علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره سیزدهم، شماره چهار، زمستان ۹۰

جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن از خاک پتروشیمی اصفهان

عباس اخوان سپهی[۱]

الهه ناظر[۲*]

Elahe_nazer@yahoo.com

باقریخچالی[۳]

محمدرضا ناظر[٤]

تاریخ دریافت:۸۷/۹/۲۰ **تاریخ پذیرش:۸۸/۴/۷**

چکیده

تولوئن یکی از محصولات اصلی پتروشیمی است که به علت سمیت بالا، جهش زایی، سرطان زایی و اثرات مخرب بر زاد و ولد یکی از مواد آلوده کننده رایج محیط زیست می باشد که در اثر نشت مواد سوختی، حلال یا شیمیایی باعث آلودگی محیط زیست می شود. روش های مختلفی برای حذف این ماده از خاک وجود داردکه یکی از بهترین و آسان ترین روش ها، روش زیستی است.

قارچ ها و باکتری های هوازی وبی هوازی جمعیت میکروبی غالب در تجزیه تولوئن هستند. سویه ای مفید تر است که توانایی تجزیه تولوئن را در غلظت بالا دارا باشد. در این مطالعه ۶ سویه باکتری ازخاک اطراف مجتمع پتروشیمی اصفهان جدا شدند. این سویه هااز تولوئن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمودند و به این منظور در معرض غلظت ۱۰۰-۱٪ تولوئن قرار گرفتند. یکی از سویه ها توانست تا۵۰٪ غلظت تولوئن رشد کند و در نتیجه بیشترین رشد را داشته باشد. این سویه توسط رنگ آمیزی گرم، تست های بیو شیمیایی و تکنیک 16S rRNA sequensing مورد شناسایی قرار گرفت که به عنوان Bacillus pumilus شناسایی شد. به علاوه میزان حذف غلظت های مختلف تولوئن در زمان رشد این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد سویه مورد نظر می تواند توانایی مناسبی در تجزیه تولوئن در محیط زیست و پاک سازی ان داشته باشد.

واژه های کلیدی: تجزیه زیستی، تولوئن،آلودگی، *Bacillus pumilus*.

۱- استاد یاردانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۲- دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دانشگاه علوم و تحقیقات*(مسئول مکاتبات)

۳- استاد یار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

۳- استاد یار دانشگاه علوم پزشکی لرستان

مقدمه

تولوئن یکی از فراورده های اصلی پتروشیمی است که به دلیل گسترش استفاده از آن و همچنین میزان سمیت بالا و خاصیت سرطان زایی امروزه یک ماده آلوده کننده فراگیر محسوب می شود(۱).

خاک و رسوبات دریایی همچنین آب های زیرزمینی غالباً با فراورده های نفتی آلود می شوند که علت آلودگی آب های زیرزمینی با تولوئن را می توان نشت ذخایر زیرزمینی ترکیبات نفتی به خصوص بنزین ذکر کرد. این ماده دارای خاصیت سمی و سرطان زایی است و همچنین باعث جهش زایی در انسان هاو حیوانات می شود که در افزایش مرگ و میر در زاد و ولد آن ها تأثیر به سزایی دارد(۲).

مقدار مجاز تولوئن در آب نوشیدنی برای سلامتی انسان ۲µg/l است که اگر مقدار آن افزایش یابد اثرات خطرناک سمی بر جای می گذارد. روش های بسیاری برای حذف این ماده آلاینده وجود دارد از جمله روش های فیزیکی، بیولوژیی، حرارتی و شیمیایی.

یکی از بی ضررترین و اسان ترین روش ها، روش زیستی است.

در روش زیستی میکروارگانیسم های زیادی موثر هستند، از جمله باکتری ها و قارچ ها. هر چه میزان حذف آلاینده توسط یک میکروارگانیسم بیشتر باشد، آن میکروارگانیسم از نظر بیو تکنولوزی محیطی ارزنده تر است (۲و ۳).

در این مطالعه باکتری هایی که تولوئن را به عنوان منبع کربن و انرژی مصرف می نمودند،از خاک اطراف مجتمع پتروشیمی اصفهان جدا شد، شرایط بهینه رشد برای آن ها تعیین و میزان درصد حذف تولوئن توسط این میکرو ارگانیسم ها بررسی گردید. در نتیجه می توان با فراهم نمودن شرایط بهینه از این میکرو ارگانیسم در مقیاس وسیع برای پاک سازی محیط زیست از آلوده کننده های نفتی استفاده نمود.

مواد و روش ها

تولوئن، محیط های کشت Nutrient Agar, Nutrient Broth, LB Broth و مواد تشکیل دهنده محیط کشت MSM از شرکت Merk(Germany) خریداری گردید. همچنین کیت PCR ، و کیت خالص سازی محصول PCR از شرکت Fermentase (Germany) خریداری شد.

خاک های آلوده به تولوئن ازپنج نقطه مختلف پتروشیمی اصفهان جمع آوری شد. پس از تهیه سری رقت و کشت در محیط اختصاصی باکتری های مختلفی جدا شدند. محیط کشت اختصاصی MSM شامل: 4 g of $NaNO_3$، 1.5 g of KH_2PO_4، 0.5 g of Na_2HPO_4، 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$، 0.0011 g $FeSO_4.7H_2O$، 0.01 g $CaCl_2$، آگار 15g در یک لیتر تهیه، pH محیط کشت را به ۷ رسانده و در پلیت ها توزیع شد(۴). پس از کشت خطی از سری رقت، پلیت ها در دسیکاتورهایی که محتوی تولوئن در غلظت های مختلف ۱-۱۰۰٪ بود قرار داده شدند. باکتری ها در این شرایط از تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می کنند.

باکتری هایی که در غلظت بالا از تولوئن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمودند توسط تکنیک روش های رنگ آمیزی ، تست های بیو شیمیایی و تکنیک 16 S rRNA sequensing شناسایی شدند(۵و۶).

پرایمرهای مورد استفاده B1وB2 بوده و توالی آن ها به صورت زیر است:

B1: 5′ AGAGTTTGATCCTGGCTTA<G>3′
B2: 5′ AAGGAGGTGATCCAG<C>3′

مخلوط واکنش PCR شامل ۱۰پیکو مولار از هر پرایمرو۲۰۰میکرو مولار از dNTPs است.

برنامه PCR شامل مرحله دناتوراسیون در ۹۴°C برای ۵ دقیقه, ۳۰ دور, در ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه , ۴۸ °C به مدت ۴۰ ثانیه و پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه در دستگاه Flexigene مدل Techne انجام

می گیرد. محصول PCR برای تشخیص نوع باکتری و تعیین به شرکت Seq lab آلمان ارسال و پس از تعیین ترادف با برنامه Blast نوع باکتری مشخص می گردد(۷و۸).

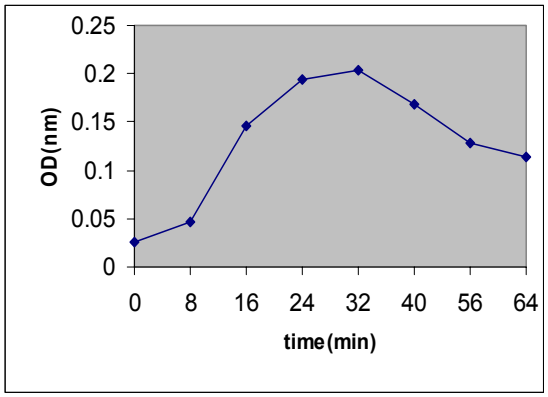
مشخص نمودن درصد حذف

باکتری هایی که از تولوئن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می نمایند در ۵۰ ml محیط کشت مایع MSM شامل غلظت های مختلف تولوئن(۱۵۰۰-۲۰۰ppm) تلقیح شده، سپس در زمان رشد باکتری میزان تولوئن مصرف شده توسط باکتری، به وسیله دستگاه GC(گاز کروماتوگرافی) مدل Shimadzu 14A تعیین گردید(۸).

نتایج

یک سویه از خاک پتروشیمی جدا شد که دارای توانایی حذف تولوئن به مقدار نسبتاً بیشتری در مقایسه با سایر سویه هاست. این سویه تولوئن را در فاز بخار تا ۵۰٪ غلظت در دسیکاتور تحمل می نماید. این باکتری گرم مثبت و میله ای شکل است و دارای اسپور مرکزی می باشد(شکل۱_الف). نمودار رشد این باکتری به صورت زیر است(شکل۱_ب):

(الف)



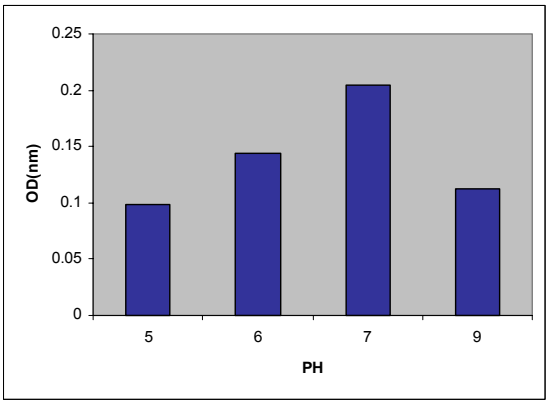
(ب)

شکل۱- رنگ آمیزی گرم(الف)، نمودار رشد باکتری (ب)

با توجه به نمودار رشد، این باکتری تا ۸ ساعت اول رشد نسبتا کمی داشته سپس میزان رشد افزایش یافته و در بیست و چهارمین ساعت به حد اکثر می رسد، پس از آن تا چهل و هشتمین ساعت میزان رشد نسبتا ثابت است و سپس کاهش می یابد.

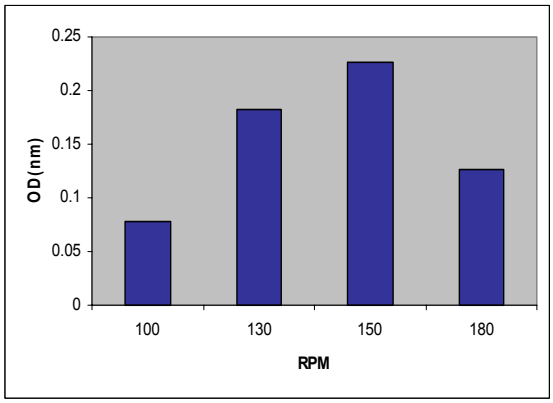
همچنین اثرpH ، دما، دور شیکر و منبع کربن بر رشد باکتری بررسی شد.

اثر pH های مختلف (۵،۶،۷،۹) بر رشد باکتری بررسی شد که بیشترین میزان رشد باکتری در pH=۷ مشاهده گردید(شکل-۲).



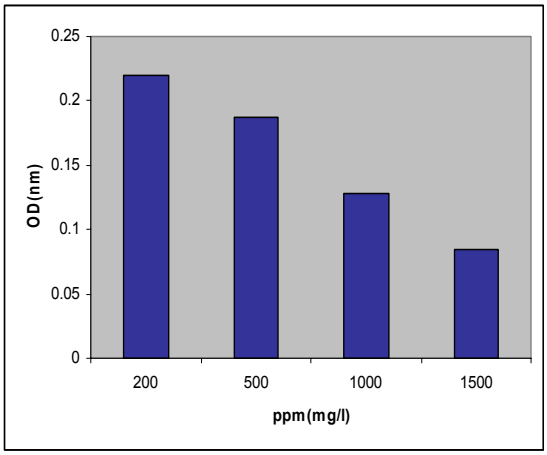
شکل۲-اثر pH بر رشد باکتری

شکل(۳) اثر دور شیکر (rpm) بر رشد باکتری مورد نظر را نشان می دهد. برای رشد این باکتری بهترین rpm، ۱۵۰ می باشد.



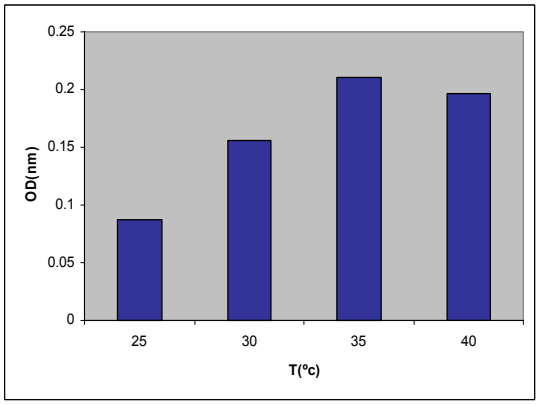
شکل۳-اثر دور شیکر بر رشد باکتری

باکتری مورد نظر در معرض غلظت های مختلف تولوئن قرار گرفت و بیشترین رشد در ppm ۲۰۰تولوئن ماهده شد (شکل۴).



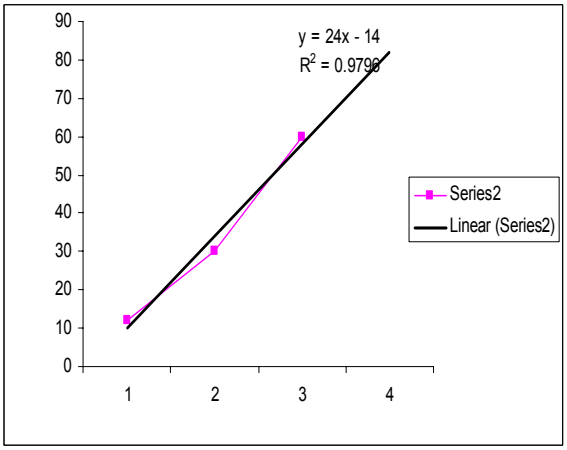
شکل۴-اثرغلظت تولوئن بر رشد باکتری

شکل(۵) نتایج حاصل از دماهای مختلف بر روی رشد باکتری را نشان می دهد و باکتری جدا شده بیشترین میزان رشد را در دمای $35\ ^{\circ}C$ دارد.



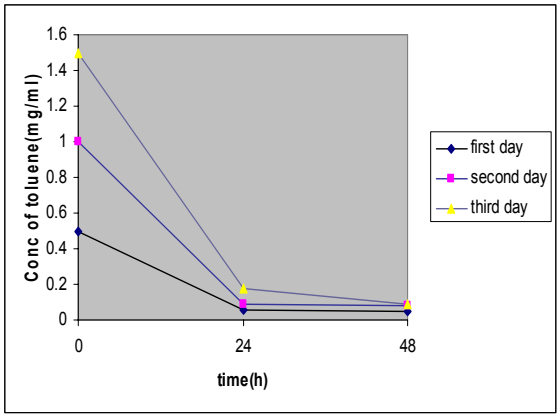
شکل۵- اثر دما بر رشد باکتری

همچنین میزان درصد حذف غلظت های مختلف تولوئن ppm ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ توسط این سویه در زمان رشد آن برآورد گردید. نمودار استاندارد آن در شکل (۶) مشخص می باشد.



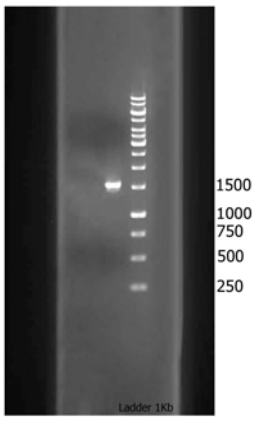
شکل ۶-نمودار استاندارد گاز کرو ماتو گرا فی

با توجه به شکل(۷) باکتری بیشترین میزان حذف را در ۲۴ ساعت بعد از تلقیح داشته که با نمودار رشد این باکتری مطابقت دارد به این معنی که در حد اکثر رشد باکتری بیشترین میزان حذف تولوئن نیز مشاهده می شود.



شکل ۷-نمودار حذف تولوئن در زمان رشد باکتری

شناسایی سویه مورد نظر توسط تکنیک 16 S rRNA sequensing انجام گرفت وباکتری مورد نظر به عنوان *Bacillus pumilus* شناسایی گردید. شکل(۸) محصول pcr را درژل آگارز نشان می دهد.



شکل ۸- محصول PCR در ژل آگارز، اندازه قطعه مورد نظر ۱۵۰۰ kb است.

بحث

در مقایسه با مطالعاتی که تا کنون در زمینه تجزیه تولوئن انجام شده از جمله Hurbert و همکاران در ۱۹۹۹ (۵) وShifang و همکاران در ۱۹۹۳ (۶) می توان نتیجه گرفت که باکتری جدا شده از خاک پتروشیمی اصفهان توانایی تجزیه تولوئن را در غلظت بالا دارا است. در این مطالعه باکتری *Bacillus pumilus* از خاک اطراف مجتمع پتروشیمی اصفهان جداسازی و شناسایی گردید و شرایط بهینه برای رشد ان تعیین شد. بهترین دما برای رشد این باکتری ۳۵ °C بوده که از رشد دردمای ۲۵ °C و۳۰ و ۴۵ بهتر می باشد. همچنین دور شیکر ۱۵۰rpm و۷=pH نیز برای رشد باکتری مساعدتر از سایر شرایط است. این باکتری در غلظت ۲۰۰ ppm تولوئن توانایی حذف بیشتری را دارا است. همچنین میزان حذف تولوئن در زمان رشد این باکتری بررسی شد که تقریباً مشابه با میزان حذف تولوئن در این مطالعه می باشد.

درسال ۲۰۰۳ ،.Afra و همکاران(۱۱) باکتری *Bacillus pumilus* را از خاک آلوده در عربستان صعودی جدا نمودند که شرایط رشد و درصد حذف ان مشابه باکتری بررسی شده در این مطالعه بود .

همچنین در سال ۲۰۰۷ Rahman و همکاران (۱۲) تجزیه (BTEX)را توسط سویه هایی از *Bacillus pumilus* که فعالیت پروتئازی شدیدی در محیط Skim Milk Agar داشتند، بررسی نمودند که این سویه ها توانایی حذف ۲۵ درصدی تولوئن را دارا بودند. با توجه به نتایج فوق و نتایج مطالعات دیگر می توان به این نتیجه رسید که اگر شرایط مساعد برای رشد میکروارگانیسم ها فراهم شود، می توان از آن ها برای پاک سازی محیط آلوده به تولوئن استفاده نمود و احتمالاً باکتری های مناطق آلوده به فراورده های نفتی به دلیل سازش با محیط زیست خود توانایی بیشتری برای تجزیه این مواد را دارا هستند.

سپاس گزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری سپاس گزاری می شود.

منابع

1. Zhaohui Xu,Ashok Mulchandani, and Wilfred Chen.2003.Detection of Benzene, Toluene,Ethyl benzene,and Xylenes (BTEX) Using Toluene Dioxgenase - Peroxidse Coupling

Reactions Biotechnol. Prog19, 1812-1815

2. Sudarat Boonchan, Margaret L, and Stanly G. A., 2000. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Co cultures Applied and Environmental Microbiology., p. 1007–1019
3. Marcelo Henrique Otenio, Maria Teresa Lopes da silva, 2005. Benzene, Toluene and Xylene Biodegradation by *Pseudomonas Putida* CCMI 852. Brazilian Journal of Microbiology 36:258-261.
4. Yin Shen, Lester G. Stehmeher, Stehmeher LG, Voordouw G 1997. Identification of Hydrocrbon-Degrading Bacteria in Soil by Reverse Sample Genoe Probbing. Applied and Enviromental Microbiology, P. 637_645.
5. Casey Hurbert, Yin shen, and Gerrit Voordouw. 1999. Composition of toluene-Degrading Microbial Communities from soil at Different Concentration of Toluene. American Society for Microbiology. p. 3064_3070
6. Shifang Fan and Kate M. Scow. 1993. Biodegradation of Trichloroethylene and Toluene by Indigenous Microbial Population in Soil. Applied and Environmental Microbiology, p 1911_1918
7. Kyung-Suna, Akio Kuroda, 2004. Isolation and Characterization of Benzene tolerant Rhodococus *opacus* Strains. Journal of Bioscience and Bioengineering. 4.278_382
8. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3:208_218.
9. Chales A. Pettigrew, Billy E, 1990. Simultaneous Biodegradation of Chlorobenzene and Toluene by a Pseudomonas Strain.Applied and Enviromental Microbiology., Jan. p. 157-162.
10. Michiaki Matsumoto, Jan A. M. De Bont, 2002. Isolation and Characterization of the Solvent-Tolerant Strain RI Bacillus cereus. Journal of Bioscience and Bioengineering. 1, 45_51
11. Afra M, 2003. Biodegradation of some Hydrocarbons (BTEX s) by a Bacterial Consortium Isolated from Polluted Site in Saudi Arabia.
12. Rahman R, 2007.Anew organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. 34:509_517.