Archive of SID

مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره دوم، ۱۳۸۸
صفحات ۹۵-۸۹

Original Article

بررسی اصلاح زیستی فنل به‌وسیله باکتری های بومی جدا شده از آب و رسوبات دریاچه پریشان

دکتر فرشید کفیل زاده [1*]، محمدصادق فرهنگ دوست[1]، عباسعلی رضاییان جهرمی[1]، دکتر امیراشکان مهجور[1]

[1]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

چکیده

مقدمه و هدف: فنل و مشتقات آن ترکیباتی به شدت سمی می‌باشد که به راحتی می توان آنها را از پساب های صنایع مختلفی مانند پالایشگاه های نفت، صنایع پتروشیمی، معادن به ویژه زغال سنگ و کارخانه های مواد شیمیایی جداسازی کرد. به همین دلیل ورود این مواد به محیط زیست باعث آلودگی های شدید زیست محیطی به ویژه منابع آبی می شود. در گذشته از روش‌های فیزیکوشیمیایی برای حذف فنل و مشتقات آن استفاده می شد اما امروزه تصفیه زیستی در اولویت قرار دارد. هدف از این پژوهش، شناسایی وجداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل از دریاچه پریشان و بررسی سینتیک رشد آنها می باشد.

روش کار: ۶۰ نمونه از مناطق مختلف دریاچه پریشان جمع آوری گردید. جداسازی باکتری های تجزیه کننده فنل با کشت نمونه‌ها بر روی محیط پایهٔ نمکی فنل براث انجام شد. برای غربالگری باکتری های تجزیه کننده فنل معرف برموتیمول بلو به محیط اضافه گردید در نهایت با کشت باکتری ها در غلظت های ۰/۲ تا ۰/۹ گرم در لیتر فنل، توانایی تجزیه زیستی فنل اندازه‌گیری شد.

یافته ها: باکتری های کشت داده شده در محیط پایهٔ نمکی فنل براث دارای معرف، رنگ محیط را به دلیل استفاده از فنل و کاهش pH از رنگ سبز به زرد تغییر داده بودند. سودوموناس، اسینتوباکتر، کلبسیلا، سیتروباکتر و شیگلا به ترتیب غالب ترین باکتری‌های تجزیه کننده فنل جداشده از دریاچه پریشان بودند که فراوانی وسیعی را در قسمت‌های مختلف در یاچه داشتند. اکثر باکتری های جدا شده قدرت خوبی در تجزیه فنل نشان دادند به طوری که گونه های سودوموناس و اسینتوباکتر تا غلظت ۰/۹-۰/۸ گرم در لیتر، گونه‌های کلبسیلا، سیتروباکتر و شیگلا تا غلظت ۰/۷-۰/۶ گرم در لیتر فنل و بقیه تا غلظت حدود ۰/۳-۰/۲ گرم در لیتر توانایی تجزیه فنل را داشتند.

نتیجه گیری: یافته های این پژوهش نشان می دهد که دریاچهٔ پریشان دارای تعداد زیادی از باکتری های تجزیه کننده فنل به ویژه جنس‌های سودوموناس و اسینتوباکتر است که قدرت تجزیه ای بالایی دارند.

واژگان کلیدی: فنل، تجزیه، سودوموناس، اسینتوباکتر، دریاچه پریشان

دریافت مقاله: زمستان ۸۸ پذیرش برای چاپ: بهار ۸۸

مقدمه

فنل ها ترکیباتی با فرمول عمومی ArOH می‌باشند که به شدت سمی بوده و در اشکال گوناگون و یا در ارتباط با عناصر دیگر به فراوانی یافت می‌شوند (۵). فنل‌های ساده، مایع یا جامدهایی با دمای ذوب پایین هستند، که بدلیل پیوند هیدروژنی دمای جوش بالایی دارند. خود فنل احتمالا به علت تشکیل پیوند هیدروژنی با آب، کمی در آن انحلال پذیر است، (۹ گرم در ۱۰۰ گرم آب) (۲).

فنل و ترکیبات فنلی یکی از مهم ترین آلاینده‌های محیط زیست، خصوصا آب ها می‌باشند. مطالعات برروی حیوانات و انسان نشان می‌دهد که فنل به طور مؤثری ازطریق استنشاق و هضم، جذب می‌گردد. بخار فنل به آسانی ازطریق پوست جذب می‌شود. فنل در محلول می‌تواند به آسانی از پوست عبور کند. متابولیسم فنل دربدن انسان در کبد و حتی در ریه و کلیه‌ها انجام

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۷۱۱۴۰۷۹۹
پست الکترونیک: kafilzadeh@jia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود. فنل درمحیط زیست سمی بوده و باعث کاهش فعالیت آنزیمی می شود و در غلظت های ۲۵- ۵ میلی گرم در لیتر برای ماهی ها کشنده است. علاوه بر اثر مستقیم فنل که ممانعت کننده واکنش‌های بیولوژیک است ترکیبات فنلی، آلوده کننده های جدی برای رودخانه ها هستند (۱ و ۳).

ترکیبات فنلی درمحیط زیست اثرات مضری همچون کاهش رشد، کاهش مقاومت در برابر بیماری، مرگ و میر موجودات آبزی و افزایش رشد گیاهان هرز را ایجاد می‌کنند و در صورت راه‌یابی آلودگی‌های فنلی به آب‌های زیرزمینی مسائل اکولوژیک جدی را ایجاد خواهد نمود. به همین دلیل مقدار مجاز فنل در خروجی صنایع نبایستی از ۰/۵ میلی گرم در لیتر بیشتر باشد. با توجه به موارد یاد شده حذف فنل از محیط زیست به ویژه آب و منابع آبی اهمیت زیادی دارد. معمولا تجزیه فنل به وسیله روش‌های فیزیکوشیمیایی انجام می‌شود، اما این روش‌ها هزینه بر بوده و واسطه‌های خطرناک تولید می‌کنند. به همین دلیل در حال حاضر تجزیه بیولوژیک فنل مورد توجه قرار گرفته است (۱).

تاکنون میکروارگانیسم‌های متعددی شامل باکتری‌ها، مخمرها، قارچ ها و جلبک ها به عنوان عوامل تجزیه کننده ی فنل از منابع مختلف جداسازی شده اند. اما در این بین باکتری ها از اهمیت خاصی برخوردارند. از بین مخمرهای تجزیه کننده فنل *Trichosporon cutaneum*، *Phanerochaete chryosporium*، *Pleurotutus ostreatus* و *Candida tropicalis* را نام برد. ازانواع قارچ های تجزیه‌کننده ی فنل می توان *Aspergillus fumigatus* و *Fusarium fluccif erum* را مثال زد. البته قابل ذکراست که جلبک *Ochromonas danica* نیز قادر به تجزیه ی فنل از مسیر متا می باشد. از بین باکتری های تجزیه کننده نیز می توان به *Pseudomonas sp* و *Acinetobacter sp* اشاره‌کرد. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه‌کننده فنل از آب و رسوب دریاچه پریشان و بررسی سینتیک رشد سویه‌های جداشده و همچنین بررسی توانایی و اندازه‌گیری میزان حذف فنل توسط باکتری های جدا شده می باشد (۴، ۵ و ۶).

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی (laboratory experimental) در ۳ فصل پاییز، زمستان و بهار بر روی یکی از استثنائی ترین و زیباترین دریاچه های آب شیرین ایران به نام دریاچه پریشان انجام شد. این دریاچه در موقعیت ۵۱ درجه و ۵۱ دقیقه طول شرقی و ۲۹ درجه و ۳۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه عرض شمالی واقع شده و ارتفاع آن از سطح آب‌های آزاد ۸۲۰ متر است. حوزه آبریز این دریاچه ۲۶۶/۵ کیلومتر مربع وسعت دارد (شکل ۱).

نمونه گیری با ظروف کاملا استریل و در هر بار نمونه گیری ۲۴ نمونه (۱۲ نمونه رسوب / ۱۲ نمونه آب) در کل ۷۲ نمونه، جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها کمتر از مدت زمان ۶ ساعت و در فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

الف) روش جداسازی باکتری‌ها ی تجزیه کننده‌ی فنل: برای جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های رسوب، ۱۰ گرم از نمونه‌ی رسوب

شکل ۱: عکس ماهواره ای دریاچه پریشان (برگرفته ازgoogle).

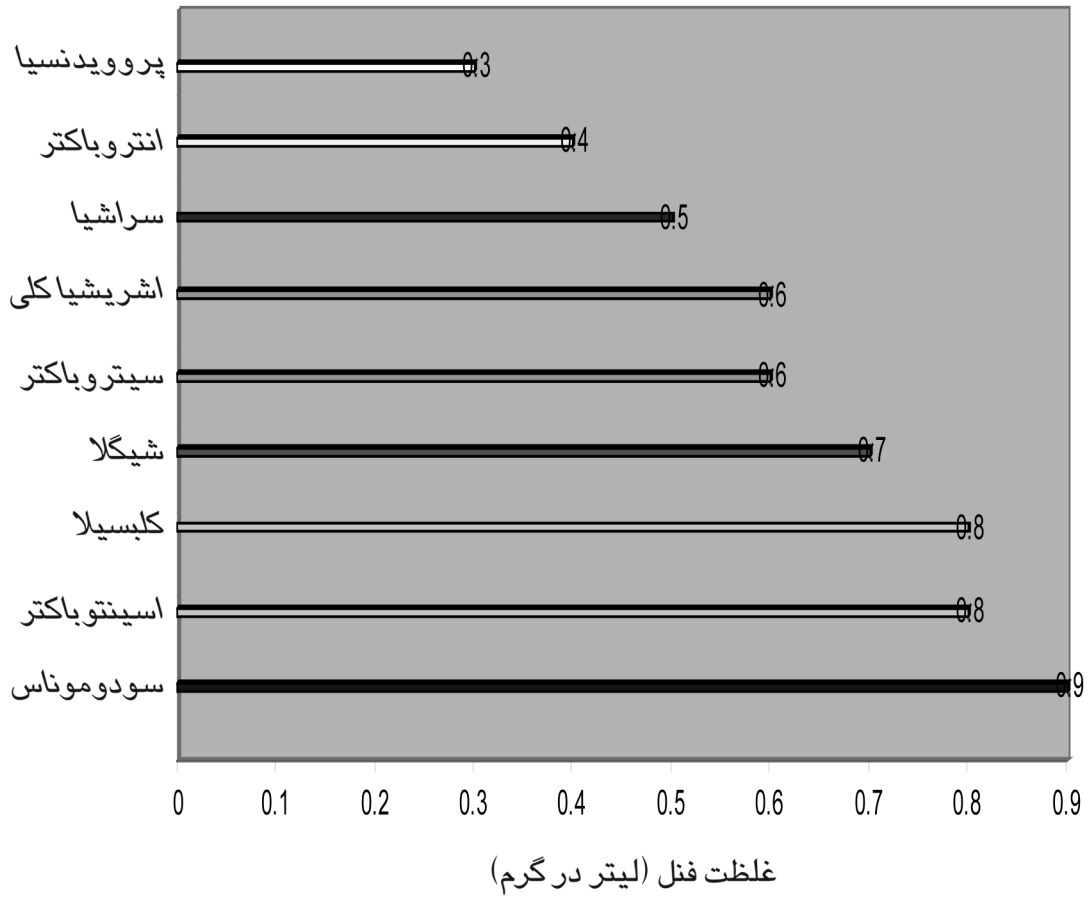
www.SID.ir

Archive of SID

با ۱۰۰ میلی لیتر ازمحیط کشت فنل براث مخلوط و به مدت یک هفته در دمای ۳۰°C و در گرمخانه‌ی شیکر دار قرار داده شد.پس از یک هفته ۱ میلی لیتر از این محیط به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت جدید فنل براث تلقیح شد و به مدت ۱ هفته در حرارت ۳۰°C و با هوادهی و گرما گذاری گردید. پس از پاساژ دوم ۱ میلی لیتر به محیط کشت جدید فنل براث تلقیح شد و به مدت یک هفته در شرایط یادشده انکوبه شد. این پاساژ دادن تا زمانی تکرار شد که کدورت به دست آمده ناشی از رشد باکتری و نه از کدورت رسوب مخلوط شده با اولین محیط کشت باشد. پس از پاساژ نهایی به صورت ایزوله روی محیط کشت فنل آگار کشت داده شد و کلنی خالص باکتری‌ها تهیه گردید. در مورد نمونه‌های آب روش کار مشابه بود با این تفاوت که مقدار اولیه ۱۰ میلی لیتر آب با ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت فنل براث مخلوط و تمامی مراحل قبل تکرار گردید (۷).

ب) بررسی توانایی حذف فنل توسط باکتری‌ها: در این پژوهش برای بررسی توانایی حذف فنل توسط باکتری ها، از محیط پایه‌ی نمکی فنل براث با غلظت های مختلف فنل استفاده شد. برای هر باکتری ۸ لوله از محیط فنل براث در نظر گرفته شد و غلظت های ۰/۲ تا ۰/۹ فنل به ترتیب به لوله ها اضافه شد. باکتری‌ها به مدت ۱ هفته با هوادهی منظم در انکوباتور با دمای ۳۰°C کشت داده شدند و پس از یک هفته لوله‌ها به منظور بررسی کدورت مورد بررسی قرار گرفتند (۷).

ج) سنجش حذف فنل توسط باکتری های جدا شده: برای ارزیابی حذف فنل توسط باکتری های تجزیه کننده‌ی جدا شده، روش گیبس به کار رفت. دراین روش از معرف گیبس یا 2 - Dichloroquinone 4-4 -chloroimide استفاده شد. این ترکیب پس از واکنش با فنل آبی رنگ می‌شود. نحوه‌ی انجام سنجش با معرف گبیس بدین صورت بود که ۱۵۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط کشت پس از سانتریفوژ که pH آن برابر ۸ بود را با ۳۰ میکرولیتر از $NaHCO_3$ با pH ۸ مخلوط کرده وسپس ۲۰میکرولیتر از معرف گیبس (۱میلی گرم برلیتر) به مخلوط اضافه گردید. سپس به مدت ۴۵ - ۱۵دقیقه در دمای اتاق با دستگاه ترمومیکسر آن را مخلوط و در نهایت در طول موج ۶۳۰ نانومتر جذب آن خوانده شد (۸).



نمودار ۱: بررسی رشد سویه های ایزوله شده طی یک هفته.

www.SID.ir

Archive of SID

د) ارزیابی رشد باکتری‌های جداشده درغلظت های مختلف فنل بوسیله جذب نوری: در این روش بهترین سویه‌های تجزیه کننده فنل از بین باکتری‌های تجزیه کننده فنل با مطالعه جذب نوری جداسازی شدند. به این صورت که در ارلن‌های جداگانه به میزان ۲۰ میلی لیتر محیط کشت فنل براث (با غلظت‌های متفاوت فنل) ریخته شد. سپس به میزان ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی باکتری به هرکدام اضافه گردید. برای هرکدام از باکتری ها ۸ ارلن در نظر گرفته شد و در هر ارلن غلظت های ۰/۲ تا ۰/۹ فنل اضافه گردید. برای هر باکتری یک ارلن به صورت شاهد در نظر گرفته شد. در محیط شاهد تنها محیط کشت پایه بدون فنل با سویه مشخص وجود داشت. محیط ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C گرماگذاری و سپس جذب آنها در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (۹).

نتایج

با بررسی رشد سویه های جدا شده طی یک هفته میزان توانایی باکتری ها در حذف فنل مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نمودار ۱ بیشترین میزان تجزیه فنل مربوط به جنس سودوموناس وکمترین میزان آن مربوط به جنس پرووِیدنسیا بود.

منحنی رشد سویه های مورد بررسی بر روی فنل نشان داد که تمامی سویه‌های جدا شده در غلظت ۰/۲ گرم بر لیتر فنل تقریبا الگوی رشد یکسانی دارند (نمودارهای ۲ و ۳).

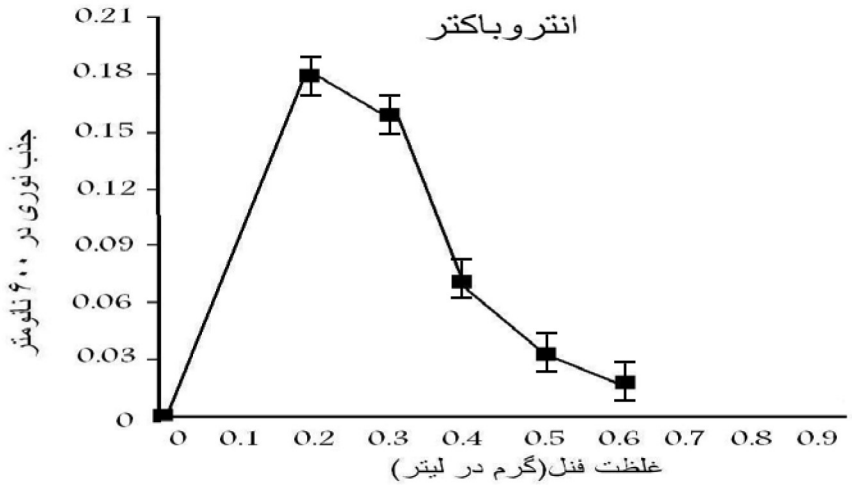
با توجه به نمودار ۴ که برای کلیه سویه ها یکسان می باشد، بعد از ۲۴ساعت از مقدار ۰/۲ مقدار ۰/۰۵ گرم بر لیتر فنل را باقی می‌گذارند و به حداکثر رشد می رسند و فنل پس از ۴۸ ساعت، به طورکامل حذف می گردد.

بحث

تاکنون روش های گوناگونی برای حذف ترکیبات فنلی کشف شده است اما استفاده از باکتری‌ها یکی از روش‌های کارآمد و ارزان قیمت می‌تواند باشد. باکتری ها با تکثیر سریع در حضور فنل و ترکیبات آن توانایی فوق العاده ای را در حذف این ترکیبات نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان با جداسازی، خالص سازی و تکثیر گونه‌هایی که توانایی بالایی در حذف این ترکیبات را دارند از آنها در مناطقی دارای آلاینده‌ای فنلی استفاده کرد. باکتری های مختلفی ازجنس های گوناگون به عنوان تجزیه‌کننده فنل جداسازی شده اند. اکثر این باکتری‌ها، گرم منفی هستند و بیشتر متعلق به خانواده سودوموناسه (*Pseudomonaceae*) می‌باشند.

Koutny و همکاران درسال ۲۰۰۳ طی تحقیق باکتری‌های تجزیه کننده فنل را از خاک های سیبری جداسازی کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که جنس غالب در تجزیه فنل در این خاک‌ها *Pseuodomons putida* می‌باشد. همچنین سایر پژوهش‌گران مانند Sayers و Williams، shingler و Powolowski در سال ۱۹۹۴ و Torres و همکاران درسال ۱۹۹۸ پراکنش گسترده آنها درخاک‌ها و قابلیت تجزیه فنل یا ترکیبات فنلی به اثبات رسانیدند. نتایج تحقیقات ما نیز این یافته ها را تائید می‌کند (۱۰، ۱۱ و ۱۲).

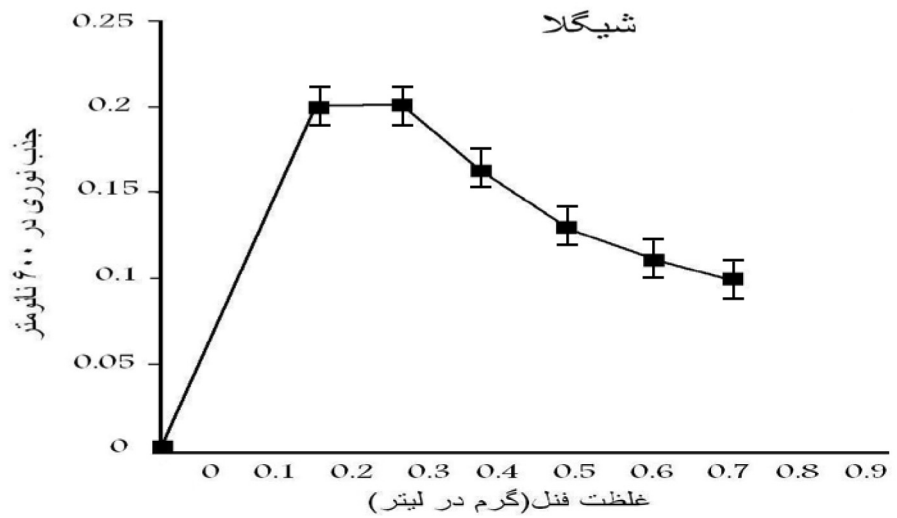
Whiteley و همکاران در سال ۲۰۰۱ ویژگی‌های اکولوژیک و فیزیولوژیک سویه های سودوموناس را در داخل سیستم‌های حذف فنل مورد بررسی قرار دادند. آنها به این نتیجه رسیدند که تنوع مشاهده شده احتمال پیچیده بودن سیستم و حضور قابلیت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی از گونه‌های *Pseudomonas* را تقویت می‌کند. آنها سویه *P. pseudoalcaligenes* را به عنوان جدایه اصلی



نمودار ۲: منحنی رشد جنس انتروباکتر. این باکتری در غلظت ۰/۲ گرم بر لیتر فنل بالاترین OD را نشان می دهد.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳: منحنی رشد جنس شیگلا . این باکتری در غلظت ۰/۲ گرم بر لیتر فنل بالاترین OD را نشان می دهد.

تجزیه کننده فنل معرفی نمودند (۱۳ و ۱۴).

پژوهش‌های Whiteley و همکاران سال ۲۰۰۱ نشان دادند که ارزیابی جدایه‌ها در بیوراکتورها می‌تواند ویژگی‌هایی مانند تنوع، فیزیولوژی و عملکرد جامعه سودوموناس‌های تجزیه‌کننده فنل در بیوراکتورهای صنعتی آشکار سازند. همچنین محققین یادشده نتیجه‌گیری نمودند که هتروژنیسیته فیزیولوژیک قابل توجهی در دامنه تحمل جدایه‌ها وجود دارد (۱۳ و ۱۴).

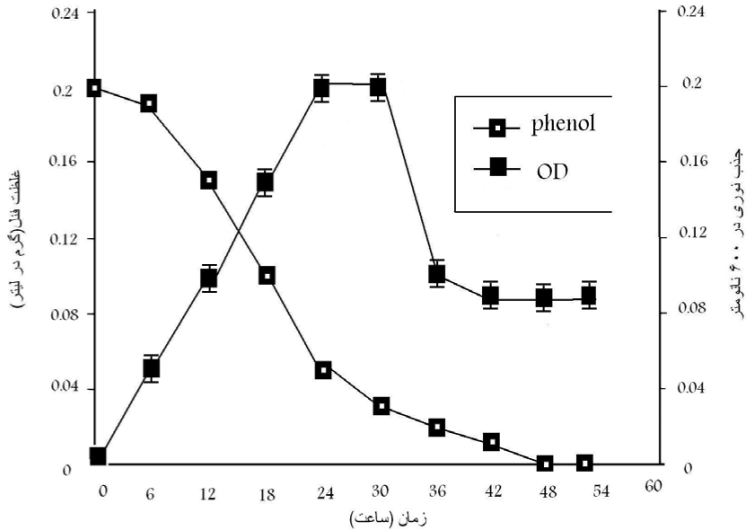
علاوه برسویه‌های یادشده Wagner و همکاران درسال ۱۹۹۸ باکتری *Klebsiella* واجد یک پلاسمید مشابه TOL کد کننده یک نوع فنل هیدروکسیلاز جدید را به عنوان تجزیه کننده فنل گزارش کردند (۱۵).

Eduardo و همکاران درسال ۲۰۰۰ باکتری *Alcaligenes faecalis* و مخمر *Candida tropica* راکه قادر به تجزیه فنل و همچنین قابلیت تحمل غلظت بالایی از نمک را داشتند (۱۵درصد) گزارش کردند (۱۶).

در این پژوهش بیشتر باکتری‌های تجزیه کننده فنل جدا شده از دریاچه پریشان متعلق به جنس‌های *Pseudomonas* و *Acinetobacter* بودند که با نتایج سایر پژوهش‌ها همخوانی دارد.

روش‌های مختلفی توسط محققین برای سنجش حذف فنل بکار رفته است. به عنوان نمونه Watanabe و همکاران درسال ۱۹۹۸ روش کالریمتری با استفاده از رنگ ۴- آمینوآنتی پیرین را به منظور اندازه گیری میزان باقیمانده درمحیط کشت بکار بردند (۱۷ و ۱۸).

همچنین Whiteley و همکاران درسال ۲۰۰۱ و Kotny



نمودار ۴: منحنی حذف فنل برای جنس اسینتوباکتر با روش گیبس در طی ۴۸ ساعت.

www.SID.ir

Archive of SID

درسال ۲۰۰۳ نیز از این روش برای سنجش مقدار فنل باقیمانده استفاده کردند. Selvaratnam و همکاران درسال ۱۹۹۷ با HPLC مقدار فنل را سنجش کردند و همینطور Heinaru درسال ۲۰۰۰ و Fries در سال ۱۹۹۷ نیز از همین روش را مورد استفاده قرار دادند (۷، ۱۳ و ۱۴).

دراین تحقیق روش گیبس و با استفاده از معرف ۲و۴ دی کلرو کینون۴ـ کلروایمید برای سنجش حذف فنل بکار رفت. این روش توسط محققین دیگری همچون Joern و White درسال ۲۰۰۳ و Quintana و همکاران درسال ۱۹۹۷ بکاررفته است. نتایج حاصل از سنجش فنل با این روش با یافته‌های سایر محققین همخوانی داشت (۱۹).

نتیجه گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری های تجزیه کننده فنل پراکندگی وسیعی در طبیعت به ویژه در دریاچه پریشان دارند. گونه‌های تجزیه کننده فنل جداسازی شده عمدتا توانایی بالقوه‌ای در تجزیه فنل و ترکیبات فنلی را داشتند. با بررسی مطالعات انجام شده و همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشتر باکتری‌های تجزیه کننده فنل متعلق به خانواده سودوموناسه می‌باشند. گونه اسینتوباکتر نیز در رتبه دوم از نظر اهمیت قرار داشت. البته شایان ذکر است که گونه های مختلف باکتری‌های یادشده نیز توانایی‌های متفاوتی در تجزیه فنل داشتند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می‌دارد.

References

1. The environmental protection agency (EPA), 2004, Collation of toxicological data and intake values for humans, EPA report, 44-64.
2. Morrison RM, Boyd RN, 1992, Organic chemistry, 6th ed, 1069-1098.
3. Stephen J, Thomas C, William AB, 2002, Water and the Environment, 31-55.
4. Godjevargova T, Ivanova D, Alexieva Z, and Dimova N. Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production wastewater by free and immobilized Trichosporon cutaneum R57, Process biochemistry, 2003; 38:915-920.
5. Xiangchun Q, Hanchang S, Yongming Z. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in airlift inner-loop bioreactor immobilized with Achromobacter sp. Separation and Purification Technology, 2004; 34:97-103.
6. Ariana F, Elke B, and Thomas B, Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the Candida maltosa using BOD measurements, International Biodeterioration & Biodegradation, 2004; 54:69-76.
7. Koutny M, Ruzicka J, Chlachula J. Screening for phenol-degrading bacteria in the Pristine solids of south Siberia. Applied soil Ecology. 2003; 23:79-83.
8. Quintana MG., Didion C, Dalton H, Colorimetric method for a rapid detection of oxygenated aromatic biotransformation product, Biotechnology technique, 1997; 11:585-87.
9. Ali S, Lafuente RF, and Cowan DA, Meta-pathway degradation of phenolics by Thermophilic Bacill, Enzyme and microbial technology, 1998; 23:462-468.
10. Powlowski J, and Shingler V, Genetic and biochemistry of phenol degradation by Pseudomonase sp. CF600, Biodegradation, 1994; 5:219-36.
11. Torres, LG, Chao C, and Chao W, methods for DNA extraction from various soils, Journal of applied microbiology, 1999; 88:937-943.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Williams PA, and Sayers JR, The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in Pseudomonas, Biodegradation, 1994; 5:195-217.
13. Whiteley A, and Mark J, Bacterial Community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system, Applied and Enviromental Microbiology, 2000; 66:2401-2407.
14. Whiteley AS, Wiles S, Lilley K, Philip J, Babailey MJ, Ecological and physiological analyses of Pseudomonad species within an phenol remediation system, Journal of Microbiological Methods, 2001; 44:79-88.
15. Wagner K, Schawarz T, Phenol degradation by an enterobacterium Kelebsiella strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase, Canadian journal of Microbiology, 1999; 45:162-171.
16. Eduardo A, Bastos R, and Moon D, Salt tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil sample, Applied and Environmental Microbiology, 2000; 174:346-52.
17. Watanabe K, Hino S, and Takahashi N. Effect of exogenous phenol-degrading bacteria on performance and ecosystem of activated sludge, Journal of fermentation and bioengineering, 1996; 82:291-298.
18. Watanabe KS, Yamamoto S, and Hino S, Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by gyrB-targeted quantitative PCR, APPL, Environ, Microbiol, 1998; 64:1203-1209.
19. John DM, and White GF, Mechanism for biotransformation of nonyl phenol polyethoxylates to xenoestrogens in Pseudomonase putida, Applied and Environment Microbiology, 2003; 180:4332-4338.

www.SID.ir