



تجزیه زیستی آلاینده های تیوفنی توسط کنسرسیوم میکروبی جدا شده از استان فارس

فاطمه داودی دهاقانی^{*}، محمد برشان تشیزی^۲

^۱ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ^۲ استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه خاک ها و آب های آلوده به ترکیبات نفتی، از معضلات محیط زیست هستند. بخش عمده ای از اثرات زیان بار نفت، ناشی از ترکیبات تیوفنی مانند دی بنزوتیوفن و مشتقات گوگردی دیگر است که شواهد روزافزونی مبنی بر سمیت و سرطان زایی و نیز پایداری نسبی آنها در طبیعت وجود دارد. هدف از این پژوهش، بررسی امکان تجزیه تعدادی از این آلاینده ها توسط مجموعه میکروارگانیسم هایی است که در سال های متمادی در مواجهه با گازوئیل گسترش یافته اند.

مواد و روش ها: به منظور امکان سنجی مصرف دی بنزوتیوفن توسط سه کنسرسیوم میکروبی جدا شده، ابتدا محیط های رشدی با دی بنزوتیوفن به عنوان تنها منبع گوگردی ساخته شد و بیوماس میکروارگانیسم ها در ده روز دنبال گردید. در ادامه به منظور تخمین مسیر متابولیک تجزیه کننده این ترکیب، در محیط رشد کنسرسیوم برگزیده، ۲-هیدروکسی بای فنیل ردیابی شد. همچنین اثر کنسرسیوم منتخب بر تیوفن، ۲-متیل تیوفن و تیوفن ۲-کربوکسیلیک اسید سنجش و مقایسه گردید.

یافته ها: افزایش توده زیستی و حذف دی بنزوتیوفن در حضور یکی از کنسرسیوم های میکروبی و نیز ظاهر نشدن ۲-هیدروکسی بای فنیل، نشان دهنده توانمندی آن کنسرسیوم در تجزیه این ترکیب، با مسیری غیر از 4S بود. این کنسرسیوم تیوفن و ۲-متیل تیوفن را نیز مصرف نمود.

نتیجه گیری: فعالیت و گستره سویسترای این کنسرسیوم در مقایسه با میکروارگانیسم های شناخته شده دیگر، آن را به عنوان بیوکاتالیستی ارزشمند در پاکسازی آلاینده های تیوفنی معرفی می کند.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، تیوفن، کنسرسیوم میکروبی، گازوئیل.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۶

مقدمه

حلقه ای هتروسیکلیک آروماتیک گوگردی به شمار می روند و به نظر می رسد که مانند سایر اعضای این خانواده دارای پتانسیل ایجاد جهش و سرطانزایی باشند. این ترکیبات در محیط های آلوده شده، آثار سمی قابل توجهی بر اکوسیستم ها دارند. در سال ۱۹۹۰، ژاکوب به بررسی اثر چندین ترکیب هتروسیکلیک آروماتیک چند حلقه ای گوگردی و مشتقات متیله آنها بر موش های صحرایی و موش ها پرداخت که فعالیت سرطان زایی بالایی را از برخی از آنها مشاهده نمود (۴). در گزارش های متعدد، تأثیر هتروسیکلیک های آروماتیک چند حلقه ای گوگردی بر دافنی ماگنا بررسی شده است. به

نفت همواره از طریق حوادثی مانند شکستگی خطوط لوله و نشت های جزئی و طولانی مدت و یا از لاشه کشتی های نفت کش به طبیعت راه یافته و سلامت انسان و سایر موجودات زنده را به خطر می اندازد (۳-۱). بخش عمده ای از اثرات زیانبار نفت در محیط های آلوده شده، ناشی از ترکیبات تیوفن دار مانند دی بنزوتیوفن (DBT) و مشتقات آن است. انواع تیوفن های متراکم از جمله DBT از خانواده ترکیبات چند

(* آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه زیست شناسی.

ترکیبات، از خاک های آلوده به گازوئیل مناطق اطراف پمپ بنزین هایی در سه شهرستان گویم، دوکوهک و سپیدان در استان فارس، نمونه برداری صورت گرفت. خاک های جمع آوری شده در ظروف شیشه ای استریل مجزا به شکل نیمه پر انباشته و به آزمایشگاه منتقل شدند.

ب) رشد و تکثیر میکروارگانیسم ها و تهیه سوسپانسیون سلولی: برای تکثیر میکروب های موجود در خاک های جمع آوری شده، ابتدا یک گرم از هر خاک به ۱۰۰ میلی لیتر محیط غنی استریل نوترینت آگار در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری اضافه شد. ارلن ها در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از ۱۰ روز، از محیط کدر هر یک از ارلن ها یک میلی لیتر برداشته شد. میکروب های تکثیر شده به دست آمده از سه خاک، با سانتریفیوژ از محیط رشد جدا شدند. مواد ناخواسته برون سلولی شامل ترکیبات گوگرد دار مختلف، تا حد امکان با دو بار شست و شو با بافر فسفات ۰/۱ مولار از سطح سلول ها حذف شدند. سلول ها پس از معلق شدن دوباره در یک میلی لیتر محیط انتخابی، جهت بررسی توانایی مصرف یکی از ترکیبات تیوفنی، به عنوان منبع گوگرد آزموده شدند (۱۱).

ج) تهیه محیط انتخابی *BMVD*: از آنجایی که اغلب باکتری ها و قارچ های مصرف کننده ترکیبات تیوفنی، ترکیبات ساده تر و در دسترس تر گوگردی مانند سولفات، سیستین، متیونین و دی متیل سولفوکسید را ترجیح داده و حضور این ترکیبات، فعالیت گوگردزایی آنها را از ترکیبات تیوفنی به شدت مهار می کند، برای جداسازی میکروارگانیسم های تجزیه کننده آلاینده های تیوفنی، محیط پایه ای عاری از هر منبع گوگردی و واجد همه ترکیبات دیگری که معمولا برای چنین میکروارگانیسم هایی ضروری یا مفید هستند، آماده شد (۱۲). در تحقیق این حاضر این محیط *BMV* نام گرفت. این محیط با مخلوط شدن محلول های بافری (B)، فلزی (M) و ویتامینی (V) مطابق جدول ۱ ساخته شد. برای تهیه محیط پایه *BMV* پیش از شروع آزمایش و مرحله به مرحله، ۱۰۰۰ میلی لیتر محلول B، ۱۰ میلی لیتر محلول M و یک میلی لیتر محلول V با یکدیگر مخلوط شدند. به منظور آزمودن تاثیر منابع کربنی مختلف بر قدرت

طور مثال LC_{50} دی بنزو تیوفن و بنزو تیوفن، توسط ایستمنوند (Eastmond) و همکاران برابر با ۰/۴۶۶ و ۶۳/۷ میلی گرم در لیتر گزارش گردید (۵). پتانسیل جهش زایی و سرطان زایی و سمیت این ترکیبات با توجه به استعدادشان برای تجمع در بافت های ارگانیک های زنده اهمیت بیشتری پیدا می کند. بعضی از آبیان دریایی که با دی بنزو تیوفن های استخلاف شده نفت آلوده شده اند تا سه سال پس از آلودگی، حضور این ترکیبات را در بافت های خود نشان داده اند (۵). در برخی از مطالعات اخیر برای حذف آلودگی های نفتی از کنسرسیون های میکروبی استفاده شده است (۶).

آلاینده های تیوفنی، ترکیباتی نسبتاً پایدار در محیط های زنده و غیر زنده می باشند. در واقع DBT و مشتقات آلکیل آن در بین ترکیبات آروماتیک نفت از پایداری ترین مواد در مقابل تجزیه می باشند (۷ و ۸). این موضوع، عزم جهانی را جهت یافتن راه حل هایی برای پاک سازی اکوسیستم ها از این آلاینده ها به دنبال داشته است. جست و جوی میکروارگانیسم های توانمند تجزیه کننده این ترکیبات، یکی از حوزه های تحقیقاتی پرتعداد در این باره می باشد (۹ و ۱۰). پژوهش حاضر با هدف یافتن میکروارگانیسم هایی جدید و بومی ایران، با توانایی تجزیه ترکیبات تیوفنی و پاکسازی زیستی خاک های آلوده به نفت و این آلاینده ها صورت گرفت.

مواد و روش ها

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک (دارم-اشنت، آلمان) خریداری شدند. استونیتریل و اتیل استات با درجه HPLC تهیه شدند و سایر مواد دارای درجه آنالیزی بودند. تمامی محلول ها و محیط ها در آب دیونیزه تهیه شدند. مطالعه حاضر به شکل تجربی و در مراحل زیر صورت گرفته است:

الف) نمونه برداری از خاک های مستعد رشد میکروارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات تیوفنی: با توجه به حضور مقادیر نسبتاً بالای ترکیبات تیوفنی در برش نفتی گازوئیل به منظور یافتن میکروب های جدید مصرف کننده این

جدول ۱: ترکیبات و نحوه آماده سازی محیط BMV.

محلول بافری B (۲/۷ pH) ^۱	
۵ گرم	گلوکز یا اتانول یا گلیسرول
۵ گرم	KH ₂ PO ₄
۴ گرم	K ₂ HPO ₄
۱ گرم	NH ₄ Cl
۰/۲ گرم	MgCl ₂ .6H ₂ O
۰/۰۲ گرم	CaCl ₂
۰/۰۱ گرم	NaCl
۱ لیتر	آب دوبار تقطیر
محلول فلزی M ^۲	
۰/۵ گرم	FeCl ₂ .4H ₂ O
۰/۵ گرم	ZnCl ₂
۰/۵ گرم	MnCl ₂ .4H ₂ O
۰/۱ گرم	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
۰/۰۵ گرم	CuCl ₂
۰/۰۵ گرم	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O
۱۲۰ میلی مول	HCl
۱ لیتر	آب دو بار تقطیر
محلول ویتامینی V ^۳	
۰/۰۴ گرم	Calcium pantothenate
۰/۰۲ گرم	Inositol
۰/۰۴ گرم	Niacin
۰/۰۴ گرم	Pyridoxine hydrochloride
۰/۰۲ گرم	p-Aminobenzoic acid
۰/۰۰۰۰۵ گرم	Cyanocobalamin
۱۰۰ میلی لیتر	آب دو بار تقطیر

^۱ این محلول ها پس از تهیه، با اتوکلاو استریل می گردند. این محلول پس از تهیه، به کمک فیلتراسیون استریل می گردد. این ویتامین به صورت محلول استوک ۱۰۰X ساخته شده و در دمای ۴ °C نگهداری می شد.

ترکیب آلی تیوفنی با محیط رشد آبی و تضمین دسترسی میکروارگانیسم ها به منبع گوگرد، آزمایش مصرف DBT و سایر ترکیبات تیوفنی در مراحل بعد با افزودن غلظت یک درصد توین ۸۰ به عنوان یک سورفکتانت غیر یونی انجام شد (۱۴).

د) بررسی امکان مصرف DBT توسط کنسرسیوم های میکروبی: محیط های BMVD ساخته شده، در شرایط استریل و در حجم های ۱۰۰ میلی لیتری در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد و پس از تلقیح شدن با حجم یک یا دو درصدی سوسپانسیون های سلولی جدا شده از محیط های غنی، در شیکر انکوباتوری با ۲۰۰ rpm به مدت ده روز گرماگذاری شدند. از آنجایی که طبق مطالعات صورت گرفته تقریباً در تمام باکتری های معتدل دوست قادر به گوگردزایی، بهترین دمای عملکرد ۳۰ درجه سلیسیوس می باشد (۱۵). در اینجا نیز این دما برای آزمودن توانایی گوگردزایی ترکیبات تیوفنی توسط کنسرسیوم های میکروبی برگزیده شد. از آنجایی که DBT تنها ترکیب گوگرد دار محیط های رشد بود، وزن خشک توده سلولی نهایی در ارلن ها، معیاری برای توانایی کنسرسیوم میکروبی مربوطه در مصرف DBT در آن محیط در نظر گرفته شد. هر آزمون به طور مستقل سه تکرار صحیح داشت. به منظور نمایش پراکندگی داده ها در هر نقطه، میانگین ها همراه با انحراف معیار اعلام گردید (۱۴).

ه) تعیین وزن سلول خشک کنسرسیوم های میکروبی در محیط های رشد انتخابی: در سوسپانسیون های حاصل از رشد کنسرسیوم های میکروبی مختلف، وزن سلول خشک (DCW) به عنوان واحد بیوماس، در نظر گرفته شد. برای تعیین آن، مخلوط های میکروبی از فیلتر های غشایی ۰/۲ میکرونی عبور داده شدند. رسوبات سلولی به جا مانده بر صافی، در دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس در آون قرار گرفتند. فیلتر های یاد شده در زمان های مختلف توزین شدند. این کار تا زمانی که سلول ها به طور کامل خشک شده و کاهش وزن نشان نمی دادند ادامه یافت. در این مرحله با محاسبه اختلاف وزن کاغذ صافی، قبل و بعد از نشست سلول ها، وزن سلول خشک موجود در

گوگردزایی میکروارگانیسم های سه مجموعه میکروبی، محیط های پایه ی جداگانه ای با یکی از منابع کربنی گلوکز، اتانول یا گلیسرول به غلظت ۵ گرم در لیتر تهیه شد (۱۳).

در بسیاری از تحقیقات، آزمون توانمندی میکروارگانیسم ها در کسب گوگرد از ترکیبات تیوفنی، با DBT آغاز می شود. این مطالعه نیز با بررسی رفتار سه کنسرسیوم میکروبی جدا شده در محیط های حاوی ۰/۲۵ میلی مولار DBT، که از استوک اتانولی به عنوان تنها ترکیب گوگرد دار اضافه می گردید، آغاز شد که این محیط انتخابی، BMVD نام گرفت.

معمولاً میکروارگانیسم هایی که از ترکیبات آلی موجود در محیط، همانند ترکیبات تیوفنی نفت، استفاده می کنند، دارای بیوسورفکتانت های زیستی سطحی یا رها شده هستند که تشکیل امولسیون سلولی در محیط آلی را تسهیل می کند. به هر حال بر پایه تجربیات مشابه قبلی و به منظور افزایش اختلاط

شده با آن، در هفت روز به کمک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) آنالیز گردید. ستون HPLC مورد استفاده به منظور ردیابی این ترکیب نسبتاً غیر قطبی، (۳/۹×۱۵۰ mm) و $4 \mu\text{m}$ Nova-Pak C18 column بود و پس از آزمون نسبت های مختلف آب و استونیتریل، در نهایت مخلوط ۱:۴ آب و استونیتریل با شدت جریان $1/8 \text{ ml/min}$ به عنوان فاز متحرک برگزیده شد که در محلول های خالص حاوی DBT، موجب تشکیل پیک متمایزی در زمان شویش مناسب (۱/۳ دقیقه) گردید. در انتهای ستون نیز به منظور تشخیص DBT، از آشکارساز جذب UV استفاده گردید که میزان جذب فاز متحرک را در 280 nm به صورت تابعی از زمان رسم و پیک شاخصی را نشان داد. سطح زیر آن متناسب با مقدار DBT در نمونه تزریقی بود. برای امکان پذیر کردن سنجش کمی DBT در نمونه های تهیه شده از محیط رشد و یافتن رابطه بین غلظت این ترکیب در این شرایط با سطح زیر پیک، نمودار استاندارد مربوطه رسم گردید. بدین منظور غلظت های ۰/۰۲ تا $0/36$ گرم بر لیتر از DBT در اتیل استات ساخته شد و در حجم 10 میکرولیتر به ستون تزریق گردید. برای تعیین غلظت DBT در زمان های مختلف رشد، در فواصل زمانی مناسب و در شرایط استریل، یک میلی لیتر از محیط رشد برداشته شد و به منظور توقف سریع رشد و فعالیت سلول ها و ممانعت از تغییر غلظت DBT پس از نمونه برداری، pH آن به کمک HCl یک نرمال به 2 رسید. DBT موجود در نمونه با به کارگیری حجم مساوی اتیل استات، استخراج شد. سپس 10 میکرولیتر از اتیل استات به ستون تزریق گردید. سطح زیر پیک ظاهر شده در زمان $1/3$ دقیقه، با توجه به نمودار استاندارد رسم شده، مقدار این ترکیب را در هر نمونه بیان نمود (۱۳).

ط) تعیین بیشینه فعالیت ویژه حذف DBT توسط کنسرسیوم میکروبی: برای بررسی سرعت تجزیه DBT در زمان های مختلف رشد، در بازه های زمانی ۶ ساعته، کاهش غلظت این ترکیب تعیین شد. پس از مقایسه، بیشینه فعالیت ویژه حذف DBT به شکل $\text{DCW}^{-1} \text{ g DBT min}^{-1}$ بیان گردید (۱۸).

ی) کاوش ابتدایی مسیر احتمالی حذف DBT توسط کنسرسیوم

مخلوط های میکروبی تعیین و مقایسه گردید (۱۶).
و) تعیین الگوی رشد کنسرسیوم میکروبی مصرف کننده DBT پس از انتخاب توانمندترین کنسرسیوم میکروبی در تجزیه DBT برای اطلاع از نحوه رشد آن، الگوی افزایش توده سلولی مربوطه در محیط BMVD دارای مناسب ترین منبع کربنی در طول زمان، رسم گردید. به منظور رسم منحنی رشد از میکروارگانیسم های تازه شسته شده و معلق شده این کنسرسیوم، تلقیحی ۲ درصدی به سه ارلن یک لیتری حاوی 200 میلی لیتر محیط BMVD صورت پذیرفت. ارلن ها به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتوری با دمای 30 و 200 دور در دقیقه نگهداری شدند. در این مدت در فواصل زمانی مناسب، بسته به سرعت رشد و کدورت محیط کشت، حجم مناسب مورد نیاز از هر محیط برای خوانش جذب در 660 نانومتر برداشته شد (روز اول و دوم یک میلی لیتر، روز سوم و چهارم 500 میکرولیتر و روزهای بعد 100 میکرولیتر). زمانی که جذب خوانده شده از $0/8$ تجاوز می نمود، رقیق سازی صورت گرفت. جذب نوری با در نظر گرفتن فاکتور رقت محاسبه و ثبت گردید. در نهایت جذب های نوری ثبت شده از ارلن ها در هر زمان معدل گیری شدند و میانگین حاصل بر اساس رابطه بین وزن سلول خشک کنسرسیوم میکروبی و جذب نوری، به وزن سلول خشک تبدیل گردید (۱۷).

ز) تعیین رابطه بین وزن سلول خشک کنسرسیوم میکروبی و جذب نوری: پس از انتخاب کنسرسیوم میکروبی سازگارتر با DBT، تخمین وزن سلول خشک در مراحل بعدی با تکیه بر رابطه بین DCW و جذب نوری در 660 نانومتر، صورت گرفت. بدین منظور سوسپانسیون هایی از کنسرسیوم میکروبی برگزیده با OD های متفاوت ($0/1-0/8$) تهیه شد و با تعیین وزن سلول خشک در این سوسپانسیون ها، منحنی استاندارد DCW برحسب OD با نرم افزار اکسل برای کنسرسیوم میکروبی منتخب رسم گردید (۱۷).

ح) پایش تغییرات غلظت DBT در محیط رشد کنسرسیوم میکروبی مصرف کننده DBT: برای مشاهده چگونگی مصرف DBT توسط کنسرسیوم میکروبی منتخب محیط BMVD تلقیح

BMVT, BMVD نام گرفتند. بیوماس میکروبی پس از گذشت ۷ روز در دمای °C ۳۰ با سنجش جذب در ۶۶۰ nm تعیین گردید. جذب های نوری ثبت شده از سه تکرار در هر مورد معدل گیری شد و بر اساس رابطه بین وزن سلول خشک و جذب نوری، وزن سلول خشک در هر مورد بیان گردید (۱۷).

یافته ها

الف) رشد و تکثیر میکروارگانیسم ها: همان طور که در جدول ۲ مشاهده می شود از میان کنسرسیوم های میکروبی جدا شده از خاک ها، کنسرسیوم میکروبی جدا شده از خاک شهرستان دوکوهک در تجزیه DBT در محیط های BMVD دارای منابع کربنی مختلف، موفق تر از سایرین بوده است. در محیط تلقیح شده توسط این کنسرسیوم و دارای اتانول، بیشترین توده سلولی نهایی پس از ده روز تولید شد. به همین دلیل این کنسرسیوم در این محیط برای ادامه آزمون ها انتخاب گردید. از سوی دیگر رشد کنسرسیوم میکروبی جدا شده از خاک گویم کمتر بود و رشد کنسرسیوم میکروبی سپیدان حتی با گذشت بیش از ۱۴ روز قابل توجه نبود.

نمودار ۱ منحنی رشد کنسرسیوم میکروبی دوکوهک و تغییرات pH را در مدت ۱۶۸ ساعت در BMVD دارای اتانول و در حضور ۰/۲۵ mM DBT به عنوان تنها منبع گوگرد نشان می دهد. بر اساس رابطه خطی مشاهده شده بین جذب طول موج ۶۶۰ نانومتر و وزن خشک سلول های کنسرسیوم میکروبی دوکوهک، در مخلوطی حاوی این کنسرسیوم، یک OD_{660nm} معادل ۰/۲۴ گرم بر لیتر وزن خشک سلول بود.

ب) مصرف DBT توسط کنسرسیوم میکروبی: بر اساس الگوی کاهش غلظت DBT هنگام رشد این کنسرسیوم میکروبی که در نمودار ۲ نمایش داده شده است.

میکروبی: برای پی بردن به مسیر بیوشیمیایی مصرف کننده DBT، تشکیل یا عدم تشکیل DBT سولفون و ۲-هیدروکسی بای فیل (2-HBP)، به عنوان متابولیت و محصول یکی از مسیرهای ممکن برای مصرف DBT در میکروارگانیسم ها، بررسی شد. بدین منظور در زمانی که سرعت حذف DBT نسبت به بیوماس، بیشینه بود و احتمالاً سلول ها فعال ترین متابولیسم را برای حذف DBT داشتند، یک میلی لیتر از محیط رشد کنسرسیوم میکروبی در شرایط استریل برداشته شد و پس از اسیدی شدن، با اتیل استات مخلوط شد. اتیل استات رویی به روش گفته شده با HPLC آنالیز گردید. کروماتوگرام حاصل از نظر حضور یا عدم حضور DBT سولفون و 2-HBP در محیط، در قیاس با پیک های مشاهده شده در همین شرایط برای این دو ترکیب به شکل خالص بررسی گردید. تمامی ترکیبات خالص و حلال های به کار رفته در آزمایشات HPLC از خلوص مناسب برخوردار بودند. حلال ها پیش از استفاده، به منظور حذف هوای حل شده و جلوگیری از تشکیل حباب ها و پهن شدگی پیک ها، در حین هم زدن مداوم به خلأ متصل شدند (۱۴).

ک) بررسی توانایی تجزیه ترکیبات تیوفنی دیگر توسط کنسرسیوم میکروبی منتخب: به منظور بررسی نسبی دامنه ترکیبات تیوفنی نفت که می توانند به عنوان تنها منبع گوگرد توسط کنسرسیوم میکروبی مورد بحث استفاده شوند، رشد یا عدم رشد کنسرسیوم میکروبی در حضور چند ترکیب تیوفنی دیگر موجود در نفت بررسی و با DBT مقایسه گردید. بدین منظور DBT، تیوفن، ۲-متیل تیوفن و تیوفن ۲-کربوکسیلیک اسید هر کدام به طور جداگانه و در غلظت ۰/۲۵ میلی مولار به ۱۰۰ میلی لیتر محیط BMV اضافه شدند. در محیط های دارای ترکیبات مختلف گفته شده، که به ترتیب BMVTC, BMVMT,

جدول ۲: بیوماس سه کنسرسیوم میکروبی در روز دهم در ۱۰۰ میلی لیتر محیط رشد انتخابی در حضور DBT با منابع کربنی مختلف.

کنسرسیوم میکروبی	گرم سلول خشک در حضور گلیسرول	گرم سلول خشک در حضور اتانول	گرم سلول خشک در حضور گلوکز
کنسرسیوم گویم	۰/۰۷۰۳±۰/۰۱۴۱	۰/۰۵۲۳±۰/۰۱۲۲	۰/۰۵۹۹±۰/۰۱
کنسرسیوم دوکوهک	۰/۱۲۰±۰/۰۲۱۲	۰/۱۴۹±۰/۰۳۰۸	۰/۰۷۳۶±۰/۰۲۴۵
کنسرسیوم سپیدان	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد

جدول ۳: مقایسه بیوماس کنسرسیوم میکروبی دوکوهک در حضور چند ترکیب تیوفنی.

ترکیب تیوفنی	گرم سلول خشک در لیتر
دی بنزوتیوفن	۱/۴۱۸۴
تیوفن	۰/۲۶۶۴
۲-متیل تیوفن	۰/۱۲۰۰
تیوفن-۲-کربوکسیلیک اسید	عدم رشد

بحث

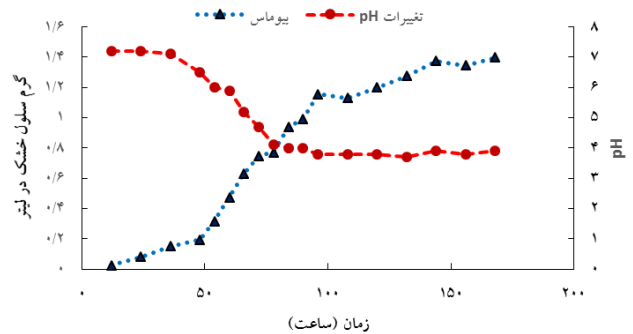
میکروارگانیزم های تجزیه کننده آلاینده های تیوفنی برای به کارگیری در فرآیند پاکسازی زیستی بسیار ارزشمند هستند. میکروارگانیزم های مختلف، بسته به قدرت متابولیک خود و دسترسی به ترکیبات گوگرد دار، گوگرد مورد نیاز خود را از ترکیبات مختلفی به دست می آورند (۱۹). البته میکروارگانیزم های مصرف کننده ترکیبات نسبتاً پیچیده ای مانند DBT فراوان نیستند و معمولاً تنها در محیط های حاوی غلظت های بالای این ترکیبات دیده می شوند.

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که کنسرسیوم میکروبی جدا شده از نمونه خاکی دوکوهک، فعالیت ویژه گوگردزدایی قابل توجهی در تجزیه DBT دارد. این یافته نسبت به میزان فعالیت گزارش شده برای ردوکوکوس اریتروپولیس KA2-5-1 و سودوموناس دلافیلدی R-8 به عنوان دو باکتری شاخص در تحقیقات گوگردزدایی بالاتر است (۲۰ و ۲۱).

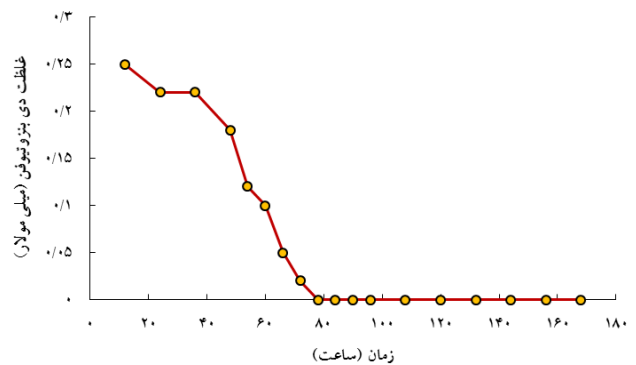
در پاکسازی زیستی محیط های آلوده، به کمک میکروارگانیزم ها، منبع کربنی مورد نیاز موضوعی در خور توجه و در مواردی محدود کننده است. در این مطالعه غلظت نهایی سلولی در حضور اتانول به عنوان منبع کربن بیشتر از گلیسرول و گلوکز بود. این امر نشان دهنده کمتر بودن زمان دو برابر شدن سلول ها در حضور اتانول و سازگاری بیشتر شبکه متابولیک میکروارگانیزم ها با این ترکیب به عنوان منبع کربن می باشد. پیش از این نیز برتری اتانول بر سایر منابع کربنی در مورد بعضی از باکتری های مصرف کننده DBT، مانند ردوکوکوس اریتروپولیس KA2-5-1 مشاهده شده است (۲۲).

رشد سلولی بیشتر در حضور اتانول احتمالاً ناشی از کوچکی

DBT موجود در محیط BMVD تقریباً q در روز چهارم به اتمام رسید و فعالیت ویژه حذف DBT در اوایل فاز لگاریتمی رشد کنسرسیوم میکروبی و در فاصله بین ساعت های ۴۸ تا ۵۴ پس از تلقیح، بیش از سایر زمان ها و معادل $1 \text{ mol DBT min}^{-1}$ بود. آنالیز محیط BMVD تلقیح شده با کنسرسیوم میکروبی منتخب، در مقایسه با محلول ترکیبات خالص DBTO_2 و 2-HBP که به ترتیب زمان های بازداری در حدود ۰/۵ و ۰/۷ دقیقه داشتند، بیانگر تشکیل نشدن این دو ترکیب ضمن مصرف DBT توسط کنسرسیوم میکروبی بود. همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می شود، این کنسرسیوم میکروبی در حضور تیوفن و ۲-متیل تیوفن با سرعتی کمتر از BMVD رشد کرده و رشد آن در حضور تیوفن ۲-کربوکسیلیک اسید حتی با تمدید زمان کشت تا ۱۴ روز نیز قابل مشاهده نبود.



نمودار ۱: منحنی رشد کنسرسیوم میکروبی دوکوهک در محیط BMVD و تغییرات pH در زمان رشد.



نمودار ۲: تغییر غلظت DBT ضمن رشد کنسرسیوم میکروبی دوکوهک.

هوازی (۲۴)، ۲) معدنی شدن که ضمن آن، میکروارگانسیم این ترکیب را به عنوان تنها منبع کربن، گوگرد و انرژی به کار می گیرد (۲۴)، ۳) مسیر کوداما که با تخریب اکسیداتیو حلقه های فنیلی، باعث تولید ترکیبات محلول در آب می شود (۲۵) و ۴) گوگرد زدایی 4S که پس از دو واکنش، DBT را به $DBTO_2$ تبدیل کرده و در نهایت گوگرد را به شکل سولفیت جدا کرده و 2-HBP را به جا می گذارد (۱۴).

در این پژوهش، آنالیز HPLC هیچ یک از دو ترکیب مربوط به مسیر 4S را نشان نداد. البته شناسایی نشدن $DBTO_2$ به عنوان حد واسط این مسیر، نمی تواند به تنهایی برای رد آن کافی باشد و می تواند صرفاً ناشی از بیشتر بودن سرعت واکنش های مصرف کننده $DBTO_2$ نسبت به واکنش های تولید کننده آن در مسیر 4S باشد (۱۴). اما 2-HBP محصول پایدار است که میزان تولید آن مبنای فعالیت گوگردزدایی باکتری های واجد این مسیر متابولیک می باشد (۱۴).

با توجه به عدم ظهور هر دوی این ترکیبات ضمن حذف DBT می توان انتظار داشت که تجزیه زیستی این ترکیب به شیوه ای دیگر صورت پذیرد. تبعیت نکردن از مسیر 4S برای حذف DBT، با توجه به اثر مهاري قابل توجه 2-HBP بر آنزیم های ابتدایی آن، مزیت محسوب شده و می تواند در حذف مقادیر بالاتر DBT توسط کنسرسیوم میکروبی، مفید باشد. از سوی دیگر DBT تنها در شرایط هوازی توسط این کنسرسیوم میکروبی استفاده می شود و یکی از عوامل محدود کننده آن، میزان اکسیژن رسانی در شیک-فلاسک می باشد. همچنین کنسرسیوم میکروبی نتوانست DBT را به عنوان منبع کربن و انرژی خود مورد استفاده قرار دهد و بدون تامین منبع کربنی ساده، رشد چندانی نداشت. بنابراین، به نظر می رسد که DBT در مسیر دیگری غیر از بی هوازی و معدنی شدن قرار گرفته و مصرف می شود که می تواند مسیر کوداما و یا مسیر شناخته نشده دیگری باشد. توالی آنزیمی تخریبی و اکسیداتیو مسیر کوداما شامل سه مرحله اصلی هیدروکسیلاسیون، برش حلقه و هیدرولیز است که تجزیه سایر ترکیبات آروماتیک مانند نفتالن و سالیسیلات و فنانتون را نیز انجام می دهد (۲۵).

این ترکیب و سهولت راهیابی اش به مسیرهای متابولیکی است. از سوی دیگر اتانول با ویژگی آب گریزی نسبی اش، می تواند به عنوان یک کمک حلال، حلالیت مشتقات تیوفن را در محیط رشد آبی سلول ها بیفزاید. علاوه بر این قیمت پایین اتانول در مقایسه با منابع کربنی دیگر از جمله گلوکز و گلیسرول می تواند به کاهش هزینه فرایند گوگردزدایی زیستی بیانجامد. رشد کنسرسیوم میکروبی دوکوهک تقریباً در دو روز اول، در فاز تاخیر بود و در روزهای سوم و چهارم رشد، فاز تکثیر سریع و لگاریتمی را پیمود و در روزهای بعد وارد فاز سکون شد. از سوی دیگر رشد آن با کاهش نسبتاً شدید pH از ۷/۲ به حدود ۴ همراه بود. این امر ناشی از تولید و تجمع اسیدهای آلی کوچک مانند اسید استیک، اسید کربنیک و غیره در حین رشد و مصرف اتانول می باشد (۱۴).

تغییر pH می تواند بر سرعت تجزیه DBT موثر باشد. پیش از این pH بهینه تجزیه زیستی DBT در مطالعات مختلف، حدود ۶ و بالاتر گزارش شده بود. در مواردی نیز در کوتاه مدت در pH برابر ۵/۵، بالاترین فعالیت گوگردزدایی DBT دیده شده بود. اما در بعضی از باکتری ها نیز تغییرات pH اثر محسوسی بر انجام گوگردزدایی نداشتند (۲۱ و ۲۳). با این وجود، بررسی دقیق تاثیر pH بر تجزیه زیستی DBT توسط این کنسرسیوم و ثابت نگه داشتن pH در حد بهینه، مطالعات بیشتری را ضمن کنترل pH مثلاً در فرمانتور می طلبد و برای بهینه سازی عملکرد این کنسرسیوم میکروبی مفید خواهد بود.

پیش از اتمام رشد کنسرسیوم میکروبی، حذف کامل DBT، به وقوع پیوسته. در گزارشات قبلی نیز این مطلب دیده شده است. به نظر می رسد که با وجود ناپدید شدن کامل DBT در محیط، بخشی از DBT در واقع وارد مسیرهای متابولیک میکروارگانسیم ها نشده و تنها با توجه به خاصیت آبگریزی خود به سطح نسبتاً هیدروفوب سلول ها وصل شده است و در مرحله استخراج متابولیت ها توسط اتیل استات نیز از قطعات سلولی جدا نشده و از آنالیز HPLC پنهان می ماند (۱۴).

تا کنون چهار مسیر متابولیک در میکروارگانسیم ها برای تجزیه زیستی DBT مورد توجه قرار گرفته است: ۱) گوگردزدایی بی

نتیجه گیری

ارزشمند نیمه صنعتی IGTS8 است. کنسرسیوم دو کوهک می تواند بیوکاتالیستی ارزشمند برای حذف آلاینده های تیوفنی باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه زیست فناوری دانشکده علوم و فنون دانشگاه تهران انجام شده و نویسندگان برای انجام این تحقیق از هیچ منبعی کمک مالی دریافت نکرده اند.

در تجزیه زیستی آلاینده های تیوفنی، که در این مطالعه به چند مورد آن پرداخته شد، علاوه بر میزان فعالیت ویژه تجزیه زیستی، گستردگی دامنه سویستراهای مورد استفاده توسط میکروارگانیسم ها نیز اهمیت دارد. با توجه به قابلیت کنسرسیوم میکروبی دوکوهک در استفاده از تیوفن و ۲-متیل تیوفن علاوه بر DBT، می توان گفت تنوع ترکیبات تیوفنی مورد استفاده این کنسرسیوم، قابل رقابت با سویه

References

1. Vogt C, Richnow HH. Bioremediation via in situ microbial degradation of organic pollutants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2014; 142: 123-146.
2. Olajire AA, Essien JP. Aerobic degradation of petroleum components by microbial consortia. *J Pet Environ Biotechnol* 2014; 5(5): 195-216.
3. Subathra MK, Immanuel G, Suresh AH. Isolation and Identification of hydrocarbon degrading bacteria from Ennore creek. *Bioinformation*. 2013; 9(3): 150-157.
4. Kropp KG, Fedorak PM. A review of the occurrence, toxicity, and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. *Can J Microbiol*. 1998; 44(7): 605-622.
5. Eastmond DA, Booth GM, Lee ML. Toxicity, accumulation and elimination of polycyclic aromatic sulfur heterocycles in *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1984; 13: 105-111.
6. Asadirad MHA, Mazaheri Assadi M, Rashedi H, Nejdassattari T. Effects of indigenous microbial consortium in crude oil degradation: a microcosm experiment. *Int J Environ Res*. 2016; 10(4): 491-498.
7. Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int*. 2011; 2011:941810. doi: 10.4061/2011/941810.
8. Papizadeh M, Ardakani MR, Motamedi H, Rasouli I, Zarei M. C-S targeted biodegradation of dibenzothiophene by *Stenotrophomonas* sp. NISOC-04. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011; 165 (3): 938-948.
9. Todescato D, Maass D, Mayer DA, Vladimir Oliveira J, de Oliveira D, Ulson de Souza S, Ulson de Souza AA. Optimal production of a *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 biocatalyst for biodesulfurization and bidenitrogenation applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 2017; 183(4): 1375-1389.
10. Tang H, Li Q, Wang Z, Yan D, Xing J. Simultaneous removal of thiophene and dibenzothiophene by immobilized *Pseudomonas delafieldii* R-8 cells. *Chinese J Chem Eng*. 2012; 20(1): 47-51.

11. Gunam IB, Yaku Y Fau - Hirano M, Hirano M Fau, Yamamura K, Yamamura K Fau, Tomita F, Tomita F Fau, Sone T, Sone T Fau, Asano K, Asano K. Biodesulfurization of alkylated forms of dibenzothiophene and benzothiophene by *Sphingomonas subarctica* T7b. J Biosci Bioeng. 2006; 101(4): 322-327.
12. Lidbury I, Krober E, Zhang Z, Zhu Y, Murrell JC, Chen Y, Schafer H. A mechanism for bacterial transformation of dimethylsulfide to dimethylsulfoxide: a missing link in the marine organic sulfur cycle. Environ Microbiol. 2016; 18(8): 2754-2766.
13. Maghsoudi S, Vossoughi M, Kheirilomoom A, Tanaka E, Katoh S. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp strain P32C1. Biochem Eng J. 2001; 8(2): 151-156.
14. Davoodi-Dehaghani F, Vosoughi M, Ziaee AA. Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. Bioresour Technol. 2010; 101(3): 1102-1105.
15. Zhang M, Hu T, Ren G, Zhu Z, Yang Y. Research on the effect of surfactants on the biodesulfurization of coal. Energy Fuels. 2017; 31(8): 8116-8119.
16. Kara Ali M, Outili N, Ait Kaki A, Cherfia R, Benhassine S, Benaissa A, Kacem Chaouche N. Optimization of Baker's yeast production on date extract using response surface methodology (RSM). Food. 2017; 6(64): 1-17.
17. Singh Y. Photosynthetic activity, and lipid and hydrocarbon production by alginate-immobilized cells of botryococcus in relation to growth phase. J Microbiol Biotechnol. 2003; 13(5): 687-691.
18. Bardania H, Raheb J Fau, Mohammad Beigi H, MohammadBeigi H Fau, Rasekh B, Rasekh B Fau, Arpanaei A, Arpanaei A. Desulfurization activity and reusability of magnetite nanoparticle-coated *Rhodococcus erythropolis* FMF and *R. erythropolis* IGTS8 bacterial cells. Biotechnol Appl Biochem. 2013; 60(3): 323-329.
19. Janosch C, Remonsellez F, Sand W, Vera M. Sulfur Oxygenase reductase (Sor) in the moderately thermoacidophilic leaching bacteria: studies in *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*. Microorganisms. 2015; 3(4): 707-724.
20. Kobayashi M, Horiuchi K, Yoshikawa O, Hirasawa K, Ishii Y, Fujino K, Sugiyama H, Maruhashi K. Kinetic analysis of microbial desulfurization of model and light gas oils containing multiple alkyl dibenzothiophenes. Biosci Biotechnol Biochem. 2001; 65(2): 298-304.
21. Luo MF, Xing JM, Gou ZX, Li S, Liu HZ, Chen JY. Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii* R-8 in the presence of dodecane. Biochem Eng J. 2003; 13(1): 1-6.
22. Yan H, Kishimoto M, Omasa T, Katakura Y, Suga K, Okumura K, Yoshikawa O. Increase in desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 using ethanol feeding. J Biosci Bioeng. 2000; 89(4): 361-366.

23. Rashtchi M, Mohebbali GH, Akbarnejad MM, Towfighi J, Rasekh B, Keytash A. Analysis of biodesulfurization of model oil system by the bacterium, strain RIPI-22. *Biochem Eng J.* 2006; 29(3): 169-173.
24. Hunt JM. *Petroleum geochemistry and geology.* 2nd ed. New York, W.H. Freeman & Co Ltd; 1979.
25. Piccoli S, Andreolli M Fau, Giorgetti A, Giorgetti A Fau, Zordan F, Zordan F Fau, Lampis S, Lampis S Fau, Vallini G, Vallini G. Identification of aldolase and ferredoxin reductase within the dbt operon of *Burkholderia fungorum* DBT1. *J Basic Microbiol.* 2014; 54(5): 464-469.



Biodegradation of thiophenic contaminants by the consortium isolated from Fars province

Fatemeh Davoodi Dehaghani¹, Mohammad Barshan-tashnizi²

¹Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Assistant Professor, Department of Life Sciences Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran. Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Today, soils and waters polluted by petroleum compounds are major environmental problems. A major part of the harmful effects of oil is due to thiophenic compounds such as dibenzothiophene and other sulfur derivatives, with increasing evidence of toxicity, carcinogenicity and their relative sustainability in nature. The purpose of this study was to investigate the possibility of biodegradation of these pollutants by microorganisms that have spread over the years in the presence of gas oil.

Materials & Methods: In order to study the feasibility of dibenzothiophene usage by isolated microbial consortia, firstly, appropriate growth medium with dibenzothiophene as the sole sulfur source was made and the biomass of the microorganisms was chased for 10 days. In order to estimate the metabolic degenerative pathway of this compound, 2-Hydroxybiphenyl was tracked in the selective consortium growth medium. Finally, the effect of the consortium on thiophene, 2-methylthiophene and thiophene-2-carboxylic acid was investigated, as well.

Results: Increasing biomass and eliminating dibenzothiophene in the presence of a microbial consortium and the absence of 2-Hydroxybiphenyl showed the consortium's ability to degrade this compound, but with a biochemical pathway other than 4S. The consortium was able to take thiophene and 2-methylthiophene, as well.

Conclusion: The biodegradation activity and the scope of the substrates in comparison with conventional microorganisms suggest this consortium as a valuable biocatalyst for the decontamination of thiophenic contaminants.

Keywords: Biodegradation, Thiophene, Microbial consortium, Gas oil.

Correspondence to: Fatemeh Davoodi Dehaghani

Tel: +98 2144600182

E-mail: fat.davoudi@iauctb.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(2): 177-187.