



## پاکسازی زیستی آب های آلوده به نفت خام توسط باسیلوس های جدا شده از حوضچه های نفتی

نویسنده گان: فریده محمدی\* عباس اخوان سپهی\*\* فائزه محمدی\*\*\* مصطفی امینی\*\*\*\*

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

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

\*\* 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 خوارسگان

## طلوغ بهداشت

### چکیده

**سابقه و اهداف:** آب های آلوده به نفت خام یا ترکیبات نفتی یکی از معضلات محیط زیست است. 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 ppm 10000 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 گرمگذاری شد. برای جداسازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت، از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان اولین معیار جداسازی و غربالگری استفاده شد. برای بررسی قدرت تجزیه نفت خام هر ۳ سویه خالص شده و کنسرسیوم این ۳ سویه تست های IR(مادون قرمز) و GC-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 اریتروسیت های گوسفند و تولید هاله همولیز برروی محیط بلاد آگار بودند. سویه های 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 و مقادیر ۳۰، ۳۴، ۳۸ mN/m برای ۳ سویه خالص شده و ۲۸ mN/m برای کنسرسیوم این ۳ سویه بدست آمد. هنگامی که توالی فوق در برنامه BLAST قرار گرفت، نتایج نشان دهنده تشابه ۹۹/۸ درصد باکتری های جدا شده با Bacillus subtilis و Bacillus cereus 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 سرثوس، باسیلوس سوبتیلیس

فصلنامه علمی پژوهشی

دانشکده بهداشت یزد

سال یازدهم

شماره: دوم

تابستان ۱۳۹۱

شماره مسلسل: ۳۵

تاریخ وصول: ۱۳۹۰/۸/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۷



## مقدمه

در این میان برخلاف بسیاری از روش‌های متداول که مشکل آلودگی را به گونه‌ای دیگر تبدیل و یا آلاینده را به بستر دیگری منتقل می‌کنند، پالایش زیستی با صرف کمترین هزینه، توانایی حذف دائم آلاینده‌ها با تبدیل آن‌ها به مواد بی خطر را دارد (۲).

به دلیل این که بیشترین قسمت نفت را هیدروکربن‌ها تشکیل می‌دهند تجزیه آن‌ها 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 می‌دهند 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 اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان دهنده اثر تخریب زیستی باسیلوس‌ها بر روی هیدروکربن‌ها نفتی و توانایی آنها در استفاده از نفت به عنوان تنها منبع کربن و انرژی می‌باشد (۳).

F.Naimpoor و A.Partoinia زیست سالم سازی خاک آلوده به هیدروکربن نفتی نرمال هگزادکان در فازدوغابی و پارامترهای مؤثر بر آن را بررسی کردند و نشان دادند باکتری جدا شده از خاک آلوده به نفت توانایی چشمگیری در تجزیه زیستی هگزادکان جذب شده در خاک مورد نظرداشته است (۱).

آلودگی محیط زیست به دلیل فعالیت‌های انسانی و صنعتی مشکلات جدی را در سراسر دنیا ایجاد کرده است. اختراع موتورهای سوخت داخلی و نیازگسترده آن‌ها به نفت خام و محصولات نفتی موجب رشد قابل توجه صنعت نفت، پتروشیمی و صنایع جانبی آن شده و باعث شده هیدروکربن‌های نفتی در رددیف گسترده ترین آلاینده‌های محیط قرار گیرند (۱). بسیاری از ترکیبات آروماتیکی با اثر شدید در سیستم هورمونی تأثیرات خطرناک خود را اعمال می‌کنند، که در مقدار کم می‌تواند اثرات بسیار عمیقی در بدن بگذارند. پلی برمینیت دی فنیل اترها و متابولیت‌های ایشان و فل دارای خاصیت مختلط کننده غدمترشحه داخلی (اندوکربن) هستند. بنزن، تولوئن، نفتالین و فناوری‌ترین اثرات سمی و ترکیبات چندحلقوی اثرات سرطان‌زا بی دارند. با وجود آنکه نفت باعث کاهش تعداد میکرووارگانیسم هاوپلانکتون هامی شوند ولی در اثرات مهمی به جا می‌گذارد (۲).

یکی از روش‌های پاکسازی زیستی بدین صورت است که، میکرووارگانیسم‌هایی به محیط افزوده می‌شوند که آلاینده‌های نفتی را به عنوان تنها منبع انرژی و کربن مصرف می‌کنند و در بهینه ترین حالت آنرا به دی اکسید کربن و آب تبدیل می‌کنند، هر چند که در واقعیت از تجزیه ترکیبات نفتی همراه آب و دی اکسید کربن مواد دیگری که اغلب اکسید شده و قابل حل هستند نیز به دست می‌آیند. پاکسازی زیستی سالهای است در دنیا به صورت میدانی به کار گرفته می‌شود. روش‌های زیستی ضمن سازگاری با محیط زیست، از نظر اقتصادی نیز برتری محسوسی نسبت به دیگر روش‌های پاکسازی (فیزیکی و شیمیایی) دارند.



دور 150rpm در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد، سپس یک لوب از باکتری را با سوزن تلچیح 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 گرمگذاری شدند.

مواد این محیط کشت عبارتند از (۳) :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O} = 2 \text{ g/l}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 2 \text{ g/l}$ ,

$\text{MgSO}_4 = 0.2 \text{ g/l}$ ,  $\text{NaCl} = 0.8 \text{ g/l}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.1$

$\text{g/l}$ ,  $\text{NaNO}_3 = 2\text{g/l}$ ,  $\text{KCl} = 0.8 \text{ g/l}$ ,  $\text{FeSO}_4$ .

$7\text{H}_2\text{O} = 0.001\text{g/l}$ , Trace element = 2 ml

Trace element:  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 0.75 \text{ g/l}$ ,

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 0.075 \text{ g/l}$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.05$

$\text{g/l}$ ,  $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 0.08 \text{ g/l}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3 = 0.15 \text{ g/l}$ ,

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 0.08 \text{ g/l}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 0.75\text{g/l}$ , The

pH should be 6.8 after sterilization

بررسی فعالیت همولیتیک به دلیل سرعت بالا و سادگی به عنوان

معیار انتخاب باسیلوس های مولد بیوسورفکتان 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 ۴۸-۷۲ ساعت

گرمگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، نتایج بررسی شدند.

از بین این تعداد سویه جداسازی شده ۸ سویه قادر به لیز نمودن

E.Rismani و همکارانش طی تحقیقی قدرت تولید بیوسورفکتان 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 سورفکتان را بر تجزیه *Bacillus pumilus* با naphthalene جدا 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 پژوهش ۴ منطقه آبی مختلف در پالایشگاه نفت اصفهان بوده است، بدین صورت که از آب آلوده به نفت خام از مناطق لجن فعال - پوند ۵ - (شناور کننده های هوایی Dissolved Air API A/B و FloataionDaf(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 ثیثیت و رنگ آمیزی گرم از نوع گرم منفی شناخته شد. برای تقویت و احتمال جداسازی باکتری ابتدا نمونه را به محیط MSM تلچیح کرده و بر روی شیکر با



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 استخراج گردید.

PCR با پرایمر های rD<sub>1</sub>و fD<sub>1</sub> انجام شد. شرایط PCR در جدول زیر ذکر شده است. توالی پرایمر های فوق به شرح زیر است:

fD<sub>1</sub> : 5` ccgaattcgtcgacaacagagtttgatccggctcag 3`  
rD<sub>1</sub> : 5` cccgggatccaaggcttaaggaggatgtatccagcc 3`  
پس از استخراج DNA باکتری به روش گفته شده و انجام PCR با پروتکل ذکر شده در زیر، برای شناسایی باکتری های مورد نظر از روش کلني PCR برای تکثیر ژن 16SrRNA استفاده شد. بدین منظور یک کلني از باکتری های مورد نظر را در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل سوسپانسیون و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق به عنوان DNA الگو در PCR با پرایمر های rD<sub>1</sub>و fD<sub>1</sub> استفاده شد.

محصول PCR در پلاسمید pBleuscript SK کلون و کلني های سفید انتخاب و پس از تایید حضور قطعه خارجی توسط PCR با استفاده از پرایمر های rD<sub>1</sub>و fD<sub>1</sub> تعیین توالی شد. توالی حاصل با توالی های موجود در بانک اطلاعات زیستی NCBI مقایسه شد.

ترکیبات مورد نیاز برای انجام PCR :

اریتروسیت های گوسفند و تولید هاله همولیز بروی محیط بلا د آگار بودند. کنسرسیوم این ۸ سویه نیز از نظر تولید بیوسورفکتانت بررسی شد. سویه های دارای فعالیت همولیتیک برای مطالعات بعدی انتخاب گردیدند. کشش سطحی سویه هایی که توانایی همولیز بر روی بلا د آگار را داشتند بررسی شد. Du Nouy Rind (۶,۷) کاهش کشش سطحی که به روش Tensiometer (Method) و 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 ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بر روی شیکر با دور ۱۵۰ 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 (۲۸). برای تشخیص اولیه باسیلوس هایی که در حد قابل قبولی بیوسورفکتانت تولید کردنده 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



از کشت باسیلوس ها به تنها بی 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<sub>2</sub> دارد ولی به طور چشمگیری کنسرسیوم باسیلوس ها در تجزیه نفت خام مؤثرتر از کشت باسیلوس ها به تنها بی عمل می کند به طوریکه کنسرسیوم باسیلوس ها خالص شده ۸۳۵۰ ppm نفت از ۱۰۰۰۰ ppm را تجزیه کرده اند در واقع کمپلکس باسیلوس های خالص شده باعث حذف 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.

PCR buffer =1X, MgCl<sub>2</sub>=1.5mM, DNTP<sub>s</sub>=2mM,

fD<sub>i</sub>=10 μM, rD<sub>i</sub>=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

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

نتایج تست IR	میزان کشش سطحی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد
غلظت اولیه نفت باقیمانده	
خام	34
2400ppm	Bacillus sp <sub>1</sub>
1850ppm	Bacillus sp <sub>2</sub>
3950ppm	Bacillus sp <sub>3</sub>
1650ppm	Consortium of Bacillus



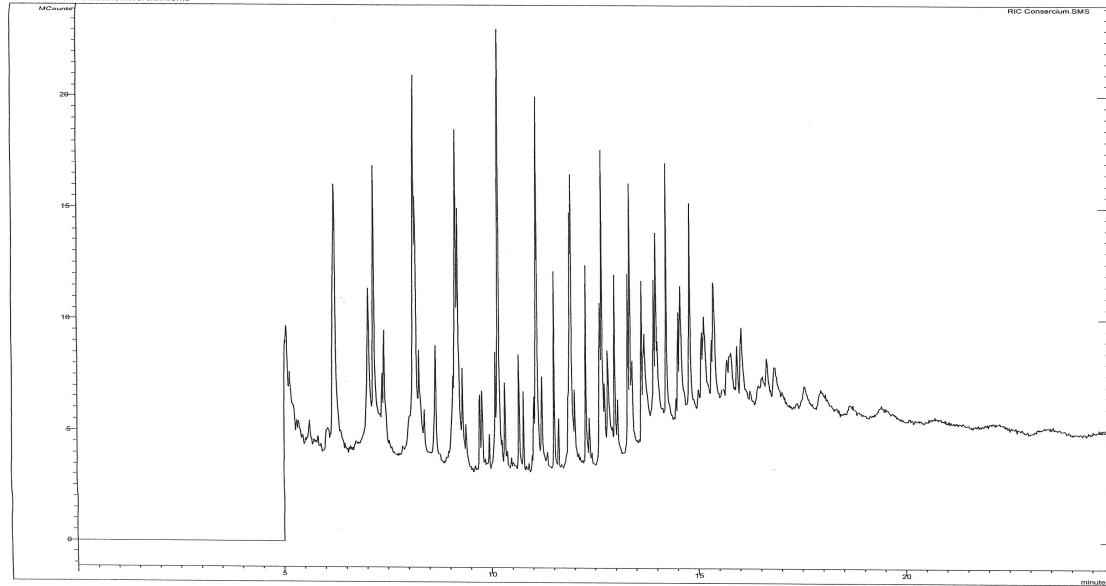
جدول ۲: نتایج تستهای بیوشیمیایی

Bacillus sp <sub>3</sub>	Bacillus sp <sub>2</sub>	Bacillus sp <sub>1</sub>	کاتالاز
+	+	+	کاتالاز
-/+	+/-	+/-	MRVP
+	-	+	مانیتول
-	-	-	اندل
+	-	+	تست لسیتیناز
+	+	+	تست هیدرولیز کازئین
+	+	+	تست آمیلاز
+	+	+	آراینوز

Print Date: 16 Jun 2011 15:45:45

## Chromatogram Plot

File: c:\varianws\data\conserciun.sms



نمودار ۱: نتیجه گاز کرومتوگرافی - اسپکترومتر



۳- محصول PCR باکتری sp<sub>2</sub>: باسیلوس سوبتیلیس

۴- محصول PCR باکتری sp<sub>3</sub>: باسیلوس سرئوس

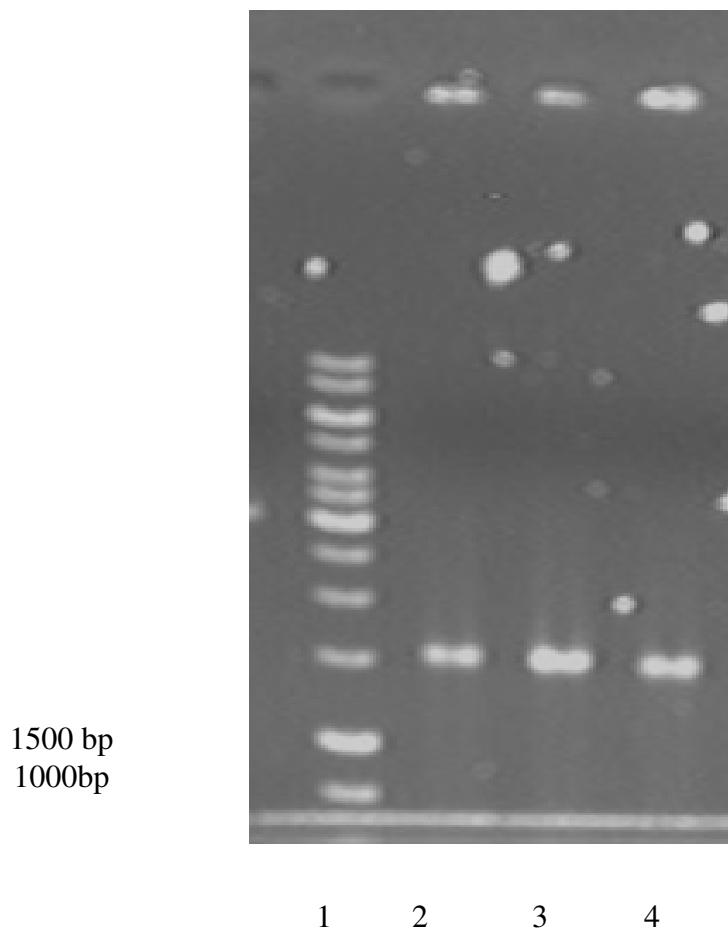
مقایسه توالی 16SrRNA ۱۶ سویه های sp<sub>1</sub> و sp<sub>2</sub> نشان داد که تنها در ۶ نوکلئوتید تفاوت دارند.

همانطور که بر روی نمودار ۲ نمایان است پایین ترین کشش سطحی برای باسیلوس های کشت داده شده زمانی است که بر روی نفت کشت داده شدن دو در بین باسیلوس هایی که بر روی نفت کشت داده شده بترین کشش سطحی را کنسرسیوم باسیلوس ها دارد.

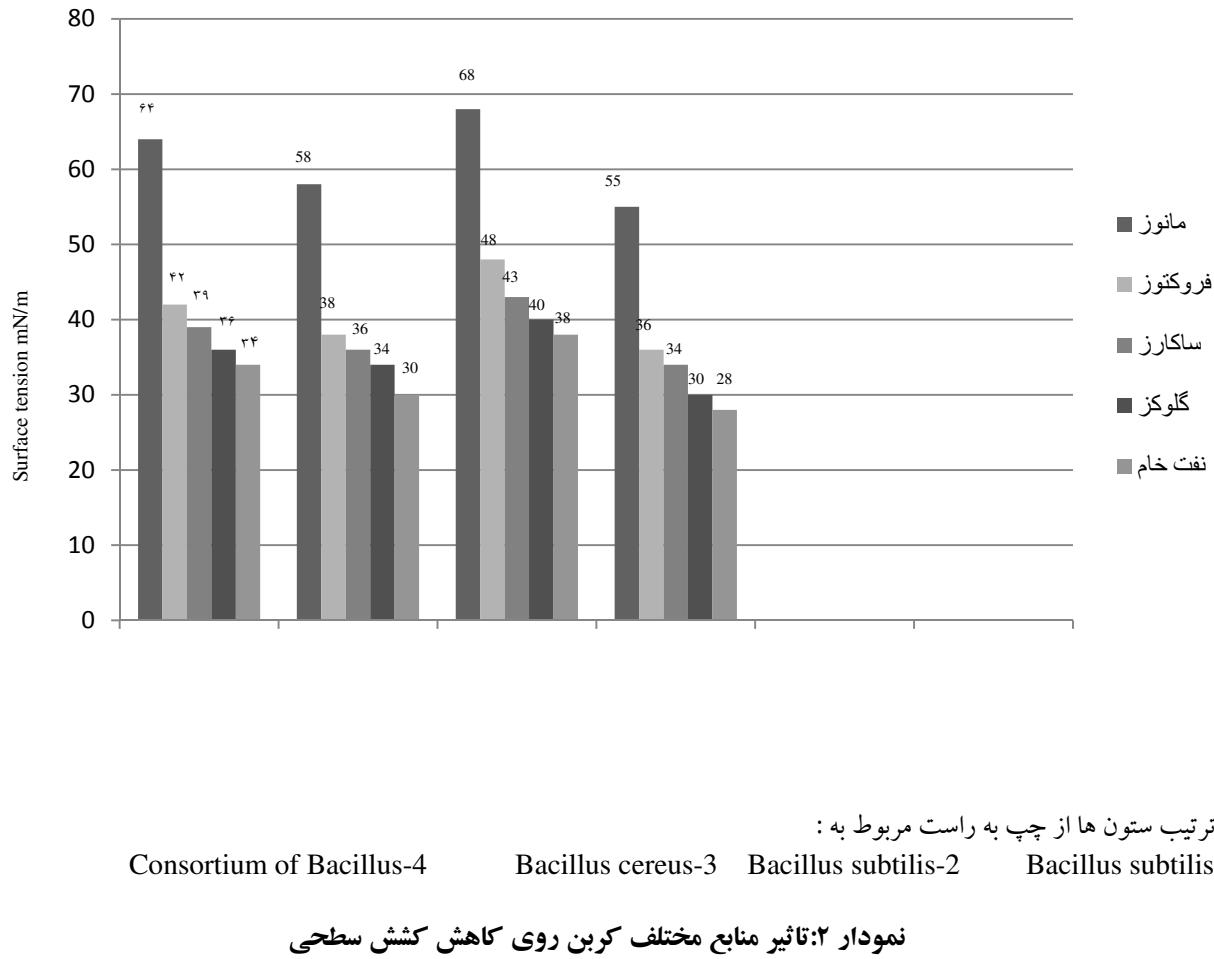
نتایج گاز کروماتوگرافی-اپسکترومتر در نمودار ۱ با توجه به تعداد بیشتر پیک های مشاهده شده نشان می دهد، در بین باسیلوس ها بهترین عملکرد در تجزیه نفت خام راکتسرسیوم باسیلوس ها دارد در واقع میزان و تنوع متابولیت های حدواسط و راندمان کمی و کیفی طبق نتایج بدست آمده در کنسرسیوم باسیلوس ها بیشتر و بالاتر می باشد. عملکرد چشمگیر در تجزیه نفت خام در کنسرسیوم باسیلوس ها، کاملاً باز می باشد. در نتیجه تکثیر و کلونینگ 16SrRNA باسیلوس ها که در شکل ۱ نشان داده شده است:

DNAsize marker-1

۲- محصول PCR باکتری sp<sub>1</sub>: باسیلوس سوبتیلیس



شکل ۱: نتیجه تکثیر و کلونینگ 16SrRNA باسیلوس ها



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 فنتالن که از آروماتیک های چند حلقه است را تحت شرایط هوایی دارد(۵). دکتر اخوان و همکارانشان تحقیقی برای مشخص کردن بهترین باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت در میدان بی بی حکیمه در شرایط Exsitu انجام دادند که در آن مشخص

## 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 نیستند ولی 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



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 مقدار 20mN/m کاهش دهد.

Banat در طی تحقیقی در سال ۱۹۹۵ برای جداسازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت از فعالیت همولیتیک استفاده کرد<sup>(۹)</sup>. در مطالعاتی که توسط Bernheimer and Avigad در سال ۱۹۷۰ صورت گرفت از همولیز بتا در محیط بلاد آگار به عنوان معیار تولید بیوسورفکتانت استفاده شد<sup>(۱۱)</sup>. طی تحقیقات خانم فرناز افشار ابراهیمی در ارتباط با بررسی اثر کنسرسیوم باسیلوس ها در تجزیه تولوئن خاک های آلووده مجتمع پتروشیمی اصفهان هر سه باسیلوس B12, B6, B3 و در حالت کدام به تنها بی و به صورت کشت خالص، کشش سطحی محیط کشت را به ترتیب تا ۳۵ و ۳۳ و ۳۷ کاهش 29mN/m دادند<sup>(۲)</sup>. در این تحقیق هر سه باسیلوس sp<sub>1</sub>, sp<sub>2</sub>, sp<sub>3</sub> هر کدام به تنها بی و به صورت کشت خالص، کشش سطحی محیط کشت را به ترتیب تا ۳۴ و ۳۰ و ۲۸ کاهش 28mN/m دادند. همانطور که انتظار می رفت

شد در آن ناحیه باسیلوس لیکنی فورمیس بهترین می باشد<sup>(۱۰)</sup>. طی تحقیقی توسط E.Rismani به این نتیجه رسید که Bacillus Licheniformis جدا شده از خلیج فارس قادر است با تولید بیوسورفکتانت نفت را تجزیه کند<sup>(۴)</sup>. هیچ میکرووار گانیسمی به تنها بی قابل 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 میکرووار گانیسم ها نیز می توان بهره گرفت چرا که در این صورت اثر سینرژیستیک و همکاری دو عامل تجزیه کننده می تواند کارایی بهتری در تجزیه آلاینده ها را باعث شود. مزیت استفاده از کنسرسیوم باکتریایی :

شامل موارد زیر می باشد<sup>(۲)</sup>:

۱- تقریباً در همه موارد استفاده از کنسرسیوم میکرووار گانیسم 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 میکرووار گانیسم مؤثر است چرا که ممکن است هر یک از اعضای کنسرسیوم در تجزیه یکی یا برخی از مواد آلاینده بیشترین کارایی را داشته باشند.



موضوع را می توان به واکنش های سینرژیک میان اعضای باکتری ها نسبت داد. مکانیسم 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 قبل از 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 کنسرسیوم از میکرووارگانیسم ها که با عنوان کنسرسیوم یا کشت مخلوط در مقالات نام برده شده، بسیار مؤثرتر از کشت خالص یا تکی میکرووارگانیسم 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 قدردانی

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

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

طیف سنجی مادون قرمز، روشی برای شناسایی مولکولها و بخصوص گروه عاملی مولکولهای است. هر ماده ای، طیف مادون قرمز مخصوص به خود دارد و همانند اثر انگشت، مختص خود مولکول می باشد. دستگاهی که طیف جنبی یک ترکیب را حاصل می کند، یک دستگاه طیف سنج مادون قرمز یا به عبارت دقیقتر یک اسکنپروفوتومتر خوانده می شود(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 مثلاً Cerniglia 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



## 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 sazandasmani 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



## **Bioremediation 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.

Bioremediation 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<sup>°</sup> tempreature. 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 similiarity 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 biodegradadon on the polluted waters.

**Keyword:**Biosurfactant, surface tension, consortium, Bacillus subtilis, Bacillus cereus