مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره دوم (پیاپی ۲۳) تابستان ۱۳۹۴
صفحات ۱۵۶-۱۴۸

Original Article

تجزیه زیستی فرمالدئید توسط باکتری جدا شده از پساب کارخانه تولید رنگ پارس نگین نما در استان مازندران

سیده صفا هاشمی جیردهی[۱]، صبا امیری کجوری*[۲]، زهیر حشمتی پور[۳]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه میکروب شناسی، [۲]کارشناس ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد چالوس، دانشگاه آزاد اسلامی، چالوس، [۳]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه میکروب شناسی.

چکیده

سابقه و هدف: فرمالدئید ترکیبی سمی و خطرناک است و به عنوان یکی از عوامل سرطان زا و جهش زا در موجودات مطرح می باشد. از میان روش های حذف آلودگی، زیست پالایی به کمک فرآیندهای میکروبی با کمترین مقدار انرژی، ماده شیمیایی و زمان قادر به تبدیل آلاینده ها به مواد غیر سمی می باشند. این مطالعه با هدف بررسی تجزیه بیولوژیکی فرمالدئید توسط باکتری جدا شده از پساب کارخانه تولید رنگ پارس نگین نما انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تحلیلی، نمونه برداری از پساب کارخانه تولید رنگ انجام شد. برای جداسازی باکتری ها از محیط های کشت MSM و CM استفاده گردید. وبژگی های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری مورد بررسی قرار گرفت. توانایی تجزیه بیولوژیکی در محیط MSM حاوی فرمالدئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. سویه جداسازی شده با بیشترین قابلیت تجزیه زیستی، با روش مولکولی بر اساس تعیین توالی ژن *16S rRNA* مورد شناسایی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد بهترین جدایه تجزیه کننده فرمالدئید یک سویه جدید با نام *باسیلوس* اس پی. صفا تنکا است که می تواند در مدت ۴۸ ساعت ۱۵۰۰ ppm فرمالدئید را در محیط MSM agar و ۲۰۰۰ ppm فرمالدئید را در MSM broth تجزیه نماید.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه تأیید کننده اهمیت و کارایی باکتری ها در راستای پالایش آلودگی فرمالدئید از محیط های آلوده به این ترکیب می باشد.

واژگان کلیدی: تجزیه بیولوژیکی، فرمالدئید، پساب کارخانه، اسپکتروفتومتر.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۳

مقدمه

فرمالدئید ترکیبی است که از آن به صورت گسترده در کارخانه های صنعتی شیمیایی استفاده می شود و از این طریق به محیط رها می گردد که در نتیجه باعث آلودگی محیط زیست می شود (۱). فرمالدئید به طور وسیع در پزشکی، کشاورزی، صنایع مختلف مانند چسب سازی، پتروشیمی و همچنین به عنوان نگهدارنده در صنایع رنگ و رزین استفاده می گردد (۲). فرمالدئید با فرمول شیمیایی CH_2O گازی بی رنگ، محرک، فوق العاده واکنش زا، با قابلیت حلالیت بالا در آب و دارای بوی تند است. همچنین به ندرت به شکل اولیه اش دیده می شود. زیرا نیمه عمرکوتاهی در هوا دارد و با تجزیه شدن در نور تولید ماده سمی می کند (۳). فرمالدئید یک ترکیب سمی و ضد عفونی کننده باکتری ها است. دارای هر دو فعالیت باکتریواستاتیک و باکتریوسایدی می باشد که نتیجه این فعالیت دو گانه، مهار سنتز DNA و سیتوپلاسم است.

فرمالدئید با فعالیت باکتری کشی خود باعث به وجود آمدن thiazane شده که مانع از سنتز متیونین می شود. تشکیل مشتق

*) آدرس برای مکاتبه: چالوس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد چالوس، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان. تلفن: ۰۹۱۱۳۹۱۵۷۸۷ پست الکترونیک: Saba_amiri12@yahoo.com

1,3-thiazane-4-carboxylic acid توسط میکروارگانیسم ها به طور مؤثری هموسیستئین را از واکنش های بیولوژیکی بعدی حذف می نماید. با توجه به نقش هموسیستئین در ساخت متیونین، در نتیجه فرمالدئید از سنتز این اسید آمینه ضروری جلوگیری نموده و با جلوگیری از سنتز این اسید آمینه اثر باکتری کشی فرمالدئید اعمال می شود (٤).

پساب صنایع تولید رنگ حاوی انواع مختلفی از آلاینده ها از جمله مواد رنگی و دیگر ترکیبات مقاوم و سمی است که تخلیه آن ها به محیط به ویژه آب های پذیرنده، همراه با مخاطرات بهداشتی و محیط زیستی غیر قابل جبران می باشد (۵). به منظور رنگ زدایی فاضلاب های رنگی روش های متفاوتی مورد بررسی قرار گرفته است که از این میان می توان به روش های انعقاد و لخته سازی، اکسیداسیون شیمیایی، تصفیه الکتروشیمیایی، تعویض یون، اکسیداسیون پیشرفته، تجزیه آنزیمی و جذب سطحی اشاره نمود (٦ و ۷). تجزیه زیستی اساساً به عنوان یک تکنولوژی جذاب برای جداسازی و بازیافت آلاینده ها، یون های فلزی و کاهش سمیت آن ها شناخته شده است (۸). همچنین اثرات سرطان زایی آن نیز به اثبات رسیده است. آژانس بین المللی تحقیقات سرطان در سال ۲۰۰٤ در طبقه بندی مجدد خود فرمالدئید را به عنوان عامل سرطان زای انسانی، سرطان تیغه بینی معرفی نمود و متعاقب آن در سال ۲۰۰۹ فرمالدئید به عنوان عامل سرطان زای تیغه بینی و لوسمی معرفی گردید (۹ و ۱۰).

با این وجود برخی از میکروارگانیسم ها قادرند از فرمالدئید به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند. چون مواد آلی فاضلاب ها منبع غذایی میکروارگانیسم ها هستند. تماس فاضلاب با تعداد بسیار زیادی میکروارگانیسم اساس جریان های تصفیه زیستی است تا آلوده کننده ها در زمان کوتاهی از آب حذف شوند. در صورت عدم تصفیه موثر فاضلاب شهری با ورود آن به محیط، به دلیل وجود بار میکروبی زیاد، تهدیدی جدی برای سلامتی مردم محسوب می شود. تصفیه و دفع نادرست فاضلاب و فضولات باعث ایجاد آلودگی و انتشار بیماری ها می شود که بایستی به دنبال گزینه های صحیح تصفیه بود. اهداف اساسی از تصفیه فاضلاب، حفظ بهداشت، سلامت جامعه و حفاظت از منابع حیاتی محیط زیست (آب، خاک و هوا) است (۱۳-۱۱). هدف از این مطالعه ارزیابی تجزیه بیولوژیکی فرمالدئید توسط باکتری جدا شده از پساب کارخانه تولید رنگ پارس نگین نما در استان مازندران بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری و جداسازی باکتری: در این پژوهش پساب کارخانه پارس نگین نما از شهرستان سلمان شهر در استان مازندران از عمق ۳ متری در بهار ۹۲ جمع آوری گردید. نمونه ها در ظروف تیره نگهداری و به آزمایشگاه تحقیقات میکروب شناسی دانشگاه تنکابن منتقل گردیدند. به منظور جداسازی باکتری مورد نظر ابتدا ۲۵ گرم از نمونه پساب به ۲۵۰ میلی لیتر محیط کشت CM broth (مرک، آلمان) حاوی ۰/۲۵ گرم Yeast extract، ۱/۲۵ گرم D-glucose، ۰/۲۵ گرم peptone، ۱/۰۵ گرم Potassium phosphate و ۰/۰۲۵ گرم NaCl اضافه گردید. همچنین به محیط کشت یاد شده ۱ میلی لیتر فرمالدئید اضافه شد. سپس ارلن در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و سرعت g ۱۸۰ به مدت ۹٦ ساعت گرمخانه گذاری گردید. سپس هر ۲٤ ساعت یک بار(به مدت ٤ روز)، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط CM broth برداشته و روی محیط CM agar کشت سفره ای انجام شد. سپس تمامی پلیت های کشت داده شده برای بررسی های ماکروسکوپی در گرمخانه ۳۰ درجه سیلسیوس و در شرایط هوازی به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شدند. به منظور به دست آوردن کلنی تک روی محیط کشت CM کشت خطی صورت گرفت (١٤).

ب) شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: بررسی های فنوتایپی شامل بررسی ویژگی های ماکروسکوپی (شکل و رنگ کلنی ها) و نیز بررسی های میکروسکوپی مانند رنگ آمیزی گرم انجام شد. سپس بر اساس نتایج آزمون های یاد شده، از سایر آزمون های متداول بیوشیمیایی مانند کاتالاز به روش شاد

(۱۵)، اکسیداز به روش کوواکس (۱٦) و سایر آزمون های مربوط به توانایی استفاده از منابع کربن و نیتروژن، با استفاده از کیت بیوشیمیایی API 20E از شرکت (BioMerieux) انجام شد. برای ثبت نتایج کیت API، از مقایسه تغییر رنگ و یا تغییر میزان کدورت سوسپانسیون باکتری با جدول استاندارد استفاده گردید (۱۷).

ج) بررسی تجزیه بیولوژیکی:

۱- با استفاده از محیط MSM (Mineral Salt Medium): باکتری های مقاوم جدا شده، در محیط معدنی MSM agar (مرک، آلمان) با ترکیبات ۱ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۱ گرم $Cacl_2$، ۰/۱ گرم NaCl، ٤/۲ گرم K_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۲ گرم $FeCl_3$، ۱۵ گرم Agar در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر که حاوی ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm فرمالدئید بود کشت داده شدند.

۲- با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر: به منظور تشخیص فرمالدئید از معرف Hantzsch استفاده شد. برای تهیه این معرف ۱۵۰ گرم آمونیوم استات، ۳ میلی لیتر استیک اسید و ۲ میلی لیتر استیل استون در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب حل گردید. سپس ۵ میلی لیتر محیط MSM broth تهیه شد. پس از آماده سازی این محیط و استریل شدن در اتوکلاو از کلنی های آماده، یک کلنی در شرایط استریل به آن تلقیح و محیط در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و سرعت ۱۸۰ g به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد. پس از ۲٤ ساعت، ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون کلنی مورد نظر به ۲۵۰ میلی لیتر محیط MSM broth حاوی ۲۰۰۰ ppm فرمالدئید در شرایط استریل تلقیح شد. ارلن در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و سرعت ۱۸۰ g به مدت ۹٦ ساعت گرمخانه گذاری گردید. همچنین ۲۵۰ میلی لیتر محیط MSM broth حاوی ۲۰۰۰ ppm فرمالدئید به عنوان شاهد تهیه شد. پس از ۲٤ ساعت، ٦ میلی لیتر از محیط MSM broth حاوی ۲۰۰۰ ppm فرمالدئید که باکتری در آن رشد کرده بود، در شرایط استریل به درون لوله آزمایش منتقل شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. سپس ۵ میلی لیتر از روماند به لوله دیگر منتقل شد. همچنین ۵ میلی لیتر از محلول شاهد که فاقد باکتری و دارای ۲۰۰۰ PPM فرمالدئید، نیز به یک لوله آزمایش منتقل شد. در نهایت به نمونه و شاهد ۱۰۰ میکرولیتر معرف Hantzsch اضافه و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦۰ درجه سیلیسیوس گرمخانه گذاری گردید (۱۸).

سپس میزان جذب نمونه و شاهد در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر خوانده شد. بر اساس میزان جذب های به دست آمده تجزیه بیولوژیکی بررسی گردید. همچنین این آزمایش هر ۲٤ ساعت تکرار و نتایج ثبت شد (۱۸).

د) روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور استخراج DNA از روش فنل-کلروفرم استفاده شد (۱۹). به منظور تکثیر قطعه ژنی *16S rRNA* از پرایمرهای پیشرو F8 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و پیرو R1492 (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3') شرکت تاگ کپنهاگن (دانمارک) استفاده گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ٦ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱۲ میکرولیتر Master Mix شرکت تاکارای ژاپن و ۵ میکرولیتر DNA الگو انجام گرفت.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (بایورد، آلمان) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. برای انجام الکتروفورز، ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم بروماید تهیه گردید. پس از گذشت زمان فوق ژل به درون دستگاه UV ترانس لومیناتور (یو وی داک، انگلستان) منتقل گردید تا باند تشکیل شده مشاهده شود. در نهایت قطعه DNA به کمک دستگاه عکس برداری شد.

به منظور شناسایی و تایید باکتری جدا شده، محصول PCR

برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه *BLAST* در سایت NCBI بررسی گردید.

یافته ها

الف) نمونه برداری و جداسازی: ۲۱ جدایه مقاوم به فرمالدئید از پساب کارخانه رنگ جداسازی شد. این جدایه ها نسبت به هم دارای کلنی های متمایزی از نظر رنگ و شکل بودند. سپس با بررسی کلنی های رنگ آمیزی شده زیر میکروسکوپ باسیل های گرم مثبت و منفی، کوکوباسیل گرم مثبت و منفی، کوکسی گرم مثبت و منفی مشاهده شدند. از میان ۲۱ جدایه، تنها ۳ جدایه توانستند بر روی محیط کشت MSM agar حاوی فرمالدئید رشد نمایند. از بین ۳ جدایه نیز، ۱ جدایه که قدرت بیشتری در تجزیه فرمالدئید داشت مورد بررسی قرار گرفت. این کلنی توانست تا ۵۰۰۰ ppm فرمالدئید را تحمل کند.

ب) شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: بر اساس نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی باکتری باسیل گرم مثبت، کلنی ها در محیط CM agar، سفید رنگ، همچنین بر اساس نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی باکتری کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بود.

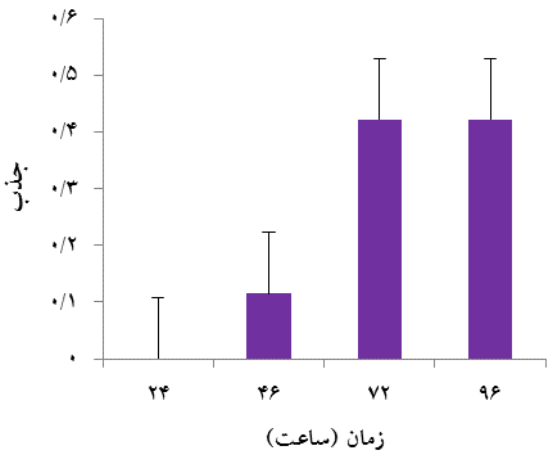
ج) بررسی تجزیه بیولوژیکی فرمالدئید:

۱- با استفاده از محیط MSM agar: باکتری مورد نظر در محیط MSM agar حاوی فرمالدئید با غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm، پس از ۲٤ ساعت و در محیط حاوی فرمالدئید با غلظت ۱۵۰۰ ppm پس از ٤۸ ساعت رشد نمود. اما قادر به رشد در محیط MSM agar حاوی فرمالدئید با غلظت ۲۰۰۰ ppm نبود. در حالی که این باکتری توانست در محیط MSM broth حاوی فرمالدئید با غلظت ۲۰۰۰ ppm رشد کند.

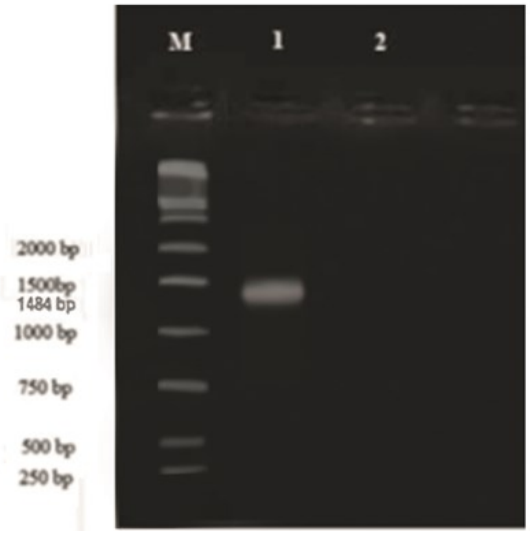
۲- بررسی تجزیه بیولوژیکی با اسپکتروفتومتر: بر اساس نتایج حاصل از بررسی تجزیه بیولوژیکی باکتری مورد نظر با اسپکتروفتومتر در محیط MSM پس از گذشت ۲٤ ساعت تفاوت میزان جذب شاهد و نمونه صفر بود و باکتری قادر به تجزیه فرمالدئید نبود. اما پس از گذشت ٤۸ ساعت تفاوت میزان جذب شاهد و نمونه ۰/۱۱۵ به دست آمد که نشان دهنده تجزیه فرمالدئید توسط باکتری است. پس از گذشت ۷۲ و ۹٦ ساعت تفاوت میزان جذب شاهد و نمونه ۰/٤۲۲ بود. این عدد ثابت ماند و تغییری نداشت (نمودار ۱).

د) شناسایی مولکولی: الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حضور قطعه ۱٤۸٤ جفت بازی را تأیید نمود (شکل ۱). پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی نمونه به وسیله نرم افزار Chromas مشاهده و بررسی گردید. در زمان بررسی توالی Chromas، چیدمان مختلفی از نقطه نظر مبدأ ردیف سازی در نظر گرفته شد، تا بهترین دقت ممکن در شناسایی بر اساس توالی موجود و مقایسه آن با بانک ژنی NCBI به دست آید. شناسایی به میزان همولوژی به دست آمده با سویه مرجع در جریان ردیف سازی توالی ها بود. به این ترتیب توالی ها بسته به میزان همولوژی به دست آمده شناسایی شدند. بر اساس نتایج حاصل از تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنی مشخص شد که جدایه متعلق به خانواده باسیلاسه و جنس *باسیلوس* می باشد (شکل ۲). با این تفاوت که شباهتی به سویه های شناخته شده از این خانواده نداشت.

به همین دلیل این سویه در سایت NCBI به عنوان *باسیلوس*



نمودار ۱: تفاوت میزان جذب نوری نمونه مورد بررسی در مقایسه با محلول شاهد.



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA*. M) سایز مارکر 1kb ، ستون ۱) نمونه مثبت جداسازی شده، ستون ۲) کنترل منفی.

اس پی. صفا. تنکا (*Bacillus* sp. Safa. Toneka) نام گذاری و با شماره دسترسی KF 706549. 1 ثبت گردید.

بحث

امروزه وجود ترکیبات آلی مقاوم به تجزیه بیولوژیکی موجود در صنایع شیمیایی و پتروشیمی به یکی از چالش های مهم زیست محیطی تبدیل شده است. حضور چنین ترکیباتی در محیط و ورود آن به منابع آبی سبب تغییر کیفیت شیمیایی و فیزیکی آب شده و امکان استفاده از آن را غیر ممکن ساخته است (۲۰).

در حال حاضر آمار و ارقام دقیقی در مورد حجم پساب های صنعتی کشور و چگونگی تصفیه آن ها وجود ندارد. بنابراین با توجه به اهمیت حفاظت کیفی منابع آب، استفاده بهینه از پساب های صنعتی، بازیافت برخی عناصر ارزشمند از این گونه پساب ها و دست یابی به روش های مناسب تصفیه برای صنایع مختلف و نیز جلوگیری از آلودگی منابع آبی کشور، مطالعه در این زمینه ضروری به نظر می رسد.

در این مطالعه، تجزیه بیولوژیکی فرمالدئید به عنوان یک آلاینده زیست محیطی از پساب کارخانه رنگ در شهرستان سلمان شهر از استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که در تهیه رنگ ها از حلال های آلیفاتیک، آروماتیک و رنگدانه های آلی و معدنی، رزین ها و افزودنی های گوناگون استفاده می شود امکان حضور چنین موادی در پساب این کارخانه ها وجود دارد. به همین دلیل پساب های رنگی مشکلات متعددی از لحاظ بهره برداری در تصفیه خانه های فاضلاب به وجود می آورند. زیرا دفع پساب های حاوی مواد رنگی خام یا با تصفیه نامناسب به محیط زیست و به ویژه آب های پذیرنده، بسیار زیاد است (۵).

یکی از معضلات مهم زیست محیطی در حال حاضر آلودگی آب دریای خزر است. با توجه به ضوابط سختگیرانه اعمال شده توسط سازمان محیط زیست، دفع پساب توسط صنایع به عنوان یک چالش بزرگ تبدیل شده است. عامل اصلی انتخاب این منطقه (کارخانه رنگ سازی) برای انجام تحقیق نیز همین مساله می باشد. تجزیه بیولوژیکی پساب در دستور کار این مطالعه قرار گرفت تا با اتخاذ راه کارهای مناسب در جهت تصفیه در نهایت در جلوگیری از آلودگی آب دریای خزر گام برداشت. با توجه به بسته بودن دریای خزر و جزر و مدی نبودن آن، تمامی آلاینده هایی تخلیه شده، در حوزه دریا انباشته می شوند. در نتیجه تجمع آن ها موجب تشدید آلودگی دریا و تالاب های اطراف آن می شود. بنابراین درصد قابل توجه ای از جمعیت ساکنین اطراف و گردشگران که همه ساله به این منطقه وارد می شوند، در معرض غلظت بالایی از این آلاینده های سمی قرار می گیرند.

برای رنگ زدایی فاضلاب های رنگی روش های متفاوتی مورد بررسی قرار گرفته است. با این وجود روش های تصفیه متداول، کارایی مناسبی را برای حذف این ترکیبات ندارد. همچنین این روش ها معمولاً گران هستند و سبب انتقال آلودگی از یک فاز به فاز دیگر می شوند. مطالعات نشان داده است در بین روش های مختلف، تصفیه بیولوژیکی مزایای خاصی نسبت به سایر روش ها دارد (۸ و ۲۱). از مزایای عمده این روش سازگاری بیشتر آن با محیط زیست و بی خطر بودن آن است.

از آن جایی که بهترین روش حذف فرمالدئید از محیط، زیست پالایی و استفاده از باکتری های تجزیه کننده این ترکیب است،

شکل ۲: درخت فیلوژنی استاندارد سویه جدید *باسیلوس* اس پی. صفا تنکا.

در این مطالعه با هدف بررسی امکان وجود باکتری های تجزیه کننده فرمالدئید در پساب آلوده، جدایه های برتر تجزیه کننده این ترکیب شناسایی شد. تا در نهایت باکتری جدیدی که توانایی حذف فرمالدئید را در غلظت بالا در مدت زمان کوتاهی دارا است برای حذف این ترکیب از محیط معرفی گردد.

نتایج آزمون های بیوشیمیایی نشان داد که این جدایه به جنس *باسیلوس* تعلق دارد. با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز و تعین توالی مشخص گردید که این جدایه سویه جدیدی می باشد که با نام *Bacillus* sp. safa. toneka ثبت گردید.

کوجی سودی (Koji Sode) و همکاران در سال ۲۰۰۱ موفق به جداسازی یک باکتری مقاوم به فرمالدئید از آب دریا شدند. نام سویه جداسازی شده DM-2 بود. این سویه قادر به تجزیه فرمالدئید با غلظت ٤۰۰ ppm در محیط Mineral بود (۲۲). اما سویه *Bacillus* sp. Safa. Toneka جدا شده در این مطالعه، باعث تجزیه فرمالدئید با غلظت ۲۰۰۰ ppm در محیط Mineral شد. در تحقیق دیگری که میردامادی (Mirdamadi) و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام دادند، *متیلوباکتریوم اکستورکوئنس*، *سودوموناس سودوآلکالیژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سودوموناس استرونی* و *سودوموناس پوتیدا* را از فاضلاب کارخانه تولید فرمالدئید جداسازی نمودند. ۲ سویه *متیلوباکتریوم اکستورکوئنس* (سویه ESS و PSS) و ٤ سویه *سودوموناس سودوآلکالیژنز*، سویه های (OSS، NSW، LSW و SSW) توانستند ۱۰۰ درصد میزان فرمالدئید با غلظت ۱۸۰۰ ppm را تجزیه نمایند. اما *سودوموناس آئروژینوزا*، *سودوموناس استرونی* و *سودوموناس پوتیدا* توانایی تجزیه کامل فرمالدئید را نداشتند (١٤).

همچنین در مطالعه ای که توسط گو چان قونگ (Gue Changhong) و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد باکتری *سودوموناس* اس پی (*Pseudomonas.* sp) از پساب کارخانه

لوازم ساختمانی جداسازی گردید. سویه ای که بالاترین میزان تجزیه فرمالدئید را انجام داد SG-71 نامیده شد که توانست مقدار ۲۰ میلی مولار فرمالدئید را در مدت ۱۲ ساعت تجزیه نماید (۲۳). با مطالعه پیرامون منابع موجود مشخص گردید که سویه جدید تجزیه کننده فرمالدئید جدا شده در این پژوهش، تاکنون از پساب های صنعتی گزارش نشده است.

این مساله می تواند نشان دهنده وجود سویه های بومی با ارزش در کشور باشد. از این رو می توان با انجام مطالعات گسترده تر در مورد سویه های بومی، از آن ها به منظور تصفیه پساب ها در صنایع مختلف استفاده نمود.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با جداسازی و شناسایی باکتری که توانایی رشد و تکثیر در شرایط آلوده به این ترکیب سمی را دارد، می توان گام مهمی را در جهت حذف این ترکیب از مکان های آلوده برداشت. در این پژوهش مطالعه تجزیه بیولوژیکی پساب صنعتی در مقیاس آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین پیشنهاد می گردد به منظور استفاده از این روش در مقیاس نیمه صنعتی و صنعتی، بهینه سازی شرایط برای بازدهی بالاتر انجام شود. همچنین می توان با ایجاد موتاسیون در برخی از ژن های خاص، فرآیند تجزیه زیستی فرمالدئید در این سویه بومی را افزایش داد. از طرفی ارزیابی و پایش قدرت تجزیه وحذف سایر آلاینده های آلی به وسیله این سویه پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به دلیل همکاری های علمی و اجرایی در این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Lavoue J, Vincent R, Gerin M. Formaldehyde exposure in U.S. industries from OSHA air sampling data. J Occup Environ Hyg. 2008; 5(9): 575-587.
2. Franks SJ. A mathematical model for the absorption and metabolism of formaldehyde vapour by humans. Toxicol Appl Pharmacol . 2005; 206(3): 309-332.
3. Zhang L, Steinmaus C, Eastmond DA, Xin XK, Smith MT. Formaldehyde exposure and leukemia: a new meta-analysis and potential mechanisms. Mutat Res. 2009; 681(2-3): 150-168.
4. Neely W-B. Action of formaldehyde on microorganisms. III. Bactericidal action of sublethal concentrations of formaldehyde. J Bacteriol. 1963; 86: 445-448.
5. Ahmet Z, Gulbeyi D. Removal of methylene blue from aqueous solution by dehydrated wheat bran carbon. J Hazard Mater. 2007; 146: 262-269.
6. Amina A, Badie S. Removal of methylene blue by carbons derived from peach stones by H3PO4 activation: Batch and column studies.- Dyes Pigm. 2008;- 76: 282-289.
7. Malik R, Ramteke DS, Waste SR. Adsorption of malachite green on groundnut shell waste based powdered activated carbon. J Waste Management. 2007; 27: 1129-1138.
8. Ishii H, Yoshida K, Inoue R, Yamada Y, Saito H, Okada Y. Formaldehyde degradation capability of the aerobic bacteria isolated from the Izu peninsula shizuoka. J School Marine Sci Technol. 2006; 4: 99-108.
9. Zhang L, Freeman LE, Nakamura J, Hecht SS, Vandenberg JJ, Smith MT, Sonawane BR.

Formaldehyde and leukemia: Epidemiology, potential mechanisms, and implications for risk assessment. Environ Mol Mutagen. 2010; 51(3): 181-191.

10. Bachand A, Mundt KA, Mundt DJ, Montgomery RR. Epidemiological studies of formaldehyde exposure and risk of leukemia and nasopharyngeal cancer: A meta-analysis. Crit Rev Toxicol. 2010; 40(2): 85-100.

11. Hidalgo A, Lopategi A, Prieto M, Serra JL, Llama MJ. Formaldehyde removal in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 58: 260-263.

12. Zhang G, Ling J, Sun H , Luo J, Fan Y, Cuia Z. Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Janibacter anophelis* strain JY11. J Hazardous Materials. 2009; 172: 580-586.

13. La S, Tabacchioni S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: A mini review. Indian J Microbiol. 2009; 49: 2-10.

14. Mirdamadi S, Rajabi A, Khalilzadeh P, Norozian D, Akbarzadeh A, Azizmohseni F. Isolation of bacteria to metabolize high concentrations of formaldehyde. World J Microbiol. 2005; 21(2): 1299-1301.

15. Schaad NW. Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic Bacteria, 2th ed. Am Phytopathol Soc St Paul MN. 1988: 158.

16. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. Nature. 1956; 178: 703-708.

17. Bailey, Scott. 2000. Analytical Profile Index (API) 20E: Manual Procedure for Bacteriological Identification. 20th Edn. Washington DC, USA. 2019.20.

18. Krishnaswamy V, Namasivayam V. Biodegradation of formaldehyde under saline conditions by a moderately halophilic bacterial consortium. Curr World Environ. 2010; 5(1): 31-38.

19. Karimnasab N, Tadayon K, Khaki P, Moradi Bidhendi S, Ghaderi R, Sekhavati M, Asadi F. An optimized affordable DNA-extraction method from *Salmonella enterica* Enteritidis for PCR experiments. Arch Razi Institute. 2013; 68(2): 105 -109.

20. Naresh B, Honey P, Vaishali S. Biodegradation of phenol by a bacterial strain isolated from a phenol contaminated site in India. Res J Environ Sci. 2012; 1: 46-49.

21. Dos Santos AB, Cervantes F J, Vanlier JB. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. J Bioresour Technol. 2007; 98(12): 2369-2385.

22. Yamazaki T, Tsugawa W, Sode K. Biodegradation of Formaldehyde by a Formaldehyde resistant bacterium isolated from seawater. Appl Biochem Biotechnol. 2001; 91(93): 213-217.

23. Changhong G, Lili S, Ge S, Diansi Y, Rui D. Isolation and characteristion of formaldehyde degrading bacteria from furniture factory. J Inf Technol Agr Eng. 2012; 134: 261-267.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 2, June 2015

Original Article

Biodegradation of formaldehyde by isolated bacteria from wastewater of paint production lant Pars Negin Nama in Mazandaran province

Safa Hashemi Jirdehi[1], Saba Amiri Kojuri[2], Zoheir Heshmatipur[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
[2] M.Sc., Young Researchers and Elite club, Chalus branch, Islamic Azad University, Chalus, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Formaldehyde is a toxic and hazardous compound and s known as one of the mutagenic and carcinogenic agents in living creatures. Among a variety of procedures designed for the elimination of contamination, biological removal is capable of converting pollutants to innocuous and nontoxic substances using less amount of energy and chemicals. This study was aimed biodegradation of formaldehyde by the bacteria isolated from Wastewater of Paint Production (Pars Negin Nama).

Materials & Methods: In this analytical study, samples were taken from paint production factory effluent. The samples were added to CM and MSM media to isolate bacteria. The bacteria were analyze based on morphological and biochemical characteristics. The bioregdaration ability of bacteria in MSM containing formaldehyde media was evaluated in absorbance at 600 nm using a spectrophotometer. The identity of bacteria was determined based on sequencing of 16SrRNA.

Results: The result showed that the best formaldehyde degrading bacteria belonged to a new strain referred to as *Bacillus sp. Safa. Toneka.* This strain was able to degrade formaldehyde 1500 ppm formaldehyde in MSM agar and 2000 ppm formaldehyde in MSM broth after 48 hour.

Conclusion: The results of the present research showed the ability of bacteria in the terms of the elimination of formaldehyde in contaminated areas.

Keywords: Biological degradation, Formaldehyde, Spectrophotometer.

Correspondence to: Saba Amiri Kojuri

Tel: +989113915787

E-mail: Saba_amiri12@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 8(2): 148-156.