پالایش پساب آلوده به فنل به‌وسیله گونه‌ای از باکتری *پانی باسیلوس*

سمیه اسکندری[1] مهران هودجی[2] آرزو طهمورث‌پور[3]

(دریافت ۹۱/۹/۱۲ پذیرش ۹۲/۱/۳۱)

چکیده

فنل و ترکیبات آن برای محیط زیست حتی در مقادیر کم، موادی سمی و خطرناک محسوب می‌شوند لذا حذف این ترکیبات از پساب‌ها توجه محققان زیادی را به خود جلب کرده است. روشهای زیادی برای تجزیه فنل وجود دارد که بهترین روش، تصفیه زیستی است. در این تحقیق با هدف بررسی امکان وجود باکتری‌های تجزیه کننده فنل در پساب حاوی فنل اقدام به جداسازی جدایه‌های بومی تجزیه کننده این ترکیب، شناسایی جدایه برتر، بررسی روند رشد و حذف فنل به‌وسیله این جدایه و در نهایت شناسایی این جدایه با استفاده از روش واکنش زنجیری پلیمراز شد. نتایج نشان داد بهترین جدایه تجزیه کننده فنل گونه‌ای از *پانی باسیلوس* است که می‌تواند مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در طی مدت زمان ۹۶ ساعت به صفر برساند. نتایج این تحقیق تأکیدی بر استفاده باکتری‌های بومی برای حذف مقدار بالای فنل از محیط آلوده به این ترکیب است.

واژه‌های کلیدی: واکنش زنجیری پلیمراز، جداسازی، باکتری بومی

Reclamation of Phenol Contaminated Wastewater by *Paenibacillus sp.*

S. Eskandari [1] M. Hoodaji[2] A. Tahmoores Pour[3]

(Received Dec. 2, 2012 Accepted Apr. 20, 2013)

Abstract

Phenol and its compounds are toxic and hazardous material for environment even in low concentrations. So removal of these compounds from wastewaters is very important. There are many methods for removal of phenol from contaminated wastewaters among which biodegradation is more attractive. In this study presuming the availabity of phenol degrading-bacterium in phenolic wastewater, indigenous bacterium were isolated and identified by PCR. The growth curve and phenol removal of this bacterium were prepared. Results showed that the best isolated was the stain of *Paenibacillus* that can remove 1000 $mg.l^{-1}$ phenol during 96 hours. The results showed that indigenous bacterium can remove high concentration of phenol from contaminated wastewater.

Keywords: Polymerase Chain Reaction, Isolation, Indigenous Bacterium.

۱- دانشجوی دکترای خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان (نویسنده مسئول) ۶۲۶۰۸۶۸ (۰۳۱۱) eskandary.s@gmail.com
۲- دانشیار گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان
۳- استادیارگروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان

1. Ph. D. Student of Soil Sciences, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan (Corresponding Author) (+98 311) 6260868 eskandary.s@gmail.com
2. Assoc. Prof. of Soil Sciences, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan
3. Assist. Prof. of Microbiology, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan

۱- مقدمه

در قرن بیستم پیشرفت سریع کارخانه‌ها و صنایع شیمیایی متعدد باعث مدرنیزه شدن زندگی شده‌اند اما تولید ترکیبات شیمیایی مختلف که از پیامد این پیشرفت‌هاست تهدید جهانی برای محیط زیست محسوب می‌شود. این ترکیبات شامل پلی کلرو بی‌فنیل‌ها (PCBs)، تری کلرو اتیلن (TCE)، پروکلرو اتیلن (PCE)، تری نیتروتولوئن (TNT) و غیره هستند که دارای سمیت ویژه بوده و مقاوم به تجزیه می‌باشند و از طریق شبکه غذایی تجمع می‌یابند [۱].

فنل و مشتقات آن به‌طور وسیعی برای ساخت رزین‌ها، پلاستیک‌ها، سورفکتانت‌ها، محافظت کننده‌های چوب، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، رنگ‌ها، آنتی اکسیدانت‌ها، واسطه‌های فعال سطحی، مواد دارویی، چاشنی‌ها و عطرها استفاده می‌شوند. تولید کننده‌هایی که خروجی آنها محتوی فنل است شامل کارخانجات زغال سنگ و پتروشیمی می‌باشند [۲و۳].

ترکیبات فنلی در محیط زیست اثرات مضری همچون کاهش رشد موجودات زنده، کاهش مقاومت در برابر بیماری‌ها، مرگ و میر موجودات آبزی و افزایش رشد گیاهان هرز را ایجاد می‌کند و چنانچه آلودگی فنلی به آبهای زیرزمینی راه پیدا کند، مسائل اکولوژیکی جدی را ایجاد خواهد نمود، به‌همین دلیل مقدار مجاز فنل در خروجی صنایع نباید از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشتر باشد [۴].

برای تصفیه پسابهای حاوی فنل، روشهای متعددی وجود دارد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به اکسیداسیون شیمیایی، جذب سطحی، تصفیه بیولوژیکی و ترکیبی از روشهای مذکور اشاره کرد [۵ و۶].

در بین روشهای بیان شده، سیستم‌های بیولوژیکی به‌دلیل مزایای خاصی که نسبت به سایر روشها دارند بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. از مزایای عمده این روشها سازگاری بیشتر آنها با محیط زیست و بی‌خطر بودن آنها است [۷].

تصفیه زیستی فنل به‌وسیله باکتری‌ها در طی تحقیقات زیادی بررسی شده و باکتری‌های متنوعی بر حسب مقدار فنل و خصوصیات فیزیولوژیکی جداسازی و بررسی شدند [۸].

مطالعات نشان داده است که فنل به‌عنوان یک منبع کربن و یا انرژی برای باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد و در نهایت به آب و دی اکسید کربن تبدیل می‌شود [۹]. این مطالعات همچنین نشان داده است که در صورتی که باکتری منبع کربن دیگری به غیر از فنل در دسترس نداشته باشد و در طی مدت زمان نسبتاً طولانی در محیط حاوی فنل قرار بگیرد می‌تواند با توجه به خصوصیات ژنتیکی، خود را با شرایط سازش داده و سبب پالایش هر چه بیشتر فنل از محیط شود [۱۰].

از آنجا که بهترین روش برای حذف فنل از محیط زیست، پالایی و استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده این ترکیب است لذا در این تحقیق تلاش شد که با شناسایی یک باکتری بومی از پساب آلوده به فنل، باکتری تجزیه کننده جدیدی که توانایی حذف فنل را در غلظت بالا در مدت زمان کوتاهی دارا است برای حذف این ترکیب از محیط معرفی گردد. با این هدف، نخست اقدام به جداسازی جدایه‌های بومی از پساب آلوده گردید و سپس روند رشد و حذف فنل به‌وسیله این جدایه بررسی شد. در نهایت این جدایه با استفاده از روش واکنش زنجیری پلیمراز[1] شناسایی و در سایت NCBI[2] ثبت گردید.

۲- مواد و روشها

در این تحقیق برای بررسی اهداف در نظر گرفته شده ابتدا اقدام به تهیه یک نمونه پساب آلوده به فنل از بخش کک سازی کارخانه ذوب‌آهن اصفهان گردید. این پساب دارای غلظت زیادی از فنل بود که به‌صورت یک سیکل بسته در سیستم مورد استفاده قرار می‌گیرد و خروجی به محیط بیرون ندارد.

۲-۱- نمونه‌برداری از پساب

سه نمونه پساب از ورودی استخر فنل که اضافه پساب بخش کک‌سازی کارخانه ذوب آهن به آن ریخته می‌شد تهیه گردید و در ظرفهای اسیدشویی و استریل شده بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-۲- مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق

در این تحقیق سعی شده از مواد شیمیایی با درصد خلوص بسیار بالا و ساخته شده در کارخانه‌های مرک[3] و سیگما[4] استفاده گردد. جدول ۱ مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق را نشان می‌دهد.

۲-۳- شمارش تعداد باکتری هتروتروف

تعداد باکتری‌های هتروتروف به‌روش گسترش بر روی پلیت در ۹ رقت و با سه تکرار در محیط کشت نوترینت آگار انجام گردید [۴].

۲-۴- اندازه‌گیری فنل در نمونه

در اندازه‌گیری فنل از معرف گیبس استفاده شد به این صورت که به هر نمونه ۱۵۰ میلی‌لیتری که در دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شده بود، ۳۰ میلی‌لیتر بیکربنات سدیم یک

[1] Polymerase Chain Reaction (PCR)
[2] National Center for Biotechnology Information
[3] Merck
[4] Sigma aldrich

جدول ۱- مواد شیمیایی در این تحقیق

نام ماده	کارخانه سازنده	نام ماده	کارخانه سازنده
محیط کشت نوترینت آگار	مرک	کلرید آمونیوم	مرک
بی کربنات سدیم	مرک	کلرید کلسیم یک آبه	مرک
معرف گیبس	سیگما	سولفات منیزیم	مرک
فسفات سدیم	مرک	سولفات آهن یک آبه	مرک
سولفات منگنز یک آبه	مرک	کیت استخراج DNA	سینا کلون
فنل	مرک	کیت PCR	سینا کلون
آگار	مرک	آگارز	مرک

مولار و ۲۰ میلی‌لیتر از معرف گیبس اضافه شد و غلظت فنل به‌صورت رنگ‌سنجی در طول موج ۶۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد [۱۱].

۲-۵- غنی‌سازی، جداسازی و خالص‌سازی باکتری تجزیه کننده فنل

عمل غنی‌سازی تمامی باکتری‌های تجزیه کننده فنل در لوله‌های در پیچ دار حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه که حاوی ۵/۳۵ گرم فسفات سدیم، ۲/۶۷ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۰۰۶ گرم کلرید کلسیم یک آبه، ۰/۰۰۶ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۲۴ گرم سولفات آهن یک آبه، ۰/۰۰۹ گرم سولفات منگنز یک آبه در آب مقطر که حاوی یک گرم فنل بود، به‌صورت سه تکرار انجام شد. لوله‌ها بر روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. هر روز به‌مدت یک دقیقه در حالی که لوله‌ها بر روی شیکر بودند از طریق نیمه باز کردن در لوله‌ها، هوادهی انجام می‌شد[۱۲-۱۴].

در پایان هر هفته در صورت مشاهده کدورت در محیط کشت تلقیح به محیط جدید صورت می‌گرفت و این مرحله سه مرتبه تکرار شد. پس از مرحله غنی‌سازی، خالص سازی باکتری‌های تجزیه کننده با کشت باکتری‌ها بر روی محیط کشت جامد صورت گرفت، به این صورت که از هر لوله حاوی محیط کشت که دارای کدورت باکتریایی بود، رقت‌های مختلفی تهیه شد و بر روی محیط کشت پایه آگار و فنل دار کشت شد و کلنی‌های تک جداسازی و به لوله‌های حاوی محیط کشت فنل دار به‌صورت جداگانه منتقل شدند [۱۱].

۲-۶- انتخاب یک جدایه از میان جدایه‌های جداشده

پس از جدا نمودن جدایه‌های باکتریایی، به‌منظور غربال بهترین و قوی‌ترین جدایه، آنها را در محیط کشت مایع فنل دار در محدوده غلظت استفاده شده در مبحث جداسازی، کشت داده و جدایه‌هایی که در حداقل زمان ممکن (۲۴ ساعت) شروع به رشد نمود و همچنین از حداکثر کدورت در مجاورت فنل برخوردار بودند، به‌عنوان جدایه میکربی مناسب انتخاب گردیدند [۱۱].

۲-۷- منحنی رشد و حذف فنل توسط جدایه مورد نظر

منحنی رشد و حذف فنل جدایه مورد نظر که توانایی رشد بر روی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را داشت به‌صورت کدورت سنجی به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر در فاصله‌های زمانی مشخص رسم شد [۱۵].

۲-۸- روش شناسایی جدایه

پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باکتری‌ها توسط میکروسکوپ نوری اقدام به شناسایی جدایه توسط روش PCR با استفاده از پرایمر همگانی 16S rDNA گردید. در این روش ابتدا DNA باکتری به‌وسیله کیت استخراج DNA (شرکت سینا کلون) استخراج گردید، سپس حدود ۱۵۸۰ باز محدوده ژن 16S rDNA به‌وسیله پرایمر جهانی (F27(5-AGCGGTCCAGAGTTTTCCTGG-3 و (R1492(5-CTCTCTGCAGCCCTTGTTACG-3 تعیین گردید. مراحل تکثیر قطعه مورد نظر به‌وسیله PCR انجام شد.

برای انجام PCR در ابتدا یک محلول مادر با غلظت‌های PCR Buffer 10X (۱۰۰ میکرولیتر)، $MgCl_2$ 50mM (۴۰ میکرولیتر)، dNTP mix 10mM (۲۰ میکرولیتر) و آب مقطر تزریقی (۸۴۰ میکرولیتر) تهیه گردید. مقدار ۲۱ میکرولیتر از محلول مادر با ۲ میکرولیتر از نمونه DNA و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و همچنین ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم اسمار تک پلیمراز در میکروتیوپ‌های ۰/۵ میلی‌لیتری مخصوص PCR مخلوط شد و در دستگاه قرار داده شد. برنامه دمایی دستگاه به‌صورت، جداسازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، جداسازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته تک DNA در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ ثانیه، پیشروی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، به‌صورت ۳۰ سیکل و در نهایت تکثیر در دمای ۷۲ درجه

سلسیوس به مدت ۱ دقیقه تنظیم گردید. در نهایت برای بررسی خلوص محصول PCR و طول باند به‌دست آمده، نمونه مورد نظر بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت[۱۶].

۲-۹- بررسی حداکثر غلظت فنل ممانعت کننده از رشد جدایه

به‌منظور تعیین حداقل و حداکثر غلظت تأمین کننده رشد یا بازدارنده از رشد در مورد هر جدایه مبادرت به تهیه شیب غلظت از فنل در محیط مایع به‌صورت ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل شد. سپس با استفاده از استاندارد نیم مک فارلند تعداد $۱/۵\times۱۰^{۷}$ باکتری در هر میلی‌لیتر به هر لوله حاوی محیط کشت پایه تلقیح شد و زمان ایجاد کدورت هر لوله ثبت شد [۱۱].

۳- نتایج و بحث

به‌منظور جداسازی گونه‌هایی از باکتری که قادر به رشد در محیط فنل‌دار و تجزیه فنل بودند از پساب آلوده به این ترکیب استفاده شد که پس از انتقال به آزمایشگاه، برخی خصوصیات شیمیایی آن اندازه‌گیری و در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول۲- آنالیزهای انجام شده بر روی نمونه پساب

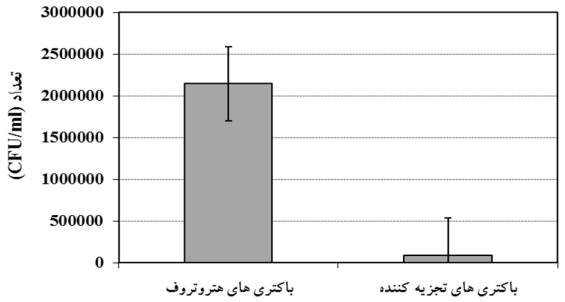
پارامتر	مقدار
اسیدیته	۷/۵۶
BOD	۳۲۸/۳(mg/L)
COD	۱۲۷۹/۳(mg/L)
غلظت فنل	۱۲۰۷(mg/L)

بررسی پارامترهای BOD و COD و همچنین اسیدیته برای بررسی امکان وجود شرایط مساعد برای رشد باکتری‌ها لازم به نظر می‌رسد. چنانچه از نتایج جدول ۱ استنباط می‌شود مقدار COD و BOD این پساب بسیار بالا است و شرایط را برای حضور باکتری‌های هوازی سخت‌تر می‌کند[۱۷].

تحقیقات نشان داده است که تجزیه فنل توسط باکتری‌ها به‌شدت تحت تأثیر دما و اسیدیته محیط است. چنانچه آنادوریا و همکاران در سال ۲۰۰۴ در طی بررسی رفتار *سودوموناس پوتیدا* و لجن فعال به‌منظور تجزیه زیستی فنل به این نتیجه رسیدند که اگر میزان اسیدیته برابر ۷ و دما برابر ۳۰ درجه سلسیوس باشد در این صورت به بهترین نحو تجزیه فنل توسط ترکیب لجن فعال و *سودوموناس* صورت خواهد گفت [۱۸]. در پساب مورد مطالعه نیز اسیدیته در محدوده خنثی و برابر ۷ است که این نشان می‌دهد شرایط برای حضور میکروارگانیسم‌ها مهیا بوده است. همچنین در طی مراحل آزمایش نیز در محیط کشت، اسیدیته در حد خنثی نگه‌داشته شده است.

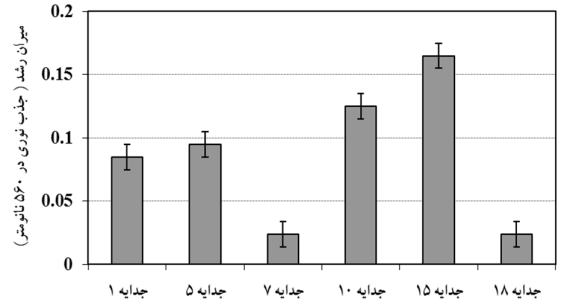
مقدار فنل نیز در این پساب چندین برابر استانداردهای بین المللی که برای میزان فنل در پساب‌های صنعتی تعریف شده است، می‌باشد. لذا با توجه به اثرات زیست محیطی خطرناک فنل و غلظت بالای آن در این پساب لزوم تصفیه آنرا قبل از ورود به محیط زیست نشان می‌دهد [۱۷].

برای بررسی درصد باکتری‌های تجزیه کننده اقدام به شمارش باکتری‌های هتروتروف و تجزیه کننده گردید. نتایج این بخش از تحقیق نشان می‌دهد که حدود ۴ درصد از کل باکتری‌های هتروتروف می‌توانند از فنل به‌عنوان منبع کربن استفاده کرده و درحضور آن رشد کنند. شکل ۱ تعداد باکتری هتروتروف و تجزیه کننده را در یک میلی‌لیتر از پساب آلوده نشان می‌دهد.



شکل ۱- تعداد باکتری هتروتروف و تجزیه کننده فنل در یک میلی‌لیتر از پساب آلوده

در مرحله جداسازی اقدام به جداسازی جدایه‌هایی گردید که قادر به رشد در کوتاه‌ترین زمان ممکن در مجاورت فنل بودند. اندازه‌گیری تراکم سلول باکتری پس از ۲۴ ساعت نشان داد که از میان ۶ جدایه جداسازی شده به‌عنوان جدایه‌های تجزیه کننده فنل ۴ جدایه که بیشترین رشد و در نتیجه بالاترین جذب نوری را نشان دادند به‌عنوان جدایه‌های مقاوم انتخاب شدند. نتایج این قسمت در شکل ۲ ارائه شده است.

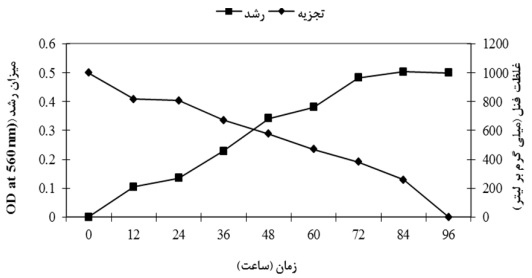


شکل ۲- رشد جدایه‌های تجزیه کننده فنل در محیط کشت حاوی فنل پس از ۲۴ ساعت و انتخاب جدایه برتر

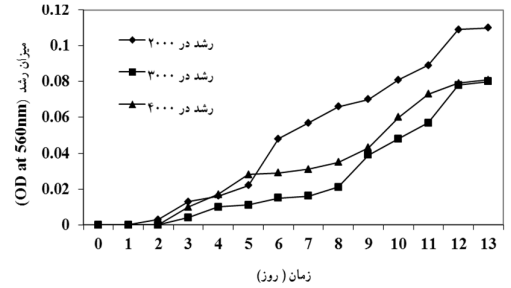
در تحقیقات دیگری که به موازات این تحقیق صورت گرفت جدایه‌های ۱، ۱۰ و۱۵ بررسی شدند و در این تحقیق تنها به بررسی روند رشد و تجزیه فنل در مورد جدایه ۵ پرداخته شد [۴].

منحنی رشد جدایه مورد نظر در شکل ۳ نشان داده شده است. این منحنی به‌صورت لگاریتمی سه فاز دوره رشد باکتری را به‌خوبی نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود جدایه پس از یک فاز تأخیری ۶ ساعته (فاز lag) به سرعت رشد کرده (فاز نمایی) و به سکون می‌رسد (فاز سکون).

منحنی تجزیه فنل این جدایه نیز در محیط کشت حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل بررسی گردید. چنانچه در شکل مشاهده می‌شود این جدایه در طی ۹۶ ساعت توانست مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را به صفر برساند. گلبانگ و همکاران نیز در سال ۱۳۸۳ در تحقیق مشابهی بر روی این پساب، گونه *سودوموناس پوتیدا* را به‌عنوان باکتری تجزیه کننده فنل شناسایی کردند که میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در طی مدت زمان ۴۸ ساعت به صفر رساند [۱۹].



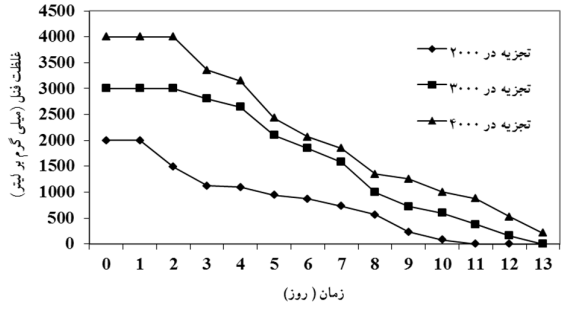
شکل ۳- منحنی رشد و تجزیه جدایه برتر در ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل



شکل ۴- منحنی رشد جدایه برتر در ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل

در بررسی حداقل و حداکثر غلظت ممانعت کننده از رشد جدایه مشاهده شد که جدایه در مقدار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل پس از یک فاز تأخیری یک روزه رشد کرده و فنل را تجزیه می‌کند در حالی که در ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، رشد با ۲ روز تأخیر و در ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل رشد تا ۳ روز به تأخیر افتاده ولی در نهایت جدایه رشد کرده و فنل را تجزیه می‌کند. اما در غلظت‌های بیشتر، یعنی در ۶۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، سلول باکتری از بین می‌رود و رشد صورت نمی‌گیرد. شکل ۴ نتایج مربوط به افزایش غلظت اولیه فنل و تأثیر آن بر فاز تأخیری جدایه را نشان می‌دهند. نتایج مشابهی در مورد افزایش فاز تأخیری رشد باکتری با افزوده شدن غلظت اولیه فنل توسط ریگو و آلج در سال ۲۰۰۴ و روبرت و همکاران در سال ۱۹۸۷ گرفته شد [۲۰ و ۲۱].

بررسی تجزیه فنل در غلظتهای بیشتر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نشان داد که با دو برابر شدن مقدار اولیه فنل تجزیه آن توسط باکتری از ۴ روز به ۱۰ روز به طول می‌انجامد و با سه و چهار برابر شدن غلظت اولیه آن، باکتری برای تجزیه کامل فنل به‌ترتیب به ۱۳ و ۱۴ روز زمان نیاز داشت. شکل ۵ نتایج مربوط به افزایش غلظت اولیه فنل و افزایش مدت زمان مورد نیاز برای تجزیه را نشان می‌دهد. تأثیر افزایش غلظت اولیه فنل در مدت زمان تجزیه این ماده در تحقیق مشابهی که توسط گنزالز و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، بررسی شد. آنها تجزیه زیستی فنل را در یک محیط کشت تلقیح شده با *سدوموناس پوتیدا* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که با افزایش غلظت اولیه فنل توانایی باکتری برای تجزیه کاهش می‌یابد و مدت زمان بیشتری را برای حذف فنل از محیط نیاز دارد [۱۷].



شکل ۵- منحنی تجزیه جدایه برتر در ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

در انتهای این تحقیق برای شناسایی جنس جدایه مورد نظر اقدام به بررسی خصوصیات فنوتیپیک آن به‌وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی گردید و در نهایت گونه جدایه به‌وسیله روش مولکولی PCR مشخص شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که این جدایه از جمله باکتری‌های گرم مثبت اسپور دار و از جنس *پانی باسیلوس* است. همچنین نتایج PCR این جدایه را با حدود ۹۹ درصد شباهت ژنتیکی *پانی باسیلوس دندریتیفورمیس*[1] تعیین کرد. این نتایج در جدول ۳ ارائه شده است.

[1] *Paenibacillus Denderitiformis*

جدول ۳- خصوصیات فنوتیپیک جدایه برتر

خصوصیت جدایه	نتیجه
شکل باکتری	*باسیل*
رنگ آمیزی گرم	+
زیستگاه	خاک و آب
تولید اسپور	+
اکسیداز	+
کاتالاز	+
سیترات	–
اسید از قند مانیتول	–
آزمون VP	-
رشد بر روی مک کانکی	–
رشد بی هوازی	+
نیترات	–
آزمون اوره	+
ایندول	+
رشد در ۵۰ درجه سانتی گراد	–
رشد بر روی ۲٪ کلرید سدیم	+
٪۵	+
تجزیه فنل	+
شناسایی به‌وسیله PCR	*پانی باسیلوس دنتریفرمیس*
شماره دسترسی در سایت NCBI	KF188437.1

در سال ۲۰۱۱ چاندرا و همکاران دو باکتری *پانی باسیلوس تیامینولیتیکوس* و *باسیلوس سرئوس* را از لجن آلوده یک کارخانه در هند جداسازی کردند که توانایی حذف فنل را از ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل در مدت زمان ۱۴۴ ساعت به‌ترتیب به ۵۱ و ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حضور ۱ درصد گلوکز در محیط کشت دارا بودند و کارایی ۸۴/۷۵ درصد را در حذف فنل نشان دادند. همچنین در این تحقیق بیان شده است که باکتری بدون وجود منبع کربنه دیگری (مانند گلوکز) توانایی تجزیه فنل را ندارد [۲۲]. باکتری *پانی باسیلوس* جداسازی شده در تحقیق حاضر از گونه *دندریتیفورمیس* است که بدون وجود هیچ منبع کربنه دیگری در محیط کشت پایه معدنی قادر است غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در مدت زمان ۹۶ ساعت به صفر برساند و کارایی ۱۰۰ درصد را در حذف این ماده نشان دهد.

یانگ و لی در سال ۲۰۰۶ اقدام به جداسازی و خالص‌سازی *سدوموناس رزینوورانس* و *براوی باسیلوس* کردند و نشان دادند که *سدوموناس* در محیط کشت حاوی ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل با فاز تأخیری ۲ روزه رشد کرده و قادر است این مقدار فنل را در مدت زمان ۵۷ ساعت به صفر برساند در حالی که *براوی باسیلوس* در غلظت اولیه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل برای حذف مدت زمان ۹۳ ساعت را نیاز دارد [۲۳]. این در حالی است که در تحقیق حاضر باکتری مورد نظر در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل با فاز تأخیری ۶ ساعته شروع به رشد و تجزیه نمود.

در تحقیقات زیادی باسیل‌های گرم مثبت از جمله جنس *پانی باسیلوس* جداسازی و شناسایی شدند اما اغلب غلظتهای بیشتر از ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را تحمل نکرده، از بین می‌روند و یا اینکه مدت زمانی که برای تجزیه فنل نیاز دارند بیش از ۴ روز است[۲۴و ۲۵]. در سال ۲۰۱۲ زانگ و همکاران باکتری *باسیلوس سرئوس* جداسازی و شناسایی نمودند که تنها قادر است غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در مدت زمان به‌ترتیب ۳۰ و ۸۰ ساعت به صفر برساند [۲۶].

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ توسط نارش و همکاران انجام گردید، باکتری گرم مثبتی از نمونه‌های پساب آلوده به فنل کارخانه پلاستیک‌سازی در هند جداسازی کردند که پس از شناسایی گونه *استافیلوکوکوس آئروس* تشخیص داده شد. این باکتری توانایی تجزیه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در مدت زمان ۴ روز در حضور ۰/۵ درصد گلوکز و ساکارز دارا بود در حالی که اگر هیچ منبع کربن دیگری در محیط کشت وجود نداشته باشد این مقدار فنل را در مدت زمان ۷ روز به ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر می‌رساند. ولی باکتری شناسایی شده در این تحقیق بدون حضور منبع کربن دیگری همین مقدار فنل را در مدت زمان ۴ روز به صفر رساند [۲۷].

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق با بررسی امکان وجود باکتری‌های بومی تجزیه کننده فنل در پساب آلوده اقدام به جداسازی یکی از آن جدایه‌ها و بررسی رفتار رشد و تجزیه آن در محیط کشت فنل دار گردید که تنها منبع کربن آن این ترکیب سمی بود. پس از شناسایی جدایه با استفاده از روش واکنش زنجیری پلیمراز مشخص گردید که جدایه *پانی باسیلوس دندریتیفورمیس* است که به‌راحتی شرایط حضور غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل رشد کرده و آنرا طی مدت زمان ۴ روز از محیط حذف می‌کند. در نهایت این تحقیق لزوم شناسایی جدایه‌های بومی جدید که توانایی حذف غلظت بیشتری از فنل را در مدت زمان کوتاه‌تری دارا باشند، نشان می‌دهد.

۵- مراجع

1. Annadoria, G., Juang, R., and Lee, D. (2002). “Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas Putida* and actived sludge.” *Waste Management*, 22, 703-710.

2. Baker, M.D., and Mayfield, C.I. (1980). "Microbial and nonbiological decomposition of chlorophenols and phenol in soil." *Water, Air and Soil Pollution*, 13, 411-424.
3. Chen, W., Chang, J., and Chang, S. (2004). "Characterization of phenol and trichloroethylene degradation by the rhizobium ralstonia taiwanensis." *J. Research in Microbiology*, 155, 672-680.
4. Eskandary, S., Tahmourespour, A., and Hoodaji, M. (2011). "Investigation of growth and removal of phenol by isolation of bacterium from industrial waste water in vitro." *J. Water and Wastewater*, 78, 78-85. (In Persian)
5. Freeman, H. (1989). *Standard handbook of hazardous waste treatment and disposal*, Mc Graw-Hill, USA.
6. Garrity, G., Brenner, J., and Krieg, R. (2001). *Bergey s manual of systematic bacteriology*, 2nd Ed., Williams and Wilkins.
7. Golbang, M., Shahian, H. M., and Emtiazi, G. (2004). "Effect of phenol concentration on growth respiration and biofilm formation of phenol degradation bacteria in Esfahan steal plant wastewater." *J. Water and Wastewater*, 61, 43-52. (In Persian)
8. Gonzalez, J., Herrera, G., Garcia, M.T., and Pena, M. (2001). "Biodegradation of phenol in a continuous process." *Bioresearches Technology*, 76, 245-251.
9. Zhang, G., Ling, J., Sun, H. , Luo, J., Fan, Y., and Cuia, Z. (2009). "Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading Janibacter anophelis strain JY11." *J. of Hazardous Materials*, 172, 580-586.
10. La, S., and Tabacchioni, S. (2009). "Ecology and biotechnological potential *of Paenibacillus polymyxa:* A mini review." *Indian J. Microbiol,* 49, 2-10.
11. Gardener, M. (2004). "Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus spp*. in agricultural systems." *Phytopathology*, 94, 1252-1258.
12. Neumann, G., Teras, R., Monson, L., Kivisaar, M., Schauer, F., and Heipieper, J. (2004). "Simultaneos degradation of atrazine and phenol by *pseudomonas sp.* Strain ADP: Effect of toxicity and adaptation." *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1907-1912.
13. Ouyang, J., Pei, Z., Lutwick, L., Dalal, S., Yang, L., Cassai, N., Sandhu, K., Hanna, B., Wieczorek, R.L., Bluth, M., and Pincus, M.R. (2008). "Paenibacillus thiaminolyticus: a new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis." *J. Ann. Clin. Lab. Sci*., 38, 393-400.
14. Patterson, J.W. (1975). *Wastewater treatment technology*, Ann. Arbor Science Publishers, Inc.,USA.
15. Pession, E., Divari, S., Griva, E., Cavaletto, M., Rossi, G.L., and Giunta, C. (2000). "Phenol hydroxylase from acinetobacter radioresistensis a multi component enzyme." *Biochemistry Journal*, 265, 162-171.
16. Rehm, H., and Reed, G. (1999). *Biotechnology*, 2nd Ed., Vol. 11a. WIVY-VCH, Weinbeim Germany.
17. Environmental Protection Agency. (2004). *Collation of toxicological data and intake values for humans*, EPA report, USA.
18. Termamoto, M., Ohnishi, K., Harayama, S., and Watanabe, K. (2002). "An rac/xy1s family member at a high level in a hierarchy of regulators for phenol metabolizing enzymesin comamonas testosterone:R5." *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 184, 3941-3946.
19. Shih, C., Davey, M., Zhou, J., Tiedje, J., and Criddle, C. (1996). "Effect of phenol feeding pattern on microbial community structure and co metabolism of trichloroethylene." *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2953-2960.
20. Rigo, M., and Alegre, R.M. (2004). "Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms kinetics of the biodegradation." *Folia Microbiology*, 49, 41-45.

21. Robert, J., Shimpand, F., and Pfaender, K. (1987). “Effect of adaptation to phenol on biodegradation of Mono Substituted Phenol Aquatic Microbial Communities.” *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1496-1499.
22. Chandra, R., Yadva, R. Bharagava, R. and Rai, V. (2011). “Phenol degradation by Paenibacillus thiaminolyticus and *Bacillus cereus* in axenic and mixed conditions.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2939-2947.
23. Yang, C., and Lee, C.M. (2006). “Enrichment, isolation and characterization of phenol-degrading *pseudomonas resinovornas strain P-1* and *brevibacillus sp. Strain P-6*.” *International Biodetrioration and Biodegradation Journal*, 59, 206-210.
24. Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., and Harayama, S. (1998). “Molecular detection , isolation , and physiological characterization of functionally dominant phenol – degrading bacteria in activated sludge.” *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4399-4402.
25. Whiteley, A. S., and Bailey, M. J. (2000). “Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system.” *J. Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2400-2407.
26. Zhang, Y., Lu, D. Ju, T., Wang, L., Lin, Sh., Zhao, Y., Wang, Ch., He, H., and Du, Y. (2013). “ Biodegradation of phenol using *bacillus cereus WJ1* and evaluation of degradation efficiency based on a graphene-modified electrode.” *Int. J. Electrochem. Sci*., 8, 504-519.
27. Naresh, B., Honey, P., and Vaishali, S. (2012). “Biodegradation of phenol by a bacterial strain isolated from a phenol contaminated site in India.” *Research Journal of Environment Sciences*, 1, 46-49.