تاثیر pH و زمان بر مقدار بیوسورفاکتانت تولیدی دو باکتری *باسیلوس‌سابتیلیس* و *سودوموناس‌پوتیدا*

امین بهاری، اکرم حلاج نیا* و امیر لکزیان[۱]
۱- به‌ترتیب دانشجویی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد گروه علوم خاک دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

پیامدهای انباشت فلزات سنگین وآلاینده‌های آلی در خاک خطرناک و نگران کننده است. یکی از روش های حذف آلاینده‌های فلزی استفاده از کی‌لیت‌ها می باشد. درمیان کی‌لیت کننده‌ها بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل داشتن سازگاری با محیط زیست و زیست تخریب پذیری و سمیت کم از اهمیت بالای برخوردارند. در تحقیق حاظر به منظور بررسی تاثیر pH و مدت زمان رشد بر مقدار بیوسورفاکتانت تولیدی دو باکتری *باسیلوس‌سابتیلیس* و *سودوموناس پوتیدا* مقدار و کیفیت بیوسورفاکتانت تولید شده از این دو باکتری در سه pH ۶، ۷ و ۸ و در زمانهای ۴تا ۱۲ روز در شرایط آزمایشگاهی تعیین گردید. نتایج نشان داد که در مورد هر دو باکتری در pH برابر ۷ بیشترین مقدار بیوسورفاکتانت تولید شد. هرچند که تاثیر pH بر باکتری سودوموناس بیشتر بود. در این pH با افزایش زمان تولید بیوسورفاکتانت تا ۶ روز افزایش یافت و با توجه به محدودیت محیط رشد به مقدار ثابتی رسید.

کلمات کلیدی: بیوسورفاکتانت، زیست پالایی، فلزات سنگین

مقدمه

در چند دهه اخیر آلودگی محیط زیست به آلاینده های آلی و معدنی مثل فلزات سنگین به یک نگرانی عمومی تبدیل شده است (Liao et al., 2008; Wuana and Okieimen, 2011). از این رو پژوهش در خصوص بازسازی و پاک سازی فلزات سنگین از محیط مورد توجه قرار گرفته و روبه افزایش است (Gusiatin and Klimiuk, 2012). تکنیک های مرسوم کنونی برای رفع آلودگی شامل شستشو با آب، اسیدهای آلی و غیر آلی، سورفاکتانت‌های شیمیایی و کی‌لیت کننده‌ها مثل EDTA می‌باشد (Chakraborty and Das, 2014). با این حال روشهای حاضر برای حذف آلاینده‌ها اطمینان بخش نبوده و روش‌های مانند عملیات حرارتی، تثبیت کردن، حفاری و دفن به دلیل کمبود فضا کمتر مورد استفاده قرار می گیرند (Wang and Mulligan, 2009).

برای حذف مناسب فلزات از یک محیط آلوده در استفاده از کمپلکس کننده‌ها نیاز به یک عامل با پتانسیل کمپلکس کنندگی بالا، دارای حلالیت و پایداری زیاد در محیط زیست و مقاوم به تغییرات pH می باشد (Juwarkar et al., 2007). سورفاکتانت به عنوان یکی از متابولیت های فعال میکروبی جز عوامل کمپلکس کننده فلزی می باشند که در پالایش محیط از فلزات سنگین موثر گزارش شده اند (Chakraborty and Das, 2014; Juwarkar et al., 2007). متحرک سازی فلزات سنگین با بیوسورفاکتانت باعث فراهمی آلاینده برای گیاه در روش گیاه‌پالایی می شود. همچنین با توجه به سطح ایستابی و آب‌های زیر زمینی می توان آلاینده را با لایه های پایین‌تر برد تا از دسترس گیاه زراعی کشت شده خارج شود. دلایل متعددی از قبیل سمیت کمتر (Gao et al., 2012)، سازگاری بهتر با محیط زیست و زیست تخریب پذیری (Chrzanowski et al., 2012; Maslin and Maier, 2000)، پایداری در pHهای مختلف، غلظت نمک و دمای بالا استفاده از بیوسورفاکتانت‌ها به منظور اصلاح خاک در پژوهشهای مختلف مد نظر قرار گرفته است (Sandrin and Maier, 2003). در سال های اخیر مطالعاتی در بررسی پتانسیل بیولوژیکی انواع بیوسورفاکتانت‌ها برای رفع آلودگی فلزات سنگین انجام پذیرفته است (Sarubbo et al.,

2015). از این جهت گونه های مختلفی از بیوسورفاکتانت‌ها با منشا باکتریای شناسایی شده‌اند که در انحلال و رفع آلودگی فلزات سنگین موثر واقع گردیده‌اند (Albuquerque et al., 2012). شرایط محیطی از جمله عواملی است می تواند بر مقدار بیوسورفاکتانت تولید شده تاثیر گذار باشد از این رو در مطالعه حاضر تاثیر دو عامل pH و مدت زمان رشد بر مقدار بیوسورفاکتانت تولید شده بوسیله دو باکتری *باسیلوس سابتیلیس* و *سودوموناس پوتیدا* مورد بررسی قرار گرفت. باکتری های انتخاب شده در مطالعات مختلف در ضمینه تولید بیوسورفاکتانت مورد بررسی قرار گرفتند و هر دو باکتری بیوسورفاکتانت از جنس Rhamnolipid تولید می کنند (Lang and Wullbrandt,1999;Rahman et al.,2002b).

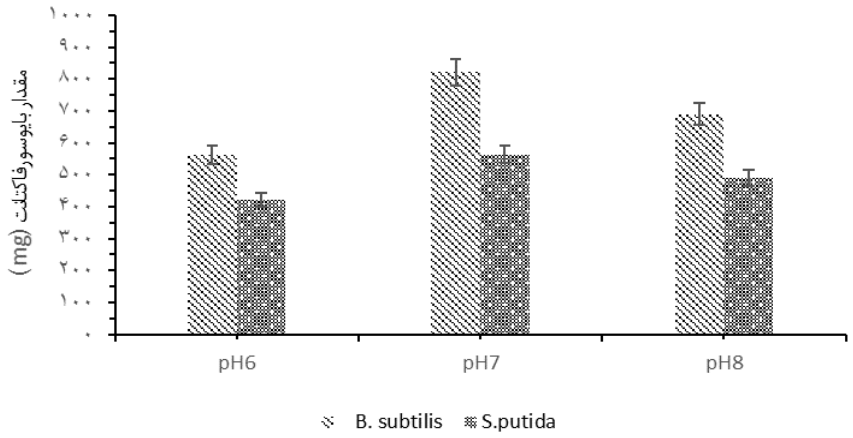
مواد و روش‌ها

جهت تولید، استخراج و خالص سازی نسبی بیوسورفاکتانت ابتدا باکتری در یک ارلن حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط MRS broth کشت داده شد و به مدت سه شبانه روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس محتویات ارلن به مدت ۲۰دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شد تا سلول‌های باکتریایی کاملا ته نشین شوند. سپس توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال، pH مایع رویی به ۲رسانده و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴درجه سلسیوس قرار داده شد تا بیوسورفاکتانت رسوب کند. رسوب قهوه‌ای حاوی بیوسورفاکتانت با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه جداسازی شد. جهت خالص سازی نسبی بیوسورفاکتانت، ۱۰میلی لیتر مخلوط کلروفرم/متانول به نسبت ۲:۱ به رسوب بدست آمده افزوده شد و به مدت ۱۵دقیقه بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. این ترکیب دوباره در ۱۲۰۰۰دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی در گرمخانه در دمای۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا کاملا خشک شود. در نهایت بیوسورفاکتانت به صورت رسوب سفید رنگ از مایع رویی بدست آمد (Mukesh Kumar, 2012). کیفیت بیوسورفاکتانت تولید شده در هر مرحله آزمایش به صورت کیفی از طریق تست روغن مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که مقدار ۳۰ میلی لیتر آب مقطر درون یک پتری دیش ریخته و ۲۵۰ میکرولیتر روغن مایع خوراکی بصورت یک لایه نازک به سطح آن اضافه شد. سپس۱۰۰میکرولیتر از مایع کشت باکتری به سطح روغن اضافه گردید. کنار رفتن روغن و مشاهده ناحیه شفاف در سطح آب موید حضور بیوسورفاکتانت است (Talaie, 2008).

جهت بررسی تاثیر pH اولیه بر مقدار بیوسورفاکتانت تولیدی محیط کشت باکتری‌ها (NB) در pH های ۶، ۷ و ۸ با استفاده از با NaOH و HCl تنظیم شد سپس بیوسورفاکتانت تولید شده بوسیله دو باکتری مورد مطالعه در این محیط کشت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بعد از ۶ روز استخراج و مقدار آن اندازه گیری شد. تاثیر مدت زمان رشد بر مقدار تولید بیوسورفاکتانت در زمانها ۴ تا ۱۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در pH مطلوب که از آزمایش قبل بدست آمد بررسی گردید.

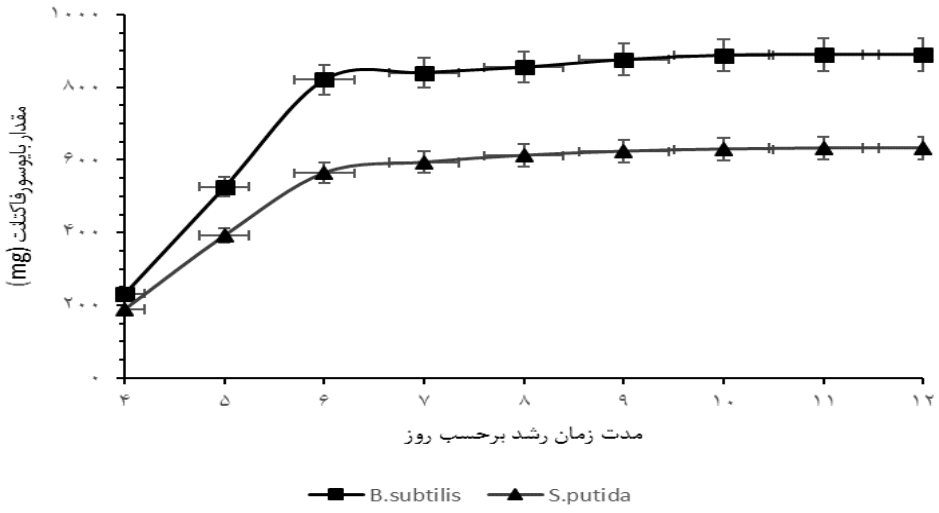
نتایج و بحث

نتایج نشان داد که pH برمیزان تولید بیوسورفاکتانت اثرگذار بوده و هردو باکتری بیشترین میزان تولید را در pH خنثی داشتند (شکل ۱). مطابق شکل ۱ تاثیر pH برروی باکتری باسیلوس‌سابتیلس بیشتر از باکتری سودوموناس پوتیدا در تولید بیوسورفاکتانت بود. نتایج بدست آمده از این مطالعه با نتایج بدست آمده در دیگر تحقیقات مشابه بود (Ruangwong et al Guerra-Santos et al. 1986, Mata-Sandoval, J. C et al 2001, 2012).



شکل ۱-تاثیر pH بر بیوسورفاکتانت بوسیله دو باکتری *باسیلوس‌سابتیلس و سودوموناس پوتیدا*

تاثیر مدت زمان رشد بر میزان بیوسورفاکتانت تولیدی تاثیر گذار بود و در هر دو باکتری تولید بایوسورفاکتانت تا ۶ روز اول روند افزایشی داشت اما بعد از ۶ روز تولید روند ثابتی پیدا کرد، احتمالا تولید بایوسورفکتانت بعد از رسیدن باکتری به حداکثر میزان رشد باتوجه به ظرفیت محدود محیط کشت کاهش یافته است. در دیگر مطالعات نیز گزارش شده است که تولید بیوسورفاکتانت و دیگر متابولیت های باکتری از الگوی رشدی آن در محیط کشت تبعیت می کند و با آن منطبق است به طوری که با افزایش تعداد باکتری در محیط کشت تولید این متابولیت ها افزایش می یابد و با نامساعد شدن شرایط محیط کشت بویژه محدودیت منابع غذایی از تولید آنها کاسته شده و روند تغییرات این متابولیت‌ها ثابت می‌ماند (MataSandovalet .(Çolak, Ferdağ, et al. 2011, al 2001



شکل ۲- تاثیر مدت زمان رشد بر مقدار تولید بایوسورفاکتانت بوسیله دو باکتری *باسیلوس‌سابتیلس و سودوموناس پوتیدا*

منابع

Albuquerque, C. F., Luna-Finkler, C. L., Rufino, R. D., Luna, J. M., de Menezes, C. T., Santos, V. A., and Sarubbo, L. A., 2012, Evaluation of biosurfactants for removal of heavy metal ions from aqueous effluent using flotation techniques: International Review of Chemical Engineering, v. 4, no. 2, p. 156-161.

Çolak, Ferdağ, et al. "Biosorption of lead from aqueous solutions by Bacillus strains possessing heavy-metal resistance." *Chemical Engineering Journal* 173.2 (2011): 422-428.

Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł., and Czaczyk, K., 2012, Why do microorganisms produce rhamnolipids World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, no. 2, p. 401-419.

Gao, L., Kano, N., Sato, Y., Li, C., Zhang, S., and Imaizumi, H., 2012, Behavior and distribution of heavy metals including rare earth elements, thorium, and uranium in sludge from industry water treatment plant and recovery method of metals by biosurfactants application: Bioinorganic chemistry and applications, v. 2012.

Juwarkar, A. A., Nair, A., Dubey, K. V., Singh, S., and Devotta, S., 2007, Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils: Chemosphere, v. 68, no. 10, p. 1996-2002.

Mata-Sandoval, Juan C., Jeffrey Karns, and Alba Torrents. "Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by P. aeruginosa UG2." *Microbiological research* 155.4 (2001): 249-256.

Maslin, P., and Maier, R. M., 2000, Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene in organic-metal co-contaminated soils: Bioremediation Journal, v. 4, no. 4, p. 295-308.

Miller, R. M., 1995, Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils: Environmental Health Perspectives, v. 103, no. Suppl 1, p. 59.

Mulligan, C. N., 2005, Environmental applications for biosurfactants: Environmental pollution, v. 133, no. 2, p. 183-198.

Mulligan, C. N., Yong, R. N., and Gibbs, B. F., 2001a, An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments: Journal of hazardous materials, v. 85, no. 1, p. 145-163.

Heavy metal removal from sediments by biosurfactants: Journal of Hazardous Materials, v. 85, no. 1, p. 111-125.

Ruangwong, O. U., Chang, C. I., Lamine, S. A., & Liang, W. J. (2012). Identification of antifungal compound produced by Bacillus subtilis LB5 with ability to control anthracnose disease caused by Colletotrichum gloeosporioides. African Journal of Microbiology Research, *6*(16), 3732-3738.

Sandrin, T. R., and Maier, R. M., 2003, Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants: Environmental Health Perspectives, v. 111, no. 8, p. 109

Sarubbo, L., Rocha Jr, R., Luna, J., Rufino, R., Santos, V., and Banat, I., 2015, Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants: Chemistry and Ecology, v. 31, no. 8, p. 707-723.

Wang, S., and Mulligan, C. N., 2009, Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings: Process Biochemistry, v. 44, no. 3, p. 296-301.

The effect of pH and time on the amount of biosurfactant production by *Bacillus Subtilis* and *Pseudomonas Putid*a

A. Bahari[1], A. Halajnia*[1] and A. Lakzian[1]
[1]MSc student, Assistant Professor and professor of soil science department, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

The consequences of the accumulation of heavy metals and organic contaminants in soil are dangerous and worrying. Using the chelating agents is one method to remove these contaminants. Among the chelating agent's bio surfactants are important due to environmental compatibility, biodegradability and low toxicity. In the present study to investigate the effect of pH and time on the bio surfactant produced by *Bacillus Subtilis* and *Pseudomonas Putida*, the amount and quality of bio surfactant produced by these two bacteria at pH 6, 7 and 8 and in times of 4 to 12 days was determined in laboratory conditions. The results showed that both bacteria produced the highest amount of bio surfactants in pH 7. However, the effect of pH on bio surfactant produced by *Pseudomonas Putida* was more than *Bacillus Subtilis.* In pH=7 with increasing time bio surfactant production increased until 6 days and then remained unchanged, probably due to growing environmental constraints.

Keywords: Bio surfactants, bioremediation, heavy metals.