Use Of Ethyleneglycol And Di(ethyleneglycol) By Isolated Bacteria From Industrial Wastewater

Kermanshahi,R.K.(Ph.D), Assoc. Prof., University of Isfahan

Abstract

There is widespread use of ethyleneglycol (EG) in preparing synthetic fibers, films, cassettes, anti-freeze, unsatuared polyster, resins, explosive materials, printing inks , and protective covering. It is also used in paper, leather , and textile industries. Therefore, identifying microorganisms consuming E.G. is very important from two aspects . First , for the protection and prevention of biodegredation of these products. Second, for extermination of the materials which are composed of E.G. and left over after being used and may pollute the environment.

In this research, the first step was the isolation and identification of the microorganisms using E.G. and second step was the determination of quantity of these materials being used by these bacteria in different intervals by gas chromatography method.

It was found that some of these bacteria can survive and grow in a medium having concentration up to 30 mg/ml E.G. and up to 5 mg/ml D.E.G.

مصرف اتیلن گلیکول و دی‌اتیلن گلیکول توسط تعدادی از باکتریهای جداسازی شده از پساب صنعتی

روحا ـ کسری کرمانشاهی*

چکیده

کاربرد وسیع اتیلن گلیکول در تهیه الیاف مصنوعی، فیلم و نوار می‌باشد. همچنین از اتیلن گلیکول در تهیه ضدیخ، رزین پلی‌استر غیر اشباع، مواد منفجره، کاغذ، چرم، پوششهای حفاظتی، جوهر چاپ و نیز در صنایع نساجی استفاده می‌شود. لذا شناسایی میکروارگانیسمهای مصرف کننده آنها از دو نظر حائز اهمیت است. یکی برای نگهداری و ممانعت از تخریب این مواد توسط میکروارگانیسمهای مزبور در صنعت و دیگری جهت از بین بردن مواد دارنده اتیلن گلیکول که بعد از مصرف در محیط انباشته و سبب آلودگی محیط زیست می‌گردد. در این پژوهش در مراحل اولیه باکتریهای مصرف کننده اتیلن گلیکول و دی‌اتیلن گلیکول از پساب صنعتی جداسازی و شناسایی شد و سپس با روش گاز کروماتوگرافی میزان مصرف این دو ماده توسط باکتریهای مزبور در فواصل زمانی مختلف بررسی گردید. نتایج نشان می‌دهد که برخی از این باکتریها حتی در غلظتی برابر ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اتیلن گلیکول و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دی‌اتیلن گلیکول قادر به حیات و رشد می‌باشند.

مقدمه

بر روی تجزیه بیولوژیکی اتیلن گلیکول ها از سال ۱۹۵۲ تا سالهای اخیر مطالعات گوناگونی انجام گرفته است که مبنی بر تجزیه این مواد توسط میکروارگانیزم می‌باشد. این مواد در صنایع مختلف مصارف گوناگونی دارند. بنابراین در پسابهای صنعتی کارخانجات مختلف که این مواد را به کار می‌برند یافت می‌شوند. لذا تعدادی از باکتریهایی که قادرند اتیلن گلیکول و دی‌اتیلن گلیکول را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی مصرف کنند از نمونه‌هایی از پساب صنعتی جداسازی و شناسایی شد و در فواصل زمانی معین میزان کاهش این ماده در محیط کشت این باکتری با روش گاز کروماتوگرافی اندازه‌گیری گردید.

مواد و روشها

محیطهای کشت : محیط کشت می‌نیمم برات حاوی مواد معدنی برای جداسازی باکتریهای مصرف کنندهٔ اتیلن گلیکول استفاده شد، که بعد از تولید کدورت در این محیط

* دانشیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

باکتری را به محیط کشت جامد (می‌نیمم آگار) جهت جداسازی و خالص‌سازی تلقیح نموده و شناسایی با استفاده از تستهای بیوشیمیایی انجام شد [۲ و ۱].

منواتیلن گلیکول (E.G) در دو غلظت نهایی ۳۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر و ۰/۰۴ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر محیط کشت می‌نیمم برات به کار رفت و دی‌اتیلن گلیکول (D.E.G) با غلظت ۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر محیط کشت می‌نیمم برات استفاده شد. این مواد قبل از استرلیزاسیون اتوکلاو به مدت ۵ دقیقه در $121^{\circ}C$ به محیط کشت می‌نیمم برات اضافه گردید. محیط کشت جامد با افزودن ۱۰ گرم آگار به یک لیتر می‌نیمم برات (حجم / وزن) تهیه شد (۳).

اندازه‌گیری میزان مصرف اتیلن گلیکولها

برای اندازه‌گیری میزان مصرف منواتیلن گلیکول، ابتدا دو غلظت متفاوت از این ماده ساخته شده (۰/۰۴ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و برای هر غلظت سه لوله آزمایش جداگانه تهیه گردید، که به دو لوله (حاوی ۱۰ میلی‌لیتر می‌نیمم برات با اتیلن گلیکول) به میزان مساوی باکتریهای مورد نظر افزوده شد و به سومین لوله باکتری اضافه نگردید (شاهد آزمایش). لوله‌ها در اتوشیکردار با دمای $30^{\circ}C$ قرار داده شد. برای دی‌اتیلن گلیکول نیز به طور جداگانه آزمایشاتی مشابه انجام یافت . برای این ماده فقط غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌نیمم برات مورد بررسی قرار گرفت [۴].

در فواصل زمانی معین و به طور ماهانه در لوله‌های استریل با درب پیچ دار حجم معینی از نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری منواتیلن گلیکول و دی اتیلن گلیکول با روش گاز کروماتوگرافی[1] آزمایش شد و مقدار مواد فوق در هر آزمایش، با شاهد و استاندارد مقایسه گردید .

نتایج

در مورد مصرف اتیلن گلیکول توسط باکتریهای گوناگون نتایج زیر بدست آمد. در قسمت اول نتایج تستهای بیوشیمیایی مربوط به شناسایی این باکتریها در جدول ۱ آمده است و در قسمت دوم میزان مصرف اتیلن گلیکول در غلظت ۰/۰۴ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و شاهدهای آنها به ترتیب در شکلهای ۱ و ۲ آمده است و میزان مصرف دی‌اتیلن گلیکول با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر توسط همین باکتریها و شاهد آن در شکل ۳ نشان داده شده است.

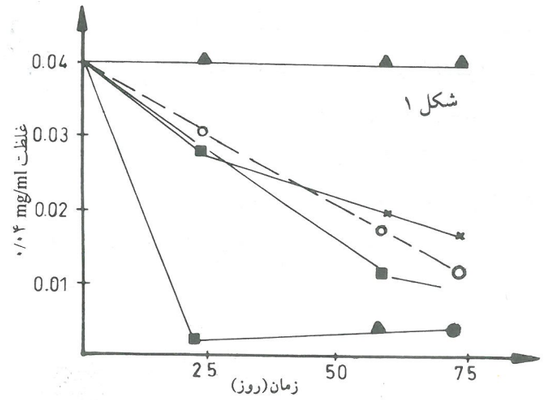
بحث و نتیجه گیری

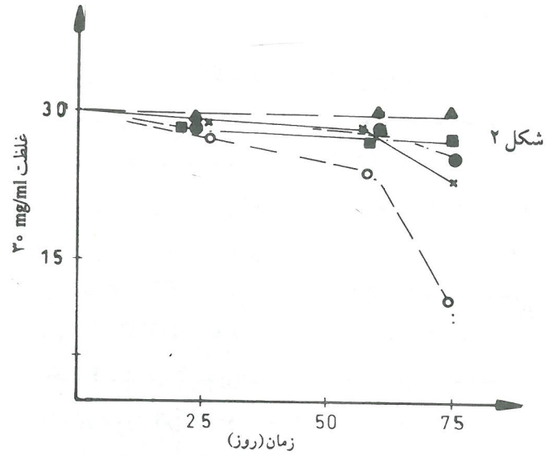
با توجه به جدول شناسایی شماره ۱، باکتری به دست آمده به ترتیب با گونه‌های استوماتوکوکوس موسیلاژنوس و کورینه باکتریوم ، آکوآتیکوم و کوریتاگیبسونی که باسیلهای گرم مثبت بدون اسپور می‌باشند شباهت دارد و پتریک گونه اندوسپردار گرم مثبت به نام باسیلوس کواگولانس به دست آمده است که توسط دلی و هانس [۶ و ۷] گزارش گردیده که قادرند موادی نظیر آلفاتیک گلیکول و پلی‌اتیلن گلیکول را مصرف کنند.

بر اثر پاساژ این باکتریها بر روی محیط کشت پایه می‌نیمم برات بدون منبع کربن و انرژی هیچگونه رشدی نشان ندادند که مؤید عدم رشد این باکتریها به روش اتوتروفی بوده و نشان دهندهٔ نیاز باکتری به تغذیه به روش هتروتروفی می‌باشد.

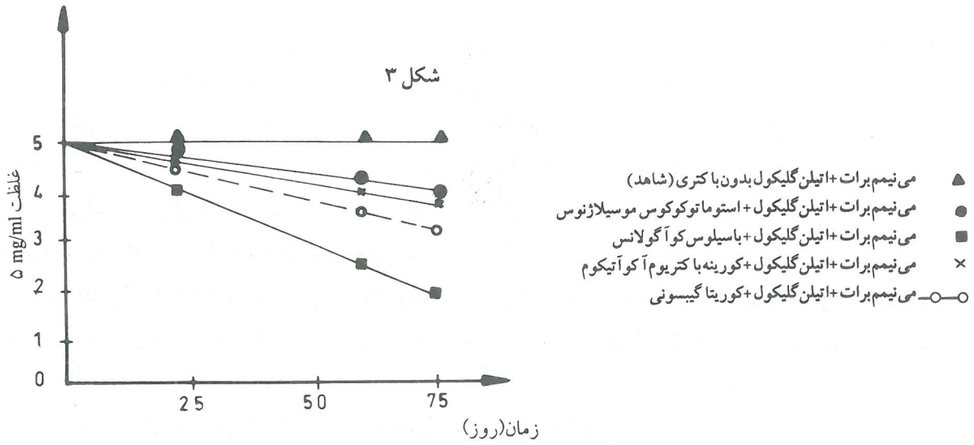
در شکل ۱ که مصرف اتیلن گلیکول با غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را در باکتریهای گوناگون جداسازی شده نشان می‌دهد مشخص می‌گردد که باکتری میکروکوکوس موسیلاژنوس به مدت بسیار کوتاه یعنی ۲۴ روز تقریباً غلظت اتیلن گلیکول را از ۰/۰۴ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر به ۰/۲۶ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر رسانده است که بیشترین سرعت را از نظر مصرف این ماده در میان باکتریهای جداسازی شده نشان می‌دهند و باکتری کوریتاگیبسونی در همان مدت ۲۴ روز غلظت این ماده را از ۰/۰۴ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر به ۰/۰۳۲ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر رسانده که کمترین سرعت را در باکتریهای به

1 - Varian aerograph series 2400





شکل ۱ و ۲: مصرف اتیلن گلیکول در غلظتهای ۰/۴ میلی‌گرم و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌نیمم برات توسط باکتریهای گرم مثبت (اتوشیکردار ۳۰°c)



شکل ۳: مصرف دی‌اتیلن گلیکول با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر توسط باکتریهای گرم مثبت (اتوشیکردار ۳۰°c)

کار رفته نشان داده است. در غلظت شاهد تغییر قابل ملاحظه‌ای در میزان غلظت به کار رفته این ماده مشاهده نمی‌گردد. که این عدم کاهش در نمونه بدون باکتری (شاهد) نشانهٔ مصرف این ماده توسط باکتریهای مزبور می‌باشد.

در شکل ۲ که مربوط به غلظت بیشتر اتیلن گلیکول یعنی ۳۰ میلی گرم در ۱ میلی‌لیتر محیط می‌نیمم برات است. باکتریهای به‌کار رفته تا مدت دو ماه تغییر محسوسی در غلظت این ماده مشاهده نگردید که این می‌تواند به علت زمان لازم برای ایجاد هماهنگیهای لازم با محیط کشت جهت ایجاد آنزیمهای ضروری برای مصرف این ماده با چنین غلظت بالایی باشد ولی در ۷۵ روز باکتریهای میکروکوکس موسیلاژنوس و کوریتاگیبسونی توانسته‌اند این ماده در این غلظت بالا را مصرف و میزان غلظت را کاهش دهند.

بنابراین نتیجهٔ کلی که از این دو منحنی حاصل می‌گردد نشان دهنده این واقعیت است که هر چهار باکتری به کار رفته در غلظت پایین (۰/۰۴ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر) اتیلن

جدول ۱ - شناسایی باکتریهای مصرف کننده اتیلن و دی اتیلن گلیکول (مواد سازنده پلی استر)

نام تست	مشخصات کلی	رشد در تتراگلیکولات	کاتالاز	اکسیداز	حرکت	نیترات ریدوکتاز	ماننیتول	اندول	H_2S	سیترات	نیترات	اوره	V.P	M.R	گلوکز	لاکتوز	ساکارز	مالتوز	ترهالوز	گزیلوز	مشخصات اسپور	حساسیت به پاسیتراسین	رشد در ۴۰°C	O/F	E.Y.A	رشد در ۷/۵٪
استوماتوکوکوس موسیلاژنوس	سفید،شفاف مرواریدی،کناره ناصاف،اندازه متوسط	+	+	-	-	N	N	-	-	+	+	-	-	-	-	-	N	-	N	-	ندارد	+	N	N	N	-
باسیلوس کوآگولانس	سفید، خشک،مطین سطح ناصاف	۷۲ ساعت +	+	N	+	+	N	-	-	+	+	N	+	N	+	-	+	-	N	N	یضی، مرکزی	N	N	-/+	N	N
کوریتا گیبسونی	صاف،کرمی متوسط	-	+	N	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	N	-	ندارد	N	+	-/+	N	N
کوریته باکتریوم	سفید،گرد، متوسط	N	+	N	+	N	+	N	N	+	N	-	+	N	+	-	+	-	N	-	ندارد	N	+	+/-	N	N

توضیح علائم جدول:
+ = نتیجه تست مثبت
- = نتیجه تست منفی
N = تست انجام نگردیده است
EY.A = تست لیپیتاز

گلیکول را به خوبی تحمل و مصرف می‌کنند ولی در غلظت بالا (۳۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت می‌نیمم برات) فقط دو تا از باکتریها یعنی میکروکوکوس موسیلاژنوس و کوریتاگیبسونی قادر به تحمل و مصرف این ماده می‌باشند و به ترتیب غلظت آن را به ۲۴۹ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر و ۷۸/۸ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر می‌رسانند. در شکل ۳ میزان مصرف دی‌اتیلن گلیکول توسط چهار باکتری مزبور مورد بررسی قرار گرفته است و در آن مشخص شده است که باکتری باسیلوس کوآگولانس بعد از گذشت ۷۵ روز غلظت این ماده را از ۵۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت می‌نیمم برات به ۱۹/۷ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر رسانده است، یعنی حدود $\frac{1}{3}$ غلظت اولیه، ولی سه باکتری دیگر به میزان کمتری توانسته‌اند این ماده را مصرف نمایند. بنابراین برای مصرف منواتیلن گلیکول بهترین باکتری که می‌توان استفاده کرد میکروکوکوس موسیلاژنوس و کوریتاگیبسونی و برای دی‌اتیلن گلیکول باکتری باسیلوس کوآگولانس می‌باشد. البته طبق مقاله دیگری که توسط مؤلف چاپ گردیده است [۵] باکتری پسودوموناس آئروژینوزا که یک باکتری گرم منفی باسیلی شکل بدون اسپور است برای همین غلظتها و همین مواد توانسته است در مدت ۲۴ روز به ترتیب غلظت منواتیلن گلیکول را از ۰/۴ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر می‌نیمم برات به ۰/۰۴ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر می‌نیمم برات و از ۳۰۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر می‌نیمم برات بعد از ۷۵ روز به ۲۱۱ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر برساند و غلظت دی‌اتیلن گلیکول را با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر به ۱۲/۱۲ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر کاهش داد. در مقاله‌ای که در سال ۱۹۸۰ توسط باربارا پیرس و همکاران [۸] منتشر شده است ، غلظت ۰/۲ درصد (حجم / وزن) از اتیلن و دی‌اتیلن گلیکول استفاده شده است که بسیار کمتر از غلظتهای بکار رفته در این تحقیق می‌باشد. لذا باکتریهای جداسازی شده در این پژوهش قدرت مصرف بیشتری را نسبت به باکتریهای مقاله مزبور نشان می‌دهند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری شرکت پلی‌اکریل اصفهان (آزمایشگاه مرکزی) در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایم .

منابع و مراجع :

1- Holt,J.G., Noel,R., Kriey , et al,(1994) " *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*", Ninth Edition, Williams, Wilkins A. Waverly Company, , PP: 527-582.

2- Bailey and Scotts (1990). "*Diagnostic Microbiology*", 4th Edition, Mosby Company, PP: 457-469.

3- Bunch, R. L. S., and Chambers, C. W. (1967)." *A Biodegradability Test for Organic Compounds.*" Journal of the Water Pollution Control Federation 39, PP:181-187.

4- Gonzalez, C.P., Taber, W. A., and Zeitoun, M. A. (1972)." *Biodegradation of Ethylene Glycol by a Salt-requiring Bacterium.*" Applied Microbiology 24, 911-919.

۵- کرمانشاهی ، ر.ک . (۱۳۷۵) "مصرف اتیلن و دی‌اتیلن گلیکول (مواد اولیه سازنده پلی‌استر) توسط پودوموناس آئروژینوزا"، کنگره سراسری میکروبیولوژی ایران ـ علوم پزشکی یزد –

6- Hanes, J. R. & Alexander, M. (1975)." *Microbial Degradation of Polyethylene Glycols.*" Applied Microbiology 29, 621-625.

7- Deley, J., and Kersters, K. (1964)." *Oxidation of Aliphatic Glycols by Acetic Acid Bacteria.*" Bacteriological Reviews 28, 164-180.

8- Pearce,B.A. et al., (1980)." *Metabolism of Di (ethylene glycol) and other short poly (ethylene glycols) by Gram Negative Bacteria.*" Journal of General Microbiology, 118, 21-27.