جداسازی و بهینه‌سازی باکتری *Staphylococcus gallinarum* ATHH41 تجزیه‌کننده تولوئن با استفاده از روش سطح پاسخ

فاطمه حیدرنژاد[1*]، مهران هودجی[2]، مهدی شهریاری نور[3]، آرزو طهمورث پور[4]

[1*] دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)، [2] استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)، [3] استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و [4] دانشیار میکروبیولوژی گروه علوم پایه دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)

چکیده

این تحقیق به منظور جداسازی باکتری تجزیه‌کننده تولوئن و تعیین سطح بهینه برای دستیابی به حداکثر درصد تجزیه تولوئن صورت گرفت. در این تحقیق ابتدا اقدام به غنی‌سازی، جداسازی، خالص‌سازی و در نهایت شناسایی باکتری تجزیه-کننده تولوئن از خاک آلوده به این ترکیب انجام شد. جدایه به روش مولکولی تعیین توالی ۱۶S rDNA شناسایی گردید. بهینه‌سازی درصد تجزیه تولوئن با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) صورت گرفت. مطالعات مولکولی انجام شده نشان داد که باکتری جداسازی شده که توانایی رشد و تجزیه تولوئن را داراست *Staphylococcus gallinarum* ATHH41 می‌باشد. طرح آماری RSM در شرایط pH معادل ۷/۶۸، دمای انکوباسیون ۳۱/۷۳ درجه سانتی‌گراد و غلظت اولیه معادل ۶۳۶/۰۴ میلی‌گرم در لیتر تولوئن، راندمان تجزیه حدود ۷۰/۷۳ درصد را توسط باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 پیش‌بینی نمود و راندمان تجزیه ۶۸/۰۱ درصدی تولوئن توسط این باکتری در شرایط بهینه حاصل شد.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس گالیناروم*، بهینه‌سازی، تولوئن، روش سطح پاسخ

مقدمه

هیدروکربن‌های مونوآروماتیک، از جمله بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و ایزومرهای زایلن (BTEX)، یک دسته مهم از آلاینده-های زیست محیطی می‌باشند. این ترکیبات فرار، به دلیل مهاجرت سریع به آب و خاک و به علت سمیت و خاصیت سرطان-زائی، بسیار خطرناک هستند و به طور گسترده به عنوان مواد شیمیایی مختلف در فرآیندهای صنعتی و به مقدار قابل توجهی در سوخت‌های فسیلی یافت می‌شوند (اورتگا گونزالس[1] و همکاران، ۲۰۱۳). در اثر نشت ترکیبات نفتی از تانک‌های ذخیره، لوله‌ها و محل‌های دفن نامناسب و مواد شیمیایی مصنوعی به شکل علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و پساب‌های صنعتی به محیط وارد می‌شوند (ال‌ناس[2] و همکاران، ۲۰۱۴). پالایش این ترکیبات با روش‌های فیزیکی و شیمیایی گران قیمت است اما پاک‌سازی زیستی یکی از بی‌ضررترین و آسان‌ترین روش‌ها است و علاوه بر آن که ارزان‌تر و مقرون به صرفه‌تر است، یک روش سازگار با محیط زیست بوده و امکان معدنی‌شدن کامل هیدروکربن‌های نفتی را فراهم می‌کند. بنابراین توجه زیادی به حذف این ترکیبات از محیط زیست توسط تجزیه بیولوژیکی شده است (کائو[3] و همکاران، ۲۰۰۹). پاک‌سازی زیستی فرآیندی است که در آن با استفاده از اجزای سلولی یا فعالیت‌های متابولیکی میکروارگانیسم‌ها می‌توان مواد سمی را از محیط حذف یا به مواد غیرسمی و بی‌خطر تبدیل کرد (اندرونی و جیانفردا[4] ، ۲۰۰۷). میکروارگانیسم‌ها همچنین سطح سلول را برای جذب بسترهای

[1] Ortega-González et al.,
[2] El-Naas et al.,
[3] Cao et al.,
[4] Andreoni and Gianfreda

آبگریز افزایش داده و در نتیجه جذب آن‌ها را تسهیل می‌نمایند (میشرا[1] و همکاران، ۲۰۱۴). تجزیه زیستی تولوئن به بسیاری از عوامل از جمله دما (خلیفت[2] ، ۲۰۰۶)، pH، دوره انکوباسیون، منبع کربن و نیتروژن و سرعت هوادهی حساس می‌باشد (شوریان[3] و همکاران، ۲۰۰۹).

روش سطح پاسخ[4] (RSM)، یکی از ابزارهای موثری است که با کمترین منابع و داده‌های کمی، و با طرح آزمایشی مناسب همزمان چندین متغیر را تعیین می‌کند و از این رو، زمان کمتری صرف می‌کند. علاوه بر این، روش بهینه‌سازی یک عامل در یک زمان گران است و اغلب منجر به سوء تعبیر نتایج، زمانی که تعامل بین اجزای مختلف وجود دارد، می‌گردد (مایرز[5] و همکاران، ۲۰۱۶).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری تجزیه‌کننده تولوئن از خاک آلوده به نفت و بهینه‌سازی محیط کشت برای دستیابی به حداکثر تجزیه زیستی تولوئن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی، جداسازی و خالص‌سازی باکتری تجزیه‌کننده تولوئن

به منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری تجزیه‌کننده تولوئن، ۱۰ گرم از نمونه خاک در ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی[6] (MSM) شامل: $NaNO_3$ 4g، KH_2PO_4 1.5g، Na_2HPO_4 0.5g، $MgSO_4.7H_2O$ 0.2g، 0.0011g $FeSO_4.H_2O$، $CaCl_2$ 0.01g، حاوی 100 میلی‌گرم در لیتر تولوئن اضافه گردید و pH روی ۷ تنظیم شد. در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار انکوبه شد (ژانگ[7] و همکاران، ۲۰۱۳). پس از غنی‌سازی، سویه تجزیه‌کننده تولوئن با انتقال به محیط تولوئن آگار(حاوی محیط پایه نمکی، تولوئن و آگار) و انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد جداسازی شد (وانگ[8] و همکاران، ۲۰۰۸).

شناسایی جدایه انتخابی به روش تعیین توالی ۱۶S rDNA

به منظور شناسایی مولکولی جدایه پس از استخراج DNA، بخشی از توالی ۱۶S rDNA با پرایمر رفت 1502F-GGTTACCTTGTTACGACTT و پرایمر برگشت 27R-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG تکثیر شد (مک‌فرسون و مولر[9]، ۲۰۰۰). دستگاه PCR بر اساس دستورالعمل مادئنو[10] و همکاران، (۲۰۱۱) برنامه‌ریزی و محصول PCR به مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران ارسال گردید. تعیین توالی DNA به کمک نرم‌افزار Blast در پایگاه NCBI مورد بررسی و همولوژی آن با اطلاعات موجود در GeneBank مقایسه و ثبت شد.

روش سطح پاسخ

روش بهینه‌سازی سطح پاسخ (RSM) در واقع مجموعه‌ای از روش‌های تجربی، ریاضی و استنتاج آماری است که به‌طور فزاینده‌ای برای بهینه‌سازی در روند مطالعات فن‌آوری زیستی به کار برده می‌شود. طرح مرکب مرکزی یکی از معروف‌ترین روش‌های طراحی آزمایشات برای بهینه‌سازی و مدل‌سازی است. مزیت آن نسبت به روش‌های فاکتوریل آن است که، به منظور

[1] Mishra et al.,
[2] Khleifat
[3] Shourian et al.,
[4] Response Surface Methodology
[5] Myers et al.,
[6] Minimal Salt Medium
[7] Zhang et al.,
[8] Wang et al.,
[9] Mcpherson and Muller
[10] Madueno et al.,

بهینه‌سازی عوامل و تخمین سطوح پاسخ، با وجود داشتن دقت مناسب نیازمند تعداد آزمایشات کمتری است (اوزر و گوسر[1]، ۲۰۱۱).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_2 + b_{22}X_2 + b_{33}X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{13}X_1X_3 \quad (۱)$$

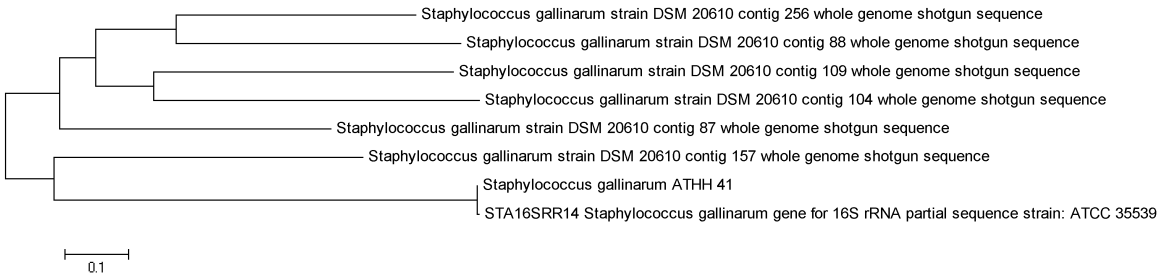
در این معادله Y پاسخ پیش‌بینی شده؛ b_0 ثابت مدل؛ b_1، b_2، b_3 ضریب خطی؛ b_{11}، b_{22}، b_{33} اثرات مربع هر متغیر؛ b_{12}، b_{13}، b_{23} اثرات متقابل؛ X_1، pH؛ X_2، دمای انکوباسیون و X_3، غلظت اولیه تولوئن هستند (آزامان[2] و همکاران، ۲۰۱۰). با استفاده از این ۳ فاکتور و ۵ سطح کد شده ($-\alpha$،۰،۱+،$+\alpha$)، با استفاده از نرم افزار Design-Expert 7.1 ۲۰ آزمایش طراحی گردید.

اندازه‌گیری تولوئن

غلظتی معادل با ۰/۵ مک فارلند از باکتری در محیط پایه نمکی تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از آن به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM مایع تلقیح گردید مقادیر مختلف pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن تنظیم شد و به مدت ۲۴ ساعت و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها با سرعت 6000 rpm و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید به مایع رویی ۱ میلی‌لیتر هگزان اضافه و به شدت تکان داده شد تا تولوئن موجود در محیط کشت در آن حل گردید. در پایان از فاز رویی که حاوی هگزان و تولوئن بود برای اندازه‌گیری میزان تولوئن در طول موج ۲۶۲ نانومتر استفاده شد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸).

نتایج و بحث

بعد از نمونه‌برداری از خاک و غنی‌سازی در محیط کشت MSM حاوی تولوئن سویه باکتری مقاوم به تولوئن جداسازی شد. سویه جداسازی شده کروی، گرم مثبت، کاتالاز و نیترات مثبت و اکسیداز منفی بود. مقایسه توالی ۱۶S rDNA به دست آمده از سویه با توالی موجود در Genebank نشان داد که همولوژی سویه جدا شده با باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم*[3] سویه ATCC 35539(T)، ۹۹/۹ درصد بوده است. بنابراین سویه به عنوان *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 (۱۳۸۹ جفت باز) با شماره دسترسی KX344723 ثبت گردید. شکل ۱ درخت فیلوژنیک *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 را نشان می‌دهد که با استفاده از نرم افزار MEGA (version 5.2) رسم گردید (تامورا[4] و همکاران، ۲۰۱۱).



شکل ۱- تصویر درخت فیلوژنی باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41

به منظور بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر تجزیه تولوئن از طراحی آزمایش‌ها با روش سطح پاسخ (RSM) استفاده گردید و سطوح بهینه هر پارامتر تعیین شد. آزمایش‌های بهینه طراحی شده RSM و تجزیه تولوئن به عنوان سطح پاسخ در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان دادند که حداکثر میزان تجزیه تولوئن توسط باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41

[1] Ozer and Gucer
[2] Azaman et al.,
[3] *Staphylococcus gallinarum*
[4] Tamura et al.,

در pH برابر ۷، دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر تولوئن مشاهده گردید و تجزیه تولوئن معادل ۶۹/۷۳ درصد بوده است.

جدول ۱- نتایج آزمایش‌های بهینه طراحی شده باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 در RSM

شماره آزمایش	pH	دمای انکوباسیون	غلظت اولیه تولوئن	تجزیه تولوئن(٪)	
		(°C)	($mg.l^{-1}$)	مقادیر تجربی	مقادیر پیش‌بینی شده
۱	۷	۳۰	۱۹۵/۴۶	۶۰/۷۰	۶۰/۴۰
۲	۶	۲۵	۴۰۰	۴۸/۰۲	۴۷/۹۰
۳	۸	۲۵	۴۰۰	۵۷/۱۵	۵۷/۱۴
۴	۶	۳۵	۴۰۰	۵۹/۱۷	۶۰/۳۶
۵	۸	۳۵	۴۰۰	۶۷/۹۶	۶۷/۵۲
۶	۷	۲۱/۵۹	۷۰۰	۵۴/۹۴	۵۵/۳۸
۷	۵/۳۲	۳۰	۷۰۰	۵۱/۲۳	۵۰/۲۲
۸	۷	۳۰	۷۰۰	۶۹/۶۴	۶۹/۲۲
۹	۷	۳۰	۷۰۰	۶۹/۷۲	۶۹/۲۲
۱۰	۷	۳۰	۷۰۰	۶۹/۷۳	۶۹/۲۲
۱۱	۷	۳۰	۷۰۰	۶۹/۵۰	۶۹/۲۲
۱۲	۷	۳۰	۷۰۰	۶۸/۳۰	۶۹/۲۲
۱۳	۷	۳۰	۷۰۰	۶۸/۳۹	۶۹/۲۲
۱۴	۸/۶۸	۳۰	۷۰۰	۶۵/۳۹	۶۶/۲۱
۱۵	۷	۳۸/۴۱	۷۰۰	۶۴/۵۴	۶۳/۹۱
۱۶	۶	۲۵	۱۰۰۰	۵۵/۳۱	۵۵/۸۹
۱۷	۸	۲۵	۱۰۰۰	۶۸/۸۰	۶۷/۷۴
۱۸	۶	۳۵	۱۰۰۰	۵۵/۵۰	۵۵/۶۶
۱۹	۸	۳۵	۱۰۰۰	۶۵/۱۸	۶۵/۴۳
۲۰	۷	۳۰	۱۲۰۴/۵۴	۶۵/۲۵	۶۵/۳۶

پس از تحلیل واریانس داده‌ها براساس معادله (۱)، ضرایب رگرسیون مربوط به درصد تجزیه تولوئن معادلات چند جمله‌ای مربوط به درصد تجزیه تولوئن باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 در زیر آورده شده است:

$$Y=۶۹/۲۲ + ۴/۷۵X_1 + ۲/۵۴X_2 + ۱/۴۸X_3 - ۳/۸۹X_1^2 - ۳/۳۹X_2^2 - ۲/۲۴X_3^2 - ۳/۱۷X_2X_3 \quad (۲)$$

مدل ارائه شده در معادله (۲) عبارت از معادلهٔ درجهٔ دو چند جمله‌ای (رگرسیونی) است که پس از حذف ضرایب بی‌معنی و در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارائه شده است. سطوح بهینه پیش‌بینی شده X_1، X_2 و X_3 به‌وسیله معادله (۲) به ترتیب pH ۷/۶۸، دمای انکوباسیون ۳۱/۷۳ درجه سانتی‌گراد و غلظت اولیه تولوئن ۶۳۶/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. درصد تجزیه تولوئن پیش‌بینی شده ۷۰/۷۳ درصد بود. ضریب تبیین (R^2) برابر ۰/۹۹ و ضریب تبیین تنظیم شده برابر ۰/۹۸ به دست آمد. جدول آنالیز واریانس(ANOVA) برای پیش‌بینی درصد تجزیه تولوئن مدل‌های درجه دومی که هر سه عبارت خطی، درجه دو و متقابل را شامل می‌شود، ارائه شده است. نتایج نشان داد که اثر متغیرهای مستقل pH، دمای انکوباسیون وغلظت اولیه تولوئن بر تجزیه تولوئن توسط باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۰۱). در حالی که اثر متقابل pH و غلظت اولیه تولوئن بر رشد باکتری و تجزیه تولوئن و همچنین اثر متقابل pH و دمای انکوباسیون بر تجزیه تولوئن توسط باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 معنی‌دار نمی‌باشند (P>۰/۰۵)(جدول ۲). من و چنگ[1]

[1] Men and Cheng

(۲۰۱۱)، پس از جداسازی گونه‌ای سودوموناس از لجن نشان دادند که سویه جدا شده توانایی خوبی برای حذف تولوئن با حداکثر راندمان حذف ۹۳/۸ درصد دارد. رشد و تجزیه تولوئن در ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رخ داده است اما بهینه دما در ۳۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. همچنین pH بهینه برای رشد و تجزیه تولوئن ۶/۵ بود.

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس(ANOVA) آزمایش‌های انجام شده تجزیه تولوئن توسط باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 با روش RSM

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-Value	P-Value
مدل	۸۹۸/۱۳	۹	۹۹/۷۹	۱۲۷/۶۳	<۰/۰۰۰۱***
X_1	۳۰۸/۵۲	۱	۳۰۸/۵۲	۳۹۴/۵۸	<۰/۰۰۰۱***
X_2	۸۷/۹۹	۱	۸۷/۹۹	۱۱۲/۵۳	<۰/۰۰۰۱***
X_3	۲۹/۷۳	۱	۲۹/۷۳	۳۸/۰۲	۰/۰۰۰۱***
X_1^2	۲۱۸/۰۸	۱	۲۱۸/۰۸	۲۷۸/۹۲	<۰/۰۰۰۱***
X_2^2	۱۶۵/۱۵	۱	۱۶۵/۱۵	۲۱۱/۲۲	<۰/۰۰۰۱***
X_3^2	۷۲/۳۴	۱	۷۲/۳۴	۹۲/۵۱	<۰/۰۰۰۱***
X_1X_2	۲/۱۷	۱	۲/۱۷	۲/۷۷	۰/۱۲۷۱ns
X_1X_3	۳/۴۲	۱	۳/۴۲	۴/۳۸	۰/۰۶۲۹ns
X_2X_3	۸۰/۵۴	۱	۸۰/۵۴	۱۰۳/۰۱	<۰/۰۰۰۱***
Residual	۷/۸۲	۱۰	۰/۷۸		
Lack of Fit	۵/۵۳	۵	۱/۱۱	۲/۴۱	۰/۱۷۷۷ns
Pure Error	۲/۲۹	۵	۰/۴۶		
جمع	۹۰۵/۹۵	۱۹			

Std. Dev. = ۰/۸۸	R-Squared = ۰/۹۹۱۴
Mean = ۶۲/۷۲	Adj R-Squared = ۰/۹۸۳۶
C.V. = ۱/۴۱	Pred R-Squared = ۰/۹۴۷۴
PRESS = ۴۷/۶۵	Adeq Precision = ۳۴/۱۰۰

X_1: pH; X_2: دمای انکوباسیون (°C); X_3: غلظت اولیه تولوئن ($mg.l^{-1}$)

منابع

Andreoni V. and Gianfreda L. 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. Applied Microbiology and Biotechnology, 76(2): 287-308.

Azaman S.N., Ramakrishnan N.R., Tan J.S., Rahim R.A., Abdullah M.P. and Ariff A.B. 2010. Optimization of an induction strategy for improving interferon-α2b production in the periplasm of Escherichia coli using response surface methodology. Biotechnology and Applied Biochemistry, 56(4): 141-150.

Cao B., Nagarajan K. and Loh K.C. 2009. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. Applied Microbiology and Biotechnology, 85(2): 207-228.

El-Naas M.H., Acio J.A. and El Telib A.E. 2014. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2(2): 1104-1122

Khleifat K.M. 2006. Biodegradation of phenol by Ewingella Americana: effect of carbon starvation and some growth conditions. Process Biochemistry, 41(9): 2010-2016.

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.

Mcpherson M.J. and Muller S.G. 2000. PCR. The basic from background to bench. 1st published, Bios scientific publishers. New York, Oxford.

Men J. and Cheng F. 2011. Biodegradation and growth characteristics of a toluene degrading strain. African Journal of Biotechnology. 10(61): 13299-13306.

Mishra S., Singh S.N. and Pande V. 2014. Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition. Bioresource Technology, 164: 299-308.

Myers R.H., Montgomery D.C. and Anderson-Cook C.M. 2016. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 4th edition. John Wiley and Sons.

Ortega-González D.K., Zaragoza D., Aguirre-Garrido J., Ramírez-Saad H., Hernández-Rodríguez C. and Jan-Roblero J. 2013. Degradation of benzene, toluene, and xylene isomers by a bacterial consortium obtained from rhizosphere soil of Cyperus sp. grown in a petroleum-contaminated area. Folia Microbiologica, 58(6): 569-577.

Ozer E.T. and Gucer C. 2011. Central composite design for the optimization of Cd and Pb determination in PVC materials by atomic absorption spectrometry after Kjeldahl digestion. Polymer Testing, 30(7): 773-778.

Shourian M., Noghabi K.A., Zahiri H.S., Bagheri T., Karballaei G., Mollaei M., Rad I., Ahadi S., Raheb J. and Abbasi H. 2009. Efficient phenol degradation by a newly characterized Pseudomonas sp. SA01 isolated from pharmaceutical Wastewaters. Desalination, 246(1-3): 577-594.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731-2739.

Wang L., Qiao N., Sun F. and Shao Z. 2008. Isolation ،gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. Extremophiles, 12(3): 335-342.

Zhang L., Zhang C., Cheng Z., Yao Y. and Chen J. 2013. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium Mycobacterium cosmeticum byf-4. Chemosphere, 90(4): 1340-1347.

Isolation and Optimization of Toluene Degradation Bacteria *Staphylococcus gallinarun* ATHH41 by Response Surface Methodology

Fatemeh Heydarnezhad[1*], Mehran Hoodaji[2], Mahdi Shahriarinour[3], Arezoo Tahmourespour[4]

[1*] Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Soil Science Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University. Email: fatemehheydarnezhad@yahoo.com

[2] Professor of Soil Science, Soil Science Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University.

[3] Assistant professor of Microbiology, Basic Sciences Department, Rasht Branch, Islamic Azad University.

[4] Associated professor of Microbiology, Basic Medical Sciences Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University.

Abstract

This study was done in order to isolate the toluene degrading bacteria and the determination of the optimal levels to obtain the maximum toluene degradation. In this study, enrichment, separation, purification and ultimately identification of the toluene degrading bacteria from contaminated soil was performed. The isolation was identified by molecular sequencing 16S rDNA. The optimization of toluene degrading bacteria was done using response surface methodology (RSM) and then the determination of the optimal levels to achieve maximum toluene degradation percentage of each parameter was done. Molecular studies showed that the isolated *Staphylococcus gallinarum* ATHH41 bacteria have the ability to degrade toluene. RSM design at pH 7.68, incubation temperature 31.73 (°C) and initial toluene concentration of 636.04 ($mg.l^{-1}$) predict toluene degradation efficiency of about 70.73 percent by *Staphylococcus gallinarum* strain ATHH41 and toluene degradation efficiency of 68.01 percent by this bacteria was obtained under optimum conditions.

Keywords: *Staphylococcus gallinarum*, optimization, toluene, response surface methodology.