

جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن

از خاک پتروشیمی اصفهان

عباس اخوان سپهی^۱

الهه ناظر^{۲*}

Elahe_nazer@yahoo.com

باقریخچالی^۳

محمد رضا ناظر^۴

تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۷

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۲۰

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 دارد که یکی از بهترین و آسان ترین روش ها، روش زیستی است. قارچ ها و باکتری های هوازی و بی 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 از خاک اطراف مجتمع پتروشیمی اصفهان جدا شدند. این سویه ها از 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 تا ۵۰٪ 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 sequencing* 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 آن داشته باشد.

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

۱- استاد یار دانشگاه 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

۴- 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 نشست 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 ها و 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 $2\mu\text{g/l}$ 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، بیولوژی، 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 تکنولوژی محیطی ارزنده تر است (۲ و 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 (Germany)Merk خریداری گردید. همچنین کیت PCR، و کیت خالص سازی محصول PCR از شرکت Fermentase (Germany) خریداری شد. خاک های آلوده به تولوئن از پنج 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: $1.5, 4 \text{ g of NaNO}_3$, $0.2 \text{ g of Na}_2\text{HPO}_4$, $0.5 \text{ g of KH}_2\text{PO}_4$, $0.01 \text{ g of FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.0011 \text{ g of MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , آگار 15 g 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 ۱-۱۰٪ بود قرار داده شدند. باکتری ها در این شرایط از تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می کنند.

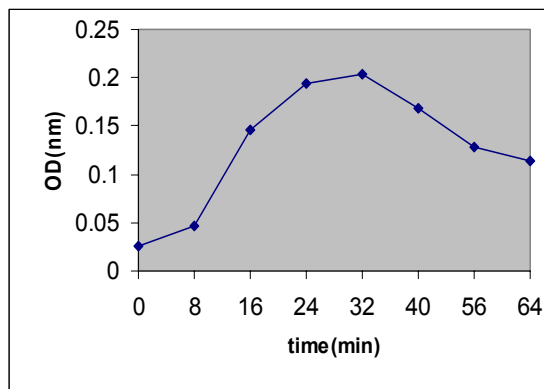
باکتری هایی که در غلظت بالا از تولوئن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمودند توسط تکنیک روش های رنگ آمیزی، تست های بیو شیمیایی و تکنیک 16 S rRNA sequencing شناسایی شدند (۵ و ۶).

پرایمرهای مورد استفاده B1 و B2 بوده و توالی آن ها به صورت زیر است:

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

مخلوط واکنش PCR شامل ۱۰ پیکو مولار از هر پرایمر و ۲۰۰ میکرو مولار از dNTPs است.

برنامه PCR شامل مرحله دناتوراسیون در 94°C برای ۵ دقیقه، ۳۰ دور، در 94°C به مدت ۱ دقیقه، 48°C به مدت ۴۰ ثانیه و پلیمریزاسیون نهایی در 72°C به مدت ۹۰ ثانیه در دستگاه Flexigene مدل Techne انجام



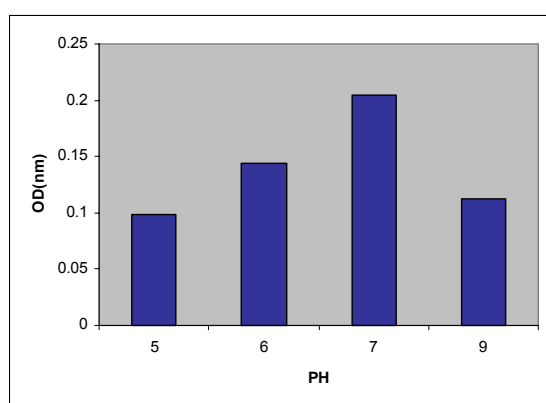
(ب)

شکل ۱- رنگ آمیزی گرم (الف)، نمودار رشد باکتری (ب)

با توجه به نمودار رشد، این باکتری تا ۸ ساعت اول رشد نسبتاً 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 نسبتاً ثابت است و سپس کاهش می یابد.

همچنین اثر pH، 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-).



شکل ۲- 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.

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 (۷ و ۸).

مشخص نمودن درصد حذف

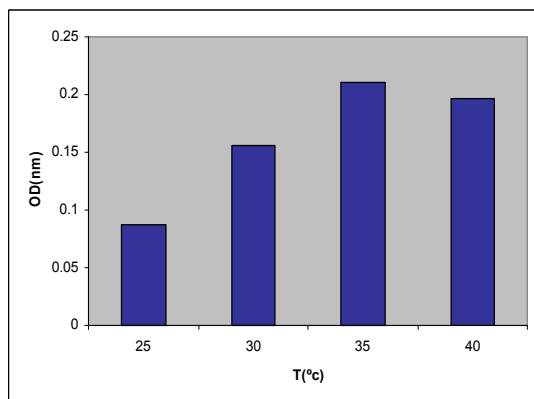
باکتری هایی که از تولوئن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می نمایند در ۵۰ ml محیط کشت مایع MSM شامل غلظت های مختلف تولوئن (۱۵۰-۲۰۰ ppm) تلقیح شده، سپس در زمان رشد باکتری میزان تولوئن مصرف شده توسط باکتری، به وسیله دستگاه GC (گاز کروماتوگرافی) مدل Shimadzu 14A تعیین گردید (۸).

نتایج

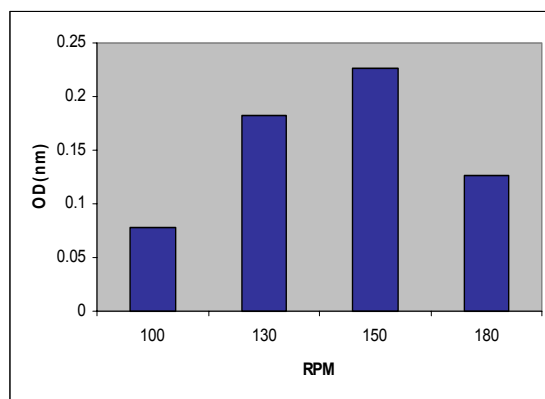
یک سویه از خاک پتروشیمی جدا شد که دارای توانایی حذف تولوئن به مقدار نسبتاً بیشتری در مقایسه با سایر سویه هاست. این سویه تولوئن را در فاز بخار تا ۵۰٪ غلظت در دسیکاتور تحمل می نماید. این باکتری گرم مثبت و میله ای شکل است و دارای اسپور مرکزی می باشد (شکل ۱_الف). نمودار رشد این باکتری به صورت زیر است (شکل ۱_ب):



(الف)

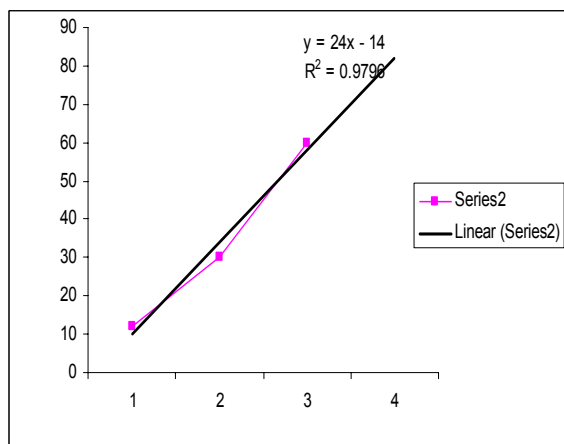


شکل ۵- اثر دما بر رشد باکتری



شکل ۳- اثر دور شیکر بر رشد باکتری

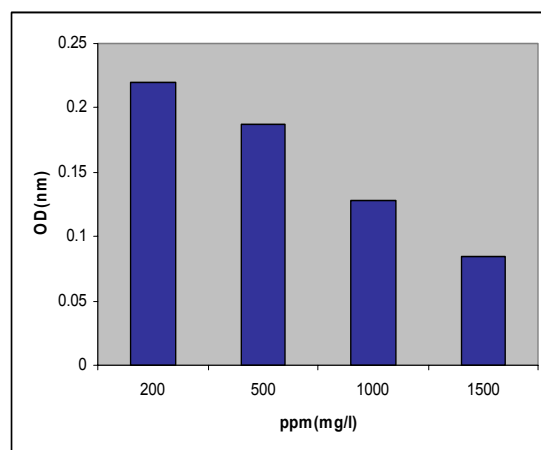
همچنین میزان درصد حذف غلظت های مختلف تولوئن ppm ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ توسط این سویه در زمان رشد آن برآورد گردید. نمودار استاندارد آن در شکل (۶) مشخص می باشد.



شکل ۶- نمودار استاندارد گاز کرو ماتو گراف

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.

باکتری مورد نظر در معرض غلظت های مختلف تولوئن قرار گرفت و بیشترین رشد در ۲۰۰ ppm تولوئن ماهده شد (شکل ۴).



شکل ۴- اثر غلظت 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 ۳۵ °C دارد.

ان تعیین شد. بهترین دما برای رشد این باکتری 35°C بوده که از رشد دردمای 25°C و 30°C و 45°C بهتر می باشد. همچنین دور شیکر 150rpm و $\text{pH}=7$ نیز برای رشد باکتری مساعدتر از سایر شرایط است. این باکتری در غلظت 200ppm 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.

در سال 2003 ، Afra. و همکاران (۱۱) باکتری *Bacillus pumilus* را از خاک آلوده در عربستان سعودی جدا نمودند که شرایط رشد و درصد حذف آن مشابه باکتری بررسی شده در این مطالعه بود.

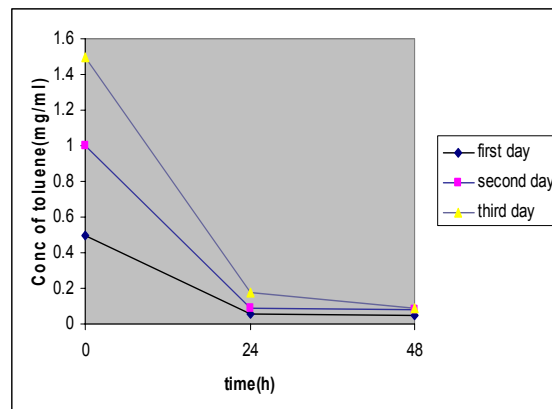
همچنین در سال 2007 Rahman و همکاران (۱۲) تجزیه (BTEX) را توسط سویه هایی از *Bacillus pumilus* که فعالیت پروتئازی شدیدی در محیط Skim Milk Agar داشتند، بررسی نمودند که این سویه ها توانایی حذف 25% درصدی تولوئن را دارا بودند. با توجه به نتایج فوق و نتایج مطالعات دیگر می توان به این نتیجه رسید که اگر شرایط 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 فرآورده های نفتی به دلیل سازش با محیط زیست خود توانایی بیشتری برای تجزیه این مواد را دارا هستند.

سپاس گذاری

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

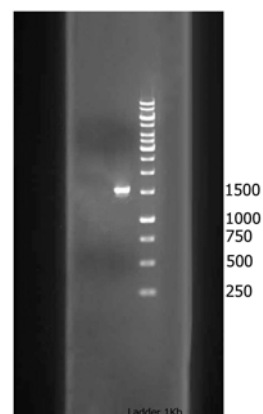
منابع

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



شکل ۷- نمودار حذف تولوئن در زمان رشد باکتری

شناسایی سویه مورد نظر توسط تکنیک 16S rRNA sequencing انجام گرفت و باکتری مورد نظر به عنوان *Bacillus pumilus* شناسایی گردید. شکل (۸) محصول PCR را در ژل آگارز نشان می دهد.



شکل ۸- محصول PCR در ژل آگارز، اندازه قطعه مورد نظر 1500kb است.

بحث

در مقایسه با مطالعاتی که تا کنون در زمینه تجزیه تولوئن انجام شده از جمله Hurbert و همکاران در 1999 (۵) و Shifang و همکاران در 1993 (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

- Environmental Microbiology, p 1911_1918
7. Kyung-Suna, Akio Kuroda, 2004. Isolation and Characterization of Benzene tolerant *Rhodococcus 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 Environmental 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. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. 34:509_517.
 - Reactions Biotechnol. Prog 19, 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 Hydrocarbon-Degrading Bacteria in Soil by Reverse Sample Genotyping. Applied and Environmental 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