

## تجزیه ی زیستی نفتالین در خاک های آلوده به نفت خام توسط کنسرسیوم باسیلوس ها

مهشید موسوی: دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

عباس اخوان سپهی: دانشیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران- نویسنده رابط: akhavansepahy@gmail.com

طاهر نژادستاری: دانشیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۱

### چکیده

زمینه و هدف: آلودگی های نفتی یکی از پیامدهای اجتناب ناپذیر افزایش جمعیت و مصرف انرژی است. در این مطالعه، به منظور حذف این آلودگی ها، از روش زیست پالایی و باکتری باسیلوس استفاده شد. روش کار: نمونه های خاک جمع آوری شد و باکتری ها جداسازی و شناسایی شدند. سپس، تولید بیوسورفاکتانت، میزان تجزیه ی نفتالین و شرایط مناسب رشد آن ها بررسی گردید.

نتایج: باسیلوس های جداشده شامل *Bacillus subtilis* و *Bacillus fusiformis*، *Paenibacillus lactis*، *Bacillus cereus* بودند. سویه های خالص و کنسرسیوم باسیلوس ها کشش سطحی کم تر از  $40 \text{ mN/m}$  داشتند، بنابراین تولیدکننده ی بیوسورفاکتانت در نظر گرفته شدند. کنسرسیوم توان تحمل نفتالین را تا غلظت  $1000 \text{ ppm}$  در محیط کشت داشت. شرایط مناسب برای رشد کنسرسیوم باسیلوس ها، pH برابر ۶، دور شیکر  $150 \text{ rpm}$ ، منبع ازت عصاره ی مخمر و غلظت نفتالین برابر  $200 \text{ ppm}$  بود. نتیجه گیری: کنسرسیوم باسیلوس ها نسبت به سویه های خالص توانایی بیشتری در کاهش کشش سطحی، تولید بیوسورفاکتانت و رشد در محیط کشت دارای نفتالین و تجزیه ی آن داشت. در بسیاری از تحقیقات مشابه نیز نشان داده شده است کنسرسیوم باسیلوس ها یا باکتری های دیگر، توانایی بیشتری در تجزیه ی آلاینده های آلی دارد. واژگان کلیدی: باسیلوس، نفتالین، کنسرسیوم، زیست پالایی

### مقدمه

کننده ی خاک به حساب می آیند ( Ganesh and Lin 2009). بنابراین با توجه به حیاتی بودن خاک برای زندگی انسان و سایر موجودات، این آلودگی ها باید از محیط زیست حذف گردند (Bisht et al. 2010).

روش های مختلفی برای پاکسازی و حذف آلاینده ها از محیط به کار گرفته می شوند. روش های فیزیکی و شیمیایی اغلب هزینه بر هستند و به علاوه ممکن است باعث ایجاد ترکیبات سمی دیگر در محیط شوند. به نظر می رسد که از میان این روش ها، روش زیست پالایی روشی

با توجه به استفاده ی روزافزون از نفت خام و مشتقات آن، آلودگی های ناشی از این منبع سوختی نیز رو به فزونی گذارده و تبدیل به امری نگران کننده شده است. در واقع آلودگی های نفتی یک پیامد اجتناب ناپذیر افزایش جمعیت و مصرف انرژی است. رسوخ نفت خام از نفت کش ها، آلودگی در حین استخراج، ذخیره سازی و حمل و نقل زمینی و دریایی، آتش سوزی جنگل ها و گدازش زغال سنگ از جمله مهم ترین عوامل آلوده

## روش کار

مواد و وسایل مورد نیاز: نفتالین، محیط های کشت آگار مغذی و آگار خونی و مواد لازم برای ساخت محیط کشت نمک های معدنی (MSM) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. هم چنین کیت استخراج DNA از شرکت زیست دانشیاران خریداری شد.

نمونه برداری: ابتدا ۱۰ نمونه ی خاک از تهران و اطراف تهران جمع آوری شدند. این نمونه ها شامل ۵ نمونه-ی خاک آلوده به نفت خام و گازوئیل که از پمپ بنزین های ترمینال آزادی، خیابان کارگر، جاده ی آبعلی، رباط کریم و جاده ساوه تهیه شده بود و ۵ نمونه خاک فاقد آلودگی پارک های لاله، بوستان گفتگو، بوستان قزل قلعه، چیتگر و ترمینال آزادی بودند. نمونه ها در ظروف شیشه ای استریل جمع آوری شدند. در هنگام نمونه گیری مشخصات ظاهری خاک ها (رنگ، دما و pH) نیز ثبت شدند. سپس نمونه ها به سرعت به آزمایشگاه منتقل شده و برای مطالعات بعدی در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند (Akhavan sepahi and Mostafai 2009).

غنی سازی و خالص سازی: حجم هر نمونه ی خاک ۲۵۰-۳۰۰ گرم بود. یک گرم خاک مورد نظر وزن شده و در داخل لوله ی آزمایش حاوی ۹ ml آب مقطر استریل ریخته و در بن ماری با دمای  $80^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. پس از انجام تیمار حرارتی، نمونه های خاک به مدت ۲ هفته در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ ml محیط کشت اختصاصی MSM مایع حاوی ۵۰ ppm نفتالین کشت داده شدند. برای تهیه ی محیط کشت MSM،  $0/8$  گرم  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ،  $0/2$  گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ،  $0/05$  گرم  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ،  $0/5$  گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  و  $0/09$  گرم  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و  $1$  گرم  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  در ۱ لیتر آب مقطر استریل حل شده و پس از رساندن pH به ۷، محیط کشت اتوکلاو گردید (Sheyni et al. 2014).

ارلن ها به مدت یک هفته در دمای اتاق ( $25^{\circ}\text{C}$ ) و روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm قرار داده شدند. این کار به مدت

مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست می باشد. در واقع زیست پالایی عبارت است از به کارگیری توانایی متابولیسمی میکروارگانیسم ها در جهت حذف آلاینده های سخت تجزیه و مضر و تبدیل آن ها به متابولیت های بی خطر (Pawar et al. 2013).

نفت خام ترکیبی از هیدروکربن های مختلف شامل آلکان ها، آلکن ها، ترکیبات آروماتیک و رزین و آسفالتن و هم چنین ترکیبات گوگردی، اکسیژن، ازت و فلزات است. آروماتیک ها با شاخه ی کناری یا چندحلقه ای، مانند بنزن، نفتالین، تولوئن و آنتراسن که در ترکیب نفت خام حضور دارند، نسبت به سایر هیدروکربن ها از چگالی بالاتر و سمیت و پایداری زیادی برخوردارند (Sadigh bayan et al. 2013). نفتالین که جزء اصلی قطران زغال سنگ است، به صورت بلور فرار سفید رنگ مشاهده می شود. نفتالین یکی از ۱۶ آلاینده ی آروماتیک اولویت دار است که از سوی آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده طبقه بندی شده و دارای خواص جهش زاوی و سرطان زاوی است (Musat et al. 2009). نفتالین می تواند به صورت کوالان به مولکول های موجود در بافت ریه، کبد و کلیه ها متصل شود و مسمومیت با این ترکیب می تواند آنمی همولیتیک ایجاد نماید. هم چنین تغییرات پوستی و چشمی نیز در کارگران معادن نفت و زغال سنگ مشاهده شده است (Gomare and Lahane 2011). بنابراین حذف این ماده از خاک ضرورت دارد.

در این مطالعه، هدف جداسازی و شناسایی باسیل های تجزیه کننده ی نفتالین از خاک، بررسی توانایی هر یک از باسیل ها و کنسرسیون آنها در تجزیه ی نفتالین و بهینه سازی شرایط رشد در محیط کشت دارای نفتالین است. در واقع سعی شده است با مقایسه ی کارایی کنسرسیون و سویه های خالص در تجزیه ی نفتالین بهترین سویه برای این منظور انتخاب شود.

دارای همولیز بتا برای انجام آزمون کاهش کشش سطحی انتخاب شدند. برای سنجش کشش سطحی از روش بیرون کشیدن حلقه از سطح مایع و دستگاه تنسیومتر استفاده شد. سویه هایی که کشش سطحی کم تر از  $40 \text{ mN/m}$  داشتند انتخاب شدند. اندازه گیری برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد (Mohammadi et al. 2012).

رسم منحنی رشد: در مرحله ی بعد سویه ها در محیط نوترینت براث کشت داده شدند و منحنی رشد آن ها با اندازه گیری جذب نوری محیط کشت هر ساعت یک بار به مدت ۱۶ ساعت رسم گردید.

بررسی میزان تحمل نفتالین: سپس میزان تحمل نفتالین توسط کنسرسیون باسیلوس ها با افزایش غلظت نفتالین در محیط کشت تا  $1000 \text{ ppm}$  بررسی شد. محیط کشت شاهد حاوی نفتالین اما فاقد باکتری بود. جذب نوری محیط کشت هر روز طی ۹ روز اندازه گیری شد و نمودار میزان تحمل نفتالین برحسب زمان رسم گردید. سپس نمونه ها به محیط نوترینت آگار و MSM آگار منتقل شدند.

بهینه سازی رشد در حضور نفتالین: برای بهینه سازی شرایط رشد کنسرسیون باسیلوس ها از روش تاگوچی استفاده شد. در این آزمون، ۴ فاکتور  $\text{pH}$  (۶، ۴، ۲، ۸)، دور شیکر (۱۵۰، ۱۲۰، ۱۰۰، ۱۸۰)، منبع ازت (آمونیم سولفات، سدیم نترات، عصاره ی مخمر و پپتون) و منبع کربن ( $150 \text{ ppm}$ ،  $100 \text{ ppm}$  و  $200 \text{ ppm}$ ) بررسی شدند. سپس کشش سطحی کنسرسیون با شرایط جدید بررسی شد.

کروماتوگرافی گازی: برای تأیید حذف نفتالین از کروماتوگرافی گازی استفاده شد. ۳ نمونه شامل محیط کشت شاهد (روز صفر)، روز چهارم و هشتم بعد از کشت تهیه شد. برای استخراج نفتالین از محیط کشت از حلال اتیل استات استفاده شد. در این آزمایش از دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent ۷۸۹۰A استفاده شد. ستون استفاده شده از نوع HP-۵ موئین با طول ۳۰ متر، قطر داخلی  $0.25 \mu\text{m}$  و ضخامت لایه ی داخلی  $0.25 \mu\text{m}$  بود. آشکارساز FID و گاز حامل هلیوم بود. دمای محفظه ی تزریق  $280^\circ\text{C}$  و دمای آشکارساز  $300^\circ\text{C}$  بود. دمای آون

۲ هفته انجام شد. در هفته ی دوم ۱۰ درصد از محیط کشت قبلی (۵ ml) به محیط کشت جدید منتقل شد.

پس از هر هفته با مشاهده ی کدورت در محیط های کشت مایع، نمونه ها به MSM آگار دار منتقل شدند. این کار با استفاده از روش تهیه ی رقت (کخ) انجام شد و کلنی های جدا شده شمارش شدند. (تعداد باکتری = تعداد کلنی \* رقت) در مرحله ی بعد، نمونه ها به محیط کشت نوترینت آگار نفتالین دار و فاقد نفتالین منتقل شدند. کلنی های رشد یافته در محیط کشت نوترینت آگار دارای نفتالین برای انجام مرحله ی خالص سازی انتخاب شدند (Akhavan sepahi et al. 2009).

شناسایی ایزوله ها: جهت شناسایی باسیلوس ها، رنگ آمیزی گرم و اسپور انجام شد. سپس نمونه ها از نظر خصوصیات بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. در این مرحله آزمون های کاتالاز، تخمیر قندها، MR-VP و هیدولیز نشاسته، کازئین، لسیترین و ژلاتین انجام شد. شناسایی مولکولی باسیلوس ها با کمک تکنیک توالی یابی ژن  $\text{SrRNA}$  ۱۶ انجام گرفت. پرایمر استفاده شده از نوع پرایمر عمومی به شرح زیر بود:

۲۷-F: ۳-AGTTTGATCCTGGCTCAG-۵'

۱۴۹۵-R: ۳-CTACGGCTACCTTGTT-۵'

مخلوط واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) به صورت  $12/5 \mu\text{l}$  پرایمر پیش رو (Forward) و پس رو (Reverse)، هر کدام  $0/5 \mu\text{l}$  DNA به میزان  $1 \mu\text{l}$  و آب دوبار تقطیر  $10/5 \mu\text{l}$  بود. برنامه ی PCR به شرح جدول ۱ تنظیم شد (Assareh et al. 2012). در این آزمایش از دستگاه PCR مدل بیورد (Bio Rad) استفاده شد. نمونه ها جهت توالی یابی به شرکت زیست تکاپو ارسال گردیدند. سپس توالی ها به منظور یافتن تشابهات در نرم افزار BLAST قرار گرفتند.

بررسی تولید بیوسورفاکتانت: به منظور بررسی تولید بیوسورفاکتانت توسط سویه های انتخاب شده، ابتدا سویه ها در محیط بلاآگار کشت داده شدند و سویه های

مقدار کشش سطحی کاهش یافته از ۲۹ mN/m به ۲۶ mN/m شاهدی براین مدعاست.

میزان تحمل نفتالین: با توجه به نمودار مربوط به میزان تحمل نفتالین (نمودار ۲) ملاحظه می‌شود کنسرسیوم غلظت ۱۰۰۰ppm نفتالین را در محیط کشت به خوبی تحمل نموده است.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها: شناسایی سویه‌های مورد نظر براساس تکنیک توالی یابی ژن  $\beta$ -SrRNA صورت گرفت و باکتری‌های مورد نظر به ترتیب ۹۹٪ تشابه ژنتیکی را با باسیلوس سرئوس، پانی باسیلوس لاکتیس، باسیلوس فوسی فورمیس و باسیلوس سوبتیلیس نشان دادند. شکل ۲ محصول PCR را روی ژل آگارز نشان می‌دهد.

کروماتوگرافی گازی: کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌های مورد نظر در نمودار ۴ نشان داده شده است. طیف اول از سمت چپ نشان دهنده‌ی حلال، طیف دوم مربوط به مقدار نفتالین و طیف سوم نشان دهنده‌ی متابولیت‌های حاصل از تجزیه‌ی زیستی مانند او۲- دی هیدروکسی او۲- دی هیدرو نفتالین می‌باشد.

آنالیز داده‌ها: آنالیز آماری داده‌ها در مورد شمارش باکتری‌ها، آزمون کاهش کشش سطحی و بهینه‌سازی  $p < 0/05$  را نشان داد که به معنای مورد قبول بودن داده‌ها از دیدگاه آماری است.

## بحث

در تحقیقات Herrera در سال ۲۰۰۸، Lily در سال ۲۰۰۹، اخوان سپهی در سال ۱۳۹۱ و ۱۳۸۷ نشان داده شده است که باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس توانایی بالایی در تجزیه‌ی نفتالین و ترکیبات نفتی دارند. در این مطالعه نیز این باسیلوس‌ها از خاک جداسازی شدند که توانایی تجزیه‌ی نفتالین را دارا هستند گرچه تاکنون پانی باسیلوس با توانایی تجزیه‌ی نفتالین از خاک جداسازی نشده است (Herrera et al. 2008; Lily et al. 2009; Mohammadi et al. 2012; Akhavan et al. 2008).

در ابتدا بر روی  $80^{\circ}\text{C}$  تنظیم گردید، سپس به مدت ۲ دقیقه در همین دما نگه داشته شد، سپس با سرعت  $10^{\circ}\text{C}$  در دقیقه، دما به  $120^{\circ}\text{C}$  افزایش یافت، سپس دما با سرعت  $4^{\circ}\text{C}$  در دقیقه، به  $300^{\circ}\text{C}$  افزایش یافت و ۱۵ دقیقه در همین دما نگه داشته شد (Shahriari et al. 2013).

آنالیز آماری: در این تحقیق از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری تجزیه‌ی واریانس (ANOVA) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

## نتایج

رنگ آمیزی و آزمون‌های بیوشیمیایی: در محیط آگاردار، برای هر نمونه کلنی‌های مختلفی مشاهده شد. با انجام خالص سازی، ۴ سویه‌ی باسیلوس از ۱۰ نمونه‌ی خاک جداسازی شدند. نمونه‌های مربوط به پارک لاله، پارک چیتگر، جاده آبعلی و بوستان گفتگو حاوی باسیلوس‌های تجزیه‌کننده‌ی نفتالین بودند. تعداد باسیلوس‌ها در هر نمونه حدود  $10^4$  تا  $10^6$  کلنی‌ها دارای حالت رونده، کشسانی، چسبناک و دارای قوام خامه‌ای و بودند. این باکتری‌ها در زیر میکروسکوپ میله‌ای شکل، گرم مثبت و دارای اسپور بودند. (شکل ۱-الف و ب)

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده روی این ۴ سویه در جدول ۲ نشان داده شده است.

تولید بیوسورفاکتانت: تمام سویه‌های خالص شده دارای همولیز بتا بودند. نتایج آزمون کاهش کشش سطحی روی سویه‌های خالص و کنسرسیوم باسیلوس‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

منحنی رشد: نمودار ۱ نشان دهنده‌ی منحنی رشد سویه‌ها می‌باشد.

بهینه‌سازی: همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، نتیجه گرفته شد که در pH برابر با ۶، دور شیکر ۱۵۰rpm، منبع ازت عصاره‌ی مخمر و غلظت نفتالین ۲۰۰ppm کنسرسیوم باسیلوس‌ها رشد بهتری دارد.

معرفی کرد. هم چنین فرناز افشار ابراهیمی بهترین pH را برای رشد باسیلوس ها، ۶ معرفی نمود ( Akhavan sepahi et al. 2009, 2012) که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارند.

با توجه به کروماتوگرام های حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی GC مشاهده می شود که میزان نفتالین پس از گذشت ۸ روز در محیط کشت کاهش یافته و میزان متابولیت های حاصل از آن افزایش یافته است.

در این مطالعه نتیجه گرفته شد که کنسرسیون باسیلوس ها نسبت به سویه های خالص دارای توانایی بیشتری در تولید بیوسورفاکتانت و تجزیه ی نفتالین می باشد. نتیجه ی مشابهی در بسیاری تحقیقات دیگر از جمله Parrasana و Herrera ، Abdel ، Mutalik در سال ۲۰۰۸ نیز حاصل شده است ( Mutalik et al. 2008; Abdel-Mawgoud et al. 2008; Herrera et al. 2008; Prassana et al. 2008).

### نتیجه گیری

احیای زیستی به عنوان یک تکنولوژی مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست در نظر گرفته می شود که عبارتست از تبدیل بخشی یا تمام آلاینده های مضر محیطی به بیومس میکربی، آب و دی اکسید کربن. این تکنیک در مورد آلاینده های سمی و آلودگی نفتی به کار می رود. نفتالین یکی از آلاینده های مهم نفتی است. از مهم ترین باکتری های تجزیه کننده ی نفتالین می توان به *Pseudomonas spp*, *Vibrio spp*, *Mycobacterium spp*, *Marinobacter spp*, *Sphingomonas spp* و *Micrococcus spp* اشاره کرد. (Pawar et al. 2013)

در این پژوهش، ابتدا باسیلوس های تجزیه کننده ی نفتالین از خاک ایزوله و شناسایی گردیدند. سپس تولید بیوسورفاکتانت، منحنی رشد و میزان تحمل نفتالین در جدایه ها و کنسرسیون آنها و نهایتاً شرایط بهینه ی تجزیه ی نفتالین در مورد کنسرسیون باسیلوس ها بررسی شد.

اخوان و همکاران در سال ۱۳۸۷ از آزمون های همولیتیک و کاهش کشش سطحی به منظور سنجش تولید بیوسورفاکتانت توسط باسیلوس ها استفاده کردند. باسیلوس های مورد مطالعه قادر بودند کشش سطحی محیط کشت را از  $60 \text{ mN/m}$  به  $31 \text{ mN/m}$  و  $38 \text{ mN/m}$  کاهش دهند. در مطالعه ی فرناز افشار ابراهیمی در سال ۱۳۸۸ سه سویه ی جدا شده از خاک با این آزمون ها بررسی شدند و سویه های دارای کشش سطحی کم تر از  $40 \text{ mN/m}$  انتخاب شدند. در این مطالعه نیز از این روش ها استفاده شده است ( Akhavan and Mostafai 2008; Akhavan sepahi et al. 2009). همان طور که مشاهده می شود کشش سطحی تمام سویه ها کم تر از  $40 \text{ mN/m}$  است که نشان دهنده ی تولید بیوسورفاکتانت توسط سویه های مورد نظر می باشد. هم چنین کشش سطحی کنسرسیون کم تر از سویه های خالص است.

با توجه به منحنی رشد باکتری ها مشاهده می شود سویه های مورد نظر در ۴ ساعت اول پس از کشت جذب نوری تقریباً ثابتی دارند. سپس میزان رشد به مدت ۸ ساعت به صورت تصاعدی افزایش یافته و سپس دوباره میزان رشد متوقف شده است. الهه ناظر در سال ۱۳۸۸ نتیجه ای مشابه در مورد باسیلوس ها به دست آورده است (Akhavan sepahi et al. 2009).

در تحقیقات صدیق بیان در سال ۱۳۸۹ تحمل باکتری های تجزیه کننده ی نفتالین تا غلظت  $1000 \text{ ppm}$  نفتالین در محیط کشت بررسی شد و نتایج مشابه این مطالعه بود، به این معنی که باکتری ها قادر به تحمل این میزان نفتالین در محیط کشت بودند ( Sadigh bayan et al. 2010).

در این مطالعه کنسرسیون مورد نظر غلظت  $1000 \text{ ppm}$  نفتالین را تحمل نموده و به تدریج با غلظت بالای نفتالین سازگار شده است. رشد باکتری ها در پلیت آگاردار شاهدی بر این مدعاست.

الهه ناظر در سال ۱۳۸۸ دور شیکر  $150 \text{ rpm}$  و میزان تولوئن  $200 \text{ ppm}$  را برای رشد باسیلوس ها مناسب

با توجه به نتایج بدست آمده نشان داده شد که کنسرسیوم ۴ ایزوله‌ی جداشده نسبت به کشت‌های خالص به طور مؤثرتری نفتالین موجود در محیط کشت را تجزیه می‌نماید. بنابراین کنسرسیوم باسیلوس‌ها می‌تواند در تجزیه زیستی نفتالین به صورت کاربردی و نیمه صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. هم چنین به منظور بررسی بیشتر در این مورد می‌توان تجزیه‌ی آلاینده‌های آلی دیگر را توسط این کنسرسیوم مورد مطالعه قرار داد یا کنسرسیومی متشکل از باکتری‌های دیگر را با کنسرسیوم به دست آمده ترکیب کرد.

جدول ۱- برنامه ی استفاده شده در دستگاه PCR. مدت زمان و دمای هر سیکل به ترتیب نشان داده شده است.

| مدت زمان (دقیقه) | دما (°C) |
|------------------|----------|
| ۵                | ۹۴       |
| ۱ (۳۵ سیکل)      | ۹۴       |
| ۱ (۳۵ سیکل)      | ۵۶       |
| ۱ (۳۵ سیکل)      | ۷۲       |
| ۱۰               | ۷۲       |
| ۵                | ۴        |

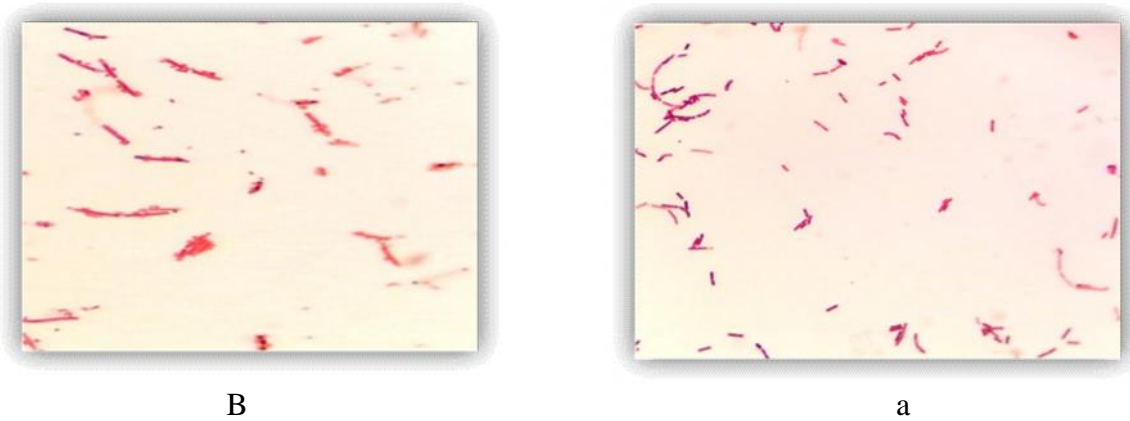
جدول ۲- نتایج آزمون های بیوشیمیایی برای سویه های انتخاب شده. نمونه ی ۲: باسیلوس سرئوس، نمونه ی ۴: پانی باسیلوس

لاکتیس، نمونه ی ۵: باسیلوس فوسیفورمیس، نمونه ی ۶: باسیلوس سوبتیلیس

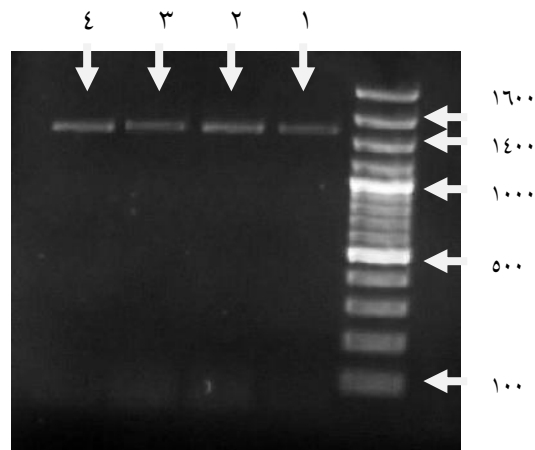
| نمونه ی ۲ | نمونه ی ۴ | نمونه ی ۵ | نمونه ی ۶ |                  |
|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|
| +         | -         | +         | +         | MR               |
| -         | +         | -         | -         | VP               |
| +         | +         | +         | +         | سیترات           |
| +         | +         | -         | +         | ژلاتیناز         |
| +         | +         | +         | +         | کاتالاز ۳٪       |
| +         | +         | +         | +         | کاتالاز ۱۰٪      |
| +         | +         | +         | +         | گلوکز هوازی      |
| +         | +         | +         | +         | گلوکز بی هوازی   |
| +         | -         | +         | +         | مانیتول هوازی    |
| +         | -         | +         | +         | مانیتول بیهوازی  |
| +         | -         | +         | +         | گزیلوز هوازی     |
| +         | -         | +         | +         | گزیلوز بیهوازی   |
| +         | -         | +         | +         | آرابینوز هوازی   |
| +         | -         | +         | +         | آرابینوز بیهوازی |
| ++        | -+-       | +++       | +++       | SIM              |
| Alk/A,G   | A/A       | Alk/A,G   | Alk/A,G   | TSI              |
| +         | +         | -         | +         | آمیلاز           |
| +         | -         | +         | -         | لستیناز          |
| -         | -         | -         | +         | کازئیناز         |

## جدول ۳- نتایج آزمون کاهش کشش سطحی

| کشش سطحی | نمونه    |
|----------|----------|
| ۳۸       | ۲        |
| ۳۳       | ۴        |
| ۳۵       | ۵        |
| ۳۷       | ۶        |
| ۲۹       | کنترسیوم |

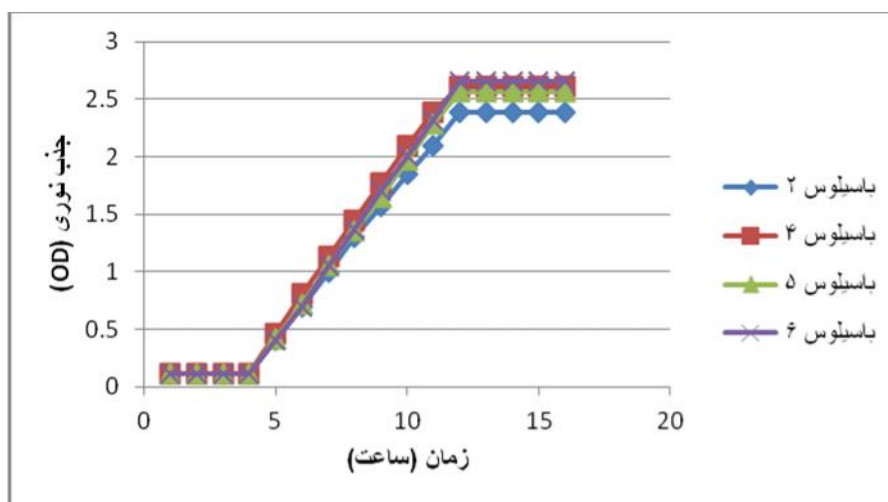


شکل ۱- a- رنگ آمیزی گرم و b- رنگ آمیزی اسپور سویه های جداشده

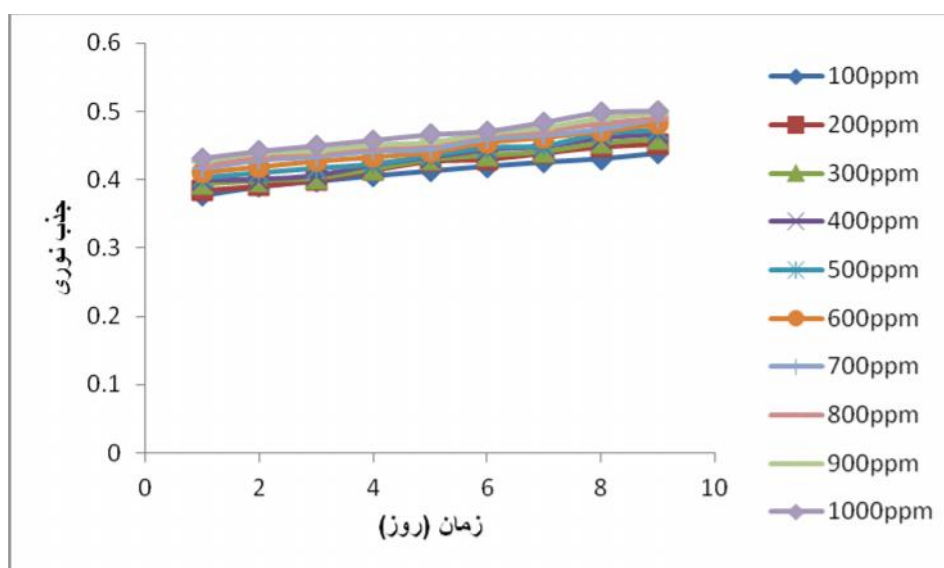


شکل ۲- محصول PCR روی ژل آگارز. اندازه های قطعه های مورد نظر ۱۵۰۰bp می باشد. مارکر مورد استفاده ۱۰۰bp بوده و نمونه ی ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب مربوط به باسیلوس سرئوس، پانی باسیلوس لاکتیس، باسیلوس فوسیفورمیس و باسیلوس سوبتیلیس است

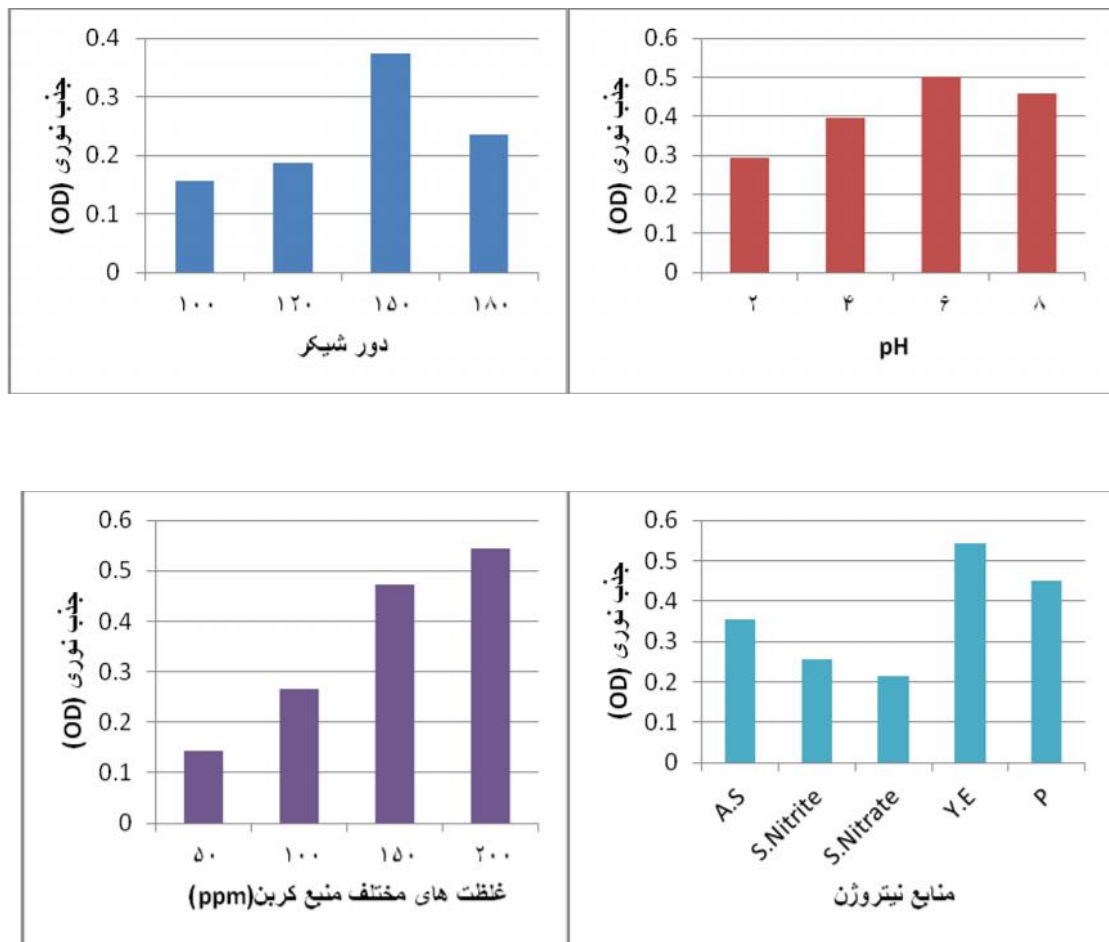




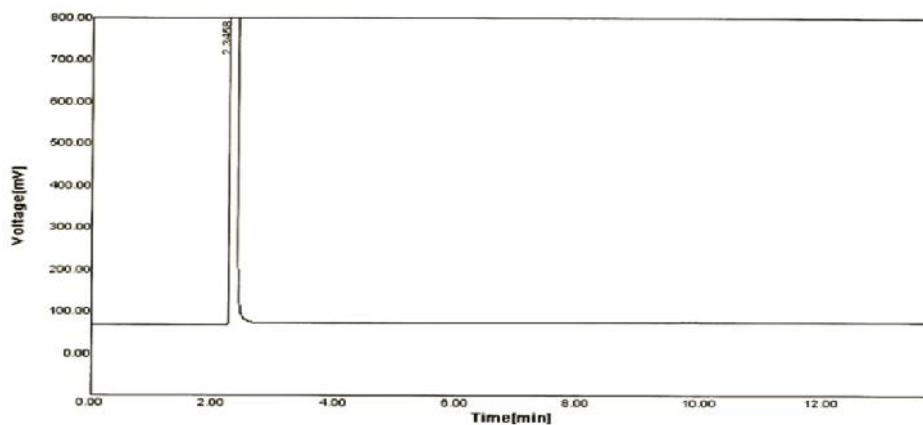
نمودار ۱- منحنی رشد سویه های باسیلوس جداشده



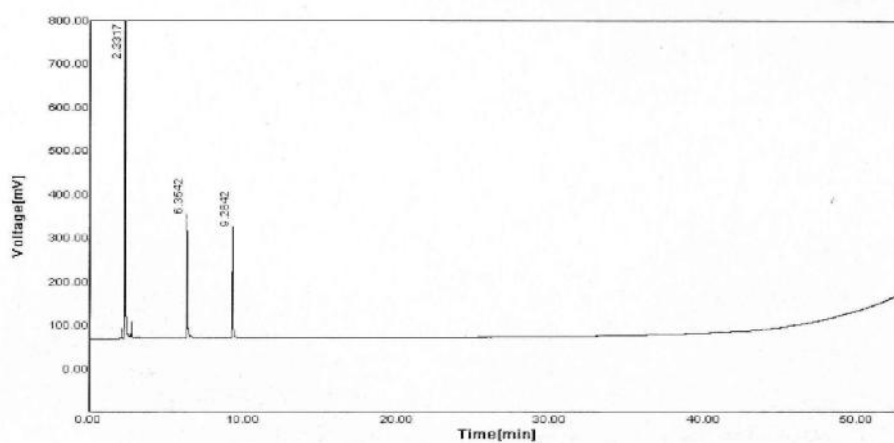
نمودار ۲- جذب نوری محیط کشت در غلظت های متفاوت نفتالین برای کنسرسیون باسیلوس ها



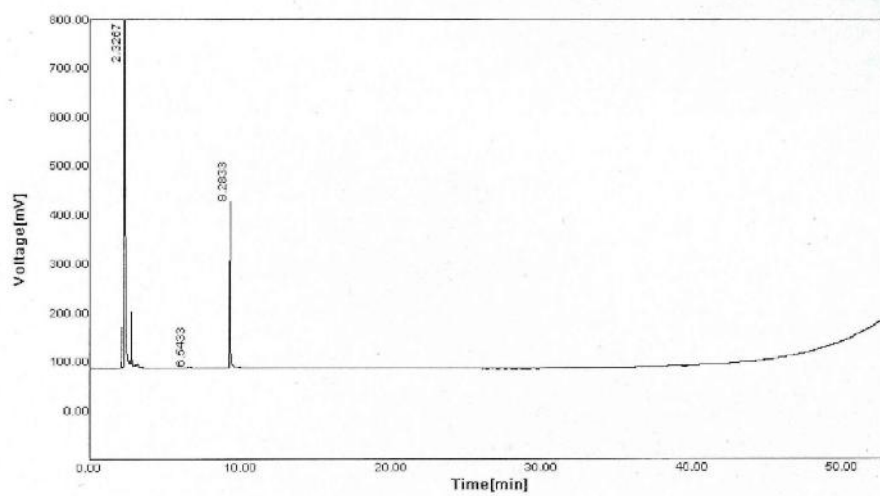
نمودار ۳-**a** - مقایسه ی میانگین میزان رشد کنسرسیوم باسیلوس ها در pH های مختلف. **b** - مقایسه ی میانگین رشد کنسرسیوم باسیلوس ها در دوره های مختلف شیکر. **c** - مقایسه ی میانگین میزان رشد کنسرسیوم باسیلوس ها در حضور منابع مختلف ازت. **A.S**: آمونیوم سولفات، **S.Nitrite**: سدیم نیتريت، **S.Nitrate**: سدیم نترات، **Y.E**: عصاره ی مخمر، **P**: پپتون. **d** - مقایسه ی میانگین رشد کنسرسیوم باسیلوس ها در غلظت های مختلف نفتالین



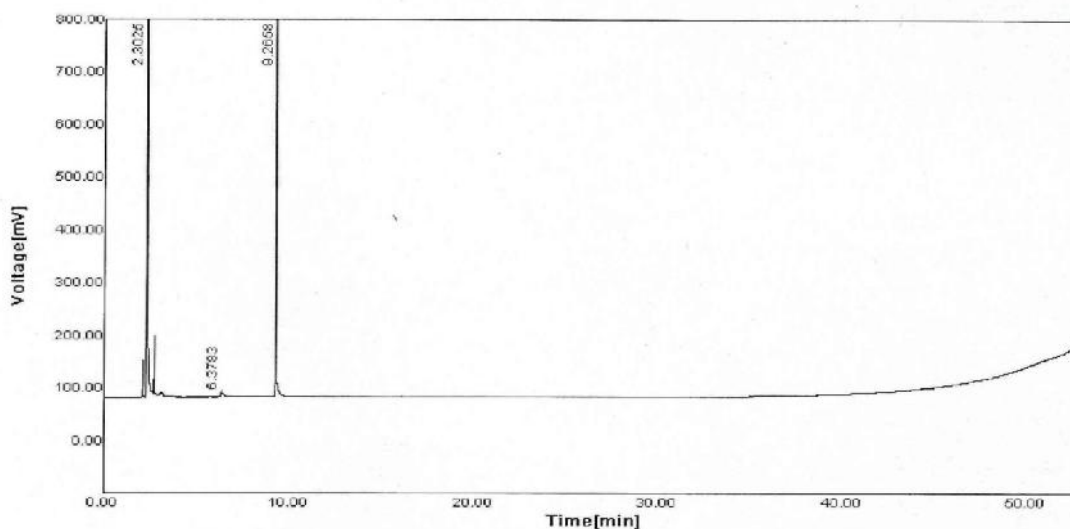
a



b



c



d

نمودار ۴-**a** - کروماتوگرام حلال. **b** - کروماتوگرام روز صفر. **c** - کروماتوگرام روز چهارم. **d** - کروماتوگرام روز هشتم

## References

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M.M., Haleem, Abdel. and Hassouna, N., 2008. Optimization of surfactin production by *B.subtilis* Isolate BS5. *Appl Biotechnol*, **150**, pp.305-325.
- Akhavan Sepahi, A. and Mostafai, R., 2009. Evaluation of Bacillus role in production of biosurfactant in case study and feasibility of using a microbial method recovery in sazavdasmari in bibihakimie square. *Journal of biology*, **19**, pp. 107-124 [In Persian].
- Akhavan Sepahi, A., Afshar Ebrahimi, F. and Minai Tehrani, D., 2009. Investigation of degradation of toluene by bacillus consortium isolated from toluene contaminated soil. *Journal of microbiology knowledge*, **1**(4), pp.7-19 [In Persian].
- Akhavan Sepahi, A., Dejban Golpasha, I., and Emami, M., 2008. Isolation and characterization of crude oil degrading Bacillus ssp. *Iranian journal of Environmental Health science and Engineering*, **5**(3), pp. 149-154 [In Persian].
- Akhavan Sepahi, A., Nazer, E., Yakhchali, B. and Nazer, M.R., 2012. Isolation of Toluene biodegrade bacteria from Isfahan petrochemical soil. *Journal of environmental science and technology*, **13**(4), pp. 61-66 [In Persian].
- Assareh, R., Shahbani Zahiri, H., Akbari Noghabi, K., Aminzadeh, S. and Bakhshi Khaniki, G., 2012. Characterization of the newly isolated *Geobacillus sp.* T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technology*, **120**, pp. 99-105.
- Bisht, S., Pandey, P., Sood, A., Sharma, S. and Bisht, N.S., 2010. Biodegradation of naphthalene and anthracene by chemotactically active rhizobacteria of *Populus deltoides*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **41**, pp.922-930.

- Ganesh, A. and Lin, J., 2009. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. *African Journal of Biotechnology*, **8**(21), pp.5847-5854.
- Gomare, K.S. and Lahane, M.N., 2011. Degradation of Polyaromatic Hydrocarbons by Isolated Cultures from Contaminated Soils at Petrol Pump Stations. *International Journal of Recent Trends in Science and Technology*, **1**(1), pp. 9-13.
- Herrera, Y., Okoh, A.I. and Alvarez, L.R., 2008. Biodegradation of 2, 4-dichlorophenol by a *Bacillus* consortium. *World J Microbial Biotechnol*, **24**, pp. 55-60.
- Lily, M.K., Bahuguna, A., Dangwal, K. and Garg, V., 2009. Degradation of Benzo [a] Pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC9447). *Environmental Microbiology*, **40**(4), pp. 884-892.
- Mohammadi, F., Akhavan Sepahi, A., Mohammadi, F. and Amini, M., 2012. Bioremediation of water contaminated with crude oil per isolation *Bacillus* from oily pound. *The journal of tolooe-behdasht*, **11**(2), pp. 107-118.
- Musat, F., Galushko, A., Jacob, J., Widdle, F., Kube, M. and Reinhardt, R., 2009. Anaerobic degradation of Naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine Sulfate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology*, **11**(1), pp. 209-219.
- Mutalik, S.R., Vaidya, B.K., Joshi, R.M., Desai, K.M. and Mene, S.N., 2008. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. *Bioresource Technology*, **99**, pp. 7875-7880.
- Pawar, AN., Ugale SS., More MG., Kokani MF. and Khandelwal SR., 2013. Biological Degradation of Naphthalene: A New Era. *Bioremediation and Biodegradation*, **4**(7), pp. 1-5.
- Prassana, N., Saravanan, N., Geetha, P., Shanmugaprakash, M. and 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.
- Sadigh bayan, Kh., Dehnad, A., Monadi, A., Mobaiyen, H. and Sadugh bayan, D., 2013. An evaluation about the role of Microorganisms isolated from the soil in the biological removal of toxic petroleum pollutants. *Journal of environmentalstudies*, **3**(39), pp. 18-20 [In Persian].
- Sadigh bayan, Kh., Dehnad, A., Mobaiyen, H., Modirshahla, N. and Naseri, A., 2010. Investigation of capability of biological dissociation of naphthalene using soil bacteria in Tabriz refinery. *Journal of microbial biotechnology*, **2**(4), pp. 13-20 [In Persian].
- Shahriari Moghadam, M., Ebrahimipour, G. H., Abtahi, B., Ghassempour, A. and Seyed Hashtroudi, M., 2013. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Journal of Environmental Health Scinece & Engineering*, **12**(114), pp. 1-9.
- Sheyni, Y., Motamedi, H. and Pourbabaee, A.A., 2014. Isolation and identification of oil sludge degrading bacteria from production tank Number 9 Masjed Soleiman. *Biological Journal of Microorganism*, **3**(10), pp. 13-26 [In Persian].

## The evaluation of naphthalene bioremediation in crude oil contaminated soils by *Bacillus* consortium

**Mousavi, M.**, MSc. Student, Department of Microbiology, Tehran Science and Research branch, Islamic Azad University, Faculty of Basic Science, Tehran, Iran

**Akhavan Sepahy, A.**, Ph.D. Associate Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Faculty of Basic Science, Tehran, Iran- Corresponding Author: akhavansepahy@gmail.com

**Nejadsattari, T.**, Ph.D. Associate Professor, Department of Biology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Faculty of Basic Science, Tehran, Iran

Received: Sep 12, 2015

Accepted: Dec 18, 2015

### Abstract

**Background and Aim:** The petroleum contamination is one of the inevitable consequences of population increase and energy consumption. In this study, the method of Bioremediation and *Bacillus* bacteria have been used in order to remove the petroleum contamination.

**Material and Methods:** The samples of soil were collected and the bacteria were isolated and identified. Then, the production of Biosurfactant, the rate of naphthalene degradation and appropriate growth conditions of them were examined.

**Results:** The *Bacillus* sp. included *Bacillus cereus*, *Paenibacillus lactis*, *Bacillus fusiformis* and *Bacillus subtilis*. The pure cultures and consortium have surface tension values less than 40 mN/m. Therefore, they were considered biosurfactant producers. The consortium had the tolerance ability of naphthalene up to 1000ppm. The appropriate conditions for the growth of *Bacillus* consortium was pH equal to 6, shaker rate 150 rpm, nitrogen source of Yeast extract and the concentration of naphthalene equal to 200ppm.

**Conclusion:** *Bacillus* consortium had more ability compared to single strains for reducing the surface tension, production of Biosurfactant, growth in culture media containing naphthalene and its degradation. It has indicated in several of the similar researches that *Bacillus* consortium or other bacteria have more ability in Biodegradation of organic contaminants.

**Keywords:** *Bacillus*, Naphthalene, Consortium, Bioremediation