فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۶۱- ۷۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

تجزیه زیستی ترکیبات مورد استفاده در صنایع پتروشیمی توسط باکتری تجزیه‌کننده تولوئن حاوی سیتوکروم P450

سیدمهدی قاسمی: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، smghasemi1985@gmail.com *
افروزالسادات حسینی ابری: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، afrouz_hosseini1985@yahoo.com
گیتی امتیازی: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، emtiazi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: با توجه به افزایش روزافزون آلاینده‌هایی نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک و مشکلات زیست محیطی ناشی از انتشار آن‌ها، تجزیه‌ی زیستی و پاک‌سازی این ترکیبات سمی توسط میکروارگانیسم‌ها از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. تولوئن یکی از مواد اصلی موجود در صنایع پتروشیمی و از مواد آلوده کننده رایج محیط زیست است که آثار مخربی بر سلامتی انسان و سایر موجودات زنده دارد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی تولوئن، از آب‌های نواحی مختلف از جمله سواحل دریای خزر و خلیج فارس و همچنین فاضلاب شهری نمونه‌برداری انجام شد. سویه‌ای که بیشترین توانایی را در تجزیه‌ی تولوئن داشت، با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی و توالی ۱۶S rDNA آن در بانک ژنی NCBI با عنوان *Bacterium Ex-DG74* با شماره HQ414235 ثبت شد. در ادامه میزان حذف تولوئن از محیط کشت با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری و کروماتوگرافی گازی، فعالیت آنزیمی سیتوکروم P450 و رشد در حضور آلاینده‌های نفتی و پتروشیمی بررسی شد.

نتایج: پس از انجام مراحل غنی‌سازی در محیط حاوی تولوئن، در حدود ۲۰ سویه جداسازی شد که در بین آن‌ها سویه‌ی جداشده از پساب تصفیه‌خانه اصفهان توانایی بالایی در تحمل و مصرف تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی داشت. نتایج حاصل از طیف سنج نوری و کروماتوگرافی گازی مشخص کرد که این سویه می‌تواند تا غلظت (v/v) ۲۵ درصد تولوئن را به خوبی تحمل کند و بیش از ۷۰ درصد از تولوئن (v/v) ۱ درصد را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی مصرف کند. سویه‌ی *Bacterium Ex-DG74* علاوه بر تولوئن توانست در محیط‌های حاوی نفت سیاه، نفت سفید، زایلن، نفتالین، اولئیک اسید، استایرن، دی‌هیدروآبتیک اسید و پلی‌اکسی‌اتیلن اکتیل‌فنل‌اتر نیز به خوبی رشد کند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که فعالیت آنزیمی سیتوکروم P450، یکی از عوامل مهم در تجزیه‌ی آلاینده‌های مختلف توسط *Bacterium Ex-DG74* است. از این باکتری به علت توانایی رشد در غلظت بالای تولوئن و تجزیه‌ی دامنه‌ی وسیعی از آلاینده‌ها، می‌توان به عنوان بذر سلولی در پاک‌سازی محیط‌های آلوده به ترکیبات سمی مختلف استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پاک‌سازی زیستی، پساب پتروشیمی، تولوئن، سیتوکروم P450

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

نفت خام و مشتقات آن از راه‌های مختلف مثل نشت تانکرهای مخصوص حمل و نقل مواد نفتی و همچنین هنگام استخراج از چاه‌ها، محیط زیست را آلوده می‌کند. آلوده شدن آب و خاک به این مواد سمی می‌تواند مشکلات جدی برای اکوسیستم منطقه به وجود آورد. تیمار این ترکیبات با روش‌های فیزیکی و شیمیایی گران قیمت است اما پاک‌سازی زیستی علاوه بر آن که ارزان‌تر و مقرون به صرفه‌تر است، یک روش سازگار با محیط زیست بوده و امکان معدنی شدن کامل هیدروکربن‌های نفتی را فراهم می‌کند. پاک‌سازی زیستی یا Bioremediation فرآیندی است که در آن با استفاده از اجزای سلولی یا فعالیت‌های متابولیکی میکروارگانیسم‌ها می‌توان مواد سمی را از محیط حذف و یا به مواد غیر سمی و بی خطر تبدیل کرد (۱- ۳).

یکی از گروه‌های اصلی ترکیبات موجود در نفت خام، هیدروکربن‌های آروماتیک است که به آن‌ها BTEX نیز گفته می‌شود. علت این نام‌گزاری حضور ۴ ماده سمی است که عبارتند از: بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن[1]. در بین این ترکیبات، تولوئن که به میزان زیادی در نفت و مشتقات آن وجود دارد به علت سمیت و خاصیت سرطانزایی خود، نگرانی‌های زیادی ایجاد کرده است. این ترکیب به میزان زیادی تولید و به عنوان سوخت، حلال و پیش‌ساز موادی مثل پلاستیک‌ها، فیبرهای سنتزی و آفت‌کش‌ها استفاده می‌شود (۴ و ۵). از جمله مواد دیگر موجود در پساب پتروشیمی می‌توان سورفکتانت‌هایی نظیر اولئیک اسید و پلی‌اکسی‌اتیلن اکتیل‌فنل‌اتر (تریتون X-100) و مواد دیگری مثل تولوئن، استایرن و دی‌هیدروآبتیک اسید (DHA) را نام برد (۶ و ۷). با وجود سمیت تولوئن و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها، تجزیه‌ی زیستی این ترکیب در محیط‌های مختلف توسط باکتری‌های مختلفی که قادرند از آن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند، دیده شده است. از جمله باکتری‌های گزارش شده تجزیه کننده تولوئن می‌توان گونه‌های مختلف جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Burkholderia*، *Exiguobacterium* و *Ralstonia* را نام برد (۸- ۱۱).

سویه‌های بومی هر ناحیه به علت سازگاری بیشتر به شرایط آن ناحیه مثل دما، شوری، اسیدیته و غیره، برای تجزیه و حذف مواد آلوده کننده کارآیی بهتری دارند (۱۲). با توجه به اثرات سمی و سرطان‌زایی تولوئن و این‌که ورود آن به آب‌های آزاد و زیرزمینی می‌تواند زندگی آبزیان، انسان و سایر موجودات را تهدید کند، ضرورت جداسازی میکروارگانیسم‌هایی که قادر به تجزیه زیستی این ترکیب هستند مشخص می‌شود.

هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری تجزیه کننده‌ی تولوئن و بررسی قدرت متابولیکی آن در مصرف ترکیبات سمی و آلاینده‌های مختلف بود. در این پژوهش، یک باکتری با توانایی بالا در تجزیه تولوئن از پساب فاضلاب اصفهان جداسازی شد که توانایی مصرف سایر آلاینده‌های نفتی و صنایع پتروشیمی را نیز داشت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

نمونه‌برداری از آب‌های ساحلی دریای خزر، خلیج فارس و همچنین تصفیه‌خانه فاضلاب اصفهان انجام شد. برای کاهش احتمال وجود باکتری‌های غیر بومی، نمونه‌ها از عمق ۱۵ سانتی‌متری در شیشه‌های درب دار استریل جمع‌آوری و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی باکتری تجزیه کننده تولوئن

به منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی تولوئن، یک میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌ها به ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی موجود در ارلن‌های در پیچ‌دار که حاوی ۴ گرم KH_2PO_4، ۴ گرم Na_2HPO_4، ۲ گرم NH_4Cl، ۰/۲ گرم $MgSO_4$، ۰/۰۰۱

گرم $CaCl_2$ و ۰/۰۰۱ گرم $FeCl_3$ در یک لیتر آب مقطر بودند، افزوده شد. تولوئن به میزان یک درصد درون هر یک از محیط‌ها ریخته شد. سپس ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از یک ماه غنی‌سازی، سویه‌های تجزیه کننده‌ی تولوئن با انتقال به محیط تولوئن آگار (حاوی محیط پایه نمکی، تولوئن و آگار) و انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند. به منظور حذف سویه‌های اتوتروف، کلونی‌های به دست آمده به محیط‌های پایه نمکی حاوی و فاقد تولوئن منتقل شدند. سویه‌هایی که فقط بر روی محیط حاوی تولوئن رشد کردند، برای بررسی بیشتر در محیط حاوی ۵۰ درصد گلیسرول و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۸ و ۱۳).

بررسی خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی باکتری

خصوصیات ظاهری باکتری تجزیه کننده‌ی تولوئن، نوع واکنش گرم، رنگ آمیزی اسپور و اسید فاست و همچنین آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلفی نظیر سنجش آنزیم‌های کاتالاز و اکسیداز، احیای نیترات، حرکت، رشد در شرایط هوازی و بی هوازی، دما، اسیدیته بهینه و میزان تحمل به غلظت تولوئن و نمک بررسی شد (۱۴ و ۱۵).

شناسایی مولکولی باکتری

به منظور شناسایی دقیق باکتری جداسازی شده، از روش مولکولی تکثیر و تعیین توالی 16S rDNA استفاده شد. بدین منظور مقداری از کلونی تازه باکتری را در میکروتیوب حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل کرده و پس از ۲ بار شستشو، به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس برای حذف ضایعات باکتری، نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ و مایع‌رویی به عنوان الگو در PCR استفاده شد (۱۶).

در این پژوهش، بخشی از توالی 16S rDNA با طولی در حدود ۳۷۰ جفت باز با کمک پرایمر رفت DG74 با توالی 5′-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3′ و پرایمر برگشت RW01 با توالی 5′-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3′ تکثیر شد (۱۷).

مخلوط PCR حاوی ۲ میکرولیتر DNA باکتری به عنوان الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول) و ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم DNA پلیمراز Taq (۵ U/µL) بود. حجم نهایی مخلوط با استفاده از آب دیونیزه دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR با دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه برای یک سیکل آغاز شد و با برنامه دمایی به شکل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه به تعداد ۳۰ سیکل تکرار شد. واکنش PCR با پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه برای یک سیکل به پایان رسید (۱۸). محصول DNA الگو به همراه نمونه شاهد (حاوی تمام مواد PCR به جز DNA الگو) و نشانگر اندازه DNA، بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید و بافر TBE[۲] به مدت ۹۰ دقیقه در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد و توسط دستگاه ژل داکیومنتاسیون (Biometra ساخت آلمان) با تابش اشعه‌ی ماورای بنفش مشاهده شد. تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA توسط شرکت Eurofin آلمان انجام شد.

بررسی میزان رشد و تجزیه تولوئن با استفاده از طیف سنج نوری

ابتدا غلظتی معادل با ۰/۵ مک فارلند از باکتری در محیط پایه نمکی تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از آن به ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌های کشت حاوی ۱ درصد تولوئن افزوده شد. پس از گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، میزان رشد باکتری با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری (Shimadzu ساخت ژاپن) در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. سپس به منظور تعیین

میـــزان تولـــوئن باقیمانـــده در محـــیط کشـــت، ابتـــدا سوسپانسـیون سـلولی بـه مـدت ۲۰ دقیقـه در rpm ۶۰۰۰ سانتریفوژ شد. به مایع رویی یک میلی‌لیتر هگـزان اضـافه و به شدت تکان داده شـد تـا تولـوئن موجـود در محـیط کشت در هگزان حل شـود. در پایـان، از فـاز رویـی کـه حاوی هگزان و تولوئن است بـرای انـدازه گیـری میـزان تولوئن در طول موج ۲۶۲ نانومتر استفاده شـد. از محـیط کشـت حـاوی تولـوئن و فاقـد بـاکتری بـه عنـوان شـاهد استفاده شد. همچنین تعیین میزان رشد و تحمـل بـاکتری نسبت به غلظت‌هـای ۵ تـا ۲۵ درصـد تولـوئن، بـه همـین شکل انجام شد(۱۳).

بررسی تجزیه‌ی تولوئن با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC)

پس از بررسی تجزیه‌ی تولوئن با روش طیف‌سـنجی، بـرای تأییـد نتـایج، میـزان تجزیـه تولـوئن توسـط سـویه جداسـازی شـده بـا اسـتفاده از کرومـاتوگرافی گـازی (Avondale سـاخت آمریکـا) مجهـز بـه آشـکار کننـده یونیزاسیون شعله‌ای[۳] (FID) و سـتون HP1 انـدازه‌گیـری شد. برنامه دمایی GC بـه ایـن شـکل تنظـیم شـد: درجـه حرارت ستون از ۶۰ تا ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد (با سـرعت ۷ درجه سانتی‌گراد در دقیقه)، دمـای تزریـق کننـده ۲۲۰ درجـه سـانتی‌گـراد و دمـای آشـکار کننـده ۲۴۰ درجـه سانتی‌گراد. از گاز هلیوم با فشـار psi ۳۴ بـه عنـوان گـاز حامل استفاده شد. از محیط کشت حاوی تولوئن و فاقـد باکتری به عنوان شاهد استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیمی سیتوکروم P450

برای آماده‌سازی تـوده سـلولی، کشـت ۲۴ سـاعته از سویه‌ی مورد نظر در محیط حاوی تولوئن تهیه شد. پـس از سانتریفیوژ در rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، به منظور شکسـتن غشـای تـوده سـلولی بـا اسـتفاده از دسـتگاه فراصـوت (Hielscher UP200H سـاخت آلمـان)، سلول‌ها در ۴ فاصله زمانی مختلـف، هـر بـار ۳۰ ثانیـه در معرض امـواج فراصـوت (دوره ۰/۵ و دامنـه ۴۰ درصـد) قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ مجدد، ۲۰۰ میکرولیتـر از مایع رویـی کـه حـاوی سـیتوکروم P450 اسـت بـه لولـه آزمایشـی کـه حـاوی یـک میلـی‌لیتـر از هـر کـدام از محلول‌های بافر سـنجش (۳۰۰ میلـی‌مـولار بـافر فسـفات پتاسیم (۷/۸ اسـیدیته) حـاوی ۰/۱ میلـی‌مـولار EDTA)، بافر رقیق‌کننـده آنزیمـی (۳۰۰ میلـی‌مـولار بـافر فسـفات پتاسیم (۷/۸ اسیدیته) حـاوی ۰/۱ میلـی‌مـولار EDTA و ۰/۵ میلـی‌گـرم در میلـی‌لیتـر آلبـومین سـرم گـاوی) و سوبسـترا (۵۰۰ میکرومـولار فـری‌سـیانید پتاسـیم در ۵۰ میلی‌مولار تریس اسیدکلریدریک با ۷/۲ اسـیدیته) بـود، افزوده شد. نمونه شـاهد منفـی هـر سـه محلـول را شـامل می‌شود اما فاقد عصـاره‌ی سـلولی اسـت. مقـدار کـاهش جـذب نمونـه در ۴۳۰ نـانومتر پـس از نـیم سـاعت قـرار گرفتن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، دلالت بـر فعالیـت سیتوکروم P450 و احیای فری‌سـیانید پتاسـیم دارد (۱۹). از سـویه *Acinetobacter* PG-3 کـه در مطالعـات قبلـی جداسازی شده بود بـه عنـوان شـاهد مثبـت اسـتفاده شـد (۲۰).

بررسی رشد باکتری در حضور سایرآلاینده‌های نفتی

پـس از تهیـه ۰/۵ مـک فارلنـد از سـویه‌ی مـورد آزمایش، به میزان ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبـی به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی حاوی یک درصـد نفت سیاه، نفت سـفید، زایلـن و ۵ میلـی‌گـرم نفتـالین بـه عنوان تنها منبع کربن و انـرژی افـزوده و بیشـترین میـزان رشد بـاکتری پـس از گرمـاگـذاری در دمـای ۲۸ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نـانومتر در مقایسه با شاهد تعیین شد.

بررسی رشد باکتری در حضور آلاینده‌های موجـود در پساب پتروشیمی

۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظتی معادل با ۰/۵ مک فارلند به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکـی حـــاوی یـــک درصـــد اولئیـــک اســـید، اســـتایرن، دی‌هیدروآبتیک اسید و پلی‌اکسی‌اتیلن اکتیل‌فنـل‌اتـر بـه عنوان تنها منبع کربن و انرژی افزوده شد. بیشترین میـزان

رشد باکتری پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد توسط طیف سنج نوری در ۶۰۰ نانومتر در مقایسه با شاهد بررسی شد.

نتایج

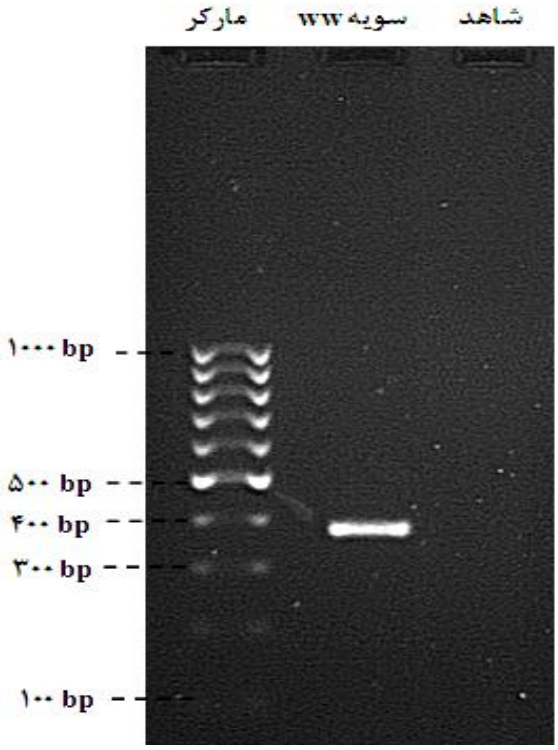
جداسازی و شناسایی

پس از انجام نمونه‌گیری از آب‌های مختلف و غنی‌سازی در محیط پایه نمکی حاوی تولوئن، حدود ۲۰ سویه باکتریایی تجزیه کننده تولوئن جداسازی شدند که در میان آن‌ها سویه‌ی به دست آمده از پساب تصفیه خانه‌ی فاضلاب اصفهان (سویه ww) بالاترین توانایی را در مصرف تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی از خود نشان داد. جدول ۱ ویژگی‌های ظاهری، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این باکتری را نشان می‌دهد.

جدول ۱- خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری

آزمایش‌های شناسایی	*Bacterium Ex-DG74*
شکل	باسیل، کورینه فرم
واکنش گرم	مثبت
اسید فاست	منفی
تولید اسپور	منفی
حرکت	مثبت
اکسیداز	مثبت
کاتالاز	مثبت
احیای نیترات	منفی
رشد هوازی	مثبت
رشد بی هوازی	مثبت
اسیدیته بهینه رشد	۷
دمای بهینه رشد	۲۸ درجه سانتی‌گراد
تحمل تولوئن	تا ۲۵ درصد
تحمل نمک	تا ۲۰ درصد

شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR با طولی حدود ۳۷۰ جفت باز را بر روی ژل آگاروز نشان می‌دهد. توالی ۱۶S rDNA حاصل از واکنش PCR این باکتری پس از تعیین ترادف، با عنوان *Bacterium Ex-DG74* و با شماره HQ414235 در بانک ژنی NCBI ثبت شد.



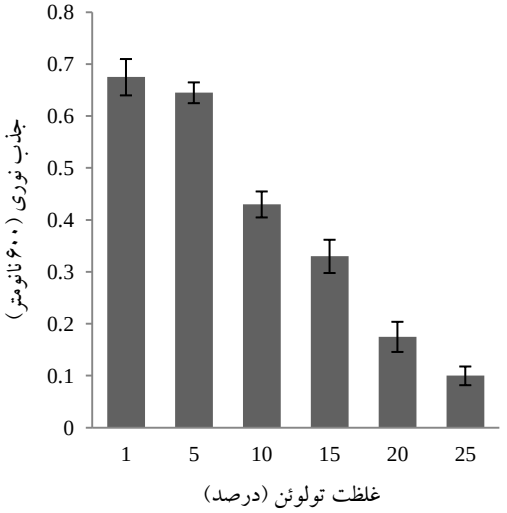
شکل ۱- باند ۱۶S rDNA حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵

میزان رشد و تجزیه تولوئن: بر اساس نتایج حاصل از طیف سنج نوری بیشترین میزان رشد (OD=۰/۷۱) و تجزیه تولوئن (۷۹ درصد) پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. بررسی‌های انجام شده توسط GC و مقایسه ارتفاع پیک‌های به دست آمده (در زمان ۸/۱۳ دقیقه) از نمونه اصلی ([pA]= ۴۵۴/۹) و نمونه‌ی شاهد ([pA]= ۲۰۲۵) نشان داد تولوئن باقیمانده در محیط کشت در حدود ۲۲/۵ درصد نسبت به مقدار نخستین است (جدول ۲).

جدول ۲- حداکثر میزان رشد و تجزیه‌ی تولوئن توسط باکتری

باکتری	میزان رشد (OD_{600nm})	حذف تولوئن (طیف سنج نوری)	حذف تولوئن (کروماتوگرافی گازی)
Bacterium Ex-DG74	۰/۷۱	۷۹ درصد	۷۷/۵ درصد

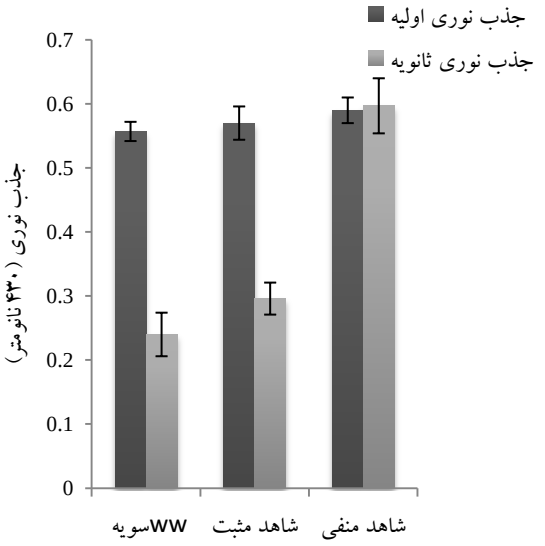
از آنجایی که تولوئن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در محیط کشت بود، باکتری در محیط فاقد تولوئن رشدی نداشت. بررسی میزان رشد در غلظت‌های مختلف تولوئن مشخص کرد که مناسب ترین غلظت برای رشد بهینه‌ی باکتری ۱ تا ۵ درصد است. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، *Bacterium Ex-DG74* قادر است تا غلظت ۲۵ درصد تولوئن را تحمل کند.



شکل۲- اثر غلظت تولوئن بر رشد باکتری

فعالیت سیتوکروم P450

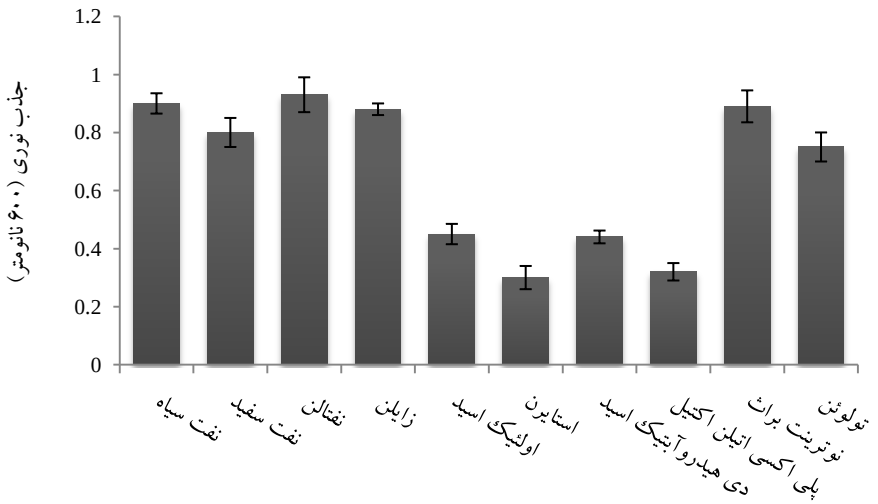
همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، *Bacterium Ex-DG74* توانست مانند کنترل مثبت جذب نوری را در طول موج ۴۳۰ نانومتر کاهش دهد که بیانگر فعالیت سیتوکروم P450 و احیای فری‌سیانید پتاسیم است.



شکل ۳- کاهش جذب نوری در نتیجه فعالیت سیتوکروم P450 باکتری

رشد در حضور آلاینده‌های نفتی و پتروشیمی

با توجه به نتایج، *Bacterium Ex-DG74* قادر است بر روی دامنه وسیعی از آلاینده‌های نفتی و پتروشیمی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی رشد کند (شکل ۴). همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، این سویه توانایی بیشتری در رشد بر روی آلاینده‌های نفتی از خود نشان داد.



شکل ۴- میزان رشد باکتری بر روی آلاینده‌های نفتی و پتروشیمی در مقایسه با میزان رشد بر روی محیط حاوی تولوئن و نوترینت براث

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اینکه کشور ما در مجاورت خلیج فارس، دریای عمان و دریای خزر قرار دارد، حمل و نقل، جابه‌جایی، تخلیه و بارگیری فرآورده‌های مختلف نفتی مانند حلال‌ها، مواد پتروشیمیایی و بسیاری دیگر از محصولات نفتی یکی از منابع مهم آلودگی سواحل در بنادر محسوب می‌شود. از این رو آلودگی آب‌ها به مشتقات نفتی از معضل‌های اساسی است. با وجود سمیت تولوئن برای موجودات زنده، تجزیه تولوئن در محیط زیست توسط میکروارگانیسم‌های مختلف انجام می‌شود (۸). از این‌رو، میکروارگانیسم‌ها و بویژه باکتری‌ها به علت داشتن قدرت متابولیکی بالا و در نتیجه تطابق سریع با محیط اطراف خود، برای حذف آلاینده‌های زیست محیطی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته اند (۲۱). در مطالعه حاضر، باکتری تجزیه کننده‌ی تولوئن، *Bacterium Ex-DG74*، از پساب تصفیه‌خانه‌ی اصفهان جداسازی شد. ورود این سویه در پساب تصفیه‌خانه می‌تواند نشانه وجود آلاینده‌های نفتی و ورود پساب‌های حاوی تولوئن کارخانه‌ها در این محیط باشد. در مقایسه با مطالعاتی که در گذشته در زمینه تجزیه‌ی تولوئن انجام شده، این باکتری توانایی بالایی در تحمل و تجزیه‌ی تولوئن و سایر آلاینده‌های پتروشیمیایی دارد (۲۲ و ۲۳). بر اساس مطالعه وانگ[۴] و همکاران سویه‌های تجزیه کننده تولوئن LJ8 (*Exiguobacterium gaetbuli*) و JB5 (*Bacillus mojavensis*) قادرند به ترتیب غلظت ۱۰ و ۱۵ درصد تولوئن را تحمل کنند (۸). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی سویه‌های *Bacillus pumilus* انجام شده، میزان حذف تولوئن فقط ۲۵ درصد گزارش شده است (۲۴). توانایی ایجاد کدورتی با جذب نوری بیش از ۰/۷ در محیط تولوئن براث، قابلیت تجزیه بیش از ۷۰ درصد از تولوئن موجود در محیط کشت در مدت ۲۴ ساعت، قدرت تحمل غلظت ۲۵ درصدی تولوئن و همچنین رشد بر روی دامنه‌ی وسیعی از ترکیب‌های سمی نفتی و پتروشیمی، این سویه را در مقایسه با سایر سویه‌ها منحصر به فرد کرده است.

مطالعاتی که در گذشته بر روی این باکتری انجام شده است نشان می‌دهد که *Bacterium Ex-DG74* قادر است به میزان زیادی آنزیم‌های پراکسیدازی نظیر کاتالاز و لاکاز تولید کند (۱۳). با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که توانایی بالای این سویه در پاک‌سازی زیستی آلاینده‌های مختلف علاوه بر

وجود آنزیم‌های پراکسیدازی به علت فعالیت سیتوکروم P450 است. سیتوکروم P450 پروتئین آهن‌داری است که در سلسله‌ی گیاهی، جانوری، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارد و به عنوان یک مونواکسیژناز انتهایی در زنجیره انتقال الکترون، در سمیت‌زدایی نقش به سزایی ایفا می‌کند (۲۵). سیتوکروم P450 باکتریایی محلول است ولی نوع یوکاریوتی آن‌ها متصل به غشاست که این امر خالص‌سازی آنزیم‌های باکتریایی را راحت‌تر می‌کند. سیتوکروم P450 دارای کاربردهای متعددی است از جمله سیستمی برای متابولیزه‌کردن ترکیباتی از قبیل ترپن‌ها و آلکان‌هاست که از این سیستم می‌توان در تجزیه‌ی پساب‌های آلی و آلاینده‌ها به خوبی استفاده کرد. بنابراین، این پروتئین با فعالیت اکسیژنازی خود از عوامل مهم در تجزیه‌ی حلال‌هایی مانند تولوئن و سورفکتانت‌هایی نظیر اسید اولئیک و غیره محسوب می‌شوند (۲۶).

در این پژوهش، سویه‌ی *Bacterium Ex-DG74* به عنوان یک گزینه‌ی مناسب برای پاک‌سازی زیستی محیط‌های آلوده به مواد نفتی و پساب پتروشیمی معرفی شد. بر اساس مطالعات قبلی و یافته‌های این پژوهش به نظر می‌رسد آنزیم‌های لاکاز و کاتالاز و همچنین سیتوکروم P450 نقش مهمی در تجزیه‌ی آلاینده‌های مختلف توسط این باکتری ایفا می‌کنند. بنابراین به علت توانایی رشد در غلظت بالای تولوئن و تجزیه‌ی دامنه وسیعی از آلاینده‌ها، از این باکتری می‌توان به عنوان بذرسلولی در پاک‌سازی محیط‌های آلوده به ترکیب‌های سمی مختلف استفاده کرد.

References

(1) Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59(2-3): 143-52.

(2) Paul D, Pandey G, Pandey J, Ain RK. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trend Biotechnol* 2005; 23(3): 135-42.

(3) Kuiper I, Lagendij EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant-Microbe Interact* 2004; 17(1): 6-15.

(4) Chapelle FH. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: The perspectives of history and hydrology. *Ground Water* 1999; 37(1): 122-32.

(5) Zilli M, Del Borghi A, Converti A. Toluene removal vapor in a laboratory-scale biofilter. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 54(2): 248-54.

(6) Frigon JC, Stephenson R, Larab´ee S, Guiot S. Biotreatment of resin acid by a coupled anaerobic/aerobic integrated system. *Pulp Pap Can* 1999; 100(5): 131-4.

(7) Shackelford WM, Keith LH. Frequency of organic compounds identified in water, EPA 600/4-76-062. NTIS No. PB-265470, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, Athens, GA, 1976.

(8) Wang L, Qiao N, Sun F, Shao Z. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles* 2008; 12(3): 335-42.

(9) Newman LM, Wackett LP. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* 1995; 34(43): 14066-76.

(10) Olsen RH, Kukor JJ, Kaphammer B. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J Bacteriol* 1994; 176(12): 3749-56.

(11) Whited GM, Gibson DT. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J Bacteriol* 1991; 173(9): 3010-6.

(12) Farhadian M, Duchez D, Vachelard C, Larroche C. BTX removal from polluted water through bioleaching processes. *Appl Biochem Biotechnol* 2008; 151(2-3): 295-306.

(13) Hosseini Abari A, Emtiazi G, Ghasemi SM. The role of exopolysaccharide, biosurfactant and peroxidase enzymes on toluene degradation by bacteria isolated from marine and wastewater environments. *Jundishapur J Microbiol* 2012; 5(3): 479-85.

(14) Slepecky RA, Hemphill HE. The genus *Bacillus*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackbrandt E, editors. *The prokaryotes*. 3rd ed. New York*:* Springer*; 2006.*

(15) Hosseini Abari A, Emtiazi G, Ghasemi SM, Roghanian R. Isolation and characterization of a novel toluene-utilizing bacterium exhibiting potential application in bioremediation. *Jundishapur J Microbiol* 2013;(in press)

(16) Li S, Qu Y, Hu D, Shi Y. Comparison of extended spectrum β-lactamases-producing *Escherichia coli* with non-ESBLs-producing *E.coli*: drug-resistance and virulence. *World J Emerg Med* 2012; 3(3): 208-12.

(17) Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR Primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2): 335-51.

(18) Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HG. Polymerase Chain Reaction (PCR) detection of *listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22(2): 153-8.

(19) Schellenberg KA, Hellerman L. Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* 1959; 231(1): 547-56.

(20) Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar Poll Bull* 2012; 64(1): 7–12.

(21) Atlas RM, Cerniglia CE. Bioremediation of petroleum pollutants: Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *Bioscience* 1995; 45(5): 332-8.

(22) Hurbert C, Shen Y, Voordouw G. Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentration of toluene. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(7): 3064-70

(23) Fan S, Scow KM. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial population in soil. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59(6): 1911-8.

(24) Rahman RN, Mahamad S, Salleh AB, Basri M. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007; 34(7): 509-17.

(25) Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450: multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 1991; 266(21): 13469-72.

(26) Munro AW, Lindsay JG. Bacterial cytochromes P450. *Mol Microbiol* 1996; 20(6): 1115-25.

---

[1]. Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene (BTEX)
[2]. Tris/Borate/EDTA
[3]. Flame ionization detector
[4]. Wang

Biodegradation of petrochemical industry compounds by cytochrome P450-producing toluene-degrading bacterium

Seyed Mahdi Ghasemi *
Ph.D student of Microbiology, University of Isfahan, Iran, smghasemi1985@gmail.com
Afrouzosadat Hosseini Abari
Ph.D student of Microbiology, University of Isfahan, Iran, afrouz_hosseini1985@yahoo.com
Giti Emtiazi
Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, emtiazi@yahoo.com

Abstract

Introduction: Owing to the serious environmental problems which have occurred due to the increasing amount of toxic petroleum hydrocarbons in the environment, bioremediation of these compounds by microorganisms seems to be necessary. Among these, toluene is a common pollutant in petrochemical industry and a serious cause for concern due to its adverse health effects and carcinogenic potential.

Materials and methods: In this study, to isolate toluene-degrading bacteria, contaminated seawater and wastewater samples were collected from the Caspian Sea, the Persian Gulf and municipal wastewater. The best toluene-degrading bacterial strain was biochemically and molecularly characterized and its 16S rDNA sequence was submitted as *Bacterium Ex-DG74* (accession no. HQ414235) in NCBI. Then, toluene removal rate, cytochrome P450 enzymatic activity, and growth rate of the isolate on oil and petrochemical contaminants were determined.

Results: After enrichment procedures in toluene-containing medium, about twenty toluene-degrading bacteria were isolated. Among them, a newly isolated strain from wastewater exhibited great ability to utilize toluene as the sole source of carbon and energy. According to the results obtained by spectrophotometer and gas chromatograph, *Bacterium Ex-DG74* showed a significant tolerance to organic solvent as it could grow in the medium containing %25 (v/v) toluene and also degraded over 70 of %1 (v/v) toluene as the sole source of carbon and energy. Moreover, this bacterium could grow on different toxic oil and petrochemical compounds.

Discussion and conclusion: The results of the present study indicated that cytochrome P450 enzymatic activity can have essential role on biodegradation of different pollutants by *Bacterium Ex-DG74*. Thus, we suggest this bacterium as a potential biological agent for *in situ* bioremediation of hydrocarbon-polluted environments.

Key words: Bioremediation, Cytochrome P450, Petrochemical wastewater, Toluene

* Corresponding Author
Received: November 05, 2012/ **Accepted:** December 29, 2012