فصلنامه علمی پژوهشی

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۴، پاییز ۱۳۸۸

بررسی تجزیه زیستی تولوئن توسط کنسرسیوم باسیلوس ها در خاک های آلوده به تولوئن

عباس اخوان سپهی*[۱]، فرناز افشارابراهیمی [۲] و داریوش مینایی تهرانی[۳]

۱. عضو هیات علمی دانشکده میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران- شمال(نویسنده مسئول)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران

۳. عضو هیات عملی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

دراین تحقیق تجزیه زیستی تولوئن توسط مخلوطی از باسیلوس های جدا شده از خاک الوده به تولوئن بررسی شد. پس از نمونه برداری از خاک مورد نظر، باسیلوس های تحمل کننده تولوئن جدا سازی شدند، با کشت باکتری ها برروی بلاد اگار، باکتریهای دارای همولیز β جدا گردید، سپس تست کشش سطحی برای تشخیص باسیلوسهای مولد بیوسورفکتانت انجام شد.پس از غربالگری باکتریهای مولد بیوسورفکتانت، تست امولسیفیکاسیون از باسیلوس های منتخب بعمل آمد. باسیلوسها با روش تشخیص بیوشیمیایی و مولکولی (استخراج DNA، PCR ،و تکنیک تعیین توالی ژن S rRNA ۱۶) شناسایی شدند. ازبین ۲۳ سویه باسیلوس جدا شده،۳سویه B3,B6,B12 دارای کشش سطحی کمتراز۴۰mN/m بودند که بعنوان باکتریهای مولد بیوسورفکتانت شناسایی شدند. پس از انجام تست امولسیفیکاسیون، توانایی امولسیفیکاسیون سه سویه مذکور به ترتیب۷۵و۷۰و۷۸٪ اندازه گیری شد. هرسه باسیلوس متعلق به گونه سوبتیلیس بودند و مقایسه توالی 16S rRNA سه سویه نیز حاکی از تشابه بسیار بالای آنها بود به طوریکه سه توالی در حدود ۶ نوکلئوتید تفاوت داشتند.

درادامه پس از بهینه سازی شرایط برای تولید بیوسورفاکتانت توسط مخلوط سه سویه (کنسرسیوم) مشخص شدکه بهترین منبع کربن همان تولوئن ومنبع بهینه نیتروژن عصاره مخمراست وبهترین غلظت نمک ۲٪ و بهترین pH برابر ۶ میباشد که درشرایط مذکور بهترین رشدودرنتیجه بهترین تولید بیوسورفاکتانت توسط کنسرسیوم باسیلوسها مشاهده گردید. کشش سطحی در محیط کشت حاوی مخلوط باسیلوسها درمقایسه با کشت تک آنها بطورواضحی کاهش داشت، بطوریکه درکشت تک باسیلوسهای B6, B3 B12,کشش سطحی به ترتیب برابرmN/m ۳۷، ۳۳/۵ ، ۳۵ تخمین زده شد درحالیکه کشش سطحی درمحیط حاوی کنسرسیوم به mN/m ۲۹ رسید .توانایی امولسیفیکاسیون مخلوط سه سویه باسیلوس ۸۵٪ اندازه گیری شد. با استفاده از دستگاه GC-MS درصد حذف تولوئن ازمحیط، توسط کنسرسیوم باسیلوسی درمقایسه با محیط شاهد (محیط پایه نمکی همراه ۱٪ تولوئن بدون تلقیح کنسرسیوم) ۹۹/۹۱ ٪ تخمین زده شد.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، تولوئن، کنسرسیوم باسیلوسها، بیو سورفکتانت، GC-MS، بهینه سازی.

مقدمه

Streptococcus نفت خام و محصولات آن، چه در هنگام استخراج و چه در مواقع حمل و نقل زمینی و دریایی، در نتیجه رخدادها و تصادف ها سبب آلودگی خاک، آب و یا به طور کلی محیط زیست می شوند. وجود هیدروکربن های نفتی در سطح دریا و در خشکی تهدیدی

Archive of SID

www.SID.ir

جدی برای اکوسیستم به شمار می آید، به همین دلیل پاک سازی این آلودگی ها باید هر چه سریع تر انجام گیرد. برای پاک سازی مواد نفتی، روش های استاندارد و معمول زیادی وجود دارد که به علت هزینه بالا و پایین بودن کارایی محدود می شوند. پاک سازی بیولوژیک مواد نفتی، پروسه هایی هستند که ترکیبات سمی را به مواد غیر سمی و بی خطر تبدیل می کنند. این عمل در نتیجه فعالیت های متابولیک میکروارگانیسم هایی که قادرند از مواد نفتی به عنوان منبع انرژی و کربن خود استفاده کنند، صورت می گیرد.این فناوری قادر است بدون ایجاد خلل در محیط زیست طبیعی، ترکیبات سمی مواد نفتی را به مواد غیر سمی تبدیل کند. در مقایسه با دیگر فناوری های پاک سازی مانند سوزاندن و دفن لجن های نفتی، روش بیولوژیک، بسیار ارزان تر و مقرون به صرفه تر است. یکی ازگروههای اصلی ترکیبات هیدروکربنی موجود در نفت های خام، آروماتیک ها هستند. بنزن ،تولوئن، اتیل بنزن و o- زایلن که مجموعا BTEXخوانده میشوند، ترکیبات سمی هستند که به دلیل حضور همه جانبه شان چه در سوخت وچه درمحصولات نفتی معمولا به محیط زیست انتشار می یابند (۱). آنها همچنین در مقیاس $۱۰^{۶}$ تن در هر سال به صورت ذخایر شیمیایی برای مصرف صنعتی بعنوان حلال ومواد اولیه برای ساختن افت کشها وپلاستیک وفیبرهای مصنوعی، تولید میشوند(۲). امتیاز بکارگیری مخلوط کشتهای میکروبی (کنسرسیوم) بجای کشت خالص در زیست درمانی کاملا مشخص شده است که این موضوع را میتوان به واکنشهای سینرژیک میان اجتماع باکتریها نسبت داد(۳). مکانیسم، کمی ممکن است پیچیده باشد. ممکن است که یک سویه، مواد متابولیکی را که سویه های دیگر تولید کرده اند را پاکسازی کند یا سویه دوم قادر به تجزیه ترکیباتی باشد که ابتدا فقط تا حد نسبی قادربه تجزیه شان بوده است (۳). ازاینرو به نظر میرسد که اجتماع چندین سویه باکتریال میتواند کارایی بهتری در تجزیه مواد هیدروکربنی داشته باشد. از دیگر عواملی که درتجزیه زیستی بوسیله باکتریها نقش بسزایی دارد تولید بیوسورفاکتانت توسط آنها است. گروه گسترده ای از میکروارگانیسمها ترکیبات فعال کننده سطحی به نام بیوسورفاکتانت ترشح می نمایند. ترشح این ترکیبات توسط سلول های میکروبی باعث تسهیل در جذب سوبستراهای غیرقابل حل می شود. ارزشمندترین جنبه کاربردی بیوسورفاکتانت ها مربوط به صنعت نفت می باشد که جهت بهبود کیفیت، تسهیل در استخراج، تقلیل گرانروی، مهار نشت نفت و پاکسازی لجن نفتی در تانکرها از آنها استفاده می شود(۴). به عبارتی بیوسورفاکتانتها میتوانند هیدروکربنها را امولسیفیه کنند و از این طریق حلالیت آنهارا در آب بالابرده، کشش سطحی پایین را بالا ببرند وافزایش جابجایی مواد نفتی از ذرات خاک را باعث شوند (۵).

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرتجزیه زیستی کشت مخلوط باسیلوسها برتجزیه تولوئن وتعیین بهترین شرایط برای تولید بیوسورفاکتانت بوسیله آنها بوده است و نهایتا با استفاده از کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی میزان کارایی تجزیه زیستی توسط کشت مخلوط را بررسی شده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری:

برای انجام این پروژه از مجتمع پتروشیمی اصفهان نمونه برداری بعمل امد. نمونه ها شامل خاکهای آلوده به تولوئن درمحل نشتی تولوئن از لوله ها بود.

محیطهای کشت:

برای جداسازی باسیلوسهای خاک از محیط کشت Nutrient Agar استفاده شد. برای تعیین سویه های باسیلوس دارای همولیز از محیط Blood Agar و برای تشخیص بیوشیمیایی سویه باسیلوسها از محیط های سیمون سیترات، احیای نیترات، و محیط mr/vp، ژلاتین،egg yolk agar, Starch agar و skim milk agar محیط SIM استفاده شد. همچنین از محیط کشت mineral saline medium (MSM) (۶) جهت انجام تستهای امولسیفیکاسیون (آمیزندگی) و تست کشش سطحی استفاده شد. محیط MSM شامل ترکیبات زیر بر اساس گرم درلیتر آب مقطر می باشد: Na_2HPO_4) ۱/ ۳ g, KH_2PO_4 ۲/۱ NH_4Cl :۰/g۵ g یا KNO_2 ۰/ ۸ g).

pH محیط برابر ۶/۵ تنظیم وسپس محیط اتو کلاو شد. پس از سردشدن ۲/۵ میلی لیتر از ۱ مول بر لیتر

Archive of SID

www.SID.ir

$MgSO_4$ و(۳۶ میلی مول برلیتر) از $FeSO_4.7H_2O$ و همچنین عناصر کمیاب به میزان ۲ میلی لیتر به محیط اضافه شد(۷). عناصر کمیاب عبارتند از:

$FeCL_3.\ 6H_2O$ (۰/۰۸ gL^{-1}), $ZnSO_4.\ H_2O$ (۰/۷۵ gL^{-1}), $CoCL_2.\ 6H_2O$ (۰/۰۸gL^{-1}), $CuSO_4.\ 5H_2O$ (۰/۰۷۵ gL^{-1}), $MnSO_4.\ H_2O$ (۰/۷۵ gL^{-1}), H_3BO_3 (۰/۱۵ gL^{-1}), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (۰/۰۵ gL^{-1}).

جداسازی باکتریها:

برای جدا سازی باکتری ها، چون هدف جدا سازی گونه های باسیلوس بود ابتدا تیمار حرارتی انجام شد تا باکتریهای فاقد اسپورحذف گردند وسپس از روش Pour Plate استفاده شد. از تمام نمونه های خاک منتقل شده به ازمایشگاه رقت متوالی تهیه شد. بدین منظور بدین منظوربه ۹ میلی لیترآب مقطر استریل ۱ گرم خاک آلوده تلقیح کرده و به مدّت ۱ ساعت در انکوباتور (۳۰^oC) شیکردار قرار داده شد. سپس از این محیط ۱ میلی‌لیتر برداشته و در لوله‌های متوالی حاوی آب مقطر تا رقت $۱۰^{-۹}$ رقت متوالی تهیّه شد. در این روش از هررقت ۱ میلی لیتر درهرپلیت استریل با پیپت استریل ریخته و ۱۵ میلی لیتر محیط کشت نوترینت اگار به آن اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای $۳۰\ ^oC$ انکوباسیون گردید.

جدا سازی سویه های دارای همولیز:

تمام کشتهای خالص برروی بلاد اگار در کشت داده شدندو به مدت ۴۸ ساعت در دمای۳۰^oC انکوبه شدند، سویه هایی که همولیز بتا (هاله شفاف) داشتند برای تستهای بعدی انتخاب شدند (۸).

اندازه گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی:

برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی از روشی که توسط Cooper و Goldenberg شرح داده شده است، استفاده شد.۴ میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیطMSM به همراه ۶ میلی‌لیتر از هیدروکربن‌مورد بررسی (تولوئن) دریک لوله آزمایش درب‌دار و مدرج ریخته شد. محتویات لوله آزمایش به مدت دو دقیقه در دورrpm ۲۰۰ با شیکر لوله به هم زده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط سکون قرار داده شدند. پس از این مدت طول کل ستون مایع و طول لایه امولسیفای شده اندازه‌گیری شد(۹) و EC با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$EC = \frac{length\ of\ the\ emolsified\ layer}{total\ length\ of\ the\ liquid\ column} \times 100$$

اندازه گیری کشش سطحی:

برای اندازه گیری کشش سطحی از دستگاه CSC DuNouy Tensiometer استفاده گردید. بدین منظور هریک از سویه‌های انتخاب شده به ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت Yeast Extract 1gr/lit + MSM، استریل تلقیح شدندو تولوئن نیز به میزان ۲٪ به عنوان منبع کربن وانرژی به ارلن اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت دردمای ۳۰ وشیکر rpm ۲۰۰ قرارداده شد. بعداز اندازه گیری با تنسیومتر، سویه های دارای کشش سطحی کمتر از mN/ m۴۰ برای مرحله بعد(بهینه سازی شرایط) انتخاب شدند. برای اطمینان ازنتایج بدست آمده آزمایش برای هرنمونه ۳بارتکرار شد (۹و۱۰).

بهینه سازی شرایط(Optimization):

ازبین سویه های جدا شده که دارای کشش سطحی کمتراز۴۰ بودند، ۳ سویه که کمترین کشش سطحی را داشتند جهت بررسی کنسرسیوم باسیلوسها برای تجزیه تولوئن موجود درخاک انتخاب شد. برای تعیین شرایط بهینه جهت biodegradation تولوئن خاک از روش تاگوچی استفاده شد. اثر درصدهای نمک صفر، ۲،۴،۶،۸،۱۰،۱۲ و منابع مختلف کربن (تولوئن ،بنزن،اتیل بنزن ،-n هگزان، اتانل، سیکلو هگزان، زایلن) و منابع نیتروژن (اوره، پپتون،عصاره مخمر،نیترات سدیم ،نیتریت سدیم و سولفات امونیوم) وگستره pH (۲،۴، ۶ ، ۸، ۱۰،۱۲) و دماهای متفاوت(۳۰،۴۰،۵۰،۶۰،۷۰،۸۰) بر رشد باسیلوسها و تولید بیوسورفاکتانت توسط آنها بررسی شد (۹و۱۱و۱۲).

انجام آزمایشات بیوشیمیایی به منظور شناسایی جنس باکتریها:

برای سه سویه باکتریایی که بعنوان کنسرسیوم بکاربرده شدند آزمایشات بیوشیمیایی از جمله تست

Archive of SID

www.SID.ir

حرکت (SIM) و تولید لیستیناز با استفاده ازمحیط egg yolk Agar وهیدرولیز کازئین با استفاده ازمحیط Skim milk Agar وهیدرولیز ژلاتین با استفاده از محیط نوترینت ژلاتین اگار و فعالیت H_2S وتولید اندول و احیای نیترات، تست سیترات و mR/vP انجام شد (۱۳و۱۴).

تشخیص مولکولی سه سویه باسیلوس مورد نظر:

برای شناسائی باکتریهای مورد نظر از روش کلنی PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA استفاده شد. بدین منظور یک کلنی از باکتری های B12 وB3 وB6 در ۵۰ ماکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل سوسپانسیون و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. ۵ ماکرو لیتر از سوسپانسیون فوق بعنوانDNA الگو در PCR با پرایمرهای fD1 و rD1 استفاده شد(۱۵). محصول PCR در پلاسمید pBleuescript SK کلون و کلونی های سفید انتخاب و پس از تایید حضور قطعه خارجی توسط PCR با استفاده از پرایمرهای fD1 و rD1 تعیین توالی شد. توالی حاصل با توالیهای موجود در بانک اطلاعات زیستی NCBI مقایسه شد.

آنالیز متابولیتهای حاصل از تجزیه زیستی تولوئن توسط دستگاه GC-MS.

یک کشت، ازکنسرسیوم ۳باسیلوس منتخب درمحیط MSM حاوی ۱٪ تولوئن تهیه کردیم و بمدت ۷۲ساعت درانکوباتورشیکردارقراردادیم. یک محیط حاوی تولوئن بدون تلقیح میکروبی هم بعنوان شاهد تهیه کردیم. ازکشت میکروبی بعد از ۷۲ ساعت ml۱۰ برداشته و از فیلتر میلی پور رد کردیم ،مایع حاصل را در ارلن استریل ریخته و به روی آن ۲ برابرکلروفرم ریختیم . بعداز ۲ساعت شیک شدن، نمونه برای انجام انالیز توسط GC-MS آماده شد(۱۶). برای آنالیز ازGC-MS مجهز به ستون VF-5ms به طول ستون ۳۰ متر وقطر داخلی ۰/۲۵میلی متر استفاده شد.گاز حامل، هلیوم بود و آنالیز ازنظر دمایی شامل شرایط زیر بود : از دمای ۵۰ درجه شروع کردیم. ۱دقیقه روی این دما ماندیم و بعد باسرعت۲۰ درجه بردقیقه تا دمای ۱۰۰درجه بالا رفتیم و بعد نهایتا ۶ دقیقه روی ۱۰۰ درجه باقی ماندیم. تزریق دردمای ۱۲۰ درجه انجام شد. کار با دستگاه مجموعا۹/۵ دقیقه طول کشید.

نتایج و بحث

پس ازخالص سازی،۲۳ سویه باسیلوس جدا گردید. از ۲۳ سویه،۱۲ سویه دارای فعالیت همولیتیک (ایجاد همولیز بتا) بودند که بعنوان باسیلوسهای مولد بیوسورفکتانت انتخاب شدند. از بین۱۲ سویه که بطورتک برای تست کشش سطحی انتخاب شدند، ۳ سویه دارای کشش سطحی کمتر از mN/m ۴۰بودند (جدول۱).

هر سه سویه دارای حد قابل قبولی از آمیزندگی بودند. سویه B3 وB6 به ترتیب بیشترین (۷۸٪) و کمترین (۷۰٪) میزان امولسیفیکاسیون را نشان دادند (جدول۲).

در بررسی توانایی امیزندگی بوسیله کشت کنسرسیوم، میزان آمیزندگی مجموع سه سویه برابر ۸۵٪ اندازه‌گیری شد.

با توجه به نمودار۱ میتوان نتیجه گرفت که بهترین دما برای رشد مخلوط سه سویه باسیلوسوبهترین تولید بیوسورفکتانت توسط آنها دمای ۳۰ درجه سانتیگراد می باشد. که با افزایش دما از $30\ ^0C$ به $40\ ^0C$ با تفاوت نسبتا زیادی کشش سطحی بالا می رود و با بالاتر رفتن دما (۵۰ و۶۰ و۷۰و ۸۰ ^0C)، کشش سطحی هم بیشتر می‌شود که نشان دهنده تولید کمتر بیوسورفکتانت توسط کشت مخلوط باسیلوسهاست (جدول ۳).

همانطور که نمودار ۲ نشان می دهد کشش سطحی در محیط بدون نمک بالاست و در غلظت نمک ۲٪ پایین می آید ولیکن درغلظت نمک ۴٪ به اندازه اندکی کشش سطحی بالا میرود واز آن به بعد همچنان شاهد بالا رفتن کشش سطحی با اختلاف زیادی هستیم ازاینرو نتیجه گرفته می شود که باسیلوسهای تشکیل دهنده این کنسرسیوم بهترین رشد و بالاترین تولید بیوسورفکتانت رادر نمک ۲٪ نشان می دهند وهالوتولرانت هستند (جدول۴).

همانطور که درنمودار ۳ مشاهده می شود که بهترین رشد کنسرسیوم باسیلوس‌های مورد نظر در$pH=6$ می‌باشد. ازطرفی در $pH=8$ نیز میزان تولید بیوسورفکتانت قابل ملاحظه است باتوجه به این نکته میتوان گفت بهترین رشد وتولید بیوسورفکتانت در pH اسیدی نزدیک به خنثی میباشد. نکته دیگر این است که بطورکلی در محدوده قلیایی نسبت به محدوده اسیدی شاهد تولید بیوسورفکتانت بیشتر و درنتیجه کشش سطحی کمتری

Archive of SID

www.SID.ir

هستیم (جدول ۵).

بهترین منبع کربن برای کنسرسیوم باسیلوسهای مورد نظر ، تولوئن می باشد. البته زایلن نیز با اختلاف بسیار کمی در رتبه دوم بهترین منبع C قرارمیگیرد. کنسرسیوم باسیلوسها در اتانل و هگزان نرمال رشد چندانی و درنتیجه تولید بیوسورفکتانت قابل ملاحظه ای نشان ندادند.

(جدول ۶) بهترین منبع نیتروژن، عصاره مخمر تشخیص داده شد. پپتون نیز با اختلاف کمی میتواند در مرتبه دوم قرار گیرد. ولی درحضور اوره و سولفات آمونیوم و نیترات سدیم و نیتریت سدیم تولید بیوسورفکتانت توسط کشت مخلوط به طور چشمگیری کاهش یافت (جدول ۷).

جدول۱.انتخاب سویه های مناسب جهت تشکیل یک کنسرسیوم باسیلوسی مولد بیوسورفکتانت

کشش سطحی mN/m	سویه باسیلوس
۳۵	*Bacillus subtilis* B3
۳۳/۵	*Bacillus subtilis* B6
۳۷	*Bacillus subtilis* B12

*درشرایط نمک صفر، pH=۶/۸ ،منبع کربن = تولوئن، منبع نیتروژن = عصاره مخمر

جدول۲. اندازه گیری فعالیت امولسیفیکاسیون (آمیزندگی) هر یک از باسیلوسها

میزان آمیزندگی	نام سویه
٪۷۵	*Bacillus subtilis* B12
٪۷۰	*Bacillus subtilis* B6
٪۷۸	*Bacillus subtilis* B3

جدول۳. اثر دماهای مختلف در کاهش کشش سطحی بوسیله کنسرسیوم باسیلوسها

کشش سطحی(mN/m)	دما(^0C)
۲۷	۳۰
۳۲	۴۰
۳۵	۵۰
۳۸	۶۰
۴۰	۷۰
۴۳	۸۰

جدول۴. اثر غلظت نمک برکاهش کشش سطحی بوسیله کنسرسیوم باسیلوسها

کشش سطحی	غلظت نمک
۳۴/۵	صفر٪
۲۷/۵	٪۲
۲۹/۶	٪۴
۳۵	٪۶
۴۲/۴	٪۸
۴۴/۸	٪۱۰
۴۵/۲	٪۱۲

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۵. اثر pH های مختلف بر کاهش کشش سطحی بوسیله کنسرسیوم باسیلوسها

کشش سطحی	pH
۵۲	۲
۴۸	۴
۳۰	۶
۳۲/۴	۸
۴۰/۵	۱۰
۴۹	۱۲

جدول۶. اثر منابع کربن مختلف در کاهش بیوسورفاکتانت بوسیله کنسرسیوم باسیلوسها

منابع مختلف کربن	کشش سطحی(mN/m)
تولوئن	۳۷/۳۳
زایلن	۳۷/۹۶
بنزن	۳۸
اتیل بنزن	۳۸/۴
سیکلوهگزان	۳۸/۳۳
اتانل	۵۰/۶۶
هگزان نرمال	۴۷/۸۵

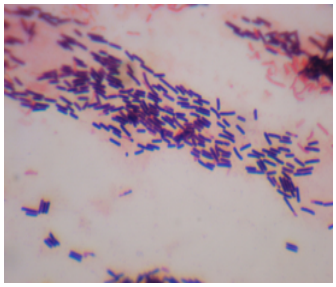
جدول۷. اثر منابع نیتروژن مختلف درکاهش بیوسورفاکتانت بوسیله کنسرسیوم باسیلوسها

منابع مختلف نیتروژن	کشش سطحی (mN/m)
عصاره مخمر	۲۷/۶۲
پپتون	۲۸
اوره	۳۶/۷۵
سولفات آمونیوم	۳۸/۵
نیترات سدیم	۴۰/۷
نیتریت سدیم	۴۵/۲۳

جدول۸. تستهای بیوشیمیایی سه باسیلوس تشکیل دهنده کنسرسیوم

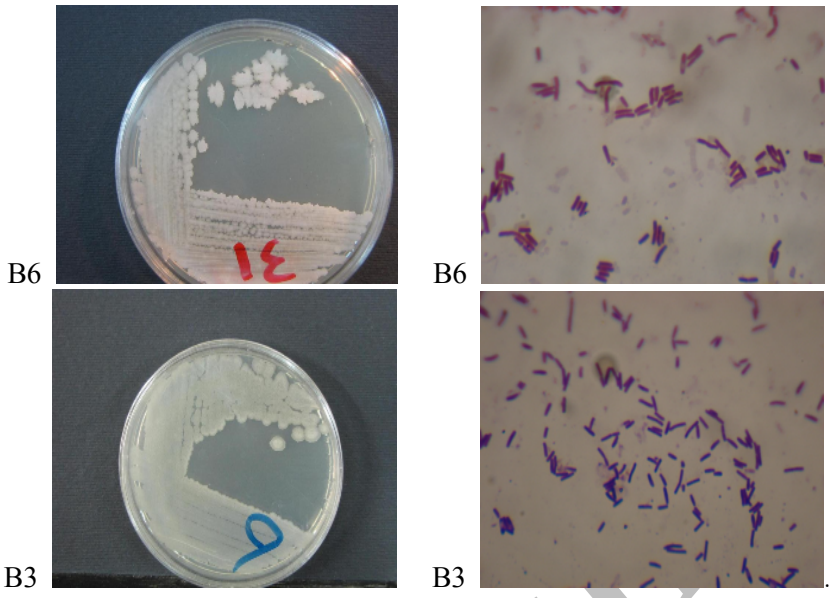
	Citrate	MR	VP	S I M	INM	لیستیناز	آمیلاز	کازئیناز	ژلاتیناز
B12	-	+	-	- - +	+	-	-	++	+
B6	+	+	-	- - +	+	-	+	+++	+
B3	+	+	-	- - +	+	-	-	+	+

B12

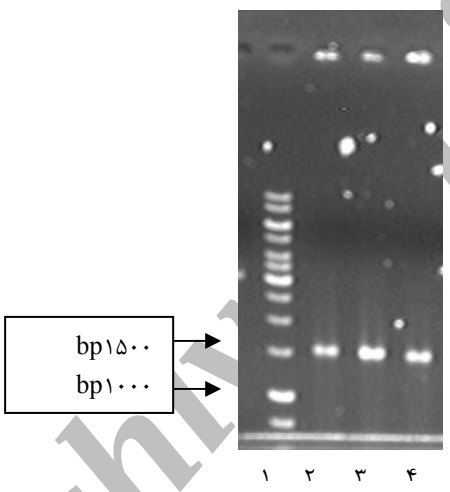
B12 

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱. اشکال میکروسکوپی و ماکروسکوپی سه سویه جدا شده B3، B6، B12



شکل ۲. PCR از DNA باکتری های B3،B12، B6 به ترتیب از چپ به راست:

۱- DNAsize marker، ۲- محصول PCR باکتری B6 ، ۳ - محصول PCR باکتری B3، ۴- محصول PCR باکتری B12

علاوه بر تشخیص ماکروسکوپی و میکروسکوپی (شکل۱)، سه سویه از نظر تستهای بیوشیمیایی نیز بررسی شدند.نتایج در جدول ۸ قابل مشاهده است.

نتایج حاصل از شناسایی مولکولی نشان می دهد که هر سه سویه باسیلوس سوبتیلیس هستند. مقایسه توالی 16S rRNA سه سویه نیز حاکی از تشابه بسیار بالای آنها است به طوریکه سه توالی در حدود ۶ نوکلئوتید تفاوت دارند (شکل۲).

آنالیز میزان تجزیه تولوئن بوسیله دستگاه GC-MS.

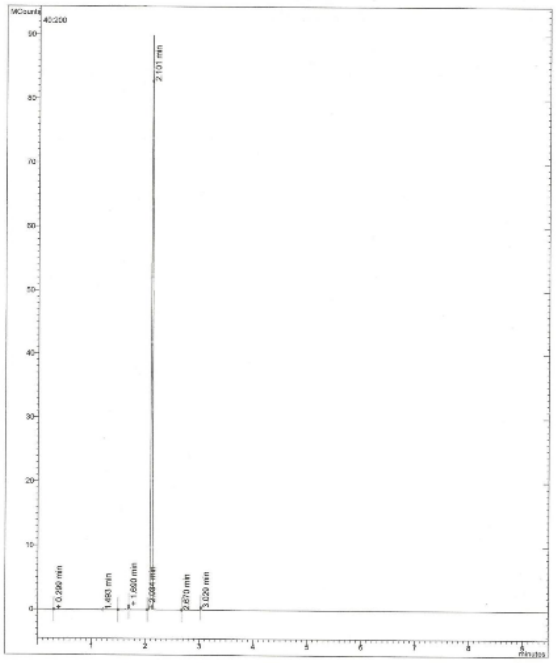
باتوجه به انطباق طیف جرمی نمونه با Library های NIST توسط نرم افزار مربوطه (نرم افزار GC-MS Varianws) و با توجه به Retention Time تولوئن درنمونه کشت ۷۲ ساعته و مقایسه آن با شاهد و انطباق این دو زمان، قطعا پیک های مشاهده شده مربوط به تولوئن می باشد. با توجه به اینکه Area درمورد پیک های GC درنمونه شاهد برابر ۵۰۹۲۰۴ودرنمونه کشت ۷۲ ساعته مخلوط باسیلوس ها برابر۴۱۱ می باشد، لذا کاهش تولوئن درمحیط کشت ۷۲ ساعته کنسرسیوم باسیلوسها، طبق فرمول زیر، ۹۹/۹۱٪ برآورد می شود (شکل۳الی ۶).

$$Degredation\ of\ toluene = \frac{509204-411}{509204}\times 100 = 99/91$$

Archive of SID

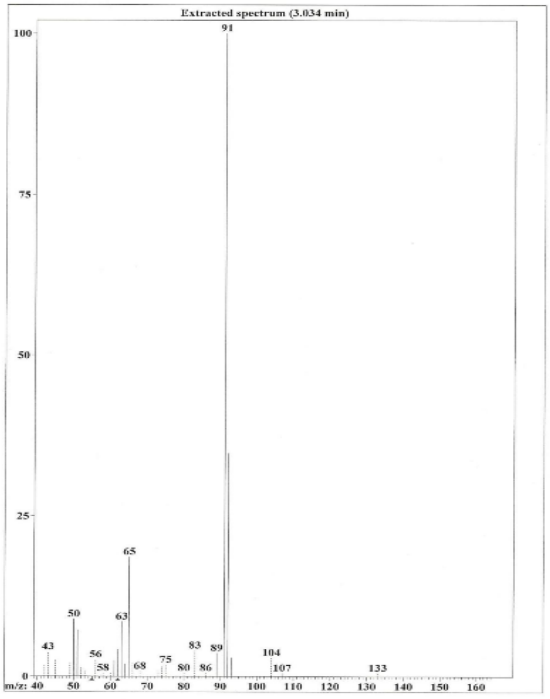
www.SID.ir

Retention time(min)	Chemical name	Base peak	Area	Purity	Amount
3/0344	toluene	285	411	16%	0/000214%



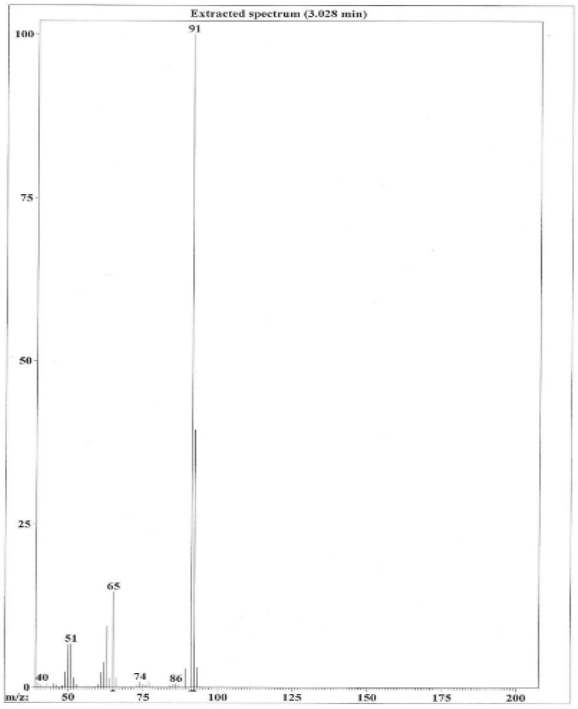
شکل۳. کروماتوگرام تولوتن درکشت ۷۲ ساعته کنسرسیوم سه سویه باسیلوس

Retention time(min)	Chemical name	Base peak	Area	Purity	Amount
3/0281	toluene	194979	509204	98%	0/306%

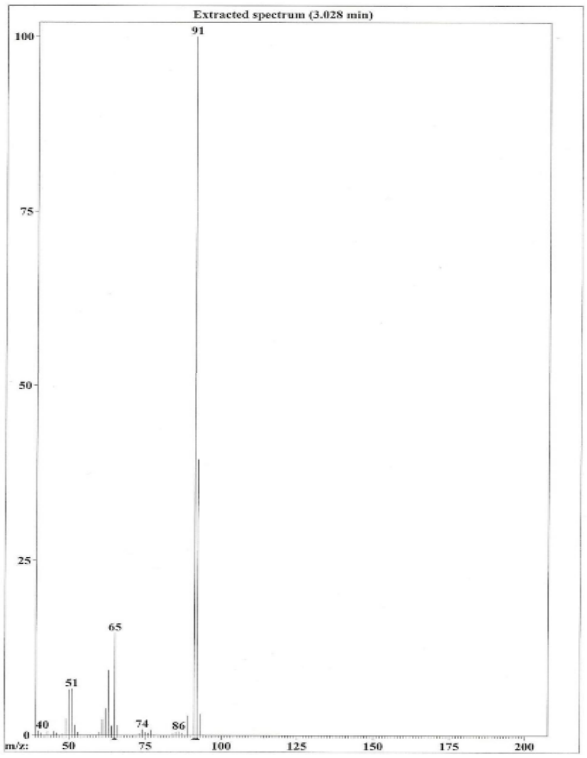


شکل ۴: کروماتوگرام تولوئن درمحیط کشت شاهد

www.SID.ir

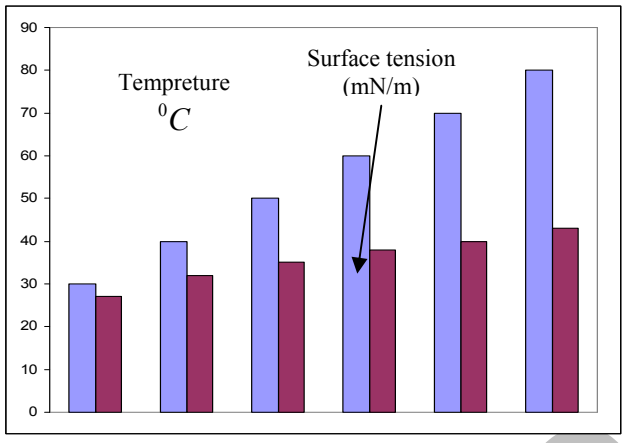


شکل ۵. طیف جرمی تولوئن در کشت ۷۲ ساعته کنسرسیوم سه سویه باسیلوس

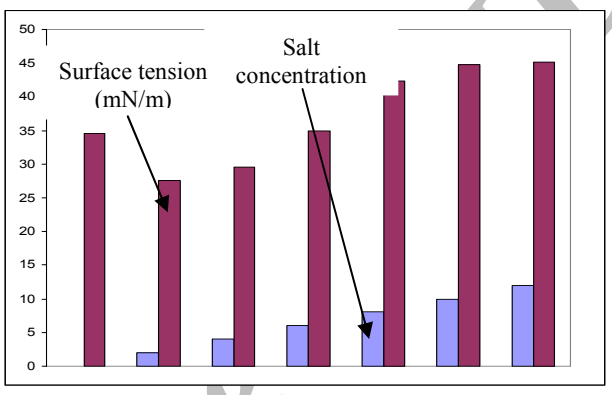


شکل ۶. طیف جرمی تولوئن درمحیط شاهد(MSM حاوی۱ ٪ تولوئن بدون تلقیح مخلوط سه سویه باسیلوس)

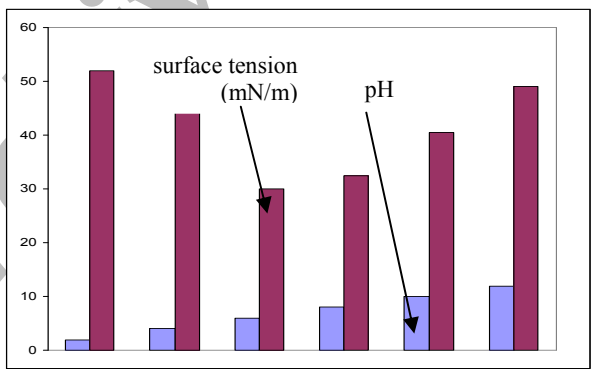
www.SID.ir



نمودار۱. میزان کشش سطحی کنسرسیوم سه باسیلوس در دماهای مختلف



نمودار۲. میزان کشش سطحی کنسرسیوم سه باسیلوس درغلظتهای مختلف نمک



نمودار۳. میزان کشش سطحی کنسرسیوم سه باسیلوس در pH های مختلف

در یک نگاه کلی به تحقیقات مختلف در زمینه تجزیه زیستی ترکیبات نفتی درمی یابیم که سویه هایی که تا حد قابل قبولی قادر به تجزیه زیستی اروماتیکها و دیگر ترکیبات نفتی هستند، ازمحیطی با آلودگی یا سابقه آلودگی جدا شدند و این موضوع بیان کننده آنست که وجود سابقه آلودگی درمحیط باعث افزایش میزان فعالیت تجزیه کنندگی در این میکروارگانیسمها می شود.

طبیعی است که میکروارگانیسمهای جدا شده ازمنطقه آلوده دارای توانایی بیشتری باشند زیرا به علت سمیت ترکیبات هیدروکربنی و آروماتیکی و دیگر آلودگی ها، میکروارگانیسم های حساس ازبین رفته و در نتیجه باقی مانده ها همان میکروارگانیسمهایی هستند که نسبت به سمیت آلودگی مورد نظر، مقاومت نشان داده و بنابراین گزینه خوبی برای درمان زیستی و تجزیه آلودگی به

Archive of SID

www.SID.ir

حساب می آیند. دراین تحقیق نیز نمونه برداری از خاکهای آلوده به تولوئن در اطراف مجتمع پتروشیمی اصفهان صورت گرفت. درتعیین بهترین منبع کربن نیز باسیلوسهای جدا شده ازخاک آلوده به تولوئن تا حد زیادی با تولوئن به عنوان منبع کربن سازگاری پیدا کردند زیرا با وجود منابع مختلف کربن، بهترین رشد درحضور تولوئن مشاهده شد. این امرنشان می دهد که آلودگی یک منطقه درنوع متابولیسم وانتخاب نوع منابع غذایی توسط باکتریها درآن منطقه کاملا تاثیر گذار است، یابهتر آنست که بگوییم اغلب باکتریهای موجود درخاک آلوده به تولوئن دارای توانایی نسبی در بکارگیری تولوئن به عنوان منبع کربن هستند. Calvo و همکاران (۱۷) درسال ۲۰۰۴، همچنین Herrera و همکاران (۶) درسال ۲۰۰۸ در تحقیقات مشابهی، عمل نمونه برداری را ازمناطق آلوده به نفت و لجنهای نفتی انجام دادند. در تحقیق دیگری که توسط Nishino وهمکاران درسال ۱۹۹۲ صورت گرفت نمونه ها باکتریهای ایزوله شده، همگی از آب زیر زمینی و خاک آلوده به کلرو بنزن بدست آمدند (۱۸). همچنین درتحقیقی که توسط Arafa درسال ۲۰۰۳درزمینه تجزیه BTEX ها انجام شد، عمل نمونه برداری از خاک و آبهای آلوده صورت گرفت که در این تحقیق یک کشت مخلوط از باکتریهای موجود در خاک سایتهای عربستان مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد باکتریهای جدا شده توانایی رشد در MSM حاوی BTEX را دارند (۲). اثر فاکتورهای محیطی شامل هوادهی و شیک شدن ودماو pH محیط روی تجزیه زیستی بررسی شد. بطور ویژه ای تجزیه زیستی همه انواع BTEX ها در محیط مایع دارای همزدگی بیشتراز محیط ثابت بود (۲). تولوئن و زایلن واتیل بنزن کاملا" درکشت مخلوط تجزیه شدند گرچه باکتریها در رابطه با تجزیه بنزن دارای محدودیتی بودند (۲). در تحقیقی که توسط Kishore Das و همکاران در سال۲۰۰۷ انجام شد اثر باسیلوس سوبتیلیس DM-04 وسودوموناس ائروژنزا سویه‌هایM وMN راکه ازخاک‌های آلوده از شمال شرق هند جدا شده، بررسی کردند و مشخص شد که دو باکتری در پاکسازی زیستی به روش درجا موثرند (۱۹).

در تحقیقی که توسط Zhao و همکاران انجام شد نیز نمونه از خاک های آلوده به پلی آروماتیک هیدروکربن ها در زمینهای پالایشگاه نفت درشانگهای چین برداشته شد (۲۰).

برای تشخیص باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان معیاری برای جداسازی اولیه سویه های مولد بیوسورفکتانت استفاده شده است. این روش بسیار ساده و بدون نیاز به امکانات پیچیده آزمایشگاهی است. Bernheimer وAvigad (۲۱) و همچنین Lin (۲۲) و نیز Banat (۵) درمطالعات خود ازهمین روش استفاده کردند. دراین تحقیق هر سه باسیلوس B3 و B6 وB12 هرکدام به تنهایی و بصورت کشت خالص،کشش سطحی محیط کشت را از ۷۰mN/mبه ترتیب تا

۳۵ و ۳۳/۵ وmN/m۳۷ و در حالت کنسرسیوم (کشت مخلوط سه باسیلوس) نیز تا مقدار mN/m ۲۹ کاهش دادند. سویه جدا شده توسط Abu Ruwaida وهمکاران(۲۳) در سال ۱۹۹۶ جدا سازی شد نیز قادر بود کشش سطحی را از ۶۹ به ۲۷ کاهش دهد که نتایجی قابل مقایسه با نتایج این تحقیق میباشد. نتایج E_{24} بدست آمده برای سه سویه باسیلوس جدا سازی شده در این تحقیق برای باسیلوس سویه B3 و سویه B6 و سویه B12 به ترتیب برابر ۷۸٪ و۷۰٪ و ۷۵ ٪ بدست آمد که در مقایسه با نتایج حاصل از کا رBodour (۲۴) نتایجی قابل قبول است. توانایی آمیزندگی درمورد کشت مخلوط ، افزایش یافته است که نشان دهنده کارایی بیشتر وبهتر کشت مخلوط در تجزیه تولوئن است. همچنین مشاهده میشود که کشش سطحی در مورد کشت مخلوط باسیلوس ها درمقایسه با کشت خالص آنها کاهش چشمگیری داشته است. بررسی نمودار کروماتوگرام تولوئن درکشت مخلوط ومقایسه آن با نمونه شاهد نیز درصد حذف بسیار بالایی از آلاینده مورد نظر را نشان میدهد.

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده می شود که کشش سطحی حاصل ازکشت کنسرسیوم باسیلوس ها در شرایط بهینه (دمای $30\ ^0C$، نمک۲٪ وpH=۶ و منبع کربن= تولوئن و منبع نیتروژن=عصاره مخمر)، درمقایسه با کشش سطحی حاصل از رشد هریک ازسویه ها به تنهایی کاهش یافته است. باتوجه به نتایج بدست آمده می توان گفت که استفاده ازکنسرسیوم باسیلوس های (mix culture) جدا شده ازخاک آلوده برای تجزیه

Archive of SID

www.SID.ir

آلودگی مورد نظر (تولوئن) در شرایط بهینه، تا حد قابل توجهی درمقایسه باتک سویه باسیلوس (culture pure) دارای کارایی بالاتری است. چنین نتیجه ای را N. Prasanna و همکارانش درموردکشت مخلوط سه سویه باسیلوس و استفیلوکوک و سودوموناس، در تجزیه تولوئن درغلظت پایین بدست آوردند (۲۵). در تحقیق دیگری که توسط Abdualdaim Mohammed Mukred و همکاران صورت گرفت نقش کنسرسیوم سه باکتری در تجزیه نفت خام بررسی شدو کروماتوگرافی گازی نشان داد که کنسرسیوم سویه های باکتری (اسینتوباکتر، استفیلوکوکوس ونایسریا) قادرند بیشتراز به ترتیب ۹۶و ۹۸ ٪ تجزیه کل هیدورکربنها را انجام دهند (۲۶). Caldeira و همکاران نیز دررابطه با تجزیه کلروفنل توسط کشت مخلوط باکتریایی (کنسرسیوم) به نتیجه ای مشابه رسیدند(۲۷).

منابع

1- LittlejohnsJ.V; Daugulis .A.J, (2008). Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium, Process Biochemistry; **43**: 1068-1076.

2- Arafa.M.A, (2003). Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (BTEXs) by a bacterial consortium isolated from polluted site in Saudi Arabia. Pakistan Journal of Biological Science; **6** (17) 1482-1486.

3- Mohammed Mukred A; Abd Hamid A; Hamzah A; Wan Yusoff W. M, (2008). On Line Journal of Biological Sciences; **8** (4): 73-79.

۴-اشرف اسادات نوحی ،محمد کارگر، مهدی رنجبر، (۱۳۷۸). شناسایی باکتریهای مولد بیوسورفاکتانت و کاربرد آنها درحذف آلاینده های نفتی.نخستین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران .دانشگاه آزاد اسلامی جهرم.

5- Banat I.M; Makkar R.S; Cameotra S.S, (2000). Potential commercial applications of microbial surfactant. Appl. Microbiol. Biotechnol. **53**:495–508.

6- Herrera Y; Okoh A.I; Alvarez L; Robledo N; Trejo-Herna´ndez M.R, (2008), World J. Microbiol. Biotechnol. **24**: 55 –60.

7- Ka¨stner M; Breuer-Jammali M; Mahro B, (1994). Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**:267–273.

8- Bicca F.C; Fleck L.C; Zachio M. A, (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcus rubber and Rhodococcus erythropolis.

9- Rev. Microbial.; **30** (3).

۱۰- اخوان سپهی. ع. ، ۱۳۸۳ بررسی نقش باسیلوس ها و کلسترودیوم ها در ازدیاد برداشت میکروبی نفت.

۱۱- دژبان گل پاشا .ا ،۱۳۸۶، مطالعه تخریب زیستی نفت خام توسط باسیلوس ها.

12- Ney R.E, (1990). Where did that Chemicals Go? A practical guide to chemicals fate and transport in environment. New york.

13- Nefrens K.P.C; Schors N.E, (1994). Organic Chemistry, 2d edition, Freeman and company, New york.

۱۴- محمدی مریم، ۱۳۸۰، نکاتی درباره ی میکروبیولوژی آزمایشگاهی.

۱۵- ملک زاده. فریدون، ۱۳۷۴، باکتری شناسی عمومی۱۵-۱۷.

16- Journal of Bacterioligy, Jan.1991, p. 697-703.

۱۷- ع. ،۱۳۷۷، مبانی شیمی تجزیه، مرکزنشر دانشگاهی.

18- Calvo C; Toledo F.L; González-López. J., (2004). Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. Journal of Biotechnology 109: 255–262.

19- NISHINO, S. F; SPAIN J. C; BELCHER L. A. AND LITCHFIELD, C. D, (1992). Chlorobenzene Degradation by Bacteria Isolated From Contaminated Groundwater. **58**: 1719-1726.

20- Das K; Mukherjee A.K., (2007). Crude petroleum-oil biodegradation eYciency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology. **98**:1339–1345.

Archive of SID

www.SID.ir

21- Zhao H.P; Wu Q.S; Wang L; Zhao X.T; Gao H.W, (2009). Journal of Hazardous Materials. **164**: 863-869.

22- Bernhemer A W; Avigod LS, (1970). Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. J.Gen. Microbiol. **61**: 361-369.

23- Lin S., (1996). Biosurfactants: Recent Reviews. J.Chem.Tech. Biotechnol. **66**: 109-120.

24- Abu Ruwaida A.S ; Banat.,(1996). Isolation of biosyurfactant –production bacteria, product characterization and evaluation. Acta biotechnologyica, 45 (62-168), aeruginosa GS3 from Molasses, Letters in Applied Microbiology, **25**: 91-94.

25- Bodour A. A; Gerrero-Barajas C; Maier M,(2004). Structure and characterization of flavolipids, a novel class of Biosurfactant produced by flavolipids sp. Strain MTN11.Appl. and Env. Microbiol. **10**(6): 1114-1120.

26- Prasanna N; Saravanan N; Geetha P; Shanmugaprakash M; Rajasekaran P; (2008). Biodegradation of Phenol and Toluene by *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Staphylococcus* sp., Isolated from Pharmaceutical Industrial Effluent. Advanced Biotech. pp 20-24.

27- Mohammed Mukred A; Abd Hamid A; Hamzah A;Wan Yusoff W. M.,(2008). OnLine Journal of Biological Sciences; **8** (4): 73-79.

28- Caldeira M; Heald SC; Carvalho MF; Vasconcelos I; Bull AT; Castro PM, (1999). 4-chlorophenol degradation by a bacterial consortium development of a granular activated carbon biofilm reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**: 722–729.

Archive of SID

www.SID.ir