

تجزیه استرهای اسید فتالیک توسط کنسرسیوم میکروبی جداسازی شده از یک خاک آلوده

شایان شریعتی^۱، احمد علی پوربابائی^{۲*}، حسینعلی علیخانی^۳، کرامت اله رضایی^۴

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۳)

چکیده

استرهای اسید فتالیک ترکیبات سنتزی هستند که به عنوان نرم کننده در ترکیبات پلی مری و پلاستیک استفاده می شوند. ورود این ترکیبات به محیط زیست و چرخه غذایی انسان و ایجاد انواع سرطانها، باعث افزایش نگرانی جهانی شده است. هدف از این پژوهش بررسی غلظت استرهای اسید فتالیک در خاک در معرض شیرابه زباله (محل دفن زباله) و یافتن یک کنسرسیوم میکروبی با قابلیت تخریب این آلایندهها می باشد. غلظت استرهای اسید فتالیک در خاک با استفاده از روش التراسونیک و توسط دستگاه GC-MS اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که غلظت دی اتیل هگزیل فتالات در خاک ($4/52 \text{ mg Kg}^{-1}$) ۶ برابر استاندارد جهانی آن ($10/7 \text{ mg Kg}^{-1}$) بود. غنی سازی میکروبی در محیط کشت معدنی حاوی استرهای اسید فتالیک صورت پذیرفت (دمای ۳۰ درجه سلسیوس و rpm ۱۲۰) و کنسرسیوم میکروبی توانمند در تجزیه استرهای اسید فتالیک جدا شد. به منظور بررسی تجزیه بیولوژیکی استرهای اسید فتالیک توسط کنسرسیوم جداسازی شده، غلظت باقی مانده فتالاتها با اتیل استات استخراج و با دستگاه GC-MS اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که این کنسرسیوم توانست بالاتر از ۹۶ درصد فتالاتهای با وزن مولکولی کم دی متیل فتالات و دی اتیل فتالات و دی بوتیل فتالات (فتالات با وزن مولکولی متوسط) را تجزیه کند (دمای ۳۰ درجه سلسیوس و rpm ۱۲۰). در مورد دی اتیل هگزیل فتالات (پرمصرف ترین نرم کننده جهان) نیز این کنسرسیوم توانست ۵۵ درصد آنرا در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر تخریب نماید. بعلاوه، تجزیه استرهای اسید فتالیک توسط این کنسرسیوم به صورت جداگانه، تقریباً به صورت کامل صورت پذیرفت (پنج روز انکوباسیون، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و rpm ۱۲۰). نتایج ما تخریب بیولوژیکی استرهای اسید فتالیک توسط این کنسرسیوم را اثبات کرده و امکان استفاده از آن را برای پالایش زیستی فتالات در خاکهای آلوده توصیه می کند.

واژه های کلیدی: زیست پالایی، شیرابه زباله، فتالات، نرم کنندهها

شریعتی ش.، پوربابائی ا.ع.، علیخانی ح.، رضایی ک. ۱۴۰۱. تجزیه استرهای اسید فتالیک توسط کنسرسیوم میکروبی جداسازی شده از یک خاک آلوده. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۱۰، شماره ۲، صفحه ۱-۱۳.

۱- محقق پسادکتری، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴- استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

* پست الکترونیک: hpourbabaei@gmail.com

مقدمه

کاهش می‌دهد (Chen *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2010).
 چن و همکاران (Chen *et al.*, 2013) استرهای اسید فتالیک را از لحاظ سمیت برای میکروب‌ها مطابق دی بوتیل فتالات (DBP) < دی متیل فتالات (DMP) < دی اکتیل فتالات (DOP) < دی اتیل هگزیل فتالات (DEHP) طبقه‌بندی کردند. وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2015) بیان کردند غلظت آنزیم دهیدروژناز با کاهش فتالات‌ها افزایش یافت. وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2016) اثر بقایای پوشش‌های پلاستیکی بر وجود فتالات در خاک و تاثیر آن بر فعالیت میکروبی و آنزیمی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد با افزایش بقایای پوشش‌های پلاستیکی غلظت فتالات‌ها افزایش یافت ولی کربن و نیتروژن میکروبی خاک، فعالیت آنزیمی و تنوع باکتری‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. یکی از روش‌های پالایش استرهای اسید فتالیک در خاک، حذف به روش تخریب میکروبی می‌باشد. محققین زیادی تجزیه ترکیبات فتالات را توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها گزارش کرده‌اند. ریزجانداران خاک از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند (Wang *et al.*, 2017ab; Li *et al.*, 2018; Boll *et al.*, 2020).
 استرهای اسید فتالیک نیازمند آنزیم‌ها و ژن‌های گوناگونی می‌باشد و برخی از میکروب‌ها می‌توانند به تنهایی این فرآیند را کامل کنند. اگرچه در طبیعت تجزیه فتالات‌ها با همیاری چندین ریزجاندار باهم صورت می‌پذیرد. هر یک از میکروب‌های مختلف در مراحل تجزیه به صورت اختصاصی عمل می‌کنند و می‌توانند ماده حد واسط ویژه‌ای را تجزیه نمایند (Ren *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018). وو و همکاران (Wu *et al.*, 2010) بیان کردند ترکیب سویه‌های *Arthrobacter sp.* strain و *Gordonia sp.* strain JDC-2 و JDC-32 توانست دی اکتیل فتالات را بعد از ۴۸ ساعت تجزیه نمایند. بونیاروج و همکاران (Boonyaroj *et al.*, 2012) نرخ تجزیه دی متیل فتالات، دی اتیل فتالات، دی بوتیل فتالات، بنزیل بوتیل فتالات، دی اتیل هگزیل فتالات و دی اکتیل فتالات در شیرابه زباله جامد شهری با استفاده از تیمار دو مرحله با راکتورهای زیستی را به ترتیب ۷۸، ۸۱، ۸۷، ۷۷، ۹۶ و ۸۲ درصد بیان کردند. استرهای اسید فتالیک در فاضلاب‌ها با غلظت ۱۲ تا ۱۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فراوانند (Fu *et al.*, 2013) که تحت فرایند

فتالات‌ها یا استرهای اسید فتالیک (PAEs) کاربردشان به عنوان نرم‌کننده از سال ۱۹۳۰ میلادی آغاز شده و در حدود ۸۰ درصد از کل تولید پلاستی‌سایزرها را به خود اختصاص داده‌اند (Julinová & Slavík, 2012; Kastner *et al.*, 2012). تولید جهانی فتالات‌ها با ۱/۸ میلیون تن در سال ۱۹۷۵، ۶/۲ میلیون تن در سال ۲۰۰۹ و افزایش تا بیش از ۸/۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۹ به سرعت در حال افزایش است (Net *et al.*, 2015ab; Sheikh & Beg, 2019; Giuliani *et al.*, 2020). استرهای اسید فتالیک در دسته ترکیبات سخت تجزیه‌پذیر، خطرناک و نو پدید قرار داده شده‌اند (Deblonde *et al.*, 2011, Benjamin *et al.*, 2015) که غالباً به منظور افزایش انعطاف‌پذیری ترکیبات پلیمری و پلاستیک استفاده شده (Daiem *et al.*, 2012; Boll *et al.*, 2020) و در بسته‌بندی مواد غذایی (Heudorf *et al.*, 2007)، رنگ و جلادهنده‌ها، چسب‌ها (Clara *et al.*, 2010)، صنایع کاغذ و مقوا سازی (Chaler *et al.*, 2008) و ... به کار گرفته می‌شوند. این ترکیبات به طور شیمیایی با پلاستیک‌ها پیوند برقرار نمی‌کنند و می‌توانند به داخل محیط آبه‌شویی شوند و جز آلاینده‌های همه‌جایی شناخته می‌شوند. آنها در خاک، اتمسفر، آب سطحی، رسوبات، فاضلاب شهری و در شیرابه محل‌های دفن زباله شناسایی شده‌اند (Boonyaroj *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Benjamin *et al.*, 2015; Net *et al.*, 2015bc, Tran & Kannan, 2015). فتالات‌ها و متابولیت‌های آنها می‌توانند مختل‌کننده فرایندهای بیولوژیک بوده و به طور بالقوه برای انسان مضر هستند (Planello *et al.*, 2011). آنها جز مواد شیمیایی مختل‌کننده غدد درون‌ریز بوده (Park *et al.*, 2012) و بدلیل خصوصیات سمی بودن برای کبد، جهش‌زایی و سرطان‌زایی (Zeng *et al.*, 2009)، استفاده از بعضی از فتالات‌ها در اسباب بازی بچه‌ها توسط اتحادیه اروپا در سال ۱۹۹۹ (European Commission, 1999)، آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA)، اتحادیه اروپا و مرکز حفاظت محیط زیست چین محدود شد (Planello *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2011). محققین بیان کردند، استرهای اسید فتالیک فعالیت میکروب‌های خاک، آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز، کاتالاز، و فعالیت موجوداتی مانند کرم خاکی را

8. Dimethyl Phthalate (DMP)

9. Dioctyl Phthalate (DOP)

10. Diethyl hexyl Phthalate (DEHP)

5. Phthalic Acid Esters

6. Phthalic Acid Esters Agency (EPA)

7. Dibutyl Phthalate (DBP)

استرهای اسید فتالیک دی متیل فتالات (DMP)، دی اتیل فتالات (DEP)، دی بوتیل فتالات (DBP) و دی اتیل هگزیل فتالات (DEHP)، از شرکت Aldrich (Germany) با غلظت ۹۹/۵ درصد تهیه گردید. اتیل استات و هگزان با درجه خلوص HPLC نیز به ترتیب از شرکت‌های Merck (Germany) و Roth (Germany) با غلظت ۹۹/۵ درصد تهیه گردید.

موقعیت منطقه

جنگل سراوان در منطقه‌ای جلگه‌ای در بین شهرهای رشت و رستم آباد قرار گرفته و در حوزه شهرستان رشت در بخش سنگر و در دهستان سراوان در بین مسیر جاده ترانزیتی رشت- تهران و رودخانه‌های سیاهرود واقع شده است. بر اساس نقشه زمین‌شناسی با مقیاس ۱:۱۰۰۰۰۰ قدیمی-ترین سازندها مربوط به دوران مزوزوئیک و دوران تریاس پسین می‌باشد. میانگین بارندگی در این منطقه ۱۳۷۴/۴ میلی‌متر بوده و متوسط دما ۱۵/۹ درجه سلسیوس است که حداقل مطلق آن در بهمن و حداکثر مطلق آن در تیرماه است. این منطقه در ارتفاع ۵۰ تا ۲۵۰ متری از سطح دریای آزاد قرار دارد (Daryayi et al., 2013). این جنگل‌ها در سال ۲۰۱۹ به عنوان میراث جهانی در یونسکو به ثبت رسیده‌اند. محل دفن زباله‌های شهر رشت واقع در منطقه سراوان تنها محل دفن پسماندهای شهر رشت می‌باشد و روزانه بیش از ۸۰۰ تن زباله در این منطقه به طور غیراصولی دفن می‌شود. این مکان ۳۷ سال محل دفن زباله شهرهای رشت، فومن، شفت، صومعه‌سرا، خشکبیجار، کوچصفهان و لشت‌نشا بوده است. ۹۰ درصد زباله‌های انتقال یافته به مرکز دفن زباله سراوان در شهر رشت تولید می‌شود (Karimpour-Fard, 2019). شیرابه‌های زباله‌های سراوان از طریق رودخانه‌های زرجوب، سفیدرود و پیربازار وارد تالاب بین‌المللی انزلی و دریای کاسپین می‌شوند. از دیگر خطرات زیست‌محیطی نیز می‌توان به نفوذ شیرابه به لایه‌های زیرین خاک و آلودگی آب‌های زیرزمینی، انتشار گاز در اتمسفر، تغذیه حیوانات بومی از زباله و آسیب‌دیدگی پوشش گیاهی و حیات وحش موجود را نام برد (Shariatmadari et al., 2018).

نمونه‌برداری

برای نمونه‌برداری به منظور جلوگیری از فتولیز استرهای اسید فتالیک در معرض نور، از ظروف شیشه‌ای تیره رنگ استفاده گردید. ظروف ابتدا با آب و آب مقطر و سپس با

کمپوست کردن با کود خوکی، این استرها به طور مطلوبی تجزیه می‌شوند (Chai et al., 2014). وانگ و همکاران (Wang et al., 2017b) بیان کردند کنسرسیوم LV-1 توانست ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دی اتیل هگزیل فتالات را طی ۲۴ ساعت تجزیه کند. Li و همکاران (۲۰۱۸) کنسرسیوم میکروبی مقاوم به شوری LF با توانایی تجزیه دی اتیل هگزیل فتالات را از لجن‌های فعال جداسازی کردند. این کنسرسیوم توانست ۹۳/۴۸ درصد دی اتیل هگزیل فتالات (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH=7 بعد از ۷۲ ساعت تجزیه نماید. LF توانست ۹۱ درصد دی اتیل هگزیل فتالات را در شوری ۳-۰ درصد تجزیه نماید. منطقه سراوان در گیلان که جز جنگل‌های هیرکانی حاشیه دریای خزر محسوب می‌شود و به عنوان میراث جهانی در یونسکو در سال ۲۰۱۹ به ثبت رسیده است که از نظر گردشگری، محیط زیست و دارا بودن گونه‌های متنوع گیاهی و منحصر به فرد در جهان و اتصال این منطقه از طریق رودهای مختلف به تالاب بین‌المللی انزلی و دریای خزر از اهمیت بالایی برخوردار است. در این منطقه، محل دفن زباله سراوان در سال ۱۳۶۳ ساخته شد و اکنون به بزرگترین محل دفن زباله در شمال ایران تبدیل شده است. متأسفانه روزانه بیش از ۸۰۰ تن زباله بدون استانداردهای مناسب و روش‌های پیش تصفیه به این محل دفن زباله ریخته می‌شود و سلامت و اکوسیستم این جنگل را به شدت تحت خطر می‌اندازد. کریم‌پور فرد (Karimpour-Fard, 2019) بیان کرد به طور متوسط ۷ لیتر شیرابه در ثانیه از محل دفن زباله سراوان به خاک، رودخانه‌ها و آب زیرزمینی وارد می‌شود که می‌تواند از این مسیرها وارد تالاب انزلی و دریای خزر شده و مشکلات زیست محیطی بسیاری را برای انسان و محیط زیست ایجاد نماید. با توجه به اینکه سهم عظیمی از زباله‌های ورودی به این تالاب را پلاستیک‌ها تشکیل می‌دهد، هدف از این پژوهش غنی‌سازی و جداسازی میکروارگانیسم‌های توانمند در تجزیه استرهای اسید فتالیک دی متیل فتالات، دی اتیل فتالات، دی بوتیل فتالات و دی اتیل هگزیل فتالات (موجود در لیست ترکیبات EPA) از خاک آلوده به ترکیبات پلاستیکی محل دفن سراوان بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

مربع) بود (Net *et al.*, 2015c). بعد از نمونه برداری و مخلوط کردن نمونه‌ها با هم، درب نمونه با پارافیلیم بسته شده به منظور انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه نیز از یونولیت مملو از یخ استفاده گردید و بعد از انتقال به آزمایشگاه نیز در یخچال نگهداری شدند.

هگزان ۹۹ درصد شسته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. نمونه برداری در عمق ۲۰-۰ سانتی متری در منطقه پائین دست محل دفن زباله که در معرض آلودگی شیرابه قرار داشت انجام پذیرفت (شکل ۱). لازم به ذکر است که نمونه متشکل از سه زیرنمونه مخلوط از اطراف آن منطقه (فاصله ۵۰×۵۰ متر



شکل ۱- پائین دست محل دفن زباله سراوان
Figure 1. Downstream of Saravan landfill

کرده و سر ظرف شیشه‌ای با ظرف آلومینیومی پوشانیده شد. سپس مخلوط با ورتکس به مدت ۵ دقیقه شیک شده و به مدت ۳۰ دقیقه همگن گردید. در مرحله بعد مخلوط در سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. بعد از جداسازی فازها، ۵ میلی لیتر از فاز بالایی برداشته شد و ۲ میلی لیتر محلول آب نمک اضافه گردید و در نهایت ۱ میلی لیتر هگزان اضافه شده و با ورتکس به مدت ۲ دقیقه شیک گردید. فاز هگزان جدا شده به ویال-های شیشه‌ای انتقال داده شده و سپس برای تعیین غلظت فتالات‌های موجود به دستگاه GC-MS مدل ۷۸۹۰ A ساخت شرکت Agilent کشور آمریکا مجهز به آشکارساز طیف‌سنج جرمی تزریق گردید.

غنی‌سازی و اندازه‌گیری میزان استرهای اسید فتالیک
باقی‌مانده

اندازه‌گیری برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و غلظت استرهای اسید فتالیک

به منظور اندازه‌گیری برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، ابتدا نمونه‌های خاک هواخشک شده و از الک ۲ و ۰/۵ میلی متری عبور داده شد. بعد از حذف رطوبت نمونه‌ها، کربن آلی به روش والکلی و بلک اندازه-گیری گردید (Sparks 1996; Carter & Gregorich 2008). pH (UNICAM 9455) و هدایت الکتریکی (JENWAY 4320) خاک نیز در عصاره ۱:۱ اندازه‌گیری گردید و تعیین بافت خاک به روش هیدرومتری انجام شد (Rhoades, 1996; Jia *et al.*, 2011). برای اندازه‌گیری غلظت استرهای اسید فتالیک، با کمی تغییرات در روش ژائو و همکاران (Zhao *et al.*, 2016) و هو و همکاران (Hu *et al.*, 2005)، ۵ گرم از نمونه خاک وزن شده، سپس به آن دی اکتیل آدیپات (DOA) به عنوان استاندارد داخلی اضافه گردید. در ادامه به آن ۱۰ میلی لیتر متانول اضافه

سانتریفیوژ گردید. فاز رویی به دستگاه GC-MS تزریق گردید.

آنالیز دستگاهی

اندازه‌گیری میزان فتالات‌های موجود در خاک و فتالات باقی‌مانده در کنسرسیون SA1 با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی توسط ستون DB-5 ms (J&W Scientific) انجام شد. دمای اولیه ستون در ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. سپس دما با سرعت ۳۰ درجه سلسیوس بر دقیقه تا رسیدن به دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس افزایش یافت و در ادامه افزایش دما به میزان ۵ درجه سلسیوس در هر دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۷۰ درجه سلسیوس انجام پذیرفت. دمای ستون به مدت ۵ دقیقه در همین درجه نگه داشته شد. میزان دی اتیل فتالات، دی بوتیل فتالات و دی اتیل هگزیل فتالات باقی‌مانده در کنسرسیون SA1 به طور جداگانه توسط دستگاه GC-MS مدل ۷۸۹۰ A ساخت شرکت Agilent کشور

آمریکا مجهز به آشکارساز طیف‌سنج جرمی TOF-MS/MS (Synapt G2-Si, Waters, MA, USA) تعیین شد. ستون DB-5 برای جداسازی استفاده شد. دمای محل تزریق و آشکارساز به ترتیب ۳۰۰ و ۳۴۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. شیب حرارتی دستگاه شامل: دمای اولیه آون ۷۰ درجه سلسیوس (دو دقیقه)، افزایش تا ۱۵۰ درجه با سرعت ۳۰ درجه سلسیوس بر دقیقه (بدون ایست)، افزایش تا ۲۷۰ درجه سلسیوس با سرعت ۸ درجه سلسیوس در دقیقه (بدون ایست) و سرانجام افزایش تا ۳۰۰ درجه سلسیوس با سرعت ۳۰ درجه سلسیوس در دقیقه (۳ دقیقه) می‌باشد. آنالیز MS/MS با استفاده از مد منفی و منبع یونش الکترواسپری (-ESI) با ولتاژ کاپیلاری ۱/۵ ولت، دمای منبع ۱۲۰ درجه سلسیوس، جریان و دمای گاز N₂ حلال‌زدا به ترتیب ۱۰۰۰ L/min و ۵۰ درجه سلسیوس و جریان گاز N₂ مربوط به لوله مرکزی ۵۰ L/min صورت گرفت. استرهای اسید فتالیک با m/z ۱۴۹ شناسایی شدند.

نتایج و بحث

پایش میزان آلودگی استرهای اسید فتالیک در خاک نتایج اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نشان داد، خاک دارای بافت لومی‌رسی، pH ۸/۲، هدایت الکتریکی ۰/۸۲۵ دسی‌زیمنس بر متر و ماده آلی ۱/۶۱ درصد بود. همانطور که در جدول دو مشاهده می‌شود دی

غنی‌سازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده استرهای اسید فتالیک با استفاده از محیط کشت معدنی حداقل (MSM) (Mineral salt medium) (MgSO₄ g/L, CaCl₂ 0.01 g/L, K₂HPO₄, KH₂PO₄ 4.5 g/L, (NH₂)₂ SO₄ 1 g/L, 0.1 g/L, 5.8 g/L, NaCl 1 g/L) و یک میلی‌لیتر از عناصر کم‌مصرف) و اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از استرهای اسید فتالیک و انکوباسیون صورت پذیرفت (Wen *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2016). ۵ گرم از خاک در ارلن مایر شیشه‌ای حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM و استرهای اسید فتالیک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور جداگانه اضافه گردید و به مدت ۷ روز در شرایط انکوباسیون (۳۰ درجه سلسیوس و ۱۲۰ rpm) قرار گرفت. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول قبلی به محیط کشت تازه MSM حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر استرهای اسید فتالیک اضافه گردید و گرماگذاری شد. با توجه به مشاهده رشد میکروارگانیسم‌ها، این روند تا افزایش ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استرهای اسید فتالیک تا دستیابی به یک کنسرسیون میکروبی موثر در تجزیه ادامه یافت و کنسرسیون حاصل تحت عنوان SA1 نامگذاری شد. غلظت استرهای اسید فتالیک باقی‌مانده در کنسرسیون با استفاده از دستگاه GC-MS طی دومرحله اندازه‌گیری و با شاهد (محیط کشت MSM + فتالات ولی بدون کنسرسیون میکروبی) مقایسه گردید (Wu *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2014).

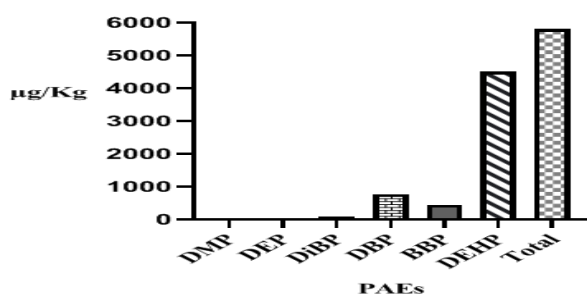
بررسی تجزیه استرهای DEP و DBP توسط کنسرسیون

SA1

به منظور بررسی توانایی کنسرسیون SA1 در تجزیه استرهای اسید فتالیک، ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور مجزا تهیه شد و ۵۰۰ میکرولیتر از کنسرسیون SA1 به هریک از ارلن‌ها اضافه شد. تیمارهای شاهد نیز شامل محیط کشت MSM و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استرهای اسید فتالیک دی اتیل فتالات، دی بوتیل فتالات و دی اتیل هگزیل فتالات بود. تیمارها در شیکر با سرعت ۱۲۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند. به منظور اندازه‌گیری غلظت باقی‌مانده استرهای اسید فتالیک، کل محتویات فلاسک‌ها با مقدار برابری از اتیل استات مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید. در مرحله بعد مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm

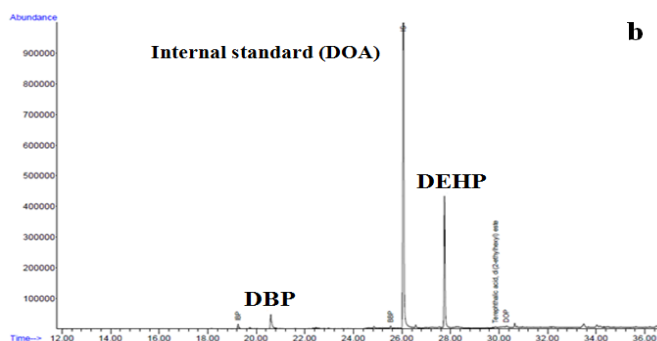
اتیل هگزیل فتالات و دی بوتیل فتالات بیشترین استرهای اسید فتالیک موجود در خاک بوده و مجموع فتالات‌های خاک آلوده نیز ۵/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بود. آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا حد مجاز دی بوتیل فتالات و دی اتیل هگزیل فتالات را در خاک به ترتیب ۰/۰۸ و ۰/۴۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعیین کرد (Liu *et al.*, 2009; He *et al.*, 2016). با توجه به این استاندارد، غلظت دی بوتیل فتالات در خاک تقریباً ۱۰ برابر استاندارد EPA و غلظت دی اتیل هگزیل فتالات ۴/۵ برابر استاندارد EPA است. ژنگ و همکاران (Zeng *et al.*, 2009) و نت و همکاران (Net *et al.*, 2015) استاندارد خطر اکولوژیک ترکیبات دی اتیل هگزیل فتالات و دی بوتیل فتالات در رسوب و خاک را به ترتیب ۱ و ۰/۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیان کردند. با توجه به مطالب بیان شده، غلظت دی اتیل هگزیل فتالات و مجموع استرهای اسید فتالیک در خاک به ترتیب ۴/۵ و ۵/۸ برابر استاندارد جهانی است. همچنین همانطور که در شکل ۱ و ۲ ملاحظه می‌شود مقدار ترکیبات دی متیل فتالات و دی اتیل فتالات بسیار کم و غیرقابل تشخیص می‌باشد. محققین بیان کردند دی متیل فتالات و دی اتیل فتالات به دلیل حلالیت بالا و ثابت تقسیم اکتانول-آب

(log Kow) پائین، کمتر در فاز جامد وجود دارند. دی بوتیل فتالات و بوتیل بنزیل فتالات حلالیت و ثابت تقسیم اکتانول-آب (log Kow) متوسط داشته و دی اتیل هگزیل فتالات و دی اکتیل فتالات به دلیل وزن مولکولی بالا، حلالیت پائین و ثابت تقسیم اکتانول-آب (log Kow) بالا بیشتر جذب بخش جامد می‌شود (Zeng *et al.*, 2008; Net *et al.*, 2015). همچنین با توجه به این که دی متیل فتالات و دی اتیل فتالات استرهای حاوی یک کربن و دو کربن در هر زنجیره هستند، به راحتی مورد استفاده میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرند. بسیاری از محققین استفاده از استرهای اسید فتالیک بویژه دی متیل فتالات و دی اتیل فتالات به عنوان منبع کربن توسط میکروارگانیسم‌ها را به اثبات رسانیده‌اند (Fang *et al.*, 2010; Benjamin *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). مطالعات بسیاری در جهان نشان داده که دی بوتیل فتالات و دی اتیل هگزیل فتالات گونه‌های اصلی استرهای اسید فتالیک در طبیعت و خاک هستند (Chai *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). همچنین دی اتیل هگزیل فتالات پرمصرف‌ترین نرم‌کننده در جهان محسوب می‌شود و بنابراین مقدار بیشتری از این آلاینده در طبیعت یافت می‌شود (Sheikh & Beg, 2019).



شکل ۱- غلظت استرهای اسید فتالیک در خاک ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)

Fig 1. Concentration of PAEs in soil ($\mu\text{g/Kg}$)



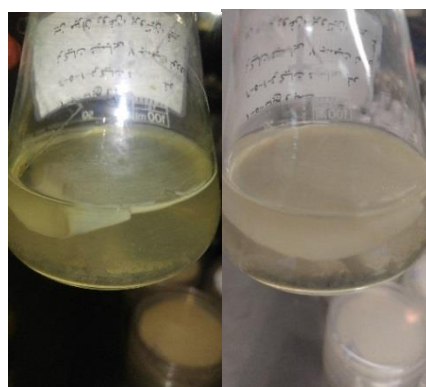
شکل ۲- کروماتوگرام‌های مربوط به وجود استرهای اسید فتالیک در خاک

Fig 2. GC-MS chromatogram related to presence of phthalic acid ester in soil

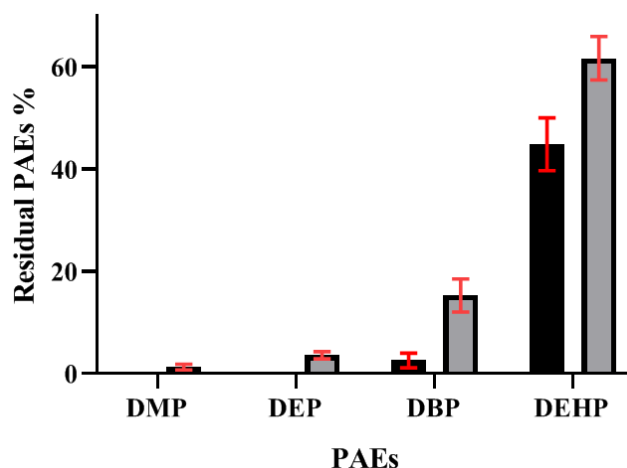
فتالیک) و کنسرسیوم SA1 غنی‌سازی شده (خاک در معرض شیرابه غنی‌سازی شده با استرهای اسید فتالیک) توسط دستگاه GC اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد میکروبیوم SA1 غنی‌سازی شده توانست ۹۸/۷، ۹۶/۴، ۸۴/۷ و ۳۸/۳ درصد به ترتیب دی‌متیل فتالات، دی‌اتیل فتالات، دی‌بوتیل فتالات و دی‌اتیل هگزیل فتالات را نسبت به شاهد مورد تجزیه قرار دهد. میزان کدورت حاصل از تجزیه استرهای اسید فتالیک در تیمار شاهد و کنسرسیوم غنی‌سازی شده به ترتیب ۰/۰۷۵ و ۱/۲۵ بود. محققین بسیاری تجزیه استرهای اسید فتالیک توسط میکروارگانسیم‌های خاک را به گزارش کردند (Wu *et al.*, 2011; Pradep *et al.*, 2015; Jun *et al.*, 2015). نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت استرهای اسید فتالیک در خاک نشان داد که غلظت دی‌متیل فتالات و دی‌اتیل فتالات کمتر از حد تشخیص دستگاه GC بود. نتایج حاصل از مرحله غنی‌سازی نیز نشان داد که این میکروارگانسیم‌ها توانستند تقریباً کل دی‌متیل فتالات و دی‌اتیل فتالات را تجزیه نمایند. لذا درصد تجزیه کمتر دی‌اتیل هگزیل فتالات نسبت به سه استر دیگر را می‌توان به دلیل بلندتر بودن طول زنجیره آلکیل این آلاینده دانست. همچنین می‌توان بیان کرد، زمانی که استرهای اسید فتالیک با وزن مولکولی پایین‌تر در محیط کشت وجود دارد، ترجیح باکتری‌ها استفاده از مواد کربنی ساده‌تر می‌باشد (Wen *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2016).

بررسی حذف استرهای اسید فتالیک توسط کنسرسیوم SA1 طی روند غنی‌سازی

به منظور اندازه‌گیری توان میکروارگانسیم‌ها در تجزیه استرهای اسید فتالیک پس از هفته چهارم انکوباسیون، میزان حذف استرهای اسید فتالیک در تیمار شاهد (بدون خاک ولی همراه استرهای اسید فتالیک) و کنسرسیوم SA1 غنی‌سازی شده (خاک در معرض شیرابه غنی‌سازی شده با استرهای اسید فتالیک) توسط دستگاه GC اندازه‌گیری شد. برخی بایوفیلیم‌های حاصل از کنسرسیوم SA1 در شکل ۳ نشان داده شده است. کروماتوگرام‌های مربوط به تجزیه استرهای اسید فتالیک در شکل ۴ ارائه شده است. میزان کدورت ایجاد شده (OD_{600}) در محیط کشت توسط کنسرسیوم SA1 ۰/۸۱ بود. با مقایسه میزان کدورت تیمار شاهد که ۰/۰۷ بود می‌توان بیان کرد در تیمار غنی‌سازی شده کدورت ایجاد شده در اثر تجزیه استرهای اسید فتالیک توسط میکروارگانسیم‌ها بوده است. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود میکروارگانسیم‌های خاک توانایی بالایی در حذف استرهای اسید فتالیک داشتند به طوری که بعد از هفته چهارم غنی‌سازی، دی‌متیل فتالات و دی‌اتیل فتالات را به طور کامل مورد مصرف قرار دادند. همچنین این کنسرسیوم توانست به ترتیب ۹۷/۵ و ۵۵ درصد دی‌بوتیل فتالات و دی‌اتیل هگزیل فتالات را تجزیه کند. در آخرین مرحله غنی‌سازی نیز میزان استرهای اسید فتالیک حذف شده در تیمار شاهد (بدون خاک ولی همراه استرهای اسید



شکل ۳- بایوفیلیم‌های جدا شده از محیط‌های غنی شده
Fig 3. Biofilms isolated from enriched media



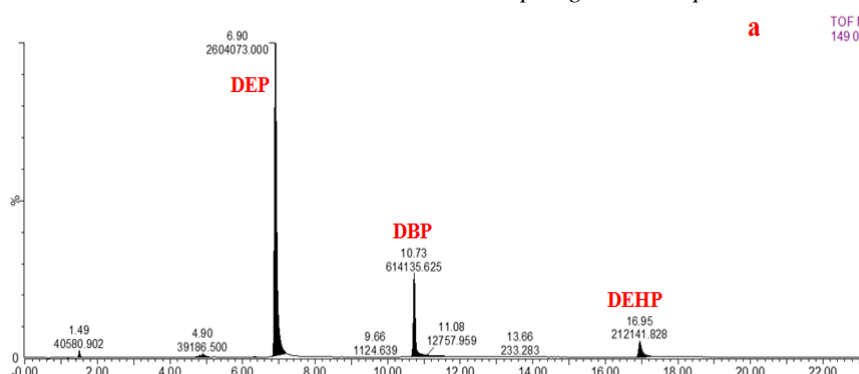
شکل ۴- درصد فتالات باقی مانده در محیط MSM حاوی کنسرسیوم

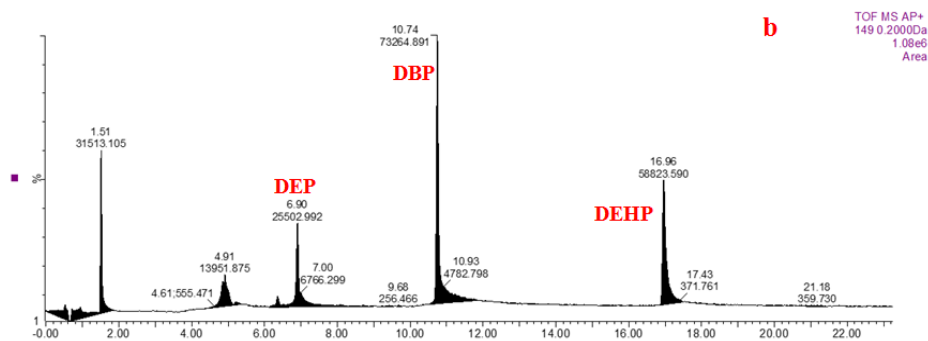
Figure 4. The amount of phthalates remaining in the MSM containing consortium

Pseudomonas و *Pseudomonas fluorescens aureofaciens* توانست ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر دی متیل فتالات را طی دو روز به طور کامل تجزیه نماید. وو و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند ترکیب سویه های *Gordonia Arthrobacter sp.* strain JDC-32 و *sp.* strain JDC-2 توانستند دی اکتیل فتالات را بعد از ۴۸ ساعت تجزیه نمایند. لی و همکاران (Li et al., 2018) کنسرسیوم میکروبی مقاوم به شوری LF با توانایی تجزیه دی اتیل هگزیل فتالات را از لجن های فعال جداسازی نمودند. این کنسرسیوم توانست ۹۳/۴۸ درصد دی اتیل هگزیل فتالات (۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH=7 بعد از ۷۲ ساعت تجزیه نماید. LF توانست ۹۱ درصد دی اتیل هگزیل فتالات را در شوری ۳-۰٪ تجزیه نماید.

تجزیه DEP و DBP توسط کنسرسیوم SA1

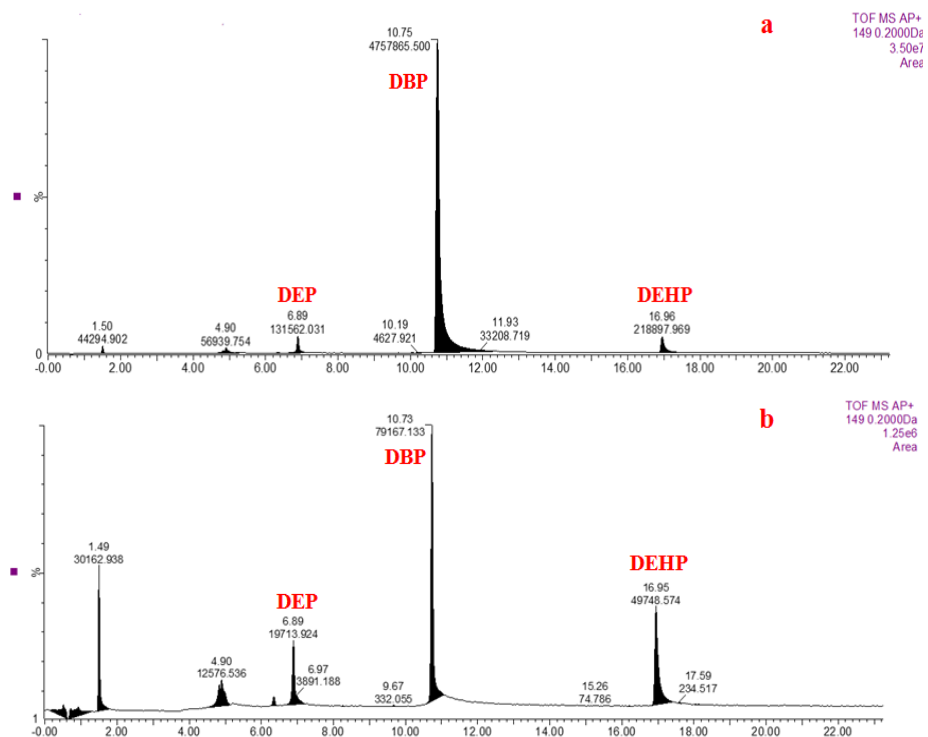
میزان تجزیه دی اتیل فتالات و دی بوتیل فتالات توسط کنسرسیوم SA1 به طور مجزا توسط دستگاه GC-MS اندازه گیری شد. کروماتوگرام های مربوط به مقدار باقی مانده استرهای اسید فتالیک در حضور کنسرسیوم SA1 در شکل های ۵ و ۶ نشان داده شده است. با توجه به نتایج می توان بیان کرد کنسرسیوم SA1 توانست به ترتیب ۹۹/۰۲ و ۹۸/۳۳ درصد کل دی اتیل فتالات و دی بوتیل فتالات با غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر را طی ۱۲۰ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس دور ۱۲۰ rpm تجزیه نماید. نتایج این پژوهش در مورد توانایی کنسرسیوم های میکروبی در تجزیه استرهای اسید فتالیک توسط سایر پژوهشگران نیز به اثبات رسیده است. وانگ و همکاران (Wang et al., 2004) بیان کردند کنسرسیوم میکروبی شامل باکتری های *Sphingomonas paucimobilis*





شکل ۵- کروماتوگرام‌های مربوط باقی‌مانده DEP در a- شاهد و b- کنسرسیوم SA1

Figure 5. Chromatograms related to remaining DEP in a-control and b- consortium SA1



شکل ۶- کروماتوگرام‌های مربوط باقی‌مانده DBP در a- شاهد و b- کنسرسیوم SA1

Figure 6. Chromatograms related to remaining DBP in a-control and b- consortium SA1

می‌شوند. همچنین استرهای اسید فتالیک با طول زنجیره کمتر مانند دی اتیل فتالات و دی بوتیل فتالات می‌توانند مستقیماً به فتالیک اسید تبدیل شوند (Liang *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2016). سپس فتالیک اسید با استفاده از دی اکسیژنازها به پروتوکتکوئیت تجزیه می‌گردد. پروتوکتکوئیت از طریق شکسته شدن پیوند اورتو یا متا به کمک آنزیم‌های شکننده حلقه‌های آروماتیک به اسیدهای آلی تبدیل شده و این اسیدها وارد چرخه تری کربوکسیلیک اسید (TCA) می‌شوند. این محصول در نهایت به دی اکسید کربن و آب تجزیه می‌شود (Gao *et al.*, 2016). با توجه به

در شکل‌های ۵ و ۶ مشاهده می‌شود که علاوه بر استر اسید فتالیک مورد نظر، غلظت سایر استرهای اسید فتالیک نیز در تیمار کنسرسیوم SA1 نسبت به شاهد کاهش یافت. محققین بیان کردند استرهای اسید فتالیک از سه طریق به Transesterification و B-oxidation, De-estrification فتالیک اسید تبدیل می‌شوند (Amir *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010). معمولاً طی فرایند De-estrification, استرهای فتالات به مونواسترها و اسید فتالیک هیدرولیز می‌شوند. فتالات‌های با وزن مولکولی بالاتر نیز از طریق B-oxidation و حذف گروه اتیل در هر مرحله به فتالیک اسید تبدیل

تجزیه استرهای اسید فتالیک از محل دفن زباله سراوان جدا شد و تجزیه این استرها توسط این کنسرسیوم مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان این کنسرسیوم توانست مخلوط استرهای اسید فتالیک دی متیل فتالات، دی اتیل فتالات، دی بوتیل فتالات و دی اتیل هگزیل فتالات با غلظت بالا (۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) را تجزیه کرده و ترتیب تجزیه بیولوژیکی این آلاینده‌ها توسط کنسرسیوم SA1 به صورت دی متیل فتالات < دی اتیل فتالات < دی بوتیل فتالات < دی اتیل هگزیل فتالات بود. همچنین این کنسرسیوم توانست بالاتر از ۹۸ درصد از دی اتیل فتالات و دی بوتیل فتالات را به صورت جداگانه تجزیه نماید. نتایج حاکی از آن است که کنسرسیوم SA1 دارای پتانسیل ارزشمندی برای تصفیه زیستی خاک‌های آلوده به فتالات است.

نتایج می‌توان بیان کرد احتمالاً تجزیه استرهای اسید فتالیک توسط کنسرسیوم SA1 از مسیر De-estrification صورت پذیرفته است. البته یافتن متابولیت‌های حاصل از تجزیه استرهای اسید فتالیک توسط کنسرسیوم SA1 و مطالعه جدایه‌های قابل کشت این کنسرسیوم با توانایی تجزیه این آلاینده‌ها نیازمند تحقیقات بیشتر بوده که در مطالعات بعدی ارائه خواهد گردید.

نتیجه گیری کلی

به دلیل وجود محل دفن زباله در جنگل‌های سراوان و حجم بالای ورودی پلاستیک به این جنگل‌ها، غلظت استرهای اسید فتالیک به ویژه دی اتیل هگزیل فتالات و دی بوتیل فتالات بالاتر از استانداردهای بین‌المللی فتالات در خاک بود. در این پژوهش کنسرسیوم میکروبی SA1 با قابلیت

References

- Amir S., Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Jouraiphy A., and El Gharous, M. 2005. Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges. *Process Biochem*, 40 (6): 2183–2190.
- Benjamin S., Predeep S., Josh M. S., Kumar S. and Masai, E. 2015. A monograph on the remediation of hazardous phthalates. *J Hazard Mater*, 298: 58–72.
- Boll M., Geiger R., Junghare M., and Schink, B. 2020. Microbial degradation of phthalates: biochemistry and environmental implications. *Environ Microbiol Rep*, 12(1):3-15.
- Boonyaroj V., Chiemchaisri C., Chiemchaisri W., Theeparaksapan S., and Yamamoto, K., 2012. Toxic organic micro-pollutants removal mechanisms in long-term operated membrane bioreactor treating municipal solid waste leachate. *Bioresour Technol*, 113: 174–180.
- Carter M. R., and Gregorich, E. G. 2008. Soil Sampling and Methods of Analysis. 2nd (Ed.) Canadian Society of Soil Science. 1224.
- Chai C., Cheng H., Ge W., Ma D., and Shi, Y. 2014. Phthalic acid esters in soils from vegetable greenhouses in Shandong Peninsula, East China. *PLoS One*, 18:9 (4):e95701.
- Chaler R., Cantón L., Vaquero M., and Grimalt, J.O. 2004. Identification and quantification of n-octyl esters of alkanic and hexanedioic acids and phthalates as urban wastewater markers in biota and sediments from estuarine areas. *J Chromatogr A*, 1046 (1–2): 203-10.
- Chen Q., Sun H.W., Wang B., and Hu G.C. 2004. Effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on microorganisms and animals in soil. *J AgroEnviron Sci*, 23(6):1156–1159.
- Chen H.L., Yao J., and Wang, F. 2013. Soil microbial and enzyme properties as affected by long-term exposure to phthalate esters. *Adv Mater Res*, 726: 3653–3656.
- Clara M., Windhofer G., Hartl, W., Braun K., Simon M., and Gans O. 2010. Occurrence of phthalates in surface runoff, untreated and treated wastewater and fate during wastewater treatment. *Chemosphere*, 78 (9):1078-84.
- Daiem M.M.A., Rivera-Utrilla J., Ocampo-Perez R., Mendez-Diaz J.D., and Sanchez-Polo M. 2012. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies — a review. *J Environ Manage*, 109: 164–178.
- Deblonde T., Cossu-Leguille C., and Hartemann P. 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *Int J Hyg Environ Health*, 214 (6): 442-448.
- European Commission. 1999. Ban of phthalates in childcare articles and toys, press release IP/99/829 10 November.

- Fu J., Pan F., Song S., Zhang L.R., Luo Y., Chen W., et al. 2013. Biodegradation of phthalic acid esters in sewage sludge by composting with pig manure and rice straw. *Environ Earth Sci*, 68 (8): 2289–2299
- Gao D.W. and Wen D.Z. 2016. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Sci Total Environ*, 541:986–1001.
- Giuliani, A., Zuccarini, M., Cichelli, A., Khan, H. and Reale, M. 2020. Critical review on the presence of phthalates in food and evidence of their biological impact. *Int J Environ Res Public Health*, 17 (5655): 1-45.
- Guo Y., Han R., Du W.T., Wu J.Y., Liu W. and Cai X.D. 2010. Effects of combined phthalate acid ester contamination on soil micro-ecology. *Res Environ Sci*, 23(11): 1410–1414.
- He L., Gielen G., Bolan N., Zhang X., Qin H., Huang H., and Wang H. 2015. Contamination and remediation of phthalic acid esters in agricultural soils in china: a review. *Agron Sustain Dev*, 35:519-534.
- He Z., Xiao H., Lu T., Min H., and Lu, Z. 2013. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by a stable bacterial consortium, HD-1, enriched from activated sludge. *Bioresour Technol*, 128: 526-532.
- Heudorf U., Mersch-Sundermann V., and Angerer J. 2007 Phthalates: Toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*, 210 (5): 623.
- Hu XY., Wen B., Zhang S., and Shan X.Q. 2005. Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia Fetida*) in artificially contaminated soils. *Ecotox Environ Safe*, 62:26–34.
- Jin D.C., Bai Z.H., Chang D.D., Hoefel D., Jin B., Wang P., et al. 2012. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by an isolated *Gordonia* sp. strain QH-11: genetic identification and degradation kinetics. *J Hazard Mater*, 221: 80–85.
- Jin D., Kong X., Li Y., Bai Z., Zhuang G., Zhuang X., and Deng Y. 2015. Biodegradation of di-n-Butyl Phthalate by *Achromobacter* sp. Isolated from Rural Domestic Wastewater. *Int J Environ Res Public Health*, 12: 13510-13522.
- Julinová, and Slavík, R. 2012. Removal of phthalates from aqueous solution by different adsorbents: a short review. *J Environ Manage*, 94 (1):13–24.
- Karimpour-Fard, M. 2019. Rehabilitation of Saravan dumpsite in Rasht, Iran: geotechnical characterization of municipal solid waste. *Int J Environ Sci Technol*, 16 (8):4419-4436.
- Kastner J., Cooper D.G., Marić M., Dodd P., and Yargeau, V. 2012. Aqueous leaching of di-2-ethylhexyl phthalate and “green” plasticizers from polyvinyl chloride. *Sci Total Environ*, 432: 357-64.
- Li F., Liu Y., Wang D., Zhang C., Yang Z., Lu S., et al. 2018. Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a halotolerant consortium LF. *PLoS ONE*, 13 (10): e0204324.
- Liu W.L., Shen C.F., Zhang Z., Zhang C.B. 2009. Distribution of phthalate esters in soil of E-waste recycling sites from Taizhou city in China. *Bull Environ Contam Toxicol*, 82 (6): 665–667.
- Ma T.T., Wu H. L., Chen L., Zhang H. B., Teng Y., and Luo, Y. M. 2015. Phthalate esters contamination in soils and vegetables of plastic film greenhouses of suburb Nanjing, China and the potential human health risk. *Environ Sci Pollut Res*, 22:12018–12028.
- Net S., Delmont A., Sempéré R., Paluselli A., and Baghdad, O. 2015a. Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environ Sci and Technol*, 49 (7): 4019-4035.
- Net S., Delmont A., Sempéré R., Paluselli A., and Baghdad, O. 2015b. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. *Sci Total Environ*, 515-516:162-180.
- Net S., Rabodonirina S., Sghaier R.B., Dumoulin D., Chbib C., Tlili I., and Ouddane B. 2015c. Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (France–Belgium). *Sci Total Environ*, 521–522: 152–159.
- Park M.A., Hwang K.A., Lee H.R., Yi B.R., Jeung E.B., and Choi K.C. 2012. Cell growth of BG-1 ovarian cancer cells is promoted by di-n-butyl phthalate and hexabromocyclododecane via upregulation of the cyclin D and cyclin-dependent kinase-4 genes. *Mol Med Rep*, 5(3): 761–766.
- Planello R., Herrero O., Martinez-Guitarte J.L., and Morcillo G. 2011. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di (2ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquat Toxicol*, 105(1–2):62–70.

- Pradeep S., Sarath M.K., Josh P., Binod R., Devi S., Balachandran S., Robin C.A. and Benjamin S. 2015. *Achromobacter denitrificans* strain SP1 efficiently remediates di (2-ethylhexyl) phthalate. *Ecotoxicol Environ Safe*, 112: 114–121.
- Ren L., Jia Y., Ruth N., Qiao C., Wang J., Zhao B., and Yan Y. 2016. Biodegradation of phthalic acid esters by a newly isolated *Mycobacterium* sp. YC-RL4 and the bioprocess with environmental samples. *Environ Sci Pollut Res*, 23:16609–16619.
- Shariatmadari N. Askari Lasaki B., Eshghinezhad H., Alidoust P. 2018. Effects of landfill leachate on mechanical behaviour of adjacent soil: a case study of Saravan Landfill, Rasht, Iran. *Int J Civi Eng*, 16:1503–1513.
- Sheikh I. A. and Beg M. A. 2019. Structural characterization of potential endocrine-disrupting activity of alternate plasticizers di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA), acetyl tributyl citrate (ATBC) and 2,2,4-trimethyl 1,3-pentanediol diisobutyrate (TPIB) with human sex hormone-binding globulin. *Rep Toxicol*, 83: 46–53.
- Sparks D. L. 1996. Method of soil Analysis. Part3. Chemical Methods. American Society of Agronomy. 1390p.
- Sun J.Q., Huang J., Zhang A.P., Liu W.P., and Cheng, W.W. 2013. Occurrence of phthalate esters in sediments in Qiantang River, China and inference with urbanization and river flow regime. *J Hazard Mater*, 248:142–149.
- Tran T.M. and Kannan K. 2015. Occurrence of phthalate diesters in particulate and vapor phases in indoor air and implications for human exposure in Albany, New York, USA. *Arch Environ Contam Toxicol*, 68: 489–499.
- Wang Y., Fan Y., and Gu J.D. 2004. Dimethyl phthalate ester degradation by two planktonic and immobilized bacterial consortia. *Int Biodeterior Biodegrad*, 53: 93–101.
- Wang J., Lv S., Zhang M., Chen G., Zhu T., Zhang S., Teng Y., Christie P., and Luo Y. 2016 Effects of plastic film residues on occurrence of phthalates and microbial activity in soils. *Chemosphere*, 151:171-1777.
- Wang J., Jiang L.H., Zhou Y., and Ye B.C. 2017a. Enhanced biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Acinetobacter species* strain LMB-5 coated with magnetic nanoparticles. *Int Biodeter Biodegr*, 116:184–190.
- Wang Y., Li F., Ruan X., Song J., Lv L., Chai L., et al. 2017b. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by bacterial consortium LV-1 enriched from river sludge. *PLoS ONE*, 12 (5): e0178213.
- Wang H., Liang H., and Gao D. 2017c. Occurrence and distribution of phthalate esters (PAEs) in wetland sediments. *J For Res*, 28 (6):1241–1248.
- Wen Z.D., Gao D.W., and Wu W.M. 2014. Biodegradation and kinetic analysis of phthalates by an *Arthrobacter* strain isolated from constructed wetland soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98:4683–4690.
- Wu X.L., Liang R.X., Dai Q.Y., Jin D.C., Wang Y.Y., and Chao W.L. 2010. Complete degradation of di-n-octyl phthalate by biochemical cooperation between *Gordonia* sp. strain JDC-2 and *Arthrobacter* sp. strain JDC-32 isolated from activated sludge. *J Hazard Mater*, 176 (1–3): 262–268.
- Wu X.L., Wang Y.Y., Liang R.X., Dai Q.Y., Jin D.C. and Chao W.L. 2011. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-n-butyl phthalate by newly isolated *Agrobacterium* sp. and the biochemical pathway. *Process Biochem*, 46 (5):1090–1094.
- Xu, W., You, Y., Wang, Z., Chen, W., Zeng, J, Zhao, X. and & Su, Y. 2018. Dibutyl phthalate alters the metabolic pathways of microbes in black soils. *Sci Rep*, 8 (2605): 1-13.
- Zeng F., Wen J., Cui K., Wu L., Liu M., Li Y., et al. 2009. Seasonal distribution of phthalate esters in surface water of the urban lakes in the subtropical city, Guangzhou, China. *J Hazard Mater*, 169 (1-3): 719-725.
- Zhao H.M., Du H., Lin J., Chen X.B., Li Y.W., Li H., Cai Q.Y., Mo C.H., Qin H.M., and Wong, M.H. 2016. Complete degradation of the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Agromyces* sp. MT-O strain and its application to bioremediation of contaminated soil. *Sci Total Environ*, 562: 170–178.
- Zhao H.M., Hu R.W., Chen X.X., Chen X.B., Lü H., Li Y.W., Li H., Mo C.H., Cai Q.Y. Wong M.H. 2018. Biodegradation pathway of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Rhodococcus pyridinivorans* XB and its bioaugmentation for remediation of DEHP contaminated soil. *Sci Total Environ*, 640 (641):1121-1131.

Degradation of Phthalic Acid Esters by the Microbial Consortium Isolated from a Contaminated Soil

Shayan Shariati¹, Ahmad Ali Pourbabaei^{*2}, Hossein Ali Alikhani³, Keramatollah Rezaei⁴

(Received: December 2020 Accepted: March 2021)

Abstract

Phthalic acid esters are synthetic compounds used as emollients in polymer and plastic compounds. The entry of these compounds into the environment and the human food cycle and the development of a variety of cancers has raised global concerns. The purpose of this research was to investigate the concentration of phthalic acid esters (PAEs) in the soil exposed to the leachate (landfill) and finding a microbial consortium capable of the degradation of these pollutants. The concentration of phthalic acid esters in the soil was measured by the ultrasonic method and GC-MS. The results showed that the concentration of diethyl hexyl phthalate (DEHP) in soil (4.52 mg kg^{-1}) was 6 times that of its international standard (0.7 mg kg^{-1}). Microbial enrichment was performed in a mineral salt medium containing phthalic acid esters (30°C and 120 rpm) and a microbial consortium capable of degrading phthalic acid esters was isolated. To investigate the biodegradation of phthalic acid esters by consortium, the residual phthalate concentration was extracted with ethyl acetate and measured by GC-MS. The results showed that this consortium was able to degrade more than 96% of low molecular weight phthalates of dimethyl phthalate, diethyl phthalate and dibutyl phthalate (medium molecular weight phthalate) (30°C and 120 rpm). In the case of DEHP (the world's most widely used plasticizer), the consortium was able to degrade it by 55% at 400 mg l^{-1} . Besides, phthalic acid esters separately were degraded almost completely by this consortium (5 days incubation, 30°C , 120 rpm). Our results demonstrate the biodegradation of phthalic acid esters by this consortium and recommend its use for bioremediation of phthalates in contaminated soils.

Keywords: Bioremediation, Leachate, Phthalate, Plasticizers

Shariati SH., R., Pourbabaei A.A., Alikhani HA., Rezaei K. 2022. Degradation of phthalic acid esters by the microbial consortium isolated from a contaminated soil. *Applied Soil Research*, 10(2): 1-13.

1. Postdoc researcher, Department of Soil Science Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Professor, Department of Soil Science Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Professor, Department of Soil Science Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Professor, Department of Food Science, Engineering, and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran

* Corresponding Author Email: hpourbabaei@gmail.com