



Biodechlorination of Chlorinated Aliphatic Compounds Trichloroethylene, Dichloromethane, and Dichloroethane in Aqueous Solution, Using Aerobic *Sphingopyxix ummariensis* Bacteria

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Badali N.¹ MSc,
Sokrollahzadeh S.*
PhD, Farazmand A.²
PhD

How to cite this article

Badali N, Sokrollahzadeh S, Farazmand A. Biodechlorination of Chlorinated Aliphatic Compounds Trichloroethylene, Dichloromethane, and Dichloroethane in Aqueous Solution, Using Aerobic *Sphingopyxix ummariensis* Bacteria. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):39-45.

*Chemical Technologies Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran

¹Chemical Technologies Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran

²Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Chemical Technologies Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Enqelab Street, Parsa Square, Ahmabad Mostoufi Road., Azadegan Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 3353136846

Phone: +98 (21) 56276637

Fax: -
shokrollahzadeh@irost.ir

Article History

Received: March 2, 2016

Accepted: February 5, 2017

ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims The chlorinated organic compounds are the most dangerous water pollutants in industrial sites. The aim of this study was to investigate the biodechlorination of chlorinated aliphatic compounds; trichloroethylene, dichloromethane, and 1,2-dichloroethane in aqueous solution, using aerobic *Sphingopyxix ummariensis* bacteria.

Materials & Methods In this experimental study, aliphatic chlorinated compounds; dichloromethane, trichloroethylene, and 1,2-dichloroethane with purity of 99.9% were used. A visible-ultraviolet spectroscopy was used to determine the cell growth from measuring the turbidity of the medium at 600nm. The amount of released chloride was measured by an Ion Selective Electrode (ISE). The live bacterial sample was inoculated into the Nutrient Broth medium and was incubated at 30°C and 150rpm for 24 hours.

Findings The rate of dechlorination of dichloromethane, trichloroethylene, and 1,2-dichloroethane by *Sphingopyxix ummariensis* were measured as 1.3, 1.05, and 0.63mg/l.h, respectively. The addition of glucose and yeast extract, as co-substrate, led to an increase in the cell growth and dechlorination rate up to 3.28, 1.67 and 0.90mg/l.h, respectively. During experiment, the highest dechlorination was measured at concentration of 2.5mM, at exponential growth phase.

Conclusion *Sphingopyxix ummariensis* bacteria is capable of biodechlorination of chlorinated aliphatic compounds and can grow on trichloroethylene, dichloromethane, and 1,2-dichloroethane as a single carbon source and can decolorize them. This strain has the highest growth and removal efficiency in eliminating dichloromethane as the sole source of carbon along with glucose and yeast extract as co-substrate.

Keywords Dechlorination; Trichloroethylene; Dichloroethane; Dichloromethane; *Sphingopyxix* Bacteria

CITATION LINKS

[1] Removal of dichloromethane from ground and ... [2] Degradation of 1, 2-dichloroethane with advanced reduction processes (ARPs) ... [3] Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic ... [4] Record display for the EPA National Library ... [5] Environmental dynamics and engineered systems for the degradation ... [6] Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus* ... [7] Soluble methane monooxygenase production and ... [8] Biodegradation of 1, 2-dichloroethane (1,2-DCA) by cometabolism ... [9] Effects of bioaugmentation on enhanced reductive dechlorination ... [10] Biological elimination of volatile xenobiotic compounds ... [11] Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a ... [12] Dehalogenation of dichloromethane by cell extracts of *Hyphomicrobium* ... [13] Effective utilization of dichloromethane by a newly ... [14] Characterization and kinetic Study of ... [15] *Sphingopyxix indica* sp. nov., isolated from a high dose point ... [16] *Sphingopyxix ummariensis* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclopentadiene ... [17] Degradation of 2, 4, 6-trichlorophenol by bacteria isolated from secondary ... [18] Compilation of EPA's sampling and analysis ... [19] Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase ... [20] In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents ... [21] Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes ... [22] Biodegradation of 1,2-dichloroethane (1,2-DCA) by cometabolism ... [23] Trichloroethylene degradation in a coupled ... [24] Aerobic bioremediation of 1, 2 dichloroethane and vinyl ... [25] Fates of chlorinated volatile organic compounds ... [26] Semicontinuous microcosm study of aerobic ... [27] *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov.–a new aerobic ... [28] Degradation of 1, 2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* ... [29] Monooxygenase-mediated 1, 2-dichloroethane degradation ... [30] Removal of dichloromethane from waste gases ... [31] Isolation and characterization of a new dichloromethane ... [32] *Bacillus circulans* WZ-12-a newly discovered aerobic dichloromethane ... [33] Aerobic biodegradation of dichloroethenes by ... [34] Optimizing aerobic biodegradation of dichloromethane ...

کلرزدایی زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری کلرواتیلن، دی کلرومتان و ۲-دی کلرواتان از محلول آبی با استفاده از باکتری هوازی اسفینگوپیکسیس/اومارینسیس

ندا بدلی MSc

پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

سهیلا شکرالله‌زاده PhD

پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

عباس فرازمنند PhD

پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: ترکیبات آلی حاوی کلر یکی از خطرناک‌ترین ترکیبات آلاینده آب در مناطق صنعتی هستند. هدف مطالعه حاضر حذف زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری کلرواتیلن، دی کلرومتان و ۲-دی کلرواتان در محلول آبی با استفاده از باکتری بومی اسفینگوپیکسیس/اومارینسیس بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر از ترکیبات آلیفاتیک کلردار دی کلرومتان، تری کلرواتیلن و ۲-دی کلرواتان با خلوص آزمایشگاهی ۹۹/۹٪ استفاده شد. برای تعیین رشد سلولی از اندازه‌گیری کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر، دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش به کار رفت. اندازه‌گیری مقدار یون کلراید آزاد شده به وسیله دستگاه یون آنالایزر الکتروذ گزینشی یونی صورت گرفت. نمونه باکتری زنده به محیط کشت نوترینت‌براث تلقیح و در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

یافته‌ها: سرعت کلرزدایی هر یک از ترکیبات تری کلرواتیلن، دی کلرومتان و ۲-دی کلرواتان در محیط آبی در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار توسط این باکتری به ترتیب ۱/۳، ۱/۰۵ و ۰/۶۳ mg/l.h به دست آمد. افزودن گلوکز و عصاره مخمر به محیط کشت، موجب افزایش سرعت رشد باکتری و همچنین سرعت کلرزدایی آنها به ترتیب ۳/۲۸، ۱/۶۷ و ۰/۹۹ mg/l.h شد. بیشترین کلرزدایی در شرایط آزمون، در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار به دست آمد و بیشترین کلرزدایی در مرحله رشد نمایی باکتری رخ داد.

نتیجه‌گیری: باکتری اسفینگوپیکسیس/اومارینسیس توانایی حذف ترکیبات آلیفاتیک کلردار را دارد و می‌تواند روی ترکیبات دیرتخریب‌پذیر تری کلرواتیلن، دی کلرومتان و ۲-دی کلرواتان به عنوان تنها منبع کربن رشد کند و موجب کلرزدایی آنها شود. این سویه بیشترین رشد و بازدهی حذف زیستی را در حذف دی کلرومتان، به عنوان تنها منبع کربن و در کنار گلوکز و عصاره مخمر به عنوان هم-سوبسترا دارد.

کلیدواژه‌ها: کلرزدایی، تری کلرواتیلن، دی کلرواتان، دی کلرومتان، باکتری اسفینگوپیکسیس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷

*نویسنده مسئول: shokrollahzadeh@irost.ir

مقدمه

باکتری اسفینگوپیکسیس/اومارینسیس (*Sphingopyxis ummariensis*) می‌تواند ترکیبات آلیفاتیک کلردار را حذف کند و قادر است روی ترکیبات دیرتخریب‌پذیر تری کلرواتیلن (TCE)، دی کلرومتان (DCM) و ۲-دی کلرواتان (1,2-DCA) به عنوان تنها منبع کربن رشد کند و موجب کلرزدایی آنها شود. ترکیبات آلیفاتیک کلردار یکی از اصلی‌ترین عوامل آلاینده آب‌های زیرزمینی در مناطق صنعتی مانند صنایع شیمیایی، پتروشیمی و نساجی هستند [1] که مهم‌ترین خطر این مواد سرطان‌زا بودن آنها است [2].

بیشترین سهم آلودگی انواع ترکیبات آلی در آب‌های زیرزمینی در کشورهای ایالات متحده و آلمان، مربوط به ترکیبات آلیفاتیک کلردار است [3]. اگرچه اطلاعات مشابه در مورد ایران وجود ندارد، ولی با توجه به وجود صنایع شیمیایی و پتروشیمیایی بزرگ تولیدکننده و مصرف‌کننده ترکیبات آلی کلردار در ایران و دیرتخریب‌پذیر بودن این نوع ترکیبات، می‌توان انتظار روند مشابهی را داشت. از میان ترکیبات کلردار، تتراکلرواتیلن و تری کلرواتیلن به ترتیب جزء آلودگی‌های عمده و نگران‌کننده در طبیعت به شمار می‌آیند [4]. دلیل این امر سرعت آهسته تجزیه زیستی این ترکیبات در شرایط هوازی و بی‌هوازی و سمیت آنها گزارش شده است. از طرفی، کاهش تعداد اتم‌های کلر در ترکیبات آلیفاتیک کلردار، سرعت تجزیه زیستی آن را در شرایط بی‌هوازی کاهش می‌دهد، در حالی که در شرایط هوازی عکس این پدیده مشاهده شده است [5]. در حذف زیستی TCE در شرایط هوازی (معدنی‌شدن)، ابتدا این ماده به cis-DCE (سیس-دی کلرواتن) و trans-DCE (ترانس-دی کلرواتن)، البته بیشتر به شکل سیس و سپس به وینیل‌کلراید، اتن و در نهایت به دی‌اکسیدکربن و آب تبدیل می‌شود. به منظور حذف زیستی هوازی تری کلرواتیلن، باکتری متیلوسینوس (*Methylosinus trichosporium OB3b*) بهترین نتیجه را تا به امروز داشته است. این باکتری قادر است ۱۰۰٪ تری کلرواتیلن با غلظت ۰/۸ گرم بر لیتر در ۲۰ دقیقه را جذب کرده و به عبارت دیگر، سرعت حذف زیستی آن ۲/۴ گرم بر لیتر در ساعت (g/l.h) گزارش شده است [6]. سویه متیلوموناس متانیکا (*Methylobacterium methanica* 68-1) نیز سرعت حذف زیستی مناسبی از TCE را نشان داده است به گونه‌ای که برای این سویه، حذف غلظت ۵/۶ میلی‌گرم بر لیتر با سرعت حذف ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر در ساعت (mg/l.h) گزارش شده است [7].

تعداد محدودی از باکتری‌ها توانایی استفاده از 1,2-DCA به عنوان منبع کربن را دارند. از این باکتری‌ها می‌توان به سویه‌های انسیلوباکتر آکواتیکوس (*Ancylobacter aquaticus* AD25)، گزانتوباکتر آئوتروفیکوس (*Xanthobacter GJ10*) و سودوموناس (*Pseudomonas sp.* autotrophius GJ10) اشاره کرد [8, 9].

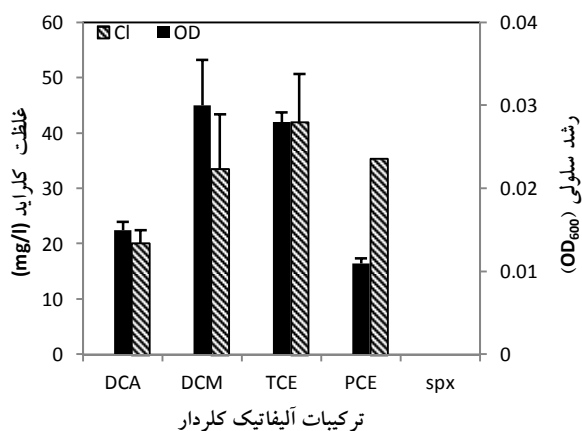
دی کلرومتان (DCM) یکی از ساده‌ترین ترکیبات آلیفاتیک کلردار است که نسبت به سایر ترکیبات سرعت تجزیه زیستی بالاتری دارد [1]. تعدادی از باکتری‌های هوازی که توانایی حذف DCM را دارند شامل پاراکوکوس متیلوتنس (*Paracoccus methylutens*), هیفوباکتریوم DM2 (*Hyphomicrobium sp.* DM2), آلبی‌باکتر متیلوورانس DM10 (*Albibacter DM10*), متیلوورانس DM10 (*methylovorans DM10*), متیلوباکتریوم دی کلرومتانیکوم DM4 (*Methylobacterium dichloromethanicum* DM4) و rhodesianum H13 هستند [10-12]. در میان باکتری‌های هوازی، بهترین عملکرد در حذف زیستی DCM را باکتری متیلوباکتریوم رودسیانوم (*M. rhodesianum* H13) دارد که قادر است ۱۰۰٪ دی کلرومتان را در غلظت ۵ میلی‌مولار، به عنوان تنها منبع کربن پس از ۴۸ ساعت حذف کند [13].

باکتری اسفینگوپیکسیس/اومارینسیس استفاده شده در پژوهش حاضر توسط شکرالله‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ از لجن فعال تصفیه‌خانه بیولوژیک شرکت پتروشیمی آبادان که تولیدکننده پلی‌وینیل‌کلراید (PVC) است، جداسازی شده است. پژوهش‌های مقدماتی نشان می‌دهد که این سویه در محیط حلال دی کلرومتان

باکتری زنده به محیط کشت نوترینت برات تلقیح و در دمای 30°C و دور 150-rpm به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. برای سلول های رشد یافته، دو بار سانتریفوژ (دور 6000 به مدت ۱۰ دقیقه) و شست و شو صورت گرفت. سپس سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۱ تا $1/2$ در طول موج 600-nm تهیه شد. سپس 100-mL میکرولیتر از آن به 12-mL مترمکعب محیط کشت حاوی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تلقیح و سپس در دمای 30°C و دور 150-rpm به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. با توجه به فرار بودن ترکیبات DCM، TCE و 1,2-DCA، برای کشت باکتری در حضور این ترکیبات، بطری سرم با حجم 120-mL مترمکعب مجهز به درپوش سپتوم سیلیکونی و درپوش آلومینیومی مورد استفاده قرار گرفت. نسبت حجم محیط کشت به حجم کلی بطری $1:10$ انتخاب شد تا شرایط هوازی برای رشد باکتری ها فراهم شود. بعد از استریل شدن محیط کشت نمکی، ترکیبات به همراه باکتری در شرایط سترون به بطری درپوش دار اضافه و پس از آن در دمای 30°C و دور 150-rpm در زمان های مورد نظر گرمخانه گذاری شدند. غلظت یون کلراید آزاد شده، به عنوان معیاری از تجزیه زیستی اندازه گیری شد [19]. نسبت یون کلراید آزاد شده به کل کلراید ترکیب به صورت درصد مولی ($100 \times \text{mM} / \text{mM}$) محاسبه شد. تمامی اندازه گیری ها سه بار تکرار شد و در مواردی با عدم ارایه خطای میانگین، مقادیر میانگین گزارش شدند.

یافته ها

بیشترین میزان رشد باکتری به ترتیب برای ترکیبات DCM، TCE و 1,2-DCA به دست آمد (نمودار ۱).



نمودار ۱) رشد سلولی /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس و غلظت یون کلراید آزاد شده حاصل از حذف زیستی DCM، TCE و 1,2-DCA در غلظت $2/5$ میلی مولار به عنوان تنها منبع کربن بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در دمای 30°C و دور 150-rpm
SPX نمونه شاهد بود (فاقد هر گونه ترکیب آلی کلردار)

در این شرایط، بیشترین یون کلراید آزاد شده با غلظت 42-mM گرم بر لیتر در TCE اندازه گیری شد. سرعت کلرزایی هر یک از ترکیبات TCE، DCM و 1,2-DCA به وسیله این باکتری به ترتیب $1/3$ و $1/5$ و $1/63$ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. بیشترین درصد نسبی کلراید آزاد شده در DCM در شرایط آزمایش برابر با 19% و همچنین بیشترین کدورت ناشی از رشد باکتری نیز در رشد با این ماده به دست آمد. درصد نسبی کلراید آزاد شده به کل اتم های کلر برای TCE و 1,2-DCA به ترتیب برابر با 16% و 12% اندازه گیری شد (نمودار ۲).

رشد مناسبی دارد [14]. سویه باکتری مشابه /سفینگوپیکسیس/ اینسیدا (*Sphingopyxis indica sp. Nov*) برای اولین بار توسط جین دال/ و همکاران از مناطق آلوده به ماده هگزا-کلروسیکلو هگزان (HCH) جداسازی شده است [15]. سویه /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس یک باکتری گرم منفی و هوازی با کلنی زرد رنگ است [16]. با توجه به محیط رشد طبیعی این باکتری (آلوده به ترکیبات آلیفاتیک کلردار)، در این پژوهش توانایی آن در حذف ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری کلرواتیلن، دی کلرواتان و دی کلرومتان بررسی شد.

به طور کلی هدف پژوهش حاضر حذف زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری کلرواتیلن (TCE)، دی کلرومتان (DCM) و دی کلرواتان (1,2-DCA) در محلول آبی با استفاده از باکتری بومی /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس بود.

مواد و روش ها

در پژوهش تجربی حاضر از ترکیبات آلیفاتیک کلردار دی کلرومتان، تری کلرواتیلن و ۲-دی کلرواتان با خلوص آزمایشگاهی $99/9\%$ استفاده شد. غلظت نمک های معدنی (مرک؛ آلمان) در یک لیتر آب مقطر شامل موارد زیر بود (گرم بر لیتر):

$\text{KH}_2\text{PO}_4 (1.0)$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 (1.8)$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (0.2)$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} (0.03)$

محیط کشت پس از تهیه، در دمای 30°C به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شد. برای ساخت محلول ریزمغذی، ترکیبات زیر مورد استفاده قرار گرفت (میلی گرم بر لیتر) [17]:

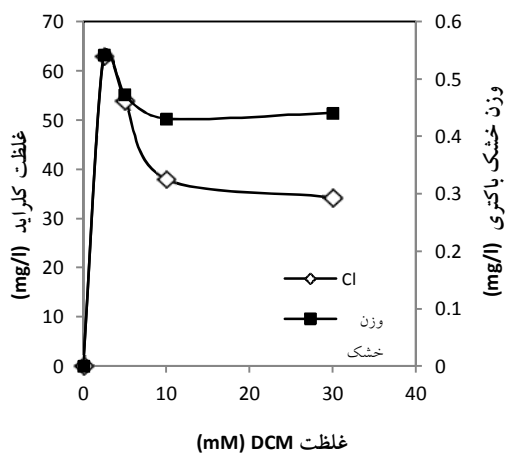
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} (10)$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (880)$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (200)$, $\text{H}_3\text{BO}_3 (10)$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (10)$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} (10)$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} (4)$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} (4)$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} (3)$, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} (2)$, $\text{H}_2\text{SO}_4 (0.05)$

محلول ریزمغذی با غلظت 10 برابر تهیه و قبل از اضافه شدن به محیط کشت، به صورت مجزا استریل شد.

در شرایطی که از گلوکز و عصاره مخمر به عنوان هم-سوپسترا استفاده شد، محلول گلوکز و عصاره مخمر با غلظت یکسان $25/5$ میلی گرم بر لیتر ساخته شد، سپس گلوکز به مدت ۵ دقیقه و عصاره مخمر به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای 121°C به مدت ۲۰ دقیقه سترون شد. باکتری /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس از لجن فعال شرکت پتروشیمی آبادان جداسازی و در کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (به شماره PTCC 1895) نگهداری و به صورت کشت زنده تهیه شد.

اندازه گیری رشد سلولی و یون کلراید آزاد شده: برای تعیین رشد سلولی از اندازه گیری کدورت محیط کشت در طول موج 600-nm به وسیله دستگاه طیف سنجی مرئی-فرابنفش مدل 8620 (UNICAM؛ ایالات متحده) استفاده شد. اندازه گیری مقدار یون کلراید آزاد شده با استفاده از دستگاه یون آنالایزر مدل 3045 (JENWAY؛ انگلستان) و الکترود گزینشی یونی (ISE) صورت گرفت. برای اندازه گیری دقیق یون کلراید آزاد شده ناشی از تجزیه زیستی، دو نقطه صفر (کنترل) شامل محیط کشت بدون باکتری و محیط کشت دارای باکتری و بدون هرگونه ترکیب کلردار انتخاب شدند، تا صرفاً مقدار یون کلراید آزاد شده به دلیل تجزیه زیستی اندازه گیری شود. برای تایید مقدار یون کلراید اندازه گیری شده با دستگاه، از روش EPA9552 به عنوان روش مکمل اندازه گیری یون کلراید استفاده شد [18].

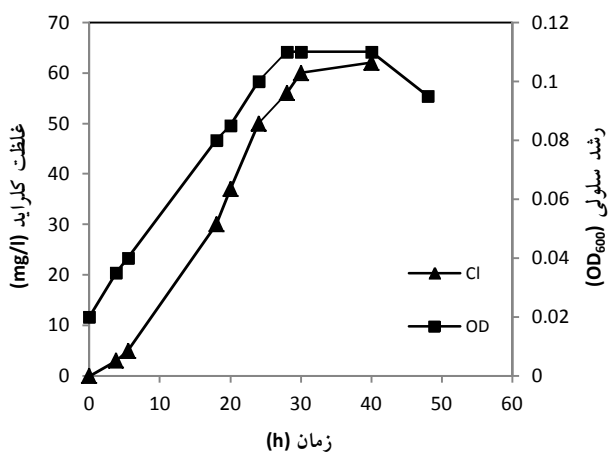
کشت باکتری و تجزیه زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار: نمونه



رشد باکتری ۶۴٪ کاهش یافت و پس از آن تا غلظت ۳۰ میلی‌مولار ثابت ماند (نمودار ۴).

نمودار ۴ رشد سلولی و غلظت یون کلراید آزاد شده حاصل از حذف زیستی DCM با غلظت‌های متفاوت در حضور گلوکز و عصاره مخمر پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm

منحنی رشد نشان‌دهنده اتمام مرحله رشد نمایی و ورود به مرحله سکون پس از ۳۲ ساعت بود. منحنی غلظت کلراید آزاد شده در تطابق با منحنی رشد سلولی بود و بیشترین تجزیه زیستی در مرحله رشد نمایی انجام شد. با کاهش رشد سلولی، میزان تجزیه زیستی به همان نسبت کاهش یافت (نمودار ۵).



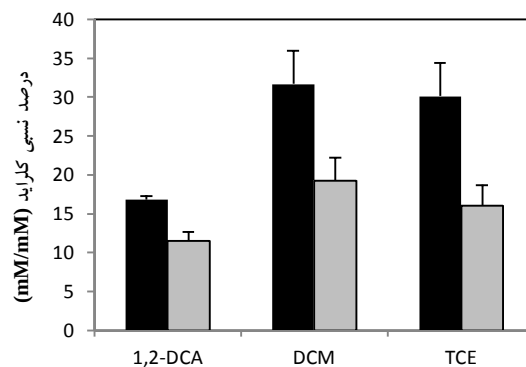
نمودار ۵ سینتیک رشد و تجزیه زیستی DCM با غلظت ۵ میلی‌مولار در حضور گلوکز و عصاره مخمر پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm

بحث

پژوهش حاضر با هدف حذف بررسی زیستی ترکیبات آلیفاتیک کلردار تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرومتان و دی‌کلرواتان در محلول آبی با استفاده از باکتری بومی /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس انجام شد.

نتایج به‌دست‌آمده از تجربه زیستی هواری ترکیبات آلیفاتیک کلردار در این پژوهش توسط سویه /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس نشان داد که با وجود رشد بهتر باکتری در محیط حاوی DCM، غلظت یون کلراید آزاد شده در هر دو مورد برای TCE بیشتر بود که علت آن را می‌توان به وجود تعداد بیشتر اتم‌های کلر در این ماده

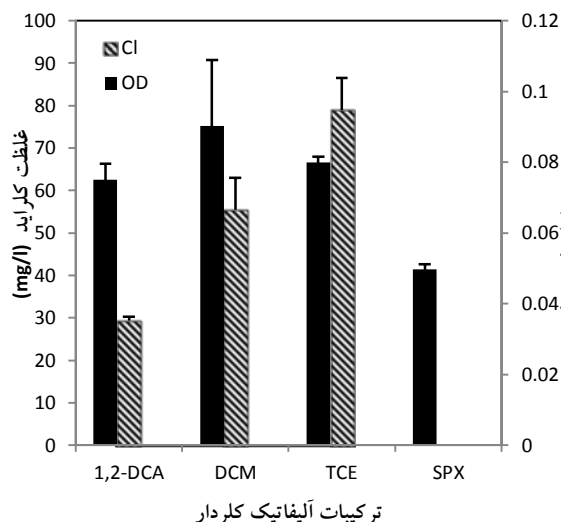
عصاره مخمر و گلوکز اثر مثبتی بر افزایش رشد و تجزیه زیستی ترکیبات آلیفاتیک مورد مطالعه داشت (نمودار ۳). با توجه به درصد نسبی کلراید آزاد شده به کل اتم‌های کلر موجود در فرآیند تجزیه زیستی (نمودار ۲)، باکتری /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس همانند آزمون گذشته در حضور DCM بهترین عملکرد را با ۳۲٪ نشان داد و پس از آن TCE و 1,2-DCA به ترتیب ۳۰ و ۱۹٪ قرار داشت.



ترکیبات آلیفاتیک کلردار

نمودار ۲ درصد نسبت یون کلراید آزاد شده به کل اتم‌های کلر موجود در اثر تجزیه زیستی ترکیبات 1, 2-DCA، TCE و DCM در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار به وسیله /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm به عنوان تنها منبع کربن (ستون‌های توپر) و با هم-سوبسترای گلوکز و عصاره مخمر (ستون خاکستری)

مقایسه درصد آزادسازی یون کلراید نسبت به شرایطی که از ترکیبات کلردار به عنوان تنها منبع کربن استفاده شده، نشان‌دهنده متوسط افزایش ۱/۷ برابری تجزیه ترکیبات آلیفاتیک کلردار بود.



ترکیبات آلیفاتیک کلردار

نمودار ۳ رشد سلولی و غلظت یون کلراید آزاد شده حاصل از حذف زیستی DCM، TCE و 1,2-DCA در حضور گلوکز و عصاره مخمر در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm

SPX نتایج در شرایط عدم حضور هر گونه ترکیب آلیفاتیک کلردار را نشان داد

بیشترین میزان تجزیه زیستی و رشد باکتری در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار حاصل شد. افزایش غلظت DCM باعث کاهش رشد باکتری شد به گونه‌ای که با افزایش غلظت از ۲/۵ به ۱۰ میلی‌مولار،

هم-سوبسترا (۳۲٪) نسبت به سایر مواد انجام شد که تاییدکننده یافته‌های پیشین است [21]. نزدیک‌تر شدن درصد نسبی یون کلراید آزاد شده نسبت به کل اتم‌های کلر موجود در ترکیبات در شرایط هوازی به ۱۰۰، نشان‌دهنده عملکرد بهتر باکتری در آزادسازی یون کلراید و تجزیه زیستی بود و چنانچه این عدد مساوی ۱۰۰ شود به‌منزله معدنی‌شدن کل ترکیب است [19].

نسبت داد [20]. تعداد اتم کلر در یک مول TCE سه و در DCM دو عدد است. بررسی درصد نسبی کلراید آزاد شده (نسبت کلراید آزاد شده به کل کلر موجود در ماده) که پارامتر بهتری برای اندازه‌گیری معدنی‌شدن ترکیبات کلردار است [19]، نشان داد که در شرایط پژوهش حاضر کلرزدایی بهتری در مورد DCM چه به‌صورت تنها منبع کربن (۱۹٪) و چه در حضور گلوکز و عصاره مخمر به‌عنوان

جدول ۱) مقایسه مطالعات انجام‌شده در حذف زیستی هوازی TCE، 1,2-DCA و DCM از آب و پساب با نتایج پژوهش حاضر

مرجع	سرعت حذف (mg/l.h)	حذف (%)	زمان (روز)	غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)	هم-سوبسترا	باکتری
ماده کلردار TCE						
[۲۵]					—	کنسرسیوم باکتری‌ها در راکتور
[۲۶]		۱۵	۷۶	۰/۵۴۶	—	کنسرسیوم باکتری‌های هوازی
[۲۶]		۶۲	۷۶	۰/۵۴۶	تولون	کنسرسیوم باکتری‌های هوازی
[۲۶]		۳۲	۷	۶۶۲	تولون	<i>Ralstonia sp. P-10</i>
پژوهش حاضر	۳۲۸	۴۵	۴۸	۳۵۲	گلوکز-عصاره مخمر	<i>Sphingopyxis ummariensis</i>
1,2-DCA ماده کلردار						
[۲۸، ۲۷]		—	—	—	—	<i>Ancylobacter aquaticus AD25</i>
[۲۹]		۱۰۰	۵	۲۱۲	—	<i>X.autotrophicus GJ10</i>
[۲۹]		۱۰۰	۱۵	۲۱۲	—	<i>Pseudomonas sp. strain DCA1</i>
[۲۲]		۹۰-۷۰	۲۱۸	۷۳۸۰	—	راکتور بیوفیلیم با کنسرسیوم باکتری‌های هوازی
پژوهش حاضر	۰/۹	۱۶	۴۸	۲۴۵	گلوکز-عصاره مخمر	<i>Sphingopyxis ummariensis</i>
DCM ماده کلردار						
[۳۰]		۱۰۰	—	۷/۱	—	<i>Methylobacterium rhodesianum H13</i>
[۳۱]		۱۰۰	—	۵/۵۳	—	<i>Pandoraea pnomenus</i>
[۳۲]		۸۳	۱/۲۵	—	—	<i>Bacillus circulans WZ-12</i>
[۳۰]		۷۲	۲۸	—	—	<i>Pseudomonas sp. and Mycobacterium sp.</i>
[۳۱]		۱۰۰	۷	۲۵۰۰	—	<i>Ralstonia metallidurans PD11</i>
[۳۳]		۱	۰/۰۴۲	۱۰۰	—	<i>Escherichia coli and Staphylococcus aureus</i>
[۳۴]		۸۰	—	۵۷۰۰	—	<i>Bacillus circulans</i>
[۳۴]		—	—	۴۴۱۷۰	گلوکز	<i>Bacillus circulans</i>
پژوهش حاضر	۱/۶۷	۵۰	۳۲	۲۱۲	گلوکز-عصاره مخمر	<i>Sphingopyxis ummariensis</i>

اسفینگوپیکسیس / اومارینسیس از DCM در غلظت ۲۱۲/۳۲ میلی‌گرم بر لیتر و در حضور گلوکز و عصاره مخمر به‌میزان ۱/۶۷ mg/l.h یون کلراید آزاد کرد که قابل مقایسه با سایر سوبه‌های گزارش شده است. در شرایطی که این باکتری از این ماده به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده کند، سرعت آزادسازی یون کلراید به ۱/۰۵ mg/l.h کاهش می‌یابد. با توجه به کلرزدایی صورت‌گرفته در پژوهش حاضر میزان حذف DCM در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار در شرایط هم-سوبسترا برابر ۵۰٪ بود. در پژوهشی برای تجزیه زیستی TCE در یک راکتور هوازی/بی‌هوازی سرعت کلرزدایی ۰/۳۳ mg/l.h در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است [23]. در پژوهش حاضر سرعت کلرزدایی TCE توسط سوبه اسفینگوپیکسیس / اومارینسیس در غلظت ۳۵۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان تنها منبع کربن ۱/۳ mg/l.h بود که در حضور گلوکز و عصاره مخمر تا ۳/۲۸ mg/l.h افزایش یافت. سرعت حذف زیستی TCE به‌وسیله سوبه مورد آزمایش در این پژوهش قابل قبول بود. بالاترین سرعت حذف در باکتری‌های هوازی به‌وسیله سوبه متیلوسینوس تریکوسپوریوم *OB3b* ثبت شده که در غلظت ۰/۸ گرم بر لیتر و با سرعت حذف زیستی بالاتر از ۲/۴ mg/l.h بوده است [6]. سوبه اسفینگوپیکسیس / اومارینسیس نسبت به پرسرعت‌ترین سوبه عملکرد ضعیفی داشت، اما در مقابل نسبت به سوبه متیلوموناس متانیکا 68-1 است با داشتن سرعت حذف ۰/۲ mg/l.h. سرعت بالاتری داشت [7]. با توجه به کلرزدایی صورت‌گرفته می‌توان نتیجه گرفت که

مقایسه درصد آزادسازی یون کلراید در حضور هم-سوبسترا نسبت به شرایطی که از ترکیبات کلردار به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شده، نشان‌دهنده متوسط افزایش ۱/۷ برابری تجزیه ترکیبات آلیفاتیک کلردار بود که پیشرفت بیشتر واکنش تجزیه ترکیبات در حضور گلوکز و عصاره مخمر را نشان داد. علت این مساله می‌تواند به‌دلیل افزایش غلظت توده سلولی باشد. تاکنون تعداد سوبه‌های کمی گزارش شده که توانایی رشد بر 1,2-DCA و TCE به‌عنوان منبع کربن را دارند [21، 22]، در حالی که در مورد DCM تعداد بسیاری از مقالات منتشر شده‌اند [19]. نتایج به‌دست‌آمده از سایر پژوهش‌ها و مقایسه آن با نتایج پژوهش حاضر در جدول ۱ ارایه شده است. سرعت کلرزدایی ترکیبات DCM، TCE و 1,2-DCA با سوبه اسفینگوپیکسیس / اومارینسیس با غلظت اولیه ۲/۵ میلی‌مولار (به‌ترتیب معادل با ۱/۰۵، ۱/۳ و ۰/۶۳ mg/l.h) و در حضور هم-سوبسترای گلوکز و عصاره مخمر در شرایط پژوهش حاضر به‌ترتیب برابر با ۱/۶۷، ۳/۲۸ و ۰/۹ mg/l.h به‌دست‌آمد.

در سوبه متیلوباکتیریوم رودسیانوم *H13* سرعت کلرزدایی DCM در غلظت ۲۱۲/۳۲ میلی‌گرم بر لیتر برابر با ۲/۹ mg/l.h گزارش شده است [18]. سرعت کلرزدایی در باکتری *راستونیا متالیدورانس PD11* (*Ralstonia metallidurans, PD11*) نیز در غلظت ۱۴۰ میلی‌گرم بر لیتر در حدود ۱/۱۶ mg/l.h گزارش شده است [22]. در گزارش راوی و همکاران، سرعت آزادسازی یون کلراید در تجزیه زیستی هوازی DCM در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (به‌عنوان تنها منبع کربن)، به‌وسیله چند سوبه باکتریایی ۰/۳۵ mg/l.h به‌دست‌آمد [17]. سوبه

سویه پژوهش حاضر، TCE را به DCE و VC (وینیل کلراید) تبدیل کرد و در حدود ۴۰٪ از TCE تجزیه زیستی شد.

در پژوهش حاضر عملکرد باکتری /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس در مورد ماده 1,2-DCA ضعیف و کدورت ناشی از رشد و نسبت یون کلراید آزاد شده آن کم بود، به گونه‌ای که سرعت کلرزایی به عنوان تنها منبع کربن 0.63 mg/l.h به دست آمد و در حضور گلوکز و عصاره مخمر تا 0.9 mg/l.h در غلظت $2/5$ میلی‌مولار اندازه‌گیری شد. دی‌کلرواتان همواره سرعت تجزیه زیستی‌کننده داشته است، به گونه‌ای که سویه‌های کمی وجود دارد که بتوانند در این ماده به عنوان تنها منبع کربنی رشد کنند. در پژوهش کوکامی و همکاران مشخص شد یک بیوفیلم هوازی می‌تواند در غلظت 7380 میلی‌گرم بر لیتر پس از گذشت ۲۱۸ روز بیش از ۷۰٪ دی‌کلرواتان موجود در راکتور را تجزیه کند [22]. این پژوهش و سایر نتایج نشان‌دهنده آهسته‌بودن تجزیه زیستی 1,2-DCA است [24]. با وجود ضعیف‌بودن تجزیه زیستی این ماده، سویه /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس در حضور DCA (به عنوان تنها منبع کربن) به صورت هوازی رشد کرد، که کمتر در مورد سایر سویه‌ها مشاهده شده است [22]. امکان رشد این باکتری در حضور سایر ترکیبات آروماتیک کلردار مانند دی‌کلروبنزن نیز بررسی شد که حتی در حضور منبع کربن گلوکز و عصاره مخمر رشدی مشاهده نشد که سمیت این ترکیبات برای باکتری /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس را نشان داد.

در پژوهش حاضر، بیشترین میزان حذف DCM در غلظت $2/5$ میلی‌مولار به دست آمد. از طرفی دیگر با افزایش غلظت DCM میزان آزادسازی کلر کاهش یافت و در نتیجه میزان حذف زیستی DCM کم شد که این امر نشان‌دهنده محدودیت باکتری در غلظت بالای DCM بود. علاوه بر کاهش حذف DCM، کدورت ناشی از رشد باکتری نیز کاهش یافت که سبب شدن محیط در غلظت‌های بالاتر از 10 میلی‌مولار برای باکتری را نشان داد. سویه تا ۳۲ ساعت در فاز لگاریتمی و پس از آن وارد فاز ایستا شد. کلرزایی و حذف DCM بیشتر در فاز لگاریتمی بود و زمانی که وارد فاز ایستا شد، سرعت کلرزایی کاهش یافت.

توانایی سویه /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس در حذف ترکیبات آلیفاتیک کلردار شامل DCM، TCE و 1,2-DCA در این پژوهش بررسی شد. سویه بیشترین رشد و بازدهی حذف زیستی را در حذف DCM، به عنوان تنها منبع کربن و در کنار گلوکز و عصاره مخمر به عنوان هم-سویسترا داشت، به گونه‌ای که در غلظت $2/5$ میلی‌مولار، ۳۲٪ کل اتم‌های کلر در شرایط هم-سویسترا از ترکیب اولیه آزاد شد. پس از آن، ترکیبات TCE و DCA به ترتیب بیشترین رشد و کلراید آزاد شده نسبت به کل اتم کلر موجود را نشان دادند. غلظت بهینه DCM برای حذف زیستی $2/5$ میلی‌مولار به دست آمد. بررسی سینتیک رشد و حذف زیستی دی‌کلرومتان نشان داد که بیشترین سرعت تجزیه زیستی این ماده در فاز نمایی رشد بود و با کاهش رشد، تجزیه این ماده نیز کاهش یافت؛ بنابراین، در طراحی بیوراکتور مورد استفاده، باید شرایط را در فاز نمایی تثبیت کرد تا حداکثر تجزیه زیستی رخ دهد. مقایسه عملکرد این باکتری با نتایج به دست آمده از سایر پژوهش‌ها، نشان‌دهنده آن است که این سویه می‌تواند در تجزیه ترکیبات دیرتخریب‌پذیر آلیفاتیک کلردار استفاده شود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به محدودیت انتقال جرم اکسیژن به هنگام رشد باکتری اشاره نمود که با طراحی و به کارگیری بیوراکتور مناسب، می‌توان انتقال اکسیژن برای رشد

باکتری و تجزیه زیستی را بهینه نمود. همچنین با استفاده از دستگاه‌های آنالیز پیشرفته می‌توان غلظت باقی‌مانده ترکیبات کلردار و چگونگی تبدیل آنها به ترکیبات آلی کوچک‌تر را بررسی کرد.

نتیجه‌گیری

باکتری /سفینگوپیکسیس/ اومارینسیس توانایی حذف ترکیبات آلیفاتیک کلردار را دارد و می‌تواند روی ترکیبات دیرتخریب‌پذیر تری‌کلرواتیلن، دی‌کلرومتان و ۲-دی‌کلرواتان به عنوان تنها منبع کربن رشد کند و موجب کلرزایی آنها شود. این سویه بیشترین رشد و بازدهی حذف زیستی را در حذف دی‌کلرومتان، به عنوان تنها منبع کربن و در کنار گلوکز و عصاره مخمر به عنوان هم-سویسترا دارد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: ندا بدلی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ سهیلا شکراله‌زاده (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ عباس فرازند (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۵٪).

منابع مالی: این پژوهش با استفاده از امکانات آزمایشگاهی پژوهشکده‌های فناوری‌های شیمیایی و زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به انجام رسیده است.

منابع

- 1- Shestakova M, Sillanpää M. Removal of dichloromethane from ground and wastewater: A review. *Chemosphere*. 2013;93(7):1258-67.
- 2- Liu X, Vellanki BP, Batchelor B, Abdel-Wahab A. Degradation of 1, 2-dichloroethane with advanced reduction processes (ARPs): Effects of process variables and mechanisms. *Chem Eng J*. 2014;237:300-7.
- 3- Field J, Sierra-Alvarez R. Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds. *Rev Environ Sci Bio*. 2004;3:185-254.
- 4- Azadpour-Keeley A, Russell HH, Sewell GW. Record display for the EPA National Library Catalog. U.S. Washington DC: Environmental Protection Agency; 1999. Report no.: EPA/540-S-99-001.
- 5- Amin MT, Hamid S, Alazba AA, Amin MN, Islam M, Manzoor U. Environmental dynamics and engineered systems for the degradation of trichloroethylene: A critical review. *Global NEST J*. 2014;16(2):316-28.
- 6- Tsien HC, Brusseau GA, Hanson RS, Waclett LP. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(12):3155-61.
- 7- Koh SC, Bowman JP, Sayler GS. Soluble methane monooxygenase production and trichloroethylene degradation by a type I methanotroph, *Methylomonas methanica* 68-1. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(4):960-7.
- 8- Kocamehi BA, Çeçen F. Biodegradation of 1, 2-dichloroethane (1,2-DCA) by cometabolism in a nitrifying biofilm reactor. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2009;63(6):717-26.
- 9- Scheutz C, Durant ND, Broholm MM. Effects of bioaugmentation on enhanced reductive dechlorination

- nitriifying biofilm reactor. Int Biodeterior Biodegradation. 2009;63(6):717-26.
- 23- Tartakovsky B, Manuel MF, Guiot SR. Trichloroethylene degradation in a coupled anaerobic/aerobic reactor oxygenated using hydrogen peroxide. Environ Sci Technol. 2003;37(24):5823-8.
- 24- Davis GB, Patterson BM, Johnston CD. Aerobic bioremediation of 1, 2 dichloroethane and vinyl chloride at field scale. J Contam Hydrol. 2009;107(1-2):91-100.
- 25- Chen WH, Yang WB, Yuan CS, Yang JC, Zhao QL. Fates of chlorinated volatile organic compounds in aerobic biological treatment processes: The effects of aeration and sludge addition. Chemosphere. 2014;103:92-8.
- 26- Han YL, Kuo MC, Tseng IC, Lu CJ. Semicontinuous microcosm study of aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene. J Hazard Mater. 2007;148(3):583-91.
- 27- Firsova J, Doronina N, Lang E, Spröer C, Vuilleumier S, Trotsenko Y. *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov.-a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. Syst Appl Microbiol. 2009;32(4):227-32.
- 28- van den Wijngaard AJ, Van der Kamp K, van der Ploeg J, Pries F, Kazemier B, Janssen DB. Degradation of 1, 2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* and other facultative methylotrophs. Appl Environ Microbiol. 1992;58(3):976-83.
- 29- Hage JC, Hartmans S. Monooxygenase-mediated 1, 2-dichloroethane degradation by *Pseudomonas* sp. strain DCA1. Appl Environ Microbiol. 1999;65(6):2466-70.
- 30- Yu Jm, Chen Jm, Wang Jd. Removal of dichloromethane from waste gases by a biotrickling filter. J Environ Sci. 2006;18(6):1073-6.
- 31- Miyake-Nakayama C, Masujima S, Ikatsu H, Miyoshi ShI, Shinoda S. Isolation and characterization of a new dichloromethane degrading bacterium, *Ralstonia metallidurans*, PD11. Biocontrol Sci. 2004;9(4):89-93.
- 32- Wu SJ, Zhang LL, Wang JD, Chen JM. *Bacillus circulans* WZ-12-a newly discovered aerobic dichloromethane-degrading methylotrophic bacterium. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;76(6):1289-96.
- 33- Olaniran AO, Pillay D, Pillay B. Aerobic biodegradation of dichloroethenes by indigenous bacteria isolated from contaminated sites in Africa. Chemosphere. 2008;73(1):24-9.
- 34- Wu S, Yu X, Hu Z, Zhang L, Chen J. Optimizing aerobic biodegradation of dichloromethane using response surface methodology. J Environ Sci. 2009;21(9):1276-83.
- of 1, 1, 1-trichloroethane in groundwater: A comparison of three sites. Biodegradation, 2014;25(3):459-78.
- 10- Ottengraf SPP, Meesters JJP, Van Den Oever AHC, Rozema HR. Biological elimination of volatile xenobiotic compounds in biofilters. Bioprocess Eng. 1986;1(2):61-9.
- 11- Scholtz R, Wackett LP, Egli C, Cook AM, Leisinger T. Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a fast-growing dichloromethane-utilizing bacterium. J Bacteriol. 1988;170(12):5698-704.
- 12- Stucki G, Gälli R, Ebersold HR, Leisinger T. Dehalogenation of dichloromethane by cell extracts of *Hyphomicrobium* DM2. Arch Microbiol. 1981;130(5):366-71.
- 13- Chen DZ, Ouyang DJ, Liu HX, Chen J, Zhuang QF, Chen JM. Effective utilization of dichloromethane by a newly isolated strain *Methylobacterium rhodesianum* H13. Environ Sci Pollut Res Int. 2014;21(2):1010-9.
- 14- Shokrollahzadeh S, Azizmohseni F, Golmohamad F. Characterization and kinetic Study of PAH-Degrading *Sphingopyxis ummariensis* bacteria isolated from a petrochemical wastewater treatment plant. Adv Environ Technol. 2015;1(1):1-9.
- 15- Jindal S, Dua A, Lal R. *Sphingopyxis indica* sp. nov., isolated from a high dose point hexachlorocyclohexane (HCH)-contaminated dumpsite. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(Pt 6):2186-91.
- 16- Sharma P, Verma M, Bala K, Nigam A, Lal R. *Sphingopyxis ummariensis* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60(Pt 4):780-4.
- 17- Karn SK, Reddy MS. Degradation of 2, 4, 6-trichlorophenol by bacteria isolated from secondary sludge of a pulp and paper mill. J Gen Appl Microbiol. 2012;58(6):413-20.
- 18- Keith LH. Compilation of EPA's sampling and analysis methods. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press; 1996.
- 19- Ryoo D, Shim H, Canada K, Barbieri P, Wood TK. Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. Nat Biotechnol. 2000;18(7):775-8.
- 20- Frascari D, Zanolli G, Danko AS. In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: A review. J Hazard Mater. 2015;283:382-99.
- 21- Tiehm A, Schmidt KR. Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes-aspects of field application. Curr Opin Biotechnol. 2011;22(3):415-21.
- 22- Alpaslan Kocamemi B, Çeçen F. Biodegradation of 1,2-dichloroethane (1,2-DCA) by cometabolism in a