

Biodegradation of benzene and toluene using indigenous bacteria extracted from the soil of northwest Iran

Lida Eftekhari-Vash

Assistant Professor of Microbiology,
Department of Microbiology, Faculty of
Basic Sciences, Maragheh Branch,
Islamic Azad University, Maragheh, Iran.

Ali-Reza Dehnad

*Assistant Professor of Microbiology,
Department of Bacterial Diseases
Research, Razi Vaccine and Serum
Research Institute, Agricultural
Research, Education and Extension
Organization (AREEO), Karaj, Iran.

a.dehnad@areeo.ac.ir

Mohammad Majdizadeh

MSc. Nano-Biotech Foresight Company
Biotechnology Campus, Science &
Technology Park of Yazd, Yazd, Iran.

Received: 2022/11/06

Accepted: 2023/02/09

Document Type: Research article

Doi:10.22038/jreh.2023.66706.1530

ABSTRACT

Background and purpose: Considering the role of hydrocarbon pollution in cancer, this research aims to investigate the degradation rate of benzene and toluene using bacteria extracted from soil, as well as to examine the compounds resulting from this decomposition.

Materials and Methods: Thirty soil samples, including agricultural soil and soil contaminated with hydrocarbons, were collected from the northwestern provinces of Iran. Bacteria were cultured in agar medium and subsequently extracted. To assess the decomposition of benzene and toluene, bacteria were separately cultured in a mineral culture medium containing a specific amount of benzene or toluene, and the percentage of decomposition was determined. Additionally, GC-Mass analysis was conducted to identify the compounds resulting from the decomposition of benzene and toluene. The type of bacteria responsible for the degradation was determined using biochemical methods and PCR.

Results: All the extracted bacteria exhibited the ability to decompose benzene and toluene, with the highest decomposition rates observed in bacteria extracted from refinery soil, averaging 55.85% for benzene and 49.39% for toluene. Agricultural and refinery soil bacteria displayed a higher decomposition rate for benzene compared to toluene. The majority of the compounds obtained from the decomposition had lower toxicity than benzene and toluene. Furthermore, the presence of the *Streptomyces* strain was confirmed in environments with the highest decomposition rates for benzene and toluene.

Conclusion: *Streptomyces* strains indigenous to soils contaminated with hydrocarbons demonstrated a high efficiency in converting benzene and toluene into organic compounds, reducing the associated risks.

Keywords: Benzene, Toluene, Carcinogenic compounds, Biodegradation, *Streptomyces*

Citation: Eftekhari-Vash L, Dehnad AR, Majdizadeh M. Biodegradation of benzene and toluene using indigenous bacteria extracted from the soil of northwest Iran. *Journal of Research in Environmental Health*. 2023; 9(1):34-49.

تجزیه زیستی بنزن و تولوئن با استفاده از باکتری‌های بومی استخراج شده از خاک شمال غرب ایران

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به نقش آلودگی‌های هیدروکربنی در ابتلاء به سرطان، پژوهش حاضر با هدف بررسی میزان تجزیه بنزن و تولوئن با استفاده از باکتری‌های استخراج شده از خاک و بررسی ترکیبات حاصل از این تجزیه انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۳۰ نمونه خاک شامل خاک کشاورزی و خاک آلوده به هیدروکربن‌ها از استان‌های شمال غرب ایران تهیه گردید. باکتری‌ها در محیط کشت آگار کشت داده شده و استخراج گردیدند. به منظور بررسی تجزیه بنزن و تولوئن، باکتری‌ها در محیط کشت معدنی (به صورت جدا) که در آنها مقدار مشخصی بنزن و تولوئن (به صورت جدا)، کشت داده شد، درصد تجزیه مشخص گردید. در پایان با استفاده از کروماتوگرافی گازی ترکیبات حاصل از تجزیه بنزن و تولوئن شناسایی و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و PCR، نوع باکتری تجزیه کننده بنزن و تولوئن، تعیین شد.

یافته‌ها: تجزیه بنزن و تولوئن توسط همه باکتری‌های استخراج شده انجام گرفت، اما بیشترین آن توسط باکتری‌های خاک پالایشگاه به ترتیب برای بنزن (۵۵/۸۵٪) و تولوئن (۴۹/۳۹٪) بود. همچنین تجزیه بنزن نسبت به تولوئن توسط باکتری‌های خاک کشاورزی و پالایشگاه بیشتر بود. اکثر ترکیبات حاصل از تجزیه، نسبت به بنزن و تولوئن، از سمیت پایین تری برخوردار بود. همچنین حضور سویه استریپتومایسس در محیط‌هایی با بیشترین تجزیه بنزن و تولوئن تأیید گردید.

نتیجه گیری: استریپتومایسس بومی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها، می‌تواند با کارایی بالا، بنزن و تولوئن را به ترکیبات آلی، با خطر کمتر تبدیل نمایند.

کلیدواژه‌ها: بنزن، تولوئن، ترکیبات سرطان‌زا، تجزیه زیستی، استریپتومایسس

لیدا افتخاری وش

استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران.

علیرضا دهناد

* استادیار، گروه تحقیقات بیماری‌های باکتریایی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. (نویسنده مسئول):
a.dehnad@areeo.ac.ir

محمد مجد زاده

کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست فناوری، شرکت ریز زیست فناوران فردانگر، پارک علم و فناوری یزد، یزد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۰

نوع مقاله: پژوهشی

◀ **استناد:** افتخاری وش ل، دهناد ع، مجد زاده م. تجزیه زیستی بنزن و تولوئن با استفاده از باکتری‌های

بومی استخراج شده از خاک شمال غرب ایران. *فصلنامه پژوهش در بهداشت محیط*. بهار ۱۴۰۲؛ ۹ (۱):

(۳۴-۴۹).

آلودگی‌های زیست‌محیطی در دهه‌های اخیر افزایش چشمگیری داشته است (۱)، بنابراین توجه زیادی از پژوهشگران را به‌ویژه در حوزه آلودگی‌های وابسته به صنایع نفت و پتروشیمی به خود معطوف نموده است (۱، ۲). نفت خام ترکیب پیچیده‌ای از انواع هیدروکربن‌ها است که می‌تواند آثار سمی و مخربی را روی موجودات زنده داشته باشد (۱، ۳)؛ به‌گونه‌ای که ترکیبات نفتی که شامل ۴ گروه مهم آسفالتن‌ها، هتروسیکل‌ها، آروماتیک‌ها و آلیفاتیک‌ها هستند، از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های شیمیایی به‌شمار می‌روند (۴)، تا جایی که ترکیبات آروماتیک آن می‌تواند اثرات نامناسبی را نظیر افزایش خطر ابتلاء به سرطان و سقط جنین در انسان، به‌دنبال داشته باشد (۵، ۶). بنزن و تولوئن، دو حلال تک‌آروماتیک می‌باشند که استفاده گسترده‌ای در صنعت به‌منظور تولید چسب، رقیق‌کننده، پاک‌کننده لاک ناخن، رنگ و غیره دارند (۷). تولوئن که شکل متیله شده بنزن است، یکی از محصولات هیدروکربنی حاصل از فعالیت‌های پتروشیمی می‌باشد که گزارش‌هایی مبنی بر سرطان‌زایی آن منتشر گردیده است؛ به‌گونه‌ای که برخی پژوهش‌ها افزایش فسفولاسیون پروتئین ضد توموری P53 را در حضور تولوئن گزارش نموده‌اند (۸، ۹). این هیدروکربن که به سرعت از طریق دستگاه تنفسی و دستگاه گوارش و به میزان کمتری از طریق پوست جذب می‌شود (۱۰)، هنوز اثرات سرطان‌زایی آن قطعی نبوده (۱۱)، ولی پنومونیت شیمیایی، تحریک دستگاه گوارش، آسیب ریوی، استفراغ، تهوع، آسیب دستگاه عصبی (با عبور از سد خونی مغزی بر رفتار، شناخت و یکپارچگی نورون‌ها تأثیر می‌گذارد) و غیره در افرادی که در معرض تولوئن قرار گرفته‌اند، مشاهده شده است (۷، ۱۲-۱۴).

برخلاف تولوئن، بنزن با فرمول شیمیایی C_6H_6 ، به‌عنوان یک عامل سرطان‌زایی قطعی معرفی شده است (۷، ۱۵، ۱۶) که قرارگیری در معرض آن می‌تواند منجر به بروز آسیب‌های ژنتیکی شود. برخی مطالعات نشان می‌دهند که شیوع میکرونوکلتوس و ناهنجاری‌های ژنتیکی در افرادی که در معرض این هیدروکربن قرار گرفته‌اند، فراوان‌تر است. کاهش گلبول‌های سفید، کاهش پلاکت‌های خون، اثر منفی بر مغز استخوان و لوسمی حاد میلوئیدی، از جمله اثرات نامناسب بنزن بر انسان است. مطالعات متعددی ارتباط معناداری را میان بنزن و خطر ابتلاء به سرطان

نشان داده‌اند (۷، ۱۶، ۱۷). تالیباو و همکاران نشان دادند که قرار گرفتن در معرض بنزن، خطر ابتلاء به سرطان روده بزرگ را به‌ویژه در زنان افزایش می‌دهد (۱۸). از سوی دیگر برخی پژوهش‌ها از نقش بارز این هیدروکربن ۶ کربنه در ایجاد سرطان خون سخن گفته‌اند. همچنین بنزن می‌تواند منجر به تولید ترکیبات نوکلئوفیل شود که مستقیماً بر DNA اثر گذاشته و باعث ایجاد تغییراتی در DNA می‌گردد (۱۹-۲۱).

با توجه به افزایش روزافزون جمعیت انسانی و نیاز بیشتر به انرژی، استفاده از سوخت‌های فسیلی مانند نفت افزایش فراوانی یافته است که به‌تبع آن میزان هیدروکربن‌های آلاینده حاصل از آن مانند بنزن و تولوئن در محیط زیست، بیشتر شده است (۲۲). از آنجایی که مشخص شده است چندین ترکیب آروماتیک می‌توانند در حیوانات آزمایشگاهی سرطان ایجاد کنند و مطالعات اپیدمیولوژیک کارگران در معرض تماس، به‌ویژه در کوره‌های کک و کارخانه‌های ذوب آلومینیوم، شیوع زیاد سرطان ریه و سرطان مثانه را نشان داده است (۲۳)، بنابراین استفاده از روش‌های ساده و کاربردی به‌منظور حذف و پاک‌سازی آلاینده‌های هیدروکربنی می‌تواند نقش بسزایی در حفاظت از محیط زیست و انسان داشته باشد.

هرچند برای تجزیه هیدروکربن‌های آلاینده از روش‌هایی نظیر شستشو، دادن گرما و تجزیه شیمیایی می‌توان استفاده نمود، اما این روش‌ها عمدتاً با چالش‌هایی نظیر گران بودن، عدم تجزیه کامل هیدروکربن‌ها و غیره همراه است (۲۴-۲۶). یکی از روش‌های ساده، ارزان و کاربردی در پاک‌سازی آلاینده‌های هیدروکربنی، روش بیولوژیکی است (۲۶). در این روش از میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری و قارچ برای حذف هیدروکربن‌های آلاینده استفاده می‌شود (۲۷). در واقع هیدروکربن‌ها منبع کربن و انرژی برای گروهی از میکروارگانیسم‌ها به‌شمار می‌آیند که این میکروارگانیسم‌ها، حین استفاده از این ترکیبات، آنها را به ترکیباتی با درجه خطر پایین تبدیل می‌کنند (۲). در این بین، خاک به‌عنوان بخش جدایی‌ناپذیر اکوسیستم، سیستمی پویا است که در آن رابطه بین مواد معدنی، مواد آلی و موجودات زنده به‌طور مداوم وجود دارد و میکروفلورا، بخشی جدایی‌ناپذیر از این سیستم پیچیده است که در آن باکتری‌ها، هم از نظر تعداد و هم از نظر تنوع،

استفاده در ساخت محیط کشت، متعلق به شرکت Merck آلمان و شرکت Sigma Aldrich آمریکا بودند. نوع وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده در پژوهش و شرکت سازنده آن، در متن مقاله قرار داده شده است.

تهیه خاک از مناطق مختلف شمال غرب ایران

از خاک مناطق کشاورزی استان‌های شمال غرب ایران شامل آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، زنجان، اردبیل، کردستان و کرمانشاه، ۱۵ نمونه خاک و از خاک‌های آلوده به محصولات نفتی پالایشگاه تبریز ۱۵ نمونه خاک از قسمت ریزوسفر در اواسط بهار با حفر چاله‌های به عمق و عرض ۳۰ سانتی‌متر به صورت تصادفی جمع‌آوری شد و نمونه‌های جمع‌آوری شده هر منطقه درون ظروف خاصی قرار داده شده و مشخصات جغرافیایی هر منطقه روی ظرف خاک آن منطقه برچسب زده شد. سپس از هر یک از نمونه خاک‌ها غلظت‌های 10^{-1} تا 10^{-4} گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه گردید. در ادامه، محیط کشت آگار تهیه و pH آن به ۷ رسانده شد و در نهایت این محیط کشت اتوکلاو گردید. از هر یک از رقت‌های تهیه شده قبلی که مربوط به هر نمونه خاک بودند، ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت آگار اضافه گردید و به وسیله اسپریدر در سطح پلیت پخش گردید. سپس پلیت‌های آماده شده درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز نگهداری شد. پس از گذشت این زمان و رشد کلنی‌ها در محیط کشت، برای هر نمونه، پلیتی که حاوی بهترین و بیشترین نمونه باکتری بود انتخاب و برای به دست آوردن تک‌کلونی بروش تست خطی، با استفاده از لوپ، کلونی مربوط به هر باکتری جدا و مجدد در محیط آگار کشت داده شد. در ادامه پلیت‌های حاوی محیط کشت و باکتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز نگهداری شد. به منظور رعایت شرایط تعادل و یکنواختی در کل آزمایش، باید از هر کدام از سویه‌های میکروبی رقتی تهیه می‌شد که شمارش تعداد باکتری‌های آنها با یکدیگر برابر باشد. برای این منظور در این پژوهش، سوسپانسیون میکروبی با حل کردن چند عدد از کلونی‌های هر باکتری در ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع Tryptic Soy Broth و قرار دادن آن در انکوباتور به مدت ۳ ساعت و مقایسه و برابر کردن کدورت آن با کدورت استاندارد نیم مک فارلند ساخته شد (۳۴).

بزرگ‌ترین گروه میکروبی‌های آن را شامل می‌شود (۲۸). از این رو استفاده از باکتری‌های بومی خاک، روشی کارآمد در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به آلودگی‌های نفتی به شمار می‌آید که در سالیان اخیر با توجه به کارایی زیاد و صرفه اقتصادی بالا، توجه زیادی را به خود جلب نموده است (۲۹). اسموتک و همکاران نشان دادند که باکتری‌های سودوموناس و برونیدی موناس، توانایی بالایی در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک در روغن کرئوزوت دارند (۳۰). همچنین چانگ و همکاران گزارش نمودند که سویه‌هایی از سرده Rhodopseudomonas استخراج شده از خاک شالیزارهای تایوان می‌توانند ترکیب هیدروکربنی هگزا برومو سیکلودودکان را به مقدار زیادی تجزیه نمایند (۳۱). چوا و همکاران نیز نشان دادند که ترکیبی از باکتری‌های مختلف می‌تواند نقش مهمی در تجزیه زیستی آلودگی‌های نفتی داشته باشد (۳۲).

با توجه به اینکه کشور ایران یکی از قطب‌های صنایع نفت و پتروشیمی در خاورمیانه است و بسیاری از صنایع وابستگی مستقیم و یا غیرمستقیم با محصولات نفتی دارند (۲، ۳۳)، و به تبع آن آلودگی‌های زیست‌محیطی محصولات استخراج شده از نفت نیز افزایش یافته است. بنابراین ارائه راهکارهایی نوین همراه با کم‌ترین آسیب زیست‌محیطی می‌تواند کمک بسیار زیادی در جهت کاهش این آلودگی‌ها نماید. بر همین اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی میزان تجزیه ترکیبات آلاینده و سرطان‌زای هیدروکربنی بنزن و تولوئن با استفاده از باکتری‌های استخراج شده از خاک مناطق مختلف، بررسی ترکیبات حاصل از این تجزیه زیستی و شناسایی سویه‌هایی از باکتری‌ها با بیشترین توانایی در تجزیه این ترکیبات آروماتیک انجام شد.

روش کار

پژوهش حاضر نوعی مطالعه آزمایشگاهی بود که طی ۶ ماه در سال ۱۴۰۰ خورشیدی در دانشگاه آزاد واحد مراغه به انجام رسید.

مواد مورد استفاده

کیت High Pure PCR Product Purification Kit متعلق به شرکت Roche سوئیس، محیط کشت Tryptic Soy Broth متعلق به شرکت Merck آلمان، ترکیبات مورد استفاده در روش PCR، ایزوپروپانول، اتانول، بنزن، تولوئن و ترکیبات مورد

تهیه محیط کشت معدنی

در این پژوهش ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی شامل Na_2HPO_4 (سدیم هیدروژن فسفات) به مقدار ۶ گرم بر لیتر، KH_2PO_4 (پتاسیم هیدروژن فسفات) به مقدار ۳ گرم بر لیتر، NaCl (سدیم کلرید) به مقدار ۰/۵ گرم بر لیتر، NH_4Cl (آمونیم کلرید) به مقدار ۱ گرم بر لیتر، MgSO_4 (منیزیم سولفات) به مقدار ۰/۵ گرم بر لیتر، CaCl_2 (کلسیم کلرید) به مقدار ۰/۱۵ گرم بر لیتر و بنزن و تولوئن هر کدام به مقدار ۵۰ میلی لیتر تهیه گردید. در ادامه، ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت معدنی درون فالکون هایی که تعداد آنها ۲ برابر سویه های میکروبی بود، ریخته و اتوکلاو گردید. سپس، ۱ میلی لیتر بنزن یا تولوئن، درون هر فالکن ریخته و ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی هر سویه که رقت و کدورت آن معادل استاندارد نیم مک فارلند بود، اضافه گردید. ۲ عدد فالکون نیز که یکی حاوی محیط کشت و بنزن با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر و دیگری حاوی محیط کشت و تولوئن با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود، به عنوان شاهد تهیه شد. فالکون های آماده شده، داخل انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و سرعت چرخش ۱۱۰ دور در دقیقه برای مدت یک هفته نگهداری شد (۳۴).

بررسی تجزیه هیدروکربن های بنزن و تولوئن به وسیله سویه های باکتریایی

پس از سپری شدن مدت زمان تیمار، به منظور مشخص کردن اینکه آیا باکتری ها بنزن و تولوئن را تجزیه کرده و یا هیچ اثری روی آن نداشته، هیدروکربن های محیط کشت با استفاده از اتانول خالص و قیف دکانتور جدا شد. برای این منظور محتویات هر فالکون درون قیف دکانتور تخلیه و به آن ۵ میلی لیتر اتانول خالص اضافه گردید. پس از گذاشتن در قیف و چند بار سر و ته کردن، ۲ فاز در داخل قیف ایجاد شد که فاز بالایی مربوط به اتانول و هیدروکربن ها (شفاف) و فاز پایین مربوط به باکتری و محیط کشت بود. سپس اتانول و هیدروکربن های محلول در آن جمع آوری و قبل از خوانش میزان جذب نور، درون یخچال نگهداری شد.

تعیین طول موج ماکزیمم و رسم نمودار استاندارد بنزن و تولوئن

به منظور رسم منحنی استاندارد، محلول هایی با غلظت مختلف از بنزن و تولوئن، در کلروفورم تهیه گردید و طیف جذبی مربوط به

هر کدام از محلول ها در محدوده ۵۰۰-۲۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر دو شعاعی (مدل Shimadzu UV 1700 ساخت ژاپن) ثبت گردید. همچنین حداکثر پیک جذب نوری هر یک از هیدروکربن ها به عنوان طول موج ماکزیمم (λ_{max}) مربوط به آنها می باشد که جهت سنجش های جذبی نمونه های تیمار شده در همان طول موج استفاده خواهد شد. پس از خوانش جذب نمونه ها و مقایسه طیف نمونه ها با نمودار استاندارد و با استناد به رابطه ۱، درصد تجزیه هیدروکربن محاسبه شد.

$$\text{درصد تخریب} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

که در این رابطه A_1 ، جذب هیدروکربن قبل از تخریب توسط میکروارگانیسم و A_2 ، جذب هیدروکربن بعد از تخریب توسط میکروارگانیسم بود.

انتخاب باکتری هایی با بیشترین میزان تجزیه بنزن و تولوئن

در این مرحله، نمونه خاک هایی که باکتری های آن بیشترین میزان تجزیه بنزن و تولوئن را داشتند، برای انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب شدند.

بررسی ترکیبات حاصل از تجزیه زیستی هیدروکربن ها

در این مرحله ترکیبات حاصل از تجزیه بنزن و تولوئن در نمونه خاک هایی که بیشترین میزان تجزیه را داشتند، شناسایی شد. برای تعیین دقیق نوع و مقدار ترکیب محصول، نمونه ها توسط دستگاه GC-Mass (مدل AGilent ساخت آمریکا) ارزیابی شد و نوع و میزان درصد مواد در متابولیت مشخص، بررسی گردید.

شناسایی سویه هایی با بیشترین میزان تجزیه و شناسایی آنها

در این مرحله، جهت شناسایی باکتری هایی که بیشترین نقش را در تجزیه بنزن و تولوئن داشتند، سویه هایی که باعث تخریب هیدروکربن های بنزن و تولوئن با بیشترین میزان تخریب شدند، انتخاب و جدا شده و با استفاده از ویژگی های ظاهری کلنی و همچنین تست های بیوشیمیایی شامل تجزیه نشاسته، تست کاتالاز، مصرف فروکتوز، مصرف گالاکتوز، تست کازاین، تست اکسیداز، مصرف سوکروز، رشد در نمک ۳٪، سویه های باکتری شناسایی گردید (۳۵، ۳۶) و در نهایت به منظور اطمینان از شناسایی نوع سویه، DNA باکتری استخراج و برای ژن

درون تیوب با ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ شستشو داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر به ویال‌ها اضافه شده و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت DNA استخراجی، از طریق مقایسه با سایز مارکر بر روی ژل آگارز تخمین زده شد.

شناسایی مولکولی سویه‌ها

استفاده از شناسایی توالی حفاظت شده ژن 16Sr RNA باکتری‌ها، روشی است که می‌توان از آن برای شناسایی جنس باکتری استفاده کرد. طول این ژن در اکثر گونه‌های استرپتومایسس تعیین توالی شده، حدود ۱۵۰۰ bp می‌باشد که حاوی درصد بسیار بالایی سیتوزین و گوانین است. در جهت تأیید مشاهدات مورفولوژیکی و برای حصول اطمینان از استرپتومایسس بودن ایزوله‌ها، توالی 16sr RNA آنها مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی پرایمر

طراحی پرایمرها بر اساس توالی استخراج شده از بانک ژن NCBI و با استفاده از نرم‌افزار OLIGO صورت گرفت (جدول ۱). پرایمرها به گونه‌ای طراحی شدند تا بتوان ژن را به‌طور کامل جدا کرد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده و خصوصیات آنها

5-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3	فوروارد
5-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3	ریورس

گرفت و میکروتیوب در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در ترموسایکلر، به ترتیب مرحله دناتوره کردن اولیه به مدت ۵ دقیقه و دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد، دناتوره کردن به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد، مرحله انیلینگ به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله اکستنشن به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله اکستنشن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به تعداد ۳۰ سیکل انجام شد.

16SrRNA واکنش PCR و سپس الکتروفورز انجام شد که خلاصه آن به شرح زیر است.

استخراج DNA ژنومیک باکتریایی

ابتدا نمونه باکتری‌ها بر روی محیط استارچ کازئین آگار^۱ کشت و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس باکتری‌ها به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده منتقل گردیدند. برای شکستن کامل دیواره پپتیدوگلیکانی باکتری‌ها، میکروتیوب‌ها ابتدا داخل ازت مایع قرار گرفته و بلافاصله به بن ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند و سپس ورتکس شدند (این بخش ۷ بار تکرار گردید). پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر دیگر از بافر لیز کننده، میکروتیوب‌ها در میکروسانتریفیوژ (مدل CFNII -15000 VS) با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی برداشته شد و به اندازه حجم آن، محلول کلروفورم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) افزوده و سپس در میکروسانتریفیوژ با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بار دیگر مایع رویی برداشته شد و به اندازه حجم آن ایزوپروپانول سرد افزوده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سانتریفیوژ گردید. همچون مراحل قبلی مایع رویی دور ریخته شده و محتویات

مواد مورد نیاز برای آزمایش PCR، شامل بافر $MgSO_4$ به میزان ۱۰ میکرولیتر، (دئوکسی نوکلئوتیدتری فسفات^۲ (۲/۵ میلی‌مولار) مقدار ۳ میکرولیتر، پرایمر فوروارد و پرایمر ریورس هر کدام به مقدار ۱/۵ میکرولیتر، (Template(DNA (۱ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) به مقدار ۲ میکرولیتر، Taq DNA Polymerase (۱ واحد بر میکرولیتر) به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، PFU DNA Polymerase (۱ واحد بر میکرولیتر) به مقدار ۱۰ میکرولیتر، آب دیونیزه به مقدار ۲۱/۵ میکرولیتر، با حجم کل ۵۰ میکرولیتر درون میکروتیوب قرار

² dNTP

¹ Starch casein agar

یک تیوب اپندورف استریل قرار گرفته و ۵۰ میکرولیتر محلول Elution به آن اضافه شد. پس از سانتریفوژ نمونه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱ دقیقه، DNA به درون تیوب انتقال یافت. برای ارزیابی کیفیت و غلظت DNA تخلیص شده، ۵ میکرولیتر از نمونه در ژل آگارز ۱٪، از جدول استاندارد سایز مارکر با تخمین شدت یا ضعفی که باند بر روی ژل نشان داده و مقایسه آن با Ladder و مقایسه انتهایی با سایز مارکر پی، استفاده شد.

نرم افزارهای مورد استفاده

در این پژوهش به منظور محاسبات آماری و رسم نمودارها از محیط نرم افزار اکسل و نرم افزار Prism graph pad استفاده شد.

یافته ها

میزان تجزیه بنزن و تولوئن به وسیله پاکتری های نمونه

خاک های مختلف

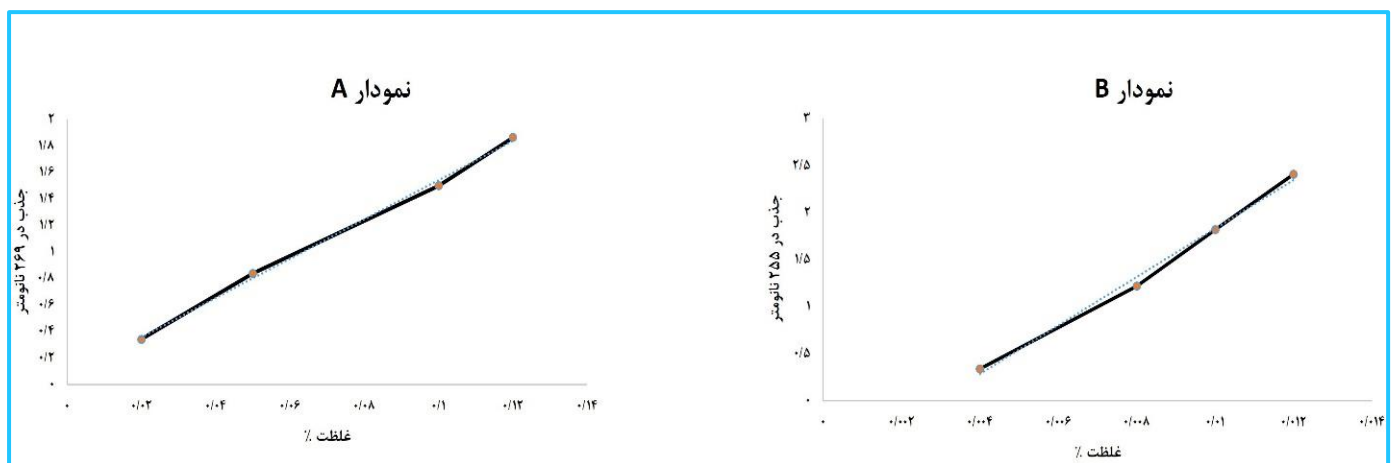
با استفاده از داده های حاصل از میزان جذب غلظت های مختلف بنزن و تولوئن، نمودار استاندارد هر کدام از این ترکیبات در طول موج ماکزیمم جذب آن رسم گردید و معادله خط و ضریب رگرسیون محاسبه گردید. با توجه به نمودار ۱، معادله خط نمودار استاندارد بنزن $y = 14/822x + 0/0614$ و ضریب رگرسیون آن $R^2 = 0/997$ و نمودار استاندارد تولوئن $y = 109/24x + 0/1023$ و ضریب رگرسیون آن $R^2 = 0/995$ محاسبه گردید.

الکتروفورز محصول PCR

بعد از آماده سازی ژل با استفاده از آگارز (۱/۵ گرم)، آب مقطر دوبار تقطیر و بافر (TAE(50x)، آن را به آرامی درون تانک الکتروفورز ریخته و نمونه های DNA استخراج شده با Loading dye (۶ x) مخلوط کرده و درون چاهک های ژل درون تانک چکانده شد. سپس DNA Ladder (۱ kb) به عنوان شاخص درون چاهک مجاور قرار گرفت. پس از گذشت حدود ۱/۵ ساعت و مشاهده باند، جریان الکتریکی قطع و ژل جهت رنگ آمیزی خارج گردید. به منظور آشکارسازی ژل، ژل آگارز برای مدت ۳۵-۲۰ دقیقه در دمای اتاق درون محلول حاوی اتیدیوم برماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر قرار گرفته و توسط اشعه UV مشاهده گردید.

تخلیص باندهای DNA از ژل آگارز

برای این منظور از ایزوپروپانول و کیت High Pure PCR Product Purification Kit شرکت Roche شامل Binding Buffer، Washing Buffer و Elution Buffer استفاده گردید. پس از جداسازی باند مورد نظر به ازای هر ۱۰۰ میلی گرم از ژل آگارز، ۳۰۰ میلی لیتر Binding Buffer و ۱۵۰ میلی لیتر ایزوپروپانول به آن اضافه شد. کل نمونه به یک filter tube منتقل و با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر و ۲۰۰ میکرولیتر Washing Buffer شستشو داده و در نهایت Filter tube درون

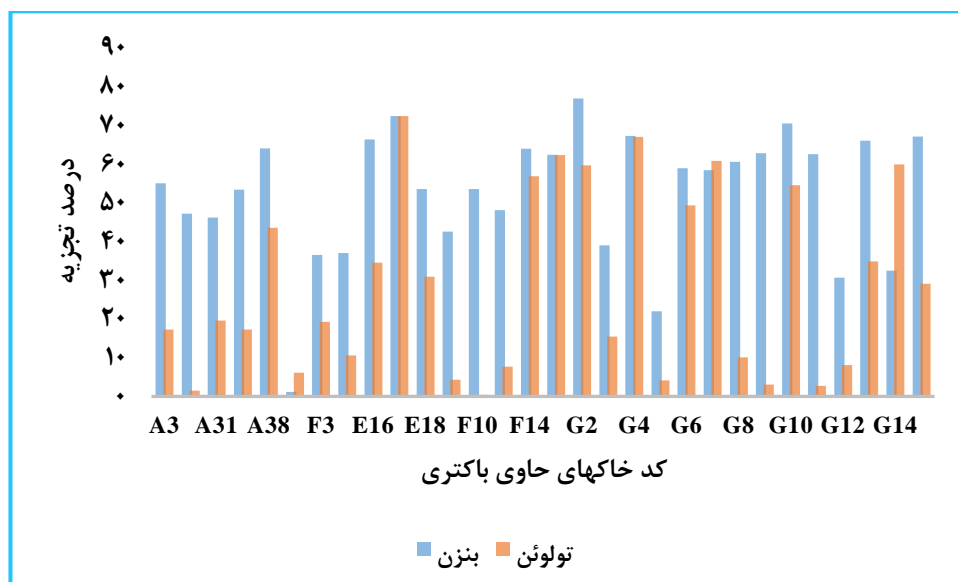


نمودار ۱. نمودار استاندارد بنزن در کلروفورم (A) و نمودار استاندارد تولوئن در کلروفورم (B)

۸ نمونه خاک کشاورزی و در ۱۲ نمونه خاک آلوده پالایشگاه تبریز، درصد تجزیه بنزن بالای ۵۰٪ بود، در حالی که میزان تجزیه تولوئن در ۲ نمونه خاک کشاورزی و ۶ نمونه خاک آلوده پالایشگاه بیش از ۵۰٪ بود.

همچنین با استناد به رابطه ۱ و با استفاده از نمودار استاندارد بنزن و تولوئن، میزان تجزیه این دو ترکیب آلی توسط باکتری-های موجود در خاک مناطق مختلف محاسبه و نتایج آن در نمودار ۲ گزارش گردید.

بر اساس نتایج، میزان تجزیه بنزن توسط باکتری‌های موجود در بسیاری از نمونه خاک‌ها، بیشتر از تولوئن بود؛ به گونه‌ای که در



نمودار ۲. درصد تجزیه بنزن و تولوئن توسط باکتری‌های استخراج شده از نمونه خاک‌های A3 (کرمانشاه)، A25 و A31 (زنجان)، A35 (کردستان)، A38 (کرمانشاه)، D34 و E19 (آذربایجان شرقی)، F3 و E12 و E16 و E17 و F10 و F12 و F14 (آذربایجان غربی)، E18 (اردبیل) و G1 تا G15 (پالایشگاه تبریز)

در این پژوهش باکتری‌های نمونه خاک E17 با تجزیه بنزن، ۶۲٪ متابولیت، باکتری‌های نمونه خاک E17 با تجزیه تولوئن، ۵۸٪ متابولیت و باکتری‌های نمونه خاک G2 با تجزیه بنزن، ۱۹۱٪ متابولیت مختلف تولید نموده که به ترتیب ۲۴، ۲۶ و ۲۹٪ متابولیت حاصل از آن دارای اطلاعات لازم برای شناسایی بودند که بخش زیادی از این ترکیبات شناسایی شده در سه محیط تجزیه یکسان بود. نوع متابولیت‌های شناسایی شده حاصل از تجزیه بنزن و تولوئن در محیط‌های E17 و G2 در جدول ۲ گزارش شده است.

با توجه به نمودار ۲، باکتری‌های استخراج شده از نمونه خاک‌های با کد E17 و G2 برای بنزن و E17 برای تولوئن با توجه به تجزیه بالای بنزن و تولوئن در آن، جهت انجام مراحل بعدی انتخاب شدند.

ترکیبات حاصل از تجزیه بنزن و تولوئن به وسیله باکتری‌های نمونه خاک‌های با بیشترین درصد تجزیه بنزن و تولوئن (نمونه خاک E17 برای بنزن و تولوئن و G2 برای بنزن)

جدول ۲. ترکیبات شناسایی شده حاصل از تجزیه بنزن و تولوئن توسط باکتری های E17 و G2

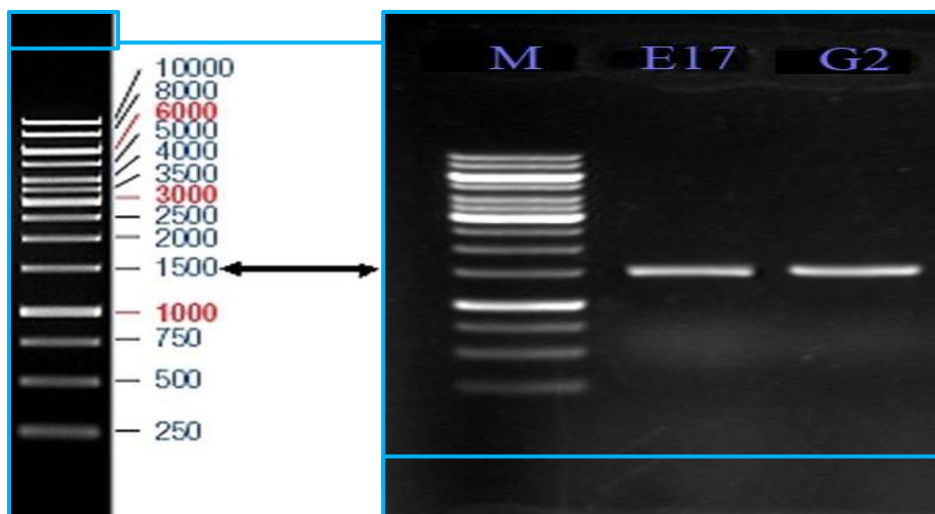
ردیف	نام متابولیت	شماره CAS	فرمول شیمیایی	نمونه خاک تولید کننده
۱	سیکلو هگزان	۷-۸۲-۱۰	C ₆ H ₁₂	E17 تولوئن و E17 بنزن
۲	سیکلو هگزاسلیکون، دو دکا متیل	۶-۹۷-۵۴۰	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	E17 تولوئن و E17 بنزن
۳	هگزادکان	۳-۷۶-۵۴۴	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CH ₃	E17 تولوئن و E17 بنزن
۴	دوتریا کونتان	۴-۸۵-۵۴۴	C ₃₂ H ₆₆	E17 تولوئن و E17 بنزن
۵	۳-متیل هگزان	۴-۳۴-۵۸۹	C ₇ H ₁₆	E17 تولوئن و E17 بنزن
۶	هگزاکوسان	۳-۰۱-۶۳۰	C ₂₆ H ₅₄	E17 تولوئن و E17 بنزن
۷	هنی کوسان	۴-۶۸-۱۵۹۹	C ₂₁ H ₄₂	E17 تولوئن و E17 بنزن
۸	۱ و ۳ دی متیل سیکلو پنتان	۱-۰۰-۲۳۵۴	C ₇ H ₁₄	E17 تولوئن و E17 بنزن
۹	۲، ۶، ۱۰، ۱۵، ۱۹، ۲۳-هگزامتیل تترا کوسان	۳-۰۱-۱۱۱	C ₃₀ H ₆₂	E17 تولوئن و E17 بنزن
۱۰	پنتاکوسان	۲-۹۹-۶۲۹	C ₂₅ H ₅₂	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۱	اکتادکان	۳-۴۵-۵۹۳	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CH ₃	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۲	هپتاکوسان	۷-۴۹-۵۴۳	C ₂₇ H ₅₆	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۳	تترا دکان	۴-۵۹-۶۲۹	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ CH ₃	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۴	نونا دکان	۵-۵۹-۶۲۹	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ CH ₃	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۵	دو کوسان	۰-۹۷-۶۲۹	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ CH ₃	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۶	ای کوسان	۸-۹۵-۱۱۲	C ₂₀ H ₄₂	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۷	هنی کوسان	۷-۹۴-۶۲۹	C ₂₁ H ₄₄	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۸	نونا کوسان	۵-۰۳-۶۳۰	C ₂₉ H ₆₀	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۱۹	فیتان	۸-۳۶-۶۳۸	C ₂₀ H ₄₂	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۲۰	تری کوسان	۵-۶۷-۶۳۸	C ₂₃ H ₄₈	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۲۱	تری کوسان	۶-۶۸-۶۳۸	C ₃₀ H ₆₂	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۲۲	تترا کوسان	۱-۳۱-۶۴۶	C ₂₄ H ₅₀	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۲۳	اوکتاکوسان	۴-۰۲-۶۳۰	C ₂₈ H ₅₈	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۲۴	پنتادکان	۶-۷۰-۱۹۲۱	C ₁₉ H ₄₀	E17 تولوئن و E17 و G2 بنزن
۲۵	هگزاتریاکونتان	۸-۰۶-۶۳۰	C ₃₆ H ₇₄	E17 تولوئن و G2 بنزن
۲۶	هنتریا کونتان	۶-۰۴-۶۳۰	CH ₃ (CH ₂) ₂₉ CH ₃	G2 بنزن
۲۷	P-زایلین	۳-۴۲-۱۰۶	C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂	G2 بنزن
۲۸	n-اکتان	۹-۶۵-۱۱۱	CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₃	G2 بنزن
۲۹	گلوٹار آلدهید	۲-۹۶-۲۵۶	C ₁₄ H ₁₁ N	G2 بنزن
۳۰	سیکلو تترا دکان	۰-۱۷-۲۹۵	C ₁₄ H ₂₈	G2 بنزن
۳۱	سیکلو پنتا دکان	۷-۴۸-۲۹۵	C ₁₅ H ₃₀	G2 بنزن
۳۲	تری دکان	۵-۵۰-۶۲۹	C ₁₃ H ₂₈	G2 بنزن
۳۳	اوندکان	۴-۲۱-۱۱۲۰	CH ₃ (CH ₂) ₉ CH ₃	G2 بنزن
۳۴	۲ و ۴ دی متیل هپتان	۲-۲۳-۲۲۱۳	C ₉ H ₂₀	G2 بنزن
۳۵	۱، ۲ و ۴ تری متیل سیکلو هگزان	۵-۷۵-۲۲۳۴	C ₉ H ₁₈	G2 بنزن
۳۶	(R)-(-)-۱، ۲- پروپان دی اول	۲-۱۴-۴۲۵۴	CH ₃ CH(OH)CH ₂ OH	G2 بنزن
۳۷	۱۷- پنتا تریاکونتن	۰-۴۰-۶۹۷۱	C ₃₅ H ₇₀	G2 بنزن
۳۸	۱-نونا دکان	۵-۴۵-۱۸۴۳۵	C ₁₉ H ₃₈	G2 بنزن
۳۹	پنتاتریاکونتن	۹-۰۷-۶۳۰	C ₃₅ H ₇₂	E17 تولوئن

سویه باکتری با بیشترین میزان تجزیه کنندگی بنزن و تولوئن (G_2 و E_{17}) استرپتومایسس تشخیص داده شد. همچنین ظهور باند 16Sr RNA در منطقه ۱۵۰۰ bp، تأییدی بر استرپتومایسس بودن سویه‌های استخراج شده از نمونه خاک‌های E_{17} و G_2 بود (شکل ۱).

شناسایی سویه‌هایی از باکتری‌ها با تجزیه بنزین و تولوئن بر اساس ویژگی‌های کلونی مانند ظاهر خشک و گچی، سفید یا رنگی، چسبیده به محیط کشت و دارای میسیلیوم رویشی (۳۷)، و همچنین نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی (جدول ۳)،

جدول ۳. تست‌های بیوشیمیایی شناسایی سویه‌های نمونه خاک‌های حاوی باکتری E_{17} و G_2

کد باکتری	تست گرم	تست اکسیداز	تست کاتالاز	تست کازاین	رشد در نمک ۳٪	رشد در دمای ۴۵°C	مصرف گلاکتوز	مصرف سوکروز	مصرف فروکتوز	تجزیه نشاسته
E_{17}	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
G_2	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+



شکل ۱. الکتروفورز محصولات تکثیر توالی‌های 16Sr RNA باکتری‌های E_{17} و G_2 (باند ۱۵۰۰ bp)

بحث

این روش‌ها، بسیار پرهزینه هستند. بنابراین، توسعه یک روش نوآورانه، کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست برای حذف آلودگی هیدروکربنی از خاک بسیار مهم است (۲۶). در پژوهش حاضر به بررسی میزان توانایی باکتری‌های خاک‌های مختلف در تجزیه دو آلاینده هیدروکربنی بنزن و تولوئن پرداخته

هیدروکربن‌های نفتی به‌طور گسترده در سراسر جهان به‌عنوان سوخت استفاده می‌شوند. بنابراین اغلب در نتیجه اکتشاف، تولید، نگهداری، حمل‌ونقل، ذخیره‌سازی و انتشار تصادفی، آلودگی‌هایی رخ می‌دهد که منجر به اثرات زیست‌محیطی قابل توجهی می‌شود. برای رفع این آلاینده‌ها، روش‌های متنوعی وجود دارد، اما

و مؤثرتر برای تجزیه بنزن نسبت به تولوئن در این باکتری‌ها باشد.

در بخش دیگر از پژوهش حاضر، به شناسایی ترکیبات شیمیایی حاصل از تجزیه بنزن و تولوئن در محیط‌هایی که بیشترین درصد تجزیه برای این دو ترکیب آروماتیک را داشته‌اند (E17 برای تجزیه تولوئن و G2 و E17 برای بنزن) پرداخته شد. بررسی این ترکیبات در پایگاه Pub Chem نشان داد که تمامی آنها به جز یک ترکیب، فاقد سمیت و یا از درجه سمیت بسیار پایینی نسبت به بنزن و تولوئن برخوردار هستند. به عنوان نمونه سیکلو هگزان، اکتا دکان، فیتان، Octacosane و غیره که بر اثر تجزیه بنزن و تولوئن توسط باکتری‌های خاکری ایجاد شده است، سمیت شناخته شده‌ای از آن برای انسان گزارش نشده است و یا از سمیت بسیار پایینی نسبت به بنزن و تولوئن برخوردار می‌باشند (۳۹، ۴۰). این در حالی است که ترکیب p-Xylene که در محیط G2 و بر اثر تجزیه بنزن ایجاد شده است، از سمیت قابل توجهی برای انسان برخوردار است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض ترکیبات خانواده Xylene، می‌تواند منجر به ناهنجاری‌های خونی مانند لوکوسیتوزیس، افزایش نوتروفیل، کاهش گلبول قرمز و کاهش هماتوکریت در حیوانات و باعث آنمی و کاهش گلبول‌های سفید در انسان گردد؛ به گونه‌ای که نقاب و همکاران ضمن بررسی تأثیر بنزن، تولوئن، زایلن و هگزان نرمال بر کارگران پتروشیمی، گزارش نمودند که کارگرانی که با این ترکیبات مواجه بوده‌اند، نسبت به گروه‌های کنترل، افزایش نوتروفیل، افزایش مقدار و غلظت هموگلوبین، افزایش تعداد لنفوسیت و مونوسیت و کاهش سایر گلبول‌های سفید، پلاکت و هماتوکریت را نشان داده‌اند (۴۱).

از دیگر نتایج حاصل از پژوهش حاضر، تعیین نوع باکتری موجود در خاک‌هایی بود که بیشترین میزان تجزیه را برای بنزن و تولوئن نشان دادند. بر این اساس، با استناد به نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های استخراج شده از خاک‌هایی با بیشترین تجزیه بنزن و تولوئن (E17 برای تجزیه تولوئن و G2 و E17 برای بنزن) که تست گرم، کاتالاز، کازاین، مصرف گلوکز، مصرف نشاسته و مصرف سوکروز مثبت را نشان داده و تست اکسیداز و رشد در دمای بالای ۴۵ درجه منفی داشته‌اند، مشخص می‌شود که این باکتری‌ها از سویه استرپتومایسس می‌باشند (۳۵، ۳۶). همچنین استفاده از روش PCR در شناسایی ژن 16S rRNA

شد که بر اساس نتایج آن، باکتری‌های استخراج شده از خاک‌های مورد آزمایش، در تمامی موارد قدرت تجزیه بنزن و تولوئن را داشتند. هرچند این توانایی در باکتری‌های خاک‌های مختلف متفاوت و برای تجزیه بنزن دامنه تجزیه ۱/۱۳٪ تا ۷۶/۹٪ و برای تجزیه تولوئن دامنه تجزیه ۰/۴۲٪ تا ۷۲/۳۶٪ مشاهده گردید. همچنین بر اساس نتایج این پژوهش، باکتری‌های تجزیه کننده استخراج شده از نمونه خاک‌هایی با بیشترین تجزیه بنزن و تولوئن، از نوع استرپتومایسس بودند. بر اساس بررسی‌های آماری، به طور میانگین باکتری‌ها در ۳۰ نمونه خاک باعث تجزیه ۵۵/۲۲٪ بنزن و تجزیه ۲۸/۷۲٪ تولوئن شدند. همچنین متوسط تجزیه بنزن توسط باکتری‌های استخراج شده از ۱۵ نمونه خاک پالایشگاه تبریز ۵۵/۸۵٪ و برای تولوئن ۴۹/۳۹٪ بود. میانگین تجزیه توسط باکتری‌های استخراج شده از ۱۵ نمونه خاک کشاورزی برای تجزیه بنزن ۳۴/۷۴٪ و برای تجزیه تولوئن ۲۲/۸۳٪ بود. این بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که قدرت تجزیه‌کنندگی بنزن و تولوئن توسط باکتری‌های نمونه خاک‌های برداشت شده از محیط‌های آلوده پالایشگاه، در بسیاری از موارد نسبت به باکتری‌های خاک‌های برداشت شده از مناطق کشاورزی بیشتر می‌باشد. این نتیجه ممکن است نشان‌دهنده این واقعیت باشد که باکتری‌های موجود در خاک‌های آلوده پالایشگاه به دلیل سازش با این نوع خاک، حاوی ژن‌هایی هستند که ضمن ایجاد سازش در خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی، زمینه تجزیه ترکیبات حاصل از نفت و استفاده از این ترکیبات را در این باکتری‌ها به وجود آورده است. هرچند این ادعا نیاز به بررسی دقیق ژنوم باکتری‌های خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در مقایسه با باکتری‌های خاک‌های زمین‌های کشاورزی دارد که پژوهشگران این مقاله، انجام آن را به سایر پژوهشگران حوزه ژنتیک میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد می‌کنند. از سوی دیگر قدرت تجزیه‌کنندگی باکتری‌ها به طور میانگین برای بنزن از تولوئن چه در نمونه خاک‌های کشاورزی و چه در نمونه خاک‌های آلوده بیشتر بود. هرچند تجزیه شیمیایی بنزن نسبت به تولوئن، انرژی بیشتری را نیازمند است (۳۸)، اما با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، به نظر می‌رسد که باکتری‌های استرپتومایسس خاک، تمایل بیشتری برای تجزیه بنزن نسبت به تولوئن نشان می‌دهند که این خود می‌تواند ناشی از وجود آنزیم‌های تجزیه کننده بیشتر

شده مرتبط با آنتراسن، نفتالین و فناترین است. آنها همچنین گزارش نمودند که این سویه، بالاترین شاخص امولسیون سازی را با ۸۲/۶٪ نشان داده و از ظرفیت تجزیه زیستی قابل توجهی برخوردار است (۵۱).

از جمله کاستی‌های پژوهش حاضر، عدم بررسی مکانیسم تجزیه بنزن و تولوئن توسط باکتری‌ها، عدم مقایسه میزان تجزیه بنزن و تولوئن به روش زیستی (توسط باکتری) با سایر روش‌های تجزیه این هیدروکربن‌ها و عدم شناسایی آنزیم‌های باکتریایی مؤثر در تجزیه زیستی بنزن و تولوئن بود که پژوهشگران این مقاله انجام و برطرف نمودن آن را به سایر پژوهشگران حوزه تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها پیشنهاد می‌نمایند.

نتیجه‌گیری

استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی استخراج شده از خاک، به‌ویژه باکتری‌ها می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تجزیه زیستی بنزن و تولوئن با هزینه کم و بازدهی بالا، به ترکیبات شیمیایی با درجه خطر کمتر باشد. پژوهش حاضر نشان داد که باکتری‌های بومی استخراج شده از خاک به‌ویژه سویه‌های استرپتومایسس می‌توانند با کارایی بالایی، بنزن و تولوئن را به ترکیبات شیمیایی با درجه خطر پایین تبدیل نمایند. بنابراین می‌توان از این باکتری‌های هتروتروف، جهت انجام پژوهش‌های مرتبط با تجزیه زیستی هیدروکربن‌های آلاینده محیط زیست استفاده نمود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند. همچنین هرگونه تضاد منافع حقیقی یا مادی که ممکن است بر نتایج یا تفسیر مقاله تأثیر بگذارد را رد می‌کنند.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، طرح مصوب تحقیقاتی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی با کد ۹۶۱۱۰۱-۱۱۴-۱۸۵۱-۳۵-۳ می‌باشد که در دانشگاه آزاد واحد مراغه و با همکاری شرکت دانش بنیان ریز زیست فناوران فردانگر به انجام رسید. بدین‌وسیله از تمام افرادی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

که روشی دقیق در شناسایی سویه استرپتومایسس است، تأکیدی بر صحت سویه تشخیص داده شده بود (۴۲). مطالعات مولکولی نشان می‌دهد که طول این ژن در اکثر گونه‌های استرپتومایسس تعیین توالی شده، حدود ۱۵۰۰ bp می‌باشد که حاوی درصد بسیار بالایی GC است (۴۳). این در حالی است که مطابق پژوهش حاضر، خدایت و همکاران به‌منظور شناسایی سویه‌هایی از استرپتومایسس در خاک نپال، ناوان و همکاران برای شناسایی استرپتومایسس‌های جدا شده از زغال‌سنگ و اصغرزاده و همکاران برای شناسایی استرپتومایسس‌های جدا شده از خاک آذربایجان شرقی ایران، از توالی ژنومی 16S rRNA استفاده نمودند (۴۴-۴۶).

تاکنون پژوهش‌های متعددی بر روی قدرت تجزیه‌کنندگی ترکیبات آلی به‌وسیله باکتری‌ها انجام شده است که در زیر به برخی از آنها اشاره می‌شود. بائونه و همکاران در پژوهش خود نشان دادند که باکتری‌های استخراج شده از خاک به‌ویژه استرپتومایسس، توانایی بالایی در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها دارد. همچنین این پژوهشگران گزارش نمودند که سویه استرپتومایسس، توانایی بالایی در تجزیه ترکیبات آروماتیک و آلکان‌ها دارند و ابراز امیدواری نمودند که استفاده از باکتری‌ها می‌تواند استراتژی امیدوار کننده‌ای برای اصلاح خاک و تجزیه نفت باشد (۴۷، ۴۸).

السبری و همکاران همانند پژوهش حاضر نشان دادند که سویه استرپتومایسس می‌تواند در پژوهش‌های مرتبط با تجزیه هیدروکربن‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۴۹).

فرضی و همکاران ضمن بررسی قدرت تجزیه‌کنندگی استرپتومایسس جدا شده از خاک پالایشگاه تبریز، گزارش نمودند که این سویه جدا شده از قدرت بالایی در تجزیه بنزن و تولوئن برخوردار است. نتایج پژوهش فرضی و همکاران تشابه بالایی با نتایج حاصل از پژوهش حاضر داشت و این تشابه نتایج می‌تواند ناشی از یکسان بودن خاکی باشد که باکتری‌های استرپتومایسس از آن استخراج گردیده است (۵۰).

سومیا و همکاران نشان دادند که سویه *Streptomyces ginkgonis* KM-1-2 قادر به تجزیه برخی هیدروکربن‌های تک آروماتیک آلکیله شده مرتبط با بنزن و همچنین برخی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای آلکیله شده و غیرآلکیله

References

- Ghorbannezhad H, Moghimi H, Dastgheib MM. Enhanced Biodegradation of Heavy Hydrocarbons by *Aspergillus Pseudodeflectus* F13 in the Presence of Rhamnolipid. *Petroleum Research*. 2020 Jun 21;30(99-2):61-75. (Persian) <https://dx.doi.org/10.22078/pr.2020.3222.2490>.
- Soleymani S, Lakzian A, Fottovat A. Benz (a)pyrene Biodegradation Improvement Using the Biosurfactant Producing Bacterial Consortium. *Journal of Water and Soil*. 2019;33(4):605-619.(Persian). <https://dx.doi.org/10.22067/jsw.v0i0.79076>
- Rezaei H, Motallebi R, Hedayati SAA, Kord-Rostami A. Evaluation of nano chitosan efficiency in removal of benzene from aqueous solutions. *Journal of Water and Soil Conversation*. 2019;26(4):255-267. (In Persian) <https://dx.doi.org/10.22069/jwsc.2019.16203.3150>.
- Rahmatabadi S, Roayaei Ardakani M, Moradzadegan A, Alizadeh B. Isolation and identification α -Naphthol-degrading bacteria from oil-contaminated soils of Masjed-e-Soleyman. *Biological Journal of Microorganism*.2018;7(25):75-85. <https://dx.doi.org/10.22108/bjm.2018.21707>.
- Famiyeh L, Chen K, Xu J, Sun Y, Guo Q, Wang C, Lv J, Tang YT, Yu H, Snape C, He J. A review on analysis methods, source identification, and cancer risk evaluation of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of The Total Environment*. 2021 Oct 1;789:147741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147741>.
- Saad AA, El-Sikaily AM, El-Badawi ES, El-Sawaf GA, Shaheen NE, Omar MM, Zakaria MA. Relation between some environmental pollutants and recurrent spontaneous abortion. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016. 1;9:S787-94. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.08.011>.
- Fooladi M, Moogouei R, Jozi SA, Golbabaei F, Tajadod G. Feasibility study of benzene and toluene removal from air by phytoremediation. *Journal of Health and Safety at Work*. 2021;11(3):433-44.(Persian) <http://jhsw.tums.ac.ir/article-1-6537-en.html>
- Fernanda Bonfim de Souza B, Lenhare S, Cristaldo Heck S, Zuber A, Beneti SC, Zanette AF, Filho LC. COSMO Study on the Heptane–Toluene–DMF/DEG-KSCN Liquid–Liquid Equilibrium System. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c02495>.
- Kim S, Park E, Song SH, Lee CW, Kwon JT, Park EY, Kim B. Toluene concentrations in the blood and risk of thyroid cancer among residents living near national industrial complexes in South Korea: A population-based cohort study. *Environment International*. 2021;146:106304. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106304>.
- Svenson DW, Davidson CJ, Thakur C, Bowen SE. Acute exposure to abuse-like concentrations of toluene induces inflammation in mouse lungs and brain. *Journal of Applied Toxicology*. 2022 Jan 6;8(2):477-480. 10.36347/sjams.2020.v08i02.024.
- Soltanpour Z, Mohammadian Y, Fakhri Y. The concentration of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene in ambient air of the gas stations in Iran: A systematic review and probabilistic health risk assessment. *Toxicology and industrial health*. 2021;37(3):134-41. <https://doi.org/10.1177%2F0748233720981218>.
- Ran J, Qiu H, Sun S, Tian L. Short-term effects of ambient benzene and TEX (toluene, ethylbenzene, and xylene combined) on cardiorespiratory mortality in Hong Kong. *Environment international*. 2018 Aug 1;117:91-8. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.049>.
- Huang L, Cheng H, Ma S, He R, Gong J, Li G, An T. The exposures and health effects of benzene, toluene and naphthalene for Chinese chefs in multiple cooking styles of kitchens. *Environment International*. 2021;156:106721. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106721>.
- Moawad RS, Abd El Fattah ER, Alsemeh AE. Deleterious effect of Toluene on Rat cerebrum cortex and The exert effect of resveratrol:(Histological,Immunohistochemical and Ultrastructural study). *Egyptian Journal of Histology*.2021;44(3):855-72. <https://dx.doi.org/10.21608/ejh.2021.71825.1459>.
- Guo H, Ahn S, Zhang L. Benzene-associated immunosuppression and chronic inflammation in humans: a systematic review. *Occupational and Environmental Medicine*. 2021;78(5):377-

84. <http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2020-106517>.
16. Negahban S A R, Ghorbani Shahna F, Rahimpour R, Jalali M, Rahiminejad S, Soltanian A et al . Evaluating Occupational Exposure to Carcinogenic Volatile Organic Compounds in an Oil-Dependent Chemical Industry: a Case Study on Benzen and Epichlorohydrin. *johc*. 2014; 1 (1) :36-46. <http://johc.umsha.ac.ir/article-1-25-fa.html>.
17. Zhou Y, Wang K, Wang B, Pu Y, Zhang J. Occupational benzene exposure and the risk of genetic damage: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*. 2020 ;20(1):1-1. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09215-1>.
18. Talibov M, Sormunen J, Hansen J, Kjaerheim K, Martinsen JI, Sparen P, Tryggvadottir L, Weiderpass E, Pukkala E. Benzene exposure at workplace and risk of colorectal cancer in four Nordic countries. *Cancer epidemiology*. 2018 ;55:156-61. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.06.011>
19. Dewi R, Hamid ZA, Rajab NF, Shuib S, Razak SA. Genetic, epigenetic, and lineage-directed mechanisms in benzene-induced malignancies and hematotoxicity targeting hematopoietic stem cells niche. *Human & experimental toxicology*. 2020;39(5):577-95. <https://doi.org/10.1177%2F0960327119895570>.
20. McHale CM, Zhang L, Smith MT. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. *Carcinogenesis*. 2012;33(2):240-52. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr297>
21. Grigoryan H, Edmands WM, Lan Q, Carlsson H, Vermeulen R, Zhang L, Yin SN, Li GL, Smith MT, Rothman N, Rappaport SM. Adductomic signatures of benzene exposure provide insights into cancer induction. *Carcinogenesis*. 2018 ;39(5):661-8. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy042>
22. Mohseni M, Pourseyed SF, Chaichi MJ. Bioassay detection of some benzene derivatives using luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2020 ;33(4):526-535 <https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832738.1399.33.4.12.8>
23. Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environmental health perspectives*. 2004;112(9):970-8. <https://doi.org/10.1289/ehp.6895>
24. Nishiwaki J, Kawabe Y, Komai T, Zhang M. Decomposition of gasoline hydrocarbons by natural microorganisms in Japanese soils. *Geosciences*. 2018 ;8(2):35. <https://doi.org/10.3390/geosciences8020035>
25. Sasani M, Khoramnejadian S, Safari R. Degradation of polycyclic hydrocarbons anthracene by using *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2017; 19(2):65-71. <http://goums.ac.ir/journal/article-1-3079-fa.html>
26. Ahmed F, Fakhrudin AN. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*. 2018;11(3):1-7. <http://dx.doi.org/10.19080/IJESNR.2018.11.555811>
27. Obi L, Atagana H, Adeleke R, Maila M, Bamuza-Pemu E. Potential microbial drivers of biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil sludge using a composting technique. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2020 ;95(5):1569-79. <https://doi.org/10.1002/jctb.6352>
28. Gagelidze NA, Amiranashvili LL, Sadunishvili TA, Kvesitadze GI, Urushadze TF, Kvrivishvili TO. Bacterial composition of different types of soils of Georgia. *Annals of Agrarian Science*. 2018;16(1):17-21. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.08.006>
29. Rasuli S, Kashefi Alasl M, Marandi R, Emtiazjou M, Zaeimdar M. Identification of Native Bacteria of Soil Contaminated with Oil Compounds in Mahshahr Petrochemical Special Economic Zone. *Journal of Environmental Science and Technology*. 2020; 21;22(3):277-86. 10.22034/JEST.2020.35538.4246
30. Smulek W, Sydow M, Zabielska-Matejuk J, Kaczorek E. Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH-A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;15;187:109843. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109843>

31. Chang TH, Wang R, Peng YH, Chou TH, Li YJ, Shih YH. Biodegradation of hexabromocyclododecane by *Rhodopseudomonas palustris* YSC3 strain: A free-living nitrogen-fixing bacterium isolated in Taiwan. *Chemosphere*. 2020;246:125621. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125621>
32. Chuah LF, Chew KW, Bokhari A, Mubashir M, Show PL. Biodegradation of crude oil in seawater by using a consortium of symbiotic bacteria. *Environmental Research*. 2022;213:113721. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113721>
33. Sadighbayan K, Farazmand A, Mazaheri-asadi M, Monadi Sefidan A, Aliasghar zad N. A Comparative Study on Four Strains of Petroleum Hydrocarbon-degrading Bacteria for the Bioremediation of Petroleum-contaminated Soils. *Biological Journal of Microorganism*. 2021;10(37):51-65. https://bjm.ui.ac.ir/article_24801.html
34. Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M. *Actinomycetes in Biotechnology*. Ed¹. USA: Academic Press; 1998; 568-76. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02828-1>
35. Dehnad AR, Bakhshi R, Monadi-Sefidan AR, Montazem SH, Abdi-Soufiani S. Screening of *Streptomyces* bacteria with antibacterial activity from soils of Azerbaijan region of Iran. *Biotechnology of Microorganisms Journal*. 2009; 1(1):18-22(Persian)
36. Saputra R, Arwiyanto T, Wibowo A. *Streptomyces* sp.: Characterization, Identification and Its Potential as a *Ralstonia solanacearum* Biological Control Agent in vitro. *Indonesian Journal of Agricultural Research*. 2019 ;2(3):148-55. <https://doi.org/10.32734/injar.v2i3.1389>
37. Dehnad A, Esmaili E, Solouki M. Isolation and molecular identification chitinase-producing *Streptomyces* strains and examination of their in-vitro antagonistic effects. *Biological Journal of Microorganism*. 2015 ;4(15):123-34.(Persian)
38. Fenglei H, Mengyu L, Huangrong Z, Ting L, Dandan L, Shuo Z, Wenwen G, Fang L. Product analysis and mechanism of toluene degradation by low temperature plasma with single dielectric barrier discharge. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2020 ;24(9):673-82. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2020.07.004>
39. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 8078, Cyclohexane; [cited 2022 May 13]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyclohexane>
40. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 15600, Decane; [cited 2022 May 13]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Decane>
41. Neghab M, Tayepheh-Rahimian J, Jahangiri M, Karimi A, Nasiri Gh, Aghabeigi M, Hasanzadeh J, Dasht S, Safaeiyan A. Evaluation of hematotoxic potential of benzene, toluene, xylene, ethyl benzene and n-hexane in petrochemical industries. *Irtiqa Imini Pishgiri Masdumiyat. journal of safety promotion and injury prevention*. 2015;2(4):293-302 <https://doi.org/10.22037/meipm.v2i4.8396>
42. Rintala H, Nevalainen A, Rönkä E, Suutari M. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. *Molecular and cellular probes*. 2001 1;15(6):337-47. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0379>
43. Ian E, Malko DB, Sekurova ON, Bredholt H, Rückert C, Borisova ME, Albersmeier A, Kalinowski J, Gelfand MS, Zotchev SB. Genomics of sponge-associated *Streptomyces* spp. closely related to *Streptomyces albus* J1074: insights into marine adaptation and secondary metabolite biosynthesis potential. *PLoS One*. 2014;12;9(5):e96719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096719>
44. Khadayat K, Sherpa DD, Malla KP, Shrestha S, Rana N, Marasini BP, Khanal S, Rayamajhee B, Bhattarai BR, Parajuli N. Molecular identification and antimicrobial potential of *Streptomyces* species from Nepalese soil. *International journal of microbiology*. 2020 Aug 27;2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8817467>
45. Nawan, Septi. Handayani. Molecular identification of *Streptomyces* sp. isolated from peat land of Palangka Raya, Kalimantan Tengah using 16S rRNA gene sequences analysis. *Research Journal of Pharmacy and Technology*.

- 2021;14(12):6639-4.
<https://doi.org/10.52711/0974360X.2021.01147>
46. Asgharzadeh MR, Manda N. Antibacterial activity of metabolites isolated from *Streptomyces* SSp. On Soil Sample of West Azerbaijan, Iran. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2021;9(2):147-59.
<https://dx.doi.org/10.22034/ijabbr.2021.241642>
47. Baoune H, El Hadj-Khelil AO, 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;147:602-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.013>
48. Baoune H, Aparicio JD, Pucci G, Ould El Hadj-Khelil A, Polti MA. Bioremediation of petroleum-contaminated soils using *Streptomyces* sp. Hlh1. *Journal of Soils and Sediments*. 2019 ;19(5):2222-30.
<https://doi.org/10.1007/s11368-019-02259-w>
49. Alseabri H, Hamad AA, Hassam MM. Biodegradation of petroleum hydrocarbons using indigenous bacterial and actinomycetes cultures. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2020;23(6):726-34.
<https://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2020.726.734>
50. Farzi A, Shirzad N, Dehnad AR. Biodegradation of Benzene and Toluene by *Streptomyces* species isolated from the soil of Tabriz Refinery, Eastern-Azerbaijan and investigation of the kinetic model. *Journal of Civil and Environmental Engineering*. 2021;1(1):12-22.(Persian)
<https://dx.doi.org/10.22034/jcee.2021.27873.1675>
51. Soumeiya S, Allaoueddine B, Hocine AK. Biodegradation of used motor oil by *Streptomyces ginkgonis* KM-1-2, isolated from soil polluted by waste oils in the region of Azzaba (Skikda-Algeria). *Journal of Biotechnology*. 2022: 10;349:1-1.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.03.006>