FANPAYA
Knowledge Based Company
(PUBLISHERS)

Journal of Environmental Sciences Studies (JESS)
Volume 10, Number 4, Winter (2026)

Journal Homepage: www.jess.ir
Print ISSN: 2588-6851 Online ISSN: 2645-520X

Investigation of phenanthrene and pyrene removal efficiency by genetically engineered Pseudomonas putida deoxygenase enzyme-producing biofilm bioreactor

Maryam ahankoub[1*]; Gashtasb Mardani Korani[2]; Elham Asadi[3]

[*]1. Department of geology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center, Basic Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
3. Basic Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

[*]Email Address: m.ahankoub@pnu.ac.ir

Article Info

Article Type:
Research Paper

Article History:

Received Date:
2024/07/17
Revised Date:
2024/07/31
Accepted Date:
2024/08/04
Published Date:
2026/01/27

Keywords:
aromatic substances,
bioreactor,
Pseudomonas putida,
genetic engineering.

ABSTRACT

Today, the environmental pollution by cyclic aromatic substances has led to serious problems due to the use of these substances in different sectors. Phenanthrene and pyrene are belonging to this group of substances that cause abnormal effects on the environment and the health of organisms. The high cost and technical problems of the usual methods to remove these cyclic toxins have led to the use of biological methods by engineered bacteria as an economical and environmentally friendly option. In order to perform this test, 36 bioreactors were built with plastic media bed with inoculation broth lactose culture medium solution, 18 bioreactors had genetically engineered bacteria and 18 bioreactors had non-genetically engineered bacteria. Then pyrene and phenanthrene aromatic substances were added with different concentrations. (10, 50, and 100 ppm) were added to the bioreactors. During the addition of the above solutions, the pH of each bioreactor was adjusted to normal with the help of sodium hydroxide and 0.1 hydrochloric acid, so that the bioreactors had 3 different pH 3, 7, and 9. Finally, the residual concentrations of pyrene and phenanthrene aromatic substances were measured by liquid chromatography (HPLC). The results of this research show that there is a significant difference between the efficiency of removing aromatic substances by two groups of engineered and non-engineered Pseudomonas putida bacteria, and the biodegradation of phenanthrene and pyrene by the bioreactor containing the genetically engineered Pseudomonas putida bacteria is much higher than the non-engineered Pseudomonas putida bacteria. Therefore, this bacterium can be used in the biological degradation of different concentrations of the above pollutants and cleaning the environment.

Cite this article: Maryam ahankoub , Gashtasb Mardani Korani , Elham Asadi (2026) Investigation of phenanthrene and pyrene removal efficiency by genetically engineered Pseudomonas putida deoxygenase enzyme-producing biofilm bioreactor , Journal of Environmental Sciences Studies, 10(4) , Pages 10807-10823.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Purification and purification of water contaminated with hydrocarbon substances such as phenanthrene and pyrene is very important due to its dependence on the food cycle. So far, various methods have been used to remove these types of pollutants, each of which has several strengths and weaknesses. The presence of such aromatic compounds in drinking water should be considered in terms of pathogenicity, taste, smell and effect on the appearance of water. Phenanthrene and pyrene are cyclic organic compounds that cause negative and adverse effects on the ecosystem in such a way that even in low concentrations they can be harmful to human health and most of these compounds are toxic, genotoxic and carcinogenic. Therefore, these compounds should be removed from water. Removing organic pollutants from water is an important issue in the industrial field. Considering the importance and high efficiency of bioreactors for the removal of cyclic organic compounds in this research, we have investigated the removal of cyclic organic compounds by constructing an innovative bioreactor, genetically engineered Pseudomonas putida biofilm media from polluted water.

Materials and methods

In this research, to investigate the biofilm performance of two genetically engineered Pseudomonas putida producing deoxygenase enzyme and non-genetically engineered Pseudomonas putida in removing aromatic substances phenanthrene and pyrene, first 36 bioreactors were constructed with plastic media substrate inoculated with lactose broth culture medium solution. 18 bioreactors had genetically engineered bacteria and 18 bioreactors had non-genetically engineered bacteria. Then pyrene and phenanthrene aromatic substances were made with different concentrations (10, 50, and 100 ppm) and added to the bioreactors. In other words, a total of 72 samples were tested. During the addition of the above solutions, the pH of each bioreactor was adjusted to 0.1 normal with the help of sodium hydroxide and hydrochloric acid, so that the bioreactors had 3 different pH values of 3, 7, and 9. Then, the residual concentrations of pyrene and phenanthrene aromatic substances were measured by liquid chromatography (HPLC). Finally, the obtained results were analyzed by statistical studies and the mean and standard deviation values were obtained. Also, independent t-tests, analysis of covariance, one-way and two-way analysis of variance, analysis of repeated measures were used in version 25 of SPSS software.

Discussion

After the cloning of the NahH gene in the PUC18 vector, which was confirmed by the BamHI and EcoRI restriction enzymes, the recombinant plasmids extracted from E. Coli were examined using the PCR method with the help of the HindIII enzyme. The transfer was well to P. putida and then the presence of NahH gene of 924 bp in P. putida was confirmed by PCR. It was observed that the bioreactor containing genetically engineered bacteria, after 8 weeks, produced phenanthrene and pyrene in three concentrations of 50, 10 and 100 mg/liter, on average, in the amount of 94.417, 65.99, and 72/417 respectively. 33 and 45.93, 62.93, 33.54 percent were destroyed. This is while these values were 93.41, 57.72, 17.44 and 92.992, 57.89, 17.75% for the non-engineered bacterial biofilm of Pseudomonas putida, respectively (Tables 8 and 9). In Table 10 and 11, the data related to the comparison of pyrene removal efficiency in engineered and non-engineered bacteria by different concentrations, comparison of removal efficiency between two bacteria by different concentration and pH are given. the percentage of phenanthrene and pyrene removal efficiency is shown in concentrations. The removal efficiency at the concentration of 10, 50 and 100 is different between two bacteria and a significant difference is observed between the removal efficiency of the groups. Therefore, investigating the transformed forms of the recombinant vector (PUC18-nahH), P. Putida with genetic engineering produced through the biosynthesis of catechol 2,3-dioxygenase enzyme for the biological degradation of phenanthrene and pyrene aromatic substances inoculated in the aqueous environment with different acidic, basic and alkaline pH and with three different concentrations of these pollutants in comparison with the non-engineered strain of this bacterium,

Conclusion

Investigating the amount of degradation and removal of phenanthrene and pyrene pollutants by the modified forms of the recombinant vector (PUC18-nahH), P. Putida with genetic engineering show that a significant difference is observed between the efficiency of removing aromatic substances by two groups of engineered and non-engineered Pseudomonas putida bacteria. Therefore, with proper planning in various industries containing these pollutants, the studied engineered forms can be used in the destruction and removal of various concentrations of the mentioned pollutants in order to have a healthier environment.

مجله مطالعات علوم محیط زیست
جلد ۱۰، شماره ۴
Journal Homepage:www.jess.ir
شاپای چاپی: 2588-6851 شاپای الکترونیکی: 2645-520X

FANPAYA
Knowledge Based Company
(PUBLISHERS)

بررسی کارایی حذف فنانترن و پایرن توسط بیوراکتور نوآورانه بیوفیلم مولد آنزیم دی اکسیژناز سودوموناس پوتیدا مهندسی ژنتیک شده

مریم آهنکوب [۱*]، گشتاسب مردانی کرانی [۲]، الهام اسدی [۳]

*۱- گروه زمین شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳- پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
*ایمیل نویسنده مسئول: m.ahankoub@pnu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله علمی پژوهشی

تاریخ دریافت:
۱۴۰۳/۰۴/۲۷
تاریخ بازنگری:
۱۴۰۳/۰۵/۱۰
تاریخ پذیرش:
۱۴۰۳/۰۵/۱۴
تاریخ انتشار:
۱۴۰۴/۱۱/۰۷

کلید واژه ها:
فنانترن،
پایرن،
بیوراکتور،
سودوموناس پوتیدا،
مهندسی ژنتیک شده.

چکیده

امروزه آلودگی محیط زیست به مواد آروماتیک حلقوی بواسطه استفاده این مواد در صنایع مختلف منجر به مشکلات جدی شده‌است. فنانترن و پایرن از جمله این گروه مواد بوده که اثرات نابهنجاری بر محیط زیست و سلامتی موجودات ایجاد می‌کنند. صرف هزینه زیاد و معضلات تکنیکی روش‌های معمول برای حذف این ترکیبات حلقوی منجر به استفاده از روش‌های بیولوژیک توسط باکتری‌های مهندسی شده، به عنوان گزینه‌ای اقتصادی و سازگار با محیط زیست شده‌است. برای انجام این آزمایش، در ابتدا ۳۶ بیوراکتور با بستر مدیا پلاستیکی با محلول محیط کشت لاکتوز براث تلقیح، ساخته‌شد که ۱۸ بیوراکتور دارای باکتری مهندسی ژنتیکی شده و ۱۸ بیوراکتور دارای باکتری مهندسی ژنتیکی نشده‌بودند. سپس مواد آروماتیک پایرن و فنانترن با غلظت‌های مختلف (۱۰و۵۰ و۱۰۰ ppm) به بیوراکتورها اضافه شدند.در طی اضافه شدن محلولهای فوق pH هر بیوراکتور به کمک سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید۱/۰ نرمال تنظیم شد به طوری که بیوراکتورها دارای pH ۳ مختلف ۳و ۷و ۹ بودند. در آخر مقادیر غلظت باقی‌مانده مواد آروماتیک پایرن و فنانترن توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) اندازه‌گیری‌شد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد بین راندمان حذف مواد آروماتیک توسط دو گروه باکتری مهندسی و غیر مهندسی سودوموناس پوتیدا تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود و تخریب زیستی فنانترن و پایرن توسط بیوراکتور حاوی باکتری مهندسی ژنتیکی شده سودوموناس پوتیدا بسیار بیشتر از باکتری غیر مهندسی شده سودوموناس پوتیدا می‌باشد. بنابراین می‌توان ازاین باکتری در تخریب زیستی غلظت‌های متفاوت آلاینده‌های فوق و پاکسازی محیط زیست استفاده کرد.

ناشر: انتشارات فن پایا

DOI: 10.22034/jess.2024.468225.2274

۱-مقدمه

تصفیه و پاکسازی آب‌های آلوده به مواد هیدروکربنی همچون فنانترن و پایرن به دلیل وابستگی با چرخه غذایی امری بسیار با اهمیت است. تاکنون روش‌های متنوعی برای حذف این نوع آلاینده‌ها بکار برده شده است که هریک دارای نقاط قوت و ضعف متعددی هستند. وجود چنین ترکیبات آروماتیکی در آب آشامیدنی از نظر بیماریزایی، ایجاد طعم، بو و تاثیر بر خصوصیات ظاهری آب نیز باید مورد توجه قرارگیرد. فنانترن و پایرن جزء ترکیبات آلی حلقوی هستند که اثرات منفی و نامطلوبی بروی اکوسیستم ایجاد می‌نماید به نحوی که حتی در غلظت‌های پایین می‌توانند برای سلامت انسان‌ها مضر باشند و اغلب این ترکیبات سمی، ژنوتوکسیک و سرطانزا هستند. بنابراین بایستی این ترکیبات از آب حذف شوند. امروزه پیشرفت‌های علمی در علوم زیست‌شناسی و مهندسی ژنتیک و کاربرد بیوفیلم‌های کاتالیزورهای زیستی در فرآیندهای تبدیل زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Sandhya and et al., 2022) و منجر به استفاده سویه‌های میکروبی دستکاری شده ژنتیکی برای پاکسازی زیستی طیف وسیعی از آلاینده‌های معدنی و آلی در خاک و محیطهای آبی شده‌است. این سویه‌ها از طریق تکنیک DNA نوترکیب حاصل می‌شوند که منجر به ایجاد بستر مناسب برای بیان ژن‌های مطلوب تولید کننده آنزیم‌هایی تجزیه کننده آلاینده‌ها می‌باشند(Bhatt etal., 2021). در میان آنزیم‌های مورد استفاده در تجزیه زیستی آلاینده‌ها، کاتکول و مشتقات آن می‌توانند حلقه آروماتیکی ترکیبات آروماتیک را تخریب نمایند. این حلقه‌ها بین دو گروه هیدروکسیل (در مسیر ارتو) یا نزدیک به یکی از گروه‌های هیدروکسیل (در مسیر متا) قرار دارند. آنزیم کاتکول ۲،۳- دی‌اکسیژناز همچنین می‌تواند ترکیبات آروماتیک آلکیل را تجزیه کند(Poblete-Castro et al., 2017; Liu et al., 2019). آب آلوده حاصل از صنایع، به طور قابل توجهی حاوی هیدروکربن‌های آلی همانند بنزن، تولوئن، فنانترن، اتیل بنزن، گزیلن (BTEX) هستند. ترکیبات آلی حل شده باعث رشد باکتری، تولید بو و رسوب زیستی خواهد بود که استفاده مجدد از آن را محدود می‌کند (Kivisaar, 2020). حذف آلاینده‌های آلی از آب در حوزه صنعتی یک امر مهم است. در عین اینکه آب آلوده از مواد آلی پاکسازی می‌شود، قابلیت بازیافت و استفاده مجدد از مواد نیز امکانپذیر خواهدشد. چالش اصلی، تشخیص، تجزیه و حذف آلاینده‌هایی است که معمولاً در غلظت‌های پایین وجود دارند (Kumar and et al., 2019). برای این منظور، انواع مختلفی از مواد جاذب جهت حذف این آلاینده‌ها تا به امروز مورد استفاده قرارگرفته‌است (Cycoń and Wójcik, 2009). گرچه استفاده از موادی همچون زئولیت‌ها، لاستیک بوتیل، پلی‌پروپیلن و الیاف پنبه آبگریز و کربن فعال شده از روش های دفع آلاینده‌ها به شمار می‌رود ولیکن استفاده ازروش های جایگزین جهت تجزیه آلاینده‌های آلی بسیار مورد توجه است به طوریکه اخیراً با ظهور فناوری نانو، بسیاری مواد دیگر مثل نانوتیوب‌های کربنی، نانوذرات فلزی، نانوساختارهای متخلخل و سیکلودکسترین‌ها به لیست جاذب‌ها اضافه شده‌است (Amiri and et al., 2022; Zhang and et al.,2020; Ichiura and et al., 2003; Gui nd et al., 2010; Parkand et al., 2009; Meglio and et al., 2020; Digioia and et al., 2009; Holden and et al., 1997; Juang and et al.,2007). با توجه به اهمیت و کارایی بالای بیوراکتورها برای حذف ترکیبات آلی حلقوی در این پژوهش،به بررسی حذف ترکیبات آلی حلقوی توسط ساخت بیورآکتورابداعی، مدیا بیوفیلم سودوموناس پوتیدای مهندسی ژنتیکی شده از آب آلوده پرداخته‌ایم.

۲-روش انجام تحقیق

در این تحقیق برای بررسی عملکرد بیوفیلم دو باکتری سودوموناس پوتیدا مهندسی ژنتیکی شده تولیدکننده آنزیم دی‌اکسیژناز و باکتری مهندسی ژنتیکی‌نشده باکتری سودوموناس پوتیدا در حذف مواد آروماتیک فنانترن و پایرن ابتدا ۳۶ بیوراکتور با بستر مدیا پلاستیکی با محلول محیط کشت لاکتوز براث تلقیح شده، ساخته شد. ۱۸ بیوراکتور دارای باکتری مهندسی ژنتیکی شده و ۱۸ بیوراکتور دارای باکتری مهندسی ژنتیکی نشده بودند.سپس مواد آروماتیک پایرن و فنانترن با غلظت‌های مختلف (۱۰و۵۰ و۱۰۰ ppm) ساخته شد و به بیوراکتورها اضافه شدند.به عبارتی مجموع ۷۲ نمونه مورد آزمایش قرار گرفتند. درطی اضافه شدن محلولهای فوق pH هر بیوراکتور به کمک سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید۱/۰ نرمال تنظیم شد به طوری که بیوراکتورها دارای ۳ pH مختلف ۳و ۷و ۹ بودند. سپس مقادیر غلظت باقی‌مانده مواد آروماتیک پایرن و فنانترن توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) اندازه‌گیری شد. در نهایت نتایج بدست آمده توسط مطالعات آماری بررسی شده و مقادیر میانگین و انحراف معیار بدست آمد. همچنین از آزمونهای تی مستقل، انالیز کوواریانس، تحلیل واریانس یکطرفه و دو طرفه، تحلیل اندازه های تکراری در نسخه ۲۵ نرم افزار SPSS استفاده شد.

- **کشت باکتریایی**

در ابتدا استوک لیوفیلیزه اشریشیاکلی TOP10F و P. Putida ATCC12633 از موسسه پاستور ایران تهیه شد. این باکتری‌ها به ترتیب در محیط Luria-Bertani (LB) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ و ۲۶ درجه سانتیگراد کشت داده‌شدند. برای ارزیابی مقاومت این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها،E. Coli و P. putida در یک محیط آگار حاوی آمپی سیلین (۵۰-۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) یا کانامایسین (۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) کشت داده‌شدند. نتایج دال بر عدم مقاومت E. Coli در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت P. putida در مقابل آمپی‌سیلین می‌باشد.

- **استخراجDNA سودوموناس پوتیدا**

برای بدست آوردن رسوب باکتریایی، سودوموناس P. Putida ابتدا در ۵ میلی‌لیتر محیط کشتLuria Bertani در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده‌شد و سپس در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب باکتریایی با ۱۲۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط وبه مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت و در نهایت، برای استخراج DNA در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن، عمق نوری DNA استخراج شده توسط دستگاه طیف‌سنج در طول موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی شد و سپس در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

- **تکثیر ژنNahH**

ابتدا توالی DNA ژن NahH درون پلاسمید NAH7 از وب سایت NCBI به دست آمد. سپس از نرم‌افزارهای Oligo Primer Analysis Software v.7و Gene Runner v.3.05 برای طراحی پرایمرها استفاده شد. کارایی اتصال آغازگرها به ژن هدف توسط نرم افزار DNASTAR Lasergene software v.10 و ابزار جستجوی BLAST در پایگاه داده GenBank تأیید شد. توالی آغازگرها و طول قطعه تقویت شده در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر جهت تقویت ژن مورد نظر شامل ۱ گرم DNA، 0.25 میکرومولار از هر آغازگر، مخلوط 200) dNTP میکرومولار) ، X۱۰ بافر 2.5) PCR میکرولیتر) و ۱ واحد Taq DNA پلیمراز بود. برنامه PCR اعمال شده نیز در جدول ۲ ارائه شده‌است. برای تأیید تکثیر ژن NahH، الکتروفورز در ۸۰ ولت و به مدت ۳۰ دقیقه، با استفاده از ۶ میکرولیتر محصولات PCR و یک نردبان DNA 1kb روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد. معرف‌ها به استثنای DNA و شامل ۲ میکرولیتر آب دیونیزه استریل نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس از اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی ژل استفاده شد و سپس توسط سیستم مستندات ژل UVIdoc مورد بررسی و تصویربرداری قرار گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن ها.

cgcagaattcatgaacaaaggtgtaatgcgccccggccacgtgcaactgcgtgtactggacatgggcaaggccttggaacactacgtcgag ttgcttggcctgatcgagatggatcgtgacgaccaaggccgtgtctatctgaaggcctggactgaggttgacaaattctccgtggtgctgcgc gaagccgatgagccaggtatggatttttatgggtttcaaggtggtcgacgaagatagtctaaatcgcctcacggatgacctgctcaactttggc tgtctgatagaaaacgtcgccgcaggagaactcaaagggtgtggtcgccgcgtgcgcttccaggccccctctgggcatcacttcgagttgtat gctgacaaggaatacactggaaaatggggtgtgagtgaggtcaatcccgaggcttggccgcgcgatctgaaaggtatggcggcggtgcgtt ttgatcattgcctgctatatggtgacgaactacaagccacttatgagttgtttaccgaggtgctcggcttttacctggccgagcaagtggtcgat gccgacggtatacgcctggcccagtttctaagcttgtcgaccaaggcccacgatgtggcttttatccatcatgcggagaagggcaagttccat catgcctcattcttcctcgatacctgggaggatgtgttgcgcgctgccgacctgatcagcatgaccgacacctcgatcgatatcggcccgacc aggcacggcctgactcagggcaagaccatttatttcttcgacccgtccggcaaccgctgcgaggtgttctgcggcgggaattacaactatccg gatcataagccggtgacttggttggccaaggatgtgggcaaggcgatcttctatcacgaccgggtgctcaacgaacgattcatgaccgttatg acctaaggatcctgtg
F-EcoRI-NAH7: CGCAGAATTCATGAACAAAGGTGTAAT
R-BamHI-NAH7: CACAGGATCCTTAGGTCATAACGGTCA

جدول ۲. مراحل و شرایط آمپلی فیکشن ژن توسط PCR

Number of cycles	Stage	Temprature	Time
1 cycle	First denaturation	94°c	**5 min**
32 cycles	Denaturation	95°c	**50 s**
	Annealing	62°c	**50 s**
	Extention	72°c	**50 s**
	Final extention	72°c	**5 min**

- **آماده‌سازی وکتور نوترکیب:**

وکتور PUC18 توسط ThermoFisher Scientific (آلمان) تهیه شده است. توالی پلاسمید PUC18 از وب سایت Addgene به دست آمد و سایت‌های آنزیم محدود کننده توسط نرم‌افزار DNASTAR® Lasergene 10 شناسایی شد.

- **انتقال وکتور نوترکیب:**

وکتور نوترکیب PUC18 -nahH با استفاده از کیت Ins TAclone PCR Cloning Kit به باکتری E. Coli TOP10F منتقل شد. سپس پلاسمید توسط کیت GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas، آلمان) از سلولهای باکتریایی استخراج شد. پس از تأیید تغییر شکل وکتورنوترکیب با آنزیم HMIII و PCR، به باکتری P. Putida منتقل شد که در محیط حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آمپی سیلین کشت داده شد. پس از خالص سازی پلاسمید از باکتریهای P. Putida مهندسی و غیرمهندسی، از PCR برای تأیید حضور ناقل نوترکیب در باکتریها استفاده شد.

- **کشت باکتری سودوموناس پوتیدا:**

باکتریهای P.Putida مهندسی و غیرمهندسی در ارلن مایر ۱۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت لاکتوز، در دستگاه انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس تراکم نوری کشت‌های باکتریایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از آن باکتری‌های سودوموناس پوتیدا با تراکم سلولی ۱۰۸×۸ to 1.2×109 CFU/ml به خاک تلقیح شد. باکتری‌ها درفالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعدی هر رسوب باکتریایی در حجم مساوی محلول نمکی ایزوتونیک حاوی ۰٫۹٪ NaCl حل شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر املاح باکتریایی به هر ظرف اضافه شد. طرح آزمایشی ظروف مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳: طرح آزمایشی برای تجزیه مواد آروماتیک فنانترن و پایرن

Number	Characteristics
1	Ps.GEMS pH: 3 C: 10 ppm phenantren
2	Ps.GEMS pH: 7 C: 10 ppm phenantren
3	Ps.GEMS pH: 10 C: 10 ppm phenantren
4	Ps.GEMS pH: 3 C: 50 ppm phenantre
5	Ps.GEMS pH : 7 C: 50 ppm phenantren
6	Ps.GEMS pH: 10 C: 50 ppm phenantren
7	Ps.GEMS pH: 3 C: 100 ppm phenantren
8	Ps.GEMS pH: 7 C: 100 ppm phenantren
9	Ps.GEMS pH: 10 C: 100 ppm phenantren
10	Ps.wild pH: 3 C: 10 ppm phenantren
11	Ps.wild pH: 7 C: 10 ppm phenantren
12	Ps.wild pH: 10 C: 10 ppm phenantren
13	Ps.wild pH: 3 C: 50 ppm phenantren
14	Ps.wild pH:7 C: 50 ppm phenantren
15	Ps.wild pH: 10 C: 50 ppm phenantren
16	Ps.wild pH: 3 C: 100 ppm phenantren
17	Ps.wild pH : 7 C: 100 ppm phenantren
18	Ps.wild pH: 10 C: 100 ppm phenantren
19	Ps.GEMS pH: 3 C: 10 ppm Payren
20	Ps.GEMS pH: 7 C: 10 ppm Payren
21	Ps.GEMS pH: 10 C: 10 ppm Payren
22	Ps.GEMS pH :3 C : 50 ppm Payren
23	Ps.GEMS pH: 7 C: 50 ppm Payren
24	Ps.GEMS pH: 10 C: 50 ppm Payren
25	Ps.GEMS pH: 3 C: 100 ppm Payren
26	Ps.GEMS pH: 7 C : 100 ppm Payren
27	Ps.wild pH: 10 C: 100 ppm Payren
28	Ps.wild pH: 3 C: 10 ppm Payren
29	Ps.wild pH: 7 C: 10 ppm Payren
30	Ps.wild pH: 10 C :10 ppm Payren
31	Ps.wild pH: 3 C : 50 ppm Payren
32	Ps.wild pH : 7 C : 50 ppm Payren
33	Ps.wild pH:10 C: 50 ppm Payren
34	Ps.wild pH: 3 C : 100 ppm Payren
35	Ps.wild pH: 7 C: 100 ppm Payren
36	Ps.wild pH: 10 C :100 ppm Payren

- **ساخت و بهره‌برداری از بیوراکتور:**

در این مقاله یک بیوراکتور بسترشناور با حجم حدود ۴ لیتر)۵۰ cm ارتفاع و ۱۰ cm قطر ساخته شد و از پکینگ مدیای پلی‌اتیلنی جهت فراهم آوردن بستر مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها استفاده شد و مراحل بدین صورت انجام گرفت: الف) مرحله اول: مدت زمان این مرحله ۲۰ روز بود که ابتدا ۵۰۰ میلی‌لیتر از هرکدام ازمحیط کشت‌های لاکتوز حاوی باکتری‌های مهندسی ژنتیکی شده و ژنتیکی نشده سودموناس پوتیدا هستند را وارد راکتورکرده و به مدت ۱۰ روز با سرم قندی این باکتری‌ها تغذیه شدند. پس از ۱۰ روز اول ۱۸مدیا پلی اتیلنی وارد راکتور شدند تا در ۱۰ روز دوم بیوفیلم مورد نیاز تشکیل شود. ب) در مرحله دوم اندازه‌گیری میزان غلظت و حذف آروماتیک‌هاصورت گرفت. بدین صورتکه ابتدا محلول مادر با غلظت ۱۰۰۰ ppm از هر کدام از آروماتیک‌ها تهیه شد. سپس محلول‌های سنتتیک فنانترن و پایرن با غلظت‌های متفاوت ppm۱۰،۵۰،۱۰۰ از محلول مادرتهیه شد و به بیوراکتور اضافه شد. برای تهیه محلول‌ها فوق با غلظت‌های ذکر شده ابتدا مقدار مشخصی از محلول مادر با آب مقطر به حجم رسانده شد. جهت تنظیم pH از محلول‌های ۰/۱ مولار هیدروکلریک اسید و ۰/۱ مولار سدیم هیدروکسید استفاده شده و سه pH مختلف ۳،۷،۱۰ برای هرکدام از محلول‌ها به دست آمد. سپس هفته‌ای یکبار نمونه به حجم ۲ میلی‌لیتر از پورت خروجی در فالکون جمع‌آوری شده و توسط فیلتر سلولزی، فیلتر شدند. جهت تعیین میزان غلظت باقی‌مانده ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد(جدول ۴).

جدول ۴. مراحل برداشت با توجه به PH و زمان

Bioreactor Pyren mg/l																			
Row	Ps GEMs									Ps Wild									Date
	Concentrations									Concentrations									
	C10			C50			C100			C10			C50			C100			
	pH			pH			pH			pH			pH			pH			
	3	7	10	3	7	10	3	7	10	3	7	10	3	7	10	3	7	10	
1	8.84	8.14	8.71	47.81	46.57	47.24	96.34	94.35	95.41	9.11	8.97	9.05	47.24	46.22	47.05	96.21	95.56	95.87	3/4/1402
	8.65	7.91	8.22	47.83	46.55	47.35	97.12	94.56	96.34	9.25	8.66	8.95	48.65	47.35	47.87	97.66	96.55	96.94	
2	8.43	7.95	8.65	47.26	45.37	46.98	97.02	94.05	96.22	8.97	8.21	8.76	47.95	46.14	47.11	96.56	95.43	95.75	10/4/1402
	8.45	7.74	8.69	48.25	45.11	46.85	96.88	93.95	95.98	8.95	8.25	8.85	47.03	46.25	47.42	96.27	95.04	95.81	
3	8.05	6.45	7.91	46.58	44.15	45.96	95.94	93.87	94.98	8.96	7.95	8.54	47.01	46.21	46.97	96.12	95.01	95.72	17/4/1402
	8.01	6.43	7.85	46.55	44.04	45.97	95.96	93.82	94.93	8.91	7.89	8.47	46.98	46.35	46.85	95.97	94.88	95.67	

- **آنالیز HPLC :**

محلول‌های استاندارد مورد استفاده در آنالیز HPLC برای اندازه‌گیری فنانترن و پایرن دارای غلظت متوالی ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر هستند (جدول ۵). منحنی کالیبراسیون مواد آروماتیک فنانترن و پایرن به ترتیب با ضریب همبستگی۰/۹۹۹۵۴ و ۰/۹۹۹۹۴ ساخته شده‌است (شکل ۱،۲). لازم به ذکر است فاز متحرک HPLC حاوی ۸۰٪ استونیتریل و ۲۰٪ H2O با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج ۲۴۰ نانومتر است.

جدول ۵ غلظت‌های رقیق سازی متوالی برای محلول‌های استاندارد در اندازه‌گیری با HPLC برای فنانترن.

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

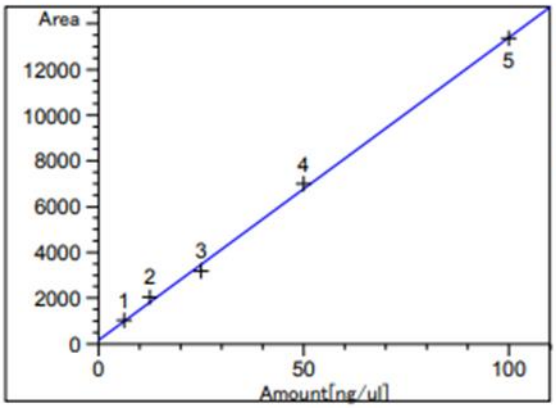
RetTime [min]	Sig	Lvl	Amount [ng/ul]	Area	Amt/Area	Ref Grp	Name
1.556	1	1	6.25000	1010.12292	6.18737e-3		Phenanthren
		2	12.50000	2032.17578	6.15104e-3		
		3	25.00000	3195.81641	7.82273e-3		
		4	50.00000	7002.06396	7.14075e-3		
		5	100.00000	1.33505e4	7.49036e-3		

Peak Sum Table

No Entries in table

تصویر ۱ : منحنی کالیبراسیون HPLC فنانترن

Calibration Curves



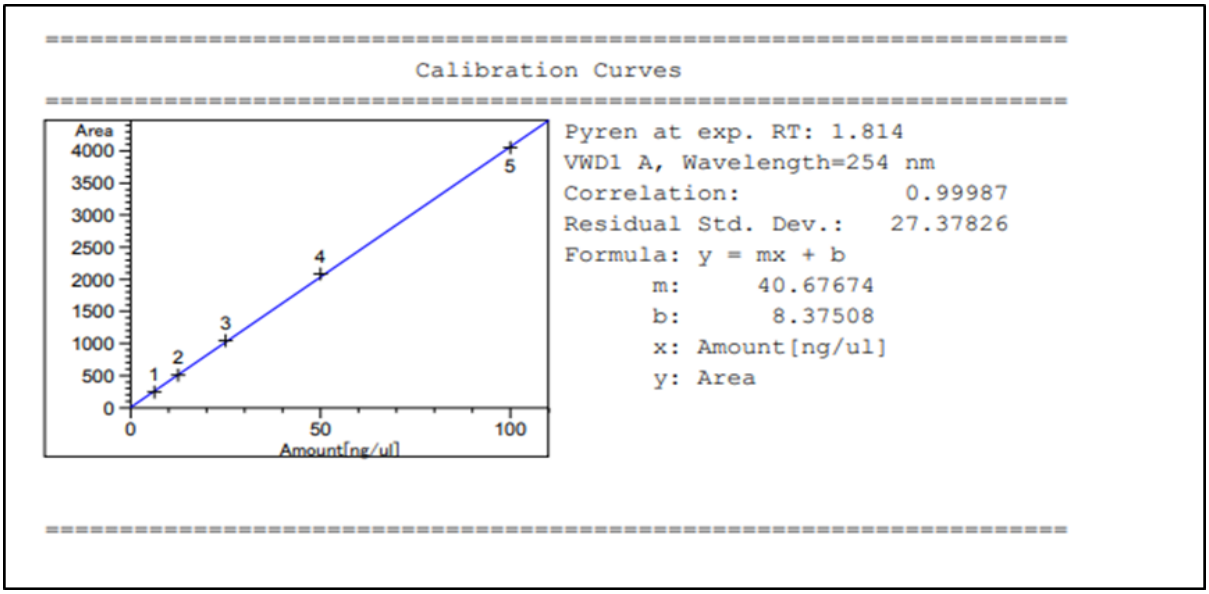
Phenanthren at exp. RT: 1.556
VWD1 A, Wavelength=254 nm
Correlation: 0.99920
Residual Std. Dev.: 223.03575
Formula: y = mx + b
m: 132.80478
b: 143.29208
x: Amount[ng/ul]
y: Area

جدول ۶. غلظت‌های رقیق‌سازی متوالی برای محلول‌های استاندارد در اندازه‌گیری با HPLC برای Pyren

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

RetTime [min]	Sig	Lvl	Amount [ng/ul]	Area	Amt/Area	Ref Grp	Name
1.814	1	1	6.25000	241.21000	2.59110e-2		Pyren
		2	12.50000	508.93000	2.45613e-2		
		3	25.00000	1047.10000	2.38755e-2		
		4	50.00000	2080.20000	2.40362e-2		
		5	100.00000	4053.92847	2.46674e-2		

شکل ۲: منحنی کالیبراسیون HPLC پایرن



- **تجزیه و تحلیل داده‌ها:**

با استفاده از میانگین و انحراف معیار آمار توصیفی بررسی شده و از آزمونهای تی مستقل، انالیز کوواریانس، تحلیل واریانس یکطرفه و دو طرفه همچنین تحلیل اندازه‌های تکراری در نسخه ۲۵ نرم افزار SPSS استفاده شد.در جدول ۷ متغیر ها نمایش داده شده است.

۳- نتایج

پس ازاینکه کلون‌سازی ژن NahH در وکتور PUC18 که توسط آنزیم‌های محدودکننده BamHI و EcoRI تایید شد، پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده از E. Coli با استفاده از روش PCR و به کمک آنزیم HindIII مورد بررسی قرار گرفتند.بر رسی‌ها ن شان دادند که انتقال به خوبی صورت گرفته ا ست. سپس پلا سمید نوترکیب با موفقیت به P. Putida منتقل شد و سپس ح ضور ژن NahH 924 جفت باز در باکتری P. putida با PCR تأیید شد. در این پژوهش م شاهده شد که بیوراکتور حاوی باکتری مهند سی ژنتیکی شده، پس از ۸ هفته، فنانترن و پایرن را در سه غلظت۱۰،۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر به طور میانگین به ترتیب به میزان ۳۳/۶۵،۷۲/۹۴،۹۹/۴۱۷ و ۳۳/۶۲،۵۴/۹۳،۹۳/۴۵ درصد تخریب کرد. این در حالی است که این مقادیر برای بیوفیلم باکتری غیرمهندسی سودوموناس پوتیدا به ترتیب ۹۳/۴۱، ۵۷/۷۲، ۱۷/۴۴ و ۹۲/۹۹۲، ۵۷/۸۹، ۱۷/۷۵درصد بود (جداول ۸ و ۹). در جدول ۱۰ و ۱۱ داده‌های مربوط به مقایسه راندمان حذف پایرن در باکتری مهندسی شده و غیرمهندسی بتفکیک غلظتها، هفته‌ها مقایسه راندمان حذف در بین دو باکتری بتفکیک غلظت و ph آورده شده ا ست. در نمودارهای A,B,C شکل‌های ۳ و ۴ در صد راندمان حذف فنانترن و پایرن در غلظت‌های نمایش داده شده است.

جدول ۸ : جدول مقایسه راندمان حذف فنانترن در باکتری مهندسی شده و غیر مهندسی بتفکیک غلظت ها، میانگین ۸ هفته

consentration	Ph		type	N	Mean	Std. Deviation	P-value
10	3	Eliminated	GEMs	16	93.641	.8634	0.97
			Wild	16	93.622	1.5816	
	7	Eliminated	GEMs	16	95.771	2.8331	0.03
			Wild	16	93.932	1.3084	
	10	Eliminated	GEMs	16	93.839	1.8369	0.07
			Wild	16	92.648	1.6811	
50	3	Eliminated	GEMs	16	56.254	3.5376	0.95
			Wild	16	56.180	3.7356	
	7	Eliminated	GEMs	16	80.788	16.8521	<0.001
			Wild	16	59.031	7.6851	
	10	Eliminated	GEMs	16	60.941	7.2999	0.20
			Wild	16	58.014	5.0451	
100	3	Eliminated	GEMs	16	22.516	19.1457	0.12
			Wild	16	13.928	9.8590	
	7	Eliminated	GEMs	16	54.541	35.0109	0.002
			Wild	16	20.771	16.7304	
	10	Eliminated	GEMs	16	24.101	22.6683	0.34
			Wild	16	17.628	13.5613	

جدول ۸: مقایسه راندمان حذف در بین دو باکتری بتفکیک غلظت و هفته (میانگین ۳ ph)

nsentration	Week		type	N	Mean	Std. Deviation	P-value
10	1	Eliminated	GEMs	6	91.808	.6730	0.20
			Wild	6	91.307	.5800	
	2	Eliminated	GEMs	6	92.365	.4151	0.12
			Wild	6	91.828	.6507	
	3	Eliminated	GEMs	6	93.282	.3824	0.09
			Wild	6	92.462	.9811	
	4	Eliminated	GEMs	6	93.957	.7852	0.02
			Wild	6	92.832	.6537	
	5	Eliminated	GEMs	6	94.740	1.3139	0.20
			Wild	6	93.860	.9054	
	6	Eliminated	GEMs	6	95.710	1.8841	0.14
			Wild	6	94.320	1.0070	
	7	Eliminated	GEMs	6	96.420	2.0711	0.11
			Wild	6	94.923	.1972	
	8	Eliminated	GEMs	6	97.053	2.0094	0.15
			Wild	6	95.672	.2379	
50	1	Eliminated	GEMs	6	52.008	.4237	0.05
			Wild	6	51.488	.4031	
	2	Eliminated	GEMs	6	54.460	2.4947	0.07
			Wild	6	52.117	.2565	
	3	Eliminated	GEMs	6	61.217	10.3347	0.13
			Wild	6	53.515	.9728	
	4	Eliminated	GEMs	6	66.583	14.8491	0.12
			Wild	6	55.290	1.1496	
	5	Eliminated	GEMs	6	69.337	15.9704	0.14
			Wild	6	57.938	.1617	
	6	Eliminated	GEMs	6	73.278	16.4537	0.13
			Wild	6	61.010	2.4097	
	7	Eliminated	GEMs	6	74.170	16.9527	0.19
			Wild	6	64.113	3.8901	
	8	Eliminated	GEMs	6	76.902	16.3072	0.18
			Wild	6	66.463	4.3473	
100	1	Eliminated	GEMs	6	3.197	1.3775	0.52
			Wild	6	2.755	.8530	
	2	Eliminated	GEMs	6	6.543	5.3668	0.18
			Wild	6	3.067	.8714	
	3	Eliminated	GEMs	6	13.280	11.0279	0.22
			Wild	6	6.920	1.3767	
	4	Eliminated	GEMs	6	21.815	20.9850	0.28
			Wild	6	11.307	1.0694	
	5	Eliminated	GEMs	6	39.818	23.5824	0.06
			Wild	6	16.855	2.6509	
	6	Eliminated	GEMs	6	52.570	23.3775	0.04
			Wild	6	27.968	6.7657	
	7	Eliminated	GEMs	6	63.115	23.9559	0.03
			Wild	6	32.885	7.6367	
	8	Eliminated	GEMs	6	69.417	20.5315	0.01
			Wild	6	37.782	6.4511	

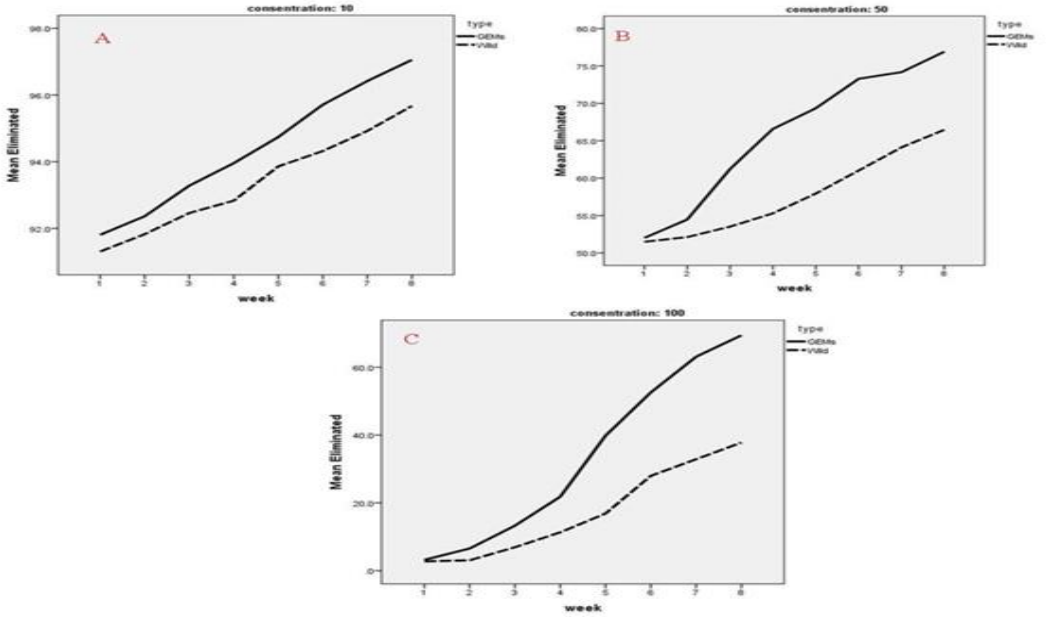
جدول ۱۰- مقایسه راندمان حذف پایرن در باکتری مهندسی شده و غیرمهندسی بتفکیک غلظتها، هفته ها مقایسه راندمان حذف در بین دو باکتری بتفکیک غلظت و ph (تحلیل مربوط به میانگین ۸ هفته).

Group Statistics							
consentration	Ph		type	N	Mean	Std. Deviation	P-value
10	3	Eliminated	GEMs	16	92.733	1.0838	0.09
			Wild	16	93.420	1.1158	
	7	Eliminated	GEMs	16	94.711	2.7172	0.02
			Wild	16	92.887	1.2745	
	10	Eliminated	GEMs	16	92.909	1.2654	0.66
			Wild	16	92.699	1.3711	
50	3	Eliminated	GEMs	16	54.946	2.5208	0.37
			Wild	16	55.893	3.3132	
	7	Eliminated	GEMs	16	75.128	16.9545	0.003
			Wild	16	60.181	6.5864	
	10	Eliminated	GEMs	16	58.713	4.7059	0.50
			Wild	16	57.593	4.6612	
100	3	Eliminated	GEMs	16	21.421	18.8138	0.20
			Wild	16	14.394	10.4212	
	7	Eliminated	GEMs	16	53.276	35.3640	0.003
			Wild	16	21.593	16.7652	
	10	Eliminated	GEMs	16	25.921	20.3122	0.15
			Wild	16	17.256	12.0919	

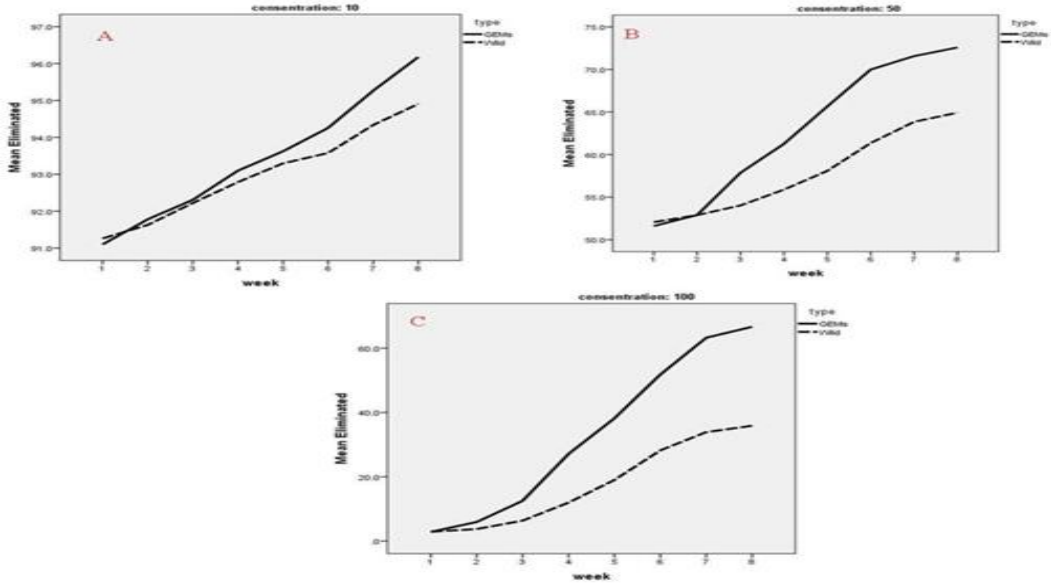
جدول ۱۱- مقایسه راندمان حذف در بین دو باکتری بتفکیک غلظت و هفته (تحلیل مربوط به ph ۳)

Group Statistics							
consentration	week		type	N	Mean	Std. Deviation	P-value
10	1	Eliminated	GEMs	6	91.098	.1433	0.38
			Wild	6	91.262	.3990	
	2	Eliminated	GEMs	6	91.780	.0930	0.44
			Wild	6	91.628	.4410	
	3	Eliminated	GEMs	6	92.308	.4331	0.71
			Wild	6	92.222	.3494	
	4	Eliminated	GEMs	6	93.098	.6787	0.44
			Wild	6	92.788	.6643	
	5	Eliminated	GEMs	6	93.623	.9419	0.48
			Wild	6	93.297	.5063	
	6	Eliminated	GEMs	6	94.257	1.6406	0.37
			Wild	6	93.577	.4505	
	7	Eliminated	GEMs	6	95.265	1.9959	0.31
			Wild	6	94.337	.2688	
	8	Eliminated	GEMs	6	96.178	2.1224	0.20
			Wild	6	94.907	.1332	
50	1	Eliminated	GEMs	6	51.605	.5001	0.17
			Wild	6	52.070	.5857	
	2	Eliminated	GEMs	6	52.902	.8671	0.99
			Wild	6	52.895	.7941	
	3	Eliminated	GEMs	6	57.873	5.7110	0.16
			Wild	6	54.032	.6309	
	4	Eliminated	GEMs	6	61.258	7.5723	0.14
			Wild	6	55.890	.7780	
	5	Eliminated	GEMs	6	65.655	12.0397	0.19
			Wild	6	58.088	1.3943	
	6	Eliminated	GEMs	6	69.988	16.7397	0.27
			Wild	6	61.362	3.1434	
	7	Eliminated	GEMs	6	71.567	17.1284	0.33
			Wild	6	63.848	4.1122	
	8	Eliminated	GEMs	6	72.582	17.2280	0.33
			Wild	6	64.927	4.1959	
100	1	Eliminated	GEMs	6	2.865	.7199	0.87
			Wild	6	2.915	.1381	
	2	Eliminated	GEMs	6	5.943	3.9466	0.23
			Wild	6	3.753	.4888	
	3	Eliminated	GEMs	6	12.527	9.4920	0.17
			Wild	6	6.365	.5436	
	4	Eliminated	GEMs	6	27.112	17.6477	0.09
			Wild	6	11.975	2.1900	
	5	Eliminated	GEMs	6	38.180	23.7565	0.11
			Wild	6	19.002	2.5688	
	6	Eliminated	GEMs	6	51.797	23.3136	0.06
			Wild	6	28.218	7.3403	
	7	Eliminated	GEMs	6	63.248	22.8854	0.02
			Wild	6	33.882	6.7420	
	8	Eliminated	GEMs	6	66.643	21.9547	0.02
			Wild	6	35.872	6.7791	

شکل ۸: راندمان حذف فنانترن با، A: غلظت اولیه ۱۰ ppm، B: غلظت اولیه ۵۰ ppm، و C: غلظت اولیه ۱۰۰ ppm در طول ۲ ماه توسط باکتری‌های مهندسی شده و غیرمهندسی سودوموناس پوتیدا



شکل ۹ : راندمان حذف پایرن با A: غلظت اولیه ۱۰ ppm، B: غلظت اولیه ۵۰ ppm، C: غلظت اولیه ۱۰۰ ppm در طول ۲ ماه توسط باکتری های مهندسی شده و غیر مهندسی سودوموناس پوتیدا



همانطوریکه در شکل‌های ۳ و ۴ مشاهده می‌شود اختلاف معناداری بین تخریب مواد آلاینده فنانترن و پایرن توسط نمونه مهندسی‌شده رخ داده‌اشت. همچنین در جدول ۹ راندمان حذف فنانترن بتفکیک غلظتهای مختلف در دو نوع باکتری مقایسه شده‌است. راندمان حذف در غلظت ۱۰ ، ۵۰و ۱۰۰ در بین دو باکتری متفاوت بوده و تفاوت معنی‌داری بین راندمان حذف گروه‌ها مشاهده می‌شود. بنابراین بررسی فرم‌های تغییرشکل‌یافته وکتور نوترکیب (P. Putida ،PUC18-nahH) با مهندسی ژنتیک تولیدشده از طریق بیوسنتز آنزیم کاتکول ۲،۳- دیوکسیژناز برای تخریب بیولوژیکی مواد آروماتیک فنانترن و پایرن تلقیح‌شده در محیط آبی با pH های مختلف اسیدی، بازی و قلیایی و با سه غلظت مختلف از این آلاینده‌ها در مقایسه با سویه مهندسی‌نشده این باکتری نشان می‌دهد که تخریب زیستی این دو ترکیب در خاک تلقیح شده با استفاده از باکتری مهندسی ژنتیکی شده سودوموناس پوتیدا در مقایسه با راکتورتلقیح شده با نوع P. putida به طور قابل توجهی بالاتر بود ($p <$ ۰/۰۰۱). در پژوهش انجام شده، بیوراکتور دارای باکتری مهندسی ژنتیکی شده پس از ۸ هفته فنانترن، پایرن را در سه غلظت۱۰،۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر به طور میانگین به ترتیب به میزان ۹۶,۵۳۰۰،۷۴,۶۲۵۰،۶۶,۸۸۸۳ و ۹۵,۴۹۰۰،۷۱,۳۴۰۰،۶۴,۸۰۸۳ درصد تخریب کرد. این در حالی است که این مقادیر برای بیوفیلم باکتری غیرمهندسی سودوموناس پوتیدا به ترتیب برابر۹۳,۵۹۵۰،۶۴,۷۳۱۷،۳۵,۸۵۶۷ و ۹۲,۹۱۸۳،۶۲,۷۳۰۰،۳۳,۲۳۶۷ درصد بود.

۴- نتیجه‌گیری

بررسی میزان تخریب و حذف آلاینده های فنانترن و پایرن توسط فرم‌های تغییرشکل‌یافته وکتور نوترکیب (P. ،PUC18-nahH Putida) با مهندسی ژنتیک نشان می‌دهند که تفاوت معنی‌داری بین راندمان حذف مواد آروماتیک توسط دو گروه باکتری مهندسی و غیرمهندسی سودوموناس پوتیدا مشاهده می‌شود. بنابراین می‌توان با برنامه‌ریزی صحیح در صنایع مختلف حاوی این آلاینده‌های، از فرمهای مهند سی شده مورد برر سی، در تخریب و حذف غلظت‌های مختلف آلاینده‌های ذکر شده ا ستفاده کرد تا محیط زیست سالم‌تری داشته باشیم.

منابع

- Amiri, N.A, Amiri, F.A, Faravardeh, L, Eslami. A, Ghasemi. A, & Rafiee. 2022. M. Enhancement of MBBR reactor efficiency using effective microorganism for treatment of wastewater containing diazinon by engineered Pseudomonas putida KT2440 with manganese peroxidase 2 gene. Journal of Environmental Management.316:115293.
- Bhatt. P, Gangola. S, Bhandari. G, Zhang. W, Maithani. D, & Mishra. S. 2021. New insights into the degradation of synthetic pollutants in contaminated environments. Chemosphere.268:128827.
- Kaushal. J, Khatri. M, & Arya. S.K. 2021. A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination. Ecotoxicology and Environmental Safety.207:111483.
- Briceño. G, Levio. M, González. M.E, Saez. J.M, Palma. G, & Schalchli. H. 2020. Performance of a continuous stirred tank bioreactor employing an immobilized actinobacteria mixed culture for the removal of organophosphorus pesticides. 3 Biotech.10(6):1-11.
- Cycoń. M, Żmijowska. A, &Wójcik. M, 2013. Piotrowska-Seget Z. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading Serratia marcescens to remove other organophosphorus pesticides from soils. Journal of Environmental Management.117:7-16.
- Kivisaar. M. 2020. Narrative of a versatile and adept species Pseudomonas putida. Journal of medical microbiology.69(3):324-38.
- Kumar. S, Kaushik, G, Dar, M.A, Nimesh. S, Lopez-Chuken, U.J, & Villarreal-Chiu. J.F. 2018. Microbial degradation of organophosphate pesticides: a review. Pedosphere.28(2):190-208.
- Levio-Raiman. M, Briceño, G, Leiva, B, López. S, Schalchli. H, & Lamilla. C. 2021. Treatment of Pesticide-Contaminated Water Using a Selected Fungal Consortium: Study in a Batch and Packed-Bed Bioreactor. Agronomy. 11(4):743.
- Liu. L, Bilal. M, Duan. X, & Iqbal. H.M. 2019. Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria—current challenges and future perspectives. Science of The Total Environment.667:444-5.
- Parra-Arroyo. L, González-González. R.B, Castillo-Zacarías. C, Martínez. E.M.M, Sosa-Hernández. J.E, & Bilal M. 2022. Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. Science of The Total Environment. 80. 7.

- Poblete-Castro. I, Borrero-de. Acuña. J.M, Nikel. P.I, Kohlstedt. M, & Wittmann. C. 2017. Host organism: Pseudomonas putida. Industrial Biotechnology: Microorganisms.1:299-326.
- Sandhya. M, Huang. Y, Li. J, Wu. X, Zhou. Z, & Lei. Q,. 2022. Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. Chemosphere. 133609.
- Zhang. Y, Xu. Z, Chen. Z, & Wang. G. 2020.Simultaneous degradation of triazophos, methamidophos and carbofuran pesticides in wastewater using an Enterobacter bacterial bioreactor and analysis of toxicity and biosafety. Chemosphere. 26: 1.