فصلنامه علوم محیطی، دوره شانزدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷

۶۳-۸۰

تجزیه زیستی زایلن توسط باکتری‌های آزاد و تثبیت‌شده *Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX*، بر اکسید گرافن

حسین محمدپور[۱]، مهدی شهریاری نور[۲]* و رامین یوسفی[۳]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی شیراز، شیراز، ایران

[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

[۳] گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مسجد سلیمان، ، مسجد سلیمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۳

محمدپور، ح. ، م. شهریاری نور و ر. یوسفی.۱۳۹۷ تجزیه زیستی زایلن توسط باکتری‌های آزاد و تثبیت‌شده Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX، بر اکسید گرافن. فصلنامه علوم محیطی. ۱۶(۴): ۸۰-۶۳.

سابقه و هدف :در چند دهه اخیر،زایلن به همراه تعدادی دیگر از ترکیب‌های آروماتیک موجود در نفت خام و دیگر محصول‌های پتروشیمی به‌عنوان یکی از آلاینده‌های مهم خاک محسوب شده‌اند، بنابراین هدف از این بررسی، یافتن سویه باکتری برای تجزیه زیستی این ترکیب و افزایش راندمان تجزیه این ترکیب به کمک تثبیت این باکتری بر روی ترکیب‌هایی با ساختار نانویی مانند اکسیدگرافن است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، تجزیه زیستی زایلن با استفاده از باکتری‌های آزاد و تثبیت‌شده به کمک اکسید گرافن در شرایط بهینه بررسی شد. باکتری‌های تجزیه‌کننده زایلن از خاک‌آلوده جداسازی شد و با استفاده از توالی ژن ۱۶ S rDNA شناسایی گردید. که باکتری شناسایی شده *Sphingomonas paucimobilis* سویه :TY4-HX بود. برای تجزیه زایلن با استفاده از سلول‌های آزاد و تثبیت‌شده ، میزان بهینه pH، دما، و غلظت زایلن به کمک روش RSM به ترتیب برابر با۷، ۳۲ °C و ۱/۵ g/l تعیین شد.

نتایج و بحث: سلول‌های آزاد تحت شرایط بهینه قادر به تجزیه زیستی زایلن به مقدار ۴۵/۸ ٪ طی ۲۴ ساعت بود. در این مطالعه از اکسید گرافن به‌منظور تثبیت باکتری *Sphingomonas paucimobilis* سویه TY4-HX استفاده شد. با استفاده از روش‌های FTIR و SEM مشخص شد که این سویه بااتصال به سطح اکسید گرافن قادر به ایجاد بیوفیلم شده است. باکتری‌های تثبیت‌شده به این روش قادر به تجزیه زیستی زایلن به مقدار بیش از ۸۶/۳ ٪ تحت شرایط بهینه و در زمان ۲۴ ساعت بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده، باکتری‌های تثبیت‌شده نسبت به همان سویه از باکتری‌های آزاد، از عملکرد بهتری در پالایش خاک‌آلوده به زایلن برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه زیستی، اکسید گرافن، RSM، SEM، زایلن.

* Corresponding Author. *E-mail Address*: mahdi.shahriari@iaurasht.ac.ir

مقدمه

مشتقات آروماتیک نفتی به‌طور معمول به‌عنوان آلاینده‌های خاک و آب‌های زیرزمینی شناخته شده‌اند. تجزیه زیستی مواد آلی با استفاده از میکروارگانیسم های متنوعی از جمله به کمک سویه‌های باکتری‌ها امکان‌پذیر است. به دلیل شباهت در ساختار بیشتر آلاینده‌های آلی آروماتیک، این امکان وجود دارد که سویه باکتری‌هایی که قابلیت تجزیه یک ترکیب خاص را دارند، توانایی تجزیه دیگر مواد آلی آروماتیک مشابه را نیز خواهند داشت. هنگامی‌که تماس فیزیکی بین آلاینده و باکتری برقرار گردد، امکان تشکیل بیوفیلم و تولید ماده فعال سطحی برای افزایش میزان در دسترس بودن مواد آلی و تجزیه آن‌ها وجود دارد (Singh and Celin, 2010). ترکیب‌های آلی مونوآروماتیک فرار حاضر در محصول‌های پتروشیمی و نفت خام که بیشتر در کنار هم حضور دارند، عبارتند از بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، و زایلن (BTEX). این ترکیب‌ها به‌عنوان عامل‌های سرطان‌زا شناخته‌شده و برای سلامتی انسان زیان‌بار است. همچنین، با توجه به طبقه‌بندی این ترکیب‌ها آن‌ها به‌عنوان آلاینده‌های اصلی محیط‌زیست، به‌وسیله‌ی سازمان حفاظت محیط‌زیست ایالات‌متحده آمریکا (EPA[1]) شناخته‌شده و حذف آن‌ها از منطقه-های آلوده از اهمیت بالایی برخوردار است. تجزیه این ترکیب‌ها به دلیل کمبود اکسیژن (Singh *et al*., 2010; Brigmon *et al*., 2002) یا گروه جایگزین نیتروژن که می‌تواند سبب افزایش شدت اکسیداسیون یک حلقه گردد، دشوار است. زایلن یک ترکیب فرار و مونوآروماتیک از اجزای اصلی تشکیل‌دهنده مواد نفتی است (Ayat *et al*., 2017). همچنین زایلن به‌عنوان ماده حلال در سنتز مواد آلی، مواد بهداشتی، و دیگر محصول‌های تولیدی در صنعت کاربردهای فراوانی دارد. این ماده در پساب صنعت‌های شیمیایی و پالایشگاه‌ها نیز یافت می‌شود. میزان فراوان ترکیب‌های زایلن به دلیل نشت از مخازن ولوله‌های زیرزمینی، استفاده از روش‌های نادرست دفع پسماند و نشت غیر عمد و اتفاقی از مکان‌های دفن زباله، در آب‌های زیرزمینی نیز یافت می‌شود (Bina *et al*., 2012). این آلاینده‌ها تأثیرهای مخربی بر سلامتی انسان، ازجمله سوزش و ناراحتی‌های پوستی، آسیب به اعصاب مرکزی، مشکل‌های تنفسی، سرطان خون، مشکل‌های کلیوی، کبدی، و خونی دارند (Aivalioti *et al*., 2010; ATSDR, 2007). در دهه‌های گذشته، روش‌های مختلف پالایش خاک ازجمله روش‌های زیستی (تخلیه زیستی و گیاه‌پالایی)، شیمیایی (اکسیداسیون شیمیایی و خاک‌شویی)، و فیزیکی (استخراج بخارات خاک و تصفیه حرارتی) برای پالایش خاک و آب‌های زیرزمینی آلوده به BTEX گسترش داده‌شده است (Firmino *et al*., 2015; Guo *et al*., 2012; Jin *et al*, 2013). با توجه به بررسی-های انجام شده، به نظر می‌رسد میکروارگانیسم‌ها باقابلیت تجزیه BTEX قادر به پالایش منطقه‌های آلوده هستند. باکتری‌های هوازی با توانایی تجزیه BTEX به‌وفور در طبیعت یافت می‌شوند. پژوهش‌های انجام‌گرفته بر ژنتیک و سوخت‌وساز باکتری‌های تجزیه‌کننده BTEX نشان می‌دهد که در بیشتر موارد باکتری‌های میله‌ای (باسیلی) دارای این قابلیت هستند (Ayat *et al*., 2017; Aivalioti *et al*., 2010; ATSDR, 2007). همچنین گونه‌های باکتریایی Ralstonia و Burkholderia نیز از توانایی تخریب زیستی BTEX برخوردارند. همچنین دیگر میکروارگانیسم‌ها ازجمله *Rhodococcus* (Guo *et al*., 2010)، *Acinetobacter*، Alcaligenes، (Singh and Celin., 2012; Jin *et al*., 2013) *Cladophialophora* sp. *strain T1*، *Brevibacterium* (Pourzamani *et al*., 2012)، *Nocardia, Bacillus*، *Bordetella, Arthrobacter* (Ayat *et al*., 2017)، *Marinobacter* ، *Acidovorax*، *Bradyrhizobium* و *Variovorax* ، *Aquaspirillum*، *Agrobacterium* *Stenotrophomonas* نیز از قابلیت تجزیه زیستی BTEX

برخوردارند (Yan *et al*.,2013; Dursun *et al*., 2005). عامل‌های گوناگونی مانند غلظت زیست‌توده فعال، غلظت آلاینده‌ها، pH، دما، در دسترس بودن مواد مغذی غیر زیستی و گیرنده‌های الکترونی، و سازگاری میکروبی، برشدت و سرعت تجزیه زیستی BTEX مؤثر هستند. همچنین از فن‌آوری میکروارگانیسم‌های تثبیت‌شده در پالایش زیستی به دلیل افزایش سطح ویژه رشد باکتری‌ها می‌توان استفاده نمود. این امر با بهبود مقاومت در برابر سم‌های شیمیایی و تنش‌های محیطی (مانند pH، دما، مواد سمی) منجر به افزایش بازدهی تجزیه زیستی می‌گردد (Pourzamani *et al*., 2012; Yan *et al*., 2013). گرافن به‌عنوان گیرنده، می‌تواند طول عمر جفت‌های الکترون-منفذ را افزایش داده و همچنین سبب افزایش جذب آلاینده‌ها به دلیل برهم‌کنش بین آلاینده‌های زیستی و بخش‌های آروماتیک گرافن شود. در ضمن گرافن به‌عنوان یک عامل تثبیت‌کننده می‌تواند فرآیند تجزیه زیستی BTEX توسط میکروارگانیسم‌ها (که قابلیت تجزیه زیستی ترکیب‌هایی مانند زایلن را دارند) را با افزایش سوخت‌وساز تقویت نماید (Azimi *et al*., 2016). هدف از این تحقیق، جداسازی سویه بومی باکتری باقابلیت تجزیه زیستی زایلن و همچنین مقایسه تجزیه زیستی زایلن توسط سلول‌های آزاد و تثبیت‌شده توسط اکسید گرافن (GO) است. همچنین، اثرهای غلظت اکسید گرافن و دیگر عامل‌های محیطی مانند pH، دما و غلظت زایلن نیز بر کارآیی تجزیه زیستی زایلن ارزیابی می‌گردند.

مواد و روش‌ها

محیط کشت و جداسازی سویه باکتری

سویه تجزیه‌کننده زایلن به نام TY4-HX با استفاده از محیط کشت غنی‌سازی به‌وسیله زایلن به‌عنوان تنها منبع تأمین‌کننده انرژی و کربن از خاک‌آلوده واقع در منطقه سی برنج مسجدسلیمان (۴۸/۲۸۹۲°N و ۳۱/۹۶۳۴ °E) در استان خوزستان ایران جمع‌آوری شد. منطقه مورد مطالعه، بدلیل حضور و تجمع پسماندهای صنعتی مرتبط با صنایع نفت و گاز در طی دهه‌های گذشته آلوده شده است. نمونه‌برداری در شهریورماه سال۱۳۹۵ انجام‌گرفته است. تعداد نمونه‌های خاک‌آلوده به پسماندهای صنعتی ۲۴ مورد بود، این نمونه‌ها از عمق ۱۰ و ۲۵ سانتی‌متری سطحی خاک این منطقه جمع‌آوری‌شد. سپس نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در دمای $4^{\circ}C$ نگه‌داری شده و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مسجدسلیمان منتقل گردیدند. نمونه‌ها تا زمان جداسازی و استخراج DNA در دمای $20^{\circ}C$ ذخیره‌سازی شدند (Stefani *et al*., 2015). محیط کشت پایه نمکی برای رشد باکتری‌های هوازی مورد استفاده قرارگرفت. این محیط شامل ۴ گرم $NaNO_3$، ۱/۵ گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم Na_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۱۱ گرم $FeSO_4.H_2O$، و ۰/۰۱ گرم $CaCl_2$ در لیتر آب یون‌زدایی بود (Zhao et al., 2017). با تنظیم pH در مقدار ۷، محیط کشت با استفاده از دستگاه اتوکلاو در دمای$^{\circ}C$ ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. سپس ماده زایلن با خلوص ۹۹/۵٪ زایلن استفاده شد که به‌صورت مجموعه‌ای از انواع زایلن (Mixed Xylene) است که شامل مجموعه‌ای از ارتو و پارا و متا زایلن است (Merck آلمان). در درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری به میزان ۱۰۰میلی‌لیتر محیط پایه نمکی اضافه گردید و سپس تا رسیدن به غلظت حجمی نهایی ۱٪ زایلن (به‌عنوان تنها منبع تأمین‌کننده انرژی و کربن) به محیط استریل‌شده اضافه شد. پس از آن سویه TY4-HX به‌صورت هوازی در محیط کشت پایه نمکی، تحت دمای ثابت$^{\circ}C$ ۳۰، در انکوباتور شیکردار با سرعت گردش ۱۵۰ rpm، و به مدت هفت روز کشت داده‌شد. سپس نمونه غنی‌سازی شده به یک محیط کشت پایه نمکی جدید و برای گرمادهی مجدد به مدت هفت روز دیگر انتقال یافت. گرمادهی در شرایط اشاره شده در بالا سه بار تکرار گردید. نمونه‌های غنی‌سازی نهایی به پلیت‌های پایه نمکی آگاره حاوی زایلن منتقل شدند (Stefani *et al*., 2015; Mesgari *et al*.,2015).

شکل۱- ارلن های ۲۵۰میلی‌لیتری حاوی محیط پایه نمکی محتوی زایلن پس از تلقیح سویه باکتری در انکوباتور
Fig. 1- Erlenmeyer flasks contain 100ml MSM and 1ml xylene in the incubator after microbial inoculation

شناسایی سویه جداسازی شده با استفاده از تکنیک ژنومی 16s rRNA

تحلیل ریبوتایپینگ[۲] توسط شرکت توپازژن واقع در کرج انجام شد. به‌طور خلاصه، استخراج DNA توسط کیت استخراج DNA ژنومی (cat NO. TGK4001) توسط شرکت توپازژن انجام گرفت. برپایه توصیه‌های شرکت سازنده کیت، ژن 16S rRNA با استفاده از Ribosomal DNA amplification 2X Master mix با شماره اختصاصی (cat No TGI4001) و به کمک آغازگرهای عمومی[۳] 27F و همچنین 1492R تکثیر شد. فرآیند آماده‌سازی واکنش‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۴] و عمل تکثیر ژن موردنظر باکتری مطابق با توصیه شرکت سازنده در مخلوطی از بافر 10xTaq، DNA پلی مرازAmpliTaqGold به میزان 1.25 U، مخلوطی از نوکلوتیدها به میزان 2 mM ، نمک کلرید منیزیم به حجم 25 mM، ۰/۷ میکروگرم DNA و آب دو بار تقطیرشده در حجم نهایی ۵۰ میلی لیترانجام شد. واکنش PCR با درنظرگرفتن یک چرخه با دمای ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با دمای۹۴ °C به مدت یک دقیقه، دمای۵۵ °C به مدت یک دقیقه، و دمای۷۲ °C به مدت یک دقیقه، و یک چرخه گسترش‌یافته با دمای۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم گردید. محصول واکنش با استفاده از ژل الکتروفورز آگارز ۱٪ پس از رنگ‌آمیزی DNA بررسی شد. توالی DNA تکثیر یافته به‌وسیله‌ی شرکت Microsynth (سوئیس) شناسایی گردید.

تحلیل‌های بیوانفورماتیک توسط نرم‌افزار MEGA6، و پایگاه داده EzBioCloud 16S انجام گردید. طراحی درخت‌های تبارشناختی[۵] با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام‌شد (Ranya *et al.*, 2008; Madueno *et al.*, 2011; Yoon *et al*., 2017).

طراحی آزمایش‌ها و مدل‌سازی

روش سطح پاسخ (RSM) به‌عنوان یک روش آماری قادر به تعیین ارتباط بین پاسخ‌های خاص و گروهی از عامل‌های مدنظر پژوهش است. روش سطح پاسخ به دلیل قابلیت رسم شدن خطی برای یک عامل دلخواه، یا به‌صورت صفحه برای دو عامل دلخواه، به‌عنوان مدلی مناسب در بسیاری از کاربردهای صنعتی معرفی می‌شود. از روش RSM برای تعیین دامنه شرایط عملیاتی که می‌تواند منجر به پاسخ بهینه در یک فرآیند یا عملیات خاص گردد، استفاده می‌شود (Zhao *et al.*, 2017). این روش همچنین ممکن است برای شناسایی شرایط عملیاتی جدید که منجر به بهبود کیفیت محصول نهایی می‌گردد، استفاده شود. تعداد ۳۰ اجرا به همراه ۷ بار تکرار به‌منظور تعیین میزان اولیه pH، دما، غلظت زایلن، و

غلظت اکسید گرافن، و رسیدن به بیشینه تجزیه زیستی زایلن در نقطه مرکزی انتخاب شد. پس از تعیین دامنه میزان بهینه، از یک طراحی کامپوزیت مرکزی (CCD) کامل برای یافتن شرایط بهینه از بین چهار عامل X_1، X_2، X_3 و X_4 استفاده گردید (Huang *et al*., 2009; Zhao *et al*., 2017). روش RSM با چهار فاکتور، و سه سطح طراحی‌شده توسط CCD برای بهینه‌سازی پاسخ Y (تجزیه زیستی زایلن) به‌عنوان تابعی از چهار متغیر اشاره‌شده، توسط رابطه زیر بیان‌شده است:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{11}X^2 + b_{22}X^2 + b_{33}X^2 + b_{44}X^2$$

در رابطه (۱)، Y پاسخ پیش‌بینی‌شده، متغیرهای X_1، X_2، X_3 و X_4 به ترتیب نشان‌دهنده دما (°C)، غلظت زایلن (g/l)، مقدار pH، و غلظت اکسید گرافن (g/l) است. b_0 عرض از مبدأ، b_1، b_2، b_3 ، و b_4 ضرایب خطی، و b_{11}، b_{22}، b_{33} ، و b_{44} ضرایب جمل‌های مربعی، و b_{12}، b_{23}، b_{13} ، b_{14}، b_{24} ، و b_{34} ضرایب ثابت مدل هستند (Huang *et al*., 2009). سطح فاکتور واقعی مرتبط با سطوح فاکتور کد شده در جدول ۱ نشان داده‌شده است. دامنه سطوح فاکتورها، برای طراحی تجربی بر مبنای سطح کشت اصلی است. شرایط کشت بهینه به‌منظور بیشینه تجزیه زیستی زایلن و ضرایب مرتبه دوم معادله (۱) با تحلیل‌های آماری و استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۶/۰/۶ محاسبه‌شد.

جدول ۱- سطوح و کد متغیرها برای طراحی کامپوزیت مرکزی (CCD)

Table 1. Levels and codes of variables for central composite design (CCD)

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded
X1	GO concentration	g/l	Numeric	0.2	0.5	-1	1
X2	Xylene concentration	g/l	Numeric	1	2	-1	1
X3	pH		Numeric	6	8	-1	1
X4	Temperature	°C	Numeric	24	40	-1	1

روش‌های ارزیابی و تعیین میزان تجزیه زیستی زایلن

باکتری‌های جاسازی‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲°C، با سرعت گردش ۱۵۰rpm ، در ارلن مایر ۲۵۰میلی لیتری شامل ۱۰۰میلی لیتر محیط کشت پایه نمکی به همراه ۱٪ حجمی زایلن در شرایط هوازی رشد داده شدند. باکتری‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ g در ۱۰ دقیقه) برداشت‌شده، سپس دو بار در محیط استریل پایه نمکی شسته شده و در نهایت دوباره در یک‌دهم حجم محیط کشت به‌صورت سوسپانسیون بازگردانده می‌شود. سوسپانسیون باکتری‌ها هم‌ارز باکدورت ۰/۵ مک فارلندبه عنوان یک ماده تلقیحی برای پیش‌بینی ترکیب بهینه محیط کشت مورداستفاده در تجزیه زیستی زایلن، استفاده‌شد. تجزیه زیستی زایلن با حل نمودن باقیمانده زایلن موجود در محیط کشت در ۳ میلی‌لیتر ماده n- هگزان محلول گشته و خوانش جذب نوری در طول‌موج ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر به‌منظور تعیین میزان تجزیه زایلن انجام شد. غلظت‌های زایلن به‌طور متناوب نیز به‌وسیله روش میکرو استخراج فاز جامد، توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز شد.

آزمایش‌ها کروماتوگرافی گازی با دستگاه GC- CP-3800 (تولید شرکت Varian استرالیا) مجهز به شناساگر یونیزاسیون شعله (FID)، انژکتور Split/Splitless ۱۱۷۷، یک دستگاه (30m, 0.32mm, 0.25µm) Cp-spill 8 CB

و هلیوم به‌عنوان یک گاز حامل با دبی ثابت ml/min ۲، انجام گردید. بازه زمانی آزمایش‌ها کروماتوگرافی در بازه دمایی ۴۰°C تا ۱۵۰ °C، ۱۰ دقیقه تنظیم‌شد. ترکیب‌ها از طریق مصرف غیر زیستی (Abiotic) در طول دوره زمانی بلندمدت گرمادهی، جدا شدند. تجزیه زیستی زایلن با اندازه‌گیری محوشدگی تدریجی این ترکیب‌ها در محلول آزمایشی شامل Sphingomonas و در محلول کنترلی تحت شرایط یکسان و در نبود Sphingomonas ، محاسبه گردید. نتایج به‌صورت درصد باقیمانده از زایلن برحسب 100*(C_t/C_c) است. به‌طوری‌که C_t غلظت زایلن در محلول آزمایشی شامل Sphingomonas، و Cc غلظت زایلن در محلول کنترلی غیر زیستی است (Berlendis *et al.*, 2010; Jean *et al.*, 2008).

آماده‌سازی و ویژگی‌های اکسید گرافن

پودر اکسید گرافن (GO) با خلوص بالا (۹۹/۹۹۹۹ ٪) با ۱۰-۶ لایه اکسید گرافن از شرکت US Research Nanomaterials INC با قطر داخلی nm ۵-۱۰ و قطر خارجی nm ۳۰ -۲۰ ، و سطح بالای $۱۱۰ m^2/g$ برای آزمایش سنتز خریداری‌شد. محلولی از GO با غلظت g/l ۰/۰۵ تهیه شد و به مدت ۱۵ دقیقه تحت تأثیر امواج فراصوت[6] قرار گرفت. سپس محلول GO به محلول سیستین M ۰/۲ که به سامانه بازگشت ارتباط داده‌شد، اضافه گردید. محلول GO به اکسید گرافن احیاشده تبدیل گردید (rGO) (Azimi *et al.*,2016). شناسایی GO به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Seron model mira3) و دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FTIR) محصول شرکت Perkin Elmer انجام شد.

تثبیت باکتریایی با استفاده از اکسید گرافن کاهش‌یافته جهت تجزیه زیستی زایلن

میزان متفاوتی از اکسید گرافن (0.05, 0.2, 0.35, 0.50, 0.65 g/l) به مدت ۳۰ دقیقه، تحت شرایط فراصوت، به آب مقطر استریل‌شده اضافه شد. سپس میزان میکرولیتر از محلول باکتریایی با چگالی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند دوباره به محلول پایه نمکی اضافه‌شده و ۱۰۰میکرو لیتر از میزان مختلف GO نیز اضافه گردید. دمای محیط گرمادهی، pH، و غلظت اولیه زایلن برحسب شرایط بهینه توسط RSM تنظیم‌شد. پس از سپری شدن ۲۴ ساعت دوره گرمادهی در دستگاه انکوباتور شیکردار با سرعت گردش rpm ۱۵۰، تجزیه زایلن مشاهده گردید.

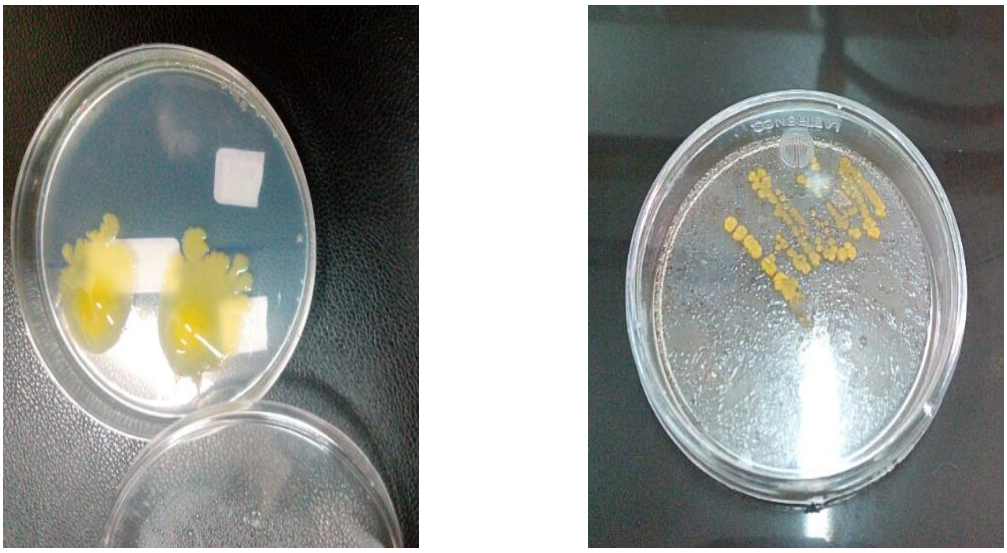
تعیین مشخصات با استفاده از SEM و FTIR

اکسید گرافن به همراه سویه باکتریایی چسبیده به آن، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز بررسی گردید. برای تحلیل میکروسکوپی، GO سه بار با آب مقطر استریل‌شده شسته شد تا سلول‌هایی که به آن متصل نیستند، جدا شوند. سپس با استفاده از دستگاه SEM مشاهده و بررسی شدند. ساختار زیستی سطح GO توسط روش FTIR مورد بررسی قرار گرفت. طیف‌های مختلف با دقت‌های تفکیک $4\ cm^{-1}$ و $0/01\ cm^{-1}$، بین مقادیر $4000\ cm^{-1}$ -$500\ cm^{-1}$ با استفاده از روش طیف‌سنجی Perkin Elmer Spectrum two series model instrumental analysis with KBr disc method مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند (Azimi *et al.*,2016).

نتایج و بحث

ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده زایلن

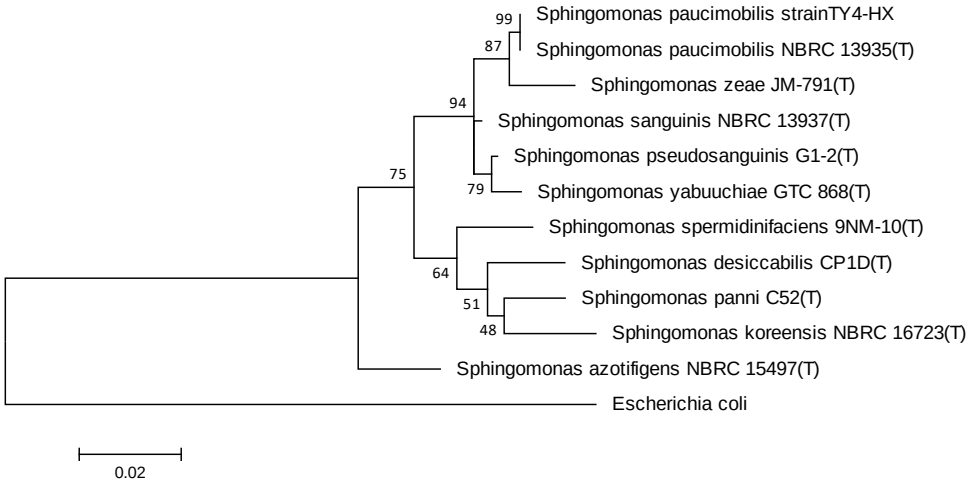
پس از نمونه‌برداری از خاک‌آلوده، بر پایه بهترین فرآیند کشت و رشد باکتری در محیط کشت پایه نمکی حاوی زایلن با شرایط بهینه، سویه‌های باکتریایی که قادر به تجزیه زیستی زایلن بودند، انتخاب شدند (شکل۲).



شکل۲- کلونی‌های سویهTY4-HX از Sphingomonas paucimobilis در پلیت اگاره محیط پایه نمکی حاوی زایلن

Fig. 2- Colonies of Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX on MSM xylene-containing agar plates

سویه باکتری جداسازی شده گرم منفی، حاوی رنگ‌دانه‌های زرد، میله‌ای شکل و متحرک، با تاژک قطبی منفرد بودند. نتایج آزمایش‌های کاتالاز، هیدرولیز اسکولین، بتا گالاکتوزیداز، اکسیداز و تجزیه گلوکز برای تمامی سویه‌های جداسازی شده مثبت بود. مقایسه توالی ژن 16S rDNA از محیط ایزوله با توالی بانک ژن نشان داد که سویه جداسازی شده دارای بیشترین شباهت (۹۹٪) به سویه TY4-HXاز باکتری *Sphingomonas paucimobilis* است. این جنس باکتری برای تجزیه مواد آلی آروماتیک مانند مواد آلی مونوآروماتیک (MAHs) و مواد آلی پلی‌آروماتیک (PAHs) استفاده شد (Story *et al*., 2004). باکتری *Sphingomonas* به دلیل کاربردهای احتمالی که در تیمارهای زیستی، همواره در مطالعه‌های پژوهشی موردتوجه بوده است. از این باکتری در پاک‌سازی آلودگی‌های محیط زیستی استفاده‌شده است. شکل ۲ نشان‌دهنده درخت تبارشناختی سویه TY4-HX از باکتری *Sphingomonas paucimobilis* است که با استفاده از نسخه ۶ نرم‌افزار MEGA آماده‌شده است (Yoon *et al*., 2017).



شکل۳- درخت تبارشناختی بر اساس توالی ۱۶ SrDNA برای سویه TY4-HX از باکتری Sphingomonas paucimobilis و دیگر سویه‌های مرتبط

Fig. 3- A phylogenetic tree based on the 16S rDNA of Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX and related strains

توسعه مدل RSM

Response Surfuce Methedology (RSM) یک رویکرد آماری است که فاکتورهای تاثیرگذار را بصورت منفرد و متقابل شامل غلظت اکسید گرافن،غلظت زایلن، pH، دما برای تجزیه زایلن مورد بررسی قرار می دهد. از طراحی RSM برای به دست آوردن میزان دقیق فاکتورها استفاده‌شده است. به صورتی که X1 غلظت اکسید گرافن،X2 غلظت زایلن ،X3 بیانگر X4،pH دما، R1 برابر با (Xylene degradation) Actule value، R2 میزان پیش‌بینی‌شده است (جدول ۲).

جدول ۲- طراحی RSM برای هر یک از سه عامل و نتایج تجربی آن‌ها

Table 2. RSM design for the three factors and their experimental results

std	Run	X_1	X_2	X_3	X_4	R_1	R_2
18	1	0.65	1.5	7	32	86.30	88.92
16	2	0.50	2.0	8	40	55.00	57.24
14	3	0.50	1.0	8	40	65.00	5914
12	4	0.50	2.0	6	40	53.70	56.39
28	5	0.35	1.5	7	32	73.00	73.00
22	6	0.35	1.5	9	32	38.00	38.60
2	7	0.50	1.0	6	24	52.00	50.82
10	8	0.50	1.0	6	40	62.00	59.59
7	9	0.20	2.0	8	24	45.00	44.36
8	10	0.50	2.0	8	24	50.40	49.92
19	11	0.35	0.5	7	32	38.00	43.95
11	12	0.20	2.0	6	40	36.50	32.57
13	13	0.20	1.0	8	40	50.00	50.18
25	14	0.35	1.5	7	32	73.00	73.00
30	15	0.35	1.5	7	32	73.00	73.00
29	16	0.35	1.5	7	32	73.00	73.00
5	17	0.20	1.0	8	24	37.70	35.96
15	18	0.20	2.0	8	40	46.50	48.63
20	19	0.35	2.5	7	32	53.00	49.15
23	20	0.35	1.5	7	16	23.00	24.38
9	21	0.20	1.0	6	40	34.00	35.42
27	22	0.35	1.5	7	32	73.00	73.00
6	23	0.50	1.0	8	24	41.00	41.88
17	24	0.05	1.5	7	32	59.70	59.18
4	25	0.50	2.0	6	24	60.80	57.57
3	26	0.20	2.0	6	24	30.00	36.80
21	27	0.35	1.5	5	32	30.00	31.50
26	28	0.35	1.5	7	32	73.00	73.00
1	29	0.20	1.0	6	24	35.00	29.71
24	30	0.35	1.5	7	48	36.70	37.42

تخریب زیستی زایلن

با استفاده از تحلیل‌های رگرسیون مختلف بر داده‌های تجربی به‌دست‌آمده حاصل از معادله (۱) و با تخمین ضرایب رگرسیون، معادله‌ای از مرتبه دو (معادله ۲) که نشان‌دهنده‌ی تجزیه زیستی زایلن است، به شرح زیر به‌دست‌آمد:

$$Y= 0.73+7.43X_1 +1.78X_3+3.26X_4 -6.61X_2^2 -9.49X_3^2-10.52X_4^2-3.8X_1X_3-2.49X_2X_4 +2.13X_3X_4 \quad (۲)$$

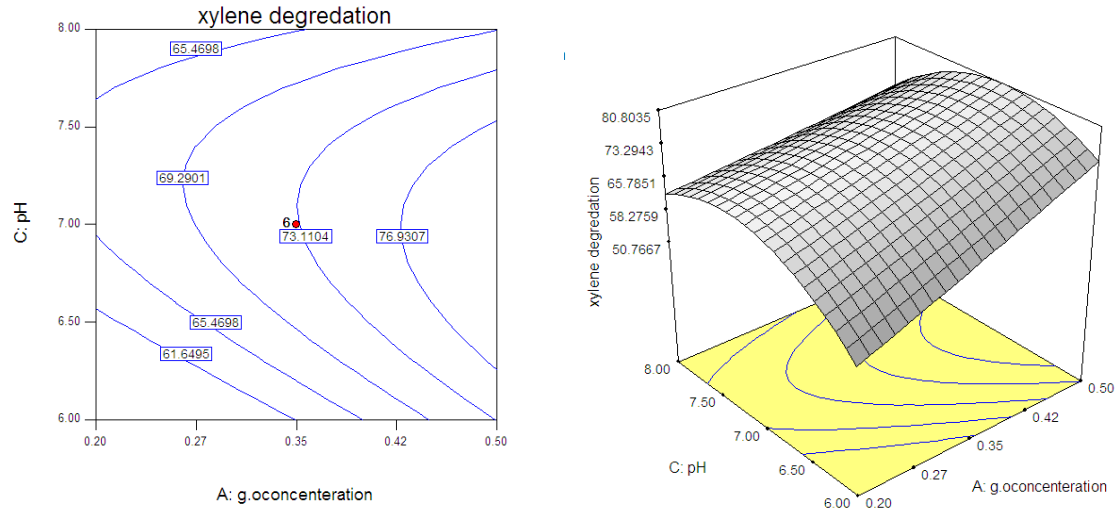
سطوح بهینه پیش‌بینی‌شده از X_1، X_2، X_3 و X_4 با استفاده از تحلیل رگرسیونی (معادله ۲) به‌دست‌آمده است، به‌طوری‌که میزان پیش‌بینی‌شده به ترتیب برای غلظت اکسید گرافن، PH، دما و غلظت زایلن عبارت‌اند از: ۰/۶۵g/l، ۷،°C ۳۲، و ۱/۵ g/l. پیش‌بینی مقدار تجزیه زیستی زایلن برابر ۸۸/۹۲٪ بود. مقدار ضریب تعیین میزان رگرسیون R_2 برای پاسخ‌های معنی‌دار برابر با ۰/۹۷۱۴ می‌باشد که نشان‌دهنده اثر ۹۷/۱۴ درصدی فاکتورها در تجزیه زیستی زایلن است. دقت مدل مرتبه چهار تجزیه زیستی زایلن با استفاده از مدل ANOVA نیز بررسی شد. در جدول ۳ خلاصه‌ای از ویژگی‌های مدل مرتبه دو که شامل جمله‌های خطی، برهم‌کنش دو فاکتوری، و توان دو است، را نشان می‌دهد. مدل‌های خطی و برهم‌کنشی اهمیت بالایی در تجزیه زیستی زایلن دارد. همچنین شکل‌های چهار الف و ب، پنج الف و ب و شش الف و ب نشانگر منحنی خطی و فضایی معنا دار در تجزیه زایلن براساس نرم افزار RSM است.

جدول ۳- تحلیل واریانس (ANOVA) مدل مرتبه دو برای زایلن

Table 3. ANOVA of the quadratic model for xylene

Source	Sum of Squares DF	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	7713.19 14 550.94 36.35 < 0.0001	14	550.94	36.35	< 0.0001	significant
A	1326.11	1	550.94	87.50	< 0.0001	
B	40.56	1	1326.11	2.68	0.1227	
C	75.62	1	40.56	4.99	0.0412	
D	254.80	1	75.62	16.81	0.0009	
A2	1.89	1	254.80	0.12	0.7289	
B2	1199.32	1	1.89	79.14	< 0.0001	
C2	2468.92	1	1199.32	162.91	< 0.0001	
D2	3038.42	1	2468.92	200.49	< 0.0001	
AB	0.12	1	3038.42	8.083E-003	0.9296	
AC	231.04	1	0.12	15.25	0.0014	
AD	9.30	1	231.04	0.61	0.4455	
BC	1.69	1	9.30	0.11	0.7430	
BD	99.00	1	1.69	6.53	0.0219	
CD	72.25	1	99.00	4.77	0.0453	
Residual	227.32	15	72.25			
Lack of Fit	227.32	10	15.15			
Pure Error	0.000	5	22.73			
Cor Total	7940.51	29				

The Model F-value of 36.35 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise. Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

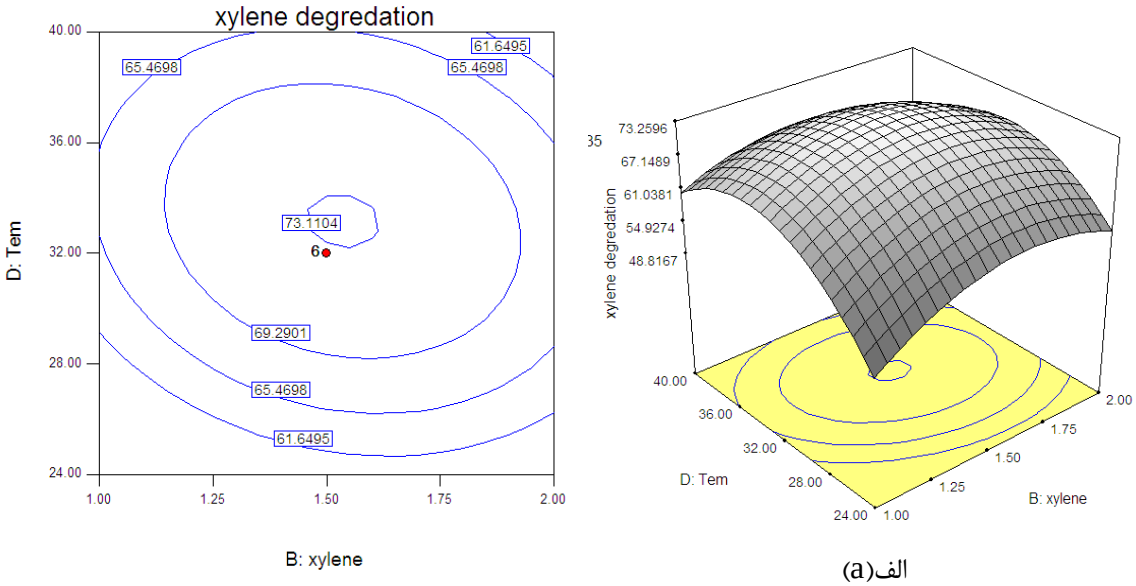


(b) ب

(a) الف

شکل ۴- طراحی سطح پاسخ تاثیر متقابل pH و غلظت اکسیدگرافن بر میزان تجزیه زیستی زایلن(الف :نمودار سطحی ،ب:نمودار شمارشی)

Fig. 4- Effect of the level of interaction between pH and graphene oxide concentration on total xylene removal: (a) surface plot and (b) contour plot



B: xylene

(b ب)

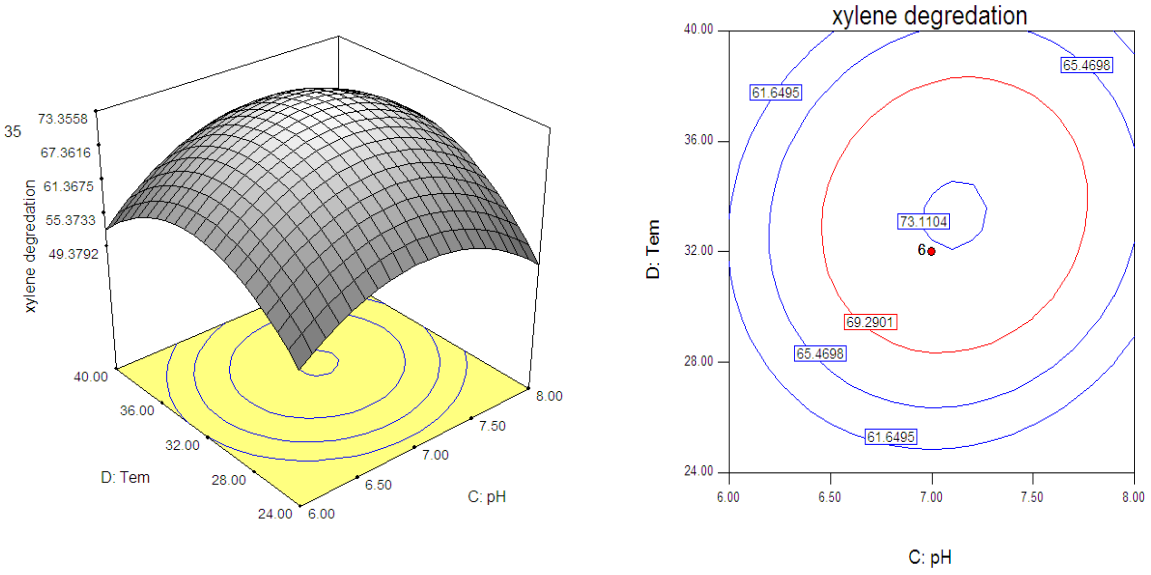
الف(a)

شکل ۵- طراحی سطح پاسخ تاثیر متقابل دما و غلظت زایلن بر میزان تجزیه زیستی زایلن (الف: نمودار سطحی، ب: نمودار شمارشی)

Fig. 5- Effect of the level of interaction between of temperature and xylene concentration on total xylene removal: (a) surface plot and (b) contour plot

شکل ۴ نشان می دهد که در طراحی سطح پاسخ، تاثیر غلظت اکسید گرافن و pH چگونه بر میزان تجزیه زیستی زایلن موثر می باشد و با رسیدن pH به عدد ۷ این میزان افزایش و با کاهش و یا افزایش pH، میزان تجزیه زیستی زایلن کاهش می‌یابد. همچنین اثرهای متقابل pH و غلظت زایلن نیز دراین بررسی مشخص گردید

شکل ۵ نشان می‌دهد که در طراحی سطح پاسخ، تاثیر غلظت زایلن و دما چگونه بر میزان تجزیه زیستی زایلن موثر است و با رسیدن دما به ۳۲ درجه سانتی‌گراد این میزان افزایش و با کاهش و یا افزایش دما از دمای بهینه، میزان تجزیه زیستی زایلن کاهش می‌یابد. همچنین اثرهای متقابل دما وغلظت زایلن نیز دراین بررسی مشخص شد.



الف(a) ب(b)

شکل۶: طراحی سطح پاسخ تاثیر متقابل دما و pH بر میزان تجزیه زیستی زایلن (الف: نمودار سطح ،ب: نمودار شمارشی)

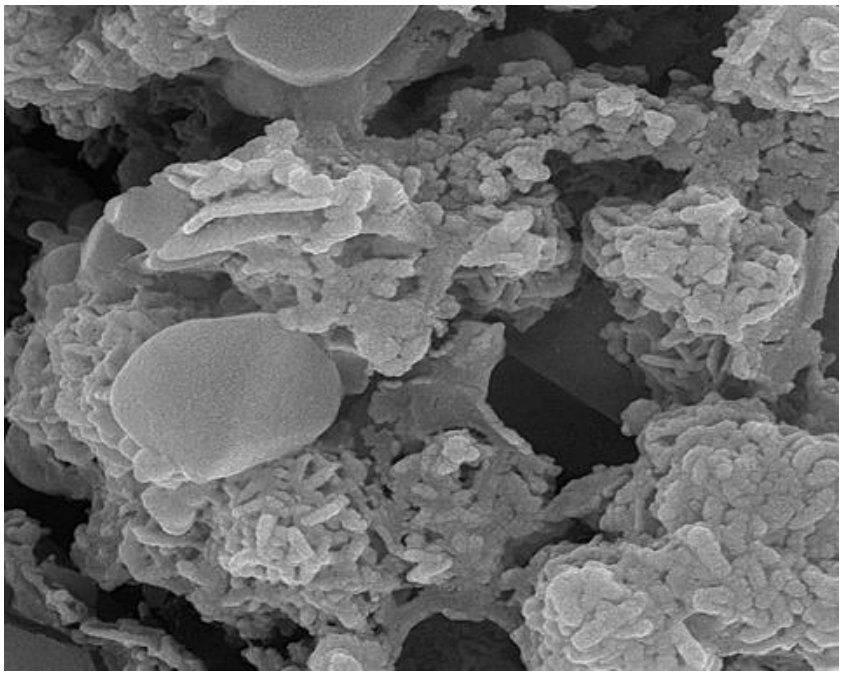
Fig. 6- Effect of the level of interaction between of pH and temperature on total xylene removal: (a) surface plot and (b) contour plot

شکل ۶ نشان می دهد که در طراحی سطح پاسخ، اثرهای pH و دما چگونه بر میزان تجزیه زیستی زایلن موثر است و با رسیدن دما به ۳۲ درجه سانتی‌گراد این میزان افزایش و با کاهش و یا افزایش دما ازدمای بهینه، میزان تجزیه زیستی زایلن کاهش می‌یابد. همچنین تاثیر متقابل دما و pH نیز دراین بررسی مشخص شد.

نتایج آنالیزهای SEM و FTIR

اتصال باکتریایی بر سطح اکسید گرافن در حضور۱/۵گرم بر لیتر زایلن با استفاده از دستگاه SEM مشاهده شد. شکل ۷ بیانگر باکتری‌های محصورشده در میان توده‌های منظم اکسید گرافن است، که می‌تواند ناشی از برهم‌کنش سلول‌های باکتریایی با سطح خارجی لایه‌های منظم اکسید گرافن باشد. همچنین بنا به شکل۷ مشاهده شد که تغییر زیادی در ریخت‌شناسی این سویه باکتری پس از دوره گرمادهی همراه با اکسید گرافن وجود ندارد. تصاویر SEM نشان‌داد که لایه‌های اکسید گرافن فقط به‌واسطه مکانیسم غربال‌گری و بدون خسارت به دیواره سلول، سلول‌های باکتریایی را جدا می‌کنند. بنا بر پژوهش‌های مشابه صورت گرفته انتظار می‌رفت، که هیچ تغییری در ساختار اکسید گرافن پس از تثبیت باکتریایی رخ نداده باشد، که این موضوع از امتیازهای این روش محسوب می‌شود (Kolangikhah *et al*., 2012). مشاهده-های به‌دست آمده از این تحقیق متفاوت از بررسی‌های مشابه است. به این دلیل که استفاده از نانولوله‌های کربنی غیر آرایه‌ای در آن پژوهش‌ها، غشای دیواره سلولی به

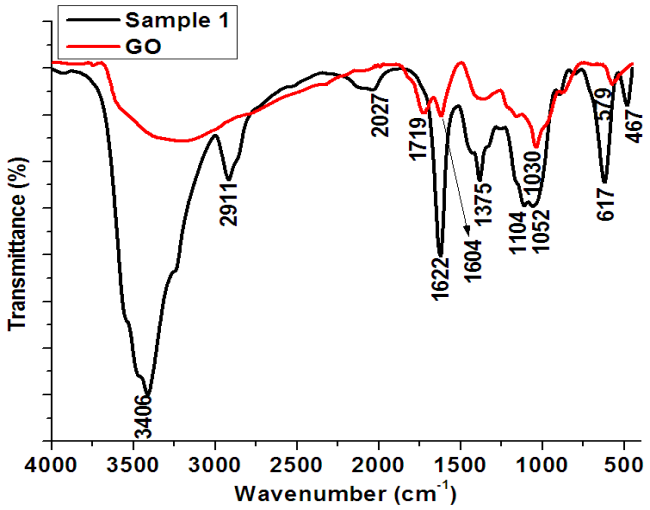
دلیل مکانیسم‌های سم زا مانند تنش‌های اکسیداتیو و آسیب‌های فیزیکی، آسیب‌دیده و از هم‌گسیخته می‌شود (Nel *et al*., 2004). طبق نتایج حاصل در این تحقیق، آسیب‌های اشاره شده در این بررسی دیده نشدند (شکل۷).



شکل ۷- تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی (با تفکیک ۱ µm) از G.O/Sphingomonas paucimobilis strainTY4-HX.A. محدوده A لایه‌های اکسید گرافن، و محدوده B سویه TY4-HX از باکتری Sphingomonas paucimobilis

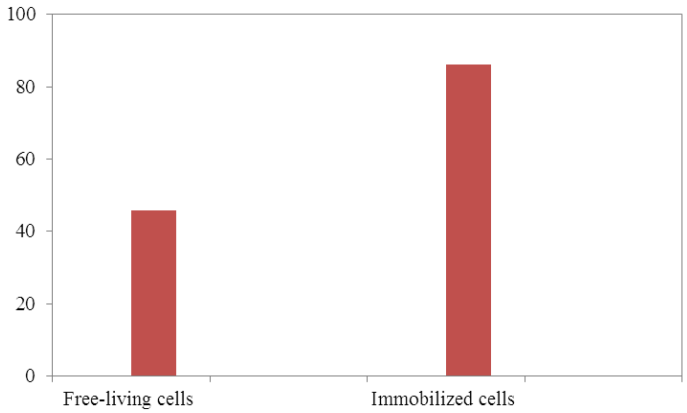
. 7- Scanning electron microscopy image (1µm resolution) of the graphene oxide (a) and Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX (b)

شکل۸ مقایسه کل طیف GO و G.O/*Sphingomonas paucimobilis* strainTY4-HX.A را نشان می‌دهد. این طیف‌نگاری FTIR از محصول‌ها و لایه‌های سالم اکسید گرافن به‌عمل‌آمده است. طبق این طیف‌نگاری برای اکسید گرافن میزان بیشینه به مرکز cm^{-1} ۳۲۳۲ به ارتعاش و کشسانی مولکول O-H مرتبط است. به‌عبارت‌دیگر، میزان بیشینه در cm^{-1} ۱۷۱۹، ۱۶۰۴، ۱۳۶۷ و ۱۲۷۱ به کشسانی C=O، اوربیتال هیبریدی ۲sp برای C=C و باند O-H، کشسانی C-OH و کشسانی C-O-O مربوط است (Nouri *et al*., 2017). به‌علاوه، میزان بیشینه در cm^{-1} ۱۱۱۰ و ۱۱۰۴ می‌توانند به کشسانی C-O از گروه‌های آلکوکسی و اپوکسی مرتبط باشد (Garrigues *et al*., 1992). بنا به شکل مشاهده شد که پیک‌های بیشینه لایه‌های اکسید گرافن دارای انحراف هستند که نشان‌دهنده برهم‌کنش بین زایلن، سویه باکتری و لایه‌های اکسید گرافن است. البته برخی از پیک‌های مشاهده‌شده در cm^{-1} ۶۱۷ و cm^{-1} ۱۱۰۴متعلق به زایلن است (Nouri *et al*., 2017). همچنین پیک مشاهده‌شده در cm^{-1} ۲۹۱۱به اکسید گرافن کاهش‌یافته (rGO) که در بررسی‌های پیشین نیز دیده‌شد، مرتبط است (Nel *et al*., 2004). بنابراین، نتایج FTIR نشان داد که یک برهم‌کنش خوب بین این باکتری‌ها و لایه‌های اکسید گرافن رخ‌داده است و لایه‌های اکسید گرافن در طول فرآیند تجزیه زیستی به لایه‌های اکسید گرافن کاهش‌یافته (rGO) تغییریافتند.



شکل ۸- طیف فروسرخ G.O/Sphingomonas paucimobilis strainTY4-HX.A

Fig. 8- The infrared spectrum of the graphene oxide/ Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX



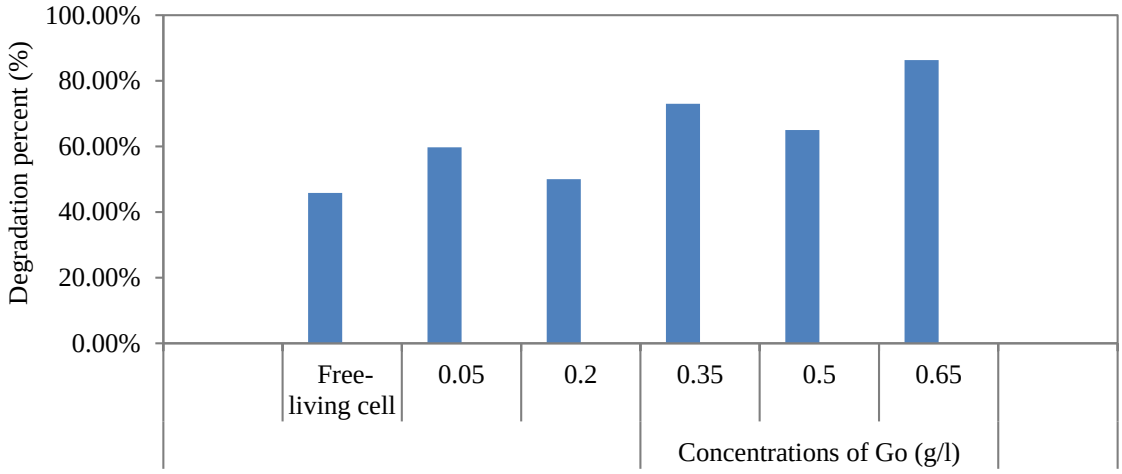
شکل۹ - مقایسه درصد حذف زایلن با سلول‌های آزاد و تثبیت‌شده سویه TY4-HX از باکتری Sphingomonas paucimobilis با اکسیدگرافن

Fig. 9- The comparison of xylene removal percentage by free-living cells and immobilized cells of Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX on graphene oxide

مقایسه عملکرد حذف زیستی زایلن بین سویه آزاد و تثبیت‌شده

فرآیند حذف ۱/۵ گرم بر لیتراز زایلن با استفاده از سلول‌های آزاد و تثبیت‌شده سویه TY4-HX با میزان‌های مختلف از اکسید گرافن با pH اولیه ۷، دمای ℃ ۳۲، در طول ۲۴ ساعت و در انکوباتور شیکردار با سرعت گردش rpm ۱۵۰مطالعه شده است در پایین (شکل ۹الف). نیز، درصد بالاتری از حذف زایلن حین تثبیت سلول‌ها با غلظت ۰/۶۵گرم بر لیتر از اکسید گرافن مشاهده‌شده است. در این بررسی زایلن تحت شرایط pH برابر با ۷، دمای ℃ ۳۲ و غلظت اولیه ۱/۵گرم بر لیتر به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای و به میزان ۴۵/۸٪ در حضور سلول‌های آزاد و بیش از ۸۶/۳٪ در حضور سلول‌های تثبیت‌شده سویه TY4-HX از باکتری *Sphingomonas paucimobilis* دچار تجزیه زیستی گردید (شکل ۹ ب). پژوهش‌های مشابه نشان داده است که باکتری *Bacillus cereus WJ1* با الکترودهای گرافن چندلایه‌ای قادر به تجزیه زیستی فنل بوده و نیز امکان تکرارپذیری آن را افزایش دادند. همچنین گرافن، کارایی بهتری در جذب فنل نشان داد. مولکول‌های زایلن با بار الکتریکی مثبت، قادر به جذب مولکول‌های با بار منفی

اکسید گرافن بودند (Yan *et al.*, 2013). اکسید گرافن یک جاذب مؤثر ترکیب‌های BTEX باقابلیت قابل‌قبول در حذف این ترکیب‌ها از پساب‌ها نیز بود (Pourmand *et al.*, 2015; Behzadi *et al.*, 2015). مکانیسم جذب زایلن می تواند به دلیل تشدید عملکرد جذب زایلن به‌وسیله‌ی سویه باکتری و اکسید گرافن و همچنین به سبب واکنش دهندگی گیرندگی الکترون حلقه زایلن و دیواره سلولی، سویه باکتری باشد.



شکل ۱۰- مقایسه درصد حذف زایلن با سلول‌های آزاد و تثبیت شده سویه TY4-HX از باکتری *Sphingomonas paucimobilis* با غلظت های مختلف اکسید گرافن

Fig. ۱b- The Comparison of Xylene removal percentage by free-living cells and immobilized cells of *Sphingomonas paucimobilis strainTY4-HX* with GO

نتیجه‌گیری

در این تحقیق تجزیه زیستی زایلن با استفاده از سویه TY4-HX از باکتری *Sphingomonas paucimobilis* که از خاک‌آلوده به پسماندهای صنعتی واقع در شهرستان مسجدسلیمان در استان خوزستان جداسازی شد، بررسی گردید. باکتری تجزیه‌کننده زایلن با فعالیت بالا در عمل تجزیه زیستی و مقاومت زیاد در برابر غلظت‌های متفاوت از زایلن، دارای قابلیت حذف زیستی زایلن در محیط کشت پایه نمکی مایع به میزان ۴۵/۸٪ در بازه زمانی ۲۴ ساعت بود. به‌علاوه از اکسید گرافن برای تثبیت سویه TY4-HX استفاده شد. بررسی نتایج به‌دست آمده از FTIR و SEM نشان دادکه این سویه در طول دوره رشد باکتریایی خود قادر به چسبیدن به سطح اکسید گرافن است. سلول‌های تثبیت‌شده با پایداری بهتری قادر به تجزیه زیستی زایلن به میزان ۸۶/۳٪ با غلظت اولیه۰/۶۵گرم برلیتراز اکسید گرافن طی ۲۴ ساعت بودند. نتایج بیانگر عملکرد بهتر باکتری‌های تثبیت‌شده در تجزیه زیستی زایلن در مقایسه با باکتری‌های آزاد به دلیل حضور گروه کربوکسیلیک سطحی اکسید گرافن است. با استفاده از روش RSM، میزان بهینه pH، دما و غلظت زایلن برای تجزیه زیستی آن به کمک سلول‌های تثبیت‌شده و آزاد به ترتیب برابر است با ۷،۰ °C ۳۲ و ۱/۵گرم بر لیترتعیین شد. ویژگی‌های منحصربه‌فرد اکسید گرافن ازجمله ایجاد سطح بسیار مناسب برای اتصال و واکنش با ترکیب‌های معدنی و آلی و زدودن این ترکیب‌ها و نیز تثبیت میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیب‌های آلی نظیر اسفنگوموناس، این ترکیب را به‌عنوان یک ماده باقابلیت بالا معرفی می‌کند که در پژوهش‌های آینده برای بهبود کارایی و سرعت تجزیه‌پذیری جایگاه ویژه‌ای خواهد داشت.

سپاسگزاری

نگارندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد مسجدسلیمان به دلیل حمایت از این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

پی‌نوشت‌ها

1 Environmental Protection Agency
2 Ribotyping
3 General primers
4 Polymerase chain reaction (PCR)
5 Genealogy
6 Ultrasonic waves

منابع

Aivalioti, M., Vamvasakis, I. and Gidarakos, E., 2010. BTEX and MTBE adsorption onto raw and thermally modified diatomite. Journal of Hazardous Materials. 178 (1-3), 136-43.

ATSDR., 2007. Interaction profile for Benzene, ethylbenzene, toluene and Xylene (BTEX)Agency for Toxic substances and disease Registry. Us Department of Health Human Services, Atlanta.

Ayat, E.E., Muftah, T., El-Naas, H. and Janice A.A., 2017. Biodegradation of BTEX: optimization through response surface methodology. American Journal of Engineering and Applied Sciences. 10 (1), 20-31.

Azimi, H.R., Ghoranneviss. M. and Elahi, M., 2016. Excellent photovoltaic and UV detector applications of ZnS/rGO nanocomposites synthesized by a green method. Ceramics International, 42(12), 14094–14099.

Behzadi, M. and Mirzaei, M., 2016. Poly (o-anisidine)/graphene oxide nano sheets composite as a coatingfor the headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene and Xylenes. Journal of Chromatography A. 1443(22), 35–42.

Berlendis. S., Lascourreges, J., Schraauwers, B., Sivadon, P. and Mago, M.T., 2010. Anaerobic biodegradation of BTEX by original bacterial communities from an underground gas storage aquiferEnvironmental Science & Technology. 44(9), 3621–3628.

Bina, B., Amin, M.M., Rashidi, A. and Pourzamani, H., 2012. Benzene and toluene removal by carbon nanotubes from aqueous solution. Archives of Environmental Protection. 38(1), 3-35.

Brigmon, R.,Camper, D. and Stutzenberger, F., 2002. Bioremediation of compounds hazardous health and the environment. Progress in Industrial microbiology. 36, 1-28.

Dursun, A.Y. and Tepe, O., 2005. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized Ralstonia eutropha. Journal of Hazardous Materials. 126(1-3), 105-111.

Firmino, P.I.M., Farias, R.S., Buarque, P.M.C. Costa, M.C., Rodríguez, E., Lopes, A.C. and dos Santos, A.B., 2015. Engineering and microbiological aspects of BTEX removal in bioreactors under sulfate-reducing conditions. Chemical Engineering Journal. 260, 503-512.

Garrigues, S., Gallignani, M. and De la Guardia. M., 1992. Simultaneous determination of *ortho-*, *meta-* and *para-*Xylene by flow injection-Fourier transform infrared spectroscopy. Analyst. 117, 1849-1853.

Guo, H., Yao, J., Chen, H., Wang, J., Masakorala, K., Jin, Y., Richnow, H.H. and Blake, R.E., 2012. Substrate interactions during biodegradation of benzene/alkyl benzene mixtures by Rhodococcus sp. ustb-1. International Biodeterioration & Biodegradation. 75, 124-130

Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z. and Wang, J., 2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of

flavonoids from Folium eucommiae and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro Food Chemistry. 114(3), 1147–1154.

Jean, j., Lee, M.K., Wang, S.M., Chattopadhyay, P. and Maity, J.P., 2008. Effects of inorganic nutrient levels on the biodegradation of benzene, toluene, and Xylene (BTX) by Pseudomonas spp. in a laboratory porous media sand aquifer model. Bioresource Technology. 99(16), 7807–7815.

Jin, H.M., Choi, E.J. and Jeon, C.O., 2013. Isolation of a BTEX-degrading bacterium, Janibacter sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. Bioresource Technology. 145, 57-64.

Kolangikhah, M., Maghrebi, M., Ghazvini, K. and Farhadian, N., 2012. Separation of Salmonella typhimurium bacteria from water using MWCNTs arrays. International Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 8(1), 23-10.

Madueno, L., Coppotelli, B.M., Alvarez, H.M. and Morelli, I.S., 2011. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. International Biodeterioration & Biodegradation. 65(2), 345-351.

Mesgari Shadi. A., Yaghmaei. S., Vafaei. F., Khataee. A. and Hejazi. M., 2015. Degradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) from aqueous solution by isolated bacteria from contaminated sites. *Research on Chemical Intermediates*. 41(1), 265–275.

Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N., 2006. Toxin potential of material at the nano level. Journal Science. 311(5761), 622 -627

Nouri.M., Moghaddam Saray.A., Azimi. H.R. and Yousefi. R., 2017. High solar-light photocatalytic activity of using Cu3Se2/rGO nanocomposites synthesized by a green co-precipitation method. Solid State Sciences. 73, 7-12.

Pourmand, S., Abdouss, M. and Rashidi, A.M., 2015. Preparation of nanoporous graphene via nanoporous zincoxide and its application as a nano adsorbent for benzene, toluene and xylenes removal. International Journal of Environmental Research. 9(4), 1269-1276.

Pourzamani, H.R., Bina, B., Rashidi, A.M. and Amin, M.M., 2012. Performance of raw and regenerated multi- and single-walled carbon nanotubes in xylene removal from aqueous solutions. International Journal of Environmental Health Engineering. 1(1), 20-23.

Ranya, A., Amer, M., Nasier, M. and Ehab, R.E., 2008. Biodegradation of Monocyclic Aromatic Hydrocarbons by a Newly Isolated Pseudomonas strain. Biotechnology. 7, 630-640.

Singh, R.S. and Celin, M., 2010. Biodegradation of BTEX (Benzene, Tolune, EthylBenzene, and Xylene) compounds by Bacterial strain under Aerobic conditions. Journal of Ecobiotechnology. 2(4), 27-32.

Stefani, F.O.P., Bell, T.H., Marchand, C., Providencia.I., Yassimi, A.E., St-Arnaud, M. and Hijri, M., 2015. Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. PLoS ONE. 10(6), e0128272.

Story, S., Kline, E., Hughes, T., Riley, M. and Hayasaka, M., 2004. Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Sphingomonas paucimobilis Strain EPA505. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 47(2), 168–176.

Yan, F.F., Wu, C., Cheng, Y.Y., He, Y.R., Li, W.W. and Yu, H.Q., 2013. Carbon nanotubes promote Cr (VI) reduction by alginate-immobilized Shewanella oneidensis MR-1. Biochemical Engineering Journal. 77 (15), 183-189.

Yan, Z., Daban, L., Tianzhen, J., Letao, W., Shaoxiong, L., Yue, Z., Chunming, W., Haijing, H. and Yongling, D., 2013. Biodegradation of Phenol Using Bacillus cereus WJ1 and Evaluation of Degradation Efficiency Based on a Graphene-Modified Electrode. International Journal of Electrochemical Science. 8(3), 504 – 519.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 67(5), 1613-1617.

Zhao, X., Wang, L., Bai, S., Yang, J. and Qi, S., 2017. Pseudomonas sp. ZXY-1, a newly isolated and highly efficient atrazine-degrading bacterium, and optimization of biodegradation using response surface methodology. Journal of Environmental Sciences. 54, 152-159.

Environmental Sciences Vol.16 / No.4 / Winter 2019

63-80

Xylene biodegradation by free and immobilized Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX on graphene oxide

Hossein Mohammadpour[1], Mahdi Shahriarinour[2*] and Ramin Yousefi[3]

[1] Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

[2] Department of Microbiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

[3] Department of Physics, Masjed-Soleiman Branch, Islamic Azad University, Masjed-Soleiman,

Received: 2018.05.05 Accepted: 2018.11.04

Mohammadpour, H., Shahriarinour, M. and Yousefi, R., 2019. Xylene biodegradation by free and immobilized Sphingomonas paucimobilis strain TY4-HX on graphene oxide. Environmental Sciences. 16(4):63-80.

Introduction: In recent decades, xylene has been considered as one of the most important pollutants in soil, along with other aromatic compounds in crude oil and other petrochemicals. Therefore, the aim of this study was to find bacteria for the biodegradation of this compound and to increase the degradation efficiency of this compound with the help of immobilizing the bacterium on compounds with a nanostructure such as graphene oxide.

Material and methods: In the current study, biodegradation of xylene by free and immobilized bacteria on graphene oxide was studied under optimized conditions. Isolated xylene degrading bacteria from contaminated soils were identified based on 16S rDNA gene sequencing and submitted to gene bank as *Sphingomonas paucimobilis* strain TY4-HX. Using response surface methodology, optimum values of pH, temperature and xylene concentration for xylene degradation by free and immobilized cells were determined as 7, 32ºC and 1.5g/l, respectively.

Results and discussion: Free bacterial cells were able to degrade 45.8% of the xylene after 24h under optimized conditions. Analyzes by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscope (SEM) showed that the strain adhered onto the Graphene oxide surface and developed a biofilm. Immobilized cells were able to degrade up to 86.3% of the xylene after 24h under optimized conditions.

Conclusion: Our results indicated that free and immobilized Bacteria had a suitable application potential in the treatment of xylene-containing soils.

Keywords: Biodegradation, Graphene oxide, Response surface methodology, SEM, Xylene.

[*] Corresponding Author. *E-mail Address*: mahdi.shahriari@iaurasht.ac.ir