شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: آلودگی زیست¬بوم، سلامت انسان و زیست¬پالایی

بررسی و تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی تولوئن توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده بر روی نانولوله‌های کربنی

فاطمه حیدرنژاد[۱*]، مهران هودجی[۲]، مهدی شهریاری نور[۳]، آرزو طهمورث پور[۴]

[۱] دکتری خاکشناسی گرایش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)

[۲] استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)

[۳] استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت

[۴] دانشیار میکروبیولوژی گروه علوم پایه دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)

چکیده

این تحقیق به منظور جداسازی باکتری تجزیه¬کننده تولوئن و تثبیت سلول به‌وسیله نانولوله‌کربنی و مقایسه سلول¬های آزاد و تثبیت¬شده با نانولوله¬کربنی چندجداره (MWCNTs) در شرایط مختلف محیطی اجرا گردید. در این تحقیق ابتدا اقدام به جداسازی باکتری تجزیه‌کننده تولوئن و شناسایی این باکتری به روش مولکولی تعیین توالی 16S rDNA گردید و سپس اقدام به تثبیت باکتری به¬وسیله نانولوله¬کربنی گردید. مطالعات مولکولی انجام شده نشان داد که باکتری جداسازی شده که توانایی رشد و تجزیه تولوئن را داراست *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 می¬باشد. سپس عوامل موثر بر تجزیه تولوئن pH(۵، ۶، ۷، ۸ و ۹)، دمای انکوباسیون (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰) (درجه سانتی‌گراد) و غلظت اولیه تولوئن (۲۰۰، ۴۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰) (میلی‌گرم در لیتر)در سلول¬های آزاد و تثبیت¬شده با نانولوله¬کربنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلول¬های تثبیت شده می-توانند غلظت تولوئن را تا ۹۷/۲ درصد کاهش داده و مقاوم به غلظت بالاتر تولوئن بوده و از باکتری در برابر تغییرات pH و دمای انکوباسیون محافظت می¬کند. همچنین این نتایج نشان می¬دهد که باکتری *بریوی باسیلوس پارابریویس* تثبیت¬شده با نانولوله¬کربنی دارای پتانسیل خوبی برای تیمار خاک حاوی تولوئن می¬باشد.

کلمات کلیدی: *بریوی باسیلوس پارابریویس*، توالی، مولکولی، 16S rDNA

مقدمه

تولوئن یکی از فرآورده‌های اصلی پتروشیمی است که به دلیل گسترش استفاده از آن و همچنین میزان سمیت بالا و سرطان‌زایی امروزه یک ماده آلوده‌کننده محسوب می‌شود. این ترکیب به عنوان آلاینده‌ی اولیه توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA) شناخته شده‌است(Mazzeo و همکاران، ۲۰۱۰). از طریق حفاری، ذخیره‌سازی، حمل و نقل، استخراج نفت، پتروشیمی، رنگ و صنایع چسب وارد محیط می-شود(Seifi و همکاران، ۲۰۱۱). به علت اثرات بهداشتی، به عنوان ترکیبی با خطر ریسک بالا برای محیط بـه شمار می‌رود و به عنوان آلاینده رایج زیست محیطی، اغلب در مکان‌های آلوده که ناشی از سوخت‌ها، حلال‌ها و یا مواد شیمیایی و شیوه‌های نامناسب دفع زباله است، یافت می‌شوند (Hu و همکاران، ۲۰۱۳). این ترکیب فرار، به دلیل مهاجرت سریع به آب و خاک و به علت سمیت و خاصیت سرطان‌زائی، بسیار خطرناک می‌باشد (Nadim و همکاران، ۲۰۰۰). با توجه به اثرات سمی و سرطان‌زایی تولوئن و ورود آن‌ها به آب‌های آزاد و زیرزمینی که زندگی آبزیان، انسان و سایر موجودات را تهدید می‌کند، ضرورت جداسازی ریزجانداران‌هایی که قادر به تجزیه زیستی این ترکیب هستند مشخص می‌شود. با جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد آلاینده و ترکیبات نفتی و تهیه بانک میکروبی و استفاده از آنها در مواقع بحرانی می‌توان حرکتی مهم در جهت کاهش آلاینده‌های محیطی و ایجاد یک اکوسیستم سالم انجام داد (Xiaofan and Oyaizu, 2003). روش‌های متعددی برای حذف آلاینده‌های مونوآروماتیک در محیط زیست ارائه شده است (Mazzeo و همکاران، ۲۰۱۰). تجزیه زیستی یک روش بسیار مناسب نسبت به روش‌های مرسوم برای حذف آلاینده‌ها با استفاده از فعالیت-های میکروبی طبیعی است (Gupta و همکاران، ۲۰۱۵).

تحقیقات گسترده‌ای در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده تولوئن و همچنین گزارش‌های زیادی در مورد استفاده از نانوتکنولوژی به عنوان فرآیند تصفیه و حذف آلاینده‌ها از محیط زیست وجود دارد (Joo and Cheng, 2006؛ Aivalioti et al., 2010؛ Wang et al., 2008؛ Dursun and Tepe, 2005,). اما تحقیقات کمی روی جنبه‌های مهندسی و توسعه صنعتی صورت گرفته است. موفقیت نانولوله‌های کربنی به عنوان بستر در حذف آلاینده‌های زیستی، به خصوصیات منحصر به فرد فیزیکی، سمیت برای سلول و ویژگی‌های عملیاتی سطح آن‌ها نسبت داده می‌شود

(Upadhyayula و همکاران، ۲۰۰۹). مزایای استفاده از نانولوله‌های کربن در فیلتراسیون به دام انداختن و غیرفعال کردن هم‌زمان پاتوژن‌ها و قابلیت استفاده مجدد از آن‌ها می‌باشد (Upadhyayula و همکاران، ۲۰۰۹). تثبیت‌کردن سلول‌ها باعث پایداری و مقاومت بیشتر آن‌ها در برابر نوسانات محیطی(مثل مواد سمی، دما، pH) نسبت به سلول‌های آزاد می‌شود (Dursun and Tepe, 2005). در این مطالعه پس از جداسازی باکتری تجزیه کننده تولوئن، تثبیت‌کردن سلول‌ها توسط نانولوله کربنی در شرایط مختلف محیطی(pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن) و مقایسه آن با سلول‌های آزاد مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی، جداسازی و خالص‌سازی باکتری تجزیه‌کننده تولوئن

به منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری تجزیه‌کننده تولوئن، ۱۰ گرم از نمونه خاک (به‌طور کاملاً تصادفی از سواحل دریای خزر که آلودگی نفتی دارد جمع‌آوری گردید) در ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی(Minimal Salt Medium, MSM) 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 $FeSO_4.H_2O$، ۰/۰۱ گرم $CaCl_2$، حاوی ۱۰۰ 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 (Zhang و همکاران، ۲۰۱۳). پس از غنی‌سازی، ۵ سویه تجزیه‌کننده تولوئن با انتقال به محیط تولوئن آگار(حاوی محیط پایه نمکی، تولوئن و آگار) و انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند (Wang و همکاران، ۲۰۰۸).

شناسایی جدایه انتخابی به روش تعیین توالی ۱۶ S rDNA

به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های مقاوم به تولوئن پس از استخراج DNA، بخشی از توالی ۱۶S rDNA با پرایمر رفت 1502F-GGTTACCTTGTTACGACTT و پرایمر برگشت 27R-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG تکثیر شد. دستگاه PCR بر اساس دستورالعمل Madueno 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.

اندازه‌گیری تولوئن

غلظتی معادل با ۰/۵ مک فارلند از باکتری (تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در میلی‌لیتر) در محیط پایه نمکی تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از آن به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM مایع تلقیح گردید مقادیر مقادیر مختلف pH (۵، ۶، ۷، ۸ و ۹)، دمای انکوباسیون (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰)(درجه سانتی‌گراد) و غلظت اولیه تولوئن (۲۰۰، ۴۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰)(میلی‌گرم در لیتر) تنظیم شد و به مدت ۲۴ ساعت و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها با سرعت g ۶۰۰۰ 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 (Wang و همکاران، ۲۰۰۸).

عامل‌دار کردن نانولوله کربنی

نانولوله کربنی چندجداره (Multiwalled Carbon Nanotube, MWCNT) از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان در مشهد وارد کننده نانومواد از کمپانی آمریکاییUS Research Nanomaterials تهیه شد. قطر داخلی نانولوله‌کربنی ۱۰-۵ نانومتر، قطر خارجی ۳۰-۲۰ نانومتر، سطح ویژه ۱۱۰< مترمربع بر گرم و درجه خلوص بالای ۹۸ درصد می‌باشد. جهت عامل‌دار کردن نانولوله‌های‌کربنی، مقدار ۱ گرم از آن به ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط اسید نیتریک (۱۵/۶ مولار) و اسید سولفوریک (۱۴/۸ مولار) (با نسبت حجمی ۳ به ۱)، اضافه و به مدت ۳ ساعت بـا استفاده از اولتراسونیک پراکنده‌سازی گردید (Zhang و همکاران، ۲۰۱۱). سپس مخلوط را با صافی ۰/۴۵ میکرون نیترات سلولزی فیلتر کرده پس از آن، مواد اسیدی با عملیات شستشو با آب مقطر و استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۹۰۰۰ دور دردقیقه خارج شد تا pH خنثی حاصل شود. در نهایت نانو لوله‌های عامل‌دار شده جمع‌آوری و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۲ ساعت در آون خشک گردید (Pan و همکاران، ۲۰۰۷).

تجزیه تولوئن توسط باکتری تثبیت شده توسط نانولوله کربنی

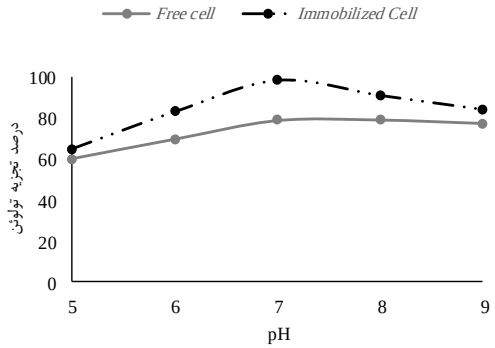
سوسپانسیونی از نانولوله‌های کربنی کربوکسیله با مقدار ۰/۰۵ گرم در لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. برای پخش بهتر نانولوله کربنی به مدت ۳۰ دقیقه اولتراسونیک گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نانولوله‌کربنی کربوکسیله به ۱۰ میلی‌لیتر MSM حاوی غلظتی معادل با

۰/۵ مک فارلند از باکتری انتقال داده شد. مقادیر مقادیر مختلف pH (۵، ۶، ۷، ۸ و ۹)، دمای انکوباسیون (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰)(درجه سانتی‌گراد) و غلظت اولیه تولوئن (۲۰۰، ۴۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰)(میلی‌گرم در لیتر) تنظیم گردید. بعد از انکوبه شدن در ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت، در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید پس از عبور از صافی ۰/۴۵ میکرون نیترات سلولزی برای اندازه‌گیری میزان تولوئن در طول موج ۲۶۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر استفاده شد.

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 میله‌ای، گرم مثبت، کاتالاز و نیترات و اکسیداز مثبت بود. مقایسه توالی ۱۶S rDNA به دست آمده از سویه با توالی موجود در Genebank نشان داد که همولوژی سویه جدا شده با باکتری *بریوی باسیلوس پارابریویس*(*Brevibacillus parabrevis*) سویه سویه IFO 12334(T)، ۹۹/۷ درصد بوده است. بنابراین سویه به عنوان *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 (۱۳۵۹ جفت باز) با شماره دسترسی KX344722 ثبت گردید.

بررسی اثر pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن بر تجزیه تولوئن توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده باکتری *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 نانولوله‌کربنی چندجداره برای تثبیت باکتری *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 استفاده گردید. عوامل موثر بر تجزیه تولوئن برای تثبیت باکتری مانند pH، دمای انکوباسیون و غلظت تولوئن بررسی شد. به منظور بررسی اثر pH محلول حاوی تولوئن بر تجزیه تولوئن توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده، مطالعات جذب تولوئن در pHهای مختلف از ۵ تا ۹ و در دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت اولیه تولوئن ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت که نتایج آن در شکل (۱) ارائه شده است. بررسی‌ها نشان داد که با افزایش pH محلول حاوی تولوئن از ۵ تا حدود ۷، راندمان تجزیه تولوئن توسط جدایه تا pH معادل ۷ افزایش و پس از آن با شیب ملایمی کاهش یافت. مقایسه سلول‌های آزاد و تثبیت شده نشان می‌دهد که سلول‌های تثبیت شده سرعت تجزیه بالاتری دارند و تغییرات درصد تجزیه تولوئن در سلول‌های آزاد دارای شیب ملایمی است.Yu و همکاران (۲۰۱۶)، مشاهده کردند که برای آلاینده‌های TEX، ظرفیت جذب در pH 6 در مقایسه با pHهای بالاتر و پایین‌تر به شدت افزایش می‌یابد. در محلول‌های به شدت اسیدی (۵-pH۲=)، گروه‌های عامل کربوکسیل و هیدروکسیل به علت حضور یون H+ به‌شدت پروتونه می‌شوند بنابراین تعداد باندهای قابل دسترس کاهش می‌یابد در نتیجه ظرفیت جذب TEX در محیط‌های به شدت اسیدی کاهش می‌یابد. وقتی pH افزایش می‌یابد (۱۱-pH۸=)، گروه‌های عاملی پروتونه شده، دپروتونه می‌شوند و دافعه الکترواستاتیکی بین محل‌های اتصال بار منفی و بار مثبت افزایش یافته، در نتیجه منجر به کاهش جذب می‌گردد. بنابراین، در pH بهینه ۶، تعادل بین حداکثر مکان‌های قابل اتصال و برهمکنش‌های بهینه اتصال منجر به حداکثر ظرفیت جذب TEX می‌شود.

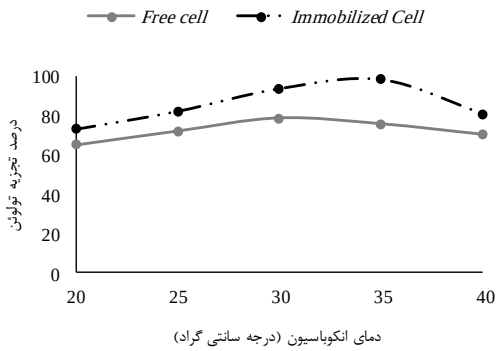


شکل ۱- اثر pH بر راندمان تجزیه تولوئن توسط باکتری *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 در مدت زمان ۲۴ ساعت

اثر دمای انکوباسیون

با افزایش دما، سرعت غالب واکنش‌های شیمیایی افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل (۲) دیده می‌شود، با افزایش دمای انکوباسیون از ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با ثابت نگه داشتن pH روی ۷ و غلظت اولیه تولوئن معادل ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر، تجزیه تولوئن افزایش یافته است سپس تا

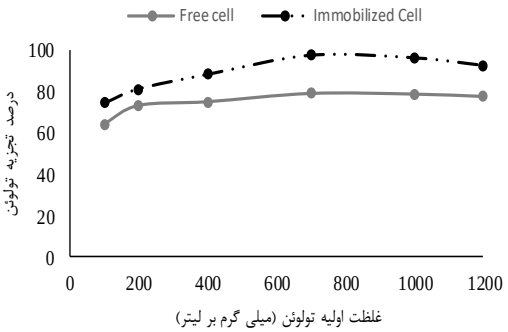
دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با شیب ملایمی کاهش یافته است. دمای بهینه باکتری برای تجزیه تولوئن دمای بین ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. همچنین شکل (۲) نشان داد که سلول‌های تثبیت شده سرعت تجزیه بالاتری دارند. فرآیند جذب تولوئن توسط نانولوله‌کربنی پوشش یافته با بیوفیلم باکتری فرآیندی گرماگیر بوده است. افزایش دما در خصوص جاذب‌هایی که طبیعت متخلخل دارند، امکان انتقال ماده جذب‌شونده در فضای خلل و فرج جاذب را تسهیل می‌نماید. یکی دیگر از دلایل افزایش شدت جذب به واسطه افزایش دما، افزایش تعداد جایگاه‌های جذب در سطح جاذب به واسطه شکسته شدن تعدادی از پیوندهای داخلی موجود در جایگاه‌های فعال سطح جاذب و افزایش امکان برهمکنش جاذب و جذب‌شونده است(Hu و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۲- اثر دمای انکوباسیون بر راندمان تجزیه تولوئن توسط باکتری *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 در مدت زمان ۲۴ ساعت

اثر غلظت اولیه تولوئن

منحنی تجزیه تولوئن توسط جدایه در حضور غلظت‌های مختلف تولوئن در شکل (۳) ارائه شده است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده با افزایش غلظت تولوئن در محیط و ثابت نگه داشتن pH روی ۷ و دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سانتی‌گراد، راندمان تجزیه تولوئن در محیط افزایش یافته است. همچنین باکتری‌های تثبیت شده با نانولوله‌کربنی دارای درصد تجزیه بالاتری نسبت به سلول‌های باکتری به تنهایی بوده است. تفاوت در شیب اولیه منحنی در حضور غلظت‌های مختلف تولوئن، احتمالاً به واسطه تفاوت در زمان مورد نیاز برای سازش باکتری با غلظت‌های مختلف تولوئن بوده است. Su و همکاران (۲۰۰۹)، با مطالعه اثر نانولوله‌کربنی چند جداره اکسید شده توسط محلول هیپوکلریت سدیم و بررسی اثر آن بر روی جذب بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن (BTEX) در محلول‌های آبی نشان دادند که با افزایش غلظت اولیه، ظرفیت جذب نانولوله‌کربنی افزایش می‌یابد. آن‌ها پیشنهاد کردند که نانولوله کربنی جاذب خوبی برای حذف ترکیبات BTEX می‌باشد.



شکل ۳- اثر غلظت اولیه تولوئن بر راندمان تجزیه تولوئن توسط باکتری *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 در مدت زمان ۲۴ ساعت

نتیجه‌گیری

در این مطالعه تجزیه زیستی تولوئن توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 مورد بررسی قرار گفته است و نتایج زیر بدست آمد: (۱) باکتری *بریوی باسیلوس پارابریویس* سویه ATHH40 مقاوم به تولوئن و از خاک آلوده به نفت جدا شد. این سویه قادر به حذف ۷۰۰ میلی گرم در لیتر تولوئن در محیط کشت مایع به حداقل ۹۷/۲٪ در ۲۴ ساعت و قادر به متابولیزه کردن تولوئن تا غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. (۲) نانولوله‌های‌کربنی چندجداره (MWCNTs) برای تثبیت سویه ATHH40 مورد استفاده قرار گرفت. باکتری تثبیت شده تجزیه تولوئن بالاتری را در شرایط مختلف pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن نسبت به سلول‌های آزاد انجام می‌دهند.

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), 136-143.

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, 105-111.

Gupta, S., Pathak, B. and Fulekar, M. H. 2015. Biodegradation of benzene under anaerobic condition using enriched microbial culture. International Journal of Scientific Research in Science Engineering and Technology, 1, 207-215.

Hu, G., Li, J. and Zeng, G. 2013. Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review. Journal of Hazardous Materials, 261, 470-490.

Hu, J., Chen, C., Zhu, X. and Wang, X. 2009. Removal of chromium from aqueous solution by using oxidized multiwalled carbon nanotubes. Journal of Hazardous Materials, 162(2), 1542-1550.

Joo, S. H. and Cheng, F. 2006. Nanotechnology for environmental remediation. Springer Science Business Media In USA.

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, 345-351.

Mazzeo, D. E., Levy, C. E., Angelis, D. D. and Marin-Morales, M. A. 2010. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. Science of the Total Environment, 408, 4334-4340.

Nadim, F., Hoag, G. E., Liu, S., Carley, R. J. and Zack, P. 2000. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: An overview. Journal of Petroleum Science and Engineering, 26, 169-178.

Pan, X., Fan, Z., Chen, W., Ding, Y., Luo, H. and Bao, X. 2007. Enhanced ethanol production inside carbon-nanotube reactors containing catalytic particles. Nature Materials, 6, 507-511.

Seifi, L., Torabian, A., Kazemian, H., Bidhendi, G. N., Azimi, A., Nazmara, S. and Mohammadi, M. 2011. Adsorption of BTEX on surfactant modified granulated natural zeolite nano particles: parameters optimizing by applying taguchi experimental design method. Clean Soil, Air Water, 39, 939-948.

Su, F., Lu, C. and Hu, S. 2009. Adsorption of benzene, toluene, ethylbenzene and p-xylene by NaOCl-oxidized carbon nanotubes. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 353(1), 83-91.

Upadhyayula, V. K., Deng, S., Mitchell, M. C. and Smith, G. B. 2009. Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review. Science of Total Environment, 408, 1-13.

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, 335-342.

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), 335-421.

Xiaofan, Z. and Oyaizu, H. 2003. Study on isolation and identification and characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria. Shanghai Environmental Sciences, 22, 544-547.

Yu, F., Ma, J. and Wu, Y. 2011. Adsorption of toluene, ethylbenzene and m-xylene on multi-walled carbon nanotubes with different oxygen contents from aqueous solutions. Journal of Hazardous Materials, 192(3), 1370-1379.

Zhang, L., Petersen, E.J. and Huang, Q. 2011. Phase distribution of 14C-labeled multiwalled carbon nanotubes in aqueous systems containing model solids: Peat. Environmental Science and Technology, 45, 1356-1362.

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, 1340-1347.

Topic for submission: Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation

The Investigatation and Determination of the Optimal Conditions of Toluene Biodegradation by free and Immobilized Bacteria on Carbon Nanotubes

Heydarnezhad, F.[*1], Hoodaji, M.[2], Shahriarinour, M.[3], Tahmourespour A[4].

[1] PhD., Soil Science Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[2] Prof., Soil Science Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[3] Assistant Prof., Basic Sciences Department, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[4] Associate Prof., Basic Medical Sciences Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

This research was conducted to isolate the toluene degrading bacteria and immobilized bacteria on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and compare the free and immobilized cells under different environmental conditions. In this research, first the toluene degrading bacteria were isolated and identified by molecular sequencing 16S rDNA and then immobilizing the bacteria by carbon nanotubes. Molecular studies showed that the isolated bacteria, which have the ability to grow and decompose toluene, is a strain of *Brevibacillus Parabrivis* ATHH40. Then, Factors affecting toluene degradation, pH(5, 6, 7, 8 and 9), incubation temperature (°C) (20, 25, 30, 35 and 40) and the initial toluene concentration ($mg.L^{-1}$) (200, 400, 700, 1000 and 1200), in free and immobilized bacteria on carbon nanotubes were investigated. The results showed that immobilized bacteria can reduce toluene concentration by 97.2%. It is resistant to higher concentrations of toluene and protects bacteria against pH changes and incubation temperatures. These results indicate that the carbon nanotube-immobilized *Brevibacillus Parabrivis* bacterium has a good potential for treatment with soil containing toluene.

Keywords: *Brevibacillus Parabrivis*, Immobilization, Biodegradation, 16S rDNA.