فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۸۳- ۹۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۳۱

جداسازی *باسیلوس‌های* مولد پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات (PHA) از پساب پالایشگاه اصفهان و بررسی شرایط مناسب رشد و تولید پلی‌مر در کشت غوطه‌ور

مهسا کشاورز اعظم: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، mahsa.keshavarz@gmail.com
نفیسه سادات نقوی *: استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، naghavi@iaufala.ac.ir
زهرا اعتمادی‌فر: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، z_etemadifar@yahoo.com

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه حاضر، جداسازی انواع *باسیلوس* مولد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات از پساب پالایشگاه نفت اصفهان و تعیین شرایط مناسب تولید بوده است. پساب‌های نفتی از لحاظ منابع کربن غنی هستند و منابع نیتروژن و فسفر ضعیفی دارند. مهم‌ترین عامل تولید دانه‌های درون سلولی، افزایش نسبت منبع کربن به نیتروژن است؛ بنابراین به نظر می‌رسید میکروارگانیسم‌های تولید کننده پلی‌هیدروکسی بوتیرات در آن‌ها یافت شوند.

مواد و روش‌ها: انواع *باسیلوس* از پساب پالایشگاه اصفهان جداسازی شدند. پلی‌هیدروکسی بوتیرات با استفاده از رنگ آمیزی تأیید و با روش هضمی استخراج شد. شرایط مناسب تولید پلی‌مر در محیط کشت حداقل نمکی با منبع کربن آلی بررسی شد. میزان تولید با استفاده از روش‌های اندازه گیری وزن خشک و سنجش غلظت بر اساس جذب نوری بررسی شد.

نتایج: در بین انواع *باسیلوس* جدا شده جدایه‌های B_1 و B_2 تولید کننده پلی‌هیدروکسی بوتیرات بودند. محیط کشت حداقل نمکی با منبع کربن آلی به علت داشتن بیش‌ترین نسبت کربن به نیتروژن (برابر با ۱۵)، بهترین محیط کشت تولید پلی مر بود. بیش‌ترین میزان تولید برای جدایه B_1 (به مقدار ۳۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در زمان ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد، وجود منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن عصاره مخمر، اسیدیته ۷ و هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه به دست آمد. جدایه B_2 نیز در همان شرایط به استثنای دما (۳۲ درجه سانتی‌گراد) بیش‌ترین تولید (به مقدار ۴۷۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را داشت. همچنین، بیش‌ترین درصد (راندمان) تولید پلی‌مر برای جدایه‌های B_1 و B_2 به ترتیب، ۵۲/۱۶ و ۵۸/۴۳ درصد گزارش شد.

بحث و نتیجه‌گیری: تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات با مناسب‌سازی شرایط تولید، در هر دو جدایه *باسیلوس* افزایش یافت. استفاده از پساب‌های نفتی علاوه بر تولید پلاستیک‌های تجزیه‌پذیر، موجب کاهش آلودگی این پساب‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، پلاستیک‌های زیست‌تجزیه‌پذیر، *باسیلوس*، شرایط مناسب تولید

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

امروزه بیشتر پلاستیک‌های تولید شده در بازار از فرآورده‌های نفتی و زغال سنگ به دست می‌آیند و برگشت آن‌ها به محیط چند هزار سال طول می‌کشد (۱). علت اصلی زیست تخریب‌ناپذیر بودن این پلاستیک‌ها توسط موجودات تجزیه کننده، طویل بودن طول مولکول پلی‌مر و پیوند قوی بین مونومرهای آن است (۲). بنابراین، پژوهشگران در پی جایگزین کردن پلاستیک‌های زیستی یا تجزیه‌پذیر با این پلاستیک‌ها هستند.

پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات[۱] متداول‌ترین گروه پلی‌استرهای تجزیه‌پذیر یا همان پلی هیدروکسی‌آلکانوات‌ها[۲] است که توسط تخمیر باکتریایی قند یا چربی تولید می‌شود و به شکل درون سلولی توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های پروکاریوت از جمله گونه‌های *باسیلوس*[۳]، *ازتوباکتر*[۴]، *آلکالیجنز*[۵]، *سودوموناس*[۶] و *ریزوبیوم*[۷] در شرایطی مانند محدود بودن نیتروژن، فسفر، سولفات و بالا بودن میزان کربن ساخته می‌شوند. این پلی‌مرها که در واقع پلی‌استرهای میکروبی به حساب می‌آیند (۳). چگالی بیش‌تری نسبت به آب دارند، به قسمت‌های عمیق انتقال یافته و به وسیله میکروارگانیسم‌های موجود در رسوبات تجزیه می‌شوند. همچنین، به علت قابلیت تجزیه‌پذیری، غیرسمی بودن، انعطاف‌پذیری و ترموپلاستیک بودن نسبت به سایر پلی‌استرهای زیست‌تخریب‌پذیر مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند (۴).

پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (رایج‌ترین پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات) در سال ۱۹۲۶، در مؤسسه پاستور پاریس در سیتوپلاسم *باسیلوس مگاتریوم*[۸] کشف شد. در سال ۱۹۶۰، روش اسپکتروفتومتری به عنوان روشی آسان و دقیق برای سنجش کمی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات معرفی شد (۵). پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به عنوان دانه‌های ذخیره شده در سلول باکتری که دارای عملکرد کمابیش مشابه نشاسته و گلیکوژن است، در سال ۱۹۷۳ به رسمیت شناخته شد (۳). در سال ۱۹۸۱، فرآیند تولید زیستی کوپلی‌مرهای پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات از منابع کربن متفاوت ارایه شد (۶). در آن زمان، پلی‌مر حاصل، بیوپل[۹] نامیده شد. پس از آن، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات درکاربردهای پزشکی مانند اندام‌های مصنوعی، نخ‌های بخیه و روکش کپسول‌های خوراکی استفاده شد (۴). برای تعیین تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات از رنگ‌آمیزی با سودان سیاه به عنوان روش غیر اختصاصی تأیید پلی‌مر استفاده می‌شود (۷). برای استخراج پلی‌مر روش‌های مختلفی پیشنهاد شده است که از جمله آن‌ها استخراج با کلروفرم و یا از طریق اسیدی کردن پالایه محیط کشت است (۸- ۱۰).

در گذشته مطالعات فراوانی در زمینه تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در دنیا و در ایران انجام شده است. در بررسی مختارانی[۱۰] و همکاران در سال ۲۰۰۸ از میکروارگانیسم‌های لجن فعال فاضلاب برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها، بدون جداسازی باکتری‌های تولید کننده استفاده شده است. بهینه‌سازی منابع ازت و کربن موجب افزایش تولید پلی‌مر شده است (۱۱). در بررسی گودرزی[۱۱] و همکاران در سال ۲۰۱۱، جدایه‌ای از *باسیلوس ترنجینسیس* از خاک آلوده به پساب کارخانه دلسترسازی شناسایی شد (۱۲). در سال ۲۰۰۸ محسن‌پور[۱۲] و همکاران، جداسازی ژن بتاکتوتیولاز که تولید کننده آنزیم یک مرحله کلیدی در تشکیل کوپلیمرهای تجزیه‌پذیر زیستی است را از باکتری *رالستونیا اوتروفا*[۱۳] انجام دادند. این جداسازی با هدف اصلاح ویژگی‌های پلاستیک‌های تجزیه‌پذیر زیستی برای بهتر شدن کیفیت و کمتر شدن عیوب این پلاستیک‌ها مانند شکنندگی و کم استقامت بودن آن‌ها بود (۱۳).

با توجه به این که روی تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات توسط باکتری‌های موجود در پساب‌های نفتی مطالعه منتشر شده‌ای به ویژه در ایران یافت نشد و با وجود غنی بودن این پساب‌ها از ترکیبات کربنی، پژوهش حاضر با هدف تهیه جدایه‌های تولید کننده این پلی‌مر از پساب پالایشگاه نفت اصفهان انجام شد. همچنین، پس از بررسی تولید پلی‌مر، افزایش توانایی تولید توسط جدایه‌ها در کشت غوطه ور، با مناسب‌سازی اولیه زمان تولید، منابع کربن و نیتروژن، اسیدیته و سرعت همزنی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها: از آن جا که پساب‌های نفتی از منابع کربن غنی و منابع نیتروژن و فسفر ضعیف هستند، در پژوهش حاضر، از پساب پالایشگاه اصفهان (حوضچه هوادهی) به عنوان نمونه برای جداسازی باکتری‌های مولد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات استفاده شد. انواع *باسیلوس* با استفاده از شوک حرارتی و کشت بر روی محیط کشت نوترینت آگار (شارلو، اسپانیا) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند. باکتری‌های جداسازی شده با رنگ آمیزی گرم بررسی و با آزمون‌های بیوشیمیایی مانند همولیز بر روی آگار خون‌دار، هیدرولیز لسیتین، متیل رد، وژپرسکوئر، اکسیداز، تخمیر قندها، مصرف سیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین و مشاهده اجسام کنار اسپور شناسایی شدند.

بررسی تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در محیط کشت‌های مختلف: به منظور تولید پلی‌مر سه محیط کشت لوریا برتانی براث[۱۴]، E_2 و حداقل نمکی با منبع کربن آلی بررسی شد. این محیط‌های کشت هر یک شامل مواد و شرایط متفاوتی هستند و در پژوهش‌های قبلی پیشنهاد شده بودند. یکی از اهداف پژوهش حاضر بررسی بهترین محیط کشت از میان این سه محیط کشت بوده است.

محیط کشت لوریا برتانی براث شامل ترکیبات گلوکز ۱۰ گرم در لیتر (مرک، آلمان)، کلرید سدیم ۱۰ گرم در لیتر (مرک، آلمان)، عصاره مخمر ۵ گرم در لیتر (شارلو، اسپانیا)، تریپتون ۱۰ گرم در لیتر (شارلو، اسپانیا) با اسیدیته ۷ است (۱۴). محیط کشت E2 مایع نیز شامل ترکیبات فسفات آمونیوم هیدروژن سدیم، ۴ آب ۳/۵ گرم در لیتر، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۳/۷ گرم در لیتر، فسفات منو هیدروژن پتاسیم ۵/۷ گرم در لیتر، سولفات منیزیم ۷ آب ۰/۲ گرم در لیتر و گلوکز ۱۰ گرم در لیتر و یک میلی‌لیتر از محلول فلزی شامل ترکیبات سولفات آهن ۷ آب ۲/۷۸ گرم در لیتر، کلرید کلسیم ۲ آب ۲/۴۷ گرم در لیتر، کلرید منگنز ۴ آب ۱/۹۸ گرم در لیتر، کلرید کبالت ۶ آب ۲/۳۸ گرم در لیتر، کلرید مس ۲ آب ۰/۱۷ گرم در لیتر و سولفات روی ۷ آب ۰/۲۹ گرم در لیتر با اسیدیته ۷ (همه مواد از شرکت مرک آلمان) است (۱۵). محیط کشت حداقل نمکی با منبع کربن آلی شامل فسفات منو هیدروژن پتاسیم یک گرم در لیتر، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۲ گرم در لیتر، کلرید سدیم یک گرم در لیتر، کلرید کلسیم ۲ آب ۰/۰۰۲ گرم در لیتر، سولفات آمونیوم ۱ گرم در لیتر، سولفات منیزیم ۷ آب ۰/۵ گرم در لیتر، سولفات مس ۵ آب ۰/۰۰۱ گرم در لیتر، سولفات روی ۷ آب ۰/۰۰۱ گرم در لیتر، سولفات منگنز یک آب ۰/۰۰۱ گرم در لیتر، سولفات آهن ۷ آب ۰/۰۰۱ گرم در لیتر و گلوکز ۱۰ گرم در لیتر با اسیدیته ۷ (همه مواد از شرکت مرک آلمان) است. به علت اضافه شدن قند گلوکز، باکتری‌های هتروتروف هم در آن قادر به رشد هستند (۱۴). شایان ذکر است با محاسبه نسبت مولکول‌ها، نسبت کربن به نیتروژن (C/N) در محیط‌های کشت یاد شده برابر با ۲ در محیط کشت لوریا برتانی براث، ۵ در محیط کشت E_2 و ۱۵ در محیط کشت حداقل نمکی با منبع کربن آلی است. محیط‌های کشت یاد شده به علت

جلوگیری از تجزیه قند موجود در آن‌ها، در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد استریل شدند.

یک کلونی خالص از کشت باکتریایی توسط لوپ به محیط نوترینت براث (شرکت شارلو) تلقیح شد و تا زمان رسیدن به کدورت نیم مک فارلند (حدود ۱۸ ساعت) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن یک میلی‌لیتر از محیط کشت یاد شده برداشته و به محیط کشت‌های تولید پلی‌مر در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر اضافه شد. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه، در انکوباتور شیکردار (شرکت شاین سینگ[۱۵]) انکوبه شدند. نمونه‌برداری برای تعیین وزن خشک سلولی و تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد.

ردیابی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات تولید شده در جدایه‌ها

رنگ آمیزی سودان سیاه: بر روی گستره خشک شده سلولی، رنگ سودان سیاه[۱۶] (مرک، آلمان) ریخته و پس از ۱۵ دقیقه با زایلل[۱۷] (مرک، آلمان) شسته شد. سپس، به مدت ۱۰ ثانیه سافرانین[۱۸] (مرک، آلمان) اضافه و با آب شستشو داده شد. پس از خشک شدن، دانه‌های پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات با رنگ سیاه در سلول‌های باکتری با رنگ قرمز قابل مشاهده بود (۱۵).

رنگ آمیزی نیل بلو برای مشاهده میکروسکوپی: برای رنگ آمیزی، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تولید برداشته و با ۱۰ میکرولیتر از رنگ نیل بلو مخلوط شد. گرانول‌های پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات با درخشش آبی توسط میکروسکوپ فلئورسنت مشاهده شد (۱۶).

رنگ‌آمیزی نیل بلو به شکل مستقیم بر روی کلونی‌های زنده: ابتدا محیط کشت جامد حداقل نمکی با منبع کربن آلی با محتویاتی که پیش از این شرح داده شد به علاوه ۱/۵ درصد آگار و رنگ نیل بلو با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در حلال دی‌متیل‌سولفوکساید ساخته شد. کلونی باکتری‌های تلقیح شده، پس از طی شدن ۷۲ ساعت دوره گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در معرض نور فرابنفش با طول موج ۴۶۰ نانومتر قرار گرفت و درخشش فلئورسنت آن‌ها بررسی شد (۱۶).

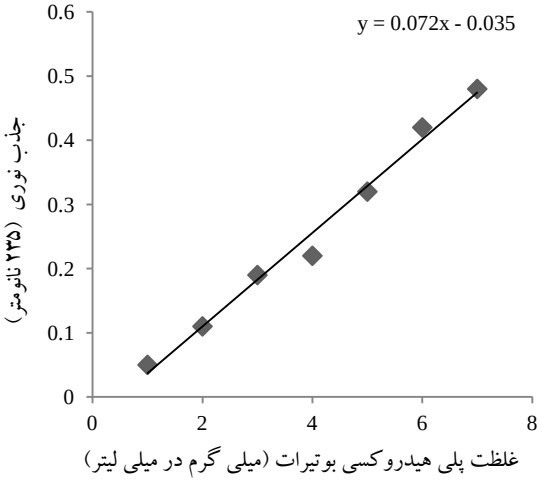
استخراج و خالص‌سازی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت‌های یاد شده برای تولید پلی‌مر با سرعت ۹۳۰۰ بر اساس واحد g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به رسوب حاصل ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیپوکلریت اضافه شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. پس از سانتریفوژ با سرعت ۲۳۰۰ بر اساس واحد g و به مدت ۳۰ دقیقه، رسوب سفید رنگ حاصل توسط الکل و استون به نسبت دو به یک شسته و به طور کامل در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس، برای استخراج پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، به رسوب سفید رنگ ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد و در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت (۱۷). پس از سرد شدن، محلول پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در کلروفرم در یک بشقابک تمیز ریخته شد و برای تبخیر کلروفرم در زیر هود شیمیایی قرار گرفت. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به شکل یک لایه نازک در ته لوله باقی ماند که به راحتی قابل جدا شدن بود (۱۸).

سنجش پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: برای سنجش کمی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات پس از استخراج و خالص‌سازی، پلی‌مر به دست آمده توسط ترازوی دقیق عددی توزین شد. درصد پلی‌مر طبق رابطه زیر به دست آمد (۱۹).

$$\text{درصد پلی هیدروکسی بوتیرات} = \frac{\text{مقدار وزن خشک پلی هیدروکسی بوتیرات}}{\text{مقدار وزن خشک رسوب سلولی}} \times 100$$

همچنین، برای تعیین غلظت پلی‌هیدروکسی بوتیرات یک میلی‌لیتر از محیط کشت تولید پلی‌مر با سرعت ۹۳۰۰ بر اساس واحد g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به رسوب حاصل یک میلی‌لیتر محلول سدیم هیپوکلریت یک درصد اضافه شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. سپس، سانتریفوژ و شستشوی رسوب سفید رنگ توسط آب مقطر انجام شد. افزون بر این، رسوب حاصل توسط الکل و استون به نسبت دو به یک شسته و در نهایت، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به طور کامل خشک شد. سپس، یک میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۹۸ درصد به آن اضافه شد و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در حمام جوش قرار گرفت. سولفوریک اسید غلیظ، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را تبدیل به کورتونیک اسید[۱۹] می‌کند. پس از سرد شدن محلول، جذب نوری کورتونیک اسید در طول موج ۲۳۵ نانومتر در مقابل سولفوریک اسید غلیظ به عنوان شاهد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مجهز به نور فرابنفش خوانده و غلظت پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات براساس منحنی استاندارد این پلی‌مر بررسی شد (۵).

رسم منحنی استاندارد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: برای رسم منحنی استاندارد غلظت‌های ۱ تا ۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات خالص به یک میلی‌لیتر محلول سدیم هیپوکلریت یک درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. سپس، جذب نوری کورتونیک اسید تولید شده در طول موج ۲۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۵). منحنی استاندارد ترسیم شده در شکل ۱ مشاهده می‌شود.



شکل ۱- منحنی استاندارد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات بر اساس جذب نوری غلظت‌های مختلف در طول موج ۲۳۵ نانومتر

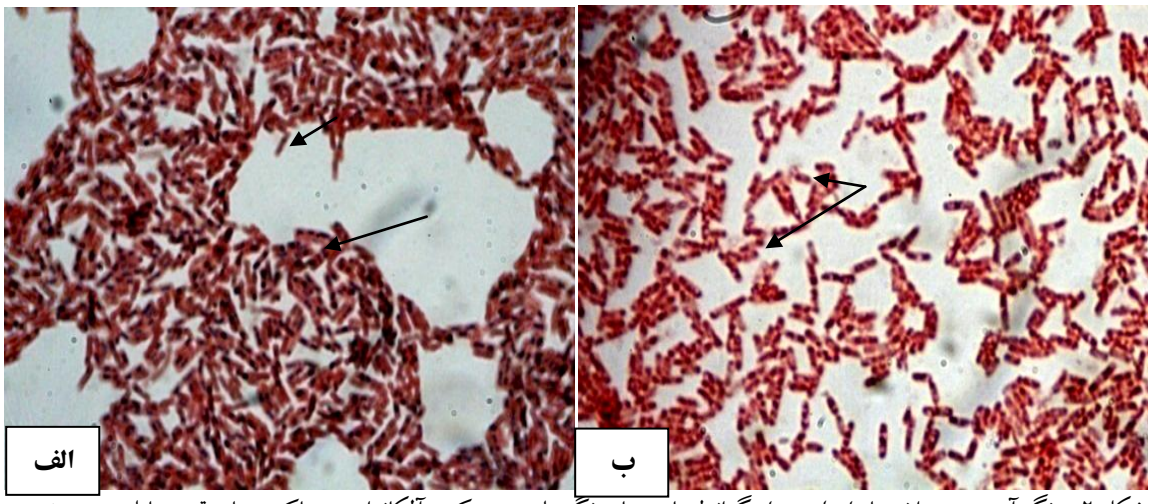
مناسب‌سازی رشد توده زیستی سلولی و تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: برای هر مرحله از مناسب‌سازی، محیط کشت با شرایط آزمایش مورد نظر ساخته شد و تعداد $3x10^8$ سلول باکتری (بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند) به ۲۵۰ میلی‌لیتر این محیط تلقیح شد. مراحل مناسب‌سازی بر اساس نوع محیط کشت (لوریا برتانی براث، E_2 و حداقل نمکی با منبع کربن آلی)، زمان تولید (۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۴۰، ۴۸، ۵۶، ۶۴، ۶۸، ۷۲ و ۷۶ ساعت)، دما (۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۵، ۳۷ و ۳۹ درجه سانتی‌گراد)، منابع کربن (گلوکز، ساکارز، مانیتول، لاکتوز، فروکتوز، گزیلوز و ملاس به میزان ۱۰ گرم در لیتر)، منابع نیتروژن (تریپتون، عصاره مخمر، کلرید آمونیوم، سولفات آمونیوم به مقدار یک گرم در لیتر)، اسیدیته محیط (۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) و دور شیکر (۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ دور در دقیقه) انجام شد. نحوه چینش آزمایش‌ها بر اساس روش یک متغیر در یک زمان تعیین شد (۱۱).

نتایج

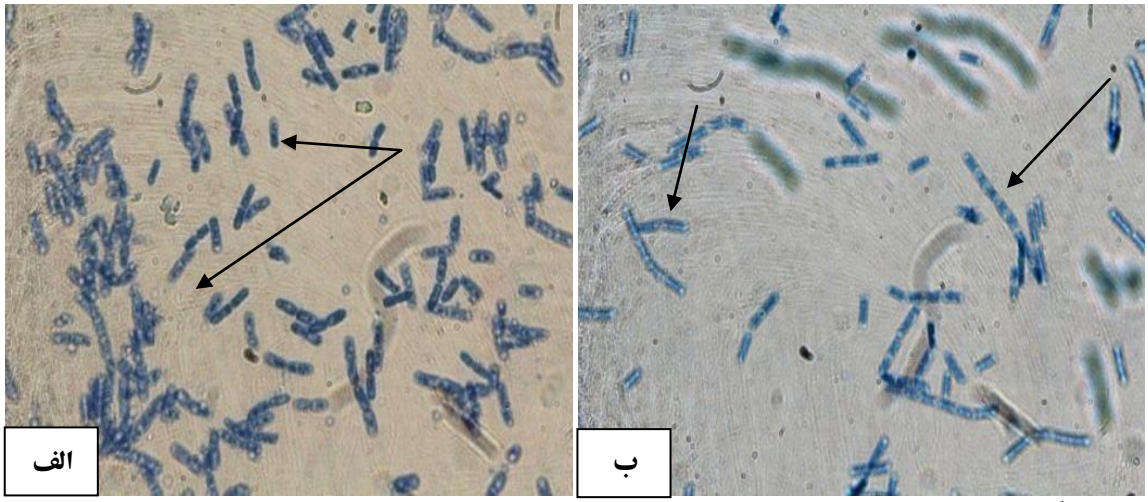
شناسایی جدایه‌ها: پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی دو جدایه B_1 و B_2 نتایج در جدول ۱ گزارش شد. بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام شده، جدایه B_1 *باسیلوس تورنجنسیس* و B_2 *باسیلوس سرئوس* شناسایی شد. با توجه به شکل‌های ۲ و ۳، گرانول‌های PHA توسط رنگ‌آمیزی سودان سیاه و نیل بلو رؤیت شد. در شکل ۴ کلونی‌های حاوی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به شکل آبی درخشان مشاهده شد.

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی دو جدایه B_1 و B_2

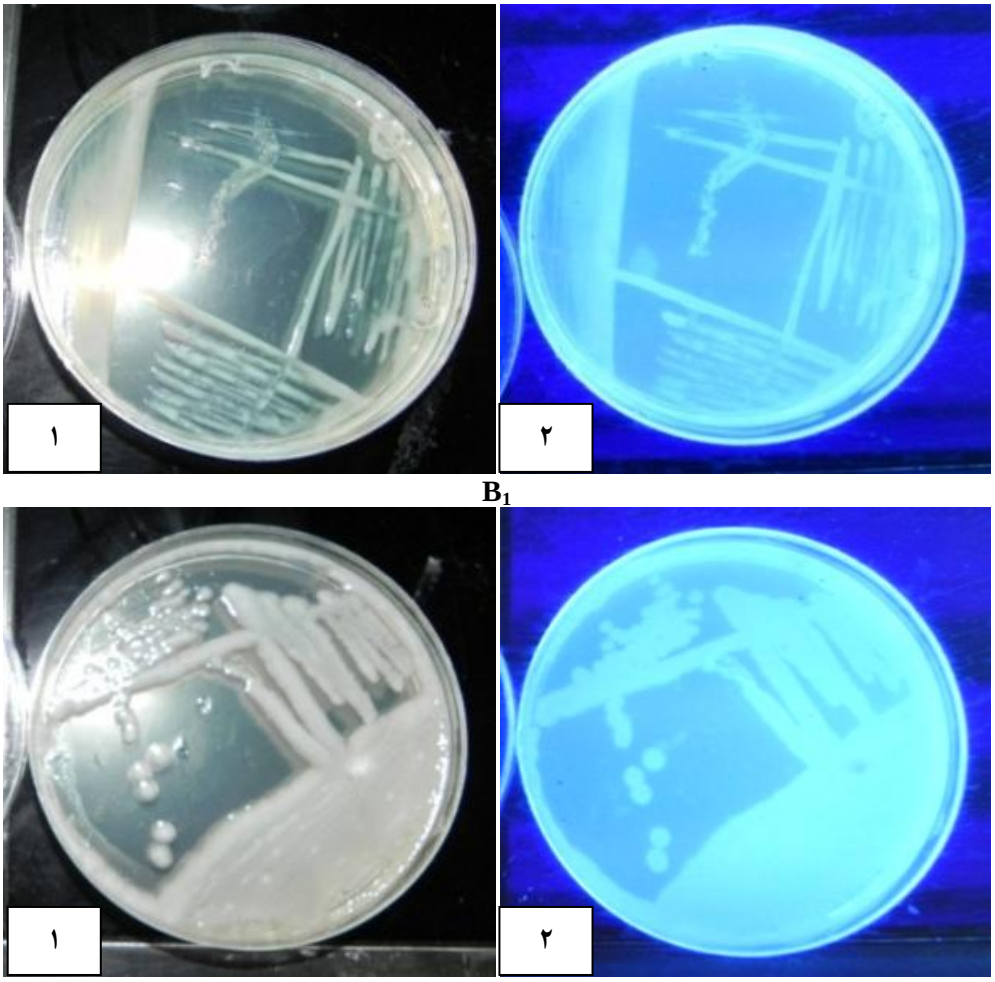
آزمون‌های بیوشیمیایی	همولیز	VP	MR	تولید اکسیداز	ژلاتیناز	اندول	اجسام کنار اسپور	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز کازیین	مصرف سیترات	تخمیر گزیلوز	تخمیر گلوکز	تخمیر مانیتول	تولید لستیناز
B_1	β	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
B_2	β	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+



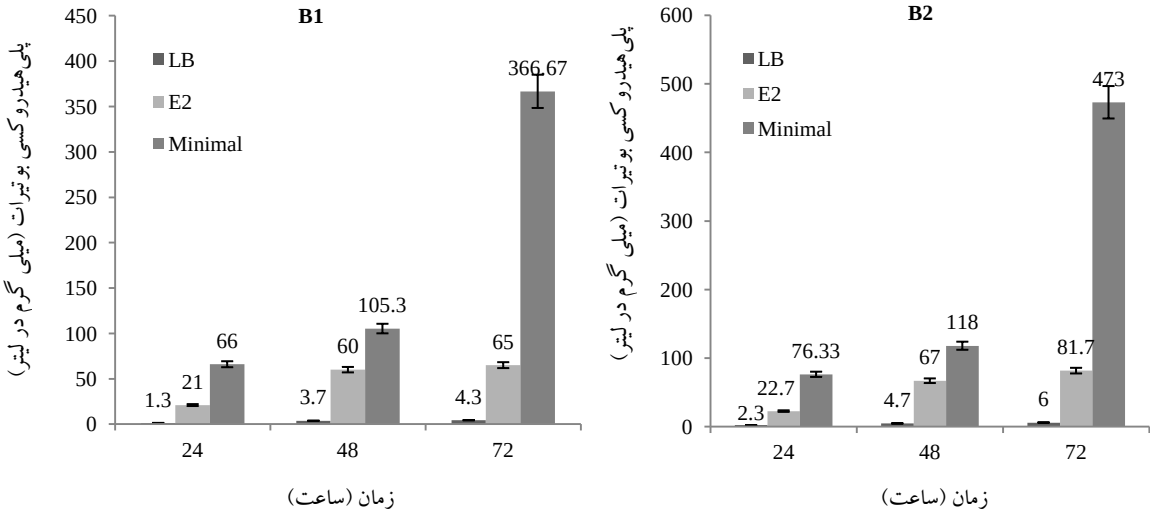
شکل ۲- رنگ‌آمیزی سودان سیاه *باسیلوس‌ها*: گرانول‌های سیاه رنگ پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در باکتری‌های قرمز مایل به صورتی در جدایه‌های B_1 و B_2 (الف و ب) زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر



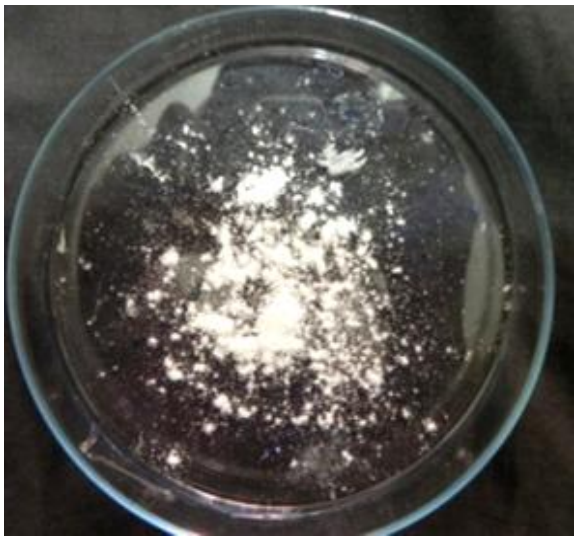
شکل ۳- رنگ‌آمیزی نیل بلو *باسیلوس‌ها*: دانه‌های درخشان پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در جدایه‌های B_1 (الف) و B_2 (ب) زیر میکروسکوپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر



شکل ۴- رنگ‌آمیزی نیل بلو به شکل مستقیم بر روی کلونی‌های زنده در جدایه‌های B_1 و B_2: کلونی‌های B_1 و B_2 موجود در بشقابک حاوی رنگ نیل بلو قبل(۱) و پس (۲) از قرار دادن در معرض اشعه فرابنفش با طول موج ۴۶۰ نانومتر



شکل ۵- نمودار بررسی وزن خشک پلی هیدروکسی‌بوتیرات استخراج شده ($mg.L^{-1}$) از محیط کشت‌های لوریا برتانی براث (LB)، E_2 و حداقل نمکی (Minimal) در جدایه‌های B_1 و B_2 بر اساس زمان (ساعت)



شکل ۶- نمونه پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات خالص شده: پلی‌مر به شکل پودر سفید رنگی به دست آمد.

بر اساس شکل ۵، نمودار مناسب‌سازی محیط نشان داد، محیط کشت حداقل نمکی با منبع کربن آلی بهترین محیط برای تولید پلی‌مر در *باسیلوس‌های* جدا شده بود. این محیط کشت دارای بیش‌ترین نسبت کربن به نیتروژن (C/N) نسبت به محیط‌های دیگر است و همین مورد می‌تواند از علت‌های اصلی تولید زیاد پلی‌مر در آن باشد. در این بررسی، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به شکل پودر خالص شده به دست آمد. ظاهر پلی‌مر در شکل ۶ نشان داده شده است.

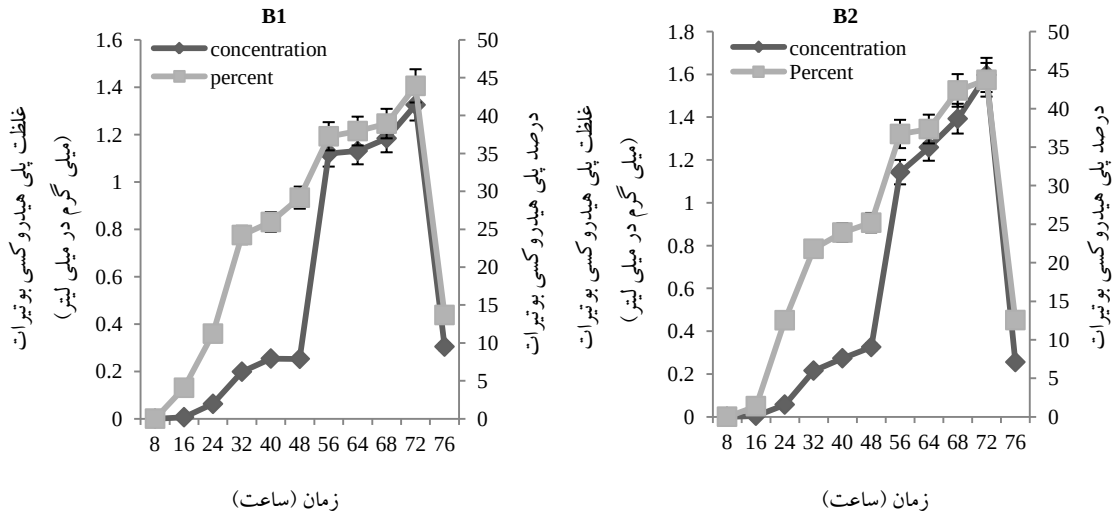
بهترین زمان تولید پلی‌مر بر اساس وزن خشک برای هر دو جدایه ۷۲ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری بود (شکل ۷).

شکل ۸ نشان می‌دهد که بهترین دمای تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات برای جدایه B_1 ۳۱ درجه سانتی‌گراد و برای جدایه B_2 ۳۲ درجه سانتی‌گراد بوده است.

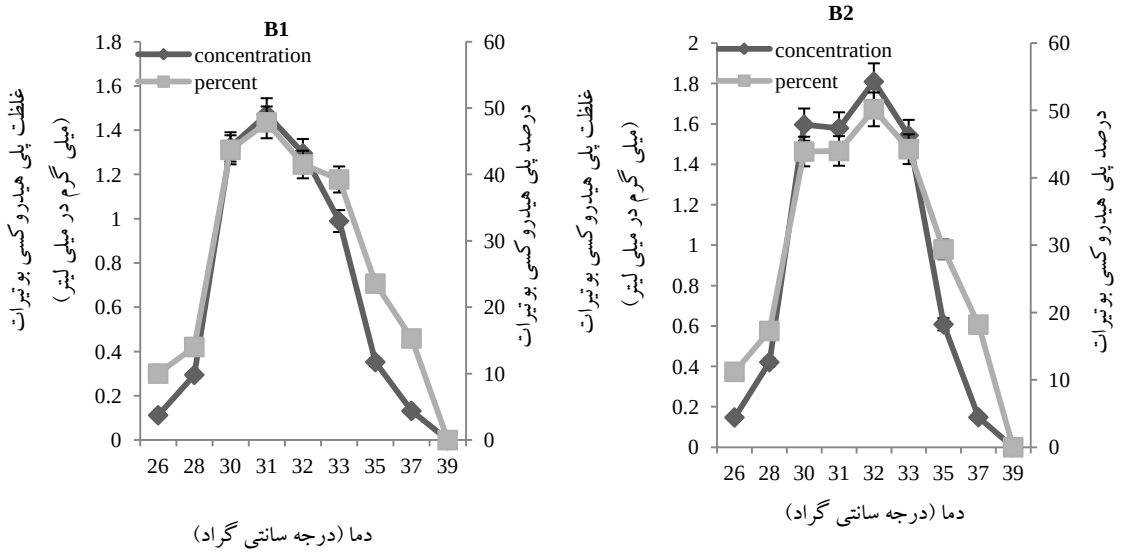
شکل ۹ نشان می‌دهد بهترین اسیدیته برای تولید پلی‌مر در هر دو جدایه، ۷ بوده است.

بر اساس شکل ۱۰ در هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه بیش‌ترین میزان تولید در هر دو جدایه گزارش شد.

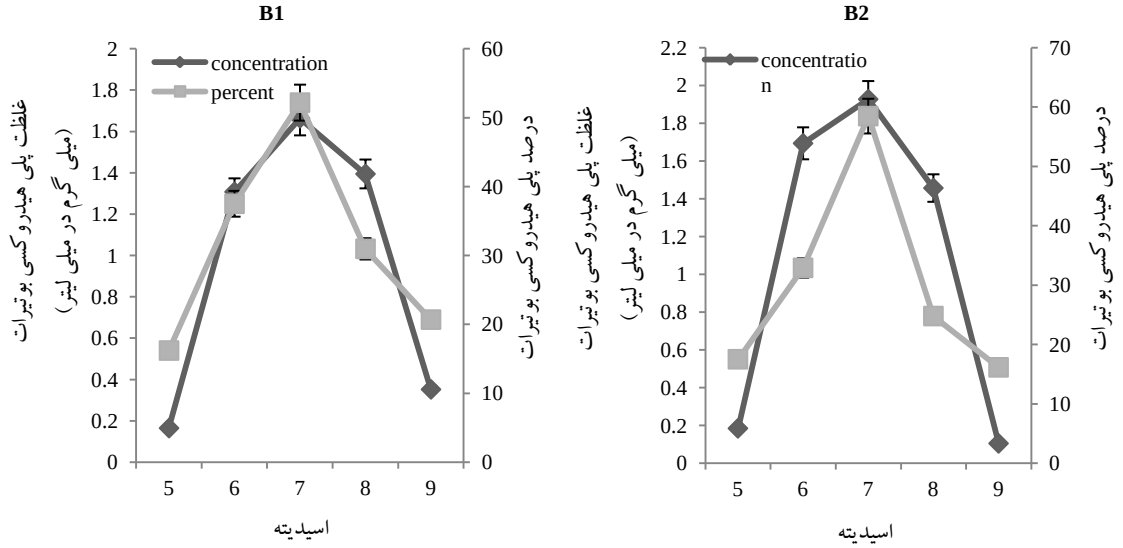
بر اساس شکل‌های ۱۱ و ۱۲ گلوکز به عنوان بهترین منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان بهترین منبع نیتروژن گزارش شد.



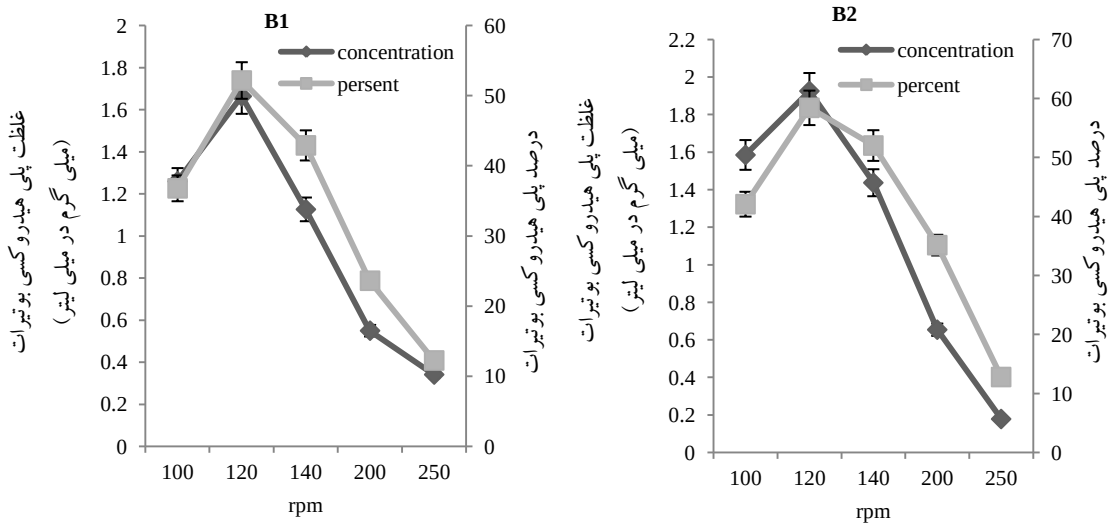
شکل ۷- نمودار مقایسه غلظت (concentration) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و درصد (percent) تولید بر اساس وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلولی در جدایه‌های B_1 و B_2 بر اساس زمان، در شرایط دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، منبع کربن گلوکز، اسیدیته ۷، هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه و منبع نیتروژن سولفات آمونیوم، نتایج میانگین سه بار تکرار آزمایش است.



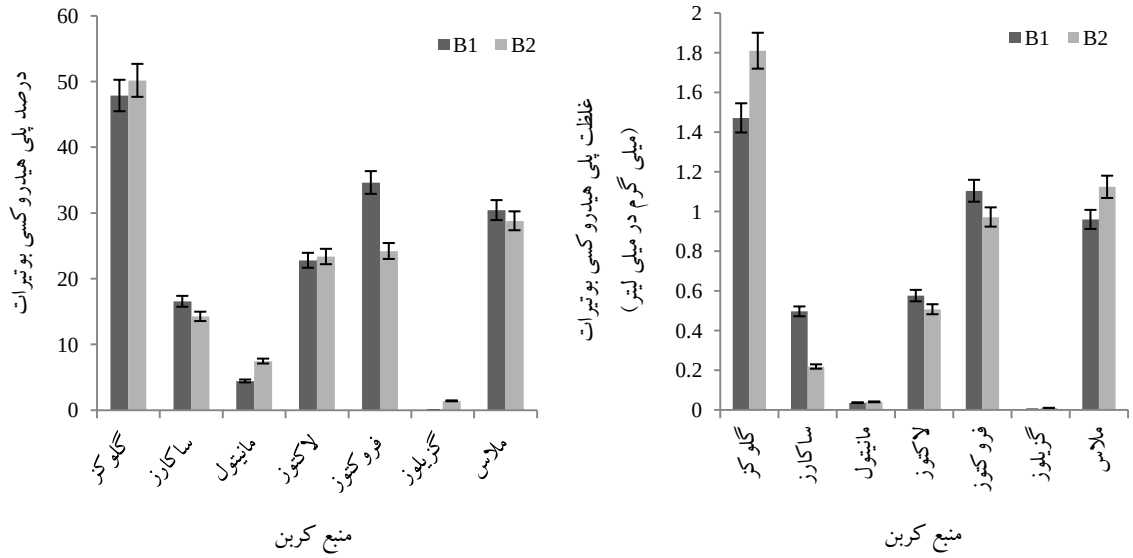
شکل ۸- نمودار مقایسه غلظت (concentration) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و درصد (percent) تولید بر اساس وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلولی در جدایه‌های B_1 و B_2 در شرایط دمایی متفاوت، منبع کربن گلوکز، اسیدیته ۷، هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه و منبع نیتروژن سولفات آمونیوم و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، نتایج میانگین سه بار تکرار آزمایش است.



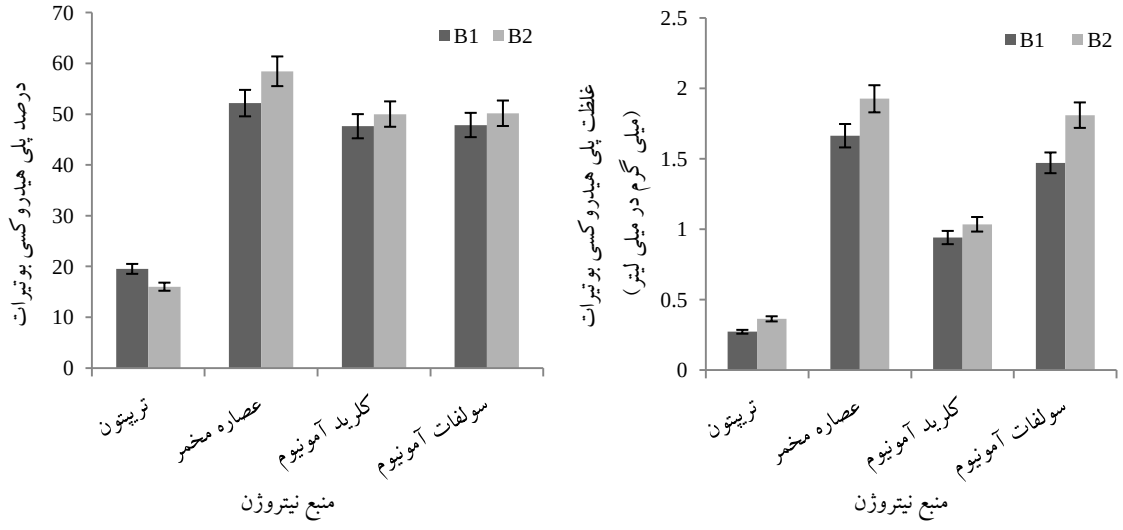
شکل ۹- نمودار مقایسه غلظت (concentration) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و درصد (percent) تولید بر اساس وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلولی در جدایه‌های B_1 و B_2 در شرایط اسیدیته مختلف، منبع کربن گلوکز، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه و منبع نیتروژن سولفات آمونیوم و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری.



شکل ۱۰- نمودار مقایسه غلظت (concentration) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و درصد (percent) تولید بر اساس وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلولی در جدایه‌های B_1 و B_2 در شرایط هم‌زنی مختلف، منبع کربن گلوکز، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷ و منبع نیتروژن سولفات آمونیوم و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری.



شکل ۱۱- نمودار مقایسه غلظت (concentration) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و درصد (percent) تولید بر اساس وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلولی در جدایه‌های B_1 و B_2 بر اساس منابع کربن. در شرایط دمایی به ترتیب ۳۱ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد، منبع کربن متفاوت، اسیدیته ۷، هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه و منبع نیتروژن سولفات آمونیوم و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، نتایج میانگین سه بار تکرار آزمایش است.



شکل ۱۲- نمودار مقایسه غلظت (concentration) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و درصد (percent) تولید بر اساس وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلولی در جدایه‌های B_1 و B_2 بر اساس منابع نیتروژن. در شرایط دمایی به ترتیب ۳۱ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد، منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن متفاوت، اسیدیته ۷، هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، نتایج میانگین سه بار تکرار آزمایش است.

بحث و نتیجه‌گیری

تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در گونه‌های مختلف *باسیلوس* در مطالعات قبلی بررسی شده است. یاکسدگ[20] و همکاران در سال ۲۰۰۴ تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را در *باسیلوس مگاتریوم* و *باسیلوس سوبتیلیس* بررسی کردند (۲۰). آن‌ها بیش‌ترین میزان تولید را مقدار ۱۰۱ و ۱۶۲ میلی‌گرم بر لیتر پس از ۴۵ ساعت گرمخانه‌گذاری گزارش نمودند که پس از گذشت ۴۸ ساعت تولید کاهش یافت. در پژوهش حاضر محیط حداقل نمکی به عنوان بهترین محیط تولید گزارش شد که ۷۲ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری، تولید پلی‌مر توسط جدایه B_1 به مقدار ۳۶۶/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و توسط جدایه B_2، برابر با ۴۷۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. رحمان[21] و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیش‌ترین مقدار پلی‌مر را در این محیط ۳۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اعلام کردند (۲۱) به علت این که در مطالعات قبلی نیز از محیط کشت حداقل نمکی با منبع کربن آلی استفاده شده است، پژوهش حاضر نشان دهنده افزایش میزان تولید پلی‌مر است. این افزایش می‌تواند به علت توانایی بالاتر جدایه‌های مورد استفاده و حفظ قدرت تولید پلیمر با گذشت زمان گرمخانه‌گذاری باشد. در سال ۲۰۱۰ سانتانام و سیدهرن[22]، برای مشاهده گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات از رنگ آمیزی سودان سیاه استفاده کرده‌اند (۱۵). در این مطالعه با استفاده از این روش گرانول‌های سیاه رنگ موجود در جدایه‌ها مشاهده شد.

از دیگر روش‌های رنگ‌آمیزی، روش اختصاصی نیل بلو بود. در سال ۲۰۱۲ پریتی[23] و همکاران، با استفاده از این روش گرانول‌های درخشان پلی‌هیدروکسی بوتیرات را مشاهده کردند. از مزایای این روش نسبت به استفاده از سودان سیاه، سهولت بیشتر رنگ آمیزی است و به علت این که این رنگ مانع رشد باکتری نمی‌شود،

می‌توان آن را قبل از رشد به محیط کشت اضافه و تولید پلی مر را در کلونی‌ها با استفاده از نور UV ردیابی کرد (۱۶). در این پژوهش نیز توسط میکروسکوپ فلئورسنت این گرانول‌ها مشاهده شد.

در پژوهش حاضر از روش جیسیلان[۲۴] و همکاران برای استخراج پلی‌هیدروکسی بوتیرات استفاده شد (۱۷). در این روش از حلال‌های سدیم هیپوکلریت، الکل و استون و کلروفرم استفاده شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سانتریفوژ با سرعت ۹۳۰۰ بر اساس واحد g و به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. خالص‌سازی پلی‌مر از روش هان[۲۵] و همکاران و با استفاده از کلروفرم انجام گرفت (۱۸).

بیش‌ترین میزان درصد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات برای جدایه‌های B_1 و B_2، ۷۲ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری به ترتیب میزان ۴۳ درصد و ۴۳ درصد اعلام شد. سودش[۲۶] و همکاران در سال ۲۰۱۲ درصد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را برای *باسیلوس سوبتیلیس* به میزان ۱۸ درصد و برای *باسیلوس مگاتریوم* به میزان ۱۵ درصد اعلام کردند (۲۲). در محیط حداقل نمکی نسبت توده زیستی سلولی به تولید پلی‌مر تعیین کننده درصد پلیمر بود. در پژوهش حاضر درصد تولید نسبت به پژوهش‌های سودش و همکاران افزایش یافت، زیرا نسبت توده زیستی سلولی به تولید پلیمر در مطالعه آن‌ها بیشتر از پژوهش حاضر بود و باعث کاهش درصد تولید شد.

برای تعیین شرایط مناسب دما فواصل دمایی دوتایی در نظر گرفته شد. دمای مناسب تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در جدایه B_1، ۳۱ درجه سانتی‌گراد، با میزان تولید ۴۷ درصد و در جدایه B_2، ۳۲ درجه سانتی‌گراد با میزان تولید ۴۷ درصد گزارش شد.

پس از رسم پروفایل دما، آزمایش یافتن منبع کربن مناسب انجام گرفت. منبع کربن گلوگز به عنوان بهترین منبع برای تولید پلی‌مر تعیین شد که بیش‌ترین درصد تولید برای جدایه‌های B_1 و B_2، ۴۷/۸۵ و ۵۰/۱۶ درصد اعلام شد. سودش و همکاران تولید در حضور منبع کربن گلوکز را به مقدار ۱۵ و ۱۹ درصد گزارش کردند (۲۲). برکا و تهودی[۲۷] نیز، گلوکز را به عنوان بهترین منبع کربن برای توده سلولی و تولید پلی مر، به میزان ۳۵ درصد گزارش کردند (۹). منبع کربن در پژوهش حاضر نیز گلوکز بود، اما مقدار درصد تولید پلی‌مر بیشتر گزارش شد.

همچنین، اسیدیته مناسب تولید برای جدایه‌های B_1 و B_2، ۷ بود که بیش‌ترین درصد تولید در جدایه‌ها به ترتیب ۵۲/۱۶، ۵۸/۴۰ به دست آمد. دور شیکر مناسب رشد و تولید پلی‌مر برای جدایه‌های B_1 و B_2، هوادهی ۱۰۰ دور در دقیقه و ۱۲۰ دور در دقیقه اعلام شد و بیش‌ترین درصد تولید پلی‌مر برای جدایه‌های B_1 و B_2 به ترتیب، ۵۲/۱۶، ۵۸/۴۳ گزارش شد.

برای سنجش کیفی پلی‌مر از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد که با استفاده از آن، غلظت پلی‌مر تعیین شد. غلظت پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات برای جدایه‌های B_1 و B_2، پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری به میزان ۱/۳ و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (بیش‌ترین مقدار تولید پلی‌مر) گزارش شد. در سال ۲۰۰۹ راماداس[۲۸] و همکاران، بیش‌ترین غلظت پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گونه‌های *باسیلوس* اعلام کردند (۲۳).

محیط تولید با منابع نیتروژن مختلف قرار گرفت که برای جدایه‌های B_1 و B_2، عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن مناسب انتخاب شد. همچنین، بیش‌ترین درصد تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات نیز مربوط به همین منابع

نیتروژنی بود که برای جدایه‌های B_1 و B_2، به ترتیب ۵۲/۱۶ و ۵۸/۴۰ درصد به دست آمد. در مطالعه‌ای در ترکیه با بهینه کردن منبع نیتروژن تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به وسیله مخمرهای جداسازی شده از چای کمبوجا به ۲۵ درصد وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلول افزایش یافت (۲۴). در بررسی دیگری، با استفاده از سویه‌های کلکسیونی *باسیلوس سابتیلیس* و *باسیلوس مگاتریوم*، با تغییر زمان گرمخانه‌گذاری و منبع نیتروژن، تولید تا ۷۷ درصد وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلول افزایش یافته است (۲۰).

در مطالعه حاضر، نتایج به دست آمده از سنجش کمی پلی‌هیدروکسی بوتیرات بر اساس وزن خشک (میلی گرم بر لیتر) و سنجش بر اساس روش اسپکتروفتومتری (تعیین غلظت آن بر اساس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داد که این دو نوع سنجش کمابیش بر هم منطبق بود و نتایج مشابهی گزارش شد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد بیش‌ترین درصد تولید پلی‌مر برای جدایه‌های B_1 و B_2 *باسیلوس* به دست آمده از پساب پالایشگاه به ترتیب، ۵۲/۱۶، ۵۸/۴۳ و بیش‌ترین میزان غلظت پلی مر تولید شده ۱/۶۶ و ۱/۹۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

بررسی مطالعات انجام شده در زمینه بهینه‌سازی شرایط تولید پلی هیدروکسی آلکانوات به وسیله جدایه‌های باکتریایی بومی یا کلکسیونی نشان دهنده نتایج مختلفی است. بررسی تأثیر ترکیبات ازت بر تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها با استفاده از لجن فعال توسط مختارانی و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد، آن‌ها بیش‌ترین میزان تولید این پلی استر را هنگام استفاده از عصاره مخمر به عنوان منبع ازت و به میزان ۲۳ درصد بر اساس وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلول معرفی کردند (۱۱). خسروی دارانی[۲۹] و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بهینه کردن شرایط تولید از نظر منابع کربن و نیتروژن، هم زنی، دما و زمان تولید توسط باکتری کلکسیونی *رالستونیا اتروفا* (ATCC 17699) که به عنوان یکی از تولید کننده‌های قدرتمند پلی‌هیدروکسی آلکانوات شناخته شده است، توانستند تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را به حداکثر ۵۰/۱۸ درصد بر اساس وزن خشک پلی‌مر نسبت به وزن خشک سلول افزایش دهند (۲۵). همین پژوهشگران در طراحی آزمایش دیگری توانستند موجب افزایش بیشتری در تولید (۸۵ درصد) به وسیله همان باکتری شوند (۲۶). مقایسه این دو مطالعه، اهمیت روش‌های طراحی آزمایش در تولیدات میکروبی را نشان می‌دهد. در بررسی دیگری گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۱، تولید پلی هیدروکسی آلکانوات توسط *باسیلوس ترنجینسیس* جداسازی شده از خاک آلوده به پساب کارخانه دلسترسازی را با مناسب‌سازی دما، اسیدیته و هوادهی تا ۳۵ درصد افزایش دادند (۱۲). با وجود این که نتایج بررسی حاضر از میزان تولید در برخی پژوهش‌های دیگر بیشتر است، در مطالعات دیگر، نتایج بالاتری با استفاده از میکروارگانیسم‌های توانمند غیر بومی به دست آمده است. با این وجود که باکتری های مولد پلی هیدروکسی آلکانوات در گزارش قبلی از خاک های آلوده به نفت در مسجد سلیمان توسط کفیل زاده و همکاران جداسازی شده‌اند (۲۷)، بررسی حاضر برای نخستین بار بر روی پساب نفتی انجام گرفت و نشان داد باکتری‌های بومی جداسازی شده از این محیط‌ها توانایی در خور توجهی برای تولید پلی استرهای میکروبی دارند که با طراحی آزمایش دقیق‌تر و بهینه‌سازی بیشتر شرایط، می‌توان تولید

توسط آن‌ها را افزایش داد و با استفاده از آن‌ها می‌توان در ضمن تولید پلی‌مرهای زیستی، در زمینه کاهش آلایندگی زیستی ترکیبات نفتی اقدام کرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و از مدیریت و کارکنان پالایشگاه نفت اصفهان برای همکاری در تهیه نمونه، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Scott G., Lemaire J., Jakubowicz L., Ojeda T., Hebbar P. Statement by oxo-biodegradable plastics association regarding biodegradability of plastics containing oxo-biodegradable additives. *Oxo-Biodegradable Plastics* 2010; 20: 1- 2.

(2) Shamala TR., Chandrashekar A., Vijayendra SVN., Kshama L. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA) producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiolog* 2003; 94: 369- 74.

(3) Chee JY., Yoga SS., Lau NS., Ling SC., Abed RMM., Sudesh K. Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting renewable resources into bioplastics. In: Mendez A., editor. *Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. 2nd ed. Spain: Formatx; 2010; 1395- 404.

(4) Zinn M. Tailor-made synthesis of polyhydroxyalkanoate. *European Cells and Materials* 2003; 5: 38- 9.

(5) Law JH., Slepecky RA. Assay of poly-β-hydroxybutyrate acid. *Biological Sciences* 1960; 82: 1- 4.

(6) Holmes E., Bollard ME., Lindon JC., Mitchell SC., Branstetter D., Zhang W., et al. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic. *Journal of Material Sciences* 1981; 19: 781- 94.

(7) Joshi PA., Jaysawal SR. Isolation and characterization of poly-β-hydroxyalkanoate producing bacteria from sewage sample. *Journal of Cell and Tissue Research* 2010; 10: 2165- 168.

(8) Kunasundari B., Sudesh K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Expres Polymer Letters* 2011; 7 (5): 620- 34.

(9) Berekaa MM., Al Thawadi AM. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biopolymer by *Bacillus megaterium* SW1-2: Application of Box-Behnken design for optimization of process parameters. *African Journal of Microbiology Research* 2012; 6 (4): 838- 45.

(10) Fradinho JC., Domingos JMB., Carvalho G., Oehmen A., Reis MAM. Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. *Bioresource Technology* 2013; 132: 146- 53.

(11) Mokhtarani N., Ghanjidoost H., Sarnami MS. The effect of Nitrogen compounds on polyhydroxyalkanoates production in activated sludge. *Journal of Environmental Sciences and Technology* 2008; 3: 85- 92.

(12) Goudarzi Z., Zahiri HS., Chamani M., Noghabi KA. Isolation and characterization of a PHA-producing bacterial strain: biopolymer production under different growth conditions. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2011; 1: 23- 32.

(13) Mohsenpoor M., Amirmozafari N., Ghaemi N. Isolation of betaketothiolase gene (bktB) from *Ralstonia eutropha* for modification of biodegradable bioplastics. *Journal of Biology Science* 2008; 1: 67- 75.

(14) Naima A., Safia S., Ishtiaq A., Saadia A., Bashir A., Geoffery R. Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4 (14): 1537- 541.

(15) Santhanam A., Sasidharan S. Microbial production of polyhydroxy alkanotes (PHA) from *Alcaligens* spp. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9: 3144- 50.

(16) Preethi P., Sasikala R., Aravind J. Microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) utilizing fruit waste as a substrate. *Research in Biotechnology* 2012; 3: 61- 9.

(17) Jeyaseelan A., Pandiyan S., Ravi P. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) using hydrolyzed grass and *syzygium cumini* seed as low cost substrates. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2012; 2: 970- 82.

(18) Hahn SK., Chang YK., Lee SY. Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 1 (61): 34- 9.

(19) Macrae RM., Wilkinson JF. Poly-beta-hyroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology* 1958; 19: 210- 22.

(20) Yüksekdag Z., Aslım B., Beyatlı Y., Mercan N. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African Journal of Biotechnology* 2004; 3 (1): 63- 6.

(21) Rehman SH., Jamil N., Hussnain SH. Characterization and optimization of antibiotic resistant bacterial strains for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production. *Pakistan Journal of Agricultural Research* 2006; 4 (19): 1- 6.

(22) Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis., structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Polymer Science* 2000; 10: 1503- 55.

(23) Ramadas N., Singh SK., Soccol CR., Pandey A. Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2009; 1: 17- 23.

(24) Şafak S., Mercan N., Aslim B., Beyatli Y. A Study on the production of poly-beta-hydroxybutyrate by some eukaryotic microorganisms. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology* 2002; Special Issue: 11-17.

(25) Khosravi-Darani K., Vasheghani-Farahani E., Shojaosadati SA. Application of the Plackett-Burman statistical design to optimize poly (hydroxybutyrate) production by *Ralstonia eutropha* in batch culture, *Iranian Journal of Biotechnology* 2003; 1: 155- 61.

(26) Khosravi-Darani K., Vasheghani-Farahani E., Shojaosadati SA. Application of the Taguchi design for production of poly (ß- hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 2004; 23: 131- 36.

(27) Kafilzadeh F., Parto A., Motamedi H. Isolation and identification of PHA producing bacteria from oil contaminanted soils in Masjed Soleiman and optimization of producing conditions. *Biological Journal of Microorganisms*. 2015; 4: 117- 28.

---

[1]- Polyhydroxybutyrate (PHB)
[2]- Polyhydroxyalkanoates (PHAs)
[3]- *Bacillus*
[4]- *Azotobacter*
[5]- *Alcaligenes*
[6]- *Pseudomonas*
[7]- *Rhizobium*
[8]- *Bacillus megaterium*
[9]- Biopol
[10]- Mokhtarani
[11]- Goudarzi
[12]- Mohsenpoor
[13]- *Ralstonia eutropha*
[14]- Leuria Bertani Broth
[15]- Shin Saeng
[16]- Black Sudan
[17]- Xylene
[18]- Safranin

[19]- Crotonic acid
[20]- Yüksekdag
[21]- Rehman
[22]- Santhanam and Sasidharan
[23]- Preethi
[24]- Jeyaseelan
[25]- Hahn
[26]- Sudesh
[27]- Berekaa and Thawadi
[28]- Ramadas
[29]- Khosravi-Darani

Isolation of *Bacillus* sp Producing Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Isfahan Refinery Wastewater and Qualification of Production in Submerged Fermentation

Mahsa Keshavarz Azam
M.Sc. of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, mahsa.keshavarz@gmail.com
Nafiseh Sadat Naghavi *
Assistant Professor of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, naghavi@iaufala.ac.ir
Zahra Etemadifar
Assistant Professor of Microbiology, Isfahan University, Isfahan, Iran, z_etemadifar@yahoo.com

Abstract

Introduction: The aim of present study was isolation of polyhydroxybutyrate producing *Bacillus* species from oil refinery waste water, Isfahan, Iran and primarily optimization of production condition. Petroleum wastes are rich of carbon sources and have low amounts of nitrogen and phosphorus sources. AS the most important factor in production of intracellular inclusions is increasing the C/N ratio, it seemed that polyhydroxybutyrate producing microorganisms will be found in these wastes.

Materials and methods: *Bacillus* species were isolated and purified from oil refinery wastewater. The polymer was verified using different staining procedures. Polymer was extracted by digestion method and the optimum production conditions were investigated in minimal salt medium with the organic carbon source by submerged fermentation. Production of polyhydroxybutyrate was studied using dry weight and optical density measurement.

Results: Between various isolated *Bacillus* strains, two of them (B_1 and B_2) were polyhydroxybutyrate producers. Maximum PHA production based on dry weight and concentration were obtained for strain B_1 after 72 hours incubation, at 31°C, in the presence of glucose as carbon source and yeast extract as nitrogen source, pH=7, and aeration in 120 rpm; and for strain B_2 in the same condition, except optimal temperature which was 32°C. The most production amounts were 367 $mg.ml^{-1}$ for B_1 and 473 $mg.ml^{-1}$ for B_2 isolates. Also the most polymer percentage was 52/16 and 58.43 for B_1 and B_2 isolates respectively.

Discussion and conclusion: The results showed that the production of polyhydroxybutyrate was increased by optimization of the conditions in both isolates. Using petroleum wastes as well as production of biodegradable plastics, leads to decontamination of theses wastes.

Key words: Polyhydroxybutyrate, Biodegradable plastics, *Bacillus*, Optimized production conditions

* Corresponding author
Received: January 21, 2014 / **Accepted:** September 22, 2014