

## تجزیه زیستی بنزن و تولوئن توسط باکتری استرپتومایسس جدا شده از خاک پالایشگاه تبریز در آذربایجان شرقی و بررسی مدل سینتیکی

علی فرضی<sup>۱</sup>، نجیبه شیرزاد<sup>۲</sup>، علیرضا دهناد<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه تبریز

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد مهندسی شیمی، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

<sup>۳</sup> استادیار میکروبیولوژی- دپارتمان بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، معاونت تشخیص و درمان بیماری‌ها، بخش تحقیقات بیماری‌های باکتریایی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، تبریز

(دریافت: ۹۷/۳/۲۷، پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۰، نشر آنلاین: ۹۹/۱۰/۲۰)

### چکیده

هیدروکربن‌های آروماتیک گروه مهمی از آلودگی‌های محیط‌زیست را تشکیل می‌دهند که از منابع مختلف مانند صنایع پالایشگاهی و پتروشیمی، داروسازی، رنگ و پلاستیک تولید می‌شوند. این آلاینده‌های محیط زیستی می‌توانند توسط روش‌های مختلفی مثل تبخیر، تجزیه شیمیایی، تجزیه زیستی و جذب سطحی حذف شوند. روش‌های بیولوژیکی به دلیل سادگی، اقتصادی بودن و استفاده از میکروارگانیسم‌های سازگار با محیط‌زیست برای این کار ترجیح داده می‌شوند. در این کار، تجزیه زیستی بنزن و تولوئن (Toluene) توسط باکتری استرپتومایسس (*Streptomyces*) جدا شده از خاک آلوده به مواد نفتی پالایشگاه تبریز مطالعه شد. بنزن و تولوئن در مقادیر ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر و به طور جداگانه در محیط کشت مایع تهیه و مقدار ثابتی از باکتری به محلول اضافه شد. محلول به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷/۶ در انکوباتور شیکردار تیمار (Shaker Incubator) گردید و میزان تخریب آلاینده‌ها با اسپکتروفتومتر دوپرتویی (Dual beam spectrophotometer) ارزیابی شد. متابولیت (Metabolite) حاصل از بیش‌ترین تخریب، مورد شناسایی با دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی قرار گرفت. مشاهده گردید که باکتری استرپتومایسس می‌تواند بیش از ۷۰٪ بنزن و تولوئن را در غلظت اولیه ۵۰ mg/L تجزیه کند. همچنین مدل‌سازی سینتیکی فرایند تجزیه زیستی بنزن و تولوئن توسط باکتری استرپتومایسس نشان داد که مدل سینتیکی بازداري میکائلیس- منتن (Kinetic model of Michaelis-Menten inhibition) بهترین پوشش را بر روی داده‌های آزمایشگاهی دارد.

**کلیدواژه‌ها:** تجزیه زیستی، آلاینده آروماتیک، استرپتومایسس، مدل‌سازی سینتیکی، مدل بازداري میکائلیس- منتن، مدل فعال‌سازی میکائلیس- منتن.

### ۱- مقدمه

دلیل مقاومت ترمودینامیکی بالای حلقه آروماتیک در محیط‌زیست، پایدار می‌مانند. با افزایش وزن مولکولی هیدروکربن‌ها مقاومت آن‌ها نیز افزایش می‌یابد. در حال حاضر آلودگی‌های هیدروکربنی ناشی از نفت خام در اتمسفر، خاک، آب دریا و رسوبات به عنوان یک مشکل محیط زیستی مطرح است (Rosell-Melé و همکاران، ۲۰۱۸؛ Singh و همکاران، ۲۰۰۷).

هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک اولین سرطان‌زاهای زیست‌محیطی تشخیص داده شده‌اند. تأثیر تعیین‌کننده آن‌ها روی محل سکونت گیاهان، جانوران و تجمع آن‌ها در زنجیره غذایی، مشکلات جدی سلامتی و حتی اختلالات ژنتیکی در انسان را باعث

راه‌های زیادی جهت کاهش آلودگی‌های محیط زیستی وجود دارند که از آن جمله استفاده از انرژی‌های تجدیدپذیر نظیر سوخت‌های زیستی یا حذف زیستی آلاینده‌ها می‌تواند از راهکارهای مناسب در این زمینه باشند (Feyzi و Shahbazi، ۲۰۱۵).

پایداری آلودگی‌ها در محیط‌زیست متأثر از طبیعت آلودگی‌ها، مقدار آلودگی موجود، فعل و انفعالات شیمیایی، زمین‌شناختی، فیزیکی و زیست‌شناختی مناطق آلوده است. هیدروکربن‌های آروماتیک که اصلی‌ترین منبع انتشار آن‌ها نفت خام می‌باشد، به

\* نویسنده مسئول؛ شماره تماس: ۰۹۱۴۳۰۰۱۹۳۰

می‌شود. آژانس حفاظت محیط‌زیست آمریکا ۱۶ نوع از هیدروکربن‌های آروماتیک از جمله بنزن را به‌عنوان خطرناک‌ترین آلوده‌کننده‌ها شناسایی کرده است و چندین مؤسسه از جمله انجمن تحقیقات سرطان دنیا، بنزن را عامل اصلی سرطان‌زایی معرفی کرده‌اند (Johnsen و Karlson, ۲۰۰۴).

آلودگی خاک‌ها و آب‌ها به هیدروکربن‌های نفتی، یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست‌محیطی در برخی از نقاط کشور به‌ویژه در اطراف پالایشگاه‌های نفت، نظیر پالایشگاه نفت تبریز می‌باشد. از آنجاکه نفت و مشتقات آن در مناطق پالایشی یا نقاط اطراف آن‌ها و به نقاط دیگر به‌مقدار زیاد حمل‌ونقل می‌شوند، امکان آلودگی خاک‌ها به این ترکیبات زیاد است. این آلودگی‌ها ممکن است به‌صورت تصادفی بوده و یا ضایعات پالایشگاه‌های نفت به‌طور عمد به خاک افزوده شوند. حذف این ترکیبات سمی و آلاینده محیط‌زیست بسیار ضروری است. برای مثال، بنزن و تولوئن ترکیبات آروماتیکی هستند که سمی و سرطان‌زا هستند (Warden و همکاران، ۲۰۱۸).

هیدروکربن‌های آزادشده به محیط‌زیست می‌توانند توسط فرایندهایی همچون تبخیر، تجزیه شیمیایی، تجزیه زیستی و جذب سطحی حذف شوند. در این میان تجزیه زیستی تنها راه انتخابی برای حذف پایدار طیف وسیعی از آلودگی‌ها از طبیعت است. روش‌های ذکرشده دیگر به‌طور کامل آلودگی‌ها را حذف نمی‌کنند. این روش‌ها یا از درصد آلودگی می‌کاهند و یا به آلودگی کم‌خطرتری تبدیل می‌کنند. اگرچه بعضی از ارگانیسم‌ها دارای مقداری توانایی جهت سم‌زدایی، معدنی کردن، انتقال دائم و عدم تحرک آلودگی‌ها هستند، اما میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها اغلب برای این کار مناسب هستند. در تجزیه زیستی، آلاینده‌ها به محصولات بی‌خطر و همچنین آب و کربن دی‌اکسید تبدیل می‌شوند (Singh و همکاران، ۲۰۰۷).

پاک‌سازی زیستی<sup>۱</sup> مواد نفتی، فرایندی است که ترکیبات سمی را به مواد غیرسمی و بی‌خطر تبدیل می‌کند. این عمل در نتیجه فعالیت‌های متابولیک میکروارگانیسم‌هایی که قادرند از مواد نفتی به‌عنوان منبع انرژی و کربن خود استفاده کنند، صورت می‌گیرد. عرضه این فناوری می‌تواند بسیار مفید باشد، زیرا قادر است بدون ایجاد خلل در محیط‌زیست طبیعی، ترکیبات سمی مواد نفتی را به مواد غیرسمی تبدیل کند (Sungpetch, ۱۹۹۸). در پاک‌سازی زیستی، مواد آلی موجود در پساب یا ترکیبات نفتی به‌عنوان غذا توسط میکروارگانیسم‌ها مصرف شده و به

سلول‌های بیولوژیکی یا جرم زنده یا همان بیومس<sup>۲</sup> تبدیل می‌شوند. پاک‌سازی زیستی یکی از روش‌های مقرون به‌صرفه برای حذف ترکیبات آلی از آب است. ولی چندین عامل وجود دارد که بر سرعت حذف ترکیبات آلی تأثیر می‌گذارند. این عوامل عبارت‌اند از غلظت آلاینده‌ها، غلظت توده زنده فعال، دما، pH و در دسترس بودن مواد مغذی و غیره (Li و همکاران، ۲۰۰۶). میکروب‌ها از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند و با تولید بیوسورفاکتانت‌ها<sup>۳</sup> موجب تجزیه آن‌ها می‌شوند. با تجزیه و یا تغییر شکل زیستی، آروماتیک‌ها به متابولیت‌هایی با درجه پیچیدگی کم‌تر و نیز از طریق معدنی شدن به مواد غیرآلی مانند آب و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شوند. تعدادی از گونه‌های باکتری که اغلب از خاک‌های آلوده و یا از رسوبات جدا شده‌اند و توانایی تجزیه زیستی آروماتیک‌ها را دارند عبارت‌اند از: سودوموناس آئروژینوزا<sup>۴</sup>، سودوموناس فلوئورسنس<sup>۵</sup>، مایکوباکتریوم<sup>۶</sup>، هموفیلوس<sup>۷</sup>، رودوکوکوس و هالوموناس<sup>۸</sup>. تخریب زیستی در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی مشاهده شده است. میزان این تخریب را می‌توان با تصفیه فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده افزایش داد. افزودن باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت می‌تواند سازگاری زیستی آروماتیک‌ها و توان متابولیکی جامعه باکتریایی را افزایش دهد (Johnsen و Karlson, ۲۰۰۴).

استرپتومایسس‌ها<sup>۹</sup> در راسته باکتریایی اکتینومیسیت‌ها<sup>۱۰</sup> که باکتری‌های گرم مثبت، بدون حرکت و رشته‌ای هستند، قرار دارند. این باکتری‌ها در ساختار رشته‌ای شاخه‌شاخه خود شبیه به قارچ‌ها هستند. گونه‌های استرپتومایسس در زمان رشد خود از رشته‌های هوایی خود اسپورهایی تولید می‌کنند که اسپوروفور<sup>۱۱</sup> نامیده می‌شوند. اسپوروفورزها در روی کلونی طولانی شده و تولید اسپورهایی به‌نام کنیدی<sup>۱۲</sup> می‌کنند. البته این فرایند از تشکیل اندوسپوره‌های باکتریایی<sup>۱۳</sup> متمایز است (Claessen و همکاران، ۲۰۰۶).

در حال حاضر از انواع خاصی از باکتری‌ها برای از بین بردن لکه‌های نفتی در دریاها و نیز آب‌های زیرزمینی استفاده می‌شود. محققان بسیاری تلاش می‌کنند تا میکروارگانیسم‌هایی را شناسایی کنند که توانایی بیشتری برای این کار داشته باشند، یا این که در شرایط مختلفی بتوانند این مواد را تجزیه کنند. علاوه بر آن می‌توان بعد از شناسایی میکروارگانیسم‌ها، با استفاده از دانش بیوتکنولوژی و روش‌های مهندسی ژنتیک، توانایی آن‌ها را برای تجزیه مواد مختلف حلقوی و مشتقات آن‌ها که از آلاینده‌های مهم

8. Rhodococcus &amp; Halomonas

9. Streptomyces

10. Actinomycetes

11. Sporophores

12. Conidi

13. Bacterial endospores

1. Bioremediation

2. Biomass

3. Biosurfactants

4. Pseudomonas aeruginosa

5. Pseudomonas fluorescens

6. Mycobacterium

7. Haemophilus

توسط GC-FID بررسی شد و نشان داد که باکتری‌های جدا شده می‌توانند ۲۸/۹۲٪ روغن دیزل و ۱۴/۹۹٪ نفتالین و ۵/۱۷٪ فنانترن را در هفت روز در دمای ۳۰°C تجزیه کنند.

Mesgari و همکاران (۲۰۱۳) تحقیقی برای ارزیابی تجزیه زیستی بنزن، تولوئن و زایلین توسط باکتری‌های جدا شده از مکان‌های آلوده هیدروکربنی انجام دادند. پنج باکتری برای تجزیه زیستی بنزن، تولوئن و زایلین (BTX) انتخاب شدند. تمام این باکتری‌ها قادر بودند تا BTX را با بازده متفاوتی تجزیه کنند. بیش-ترین بازده تجزیه زیستی برای بنزن بود که توسط باکتری گرم مثبت کوکوباسیلوس<sup>۲۵</sup>، گرم مثبت کوکوس و گرم منفی باسیلوس بیش از ۷۰٪ به دست آمد. درصد تجزیه برای تولوئن ۶۰٪ و زایلین ۷۰٪ به ترتیب توسط باکتری گرم مثبت کوکوباسیلوس و گرم منفی کوکوباسیلوس به دست آمد. نتایج نشان داد که حضور زایلین در مخلوط باعث کاهش بازده تجزیه بنزن و تولوئن می‌شود.

Li و همکاران (۲۰۱۹) تجزیه زیستی نفتالین، BTEX و هیدروکربن‌های غیرآروماتیک<sup>۲۶</sup> توسط باکتری پارابورخولدر<sup>۲۷</sup> یا BN5 را که از خاک‌های آلوده به نفت جدا شده بود، مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که باکتری در حضور مواد مغذی توانست پس از ۷ روز بیش از ۸۰٪ بنزن و تولوئن به تنهایی را وقتی غلظت اولیه آن‌ها برابر ۳۰ mg/L بود، تجزیه کند.

علی‌رغم مطالعات زیادی که در مورد کاربرد باکتری‌ها در تجزیه زیستی، به‌خصوص در ده سال گذشته انجام شده است، اما اطلاعات بسیار کمی درباره نقش استرپتومایسس‌ها در تجزیه زیستی بیان شده است. استرپتومایسس‌ها گونه‌ای از باکتری‌های خاک هستند که به‌طور وسیعی در محیط‌های طبیعی و خاک پخش شده‌اند.

Farzi و همکاران (۲۰۱۹)، تجزیه زیستی پلی‌اتیلن ترفتالات (PET)<sup>۲۸</sup> توسط باکتری استرپتومایسس را بررسی کردند. آن‌ها با آسیاب کردن بطری‌های PET پودرهایی با چهار اندازه ذرات مختلف تولید کردند. سپس آن‌ها را در محیط کشت حاوی باکتری استرپتومایسس قرار دادند. نتایج نشان داد که باکتری قادر به تجزیه هر چهار نوع پودر بود و حداکثر تجزیه با پودر ریزتر به دست آمد. همچنین آن‌ها سینتیک فرایند تجزیه زیستی PET را بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که هر دو مدل بازداری میکائلیس-منتن (MMIM)<sup>۲۹</sup> و فعال‌سازی میکائلیس-منتن

منابع آب‌خاک محسوب می‌شوند، افزایش داد (Claessen و همکاران، ۲۰۰۶؛ Baoune و همکاران، ۲۰۱۸).

Otenio و همکاران (۲۰۰۵) تجزیه زیستی بنزن، تولوئن و زایلین توسط باکتری سودوموناس پوتیدا<sup>۱۴</sup> را بررسی کردند. آن‌ها غلظت‌های اولیه ۵۰ mg/L از هر یک از آروماتیک‌ها و ترکیب آن‌ها را آزمایش کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که پس از ۲۴ ساعت، بنزن تحت هیچ شرایطی تجزیه نشده بود و نرخ تجزیه تولوئن و زایلین در مخلوط سه جزئی آن‌ها ۵۰٪ کاهش یافته بود. به دلیل زمان کمی که این محققان برای تجزیه زیستی در نظر گرفته بودند، اثر رشد باکتری بر روی تجزیه زیستی در روزهای بعد قابل برآورد نبود.

Li و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقات خود بر روی خاک‌های آلوده نفتی شهر لین‌زی<sup>۱۵</sup> چین موفق به جداسازی ۶ سوش<sup>۱۶</sup> باکتریایی تجزیه‌کننده سوخت موتور دیزل گردیدند که از طریق تولید بیوسورفکتانت‌هایی مثل رامنولیپید<sup>۱۷</sup> قادر به محلول کردن و تجزیه هیدروکربن‌ها هم در خاک و هم در آب می‌باشند.

Leonardi و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که با استفاده از میکروارگانیزم‌های خاک‌های آلوده به نفت، میزان تخریب هیدروکربن‌های آروماتیک ۳ و ۴ حلقه‌ای مثل فنانترن<sup>۱۸</sup>، پیرنوفلورانتن<sup>۱۹</sup> از ۴٪ به ۹۲٪ می‌رسد.

Feijoo-Siota و همکاران (۲۰۰۸) تخریب زیستی سودوموناس جدا شده از محیط‌زیست دریا را بررسی کردند. در غلظت ۲۵ میلی مول بر لیتر نفتالین میزان تخریب ۹۳٪ در مدت ۶ روز تعیین گردید. درصد تخریب در دمای ۱۶°C کم‌تر از ۳۰°C نشان داده شد. درصد تخریب در ۱۶°C بین ۲۲-۳۴٪ می‌باشد.

Dou و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقات خود از باکتری باسیلوس سرئوس<sup>۲۰</sup> جداسازی شده از غربال‌گری خاک آلوده به گازوئیل برای تجزیه زیستی بی‌هوازی بنزن استفاده کرده و نشان دادند که بنزن در غلظت ۱۵۰ میلی گرم در لیتر در مدت ۲۵ روز به‌طور کامل تجزیه می‌شود. این باکتری ابتدا بنزن را به فنول<sup>۲۱</sup> و بنزوات<sup>۲۲</sup> تبدیل کرده و سپس از آن به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کند. افزایش فنول و بنزوات تجزیه بی‌هوازی بنزن را افزایش می‌دهد.

Balachandran و همکاران (۲۰۱۳) از باکتری‌های استرپتومایسس جدا شده از خاک آلوده در چنای<sup>۲۳</sup> هند برای تجزیه هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای استفاده کردند. بازده تجزیه

23. Chennai

24. Toluene and xylene

25. Cocobacillus

26. Non-aromatic

27. Para Borkholder

28. Polyethylene Terephthalate

29. Michaelis-Menten Inhibition model

14. Pseudomonas Putida

15. Linzi

16. Strian

17. Ramenolipid

18. Phenanthrene

19. Pirnofluoranten

20. Bacillus Cereus

21. Phenol

۲۲. Benzoate

یک انکوباتور (پارس آزما، ایران) به مدت ۲ تا ۳ ساعت قرار داده شد. از روش استاندارد نیم مک فارلند<sup>۳۳</sup> (Weinstein, ۲۰۱۸) به عنوان روش استاندارد تست کدورت استفاده گردید. با یکسان کردن کدورت سوش باکتریایی با استاندارد مشخص شده، شمارش باکتری‌ها باید در حدود  $10^8 \times 1/8$  به دست آید (Swinehart و همکاران، ۲۰۰۱؛ Li، ۲۰۰۶).

پنج گونه متفاوت استرپتومایسس برای تجزیه بنزن و تولوئن تست شدند و گونه *Streptomyces ambofaciens* Azar411 (NCBI، ۲۰۱۲) که بیشترین درصد تجزیه را برای هر دو ماده آروماتیک داشت، برای مراحل بعدی کار انتخاب گردید.

پس از تهیه سوش‌های باکتریایی، به میزان ۵mL توسط سمپلر<sup>۳۳</sup> و سرسمپلر<sup>۳۴</sup> استریل از سوسپانسیون میکروبی برداشته شده و به لوله‌های فالكون دارای محیط کشت و آلاینده آروماتیک به‌طور جداگانه اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ روز داخل انکوباتور شیکردار (پارس آزما، ایران) در دمای ۲۸°C، pH برابر ۷/۶ و سرعت چرخش ۱۳۰ rpm تیمار شدند. جهت مهیا کردن شرایط هوازی، در لوله‌های فالكون، نیم دور باز گذاشته شد (Jussara و Francisca، ۱۹۹۹ و Swinehart، ۲۰۰۱).

در طی انجام آزمایشات، روزانه از هر لوله آزمایش، یک نمونه گرفته شد تا میزان تخریب آروماتیک‌ها در روزهای مختلف بررسی شود. برای بررسی میزان تخریب، لازم بود تا آروماتیک تخریب نشده از نمونه جدا شود. پس از امتحان کردن حلال‌های مختلف، اتانول به‌عنوان بهترین حلال بنزن و تولوئن شناسایی گردید. در شکل (۱) لوله‌های فالكون دارای محیط کشت باکتریایی و آلاینده و نیز نمونه‌هایی که از آن‌ها گرفته شده است، نشان داده شده‌اند.



شکل ۱- لوله‌های فالكون دارای محیط کشت، آلاینده و سوش باکتریایی و نیز نمونه‌های گرفته‌شده

(MMAM)<sup>۳۰</sup> با دقت بالایی نتایج آزمایشگاهی را پیش‌بینی می‌کنند.

از آنجایی که آلاینده‌های آروماتیک، بخش عمده آلاینده‌های خاک محیط‌های نفتی و پالایشگاهی را تشکیل می‌دهند، هدف از این کار پژوهشی، استفاده از باکتری استرپتومایسس جدا شده از خاک پالایشگاه تبریز واقع در آذربایجان شرقی برای تجزیه زیستی بنزن و تولوئن به‌عنوان بیشترین مقادیر تشکیل‌دهنده آلاینده‌های آروماتیک و ارائه مدل سینتیکی مناسب برای پیش‌بینی نرخ واکنش تجزیه توسط این باکتری می‌باشد تا بتوان به کمک مدل ارائه‌شده، تجزیه زیستی باکتری استرپتومایسس را در غلظت‌های مختلف آلاینده‌ها پیش‌بینی کرد.

## ۲- مواد و روش‌ها

جدول (۱) مواد استفاده‌شده در محیط کشت معدنی سوپ تریپتون سویا (TSB)<sup>۳۱</sup>، (تهیه‌شده از شرکت OXOID انگلیس) را که در این کار پژوهشی به کار رفته است، نشان می‌دهد.

### جدول ۱- ترکیبات استفاده‌شده برای تهیه محیط کشت معدنی

| TSB در یک لیتر آب بدون یون |                       |       |
|----------------------------|-----------------------|-------|
| نام ماده شیمیایی           | مقدار استفاده‌شده (g) | شرکت  |
| دی پتاسیم هیدروژن فسفات    | ۱/۷۳                  | Merck |
| پتاسیم دی هیدروژن فسفات    | ۰/۶۸                  | Merck |
| آمونیم نیترات              | ۱                     | Merck |
| سدیم کلرید                 | ۰/۱                   | Merck |
| منیزیم سولفات هفت آب       | ۰/۱                   | Merck |
| کلسیم کلرید دو آب          | ۰/۰۲                  | Merck |
| فرو سولفات هفت آب          | ۰/۳                   | Merck |

## ۳- روش انجام آزمایشات

پس از تهیه محیط کشت معدنی، هر بار ۲۰ میلی‌لیتر از آن برداشته شده و برای آزمایشات تجزیه زیستی آلاینده‌های بنزن و تولوئن استفاده شد. محیط‌های کشت جدا شده درون لوله‌های فالكون در پیچ‌دار ریخته شده و برای آزمایشات استفاده شدند. محلول‌های داخل لوله‌ها در یک اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱۵psig به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه استریل شدند. سپس لوله‌ها به زیر یک هود میکروبیولوژی منتقل گردیدند و در شرایط استریل، به‌میزان مشخص شده از ترکیب آروماتیک بنزن یا تولوئن به هر یک از لوله‌ها اضافه گردید.

برای تهیه سوش‌های باکتری، تعداد مشخصی از باکتری جدا شده درون ۲ تا ۳mL از محیط کشت TSB ریخته شد و سپس در

33. Sampler  
34. Sampler Tip

30. Michaelis-Menten Activation model  
31. Tryptic Soy Broth  
32. McFarland

$$C_{C_6H_6} = 22.307A_{C_6H_6} + 0.526 \quad (۱)$$

$$C_{C_7H_8} = 25.853A_{C_7H_8} + 0.288 \quad (۲)$$

در روابط فوق،  $C_i$  غلظت آروماتیک در محلول و  $A_i$  میزان جذب نوری آن جزء است.

#### ۵- تعیین درصد تخریب آروماتیک‌ها

میزان حذف بنزن و تولوئن توسط باکتری استرپتومایسس در روزهای مختلف و در غلظت‌های مختلف در شرایط بهینه شامل دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷/۶ بررسی گردید و آروماتیک موجود در محیط به دست آمد. پس از خواندن جذب نوری نمونه‌ها و مقایسه طیف نمونه‌ها با استاندارد و کاهش میزان جذب نمونه‌ها می‌توان تجزیه بنزن و تولوئن و درصد تخریب آن توسط باکتری را از معادله (۳) تعیین کرد.

$$\text{درصد تخریب} = \frac{C_{i,0} - C_{i,1}}{C_{i,0}} = \frac{A_{i,0} - A_{i,1}}{A_{i,0}} \quad (۳)$$

که در آن،  $C_{i,0}$  و  $C_{i,1}$  به ترتیب، غلظت‌های جرمی جزء  $i$  قبل و بعد از تخریب زیستی، و  $A_{i,0}$  و  $A_{i,1}$  به ترتیب، میزان جذب نوری جزء  $i$  در نمونه‌ها قبل و بعد از تخریب توسط میکروارگانیزم‌ها هستند. تعیین غلظت باقی‌مانده ترکیب بنزن و تولوئن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و معادلات (۱) و (۲) انجام گرفت.

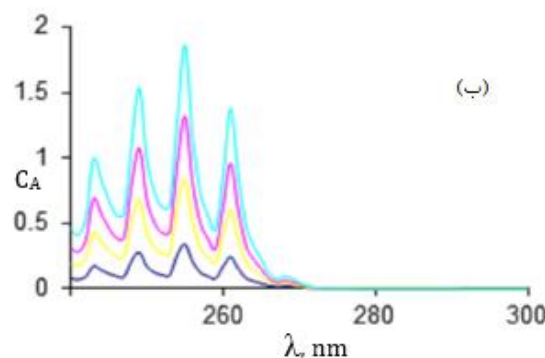
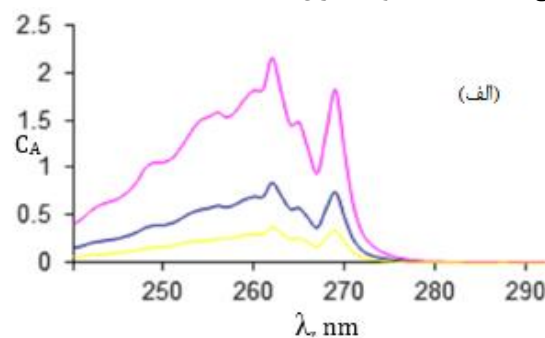
#### ۶- تجزیه متابولیت با دستگاه GC-MS

برای تعیین نوع محصولات تجزیه زیستی، نمونه‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مدل ۶۸۹۰ ساخت آمریکا مجهز شده با یک اسپکترومتر جرمی (MS) مدل ۵۹۷۳ Agilent با شرایط تزریق زیر مورد تجزیه و ارزیابی قرار داده شد و نوع و میزان درصد مواد موجود در متابولیت مشخص، یادداشت و بررسی شد.

در پایان روز دهم نمونه‌ای که بیش‌ترین درصد تخریب را داشت، برای کروماتوگرافی گازی انتخاب شد. نمونه‌ها با سانتریفیوژ Hettich EBA20 ساخت آلمان با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دو بار با مقدار دو برابر از اتانول استخراج شد. سپس برای شناسایی متابولیت‌های ثانویه از دستگاه GC-MS، استفاده گردید. ترکیبات مشتق شده روی HP-5ms (0.25mm×30m×0.25µm) شناسایی شدند. برنامه‌ریزی دمایی به این صورت بود که ابتدا دمای نمونه به ۴۰°C رسید و سپس با سرعت ۵°C/min تا دمای ماکزیمم ۳۳۰°C افزایش یافت. تزریق ابتدایی در دمای ۲۸۰°C آون صورت گرفت (Singh و

#### ۴- تعیین $\lambda_{max}$ جذب نوری بنزن و تولوئن

اساس تعیین جذب نوری بنزن تیمار شده با باکتری، استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر برای ارزیابی غلظت آنالیت<sup>۳۵</sup> در نمونه است. از قانون بیر- لامبرت<sup>۳۶</sup> (Swinehart, ۱۹۶۲) برای بیان رابطه بین میزان نور جذب‌شده توسط نمونه و غلظت نمونه، استفاده شده است. در این کار پژوهشی برای آنالیزهای مربوطه از دستگاه اسپکتروفتومتر دو شعاعی مدل Shimadzu UV1700 ساخت کشور ژاپن استفاده شد. برای سنجش جذب نوری نمونه‌ها، ابتدا باید میزان حداکثر جذب نوری ( $\lambda_{max}$ ) بنزن و تولوئن مشخص شود. برای این منظور یک استاندارد از محلول آلاینده آروماتیک در اتانول تهیه شد و جذب نوری رقت‌های مختلف آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر دو شعاعی در طیف ۲۴۰ تا ۳۰۰ ثبت گردید. با توجه به شکل (۲) می‌توان نتیجه گرفت که بیش‌ترین جذب نوری برای تولوئن ۲۶۰ نانومتر و برای بنزن ۲۵۵ نانومتر می‌باشد (Straube و همکاران، ۲۰۰۳).



شکل ۲- منحنی تعیین: الف)  $\lambda_{max}$  تولوئن، ب)  $\lambda_{max}$  بنزن

سپس غلظت‌های مختلفی از هر آروماتیک در اتانول تهیه گردید و میزان جذب نوری هر نمونه یادداشت گردید. در نهایت با رگرسیون خطی، یک معادله خطی بین غلظت آروماتیک در محلول و میزان جذب نور آن در  $\lambda_{max}$  به دست آمد. معادلات زیر به ترتیب رابطه بین غلظت بنزن و تولوئن و میزان جذب نوری آن‌ها را نشان می‌دهند:

35. Analyte

36. Beer- Lambert law

#### ۷- مدل سازی سینتیکی تجزیه زیستی

پس از انجام آزمایشات تجزیه زیستی بر روی آلاینده های بنزن و تولوئن، در مرحله آخر، مدل سازی سینتیکی فرایند تجزیه زیستی این آلاینده ها توسط باکتری استریتومایسس انجام گرفت. با استفاده از نتایج مدل سازی سینتیکی می توان عملکرد فرایند را بدون نیاز به آزمایش های مکرر پیش بینی کرد.

برای مدل سازی سینتیکی از مدل های متداول درجه اول، مدل بازداري میکائلیس- منتن (MMIM)<sup>۳۷</sup> و مدل فعال سازی میکائلیس- منتن (MMAM)<sup>۳۸</sup> استفاده شد. بر طبق نظر Nauman (۲۰۰۲)، مدل MMIM زمانی استفاده می شود که افزایش غلظت سوبسترا<sup>۳۹</sup> سبب کاهش سرعت تجزیه شود. با این حال در این کار از مدل MMAM نیز استفاده شد تا نشان داده شود آن مدل هم تا حدودی قادر به پیش بینی نتایج آزمایشگاهی است. معادلات مدل های سینتیکی اشاره شده، در زیر ارائه شده اند:

- مدل درجه اول:

$$-r_s = kC_s \quad (4)$$

- مدل بازداري میکائلیس- منتن (Nauman, ۲۰۰۲):

$$-r_s = \frac{kC_s}{1 + k_1C_s + k_2C_s^2} \quad (5)$$

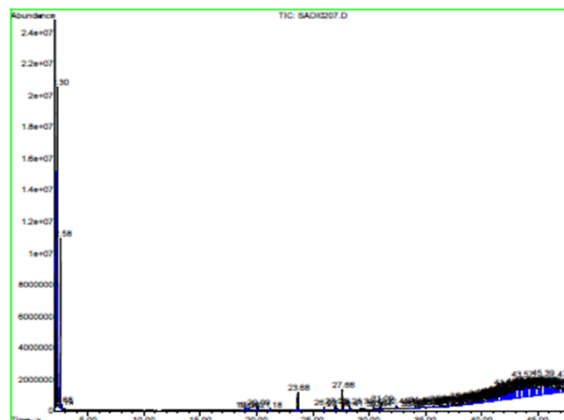
- مدل فعال سازی میکائلیس- منتن (Nauman, ۲۰۰۲):

$$-r_s = \frac{kC_s^2}{1 + k_1C_s + k_2C_s^2} \quad (6)$$

در معادلات فوق،  $-r_s$  نرخ تجزیه سوبسترا برحسب mol/L.day،  $C_s$  غلظت سوبسترا (بنزن یا تولوئن) برحسب mol/L،  $k$  ثابت سرعت واکنش، و  $k_1$  و  $k_2$  مقادیر ثابتی هستند که باید محاسبه شوند. ضرایب این سه مدل با استفاده از داده های آزمایشگاهی و به کمک رگرسیون خطی محاسبه گردیدند. در نهایت بهترین مدل سینتیکی از بین مدل های بررسی شده، از لحاظ دقت پیش بینی نتایج آزمایشگاهی انتخاب گردید. برای انجام رگرسیون خطی بر روی مدل های MMIM و MMAM از معادلات استخراج شده در کار Farzi و همکاران (۲۰۱۹) استفاده شد. برای بررسی دقت مدل ها از دو معیار آماری ضریب همبستگی<sup>۴۰</sup> ( $R^2$ ) و جذر متوسط مربعات خطا<sup>۴۱</sup> (RMSE) استفاده شد:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (7)$$

همکاران، ۲۰۰۷؛ Claessen و همکاران، ۲۰۰۶). شکل (۳) نتایج حاصل از آنالیز با دستگاه GC-MS و طیف مواد شناسایی شده را نشان می دهد.



شکل ۳- منحنی طیف تجزیه GC-MS برای نمونه حاوی بنزن به عنوان آلاینده

با بررسی طیف، نتایج مربوط به محصولات تجزیه، استخراج شده و در جدول (۲) خلاصه شده اند.

#### جدول ۲- شناسایی ترکیبات به دست آمده از طیف GC-MS برای محصولات تجزیه زیستی

| ردیف | نام ترکیب                    | فرمول مولکولی                                  | زمان بازداری (زمان ظاهر شدن طیف ترکیب) |
|------|------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------|
| ۱    | سیکلو هگزان                  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>                 | ۳/۲۸                                   |
| ۲    | سیکلو هپتاسیل کسان           | -                                              | ۲۳/۷۱                                  |
| ۳    | ۱ و ۴ بنزن دی کروکسیلیک اسید | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>   | ۲۴/۱۹-۲۴/۲۵                            |
| ۴    | تترادکانوئیک اسید            | C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> | ۲۸/۹۲                                  |
| ۵    | هگزادکانوئیک اسید            | C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> | ۳۳/۰۰                                  |
| ۶    | هپتادکانوئیک اسید            | C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | ۳۴/۹۴                                  |
| ۷    | اکتادکانوئیک اسید            | C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> | ۳۶/۴۲-۳۶/۷۸                            |

با توجه به نتایج جدول فوق، بیشتر محصولات تجزیه، اسیدهای ضعیف هستند که سبب کاهش pH و اسیدی شدن نمونه ها خواهند شد. در نتیجه، فعالیت و رشد باکتری در pH های اسیدی نسبت به pH بهینه ۷/۶ کاهش خواهد یافت. همچنین این ترکیبات در مقایسه با بنزن و تولوئن آلاینده های ضعیف تر با سمیت بسیار کم تر هستند.

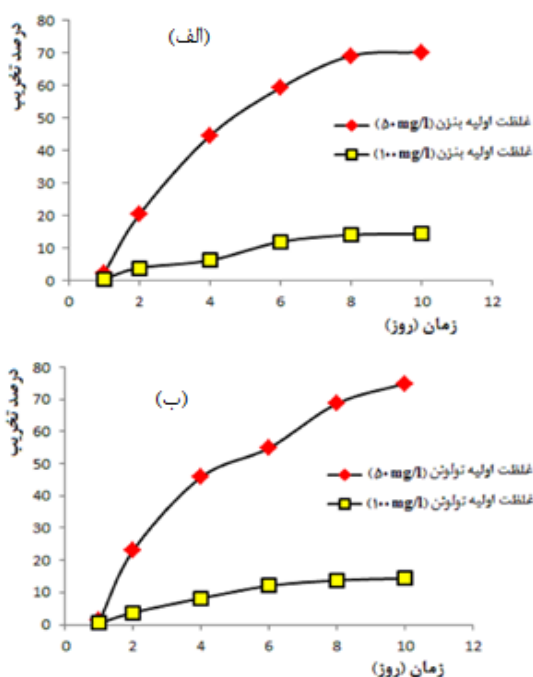
40. Correlation Coefficient

41. Root Mean of Square of Errors

37. Michaelis-Menten Inhibition Model

38. Michaelis-Menten activation model

39. Substrate



شکل ۴- منحنی درصد تجزیه زیستی: الف) بنزن، ب) تولوئن برحسب زمان قرارگیری در مقابل باکتری استرپتومایسس در غلظت‌های اولیه ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر

با مقایسه نتایج به‌دست‌آمده در این کار با نتایج کار Li و همکاران (۲۰۱۹)، مشخص شد که آن‌ها بعد از ۷ روز برای غلظت اولیه برابر ۳۰ mg/L بنزن و تولوئن بیش از ۸۰٪ تجزیه زیستی با استفاده از باکتری BN5 به‌دست آوردند، درحالی‌که در این کار در غلظت اولیه ۵۰ mg/L از بنزن و تولوئن، میزان تجزیه زیستی توسط باکتری استرپتومایسس پس از ۸ روز حدود ۷۰٪ بود. بنابراین، اعتبار نتایج آزمایشگاهی حاصل در این کار توسط کار Li و همکاران (۲۰۱۹) تأیید می‌شود. همچنین برای غلظت‌های اولیه پایین‌تر بنزن و تولوئن، باکتری استرپتومایسس عملکرد بهتری نسبت به باکتری BN5 خواهد داشت.

#### ۹- بررسی مدل سینتیکی تجزیه زیستی بنزن و تولوئن توسط باکتری استرپتومایسس

همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها گفته شد، در این کار، مدل‌سازی سینتیکی فرایند نیز انجام گرفت. سه مدل درجه اول، بازدارنده میکانیسم- منتن (MMIM) و فعال‌سازی میکانیسم- منتن (MMAM) ارزیابی شدند. ابتدا ضرایب مجهول مدل‌ها با رگرسیون خطی بر روی نتایج آزمایشگاهی و بر مبنای غلظت اولیه سوپسترا برابر ۵۰ mg/L محاسبه گردیدند. نتایج حاصل شامل ثابت‌های موجود در معادلات سرعت واکنش و دقت مدل‌ها در جدول (۳) گزارش شده‌اند. همان‌گونه که دیده می‌شود، مدل MMIM دارای دقت بالاتری نسبت به دو مدل دیگر است، چون

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (8)$$

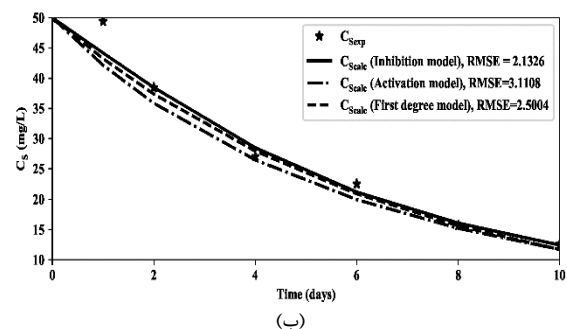
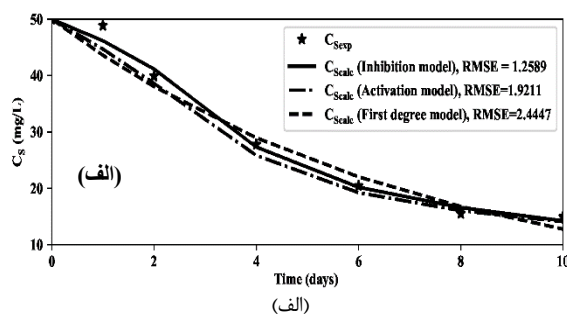
در معادلات فوق،  $y_i$ ،  $\hat{y}_i$  و  $\bar{y}$  به ترتیب، مقادیر آزمایشگاهی، محاسبه شده و متوسط مقادیر آزمایشگاهی متغیر وابسته هستند.

#### ۸- یافته‌ها و بحث

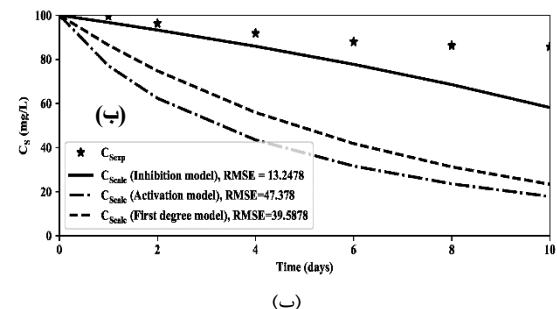
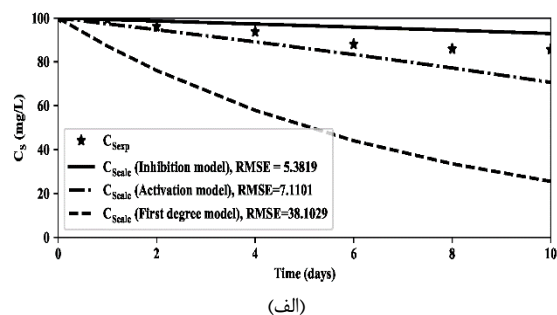
در طول موج‌های جذب به‌دست‌آمده برای بنزن و تولوئن که در بخش مواد و روش‌ها ذکر شد، جذب نوری نمونه‌های بنزن و تولوئن به‌همراه میزان تجزیه باکتری استرپتومایسس، یادداشت شده و درصد‌های تخریب بنزن و تولوئن به‌کمک معادله (۳) محاسبه شدند. شکل (۴) درصد‌های تخریب بنزن و تولوئن توسط باکتری را در روزهای مختلف نشان می‌دهد.

مطابق شکل (۴-الف) می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش زمان قرارگیری بنزن در مقابل باکتری، درصد تخریب بنزن رفته‌رفته افزایش می‌یابد تا به مقدار ۷۱/۴٪ برسد. همچنین وقتی غلظت اولیه بنزن ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر باشد، درصد تجزیه بسیار کم‌تر بوده و بعد از روز هشتم، درصد تجزیه بنزن به ۱۱/۵۶٪ می‌رسد. می‌توان گفت فعالیت باکتری در غلظت‌های بالاتر بنزن کم‌تر می‌شود. از شکل (۴-ب) می‌توان دید که با گذشت زمان درصد تخریب تولوئن نیز افزایش می‌یابد و به ازای غلظت اولیه تولوئن برابر ۵۰ mg/L به‌میزان ۷۴/۷۷٪ می‌رسد و سپس تقریباً ثابت می‌شود. همچنین، وقتی غلظت تولوئن ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در نظر گرفته شد، درصد تجزیه به‌دلیل غلظت بالاتر، کم‌تر شده و بعد از روز هشتم به ۱۳/۸۰٪ رسید و سپس ثابت شد.

در غلظت اولیه بالاتر بنزن و تولوئن درصد تخریب بسیار پایین‌تر از مقدار مورد انتظار است. این پدیده را می‌توان به ممانعت فضایی منبع کربن در برابر باکتری و همچنین سمیت آن برای باکتری ربط داد. یعنی با افزایش غلظت منبع کربن، فضای کم‌تری برای رشد باکتری در دسترس خواهد بود و همچنین سمیت ترکیبات آروماتیک مانع از رشد بیشتر باکتری‌ها می‌شود. اگرچه این باکتری‌ها برای این نوع از منابع کربن سازگاری دارند، با این‌وجود، غلظت‌های بالاتر آن‌ها، باز هم برای این باکتری سمی است و مانع از رشد مناسب باکتری می‌شود. همچنین طبق نتایج GC-MS در جدول (۲)، بیشتر محصولات تجزیه زیستی شناسایی شده اسیدی هستند و با افزایش مقدار آن‌ها در نمونه، pH محلول پایین آمده و به pH‌های اسیدی میل می‌کند. فعالیت باکتری نیز به‌دلیل اسیدی شدن محلول کاهش می‌یابد تا در نهایت رشد باکتری متوقف شده و درصد تخریب ثابت می‌ماند.



شکل ۵- منحنی تطابق داده‌های تجربی تغییرات غلظت سوپسترا بر حسب زمان به کمک مدل‌های سینتیکی برازش شده با غلظت اولیه سوپسترا برابر ۵۰ mg/L برای سیستم تجزیه زیستی: (الف) بنزن، (ب) تولوئن، وقتی غلظت اولیه برابر با ۵۰ mg/L بود



شکل ۶- منحنی تطابق داده‌های تجربی تغییرات غلظت سوپسترا بر حسب زمان به کمک مدل‌های سینتیکی برازش شده با غلظت اولیه سوپسترا برابر ۱۰۰ mg/L برای سیستم تجزیه زیستی: (الف) بنزن، (ب) تولوئن، وقتی غلظت اولیه برابر با ۱۰۰ mg/L بود

بالاترین ضریب همبستگی و کم‌ترین خطای کل (RMSE) را برای هر دو سوپسترای بنزن و تولوئن حاصل کرده است.

جدول ۳- داده‌های نتایج حاصل از برازش مدل‌های درجه اول و دوم بر روی داده‌های تجربی

| نوع سوپسترا | مدل سینتیکی | $k$    | $k_1$<br>$\times 10^{-2}$ | $k_2$<br>$\times 10^{-2}$ | $R^2$  | MSE    |
|-------------|-------------|--------|---------------------------|---------------------------|--------|--------|
| بنزن        | درجه اول    | ۰/۱۳۶۶ | -                         | -                         | ۰/۹۷۶۴ | ۲/۴۴۴۷ |
|             | MMIM        | ۰/۰۲۷۳ | -۰/۵۵۳۸                   | ۸/۶۷۶۷                    | ۰/۹۹۲۸ | ۱/۲۵۸۹ |
|             | MMAM        | ۱/۵۸۷۴ | -۰/۵۸۸۳                   | ۱۰/۹۵۹۳                   | ۰/۹۹۱۰ | ۱/۹۲۱۱ |
| تولوئن      | درجه اول    | ۰/۱۴۵۴ | -                         | -                         | ۰/۹۷۹۵ | ۲/۵۰۰۴ |
|             | MMIM        | ۰/۰۰۹  | -۲۶/۹۵۱۴                  | ۴/۵۱۸۶                    | ۰/۹۸۲۵ | ۲/۱۳۲۶ |
|             | MMAM        | ۱۹۲/۴۵ | ۱۵/۱۶۴۴                   | -۸۹/۶۴۵۴                  | ۰/۹۷۵۸ | ۳/۱۱۰۸ |

همچنین نمودارهای ارائه شده در شکل (۵) نتایج حاصل از برازش سه مدل سینتیکی بر روی داده‌های تجربی با غلظت اولیه سوپسترا برابر ۵۰ mg/L به ترتیب برای بنزن و تولوئن را نشان می‌دهند. همان‌طور که دیده می‌شود، در این غلظت اولیه، هر سه مدل برای هر دو آلاینده بنزن و تولوئن نتایج مناسبی دارند، ولی مدل MMIM دارای RMSE کم‌تری نسبت به دو مدل دیگر است که برتری آن را نسبت به دو مدل دیگر بیان می‌کند.

در ادامه، برای آنکه دقت مدل‌های به‌دست‌آمده با غلظت اولیه ۵۰ mg/L برای پیش‌بینی نتایج آزمایشگاهی با غلظت اولیه ۱۰۰ mg/L سنجیده شود، محاسبات میزان تجزیه زیستی با غلظت اولیه ۱۰۰ mg/L انجام شد، بدون آنکه دوباره برازش منحنی صورت گیرد. از نمودارهای ارائه‌شده در شکل (۶) مشخص است که مدل MMIM به‌مراتب دقت بالاتری دارد و عملاً می‌توان با دقت خوبی از آن برای پیش‌بینی تخریب زیستی هر دو سوپسترا حتی در غلظت اولیه دو برابر حالتی که برازش برای آن انجام شده است، استفاده کرد. بنابراین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده باز هم مشخص می‌شود که مدل بازداري میکائلیس-منتن برای حالتی که افزایش غلظت سوپسترا باعث کاهش تخریب زیستی آن می‌شود، تقریب بسیار بهتری نسبت به مدل‌های دیگر می‌دهد. همچنین مقایسه دیگری که می‌توان انجام داد، بین مدل درجه اول و مدل MMAM است.

از نمودارهای شکل (۶) ملاحظه می‌شود که مدل درجه اول باوجود ساده‌تر بودن، برای تولوئن از مدل MMAM نتایج بهتری را حاصل نموده است، اما در مورد بنزن، مدل MMAM بهتر از مدل درجه اول است.

## ۱۰- نتیجه گیری

ترکیبات آلی با ساختار پیچیده، به دلیل سمیت، سرطان‌زایی و قابلیت کم تجزیه بیولوژیکی از مهم‌ترین آلاینده‌های زیست-محیطی محسوب می‌شوند. در این میان هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای مانند آنتراسن<sup>۴۲</sup>، نفتالین، بنزن، فنانترون و تا حدی تولوئن از مهم‌ترین آلاینده‌های سمی و سرطان‌زا می‌باشند که در اثر دفع پسماندهای صنایع از جمله نفت و پتروشیمی، رنگ، لاستیک، داروسازی و پلاستیک باعث آلودگی خاک، آب و موجودات زنده و آثار سوء فراوانی می‌گردند. جهت پاک‌سازی این مواد، روش‌های زیستی و استفاده از پتانسیل میکروارگانیسم‌های بومی خاک به جهت ارزان و قابل‌دسترسی بودن بر سایر روش‌ها ترجیح داده می‌شوند.

این مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی برای تجزیه زیستی بنزن و تولوئن به عنوان آلاینده سرطان‌زا توسط باکتری استرپتومایسس که یک باکتری بومی و مقاوم در برابر تغییرات محیطی می‌باشد و از خاک اطراف تانکر نفت سفید در پالایشگاه تبریز جداسازی شده بود، انتخاب گردید.

در این تحقیق طول موج حداکثر جذب ماده موردنظر با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین و غلظت بنزن و تولوئن در نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی جذبی تعیین شد و درصد تخریب بنزن در محلول‌های نمونه‌گیری شده در روزهای مختلف آزمایش محاسبه گردید.

باکتری استرپتومایسس توانست غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بنزن و تولوئن را در شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷/۶ و در محیط هوازی در مدت ده روز به میزان قابل توجه ۷۱/۴٪ و ۷۴/۹۴٪ تجزیه کند. در همان شرایط، بنزن و تولوئن با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ۱۰ روز به میزان ۱۴/۴۰٪ و ۱۳/۸٪ تجزیه گردیدند.

در درصدهای بالاتر تجزیه، به صورت انتخابی چندین نمونه به وسیله دستگاه GC-MS آنالیز و بررسی شد و مشاهده گردید که مواد ثانویه حاصل از تجزیه زیستی سمیت و آلودگی کم‌تری نسبت به بنزن و تولوئن دارند.

برای بررسی مدل سینتیکی تجزیه بیولوژیکی بنزن و تولوئن به وسیله باکتری فوق، مدل‌های سینتیکی بازداري میکائلیس-منتن، فعال‌سازی میکائلیس-منتن و درجه اول مورد بررسی قرار گرفتند و مشاهده گردید که مدل بازداري میکائلیس-منتن دارای کم‌ترین خطا نسبت به داده‌های تجربی بود.

در این کار برای اولین بار از باکتری بومی استرپتومایسس استفاده شد که هم در کارهای دیگر تا به حال استفاده نشده است و هم این که یک باکتری بومی و سازگار با محیط زیست اطراف

پالایشگاه تبریز است. همچنین از رگرسیون خطی برای یافتن ضرایب مدل‌های پیچیده استفاده شده است، در حالی که در کارهای دیگر از رگرسیون غیرخطی استفاده می‌شد که در نتیجه ضرایب با خطا به دست می‌آمدند (Hazrati و همکاران، ۲۰۱۵).

به دلیل هزینه کم، دسترسی آسان به مواد اولیه و عملکرد قابل توجه باکتری‌های استرپتومایسس به عنوان تجزیه‌کننده زیستی، این باکتری‌ها می‌توانند جهت حذف آلاینده‌های آلی از محلول‌های حاوی بنزن و تولوئن به کار روند.

## ۱۱- مراجع

- Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K, Ignacimuthu S, "Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil", *Bioresource Technology*, 2012, 112, 83-90.
- Baoune H, Ould El Hadj-Khelil A, Pucci G, Sineli P, Loucif L, Polti MA, "Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 147, 602-609.
- Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HAB, "Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!", *Trends in Microbiology*, 2006, 14 (7), 313-319.
- Dou J, Ding A, Liu X, Du Y, Deng D, Wang J, "Anaerobic benzene biodegradation by a pure bacterial culture of *Bacillus cereus* under nitrate reducing conditions", *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22 (5), 709-715.
- Farzi A, Dehnad A, Fotouhi AF, "Biodegradation of polyethylene terephthalate waste using *Streptomyces* species and kinetic modeling of the process", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 17, 25-31.
- Feijoo-Siota L, Rosa-Dos-Santos F, de Miguel T, Villa TG, "Biodegradation of Naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* in Marine Environments: Testing Cells Entrapment in Calcium Alginate for Use in Water Detoxification", *Bioremediation Journal*, 2008, 12 (4), 185-192.
- Feyzi M, Shahbazi E, "Catalytic performance and characterization of Cs-Ca/SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> nanocatalysts for biodiesel production", *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2015, 404-405, 131-138.
- Hazrati H, Shayegan J, Seyed SM, "Biodegradation kinetics and interactions of styrene and ethylbenzene as single and dual substrates for a mixed bacterial culture", *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2015, 13 (1), 72.
- Johnsen AR, Karlson U, "Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63 (4), 452-459.

- Warden H, Richardson H, Richardson L, Siemiatycki J, Ho V, "Associations between occupational exposure to benzene, toluene and xylene and risk of lung cancer in Montréal", *Occupational and Environmental Medicine*, 2018, 75 (10), 696.
- Weinstein MP, "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard", USA, CLSI, 2018, 11 ed.
- Jussara PD, Francisca PdF, "Biodegradation of crude oil in sandy sediment", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1999, 44 (2-3), 87-92.
- Lee Y, Lee Y, Jeon CO, "Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil", *Scientific Reports*, 2019, 9 (1), 860.
- Leonardi V, Šašek V, Petruccioli M, D'Annibale A, Erbanová P, Cajthaml T, "Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 60 (3), 165-170.
- Li YY, Zheng X, Li B, Li B, "Influence of biosurfactant on the diesel oil remediation in soil-water system", *Journal of Environmental Sciences*, 2006, 18 (3), 587-590.
- Mesgari Shadi A, Yaghmaei S, Vafaei F, Khataee AR, Hejazi MS, "Degradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) from aqueous solution by isolated bacteria from contaminated sites", *Research on Chemical Intermediates*, 2015, 41 (1), 265-275.
- Nauman EB, "Chemical reactor design, optimization, and scaleup", New York, USA, McGraw-Hill, 2002.
- NCBI. 2020. *Streptomyces ambofaciens* strain Azar411 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 20122020]. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/385844747>.
- Otenio MH, da Silva MTL, Marques MLO, Roseiro JC, Bidoia ED, "Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* ccmi 852", *Brazilian Journal of Microbiology*, 2005, 36, 258-261.
- Rosell-Melé A, Moraleda-Cibrián N, Cartró-Sabaté M, Colomer-Ventura F, Mayor P, Orta-Martínez M, "Oil pollution in soils and sediments from the Northern Peruvian Amazon", *Science of The Total Environment*, 2018, 610-611, 1010-1019.
- Singh A, Van Hamme JD, Ward OP, "Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects", *Biotechnology Advances*, 2007, 25 (1), 99-121.
- Southam G, Whitney M, Knickerbocker C, "Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: implications for bioremediation", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2001, 47(4), 197-201.
- Straube WL, Nestler CC, Hansen LD, Ringleberg D, Pritchard PH, Jones- Meehan J, "Remediation of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation", *Acta Biotechnologica*, 2003, 23 (2-3), 179-196.
- Sungpetch A, "Bioremediation of crude oil and standard hydrocarbons in soil", PhD Thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1998.
- Swinehart DF, "The Beer- Lambert Law", *Journal of Chemical Education*, 1962, 39 (7), 333-335.

## EXTENDED ABSTRACT

# Biodegradation of Benzene and Toluene by *Streptomyces* Species Isolated From the Soil of Tabriz Refinery, Eastern-Azerbaijan and Investigation of the Kinetic Model

Ali Farzi<sup>a</sup>, Najibeh Shirzad<sup>b</sup>, Alireza Dehnad<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, University of Tabriz, Tabriz 5166616471, Iran

<sup>b</sup> Young Researchers and Elite Club, Ilkhchi Branch, Islamic Azad University, Ilkhchi, Iran

<sup>c</sup> Microbiology and Biotechnology Department, East Azerbaijan Research and Education Center Agricultural and Natural Resources, Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREEO, Tabriz, Iran

Received: 18 June 2018; Accepted: 10 January 2021

### Keywords:

Biodegradation, Aromatic pollutant, *Streptomyces*, Michaelis-menten inhibition model, Michaelis-menten activation model.

## 1. Introduction

Aromatic hydrocarbons are an important group of environmental pollutants that are produced from different sources such as refineries and petrochemical, pharmaceutical, paint, and plastics industries. These environmental pollutants can be removed by different methods such as evaporation, chemical degradation, biological degradation, and adsorption. Biological methods are preferred selective methods because of their simplicity, utilization of environmental-friendly microorganisms, and production of safe materials such as water and carbon dioxide (Singh et al. 2007). Bioremediation is a process for the conversion of toxic materials into non-toxic and safe ones based on the metabolic activity of microorganisms capable of using organic and petroleum pollutants as carbon and energy sources. It is a useful technology with no environmental disruption (Sungpetch 1998). *Streptomyces* species, which belong to the category of Actinomycetes, are gram-positive and non-moving strains. Most of them produce spores and produce most of the clinically useful antibiotics of natural origin. These species have a different genus, and some of them can degrade aromatic compounds such as benzene, toluene, and even complex petroleum compounds (Claessen et al., 2006).

## 2. Methodology

### 2.1. Experimental study

In this work, biodegradation of benzene and toluene by *Streptomyces* species isolated from petroleum-contaminated soil in Tabriz Refinery was studied. Solutions containing bacterial strains were prepared using a Tryptic Soy Broth culture medium and adding a certain number of strains to it based on half McFarland standard and incubated for about 3 h (Weinstein 2018). In this study, four parameters, including pollutant type, its initial concentration, different *Streptomyces* species, and incubation time, were examined. Benzene and toluene were prepared separately in a sterilized liquid medium with concentrations of 50 and 100 mg/L and were added into the culture medium containing bacteria. Five different *Streptomyces* species were tested. The solution samples were incubated in a shaker incubator for 10 days at a temperature of 28 °C and a pH of 7.6. Each day a sample was obtained from tubes containing incubated samples and degradation rates of pollutants in each sample were obtained by double-beam spectrophotometer. The resulting metabolite with the highest

\* Corresponding Author

E-mail addresses: a-farzi@tabrizu.ac.ir (Ali Farzi), sanamshirzad@yahoo.com (Najibeh Shirzad), a.dehnad@areeo.ac.ir (Alireza Dehnad).

degradation rate, was analyzed by GC-MS apparatus. It was found that *Streptomyces ambofaciens* Azar411 species had the maximum biodegradation percentage compared to other strains.

## 2.2. Modeling

Also, kinetic modeling of the biodegradation process of benzene and toluene was assessed in order to reveal degradation kinetics and to predict process performance at different initial concentrations of pollutants. The following mole balance equation can be written for the degradation of the substrate (benzene or toluene) by bacteria.

$$\frac{dC_s}{dt} = -(-r_s) \quad (1)$$

Where  $C_s$  ( $\text{molL}^{-1}$ ) is the concentration of substrate,  $t$  is time in days, and  $-r_s$  ( $\text{molL}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) is the rate of consumption of substrate by bacteria. Conventional models including first order, Michaelis-Menten Inhibition (MMI), and Michaelis-Menten Activation (MMA) models (Farzi et al. 2019) were utilized as reaction rate equations and their parameters were calculated using linear regression.

## 3. Results and discussion

Fig. 1 shows results of biodegradation of benzene and toluene by *Streptomyces ambofaciens* Azar411 species for 10 days of incubation. As can be seen, more than 70% of benzene and toluene were degraded with an initial pollutant concentration of 50mg/L was degraded by the bacteria. But the degradation efficiency was much lower for higher initial concentrations of substrates which can be due to the inhibition effect of substrates and also the reduction of space for bacteria to degrade the pollutants.

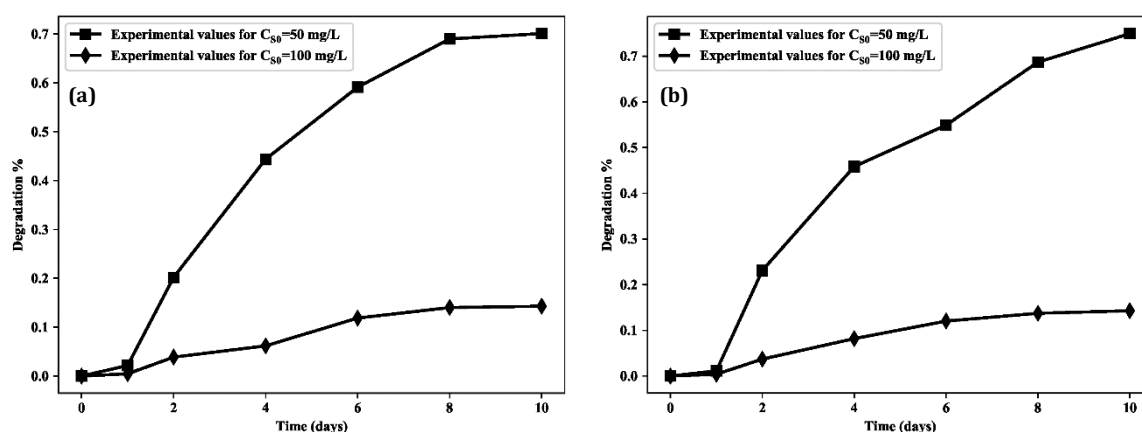


Fig. 1. Biodegradation percent of: a) benzene, b) toluene by *Streptomyces ambofaciens* Azar411 species with respect to time

GC-MS analysis of the metabolite after incubation revealed that no highly toxic components were produced during biodegradation process. Fig. 2 shows the results of kinetic modeling of the biodegradation process of benzene and toluene using three different models discussed above. As can be seen, Michaelis-Menten Inhibition Model resulted in the best fit on experimental results for both pollutants, which validates the claim about the inhibition effect of toxic pollutants on bacterial species.

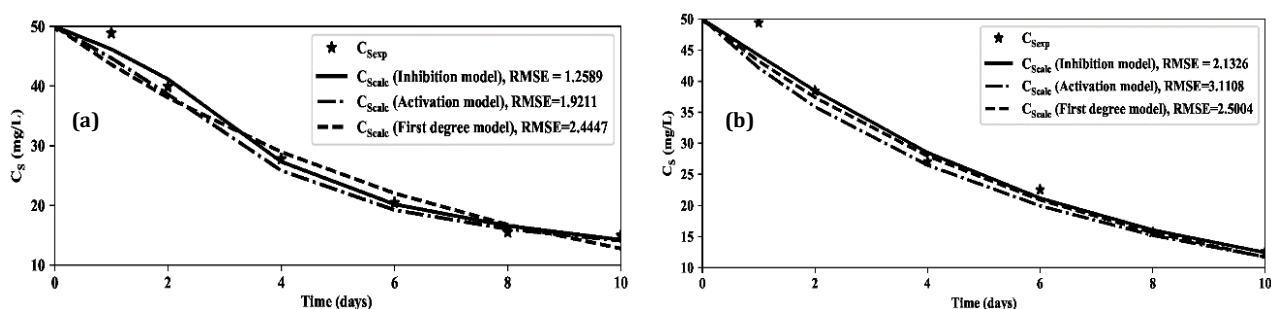


Fig. 2. Kinetic modeling results for biodegradation of: a) benzene, b) toluene by *Streptomyces* species

#### 4. Conclusions

In this work, the biological degradation of two organic pollutants, including benzene and toluene using different *Streptomyces* species was investigated. It was observed that, more than 70% of the pollutants were degraded after 10 days of incubation for pollutant initial concentration of 50 mg/L. It was also revealed that increasing the initial concentration of the pollutant sharply decreased degradation efficiency. GS-MS analysis of the most degraded sample showed that no highly toxic components were produced and the process is environmentally safe, though it is slow compared to other methods. Also, for a better understanding of the degradation process, it was modelled kinetically using different conventional models and the results revealed that the Michaelis-Menten Inhibition model best fitted experimental results. Based on the results of this work, it can be concluded that *Streptomyces* species are a good choice for biodegradation of organic and petroleum pollutants because of their ease of access, production of non-toxic materials, and good performance in harsh environments.

#### 5. References

- Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HAB, "Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!", *Trends in Microbiology*, 2006, 14 (7), 313-319.
- Farzi A, Dehnad A, Fotouhi AF, "Biodegradation of polyethylene terephthalate waste using *Streptomyces* species and kinetic modeling of the process", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 17, 25-31.
- Singh A, Van Hamme JD, Ward OP, "Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects", *Biotechnology Advances*, 2007, 25 (1), 99-121.
- Sungpetch A, "Bioremediation of crude oil and standard hydrocarbons in soil", PhD Thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1998.
- Weinstein MP, "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard", USA, CLSI, 2018, 11 ed.