

جداسازی باکتری‌های لیپولیتیک از منابع محیطی به منظور تجزیه‌ی پلی‌سوربات‌ها در پساب‌های صنعتی

فاطمه آدمی قمصری^{۱*}، دکتر فرزانه حسینی^۲، دکتر آنتیا خنafari^۳

^۱ کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم، تهران، ایران
^۲ استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
^۳ دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسؤول: تهران، شمیران، پاسداران، میدان هروی، خیابان مکران جنوبی، بوستان دهم، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، فاطمه آدمی قمصری
 E-mail: Mahla_fag@yahoo.com

وصول: ۹۳/۹/۹، اصلاح: ۹۳/۱۰/۱۳، پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: امروزه یکی از دغدغه‌های زیست محیطی، ورود پساب‌های آلوده به ویژه صنایع شوینده و پاک‌کننده‌ی حاوی دترجنت‌ها و سورفکتانت‌ها از جمله پلی‌سوربات‌ها به آب‌های سطحی و زیر زمینی می‌باشد. با توجه به تماس انسان و سایر موجودات زنده با این مواد، زدایش و تجزیه آن‌ها اهمیت فراوانی دارد. در پژوهش حاضر، تجزیه‌ی یک دترجنت غیریونی گروه پلی‌سوربات به نام توین ۸۰ توسط باکتری‌های لیپولیتیک جدا شده از پساب و لجن فعال پالایشگاه نفت تهران و تأثیر عوامل pH و دما بر روند تجزیه‌ی این دترجنت مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها: در جداسازی اولیه‌ی آن‌ها از محیط کشت تریپتون سوی آگار (TSA) حاوی توین ۸۰ و روغن زیتون با غلظت‌های متفاوت به‌طور جداگانه استفاده شد. سپس دو محیط کشت اختصاصی تریپتون سوی آگار و توین آگار به ترتیب جهت بررسی تولید آنزیم لیپاز و تجزیه‌ی توین ۸۰ مورد استفاده قرار گرفت. همچنین جهت تأیید تجزیه ترکیب مورد نظر از دو روش دستگاهی اسپکتروفتومتری و طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان می‌دهد، باکتری‌های جدا شده با تولید آنزیم لیپاز قادر به تجزیه‌ی پلی‌سوربات ۸۰ بوده و بهترین تجزیه‌کنندگان به ترتیب باسیلوس سویه SP1، سودوموناس آئروجینوزا و باسیلوس سویه SP2 می‌باشند. سویه SP1 پس از شناسایی مولکولی براساس تعیین توالی ژن rRNA ۱۶S، به عنوان *Bacillus cereus* ATCC14579 (T) شناخته شد.

نتایج بررسی تأثیر عوامل pH و دما بر تسریع روند تجزیه توین ۸۰، سویه سودوموناس را گزینه مناسب تجزیه در pH اسیدی و دوپاسیل گرم مثبت را گزینه مناسب تجزیه در pH قلیایی معرفی می‌نماید. سه باکتری مذکور در دمای ۳۷ بهترین تجزیه‌رانشان دادند.

نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر باکتری‌های لیپولیتیک جدا شده از منابع محیطی، قادر به تجزیه‌ی دترجنت غیریونی توین ۸۰ از گروه پلی‌سوربات بودند. از بین باکتری‌های جدا شده، بهترین تجزیه‌ی توسط باسیلوس سرئوس مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، باکتری‌های لیپولیتیک (تجزیه‌کننده‌ی چربی)، منابع محیطی، دترجنت غیریونی، پلی‌سوربات، توین ۸۰، پساب صنعتی، لجن فعال، تجزیه.

مقدمه

امروزه آلودگی محیط زیست از مسائل مهمی است که جوامع بشری با آن روبه رو می‌باشد. رشد روز افزون فعالیت‌های صنعتی از یک سو و عدم رعایت الزامات زیست محیطی از سوی دیگر سبب شده تا چند دهه‌ی اخیر مقادیر زیادی از آلاینده‌ها وارد محیط شوند.

تجمع آلاینده‌ها در محیط تهدیدی جدی برای سلامت انسان، محیط زیست، سایر موجودات زنده و اکوسیستم است. یک دسته از ترکیبات آلوده کننده، پلی‌سوربات‌ها هستند که وارد پساب صنایع مرتبط از جمله صنایع شوینده شده و بر اساس فعالیت‌های مختلف در محیط زیست تجمع می‌یابند (۱ و ۳).

روش‌های مرسوم جهت حذف آلودگی و تجزیه‌ی برخی ترکیبات از پساب عبارتند از: حذف شیمیایی مانند اکسیداسیون، استفاده از کاتالیزورها، حذف فیزیکی، حذف و تجزیه‌ی بیولوژیک روش‌های مذکور معایب متعددی همچون بر جا گذاشتن اثرات جانبی، هزینه‌ی بالا، کاهش راندمان تجزیه و غیره را در بر دارند که روش‌های نوین می‌توانند جایگزین آن‌ها شوند (۱۰).

ترکیبات پلی‌سوربات یا استرهای سوربیتان با نام تجاری اسپن (SPAN) و اتوکسیلات آن‌ها با نام تجاری تووین (TWEEN)، سورفکتانت‌های غیریونی از گروه پلی‌سوربات می‌باشند. ترکیبات فوق مایعات روغنی هستند که از اتوکسیلاسیون سوربیتان شده با اسیدهای چرب حاصل می‌گردند. این دسته از ترکیبات، آمفی پاتیک یا دو قطبی هستند. یعنی، دارای بخش آب‌دوست (هیدروفیل) و آب‌گریز (هیدروفوب) قدرتمندی می‌باشند. به همین دلیل تمایل فراوانی به تجمع در بین سطوح دارند لذا، به عنوان امولسیفایر، کنترل‌کننده کف، ترکنده (حل-کننده) در صنایع مختلف مانند صنایع شوینده، غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی و غیره استفاده می‌گردند. تووین‌ها (استرهای اسید چرب پلی اکسی اتیلن سوربیتان) دارای انواع ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ می‌باشند (۹ و ۸)

و (۷).

پاکسازی و تجزیه‌ی زیستی ارگانسیم‌های طبیعی مزیت‌های بیشتری نسبت به ارگانسیم‌های غیر طبیعی دارد. این مزایا شامل سرعت متفاوت رشد، فعالیت متابولیک گسترده و غیره می‌باشد. امروزه گونه‌های متعددی از میکروارگانسیم‌ها در طبیعت شناخته شدند و یا در حال جداسازی می‌باشند که به پاکسازی محیط زیست کمک کنند (۵). باکتری‌های لیپولیتیک با تولید آنزیم لیپاز باعث تجزیه‌ی ترکیبات لیپیدی مانند پلی‌سوربات می‌شوند (۱۹ و ۱۲ و ۱۱). بهترین تولید کنندگان آنزیم لیپاز متعلق به خانواده باسیلوس‌ها از باسیل‌های گرم مثبت و از باسیل‌های گرم منفی خانواده سودوموناس‌ها مانند سودوموناس آئروجینوزا و فلورسنس می‌باشند. سایر باکتری‌ها مانند استافیلوکوکوس اورئوس نیز آنزیم لیپاز تولید می‌کنند.

لیپازها کاتالیزورهای حیاتی هستند که لیپیدها و تری‌گلیسیریدهای زنجیره‌ی بلند را به وسیله‌ی آب تجزیه می‌کنند و بازدهی آن اسیدهای چرب، منوگلیسیریدها، دی‌گلیسیریدها و گلیسرین است. لیپازهای میکروبی به دلیل ویژگی‌های خاصی که دارند مورد توجه بیشتری قرار می‌گیرند، که از آن‌ها در زمینه‌ی هاو صنایع مختلف غذا، دارو، دترجنت‌ها و غیره استفاده می‌گردد (۱۹ و ۱۸ و ۱۶).

پژوهش حاضر به بررسی تجزیه‌ی دترجنت غیریونی پلی‌سوربات ۸۰ توسط باکتری‌های لیپولیتیک جدا شده از پساب و لجن فعال نفتی پالایشگاه نفت تهران و تأثیر دو عامل دما و pH بر روند تجزیه این دترجنت پرداخته است.

مواد و روش‌ها**جداسازی باکتری‌ها از منابع محیطی**

نمونه برداری: در این پژوهش، جداسازی باکتری‌های لیپولیتیک از پساب (API) و لجن فعال پالایشگاه نفت

محیط مذکور به صورت T شکل و نقطه ای کشت داده شد و پس از گرماگذاری در دمای 37°C به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت نتایج بررسی گردید.

استفاده از محیط کشت ترکیبی توین آگار: از

محیط کشت ترکیبی توین آگار حاوی توین ۸۰، با ۷ pH که جهت بررسی تجزیه‌ی توین مناسب می باشد، استفاده گردید. این محیط حاوی اسید چرب ۲۴ کربنه‌ی توین ۸۰ است. به علت حضور کلرید کلسیم هیدراته ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) موجود در محیط، باکتری‌های کشت داده شده بر روی آن پس از رشد، با تولید آنزیم لیپاز و تجزیه‌ی توین ۸۰، با کلرید کلسیم محیط ترکیب شده و اولئات کلسیم تولید می کنند که به صورت رسوب سفید رنگی اطراف کلنی باکتری نمایان می شود. این امر نشان دهنده تجزیه‌ی توین موجود در محیط می باشد. این روش بر اساس پرسپییتاسیون نمک کلسیم از اسید چرب آزاد شده از هیدرولیز توین است. اسید چرب آزاد شده با کلسیم محیط باند شده و این ترکیب اولئات کلسیم به صورت کریستال نامحلول در اطراف کلنی باکتری مشاهده می شود. باکتری‌های جدا شده به صورت نقطه‌ای در محیط مذکور کشت داده شدند و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای 37°C گرماگذاری و نتایج بررسی گردید.

بررسی تجزیه‌ی توین ۸۰ باروش دستگاهی

اسپکتروفتومتر و FTIR

آماده سازی نمونه‌ها جهت بررسی تجزیه با اسپکتروفتومتر و FTIR، در شرایط یکسان شامل محیط کشت نوترینت برات حاوی ۱ درصد توین ۸۰ و به میزان مساوی ۱ درصد از هر باکتری با غلظت ۰/۵ مک فارلند به طور جداگانه انجام شد. پس از ۸ روز گرماگذاری 37°C ، جذب نوری حاصل از رشد باکتری‌ها در طول موج nm ۶۰۰ و جذب نوری حاصل از تجزیه‌ی توین ۸۰ در طول موج nm ۵۶۰ قرائت گردید.

جهت تأیید نهایی، از روش دستگاهی FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) مدل

شهید تندگویان تهران به عنوان منابع محیطی انجام گرفته است. نمونه برداری از پساب و لجن فعال با استفاده از ظروف مخصوص نمونه برداری شیشه ای ۲۵۰ میلی لیتری استریل صورت گرفته است. دقت شد که حدود ۳ سانتی متر از بالای بطری خالی بماند تا هنگام شروع آزمایش بتوان به راحتی و کامل نمونه را به هم زد و آن یکنواخت شود. روی هر نمونه تاریخ برداشت، دمای محل، pH محل نمونه برداری و نوع نمونه نوشته شد. در مرحله بعدی به جهت بررسی باکتری‌های چربی دوست، از محیط تریپتون سوی آگاریا غلظت های ادرصد، ۲درصد، ۴درصد و ۶درصد از توین ۸۰ و روغن زیتون به عنوان یک منبع چربی (لیپیدی) به صورت جداگانه در دو ظرف استفاده گردید. توین ۸۰ با درصد خلوص ۹۸/۵ و pH ۵/۵ خریداری شده از شرکت مرک آلمان مورداستفاده قرار گرفت. جداسازی وخالص سازی پس از چندین بار تجدید کشت انجام شد. پس از اطمینان از خالص بودن باکتری‌ها، شناسایی براساس سه شاخص ماکروسکوپی، میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی کتاب باکتریولوژیک سیستماتیک برگگی (ازکشت تازه ۲۴ ساعته باکتری‌ها) انجام شد. شناسایی مولکولی بهترین تجزیه کننده توین ۸۰ بر اساس تعیین توالی ژن SrRNA ۱۶ انجام گرفت.

بررسی تجزیه‌ی پلی‌سوربات توسط باکتری‌های جدا شده

استفاده از محیط کشت تریبوتیرین آگار: محیط

کشت تریبوتیرین آگار، محیط کشتی مخصوص بررسی باکتری‌های لیپولیتیک می باشد. این محیط حاوی اسید چرب تریبوتیرین است که باکتری‌های لیپولیتیک با تولید آنزیم لیپاز باعث تجزیه‌ی این اسید چرب موجود در محیط شده و هاله شفاف اطراف کلنی باکتری ایجاد می نمایند. این تست نشان دهنده لیپولیتیک بودن باکتری‌های جدا شده می باشد و تولید آنزیم لیپاز توسط آن‌ها تأیید می‌گردد. جهت انجام آزمایش، از هر نمونه باکتری در

و کوکوباسیل گرم مثبت و گرم منفی، دارای اسپور و فاقد اسپور با جایگاه متفاوت مشاهده شدند.

ارزیابی فعالیت آنزیم لیپاز در محیط تریبوتیرین آگار

با کشت سه باکتری منتخب از بین باکتری‌های جدا شده در محیط اختصاصی تریبوتیرین آگار، دو باسیلوس sp1 و sp2 و باسیل گرم منفی که با انجام آزمون‌های افتراقی سودوموناس آئرجینوزا شناسایی شد، قادر به تولید آنزیم لیپاز بوده و اسید چرب موجود در محیط را هیدرولیز کرده و هاله شفاف با درجات مختلف اطراف کلنی باکتری ایجاد نمودند. واضح ترین و بهترین هاله ایجاد شده توسط باسیلوس sp1 مشاهده شد (شکل ۲).

یافته‌های بررسی تجزیه‌ی توپین ۸۰ در محیط اختصاصی توپین آگار

سه باکتری چربی‌دوست منتخب، نیز به جهت بررسی تجزیه‌ی توپین ۸۰، در محیط توپین آگار حاوی توپین ۸۰ که به صورت نقطه ای کشت داده شده بودند، با تجزیه‌ی توپین ۸۰ موجود در محیط به اسید چرب، در ترکیب با کلسیم موجود در محیط، هاله رسوبی سفید رنگ اولئات کلسیم ایجاد نموده که در اطراف کلنی باکتری‌ها قابل مشاهده است. از بین سه باکتری مذکور،

NICOLET8700 استفاده گردید. روش مذکور به صورت کیفی، میزان تجزیه ترکیب مورد نظر را بر روی نمودار به شکل طیف نمایش می‌دهد.

بررسی تاثیر دو عامل pH و دما بر روند تجزیه

روش آماده سازی نمونه‌ها، همانند روش آماده سازی جهت بررسی دو روش دستگاهی می باشد. روند تجزیه‌ی توپین ۸۰ توسط باکتری‌های جدا شده در pH های ۵، ۶، ۷ و ۸ و دماهای ۳۰، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد بررسی گردیده است.

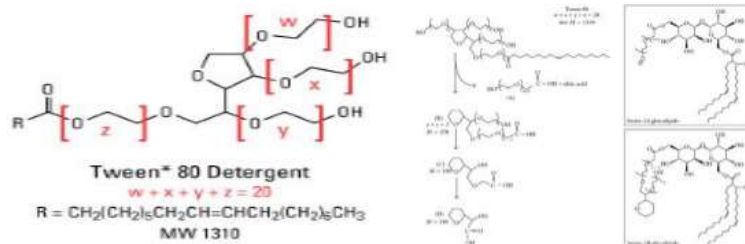
یافته‌ها

یافته‌ها مربوط به جداسازی باکتری‌ها از منابع محیطی

حدود ۴۰ نمونه باکتری جدا و خالص گردید. حدود ۲۰ نمونه از مجموع نمونه‌ها به عنوان چربی‌دوست، و در نهایت سه باکتری که توانایی رشد خوبی در محیط‌های حاوی غلظت ۶ درصد از توپین ۸۰ و روغن زیتون را داشتند برای ادامه کار گزینش گردیدند.

یافته‌های مربوط به شناسایی باکتری‌ها

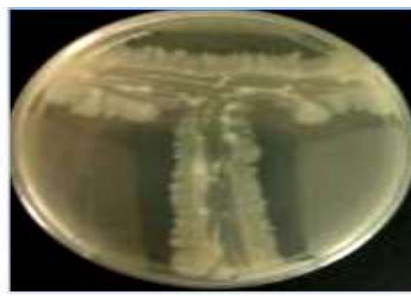
باکتری‌های جدا و خالص شده دارای کلنی‌هایی با اندازه، شکل و رنگ متفاوت بوده و پس از رنگ آمیزی گرم از کشت ۲۴ ساعته، به اشکال مختلف باسیل



شکل ۱: ساختمان مولکول دترجنت توپین ۸۰



شکل ۳: رسوب حاصل از تجزیه‌ی توپین ۸۰ توسط باسیلوس sp1 در محیط توپین آگار



شکل ۲: هاله شفاف اطراف کلنی باسیلوس sp1 نشان دهنده تولید آنزیم لیپاز

سودوموناس آئروجینوزا بهترین تجزیه را در pH اسیدی (حدود ۶) و دو باسیل گرم مثبت در pH قلیایی (حدود ۸) دارند.

نتایج تأثیر دما: بررسی جذب نوری حاصل از تجزیه‌ی توین توسط سه باکتری مورد نظر در چهاردمای مختلف نشان می‌دهد هر سه باکتری بهترین تجزیه را در دمای ۳۷°C دارند و درسه دمای دیگر میزان تجزیه تقریباً به یک میزان مشاهده گردید.

بحث

آلودگی های زیست محیطی یکی از مخاطرات دنیای امروزی می‌باشد. از جمله موارد قابل توجه، آلودگی های موجود در پساب‌ها ناشی از تخلیه‌ی پساب‌های خانگی و صنعتی به ویژه صنایع شوینده و پاک کننده به محیط زیست می‌باشد که با توجه به تماس انسان و سایر موجودات زنده، زیان های جبران ناپذیری را به همراه خواهند داشت (۱۷ و ۱۸). از آنجایی که پساب این صنایع به علت داشتن غلظت بالای مواد کف کننده مانند

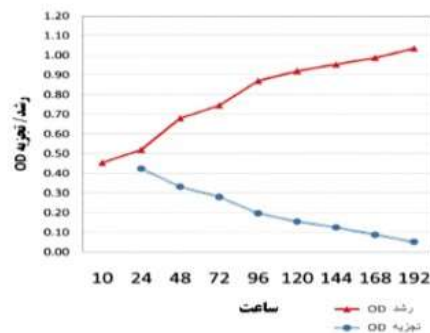
بهترین هاله رسوبی مشاهده شده متعلق به باسیلوس sp ۱ می باشد (شکل ۳).

نتایج روش های دستگاهی:

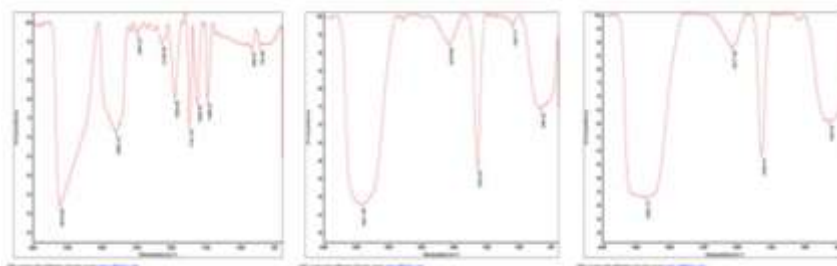
بررسی میزان جذب نوری حاصل از رشد باکتری‌ها و تجزیه‌ی توین ۸۰ توسط آن‌ها، نشان می‌دهد با افزایش زمان انکوباسیون، رشد باکتری‌ها افزایش یافته و هم‌زمان با آن میزان تجزیه نیز افزایش پیدا کرده است.

میزان تجزیه توسط سه باکتری متفاوتاً، نزدیک به هم مشاهده شد (نمودار ۱). مقایسه طیف‌های FTIR حاصل از تجزیه‌ی توین ۸۰ توسط باکتری‌های مذکور با طیف‌های حاصل از نمونه شاهد (محیط کشت نوترینت برات حاوی ۱ درصد توین ۸۰) و توین خالص، نشان می‌دهد باسیلوس sp ۱، سودوموناس آئروجینوزا و باسیلوس sp ۲ به ترتیب بهترین تجزیه را دارا می‌باشند (نمودار ۲).

یافته‌های تأثیر pH: بررسی جذب نوری حاصل از تجزیه‌ی توین ۸۰ توسط سه باکتری منتخب مورد نظر در چهار pH مختلف (۵-۸) نشان می‌دهد که باکتری



نمودار ۱: جذب نوری حاصل از میزان رشد و تجزیه توین ۸۰ توسط باسیلوس sp ۱ بهترین تجزیه کننده‌ی توین ۸۰، باروش اسپکتروفتومتر



نمودار ۲: الف- طیف‌های حاصل از FTIR توین ۸۰ خالص ب- شاهد ج- توین تجزیه شده توسط باسیلوس sp ۱

سوبتیلیس و پومیلوس و همچنین در چند پژوهش دیگر نیز به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم لیپاز و جداسازی باکتری‌های لیپولیتیک، از محیط کشت اختصاصی تریوتیرین آگار استفاده نموده اند. در پژوهش حاضر نیز به جهت بررسی فعالیت آنزیم لیپاز و لیپولیتیک بودن باکتری‌های چربی دوست منتخب، باکتری‌ها در محیط کشت تریوتیرین آگار کشت داده شدند و پس از گرماگذاری، هاله شفاف اطراف کلنی باکتری‌ها بررسی گردید. همچنین جهت بررسی تجزیه توپین ۸۰، نیاز محیط ترکیبی توپین آگار حاوی توپین ۸۰ و پیتون استفاده شده است.

حسینی و همکارانش در پژوهشی که بر روی تجزیه‌ی دترجنت یونی (SDS) با استفاده از باکتری‌های جدا شده از لجن فعال انجام دادند، از روش دستگاهی اسپکتروفتومتر نیز استفاده نمودند (۱۹ و ۴). در پژوهش حاضر، جهت سنجش میزان رشد و تجزیه توپین ۸۰ علاوه بر روش دستگاهی اسپکتروفتومتر، از طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) نیز استفاده گردید. بررسی طیف‌های حاصل از میزان جذب نوری حاصل از رشد باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ nm، جذب نوری حاصل از تجزیه توپین ۸۰ در طول موج ۵۶۰ nm و مقایسه آن با نمونه شاهد، نشان دهنده‌ی تجزیه ترکیب مذکور توسط باکتری‌های جدا شده می باشد.

قمصری و همکارانش سودوموناس آئروجینوزای سویه KM110 را از خاک جدا و تأثیر چهار دما (۲۵، ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی گراد) و pH های ۴ تا ۱۲ را بر تولید لیپاز توسط باکتری مذکور بررسی نمودند. بیشترین تولید لیپاز را در دمای ۳۷°C و در ۱۲-۸ pH مشاهده کردند (۱۸). در پژوهش حاضر تأثیر چهار دمای ۳۰، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد و چهار pH ۵، ۶، ۷ و ۸ بررسی گردید. نتایج حاصل از تأثیر چهار pH و چهار دمای مختلف بر روند تجزیه‌ی توپین ۸۰ نشان داد که سودوموناس آئروجینوزا گزینه مناسب تجزیه در pH اسیدی و دوسویه باسیل گرم مثبت گزینه مناسب تجزیه در

دترجنت‌ها که نفوذ اکسیژن در پساب راکاهش می‌دهند، از قدرت تصفیه پذیری بیولوژیکی پایینی برخوردار می‌باشند و به‌طور مناسب به وسیله‌ی سیستم‌های متداول بیولوژیکی تصفیه نمی‌شود (۵).

توپین‌ها سورفکتانت‌های غیر یونی از گروه پلی‌سوربات می‌باشند که با نام تجاری اسپن (SPAN) معروفند و دارای انواع مختلفی می‌باشند. ترکیبات مذکور که مایعات روغنی هستند و از اتوکسیلاسیون سوربیتان شده با اسیدهای چرب حاصل گردیدند، از مهم‌ترین و پر مصرف‌ترین انواع آن توپین ۸۰ است که در این تحقیق تجزیه آن توسط باکتری‌های لیپولیتیک جدا شده مورد بررسی قرار گرفته است (۷ و ۶).

باکتری‌های لیپولیتیک با تولید آنزیم لیپاز باعث تجزیه‌ی ترکیبات لیپیدی می‌گردند. از جمله‌ی این باکتری‌ها باسیلوس‌ها، سودوموناس، استافیلوکوک‌ها و غیره می‌باشند که از لیپاز تولیدی آن‌ها در صنایع مختلف و تجزیه ترکیبات لیپیدی می‌توان استفاده نمود (۱۸ و ۱۵ و ۱۳). در این پژوهش باسیل‌های گرم مثبت و گرم منفی که توانایی تجزیه‌ی توپین ۸۰ را دارند جداسازی و شناسایی شدند.

جهت جداسازی باکتری‌ها از پساب (API) و لجن فعال پالایشگاه نفت شهید تند گویان تهران از محیط کشت TSA حاوی روغن زیتون و توپین ۸۰ به‌طور جداگانه استفاده شد. ابتدا حدود ۴۰ باکتری جدا، سپس با استفاده از محیط کشت TSA حاوی غلظت ۶ درصد از توپین ۸۰ و روغن زیتون، ۳ باکتری به عنوان چربی‌دوست خوب جداسازی و پس از چندین بار تجدید کشت، خالص و انتخاب گردیدند. در پژوهش‌های مشابه نیز برای جداسازی باکتری‌های لیپولیتیک، از محیط حاوی روغن زیتون استفاده نمودند. پراساد روغن زیتون را بهترین منبع کربن برای تولید لیپاز از باسیلوس‌ها معرفی می‌نماید (۱۱ و ۱۰).

جهت جداسازی باکتری‌های تولیدکننده‌ی لیپاز از خاک و جهت بررسی تولید آنزیم لیپاز در باسیلوس

تشریح و تقدیر

از اساتید و پرسنل محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی و شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و مدیرعامل محترم پالایشگاه نفت شهید تندگویان تهران نهایت تقدیر و تشکر را دارم. مقاله حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد.

pH قلیایی می باشد. هر سه باکتری مذکور بهترین تجزیه را در دمای C ۳۷ نشان دادند. پژوهش حاضر بهترین تجزیه کنندگان توین ۸۰ از بین باکتری های جدا شده از پساب و لجن فعال نفتی را به ترتیب: باسیلوس سرئوس با (T) ATCC14579، سودوموناس آئروجینوزا و باسیلوس ۲ Sp معرفی می نماید.

References

- Ojo OA,OSO BA. Isolation and characterization of synthetic detergent degraders from Wastewater. Afr J Biotechnol. 2008; 7(20): 3753-60.
- Ertugrul S,Donmez G, Takac S. Isolation of lipase producing Bacillus sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. J Hazard Mater. 2009; 149(3): 720-4.
- CipinyteV,Grigiskis S,Baskys E. Selection of fat-degradation microorganisms for The treatment of lipid-contaminated environment.Biology J. 2009; 35: 84-92.
- Hosseini F, Malekzadeh F, Amirmozafari N, Ghaemi N. Biodegradation of anionic surfactants by isolated bacteria from activated sludge. Int J Environ Sci Tech. 2007;4 (1): 127-32.[Persian]
- Juan L, Gabriela M, Esperanza R, Petia M, Luciano S, Lina C, et al. Isolation and Identification of Bacterial Strains from a Mixed Wastewater Treatment System Used to Treat Petrochemical Effluents. 2009.
- Morelli J,SzajerG. Analysis of Surfactant. J Surfactants Deterg.2012;4(1): 75-83.
- JayashreeR, VasudevanN. Effect of Tween 80 added to the soil on the degradation of endosulfan by Pseudomonas aeruginosa. Int J Environ SciTech. 2010;4(2):203-10.
- Zhou J, Jiang W, Ding J, Zhang X, Gao S. Effect of tween 80 and B-Cyclodextrin on degradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by white Rot fungi. Chemosphere. 2007; 70(2): 172-7.
- Negm NA,Saad El-Tabl A, Aiad IA, Zakareya K, Moustafa AH.Synthesis, Characterization, Biodegradation and Evaluation of the Surface Active Properties of Nonionic Surfactants Derived from Jatropha,Oil.J Surfactants Deterg. 2013; 16(6): 857-63.
- Prasad MP, Manjunath k. Comparative Study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. Indian J Biotechnol.2011;10:121-4.
- Tarntip R, Sirichom T. Isolation of Proteolytic, lipolytic and bioemulsifying bacteria for improvement of the aerobic treatment of poultry processing wastewater. Afr J Microbiol.2011; 5(30): 5493-7.
- Bhavani M, Chowdary GV, David M, Archana G. Screening , Isolation and Biochemical characterization of Novel Lipase Producing Bacteria from Soil samples. International Journal of Biology Engineering. 2012; 2(2):18-22.
- Hoon Joo M, Yeon Kim J. characteristics of crude oil biodegradation by biosurfactant-producing bacterium Bacillus subtilis JK-1. J Korean soc Appl Biol chem. 2013; 56: 193-200.
- Liaw RB, Cheng MP, Wu MC, Lee CY.Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. Bioresour Technol. 2010; 101(21): 8323-9.
- Muir DO, Phillips DG, Dalgle SH. The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. Int J Dairy Technol. 1979;32(1):19-23.
- Parkash M,Rajasekar K, KarmegamN. Bacterial Population of Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Activities. Res J Basic Appl Sci. 2007;3: 848-51.
- Pirsaheb M, Almasi A, Zinatizade AA, khamutian R, Delangizan S. Economic Comparison of Standard Method with E-Jurdo Simplified Method to Measure Linear Alkyl Benzenesulfonates in Municipal Wastewaters.Iran J Health & Environ. 2011; 4(2): 245-53.
- Mobarak-Qamsari E, Kasra-Kermanshahi R, Moosavi-nejad Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, pseudomonas aeruginosa KM110. Iran J Microbiol.2011;3(2): 92-8.
- Maier MS, de Faria DLA, Boschín MT,Parera SD. Characterization of reference lipids and their degradation products by Raman spectroscopy, nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry.Issue in Honor of Prof. 2005;311-8.
- Mauerer A. Secondary Structural Changes of Spray Dried Protein With Fourier Transform Infrared Spectroscopy.2006.

21. Shabtai Y. Isolation and Characterization of a Lipolytic Bacterium Capable of Growing in a Low-water-content Oil-water Emulsion. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57(6): 1740-5.
22. Watanabe K. Molecular Detection , Isolation and Physiological Characterization of Functionally Dominant Phenol-degrading Bacteria in Activated Sludge. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(11): 4396-402.
23. Ehara K, Iiyoshi Y, Tsutsumi Y, Nishida T. Polyethylene degradation by manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *J wood sci.* 2000;46:180-3.
24. Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S. Molecular Detection. Isolation and Physiological Characterization of Functionally Dominant Phenol-degrading Bacteria in Activated Sludge. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(11): 4396-402.
25. Walter V, Syldatk C, Hausmann R. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant producing Microorganisms. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 672: 1-3.
26. Ali A, Naseem F. Frequency distribution of bacteria isolated from different industrial effluents. *Daffodil Int Univ JSci Techn.* 2012;7(1): 28-33.
27. Walter V, Syldatk C, Hausmann R. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant producing Microorganisms. *Adv Exp Med Biol.* 2010;672: 1-13.
28. Sirisha E, Rajasekhar N, Narasu ML. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Adv Biol Res.* 2010;4(5): 249-52.
29. Mukherjee S, Das P, Sen R. Rapid quantification of microbial surfactant by a simple turbidometric method. *J Microbiol Methods.* 2009; 76(1): 38-42.

Isolation of Lipolytic Bacteria from Environmental Resources for Biodegradation Polysorbates in Industrial Wastewater

**Fatemeh Adami Ghamsari,*

M.Sc., Department of Microbiology, Basic Science Collage, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

Farzaneh Hosseini,

Associate Prof., Department of Microbiolog, Basic Science Collage, Islamic Azad University, North Tehran Branches, Tehran, Iran.

Anita Khanafari,

Associate Prof., Department of Microbiolog, Basic Science Collage, Islamic Azad University, North Tehran and Science and Research Branches, Tehran, Iran.

Received:30/11/2014, Revised:03/01/2015, Accepted:03/02/2015

Correspond Author:

Fatemeh Adami Ghamsari,
Tehran, Department of
Microbiology, Basic Science
Collage, Islamic Azad University,
North Tehran Branch,
E-mail: Mahla_fag@yahoo.com

Abstract

Background & Objectives: Today, entrance of wastewaters, especially detergent and cleaner agent's production industries wastewaters, to surface and underground waters is one of environmental pollution concerns. These wastewaters are containing detergents and surfactants, such as polysorbates and, because of exposure of human and other organisms, their degradation is of great important. This research analyses degradation of a non-ionic detergent in polysorbate group called Tween 80 (polysorbate 80) and studies effect of pH and temperature on degradation rate of this detergent, using lipolytic bacteria (isolated from Tehran oil refinery wastewater and activated sludge).

Materials & Methods: For primary isolating of lipolytic bacteria, the TSA medium containing Tween 80 and olive oil has been, separatively, used. Then specific culture Tween agar and Tributyrin agar have been used to study for lipase enzyme bacteria production. Also for confirmation degradation, instrumental methods, spectrophotometer and FTIR were used.

Results: The results shows that the isolated bacteria are able to depredate polysorbate 80 by lipase enzyme production. *Bacillus cereus* was known as the best degradator after the identification of the molecular basis of sequencing 16S rRNA. *Bacillus cereus* ATCC 14579 (T), *Pseudomonas aeruginosa* and other *Bacillus* sp was known.

Conclusion: The results showed that pH and temperature affects on the degradation of tween, and the *Pseudomonas aeruginosa* at acidic range of pH, two gram positive bacillus at alkali range of pH and three bacteria at 37 °C have the best degradation.

Keywords: *Lipolytic bacteria; Environmental resources; Non-ionic detergent; Polysorbate; Tween 80; Industrial wastewater; Activated sludge; Degradation.*