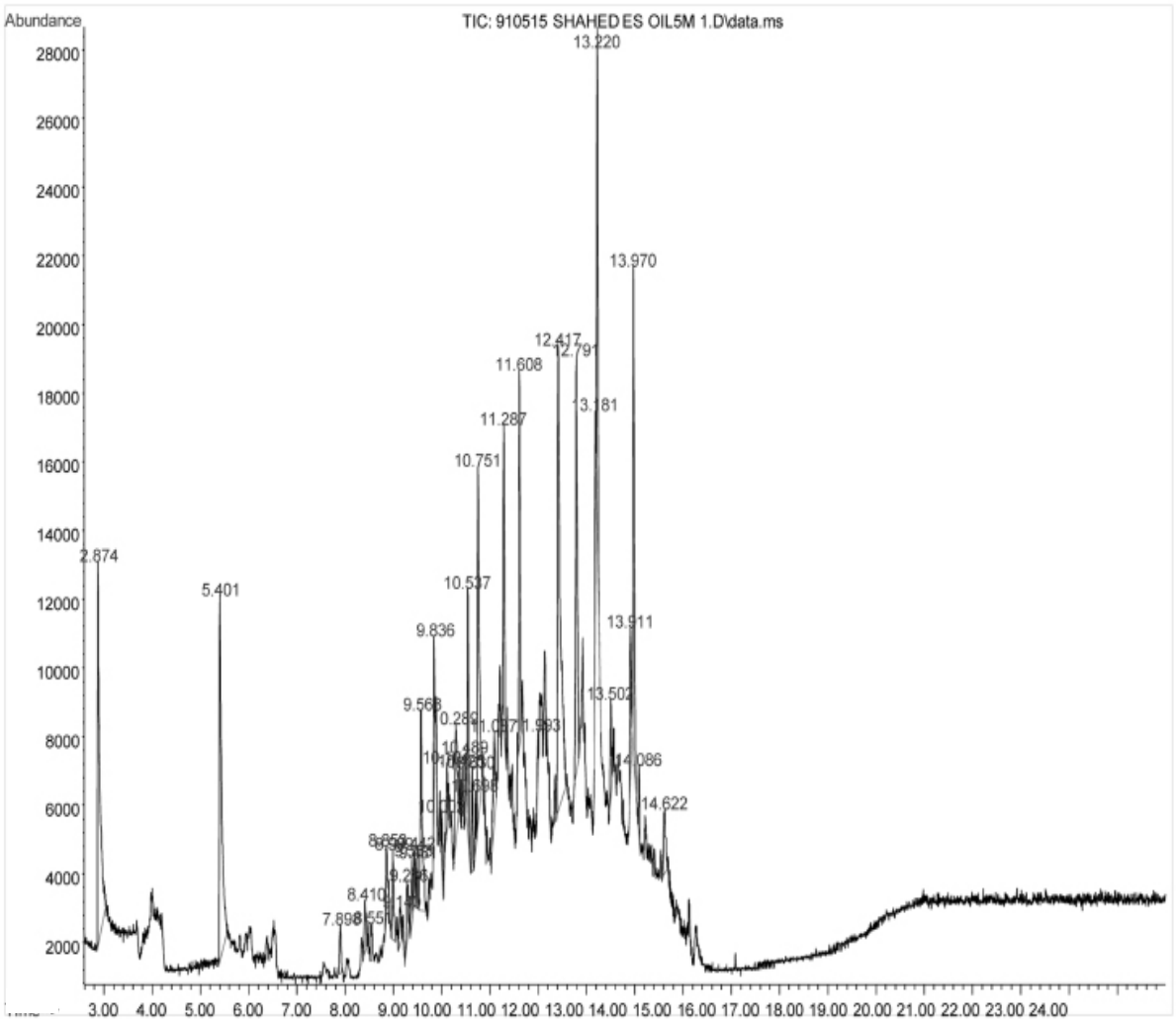
Acqo cOn c k .c : 6 Aug 2012 4:26

ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1000

Integration Parameters: 1.p
Integrator: RTE
Smoothing : ON Filtering: 5
Sampling : 1 Min Area: 4 % of largest Peak
Start Thrs: 0.2 Max Peaks: 100
Stop Thrs : 0 Peak Location: TOP

If leading or trailing edge < 100 prefer < Tangent else baseline drop >
Peak separation: 5

Method : D:\MSDCHEM\1\METHODS\STANDBY.M
Title :



زمان (min)

شکل ۳- طیف جرمی نمونه شاهد

www.SID.ir

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\1\data\Es Oil \
Data File : 910515 SHAHED ES OIL5M 1.D

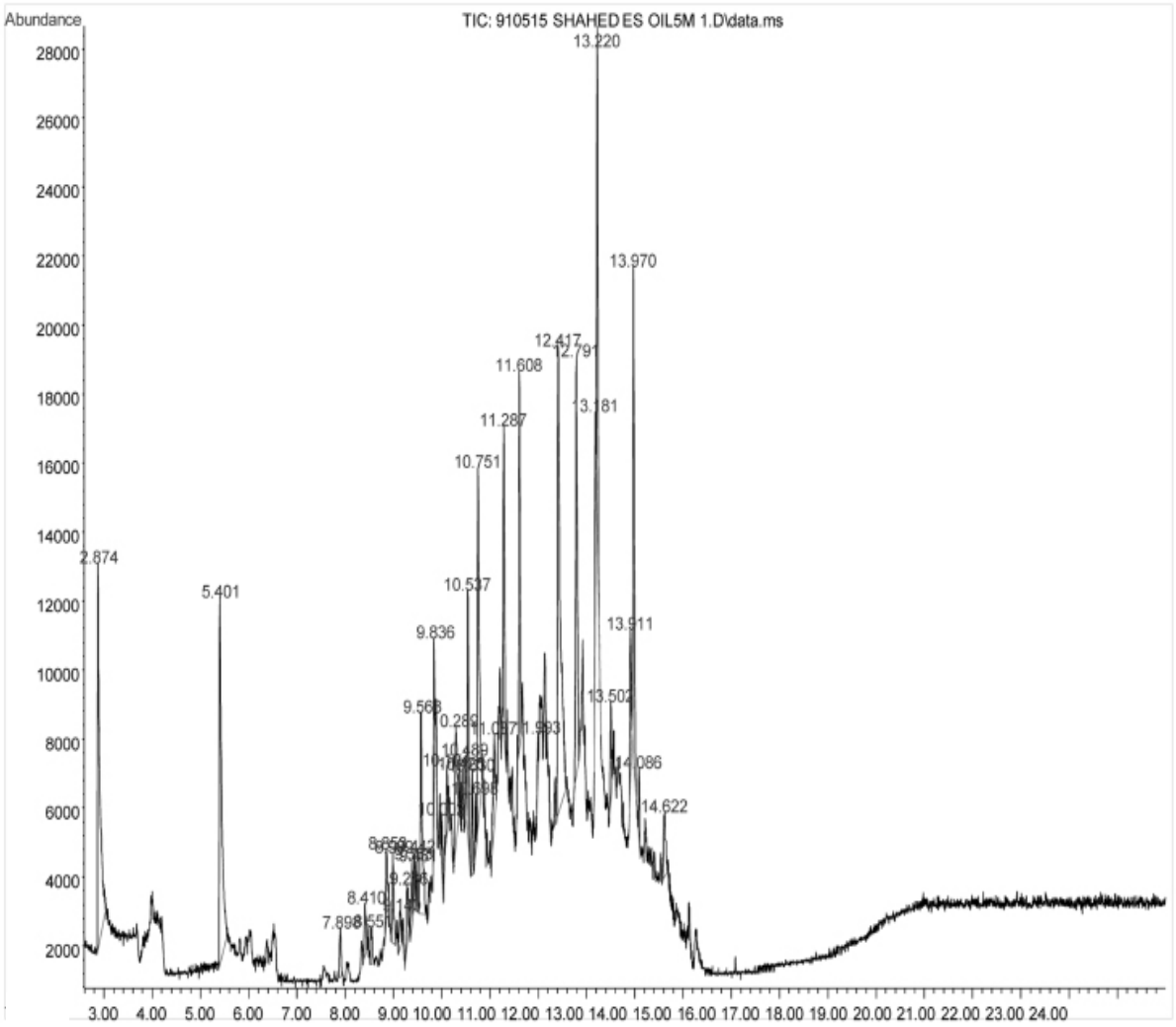
Acqo cOn c k .c : 6 Aug 2012 4:26

ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1000

Integration Parameters: 1.p
Integrator: RTE
Smoothing : ON Filtering: 5
Sampling : 1 Min Area: 4 % of largest Peak
Start Thrs: 0.2 Max Peaks: 100
Stop Thrs : 0 Peak Location: TOP

If leading or trailing edge < 100 prefer < Tangent else baseline drop >
Peak separation: 5

Method : D:\MSDCHEM\1\METHODS\STANDBY.M
Title :



شکل۴- طیف جرمی باسیل ۱

www.SID.ir

جدول۴- درصد تجزیه ترکیبات حاضر در نفت خام نسبت به نمونه شاهد با توجه به پیک‌های GC-MS

شماره پیک (باسیل B1)	زمان (min)	سطح زیر منحنی باسیل B1	نام ترکیب مشابه در نمونه شاهد و باسیل B1	شماره پیک (شاهد)	زمان (شاهد) (min)	سطح زیر منحنی شاهد	کاهش
۱	۲/۹۲۳	۲۵۱۳۶	Methyl-d3 1-Dideuterio-2-propenyl Ether	۱	۲/۸۷۴	۳۶۹۲۰	٪ ۳۱/۲
۲	۵/۴۱۱	۱۵۷۸۶	Oxime-, methoxy-phenyl-	۲	۵/۴۰۱	۳۴۹۳۹	٪۵۴/۹
۵	۸/۸۵۸	۴۸۶۸	Heptadecanamine (CAS)	۶	۸/۸۵۳	۷۷۳۰	٪۳۷/۱
۵	۸/۸۵۸	۴۸۶۸	Margarylamine	۶	۸/۸۵۳	۷۷۳۰	٪۳۷/۱
۵	۸/۸۵۸	۴۸۶۸	Hep tadecylamine	۶	۸/۸۵۳	۷۷۳۰	٪۳۷/۱
۵	۸/۸۵۸	۴۸۶۸	1-Aminoheptadecane	۶	۸/۸۵۳	۷۷۳۰	٪۳۷,۱
۶	۹/۵۶۸	۴۶۰۷	Eicosane, 2-methyl- (CAS)	۷	۸/۸۹۸	۷۵۰۱	٪۳۸/۶
۶	۹/۵۶۸	۴۶۰۷	19-Methyleicosane	۷	۸/۸۹۸	۷۵۰۱	٪۳۸/۶
۱۰	۱۲/۷۹۱	۲۰۲۷	Hexadecane, 2-methyl	۳۱	۱۳/۲۲۰	۲۳۹۵۰	٪۹۱/۶
۱۰	۱۲/۷۹۱	۲۰۲۷	Dodecane, 1,1'-oxybis-(CAS)	۱۱	۹/۴۴۲	۲۴۰۶	٪۱۵/۸
۱۰	۱۲/۷۹۱	۲۰۲۷	Dodecyl ether	۱۱	۹/۴۴۲	۲۴۰۶	٪۱۵/۸
۱۰	۱۲/۷۹۱	۲۰۲۷	13-Oxapentacosane	۱۱ ۱۰	۹/۴۴۲ ۹/۳۸۳	۲۴۰۶ ۴۲۱۷	٪۱۵/۸ ٪۵۲
۱۲	۱۳/۲۲۰	۵۰۱۲	Tetratetracontane	۳۲۳	۱۰/۷۵۱	۲۶۲۶۶	٪۸۱
۱۲	۱۳/۲۲۰	۵۰۱۲	Pentadecane, 2,6,10,14-tetra-methyl	۲۹	۱۲/۷۹۱	۲۷۲۸۹	٪۸۱/۴
۱۳	۱۳/۹۷۰	۱۵۹۱۰	Hexadecane l	۳۴	۱۳/۹۷۰	۲۷۳۸۵	٪۴۱/۹

براساس نتایج به‌دست آمده از کروماتوگرافی گازی مشخص می‌شود که بیشترین میزان حذف مربوط به Hexadecane,2methyle و برابر ۹۱/۶٪، و پس از آن، بیشترین حذف مربوط به Pentadecane,2,6,10,14-tetramethle می‌باشد (جدول۴).

بررسی حذف نفت خام به روش اسپکتروفتومتری

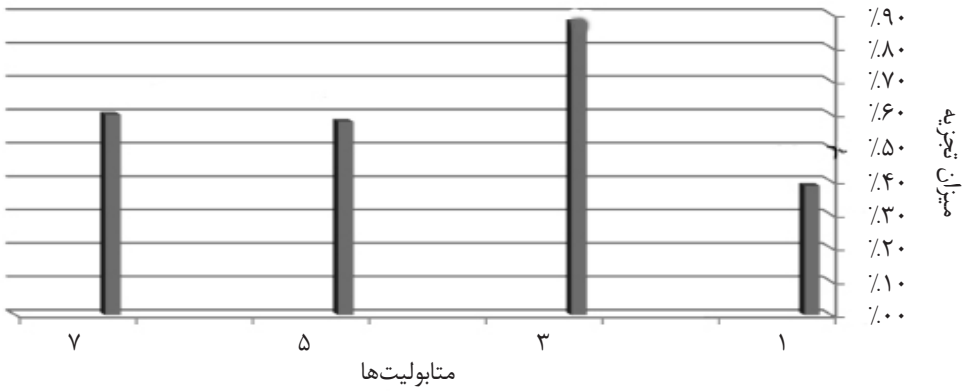
در جدول ۵ میزان درصد حذف نفت خام توسط این سویه در طول موج ۴۲۰ nm ارائه شده است. در شکل ۵٪، تجزیه متابولیت‌های حاضر در نفت خام رسم شده است.

جدول۵- درصد حذف نفت خام توسط سویه جداسازی شده به روش اسپکتروفتومتری

سویه	درصد حذف نفت
باسیلوس (B_1)	٪ ۶۱/۹

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- درصد تجزیه متابولیت‌های حاضر در نفت خام توسط باسیلوس b1

همان‌گونه که در طیف جرمی باسیل ۱ مشاهده می‌شود، ارتفاع و سطح زیرپیک کاهش یافته که نشان‌دهنده حذف آلودگی توسط باسیلوس مورد نظر می‌باشد در جدول ۴ میزان حذف آلودگی مواد مختلف توسط باسیلوس مورد نظر بر حسب درصد نشان داده شده است

نتیجه‌گیری

نمونه‌برداری از مناطق آلوده به نفت و لجن‌های نفتی انجام شد .نمونه‌ها پس از سپری شدن مراحل غنی‌سازی و خالص‌سازی بر روی محیط کشت (MSM) حاوی ۱٪ نفت خام و به‌دست آمدن کلنی‌های خالص شده بر روی محیط کشت اختصاصی برده شدند که همگی قادر به رشد برروی محیط کشت اختصاصی بودند سپس برای بررسی فعالیت همولیتیک بر روی بلاد آگار کشت داده شدند. در این روش به علت خالص بودن کشت‌ها میزان آلودگی قارچی تا حد زیادی کاهش می‌یابد. به‌طور کلی با این روش، غربال‌گری اولیه باکتری‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت انجام می‌شود بیوسورفاکتانت‌ها سبب لیز شدن اریتروسیت‌ها می‌شوند که نتیجه آن تشکیل هاله بتاهمولیز اطراف سویه‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت است دراین مطالعه از ۱۲باسیل جداسازی شده از خاک و آب آلوده به نفت خام، ۴ باسیل دارای همولیز بتا روی محیط بلاد آگار بودند. اندازه‌گیری کشش سطحی به روش Du Nouy Ring Method و با استفاده از دستگاه تنسیومتر انجام شد. سویه‌های دارای کشش سطحی کمتر از ۴۰ mN/m برای مراحل بعدی انتخاب شدند، گام بعدی جهت غربال‌گری باکتری‌های هوازی تولید کننده بیوسورفاکتانت بررسی فعالیت امولسیفیه کنندگی سویه‌های باکتریایی جدا شده است. که ما در این پژوهش EC را برای باسیل‌های جدا شده به‌دست آوردیم. میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده نفت خام هر یک قادرند برخی از ترکیبات نفت خام را تجزیه نمایند و آن ترکیب را حذف کنند. به منظور بررسی و آنالیز نفت خام و تعیین نوع ترکیب حذف شده از درون آن از روش‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود در این پژوهش از روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC-MS) استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

در این تحقیق درصد حذف نفت خام توسط روش اسپکترفتومتری نیز انجام شد. میزان حذف نفت خام به وسیله حل کردن مقدار نفت باقی‌مانده محیط کشت در دی‌کلرومتان (DCM) و سپس خواندن کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گردید. در نهایت سویه‌های جداسازی شده با بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی و در نهایت تخلیص DNA و تعیین 16S rRNA آنها شناسایی گردیدند.

پس از خالص‌سازی، ۱۲ سویه باسیلوس جداسازی گردید. که ۴ سویه دارای فعالیت همولیتیک (همولیز بتا) بودند که به‌عنوان باسیلوس‌های مولد بیوسورفاکتانت انتخاب شدند. از بین ۴ سویه که برای تست کشش سطحی انتخاب شدند، ۱سویه دارای کشش سطحی کمتر از ۴۰ mN/m بود همچنین این سویه دارای حد قابل قبولی از آمیزندگی (امولسیفیه کنندگی) بود. میزان کشش سطحی در ۴ باسیل به‌دست آمده به ترتیب برابر با ۳۵، ۴۷، ۴۲ و ۴۹ mN/m بود که در این میان باسیل ۱ قابل قبول بود. میزان امولسیفیه کنندگی باسیلوس‌ها برابر با ۷۰،۶۰،۶۵ و ۵۰ بود. با توجه به نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی و مشخصات مورفولوژیک این سویه و با استفاده از کتاب رده‌بندی باکتری‌ها، این باکتری به‌عنوان جنس باسیلوس گزارش شد. با به‌دست آوردن نتایج توالی ژن با استفاده از داده‌های موجود در بانک ژنی NCBI عملیات BLAST انجام گردید و نتایج نشان داد که توالی حاصل از باکتری B1 بیشترین شباهت را با توالی ژن‌های Bacillus cereus، 16SrRNA دارد و به احتمال ۹۹/۶٪ Bacillus cereus می‌باشد.

مراجع

[1]. Akhavan Sepahi A., Dejban Golpash I., Emami M, and Nakhoda A. M., "*Isolation and characterization of crude oil degrading Bacillus spp.*," Iranian Journal of Enviroment Health Science & Engineering., Vol. 5 , No. 3 , pp. 149-154 , 2008.

[2]. Aparana A., Srinikethon G., and Hegde S.. "*Effect of addition of biosurfatant produced by Pseudomonas sps. on biodegradation of crude oil*," 2nd International Conference on Enviromental Science and Technology, Vol. 6, pp. 71-75, 2010.

[3]. Bardi L., Mattei A., and Staffan S. "*Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β-cylodextrin as surfactant to enhance bioaviability,"* Enzyme and Microbial Technology, Vol. 27, No. 9, pp. 709-713, 2000.

[4]. Bernheimer A. W. and Avigad L. S. "*Nature and properties of cytolytic agent produced by Bacillus subtilis*," Journal of General Microbiology., Vol. 61, pp. 361-369. 1970.

[5]. Bicca F. C., Fleck L. C., and Ayub M.A. Z. "*Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcus ruber and Rhodococcus erythropolis*," Revista de Microbiologica, Vol. 30, No. 3, pp. 231-236. 1999.

[6]. Calvo C., Toledo F. L., and Gonzales-Lopez J., "*Surfactant activity of a naphthalene degrading Bacillus pumilus strain isolated from oil sludge,*" J Biotechnol., Vol. 109, No. 3, pp 255-262, 2004.

[7]. Dhail S. and Jasuja N. D., "*Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria,*" African Journal of Enviromental Science and Technology, Vol. 6, No. 6, pp. 263-266. 2012.

[8]. Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., and Staley J. T., "*Bergeys manual of systematic bacteriology*," 2th edition, New York: Spriger, pp. 323-84. 2005.

Archive of SID

www.SID.ir

[9]. Gogoi B. K., Dutta N. N., Goswami P., and Krishna Mohan T. R., "*A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site*," Adv. Environ. Res., Vol. 7, pp. 767-782. 2003. [10]. Haghighat S., Akhavan Sepahi A., Mazaheri Assadi M., and Pasdar H., "*Ability of indigenous Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis in microbial enhanced oil recovery*," International Journal of Enviroment Science snd Technology., Vol. 5, No. 3, pp. 385-390. 2008.

[11]. Hua J., "*Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy*," Ocean Engineering, Vol. 33, pp. 152-167. 2006.

[12]. Rahman K. S., Banat I. M., Thahira J., Thayumanvan T., and Lakshmanaperumalsamy P., "*Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter,coir pith and rhamnolipid biosurfactant,*" Bioresource Technology, Vol. 81, No.1, pp. 25-32. 2002.

[13]. Teschener M. and Wehner H. "*Chromatographic investigations on biodegraded crude oils,*" Chromatographia, Vol. 20, No. 7, pp. 407-416. 1983.

[14]. Singh A., Jonathan D., Hamme V., and Owen P. "*Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2,*" Application Aspects Biotechnology Advances, Vol. 25, pp. 99-121. 2007.

Archive of SID

www.SID.ir