جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده فنل و بررسی سینیتیک رشد آن ها از خاک های کشاورزی اطراف پالایشگاه شیراز

مرتضی خانی[1*]،مهدی زارعی[2]،سارا استواری[1]

[1]گروه زیست شناسی،دانشگاه ازاد اسلامی،واحد جهرم،جهرم

[2] گروه زیست شناسی،دانشگاه ازاد اسلامی،واحد کازرون،کازرون،ایران

Mortezakhani1365@gmail.com

چکیده

مقدمه و هدف: فنل یک ساختار پایه ای دارد که بطور گسترده ای در ترکیبات آلی سنتزی استفاده می شود. این ترکیبات شامل مواد شیمیایی کشاورزی و حشره کش ها می باشد.ترکیبات فنلی سمیت فوق العاده ای برای بیشتر میکروارگانیسم ها, گیاهان, ماهی ها و جانوران دارد. بنابراین حذف آن از محیط ضروری می باشد. فرآیندهای فیزیکوشیمیایی یکی از روش های حذف فنل می باشد که به دلیل پرهزینه بودن و تولید ترکیبات فرعی خطرناک مناسب نمی باشد. بهترین روش برای حذف فنل روش حذف زیستی می باشد که ارزانتر ومنجر به حذف کامل آن می شود.هدف از این پژوهش جدا سازی وشناسایی باکتری های تجزیه کننده فنل از بیمارستان مطهری مرودشت وتعیین رشد باکتریهای جدا شده در غلظت های مختلف فنل توسط مطالعه ی جذب نوری آنها می باشد.

روش کار:نمونه برداری از خاک های کشاورزی اطراف پالایشگاه شیرازگرفت. جداسازی باکتری های تجزیه کنندهی فنل به وسیله ی کشت نمونه ها در محیط پایه ی نمکی نوترین براث و MSMآگار انجام شد.با کشت باکتری های ایزوله در غلظت های 0/5، 7/، 0/9، 1 و1/2 گرم برلیتر فنل توانایی رشد باکتری ها ارزیابی گردید.هدف از این پژوهش جدا سازی وشناسایی باکتری های تجزیه کننده فنل از صنایع غذایی پالایشگاه شیرازو بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها می باشد.

یافته ها:مهمترین باکتری های تجزیه کننده ی فنل جداشده از خاک های کشاورزی اطراف پالایشگاه شیرازسودوموناس، اشرشیا کلی،استافیلوکوکوس، انتروکوک و اسینتوباکتر بودند. همه ی باکتری های جدا شده قدرت تجزیه ی بالایی در حذف فنل از خود نشان دادند. به طوری که سودوموناس و اشرشیا کلی قادر به تجزیه ی 1200 میلی گرم بر لیتر فنل به میزان 100٪ و94٪ در مدت یک هفته را داشتند.

نتیجه گیری: یافته های این پژوهش نشان می دهد،باکتری ها ی سودوموناس واشرشیاکلیبه تریتب 100 درصد و 87 درصد فنل را در مدت یک روز تجزیه می کنند.

واژگان کلیدی: فنل، تجزیه‌ی زیستی، سودوموناس، اشرشیا کلی، پالایشگاه شیراز ،

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه:

آب مایه حیات و در سطح زمین به وفور یافت می شود.۹۷٪ از این آب‌ها در دریا ها و اقیانوس ها متمرکز هستند و حدود ۲٪ نیز به صورت یخ و یخچال‌ها در مناطق قطبی تجمع یافته‌است. از یک درصد آب باقی‌مانده نیز بخش زیادی در اعماق زمین بوده و استخراج آن مشکل و از دسترس انسان خارج می باشد. با توجه به افزایش روز افزون جمعیت، توسعه صنایع و افزایش آلودگی منابع آب شیرین تصفیه آب فاضلاب به منظور استفاده مجدد آن امری ضروری به نظر می رسد.

تولید فنل از سال 1860 آغاز شد و تا پایان قرن 19 در علوم صنعتی مختلف کاربردهای زیادی پیداکرد. فنل در سنتز رنگ ها، آسپرین وبه طور فراوان در مواد منفجره استفاده می شود. این ترکیب آلی می تواند با آلدهید(به عنوان مثال متانول) فشرده شود و ترکیبات صمغی را بسازد. تولید صمغ از فنل یک فرآیندی است که تا به امروز از آن استفاده می شود. فنل متانول(فرمالدهید)صمغ های هستند که پایه پلاستیک های قدیمی را می سازد. این صمغ ها ارزان تر و در پلاستیک های مقاوم به حرارت مثل ملامین و تجهیزات برقی استفاده می شود. این صمغ ها بطور وسیعی به عنوان عوامل چسبنده در کارخانه های تولید چوب و تخته های چند لا استفاده می شود. فنل بطور گسترده ای به عنوان یاور در درمان موضعی تومور های استخوان استفاده می شود. کارآمدترین روش محافظتی بعد از شستشوی با فنل به عنوان یاور شستشوی حفره استخوان با اتانول است. فنل 3 %توانایی کشتن سلول های سرطانی را در محیط in vitroدارد(Verdegaal*et al*., 2012).

فنل یک ترکیب آروماتیکی است که در فاضلاب تعداد زیادی از صنایع مثل پلایشگاه نفت، پتروشیمی، کارخانه پلاستیک، مواد رنگی، دارویی، تولید صمغ و قطران زغال سنگ وجود دارد(Movahedyan*et al*.,2009). فنل در فاضلاب های پتروشیمی، رنگ سازی و در صنایع خمیر و کاغذ وجود دارد. ترکیبات فنلی در غلظت های بالاتر از 2 میلی گرم بر لیتر برای ماهی ها سمی است(Andrade *et al*.,2006). در کارخانه های تولید کننده صمغ های فنلی از بیس فنلA، کارپالاکتم، آلکیل فنل استفاده می شود. و در کارخانه های رنگ سازی فنل به عنوان یک عامل ضد حشره کش و ضد عفونی کننده به کار می رود. فنل به عنوان یک محافظ در صنعت دارویی و همچنین در ساختن مواد منفجره نیزاستفاده می شود. در فرآورده های پنبه نسوز، در محافظت از چوب، تولید رزین، پارچه ها، عطریات و پلاستیک ها نیز کارایی دارد.

فنل و ترکیبات فنلی در فاضلاب مواد نفتی و پالاشگاه نفتوجود دارد و در صنایع دارو سازی، خمیر و کاغذ، زغال سنگ، دباغی و ریخته گری نیز به صورت وسیعی استفاده می شود(Marrot*et al*.,2005). بنابراین

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ترکیبات فنلی به دلیل عوارض متنوعی که دارند باید از فاضلاب صنایع حذف شود.روش های متنوعی برای حذف فنل وجود دارد که به دوصورت فیزیکوشیمیایی و زیستی می باشد. فرآیندهای فیزیکو شیمیایی شامل فرآیند هیبرید, تجزیه کاتالیتیکی, جذب در ماتریکس های مختلف, اکسایش شیمایی و استخراج در حلال می باشد. مشکلات این روش هابه دلیل پرهزینه بودن و تولید ترکیبات فرعی خطرناک مناسب نمی باشد. بهترین روش برای حذف فنل روش حذف زیستی می باشد که ارزانتر ومنجر به حذف کامل آن می شود (Chakraborty*et al*., 2008))

روش کار:

نمونه برداری:

نمونه برداری با ظروف کاملا استریل و در طی دو فصل پاییز و زمستان انجام شد. در هر بار نمونه گیری 9 نمونه از تصفیه خانه صنایع غذایی پالایشگاه شیرازجمع آوری شد(از هر ایستگاه 3بار نمونه برداری شد). نمونه ها کمتر از مدت زمان 2 ساعت و در فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

نمونه برداری و شمارش باکتری ها:

پس از انتقال نمونهها بهآزمایشگاه شمارش باکتریها بااستفاده از روش (Total viable plate count)صورت گرفت. در این روش از نمونه های خاک به وسیله ی سرم فیزیولوژی رقت 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه و در محیط نوترینت آگار حاوی 0/2 گرم برلیتر فنل و نوترینت آگار بدون فنل کشت سطحیداده شد (surface plate). پس از 48–24 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. تعداد کلنی ها در محیط کشت حاوی فنل و بدون فنل شمارش شد(Udeaani*etal*., 2009).

جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده ی فنل از پالایشگاه شیراز:

بعد از یک هفته 10میلی لیتراز این محیط کشت به 90 میلی لیتر محیط جدید فنل براث تلقیح شد و به مدت یک هفته در دمای 30 درجه و با هوادهی قرار داده می شود. ودر نهایت با استفاده از لوپ باکتری ها را از محیط فنل براث برداشته به صورت استریک در محیط فنل آگار کشت داده شد.برای شناسایی باکتریهای جدا شده از نمونه های خاک کشاورزی از تست های اولیه ی زیر استفاده شد:رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی آلبرت،

رشد در شرایط هوازی/ بی هوازی، تولید اسپور، تولید گرانول های متاکروماتیک، رنگ آمیزی کپسول، مورفولوژی، حرکت، اکسیداز وکاتالازمحیط های تشخیصی شامل:TSI، SIM، LD/OD، MacConkey، سیمون سیترات ، اوره آز، اکسیداسیون / فرمانتاسیون(O/F)، تولید اسید از گلوکز

بررسی توانایی حذف فنل توسط باکتری ها:

برای بررسی توانایی حذف فنل توسط باکتریهااز محیط پایهی نمکی فنل براث با غلظتهای مختلف فنل استفاده میشود.برای هر باکتری9 لوله در نظر گرفته می شودو غلظت های فنل را از1/2-0/5 به ترتیب به لولهها اضافه می شود.باکتریها به مدت یک هفته هوادهی منظم در انکوباتور با دمای 30 درجه کشت داده شدندو بعد از یک هفته لولهها مورد بررسی قرارگرفتند(Lafuent and Cowan., 1998).

سنجش حذف فنل توسط باکتری های جدا شده:

جهت ارزیابی حذف فنل توسط باکتری های تجزیه کننده روش گیبس به کار رفت.در این روش معرف 2,6-Dichloroquinune-4- Chloramidبا فنل واکنش داده و یک ترکیب آبی ایجاد می کند،استفاده می شود.(Rhee*et al*., 2005;Watanab*et al*., 1996; Quintana*et al*., 1997)

آزمون گیبس

محلول معرف گیبس شامل 2,6-Dichloroquinon-4-chloromideدر یک میلی لیتر اتانول مطلق می باشد.مقدار 5ml از محلول رویی محیط کشت در یک لوله آزمایش ریخته و pH آن با کربنات سدیم 10% به 8 رسانده شد.سپس 25میکرو لیتر معرف گیبس اضافه و مخلوط گردید.محلول حاصل به مدت 30-25 دقیقه در در انکوباتور 30درجه قرار گرفت تا رنگ آبی ظاهر شود.محلول را سانتریفوژکرده (5000-4000دور به مدت 10 دقیقه)سپس طول موج آن در 630 نانومتر خوانده شد.و با تطبیق آن با منحنی استاندارد مقدار تقریبی حذف فنل به دست می آید(Rhee*etal*.,2005; Quintana*etal*., 1997).

تعیین رشد باکتریهای جدا شده در غلظت های مختلف فنل توسط مطالعهی جذب نوری آنها:

در این روش بهترین سویههای تجزیه کنندهی فنل از بین باکتریهای تجزیه کنندهی فنل با مطالعه جذب نوری آنها جداسازی میشود.روش کار به این صورت است که در ارلن های جداگانه به میزان 20 میلی لیتر

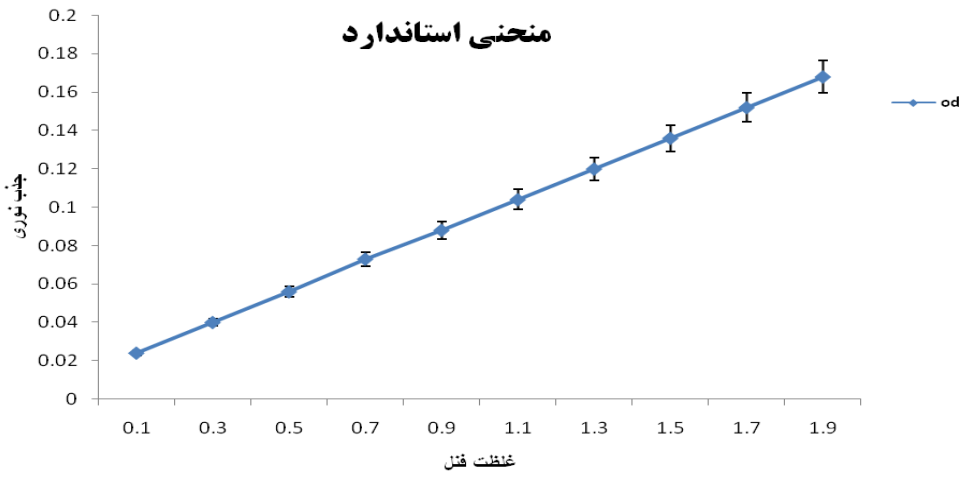
محیط کشت فنل براث(با غلظت های مختلف فنل)ریخته می شود سپس بـه میـزان5 mlمحـیط کشـت حـاوی باکتری به هر کدام اضافه می گرددبرای هر باکتری6 ارلن در نظر گرفته می شود.و در هرارلن غلظت هـای0/5-1/2 گرم بر لیتر فنل اضافه می شود.برای هر باکتری به صورت یک ارلن شـاهد در نظـر گرفتـه شـد.در محـیط شاهد تنها محیط کشت پایه بدون فنل با سویه ی مشخص وجود دارد. محیط ها به مدت 24 سـاعت در دمـای 30 درجه انکوبه و سپس جذب آنها در 600 نانومتر خوانده می شود(Kouday andRuzicka., 2011).

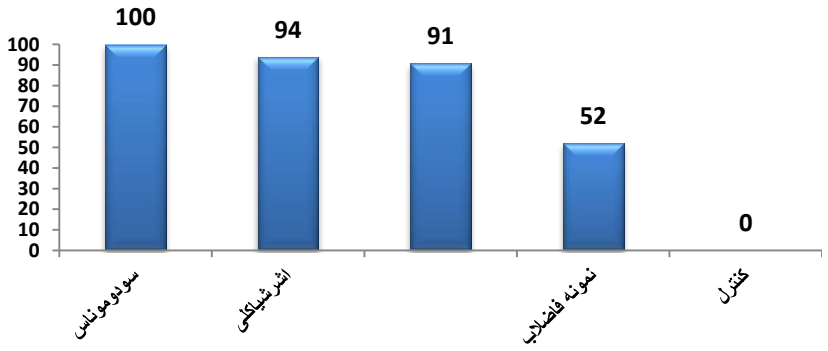
شناسایی باکتریهای تجزیه کنندهی فنل:

باکتری های تجزیه کننده ی فنل از خاک های کشاورزی اطراف پالایشگاه شیرازجداسازی گردید و ایـن بـاکتری ها عبارتند از: سودوموناس،اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس ،انتروکوک و اسینتوباکتر می باشد.

بررسی میزان تجزیه

ابتدا نمودار استاندارد فنل رسم شد(شکل3). و سپس میزان تجزیه فنل توسط سویه های ایزوله شده طی یک هفته مورد بررسـی قـرار گرفت(شـکل4). باتوجـه بـه نمـودار بیشـترین میـزان تجزیـه مربـوط بـه سـویه سودوموناس می باشد که 100درصد فنل را تجزیه کرد و بعد از آن بیشترین میزان تجزیه به ترتیب مربـوط بـه باکتری های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس ،انتروکوک و اسینتوباکترمی باشد. تجزیه مخلوط باکتریایی نشـان مـی دهد که باکتری های نسبت به یک دیگر اثر مهاری دارند.



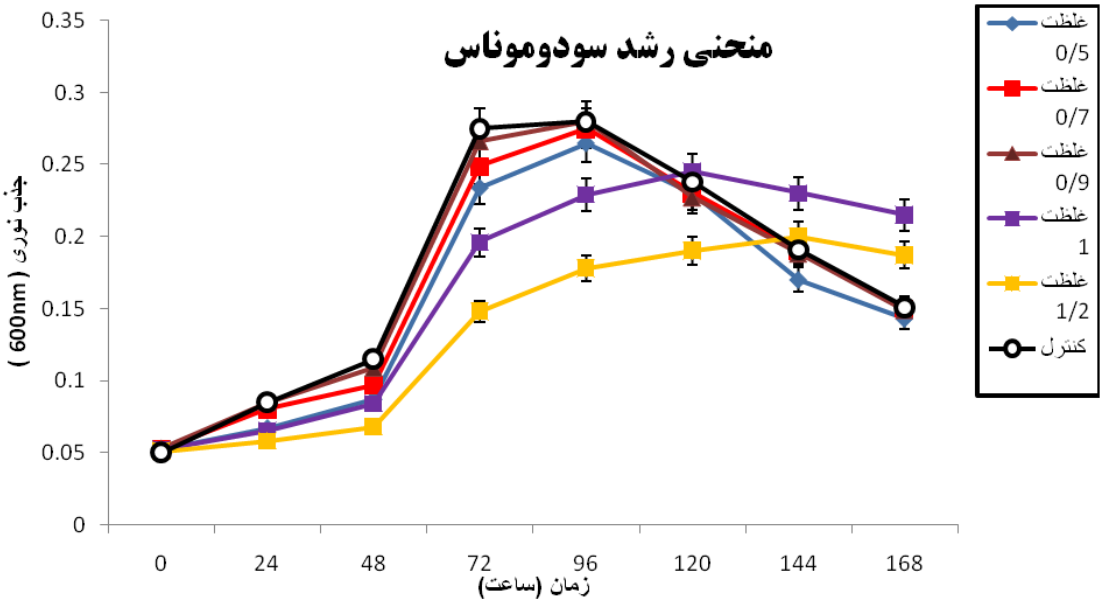


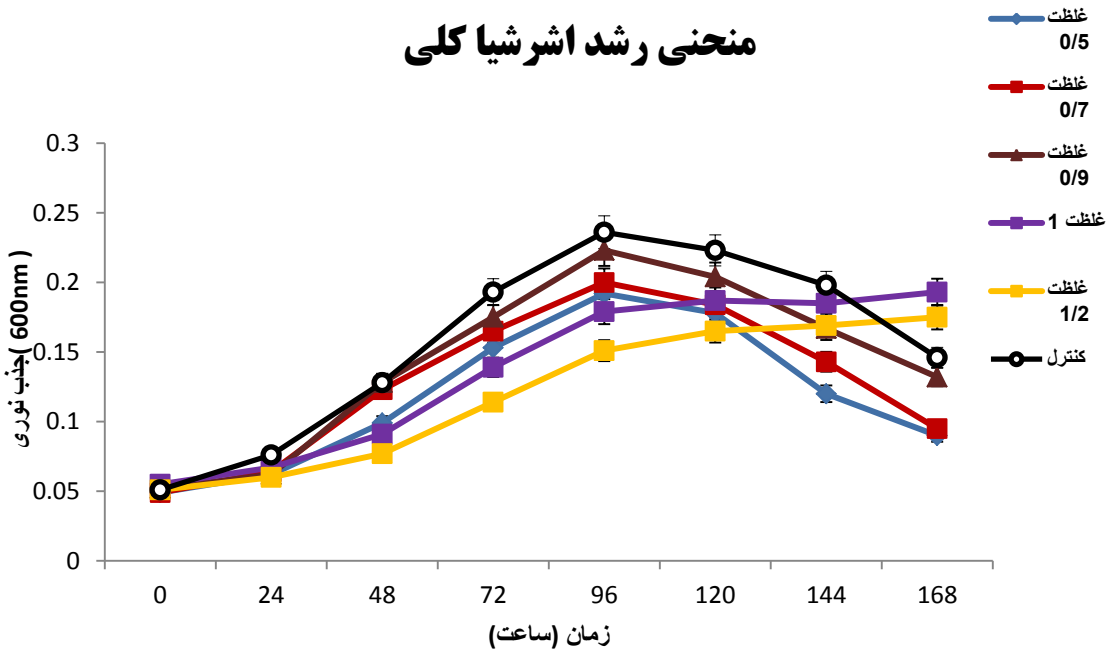
شکل 4 درصدحذف فنل توسط باکتری هاهاباکتری ها

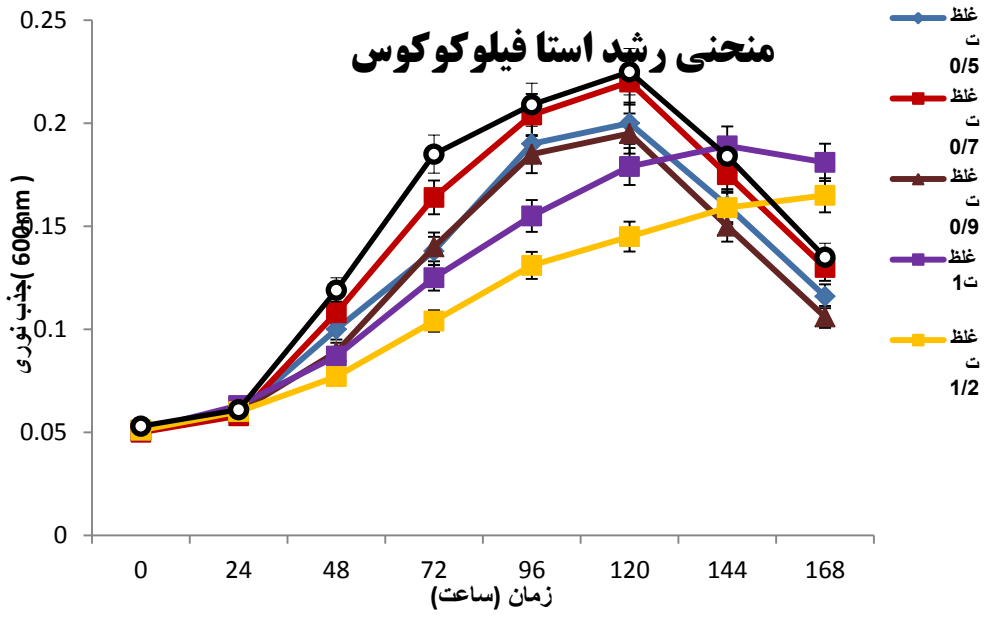
بررسی سینیتیک رشد:

بهترین میزان رشدسودوموناس در غلظت 0/9 گرم بر لیتر فنل، با جذب نوری 0/267 می باشد(شکل 5)و

بهترین میزان رشداشرشیاکلی در غلظت 0/9 گرم بر لیتر فنل، با جذب نوری 0/223 می باشد(شکل6) و بررسی منحنی رشد استافیلوکوکوس بهترین میزان رشداستافیلوکوکوس در غلظت 0/7 گرم بر لیتر فنل، با جذب نوری 0/220 می باشد(شکل7).


منحنی رشد سودوموناس
جذب نوری (600nm)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0
24
48
72
96
120
144
168
زمان (ساعت)
غلظت 0/5
غلظت 0/7
غلظت 0/9
غلظت 1
غلظت 1/2
کنترل


منحنی رشد اشرشیا کلی
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
جذب نوری (600nm)
0
24
48
72
96
120
144
168
زمان (ساعت)
غلظت 0/5
غلظت 0/7
غلظت 0/9
غلظت 1
غلظت 1/2
کنترل


منحنی رشد استا فیلوکوکوس
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
جذب نوری (600nm)
0
24
48
72
96
120
144
168
زمان (ساعت)
غلظت 0/5
غلظت 0/7
غلظت 0/9
غلظت 1
غلظت 1/2

بحث:

Movahedyan و همکاران در سال (2009) باکتری های تجزیه کننده فنل در لجن فعال را با استفاده از تکنیک PCR شناسایی کردند. از 10ایزوله، 6ایزوله به عنوان سودوموناس پوتیدا تعیین شد. و بهترین باکتری تجزیه کننده فنل سودوموناس پوتیدا بود که مقدار 500-600 میلی گرم بر لیتر فنل را بعد از 48ساعت تجزیه کرد.Soudai و Kolachiدر سال (2011) باکتری *Rhodococcuserytropolis*SKO-1 را ازخاک های آلوده در اطراف پالایشگاه نفت در تهران جدا کردند. این باکتری در مدت 56 ساعت غلظت اولیه 1000mg/l فنل را به میزان تقریبی 99/64٪ تجزیه کرد. و بیشترین تجزیه زیستی فنل را در دمای 30 درجه سانتی گراد بدست آوردند.

Yangو VanSchie در سال(1998) سه میکروارگانیسم احیاء کننده نیترات که توانایی حذف فنل را داشتند از رسوبات سه ناحیه مختلف شامل رودخانه شرقی در نیویورک، جنگل نارنجی فلوریدا و جنگل پر باران در کاستاریکا جدا کردند. این سه سویه از طریق آنالیز اسیدهای چرب آن ها شناسایی نشدند اما از طریق انالیز 16srRNA این سویه های شناسایی شدند و رابطه نزدیکی با اعضای جنس *Azoarcus* داشت.

Abed-EL-Halee و همکاران در سال (2002), 12 باکتری تجزیه کننده فنل به وسیله تکنیک غنی سازی در پلیت فنل آگارجدا کردند و بر اساس 16srRNA آن ها اکثر باکتریها ی جدا شده مربوط به زیر گونه پرتوباکتریا می باشد. چهار تا از این 10 باکتری رابطه نزدیکی با جنس *Acinetobacter* داشت. و با استفاده از انگشت نگاری مولکولی نیز مشخص شد که این سویه ها از مکان های مختلفی جمع آوری شده است.

Ajaz و همکاران در سال (2004) باکتریهای مقاوم به فنل را از اطراف ریزوسفر گیاهان جدا کردند. چهار تا از سویه های جدا شده متعلق به جنس های *Staphylococcus,Coynebactrerium, BacillusandProteus* بود. و این ها باکتری ها مقاوم به 15mmفنل بودند آن ها از سویه های جدا شده ژن های پلاسمیدی مقاوم به فنل را جدا کردند. و پلاسمید جدا شده را به سویه های فاقد آن وارد و مشاهده کردند این سویه ها به فنل مقاوم هستند.

نتیجه گیری:

نتایج پژوهش نشان می دهد طیف وسیعی از باکتری ها گرم منفی توانایی تجزبه فنل را دارد. و با بررسی تجزیه سویه های ایزوله شده طی یک هفته، میزان توانایی باکتریها در تجزیه فنل مورد بررسی قرار گرفت. و بیشترین میزان تجزیه مربوط به سویه سودوموناس می باشد که 100درصد فنل را تجزیه کرد و بعد از آن بیشترین میزان تجزیه به ترتیب مربوط به باکتری های اشرشیا کلی(94٪)، استافیلوکوکوس(91٪)، می باشد. نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن است، ایزوله های تجزیه کننده ی فنل غالبا در غلظت 900میلی گرم برلیتر فنل ، به خوبی رشد می کنند. سویه های سودوموناس و اشرشیا کلی در غلظت900 میلی گرم بر لیتر

رشد فزاینده ی داشته و در غلظت1200میلی گرم بر لیتر اثرات سمی فنل باعث کاهش رشد و کـاهش تحمـل این باکتری ها می شود.

منابع:

1- Verdegal S H M, Hartigh J D, Hogendoorn P CW, Brouwers H F G, Taminiau A H M. 20212, Phenol levels during Intralesional curettage And Local Adjuvant Tretment Of Benign And Law Malignant Bone Tuomours. Clinical Sarcoma Reserch, 2: 1-10.

2- Movahedyan. H., Khorsandi. H., Salehi. R., Nikaeen. m\M, Detection of Phenol Degrading Bacteria and Pseudomonas Putida in Activeted Sludge by Polymerase Chain Reaction, Iran. J. Environ, Healh. Sci. Eng(2009)., 6(2):115-220.

3- Andrae L S, Laurindo E A, Deolivira R V, Rocha-Filho R C, Cass Q B. 2006. Development OF A HPLC Method To Follow The Degrading OF Phenol By Electrochemical or Photo Electrochemical Tretment. J. Braz. Chem. SoZ 17: 396-373.

4- Marrot.B., Barrios-Martinez. A., Moulin. P.,Roche. N, Biodegradation of High Phenol Phenol Concentration by Activated Sludge in an Immersed Membran Bioreactor, Biochemical EngneeringJournal(2006)., 30:174-183.

5- Chakraborty.S.,Bhattacharya.T., Patel. T. N., Tiwar, K. K, Biodegradation of Phenol by Native Microorganisms Isolated from Coke Processing Wastewater, Journal of Environmental Biology(2010).,31:293-296.

6- Rozich A F, Colvin R J. 1985. Effects of glucose on phenol biodegradation by heterogeneous populations.Biotechnol. Bioeng, 28:965-971.

7- Soudi. M. R., Kolahchi. N, Bioremediation Potential of a Phenol Degrading bacterium Rhodococcuserythropolis SKO_1, Progress in Biological Sciences(2011).,1(1):31-40.

8-Yang C F, Lee C M. 2007.Enrichment, Isplation and Characterization OF Phenol-degrading Pseudomonas Resinovorans Strain P-6. International BiodeteriorationAndBiodegradtion 59: 206-210.

9-Van Schie.P, M., Yang. L.1998. Isolation and Charachterization of Phenol-Degrading Denitrifing Bacteria, Apple Environ Microbial(1998)., 64(7), 2432-2438.

10-Ajaz.M., Noor. N., Rasool. S.A., Khan. S. A. Phenol Resistant Bacteria from Soil: Identification-Characterization and Genetical Studies, Pak. J. bot(2004)., .36(2):415-424

11-Andrae L S, Laurindo E A, Deolivira R V, Rocha-Filho R C, Cass Q B. 2006. Development OF A HPLC Method To Follow The Degrading OF Phenol By Electrochemical or Photo Electrochemical Tretment. J. Braz. Chem. SoZ 17: 396-373.

12-Abd-el-haleem. D., Moawad. H., Zaki. E. A ., Zaki, Molecular Characterization of Phenpl-Degrading Bacteria Isolated from Different Egyptian Ecosystems., MicrobEcol(2002)., 43:217-224.

13- Rozicka A F, Colvin R J. 1985. Effects of glucose on phenol biodegradation by heterogeneous populations.Biotechnol.Bioeng, 28:965-971.

14-Khodai L, Bamdad S, Dalazar A, Nazemiyeh H. 2012. Antioxidant, Total Phenol And Flavonoid Contents OF Two *Pedicularis* L Species From EsternAzarbaijan, Iran. BioImpacts, 2: 47-53.