

بررسی راهکارهای افزایش تجزیه زیستی تری کلرواتیلن با باکتری هوازی *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران

ندا بدلی و رزقانی^۱، عباس فرازمنند^۲، سهیلا شکرالله زاده^{۳*}

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۳۰

تاریخ تصویب: ۹۵/۱۲/۱۱

چکیده

در تحقیق حاضر، برای تجزیه زیستی ماده آلاینده تری کلرواتیلن (TCE) از باکتری محلی هوازی *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران استفاده شد. این باکتری در حضور TCE به عنوان تنها منبع کربن رشد نموده و در غلظت اولیه ۵ mM در زمان ۴۸ ساعت ۱۵/۶٪ از این ترکیب را تجزیه نمود. برای افزایش بازده حذف TCE، چهار ماده گلوکز، تولوئن، گلوکز/عصاره مخمر و فنل/نوترینت بر اثر به عنوان منبع کربن هم سوبسترا استفاده شد که بیشترین درصد حذف با استفاده از گلوکز/عصاره مخمر به میزان ۱۶/۳٪ به دست آمد. همچنین، سازگار نمودن این سویه با TCE، موجب افزایش تجزیه زیستی شد به گونه ای که در غلظت اولیه ۵ mM تجزیه TCE به عنوان تنها منبع کربن از ۱۵/۶ تا ۳۹/۱٪ افزایش یافت. در این شرایط و در حضور هم سوبسترای بهینه، تجزیه زیستی TCE تا ۴۳٪ افزایش یافت. افزایش غلظت TCE از ۰/۵ تا ۵ mM، باعث کاهش توده سلولی و تجزیه زیستی شد. بیشترین تجزیه زیستی برای سویه های سازگار یافته و در

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران

۲- استادیار زیست شناسی، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران

۳- دانشیار مهندسی شیمی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران

حضور گلوکز/عصاره مخمر و در غلظت 0.5 mM TCE به میزان $94\% / 8$ و با سرعت $1/6 \text{ mg/l.h}$ به دست آمد.

واژه های کلیدی: تری کلرواتیلن، تجزیه زیستی هوازی، جدایه ایران، سازگار نمودن، *Sphingopyxis ummariensis*

مقدمه

تری کلرواتیلن (TCE)، یک ترکیب هیدروکربنی کلردار است که برای اولین بار در سال ۱۹۲۰ میلادی تولید شده و از آن زمان تاکنون به عنوان حلال مورد مصرف صنایع مختلف قرار گرفته است (Ohlen et al., 2005). در ایران به طور معمول از تری-کلرواتیلن به عنوان تمیزکننده خشک استفاده میشود. این ماده یکی از آلاینده های دیرتخریب پذیر آب های زیرزمینی محسوب شده و محدودیت های بسیاری برای تخلیه پساب های آلوده به این نوع ترکیب وضع شده است (Lohner et al., 2011). برای اولین بار در سال ۱۹۷۰، TCE در آب های زیرزمینی امریکا مورد سنجش قرار گرفته و با گذشت زمان و افزایش میزان این ماده خطرناک در آب های زیرزمینی باعث ایجاد نگرانی جدی برای سازمان های مختلف نظارتی مانند سازمان محیط زیست امریکا (EPA)، آژانس مواد سمی و ثبت بیماریها^۱ و غیره گردیده است (Shukla et al., 2014).

با توجه به نگرانیهای بوجود آمده برای محیط زیست و سلامتی انسانها، دانشمندان به دنبال راهکارهای مقرون به صرفه و قابل اجرا و با کارایی بالا جهت حل این مشکل هستند. برای این منظور روش های متعددی مانند جذب سطحی با استفاده از کربن فعال، هوادهی، روشهای شیمیایی و فیزیکی و اکسیداسیون پیشرفته استفاده شده است (Tiehm and Schmidt, 2011). از میان این روشها، روش های تجزیه زیستی TCE به دلیل اقتصادی و دوستدار محیط زیست بودن و همچنین کاهش مداخله انسانی در آن نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی مورد توجه بیشتر می باشد (Tiehm and Schmidt, 2011).

سرعت تجزیه زیستی TCE در طبیعت بستگی به منطقه آلوده (آب، خاک و هوا) داشته و با توجه به گزارش های منتشر شده، تجزیه زیستی TCE در آب های زیر زمینی بسیار آهسته تر است که دلیل آن، آهسته بودن فرایند تجزیه زیستی در شرایط بی هوازی

است که باعث تجمع این ترکیبات در آب های زیرزمینی می گردد (Azadpour-Keeley et al., 1999). در شرایط تجزیه زیستی بی هوازی، تری کلرواتیلن (TCE) ابتدا به دی کلرواتیلن (DCE) و سپس به وینیل کلراید (VC) تبدیل می گردد. تا به امروز، تنها تعداد معدودی باکتری های بی هوازی جداسازی شده اند که توانایی حذف TCE تا مرحله ی معدنی شدن را دارا باشند (Futagami et al., 2008).

تجزیه زیستی TCE در شرایط هوازی با استفاده از باکتری های اکسیدکننده متان برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط ویلسون^۱ و سپس در سال ۱۹۹۱ توسط لیتل^۲ و همکاران گزارش گردید (Shukla et al., 2014). متداول ترین باکتری های هوازی که تا به امروز توسط پژوهشگران برای تجزیه زیستی TCE در شرایط مورد استفاده قرار گرفته است عبارتند از: *Nitrosomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Xanthobacter*، *Clostridium sp. DC-1*, *KYT* و *sp.* *Dehalobacter sp.*, *Dehalococcoides sp.*, *Desulfuromonas sp.*, *Desulfitobacterium sp.* و *Propionibacterium sp. HK-1* اشاره نمود. در تجزیه زیستی در شرایط هوازی، TCE ابتدا به دی کلرواتان و سپس به وینیل کلراید، اتن و در نهایت به دی اکسیدکربن و آب متابولیزه می شود. (Field and Sierra-Alvarez, 2004).

باکتری گرم منفی و هوازی *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران، توسط شکرالله زاده و همکاران از لجن فعال تصفیه خانه بیولوژیک شرکت پتروشیمی آبادان جدا شده است (Shokrollahzadeh et al., 2015). در این پژوهش، تجزیه زیستی تری کلرواتیلن با استفاده از این باکتری محلی ایران مورد بررسی قرار گرفته و با بهینه سازی شرایط کشت و نیز استفاده از روش سازگاری سویه، افزایش بازده تجزیه زیستی TCE به وسیله باکتری مورد نظر مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد

ترکیب محیط کشت معدنی مورد استفاده در آب مقطر به شرح زیر می باشد (g/l) (Chen et al., 2014):

KH_2PO_4 (1.0), $(NH_4)_2SO_4$ (1.8), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.03), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (2.5)

۱-Wilson

۲-Little

غلظت ترکیبات در محلول ریزمغذی (mg/l) عبارت است از (Aranda et al. 2003):

$Ca(NO_3)2.4H_2O$ (880), $FeSO_4.7H_2O$ (200), $ZnSO_4.7H_2O$ (10), 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 N)

کشت زنده باکتری *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران که از لجن فعال شرکت پتروشیمی آبادان جداسازی شده (به شماره PTCC 1895)، از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه شد.

روش کشت باکتری

با توجه به فراریت ترکیب TCE، برای کشت باکتری در حضور این ترکیب از بطری سرم با حجم 120 cm^3 مجهز به دو درپوش سپتوم سیلیکونی و آلومینیومی استفاده شد. نسبت حجم محیط کشت مورد استفاده به حجم بطری ۱:۹ انتخاب گردید تا شرایط هوایی برای رشد باکتری‌ها فراهم شود. محلول محیط کشت معدنی و محلول ریز مغذی در دمای 121°C به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون گردید. محلول ریزمغذی با غلظت ۱۰ برابر تهیه شده و پیش از اضافه شدن به محیط کشت، به صورت مجزا استریل شد. محلول گلوکز و عصاره مخمر با غلظت یکسان 0.25 mg/l ساخته شده و سپس گلوکز به مدت ۵ دقیقه (Ryoo et al. 2000) و عصاره مخمر به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای 121°C سترون شد. محیط کشت معدنی و ریز مغذی TCE، 0.5% (v/v) (Aranda et al., 2003) و در صورت نیاز ماده هم سوبسترا در غلظت‌های مورد نظر به همراه باکتری در شرایط استریل به بطری درپوش دار اضافه گردیده و پس از آن در دمای 30°C و دور rpm ۱۵۰ در زمان‌های مورد نظر گرمخانه گذاری شد. در طی فرایند تجزیه زیستی، TCE pH محیط کشت تغییر محسوسی نداشته و در بازه ۷-۶/۵ قرار داشت. نمونه باکتری از کشت ۲۴ ساعته به محیط کشت نوترینت برات تلقیح گردید و در دمای 30°C و دور rpm ۱۵۰ به مدت یک شبانه روز گرمخانه گذاری شد.

سلول‌های رشد یافته، دو بار سانتریفوژ (6000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه) و شستشو شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی دارای جذب نوری ۱ تا $1/2$ در طول موج 600 nm تهیه شد و $100 \mu\text{l}$ از آن به هر بطری تلقیح گردید. برای بررسی تاثیر ترکیبات مختلف هم سوبسترا در افزایش تجزیه زیستی TCE از چهار ترکیب فنل، گلوکز، گلوکز/عصاره مخمر و تولوئن استفاده گردید. برای این منظور در شرایط یکسان تلقیح و گرمخانه گذاری و غلظت اولیه $2/5 \text{ mM}$ ماده TCE، از هم سوبستراهای فنل/نوترینت برات (g/l)

۰/۵)، گلوکز/عصاره مخمر با نسبت ۱:۱ (۰/۵g/l) و تولوئن (۱۰۰/۱mg) استفاده شد (Han et al. 2007, Fan and Scow, 1993).

سازگار نمودن سویه

برای افزایش بازده حذف TCE، باکتری با تری کلرواتیلن سازش داده شد. برای این منظور، سلول های باکتریایی پس از خارج شدن از فریزر در محیط جامد نوترینت آگار دارای TCE با غلظت ۰/۱ mM برای مدت ۲ روز در دمای 30 °C کشت داده شد و سپس به محیط کشت مایع نوترینت براث حاوی TCE با غلظت ۰/۱ mM منتقل گردید و به مدت ۴۰ ساعت در دمای 30 °C و دور ۱۵۰ rpm گرمخانه گذاری شد. سپس، باکتری های رشد یافته به محیط کشت جدید نوترینت براث و TCE با غلظت بهینه رشد ۰/۵ mM انتقال داده شده و در دمای 30 °C برای ۴۰ ساعت رشد داده شد. پس از آن، باکتری در محیط کشت مایع نوترینت براث حاوی TCE با غلظت های ۱/۲، ۲/۵ و ۵ mM در شرایط دما و زمان مشابه به صورت متوالی کشت داده شد. در انتها، سلول های باکتری با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت جدا شده و دو بار با سرم نمکی شست و شو داده شدند. با استفاده از محیط کشت نمکی، سوسپانسیونی با کدورت (OD₆₀₀) ۱ تا ۱/۲ تهیه شده و ۱۰۰ μl از آن درون بطری های سرم تلقیح گردید.

اندازه گیری رشد سلولی و غلظت یون کلراید

برای تعیین رشد سلولی، از اندازه گیری کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ nm به وسیله دستگاه طیف سنجی مرئی-فرا بنفش مدل UNICAM ۸۶۲۰ استفاده شد. غلظت یون کلراید آزاد شده، به عنوان معیاری از تجزیه زیستی اندازه گیری شد (Ryoo et al. 2000). مقدار یون کلراید آزاد شده با استفاده از دستگاه یون آنالایزر JENWAY مدل ۳۰۴۵ و الکتروود گزینشی یونی (ISE) اندازه گیری شد. به منظور اندازه گیری مقدار یون کلراید آزاد شده ناشی از تجزیه زیستی، دو نقطه صفر (کنترل) انتخاب شد که شامل محیط کشت بدون باکتری و محیط کشت دارای باکتری و بدون هرگونه ترکیب کلردار بوده است. برای تأیید مقدار یون کلراید اندازه گیری شده با دستگاه، از روش EPA9552 به عنوان روش مکمل اندازه گیری یون کلراید استفاده شد (Keith, 1996). تمامی اندازه گیری ها با سه بار تکرار به انجام رسیده و در مواردی که خطای میانگین ارائه نشده، مقادیر میانگین گزارش شده اند.

اندازه گیری TCE به روش کروماتوگرافی گازی

به منظور اندازه گیری غلظت تری کلرواتیلن از دستگاه کروماتوگرافی گازی YL

Instrument مدل ۶۵۰۰ ساخت کشور کره جنوبی استفاده شد. برای آماده سازی نمونه حاوی TCE، از روش استخراج با تولوئن استفاده شد. برای این منظور در دو مرحله و هر بار به مقدار ۳۱ cm حلال تولوئن با استفاده از یک سرنگ شیشه‌ای کروماتوگرافی گازی به درون بطری نمونه‌ها تزریق شده و بطری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه درون انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ rpm و دمای ۲۵°C قرار گرفت تا استخراج انجام گیرد. پس از آن، نمونه به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ شد تا دو فاز آلی و آبی جدا شوند (Bagley et al., 2000, Fathepure and Boyd, 1988, 1988-1). با انجام استخراج بر نمونه شاهد به روش مشابه، بازدهی استخراج تری کلرواتیلن ۹۵% بدست آمد. مقدار $0.1 \mu\text{m}$ از نمونه فاز آلی به دستگاه کروماتوگرافی گازی با آشکارساز تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) تزریق شد. ستون دستگاه گاز کروماتوگرافی، TRGH3 به طول ۳۰ m و قطر داخلی ۰/۵۳ mm بوده و از گاز حامل نیتروژن با سرعت ۴ cm³/min استفاده شد. دمای ستون از ۵۰ تا ۱۶۰°C با افزایش ۱۰°C در هر دقیقه تغییر داده شد. دمای تزریق و آشکارساز هر دو در ۲۸۰°C تنظیم گردید.

میزان تجزیه زیستی از رابطه زیر محاسبه شد. در این رابطه C و C₀ به ترتیب غلظت و غلظت اولیه TCE می باشند:

$$\text{تجزیه زیستی (\%)} = \frac{(C_0 - C)}{C_0} * 100$$

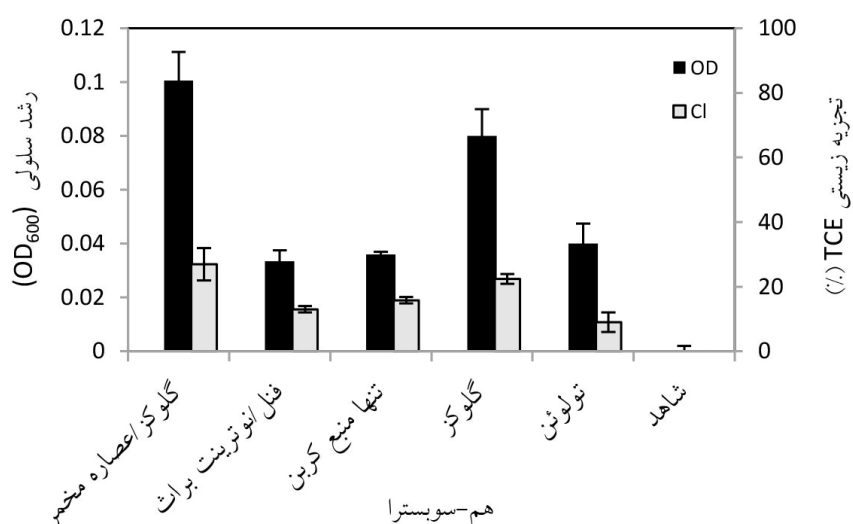
نتایج و بحث

نتایج اولیه حاصل از بررسی‌های تجربی در این پژوهش، رشد *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران در شرایط هوایی نشان داد که این سویه قادر به حذف ترکیبات هیدروکربنی آلیفاتیک کلردار است، درحالی‌که قادر به تجزیه زیستی ترکیبات آروماتیک کلردار نظیر کلروبنزن و دی کلروبنزن نیست. نتایج نشان داد که این سویه باکتریایی می‌تواند از تری کلرواتیلن (TCE) به عنوان تنها منبع کربن برای رشد استفاده نماید به گونه‌ای که در غلظت‌های اولیه ۰/۵، ۲/۵ و ۵ mM و پس از ۴۸ ساعت (که باکتری به فاز نمایی رشد می‌رسد)، میزان تجزیه زیستی TCE معادل با ۱۸/۲، ۱۷/۱ و ۱۵/۶% بدست آمد (ستون‌های سیاه در شکل ۲). بدین ترتیب، با افزایش غلظت میزان تجزیه زیستی TCE کاهش می‌یابد. تعداد معدودی باکتری شناسایی شده است که توانایی حذف TCE را در شرایط هوایی به عنوان تنها منبع کربن دارا باشد (Shukla et al., 2014). سویه محلی ایران مورد بررسی در این تحقیق از این نظر حائز اهمیت می‌باشد. در پژوهش حاضر به منظور افزایش تجزیه زیستی TCE، استفاده از هم

سوبسترای مناسب و سازگاری باکتری با شرایط کشت، مورد بررسی قرار گرفت.

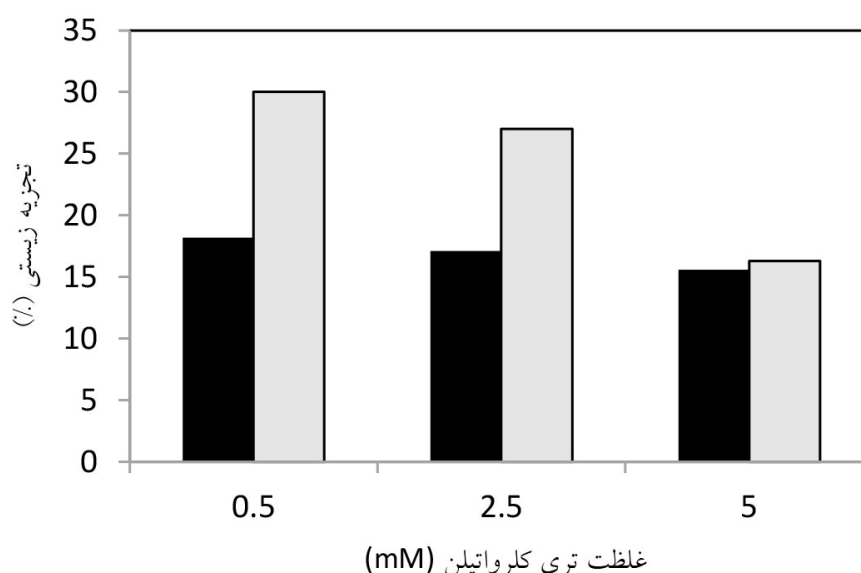
بررسی اثر هم سوبسترا بر تجزیه زیستی TCE

با توجه به گزارش های موجود در زمینه تجزیه زیستی TCE به وسیله باکتری های هوازی، به منظور افزایش توانایی حذف TCE از چهار ترکیب هم-سوبسترای، فنل/نوترینت برات، گلوکز، گلوکز/عصاره مخمر و تولوئن در شرایط یکسان کشت، استفاده شد (Shulka et al., 2014, Zhang et al., 2013, Reij et al., 1995) و نتایج آن در شکل (۱) نشان داده شده است. براساس نتایج بدست آمده، استفاده از هم-سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر با تجزیه زیستی ۲۷٪، بهترین عملکرد را نسبت به سایر ترکیبات در تجزیه TCE در غلظت ۲/۵ Mm نشان داد. در حالی که، میزان تجزیه زیستی TCE در صورت استفاده از فنل/نوترینت برات، گلوکز و تولوئن به ترتیب برابر با ۱۳، ۲۲/۴ و ۹٪ بوده است. همچنین، استفاده از هم سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر رشد سلولی بیشتری را به دنبال داشت به گونه ای که افزایش کدورت حاصل از رشد سلولی (OD₆₀₀) از ۰/۱۱ به ۰/۵۸ و نیز افزایش در تجزیه زیستی TCE از ۱۷/۱ به ۲۷٪ (۱/۶ برابر) مشاهده شد که نشان دهنده رابطه مستقیم تجزیه زیستی و رشد سلولی می باشد. وابسته بودن تجزیه زیستی هوازی TCE در مطالعات دیگر نیز مورد اشاره قرار گرفته است (Li et al. 2014).



شکل ۱: کدورت ناشی از رشد سویه (ستون سیاه) و میزان تجزیه زیستی TCE (ستون خاکستری) در غلظت ۲/۵ mM و زمان ۴۸ ساعت در حضور هم سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر (0/15 g/l)، فنل/نوترینت برات (0/5 g/l)، گلوکز (0/5 g/l) تولوئن (100mg/l) و TCE (تنها منبع کربن) و شاهد (نمونه حاوی باکتری بدون منبع کربن).

بررسی اثر غلظت TCE بر تجزیه زیستی آن در بازه ۰/۵ تا ۵ mM (شکل ۲) نشان داد که در هر دو حالت استفاده از TCE به عنوان تنها منبع کربن و استفاده از گلوکز/عصاره مخمر، با افزایش غلظت TCE میزان تجزیه زیستی کاهش می یابد. این پدیده می تواند به دلیل مسمومیت سلول های باکتری و رشد کمتر آنها در غلظت های بالاتر باشد (Li et al. 2014). افزودن هم-سوپسترای گلوکز/عصاره مخمر به محیط کشت حاوی TCE در غلظت های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ mM و اگرچه به ترتیب باعث افزایش تجزیه زیستی تا ۳۰، ۲۷ و ۱۶/۳% (افزایش ۶۴/۸، ۵۷/۸ و ۴/۵ درصدی نسبت به استفاده از TCE به عنوان تنها منبع کربن) شد ولی با افزایش غلظت از ۰/۵ تا ۵ mM میزان تجزیه زیستی از ۳۰ تا ۱۶/۳% کاهش یافت. در تمامی مطالعات صورت گرفته در تجزیه زیستی TCE، با افزایش غلظت اولیه TCE تجزیه زیستی آن کاهش یافته است. در یکی از این تحقیقات با استفاده از یک کنسرسیوم باکتریایی، با افزایش غلظت اولیه TCE از ۰/۰۳ mM تا ۰/۴ mM میزان تجزیه زیستی از ۳۶ تا ۱۳% کاهش یافته است (Han et al. 2007). در مطالعه ای مشابه، در طی فرایند تجزیه زیستی با استفاده از یک کنسرسیوم باکتریایی، با تغییر غلظت اولیه TCE از ۰/۷ M تا ۰/۸ mM میزان حذف از ۸۰ تا کمتر از ۲۰% کاهش یافت (Li et al. 2014).



شکل ۲: تجزیه زیستی TCE در غلظت های متفاوت به عنوان تنها منبع کربن (ستون سیاه) و در حضور هم سوپسترای گلوکز/عصاره مخمر (ستون خاکستری) پس از ۴۸ ساعت کشت.

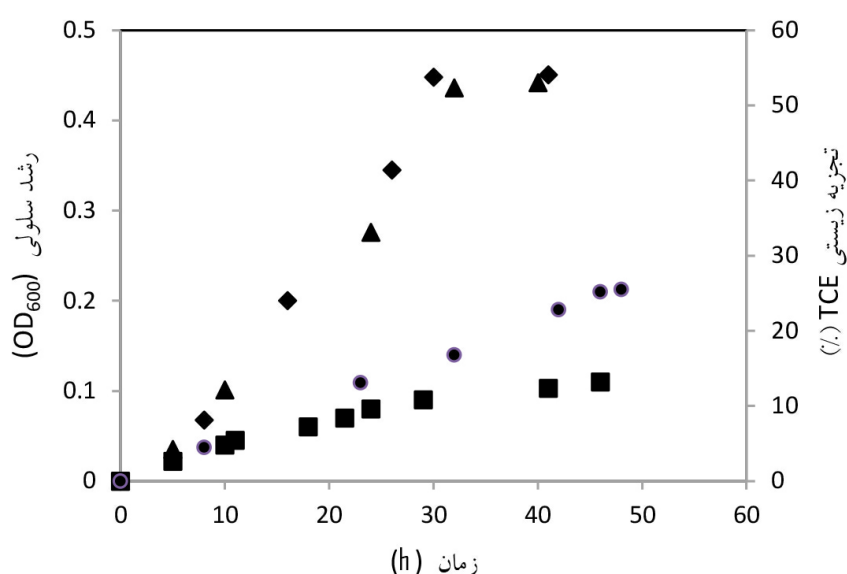
در مطالعاتی که از باکتری‌های متانوتروف برای تجزیه زیستی TCE استفاده شده است، متان یا متانول به عنوان هم سوبسترا باعث تجزیه زیستی TCE و یا افزایش تجزیه زیستی شده است (Tiehm and Schmidt, 2011). در تحقیقی دیگر با کنسرسیوم باکتریایی، هنگامی که از TCE به عنوان تنها منبع کربن در غلظت 0.07 mM استفاده گردید، تجزیه زیستی TCE مشاهده نشد ولی پس از استفاده از فنل به عنوان هم سوبسترا، ۸۰٪ از TCE پس از ۳ روز حذف گردید (Li et al. 2014). همچنین، با افزودن گلوکز به محیط کشت سویه *Stenotrophomonas maltophilia* که توانایی تجزیه زیستی TCE به عنوان تنها منبع کربن را داشته، رشد سلول افزایش یافته و در نتیجه میزان تجزیه زیستی TCE با استفاده از هم سوبسترا افزایش یافت (Mukherjee and Roy, 2013). در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابه بدست آمد، بنابراین، علت افزایش حذف TCE در کنار گلوکز/عصاره مخمر، افزایش بیشتر رشد سلولی (OD_{600}) با استفاده از این هم سوبسترا بوده است.

بررسی سازگار نمودن باکتری بر تجزیه زیستی TCE

به منظور افزایش میزان تجزیه زیستی TCE از کشت متوالی *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران رای سازگار نمودن آن با تری کلرواتیلن با غلظت 5 mM استفاده شد. پس از سازگاری، میزان تجزیه زیستی TCE در شرایط یکسان و استفاده از TCE به عنوان تنها منبع کربن در غلظت 5 mM پس از گذشت ۴۸ ساعت، ۲/۵ برابر نسبت به قبل از فرایند سازگار کردن باکتری افزایش یافته و از ۱۵/۶ به ۳۹/۱٪ رسید. همچنین، تجزیه زیستی TCE با غلظت 5 mM در شرایط هم سوبسترا در حضور گلوکز/عصاره مخمر با غلظت مشابه و پس از سازگاری، به ۴۳٪ افزایش یافت، در حالی که پیش از سازگاری ۱۶/۳٪ اندازه گیری شد. با توجه به نتایج حاصل، تاثیر سازگاری بر تجزیه زیستی ECT بسیار بیشتر از افزایش هم سوبسترا بوده و نشان دهنده ی آن است که سویه مورد مطالعه پس از سازگاری، دارای فعالیت آنزیم‌های موثر بیشتری در تجزیه زیستی TCE نسبت به قبل از سازگاری می باشد (Sedighi et al., 2016). همچنین عامل دیگر در افزایش تجزیه زیستی TCE، پس از سازگار نمودن سویه، افزایش رشد سلولی بوده است به گونه ای که پس از سازگاری، OD_{600} محیط کشت تقریباً چهار برابر شده و از ۰/۱۱ به ۰/۴۵ رسید. تجزیه زیستی وابسته به رشد بوده و افزایش توده سلولی معمولاً باعث افزایش تجزیه زیستی می گردد (Sedighi et al., 2016, Li et al., 2014).

اثر سازگار نمودن سلول ها بر سینتیک رشد و تجزیه زیستی TCE نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل (۳) ارائه شده است. نتایج نشان داد که پس از سازگاری،

فاز تاخیر کاهش یافته و زمان لازم برای رسیدن به رشد نمایی از ۴۸ ساعت به ۳۲ ساعت کاهش می یابد. همچنین، میزان توده سلولی در زمان یکسان افزایش قابل توجهی داشته است. هنگامی که سویه باکتریایی سازگار شده، برای سه بار در محیط فاقد TCE کشت داده شود، میزان تجزیه زیستی TCE کاهش یافته و به همان میزان حذف قبل از شرایط سازگاری می رسد.



شکل ۳: سینتیک رشد *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران پیش (□) و پس (□) از سازگاری و سینتیک تجزیه زیستی TCE پیش (□) و پس (▲) از سازگاری در غلظت اولیه ۲/۵ mM

جدول (۱) تاثیر همزمان سازگار نمودن باکتری و افزودن هم سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر را بر تجزیه زیستی TCE در غلظت های مختلف ارائه نموده است. همانگونه که از نتایج مشاهده می شود، اثر افزودن هم سوبسترا در غلظت های پایین TCE بیشتر بوده به گونه ای که بیشترین تجزیه زیستی TCE در غلظت ۰/۵ mM برابر با ۹۴/۸٪ و در شرایط پس از سازگاری و افزودن هم-سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر بدست آمد.

جدول ۱: اثر افزودن هم سوبسترا بر تجزیه زیستی TCE پس از سازگاری

غلظت اولیه TCE (mM)	شرایط آزمایش	تجزیه زیستی پیش از سازگاری (%)	تجزیه زیستی پس از سازگاری (%)
۰/۵	تنها منبع کربن گلوکز/عصاره مخمر	۱۸/۲ ۳۰/۰	۳۲ ۹۴/۸
۲/۵	تنها منبع کربن گلوکز/عصاره مخمر	۱۷/۱ ۲۷/۰	۲۵/۱ ۵۳/۰
۵	تنها منبع کربن گلوکز/عصاره مخمر	۱۵/۶ ۱۶/۳	۳۹/۱ ۴۳/۰

میزان تجزیه زیستی TCE در غلظت‌های بالا پس از سازگاری سویه، قابل مقایسه با سایر مطالعات و در برخی از موارد بهتر از سایر مطالعات می باشد. بیشتر تحقیقات صورت گرفته در تجزیه زیستی TCE با استفاده از یک باکتری، در غلظت‌های پایین بوده و در غلظت‌های بالا معمولاً از کنسرسیوم باکتریایی استفاده شده است (Shukla et al. 2014).

بهترین عملکرد گزارش شده در تجزیه زیستی TCE در غلظت بالای TCE، با استفاده از یک کنسرسیوم باکتریایی دی-آزوتروفیک بوده که در غلظت اولیه ۷/۶ mM از TCE، میزان 58% تجزیه زیستی با سرعت ۲ mg/l.h گزارش شده است (Shukla et al. 2010). در تحقیقی دیگر، کنسرسیوم باکتریایی در غلظت اولیه ۰/۴ mM توانایی حذف ۱۳% از TCE را داشته است (Kocamemi and Çeçen, 2005). در بررسی صورت گرفته بر سویه *Rhodococcus erythropolis* JE ۷۷، در تجزیه زیستی TCE، این سویه پس از گذشت ۶۰ ساعت و در غلظت اولیه ۱/۱ mM، تمامی TCE را با سرعت ۲/۴ mg/l.h حذف نمود. در این مطالعه از ایزوپرن به عنوان هم سوبسترا استفاده گردید (Ewers et al. 1990). بر اساس نتایج حاصل تحقیق حاضر، میزان تجزیه زیستی در غلظت اولیه ۵ mM، ۴۳% و سرعت تجزیه زیستی ۸ mg/l.h پس از سازگاری و گذشت ۳۲ ساعت بوده است. بر اساس نتایج بدست آمده، سرعت حذف باکتری محلی ایران مورد مطالعه پس از سازگاری، مقادیر بالاتری را در مقایسه با سایر تحقیقات ارائه داده است. بدیهی است که در صورت ادامه رشد در زمان‌های بالاتر در یک راکتور مناسب، امکان دستیابی به مقادیر بالاتر تجزیه زیستی امکان پذیر می باشد.

تجزیه زیستی TCE در غلظت ۰/۵ mM

از آنجا که تجزیه زیستی TCE منجر به آزاد سازی یون کلراید در محیط کشت می

شود، در شکل (۴) رابطه تغییرات غلظت TCE و یون کلراید محیط کشت با استفاده از *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران و با به کار بردن هم سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر نسبت به زمان در غلظت اولیه ۰/۵ ECT Mm نشان داده شده که مربوط به شرایط پس از سازگاری باکتری است. همانگونه که مشاهده می شود با کاهش غلظت TCE در اثر تجزیه زیستی، غلظت یون کلراید افزایش یافته است. با توجه به این نتایج می توان نتیجه گرفت که تغییرات ECT در این آزمایشات ناشی از تجزیه زیستی ECT بوده و در طی فرایند تجزیه زیستی ECT، کلرزدایی صورت گرفته است (Ryoo et al. 2000).

نتایج این منحنی بیانگر آن است که فرایند تجزیه زیستی TCE در مرحله رشد نمایی انجام می شود، این موضوع در سایر باکتری‌ها هوازی و بی‌هوازی نیز گزارش شده است (Li et al., 2014, He et al., 2005, Guo et al., 2001).

غلظت اولیه TCE (mM)	شرایط آزمایش	تجزیه زیستی پیش از سازگاری (%)	تجزیه زیستی پس از سازگاری (%)
۰/۵	تنها منبع کربن گلوکز/عصاره مخمر	۱۸/۲ ۳۰/۰	۳۲ ۹۴/۸
۲/۵	تنها منبع کربن گلوکز/عصاره مخمر	۱۷/۱ ۲۷/۰	۲۵/۱ ۵۳/۰
۵	تنها منبع کربن گلوکز/عصاره مخمر	۱۵/۶ ۱۶/۳	۳۹/۱ ۴۳/۰

شکل ۴: تغییرات غلظت یون کلراید به وسیله *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران سازگار شده (●) و غلظت TCE (□) در غلظت اولیه ۰/۵ mM نسبت به زمان با باکتری سازش یافته در حضور هم سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر

همانطور که در شکل نشان داده شده است، در غلظت ۰/۵ Mm تری کلرواتیلن و در حضور گلوکز/عصاره مخمر با غلظت ۰/۵ l/g به عنوان هم سوبسترا، بیشترین غلظت یون کلراید (حذف زیست ECT) در انتهای فاز لگاریتمی و زمانی که کدورت نمونه افزایش می یابد حاصل شده است. افزایش سرعت رشد باکتری با میزان حذف ارتباط

مستقیم داشته و با افزایش کدورت محیط کشت باکتری، درصد حذف نیز افزایش می‌یابد. این ارتباط در سایر سویه‌هایی که قبلاً در تجزیه زیستی TCE جداسازی شده اند نیز گزارش گردیده است (Li et al., 2014, He et al., 2005, Schroth et al., 2001). تجزیه زیستی TCE در غلظت‌های پایین توسط سایر محققین نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در غلظت مشابه ۰/۵ mM با استفاده از یک کنسرسیوم باکتریایی متانوتروف با هم سوبسترای متان در یک راکتور بستر ثابت، حذف ۶۳٪ گزارش شده است (Fennell et al., 1992). در مطالعه دیگری در غلظت اولیه ۰/۰۰۷ mM، درصد تجزیه زیستی ۶۰-۷۰٪ پس از گذشت ۸۰-۶۰ ساعت با سویه *Pseudomonas putida* F1 گزارش شده است (Fan and Scow, 1993). گونه‌ی مشابه *Pseudomonas putida* در سال ۲۰۱۰ مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده که در غلظت اولیه ۰/۰۰۷ mM و در مدت ۲۷ ساعت، ۱۰۰٪ حذف انجام گرفته است (Chen et al., 2008). در گزارشی دیگر، از کنسرسیوم باکتریایی متشکل از *Methylomonas* sp. GD1, GD2, GD3 استفاده شد که پس از گذشت ۱۶۸ h و در غلظت اولیه ۰/۰۰۶ Mm ECT بیش از ۹۹٪ تجزیه زیستی TCE به دست آمد (Di Spirito et al., 1991). در مورد کنسرسیوم باکتریایی دی آزوتروف پس از گذشت ۸ h و در غلظت اولیه ۱/۵ μM از TCE، ۱۰۰٪ حذف گزارش شده است (Shukla et al., 2010). در بسیاری از مطالعات، کنسرسیوم باکتری هوازی مورد استفاده در تجزیه زیستی TCE از جنس باکتری‌های متانوتروفیک بوده است (Tiehm and Schmidt, 2011). به عنوان مثال، با استفاده از کنسرسیوم متانوتروفیک و *Methylocystis* sp. و در حضور متان و هوا با نسبت (۱:۵) و در غلظت اولیه ۰/۰۰۶ Mm از TCE، میزان تجزیه زیستی ۶۰٪ گزارش شده است (Shukla et al., 2009). با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش و مقایسه عملکرد *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران با سایر سویه‌های هوازی گزارش شده، می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد این سویه در غلظت‌های پایین TCE، قابل مقایسه با سایر سویه‌ها بوده است. در بررسی تجزیه زیستی TCE، سرعت حذف از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد که نتایج مطالعات سایر پژوهشگران در غلظت‌های پایین در ادامه مورد اشاره قرار گرفته و با نتایج تحقیقات حاضر مقایسه شده است. از میان باکتری‌های هوازی تجزیه‌کننده تری‌کلرواتیلن، باکتری *Methylosinus trichosporium* OB3b در طی مدت زمان ۲۰ دقیقه ۱۰۰٪ از TCE را در غلظت ۸۰ μM با سرعت ۱۰/۵ h.l/gm حذف نموده است (Tsien et al., 1989). این سویه با توجه به گزارش منتشر شده بیشترین سرعت تجزیه زیستی TCE را در غلظت‌های

پایین داشته است. سویه *Methylomonas methanica* ۶۸-۱ در غلظت $42 \mu\text{M}$ قادر به حذف کامل TCE در مدت زمان ۲۴ ساعت با سرعت حذف 0.2 mg/l.h بوده است (Koh et al., 1993). در بهترین شرایط آزمون تحقیق حاضر، درصد تجزیه زیستی TCE در حضور گلوکز/عصاره مخمر به وسیله سویه سازگار شده و در غلظت 0.5 mM ، پس از گذشت ۴۸ h برابر با $94/8\%$ بوده و سرعت تجزیه زیستی به وسیله *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران برابر با $1/6 \text{ mg/l.h}$ اندازه‌گیری شد. اگرچه، سرعت تجزیه زیستی کمتری نسبت به مطالعات پیشین به دست آمده ولی باید توجه نمود که غلظت مورد مطالعه بیشتر از غلظت های به کار برده شده در سایر مراجع بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که 60% از کل اتم‌های کلر موجود در TCE پس از سازگاری در غلظت 0.5 mM آزاد شده است و بدین معنا است که معدنی سازی به طور کامل انجام نشده و هنوز در فرایند تجزیه زیستی در شرایط آزمون، ترکیب آلیفاتیک کلردار باقی می ماند. این مسئله را می توان با بهینه سازی شرایط کشت و استفاده از کنسرسیون باکتری حل نمود (Tiehm and Schmidt, 2011).

نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که با استفاده از راهکارهایی همچون افزودن هم سوسترها و سازگار نمودن *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران، تجزیه زیستی تری کلرواتیلن به مقدار زیادی افزایش می یابد. استفاده از هم سوسترهای گلوکز/عصاره مخمر به دلیل افزایش توده سلولی، بیشترین تاثیر را در افزایش تجزیه زیستی نشان داد. افزایش غلظت TCE باعث کاهش تجزیه زیستی در بازه 0.5 تا 5 mM شد. پس از سازگاری سویه با غلظت های بالا، افزایش قابل توجهی در تجزیه زیستی TCE مشاهده شد و سرعت تجزیه زیستی تری کلرواتیلن در غلظت های بالا بیشتر از سویه های گزارش شده به دست آمد. در شرایط بهینه و استفاده از سویه سازگار شده، در حضور گلوکز/عصاره مخمر و در غلظت 0.5 mM ، $94/8\%$ از TCE تجزیه شده و 60% از کل اتم کلر موجود در آن آزاد شد. نتایج بدست آمده نشان داد که با بهینه سازی شرایط کشت *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران، می توان به تجزیه زیستی بالا به وسیله این سویه دست یافت.

منابع

- Aranda, C., Godoy, F., Becerra, J., Barra, R. and Martínez, M. (2003) Aerobic secondary utilization of a non-growth and inhibitory substrate 2, 4, 6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37 and Sphingopyxis-like strain S32. *Biodegradation* 14(4): 265-274.
- Azadpour-Keeley, A., Russell, H. and Sewell, W (1999) Ground Water Issue. In: Research Report, Environmental Protection Agency, Washington DC.
- Bagley, D.M., Lalonde, M., Kaseros, V., Stasiuk, K. E., and Sleep, B. E. (2000) Acclimation of anaerobic systems to biodegrade tetrachloroethene in the presence of carbon tetrachloride and chloroform. *Water Research* 34(1): 171-178.
- Chen, D.Z., Ouyang, D.J., Liu, H.X., Chen, J., Zhuang, Q.F. and Chen, J.M. (2014) Effective utilization of dichloromethane by a newly isolated strain *Methylobacterium rhodesianum* H13. *Environmental Science and Pollution Research* 21(2): 1010-1019.
- Chen, Y.M., Lin, T.F., Huang, C. and Lin, J.C. (2008) Cometabolic degradation kinetics of TCE and phenol by *Pseudomonas putida*. *Chemosphere* 72(11): 1671-1680.
- Dispirito, A.A., Gullledge, J., Shiemke, A.K., Murrell, J.C., Lidstrom, M.E. and Krema, C.L. (1991) Trichloroethylene oxidation by the membrane-associated methane monooxygenase in type I, type II and type X methanotrophs. *Biodegradation* 2(3): 151-164.
- Ewers, J., Freier-Schröder, D. and Knackmuss, H.J. (1990) Selection of trichloroethene (TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE. *Archives of Microbiology* 154(4): 410-413.
- Fan, S. and Scow, K.M. (1993) Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 59(6): 1911-1918.
- Fathepure, B.Z. and Boyd, S.A. (1988) Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain

- DCM. *Applied and Environmental Microbiology* 54(12): 2976-2980.
- Fathepure, B.Z. and Boyd, S.A. (1988-1) Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *Fems Microbiology Letters* 49(2): 149-156.
- Fennell, D.E., Underhill, S.E. and Jewell, W. J. (1992) Methanotrophic attached-film reactor development and biofilm characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*. 40(10): 1218-1232.
- Field, J. and Sierra-Alvarez, R. (2004) Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3(3): 185-254.
- Futagami, T., Goto, M. and Furukawa, K. (2008) Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *The Chemical Record* 8(1): 1-12.
- Guo, G.L., Tseng, D.H., and Huang, S.L. (2001) Co-metabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas putida* in a fibrous bed bioreactor. *Biotechnology Letters* 23(20): 1653-1657.
- Han, Y., Kuo, M.T., Tseng, I. and Lu, C. (2007) Semicontinuous microcosm study of aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene. *Journal of Hazardous Materials* 148(3): 583-591.
- He, J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K. M. and Löffler, F. E. (2005) Isolation and characterization of Dehalococcoides sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)-and 1, 2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environmental Microbiology* 7(9): 1442-1450.
- Keith, L. H. (1996) Compilation of EPA's sampling and analysis methods. 1696 PP, USA.
- Kocamemi, B.A. and Çeçen, F. (2005) Cometabolic degradation of TCE in enriched nitrifying batch systems. *Journal of Hazardous Materials* 125(1): 260-265.
- Koh, S.C., Bowman, J.P. and Sayler, G.S. (1993) Soluble methane monooxygenase production and trichloroethylene degradation by a type I methanotroph, *Methylomonas methanica* 68-1. *Applied and Environmental Microbiology* 59(4): 960-967.
- Li, Y., Li, B., Wang, C.P., Fan, J.Z. and Sun, H.W. (2014) Aerobic degradation of trichloro-

- ethylene by co-metabolism using phenol and gasoline as growth substrates. *International Journal of Molecular Sciences* 15(5): 9134-9148.
- Lohner, S.T., Becker, D., Mangold, K.M. and Tiehm, A. (2011) Sequential reductive and oxidative biodegradation of chloroethenes stimulated in a coupled bio-electro-process. *Environmental Science & Technology* 45(15): 6491-6497.
- Mukherjee, P. and Roy, P. (2013) Persistent organic pollutants induced protein expression and immunocrossreactivity by *Stenotrophomonas maltophilia* PM102: a prospective bioremediating candidate. *BioMed Research International* 11-9.
- Ohlen, K., Chang, Y., Hegemann, W., Yin, C.R. and Lee, S.T. (2005) Enhanced degradation of chlorinated ethylenes in groundwater from a paint contaminated site by two-stage fluidized-bed reactor. *Chemosphere* 58(3): 373-377.
- Reij, M.W., Kieboom, J., de Bont, J. and Hartmans, S. (1995) Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. strain Py2 during growth on propene. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8): 2936-2942.
- Ryoo, D., Shim, H., Canada, K., Barbieri, P. and Wood, T.K. (2000) Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nature Biotechnology* 18(7): 775-778.
- Schroth, M.H., Oostrom, M., Wietsma, T.W. and Istok, J.D. (2001) In-situ oxidation of trichloroethene by permanganate: effects on porous medium hydraulic properties. *Journal of Contaminant Hydrology* 50(1): 79-98.
- Sedighi, M., Zamir, S. M. and Vahabzadeh, F. (2016) Cometabolic degradation of ethyl mercaptan by phenol-utilizing *Ralstonia eutropha* in suspended growth and gas-recycling trickle-bed reactor. *Journal of Environmental Management* 165: 53-61.
- Shokrollahzadeh, S., Azizmohseni, F. and Golmohamad, F. (2015) Characterization and Kinetic Study of PAH-Degrading *Sphingopyxis ummariensis* Bacteria Isolated from a Petrochemical Wastewater Treatment Plant. *Advances in Environmental Science and Technology* 1(1): 1-9.
- Shukla, A.K., Upadhyay, S.N. and Dubey, S.K (2014) Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 34(2): 101-

114.

- Shukla, A.K., Vishwakarma, P., Singh, R., Upadhyay, S. and Dubey, S.K. (2010) Bio-filtration of trichloroethylene using diazotrophic bacterial community. *Bioresource Technology* 101(7): 2126-2133.
- Shukla, A.K., Vishwakarma, P., Upadhyay, S., Tripathi, A.K., Prasana, H. and Dubey, S.K. (2009) Biodegradation of trichloroethylene (TCE) by methanotrophic community. *Bioresource Technology* 100(9): 2469-2474.
- Tiehm, A. and Schmidt, K.R. (2011) Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes—aspects of field application. *Current Opinion in Biotechnology* 22(3): 415-421.
- Tsien, H.C., Brusseau, G.A., Hanson, R.S. and Waclett, L. (1989) Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Applied and Environmental Microbiology* 55(12): 3155-3161.
- Zhang, X.S., Li, J.H., Kang, Y.J. and Dong, S.S. (2013) Isolation and Characterization of a Novel *Pseudomonas* sp. Strain Em-1 Capable of Degrading Trichloroethylene by Cometabolism under Aerobic Conditions. *Environmental Science & Technology* 1: 1-15.