

بهبود حذف فنل در پساب‌های شور به کمک باکتری تثبیت شده

زینب ونک^۱، صدیقه اسد^{۲*}، سید محمدمهدی دستغیب^۳

۱- کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

*صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵، تهران، ایران
asad@ut.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۷

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۴

چکیده

فنل‌ها ترکیبات آلی و بسیار سمی هستند که با توجه به کاربرد گسترده، معمولاً در پساب صنایع مختلف یافت می‌شوند. اثر بازرندگی فنل در غلظت‌های بالا و همچنین شوری بالای پساب‌های صنعتی، یک چالش جدی برای تصفیه پساب توسط میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. یکی از رایج‌ترین رویکردها جهت غلبه بر این مشکل، تثبیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده فنل می‌باشد. هدف از این مطالعه، مقایسه حذف فنل یک باکتری بومی تحمل‌کننده نمک از جنس *Janibacter* به صورت آزاد و تثبیت شده است. به این منظور، فرایند تثبیت باکتری روی بستر میکا انجام شد و کارایی تثبیت به روش پروتئین سنجی محاسبه شد. همچنین، حذف فنل توسط سلول آزاد و تثبیت شده مقایسه شد و اثر پارامترهای مختلف بر میزان حذف فنل برر سی شد. بر اساس اندازه‌گیری غلظت پروتئین، کارایی تثبیت روی میکا، ۶۸/۷۵ درصد به دست آمد. مدت زمان حذف ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل توسط سلول‌های آزاد ۸۸ ساعت و سلول‌های تثبیت شده روی میکا، ۴۰ ساعت اندازه‌گیری شد. سلول‌های تثبیت شده، برخلاف سلول‌های آزاد قادر به حذف فنل در دماهای پایین تا ۱۶ سانتی‌گراد، غلظت نمک بیش از ۷/۵ درصد و pH‌های کمتر از ۷/۵ و بیش از ۸/۵ بودند. نتایج مشابهی مبنی بر عملکرد بهتر سلول‌های تثبیت شده در مطالعات دیگر نیز به دست آمده است. طبق نتایج، فرایند تثبیت برای محافظت از سلول‌ها در برابر اثرات سمی فنل، کارایی حذف فنل سلول‌ها را به طور چشمگیری افزایش می‌دهد و آن‌ها را نسبت به شرایط سخت محیطی مقاوم می‌سازد.

کلید واژگان: تثبیت باکتری، حذف فنل، *Janibacter* میکا

۱-مقدمه

ترکیبات فنلی اغلب در پساب‌های صنایع مختلف مانند پتروشیمی، چرم، نساجی، داروسازی و رنگ یافت می‌شوند. فنل‌ها دسته‌ای از ترکیبات آلی هستند که حتی در غلظت‌های کم برای میکروب‌ها، گیاهان، حیوانات و انسان‌ها، سمی هستند [۱]. به همین دلیل، حذف فنل از پساب، قبل از تخلیه به محیط زیست، توسط آژانس حفاظت از محیط‌زیست ایالات متحده، در اولویت قرار دارد [۲]. ترکیبات آروماتیک در میان پساب‌های شور صنعتی از جمله پالایشگاه‌های نفت، سایت‌های فرآوری مواد غذایی و صنایع چرم‌سازی، فراوان هستند و می‌توانند غلظت‌هایی از میلی‌گرم در لیتر تا گرم در لیتر، در صنایع مختلف، داشته باشند. برای فرآیندهای تصفیه پساب صنعتی، یافتن سویه‌های نمک‌دوست یا تحمل‌کننده نمک که بتوانند ترکیبات آروماتیک خاص موجود در پساب را تجزیه کنند، بسیار مهم است [۳]. از معایب سیستم‌های تصفیه فنل مبتنی بر میکروارگانیسم‌ها، سمیت فنل برای سلول‌های باکتریایی می‌باشد، که اغلب موجب مهار فعالیت‌های حیاتی باکتری‌ها و در نتیجه کارایی پایین حذف فنل می‌شود. علاوه بر این، محدودیت‌های دیگری نیز برای استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تصفیه پساب‌های فنلی از جمله حساسیت و عدم تحمل شرایط محیطی و همچنین مشکلات بازیابی و استفاده مجدد، وجود دارد [۴]. اخیراً تثبیت میکروارگانیسم‌ها برای غلبه بر این مشکلات نتایج مثبتی را در پی داشته است. تثبیت به دام انداختن یا اتصال سلول یا ذرات در یک بستر را توصیف می‌کند [۵]. این روش مزایای بسیاری از جمله؛ محافظت از سلول‌های باکتریایی در برابر استرس ناشی از شرایط سخت محیطی، جلوگیری از شستشوی سلول‌ها در فرآیند مداوم تصفیه، کاهش هزینه از طریق بازیافت و تأمین تراکم بالاتر سلول‌های باکتریایی با ظرفیت حذف بالا را فراهم می‌کند [۶].

میکروارگانیسم‌های مختلفی از جمله *Sphingomonas* sp., *Bacillus* sp., *Candida tropicalis*, *Acinetobacter* sp. و *Pseudomonas* sp. تثبیت شده در بسترهایی از جنس سدیم آلزینات، پلی‌وینیل الکل، ژل متخلخل کربنی و فوم پلی‌اورتان جهت حذف فنل، در مطالعات گوناگون مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۴، ۷-۹]. تثبیت میکروارگانیسم‌ها برای حذف آلاینده‌های مختلفی از جمله رنگ‌های آزو و آفت‌کش‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفته و نتایج مثبتی به دست آمده است [۱۰-۱۲]. اما، مطالعات کمی در زمینه استفاده از میکروارگانیسم‌های تثبیت شده برای حذف آلاینده از پساب‌های شور وجود دارد [۱۳].

باکتری مورد استفاده در این مطالعه، سویه‌ای از جنس *Janibacter* بود که از آب مخزن میدان نفتی یادآوران جداسازی شده و ۹۹/۱۱ درصد به گونه *Janibacter cremeus* شباهت داشته است که یک کوکوس گرم مثبت و هوازی اختیاری بوده و از رسوب دریا جدا سازی شده است [۱۴]. این باکتری تجزیه‌کننده فنل، تحمل‌کننده نمک بوده و بهینه رشد آن در محیط دارای ۵ درصد نمک می‌باشد [۱۵]. سویه‌ای از این جنس که توانایی حذف پتاکلروفنل را در شرایط شوری داشته، در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است [۱۶]. همچنین گزارشی از سویه‌ای از این جنس که قادر به حذف ترکیبات پلی‌آروماتیک مانند فنانترن، پیرن، آنتراسن بوده است، موجود می‌باشد [۱۷].

در مطالعه حاضر، از میکا جهت تثبیت باکتری استفاده شد. میکاها، گروهی از مواد معدنی آلومینو سیلیکات هستند که با ساختار پیچیده چندلایه و آرایش چهار وجهی لانه زنبوری $Si(A1)O_4$ با بار منفی، به عنوان بستری برای تثبیت استفاده می‌شوند [۱۸]. تاکنون از این بستر برای تثبیت آنزیم استفاده شده است و گزارشی از تثبیت سلول روی این بستر در دسترس نیست [۱۹]. هدف از این مطالعه، مقایسه میزان حذف فنل توسط سلول‌های *Janibacter* sp. در شرایط آزاد و تثبیت شده و بررسی اثر فاکتورهای فیزیوشیمیایی بر حذف فنل بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

فنل (با خلوص >99 درصد) و نمک سدیم کلرید از شرکت دکتر مجللی و سایر مواد از برند مرک تهیه شدند. میکا از پژوهشگاه صنعت نفت تحویل گرفته شد. بستر میکا پیش از استفاده، به کمک الک با مش ۱ میلی‌متر، غربال و سپس شسته شد.

۲-۲ میکروارگانیزم و شرایط کشت

باکتری *Janibacter* sp. با شماره دسترسی PBCC 1262 از بانک میکروارگانیزم‌های پژوهشگاه صنعت نفت تهیه شد. این باکتری در محیط نوترینت براث در دمای ۳۰ سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه کشت داده شد. از محیط پایه معدنی متشکل از (در هر لیتر): KH_2PO_4 : ۲ گرم، Na_2HPO_4 : ۱/۳ گرم، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: ۰/۱ گرم، NaCl : ۵۰ گرم و ۱ میلی‌لیتر از محلول عناصر کم‌مقدار^۱ (MnCl_2 : ۰/۱ گرم در لیتر، ZnCl_2 : ۰/۱۷ گرم در لیتر، CuCl_2 : ۰/۴۳ گرم در لیتر، CoCl_2 : ۰/۰۶ گرم در لیتر و Na_2MoO_4 : ۰/۰۶ گرم در لیتر) و فنل به عنوان منبع کربن، جهت بررسی حذف فنل استفاده شد.

۲-۳ تثبیت باکتری

از بستر میکا جهت تثبیت باکتری استفاده شد. به این منظور، باکتری در ۲۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث ($\text{OD}_{600}=0/1$ پس از تلقیح) در دمای ۳۰ سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه کشت داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت ($\text{OD}_{600}=1/5$)، سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۸۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلول‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث مخلوط و روی ۱ گرم بستر استریل ریخته شد و در انکوباتور با دمای ۳۰ سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. پس از گذشت ۴۸ ساعت، بستر تثبیت شده، ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی

(سدیم کلرید ۰/۹ درصد) شستشو داده شد و سپس به محیط معدنی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، منتقل شد [۸].

۲-۴ تعیین کارایی تثبیت

جهت تعیین کارایی تثبیت، سنجش غلظت پروتئین به روش لوری، انجام شد. جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین در بستر تثبیت شده، ۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به هر گرم بستر تثبیت شده اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه ورتکس شد. پس از انجام سانتریفیوژ، سلول‌ها به همراه بافر لیز (بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و $\text{pH}=7$ و سدیم کلرید ۵۰۰ میلی‌مولار) به مدت ۵ دقیقه تحت سونیکاسیون قرار گرفتند و مجدداً سانتریفیوژ شدند. از مایع‌رویی جهت انجام سنجش لوری استفاده شد. از بستر تثبیت نشده نیز به عنوان شاهد استفاده شد. غلظت پروتئین سلول‌های آزاد بدون بستر نیز اندازه‌گیری شد [۲۰]. کارایی تثبیت با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{کارایی تثبیت} = \frac{\text{غلظت پروتئین در نمونه همراه بستر}}{\text{غلظت پروتئین در نمونه بدون بستر}} \times 100$$

۲-۵ بررسی حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت

شده

به منظور بررسی حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده، سلول‌های آزاد رشد کرده در محیط نوترینت براث ($\text{OD}_{600}=1/5$) و ۱ گرم بستر تثبیت شده، به محیط معدنی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل منتقل شدند و در دمای ۳۰ سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. در بازه‌های زمانی ۸ و ۱۶ ساعت، ۱ میلی‌لیتر نمونه از محیط گرفته شد و پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ دور بر دقیقه، میزان فنل موجود در مایع‌رویی، به کمک ۴-آمینوآنتی پیرین و پتاسیم فری سیانید محاسبه شد [۲۱]. از سلول اتوکلاو شده، بستر تثبیت نشده و بستر تثبیت شده اتوکلاو

^۱ Trace elements

شده، به عنوان کنترل منفی و به منظور بررسی جذب سطحی فنل استفاده شد.

۲-۶ تاثیر پارامترهای فیزیکوشیمیایی بر حذف فنل

تأثیر پارامترهای فیزیکوشیمیایی از جمله دما، pH و غلظت نمک، بر میزان حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده، مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی اثر pHهای مختلف روی حذف فنل، سلول‌های آزاد و تثبیت شده به محیط‌های معدنی دارای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل و ۵ درصد نمک با pHهای ۰/۵، ۶/۵، ۷/۵، ۸/۵ و ۹/۵ و ۱۰/۵ منتقل شدند. تاثیر غلظت‌های مختلف نمک بر میزان حذف فنل، در محیط‌های معدنی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، و غلظت‌های مختلف نمک (۰-۱۵ درصد)، بررسی شد. حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده در دماهای مختلف ۱۶، ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۵ سانتی‌گراد در محیط معدنی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، pH=۷/۵ و ۵ درصد نمک، به منظور بررسی اثر دما روی فرآیند، انجام گرفت. در بازه‌های زمانی مشخص، از محیط‌ها نمونه گرفته شد و پس از سانتریفیوژ، میزان حذف فنل بررسی شد [۲۲].

۳-۳ نتایج

۳-۱ تثبیت باکتری

کارایی تثبیت، با مقایسه میزان پروتئین در نمونه بدون بستر و نمونه دارای بستر، به دست آمد. غلظت پروتئین و درصد تثبیت در جدول ۱ آورده شده است.

۳-۲ بررسی حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت

شده

نتایج حاصل از تجزیه فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده در شکل ۱ آورده شده است. طبق این نمودار، باکتری‌های آزاد قادر به حذف ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل در محیط معدنی دارای ۵ درصد نمک، طی حدود ۸۸ ساعت بوده‌اند. همچنین، رشد سلول‌ها نیز در نمودار قابل مشاهده است. در نمونه کنترل منفی که سلول آزاد اتوکلاو شده بود، تغییری در غلظت فنل مشاهده نشد. سلول‌های تثبیت شده روی میکا، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را طی ۴۰ ساعت به مصرف رساندند. همچنین کاهش غلظت فنل در نمونه‌های کنترل منفی شامل بستر تثبیت شده و بستر تثبیت شده اتوکلاو شده، مشاهده نشد.

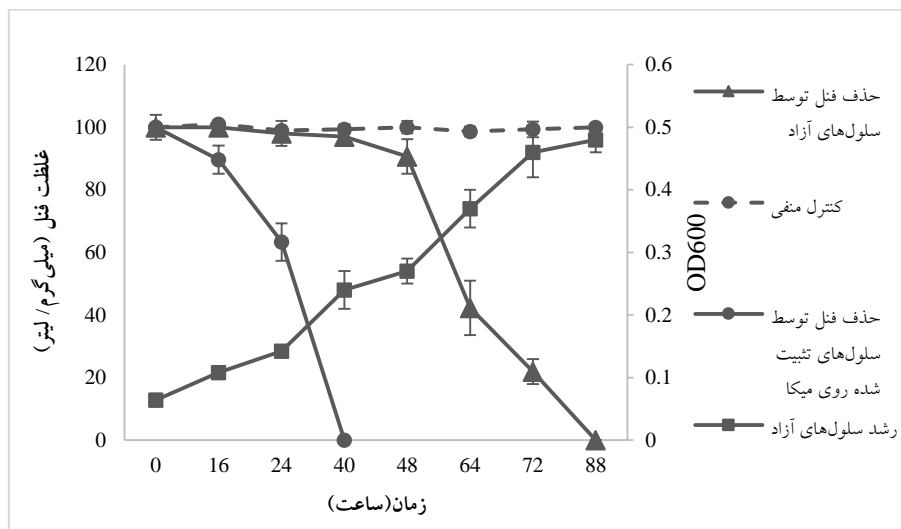
۳-۳ تاثیر پارامترهای فیزیکوشیمیایی بر حذف فنل

pH نقش مهمی در تجزیه ترکیبات فنلی توسط میکروارگانیسم‌ها دارد. تغییرات شدید در pH باعث دناتوره شدن و از بین رفتن فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. بنابراین، مقدار pH محیط بر فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه سرعت رشد میکروبی تأثیر می‌گذارد.

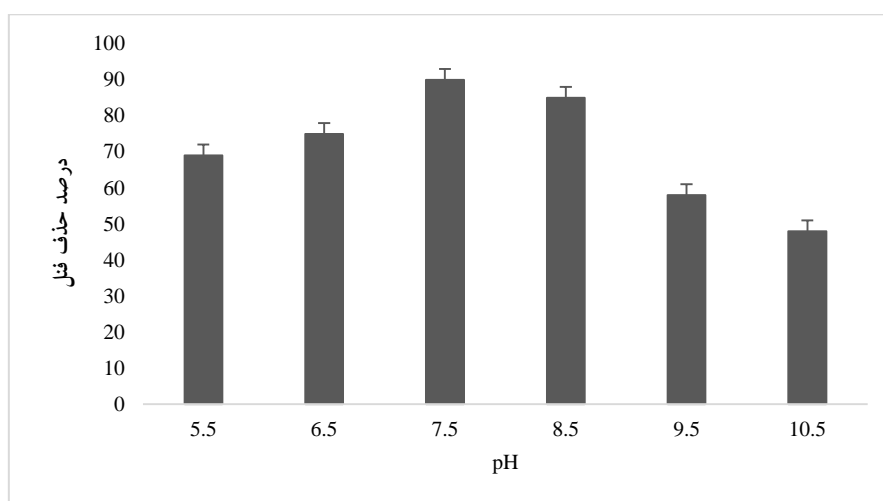
نتایج نشان دادند که سلول‌های آزاد تنها در pH=۷/۵ قادر به مصرف فنل طی ۸۸ ساعت بودند و در pH=۸/۵ مدت زمان انجام این کار به ۱۶۰ ساعت افزایش یافت. اما در محیط‌هایی با pHهای اسیدی‌تر و قلیایی‌تر، قادر به مصرف فنل نبوده‌اند. در مقابل، سلول‌های تثبیت شده روی میکا، در محدوده pHهای ۵/۵-۱۰/۵، طی ۴۰ ساعت، توانسته‌اند ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را مصرف کنند. طی مدت ۲۴ ساعت، سلول‌های تثبیت شده بیشترین میزان حذف را در pH=۷/۵ داشتند (شکل ۲).

جدول ۱ کارایی تثبیت روی بستر میکا

کارایی تثبیت (%)	غلظت پروتئین در بستر تثبیت شده (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)	غلظت پروتئین در نمونه بدون بستر (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)
۶۸۷۵	۱/۱	۱/۶



شکل ۱ حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده



شکل ۲ حذف فنل توسط سلول‌های تثبیت شده در pHهای مختلف طی ۲۴ ساعت

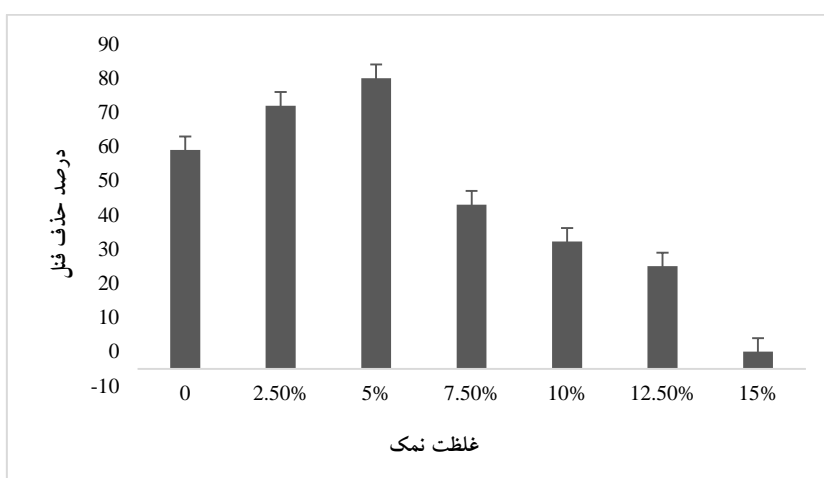
*برای تجزیه و تحلیل معنی‌داری آماری ($p < 0.05$) انحراف معیار توسط نرم‌افزار SPSS محاسبه شد.

فنل را در مدت ۴۰ ساعت به مصرف رساندند و در محیط‌هایی با غلظت نمک ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ درصد این مدت زمان به ۴۸ ساعت افزایش یافت. سلول‌های تثبیت شده روی میکا قادر به تجزیه فنل در غلظت‌های بالاتر نمک نبودند. بیشترین میزان حذف توسط سلول‌های تثبیت شده طی مدت ۲۴ ساعت، در محیطی با ۵ درصد نمک اتفاق افتاد (شکل ۳).

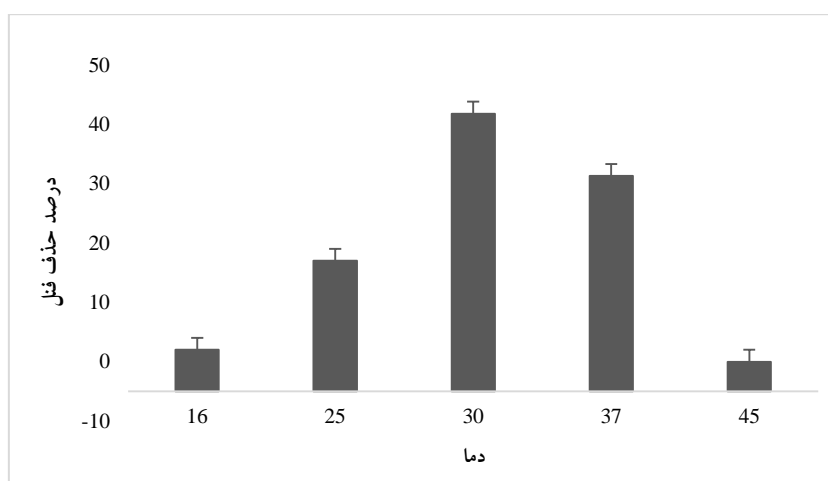
شوری بالا ممکن است باعث کاهش فعالیت و نرخ متابولیسم میکروارگانیسم شود. سلول‌های آزاد در محیط‌هایی با حداکثر غلظت نمک ۷/۵ درصد توانایی تجزیه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در مدت ۸۸ ساعت داشتند اما در غلظت‌های بالاتر قادر به رشد و مصرف فنل نبودند. درحالی‌که سلول‌های تثبیت شده روی میکا، در محیط‌هایی با غلظت نمک ۰، ۲/۵ و ۵ درصد، همین مقدار

تثبیت شده برخلاف سلول های آزاد در دمای ۱۶ سانتی گراد، قابلیت حذف فنل خود را حفظ کردند اما در دمای ۴۵ سانتی گراد توانایی حذف فنل خود را از دست دادند. سلول های تثبیت شده طی مدت ۲۴ ساعت، بالاترین عملکرد خود را در دمای ۳۰ سانتی گراد داشتند (شکل ۴).

در بررسی تاثیر دما بر فرآیند حذف فنل، نتایج نشان دادند که سلول های آزاد می توانند در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ سانتی گراد طی مدت ۸۸ ساعت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر فنل را به مصرف برسانند اما در دماهای ۱۶ و ۴۵ سانتی گراد، قادر به فعالیت نیستند. سلول های تثبیت شده روی میکا، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر فنل را طی مدت ۴۰ ساعت در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ سانتی گراد مصرف کردند. سلول های



شکل ۳ حذف فنل توسط سلول های تثبیت شده در غلظت های مختلف نمک طی ۲۴ ساعت. * برای تجزیه و تحلیل معنی داری آماری ($p < 0/05$) انحراف معیار توسط نرم افزار SPSS محاسبه شد.



شکل ۴ حذف فنل توسط سلول های تثبیت شده در دماهای مختلف طی ۲۴ ساعت. * برای تجزیه و تحلیل معنی داری آماری ($p < 0/05$) انحراف معیار توسط نرم افزار SPSS محاسبه شد.

۴- بحث

بسیاری از صنایع مانند صنایع نفت، پتروشیمی، کشاورزی، مواد غذایی و معادن، پساب‌هایی با مقدار زیادی نمک که اغلب دارای ترکیبات آلی مختلف مانند فنل و فلزات سنگین هستند، تولید می‌کنند. شوری بالا سبب پلاسمولیز، کاهش فعالیت سلولی و در نهایت مرگ میکروارگانیسم‌های مؤثر در حذف مواد آلی می‌شود [۲۳]. به همین جهت از یک باکتری از جنس *Janibacter* که تحمل کننده نمک بوده و بهینه رشد آن در ۵ درصد می‌باشد، جهت حذف فنل استفاده شد.

میکا ساختار سیلیکات ورقه‌ای دارد و صفحات موازی چهاروجهی سیلیکات را با به اشتراک گذاشتن سه اکسیژن خود با چهاروجهی سیلیکات دیگر تشکیل می‌دهد. میکا در دسترس و بسیار ارزان است و به طور گسترده برای تولید صنعتی در مقیاس بزرگ به ویژه در صنایع سرامیک و کاشی استفاده می‌شود [۱۹]. تاکنون از این بستر جهت تثبیت سلول استفاده نشده است، اما در برخی مطالعات از آن به عنوان بستری برای تثبیت آنزیم‌هایی همچون لپاز و گلوکز اکسیداز استفاده شده است [۱۹، ۲۴].

با توجه به نتایج به دست آمده، سلول‌های تثبیت شده و آزاد تفاوت قابل توجهی در میزان حذف فنل داشتند. مدت زمان مصرف ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده، به ترتیب ۸۸ و ۴۰ ساعت به دست آمده است. در مطالعه انجام شده توسط لیو و همکاران، مشاهده شده است که در غلظت‌های پایین آلاینده، سلول‌های آزاد عملکرد بهتری دارند اما با افزایش غلظت آلاینده، سلول‌های تثبیت شده عملکرد بهتری نسبت به سلول‌های آزاد داشته‌اند [۹]. در مطالعات دیگر، سلول‌های تثبیت شده عملکرد بهتری نسبت به سلول‌های آزاد داشتند و فنل را در مدت زمان کمتری حذف می‌کردند [۲۲، ۲۵-۲۷]. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که فرآیند تثبیت، سلول‌ها را در برابر اثرات سمی فنل محافظت می‌کند.

همچنین، تمایل سلول‌های تثبیت شده به تحمل غلظت‌های بالاتر فنل، به این دلیل است که تثبیت، تراکم سلولی را افزایش می‌دهد و در نتیجه باعث افزایش نرخ تجزیه زیستی می‌شود.

عوامل مختلفی از جمله دما، pH و غلظت نمک می‌توانند بر کارایی زیست‌پالایی اثر بگذارند. با توجه به نتایج بدست آمده، سلول‌های آزاد نسبت به سلول‌های تثبیت شده، دامنه تحمل pH کمتری داشتند. سلول‌های آزاد تنها در pH=۷/۵ و pH=۸/۵ فنل را مصرف کردند؛ در مقابل سلول‌های تثبیت شده، در دامنه گسترده‌ای از Ph (۱۰/۵ - ۵/۵) قادر به فعالیت و حذف فنل بودند. همچنین، نتایج مشابهی مبنی بر حفظ عملکرد سلول‌های تثبیت شده در pH های اسیدی و قلیایی نسبت به سلول‌های آزاد، در مطالعات دیگر به دست آمده است [۴، ۲۶]. توانایی سلول‌های باکتریایی تثبیت شده در تحمل pH های اسیدی و قلیایی را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که فرآیند تثبیت، محافظت زیادی را ایجاد می‌کند.

همانطور که نشان داده شد، سلول‌های تثبیت شده روی میکا، توانایی تحمل غلظت‌های بالاتری از نمک را نسبت به سلول‌های آزاد داشتند. سلول‌های آزاد در محیط‌هایی با حداکثر غلظت نمک ۷/۵ درصد، قادر به فعالیت و حذف فنل بودند اما سلول‌های تثبیت شده قادر به تحمل ۱۲/۵ درصد نمک هم بوده‌اند. در مطالعه انجام شده بر روی *Comamonas sp.* تثبیت شده، نتایج نشان دادند که در غلظت ۵۰ گرم بر لیتر نمک، علیرغم اینکه کارایی سلول‌های آزاد کاهش یافت، کارایی سلول‌های تثبیت شده تغییری نکرد [۱۳]. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت بالای نمک می‌تواند باعث ایجاد استرس بر روی گونه‌های میکروبی و در نتیجه کاهش فعالیت سلولی شود، در حالی که تثبیت سلول‌های می‌تواند این استرس را کاهش داده و فعالیت سلولی را حفظ کنند.

- [4] Ke, Q., et al., *Sustainable biodegradation of phenol by immobilized Bacillus sp. SAS19 with porous carbonaceous gels as carriers*. J Environ Manage, 2018. 222: p. 185-189.
- [5] Suzana, C.u.S.M., et al., *Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater*. African Journal of Biotechnology, 2013. 12(28): p. 4412-4418.
- [6] Wang, H.Q., et al., *Immobilization of Pseudomonas sp. DG17 onto sodium alginate-attapulgitic-calcium carbonate*. Biotechnol Biotechnol Equip, 2014. 28(5): p. 834-842.
- [7] Kotresha, D. and G.M. Vidyasagar, *Phenol degradation in a packed bed reactor by immobilized cells of Pseudomonas aeruginosa MTCC 4997*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017. 10: p. 386-389.
- [8] Gomes e Silva, N.C., et al., *Phenol biodegradation by Candida tropicalis ATCC 750 immobilized on cashew apple bagasse*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2019. 7.(۳)
- [9] Liu, Y.J., A.N. Zhang, and X.C. Wang, *Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of Acinetobacter sp. XA05 and Sphingomonas sp. FG03*. Biochemical Engineering Journal, 2009. 44(2-3): p. 187-192.
- [10] Fareed, A., et al., *Immobilized cells of a novel bacterium increased the degradation of N-methylated carbamates under low temperature conditions*. Heliyon, 2019. 5(11): p. e02740.
- [11] Pandey ,K., P. Saha, and K.V.B. Rao, *A study on the utility of immobilized cells of indigenous bacteria for biodegradation of reactive azo dyes*. Prep Biochem Biotechnol, 2020. 50(4): p. 317-329.
- [12] Sharma, S.C.D., et al., *Decolorization of azo dye methyl red by suspended and co-immobilized bacterial cells with mediators anthraquinone-2,6-disulfonate and Fe₃O₄ nanoparticles*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016. 112: p. 88-97.
- [13] Jiang, B., et al., *Efficient treatment of phenolic wastewater with high salinity using a novel integrated system of magnetically immobilized cells coupling with electrodes*. Bioresour Technol, 2016. 218: p. 108-14.
- [14] Hamada, M., et al., *Janibacter cremeus sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sediment*. Int J Syst Evol Microbiol, 2013. 63(Pt 10): p. 3687-3690.
- [15] Narges Abavisani, M.A.A., Seyed Mohammad Mehdi Dastgheib *Isolation and identification of haloalkaliphilic phenol degrading bacteria and evaluating their applicability*. 2015.
- [16] Khessairi, A., et al. *Pentachlorophenol degradation by Janibacter sp., a new actinobacterium isolated from saline sediment of arid land*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 296472.

سلول‌های تثبیت شده روی میکا، در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ سانتی‌گراد، فنل را در مدت زمان کمتری نسبت به سلول‌های آزاد تجزیه کردند. علاوه بر این، در دمای ۱۶ سانتی‌گراد که سلول‌های آزاد عملکرد خود را از دست دادند، سلول‌های تثبیت شده همچنان قادر به مصرف فنل بودند. نتایج مشابهی در مطالعات دیگر به دست آمده است، به این ترتیب که سلول‌های تثبیت شده در دماهای مختلف عملکرد بهتری نسبت به سلول‌های آزاد نشان داده‌اند و همچنین، در دماهای بالا که سلول‌های آزاد عملکرد خود را از دست می‌دهند، سلول‌های تثبیت شده فعالیت خود را حفظ کرده‌اند [۹، ۲۲]. با توجه به این نتایج، دما تأثیر کمتری بر سلول‌های تثبیت شده نسبت به سلول‌های آزاد دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که فرایند تثبیت، پایداری حرارتی سلول‌ها را افزایش می‌دهد.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این کار پژوهشی نشان می‌دهند که سلول‌های بومی و تحمل‌کننده نمک *Janibacter* می‌توانند روی میکا به شکل کارآمدی تثبیت شوند. فرایند تثبیت به جهت افزایش تراکم سلولی و محافظت از سلول‌ها در برابر اثرات سمی فنل، کارایی حذف فنل سلول‌ها را به طور چشمگیری افزایش می‌دهد. مدت زمان حذف فنل توسط سلول‌های تثبیت شده تقریباً نصف سلول‌های آزاد است. همچنین، بوا سطحی فرایند تثبیت، پایداری حرارتی سلول‌ها و تحمل‌پذیری آن‌ها نسبت به غلظت‌های بالای نمک و شرایط pH اسیدی و قلیایی، افزایش می‌یابد.

۶- منابع

- [1] Basak, B., et al., *Biodegradation of high concentration phenol using sugarcane bagasse immobilized Candida tropicalis PHB5 in a packed-bed column reactor*. Ecotoxicol Environ Saf, 2019. 180: p. 317-325.
- [2] EPA, *priority pollutant list*. 2014.
- [3] Mainka ,T., et al., *Potential applications of halophilic microorganisms for biological treatment of industrial process brines contaminated with aromatics*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2021. 48-(۱).

- [23] Sadeghi, M., et al., *Improving the efficiency of saline wastewater treatment plant through adaptation of halophilic microorganisms*. Desalination and Water Treatment, 2019. 157: p. 62-68.
- [24] Saal, K., et al., *Characterization of glucose oxidase immobilization onto mica carrier by atomic force microscopy and kinetic studies*. Biomolecular engineering, 2002. 19(2-6): p. 195-199.
- [25] Abarian, M., M. Hassanshahian, and A. Esbah, *Degradation of phenol at high concentrations using immobilization of Pseudomonas putida P53 into sawdust entrapped in sodium-alginate beads*. Water Sci Technol, 2019. 79(7): p. 1387-1396.
- [26] Ruan, B., et al., *Immobilization of Sphingomonas sp. GY2B in polyvinyl alcohol-alginate-kaolin beads for efficient degradation of phenol against unfavorable environmental factors*. Ecotoxicol Environ Saf, 2018. 162: p. 103-111.
- [27] Xia, L., et al., *Effects of CaCl₂ freeze-drying and acidic solutions on the reusability of calcium alginate beads; and degradation of phenol by immobilized Acinetobacter sp. PR1*. Biochemical Engineering Journal, 2019. ۱۵۱ .
- [17] Zhang, G.Y., et al., *Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading Janibacter anophelis strain JY11*. J Hazard Mater, 2009. 172(2-3): p. 580-6.
- [18] Nock, S., J.A. Spudich, and P. Wagner, *Reversible, site-specific immobilization of polyarginine-tagged fusion proteins on mica surfaces*. FEBS letters, 1997. 414(2): p. 233-238.
- [19] Zaidan, U.H., et al., *Silylation of mica for lipase immobilization as biocatalysts in esterification*. Applied Clay Science, 2010. 47(3-4): p. 276-282.
- [20] Li, J., et al., *A bio-hybrid material for adsorption and degradation of phenanthrene: bacteria immobilized on sawdust coated with a silica layer*. RSC Advances, 2016. 6(109): p. 107189-107199.
- [21] Y. Fiamegos, C.S., G. Pilidis, <-4-Aminoantipyrine_spectrophotometric_method_of_p he.pdf>. Analytica Chimica Acta, 2002.
- [22] Bera, S .and K. Mohanty, *Areca nut (Areca catechu) husks and Luffa (Luffa cylindrica) sponge as microbial immobilization matrices for efficient phenol degradation*. Journal of Water Process Engineering, 2020. 33.

Improved phenol removal in saline effluents by immobilized bacteria

Zeynab Vanak¹, Sedigheh Asad^{2*}, Seyed Mohammad Mehdi Dastgheib³

1-M.Sc. of Microbial Biotechnology, Faculty of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

2-Associate Professor, Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

3-Assistant Professor, Microbiology and Biotechnology Group, Department of environment and Biotechnology, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran

asad@ut.ac.ir

Receipt: 2022/05/25

Accepted: 2022/11/08

Abstract

Phenols are organic and highly toxic compounds commonly found in the effluents of various industries due to their wide range of applications. The inhibitory effect of phenol at high concentrations, as well as the high salinity of industrial effluents, poses a serious challenge for treatment by microorganisms. One of the most common approaches to overcome this problem is the immobilization of phenol-degrading microorganisms. The aim of this study was to study the immobilization effect on the phenol removal efficiency of native *Janibacter* halotolerant bacterium. For this purpose, mica was used as a carrier for bacterial immobilization and the protein concentration assay was applied to determine the immobilization efficiency. The phenol removal by free and immobilized cells was studied as well as the effect of different parameters on phenol removal efficiency. The immobilization efficacy on mica was %68.75, based on protein concentration measurements. The removal time of 100 mg/L phenol by suspended cells was 88 h, while the immobilized cells degraded it in 40 h. Immobilized cells, unlike free cells, were able to remove phenol at lowered temperatures up to 16°C, salt concentrations greater than 7/5%, and pH levels below 7/5 and above 8/5. Similar results regarding the superior performance of immobilized cells have been obtained in other studies. As a result, the immobilization process considerably improves the efficiency of phenol removal and makes the cells resistant to harsh environmental conditions by protecting the cells from the toxic effects of phenol.

Keywords: Bacterial immobilization, Phenol removal, *Janibacter* sp., Mica