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

ندا بدلی ورزقانی[۱]، عباس فرازمند[۲]، سهیلا شکرالله‌زاده[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 به‌عنوان 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 گلوگز، تولوئن، گلوکز/عصاره مخمر و فنل/نوترینت براث 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 میزان 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

۱-دانشجو کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
۲-استادیار زیست شناسی، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
*۳-دانشیار مهندسی شیمی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
(نویسنده مسئول: shokrollahzadeh@yahoo.com)

و تجزیه زیستی شد. بیشترین تجزیه زیستی برای سویه های سازگاریافته و در حضور گلوکز/عصاره مخمر و در غلظت mM TCE ۰/۵ به میزان ۹۴/۸٪ و با سرعت mg/l.h ۱/۶ به دست آمد.

واژه های کلیدی: تری‌کلرواتیلن، تجزیه زیستی هوازی، جدایه ایران ،سازگار نمودن، Sphingopyxis ummariensis

مقدمه

تری‌کلرواتیلن (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 به‌طور 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 وضع‌شده 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 روش‌های 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 آهسته‌تر است که دلیل آن، آهسته بودن فرایند تجزیه زیستی در شرایط بی‌هوازی است که باعث تجمع این ترکیبات در آب های زیرزمینی می‌گردد

۱-Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA

(Azadpour-Keeley et al., 1999). در شرایط تجزیه زیستی بی هوازی، تری‌کلرواتیلن (TCE) ابتدا به دی کلرواتیلن (DCE) و سپس به وینیل‌کلراید (VC) تبدیل می گردد. تا به امروز، تنها تعداد معدودی باکتری‌های بی هوازی جداسازی شده اند که توانایی حذف TCE تا مرحله‌ی معدنی شدن را دارا باشند (Futagami et al., 2008).

تجزیه زیستی TCE در شرایط هوازی با استفاده از باکتری‌های 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). متداول‌ترین باکتری‌های هوازی که تا به امروز توسط پژوهشگران برای تجزیه زیستی TCE در شرایط مورداستفاده قرارگرفته است عبارتند از:.sp *Pseudomonas*، .sp *Rhodococcus*، *Nitrosomonas* sp. *Clostridium* sp. DC-1, KYT و .sp *Xanthobacter*. همچنین، از باکتری های بی هوازی می توان به .sp *Desulfuromonas*، .sp *Dehalococcoides*، *Dehalobacter* sp. HK-1 *Propionibacterium* sp. و *Desulfitobacterium* اشاره نمود. در تجزیه زیستی در شرایط هوازی، TCE ابتدا به دی کلرواتان و سپس به وینیل کلراید، اتن و در نهایت به دی‌اکسیدکربن و آب متابولیزه می‌شود.(Field and Sierra-Alvarez, 2004). باکتری گرم منفی و هوازی *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران، توسط شکرالله زاده و همکاران از لجن فعال تصفیه‌خانه 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 روش‌ها

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)

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(NO3)2.6H_2O (4), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (3), $Na_2WO_4.2H_2O$ (2), H_2SO_4 (0.05 N)

۱-Wilson

۲-Little

کشت زنده باکتری *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران که از لجن فعال شرکت پتروشیمی آبادان جداسازی شده (به شماره PTCC ۱۸۹۵)، 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 ۱۲۰ cm^3 مجهز به دو درپوش سپتوم سیلیکونی و آلومینیومی استفاده شد. نسبت حجم محیط کشت مورداستفاده به حجم بطری ۱:۹ انتخاب گردید تا شرایط هوازی برای رشد باکتری ها فراهم شود. محلول محیط کشت معدنی و محلول ریز مغذی در دمای ۱۲۱°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، به‌صورت مجزا استریل شد. محلول گلوکز و عصاره مخمر با غلظت یکسان ۰/۲۵ mg/l ساخته‌شده و سپس گلوکز به مدت ۵ دقیقه (Ryoo et al., 2000) و عصاره مخمر به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ °C سترون شد. محیط کشت معدنی و ریز مغذی (با نسبت ۰/۵٪ (v/v)) (Aranda et al., 2003)، TCE و در صورت نیاز ماده هم سوبسترا در غلظت های موردنظر به همراه باکتری در شرایط استریل به بطری درپوش دار اضافه گردیده و در و پس از آن در دمای ۳۰ °C و دور ۱۵۰ rpm در زمان های موردنظر 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 براث تلقیح گردید و در دمای ۳۰ °C و دور ۱۵۰ rpm به مدت یک شبانه روز گرمخانه گذاری شد.

سلول های رشد یافته، دو بار سانتریفوژ (۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه) و شستشو شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی دارای جذب نوری ۱ تا ۱/۲ در طول‌موج ۶۰۰ nm تهیه شد و ۱۰۰ µl 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 ۲/۵ mM ماده TCE، از هم سوبستراهای فنل/نوترینت براث (0/5 l/g)، گلوکز/عصاره مخمر با نسبت ۱:۱ (0/5l/g) و تولوئن (mg/l100) استفاده شد (Han et al., 2007, Fan and Scow, 1993).

سازگارنمودن 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 ۳۰ °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 ۳۰ °C و دور ۱۵۰ rpm گرمخانه گذاری شد. سپس، باکتری‌های رشد یافته به محیط کشت جدید نوترینت براث و TCE با غلظت بهینه رشد ۰/۵ mM انتقال داده شده و در دمای ۳۰ °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 (۶۰۰ OD) ۱ تا ۱/۲ تهیه شده و ۱۰۰ µl از آن درون بطری‌های سرم تلقیح گردید.

اندازه‌گیری رشد سلولی و غلظت یون کلراید

برای تعیین رشد سلولی، از اندازه گیری کدورت محیط کشت در طول‌موج ۶۰۰ nm به‌وسیله دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش مدل UNICAM ۸۶۲۰ استفاده شد. غلظت یون کلراید آزادشده، به‌عنوان معیاری از تجزیه زیستی اندازه گیری شد(Ryoo et al., 2000). مقدار یون کلراید آزادشده با استفاده از دستگاه یون آنالایزر JENWAY مدل ۳۰۴۵ و الکترود گزینشی یونی (ISE) اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری مقدار یون کلراید آزادشده 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 EPA ۹۵۵۲ به‌عنوان روش مکمل اندازه‌گیری 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 گزارش‌شده اند.

اندازه‌گیری TCE به روش کروماتوگرافی گازی

به‌منظور اندازه گیری غلظت تری کلرواتیلن از دستگاه کروماتوگرافی گازی YL Instrument مدل ۶۵۰۰ ساخت کشور کره جنوبی استفاده‌شد. برای آماده سازی نمونه حاوی TCE، از روش استخراج با تولوئن استفاده‌شد. برای این منظور در دو مرحله و هر بار به مقدار ۳۱ cm حلال تولوئن با استفاده از یک سرنگ شیشه‌ای کروماتوگرافی گازی

بـه درون بطـری نمونـه هـا تزریـق شـده و بطری‌هـا بـه مـدت ۱۵ دقیقـه درون انکوباتـور شـیکردار بـا دور rpm ۲۰۰ و دمـای°C ۲۵ قـرار گرفـت تـا اسـتخراج انجـام گیـرد. پـس از آن، نمونـه بـه مـدت ۳۰ ثانیـه بـا دور rpm ۱۲۰۰ سـانتریفوژ شـد تـا دو فـاز آلـی و آبـی جـدا شـوند (Bagley et al., 2000, Fathepure and Boyd, 1988, 1988-1). بـا انجـام اسـتخراج بـر نمونـه شـاهد بـه روش مشـابه، بازدهـی اسـتخراج تـری کلرواتیلـن ۹۵٪ بدسـت آمـد. مقـدار µl ۰/۱ از نمونـه فـاز آلـی بـه دسـتگاه کروماتوگرافـی گازی بـا آشکارسـاز تبدیـل فوریـه مـادون قرمـز (FTIR) تزریـق شـد. سـتون دسـتگاه گاز کروماتوگرافـی، TRGH ۳ بـه طـول m ۳۰ و قطـر داخلـی mm ۰/۵۳ بـوده و از گاز حامـل نیتـروژن بـا سـرعت min ٤ / cm۱۳اسـتفاده شـد. دمـای سـتون از °C ۵۰ تـا °C ۱٦۰ بـا افزایـش°C ۱۰ در هـر دقیقـه تغییـر داده شـد. دمـای تزریـق و آشکارسـاز هـر دو در°C ۲۸۰ تنظیـم گردیـد.

میـزان تجزیـه زیسـتی از رابطـه زیـر محاسـبه شـد. در ایـن رابطـه C و C0 بـه ترتیـب غلظـت و غلظـت اولیـه TCE مـی باشـند:

زیستی تجزیه (%)=(C_0-C)/C_0 *100

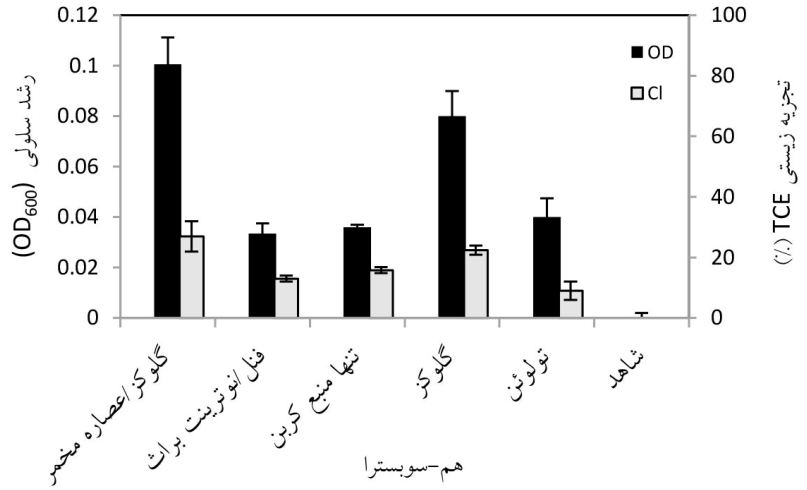
نتایج و بحث

نتایـج اولیـه حاصـل از بررسـی هـای تجربـی در ایـن پژوهـش، رشـد *Sphingopyxis ummariensis* جدایـه ایـران در شـرایط هـوازی نشـان داد کـه ایـن سـویه قـادر بـه حـذف ترکیبـات هیدروکربنـی آلیفاتیـک کلـردار اسـت، درحالی‌کـه قـادر بـه تجزیـه زیسـتی ترکیبـات آروماتیـک کلـردار نظیـر کلروبنـزن و دی کلروبنـزن نیسـت. نتایـج نشـان داد کـه ایـن سـویه باکتریایـی می‌توانـد از تری‌کلرواتیلـن (TCE) بـه عنـوان تنهـا منبـع کربـن بـرای رشـد اسـتفاده نمایـد بـه گونـه ای کـه در غلظـت هـای اولیـه ۰/۵، ۲/۵ و mM ۵ و پـس از ٤۸ سـاعت (کـه باکتـری بـه فـاز نمایـی رشـد مـی رسـد)، میـزان تجزیـه زیسـتی TCE معـادل بـا ۱۸/۲، ۱۷/۱ و ٦/ ۱۵٪ بدسـت آمـد (سـتون هـای سـیاه در شـکل ۲). بدیـن ترتیـب، بـا افزایـش غلظـت میـزان تجزیـه زیسـتی TCE کاهـش مـی یابـد. تعـداد معـدودی باکتـری شناسـایی شـده اسـت کـه توانایـی حذف □□□ را در شـرایط هـوازی بـه عنـوان تنهـا منبـع کربـن دارا باشـد (Shukla et al., 2014) . سـویه محلـی ایـران مـورد بررسـی در ایـن تحقیـق از ایـن نظـر حائـز اهمیـت می‌باشـد. در پژوهـش حاضـر بـه منظـور افزایـش تجزیـه زیسـتی TCE، اسـتفاده از هـم سوبسـترای مناسـب و سـازگاری باکتـری بـا شـرایط کشـت، مـورد بررسـی قـرار گرفـت.

بررسی اثر هم سوبسترا بر تجزیه زیستی TCE

بـا توجـه بـه گـزارش هـای موجـود در زمینـه تجزیـه زیسـتی TCE بـه وسـیله باکتری‌هـای

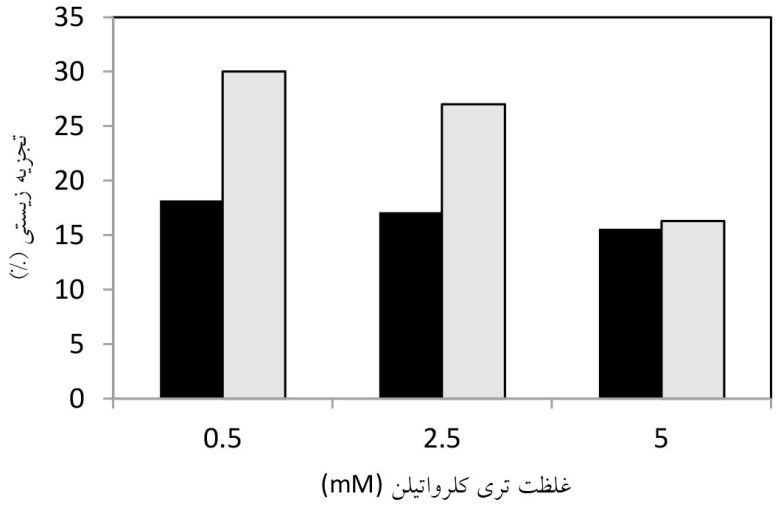
هوازی، به‌منظور افزایش توانایی حذف TCE از چهار ترکیب هم-سوبسترای، فنل/ نوترینت براث، گلوکز، گلوکز/عصاره مخمر و تولوئن در شرایط یکسان کشت، استفاده شد (Shulka et al., 2014, Zhang et al., 2013, Reij et al., 1995) و نتایج آن در شکل (۱) نشان داده‌شده است. براساس نتایج بدست آمده، استفاده از هم-سوبسترای گلوکز/ 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 براث، گلوکز و تولوئن به ترتیب برابر با ۱۳، ۲۲/٤ 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 (OD ٦۰۰) از ۰/۱۱ به ۰/۵۸ و نیز افزایش در تجزیه زیستی TCE از ۱۷/۱ به ۲۷٪ (۱/٦ برابر) مشاهده شد که نشان دهنده رابطه‌ی 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 ٤۸ ساعت در حضور هم سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر (۰/۵ g/l)، فنل/نوترینت براث (۰/۵ g/l)، گلوکز (۰/۵ g/l) تولوئن (۱۰۰ mg/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 سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر به محیط کشت حاوی TCE در غلظت های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ mM 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 مطالعه‌ای مشابه، در طی فرایند تجزیه زیستی با استفاده از یک کنسرسیوم باکتریایی، با تغییر غلظت اولیه TCE از ۰/۷ µM 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 سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر (ستون خاکستری) پس از ۴۸ ساعت کشت.

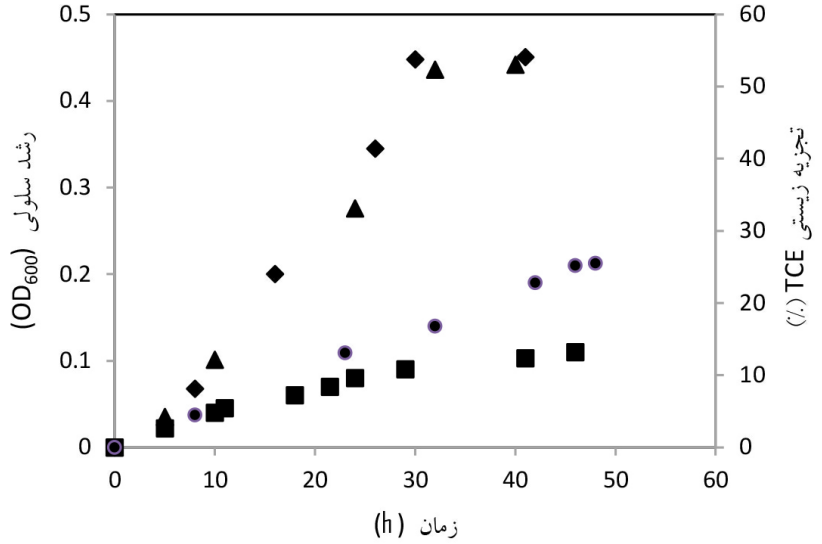
در مطالعاتی که از باکتری‌های متانوتروف برای تجزیه زیستی TCE استفاده شده است، متان یا متانول به عنوان هم-سوبسترا باعث تجزیه زیستی TCE و یا افزایش تجزیه زیستی شده است (Tiehm and Schmidt, 2011). در تحقیقی دیگر با کنسرسیوم باکتریایی، هنگامی که از TCE به عنوان تنها منبع کربن در غلظت ۰/۰۰۷ mM استفاده گردید، 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 PM102* 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 ۶۰۰) با استفاده از این هم سوبسترا بوده است.

بررسی سازگارنمودن باکتری بر تجزیه زیستی TCE

به‌منظور افزایش میزان تجزیه زیستی TCE از کشت متوالی *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران رای سازگار نمودن آن با تری-کلرواتیلن با غلظت mM ۵ استفاده شد. پس از سازگاری، میزان تجزیه زیستی TCE در شرایط یکسان و استفاده از TCE به‌عنوان تنها منبع کربن در غلظت mM ۵ 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 mM ۵ درشرایط هم سوبسترا درحضور 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 TCE بسیار بیشتر از افزایش هم سوبسترا بوده و نشان دهندهی 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 ۶۰۰ 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 mM ۲/۵

جدول ۱: تاثیر همزمان سازگارنمودن 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 mM ۰/۵ برابر با ۹٤/۸٪ و در شرایط پس از سازگاری و افزودن هم سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر بدست آمد.

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

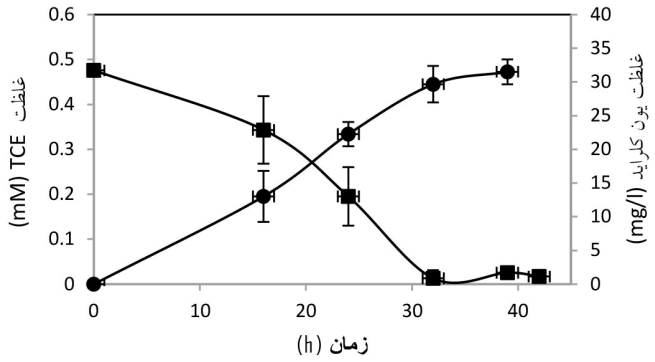
میزان تجزیه زیستی TCE در غلظت‌های بالا پس از سازگاری سویه، قابل مقایسه با

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 ۷/٦ mM از TCE، میزان ۸۵٪ تجزیه زیستی با سرعت ۰/۲ mg/l.h گزارش شده است (Shukla et al., 2010). در تحقیقی دیگر، کنسرسیوم باکتریایی در غلظت اولیه ۰/٤ 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 ٦۰ ساعت و در غلظت اولیه ۱/۱ mM، تمامی TCE را با سرعت ۲/٤ 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 ۵mM، ٤۳٪ 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 زمان های 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 (٤) رابطه تغییرات غلظت TCE و یون کلراید محیط کشت با استفاده از *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران و با به کاربردن هم سوبسترای گلوکز/عصاره مخمر نسبت به زمان در غلظت اولیه ۰/۵ mM TCE 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 TCE در این آزمایشات ناشی از تجزیه زیستی TCE بوده و در طی فرایند تجزیه زیستی TCE، 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).



شکل ٤. تغییرات غلظت یون کلراید به وسیله *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران سازگارشده (●) 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 تری‌کلرواتیلن و در حضور گلوکز/عصاره مخمر با غلظت ۰/۵ g/l به‌عنوان هم سوبسترا، بیشترین غلظت یون کلراید (حذف زیست TCE) در انتهای فاز لگاریتمی و زمانی که کدورت نمونه افزایش می‌یابد 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 غلظت های 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 ٦٣٪ گزارش شده است (Fennell et al., 1992). در مطالعه دیگری در غلظت اولیه ۰/۰۰۷ mM، درصد تجزیه زیستی ۷۰-٦۰٪ پس از گذشت ۸۰-٦۰ ساعت با سویه F1 *Pseudomonas putida* 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 ١٦٨ و در غلظت اولیه TCE ۰/۰۰٦ mM بیش از ۹۹٪ تجزیه زیستی TCE به دست آمد (Di Spirito et al., 1991). در مورد کنسرسیوم باکتریایی دی

آزوتروف پس از گذشت ۱h 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 باکتری-های 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 می باشد که نتایج مطالعات سایر پژوهشگران در غلظت های پایین در ادامه مورد اشاره قرار گرفته و با نتایج تحقیقات حاضر مقایسه شده است. از میان باکتری‌های هوازی تجزیه کننده تری‌کلرواتیلن، باکتری *Methylosinus trichosporium* OB3b در طی مدت زمان ۲۰ دقیقه ۱۰۰٪ از TCE را در غلظت ۸۰ µM با سرعت ۱۰/۵ mg/l.h حذف نموده است (Tsien et al., 1989). این سویه با توجه به گزارش منتشر شده بیشترین سرعت تجزیه زیستی TCE را در غلظت های پایین داشته است. سویه *Methylomonas methanica* ۶۸-۱ در غلظت ۴۲ µM قادر به حذف کامل TCE در مدت زمان ۲۴ ساعت با سرعت حذف ۰/۲ 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 ۰/۵ mM، پس از گذشت ۴۸ h برابر با ۹۴/۸٪ بوده و سرعت تجزیه زیستی به وسیله *Sphingopyxis ummariensis* جدایه ایران برابر با ۱/۶ mg/l.h اندازهگیری شد. اگرچه، سرعت تجزیه زیستی کمتری نسبت به مطالعات پیشین به‌دست 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 ۶۰٪ از کل اتم‌های کلر موجود در TCE پس از سازگاری در غلظت ۰/۵ 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 کنسرسیوم باکتری حل نمود (Tiehm and Schmidt, 2011).

نتیجه گیری

در ایـن مطالعـه نشـان داده شـد کـه بـا اسـتفاده از راهکارهایـی همچـون افـزودن هـم سوبسـترا و سـازگار نمـودن *Sphingopyxis ummariensis* جدایـه ایـران، تجزیـه زیسـتی تـری کلرواتیلـن بـه مقـدار زیـادی افزایـش مـی یابـد. اسـتفاده از هـم سوبسـترای گلوکـز/ عصـاره مخمـر بـه دلیـل افزایـش تـوده سـلولی، بیشـترین تاثیـر را در افزایـش تجزیـه زیسـتی نشـان داد. افزایـش غلظـت TCE باعـث کاهـش تجزیـه زیسـتی در بـازه ۰/۵ تـا mM ۵ شـد. پـس از سـازگاری سـویه بـا غلظـت هـای بـالا، افزایـش قابـل توجهـی در تجزیـه زیسـتی TCE مشـاهده شـد و سـرعت تجزیـه زیسـتی تـری کلرواتیلـن در غلظـت هـای بـالا بیشـتر از سـویه هـای گـزارش شـده بـه دسـت آمـد. در شـرایط بهینـه و اسـتفاده از سـویه سـازگار شـده، در حضـور گلوکز/عصـاره مخمـر و در غلظـت mM ۰/۵، ۹۴/۸٪ از TCE تجزیـه شـده و ۶۰٪ از کل اتـم کلـر موجـود در آن آزاد شـد. نتایـج بدسـت آمـده نشـان داد کـه بـا بهینه–سـازی شـرایط کشـت *Sphingopyxis ummariensis* جدایـه ایـران، مـی تـوان بـه تجزیـه زیسـتی بـالا بـه وسـیله ایـن سـویه دسـت یافـت.

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., Gulledge, 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. Biodegra-

dation 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 pro-

duction 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 trichloroethylene 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 bioelectro-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. 2013- article ID 714232: 1-9.

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 Rviews 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.