Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۲۵- ۳۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۲۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک- قلیادوست تجزیه کننده فنل و ارزیابی عملکرد آن‌ها

نرگس ابویسانی: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، nabavisani@ut.ac.ir
محمد علی آموزگار *: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
سیدمحمدمهدی دستغیب: استادیار بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، ایران، dastgheibsmm@ripi.ir

چکیده

مقدمه: ترکیبات فنلی جزو سمی‌ترین آلاینده‌های محیط زیست به شمار می‌آیند. بنابراین، وجود این ترکیبات در پساب‌های صنعتی مشکل بزرگی محسوب می‌شود. تجزیه زیستی فنل روشی است که می‌تواند جایگزین روش‌های فیزیکی- شیمیایی مرسوم شود. هدف از این مطالعه جداسازی میکروارگانیسم‌های نمک- قلیادوست تجزیه کننده فنل به منظور حذف این ترکیب از پساب‌های صنعتی با شرایط شور و قلیایی است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از خاک و آب‌های آلوده به ترکیبات نفتی انجام شد. بعد از غنی‌سازی نمونه‌ها در محیط پایه معدنی دارای فنل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی، کنسرسیوم میکروبی به دست آمده خالص‌سازی شد. سویه‌های تجزیه کننده فنل شناسایی مولکولی شدند. بهترین سویه انتخاب و شرایط رشد آن در حضور فنل بهینه‌سازی شد.

نتایج: سه سویه تجزیه‌کننده فنل متعلق به جنس‌های باکتریایی *Halomonas*، *Janibacter* و *Pseudomonas* از نمونه‌های آب مخزن جداسازی و شناسایی شد. در این میان سویه YF3 با ۹۸/۹۲ درصد شباهت به *Janibacter cremeus* به علت سرعت رشد بالاتر در محیط پایه معدنی دارای فنل به عنوان سویه برتر شناسایی شد. این سویه کوکوس گرم مثبت با محدوده تحمل سدیم کلراید ۱ تا ۱۰ درصد و بهینه غلظت ۵ درصد است.

بحث و نتیجه‌گیری: YF3 قادر به رشد در شرایط قلیایی با اسیدتیه ۹/۵ و بهینه غلظت فنل ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است. بیش‌ترین رشد این سویه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در حضور نمک سدیم نیترات به عنوان منبع نیتروژن است. دامنه تحمل شرایط سخت برای این سویه نمک- قلیادوست از نظر اسیدیته و غلظت فنل به ترتیب ۶/۵ تا ۹/۵ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود که نشان‌دهنده پتانسیل بالای این سویه اکستریموفیل، در حذف فنل است و می‌تواند به عنوان سویه‌ای کاربردی در حذف ترکیبات فنلی از پساب‌های شور و قلیایی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پساب‌های صنعتی، تجزیه زیستی، ترکیبات فنلی، نمک- قلیادوست، *Janibacter*

* نویسنده مسؤول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آلاینده‌های محیطی با اثرات سمی خود بر روی ارگانیسم‌های زنده، اکوسیستم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در میان این آلاینده‌ها، ترکیبات آروماتیک به علت پایداری ترمودینامیکی بالای حلقه بنزنی یکی از بزرگ‌ترین مشکلات زیست محیطی به شمار می‌آیند (۱). یکی از این ترکیبات آروماتیک فنل است که طبق گزارش آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا در گروه سمی‌ترین آلاینده‌ها قرار می‌گیرد (۲).

پساب‌های تولید شده از سوخت‌های فسیلی، پالایشگاه‌ها، صنایع داروسازی، کارخانه‌های رنگ‌سازی و حشره‌کش‌ها مهم‌ترین منابع برای تولید آلودگی‌های فنلی هستند (۳). روش‌های فیزیکی- شیمیایی حذف فنل شامل: اکسیداسیون شیمیایی، جذب کربن فعال، استخراج با حلال و تجزیه فتوکاتالیستی است که انجام این روش‌ها با مشکلاتی روبروست (۳- ۴). این روش‌ها هزینه زیادی در بر دارند و با انجام آن‌ها معمولا فنل به محیطی دیگر منتقل شده یا به ماده‌ای با سمیت کمتر تبدیل می‌شود که خود به عنوان یک آلاینده شناخته می‌شود. اما تجزیه زیستی فنل روشی است که علاوه بر سازگاری با محیط زیست و هزینه پایین، به علت تجزیه کامل فنل به مواد معدنی (آب و دی اکسید کربن) بر سایر روش‌ها ترجیح داده می‌شود (۵- ۶). تجزیه زیستی فرآیندی است که بسیاری از عامل‌های زیستی و غیرزیستی بر روی آن تأثیر می‌گذارند. عامل‌های زیادی وجود دارد که با جلوگیری و یا تحریک رشد میکروارگانیسم می‌تواند بر روی توانایی تجزیه یا متابولیسم آن تأثیرگذار باشد. این عامل‌ها شامل: دما، اسیدیته، غلظت سوبسترا، ویژگی‌های فیزیکی آلاینده و میزان اکسیژن و دسترسی به آن است (۷). مطالعات زیادی در زمینه تجزیه زیستی فنل انجام شده است. یکی از باکتری‌های مهم در زمینه تجزیه زیستی فنل *Pseudomonas putida* است که تاکنون گزارش‌های متعددی درباره تجزیه فنل توسط این باکتری در شرایط مختلف از جمله حالت تثبیت شده و یا در بیورآکتورهای متفاوت ارائه شده است (۸- ۱۰). بیش‌ترین غلظتی که این باکتری توانایی تجزیه آن را داراست، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است (۱۱). باکتری‌های دیگری از جمله جنس‌های *Halomonas*، *Acinetobacter*، *Alcaligenes* و *Ewingella* در رابطه با تجزیه زیستی فنل گزارش شده‌اند. پساب‌های صنعتی شور و قلیایی که دارای فنل هستند، به علت شرایط فیزیکی خاص آن‌ها یکی از مشکلات صنایع برای تصفیه زیستی هستند. یکی از انواع این پساب‌ها که در حین تصفیه نفت خام تولید می‌شود، اسپنت کاستیک[1] نامیده می‌شود (۱۲). شرایط اکستریم موجود در این پساب‌ها، می‌تواند باعث مرگ یا مهار رشد سویه‌های غیر اکستریم شود. هدف این مطالعه، تجزیه زیستی فنل در شرایط اکستریم است که به این منظور جداسازی، شناسایی و بررسی شرایط رشد میکروارگانیسم‌های نمک-قلیادوست[2] تجزیه کننده فنل در دستور کار قرار گرفت تا با کمک آن‌ها بتوان پساب‌های صنعتی شور-قلیایی را تصفیه کرد.

مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی سویه‌های نمک- قلیادوست تجزیه کننده فنل نمونه‌گیری از خاک‌های شور و آلوده به نفت پالایشگاه تهران، خاک‌های شور قم، خاک‌های شور و آلوده به نفت جزیره خارک و آب مخزن میدان نفتی یادآوران انجام شد. نمونه‌ها در شرایط استریل به

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. میزان شوری، TDS و اسیدیته نمونه‌ها توسط دستگاه مالتی‌متر MettlerToledo اندازه‌گیری شد. غنی‌سازی نمونه‌ها بر روی محیط پایه معدنی که فنل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی به آن افزوده شد، انجام شد (۱۳). درصد شوری محیط ۵ درصد و اسیدیته محیط کشت بر روی ۸/۵ تنظیم شد. این محیط پایه معدنی شامل مونوپتاسیم فسفات ۱ گرم در لیتر، دی آمونیوم هیدروژن فسفات ۱ گرم درلیتر، پتاسیم نیترات ۱ گرم درلیتر، منیزیم سولفات ۰/۲ گرم درلیتر و فریک کلرید ۰/۰۵ گرم درلیتر بود. فنل به عنوان تنها منبع کربن به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزوده شد.

جداسازی کشت مخلوط میکروبی: یک گرم از نمونه‌های خاک و آب مناطق مختلف، در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری با ۲۰ میلی‌لیترمحیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل به مدت دو روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm انکوبه شد. بعد از ۲ روز مخلوط‌سازی، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط اولیه به محیط جدید منتقل شد و به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm گرمخانه‌گذاری شد. پاساژ دادن نمونه‌ها در محیط حاوی فنل تا ۵ دور انجام شد. در نهایت، محیط‌هایی که رشد میکروبی مشخص در آن‌ها مشاهده شد، برای جداسازی سویه‌های خالص از کشت مخلوط میکروبی تجزیه کننده فنل انتخاب شدند.

خالص‌سازی: برای جداسازی سویه‌های خالص، رقت‌های متوالی تا 10^{-6} از کشت مخلوط تهیه و به محیط R_2A آگار منتقل شد و با استفاده از میله L شکل در داخل پلیت پخش شدند. R_2A آگار محیطی کمابیش فقیر با تنوع ترکیات منبع کربن برای جداسازی بیشتر باکتری‌های محیطی است. ترکیبات این محیط کشت (گرم بر لیتر) شامل پپتون ۰/۵، کازآمینواسید ۰/۵، دکستروز ۰/۵، نشاسته ۰/۵، سدیم پیرووات ۰/۳، دی پتاسیم فسفات ۰/۳، منیزیم سولفات ۰/۰۵ و سدیم کلراید ۵۰ است (۱۴). پلیت‌ها به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از این مدت تک کلونی‌های رشد کرده، به روش خطی در محیط جدید R_2A آگار کشت داده شد.خالص‌سازی جدایه‌ها براساس اختلافات ریخت‌شناسی (شکل و رنگ کلونی و ...) انجام شد. تجدید کشت تا زمان اطمینان از خالص بودن سویه‌ها انجام شد (۱۵).

انتخاب سویه برتر: بعد از خالص‌سازی سویه‌ها، برای اطمینان از اینکه هر سویه به تنهایی قابلیت تجزیه فنل را داراست، سویه‌ها به محیط کشت مایع پایه معدنی تلقیح شدند. به این شکل که سوسپانسیون با کدورت نیم مک فارلند از سویه‌ها تهیه شد و به محیط پایه معدنی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم درلیتر فنل تلقیح شد. در این مرحله بهترین سویه از نظر رشد و تجزیه کنندگی فنل در مقایسه با سایر سویه‌ها انتخاب شد و بهینه‌سازی شرایط رشد برای سویه مورد نظر انجام گرفت (۱۶).

بهینه‌سازی شرایط رشد سویه برتر: مهم‌ترین شاخص‌ها برای فعالیت سویه برتر، میزان تحمل سدیم کلراید و قلیایی بودن و میزان تحمل فنل با توجه به سمیت بالای این ترکیب بود.

برای بهینه‌سازی غلظت سدیم کلراید، محیط کشت پایه معدنی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل با درصدهای متفاوتی(صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد. برای مطالعه اثر اسیدیته روی رشد باکتری، اسیدیته‌های ۶/۵، ۷/۵، ۸/۵، ۹/۵ و ۱۰/۵ بررسی شد. در مورد بهینه‌سازی شرایط رشد

www.SID.ir

Archive of SID

در حضور فنل، غلظت‌های ۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل تهیه شد. علاوه بر عوامل یاد شده، دو عامل دیگر یعنی دما (۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و تأثیر نمک‌های مختلف ($NaNO_3$، KCl، Na_2SO_4 و NaCl) در غلظت ۵ درصد حجمی- وزنی نیز با توجه به شرایط فرآیند تصفیه پساب بررسی شد.

سنجش حذف فنل: به منظور بررسی میزان حذف فنل در هر آزمایش، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به ویال منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۱۵۰۰g سانتریفوژ شد. پس از آن محلول رویی برای خواندن جذب در ۲۷۰ نانومتر (طول موجی که در آن ترکیبات آروماتیک دارای پیک جذب نوری هستند.) به کووت‌های کوارتز منتقل شد. جذب نمونه‌ها در برابر محیط کشت بدون فنل به عنوان شاهد خوانده شد. تمام آزمایش‌ها با سه با تکرار انجام شد (۱۶- ۱۹).

به منظور تایید حذف فنل، از روش HPLC استفاده شد. بدین منظور در ابتدا و انتهای آزمایش یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به ویال منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۱۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. برای استخراج ترکیبات فنلی از محلول رویی، سه بار هم‌حجم آن حلال تری‌کلرومتان افزوده و استخراج انجام شد. با قرار دادن حلال تری‌کلرومتان حاوی ترکیبات فنلی در دمای محیط، این حلال فرار به سرعت تبخیر شد و در نهایت، رسوب باقی‌مانده در بافر پتاسیم‌فسفات به اندازه همان حجمی از مخلوط واکنش که استخراج شده بود، حل شد (۲۰).

برای تحلیل HPLC نمونه‌ها از ستون C18 [۳] به عنوان فاز سکون و از آب و متانول با نسبت حجمی ۵۰ درصد استفاده شد. دستگاه مجهز به UV detector 2500 مدل Knauer بوده و برای تشخیص ترکیبات فنلی از طول موج ۲۷۰ نانومتر استفاده و ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده به دستگاه تزریق شد (۲۰).

شناسایی مولکولی سویه‌های تجزیه کننده فنل: شناسایی مولکولی سویه‌های تجزیه کننده فنل با تکثیر و تعیین توالی ژن *16S rRNA* سویه‌ها انجام شد. برای این منظور ابتدا از سویه‌ها زیست توده تهیه و سپس استخراج DNA براساس روش اصلاح شده Marmur انجام شد (۲۰). پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز، از این DNA برای انجام PCR و تکثیر ژن مربوط به زیر واحد کوچک ریبوزومی استفاده شد. این تکثیر با استفاده از پرایمرهای عمومی *16S rRNA*، 27F (پرایمر رفت) با توالی '5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و R 1492 (پرایمر برگشت) با توالی '5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' و از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام شد. تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از الکتروفورز تایید شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر انجام شد که ۳ میکرولیتر بافر PCR۱۰ X با غلظت برابر X۱، ۱-۲ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت برابر ۵۰ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مول در حجم نهایی، ۱میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰۰ پیکومولار، آنزیم Taq پلیمراز U/2۵۰ میکرولیتر و DNA به میزان مناسب استفاده شد. در انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز از نمونه با شرایط مشابه نسبت به سایرنمونه‌ها که در آن به جای DNA الگو از آب دیونیزه استریل استفاده شده بود، به عنوان شاهد منفی استفاده شد. برنامه تکثیری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق برنامه ذیل انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه

www.SID.ir

Archive of SID

تکرار شونده شامل واسرشت با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و اتصال با دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۶۰ ثانیه و سنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ تا ۶۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. محصول نهایی واکنش زنجیره ای پلیمراز توسط روش دی‌داکسی به شکل رفت و برگشت تعیین ترادف شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Chromas pro ویرایش شده و با کمک ابزار BLAST با توالی‌های معتبر ثبت شده در پایگاه ژنی EzTaxon مقایسه و نزدیک‌ترین سویه از نظر مشابهت در توالی ژن *16S rRNA* شناسایی شد. تحلیل فیلوژنتیک سویه منتخب با استفاده از نرم افزارهای ClustalX و Mega6 و رسم درخت فیلوژنتیک مربوط به این سویه با استفاده از الگوریتم Neighbour Joining انجام شد (۲۱- ۲۴).

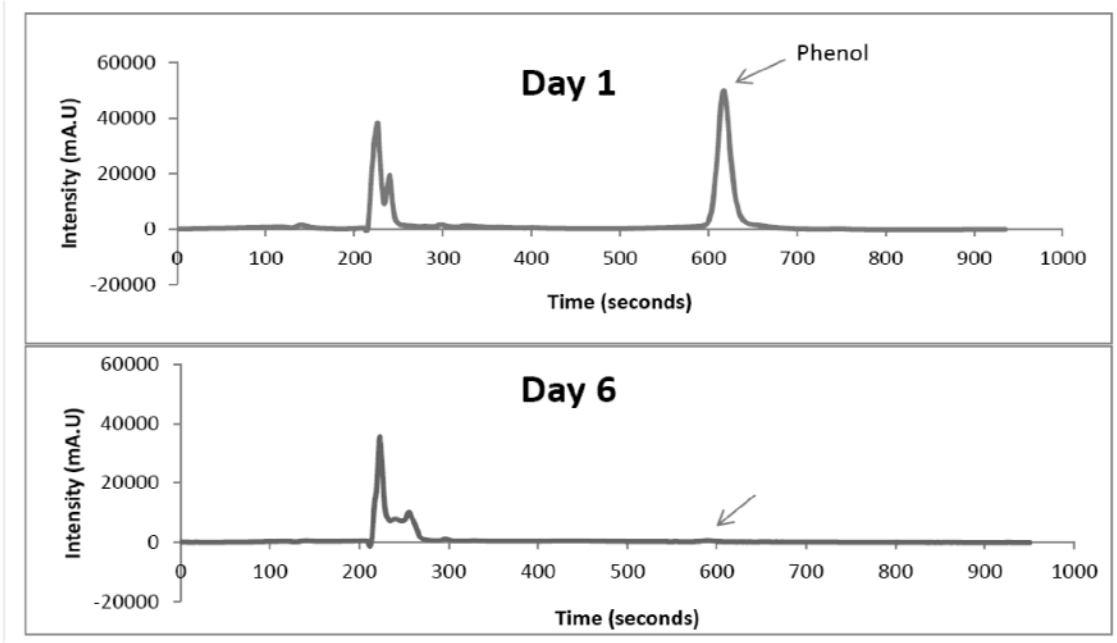
نتایج

ویژگی‌های فیزیکی نمونه‌ها سنجیده شد و نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.

در مرحله غنی‌سازی، فقط کشت حاصل از نمونه آب مخزن یادآوران به ایجاد کدورت منجر شد. با توجه به حضور فنل به عنوان تنها منبع کربن در محیط، ایجاد کدورت نشان دهنده توان میکروارگانیسم‌ها در تجزیه فنل است که نتایج HPLC نیز حذف فنل از محیط کشت را تایید کرد (شکل ۱).

جدول ۱- شوری و اسیدیته نمونه‌های مورد بررسی

نمونه‌ها	شوری	اسیدیته
خاک پالایشگاه تهران	۸ درصد	۷/۵
آب مخزن یادآوران	۱۲ درصد	۷/۷
خاک شور قم	۱۵ درصد	۷/۵
خاک پالایشگاه خارک	۵ درصد	۷/۲



شکل ۱- تایید حذف فنل در کشت به دست آمده از نمونه آب مخزن یادآوران با کمک HPLC

www.SID.ir

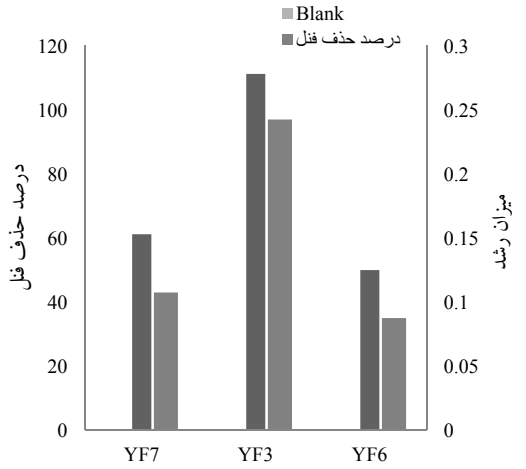
Archive of SID

در ادامه کار سه سویه با توانایی تجزیه فنل از نمونه کشت غنی‌شده جدا شدند. برای انجام مراحل بعدی پژوهش انتخاب سویه براساس توانایی تحمل غلظت بالای فنل و میزان حذف آن انجام شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، جدایه YF3 با ۹۷ درصد تجزیه فنل پس از سه روز گرماگذاری به عنوان سویه برتر انتخاب شد.

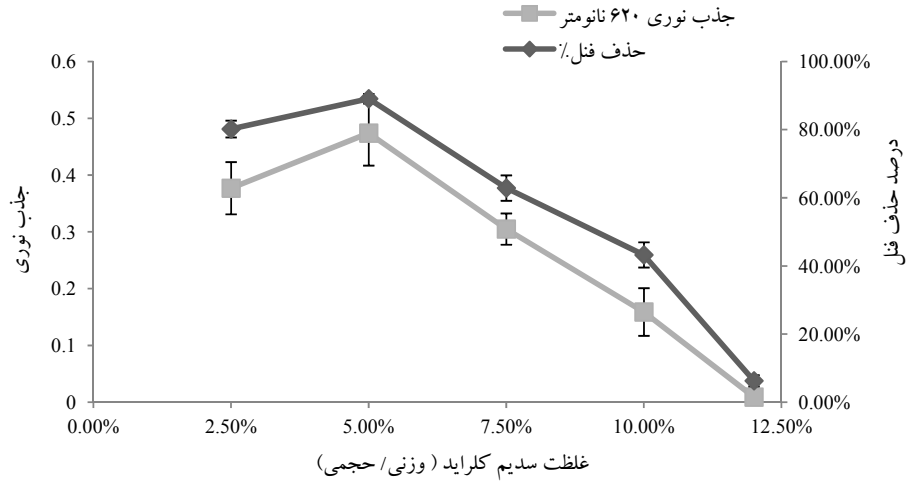
بهینه‌سازی شرایط رشد سویه YF3: برای اینکه سویه برتر بیش‌ترین بازدهی در تجزیه فنل را داشته باشد، شرایط رشد بهینه‌سازی شد. تمام نتایج بعد از ۷۲ ساعت تلقیح خوانده شد. همان‌طور که در شکل۳ قابل مشاهده است، بهینه نمک برای رشد سویه YF3 غلظت ۵ درصد وزنی- حجمی سدیم کلراید است . اما این سویه قادر به رشد در غلظت‌های سدیم کلراید بالاتر از ۱۰ درصد نبود. همچنین، سویه YF3 توانایی رشد در محیط بدون نمک را نداشت.

با توجه به شکل ۴، اسیدیته بهینه برای رشد سویه YF3،۸/۵ است. در طی این آزمایش مشاهده شد که این سویه در محیط پایه معدنی دارای فنل، توانایی رشد در شرایط قلیایی بالاتر از ۹/۵ را ندارد.

بیش‌ترین رشد و حذف فنل، درغلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل در شکل ۵ قابل مشاهده است. کمترین غلظت مورد بررسی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. البته سویه YF3 قادر به رشد تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل نیز است.



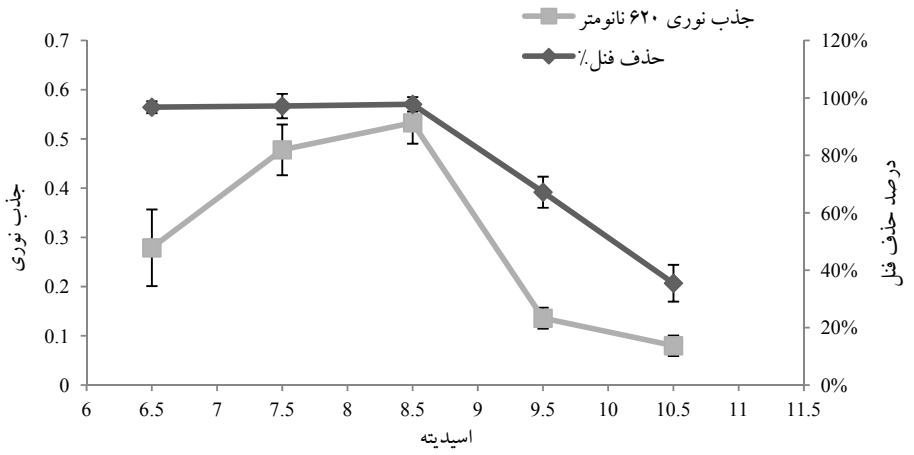
شکل ۲- میزان رشد و درصد تجزیه فنل جدایه‌های تجزیه کننده فنل در حضور ppm ۲۰۰ فنل، اسیدیته ۸/۵ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد



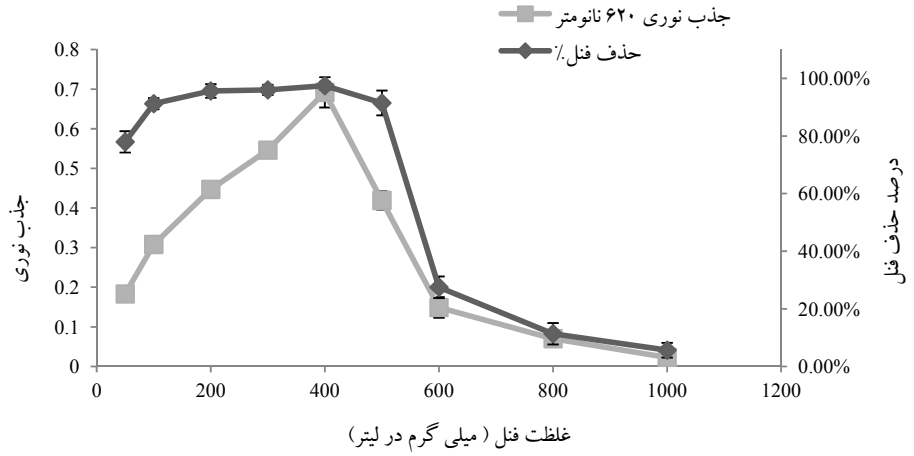
شکل ۳- بهینه‌سازی غلظت سدیم کلراید در حضور ppm۲۰۰ فنل، اسیدیته ۸/۵ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

www.SID.ir

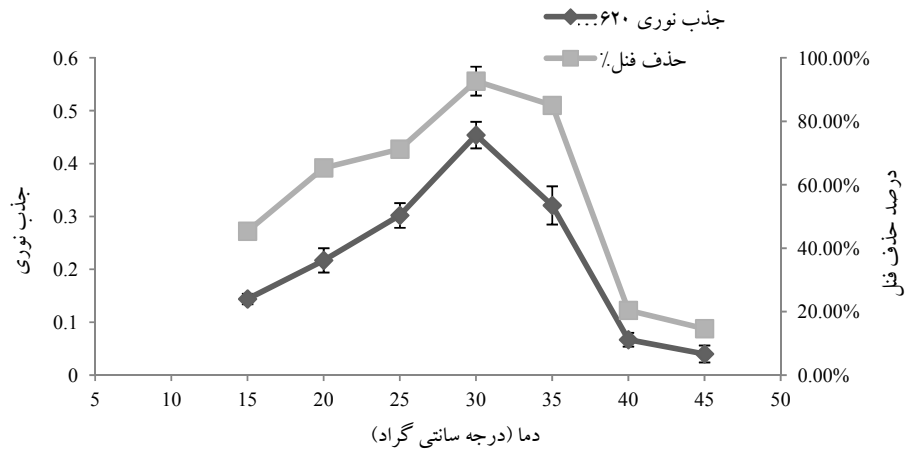
Archive of SID



شکل ۴- بهینه‌سازی اسیدیته در حضور ppm ۲۰۰ فنل و سدیم کلراید ۵ درصد و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد



شکل ۵- بهینه‌سازی غلظت فنل در اسیدیته ۸/۵ و سدیم کلراید ۵ درصد (W/V) و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد



شکل ۶- بهینه‌سازی دما در اسیدیته ۸/۵ و سدیم کلراید ۵ درصد (W/V) و ppm۲۰۰ فنل

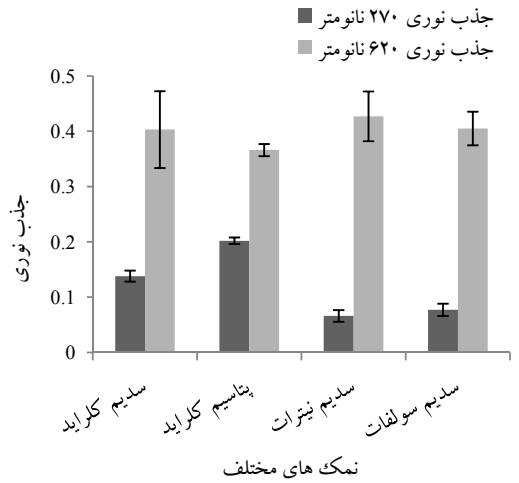
www.SID.ir

Archive of SID

همچنین با مشاهده شکل‌های ۶ و ۷ مشاهده می شود که این سویه بیش‌ترین میـزان رشـد و حـذف فنـل را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در حضـور نمـک $NaNO_3$ دارد.

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *16S rRNA* سه سویه موردنظر و مقایسه آن‌ها با داده‌های ثبت شـده در پایگـاه EzTaxon در جدول ۲ مشخص شده است. در این میـان سویه YF6 بـا ۹۹/۳۰ درصـد شـباهت، بـیش‌تـرین میـزان شباهت را داراست.

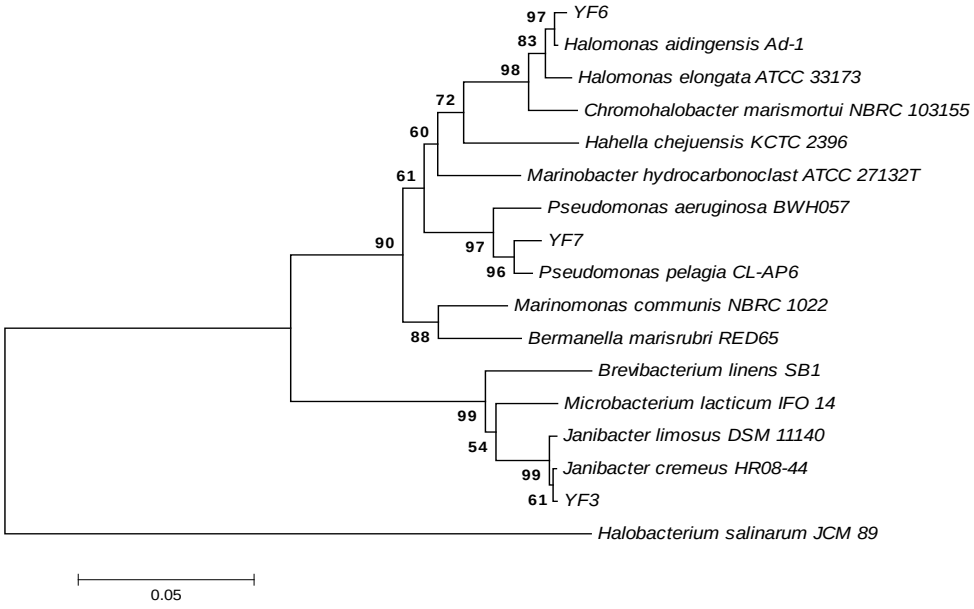
درخت فیلوژنتیک سویه‌های شناسـایی شـده بـر پایـه روش neighbor joining و بـا اسـتفاده از نـرم افـزار MEGA6 ترسیم شد.



شکل ۷- تأثیر نمک‌های مختلف با غلظت ۵ درصد حجمی- وزنی در رشد سویه YF3

جدول ۲- مقایسه میزان شباهت ژن *16S rRNA* سویه‌ها با سویه‌های استاندارد

نام سویه	شماره دستیابی	درصد شباهت	سویه استاندارد با بیش‌ترین میزان شباهت
YF3	KP027471	۹۸/۹	*Janibacter cremeus* HR08-44
YF6	KP027470	۹۹/۳	*Halomonas aidingensis* Ad-1
YF7	KP027472	۹۷/۷	*Pseudomonas pelagia* CL-AP6



شکل ۷- درخت فیلوژنتیک سویه‌های تجزیه کننده فنل بر پایه روش neighbour joining

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر، با توجه به افزایش رو به رشد صنایع و حجم بالای آلودگی تولید شده ناشی از پساب‌های صنعتی، جوامع صنعتی و نیمه صنعتی با مشکلات زیست محیطی بسیاری رو به رو هستند. آلودگی آب، خاک، هوا، رسوبات و آب‌های زیرزمینی با آلاینده‌های شیمیایی و سمی یکی از مهم‌ترین مشکلات این جوامع محسوب می‌شود (۲۵). پساب‌های صنعتی معمولا توسط روش‌های فیزیکی- شیمیایی مرسوم تصفیه می‌شوند. اما ناکارآمدی و هزینه‌های بالای این روش‌ها، باعث توجه به روش‌های جایگزین شده است.

باکتری‌های کلیدی در مسیر تجزیه فنل، *سودوموناس‌ها* هستند که توانایی متابولیکی بالایی در تجزیه انواع ترکیبات آروماتیک دارند. در این مطالعه سه سویه تجزیه کننده فنل، از اعضای جنس *Halomonas*، *Pseudomonas* و *Janibacter* بودند. در مورد توانایی تجزیه فنل توسط دو جنس نخست، مطالعات زیادی انجام شده است. اما در مطالعه حاضر سویه برتر تجزیه کننده فنل، از جنس *Janibacter* بود. این مطالعه نخستین گزارش در مورد توانایی اعضای این جنس از اکتینوباکتریا در زمینه تجزیه زیستی فنل است. این سویه، با ۹۸/۹ درصد به *Janibacter cremeus* شباهت دارد و قادر به تجزیه فنل در غلظت‌های بالای این ترکیب آروماتیک است. به طور کلی جنس *Janibacter* با توانایی آن‌ها در تجزیه ترکیبات پلی آروماتیک شناخته می‌شوند. در بررسی‌هایی که انجام شده است، سویه باکتریایی مربوط به اعضای جنس *Janibacter* قادر به تجزیه گروهی از ترکیبات پلی آروماتیک از جمله آنتراسن، فنانترن، دی بنزوتیوفن و فلوئورن بودند (۲۶- ۲۷).

مطالعات محدودی در مورد تجزیه زیستی فنل در شرایط اکستریم (شوری و قلیایی) وجود دارد. فنل به عنوان یک ترکیب هیدروکربنی آروماتیک و بسیار سمی هدف بسیاری از این مطالعات در شرایط نمکی بوده است. در مطالعه بوستس[۴] و همکاران سویه باکتریایی جدا شده قابلیت تجزیه فنل در غلظت ۵/۶ درصد سدیم کلراید و تا بیشینه غلظت فنل ۷۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را دارا بود (۲۸). در زمینه تجزیه فنل در شرایط قلیایی نیز گزارش‌های کمی موجود است که یک مورد آن مطالعه کناکار[۵] و همکاران است. در این مطالعه چهار سویه قلیادوست جدا شده، برای تصفیه پساب‌های صنعتی در اسیدیته ۱۰ استفاده شدند که بیش‌ترین میزان حذف فنل توسط این سویه‌ها ۶۶۰ میلی‌گرم درلیتر بود (۲۹).

در مطالعه حاضر، سویه برتر قابلیت تحمل و رشد در شرایط اکستریم را داراست. بیشینه اسیدیته رشد سویه ۱۰/۵ و بیشینه غلظت نمک سدیم کلراید ۱۰ درصد است. از این رو سویه YF3 به عنوان یک باکتری نمک- قلیادوست شناسایی می شود. بالاترین دمای رشد سویه ۳۵ درجه سانتی‌گراد است. آنزیم کلیدی مسیر تجزیه فنل، فنل هیدورکسیلاز است که به دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد حساس است و به طور درخور توجهی فعالیت خود را از دست می دهد (۳۰). به نظر می رسد عدم رشد سویه YF3 در دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد نیز به خاطر کاهش فعالیت این آنزیم است.

همچنین مشخص شد نمک بهینه برای رشد سویه YF3 در این پژوهش سدیم نیترات بود. از میان

www.SID.ir

Archive of SID

نمک‌های سدیمی و پتاسیمی مورد بررسی، این سویه نمک‌های سدیمی را ترجیح می دهد.

معدودی از مطالعات در زمینه تجزیه زیستی فنل در غلظت‌های بالای این ترکیب آروماتیک انجام شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به گزارشی اشاره کرد که بالاترین غلظت قابل تحمل برای میکروارگانیسم مورد بررسی، *Candida tropicalis*، ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (۳۱). شایان ذکر است هیچ کدام از شرایط آزمایش اکستریم نبود.

در مطالعه حاضر با وجود شرایط اکستریم حاکم بر آزمایش، بیش‌ترین میزان تجزیه غلظت فنل توسط سویه YF3، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. با توجه به اینکه میزان فنل موجود در پساب‌های کمتر از این میزان است، این سویه می‌تواند نقشی کاربردی در تصفیه پساب‌های فنلی ایفا کند.

References

(1) Cao B., Nagarajan K., Loh K.C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied microbiology and biotechnology* 2009; 85 (2): 207- 28.

(2) Reda A.B., Ashraf T. Optimization of bacterial biodegradation of toluene and phenol under different nutritional and environmental conditions. *Journal of Applied Sciences Research* 2010; 6 (8): 1086- 95.

(3) Amer R. Newly Isolated Pandoraea sp. Capable of Phenol Biodegradation. *Research Journal of Microbiology* 2008; 3 (10): 622- 29.

(4) Basha K. M., Rajendran A., Thangavelu V. Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences* 2010; 1(2): 219- 34.

(5) Kim J. H., Oh K. K., Lee S. T., Kim S. W., Hong S. I. Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Process Biochemistry* 2002; 37 (12): 1367- 73.

(6) Nair C. I., Jayachandran K., Shashidhar S. Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7 (25): 4951- 8

(7) Al-Khalid T., El- Naas M.H. Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2012; 42 (16): 1630- 90.

(8) Chung T. P., Tseng H. Y., Juang R. S. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized Pseudomonas putida systems. *Process Biochemistry* 2003; 38 (10): 1497- 507.

(9) Gonzalez G., Herrera G., García M. T., Pena M. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of Pseudomonas putida. *Bioresource technology* 2001; 80 (2): 137- 42.

(10) Abuhamed T., Bayraktar E., Mehmetoğlu T., Mehmetoğlu Ü. Kinetics model for growth of Pseudomonas putida F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*, 2004; 39 (8): 983- 8.

(11) Al-Zuhair S., El-Naas M. Immobilization of Pseudomonas putida in PVA gel particles for the biodegradation of phenol at high concentrations. *Biochemical Engineering Journal* 2011; 56 (1): 46- 50.

(12) Li H., Liu Y. H., Luo N., Zhang X. Y., Luan T. G., Hu J. M and et al. Biodegradation of benzene and its derivatives by a psychrotolerant and moderately haloalkaliphilic Planococcus sp. strain ZD 22. *Research in microbiology* 2006; 157 (7): 629- 36.

www.SID.ir

Archive of SID

(13) Juang R. S., Tsai S. Y. Growth kinetics of Pseudomonas putida in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate. *Biochemical Engineering Journal* 2006; 31 (2): 133- 40.

(14) Yang C. F., Lee C. M. Enrichment, isolation, and characterization of phenol-degrading Pseudomonas resinovorans strain P-1 and Brevibacillus sp. strain P-6. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2007; 59 (3): 206- 10.

(15) Øvreås L., Torsvik V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial ecology* 1998; 36 (3- 4): 303-15.

(16) Alva V.A., Peyton B.M. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile Halomonas campisalis: influence of pH and salinity. *Environmental science & technology* 2003; 37 (19): 4397- 402.

(17) Santos V.L., Valter R. Linardi, Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents identification and degradation potential, *Process Biochemistry* 2003; 39 (2004): 1001- 6.

(18) Ying W., Ye T., Bin H., Zhao H., BI J., Cai B. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Joumdl ot Emironmental Sciences* 2006; 19 (2007): 222- 5.

(19) Peyton B.M., Wilson T, Yonge D.R. Kinetics of phenol biodegradation in high salt solutions. *Water Research* 2003; 36 (2002): 4811- 820.

(20) Asad S., Dabirmanesh B., Khajeh K. Phenol removal from refinery wastewater by mutant recombinant horseradish peroxidase. *Biotechnology and applied biochemistry* 2014; 61 (2): 226- 9.

(21) Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology* 1987; 2- 4.

(22) Kumar S., Tamura K., Nei M. Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, *Briefings in Bioinformatics*, 2004.

(23) Mehrshad M., Amoozegar M. A., Yakhchali B., Fazeli A. S. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (2): 49- 70.

(24) Thompson G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 1997; 24: 4876- 882.

(25) Vidali M. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 2001; 73 (7): 1163- 72.

(26) Yamazoe A., Yagi O., Oyaizu H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly isolated dibenzofuran-utilizing Janibacter sp. strain YY-1. *Applied microbiology and biotechnology* 2004; 65(2): 211- 18.

(27) Zhang G. Y., Ling J. Y., Sun H. B., Luo J., Fan Y. Y., Cui Z. J., et al., Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading Janibacter anophelis strain JY11. *Journal of hazardous materials* 2009; 172 (2): 580- 86.

(28) Bastos A. E. R., Moon D. H., Rossi A., Trevors J. T., Tsai S. M. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archives of microbiology* 2000; 174 (5): 346- 52.

(29) Kanekar P. P., Sarnaik S. S., Kelkar A. S. Bioremediation of phenol by alkaliphilic bacteria isolated from alkaline lake of Lonar, India. *Journal of applied microbiology* 1998; 85 (1): 128- 33.

(30) Al-Khalid T., El- Naas M.H. Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2012; 42(16): 1631- 90.

www.SID.ir

Archive of SID

(31) Yan J., Yan J., Jianping W., Hongmei L., Suliang Y., Zongding H. The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast Candida tropicalis. *Biochemical Engineering Journal* 2005; 24 (3): 243- 7.

[1]- Spent caustic
[2]- Haloalkaliphile
[3]- 5 mm×4.66250 mm, MetaChem Technologies
[4]- Bastos
[5]- Kanekar

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and identification of haloalkaliphilic phenol degrading bacteria and evaluating their applicability

Narges Abavisani
M.Sc. of Microbial Biotechnology, University of Tehran, Iran, nabavisani@ut.ac.ir
Mohammad Ali Amoozegar *
Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
Seyed Mohammad Mehdi Dastgheib
Assistant Professor of Biotechnology, Research Institute of Petroleum Industry, Iran, dastgheibsmm@ripi.ir

Abstract

Introduction: Phenolic compounds are toxic environmental pollutants. Removal of phenol from wastewaters is very important. Phenol biodegradation is generally preferred to common physico- chemical methods. The aim of this study is to enrich and isolate haloalkaliphilic phenol-degrading bacteria and evaluate their potential for caustic wastewater treatment in consortium and pure cultures.

Materials and methods: Soil and water samples were collected from hydrocarbon polluted areas. Samples were enriched in the mineral medium with phenol as the only carbon and energy source. Phenol degrading strains were isolated and identified using morphological and phylogenic techniques. Isolates were screened based on phenol removal ability and key parameters such as pH, temperature and various salt (NaCl, $NaNO_3$, NH_4Cl and KCl) and phenol concentration were evaluated for optimizing biodegradation activity of the selected strain.

Results: Three phenol-degrading strains were isolated from Yadavaran oilfield sample, which belong to bacterial genera *Halomonas*, *Janibacter* and *Pseudomonas*. The strain *Janibacter* sp.YF3 was selected due to its high phenol-degrading rate. The strain was gram positive coccus whose optimal growth condition was 30 ºC, Nacl 5 % (w/v), pH 8.5 and phenol 400 ppm. The results showed that this strain could thrive in highly saline conditions and preferred NaNO3 among other salts.

Discussion and conclusion: Isolate entitled *Janibacter* sp. strain YF3 was a polyextremophile which could tolerate harsh conditions (NaCl concentration up to 10 % and pH 9.5) and could utilize phenol at high concentration up to 1000 ppm. These results showed that this strain could be potentially applicable for phenol removal from haloalkaline industrial wastewaters such as spent caustic.

Key words: Industrial wastewaters, Biodegradation, Phenolic compounds, Haloalkaliphile, *Janibacter*

* Corresponding author, Extremophiles Lab, Dept. of Microbiology, Fac. of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran
Received: September 20, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014

www.SID.ir