Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):39-45

Biodechlorination of Chlorinated Aliphatic Compounds Trichloroethylene, Dichloromethane, and Dichloroethane in Aqueous Solution, Using Aerobic *Sphingopyxix ummariensis* Bacteria

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Badali N.[1] *MSc*,
Sokrolahzade S.* *PhD*,
Farazmand A.[2] *PhD*

How to cite this article
Badali N, Sokrolahzade S, Farazmand A. Biodechlorination of Chlorinated Aliphatic Compounds Trichloroethylene, Dichloromethane, and Dichloroethane in Aqueous Solution, Using Aerobic *Sphingopyxix ummariensis* Bacteria. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):39-45.

*Chemical Technologies Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran
[1]Chemical Technologies Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran
[2]Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Chemical Technologies Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Enqelab Street, Parsa Square, Ahmadabad Mostoufi Road., Azadegan Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 3353136846
Phone: +98 (21) 56276637
Fax: -
shokrollahzadeh@irost.ir

Article History
Received: March 2, 2016
Accepted: February 5, 2017
ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims The chlorinated organic compounds are the most dangerous water pollutants in industrial sites. The aim of this study was to investigate the biodechlorination of chlorinated aliphatic compounds; trichloroethylene, dichloromethane, and 1,2- dichloroethane in aqueous solution, using aerobic *Sphingopyxix ummariensis* bacteria.

Materials & Methods In this experimental study, aliphatic chlorinated compounds; diclormethan, trichlorethylene, and 1,2-dichloroethane with purity of 99.9% were used. A visible-ultraviolet spectroscopy was used to determine the cell growth from measuring the turbidity of the medium at 600nm. The amount of released chloride was measured by an Ion Selective Electrode (ISE). The live bacterial sample was inoculated into the Nutrient Broth medium and was incubated at 30°C and 150rpm for 24 hours.

Findings The rate of dechlorination of diclormethan, trichlorethylene, and 1,2-dichloroethane by *Sphingopyxis ummariensis* were measured as 1.3, 1.05, and 0.63mg/l.h, respectively. The addition of glucose and yeast extract, as co-substrate, led to an increase in the cell growth and dechlorination rate up to 3.28, 1.67 and 0.90mg/l.h, respectively. During experiment, the highest dechlorination was measured at concentration of 2.5mM, at exponential growth phase.

Conclusion *Sphingopyxix ummariensis* bacteria is capable of biodechlorination of chlorinated aliphatic compounds and can grows on trichloroethylene, dichloromethane, and 1,2-dichloroethane as a single carbon source and can decolorize them. This strain has the highest growth and removal efficiency in eliminating dichloromethane as the sole source of carbon along with glucose and yeast extract as co-substrate.

Keywords Dechlorination; Trichloroethylene; Dichloroethane; Dichloromethane; Sphingopyxix Bacteria

CITATION LINKS

[1] Removal of dichloromethane from ground and ... [2] Degradation of 1, 2-dichloroethane with advanced reduction processes (ARPs) ... [3] Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic ... [4] Record display for the EPA National Library ... [5] Environmental dynamics and engineered systems for the degradation ... [6] Biodegradation of trichloroethylene by Methylosinus ... [7] Soluble methane monooxygenase production and ... [8] Biodegradation of 1, 2-dichloroethane (1,2-DCA) by cometabolism ... [9] Effects of bioaugmentation on enhanced reductive dechlorination ... [10] Biological elimination of volatile xenobiotic compounds ... [11] Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a ... [12] Dehalogenation of dichloromethane by cell extracts of Hyphomicrobium ... [13] Effective utilization of dichloromethane by a newly ... [14] Characterization and kinetic Study of ... [15] Sphingopyxis indica sp. nov., isolated from a high dose point ... [16] Sphingopyxis ummariensis sp. nov., isolated from a hexachlorocy ... [17] Degradation of 2, 4, 6-trichlorophenol by bacteria isolated from secondary ... [18] Compilation of EPA's sampling and analysis ... [19] Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase ... [20] In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents ... [21] Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes ... [22] Biodegradation of 1,2-dichloroethane (1,2-DCA) by cometabolism ... [23] Trichloroethylene degradation in a coupled ... [24] Aerobic bioremediation of 1, 2 dichloroethane and vinyl ... [25] Fates of chlorinated volatile organic compounds ... [26] Semicontinuous microcosm study of aerobic ... [27] Ancylobacter dichloromethanicus sp. nov.–a new aerobic ... [28] Degradation of 1, 2-dichloroethane by Ancylobacter aquaticus ... [29] Monooxygenase-mediated 1, 2-dichloroethane degradation ... [30] Removal of dichloromethane from waste gases ... [31] Isolation and characterization of a new dichloromethane ... [32] Bacillus circulans WZ-12-a newly discovered aerobic dichloromethane ... [33] Aerobic biodegradation of dichloroethenes by ... [34] Optimizing aerobic biodegradation of dichloromethane ...

Archive

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

کلرزدایی زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرومتان و ۱و۲-دی‌کلرواتان از محلول آبی با استفاده از باکتری هوازی *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس*

ندا بدلی MSc
پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
سهیلا شکرالله‌زاده* PhD
پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
عباس فرازمند PhD
پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده
اهداف: ترکیبات آلی حاوی کلر یکی از خطرناک‌ترین ترکیبات آلاینده آب در مناطق صنعتی هستند. هدف مطالعه حاضر حذف زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرومتان و ۱و۲-دی‌کلرواتان در محلول آبی با استفاده از باکتری بومی *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر از ترکیبات آلیفاتیک کلردار دی‌کلرومتان، تری‌کلرواتیلن و ۱و۲-دی‌کلرواتان با خلوص آزمایشگاهی ۹۹/۹% استفاده شد. برای تعیین رشد سلولی از اندازه‌گیری کدورت محیط کشت در طول‌موج ۶۰۰نانومتر، دستگاه طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش به‌کار رفت. اندازه‌گیری مقدار یون کلراید آزادشده به‌وسیله دستگاه یون آنالایزر الکترود گزینشی یونی صورت گرفت. نمونه باکتری زنده به محیط کشت نوترینت‌براث تلقیح و در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm به‌مدت ۲۴ساعت گرمخانه‌گذاری شد.
یافته‌ها: سرعت کلرزدایی هر یك از ترکیبات تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرومتان و ۱و۲-دی‌کلرواتان در محیط آبی در غلظت ۲/۵میلی‌مولار توسط این باکتری به ترتیب ۱/۳، ۱/۰۵ و ۰/۶۳mg/l.h به دست آمد. افزودن گلوکز و عصاره مخمر به محیط کشت، موجب افزایش سرعت رشد باکتری و همچنین سرعت کلرزدایی آنها به ترتیب به ۳/۲۸، ۱/۶۷ و ۰/۹mg/l.h شد. بیشترین کلرزدایی در شرایط آزمون، در غلظت ۲/۵میلی‌مولار به دست آمد و بیشترین کلرزدایی در مرحله رشد نمایی باکتری رخ داد.
نتیجه‌گیری: باکتری *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* توانایی حذف ترکیبات آلیفاتیك کلردار را دارد و می‌تواند روی ترکیبات دیرتخریب‌پذیر تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرومتان و ۱و۲-دی‌کلرواتان به‌عنوان تنها منبع کربن رشد کند و موجب کلرزدایی آنها شود. این سویه بیشترین رشد و بازدهی حذف زیستی را در حذف دی‌کلرومتان، به‌عنوان تنها منبع کربن و در کنار گلوکز و عصاره مخمر به‌عنوان هم-سوبسترا دارد.
کلیدواژه‌ها: کلرزدایی، تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرواتان، دی‌کلرومتان، باکتری اسفینگوپیکسیس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷
*نویسنده مسئول: shokrollahzadeh@irost.ir

مقدمه

باکتری *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* (*Sphingopyxis ummariensis*) می‌تواند ترکیبات آلیفاتیک کلردار را حذف کند و قادر است روی ترکیبات دیرتخریب‌پذیر تری‌کلرواتیلن (TCE)، دی‌کلرومتان (DCM) و ۱و۲-دی‌کلرواتان (1,2-DCA) به‌عنوان تنها منبع کربن رشد کند و موجب کلرزدایی آنها شود. ترکیبات آلیفاتیک کلردار یکی از اصلی‌ترین عوامل آلاینده آب‌های زیرزمینی در مناطق صنعتی مانند صنایع شیمیایی، پتروشیمی و نساجی هستند[1] که مهم‌ترین خطر این مواد سرطان‌زابودن آنها است[2].

بیشترین سهم آلودگی انواع ترکیبات آلی در آب‌های زیرزمینی در کشورهای ایالات‌متحده و آلمان، مربوط به ترکیبات آلیفاتیک کلردار است[3]. اگرچه اطلاعات مشابه در مورد ایران وجود ندارد، ولی با توجه به وجود صنایع شیمیایی و پتروشیمیایی بزرگ تولیدکننده و مصرف‌کننده ترکیبات آلی کلردار در ایران و دیرتخریب‌پذیربودن این نوع ترکیبات، می‌توان انتظار روند مشابهی را داشت. از میان ترکیبات کلردار، تتراکلرواتیلن و تری‌کلرواتیلن به‌ترتیب جزء آلودگی‌های عمده و نگران‌کننده در طبیعت به‌شمار می‌آیند[4]. دلیل این امر سرعت آهسته تجزیه زیستی این ترکیبات در شرایط هوازی و بی‌هوازی و سمیت آنها گزارش شده است. از طرفی، کاهش تعداد اتم‌های کلر در ترکیبات آلیفاتیک کلردار، سرعت تجزیه زیستی آن را در شرایط بی‌هوازی کاهش می‌دهد، در حالی که در شرایط هوازی عکس این پدیده مشاهده شده است[5]. در حذف زیستی TCE در شرایط هوازی (معدنی‌شدن)، ابتدا این ماده به cis-DCE (سیس- دی‌کلرواتن) و trans-DCE (ترانس- دی‌کلرواتن)، البته بیشتر به شکل سیس و سپس به وینیل‌کلراید، اتن و در نهایت به دی‌اکسیدکربن و آب تبدیل می‌شود. به‌منظور حذف زیستی هوازی تری‌کلرواتیلن، باکتری *متیلوسینوس تریکوسپوریوم* (*Methylosinus trichosporium OB3b*) بهترین نتیجه را تا به‌امروز داشته است. این باکتری قادر است ۱۰۰% تری‌کلرواتیلن با غلظت ۰/۸گرم بر لیتر در ۲۰ دقیقه را جذب کرده و به عبارت دیگر، سرعت حذف زیستی آن ۲/۴گرم بر لیتر در ساعت (g/l.h) گزارش شده است[6]. سویه *متیلوموناس متانیکا* (*Methylomonas methanica 68-1*) نیز سرعت حذف زیستی مناسبی از TCE را نشان داده است به‌گونه‌ای که برای این سویه، حذف غلظت ۵/۶میلی‌گرم بر لیتر با سرعت حذف ۰/۲میلی‌گرم بر لیتر در ساعت (mg/l.h) گزارش شده است[7].

تعداد محدودی از باکتری‌ها توانایی استفاده از 1,2-DCA به‌عنوان منبع کربن را دارند. از این باکتری‌ها می‌توان به سویه‌های *انسیلوباکتر آکواتیکوس* (*Ancylobacter aquaticus AD25*)، *گزانتوباکتر آئوتروفیکوس GJ10* (*Xanthobacter autotrophius GJ10*) و *سودوموناس* (*Pseudomonas sp. Strain DCA*) اشاره کرد[8, 9].

دی‌کلرومتان (DCM) یکی از ساده‌ترین ترکیبات آلیفاتیک کلردار است که نسبت به سایر ترکیبات سرعت تجزیه زیستی بالاتری دارد[1]. تعدادی از باکتری‌های هوازی که توانایی حذف DCM را دارند شامل *پاراکوکوس متیلوتنس* (*Paracoccus methylutens*)، *هیفوباکتریوم DM2* (*Hyphomicrobium sp. DM2*)، *آلبی‌باکتر متیلوورانس DM10* (*Albibacter methylovorans DM10*)، *متیلوباکتریوم دی‌کلرومتانیکوم DM4* (*Methylobacterium dichloromethanicum DM4*) و *M. rhodesianum H13* هستند[10-12]. در میان باکتری‌های هوازی، بهترین عملکرد در حذف زیستی DCM را باکتری *متیلوباکتریوم رودسیانوم H13* (*M. rhodesianum H13*) دارد که قادر است ۱۰۰% دی‌کلرومتان را در غلظت ۵میلی‌مولار، به‌عنوان تنها منبع کربن پس از ۴۸ ساعت حذف کند[13].

باکتری *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* استفاده‌شده در پژوهش حاضر توسط *شکرالله‌زاده* و همکاران در سال ۲۰۱۳ از لجن فعال تصفیه‌خانه بیولوژیک شرکت پتروشیمی آبادان که تولیدکننده پلی‌وینیل‌کلراید (PVC) است، جداسازی شده است. پژوهش‌های مقدماتی نشان می‌دهد که این سویه در محیط حلال دی‌کلرومتان

Archive of SID
www.SID.ir

رشد مناسبی دارد[14]. سویه باکتری مشابه *اسفینگوپیکسیس اینسید* (*Sphingopyxis indica sp. Nov*) برای اولین‌بار توسط *جین‌دال* و همکاران از مناطق آلوده به ماده هگزا-کلروسیکلوهگزان (HCH) جداسازی شده است[15]. سویه *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* یک باکتری گرم‌منفی و هوازی با کلنی زردرنگ است[16]. با توجه به محیط رشد طبیعی این باکتری (آلوده به ترکیبات آلیفاتیک کلردار)، در این پژوهش توانایی آن در حذف ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرواتان و دی‌کلرومتان بررسی شد.

به‌طور کلی هدف پژوهش حاضر حذف زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری‌کلرواتیلن (TCE)، دی‌کلرومتان (DCM) و دی‌کلرواتان (1,2-DCA) در محلول آبی با استفاده از باکتری بومی *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس بود.*

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر از ترکیبات آلیفاتیک کلردار دی‌کلرومتان، تری‌کلرواتیلن و ۱و۲-دی‌کلرواتان با خلوص آزمایشگاهی ۹۹/۹% استفاده شد. غلظت نمک‌های معدنی (مرک؛ آلمان) در یک لیتر آب مقطر شامل موارد زیر بود (گرم بر لیتر):

$KHPO_4(1.0)$, $(NH_4)_2SO_4$ (1.8), $MgSO_4.7H_2O(0.2)$, (0.03) $CaCl_2 2H_2O$

محیط کشت پس از تهیه، در دمای ۱۲۱°C به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شد. برای ساخت محلول ریزمغذی، ترکیبات زیر مورد استفاده قرار گرفت (میلی‌گرم بر لیتر)[17]:

$Ca(NO_3).24H_2O(10)$, $FeSO_4.7H_2O(880)$, $ZnSO_4.7H_2O(200)$, $H_3BO_3(10)$, $CoSO_4.7H_2O(10)$, $CuSO_4.5H_2O(10)$, $MnSO_4.H_2O(4)$, $Ni(NO_3)_2.6H_2O(4)$, $Na_2MoO_4.2H_2O(3)$, $Na_2WO_4.2H_2O(2)$, $H_2SO_4(0.05)$

محلول ریزمغذی با غلظت ۱۰برابر تهیه و قبل از اضافه‌شدن به محیط کشت، به‌صورت مجزا استریل شد.

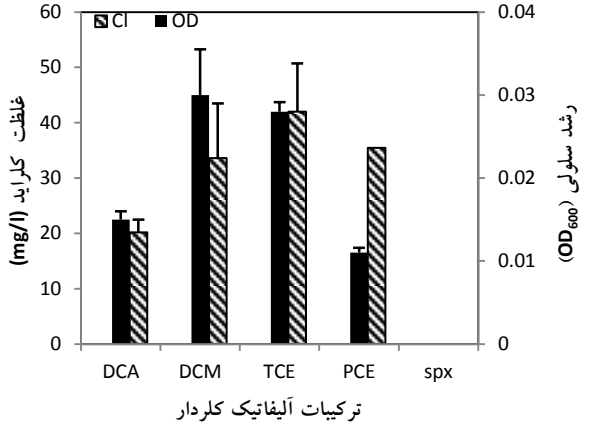
در شرایطی که از گلوکز و عصاره مخمر به‌عنوان هم-سوبسترا استفاده شد، محلول گلوکز و عصاره مخمر با غلظت یکسان ۰/۲۵میلی‌گرم بر لیتر ساخته شد، سپس گلوکز به‌مدت ۵ دقیقه و عصاره مخمر به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به‌مدت ۲۰ دقیقه سترون شد. باکتری *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* از لجن فعال شرکت پتروشیمی آبادان جداسازی و در کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (به شماره PTCC 1895) نگهداری و به‌صورت کشت زنده تهیه شد.

اندازه‌گیری رشد سلولی و یون کلراید آزادشده: برای تعیین رشد سلولی از اندازه‌گیری کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰نانومتر به‌وسیله دستگاه طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش مدل 8620 (UNICAM؛ ایالات متحده) استفاده شد. اندازه‌گیری مقدار یون کلراید آزادشده با استفاده از دستگاه یون آنالایزر مدل 3045 (JENWAY؛ انگلستان) و الکترود گزینشی یونی (ISE) صورت گرفت. برای اندازه‌گیری دقیق یون کلراید آزادشده ناشی از تجزیه زیستی، دو نقطه صفر (کنترل) شامل محیط کشت بدون باکتری و محیط کشت دارای باکتری و بدون هرگونه ترکیب کلردار انتخاب شدند، تا صرفاً مقدار یون کلراید آزادشده به‌دلیل تجزیه زیستی اندازه‌گیری شود. برای تایید مقدار یون کلراید اندازه‌گیری‌شده با دستگاه، از روش EPA9552 به‌عنوان روش مکمل اندازه‌گیری یون کلراید استفاده شد[18].

کشت باکتری و تجزیه زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار: نمونه باکتری زنده به محیط کشت نوترینت‌براث تلقیح و در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. برای سلول‌های رشدیافته، دو بار سانتریفوژ (دور ۶۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه) و شست‌وشو صورت گرفت. سپس سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۱ تا ۱/۲ در طول موج ۶۰۰نانومتر تهیه شد. سپس ۱۰۰میکرولیتر از آن به ۱۲مترمکعب محیط کشت حاوی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تلقیح و سپس در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm به‌مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. با توجه به فراربودن ترکیبات DCM، TCE و 1,2-DCA، برای کشت باکتری در حضور این ترکیبات، بطری سرم با حجم ۱۲۰مترمکعب مجهز به درپوش سپتوم سیلیکونی و درپوش آلومینیومی مورد استفاده قرار گرفت. نسبت حجم محیط کشت به حجم کلی بطری ۱:۱۰ انتخاب شد تا شرایط هوازی برای رشد باکتری‌ها فراهم شود. بعد از استریل‌شدن محیط کشت نمکی، ترکیبات به‌همراه باکتری در شرایط سترون به بطری درپوش‌دار اضافه و پس از آن در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm در زمان‌های مورد نظر گرمخانه‌گذاری شدند. غلظت یون کلراید آزادشده، به‌عنوان معیاری از تجزیه زیستی اندازه‌گیری شد[19]. نسبت یون کلراید آزادشده به کل کلراید ترکیب به‌صورت درصد مولی (mM/mM×100) محاسبه شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها سه بار تکرار شد و در مواردی با عدم ارایه خطای میانگین، مقادیر میانگین گزارش‌شدند.

یافته‌ها

بیشترین میزان رشد باکتری به‌ترتیب برای ترکیبات DCM، TCE و 1,2-DCA به‌دست‌آمد (نمودار ۱).

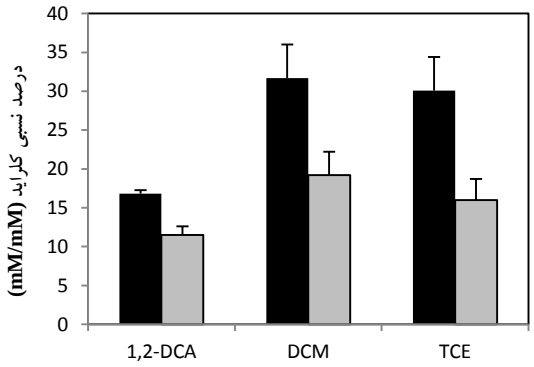


نمودار ۱) رشد سلولی *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* و غلظت یون کلراید آزادشده حاصل از حذف زیستی DCM، TCE و 1, 2-DCA در غلظت ۲/۵میلی‌مولار به‌عنوان تنها منبع کربن بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm
SPX نمونه شاهد بود (فاقد هر گونه ترکیب آلی کلردار)

در این شرایط، بیشترین یون کلراید آزادشده با غلظت ۴۲میلی‌گرم بر لیتر در TCE اندازه‌گیری شد. سرعت کلرزدایی هر یک از ترکیبات TCE، DCM و 1,2-DCA به‌وسیله این باکتری به‌ترتیب ۱/۰۵، ۱/۳ و ۰/۶۳میلی‌گرم بر لیتر به‌دست‌آمد. بیشترین درصد نسبی کلراید آزادشده در DCM در شرایط آزمایش برابر با ۱۹% و همچنین بیشترین کدورت ناشی از رشد باکتری نیز در رشد با این ماده به‌دست‌آمد. درصد نسبی کلراید آزادشده به کل اتم‌های کلر برای TCE و 1,2-DCA به‌ترتیب برابر با ۱۶ و ۱۲% اندازه‌گیری شد (نمودار ۲).

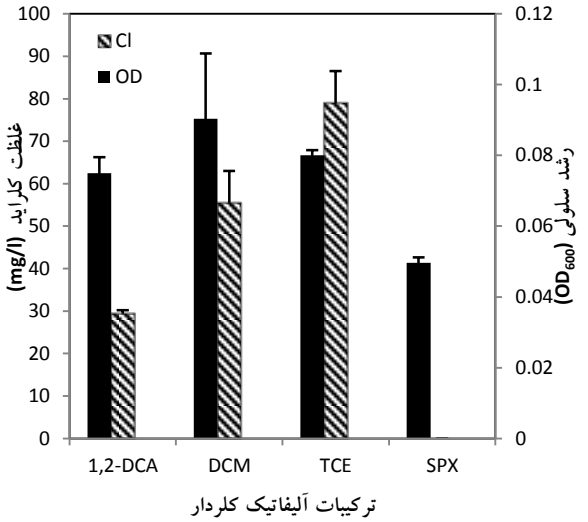
www.SID.ir

عصاره مخمر و گلوکز اثر مثبتی بر افزایش رشد و تجزیه زیستی ترکیبات آلیفاتیک مورد مطالعه داشت (نمودار ۳). با توجه به درصد نسبی کلراید آزادشده به کل اتم‌های کلر موجود در فرآیند تجزیه زیستی (نمودار ۲)، باکتری *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* همانند آزمون گذشته در حضور DCM بهترین عملکرد را با ۳۲% نشان داد و پس از آن TCE و 1,2-DCA به‌ترتیب ۳۰ و ۱۹% قرار داشت.



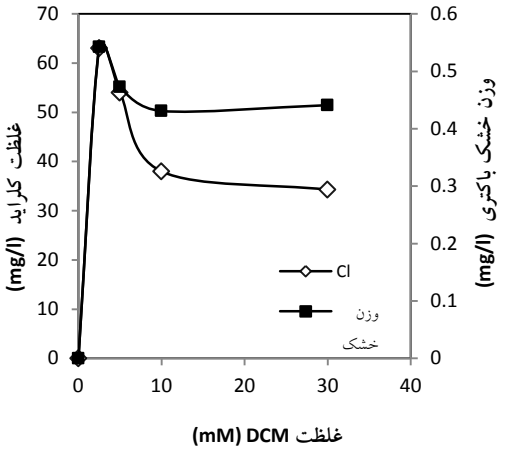
نمودار ۲) درصد نسبت یون کلراید آزادشده به کل اتم‌های کلر موجود در اثر تجزیه زیستی ترکیبات 1,2-DCA، TCE و DCM در غلظت ۲/۵میلی‌مولار به‌وسیله *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm به‌عنوان تنها منبع کربن (ستون‌های توپر) و با هم-سوبسترای گلوکز و عصاره مخمر (ستون خاکستری)

مقایسه درصد آزادسازی یون کلراید نسبت به شرایطی که از ترکیبات کلردار به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شده، نشان‌دهنده متوسط افزایش ۱/۷برابری تجزیه ترکیبات آلیفاتیک کلردار بود.



نمودار ۳) رشد سلولی و غلظت یون کلراید آزادشده حاصل از حذف زیستی DCM، TCE و 1,2-DCA در حضور گلوکز و عصاره مخمر در غلظت ۲/۵میلی‌مولار پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm
SPX نتایج در شرایط عدم حضور هر گونه ترکیب آلیفاتیک کلردار را نشان داد

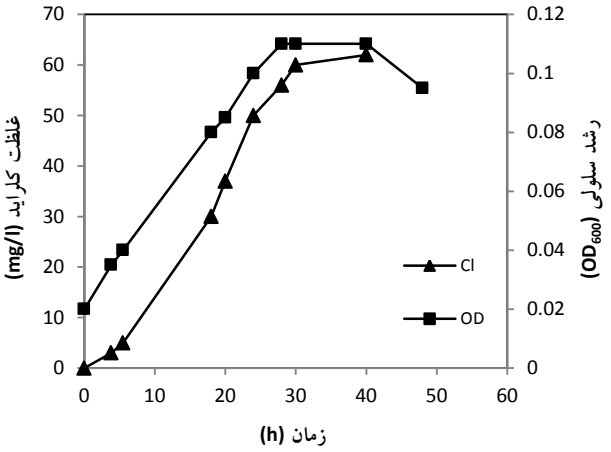
بیشترین میزان تجزیه زیستی و رشد باکتری در غلظت ۲/۵میلی‌مولار حاصل شد. افزایش غلظت DCM باعث کاهش رشد باکتری شد به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت از ۲/۵ به ۱۰میلی‌مولار،



رشد باکتری ۶۴% کاهش یافت و پس از آن تا غلظت ۳۰میلی‌مولار ثابت ماند (نمودار ۴).

نمودار ۴) رشد سلولی و غلظت یون کلراید آزادشده حاصل از حذف زیستی DCMبا غلظت‌های متفاوت در حضور گلوکز و عصاره مخمر پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm

منحنی رشد نشان‌دهنده اتمام مرحله رشد نمایی و ورود به مرحله سکون پس از ۳۲ ساعت بود. منحنی غلظت کلراید آزادشده در تطابق با منحنی رشد سلولی بود و بیشترین تجزیه زیستی در مرحله رشد نمایی انجام شد. با کاهش رشد سلولی، میزان تجزیه زیستی به همان نسبت کاهش یافت (نمودار ۵).



نمودار ۵) سینتیک رشد و تجزیه زیستی DCM با غلظت ۵میلی‌مولار در حضور گلوکز و عصاره مخمر پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm

بحث

پژوهش حاضر با هدف حذف بررسی زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرومتان و دی‌کلرواتان در محلول آبی با استفاده از باکتری بومی *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* انجام شد.

نتایج به‌دست‌آمده از تجربه زیستی هوازی ترکیبات آلیفاتیک کلردار در این پژوهش توسط سویه *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* نشان داد که با وجود رشد بهتر باکتری در محیط حاوی DCM، غلظت یون کلراید آزادشده در هر دو مورد برای TCE بیشتر بود که علت آن را می‌توان به وجود تعداد بیشتر اتم‌های کلر در این ماده

www.SID.ir

نسبت داد[20]. تعداد اتم کلر در یک مول TCE سه و در DCM دو عدد است. بررسی درصد نسبی کلراید آزادشده (نسبت کلراید آزادشده به کل کلر موجود در ماده) که پارامتر بهتری برای اندازه‌گیری معدنی‌شدن ترکیبات کلردار است[19]، نشان داد که در شرایط پژوهش حاضر کلرزدایی بهتری در مورد DCM چه به‌صورت تنها منبع کربن (۱۹%) و چه در حضور گلوکز و عصاره مخمر به‌عنوان هم-سوبسترا (۳۲%) نسبت به سایر مواد انجام شد که تاییدکننده یافته‌های پیشین است[21]. نزدیک‌ترشدن درصد نسبی یون کلراید آزادشده نسبت به کل اتم‌های کلر موجود در ترکیبات در شرایط هوازی به ۱۰۰، نشان‌دهنده عملکرد بهتر باکتری در آزادسازی یون کلراید و تجزیه زیستی بود و چنانچه این عدد مساوی ۱۰۰ شود به‌منزله معدنی‌شدن کل ترکیب است[19].

جدول ۱) مقایسه مطالعات انجام‌شده در حذف زیستی هوازی TCE، 1,2-DCA و DCM از آب و پساب با نتایج پژوهش حاضر

باکتری	هم-سوبسترا	غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)	زمان (روز)	حذف (%)	سرعت حذف (mg/l.h)	مرجع
ماده کلردار TCE						
کنسرسیوم باکتری‌ها در راکتور	—					[۲۵]
کنسرسیوم باکتری‌های هوازی	—	۰/۵۴۶	۷۶	۱۵		[۲۶]
کنسرسیوم باکتری‌های هوازی	تولوئن	۰/۵۴۶	۷۶	۶۲		[۲۶]
Ralstonia sp. P-10	تولوئن	۶۶۲	۷	۳۲		[۲۶]
Sphingopyxis ummariensis	گلوکز-عصاره مخمر	۳۵۲	۴۸	۴۵	۳۲۸	پژوهش حاضر
ماده کلردار 1,2-DCA						
Ancylobacter aquaticus AD25	—	—	—	—		[۲۷، ۲۸]
X.autotrophicus GJ10	—	۲۱۲	۵	۱۰۰		[۲۹]
Pseudomonas sp. strain DCA1	—	۲۱۲	۱۵	۱۰۰		[۲۹]
راکتور بیوفیلم با کنسرسیوم باکتری‌های هوازی	—	۷۳۸۰	۲۱۸	۹۰-۷۰		[۲۲]
Sphingopyxis ummariensis	گلوکز-عصاره مخمر	۲۴۵	۴۸	۱۶	۰/۹	پژوهش حاضر
ماده کلردار DCM						
Methylobacterium rhodesianumH13	—	۷/۱	—	۱۰۰		[۳۰]
Pandoraea pnomenusa	—	۵/۵۳	—	۱۰۰		[۳۱]
Bacillus circulansWZ-12	—		۱/۲۵	۸۳		[۳۲]
Pseudomonus sp. and *Mycobacteriurn sp.*	—		۲۸	۷۲		[۳۰]
Ralstonia metallidurans PD11	—	۲۵۰۰	۷	۱۰۰		[۳۱]
Escherichia coli and *Staphylococcus aureus*	—	۱۰۰	۰/۰۴۲	۱		[۳۳]
Bacillus circulans	—	۵۷۰۰	—	۸۰		[۳۴]
Bacillus circulans	گلوکز	۴۴۱۷۰	—	—		[۳۴]
Sphingopyxis ummariensis	گلوکز-عصاره مخمر	۲۱۲	۳۲	۵۰	۱/۶۷	پژوهش حاضر

مقایسه درصد آزادسازی یون کلراید در حضور هم-سوبسترا نسبت به شرایطی که از ترکیبات کلردار به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شده، نشان‌دهنده متوسط افزایش ۱/۷برابری تجزیه ترکیبات آلیفاتیک کلردار بود که پیشرفت بیشتر واکنش تجزیه ترکیبات در حضور گلوکز و عصاره مخمر را نشان داد. علت این مساله می‌تواند به‌دلیل افزایش غلظت توده سلولی باشد. تاکنون تعداد سویه‌های کمی گزارش شده که توانایی رشد بر 1,2-DCA و TCE به‌عنوان منبع کربن را دارند[21, 22]، در حالی که در مورد DCM تعداد بسیاری از مقالات منتشر شده‌اند[19]. نتایج به‌دست‌آمده از سایر پژوهش‌ها و مقایسه آن با نتایج پژوهش حاضر در جدول ۱ ارایه شده است.

سرعت کلرزدایی ترکیبات DCM، TCE و 1,2-DCA با سویه *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* با غلظت اولیه ۲/۵میلی‌مولار (به‌ترتیب معادل با ۱/۰۵، ۱/۳ و ۰/۶۳mg/l.h) و در حضور هم-سوبسترای گلوکز و عصاره مخمر در شرایط پژوهش حاضر به‌ترتیب برابر با ۱/۶۷، ۳/۲۸ و ۰/۹mg/l.h به‌دست‌آمد.

در سویه *متیلوباکتریوم رودسیانوم H13* سرعت کلرزدایی DCM در غلظت ۲۱۲/۳۲میلی‌گرم بر لیتر برابر با ۲/۹mg/l.h گزارش شده است[18]. سرعت کلرزدایی در باکتری *راستونیا متالیدورانس PD11* (*Ralstonia metallidurans, PD11*) نیز در غلظت ۱۴۰میلی‌گرم بر لیتر در حدود ۱/۱۶mg/l.h گزارش شده است[22]. در گزارش *راوی* و همکاران، سرعت آزادسازی یون کلراید در تجزیه زیستی هوازی DCM در غلظت ۲۰۰میلی‌گرم بر لیتر (به‌عنوان تنها منبع کربن)، به‌وسیله چند سویه باکتریایی ۰/۳۵mg/l.h به‌دست‌آمد[17]. سویه *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* از DCM در غلظت ۲۱۲/۳۲میلی‌گرم بر لیتر و در حضور گلوکز و عصاره مخمر به‌میزان ۱/۶۷mg/l.h یون کلراید آزاد کرد که قابل مقایسه با سایر سویه‌های گزارش‌شده است. در شرایطی که این باکتری از این ماده به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده کند، سرعت آزادسازی یون کلراید به ۱/۰۵mg/l.h کاهش می‌یابد. با توجه به کلرزدایی صورت‌گرفته در پژوهش حاضر میزان حذف DCM در غلظت ۲/۵میلی‌مولار در شرایط هم-سوبسترا برابر ۵۰% بود. در پژوهشی برای تجزیه زیستی TCE در یک راکتور هوازی/بی‌هوازی سرعت کلرزدایی ۰/۰۳۳mg/l.h در غلظت ۱۰میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است[23].

در پژوهش حاضر سرعت کلرزدایی TCE توسط سویه *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* در غلظت ۳۵۲/۵میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان تنها منبع کربن ۱/۳mg/l.h بود که در حضور گلوکز و عصاره مخمر تا ۳/۲۸mg/l.h افزایش یافت. سرعت حذف زیستی TCE به‌وسیله سویه مورد آزمایش در این پژوهش قابل قبول بود. بالاترین سرعت حذف در باکتری‌های هوازی به‌وسیله سویه *متیلوسینوس تریکوسپوریوم OB3b* ثبت شده که در غلظت ۰/۸گرم بر لیتر و باسرعت حذف زیستی بالاتر از ۲/۴mg/l.h بوده است[6]. سویه *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* نسبت به پرسرعت‌ترین سویه عملکرد ضعیفی داشت، اما در مقابل نسبت به سویه *متیلومونس متانیکا 1-68* که دومین سویه برتر هوازی در حذف TCE است با داشتن سرعت حذف ۰/۲mg/l.h، سرعت بالاتری داشت[7]. با توجه به کلرزدایی صورت‌گرفته می‌توان نتیجه گرفت که

Archive
www.SID.ir

سویه پژوهش حاضر، TCE را به DCE و VC (وینیل‌کلراید) تبدیل کرد و در حدود ۴۰% از TCE تجزیه زیستی شد.

در پژوهش حاضر عملکرد باکتری *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* در مورد ماده 1,2-DCA ضعیف و کدورت ناشی از رشد و نسبت یون کلراید آزادشده آن کم بود، به‌گونه‌ای که سرعت کلرزادیی به‌عنوان تنها منبع کربن ۰/۶۳mg/l.h به‌دست‌آمد و در حضور گلوکز و عصاره مخمر تا ۰/۹mg/l.h در غلظت ۲/۵میلی‌مولار اندازه‌گیری شد. دی‌کلرواتان همواره سرعت تجزیه زیستی کندی داشته است، به‌گونه‌ای که سویه‌های کمی وجود دارد که بتوانند در این ماده به‌عنوان تنها منبع کربنی رشد کنند. در پژوهش *کوکاممی* و همکاران مشخص شد یک بیوفیلم هوازی می‌تواند در غلظت ۷۳۸۰میلی‌گرم بر لیتر پس از گذشت ۲۱۸ روز بیش از ۷۰% دی‌کلرواتان موجود در راکتور را تجزیه کند[22]. این پژوهش و سایر نتایج نشان‌دهنده آهسته‌بودن تجزیه زیستی 1,2-DCA است[24]. با وجود ضعیف‌بودن تجزیه زیستی این ماده، سویه *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* در حضور DCA (به‌عنوان تنها منبع کربن) به‌صورت هوازی رشد کرد، که کمتر در مورد سایر سویه‌ها مشاهده شده است[22]. امکان رشد این باکتری در حضور سایر ترکیبات آروماتیک کلردار مانند دی‌کلروبنزن نیز بررسی شد که حتی در حضور منبع کربن گلوکز و عصاره مخمر رشدی مشاهده نشد که سمیت این ترکیبات برای باکتری *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* را نشان داد.

در پژوهش حاضر، بیشترین میزان حذف DCM در غلظت ۲/۵میلی‌مولار به‌دست‌آمد. از طرفی دیگر با افزایش غلظت DCM میزان آزادسازی کلر کاهش یافت و درنتیجه میزان حذف زیستی DCM کم شد که این امر نشان‌دهنده محدودیت باکتری در غلظت بالای DCM بود. علاوه بر کاهش حذف DCM، کدورت ناشی از رشد باکتری نیز کاهش یافت که سمی‌شدن محیط در غلظت‌های بالاتر از ۱۰میلی‌مولار برای باکتری را نشان داد.

سویه تا ۳۲ ساعت در فاز لگاریتمی و پس از آن وارد فاز ایستا شد. کلرزدایی و حذف DCM بیشتر در فاز لگاریتمی بود و زمانی که وارد فاز ایستا شد، سرعت کلرزدایی کاهش یافت.

توانایی سویه *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* در حذف ترکیبات آلیفاتیک کلردار شامل DCM، TCE و 1,2-DCA در این پژوهش بررسی شد. سویه بیشترین رشد و بازدهی حذف زیستی را در حذف DCM، به‌عنوان تنها منبع کربن و در کنار گلوکز و عصاره مخمر به‌عنوان هم-سوبسترا داشت، به‌گونه‌ای که در غلظت ۲/۵میلی‌مولار، ۳۲% کل اتم‌های کلر در شرایط هم-سوبسترا از ترکیب اولیه آزاد شد. پس از آن، ترکیبات TCE و DCA به ترتیب بیشترین رشد و کلراید آزادشده نسبت به کل اتم کلر موجود را نشان دادند. غلظت بهینه DCM برای حذف زیستی ۲/۵میلی‌مولار به‌دست‌آمد. بررسی سینتیک رشد و حذف زیستی دی‌کلرومتان نشان داد که بیشترین سرعت تجزیه زیستی این ماده در فاز نمایی رشد بود و با کاهش رشد، تجزیه این ماده نیز کاهش یافت؛ بنابراین، در طراحی بیوراکتور مورد استفاده، باید شرایط را در فاز نمایی تثبیت کرد تا حداکثر تجزیه زیستی رخ دهد. مقایسه عملکرد این باکتری با نتایج به‌دست‌آمده از سایر پژوهش‌ها، نشان‌دهنده آن است که این سویه می‌تواند در تجزیه ترکیبات دیرتخریب‌پذیر آلیفاتیک کلردار استفاده شود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به محدودیت انتقال جرم اکسیژن به‌هنگام رشد باکتری اشاره نمود که با طراحی و به‌کارگیری بیوراکتور مناسب، می‌توان انتقال اکسیژن برای رشد باکتری و تجزیه زیستی را بهینه نمود. همچنین با استفاده از دستگاه‌های آنالیز پیشرفته می‌توان غلظت باقی‌مانده ترکیبات کلردار و چگونگی تبدیل آنها به ترکیبات آلی کوچک‌تر را بررسی کرد.

نتیجه‌گیری

باکتری *اسفینگوپیکسیس اومارینسیس* توانایی حذف ترکیبات آلیفاتیک کلردار را دارد و می‌تواند روی ترکیبات دیرتخریب‌پذیر تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرومتان و ۱و۲-دی‌کلرواتان به‌عنوان تنها منبع کربن رشد کند و موجب کلرزدایی آنها شود. این سویه بیشترین رشد و بازدهی حذف زیستی را در حذف دی‌کلرومتان، به‌عنوان تنها منبع کربن و در کنار گلوکز و عصاره مخمر به‌عنوان هم-سوبسترا دارد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
سهم نویسندگان: ندا بدلی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵%)؛ سهیلا شکراله‌زاده (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰%)؛ عباس فرازمند (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۵%).
منابع مالی: این پژوهش با استفاده از امکانات آزمایشگاهی پژوهشکده‌های فناوری‌های شیمیایی و زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به انجام رسیده است.

منابع

1- Shestakova M, Sillanpää M. Removal of dichloromethane from ground and wastewater: A review. Chemosphere. 2013;93(7):1258-67.
2- Liu X, Vellanki BP, Batchelor B, Abdel-Wahab A. Degradation of 1, 2-dichloroethane with advanced reduction processes (ARPs): Effects of process variables and mechanisms. Chem Eng J. 2014;237:300-7.
3- Field J, Sierra-Alvarez R. Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds. Rev Environ Sci Bio. 2004;3:185-254.
4- Azadpour-Keeley A, Russell HH, Sewell GW. Record display for the EPA National Library Catalog. U.S. washington DC: Environmental Protection Agency; 1999. Report no.:EPA/540-S-99-001.
5- Amin MT, Hamid S, Alazba AA, Amin MN, Islam M, Manzoor U. Environmental dynamics and engineered systems for the degradation of trichloroethylene: A critical review. Global NEST J. 2014;16(2):316-28.
6- Tsien HC, Brusseau GA, Hanson RS, Waclett LP. Biodegradation of trichloroethylene by Methylosinus trichosporium OB3b. Appl Environ Microbiol. 1989;55(12):3155-61.
7- Koh SC, Bowman JP, Sayler GS. Soluble methane monooxygenase production and trichloroethylene degradation by a type I methanotroph, Methylomonas methanica 68-1. Appl Environ Microbiol. 1993;59(4):960-7.
8- Kocamemi BA, Çeçen F. Biodegradation of 1, 2-dichloroethane (1,2-DCA) by cometabolism in a nitrifying biofilm reactor. Int Biodeterior Biodegradation. 2009;63(6):717-26.
9- Scheutz C, Durant ND, Broholm MM. Effects of bioaugmentation on enhanced reductive dechlorination

Archive of SID
www.SID.ir

nitrifying biofilm reactor. Int Biodeterior Biodegradation. 2009;63(6):717-26.
23- Tartakovsky B, Manuel MF, Guiot SR. Trichloroethylene degradation in a coupled anaerobic/aerobic reactor oxygenated using hydrogen peroxide. Environ Sci Technol. 2003;37(24):5823-8.
24- Davis GB, Patterson BM, Johnston CD. Aerobic bioremediation of 1, 2 dichloroethane and vinyl chloride at field scale. J Contam Hydrol. 2009;107(1-2):91-100.
25- Chen WH, Yang WB, Yuan CS, Yang JC, Zhao QL. Fates of chlorinated volatile organic compounds in aerobic biological treatment processes: The effects of aeration and sludge addition. Chemosphere. 2014;103:92-8.
26- Han YL, Kuo MC, Tseng IC, Lu CJ. Semicontinuous microcosm study of aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene. J Hazard Mater. 2007;148(3):583-91.
27- Firsova J, Doronina N, Lang E, Spröer C, Vuilleumier S, Trotsenko Y. Ancylobacter dichloromethanicus sp. nov.–a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. Syst Appl Microbiol. 2009;32(4):227-32.
28- van den Wijngaard AJ, Van der Kamp K, van der Ploeg J, Pries F, Kazemier B, Janssen DB. Degradation of 1, 2-dichloroethane by Ancylobacter aquaticus and other facultative methylotrophs. Appl Environ Microbiol. 1992;58(3):976-83.
29- Hage JC, Hartmans S. Monooxygenase-mediated 1, 2-dichloroethane degradation by Pseudomonas sp. strain DCA1. Appl Environ Microbiol. 1999;65(6):2466-70.
30- Yu Jm, Chen Jm, Wang Jd. Removal of dichloromethane from waste gases by a biotrickling filter. J Environ Sci. 2006;18(6):1073-6.
31- Miyake-Nakayama C, Masujima S, Ikatsu H, Miyoshi ShI, Shinoda S. Isolation and characterization of a new dichloromethane degrading bacterium, Ralstonia metallidurans, PD11. Biocontrol Sci. 2004;9(4):89-93.
32- Wu SJ, Zhang LL, Wang JD, Chen JM. Bacillus circulans WZ-12-a newly discovered aerobic dichloromethane-degrading methylotrophic bacterium. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;76(6):1289-96.
33- Olaniran AO, Pillay D, Pillay B. Aerobic biodegradation of dichloroethenes by indigenous bacteria isolated from contaminated sites in Africa. Chemosphere. 2008;73(1):24-9.
34- Wu S, Yu X, Hu Z, Zhang L, Chen J. Optimizing aerobic biodegradation of dichloromethane using response surface methodology. J Environ Sci. 2009;21(9):1276-83.
of 1, 1, 1-trichloroethane in groundwater: A comparison of three sites. Biodegradation, 2014;25(3):459-78.
10- Ottengraf SPP, Meesters JJP, Van Den Oever AHC, Rozema HR. Biological elimination of volatile xenobiotic compounds in biofilters. Bioprocess Eng. 1986;1(2):61-9.
11- Scholtz R, Wackett LP, Egli C, Cook AM, Leisinger T. Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a fast-growing dichloromethane-utilizing bacterium. J Bacteriol. 1988;170(12):5698-704.
12- Stucki G, Gälli R, Ebersold HR, Leisinger T. Dehalogenation of dichloromethane by cell extracts of Hyphomicrobium DM2. Arch Microbiol. 1981;130(5):366-71.
13- Chen DZ, Ouyang DJ, Liu HX, Chen J, Zhuang QF, Chen JM. Effective utilization of dichloromethane by a newly isolated strain Methylobacterium rhodesianum H13. Environ Sci Pollut Res Int. 2014;21(2):1010-9.
14- Shokrollahzadeh S, Azizmohseni F, Golmohamad F. Characterization and kinetic Study of PAH–Degrading Sphingopyxis ummariensis bacteria isolated from a petrochemical wastewater treatment plant. Adv Environ Technol. 2015;1(1):1-9.
15- Jindal S, Dua A, Lal R. Sphingopyxis indica sp. nov., isolated from a high dose point hexachlorocyclohexane (HCH)-contaminated dumpsite. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(Pt 6):2186-91.
16- Sharma P, Verma M, Bala K, Nigam A, Lal R. Sphingopyxis ummariensis sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60(Pt 4):780-4.
17- Karn SK, Reddy MS. Degradation of 2, 4, 6-trichlorophenol by bacteria isolated from secondary sludge of a pulp and paper mill. J Gen Appl Microbiol. 2012;58(6):413-20.
18- Keith LH. Compilation of EPA's sampling and analysis methods. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press; 1996.
19- Ryoo D, Shim H, Canada K, Barbieri P, Wood TK. Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of Pseudomonas stutzeri OX1. Nat Biotechnol. 2000;18(7):775-8.
20- Frascari D, Zanaroli G, Danko AS. In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: A review. J Hazard Mater. 2015;283:382-99.
21- Tiehm A, Schmidt KR. Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes--aspects of field application. Curr Opin Biotechnol. 2011;22(3):415-21.
22- Alpaslan Kocamemi B, Çeçen F. Biodegradation of 1,2-dichloroethane (1,2-DCA) by cometabolism in a

Archive of SID

www.SID.ir