علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیستم، شماره یک، بهار ۹۷

تجزیه زیستی نیکوتین توسط باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas* sp. strain ND9، جدا شده از دریاچه نمکی بختگان فارس

مراحم آشنگرف [۱]*

m.ashengroph@uok.ac.ir

محمد مجدی [۲]

تاریخ دریافت:۹۳/۵/۲ **تاریخ پذیرش:۹۴/۴/۴**

چکیده

زمینه و هدف: نیکوتین از سمی ترین آلکالوئیدهای مرتبط با صنایع توتون است که با توجه به مشکلات درمانی و زیست محیطی ناشی از حضور آن در محیط های طبیعی، تجزیه زیستی آن با استفاده از میکروارگانیسم ها توجه زیادی را به خود جلب کرده است. هدف از مطالعه اخیر، غربال گری باکتریهای بومی نمک دوست نسبی با فابلیت تجزیه کنندگی نیکوتین و بررسی امکان استفاده از این باکتریها به عنوان کاتالیست در جهت پالایش نیکوتین از محیط های آلوده است.

روش بررسی: انتخاب باکتری های نمک دوست با قابلیت تجزیه کنندگی نیکوتین در سه مرحله غنی سازی، توانایی در مصرف نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت و براساس الگوی تحمل پذیری انجام شد. جدایه نمک دوست ND9 که دارای بالاترین قابلیت در حذف زیستی نیکوتین بود، براساس تست های ریخت شناسی، بیوشیمایی و تکثیر نواحی حفاظت شده 16s rRNA شناسایی شد. سنتتیک رشد و میزان حذف نیکوتین با استفاده از اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: *Halomonas* sp. strain ND9 (با کد شناسایی KM077028 در بانک ژنی)، به عنوان قوی ترین باکتری در تحمل پذیری و مصرف نیکوتین برگزیده شد. فعالیت متابولیکی بالا در کشت های رویشی سویه ND9 منجر به حذف ۹۲ درصدی نیکوتین در محیط های پایه نمکی با غلظت ۲ گرم در لیتر نیکوتین، به عنوان تنها منبع کربن و ازت، در طی ۹۶ ساعت گرماگذاری شد.

بحث و نتیجه گیری: در این پژوهش، برای اولین بار پتانسیل باکتری های نمک دوست در فرآیند نیکوتین زدایی بررسی شد. با توجه به پتانسیل سویه باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas* sp. strain ND9 در حذف زیستی نیکوتین، جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست نسبی به‌عنوان زیست کاتالیزگر طبیعی ایمن در جهت پاکسازی زیستی نیکوتین پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تحمل پذیری ، حذف زیستی، نیکوتین، *Halomonas* sp. strain ND9.

۱- دانشیار میکروبیولوژی صنعتی، عضو هیات علمی دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی، سنندج، ایران*(مسوول مکاتبات).

۲- دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، عضو هیات علمی دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، سنندج، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

J.Env. Sci. Tech., Vol 20, No.1, Spring 2018

Biodegradation of nicotine by *Halomonas* sp. strain ND9, a moderately halophilic bacterium isolated from Bakhtegan salt lake

Morahem Ashengroph[1]*
m.ashengroph@uok.ac.ir
Mohammad Majdi[2]

Admission Date:June 25, 2015 Date Received: July 24, 2014

Abstract

Background and Objective: Nicotine is a highly toxic alkaloid which can be found in tobacco processing industry. Due to the serious environmental problems and therapeutic concerns which have occurred because of presence of toxic nicotine in the environment, biodegradation of this compound by microorganisms has received considerable attention. The objective of the present study was to screen the moderately halophilic bacteria which are able to degrade nicotine and to evaluate the possibility of using the bacterial biocatalysts to clean up nicotine in contaminated environments.

Method: Screening and selection of halophilic bacteria degrading nicotine has performed in three separate steps using enrichment culture technique, nicotine as the sole carbon and nitrogen source, and tolerance patterns. The best nicotine-degrading bacterial isolate (designated as strain ND9) was characterized on the basis of morphological and biochemical phenotypes and 16S rRNA sequencing. Growth kinetics and the removal rate of nicotine were evaluated using spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC).

Findings: According to the results obtained, growing cultures of *Halomonas* sp. strain ND9 (accession no. KM077028) showed the highest tolerance to nicotine and also degraded over 92% of nicotine (initial concentration of 2 g/L) as the sole source of carbon and nitrogen after 96 h incubation time.

Discussion and Conclusions: The present work describes the potential of moderately halophilic bacteria to be used in a de-nicotination process for the first time. Given the potential of *Halomonas* sp. strain ND9 in the bio-removal of nicotine, isolation and characterization of moderately halophilic bacteria as green bio-catalysts for their application in the bio-degradation of nicotine has been proposed.

Keywords: Bioremoval, *Halomonas* sp. strain ND9, Nicotine, Tolerance.

1- Associate Professor of Industrial Microbiology, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran * *(Corresponding Author)*.
2- Associate Professor of Plant Biotechnology, College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

نیکوتین [۳-(۱-متیل-۲-پیرولیدین) پیریدین] یک آلکالوئید تجاری با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}N_2$ است که عمدتا در برگ بیش از ۷۰ گونه گیاهی متعلق به جنس *Nicotina* و به مقدار کمتر در گوجه فرنگی، سیب زمینی، فلفل سبز و بادمجان یافت می شود (۱ و ۲). نیکوتین در غلظت های بسیار پایین به عنوان یک محرک دستگاه عصبی سطح هوشیاری را افزایش داده و با غلبه بر حستگی باعث حفظ تمرکز می شود. این در حالی است که دوز توکسیک نیکوتین در افراد بالغ بین ۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم بوده و تزریق تنها ۶۰ میلی گرم از آن در خون می تواند منجر به مرگ انسان شود (۳). نیکوتین عمدتا در صنایع مرتبط با توتون و تنباکو به ویژه صنعت مرگبار سیگار، به عنوان یک محرک زیستی اعتیاد آور استفاده می شود. از دیگر موارد مصرف نیکوتین می توان به کاربرد آن به عنوان یک سم در حشره کش های آلی جهت کنترل آفات حشره میوه جات و سبزیجات و همچنین در فرمولاسیون داروهای مسکن و آرام بخش اشاره نمود (۴). علیرغم مصارف گسترده نیکوتین، این ماده در غلظت های بالا آنچنان سمی و زهرآگین بوده که باعث بروز صدمات غیرقابل جبران بر سلامت و محیط زیست می شود. نیکوتین در غلظت های بالا علاوه بر بروز اختلالات گوارشی و پوستی، می تواند در بروز آسیب های جدی به قلب و عروق کرونر از جمله تنگی عروق، افزایش ضربان های قلب، افزایش فشار خون، افزایش کلسترول، بی نظمی قلب، تشکیل لخته خونی، بسته شدن عروق و چسبندگی پلاکت ها موثر بوده و زمینه حملات کشنده قلبی را فراهم نماید (۵). علاوه برا این مصرف بالای نیکوتین می تواند سبب فلج عضلات تنفسی شود. با توجه به اثرات زیان بار نیکوتین بر روی سیستم فیزیولوژیک انسان، علاوه بر لزوم کاهش سطح نیکوتین در توتون های فرآوری شده، برای رهایی اکوسیستم های آبی از این سم خطرناک حذف نیکوتین از پساب های صنعتی مرحله ی بسیار ضروری در پردازش زباله های حاوی نیکوتین است. نیکوتین با توجه به مقاومت بالا نسبت به تجزیه فتوشیمیایی و تخریب طبیعی و همچنین با توجه به حلالیت بالا در آب، براحتی وارد آب های سطحی و زیرزمینی شده و بنابراین باعث آلودگی منابع آبی خواهد شد (۶). سالانه میلیونها تن پساب و فاضلاب حاوی نیکوتین در سرتاسر دنیا تولید می شود که در برخی از این پساب ها غلظت نیکوتین ورودی بیش از ۱۸ گرم در لیتر تخمین زده شده است (۷). این در حالی است که براساس مقررات و استانداردهای محیطی وضع شده توسط اتحادیه اروپا، چنانچه غلظت نیکوتین در پساب ها و فاضلاب های تولیدی از ۵۰۰ میلی گرم در لیتر تجاوز کند این پساب ها در زمره مواد بسیار سمی و خطرناک رده بندی می شوند (۶). بنابراین حذف نیکوتین از محیط های آلوده هم از نظر سلامت و هم از نظر زیست محیطی امری ضروری است. به منظور کاهش غلظت نیکوتین در توتون های فرآوری شده و همچنین به منظور تصفیه پساب های حاوی نیکوتین روش های فیزیکی و شیمیایی متعددی مطرح شده اند اما مشکلاتی از قبیل سمیت بالا، گران بودن و حذف غیر اختصاصی، استفاده عملی از این روش ها را با محدودیت همراه نموده است (۸). به همین دلیل امروزه دانشمندان همواره به دنبال روش هایی هستند که هم ارزان تر از نظر اقتصادی و هم از دیدگاه محیط زیست ایمن تر محسوب می شوند که در این میان سویه های میکروبی تجزیه کننده نیکوتین به دلیل قابلیت استفاده از نیکوتین سمی به عنوان منبع کربن و انرژی از جایگاه ویژه ایی برخوردار هستند (۹). مطالعات مربوط به تجزیه زیستی نیکوتین توسط میکروارگانیسم ها از دهه ۱۹۶۰ آغاز شد. سویه های باکتری توانمندی از قبیل *Arthrobacter oxydans* (۱۰)، *Pseudomonas* sp. strain HF-1 (۱۱)، *Arthrobacter* sp. strain HF-2 (۱۲)، *Pseudomonas putida* S16 (۱۳)، *Ochrobactrum intermedium* DN2 (۱۴)، *Pseudomonas* sp. strain nic 22 (۱۵)، *Pseudomonas putida* J5 (۱۶)، *Rhodococcus* sp. strain Y22 (۱۷)، *Agrobacterium* sp. strain S33 (۱۸)، *Pseudomonas* sp. strain ZUTSKD (۱۹)،

Archive of SID

www.SID.ir

Aceintobacter sp. strain ND12 (۲۰)، *Pseudomonas geniculata* N1 (۹) از مناطق مختلف دنیا جداسازی و برای تجزیه زیستی نیکوتین بکار گرفته شده اند. اولین تجزیه میکروبی نیکوتین در گونه باکتری *Arthrobacter oxidans* توسط Gherna و همکارانش در سال ۱۹۶۵ گزارش شد. باکتری مذکور قابلیت استفاده از نیکوتین را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی دارا بود (۱۰). در سال ۲۰۰۵ میلادی، سویه ایی از *Pseudomonas* sp. HF1 بوسیله Ruan و همکارانش جداسازی شد که قادر به تجزیه نیکوتین در غلظت ۱/۳ گرم در لیتر با راندمان ۹۹/۶ درصدی پس از ۲۵ ساعت گرماگذاری بود (۱۱). Gong و همکارانش در سال ۲۰۰۹ میلادی نیکوتین زدایی را با استفاده از سویه باکتری *Rhodococcus* sp. Y22 که قادر به تجزیه کامل نیکوتین در غلظت ۱ گرم در لیتر بعد از ۵۲ ساعت گرماگذاری و تحت شرایط بهینه شه از نظر پارامترهای محیطی بود را گزارش دادند (۱۷). در جدیدترین مطالعه صورت گرفته توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۴، سویه باکتری *Pseudomonas geniculata* N1، قابلیت حذف کامل نیکوتین در غلظت اولیه ۱/۵ گرم در لیتر را پس از ۴ روز گرماگذاری دارا بود (۹). این در حالی است که تا به امروز تحقیقی در ارتباط با فرآیند نیکوتین زدایی در باکتری های نمک دوست انجام نشده است. باکتریهای نمک دوست با توجه به داشتن ویژگی هایی مانند انتشار فراوان، پایداری زیاد در شرایط سخت محیطی، سریع الرشد بودن، نیازمندی های غذایی کم، توانایی استفاده از انواع ماکروملکول ها به عنوان تنها منبع دریافت انرژی و همچنین عدم ایجاد آلودگی برای استفاده در فرآیندهای صنعتی مناسب هستند (۲۱). علیرغم قابلیت بالای باکتریهای نمک دوست در تولید انواع آنزیم های هیدرولیتیک که باعث ارزشمندی این میکروارگانیسم ها در فرآیندهای مختلفی از جمله اصلاح و پاکسازی آلاینده های زیست محیطی مختلف شده است، با این وجود تا به امروز مطالعه ایی در ارتباط با باکتری های نمک دوست تجزیه کننده نیکوتین گزارش نشده است. هدف از مطالعه اخیر جداسازی و تعیین خصوصیت باکتریهای بومی نمک دوست نسبی با پتانسیل تجزیه کنندگی نیکوتین و بررسی امکان استفاده از این باکتریها ی بومی بعنوان کاتالیست های ایمن به منظور پالایش زیستی نیکوتین از محیط های آلوده است.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی و نمونه گیری: نیکوتین با خلوص ۹۹ درصد از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) تهیه گشت. عصاره مخمر، پپتون و نمک کلرید سدیم از کمپانی مرک (E. Merck, Darmstadt, Germany) خریداری شد. متانول با درجه خلوص بسیار بالا مخصوص دستگاه HPLC از مرک خریداری شد. نمک های $MgCl_2$، $CaCl_2$، $MgSO_4$، KCl، $NaHCO_3$، $NaBr$، KH_2PO_4، Na_2HPo_4 و $FeSO_4$ با درجه خلوص بالا (Analytical grade) بودند. نمونه های آب و خاک های شور و پرشور از مناطق مختلف ایران از جمله دریاچه حوض سلطان قم، دریاچه بختگان فارس، دریاچه ارومیه و نمکزارهای اطراف شهرستان های قم و قشم جمع آوری شد.

غربال گری جدایه های نمک دوست با توان بالقوه ی تجزیه کنندگی نیکوتین: غربال گری و انتخاب باکتری های نمک دوست با قابلیت تجزیه کنندگی نیکوتین در سه مرحله غنی سازی، توانایی در مصرف نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت و بررسی الگوی تحمل پذیری جدایه ها انجام شد. پس از جمع آوری نمونه های محیطی و انتقال آنها به آزمایشگاه، غنی سازی جدایه های نمک دوست طبق محیط پیشنهاد شده توسط Nieto و همکاران (۲۲) انجام شد. محیط پیشنهادی مذکور شامل محیط لوریا برتانی (۱۰ گرم در لیتر پپتون و ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر) بوده که به آن نمک های زیر افزوده شد (بر حسب گرم در لیتر):

$NaCl$ 81; $MgCl_2$ 7; $MgSO_4.7H_2O$ 9.6; $CaCl_2$ 0.36; KCl 2; $NaHCO_3$ 0.06; $NaBr$ 0.026

pH محیط مذکور با استفاده از سود یک مولار قبل از اتوکلاو کردن در ۷ تنظیم گشت. به منظور انجام تکنیک غنی سازی، ابتدا از نمونه های محیطی جمع آوری شده از مناطق نمکی

Archive of SID

www.SID.ir

ایران (برای نمونه های خاک ۱ گرم و نمونه های آب ۱۰ میلی لیتر) در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول سرم فیزیولوژیک (نمک سدیم کلرید با غلظت ۸/۵ گرم در لیتر) سوسپانسیونی تهیه شد. یک درصد از سوسپانسیون تهیه شده به عنوان مایه ی تلقیح به ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از محیط های پیشنهاد شده (۲۲) اضافه شد. سپس نیکوتین، پس از استریل شدن با پالایه های سر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی، در غلظت نهایی ۲ گرم در لیتر به محیط های مذکور اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت جدایه هایی که دارای مورفولوژی مختلف بودند، نشانه گذاری شدند. هر کدام از جدایه ها به پلیت های لوریا برتانی با غلظت نهایی ۸۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم، به صورت خطی کشت داده شدند تا با رسیدن به کلنی های تک از خلوص اطمینان حاصل شود. در ادامه به منظور تشخیص باکتری های تجزیه کننده نیکوتین، جدایه های نمک دوست جداسازی شده در طی تکنیک غنی سازی، از محیط پایه نمکی M9-nicotine agar ($MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g/l; $CaCl_2$ 0.015 g/l; $FeSO_4.7H_2O$ 0.03 g/l; NaCl 80 g/l; KH_2PO_4 0.3; Na_2HPO_4 1.5 pH 7)، با اندکی تغییرات، استفاده شد (۲۳). به محیط مذکور نیکوتین در غلظت نهایی ۲ گرم در لیتر بعنوان تنها منبع کربن و ازت افزوده شد. پلیت های M9-nicotine agar تلقیح شده با جدایه های نمک دوست، در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرما گذاری شدند. در نهایت الگوی تحمل پذیری جدایه ها در محیط های کشت سنتتیک و کمپلکس با استفاده از روش میکروپلیت (Microdilution assay) تعیین شد (۲۴). برای این منظور از چاهک های الیزای ۹۶ تایی برای سنجش میزان تحمل پذیری به نیکوتین استفاده شد. در این روش پس از تهیه محلول های استوک نیکوتین و تهیه رقت هایی از تراکم های نیکوتین در محیط های سنتتیک M9 و کمپلکس لوریا برتانی براث با غلظت های نهایی ۸۰ گرم در لیتر کلرید سدیم، به میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری ها (با تراکم ۰/۵ مک فارلند) به چاهک های الیزای حاوی ۱۴۰ میکرولیتر محیط های کشت مذکور شامل غلظت های مشخصی از نیکوتین، اضافه گردید. پلیت های مذکور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸و ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. پس از طی مدت زمان گرماگذاری میزان کدورت باکتریایی توسط دستگاه الیزا ریدر (*ELISA Microplate Reader*) در مقایسه با شاهدهای تهیه شده در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

شناسایی فنوتیپی و ملکولی جدایه باکتری نمک دوست نسبی ND9: شناسایی اولیه جدایه منتخب ND9 براساس تست های استاندارد از قبیل رنگ کلنی، شکل ظاهری، واکنش گرم، تست های اکسیداز و کاتالاز، تست حرکت، فعالیت اوره آز، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز کازئین و تولید اسید از منابع کربوهیدراتی براساس روش پیشنهادی Smibert و Krieg (۲۵) مطالعه گشت. شناسایی دقیق جدایه ND9 براساس استخراج DNA ژنومی، تکثیر نواحی حفاظت شده 16s rRNA با استفاده از PCR، تعیین ترادف ژن 16s rRNA، نتایج حاصل از Blast در سایت NCBI و ترسیم درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم افزار MEGA. 6، انجام شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (فرمنتاز) صورت گرفت. از دو پرایمر همه گانی RW01 و DG74 با توالی های نوکلئوتیدی زیر برای تکثیر نواحی حفاظت شده 16s rRNA با استفاده از PCR استفاده شد (۲۶).

Forward RW01(5 '-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3 ')
Reverse primer DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3 ')

محصول تکثیری ژن 16S rRNA طبق روش Ashengroph و همکارانش شناسایی شد (۲۷). محصول خالص PCR برای تعیین توالی به کمپانی ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Seoul, Korea) ارسال گردید. میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA جدایه نمک دوست ND9 به کمک الگوریتم BLAST با توالی های نوکلئوتیدی ثبت شده در پایگاه اطلاعات ژنی GeneBank مقایسه شد. در نهایت رسم درخت فیلوژنی با استفاده از مدل Kimura-2 Parameters با الگوریتم نزدیک ترین همسایه (Neighbor-

Archive of SID

www.SID.ir

Joining method) و به کمک نرم افـزار MEGA (نسـخه ۶) ترسیم گردید (۲۸).

سنجش سنتیک رشد و ارزیابی تجزیـه ی نیکـوتین بـا استفاده از روش های اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی: به منظور تعیین منحنی رشد و سنجش درصد حذف نیکـوتین، میکروارگانیسم جـدا شـده ND9 در محـیط بـافر نمکـی M9 ($MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g/l; $CaCl_2$ 0.015 g/l; $FeSO_4.7H_2O$ 0.03 g/l; NaCl 50 g/l;Na_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM pH 7) حـاوی نیکوتین در غلظت های ۱، ۲، ۳ و ۴ گرم در لیتر در ارلن هـای ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت نمکی مذکور تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سـانتی گـراد و دور شـیکر rpm ۱۸۰ تلقیح شد. در تمام مراحل آزمایش یک نمونه کنترل بدون تلقیح باکتری قرار داده شد. بـه منظـور ترسـیم منحنـی رشـد باکتری ND9 در حضور غلظت های مختلف نیکـوتین از روش کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600nm}) استفاده گردید. میزان OD به مدت ۱۲۰ ساعت با فواصل ۲۴ سـاعته و با استفاده از دسـتگاه اسـپکتروفتومتری (Analytik Jena's spectrophotometer SPECORD 210, Carel Zeiss Technology, Germany) خوانـده شـد. سـنجش درصـد تجزیه نیکوتین با استفاده از دستگاه HPLC (مدل JASCo Pu 980) و براسـاس روش پیشـنهادی Liu و همکـاران (۹) انجام شد. در دستگاه HPLC از ستون C18 (اندازه قطر ذرات فاز ثابت ۵ میکرون)، به طول ۲۵ سانتی متر و قطر داخلـی ۴/۶ میلی متر استفاده شـد. فـاز متحـرک متشـکل از متانول/اسـید سـولفوریک یـک میلـی مـولار (بـه نسـبت ۵ بـه ۹۵ حجمی/حجمی)،سرعت دبی ۰/۵ میلـی لیتـر در دقیقـه، طـول مـوج دسـتگاه آشکارسـاز ۲۶۰ نـانومتر و میـزان تزریـق ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد. زمان بـازداری بـرای نیکـوتین اسـتاندارد تحت شـرایط کروماـتوگرافی ذکـر شـده در زمـان ۶/۶۶ دقیقـه بدست آمد. درصد تجزیه نیکوتین بوسیله میکروارگانیسـم جـدا شده ND9، تخمین زده شده توسط دستگاه HPLC، بر طبق فرمول زیر بدست آمد:

$$Nicotine\ degradation\ (\%) = \frac{(a-b)}{a} \times 100$$

کـه در آن، a: غلظـت اولیـه نیکـوتین و b: غلظـت نیکـوتین باقیمانده می باشد.

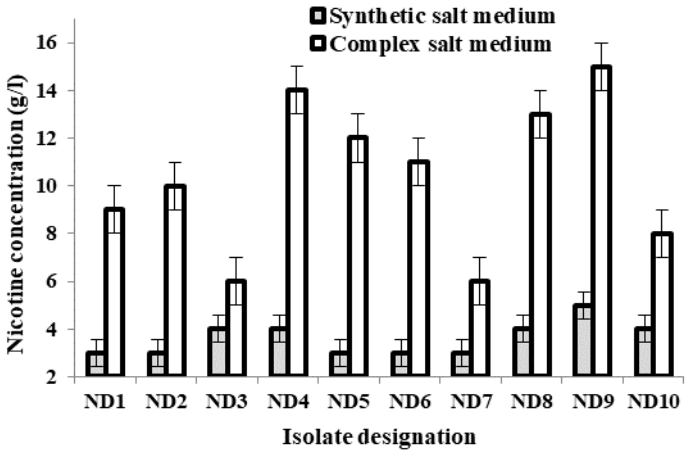
یافته ها

ارزیابی قدرت تجزیه کنندگی نیکوتین توسط سویه های نمک دوست غربال گری شده و تعیین کارآمدترین سویه بـاکتری: بـا توجـه بـه سـمیت نیکـوتین بـر روی سـلول میکروارگانیسـم هـا، قـدم اول در انتخـاب جدایـه برتـر جهـت آزمایشات نیکوتین زدایی، غربال گری باکتری های نمک دوست نسبی تجزیه کننده نیکوتین با پتانسیل تحمل پذیری ذاتی بـالا نسبت به غلظت های بالای نیکوتین است. برای این منظور، پس از جمع آوری نمونه های آبی و خاکی از مناطق نمکـی مختلـف ایران و انجام تکنیک غنی سازی در محـیط هـای کشـت غنـی کننده حاوی ۲ گرم در لیتر نیکوتین (رجوع شود به بخش مواد و روش ها)، در مجموع ۳۵ بـاکتری نمـک دوسـت نسـبی (کـه حداقل تفاوت ها ی مورفولوژیک و فیزیولوژیـک داشـتند) جـدا شد که براساس واکنش گـرم ۱۹ جدایـه میلـه ای شـکل گـرم منفی، ۱۰ جدایه کروی شکل گرم مثبت و ۶ جدایه کوکوباسیل گرم منفی بودند. میزان تحمل پذیری به نمک کلرید سـدیم در جدایه های مذکور بین ۱ تـا ۲۰ درصـد ارزیـابی شـد. رشـد در مرحلـه ی بعـد بـا هـدف جداسـازی و تشـخیص جدایـه هـای باکتریایی با قابلیت تجزیه کنندگی نیکوتین، ۳۵ میکروارگانیسم جدا شده در محیط های کشت M9-nicotine-agar حـاوی ۲ گرم در لیتر نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت و انرژی کشت داده شدند که براساس نتایج بدست آمده تنها ۱۰ جدایـه (نامگذاری شده تحـت عنـوان ND1-ND9) قابلیـت رشـد در محیط های مذکور را دارا بودنـد. جدایـه هـا براسـاس پروتکـل توضیح داده شده در بخش مواد و روش ها در محیط سـنتتیک M9-nicotine-broth و کمـــپلکس Luria Bertani-nicotine broth با غلظت نهایی ۵۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم و حاوی ۲ تا ۱۶ گـرم در لیتـر نیکـوتین جهـت ارزیـابی میزان تحمل پذیری ذاتی نسبت به نیکوتین به منظور دستیابی

Archive of SID

www.SID.ir

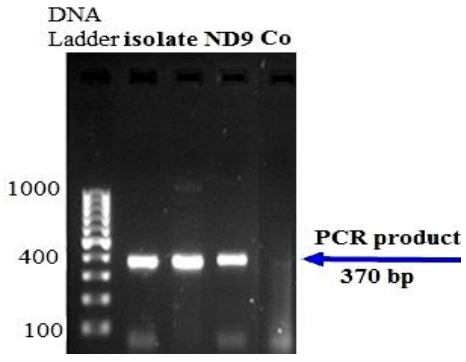
به جدایه ی برتر مورد مطالعه قرار گرفت که براساس نتایج بدست آمده (نمودار ۱)، از میان جدایه های مذکور، جدایه ND9 (جدا شده از دریاچه نمکی بختگان فارس) بالاترین مقاومت نسبت به نیکوتین را در محیط های سنتتیک و کمپلکس نشان داد که به ترتیب ۵ و ۱۵ گرم در لیتر بود. در ادامه جدایه ND9 به عنوان جدایه منتخب برای آزمایشات نیکوتین زدایی زیستی مورد شناسایی فنوتیپی و فیلوژنیک قرار گرفت.



نمودار ۱- نتایج الگوی تحمل پذیری جدایه های باکتری نمک دوست نسبی نسبت به نیکوتین در محیط های کشت سنتتیک و کمپلکس. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار±۱ معرف انحراف معیار می باشد.

Diagram 1. The results for the tolerance pattern of isolated moderately halophilic bacteria to nicotine in synthetic and complex media. Results represent the means of three separate experiments, and deviation bars (±1) indicated.

تعیین خصوصیت جدایه ی باکتری نمک دوست نسبی ND9: شناسایی اولیه جدایه ND9 براساس ویژگی های ماکروسکوپی، ریخت شناسی و واکنش گرم و همچنین تست های بیوشیمیایی استاندارد صورت گرفت که براساس نتایج بدست آمده، جدایه ND9 یک کوکوباسیل گرم منفی، دارای رنگدانه کرمی شکل، واکنش اکسیداز و کاتالاز مثبت، از نظر متابولیسمی هوازی، از نظر هیدرولیز ژلاتین و کازئین منفی و از نظر فعالیت اوره آزی مثبت بود. از نظر تولید اسید از کربوهیدراتهای گلوکز مثبت و فروکتوز و سوکروز منفی بود. محدوده ی رشد در نمک سدیم کلرید در جدایه ND9 بین ۱ تا ۱۵ درصد تعیین شد. رشد بهینه جدایه مذکور در ۵ درصد وزنی/حجمی نمک سدیم کلراید رخ می دهد. بر مبنای نتایج مطالعات فنوتیپی و مقایسه ویژگی های این جدایه با سایر باکتری های نمک دوست نسبی، جدایه ی مذکور به طور موقت در جنس *Halomonas* طبقه بندی شد. در ادامه جهت تعیین هویت ملکولی جدایه ی ND9، ابتدا DNA ی ژنومی استخراج و سپس با استفاده از واکنش PCR، ژن کد کننده ی 16S rRNA از طریق پرایمرهای همگانی RW01 و DG74 که که مربوط به ترادف ژنی 16s rDNA باکتری *E .coli* (Position 1100-1450/1500) است، تکثیر شد (شکل ۱).



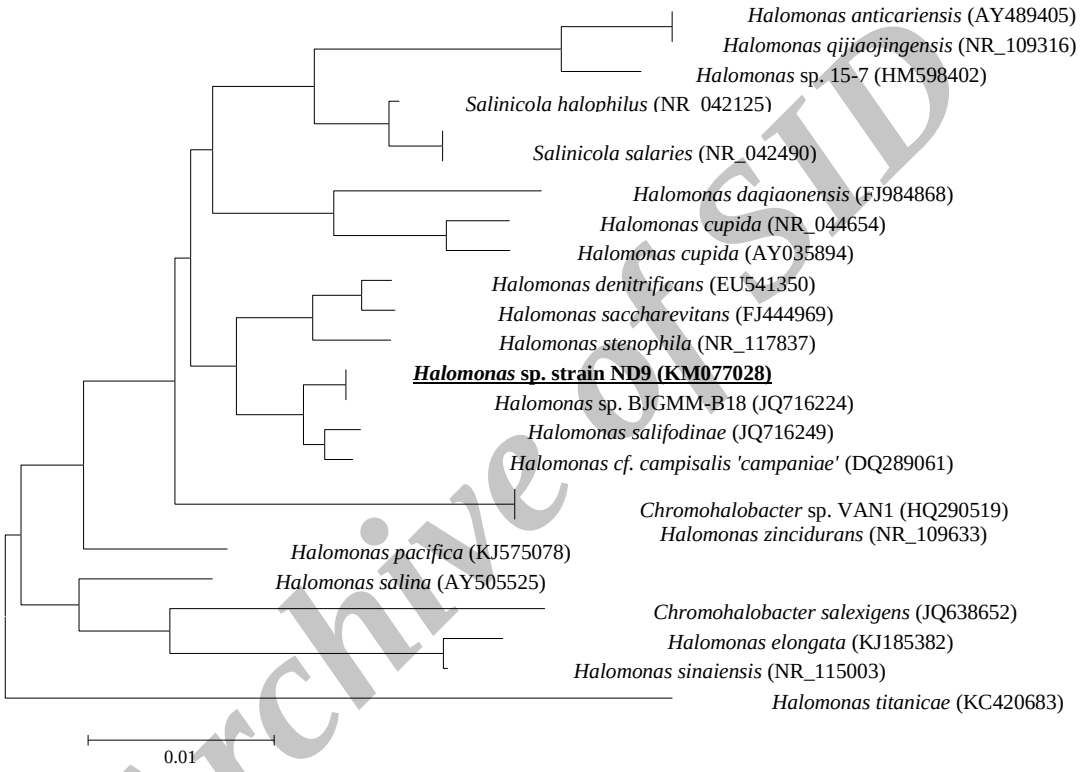
شکل ۱- باند 16 S rDNA حاصل از واکنش PCR جدایه ی باکتری ND9 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

Figure 1. 16S rDNA PCR gel electrophoresis of bacterial strain ND9 on 1% agarose gel

Archive of SID

www.SID.ir

پس از توالی یابی محصول PCR، میزان شباهت توالی ژن 16S rRNA جدایه ND9 در بانک اطلاعات ژنی NCBI به کمک نرم افزار BLAST مورد جستجو قرار گرفت که با توجه به همپوشانی ۹۹ درصدی این توالی با توالی های ثبت شده از بانک ژن موجود در سایت NCBI، میکروارگانیسم نمک دوست نسبی جدا شده تحت عنوان *Halomonas* sp. strain ND9 نام گذاری گردید. پس از تعیین توالی ژن 16S rRNA باکتری مذکور، ژن مذکور در GeneBank با شماره دسترسی KM077028 ثبت گردید. در ادامه ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از ترادف ژن سویه منتخب و ۲۲ سویه بدست آمده از GeneBank نشان داد که سویه منتخب ND9 نزدیکترین قرابت ژنتیکی را با سویه ای از BJGMM-B18 *Halomonas* sp. با شماره دسترسی JQ716224 دارد که نتایج در شکل ۲ ارائه شده است.



شکل ۲- درخت فیلوژنیک باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas* sp. ND9 با پتانسیل تجزیه کنندگی نیکوتین. درخت فیلوژنیک به کمک نرم افزار MEGA (نسخه ۶) و به کمک روش Neigbor-Joining رسم شده است. اعداد داخل پرانتز شماره دسترسی سویه های ثبت شده در بانک ژنی است.

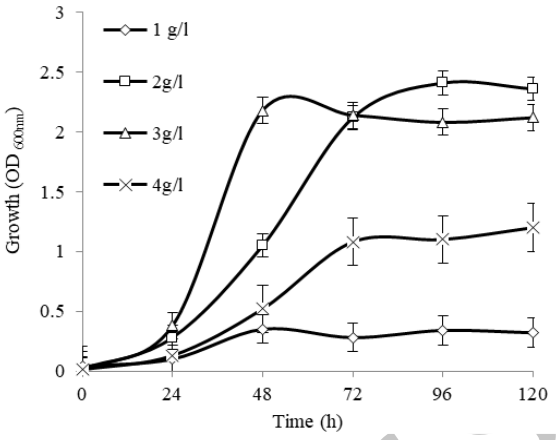
Figure 2. Phylogenetic tree *moderately halophilic bacterium, Halomonas* sp. ND9, with potential degrading of nicotine. Phylogenetic tree was constructed by MEGA6 software based on neighbor joining method.

بررسی اثر غلظت های مختلف نیکوتین بر رشد سلولی و توانایی تجزیه نیکوتین در باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas* sp. strain ND9: نتایج بررسی منحنی رشد باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas* sp. ND9 در محیط کشت بافر نمکی M9-nicotine- broth حاوی غلظت های مختلف نیکوتین در طی دوره زمانی ۱۲۰ ساعت در نمودار ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج بدست آمده، سویه باکتری مذکور بالاترین دانسیته سلولی (۲/۴) را در حضور ۲ گرم در لیتر نیکوتین داشته است در حالی که در حضور غلظت های بالاتر نیکوتین رشد باکتری کاهش پیدا کرده است. باکتری بومی *Halomonas* sp. ND9 در حضور غلظت بهینه رشد ۲ گرم در لیتر نیکوتین، تا ساعت ۲۴ از شروع گرماگذاری در

Archive of SID

www.SID.ir

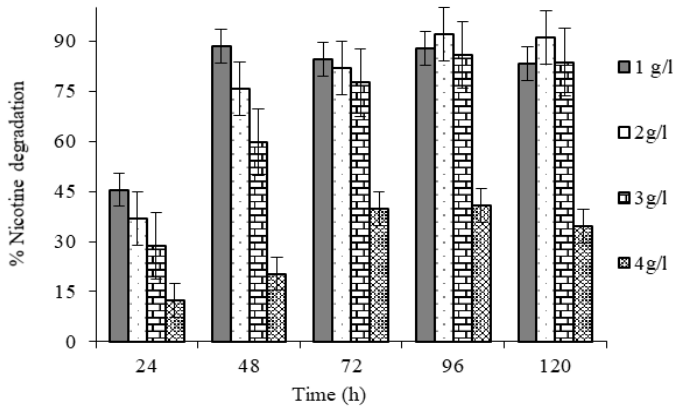
فاز تاخیری (Lag phase) قرار داشته است و تقریبا رشد معناداری در این فاصله زمانی صورت نگرفته است، این در حالی است که سویه مذکور پس از ساعت ۲۴ ام وارد فاز رشد لگاریتمی (Log phase) شده است و در نتیجه دانسیته سلولی به تدریج افزایش یافته است و منحنی رشد باکتری روند صعودی را تا ساعت ۹۶ ام طی نموده است و پس از آن وارد فاز سکون (Stationary phase) شده است (نمودار ۲).



نمودار ۲- نتایج دانسیته سلولی باکتری *Halomonas* sp. ND9 بر حسب زمان در غلظت های مختلف نیکوتین. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار۱± معرف انحراف معیار می باشد.

Diagram 2. The results of cell density of *Halomonas* sp. ND9 grown at different concentration of nicotine at various times. Results represent the means of three separate experiments, and deviation bars (±1) indicated.

در ادامه و براساس آنچه که در نمودار ۳ مشاهده می شود، بیشترین درصد حذف زیستی نیکوتین (۹۲ درصد) توسط باکتری *Halomonas* sp. ND9 ، در غلظت ۲ گرم در لیتر و پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری بدست آمد. همانگونه که در نمودار ۳ مشاهده می شود، در فرآیند نیکوتین زدایی زیستی توسط باکتری مذکور غلظت های بیش از ۲ گرم در لیتر کافئین دارای اثرات سمی بر روی میکروارگانیسم بوده که نتایج حاصل با یافته های سنتیک رشد سلولی کاملا همخوانی دارد.



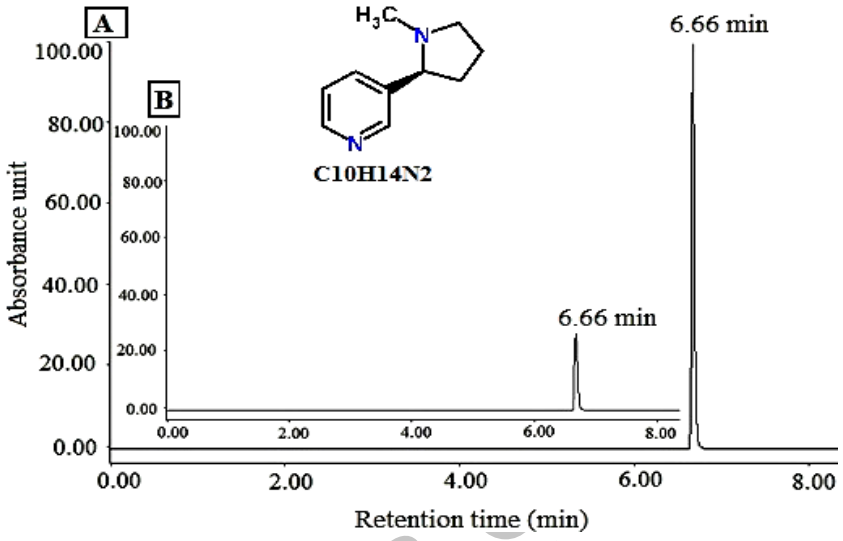
نمودار ۳- دوره زمانی تجزیه زیستی نیکوتین توسط باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas* sp. ND9 در غلظت های مختلف نیکوتین. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار۱± معرف انحراف معیار می باشد.

Diagram 3. The time course of nicotine degradation by *Halomonas* sp. ND9 in the *presence* of the *different* concentrations of nicotine. Results represent the means of three separate experiments, and deviation bars (±1) indicated.

Archive of SID

www.SID.ir

در شکل ۳ کروماتوگرام HPLC حاصل از فرآیند تجزیه زیستی نیکوتین تحت شرایط سلول های رویشی *Halomonas* sp. ND9 در کشت های حاوی ۲ گرم در لیتر نیکوتین پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری نشان داده شده است. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می شود، فعالیت متابولیکی بالا در کشت های رویشی سویه مذکور منجر به کاهش چشمگیر نیکوتین شده است و بنابراین استفاده از سلول های رویشی باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas* sp. ND9 به عنوان کاتالیست های زیستی مبتنی بر شیمی سبز جهت حذف زیستی نیکوتین پیشنهاد شده است.



شکل ۳- کروماتوگرام های HPLC به دست آمده از تجزیه کافئین تحت شرایط سلول های رویشی *Halomonas* sp. ND9. A: کروماتوگرام مربوط به ساعت صفرم و B: کروماتوگرام مربوط به ساعت ۹۶ ام پس از تلقیح میکروارگانیسم.

Figure3. *HPLC chromatograms* of nicotine degradation by Halomonas sp. ND9 under resting cells conditions in 0 and 96 h after *inoculation*.

بحث

باکتری های نمک دوست نسبی شامل گروه نامتجانس از میکروارگانیسم ها با تنوع زیاد می باشد که همگی می توانند در محیط های نمک دار مختلف مانند غذاهای شور، دریاچه های پرشور و خاک های پرشور و پر نمک زندگی می کنند (۲۱). باکتری های نمک دوست نسبی دارای توانایی های بالقوه برای وارد شدن در دنیای بیوتکنولوژی هستند. از این باکتری ها در ساخت غذاهای تخمیری، تولید بسیاری از ترکیبات باارزش صنعتی مانند آنزیم ها، پلی مرها، ترکیبات محافظ اسمزی و همچنین زیست پالایی انواع ترکیبات سمی در محیط های طبیعی استفاده شده است (۲۹). علاوه بر این باکتری های نمک دوست نسبی دارای ویژگی های نمک دوست نسبی دارای ویژگی های فیزیولوژیک مناسبی هستند که آنها را از جنبه های تجاری و صنعتی ارزشمند کرده است. یکی از ویژگی های مهم این باکتری ها، رشد در تراکم های بالای نمک است که این مسئله خطر آلودگی فرآیندهای صنعتی میکروبی را به حداقل می رساند. ویژگی ارزشمند دیگر رشد آسان این باکتری ها و نیازمندی های غذایی ساده این میکروارگانیسم ها است. بیشتر این باکتری ها می توانند طیف وسیعی از ترکیبات را به عنوان منبع کربن و انرژی مورد استفاده قرار دهند (۲۱). بهرحال با تمام اوصاف ذکر شده، هنوز مطالعه ایی در ارتباط با بکارگیری میکروارگانیسم های نمک دوست به عنوان کاتالیست های زیستی برای مطالعه در زمینه حذف زیستی نیکوتین صورت نگرفته است. بنابراین به منظور بررسی نقش اکولوژیک این گروه از باکتری ها در پاکسازی زیستی نیکوتین از محیط

Archive

www.SID.ir

های طبیعی، برای اولین بار جداسازی و شناسایی باکتری های نمک دوست نسبی بومی تجزیه کننده نیکوتین انجام شد. پس از غنی سازی جدایه های نمک دوست نسبی، جداسازی باکتری های بومی با قابلیت مصرف نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن، ازت و انرژی و تعیین پروفایل تحمل پذیری جدایه ها نسبت به نیکوتین، باکتری بومی *Halomonas* sp. strain ND9 (با شماره دسترسی KM077028 در بانک ژنی)، جدا شده از دریاچه نمکی بختگان فارس، به عنوان قوی ترین باکتری در تجزیه زیستی نیکوتین برگزیده شد. در نهایت با استفاده از دستگاههای اسکتروفتومتری و کروماتوگرافی HPLC، سنتتیک رشد سلولی و میزان حذف نیکوتین مورد ارزیابی قرار گرفت. کشت های رویشی باکتری *Halomonas* sp. ND9،با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به نیکوتین، توانست در طی ۹۶ ساعت بیش از ۹۲ درصد از نیکوتین با غلظت اولیه ۲ گرم در لیتر را تجزیه و حذف نماید. تا به امروز مطالعات گوناگونی بر روی تجزیه نیکوتین توسط سویه های مختلف میکروبی صورت گرفته است که در این میان سویه های باکتری متعلق به جنس *Pseudomonas* به عنوان توانمندترین سویه های باکتری در پاکسازی زیستی نیکوتین از محیط های آلوده شناخته شده اند. Ruan و همکاران (۱۱) استفاده از باکتری تجزیه کننده نیکوتین *Pseudomonas* sp. strain HF-1 ، جدا شده از خاک آلوده به پساب کارخانجات توتون، را برای تیمار پساب های دارای نیکوتین گزارش کردند. سویه مذکور قادر به تجزیه ۹۹/۶ درصدی نیکوتین با غلظت اولیه ۱/۳ گرم در لیتر پس از ۲۵ ساعت گرماگذاری بود. همچنین فرآیندی برای حذف نیکوتین پیشنهاد شده است و در آن از باکتری *Arthrobacter* sp. strain HF-2 استفاده شده است که می تواند در طی ۴۳ ساعت ۰/۷ گرم در لیتر نیکوتین را تحت شرایط کشت بهینه به صورت ۱۰۰ درصد تجزیه کند (۱۲). کشت های رویشی *Pseudomonas putida* J5 ، جداسازی شده از ریزوسفر گیاه تنباکو، با قابلیت تحمل پذیری ۴ گرم در لیتر نیکوتین، قادر به حذف کامل محلول های حاوی ۲ گرم در لیتر نیکوتین پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری بود (۱۶). همچنین گزارش شده است که وقتی نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت در محیط وجود داشته باشد، سویه باکتری *Rhodococcus* sp. strain Y22 می تواند بطور کامل محلول های حاوی نیکوتین در غلظت نهایی ۱ گرم در لیتر را تحت شرایط دمای بهینه ۲۸ درجه سانتی گراد و pH بهینه برابر ۷ را پس از ۵۲ ساعت گرماگذاری تجزیه نماید (۱۷). در پژوهش دیگری یک سویه باکتری تحت عنوان *Agrobacterium* sp. strain S33 از خاک ریزوسفر مزارع تحت کشت تنباکو جداسازی شد که طی ۶ ساعت قابلیت تجزیه ۱۰۰ درصد نیکوتین را در غلظت ۱ گرم در لیتر ، تحت شرایط کشت بهینه شده، دارا بود (۱۸). علاوه بر این، در تحقیق دیگری از فرآیند حذف نیکوتین توسط باکتری *Pseudomonas* sp. strain ZUTSKD مشخص شد که سویه مذکور قادر به تجزیه ۹۷ درصدی نیکوتین (غلظت اولیه ۱/۶ گرم در لیتر) پس از ۱۲ ساعت گرماگذاری در دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی گراد، pH بهینه برابر ۷ و در محیط های کشت بافری حاوی عصاره مخمر به عنوان منبع ازت کمکی است (۱۹). در مطالعه صورت گرفته دیگری توسط Li و همکاران (۲۰) مشخص شد که سویه باکتری *Aceintobacter* sp. strain ND12 تحت شرایط بهینه شده از نظر دما، pH و دور شیکر، قادر به تجزیه ۱۰۰ درصدی نیکوتین در غلظت بهینه ۱ گرم در لیتر است. در جدیدترین مطالعه صورت گرفته توسط Liu و همکاران (۹) سویه باکتری غربال گری شده *Pseudomonas geniculata* N1، با قابلیت مصرف نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، در دمای بهینه ۳۰ درجه، pH بهینه برابر ۶/۵ و دور شیکر بهینه ۱۲۰ rpm قابلیت حذف کامل نیکوتین در غلظت اولیه ۱/۵ گرم در لیتر را پس از ۴ روز گرماگذاری دارا بود. جداسازی باکتری بومی *Halomonas* sp. ND9، با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به نیکوتین و دستیابی به حذف ۹۲ درصدی نیکوتین با غلظت اولیه ۲ گرم در لیتر پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری تحت شرایط سلول های رویشی و بدون بهینه سازی شرایط کشت و بدون اضافه نمودن منابع کربن و یا ازت کمکی

Archive of SID

www.SID.ir

و سایر موادی که هزینه فرآیند نیکوتین زدایی را افزایش دهد و مقایسه این مطالعه با سایر مطالعات انجام شده در ارتباط با تجزیه زیستی نیکوتین، این امید را می دهد که باکتری بومی *Halomonas* sp. strain ND9 انتخاب مناسبی جهت استفاده به عنوان یک بیوکاتالیزور مناسب در تیمار پساب های حاوی نیکوتین باشد.

نتیجه گیری و پیشنهادات

تا به امروز گزارشات وسیعی از کاربرد سویه های باکتری متعلق به جنس *Halomonas* به عنوان یک ابزار میکروبی کارآمد در جهت اصلاح و تجزیه زیستی انواع آلاینده های زیست محیطی از جمله حذف زیستی ماده پرتوزای تکنیتیوم، تجزیه بنزوات و سالسیلات، حذف زیستی رنگ های آزو، اصلاح زیستی سرب و کادمیوم و همچنین تجزیه زیستی انواع ترکیبات فنلی منتشر شده است. این در حالی است که تاکنون هیچ گزارشی از حذف نیکوتین بوسیله سویه های جنس *Halomonas* گزارش نشده است. باکتری بومی غربال گری شده *Halomonas* sp. strain ND9 با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به نیکوتین، این توانایی را دارد که از نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت و انرژی استفاده کند، بنابراین استفاده از باکتری بومی مذکور به عنوان کاتالیست در جهت زیست پالایی نیکوتین از محیط زیست، می تواند بسیاری از مشکلات درمانی و زیست محیطی ناشی از حضور نیکوتین سمی را مرتفع سازد و با صرف هزینه های بسیار کمتر نسبت به روش های سنتی این ترکیب سمی را از محیط های طبیعی حذف نمود. با توجه به توانایی خوب باکتری *Halomonas* sp. ND9 در تجزیه نیکوتین می توان جهت کاربرد نهایی باکتری بومی مذکور در فرآیند نیکوتین زدایی محیط های آلوده (Scale-up)، اتخاذ فرآیندهای بهینه سازی ترکیبات و شرایط محیط کشت و همچنین شناسایی و بررسی ساز و کار فعالیت آنزیم های تجزیه کننده نیکوتین در سویه *Halomonas* sp. ND9 را با هدف بهبود راندمان فرآیند حذف پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

این پروژه در قالب طرح پژوهشی به شناسه ۴/۴۱۹۸۳/۱۳۹۳ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام گرفته است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان نهایت سپاس و قدردانی به عمل می آید.

Reference

1. Doolittle, DJ., Winegar, R., Lee, CK., Caldwell, WS., Hayes, AW., Bethizy, JD., 1995. The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. Mutation Research, Vol. 344, No. 3, pp. 95–102
2. Siegmund, B., Leitner, E., Pfannhauser, W., 1999. Development of simple sample preparation technique for gas chromatographic - mass spectrometric determination of nicotine in edible nightshades (Solanaceae). Journal of Chromatography A, Vol. 840, No. 2, pp. 249-260
3. Samuelsson, G., 1999. Drugs of Natural Origin. A textbook of pharmacognosy, Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm, pp. 551
4. Soloway, SB., 1976. Naturally occurring insecticides. Environmental Health Perspectives, Vol. 14, No.2, pp. 109-117
5. Sabha, M., Tanus-Santos, JE., Toledo, JC., Cittadino, M., Rocha, JC., Moreno, H., 2000. Transdermal nicotine mimics the smoking-induced endothelial dysfunction. Clinical Pharmacology Therapeutics, Vol. 68, No. 2, pp. 167–174
6. Civilini, M., Domenis, C., Sebastianutto, N., Bertoldi, M., 1997. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its

Archive of SID

www.SID.ir

degradation by microorganisms. Waste Management Research, Vol. 15, No. 4, pp. 349–358

7. Zheng, KL., Yu, DM., 2004. A status of the comprehensive utilization of discarded tobacco leaves. Journal of Chongqing Jianzhu University, Vol. 3, No. 2, pp. 61–64
8. Lenkey, AA., 1989. Nicotine removal process and product produced thereby; mixing with alkaline agent in aerobic environment. United States Patent No. 4, pp. 848-373
9. Liu, Y., Wang, L., Huang, K., Wang, W., Nie, X., Jiang, Y., Li, P., Liu, S., Xu, P., Tang, H., 2014. Physiological and biochemical characterization of a novel nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas geniculata* N1. PLOS ONE, Vol. 9, No.1, pp. e84399
10. Gherna, RL., Richardson, SH., Rittenberg, SC., 1965. The bacterial oxidation of nicotine.VI. Themetabolism of 2, 6-dihydroxypseudooxynicotine. Journal of Biological Chemistry, Vol. 240, No. 9, pp. 3669–3674
11. Ruan, AD., Min, H., Peng, X., Huang, Z., 2005. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine. Research in Microbiology, Vol. 156, No. 5, pp. 700–706
12. Ruan, A., Min, H., Zhu, W., 2006. Studies on biodegradation of nicotine by *Arthrobacter* sp. strain HF-2. Journal of Environmental Science and Health B, Vol. 41, No. 7, pp. 1159-1170
13. Wang, SN., Liu, Z., Tang, HZ., Meng, J., Xu, P., 2007. Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16. Microbiology, Vol. 153, No. 5, pp. 1556-1565
14. Yuan, YJ., Lu, ZX., Huang, LJ., Li, Y., Lu, FX., Bie, XM., Teng, YQ., Lin, Q., 2007. Biodegradation of nicotine from tobacco waste extract by *Ochrobactrum intermedium* DN2. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology Vol. 34, No. 8, pp. 567-570
15. Chen, CM., Li, XM., Yang, JK., Gong, XW., Li, B., Zhang, KQ., 2008. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. nic22, and its potential application in tobacco processing. International Biodeterioration and Biodegradation, Vol. 62, No. 3, pp. 226–231
16. Wei, HL., Lei, LP., Xia, ZY., Liu, XZ., 2008. Characterization of a novel aerobic nicotine-biodegrading strain of *Pseudomonas putida*. Annals of Microbiology, Vol. 58, No. 1, pp. 41-45
17. Gong, XW., Yang, JK., Duan, YQ., Dong, JY., Zhe, W., Wang, L., Li, QH., Zhang, KQ., 2009. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing. Research in Microbiology, Vol. 160, No. 3, pp. 200–204
18. Wang, SN., Liu, Z., Xu, P., 2009. Biodegradation of nicotine by a newly isolated *Agrobacterium* sp. strain S33. Journal of Applied Microbiology, Vol. 107, No. 3, pp. 838-847
19. Zhong, W., Zhu, C., Shu, M., Sun, K., Zhao, L., Wang, C., Ye, Z., Chen, J., 2010. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD.

Archive of SID

www.SID.ir

Bioresource Technology. Vol. 101, No. 18, pp. 6935–6941

20. Li, HJ., Duan, YQ., Ma, GH., Lei, LP., Zhang, KQ., Yang, JK., 2011. Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. ND12 capable of degrading nicotine. African Journal of Microbiology Research, Vol. 5, No. 11, pp. 1335–1341
21. Ventosa, A., Nieto, JJ., Oren, A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol.
22. Molecular Biology Reviews, Vol. 62, No. 2, pp. 504–544
23. Nieto, JJ., Fernandez-Castillo, R., Marquez, MC., Ventosa, A., Quesada, E., Ruiz-Berraquero, F., 1989. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Applied Environmental Microbiology, Vol. 55, No. 9, pp. 2385–2390
24. Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
25. Al-Bayati, FA., 2008. Synergistic antibacterial activity between Thymus vulgaris and Pimpinella anisum essential oils and methanol extracts. Journal of Ethnopharmacology, *Vol. 116, No. 3, pp.* 403-406
26. Smibert, RM., Krieg, NR., 1994. Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds.), Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 607–654
27. Leong, DU., Greisen, KS., 1993. PCR detection of bacteria found in cerebrospinal fluid. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC and White TJ. (eds.) Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Mayo Foundation, Rochester, pp. 300–309
28. Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F., 2011. Use of growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the natural vanillin via conversion of isoeugenol. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, Vol. 10, No. 4, pp. 749-757
29. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, Vol. 30, No. 12, pp. 2725-2729
30. Oren, A., 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environmental Technology, Vol. 31, No. 8, pp. 825-834

Archive of SID

www.SID.ir