زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

بهبود حذف فنل در پساب‌های شور به کمک باکتری تثبیت شده

زینب ونک[1]، صدیقه اسد[2*]، سید محمدمهدی دستغیب[3]

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 ٦٤٥٥-١٤١٥٥، تهران، ایران

asad@ut.ac.ir

دریافت: ١٤٠١/٠٣/٠٤ پذیرش: ١٤٠١/٠٨/١٧

چکیده

فنل‌ها ترکیبات آلی و بسیار سمی هستند که با توجه به کاربرد گسترده، معمولاً در پساب صنایع مختلف یافت می شوند. اثر بازدارندگی 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 تجزیه کننده فنل می‌باشد. هدف از این مطالعه، مقایسه حذف فنل یک باکتری بومی تحمل‌کننده نمک از جنس *Janibacter* به صورت آزاد و تثبیت‌شده 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 بررسی شد. براساس اندازه‌گیری غلظت پروتئین، کارایی تثبیت روی میکا، ٦٨/٧٥ درصد به دست آمد. مدت زمان حذف ١٠٠ میلی‌گرم در لیتر فنل توسط سلول‌های آزاد ٨٨ ساعت و سلول‌های تثبیت‌شده روی میکا، ٤٠ ساعت اندازه‌گیری شد. سلول‌های تثبیت‌شده، برخلاف سلول‌های آزاد قادر به حذف فنل در دماهای پایین تا ١٦ سانتی‌گراد، غلظت نمک بیش از ٧/٥ درصد و pHهای کمتر از ٧/٥ و بیش از٨/٥ 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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-06-24]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.10.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

فنل (با خلوص>۹۹ 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 میکروارگانیسم و شرایط کشت

باکتری *Janibacter* sp. با شماره دسترسی PBCC 1262 از بانک میکروارگانیسم‌های 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، $(NH_4)_2SO_4$: ۰/۱ گرم، NaCl: ۵۰ گرم و ۱ میلی‌لیتر از محلول عناصر کم‌مقدار[1] ($MnCl_2$: ۰/۱ گرم در لیتر، $ZnCl_2$: ۰/۱۷ گرم در لیتر، $CuCl_2$: ۰/۰۴۳ 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 (OD_{600}=۰/۱ پس از تلقیح) در دمای ۳۰ سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه کشت داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت (OD_{600}=۱/۵)، 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].

۲-٤ 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 pH=۷ و سدیم کلرید ۵۰۰ میلی‌مولار) به مدت ۵ دقیقه تحت سونیکاسیون قرار گرفتند و مجددا 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:

$$\text{کارایی تثبیت} = \frac{\text{غلظت پروتئین در نمونه همراه بستر}}{\text{غلظت پروتئین در نمونه بدون بستر}} \times ۱۰۰$$

۲-۵ بررسی حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده

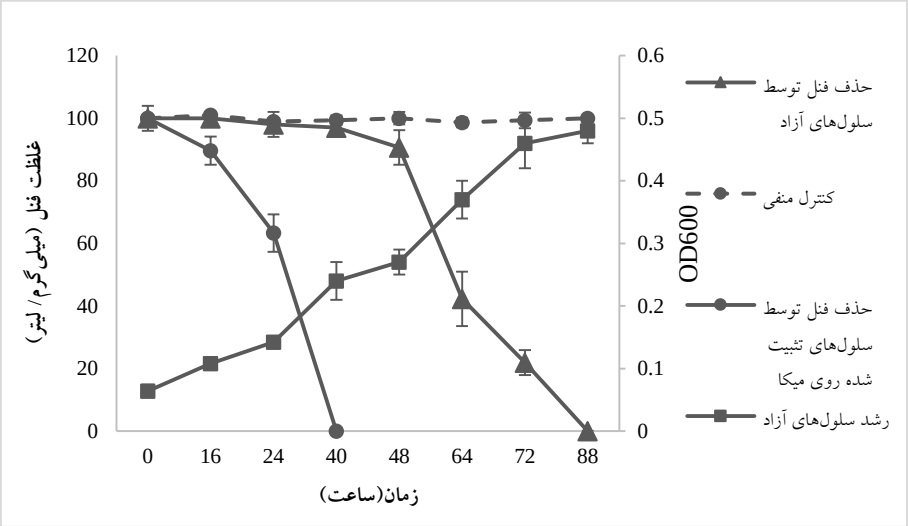
به منظور بررسی حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده، سلول‌های آزاد رشد کرده در محیط نوترینت براث (OD_{600}=۱/۵) و ۱ گرم بستر تثبیت شده، به محیط معدنی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل منتقل شدند و در دمای ۳۰ سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. در بازه‌های زمانی ۸ و ۱٦ ساعت، ۱ میلی‌لیتر نمونه از محیط گرفته شد و پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ دور بر دقیقه، میزان فنل موجود در مایع‌رویی، به کمک ٤-آمینوآنتی پیرین و پتاسیم فری سیانید محاسبه شد [۲۱]. از سلول اتوکلاو شده، بستر تثبیت نشده و بستر تثبیت شده اتوکلاو

[1] Trace elements

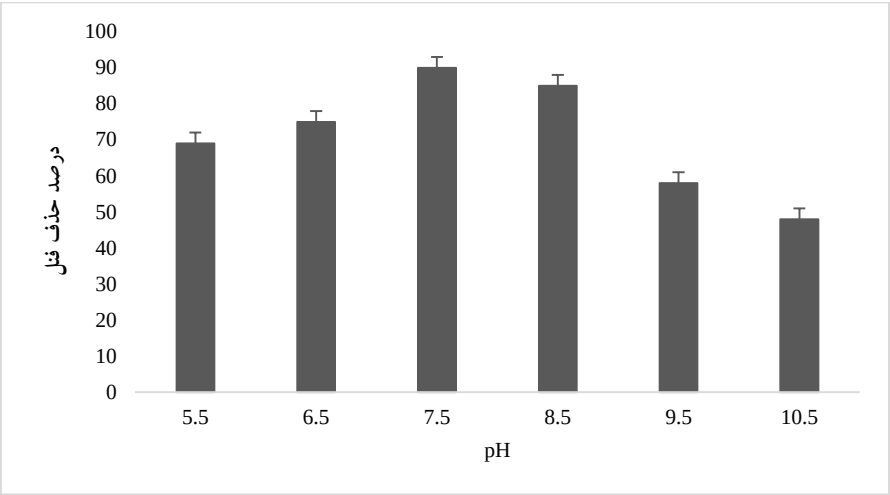
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-06-24]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.10.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ



شکل ۱ حذف فنل توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده



شکل ۲ حذف فنل توسط سلول‌های تثبیت شده در pHهای مختلف طی ۲٤ ساعت

*برای تجزیه و تحلیل معنی‌داری آماری (p<۰/۰۵) انحراف معیار توسط نرم‌افزار SPSS محاسبه شد.

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 فنل را در مدت ٤۰ ساعت به مصرف رساندند و در محیط‌هایی با غلظت نمک ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ درصد این مدت زمان به ٤۸ 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 ۲٤ ساعت، در محیطی با ۵ درصد نمک اتفاق افتاد (شکل ۳).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-06-24]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.10.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

٤- بحث

بسیاری از صنایع مانند صنایع نفت، پتروشیمی، کشاورزی، موادغذایی 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 موادآلی می شود [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 می شود [۱۹]. تاکنون از این بستر جهت تثبیت سلول استفاده نشده است، اما در برخی مطالعات از آن به عنوان بستری برای تثبیت آنزیم‌هایی همچون لیپاز و گلوکزاکسیداز استفاده شده است [۱۹, ۲٤].

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 ٤۰ 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 سلول های 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 [٤, ۲٦]. 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 می تواند این استرس را کاهش داده و فعالیت سلولی را حفظ کنند.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-06-24]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.10.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

[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 :(٢)٤١٤ .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_phe.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.

[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, 2019.١٥١ .

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-06-24]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.10.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ