

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۶۱-۷۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

تجزیه زیستی ترکیبات مورد استفاده در صنایع پتروشیمی توسط باکتری تجزیه‌کننده تولوئن حاوی سیتوکروم P450

سیدمهدی قاسمی: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، smghasemi1985@gmail.com*
افروزالسادات حسینی ابری: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، afrouz_hosseini1985@yahoo.com
گیتی امتیازی: استناد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، entiazi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: با توجه به افزایش روزافزون آلاینده‌هایی نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک و مشکلات زیست محیطی ناشی از انتشار آن‌ها، تجزیه‌ی زیستی و پاک‌سازی این ترکیبات سمی توسط میکروارگانیسم‌ها از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. تولوئن یکی از مواد اصلی موجود در صنایع پتروشیمی و از مواد آلوده‌کننده رایج محیط زیست است که آثار مخربی بر سلامتی انسان و سایر موجودات زنده دارد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی تولوئن، از آب‌های نواحی مختلف از جمله سواحل دریای خزر و خلیج فارس و همچنین فاضلاب شهری نمونه‌برداری انجام شد. سویه‌ای که بیشترین توانایی را در تجزیه‌ی تولوئن داشت، با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی و توالی rDNA ۱۶S آن در بانک ژنی NCBI با عنوان *Bacterium Ex-DG74* با شماره HQ414235 ثبت شد. در ادامه میزان حذف تولوئن از محیط کشت با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری و کروماتوگرافی گازی، فعالیت آنزیمی سیتوکروم P450 و رشد در حضور آلاینده‌های نفتی و پتروشیمی بررسی شد.

نتایج: پس از انجام مراحل غنی‌سازی در محیط حاوی تولوئن، در حدود ۲۰ سویه جداسازی شد که در بین آن‌ها سویه‌ی جدا شده از پساب تصفیه‌خانه اصفهان توانایی بالایی در تحمل و مصرف تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی داشت. نتایج حاصل از طیف سنج نوری و کروماتوگرافی گازی مشخص کرد که این سویه می‌تواند تا غلظت (v/v) ۲۵ درصد تولوئن را به خوبی تحمل کند و بیش از ۷۰ درصد از تولوئن (v/v) ۱ درصد را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی مصرف کند. سویه‌ی *Bacterium Ex-DG74* علاوه بر تولوئن توانست در محیط‌های حاوی نفت سیاه، نفت سفید، زابلن، نفتالین، اولئیک اسید، استایرن، دی‌هیدروآبتیک اسید و پلی‌اکسی اتیلن اکتیل فنل اتر نیز به خوبی رشد کند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که فعالیت آنزیمی سیتوکروم P450، یکی از عوامل مهم در تجزیه‌ی آلاینده‌های مختلف توسط *Bacterium Ex-DG74* است. از این باکتری به علت توانایی رشد در غلظت بالای تولوئن و تجزیه‌ی دامنه‌ی وسیعی از آلاینده‌ها، می‌توان به عنوان بذر سلولی در پاک‌سازی محیط‌های آلوده به ترکیبات سمی مختلف استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پاک‌سازی زیستی، پساب پتروشیمی، تولوئن، سیتوکروم P450

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

نفت خام و مشتقات آن از راه‌های مختلف مثل نشت تانکرهای مخصوص حمل و نقل مواد نفتی و همچنین هنگام استخراج از چاه‌ها، محیط زیست را آلوده می‌کند. آلوده شدن آب و خاک به این مواد سمی می‌تواند مشکلات جدی برای اکوسیستم منطقه به وجود آورد. تیمار این ترکیبات با روش‌های فیزیکی و شیمیایی گران قیمت است اما پاک‌سازی زیستی علاوه بر آن که ارزان‌تر و مقرون به صرفه‌تر است، یک روش سازگار با محیط زیست بوده و امکان معدنی شدن کامل هیدروکربن‌های نفتی را فراهم می‌کند. پاک‌سازی زیستی یا Bioremediation فرآیندی است که در آن با استفاده از اجزای سلولی یا فعالیت‌های متابولیکی میکروارگانیسم‌ها می‌توان مواد سمی را از محیط حذف و یا به مواد غیر سمی و بی‌خطر تبدیل کرد (۱-۳).

یکی از گروه‌های اصلی ترکیبات موجود در نفت خام، هیدروکربن‌های آروماتیک است که به آن‌ها BTEX نیز گفته می‌شود. علت این نام‌گذاری حضور ۴ ماده سمی است که عبارتند از: بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن^۱. در بین این ترکیبات، تولوئن که به میزان زیادی در نفت و مشتقات آن وجود دارد به علت سمیت و خاصیت سرطان‌زایی خود، نگرانی‌های زیادی ایجاد کرده است. این ترکیب به میزان زیادی تولید و به عنوان سوخت، حلال و پیش‌ساز موادی مثل پلاستیک‌ها، فیبرهای سنتزی و آفت‌کش‌ها استفاده می‌شود (۴ و ۵). از جمله مواد دیگر موجود در پساب پتروشیمی می‌توان سورفکتانت‌هایی نظیر اولئیک اسید و پلی‌اکسی‌اتیلن اکتیل فنل‌اتر (تریتون X-100) و مواد دیگری مثل تولوئن، استایرن و دی‌هیدروآبتیک اسید (DHA) را نام برد (۶ و ۷). با وجود سمیت تولوئن و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها، تجزیه‌ی زیستی این ترکیب در محیط‌های مختلف توسط باکتری‌های مختلفی که قادرند از آن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند،

دیده شده است. از جمله باکتری‌های گزارش شده تجزیه‌کننده تولوئن می‌توان گونه‌های مختلف جنس‌های *Burkholderia*، *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Exiguobacterium* را نام برد (۸-۱۱).

سویه‌های بومی هر ناحیه به علت سازگاری بیشتر به شرایط آن ناحیه مثل دما، شوری، اسیدیته و غیره، برای تجزیه و حذف مواد آلوده‌کننده کارآیی بهتری دارند (۱۲). با توجه به اثرات سمی و سرطان‌زایی تولوئن و این که ورود آن به آب‌های آزاد و زیرزمینی می‌تواند زندگی آبزیان، انسان و سایر موجودات را تهدید کند، ضرورت جداسازی میکروارگانیسم‌هایی که قادر به تجزیه زیستی این ترکیب هستند مشخص می‌شود.

هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری تجزیه‌کننده‌ی تولوئن و بررسی قدرت متابولیکی آن در مصرف ترکیبات سمی و آلاینده‌های مختلف بود. در این پژوهش، یک باکتری با توانایی بالا در تجزیه تولوئن از پساب فاضلاب اصفهان جداسازی شد که توانایی مصرف سایر آلاینده‌های نفتی و صنایع پتروشیمی را نیز داشت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

نمونه‌برداری از آب‌های ساحلی دریای خزر، خلیج فارس و همچنین تصفیه‌خانه فاضلاب اصفهان انجام شد. برای کاهش احتمال وجود باکتری‌های غیر بومی، نمونه‌ها از عمق ۱۵ سانتی‌متری در شیشه‌های درب دار استریل جمع‌آوری و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی باکتری تجزیه‌کننده تولوئن

به منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی تولوئن، یک میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌ها به ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی موجود در ارلن‌های در پیچ‌دار که حاوی ۴ گرم KH_2PO_4 ، ۴ گرم Na_2HPO_4 ، ۲ گرم NH_4Cl ، ۰/۲ گرم MgSO_4 ، ۰/۰۰۱

5'-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3' تکثیر شد (۱۷).

مخلوط PCR حاوی ۲ میکرولیتر DNA باکتری به عنوان الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول) و ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم DNA پلیمراز Taq (۵ U/ μ L) بود. حجم نهایی مخلوط با استفاده از آب دیونیزه دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR با دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه برای یک سیکل آغاز شد و با برنامه دمایی به شکل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه به تعداد ۳۰ سیکل تکرار شد. واکنش PCR با پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه برای یک سیکل به پایان رسید (۱۸). محصول DNA الگو به همراه نمونه شاهد (حاوی تمام مواد PCR به جز DNA الگو) و نشانگر اندازه DNA، بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید و بافر TBE^۲ به مدت ۹۰ دقیقه در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد و توسط دستگاه ژل داکيومنتاسیون (Biometra ساخت آلمان) با تابش اشعه ی ماورای بنفش مشاهده شد. تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن rDNA ۱۶S توسط شرکت Eurofin آلمان انجام شد.

بررسی میزان رشد و تجزیه تولوئن با استفاده از طیف سنج نوری

ابتدا غلظتی معادل با ۰/۵ مک فارلند از باکتری در محیط پایه نمکی تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از آن به ۱۰ میلی لیتر محیط‌های کشت حاوی ۱ درصد تولوئن افزوده شد. پس از گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، میزان رشد باکتری با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری (Shimadzu ساخت ژاپن) در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. سپس به منظور تعیین

گرم $CaCl_2$ و ۰/۰۰۱ گرم $FeCl_3$ در یک لیتر آب مقطر بودند، افزوده شد. تولوئن به میزان یک درصد درون هر یک از محیط‌ها ریخته شد. سپس ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. پس از یک ماه غنی سازی، سوبه‌های تجزیه کننده‌ی تولوئن با انتقال به محیط تولوئن آگار (حاوی محیط پایه نمکی، تولوئن و آگار) و انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد جداسازی شدند. به منظور حذف سوبه‌های اتوتروف، کلونی‌های به دست آمده به محیط‌های پایه نمکی حاوی و فاقد تولوئن منتقل شدند. سوبه‌هایی که فقط بر روی محیط حاوی تولوئن رشد کردند، برای بررسی بیشتر در محیط حاوی ۵۰ درصد گلیسرول و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۸ و ۱۳).

بررسی خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی باکتری

خصوصیات ظاهری باکتری تجزیه کننده‌ی تولوئن، نوع واکنش گرم، رنگ آمیزی اسپور و اسید فاست و همچنین آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلفی نظیر سنجش آنزیم‌های کاتالاز و اکسیداز، احیای نترات، حرکت، رشد در شرایط هوازی و بی هوازی، دما، اسیدیته بهینه و میزان تحمل به غلظت تولوئن و نمک بررسی شد (۱۴ و ۱۵).

شناسایی مولکولی باکتری

به منظور شناسایی دقیق باکتری جداسازی شده، از روش مولکولی تکثیر و تعیین توالی rDNA ۱۶S استفاده شد. بدین منظور مقداری از کلونی تازه باکتری را در میکروتیوب حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل کرده و پس از ۲ بار شستشو، به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس برای حذف ضایعات باکتری، نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ و مایع‌رویی به عنوان الگو در PCR استفاده شد (۱۶).

در این پژوهش، بخشی از توالی rDNA ۱۶S با طولی در حدود ۳۷۰ جفت باز با کمک پرایمر رفت DG74 با توالی 5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3' و پرایمر برگشت RW01 با توالی

مایع رویی که حاوی سیتوکروم P450 است به لوله آزمایشی که حاوی یک میلی‌لیتر از هر کدام از محلول‌های بافر سنجش (۳۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (۷/۸ اسیدیته) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA)، بافر رقیق‌کننده آنزیمی (۳۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (۷/۸ اسیدیته) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلومین سرم گاوی) و سوبسترا (۵۰۰ میکرومولار فری‌سیانید پتاسیم در ۵۰ میلی‌مولار تریس اسید کلریدریک با ۷/۲ اسیدیته) بود، افزوده شد. نمونه شاهد منفی هر سه محلول را شامل می‌شود اما فاقد عصاره‌ی سلولی است. مقدار کاهش جذب نمونه در ۴۳۰ نانومتر پس از نیم ساعت قرار گرفتن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، دلالت بر فعالیت سیتوکروم P450 و احیای فری‌سیانید پتاسیم دارد (۱۹). از سویه *Acinetobacter PG-3* که در مطالعات قبلی جداسازی شده بود به عنوان شاهد مثبت استفاده شد (۲۰).

بررسی رشد باکتری در حضور سایر آلاینده‌های نفتی

پس از تهیه ۰/۵ مک فارلند از سویه‌ی مورد آزمایش، به میزان ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی حاوی یک درصد نفت سیاه، نفت سفید، زایلن و ۵ میلی‌گرم نفتالین به عنوان تنها منبع کربن و انرژی افزوده و بیشترین میزان رشد باکتری پس از گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر در مقایسه با شاهد تعیین شد.

بررسی رشد باکتری در حضور آلاینده‌های موجود در پساب پتروشیمی

۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظتی معادل با ۰/۵ مک فارلند به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی حاوی یک درصد اولئیک اسید، استایرن، دی‌هیدروآبتیک اسید و پلی‌اکسی اتیلن اکتیل فنل اتر به عنوان تنها منبع کربن و انرژی افزوده شد. بیشترین میزان

میزان تولوئن باقیمانده در محیط کشت، ابتدا سوسپانسیون سلولی به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. به مایع رویی یک میلی‌لیتر هگزان اضافه و به شدت تکان داده شد تا تولوئن موجود در محیط کشت در هگزان حل شود. در پایان، از فاز رویی که حاوی هگزان و تولوئن است برای اندازه‌گیری میزان تولوئن در طول موج ۲۶۲ نانومتر استفاده شد. از محیط کشت حاوی تولوئن و فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده شد. همچنین تعیین میزان رشد و تحمل باکتری نسبت به غلظت‌های ۵ تا ۲۵ درصد تولوئن، به همین شکل انجام شد (۱۳).

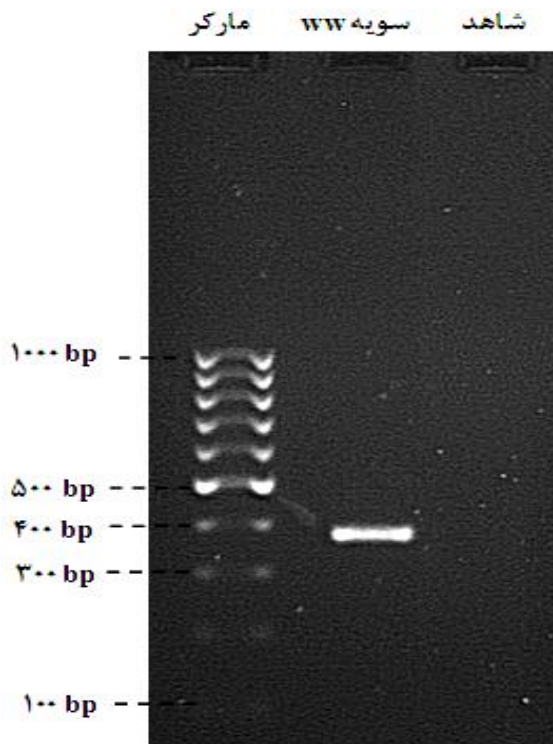
بررسی تجزیه‌ی تولوئن با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC)

پس از بررسی تجزیه‌ی تولوئن با روش طیف‌سنجی، برای تأیید نتایج، میزان تجزیه تولوئن توسط سویه جداسازی شده با استفاده از کروماتوگرافی گازی (Avondale ساخت آمریکا) مجهز به آشکار کننده یونیزاسیون شعله‌ای^۳ (FID) و ستون HP1 اندازه‌گیری شد. برنامه دمایی GC به این شکل تنظیم شد: درجه حرارت ستون از ۶۰ تا ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد (با سرعت ۷ درجه سانتی‌گراد در دقیقه)، دمای تزریق کننده ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکار کننده ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد. از گاز هلیوم با فشار ۳۴ psi به عنوان گاز حامل استفاده شد. از محیط کشت حاوی تولوئن و فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیمی سیتوکروم P450

برای آماده‌سازی توده سلولی، کشت ۲۴ ساعته از سویه‌ی مورد نظر در محیط حاوی تولوئن تهیه شد. پس از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، به منظور شکستن غشای توده سلولی با استفاده از دستگاه فراصوت (Hielscher UP200H ساخت آلمان)، سلول‌ها در ۴ فاصله زمانی مختلف، هر بار ۳۰ ثانیه در معرض امواج فراصوت (دوره ۰/۵ و دامنه ۴۰ درصد) قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ مجدد، ۲۰۰ میکرولیتر از

شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR با طولی حدود ۳۷۰ جفت باز را بر روی ژل آگاروز نشان می دهد. توالی rDNA ۱۶S حاصل از واکنش PCR این باکتری پس از تعیین ترادف، با عنوان *Bacterium Ex-DG74* و با شماره HQ414235 در بانک ژنی NCBI ثبت شد.



شکل ۱- باند rDNA ۱۶S حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز
۱/۵

میزان رشد و تجزیه تولوئن: بر اساس نتایج حاصل از طیف سنج نوری بیشترین میزان رشد ($OD=0.71$) و تجزیه تولوئن (۷۹ درصد) پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد مشاهده شد. بررسی های انجام شده توسط GC و مقایسه ارتفاع پیک های به دست آمده (در زمان ۸/۱۳ دقیقه) از نمونه اصلی ($[pA]=454/9$) و نمونه های شاهد ($[pA]=2025$) نشان داد تولوئن باقیمانده در محیط کشت در حدود ۲۲/۵ درصد نسبت به مقدار نخستین است (جدول ۲).

رشد باکتری پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد توسط طیف سنج نوری در ۶۰۰ نانومتر در مقایسه با شاهد بررسی شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی

پس از انجام نمونه گیری از آب های مختلف و غنی سازی در محیط پایه نمکی حاوی تولوئن، حدود ۲۰ سویه باکتریایی تجزیه کننده تولوئن جداسازی شدند که در میان آن ها سویه ی به دست آمده از پساب تصفیه خانه ی فاضلاب اصفهان (سویه WW) بالاترین توانایی را در مصرف تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی از خود نشان داد. جدول ۱ ویژگی های ظاهری، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این باکتری را نشان می دهد.

جدول ۱- خصوصیات ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

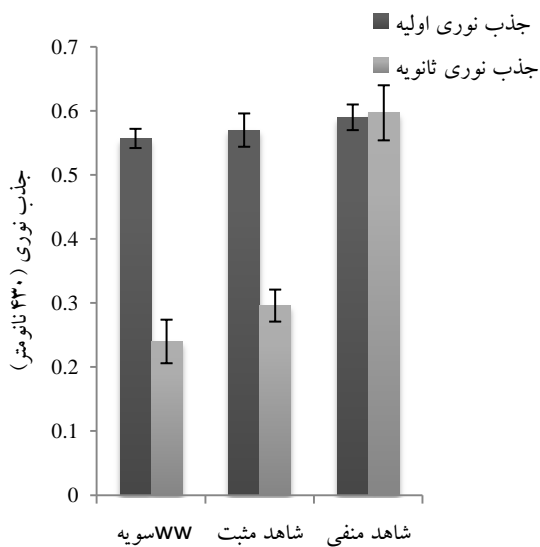
باکتری

<i>Bacterium Ex-DG74</i>	آزمایش های شناسایی
باسیل، کورینه فرم	شکل
مثبت	واکنش گرم
منفی	اسید فاست
منفی	تولید اسپور
مثبت	حرکت
مثبت	اکسیداز
مثبت	کاتالاز
منفی	احیای نترات
مثبت	رشد هوازی
مثبت	رشد بی هوازی
۷	اسیدیته بهینه رشد
۲۸ درجه سانتی گراد	دمای بهینه رشد
تا ۲۵ درصد	تحمل تولوئن
تا ۲۰ درصد	تحمل نمک

جدول ۲- حداکثر میزان رشد و تجزیه‌ی تولوئن توسط باکتری

حذف تولوئن (کروماتوگرافی گازی)	حذف تولوئن (طیف سنج نوری)	میزان رشد (OD _{600nm})	باکتری
۷۷/۵ درصد	۷۹ درصد	۰/۷۱	<i>Bacterium Ex-DG74</i>

که بیانگر فعالیت سیتوکروم P450 و احیای فری سیانید پتاسیم است.

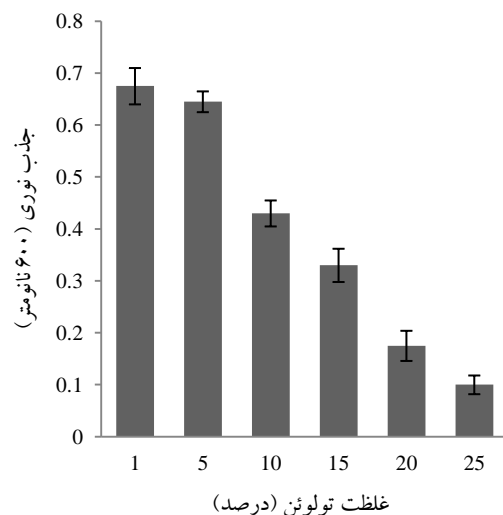


شکل ۳- کاهش جذب نوری در نتیجه فعالیت سیتوکروم P450 باکتری

رشد در حضور آلاینده‌های نفتی و پتروشیمی

با توجه به نتایج، *Bacterium Ex-DG74* قادر است بر روی دامنه وسیعی از آلاینده‌های نفتی و پتروشیمی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی رشد کند (شکل ۴). همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، این سویه توانایی بیشتری در رشد بر روی آلاینده‌های نفتی از خود نشان داد.

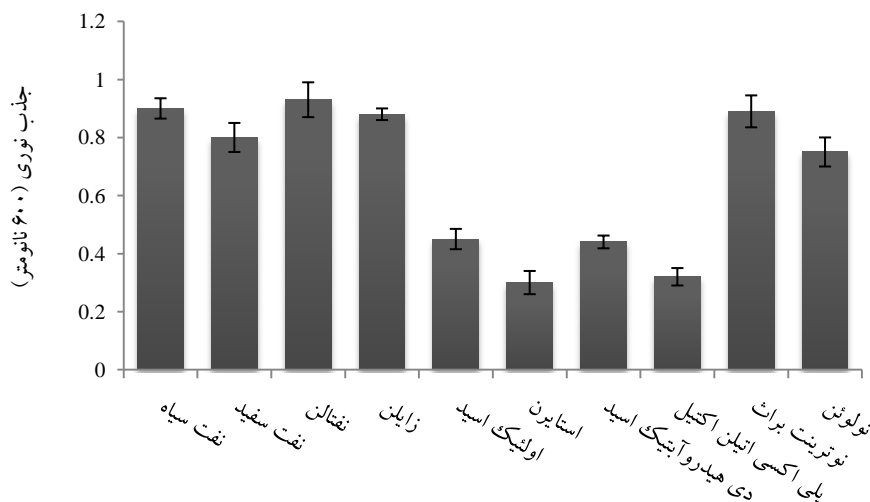
از آنجایی که تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در محیط کشت بود، باکتری در محیط فاقد تولوئن رشدی نداشت. بررسی میزان رشد در غلظت‌های مختلف تولوئن مشخص کرد که مناسب‌ترین غلظت برای رشد بهینه‌ی باکتری ۱ تا ۵ درصد است. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، *Bacterium Ex-DG74* قادر است تا غلظت ۲۵ درصد تولوئن را تحمل کند.



شکل ۲- اثر غلظت تولوئن بر رشد باکتری

فعالیت سیتوکروم P450

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، *Bacterium Ex-DG74* توانست مانند کنترل مثبت جذب نوری را در طول موج ۴۳۰ نانومتر کاهش دهد



شکل ۴- میزان رشد باکتری بر روی آلاندهای نفتی و پتروشیمی در مقایسه با میزان رشد بر روی محیط حاوی تولوئن و نوترینت برات

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اینکه کشور ما در مجاورت خلیج فارس، دریای عمان و دریای خزر قرار دارد، حمل و نقل، جابه جایی، تخلیه و بارگیری فرآورده‌های مختلف نفتی مانند حلال‌ها، مواد پتروشیمیایی و بسیاری دیگر از محصولات نفتی یکی از منابع مهم آلودگی سواحل در بنادر محسوب می‌شود. از این رو آلودگی آب‌ها به مشتقات نفتی از معضله‌های اساسی است. با وجود سمیت تولوئن برای موجودات زنده، تجزیه تولوئن در محیط زیست توسط میکروارگانیسم‌های مختلف انجام می‌شود (۸). از این رو، میکروارگانیسم‌ها و بویژه باکتری‌ها به علت داشتن قدرت متابولیکی بالا و در نتیجه تطابق سریع با محیط اطراف خود، برای حذف آلاندهای زیست محیطی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته اند (۲۱). در مطالعه حاضر، باکتری تجزیه کننده‌ی تولوئن، *Bacterium Ex-DG74*، از پساب تصفیه‌خانه‌ی اصفهان جداسازی شد. ورود این سویه در پساب تصفیه‌خانه می‌تواند نشانه وجود آلاندهای نفتی و ورود پساب‌های حاوی تولوئن کارخانه‌ها در این محیط باشد. در مقایسه با مطالعاتی که در گذشته در زمینه تجزیه‌ی تولوئن انجام شده، این

باکتری توانایی بالایی در تحمل و تجزیه‌ی تولوئن و سایر آلاندهای پتروشیمیایی دارد (۲۲ و ۲۳). بر اساس مطالعه وانگ^۴ و همکاران سویه‌های تجزیه کننده تولوئن *Bacillus* (JB5) و *(Exiguobacterium gaetbuli)* LJ8 *mojavensis* قادرند به ترتیب غلظت ۱۰ و ۱۵ درصد تولوئن را تحمل کنند (۸). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی سویه‌های *Bacillus pumilus* انجام شده، میزان حذف تولوئن فقط ۲۵ درصد گزارش شده است (۲۴). توانایی ایجاد کدورتی با جذب نوری بیش از ۰/۷ در محیط تولوئن برات، قابلیت تجزیه بیش از ۷۰ درصد از تولوئن موجود در محیط کشت در مدت ۲۴ ساعت، قدرت تحمل غلظت ۲۵ درصدی تولوئن و همچنین رشد بر روی دامنه‌ی وسیعی از ترکیب‌های سمی نفتی و پتروشیمی، این سویه را در مقایسه با سایر سویه‌ها منحصر به فرد کرده است.

مطالعاتی که در گذشته بر روی این باکتری انجام شده است نشان می‌دهد که *Bacterium Ex-DG74* قادر است به میزان زیادی آنزیم‌های پراکسیدازی نظیر کاتالاز و لاکاز تولید کند (۱۳). با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که توانایی بالای این سویه در پاک‌سازی زیستی آلاندهای مختلف علاوه بر

References

- (1) Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59(2-3): 143-52.
- (2) Paul D, Pandey G, Pandey J, Ain RK. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trend Biotechnol* 2005; 23(3): 135-42.
- (3) Kuiper I, Lagendij EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant-Microbe Interact* 2004; 17(1): 6-15.
- (4) Chapelle FH. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: The perspectives of history and hydrology. *Ground Water* 1999; 37(1): 122-32.
- (5) Zilli M, Del Borghi A, Converti A. Toluene removal vapor in a laboratory-scale biofilter. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 54(2): 248-54.
- (6) Frigon JC, Stephenson R, Larab'ee S, Guiot S. Biotreatment of resin acid by a coupled anaerobic/aerobic integrated system. *Pulp Pap Can* 1999; 100(5): 131-4.
- (7) Shackelford WM, Keith LH. Frequency of organic compounds identified in water, EPA 600/4-76-062. NTIS No. PB-265470, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, Athens, GA, 1976.
- (8) Wang L, Qiao N, Sun F, Shao Z. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles* 2008; 12(3): 335-42.
- (9) Newman LM, Wackett LP. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* 1995; 34(43): 14066-76.
- (10) Olsen RH, Kukor JJ, Kaphammer B. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J Bacteriol* 1994; 176(12): 3749-56.

وجود آنزیم‌های پراکسیدازی به علت فعالیت سیتوکروم P450 است. سیتوکروم P450 پروتئین آهن‌داری است که در سلسله‌ی گیاهی، جانوری، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارد و به عنوان یک مونواکسیژناز انتهایی در زنجیره انتقال الکترون، در سمیت‌زدایی نقش به‌سزایی ایفا می‌کند (۲۵). سیتوکروم P450 باکتریایی محلول است ولی نوع یوکاریوتی آن‌ها متصل به غشاست که این امر خالص‌سازی آنزیم‌های باکتریایی را راحت‌تر می‌کند. سیتوکروم P450 دارای کاربردهای متعددی است از جمله سیستمی برای متابولیزه کردن ترکیباتی از قبیل ترپن‌ها و آلکان‌هاست که از این سیستم می‌توان در تجزیه‌ی پساب‌های آلی و آلاینده‌ها به خوبی استفاده کرد. بنابراین، این پروتئین با فعالیت اکسیژنازی خود از عوامل مهم در تجزیه‌ی حلال‌هایی مانند تولوئن و سورفکتانت‌هایی نظیر اسید اولئیک و غیره محسوب می‌شوند (۲۶).

در این پژوهش، سویه‌ی *Bacterium Ex-DG74* به عنوان یک گزینه‌ی مناسب برای پاک‌سازی زیستی محیط‌های آلوده به مواد نفتی و پساب پتروشیمی معرفی شد. بر اساس مطالعات قبلی و یافته‌های این پژوهش به نظر می‌رسد آنزیم‌های لاکاز و کاتالاز و همچنین سیتوکروم P450 نقش مهمی در تجزیه‌ی آلاینده‌های مختلف توسط این باکتری ایفا می‌کنند. بنابراین به علت توانایی رشد در غلظت بالای تولوئن و تجزیه‌ی دامنه وسیعی از آلاینده‌ها، از این باکتری می‌توان به عنوان بذرسلولی در پاک‌سازی محیط‌های آلوده به ترکیب‌های سمی مختلف استفاده کرد.

- (11) Whited GM, Gibson DT. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J Bacteriol* 1991; 173(9): 3010-6.
- (12) Farhadian M, Duchez D, Vachelard C, Larroche C. BTX removal from polluted water through bioleaching processes. *Appl Biochem Biotechnol* 2008; 151(2-3): 295-306.
- (13) Hosseini Abari A, Emtiazi G, Ghasemi SM. The role of exopolysaccharide, biosurfactant and peroxidase enzymes on toluene degradation by bacteria isolated from marine and wastewater environments. *Jundishapur J Microbiol* 2012; 5(3): 479-85.
- (14) Slepecky RA, Hemphill HE. The genus *Bacillus*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackbrandt E, editors. *The prokaryotes*. 3rd ed. New York: Springer; 2006.
- (15) Hosseini Abari A, Emtiazi G, Ghasemi SM, Roghanian R. Isolation and characterization of a novel toluene-utilizing bacterium exhibiting potential application in bioremediation. *Jundishapur J Microbiol* 2013;(in press)
- (16) Li S, Qu Y, Hu D, Shi Y. Comparison of extended spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* with non-ESBLs-producing *E.coli*: drug-resistance and virulence. *World J Emerg Med* 2012; 3(3): 208-12.
- (17) Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR Primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2): 335-51.
- (18) Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HG. Polymerase Chain Reaction (PCR) detection of *listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22(2): 153-8.
- (19) Schellenberg KA, Hellerman L. Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* 1959; 231(1): 547-56.
- (20) Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar Poll Bull* 2012; 64(1): 7-12.
- (21) Atlas RM, Cerniglia CE. Bioremediation of petroleum pollutants: Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *Bioscience* 1995; 45(5): 332-8.
- (22) Hurbert C, Shen Y, Voordouw G. Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentration of toluene. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(7): 3064-70
- (23) Fan S, Scow KM. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial population in soil. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59(6): 1911-8.
- (24) Rahman RN, Mahamad S, Salleh AB, Basri M. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007; 34(7): 509-17.
- (25) Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450: multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 1991; 266(21): 13469-72.
- (26) Munro AW, Lindsay JG. Bacterial cytochromes P450. *Mol Microbiol* 1996; 20(6): 1115-25.

¹. Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene (BTEX)

². Tris/Borate/EDTA

³. Flame ionization detector

⁴. Wang