مجله دانشکده بهداشت وانستیتوتحقیقات بهداشتی
زمستان ۱۳۹٤، دوره ۱۳، شماره چهارم، صفحه۷۸- ٦٥

تجزیه ی زیستی نفتالین در خاک های آلوده به نفت خام توسط کنسرسیوم باسیلوس‌ها

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 دریافت: ۱۳۹٤/٦/۲۱ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۹/۲۷**

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 cereus*، *Paenibacillus lactis*، *Bacillus fusiformis* و *Bacillus subtilis* بودند. سویه های خالص و کنسرسیوم باسیلوس ها کشش سطحی کم تر از ٤٠ mN/m داشتند، بنابراین تولیدکننده ی بیوسورفاکتانت درنظر گرفته شدند. کنسرسیوم توان تحمل نفتالین را تا غلظت ۱۰۰۰ ppm در محیط کشت داشت. شرایط مناسب برای رشد کنسرسیوم باسیلوس ها، pH برابر ٦، دور شیکر ۱۵۰ rpm، منبع ازت عصاره ی مخمر و غلظت نفتالین برابر ۲۰۰ 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

با توجه به استفاده ی روزافزون از نفت خام و مشتقات آن، آلودگی‌های 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 ازافزایش 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 کننده‌ی خاک به حساب می آیند (Ganesh and Lin 2009). بنابراین با توجه به حیاتی بودن خاک برای زندگی انسان و سایر موجودات، این آلودگی‌ها باید از محیط زیست حذف گردند (Bisht et al. 2010).

روش‌های مختلفی برای پاکسازی و حذف آلاینده‌ها 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 می‌رسد که از میان این روش‌ها، روش زیست پالایی روشی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست می باشد. در واقع زیست پالایی عبارت است از به کارگیری توانایی متابولیسمی میکروارگانیسم ها درجهت 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 هیدروکربن‌ها 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 فرّار سفید رنگ مشاهده می شود. نفتالین یکی از ١٦ آلاینده ی آروماتیک اولویت دار است که از سوی آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده طبقه بندی شده و دارای خواص جهش زایی و سرطان زایی است (Musat et al. 2009). نفتالین می-تواند به صورت کوالان به مولکول‌های موجود در بافت ریه، کبد و کلیه‌ها 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 کنسرسیوم آنها در تجزیه ی نفتالین و بهینه سازی شرایط رشد در محیط کشت دارای نفتالین است. در واقع سعی شده است با مقایسه ی کارآیی کنسرسیوم و سویه های خالص در تجزیه ی نفتالین بهترین سویه برای این منظور انتخاب شود.

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 ١٠ نمونه ی خاک از تهران و اطراف تهران جمع آوری شدند. این نمونه‌ها شامل ۵ نمونه-ی خاک آلوده به نفت خام و گازوئیل که از پمپ بنزین های ترمینال آزادی، خیابان کارگر، جاده‌ی 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 نمونه‌ها به سرعت به آزمایشگاه منتقل شده و برای مطالعات بعدی در دمای ٤^{o}C نگهداری شدند (Akhavan sepahi and Mostafai 2009).

غنی سازی و خالص سازی: حجم هر نمونه ی خاک ۲۵۰ـ۳۰۰ گرم بود.یک گرم خاک مورد نظر وزن شده و در داخل لوله‌ی آزمایش حاوی ml ۹ آب مقطر استریل ریخته و در بن ماری با دمای ٨٠ ^{o}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 ml ۵۰ محیط کشت اختصاصیMSM مایع حاوی ppm ۵۰ نفتالین کشت داده شدند. برای تهیه ی محیط کشت MSM، ٠/٨ گرم K_2HPO_4 ، ٠/٢ گرم KH_2PO_4 ، ٠/٠۵ گرم $CaSO_4.2H_2O$ ، ٠/۵ گرم $MgSO_4.H_2O$ و ٠/٠٩ گرم$FeSO_4.7H_2O$ و ١ گرم $(NH_4)_2SO_4$ در ١ لیتر آب مقطر استریل حل شده و پس از رساندن pH به۷، محیط کشت اتوکلاو گردید (Sheyni et al. 2014).

ارلن ها به مدت یک هفته در دمـای اتـاق (٢۵ ^{o}C) و روی شیکر با سرعت ١۵٠ rpm قرارداده شدند. این کار به مدت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

۲ هفته انجـام شـد. در هفتـه‌ی دوم ۱۰ درصـد از محـیط 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 آگاردار منتقل شدند. این کار با استفاده از روش تهیه ی رقّت (کخ) انجام شد و کلنی های جداشده 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 مرحله‌ی 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، لسیتین و ژلاتین انجام شد.

شناسایی مولکولی باسیلوس ها با کمک تکنیک توالی یابی ژن SrRNA ۱۶ انجام گرفت. پرایمر استفاده شده از نوع پرایمر عمومی به شرح زیر بود:

۲۷ :F-۵'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-'۳

۱۴۹۵ :R-۵'-CTACGGCTACCTTGTT-'۳

مخلوط واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) به صورت ۱۲/۵ µl، پرایمر پیش رو(Forward) و پس رو (Reverse)، هرکدام ۰/۵ µl DNA به میزان ۱ µl و آب دوبار تقطیر ۱۰/۵ µl بود. برنامه‌ی 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 سویه‌های انتخاب شده، ابتدا سویه‌ها در محیط بلادآگار کشت داده شدند و سویه‌های 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 ۴۰ 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 کنسرسیوم باسیلوس‌ها با افزایش غلظت نفتالین در محیط کشت تا ۱۰۰۰ 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 کنسرسیوم باسیلوس‌ها از روش تاگوچی استفاده شد. در این آزمون، ۴ فاکتور pH (۶،۴،۲و۸) ، دور شیکر (۱۵۰،۱۲۰،۱۰۰و۱۸۰)، منبع ازت (آمونیوم سولفات، سدیم نیترات، عصاره ی مخمر و پپتون) و منبع کربن (۱۵۰،۵۰،۱۰۰ppmو ۲۰۰) بررسی شدند. سپس کشش سطحی کنسرسیوم 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 ۰/۲۵ µm و ضخامت لایه ی داخلی ۰/۲۵ بود. آشکارساز FID و گاز حامل هلیوم بود. دمای محفظه ی تزریق ۲۸۰ ^{o}C و دمای آشکارساز ۳۰۰ ^{o}C بود. دمای آون

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

در ابتدا بر روی ^{o}C ۸۰ تنظیم گردید، سپس به مدت ۲ دقیقه در همین دما نگه داشته شد، سپس با سرعت ^{o}C ۱۰ در دقیقه، دما به ^{o}C ۱۲۰ افزایش یافت، سپس دما با سرعت ^{o}C ٤ در دقیقه، به ^{o}C ۳۰۰ افزایش یافت و ۱۵ دقیقه در همین دما نگه داشته شد (Shahriari moghadam et al. 2013).

آنالیز آماری: در این تحقیق از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری تجزیه ی واریانس(ANOVA) برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد.

نتایج

رنگ آمیزی و آزمون‌های بیوشیمیایی: در محیط آگاردار، برای هر نمونه کلنی های مختلفی مشاهده شد. با انجام خالص سازی، ٤ سویه ی باسیلوس از ۱۰ نمونه ی خاک جداسازی شدند. نمونه های مربوط به پارک لاله، پارک چیتگر، جاده آبعلی و بوستان گفتگو حاوی باسیلوس های تجزیه کننده ی نفتالین بودند.تعداد باسیلوس ها در هر نمونه حدود $۴۰*۱۰^{-٤}$ بود. کلنی ها دارای حالت رونده، کشسانی، چسبناک و دارای قوام خامه ای و بودند. این باکتری ها در زیر میکروسکوپ میله ای شکل، گرم مثبت و دارای اسپور بودند. (شکل۱-الف و ب)

نتایج آزمون های بیوشیمیایی انجام شده روی این ٤ سویه در جدول ۲ نشان داده شده است.

تولید بیوسورفاکتانت: تمام سویه های خالص شده دارای همولیز بتا بودند. نتایج آزمون کاهش کشش سطحی روی سویه های خالص و کنسرسیوم باسیلوس ها در جدول۳ نشان داده شده است.

منحنی رشد: نمودار ۱ نشان دهنده ی منحنی رشد سویه ها می باشد.

بهینه سازی: همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می شود، نتیجه گرفته شد که در pH برابر با ٦، دور شیکر ۱۵۰rpm، منبع ازت عصاره ی مخمر و غلظت نفتالین ۲۰۰ppm کنسرسیوم باسیلوس ها رشد بهتری دارد. مقدار کشش سطحی کاهش یافته از mN/m ۲۹ به mN/m ۲٦ 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 ۱٦SrRNA صورت گرفت و باکتری های 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 می دهد.

کروماتوگرافی گازی: کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌های موردنظر در نمودار ٤ نشان داده شده است. طیف اول از سمت چپ نشان دهنده‌ی حلال، طیف دوم مربوط به مقدار نفتالین و طیف سوم نشان دهنده ی متابولیت های حاصل از تجزیه ی زیستی مانند ۱و۲- دی هیدروکسی ۱و۲- دی هیدرو نفتالین می باشد.

آنالیز داده ها: آنالیز آماری داده ها در مورد شمارش باکتری‌ها، آزمون کاهش کشش سطحی و بهینه سازی $p<۰/۰۵$ را نشان داد که به معنای مورد قبول بودن داده ها از دیدگاه آماری است.

بحث

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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

اخوان و همکاران در سال ۱۳۸۷ از آزمون‌های همولیتیک و کاهش کشش سطحی به منظور سنجش تولید بیوسورفاکتانت توسط باسیلوس‌ها استفاده کردند. باسیلوس‌های مورد مطالعه قادر بودند کشش سطحی محیط کشت را از ۶۰ mN/m به ۳۱ mN/m و ۳۸ کاهش دهند. در مطالعه‌ی فرناز افشار ابراهیمی در سال ۱۳۸۸ سه سویه‌ی جدا شده از خاک با این آزمون‌ها بررسی شدند و سویه های دارای کشش سطحی کم تر از ۴۰ mN/m انتخاب شدند. در این مطالعه نیز از این روش‌ها 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 ۴۰ mN/m است که نشان دهنده‌ی تولید بیوسورفاکتانت توسط سویه‌های مورد نظر می‌باشد. هم چنین کشش سطحی کنسرسیوم کم تر از سویه‌های خالص است.

با توجه به منحنی رشد باکتری ها مشاهده می‌شود سویه‌های مورد نظر در ٤ ساعت اول پس از کشت جذب نوری تقریبا 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 ppm ۱۰۰۰ نفتالین در محیط کشت بررسی شد و نتایج مشابه این مطالعه بود، به این معنی که باکتری‌ها قادر به تحمل این میزان نفتالین در محیط کشت بودند (Sadigh bayan et al. 2010).

در این مطالعه کنسرسیوم مورد نظر غلظت ppm ۱۰۰۰ نفتالین را تحمل نموده و به تدریج با غلظت بالای نفتالین سازگار شده است. رشد باکتری‌ها در پلیت آگاردار شاهدی براین مدعاست.

الهه ناظر در سال ۱۳۸۸ دور شیکر rpm ۱۵۰ و میزان تولوئن ppm ۲۰۰ را برای رشد باسیلوس‌ها مناسب معرفی کرد. هم چنین فرناز افشار ابراهیمی بهترین pH را برای رشد باسیلوس ها، ٦ 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 کنسرسیوم 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 ازجمله تحقیقات Mutalik ، Abdel ، Herrera و Parrasana 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 کنسرسیوم آنها و نهایتا شرایط بهینه ی تجزیه ی نفتالین در مورد کنسرسیوم باسیلوس ها بررسی شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

با توجه به نتایج بدست آمده نشان داده شد که کنسرسیوم ٤ ایزوله‌ی جداشده نسبت به کشت‌های خالص به طور مؤثرتری نفتالین موجود در محیط کشت را تجزیه می-نماید. بنابراین کنسرسیوم باسیلوس‌ها می تواند 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.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

جدول۱- برنامه ی استفاده شده در دستگاه PCR.مدت زمان و دمای هر سیکل به ترتیب نشان داده شده است.

مدت زمان(دقیقه)	دما(^{o}C)
۵	۹٤
۱ (۳۵ سیکل)	۹٤
۱ (۳۵ سیکل)	٥٦
۱ (۳۵ سیکل)	۷۲
۱۰	۷۲
٤	۵

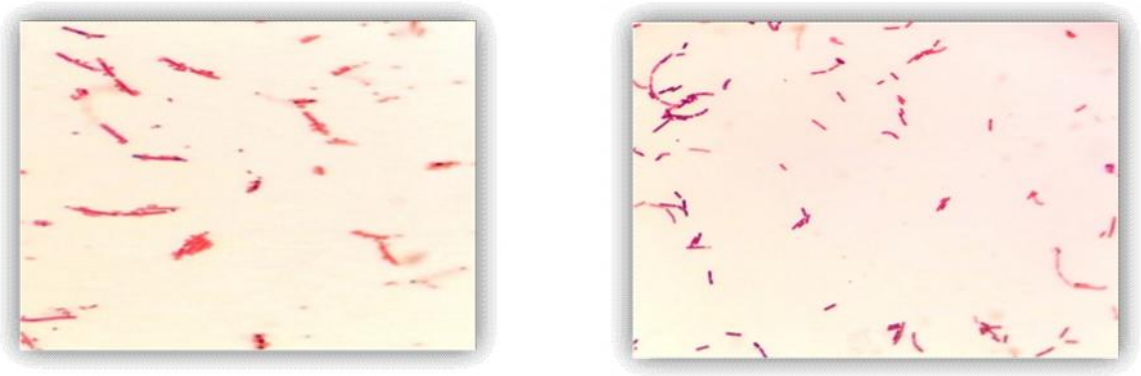
جدول ۲- نتایج آزمون های بیوشیمیایی برای سویه های انتخاب شده.نمونه ی ۲:باسیلوس سرئوس، نمونه ی ٤:پانی باسیلوس لاکتیس، نمونه ی ۵: باسیلوس فوسیفورمیس، نمونه ی ٦: باسیلوس سوبتیلیس

	نمونه ی ۲	نمونه ی ٤	نمونه ی ۵	نمونه ی ٦
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	–++	– + –	–++	–++
TSI	Alk/A,G	A/A	Alk/A,G	Alk/A,G
آمیلاز	+	+	–	+
لستیناز	–	–	+	+
کازئیناز	+	–	–	–

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

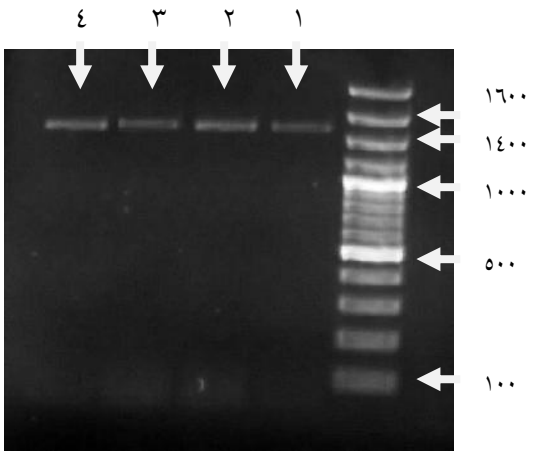
جدول۳-نتایج آزمون کاهش کشش سطحی

نمونه	کشش سطحی
۲	۳۸
٤	۳۳
٥	۳٥
٦	۳۷
کنسرسیوم	۲۹



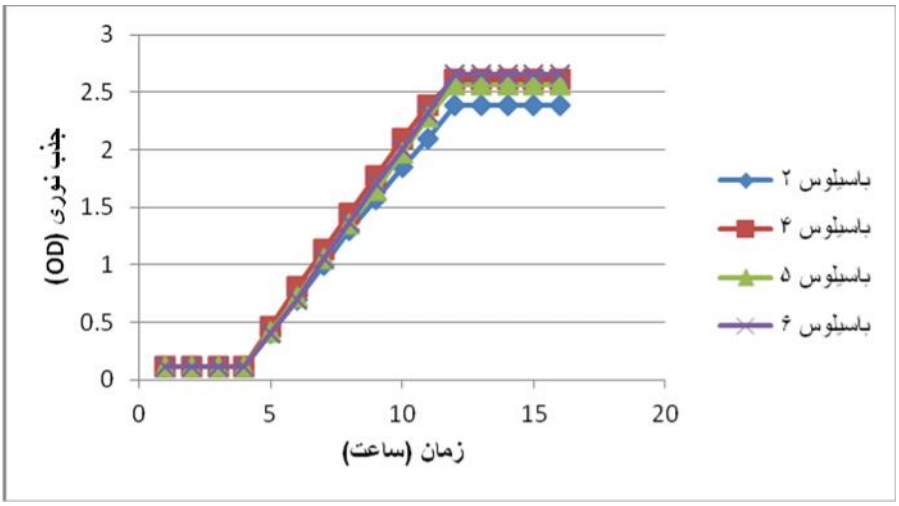
a B

شکل۱-a- رنگ آمیزی گرم و b- رنگ آمیزی اسپور سویه های جداشده

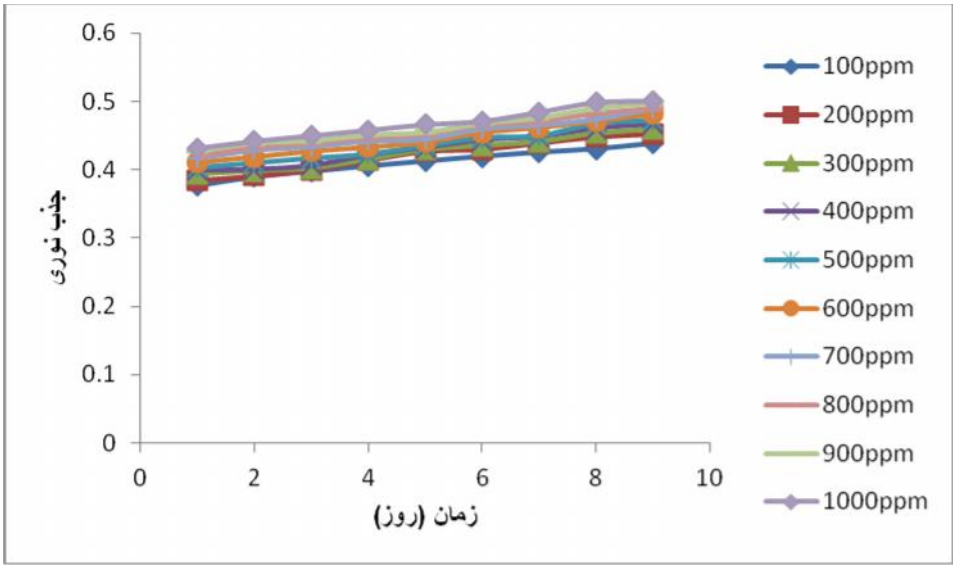


شکل ۲- محصول PCR روی ژل آگارز. اندازه های قطعه های مورد نظر ۱٥۰۰bp می باشد. مارکر مورد استفاده ۱۰۰bp بوده و نمونه ی ۳،۲،۱و٤ به ترتیب مربوط به باسیلوس سرئوس،پانی باسیلوس لاکتیس، باسیلوس فوسیفورمیس و باسیلوس سوبتیلیس است

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

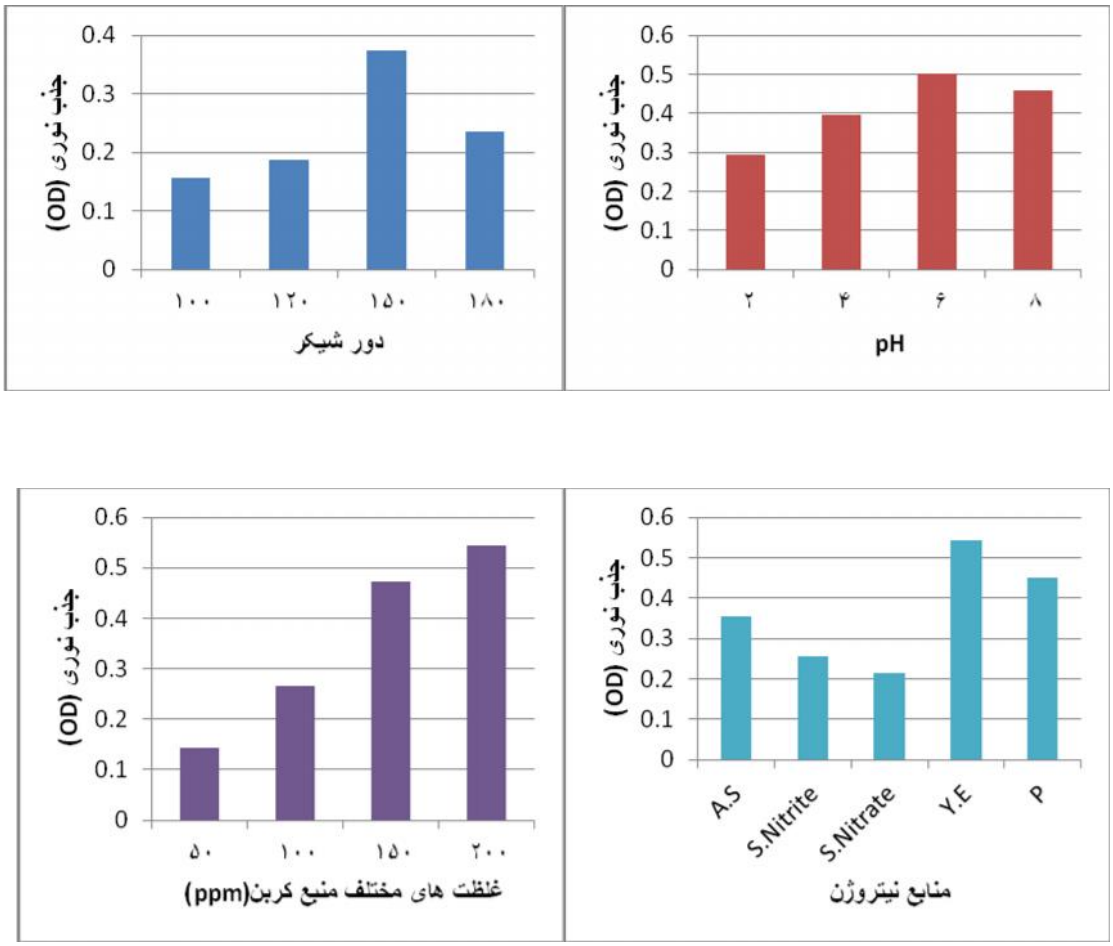


نمودار ۱- منحنی رشد سویه های باسیلوس جداشده



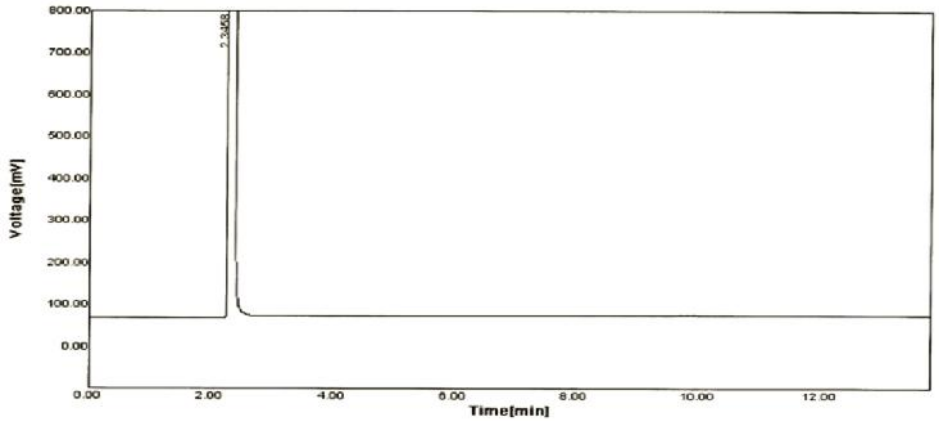
نمودار ۲- جذب نوری محیط کشت در غلظت های متفاوت نفتالین برای کنسرسیوم باسیلوس ها

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

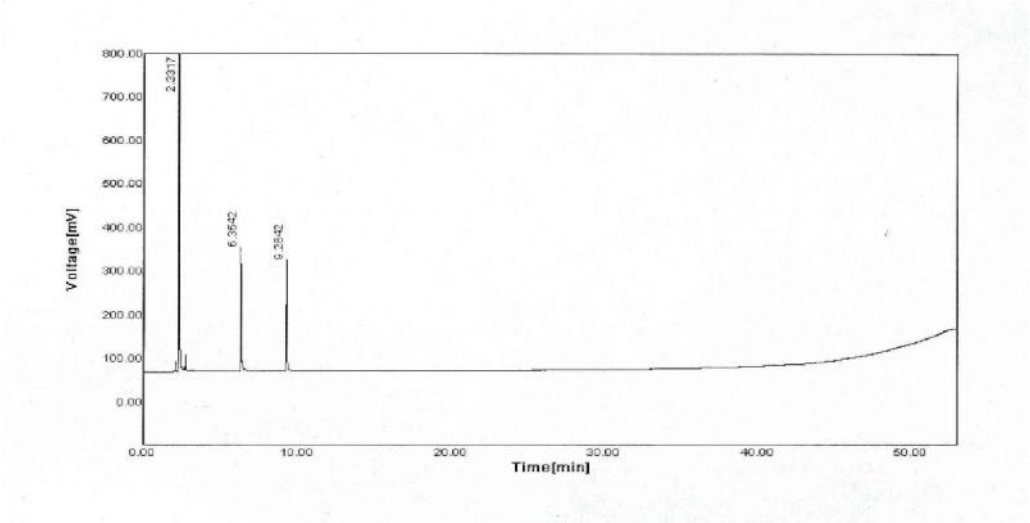


نمودار ۳-a- مقایسه ی میانگین میزان رشد کنسرسیوم باسیلوس ها در pH های مختلف. b- مقایسه ی میانگین رشد کنسرسیوم باسیلوس ها در دورهای مختلف شیکر. c- مقایسه ی میانگین میزان رشد کنسرسیوم باسیلوس ها در حضور منابع مختلف ازت. A.S: آمونیوم سولفات، S.Nitrite: سدیم نیتریت، S.Nitrate: سدیم نیترات، Y.E: عصاره ی مخمر،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

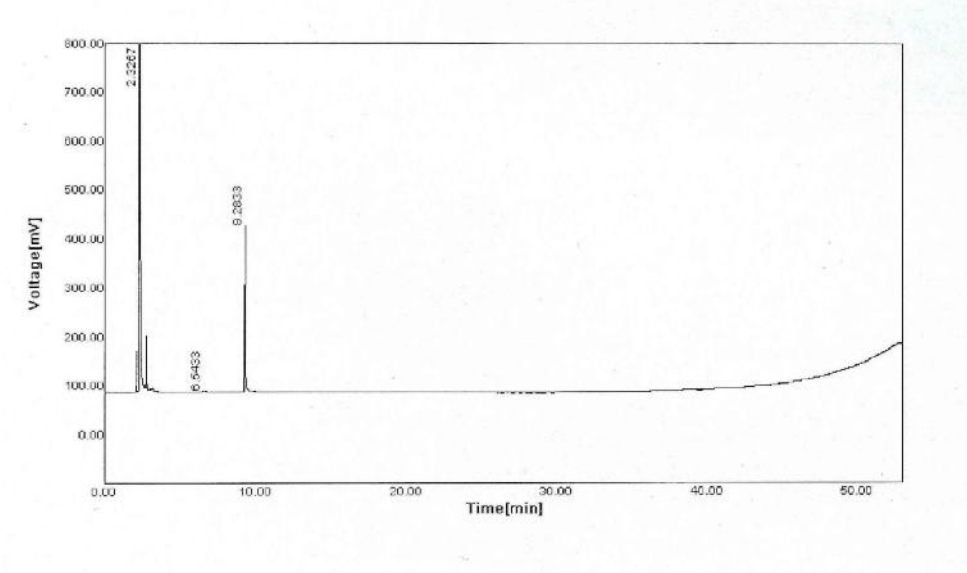
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]



a

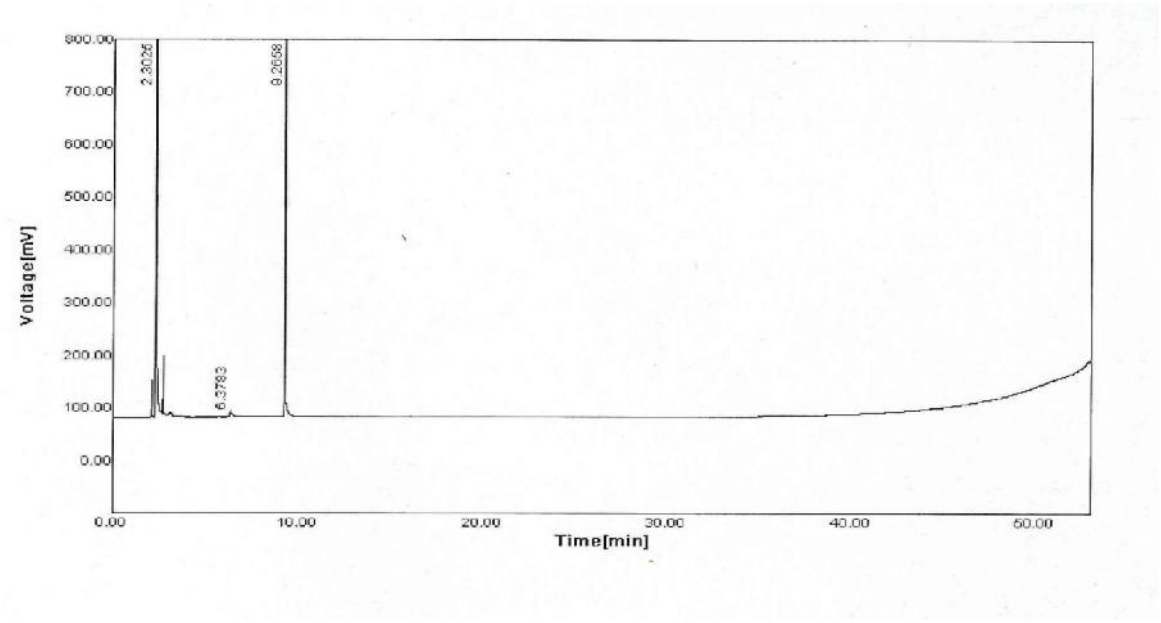


b



c

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]



d

نمودار ٤–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 Enviromental 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 chemo-tactically active rhizobacteria of *Populus deltoides*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **41**, pp.922-930.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

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 toloo-e-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., Psedomonas 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].

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]

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 Bcience, 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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-11]