حذف زیستی فنل به‌کمک باکتری بومی جداسازی شده از خاک منطقه ذوب آهن اصفهان

سمیه اسکندری[1] مهران هودجی[2] آرزو طهمورث پور[3]

(دریافت ۸۹/۱۲/۲۰ آخرین اصلاحات ۹۱/۷/۳۰ پذیرش ۹۱/۸/۲۳)

چکیده

فرایندهای صنعتی از جمله فعالیتهای بشر هستند که سبب تولید حجم بالایی از پساب حاوی آلاینده‌های آلی از جمله فنل و مشتقات آن می‌شوند. این آلاینده‌ها از جمله موادی هستند که برای سلامت محیط زیست، خاک و انسان تهدید جدی به‌حساب می‌آیند. برای پاکسازی منابع خاکی آلوده به فنل روشهای زیادی وجود دارد که از جمله این روشها حذف زیستی آن است. این تحقیق با هدف حذف زیستی فنل به جداسازی باکتری های تجزیه کننده از خاک آلوده به فنل در مجاورت استخر ایزوله کارخانه ذوب آهن اقدام شد. پس از نمونه برداری اسیدیته، مقدار مواد آلی، هدایت الکتریکی و غلظت فنل با هدف امکان وجود شرایط مساعد برای رشد باکتری تعیین گردید. همچنین اقدام به غنی‌سازی، جداسازی، شناسایی و بررسی روند تجزیه فنل توسط جدایه برتر گردید. نتایج نشان داد بهترین گونه در خاک مورد مطالعه، گونه‌ای از انتروباکتر است که توانایی حذف ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در طی مدت زمان ۷۲ ساعت دارد. نتایج این تحقیق می‌تواند تأکیدی بر استفاده باکتری‌ها برای تصفیه آلاینده‌های آلی مانند فنل از محیط خاک باشد.

واژه های کلیدی: خاک آلوده، صنایع ذوب فلز، فنل، باکتری بومی، تجزیه زیستی

Biodegradation of Phenol by Indigenous Bacterium Isolated from Contaminated Soil of Esfahan Steel Company Zone

Somayeh Eskandari [1] *Mehran Hoodeji [2]* *Arezo Thamorespour [3]*

(Received March 11, 2011 Revised Oct. 21, 2012 Accepted Nov. 13, 2012)

Abstract

Industrial processes produce high volumes of wastewater containing organic pollutants such as phenol and its derivatives. These contaminants include materials that are serious threats for environmental, human and soils characteristics . There are lots of methods for phenol removing from contaminated soils that one of them is biodegradation. In this study with the aim of phenol biodegradation, take action to isolation of bacteria from contaminated soil of Esfahan steel factory. Some properties of soil such as pH, organic matters, electrical conductivity and phenol concentration were determined. Enrichment of isolated bacteria was done. The best indigenous bacterium was selected according to its growth in presence of 400 $mg.L^{-1}$ of phenol during 24h for further biodegradation studies and molecular identification. Results showed that according to phylogenetic analysis, the best isolated bacterium was the strain of *Enterobactersp.* that could remove 400 $mg.L^{-1}$phenol during 72 hours. The results of this study shown that indigenous bacterium can remove organic pollutant such as phenol from contaminated soil.

Keywords: Contaminated Soil, Steel Company, Phenol, Indigenous Bacterium, Biodegradation.

۱- دانشجوی دکترای خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان
Eskandary.s@gmail.com (۰۳۱۱) ۶۲۶۰۸۶۸
۲- دانشیار گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان
۳- استادیار میکرب شناسی گروه علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان

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

Archive of SID
www.SID.ir

امروزه در جهان، صنعت و فناوری با سرعتی روز افزون به پیشرفت خود ادامه می دهند؛ در این راستا مشکلات و مسائلی ایجاد می‌شود که مستقیم یا غیر مستقیم معلول این پیشرفتها است. از جمله این مشکلات تولید حجم بالایی از پساب با ترکیبات شیمیایی متفاوت است که دفع یا پاکسازی آنها نیازمند صرف وقت و هزینه زیادی است. از جمله این ترکیبات شیمیایی آلاینده‌های آلی مانند فنل و مشتقات آن هستند که تهدید جدی برای سلامت محیط زیست و موجودات محسوب می شوند[۱و۲]. ورود این ترکیبات شیمیایی مضر و سمّی به خاکها، سفره‌های آب زیرزمینی، رسوبات و حتی هوا، مسائل زیست محیطی جدی را به دنبال دارد و باعث پیدایش مشکلات اکولوژیکی بسیار جدی می شود. از جمله این مشکلات می‌توان به مرگ و میر موجودات آبزی و خاکزی به‌دلیل مسمومیّت با این مواد اشاره نمود [۳و۴]. به همین دلیل آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا[1] مقدار مجاز فنل در پساب خروجی صنایع را ۰/۵ میلی گرم در لیتر تعیین نموده است[۵].

حذف فنل به روشهای مختلفی صورت می گیرد که حذف زیستی یکی از این روشها است. در این روش از باکتری‌هایی که توانایی مصرف فنل را به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی دارند، برای حذف فنل از محیط آلوده استفاده می‌شود.

حذف زیستی فنل به‌وسیله باکتری‌ها، طی تحقیقات زیادی بررسی شده و باکتری‌های متنوعی بر اساس خصوصیات فیزیولوژیکی و غلظت فنل در محیط جداسازی و بررسی شده‌اند. این در حالی است که اکثر باکتری‌هایی که تا کنون در خاک مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند، تنها قادر به تجزیه فنل در غلظتهای کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بودند؛ زیرا فنل در غلظتهای بالاتر با متلاشی کردن سلول‌ها مانع رشد اکثر میکروارگانیسم ها می‌گردد [۶ تا ۸].

از آنجا که در حذف زیستی فنل، باکتری‌ها مسئول تصفیه این آلاینده از محیط هستند، لذا با شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌ها، گام مهمی در روند پاکسازی محیط به خصوص محیط‌های آلوده به این ترکیبات سمّی و خطرناک برداشته می‌شود.

این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده فنل و سازش پذیر کردن آنها به مقادیر بالای فنل در محیط کشت، صورت پذیرفت تا در نهایت بتوان از این باکتری‌های بومی برای پاکسازی محیط‌های خاکی و آبی آلوده به غلظتهای مختلف فنل استفاده کرد.

۲- مواد و روشها

سه نمونه خاک کاملا" تصادفی از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری مجاور استخر ایزوله کارخانه ذوب آهن اصفهان که پساب حاوی فنل تولید شده از فرایند کک‌سازی به آن ریخته می‌شد در ظرفهای اسید شویی شده و استریل، جمع‌آوری و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. برای جلوگیری از تغییرات بیولوژیکی در پساب مورد نظر، در طی مدت زمان کمتر از یک ساعت، نمونه‌ها کشت و برخی خصوصیات شیمیایی خاک بررسی شد. از جمله خصوصیات شیمیایی اندازه گیری شده خاک به شرح زیر است:

۱- اسیدیته خاک : پس از تهیه عصاره اشباع، اسیدیته خاک به‌وسیله دستگاه pH متر مدل ۲۶۲ کالیبره شده با محلولهای بافر، اندازه گیری شد[۹].

۲- ماده آلی خاک : برای اندازه‌گیری ماده آلی خاک از روش والکلی و بلاک استفاده شد [۱۰].

۳- هدایت الکتریکی خاک : هدایت الکتریکی عصاره اشباع توسط دستگاه هدایت‌سنج مترـاهم، تعیین شد[۱۱].

۲-۱- غلظت فنل

به این منظور، یک گرم از خاک نمونه برداری شده به یک بطری درپیچ‌دار ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد و سپس مقدار ۵۰ میلی لیتر محلول متانول- آب (به نسبت ۶۰ : ۴۰) به آن اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت. سپس به‌وسیله پمپ خلاء صاف و در نهایت با محلول متانول- آب (به نسبت ۶۰ : ۴۰) به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. عصاره به‌دست آمده، از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد و در نهایت با استفاده از دستگاه HPLC[2] ستون C_{18} غلظت فنل در نمونه اندازه‌گیری و محاسبه گردید [۱۲].

۲-۲- شمارش جمعیت باکتری‌های هتروتروف در خاک

به این منظور، اقدام به کشت رقتهایی از نمونه یک گرمی خاک در محیط کشت نوترینت آگار شد و پس از ۳ روز انکوباسیون در دمای ۲۹ درجه سلسیوس کلنی‌های تک، شمارش شد.

۲-۳- جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل

برای جداسازی باکتری‌هایی که دارای قدرت تجزیه فنل هستند، از محیط کشت حاوی ۵۳۵۰ میلی‌گرم Na_2HPO_4 ، ۲۶۷۰ میلی‌گرم NH_4Cl ، ۰/۶ میلی‌گرم $CaCl_2.H_2O$ ، ۶ میلی‌گرم $MgSO_4$ ، ۲/۴میلی‌گرم $FeSO_4.H_2O$ و ۰/۰۹ میلی‌گرم $MnSO_4.H_2O$ در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل استفاده شد و در نهایت اسیدیته محیط کشت بر روی ۷ تنظیم شد و در لوله‌های در پیچ‌دار به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به‌صورت سه تکرار توزیع

[1] United State Environmental Protection Agency (USEPA)

[2] High Performance Liquid Chromatography

Archive of SID
www.SID.ir

شد. سپس به هر لوله حاوی محیط کشت مایع فنل دار یک گرم خاک آلوده به فنل اضافه گردید. لوله‌ها بر روی دستگاه تکان دهنده با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و هر روز به‌مدت یک دقیقه از طریق نیمه باز کردن در لوله‌ها، هوادهی انجام شد. در پایان هر هفته در صورت مشاهده کدورت در لوله‌های حاوی محیط کشت، با استفاده از محلولهای ۰/۵ مک فارلند و تنظیم کدورت، تلقیح به محیط کشت جدید صورت گرفت[۱۳ تا ۱۵].

۲-۴- شمارش باکتری‌های تجزیه کننده فنل

برای این منظور، از لوله‌های حاوی محیط کشت و باکتری که کدورت در آنها مشاهده می‌شد، رقتهای مختلف به نسبت ۱:۱۰ تهیه و سپس بر روی محیط کشت جامد فنل دار کشت داده شد و پس از ۳ روز انکوباسیون در دمای ۲۹ درجه سلسیوس کلنی‌های تک شمارش گردید. در نهایت درصد باکتری‌هایی که توانایی استفاده از فنل محیط را داشتند، با توجه به تعداد کل باکتری‌های هتروتروف محاسبه شد[۱۶].

۲-۵- انتخاب جدایه پر قدرت

پس از جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل، برای غربال بهترین و قوی‌ترین جدایه، آنها را در محیط کشت مایع فنل‌دار در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، کشت داده و باکتری که در حداقل زمان ممکن شروع به رشد نموده و همچنین پس از گذشت ۲۴ ساعت از حداکثر کدورت در مجاورت فنل برخوردار بوده به‌عنوان جدایه میکربی پرقدرت انتخاب شد [۱۶].

۲-۶- منحنی رشد و حذف فنل جدایه مقاوم

منحنی رشد جدایه مقاوم در محیط کشت، حاوی ۴۰۰ میلی گرم در لیتر فنل در دوره‌های زمانی ۱۲ ساعته، به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر رسم شد. همچنین برای بررسی روند حذف فنل، مقدار ۳ میلی لیتر از محیط کشت، به‌منظور حذف کدورت ناشی از حضور باکتری‌ها در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس با ۴۰۰ میکرولیتر معرف گیبس و ۶۰۰ میکرولیتر بیکربنات سدیم یک مولار مخلوط گردید؛ در نهایت غلظت فنل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به‌صورت رنگ‌سنجی در طول موج ۶۳۰ نانومتر در دوره‌های زمانی ۱۲ ساعته اندازه‌گیری و منحنی حذف فنل رسم شد [۱۷].

۲-۷- تعیین حداکثر غلظت فنل ممانعت کننده از رشد باکتری(MIC)[1]

به‌منظور تعیین حداقل غلظت تأمین کننده رشد، حداکثر غلظت بازدارنده از رشد در مورد هر جدایه، مبادرت به تهیه شیب غلظت از فنل در محیط کشت مایع شد. محدوده شیب غلظت به‌صورت ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل بود و با استفاده از استاندارد ۰/۵ مک فارلند تعداد $1/5\times10^7$ باکتری در هر میلی لیتر محیط کشت به هر لوله آزمایش حاوی محیط کشت تلقیح و رشد در طی دوره‌های زمانی ۱۲ ساعته بررسی گردید [۱۶].

۲-۸- شناسایی جدایه مقاوم با استفاده از PCR[2]

پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهده باکتری‌ها توسط میکروسکوپ اقدام به شناسایی جدایه برتر توسط روش PCR با استفاده از پرایمر همگانی 16S rDNA شد.

در این روش ابتدا DNA باکتری مقاوم به‌وسیله کیت استخراج DNA محصول شرکت سینا ژن استخراج شد، سپس حدود ۱۵۸۰ باز در محدوده ژن 16S rDNA به‌وسیله پرایمر جهانی F27(5-AGCGGTCCAGAGTTTTCCTGG-3) و R1492(5-CTCTCTGCAGCCCTTGTTACG-3) تعیین گردید و اقدام به انجام PCR شد، به این صورت که ابتدا یک محلول مادر با غلظتهای زیر تهیه گردید:PCR Buffer 10 X (۱۰۰ میکرولیتر)، $MgCl_2$ 50mM (۴۰ میکرولیتر)، dNTP mix 10mM (۲۰ میکرولیتر) و آب مقطر تزریقی (۸۴۰ میکرولیتر).

مقدار ۲۱ میکرولیتر از محلول مادر با ۲ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم اسمار تک پلیمراز در میکروتیوپ‌های ۰/۵ میلی‌لیتری مخصوص PCR مخلوط 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 به‌مدت ۲۵ ثانیه، پیشروی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، به‌صورت ۳۰ سیکل و در نهایت تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه تنظیم شد [۱۸و۱۹].

۲-۹- روش آماری

در این تحقیق از روش بررسی فاصله اطمینان توافقی با استفاده از نرم افزار اکسل و محاسبه خطای استاندارد با سه تکرار استفاده شد.

[1] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
[2] Polymerase Chain Reaction

www.SID.ir
Archive of SID

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی خصوصیات شیمیایی خاک

نتایج برخی از خصوصیات شیمیایی خاک در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- اندازه گیری برخی خصوصیات شیمیایی خاک آلوده

پارامتر اندازه گیری شده	مقدار
اسیدیته	۶/۹
ماده آلی (٪)	۱/۳۳
هدایت الکتریکی (dS/m)	۴۵
فنل (ppm)	۱۰۰

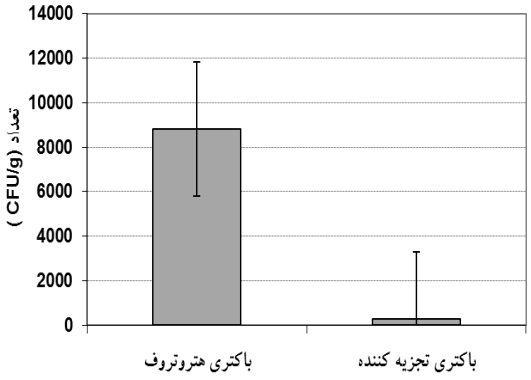
۳-۲- بررسی تعداد کل باکتری‌های هتروتروف در خاک

تعداد کل باکتری‌های هتروتروف موجود در خاک ۸۸۰۰ CFU/g و باکتری‌های تجزیه کننده فنل ۲۸۶ CFU/g شمارش گردید.

چنانچه در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تعداد باکتری هتروتروف اختلاف معنی‌داری با تعداد باکتری‌های تجزیه کننده دارد. از کل باکتری‌های هتروتروف موجود در خاک حدود ۳/۲۵ درصد توانایی رشد در حضور فنل و تجزیه آن را دارا بودند.

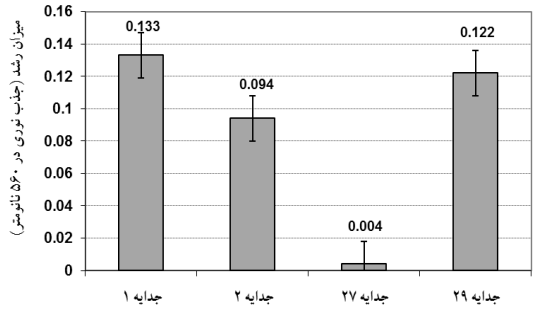
نتایج مربوط به انتخاب جدایه برتر در شکل ۲ ارائه شده است. از بین ۴ جدایه جداسازی شده به‌عنوان باکتری‌های تجزیه کننده فنل، تنها جدایه ۱ به‌عنوان پر قدرت‌ترین جدایه انتخاب شد. همانطور که در شکل نیز مشاهده می‌شود، میزان رشد این جدایه در مدت زمان ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها دارد.

با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های بیوشیمیایی و نتایج حاصل از تعیین توالی محصول PCR مربوط به جدایه ۱ مشخص شد که باکتری فوق، گونه‌ای از جنس *انتروباکتر*[1] است (جدول ۲) [۱۷].



شکل ۱- تعداد باکتری هتروتروف و تجزیه کننده فنل در خاک آلوده

[1] *Enterobacter*



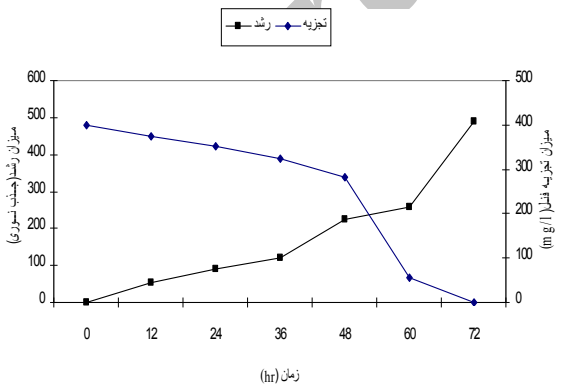
شکل ۲- انتخاب جدایه پر قدرت از میان جدایه های جداسازی شده

جدول ۲- نتایج مربوط به شناسایی فنوتیپیک جدایه ۱

زیستگاه	خاک
واکنش گرم	–
اکسیداز	–
کاتالاز	+
گلوکز	+
سیترات	+
لاکتوز	+
حرکت	+
اوره	+
مانیتول	+
متیل رد	+
رشد بر روی نوترینت آگار	+
تجزیه کننده پلی بی فنیل هیدروکربن‌ها	+
تجزیه کننده آلاینده‌های آلی	+
جنس	*انتروباکتر*
گونه	*هورماچئیی*[2]

۳-۳- روند رشد و تجزیه فنل توسط باکتری

منحنی رشد و تجزیه فنل جدایه مقاوم که بر روی ۴۰۰ میلی گرم در لیتر فنل رشد کرده است، در شکل ۳ نشان داده شده است.

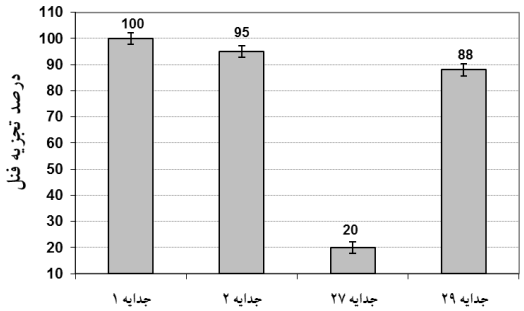


شکل ۳- منحنی رشد و تجزیه فنل جدایه ۱ در غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر فنل

[2] *Hormaechiei*

Archive of SID
www.SID.ir

درصد تجزیه فنل توسط چهار جدایه جداسازی شده ۱، ۲، ۲۷ و ۲۹، در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، طی مدت زمان ۷۲ ساعت در شکل ۴ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود راندمان حذف فنل طی این مدت توسط جدایه‌ها به‌ترتیب ۱۰۰، ۹۵، ۲۰ و ۸۸ درصد بوده است.



شکل ۴- درصد تجزیه فنل توسط جدایه‌ها در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل طی مدت زمان ۷۲ ساعت

جدول ۳، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد برای فنل (MIC) و حداکثر غلظت کشنده فنل (MBC)[1] را برای باکتری نشان داده است. برای این منظور ۳ جدایه ۱، ۲ و ۲۹ به محیط‌های کشت حاوی ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل انتقال داده شدند و دوره رشد و فاز تأخیری آنها بررسی شد. چنانچه نتایج جدول نشان می‌دهد، جدایه های ۱ و ۲ با افزایش غلظت از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ۱۲۰۰ میلی گرم در لیتر، دیگر رشدی نشان ندادند؛ لذا حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد برای این دو جدایه مقدار ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر فنل تعیین شد. این در حالی است که این غلظت برای جدایه ۲۹، مقدار ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. طبیعتاً غلظت بالاتر از این غلظتها برای این جدایه‌ها غلظت کشنده تعیین می‌شود.

جدول ۳- تعیین فنل برای جدایه‌ها در خاک

جدایه	MIC (mg/L)_	MBC (mg/L)
جدایه ۱	۱۰۰۰	۱۲۰۰
جدایه ۲	۱۰۰۰	۱۲۰۰
جدایه ۲۹	۸۰۰	۱۰۰۰

خاک مورد مطالعه، برای مدت طولانی تحت تاثیر پساب حاوی فنل با مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود، اما به‌دلیل این‌که فنل یک ترکیب شیمیایی فرّار است و به‌راحتی از لایه‌های سطحی خاک تبخیر شده و وارد اتمسفر می‌شود، در نتیجه مقدار فنل در لایه‌های سطحی خاک کاهش پیدا کرده است.

مقدار ماده آلی این خاک، ۱/۳۳ درصد اندازه‌گیری شد که نسبت به مقدار متوسط آن در خاکها (۰/۵ درصد)، این مقدار ماده آلی زیاد است. این مسئله می‌تواند به‌دلیل بالا بودن مقدار فنل در این خاک باشد. از طرف دیگر مواد آلی نه تنها خود مقادیر زیادی فنل دارند بلکه می‌توانند به‌دلیل داشتن گروههای عاملی زیاد با فنل پیوند برقرار کرده و آن را در ساختار خود نگه داشته و مانع از در دسترس قرار گرفتن آن توسط میکروارگانیسم‌ها شود [۲۰].

مقدار EC مناسب در خاکها ۳ دسی زیمنس بر متر است، اما نتایج آنالیز هدایت الکتریکی نشان داد که در این خاک هدایت الکتریکی بسیار بالا و برابر ۴۵ دسی زیمنس بر متر است و می‌تواند به‌دلیل تخلیه پی در پی پساب حاوی املاح فراوان در این خاک باشد. میزان اسیدیته این خاک خنثی اندازه گیری شد که این مقدار برای فعالیتهای بیولوژیکی محدودیتی ایجاد نمی‌کند[۲۱].

مقایسه تعداد کل باکتری‌های هتروتروف و تجزیه کننده فنل، نشان می‌دهد که بین تعداد کل باکتری‌های هتروتروف و کل باکتری‌های تجزیه کننده فنل، تفاوت معنی‌داری وجود دارد و تنها ۳/۲۵ درصد از کل باکتری‌ها توانایی تجزیه فنل را دارا بودند زیرا برخی از باکتری‌های هتروتروف توانایی استفاده از فنل را به‌عنوان یک منبع غذایی نداشته و زمانی که در محیط، فنل به‌عنوان تنها منبع کربن در اختیار باکتری قرار می‌گیرد، تنها جدایه هایی توانایی رشد و ادامه حیات را دارند که بتوانند از فنل به‌عنوان منبع کربن بهره ببرند.

جدایه شناسایی شده در این تحقیق، از جمله *باسیل‌های* گرم منفی از جنس *انتروباکتر*، بود در بیشتر تحقیقات صورت گرفته جدایه‌هایی که برای تجزیه فنل شناسایی و معرفی شده‌اند، از جمله باکتری‌های میله ای گرم منفی هستند. هرمن و جانسن در سالهای ۱۹۹۵ و ۲۰۰۲ دو گونه باکتریایی *سودوموناس آئروجینوس*[2] و *سدوموناس فلورسنس*[3] را شناسایی کرده‌اند که توانایی حذف فنل از محیط را دارا بودند [۶ و۷].

شکل ۲، میزان رشد جدایه‌ها را در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل پس از ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. رشد جدایه ۱ نسبت به جدایه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارد. بنابراین بین ۴ جدایه جداسازی شده، جدایه ۱ به‌عنوان مقاوم ترین جدایه در نظر گرفته شد.

منحنی رشد و حذف فنل توسط جدایه مقاومی که به‌راحتی بر روی ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل رشد کرد، در شکل ۳ نشان داده

[1] Maximum Bactericidal Concentration (MBC)

[2] *Pseudomonas Aeruginosa*

[3] *Pseudomonas Floresence*

Archive of SID
www.SID.ir

شده است، چنانچه در این شکل مشاهده می‌شود، جدایه ۱ در محیط حاوی فنل رشد کرده و مقدار فنل را در طی مدت زمان ۷۲ ساعت به صفر می‌رساند. در پژوهشی در سال ۲۰۰۷ در بررسی تجزیه زیستی فنل به‌وسیله سودوموناس *پیکتوروم*[1]، باکتری در اسیدیته خنثی تنها قادر به تجزیه فنل تا ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بوده است، این در حالی است که در تحقیق حاضر جدایه برتر مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را پس از مدت زمان ۷۲ ساعت به صفر رساند [۲۲].

میزان فنل تجزیه شده توسط هر یک از جدایه‌ها، به‌صورت درصد محاسبه شد و از میان جدایه‌ها، جدایه ۱ و ۲ بیشترین درصد حذف فنل را دارا بودند؛ از بین این دو جدایه، جدایه ۱ فنل را به صورت ۱۰۰ درصد در مدت زمان ۷۲ ساعت تجزیه کرده است.

در بررسی حداقل غلظت فنل ممانعت کننده از رشد (MIC) باکتری‌ها، مشاهده شد که جدایه‌ها بر روی ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل به‌راحتی رشد کردند. جدایه‌های ۱ و ۲ بر روی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل پس از یک فاز تاخیری ۴ روزه رشد کردند، اما جدایه ۲۹ در غلظت ۸۰۰ میلی گرم در لیتر فنل پس از ۳ روز رشد کرد و در ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر فنل رشد آن متوقف شد. این نشان می‌دهد که علی‌رغم افزایش غلظت فنل در محیط، باکتری حتی پس از یک فاز تأخیری به رشد خود ادامه می‌دهد، اما این شرایط تا زمانی صادق است که افزایش غلظت فنل سبب از بین رفتن کلیه سلول‌ها و عدم تولید مثل نگردد، در این صورت باکتری از بین رفته و هیچ رشدی صورت نمی‌گیرد.

در سال ۲۰۰۸ آگاری و سولومن از سدوموناس فلورسانس[2] برای تجزیه فنل استفاده کرده‌اند. این محققان *سدوموناس* را از خاک آلوده به مواد نفتی جدا کرده و در محیط کشت حاوی چندین نمک رشد دادند. سپس اقدام به رسم منحنی رشد و تجزیه فنل این باکتری در غلظتهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل نموده‌اند. مدت زمان لازم برای این‌که این باکتری بتواند فنل را تجزیه کند، برای غلظتهای ذکر شده به‌ترتیب ۸۴، ۱۲۶، ۱۶۸، ۲۴۰ و ۳۶۰ ساعت بود. این محققان به این نتیجه رسیدند که فاز تأخیری باکتری برای غلظتهای ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، به‌ترتیب ۶، ۱۸، ۲۴ و ۶۶ ساعت بود که با افزایش فنل فاز تأخیری باکتری نیز افزایش پیدا می‌کرد [۲۳]. این در حالی است که در مطالعه حاضر پس از جداسازی باکتری‌ها و رسم منحنی رشد و تجزیه فنل، مشاهده شد که جدایه برتر در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل رشد کرده و فنل را تجزیه می‌کند.

پاراسکوی و اروبیدس نیز در سال ۲۰۰۵ از خاک آلوده به مواد نفتی در دانمارک گونه ای از *سدوموناس* را جدا نموده‌اند که، می‌توانست در غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل رشد کرده و آن را تجزیه کند[۲۴].

در سال ۲۰۰۶ یانگ و لی اقدام به جداسازی و خالص‌سازی *سدوموناس رزینورانس*[3] و *براوی باسیلوس*[4] کردند، نشان دادند که، *سدوموناس* نسبت به براوی باسیلوس، در محیط کشت حاوی نمک‌ها وغلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، با سرعت بیشتری رشد کرده و فنل را تجزیه می کند، در حالی که *براوی باسیلوس* با دوره تأخیری ۲ هفته‌ای رشد کرد. همچنین نتایج آنها نشان داد که *سدوموناس* در مقایسه با *براوی باسیلوس* راندمان بالاتری برای حذف فنل از محیط نشان می‌دهد[۲۵].

در بررسی که توسط مفتح و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت، فعالیت بهینه باکتری *سدوموناس* برای تصفیه مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تصفیه فنل توسط باکتری، به اسیدیته محیط کشت، غلظت اولیه فنل و دما بستگی دارد. بهترین فعالیت باکتری در شرایطی بود که اسیدیته برابر ۷، دما ۳۰ درجه سلسیوس و غلظت اولیه فنل ۷۵ میلی‌گرم در لیتر بود و غلظتهای بالاتر از ۷۵ میلی‌گرم در لیتر فنل نیز، از رشد باکتری ممانعت می‌کرد[۲۶].

همچنین در سال ۲۰۰۶ استویلا و همکاران گونه آسپرجیلوس آواموری[5] را شناسایی و به‌عنوان ارگانیسم تجزیه کننده فنل گزارش کرده‌اند. آنها به بررسی رشد و تجزیه فنل به‌وسیله این قارچ در غلظت ۰/۳ و ۰/۶ گرم در لیتر فنل پرداختند. نتایج نشان داد که این قارچ برای تجزیه غلظت‌های فنل ذکر شده به‌ترتیب به ۶۰ و ۷۲ ساعت و در ۱ گرم در لیتر فنل به ۸ روز زمان نیاز دارد. *آسپرجیلوس آواموری*، توانایی بالایی در تجزیه فنل، کاتکول، ۲و۴ دی کلرو فنل، ۲و۶ دی متوکسی فنل و دیگر ترکیبات آروماتیک در غلظتهای بالا نشان داده است[۲۷].

۴- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باکتری *انتروباکتر*، توانایی بالایی برای رشد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل داشته و در طی دوره رشد در صورتی که نیازهای اولیه باکتری از نظر عناصر ضروری رشد مانند نیتروژن، فسفر، اکسیژن و هیدروژن در محیط وجود داشته باشد و باکتری منبع کربنی به جز فنل در دسترس نداشته باشد، از فنل به‌عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط

[1] *Pseudomonas Pectorium*
[2] *Pseudomonas Floresence*
[3] *Pseudomonas Resinovorans strain P-1*
[4] *Brevibacillus sp. Strain P-6*
[5] *Aspergillus Awamori*

www.SID.ir
Archive of SID

استفاده نموده و آن‌را تجزیه می‌کند.

بنابراین، استفاده از این باکتری‌ها می‌تواند به‌عنوان یک روش کم خطر و کم هزینه برای حذف آلاینده آلی فنل و مشتقات آن مورد توجه قرار گیرد. لازم به‌ذکر است در تحقیقات دیگری شرایط بهینه از نظر اسیدیته، دما، میزان تهویه و حضور یک قند در محیط به‌عنوان منبع دیگری از کربن برای افزایش کارایی حذف فنل توسط این باکتری ها در حال بررسی و مطالعه است.

۵- مراجع

1- Environmental Protection Agency. (2004). *Collation of toxicological data and intake values for humans*, EPA. Report, USA.

2- Veglio F., Esposito, A., and Reverberi, A.P. (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.D. (2003). "Toxicity estimation of phenolic compounds by bioluminescent bacterium." *J. Environmental Metal Engin*., 129, 328-335.

5- Koutny, M., Ruzicka, J., and Chiachula, J. (2003). "Screening for phenol-degrading bacteria in the pristine soils of south Liberia." *J. Applied Soil Eco.*, 23, 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- Janssen, D. B., and Noordman, W.H. (2002). "Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compound by *Pseudomonas Aeruginosa*." *J. Applied and Environmental Mic*., 68, 4502-4508.

8- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., and Banat, I.M. (2002). "Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium." *J. Bioresearch Tech*., 85, 251-257.

9- Hogg, T., and Heury, J. L. (1984). "Comparison and extracts with the saturation extracts in estimating salinity in Liberia Ewan soils." *J. Canadian Soil Science*, 64, 699-704.

10- Rhoades, J. D. (1986). "Cation exchange capacity." Page, A. C. (Ed.,) *Methods of soil analysis, part 2*, *American Society Agronomy*.

11- American Public Health Association. (1998). *Standard methods for the examination for water and wastewater*, 20th Ed., AWWA, WPCF, Washington D.C.

12- Hancock, P., and Deau, J. R. (1997). "Extraction and fate of phenols in soil." *J. Analitical Communications*, 34, 377-379.

13- Abuhamed, T., and Bayraktar, E. (2004). "Biodegradation of benzene, toluene and phenol in a two-phase system." *J. Biochemical Eng*., 19, 137-146.

14- Aislabie, J., Foght, J. and Saul., D. (2000). "Aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near Scott base, Iberia ewen." *J. Polar Biological*, 23, 183-188.

15- Tahmourespour, A., and Kasra Kermanshahi, R. (2007). "Adaptation a bacterium isolated from wastewater to heavy metal" *J. Water and Wastewater*, 61, 53-59. (In Persian)

16- Eskandary, S., Tahmourespour, A., and Hoodaji, M. (2011). "Investigation of growth and removal of phenol by isolation of bacterium from industrial wastewater in vitro." *J. Water and Wastewater*, 22, 78-85. (In Persian)

17- Malekzade, F. (1992). *Microbiology*., 1st Ed., Aghigh, Pub., Tehran. (In Persian)

18- Guo-Ying, Z., Jian-Ya, L., Hai-Bo, S., Jie, L., Yuan-Yuan, F., and Zhao-Jie, C. (2009). "Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading Janibacter anophelis strain JY11." *J. Hazardous Materials*, 172, 580-586.

19- Mcpherson, M.J., and Muller S.G. (2000). *PCR*, Bios. Scientific Pub., New York, Oxford.

Archive of SID

www.SID.ir

20- Mahmodi, S. (2001). *Principle of soil science*, Tehran University, Tehran. (In Persian)

21- Kotresha, D., and Vidyasagar, G.M. (2008). "Isolation and characterization of phenol degradation *Pseudomonas aeroginosa MTCC- 4946.*" *J. World Journal Microbial Biotech*., 24,541-547.

22- Ghanavati, H., and Emtiazi, G. (2007). "Effect of phenol inhibition on nitrification process in ammonium and phenolic wastewater of coaltar plant." *J. Water and Wastewater*, 61,43-52. (In Persian)

23- Agarry, S.E., and Solomon, B.O. (2008). "Kinetic of batch microbial degradation of phenol by indigenous *Pseudomonas Fluorescence.*" *J. Environmental Science Tech*., 5, 223-232.

24- Paraskevi, N.P., and Euripides, G.S. (2005). " Effect of temperature and additional carbon source on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonas.*" *J. Biodegradation*, 16, 403-413.

25- 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.*" *J. International Biodetrioration and Biodegradation*, 59, 206-210.

26- Muftah, H., Muhtaseb, Sh., and Maklouf, S. (2009). "Biodegradation of phenol by *Pseudomonas Putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel." *J. Hazardous Material*, 164, 720-725.

27- Stoiloue, I., Krastanov, A., Stanchev, V., Daniel, D., Gerginova, M., and Alexieva, Z. (2006). "Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4 diclorophenol and 2,6 dimethoxyphenol by *Aspergillus Awamori* cells." *J. Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1036-1041.

Archive of SID

www.SID.ir