# جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل از پساب کارخانه گل‌گهر سیرجان

مهدی حسن شاهیان [۱]، مژده لشکری [۱]، بابک خیرخواه [۲]

۱- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران (نویسنده مسئول) ۰۹۱۳۲۹۰۶۹۷۱ hasanshahi@gmail.com
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات سیرجان، سیرجان، ایران
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات سیرجان، سیرجان، ایران

(دریافت ۹۲/۹/۲۳ پذیرش ۹۳/۹/۱۲)

## چکیده

**فنل و مشتقات آن ترکیباتی به‌شدت سمی می‌باشند که به‌راحتی می‌توان آنها را از پساب‌های صنایع مختلفی مانند پالایشگاه‌های نفت، صنایع پتروشیمی، معادن به‌ویژه زغال سنگ و کارخانه‌های مواد شیمیایی حذف کرد. ورود این مواد به محیط زیست باعث آلودگی‌های شدید به‌ویژه در منابع آبی می‌شود. در گذشته از روش‌های فیزیکوشیمیایی برای حذف فنل و مشتقات آن استفاده می‌شد اما امروزه تصفیه زیستی در اولویت قرار دارد. هدف از این پژوهش شناسایی و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل از پساب کارخانه گل‌گهر سیرجان بود. در این تحقیق برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل، نمونه‌برداری از مناطق مختلف پساب کارخانه گل‌گهر سیرجان صورت گرفت و با استفاده از روش‌های غنی‌سازی در محیط بوشنل- هاس همراه با فنل به‌عنوان منبع کربن، باکتری‌های تجزیه کننده فنل جداسازی شدند. باکتری‌های برتر در تجزیه فنل با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن ۱۶S rRNA و انجام واکنش زنجیره‌ای چندگانه و در نهایت تعیین توالی باند حاصله شناسایی شدند. در طی این تحقیق، ۱۷ سویه باکتریایی تجزیه‌کننده فنل از نمونه‌های خاک و پساب جمع‌آوری شده از مناطق مختلف معدن جداسازی شد. با انجام آزمون‌های غربالگری، تعداد چهار سویه به‌عنوان سویه‌های برتر انتخاب شدند. بالاترین غلظتی از فنل که به این باکتری‌ها تجزیه می‌شد، غلظت ۰/۴ گرم در لیتر بود. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی نشان داد که این باکتری‌های برتر تجزیه‌کننده فنل متعلق به جنس‌های سودوموناس اس پی و نیتراتیرداکتر اس پی و سالجنتی باکتر اس پی هستند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد پساب کارخانه گل‌گهر سیرجان دارای تعداد زیادی از باکتری‌های تجزیه کننده فنل به‌ویژه جنس‌های مذکور است و با به‌کارگیری این باکتری‌ها در پساب حاصل از کارخانه گل‌گهر می‌توان میزان آلودگی این کارخانه را به‌طور قابل توجهی کاهش داد.**

***واژه‌های کلیدی***: آلودگی فنلی، باکتری، پساب، تصفیه زیستی، فنل

## ۱- مقدمه

فنل یکی از هیدروکربن‌های آروماتیک سمی است که آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا [۱] آن‌را در زمره آلاینده‌های خطرناک محیطی قرار داده است[۱]. این ماده و مشتقات آن در پساب صنایع متعددی از جمله کارخانه‌های تولید رزین، رنگ، سموم دفع آفات، داروسازی، پالایشگاه‌های نفت، صنایع پتروشیمی، معادن زغال سنگ و تعدادی صنایع دیگر وجود دارد و سبب آلودگی محیط زیست به‌ویژه منابع آب می‌شود [۲]. رایج‌ترین روش‌های تصفیه فنل، عبارت‌اند از: انعقاد، پدیده اسمز، تبادل یونی، اولترافیلتراسیون، الکترودیالیز، تصفیه الکتروشیمیایی و شناورسازی. این روش‌ها بسیار گران هستند و بازده آنها پایین است [۳ و ۴] . در مقایسه با روش‌های یاد شده، سیستم‌های زیستی به‌دلیل مزایای خاصی که نسبت به سایر روش‌ها دارند، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از مزایای عمده این روش‌ها این است که سازگاری بیشتری با محیط زیست دارند؛ به عبارت دیگر از دیدگاه محیط زیست ایمن‌تر محسوب می‌شوند. مزیت دیگر این سیستم‌ها نسبت به روش‌های شیمیایی این است که معمولاً در آن‌ها ماده شیمیایی زیان‌آوری برای محیط زیست مصرف نمی‌شود، لذا دفع پساب و لجن حاصل از این فرایندها نسبت به فرایندهای شیمیایی، اثرات سوء به دنبال ندارد [۵].

تصفیه زیستی [۲] فنل به‌وسیله باکتری‌ها طی تحقیقات زیادی

[1] US. Environmental Protection Agency (USEPA)

[2] Bioremediation

بررسی شده و باکتری‌های متنوعی بر حسب مقدار فنل و خصوصیات فیزیولوژیکی باکتری، جداسازی و بررسی شده‌اند. اکثر باکتری‌هایی که تاکنون مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند، قادر به تجزیه فنل در غلظت‌های پایین بودند (یک گرم در لیتر) به این دلیل که فنل در غلظت‌های بالا (۳ تا۴ گرم در لیتر) با ایجاد لیز سلولی مانع رشد اکثر میکروارگانیسم‌ها می‌شود [۶ و ۷].

در بررسی‌هایی که بر روی فنل انجام گرفته مشخص شده است، در صورتی که باکتری منبع کربن دیگری به غیر از فنل در دسترس نداشته باشد و در طی مدت زمان نسبتاً طولانی در برابر آن قرار گیرد، می‌تواند خود را با شرایط سازش داده و از فنل به‌عنوان یک منبع کربن یا انرژی استفاده کند. تجزیه فنل به‌وسیله باکتری‌ها می‌تواند به تولید دی‌اکسید کربن یا متان منجر شود[ ۸ و ۹].

شرکت سنگ آهن گل گهر با داشتن معادن غنی از سنگ آهن به‌عنوان یکی از مطرح‌ترین قطب‌های فعال معدنی و صنعتی در خاور میانه است که دارای قابلیت‌های بسیاری برای تبدیل شدن به یک شرکت بزرگ و رقابتی در سطح ایران و حتی جهان است. با اجرای پروژه‌های شرکت در آینده نزدیک مجموعه تولیدات سالانه این شرکت به مرز ۱۲ میلیون تن خواهد رسید؛ این رقم ۳۰ درصد از نیاز فولادسازی‌های کشور را تأمین می‌نماید. ذخایر سنگ آهن گل‌گهر در استان کرمان و در ۵۰ کیلومتری جنوب غربی شهرستان سیرجان واقع شده است. میزان برنامه تولیدی کارگاه در حدود ۹۰۰،۰۰۰ تن در سال پیش‌بینی شده است. این تولید زیاد و انجام کارهای صنعتی سبب تولید آلاینده‌های زیادی می‌شود که یکی از خطرناک‌ترین و سمی‌ترین آنها فنل است که برای محیط زیست، منابع آبی و موجودات زنده بسیار سمی و خطرناک است و مشکل بزرگی برای منطقه به‌حساب می‌آید که باید پاکسازی شود.

با علم به این که در سیستم‌های تصفیه زیستی، میکروارگانیسم‌ها عامل تصفیه آلاینده‌های مورد نظر هستند، بنابراین شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌ها گام مهمی در روند تکاملی سیستم‌های تصفیه فاضلاب به‌ویژه مواد سمی محسوب می‌شود. به‌طور کلی در این تحقیق به جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل از پساب کارخانه گل‌گهرسیرجان پرداخته شد.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- نمونه‌برداری

این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی روی خاک و پساب کارخانه گل‌گهر سیرجان انجام شد. کانسار در دشت مرتفعی با ارتفاع متوسط ۱۷۵۰ متر از سطح دریا در دامنه شمالی رشته کوه زاگرس در یک ناحیه نیمه کویری واقع شده است. دو نمونه خاک و سه نمونه پساب و در کل پنج نمونه با ظروف کاملاً استریل نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها کمتر در مدت زمان کمتر از ۶ ساعت و در بطری‌های شیشه‌ای اسیدشویی شده و استریل، جمع‌آوری شد و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

### ۲-۲- جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل

میزان پنج میلی‌لیتر از پساب جمع‌آوری شده داخل محیط بوشنل هاس[1] برای غنی‌سازی اولیه تلقیح شد. پس از گذشت یک هفته میزان ۱ میلی لیتر از این محیط برداشته شد و به محیط بوشنل-هاس جدید انتقال یافت. این عمل تا چند پاساژ ادامه یافت تا این که کدورت به‌دست آمده ناشی از رشد باکتری باشد و آلودگی ترکیبات دیگر در نمونه کاهش یابد. از پاساژ آخر یا دو پاساژ آخر میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط نوترنیت آگار[2] پخش شد و باکتری‌ها به‌صورت کلنی تک جداسازی و به محیط بوشنل هاس آگار[3] جدید منتقل شدند[۱۰].

### ۲-۳- شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل

باکتری‌های جداسازی شده ابتدا بر اساس مشاهدات مورفولوژیک و اختصاصات بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. به این منظور آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، بررسی شکل باکتری، آزمون OF[4]، آزمون حرکت، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز، رشد بی‌هوازی و تولید اسید از گلوکز انجام شد. در ادامه برای شناسایی قطعی باکتری‌ها، شناسایی مولکولی انجام شد. برای شناسایی مولکولی سویه‌ها از پرایمرهایی که در جدول ۱ بر اساس ژن 16S rRNA انتخاب شده‌اند، استفاده شد [۱۱ و ۱۲]. این پرایمر ناحیه‌ای به‌طول ۱۴۰۰ جفت باز را تکثیر می‌دهد.

برنامهPCR[5] به این صورت بود: دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ محصول حاصل از PCR در ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس باند ۱۴۰۰ جفت باز از ژل آگارز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست[6] شده و همولوژی آنها بررسی شد و قرابت

[1] Bushnell-Hass
[2] Nutrient Agar
[3] Bushnell-Hass Agar
[4] Oxidative Fermentative (OF)
[5] Polymerase Chain Reaction (PCR)
[6] BLAST

بالاتر از ۹۸ درصد به‌عنوان جنس و گونه باکتری مجهول لحاظ شد.

### ۲-۴- تعیین میزان رشد باکتری‌های جدا شده در محیط بوشنل هاس همراه با فنل

برای تعیین میزان رشد باکتری‌ها، از روش اندازه‌گیری جذب ناشی از رشد باکتری‌ها در حضور فنل به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شد. باکتری‌ها در حضور فنل به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی کشت داده شدند و هر ۲۴ ساعت یک بار، جذب محیط کشت باکتری‌ها در مقایسه با شاهد بدون باکتری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد [۱۳].

برای سنجش حذف فنل و سنجش رشد باکتری‌های تجزیه کننده فنل، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محیط بوشنل هاس و ۰/۱ گرم در لیتر فنل (غلظت ۰/۰۱ درصد) به‌علاوه یک لوپ کشت تازه هر باکتری به ارلن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها بر روی شیکر با دور ۱۸۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی حذف فنل توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده از روش گیبس استفاده شد. در این روش از معرف گیبس یا 2,6-Dicholoroquinon-4-choloroimide که با فنل واکنش داده و یک ترکیب آبی رنگ ایجاد می‌کند، استفاده شد. معرف گیبس به‌صورت پودر است. برای استفاده از آن باید مقدار ۰/۰۴ گرم از معرف گیبس را در ۱۰ سی سی الکل ۹۶ درجه حل کرده و بعد آن را مورد استفاده قرار داد.

۱۵۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط کشت پس از سانتریفوژ با ۳۰ میکرولیتر از $NaHCO_3$ مخلوط شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از معرف گیبس به مخلوط اضافه شد و به‌مدت ۱۵ تا ۴۵ دقیقه در دمای اتاق با دستگاه ترمومیکسر هم زده شد و در نهایت جذب مخلوط در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد [۱۴ و ۱۵].

## ۳- نتایج

### ۳-۱- جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل و مشخصات آنها

در این تحقیق ۱۷ سویه باکتریایی تجزیه‌کننده فنل از نمونه‌های خاک و پساب جمع‌آوری شده از مناطق مختلف معدن جداسازی شد، که در جدول ۲ پاره‌ای از خصوصیات این باکتری‌ها به‌همراه محل جداسازی آنها نشان داده شده است. نتایج با استفاده از کتاب مرجع برگی[1] و آزمون‌های بیوشیمیایی به‌دست آمد. البته برای شناسایی بیشتر این باکتری‌ها نیاز به آزمون‌های شناسایی دقیق‌تر از جمله شناسایی ملکولی است.

### ۳-۲- غربالگری بهترین باکتری‌های تجزیه کننده فنل

کلیه سویه‌ها در محیط بوشنل هاس حاوی ۰/۰۱ درصد فنل و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰ rpm به‌مدت یک هفته کشت داده شدند. سپس میزان رشد سویه‌ها با خواندن جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بیشترین میزان رشد مربوط به سویه‌های باکتریایی A3, B2, B4, B5, C2, D1, D4, و کمترین میزان رشد مربوط به سویه‌های باکتریایی A1, D2, E1 است.

### ۳-۳- منحنی رشد سویه‌های برتر جداسازی شده روی فنل

به طور کلی، کلیه سویه‌های جداسازی شده در غلظت ۰/۱ گرم در لیتر فنل، الگوی رشد یکسانی نشان دادند. منحنی رشد این سویه‌ها همراه با منحنی حذف فنل توسط روش گیبس با دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سلسیوس بر روی شیکر ۱۸۰rpm بررسی شد (شکل ۱). همان‌طور که در شکل دیده می‌شود کلیه سویه‌ها بعد از ۲۴ ساعت مقدار ۰/۰۵ گرم در لیتر فنل را باقی می‌گذارند و به حداکثر رشد می‌رسند و فنل بعد از ۴۸ ساعت به‌طور کلی حذف می‌شود.

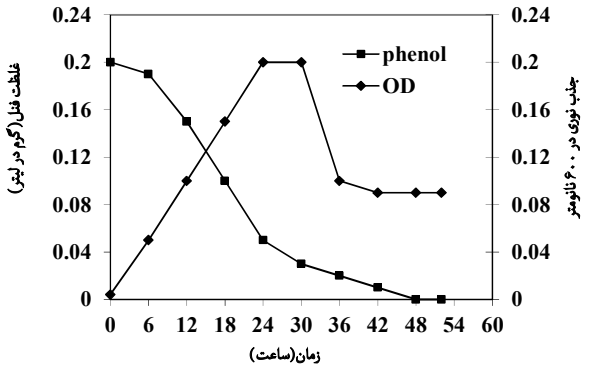
[1] Brggeys Manual Method

**جدول ۱**- توالی و ویژگی‌های پرایمرها

| پرایمر | توالی | طول (bp) | تعداد GC % | دما (°C) |
|---|---|---|---|---|
| Uni_1492R | 5′-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3′ | ۲۱ | ۴۲ | ۵۳/۶ |
| Bac27_F | 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ | ۲۰ | ۵۰ | ۵۶/۷ |

**جدول ۲**- باکتری‌های تجزیه کننده فنل جداسازی شده و ویژگی‌های آنها

| نام سویه | محل جداسازی | شکل باکتری و واکنش گرم | O/F | اکسیداز | کاتالاز | حرکت | تولید اسید از گلوکز | رشد بی‌هوازی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 | تیکنر پلی کام | باسیل گرم منفی | $O^-/F^-$ | + | + | + | – | – |
| A2 | تیکنر پلی کام | کوکوباسیل گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | - | – |
| A3 | تیکنر پلی کام | کوکسی و دیپلوکوکسی گرم منفی | $O^-/F^-$ | + | + | + | – | – |
| B1 | سد باطله تغلیظ | کوکسی و دیپلوکوکسی گرم منفی | $O^+/F^+$ | + | + | + | – | – |
| B2 | سد باطله تغلیظ | کوکسی و دیپلوکوکسی گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | – | – |
| B3 | سد باطله تغلیظ | باسیل گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | – | – |
| B4 | سد باطله تغلیظ | باسیل گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | – | – |
| C1 | سد باطله پلی کام | کوکوباسیل گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | + | – |
| C2 | سد باطله پلی کام | کوکوباسیل گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | – | – |
| C3 | سد باطله پلی کام | باسیل پلی‌مورف | $O^+/F^+$ | + | + | + | + | – |
| D1 | سد باطله هماتیت | میله ای گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | – | – | – |
| D2 | سد باطله هماتیت | کوکسی گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | – | – |
| D3 | سد باطله هماتیت | دیپلوکوکسی گرم منفی | $O^+/F^+$ | + | + | + | – | – |
| D4 | سد باطله هماتیت | کوکسی و کوکوباسیل گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | – | – |
| E1 | تیکنر هماتیت | باسیل و کوکوباسیل گرم منفی | $O^+/F^-$ | + | + | + | – | – |
| E2 | تیکنر هماتیت | باسیل ریز پلی‌مورف | $O^+/F^+$ | + | + | + | + | – |




**شکل ۱**- منحنی رشد و حذف فنل برای سویه‌های جداسازی شده
حذف فنل

### ۳-۴- اثر غلظت‌های مختلف فنل بر روی رشد چهار سویه باکتریایی تجزیه‌کننده

با توجه به نتایج حاصل از غربالگری، مشخص شد که چهار سویه D1، C2، B5 و A3 دارای بیشترین میزان حذف فنل در بین سویه‌های جداسازی شده هستند. بنابراین اثر غلظت‌های مختلف فنل روی رشد این چهار سویه بررسی شد. چهار سویه جدا شده برای به‌دست آوردن حداکثر مقداری از فنل که قادر به تجزیه آن هستند توسط روش کدورت‌سنجی مورد آزمایش قرار گرفتند. هر چهار سویه قابلیت خوبی در رشد بر روی محیط فنل براث نشان داد که قابلیت رشد تعدادی از این سویه‌ها در دامنه فزاینده‌ای از غلظت‌های فنل (۰/۲ تا ۰/۹ گرم در لیتر) در شکل نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود تقریباً هر چهار سویه تا غلظت ۰/۴ گرم در لیتر فنل قابلیت تجزیه فنل را دارند و هنگامی که غلظت فنل از ۰/۵ گرم در لیتر تجاوز می‌کند، اکثر سویه‌ها می‌میرند و قادر به تحمل و تجزیه غلظت بالای فنل نیستند.

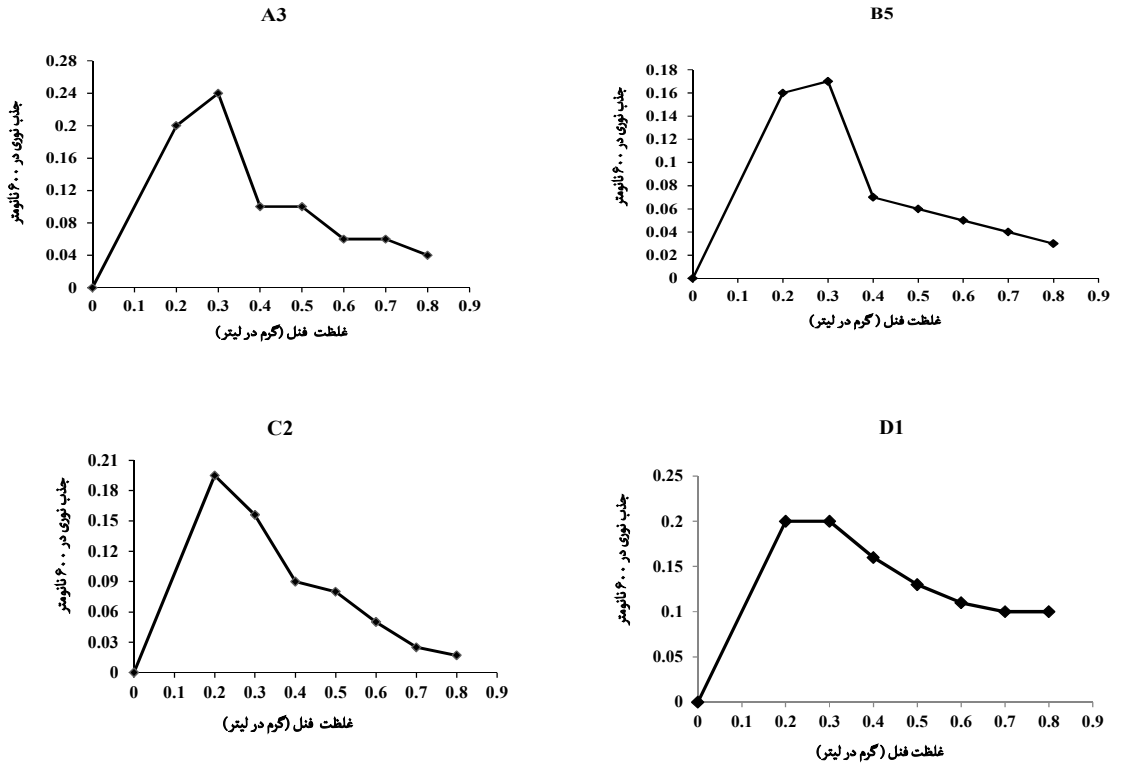
### ۳-۵- شناسایی مولکولی باکتری‌های برتر تجزیه‌کننده فنل

نتایج حاصله از شناسایی مولکولی سویه‌ها نشان داد که سویه A3 مربوط به *سودوموناس اس پی*[1] درصد تقارب ۹۸ درصد، سویه B5 مربوط به *سودوموناس اس پی* درصد تقارب ۹۷ درصد، سویه C2 مربوط به *نیتراتیرداکتور*[2] درصد تقارب ۹۹ درصد، سویه D1 مربوط به *سالجنتی باکتر اس پی*[3] با درصد تقارب ۹۹ درصد است.

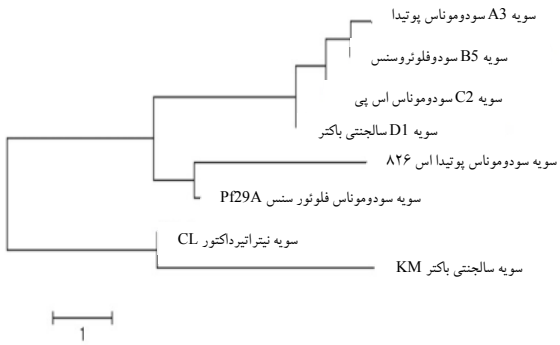
### ۳-۶- درخت فیلوژنی

توالی‌های حاصل از سویه‌های جداسازی شده، همراه با توالی سویه استاندارد در نرم‌افزار MEGA-4 وارد شد، قرابت و نزدیکی سویه‌ها به‌صورت درخت فیلوژنی به‌دست آمد (شکل ۳).

[1] *Pseudomona sp*
[2] *Nitratireductor sp*
[3] *Salegentibacter sp*




**شکل ۲**- اثر غلظت فنل بر روی رشد چهار سویه باکتری‌های تجزیه‌کننده




**شکل ۳**- فیلوژنی باکتری های برتر تجزیه‌کننده فنل

طبق آخرین گزارش‌ها در مقالات علمی، سویه‌های باکتریایی فراوانی شناخته شده‌اند که می‌توانند از هیدروکربن‌های آروماتیک به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند. باکتری‌های مختلفی از جنس‌های گوناگون به‌عنوان تجزیه کننده فنل جداسازی شده‌اند. اکثر این باکتری‌ها، باکتری‌های گرم منفی هستند که عمدتاً متعلق به خانواده *سودوموناس*[1] می‌باشند [۱۶]. در ادامه به برخی از این تحقیقات اشاره می‌شود.

محیطه و همکاران در سال ۲۰۱۰ باکتری‌های هوازی را از خاک آلوده به ترکیبات زنوبیوتیک[2] با استفاده از روش غنی‌سازی به‌وسیله فنل به‌عنوان منبع کربن و انرژی جداسازی کردند. باکتری خاک به‌عنوان *استرپتوکوکوس اپی درمیس*[3] شناسایی شد. این باکتری قادر به به تجزیه فنل تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود[ ۱۷]. در پژوهش یاد شده، باکتری مذکور جداسازی نشد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی ندارد.

لو و همکاران در سال ۲۰۰۹ باکتری‌های تجزیه‌کننده ۴-کلروفنل را از آب رودخانه *کین‌هور*[4] جداسازی کردند. باکتری‌های جدا شده به‌عنوان *مایکوپیانا*[5]، *آلکالیجنس*[6] *سودوموناس* و *فلاوباکتریوم*[7] شناسایی شدند[ ۱۸]. تحقیق جاری نیز باکتری *سودوموناس* از پساب کارخانه گل‌گهر جدا شد که با نتایج تحقیق حاضر تطابق دارد.

حسن‌شاهیان و همکاران در سال ۲۰۰۷ باکتری‌های تجزیه کننده فنل را در خاک آلوده به این ماده جداسازی و شناسایی

[1] *Pseudomonas*

[2] Xenobiotic
[3] *Streptococcus Epidermis*
[4] *Qinhuair*
[5] *Mycopiana*
[6] *Alcaligenes*
[7] *Flavobacterium*

کردند. تمام ایزوله‌ها ۰/۲ گرم در لیتر فنل را مصرف نموده و به‌عنوان گونه‌های *سودوموناس* شناسایی شدند [۱۹]. در تحقیق حاضر نیز *سودوموناس* جدا شده از پساب کارخانه گل‌گهر بیشترین فراوانی را داشت و تمام ایزوله‌ها ۰/۲ گرم در لیتر فنل را مصرف نموده و به‌عنوان گونه‌های *سودوموناس* شناسایی شدند.

کفیل‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ تجزیه زیستی فنل را در دریاچه پریشان مورد بررسی قرار دادند. باکتری‌های *سودوموناس*، *آسینتوباکتر*[1]، *کلبسیلا*[2]، *سیتروباکتر*[3] و *شیگلا*[4] به‌ترتیب غالب‌ترین باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل در این دریاچه بودند. *سودوموناس* و *آسینتوباکتر* بیشترین توانایی را درتجزیه فنل داشتند. تمام باکتری‌های جداشده در غلظت ۰/۲گرم در لیتر فنل بیشترین جذب نوری را نشان دادند [۱۶]. در تحقیق مذکور باکتری *سودوموناس* به‌عنوان قوی‌ترین باکتری تجزیه‌کننده فنل تعیین شد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

موحدیان و همکاران در سال ۲۰۰۹ به شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده فنل در لجن فعال با استفاده از تکنیک PCR پرداختند. نتایج نشان داد از ۱۰ ایزوله ۶ ایزوله به‌عنوان *سودوموناس پوتیدا*[5] تعیین شدند. بهترین باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل که مقدار ۵۰۰ تا ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون تجزیه کردند، متعلق به سویه‌های باکتری مذکور بود. میزان حذف فنل با میزان رشد باکتری‌های جداشده ارتباط داشت. به‌طوری که بیشینه رشد باکتری‌ها (بیشترین جذب نور در ۶۰۰ نانومتر) در غلظت ۵۰۰ تا ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل اتفاق افتاد[۲۰]. در تحقیق جاری نیز *سودوموناس اس پی* به‌عنوان غالب‌ترین باکتری تجزیه‌کننده فنل تعیین شد و مقدار بیشینه رشد باکتری‌ها با بیشینه غلظت تجزیه فنل در باکتری‌های مختلف رابطه داشت. به‌طوری که بیشینه برای هر باکتری در حداکثر غلظت تجزیه به‌وسیله آن مشاهده شد.

کوتنی و همکاران در سال ۲۰۰۳ طی تحقیقی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل را از خاک‌های سیبری جداسازی کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که جنس غالب در تجزیه فنل در این خاک‌ها *سودوموناس* و به‌ویژه گونه *پوتیدا* است [۵]. در تحقیق حاضر نیز جنس غالب در تجزیه فنل در پساب کارخانه گل‌گهر، *سودوموناس* بود.

جنس‌های باکتریایی تجزیه‌کننده فنل که به‌وسیله سایر محققان جداسازی و شناسایی شده‌اند، همخوانی و شباهت زیادی با جنس‌های گزارش شده در این تحقیق دارند. به‌عنوان مثال جنس *سودوموناس* توسط محققان دیگر نیز جداسازی و شناسایی و گزارش شده‌اند. اما نکته جالب و نوآوری تحقیق حاضراین است که دو جنس به‌عنوان باکتری تجزیه کننده فنل در این تحقیق شناسایی شد که قبلاً توسط محققین مطرح و گزارش نشده بودند این دو جنس عبارتنداز *نیتراتیرداکتور* و *سالنجنتی باکتر*. در این تحقیق برای اولین بار اثبات کردیم که این دو باکتری می‌توانند فنل را نیز مورد استفاده قرار دهند.

*نیتراتیرداکتور* یک باکتری میله‌ای گرم منفی، هوازی اختیاری و هتروتروف است و دمای مناسب رشد آن ۳۰ درجه سلسیوس است. این باکتری از لحاظ فیلوژنی نزدیک به خانواده *سودوموناس*ها است و شباهت زیادی بین آنها با جنس *سودوموناس* وجود دارد؛ اما تفاوت مهم آن با *سودوموناس* رشد در شرایط بی‌هوازی است. این باکتری به‌عنوان یک باکتری احیا کننده نیترات در اکوسیستم‌های غرقابی شناخته شده است و در خصوص فعالیت تجزیه زیستی آن گزارش‌های کمی وجود دارد به‌طوری که در خصوص ترکیبات آروماتیک هیچ گزارشی نیست[۲۱].

*سالجنتی‌باکتر* یک باکتری هوازی، هتروتروف و میله‌ای گرم منفی است. این باکتری غیر متحرک است و پیگمان زرد رنگ تولید می‌کند. این باکتری قادر است از ترکیبات آلکانی نفت به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کند. تاکنون گزارش‌های کمی در خصوص تجزیه ترکیبات آروماتیک مثل فنل و نفتالین در مورد این باکتری وجود دارد [۲۲].

## ۴- نتیجه‌گیری

در پساب مناطق صنعتی که آلوده به ماده سمی فنل در غلظت‌های بالا هستند نیز باکتری‌هایی وجود دارند که رشد کرده و قادرانند تجزیه زیستی فنل را انجام دهند. افزایش غلظت فنل در محیط با افزایش سطح مقاومت باکتری‌های موجود همراه است و در طی رشد در صورتی که باکتری، منبع کربنی به‌جز فنل در دسترس نداشته باشد، از فنل به‌عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط استفاده می‌کند. اکثر جدایه‌هایی که در پساب‌های آلوده به فنل وجود داشتند و قادر به تجزیه فنل بودند، باسیل‌ها و کوکو باسیل‌های گرم منفی بودند که در این تحقیق نیز باکتری‌های مورد نظر از باسیل‌ها و کوکوباسیل‌های گرم منفی شناسایی شد. با استفاده از این باکتری‌های مقاوم و ایجاد شرایط بهینه تصفیه زیستی می‌توان با صرف هزینه کمتر و مشکلات محیط‌زیستی

---

1 *Acinetobacter*
2 *Klebsiella*
3 *Citrobacter*
4 *Shigella*
5 *Pseudomonas putida*

کمتر ناشی از بقایای تصفیه یک ماده خطرناک، پساب‌های آلوده به این ترکیب کربنه را پالایش کرد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل پراکندگی وسیعی در پساب کارخانه گل‌گهر دارند. جنس‌های تجزیه‌کننده فنل جداسازی شده عمدتاً دارای توانایی بالقوه‌ای در تجزیه فنل می‌باشند. با بررسی مطالعات انجام شده و همچنین نتایج حاصل از تحقیق حاضر این نتیجه به‌دست می‌آید که باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل عمدتاً متعلق به جنس *سودوموناس* است

## ۵- مراجع


1. Environmental Protection Agency. (2004). *Collation of toxicological data and intake values for humans*, EPA. Report, USA. 44-64.
2. Veglio, F., Esposito, A., and Reverberi, A. (2003). "Standardization of heavy metal adsorption test." *J. Process Biochem.*, 38, 953-961.
3. Boopathy, R.(2000)."Factors limiting bioremediation technologies." *J. Bioresource Tech*., 74, 63-67.
4. Ren, S., and Frymier, P. (2003). "Toxicity estimation of phenolic compounds by bioluminescent bacterium." *J. Environmental Metal Engin*., 129, 328-335.
5. Koutny, M., Ruzicka, J., and Chlachula, J. (2003). "Screening for phenol- degrading bacteria in the pristine soils of south stoene." *Applied Soil Ecology*, 23(1), 79-83.
6. Herman, H., Muller, C., Schimdt, I., and Hahnake, K. (1995). "Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas Putida strain H*. molecular and general genetics." *J. Microbiological Rev*., 247, 240-246.
7. Rahman, K., Thahira, J., and Banat, I. (2002)."Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium." *J. Bioresearch Tech*., 85, 251-257.
8. Hogg, T., and Heury, J. (1984). "Comparison and extracts with the saturation extracts in estimating salinity in Liberia Ewan soils." *J. Canadian Soil Science*, 64, 699-704.
9. Rhoades, J. (1986). "Cation exchange capacity." Page, A. C. (Ed.), *Methods of soil analysis*, part 2, American Society Agronomy.
10. Alef , K., and Nanniper, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Academic Pub., New York.
11. Caruso, G., Cappello, S., Zampino, D., Monticelli, L., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M., Yakimov, M., and Giuliano, L. (2007). "Microbial community dynamics during assays of harbor oil spill bioremediation, microscale simulation study." *J. Appl.Microbiol*, 102(1),184-194.
12. Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., and Yakmov, M. (2006). "Predominant growth of Alcanivorax during experiments on oil spill bioremediation in mesocosms." *Microbiology Research*, 162, 185-190.
13. Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular cloning III: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1115.
14. Godjevargova, T., Ivanova, D., Alexiva, Z., and Dimova, N. (2003). "Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production wastewater by free and immobilized trichosporon cutaneum R57. " *Process Biochemistry*, 38, 915-920.

15. Rao, J.R., and Viraraghavan, T. (2002). Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass." *Bioresource Technology*, 85(2), 165-171.
16. Kafilzadeh, F., Farhangdoost, M., Rezaeian, A., and Mahjour, A.(2009). "Assessment of bioremediation of phenol using native bacteriaisolated from water and sediments of ParishanLake." *J. Microb World*, 2(2), 89-95.
17. Mohite, B., Jalgaonwala, R., Pawar, S., and Morankar, A.(2010). "Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil." *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7, 61-65.
18. Lu, G., Wang, C., and Sun, Z.( 2009). "Biodegradation of complex bacteria on phenolic derivatives in river water." *Biomed. Environ Sci*., 22(2), 112-117.
19. Hassanshahian, M., Golbang, N., and Emtiazi, G. (2007). "Isolation and molecular determination of phenol degrading bacteria." *Res. J. Univers Isfahan Sci*., 28, 1-8.
20. Movahedyan, H., Khorsandi, H., Salehi, R., and Nikaeen, M. (2009). "Detection of phenol degrading bacteria and Pseudomonas putida in activated sludge bypolymerase chain reaction." *Iran J. Environ Health Sci. Eng*., 6(2), 115-120.
21. Normand, L., Serge, P., and Richard, V. (2004). "Nitratireductor aquibiodomus gen. nov., sp. nov.,a novel a-proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome(Canada)." *Inter. J. System Evol. Microbiol*., 54, 26-273.
22. Ying, J., Liu, Z., Wang, B., Xin Dai, S., and Yang, Shuang, J. (2007). "Salegentibacter catena sp. nov., isolated from sediment of the South China Sea, and emended description of the genus Salegentibacter." *Inter J. System Evol Microbiol*, 57, 219-222.