

غربالگری و جداسازی برخی از باکتری‌های تجزیه‌کننده فنول در خاک‌های حاوی آلاینده‌های

نفتهی

فائزه ربانی^۱، وهب جعفریان^{۲*}، احمد آسوده^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۵

چکیده

پژوهش حاضر با هدف شناسایی ژنتیکی ژن *16S rDNA* جدایه‌های برتر باکتری در حذف فنول به منظور زیست‌پالایی فنول انجام شد. دو جدایه‌ی برتر از نظر فعالیت بالای فنول‌لازی گزینش و در محیط کشت با pH و دما، منابع کربنی و نیتروژنی مختلف بررسی شدند. جدایه‌ی اول در محیط کشت حاوی ۰/۳ گرم در لیتر فنول به عنوان منبع کربن، ۰/۲ درصد پیتون و آمونیوم کلرید به عنوان منابع نیتروژن، ۱۰۰ درصد فنول را پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و $pH = 7$ حذف کرد و جدایه‌ی دوم در محیط کشت حاوی یک درصد ساکارز، ۰/۳ گرم بر لیتر فنول به عنوان منبع کربن و ۰/۲ درصد عصاره مخمر آمونیوم کلرید به عنوان منبع نیتروژن، ۱۰۰ درصد فنول را پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و $pH = 7$ حذف کرد. نتایج تعیین توالی و هم‌ردیفی توالی *16S rDNA* نشان داد که جدایه‌ی اول باکتری *Aneurinibacillus migulanus* و جدایه‌ی دوم باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* است. دو جدایه‌ی گزینش‌شده در این پژوهش می‌توانند به عنوان گزینه‌های مناسبی در اهداف زیست‌پالایی فنول مورد توجه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* *Aneurinibacillus migulanus* تجزیه

فنول، زیست‌پالایی.

مقدمه

امروزه پیشرفت فزاینده‌ی صنعت در حوزه‌های گوناگون باعث پدید آمدن مشکلات گوناگون زیست‌محیطی شده است (Lješević et al., 2019). آلودگی آب و خاک توسط ترکیبات آلی و معدنی ناشی از فرآورده‌های نفتی از آلودگی‌های مهمی هستند که در دهه‌های اخیر نگرانی‌های زیادی را در بیشتر نقاط جهان به همراه داشته است (Besharati, 2015). آلودگی‌های

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان

* نویسنده مسئول: (v.jafarian@znu.ac.ir)

۳- استاد گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

نفی از قبیل هیدروکربن‌های آروماتیک مانند فنول و مشتقات آن که پایدارترین و سمی‌ترین قسمت نفت را تشکیل می‌دهند، به‌ویژه در کشورهای نفت خیزی چون ایران به‌عنوان یک مشکل اجتناب‌ناپذیر به‌شمار می‌آیند (Logeshwaran *et al.*, 2018). فنول در بسیاری از صنایع به‌عنوان ماده‌ی خام اولیه کاربرد دارد، با این حال، به‌عنوان آلاینده‌ای مهم، توسط فاضلاب بسیاری از صنایع وارد محیط زیست می‌شود و به‌دلیل ویژگی‌های جهش‌زایی و سرطان‌زایی، سلامتی انسان‌ها و سایر موجودات را در معرض خطر جدی قرار می‌دهد (Silva *et al.*, 2013). از این رو، مورد توجه بسیاری برای دستیابی به فناوری‌های پاکسازی و بازیابی جزئی یا کامل فنول از مناطق آلوده قرار گرفته است. در میان روش‌های گوناگونی که برای حذف فنول پیشنهاد شده است، تیمار زیستی به دلیل بازدهی بالا و تولید محصولات نهایی بی‌ضرر و سازگار با محیط در اولویت قرار گرفته است. میکروارگانیسم‌های موجود در منابع آلوده، کاتالیزورهای توانمندی برای تجزیه‌ی زیستی ترکیبات سمی به‌صورت هوازی و بی‌هوازی هستند که برخلاف سایر میکروارگانیسم‌ها، نه تنها در حضور مقادیر بالایی از این ترکیبات مهار نمی‌شوند بلکه به‌صورت انتخابی از آن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها از جمله منابع با ارزش برای تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی ترکیبات آروماتیک مانند فنول و مشتقات آن به‌شمار می‌آیند (Mishra & Kumar, Nadaf & Ghosh, 2011; 2017).

پژوهش‌های گوناگونی بر روی شناسایی و ارزیابی عملکرد باکتری‌های مختلف با قابلیت تجزیه‌ی فنول انجام گرفته است. در پژوهشی فعالیت تجزیه‌ی فنول توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از بنزوئیک اسید به‌عنوان منبع کربن و انرژی ارزیابی شد (Wang *et al.*, 2006). همچنین، مشخص شد که باکتری *Rhodococcus sp.* تجزیه‌کننده‌ی فنول است و دارای آنزیم کتکول ۱ و ۲ دی اکسیژناز است که نقش اساسی در مسیر تجزیه‌ی فنول ایفا می‌کند. این باکتری در محیط کشت حاوی مقادیر نسبتاً بالای فنول عملکرد خوبی از خود نشان داد (Nadaf & Ghosh, 2011). میلان (Milase, 2015) گزارش کرد که باکتری *Acinetobacter sp.* قادر به تجزیه‌ی فنول است ولی این باکتری توانایی تجزیه‌ی میزان اندکی فنول دارد. چاکرابورتی و همکاران (Chakraborty *et al.*, 2010) به بررسی تجزیه‌ی زیستی فنول توسط یک سویه‌ی جداسازی‌شده از فاضلاب صنایع تبدیلی زغال سنگ در شرایط فیزیولوژیکی مختلف از جمله دما، pH و درصد گلوکز موجود در محیط کشت پرداختند و بیشترین میزان تجزیه‌ی فنول را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس $pH = 7$ و گلوکز ۰/۲۵ درصد مشاهده کردند. ابوحماد و همکاران (Abuhamed *et al.*, 2004) به بررسی تجزیه‌ی زیستی فنول، بنزن و تولوئن توسط باکتری *Pseudomonas putida* پرداختند و مدلی مناسب برای پیش‌بینی رشد و مهار باکتری در حضور این سه سوبسترا ارائه کردند. با این حال جستجو برای یافتن جدایه‌هایی با توانایی بالا در تجزیه‌ی فنول و توانمندی فعالیت در دامنه‌های مختلف دمایی، pH و مواد غذایی امری ضروری است.

بنابراین با توجه به ضرورت حذف آلاینده‌های نفتی از محیط و نیز بازیابی آن‌ها از طریق روش‌های زیستی، پژوهش حاضر در راستای شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنول و بررسی تجزیه‌ی فنول در شرایط مختلف است که گامی در جهت استفاده از این جدایه‌ها در صنعت زیست‌پالایی (Bioremediation) فنول است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک

نمونه‌برداری باکتری از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری خاک با استفاده از قاشق استریل انجام گرفت و در ظروف شیشه‌ای در پوش‌دار استریل گذاشته شدند. به‌منظور هوادهی، درپوش‌ها به‌صورت نیمه‌باز گذاشته و سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند (Reda, 2009). نمونه‌برداری در خاک شیل‌های نفتی مربوط در ارتفاعات منطقه دودان ($E: 46^{\circ} 11' 8''$ و $N: 35^{\circ} 01' 32''$) و کزی ($E: 46^{\circ} 08' 30/4''$ و $N: 34^{\circ} 51' 52/6''$) واقع در غرب استان کرمانشاه صورت پذیرفت.

محیط کشت و جداسازی باکتری

جداسازی باکتری‌ها با استفاده از محیط‌های کشت نوترینت‌براث (NB) و نوترینت‌آگار (NA) در مرحله اولیه کشت باکتری‌ها، و محیط کشت پایه معدنی حاوی نمک‌های Na_2HPO_4 (۵/۳۵ گرم در لیتر)، NH_4Cl (۲/۶۷ گرم در لیتر)، $CaCl_2.H_2O$ (۰/۰۰۶ گرم در لیتر)، $MgSO_4$ (۰/۰۰۶ گرم در لیتر)، $FeSO_4.H_2O$ (۱/۰۲۴ گرم در لیتر)، $MnSO_4.H_2O$ (۰/۰۰۶ گرم در لیتر) و مقدار فنول (۰/۱ گرم در لیتر) در مرحله جداسازی و تشخیص باکتری‌های تجزیه‌کننده فنول انجام گرفت و pH محیط‌ها در محدوده ۷ تنظیم شد (Kiyangpour *et al.*, 2016).

محیط‌های کشت برای سترون‌شدن در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. غلظت‌های مناسب از خاک هموزن‌شده در سرم فیزیولوژی استریل (۹ گرم در لیتر NaCl) تهیه شد و سپس رقت‌های مناسب به‌طور جداگانه در محیط کشت NB حاوی ۰/۱ گرم در لیتر فنول اضافه شد. پس از دو روز گرماگذاری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و شرایط دورانی ۱۵۰ دور در دقیقه، از کشت مخلوط حاصل سری رقت تهیه و بر روی محیط کشت NA فنول‌دار تلقیح گردید. محیط‌های کشت حداقل به‌مدت ۱۵ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان لازم برای رشد باکتری‌ها، کلونی‌هایی با رنگ و شکل ظاهری متفاوت پدیدار شد. با توجه به تفاوت ریخت‌شناسی کلونی‌های رشد کرده (Busse & Wieser, 2018) و با انجام کشت‌های متوالی، کشت خالص از جدایه‌های متفاوت حاصل از خاک‌های آلوده به نفت به‌دست آمد.

بررسی توانایی باکتری‌ها در تجزیه فنول و تعیین جدایه‌های برتر

شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنول با تلقیح جدایه‌های به‌دست آمده در محیط کشت پایه معدنی حاوی ۰/۱ گرم در لیتر فنول به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی انجام شد. چون فنول تنها منبع کربن و انرژی موجود در محیط کشت است، باکتری‌هایی در این محیط رشد خواهند کرد که قابلیت تجزیه و استفاده از فنول را داشته باشند. برای انتخاب جدایه‌های برتر در حذف فنول، محیط‌های کشت پایه معدنی حاوی ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ گرم در لیتر فنول تهیه شد. سوبه‌ها یک‌باره به تمام غلظت‌ها منتقل شدند. سپس از سوسپانسیون باکتری‌ها به میزان ۲ درصد به محیط کشت تلقیح شد و به انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و قدرت دورانی ۱۵۰ دور در دقیقه، منتقل شد. نمونه‌هایی که قادر به رشد در کمترین زمان و در بالاترین غلظت فنول بودند به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شدند (Ajaz et al., 2004). برای بررسی میزان حذف فنول، نمونه‌های باکتری در غلظت ۰/۳ گرم در لیتر فنول به میزان ۲ درصد تلقیح گردیدند و به انکوباتور شیکردار منتقل شدند. میزان رشد نمونه‌ها و بررسی تجزیه‌ی فنول هر ۲۴ ساعت یک‌بار به مدت ۷ روز بررسی گردید. میزان حذف فنول با استفاده از روش گیبس و بر اساس جذب خوانده شده در طول موج ۶۳۰ نانومتر محاسبه شد. در این روش از ۲ و ۶ دی‌کلروکونینون کلروایمید (معرف گیبس) استفاده شده است که در حضور فنول از موقعیت پارا به آن متصل می‌شود و ایجاد ترکیب آبی رنگی می‌کند، (Smith, 1976). منحنی رشد جدایه‌های برتر در محیط کشت، حاوی ۰/۳ گرم در لیتر فنول در دوره‌های زمانی ۶ ساعته، به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Hach، آمریکا) در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسم شد.

بررسی عوامل مختلف بر رشد باکتری و تجزیه‌ی فنول

به منظور بهینه‌سازی تولید آنزیم، دو جدایه‌ی گزینش شده در ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت در pHهای برابر با ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸، و دماهای ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه‌ی سلسیوس، و منابع کربنی مختلف از قندهای گلوکز، نشاسته، ساکارز و مالتوز با غلظت ۱ درصد (وزنی به حجمی)، و منابع نیتروژنی مختلف شامل آمونیوم کلراید، آمونیوم سولفات، عصاره مخمر، پپتون و اوره با غلظت ۰/۲ درصد (وزنی به حجمی)، کشت شدند (Abd-El-Haleem et al., 2003). برای اندازه‌گیری دمای بهینه و pH بهینه و نیز آزمایش‌های مربوط به منابع کربنی و نیتروژنی، آزمایش کشت باکتری‌ها در غلظت فنول ۰/۳ گرم در لیتر (یعنی غلظت بهینه‌ی فنول) انجام شد. پس از یافتن دمای بهینه‌ی مربوط به هر جدایه، دیگر آزمایشات در دمای بهینه‌ی مخصوص به هر یک و در محیط بهینه‌ی مرحله قبل در ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار انجام گرفت و رشد جدایه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر و غلظت فنول در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد بررسی قرار گرفت (Smith, 1976).

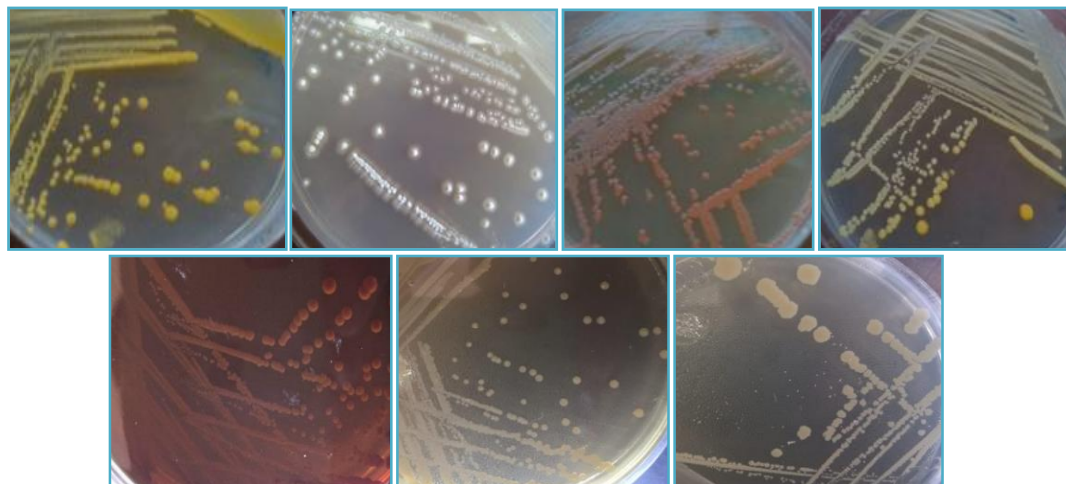
شناسایی ژنتیکی ژن *16S rDNA* باکتری

استخراج DNA ژنومی به روش سمبروک و راسل (Sambrook & Russell, 2001) انجام شد. برای شناسایی جدایه‌ها از آغازگرهای عمومی 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و 1492R (3'GGTTACCTTGTACGACTT3') در تکثیر توالی ژنومی 16S rRNA استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر آغازگر پیشرو (۲۰ پیکومولار)، ۱ میکرولیتر آغازگر پیرو (۲۰ پیکومولار)، ۱۲/۵ میکرولیتر Mastermix، و ۹/۵ میکرولیتر آب صورت گرفت و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biorad, USA) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Aliakbari *et al.*, 2018). تعیین توالی قطعات حاصل از واکنش PCR با آغازگرهای 27F و 1492R در شرکت ماکروژن کره، به سفارش شرکت دنا زیست آسیا انجام شد. به منظور بررسی میزان همسانی توالی‌های 16S rRNA جدایه‌های مورد نظر از پایگاه ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) استفاده شد و با استفاده از تطبیق توالی با ساختار نوشتاری FASTA جستجوهای همسانی به عمل آمد. سپس، درخت تبارشناسی به روش Maximum Likelihood و تعداد Bootstrap ۱۰۰۰ با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X رسم شد (Kumar *et al.*, 2018).

نتایج و بحث

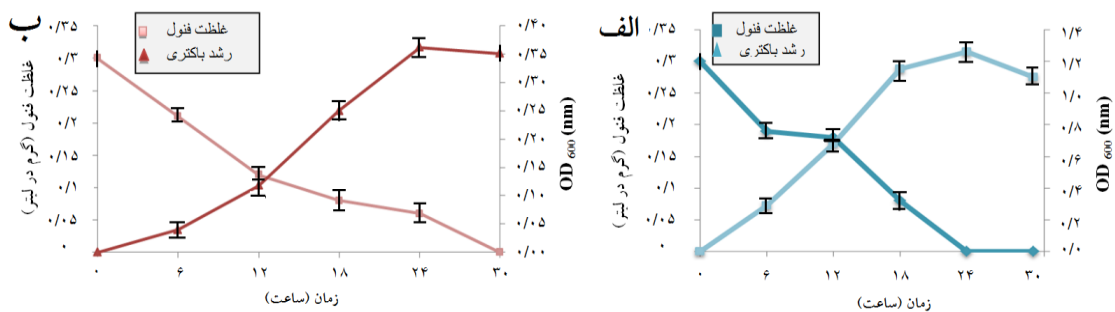
گزینش باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی فنول و انتخاب جدایه‌های برتر

به منظور شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی فنول، پس از کشت جدایه‌ها در محلول حاوی فنول مشخص شد که از مجموع ۵۰ جدایه‌ی خالص‌سازی‌شده، ۷ جدایه توانایی تجزیه فنول را داشتند. میزان رشد و تجزیه‌ی فنول توسط این جدایه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت که نشان دهنده‌ی مثبت بودن فعالیت فنولازی جدایه‌ها بود (نگاره ۱).



نگاره ۱: رشد ۷ جدایه جداسازی شده در پلیت حاوی ۰/۱ گرم در لیتر فنول در محیط کشت نوترینت آگار (NA) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

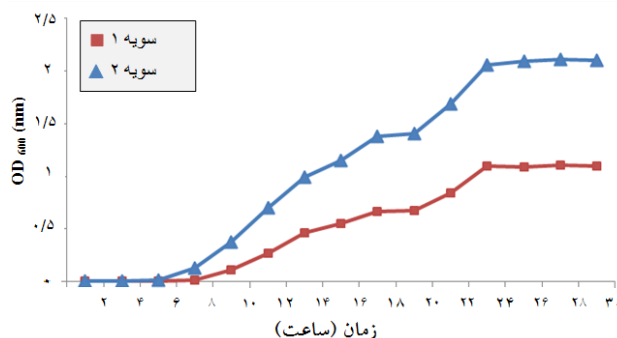
سپس، سنجش غلظت فنول به عنوان سوبسترا در طی رشد جدایه‌ها در زمان‌های مختلف، از طریق رسم منحنی استاندارد فنول بر اساس میزان جذب برای غلظت‌های مختلف (۰/۱ تا ۰/۹ گرم در لیتر) به دست آمد. فرایند مواجه شدن سویه‌ها با غلظت‌های مختلف فنول به صورت تدریجی نبود و سویه‌ها در هر غلظت به طور مستقل قرار گرفتند. با توجه به سرعت رشد در بیشترین غلظت فنول و همچنین میزان حذف فنول توسط جدایه‌ها از میان ۷ جدایه‌ی جداسازی شده، تعداد دو جدایه به عنوان جدایه‌های برتر جهت انجام مراحل بعدی برگزیده شدند. طی ۳۰ ساعت اول و بر اساس نتایج جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر منحنی رشد و بر اساس جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر منحنی حذف فنول جدایه‌های برتر رسم گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، جدایه‌ی شماره‌ی یک پس از ۲۴ ساعت و جدایه‌ی دوم پس از ۳۰ ساعت میزان ۰/۳ گرم در لیتر فنول موجود در محیط کشت را به طور کامل تجزیه کردند (نگاره ۲). در بررسی توانایی تجزیه فنول توسط میکروارگانیسم‌ها معمولاً از دو روش استفاده می‌شود. در روش نخست، افزایش تدریجی غلظت فنول به منظور خوگیری (سازگاری) میکروارگانیسم انجام می‌شود که در این حالت میکروارگانیسم فرصت خوگیری به غلظت‌های بالاتر سوبسترا (فنول) را از طریق افزایش بیان ژن آنزیم‌های درگیر در فرایند تجزیه فنول کسب می‌کنند. در این روش باکتری‌های مورد آزمون ممکن است به مرور توانمندی حذف فنول را با استفاده از فرصت ایجاد شده از طریق فرایند خوگیری پیدا کنند (Joseph & Chandrika, 1999). در حالی که در روش دوم که مبنای آن قرارگیری میکروارگانیسم‌ها به صورت یک‌باره در غلظت‌های بالای فنول است، تنها میکروارگانیسم‌هایی که ذاتاً نسبت به غلظت‌های بالای فنول مقاوم هستند توانایی زیست و استفاده از فنول را خواهند داشت. در کاربردهای زیست‌پالایی میکروارگانیسم‌های برگزیده طبق روش دوم به عنوان یک مزیت محسوب می‌شوند (Bathe et al., 2005).



نگاره ۲: میزان رشد و غلظت فنول جدایه اول (الف) و جدایه دوم (ب) در مدت زمان ۳۰ ساعت در محیط کشت پایه معدنی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس

نرخ رشد جدایه‌های برگزیده

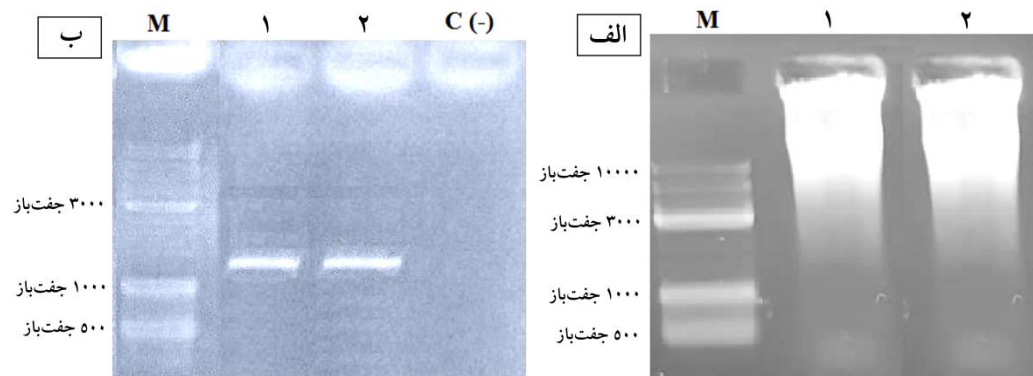
طی ۳۰ ساعت اول پس از کشت جدایه‌ها در محیط کشت پایه معدنی، هر ۲ ساعت یک بار جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و منحنی نرخ رشد جدایه‌ها رسم گردید (نگاره ۳). نتایج نشان داد که برای جدایه‌ی اول مدت فاز تأخیری ۸ ساعت تعیین است. این جدایه‌ی از ساعت ۹ تا ۲۴ رشد خود در فاز لگاریتمی قرار داشت و پس از آن وارد فاز سکون شد. بر این اساس ساعت ۱۶ رشد باکتری، به‌عنوان میانه فاز لگاریتمی جدایه‌ی اول مشخص گردید. برای جدایه‌ی دوم نیز مدت فاز تأخیری ۶ ساعت تعیین گردید. از ساعت ۶ تا ۲۴ جدایه‌ی در فاز لگاریتمی رشد خود قرار داشت و پس از آن وارد فاز سکون شد بر این اساس ساعت ۱۶ رشد باکتری، به عنوان میانه فاز لگاریتمی جدایه‌ی دوم مشخص شد.



نگاره ۳: نرخ رشد جدایه‌های برگزیده در زمان‌های مختلف در محیط کشت پایه معدنی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و غلظت فنول ۰/۱ گرم در لیتر.

شناسایی مولکولی جدایه‌های برگزیده

محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز بر روی ژل آگارز پس از استخراج DNA ژنومی و انجام واکنش‌های پلیمرز برای توالی 16S rDNA، بیانگر یک باند در ناحیه ۱۵۰۰ جفت باز برای هر دو جدایه بود (نگاره ۴).

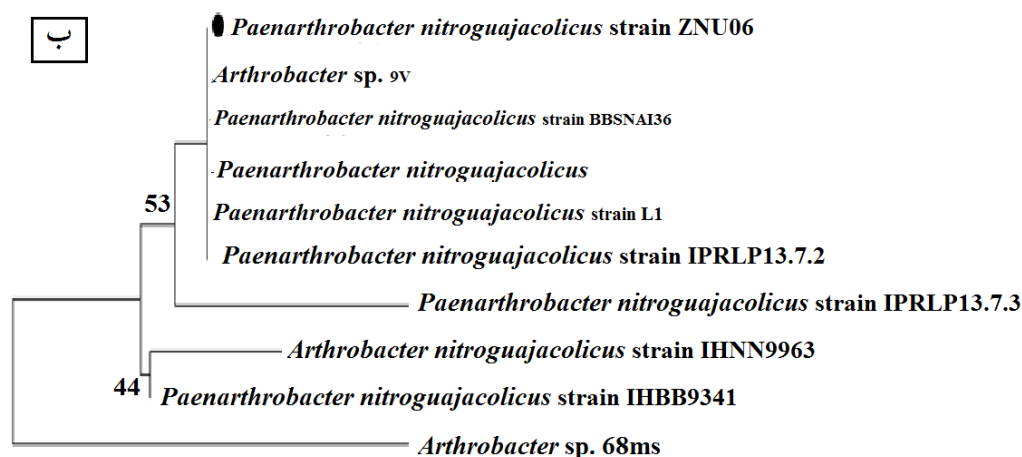
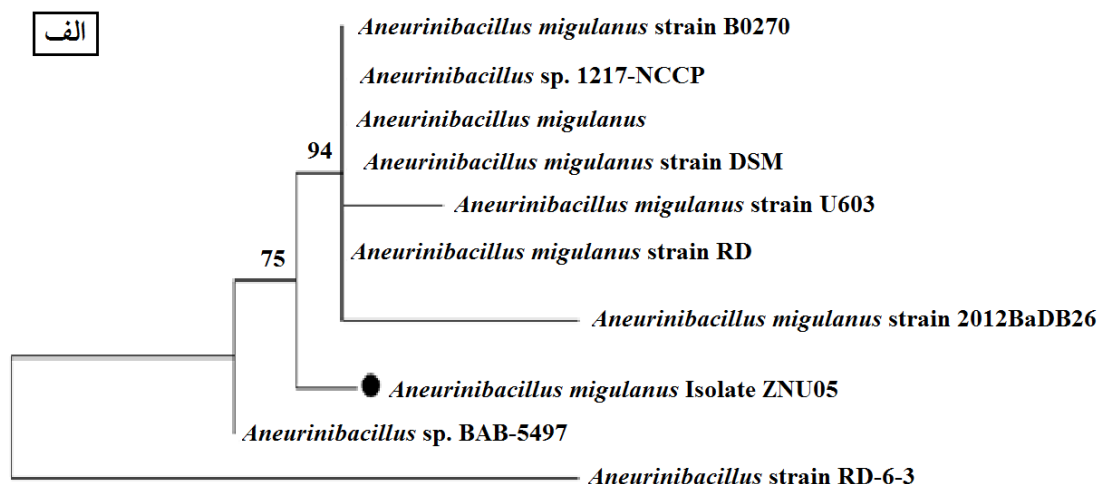


نگاره ۴: ژل الکتروفورز آگاروز: (الف) استخراج DNA ژنومی، (ب) محصول PCR توالی 16S rDNA (۱) جدایه یک نخست، (۲) جدایه‌ی دوم، (M) مارکر وزن مولکولی SM0334، (-) C: کنترل منفی

تعیین توالی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای 27F و 1492R انجام شد. بررسی نتایج تعیین توالی بیانگر یک توالی ۱۳۸۲ نوکلئوتیدی برای جدایه‌ی اول و یک توالی ۱۳۲۵ نوکلئوتیدی برای جدایه‌ی دوم بود. مقایسه توالی ژن 16S rDNA به دست آمده از جدایه‌های برگزیده با توالی‌های موجود در NCBI مشخص کرد که نزدیکترین جدایه‌های شناخته شده به جدایه‌های برگزیده اول و دوم، به ترتیب با درجه همسانی ۹۹ و ۱۰۰ درصد مربوط به *Aneurinibacillus migulanus* و *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* می‌باشند. تاکنون گزارشی در مورد تولید آنزیم کتکول و ۲ دی اکسیژناز و فعالیت فنولازی *Aneurinibacillus migulanus* منتشر نشده است، ولی باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* در پژوهش‌های پیشین به عنوان باکتری واجد فعالیت فنولازی معرفی شده است (Kumar et al., 2005).

نتایج رسم درخت تبارشناسی (نگاره ۵) به روش Maximum Likelihood و تعداد بوت‌استرپ (Bootstrap) ۱۰۰۰ نشان می‌دهد که سویه‌های مختلف باکتری *Aneurinibacillus migulanus* همراه با *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 تشکیل یک خوشه کلی می‌دهد که شامل حداقل یک زیر خوشه هستند. خوشه اول شامل سویه‌های متنوعی هستند که به جز *Aneurinibacillus migulanus* strain U603 بقیه در این زیر خوشه تفاوت ژنتیکی چندانی با هم ندارند اما *Aneurinibacillus migulanus* strain U603 از نظر ژنتیکی متفاوت است. جدایه‌ی *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 نیز به صورت تک نیایی با این شاخه اما در یک زیر خوشه‌ی دیگر قرار می‌گیرد. باکتری *Aneurinibacillus* sp. strain RD--6-3 به عنوان عضو برون گروه است. همچنین، درخت تبارشناسی نشان می‌دهد که *Paenarthrobacter* Isolate ZNU06 با سایر جدایه‌های *Paenarthrobacter* تشکیل یک خوشه مستقل را می‌دهند که با بوت‌استرپ ۵۳ این خوشه تشکیل شده است. همه سویه‌های این شاخه متعلق به گونه *P. nitroguajacolicus* هستند که با توجه به طول شاخه‌ها در بین این جدایه‌ها تنوع ژنتیکی وجود ندارد. در شاخه‌ی مذکور یک جنس *Arthobacter* sp. 9.V وجود دارد که احتمالاً متعلق به گونه *P. nitroguajacolicus* است و باید بررسی شود، این گونه‌ها به صورت تک نیایی هستند. سایر سویه‌های *P.*

nitroguajacolicus نیز در خوشه‌های دیگر قرار دارند که ناشی از تنوع ژنتیکی و تنوع در بین این سویه‌ها هستند. گونه *Arthrobacter* sp. 68 به‌عنوان عضو برون‌گروه در این درخت قرار دارد و با توجه به محل قرار گرفتن از یک جد نیای دیگر منشا گرفته است.



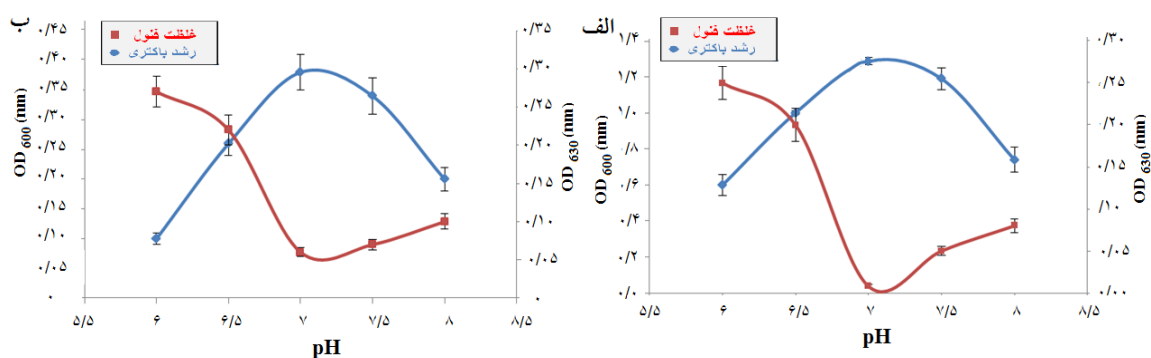
0.005

نگاره ۵: درخت تبارشناسی (فیلوژنی) جدایه‌های برگزیده در این پژوهش بر اساس توالی ژن *16S rDNA* با استفاده از نرم-افزار MEGA-X به روش Maximum Likelihood. نمودار الف مربوطه به جدایه *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 و نمودار ب مربوط به جدایه *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 است.

تعیین pH و دمای بهینه‌ی رشد جدایه‌ها

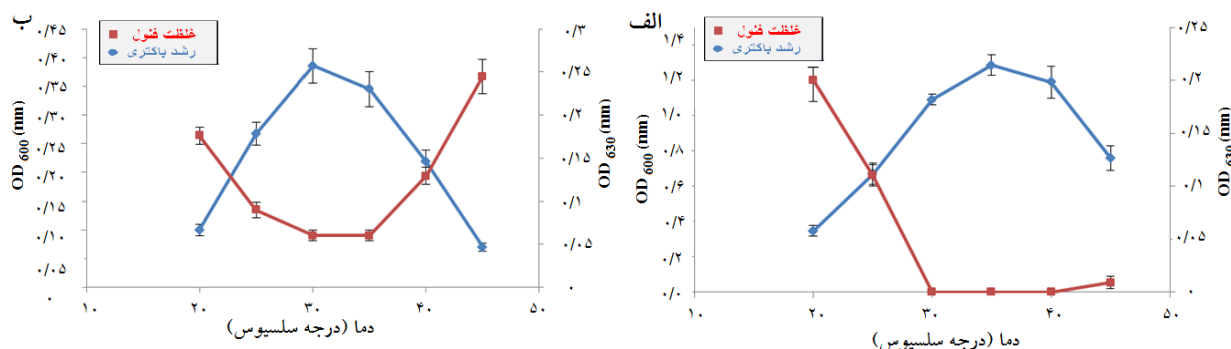
نتایج کشت جدایه‌های برگزیده در pH های مختلف نشان داد که هر دو جدایه در گستره‌ی pH برابر با ۶/۵ تا ۷/۵ رشد بالایی دارند، ولی بیشترین رشد در pH = ۷ مشاهده شد (نگاره ۶). برای اندازه‌گیری pH بهینه نیز از محیط کشت پایه

معدنی و غلظت فنول ۰/۳ گرم در لیتر (یعنی غلظت بهینه فنول) استفاده شد. رشد جدایه‌ها در دامنه pH برابر با ۶ تا ۸ نشان‌دهنده‌ی توانایی بالای این جدایه‌ها برای رشد در محیط‌های مختلف می‌باشد. برای هر دو جدایه، حداکثر رشد و فعالیت فنولازی در حدود pH = ۷ مشاهده شد. همچنین هر دو جدایه، در شرایط قلیایی نسبت به شرایط اسیدی فعالیت فنولازی بهتری را از خود نشان دادند. مطالعات انجام‌شده توسط نداف و گوش (Nadaf & Ghosh, 2011)، تسای و لی (Tsai & Li, 2007) و سیلوا و همکاران (Silva et al., 2013) نشان می‌دهد که باکتری‌های تجزیه‌کننده فنول میانه‌دوست هستند و در شرایط قلیایی نسبت به شرایط اسیدی عملکرد بهتری را از خود نشان می‌دهند. نتایج اثر دماهای گوناگون بر رشد دو جدایه برگزیده نشان می‌دهد که برای جدایه‌ی اول و دوم دمای بهینه برای رشد و فعالیت فنولازی باکتری به ترتیب ۳۵ و ۳۰ درجه سلسیوس است (نگاره ۷) و این بیانگر میانه‌دوست بودن جدایه‌های مورد نظر نسبت به دما می‌باشد. در سایر مطالعات انجام شده بر روی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنول از جمله *Acinetobacter sp* و *Rhodococcus sp*، توانایی تجزیه‌ی فنول در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH = ۷ گزارش شده است (Nadaf & Ghosh, 2011). این نتایج همسو با مطالعه حاضر و نشان‌دهنده‌ی میانه‌دوست بودن این باکتری‌ها است.



نگاره ۶: اثر pHهای مختلف بر قابلیت تجزیه‌ی فنول و رشد جدایه‌ی *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05

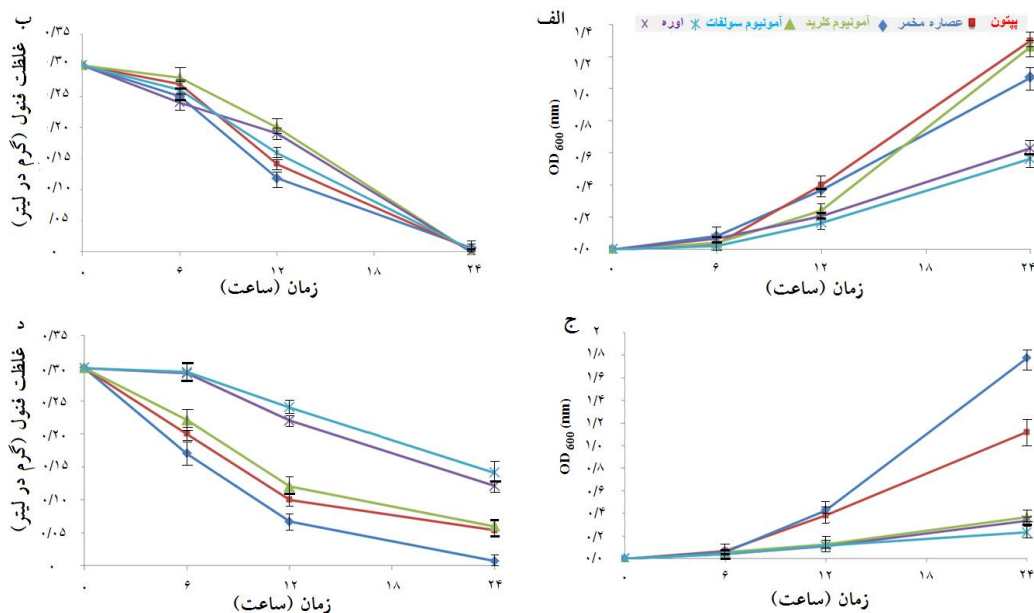
(الف) و جدایه‌ی *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 (ب) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت پایه معدنی. نمودار آبی رنگ میزان رشد باکتری و نمودار قرمز رنگ میزان غلظت فنول باقی‌مانده در محیط را نشان می‌دهند.



نگاره ۷: اثر دماهای مختلف بر قابلیت تجزیه فنول و رشد جدایه‌ی *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 (الف) و جدایه‌ی *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 (ب) در محیط کشت پایه معدنی در pH برابر با ۷. نمودار آبی رنگ میزان رشد باکتری و نمودار قرمز رنگ میزان غلظت فنول باقی مانده در محیط را نشان می‌دهند.

اثر منبع نیتروژن بر رشد جدایه‌ها و تجزیه فنول

بنابر نتایج به دست آمده، بیشترین میزان رشد در باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 در حضور منبع نیتروژن پپتون و آمونیوم کلرید مشاهده شد (نگاره ۸). این نتایج نشان‌دهنده توانایی این جدایه برای رشد در محیط‌های حاوی منابع آلی مانند پپتون می‌باشد و بنابراین دلالت بر خاصیت ارگانوتروف بودن این جدایه دارد (Nelson et al., 2008). رشد مناسب جدایه‌ی مورد نظر در حضور یک منبع نیتروژن ساده مانند آمونیوم کلرید نیز نشان‌دهنده توانایی این جدایه، برای عملکرد مناسب در محیط‌های دارای حداقل شرایط رشد می‌باشد. نتایج حاصل از فعالیت فنولازی نشان داد که این جدایه در تمامی منابع نیتروژن به کار گرفته عملکرد بالایی دارد (نگاره ۸). در باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* بیشترین میزان رشد و تجزیه‌ی فنول در حضور منبع نیتروژن عصاره مخمر مشاهده شد که این نتایج نشان‌دهنده ارگانوتروف بودن این جدایه می‌باشد. در مطالعه‌ی باشا و همکاران (Basha et al., 2010) مشاهده شده است که حضور عصاره مخمر باعث افزایش جذب فنول توسط *Pseudomonas putida* می‌شود و همچنین مطالعه روی *Pseudomonas aeruginosa* با پپتون به عنوان ماده مغذی اضافی بیشترین میزان تجزیه فنول را نشان داده است (He et al., 2013).

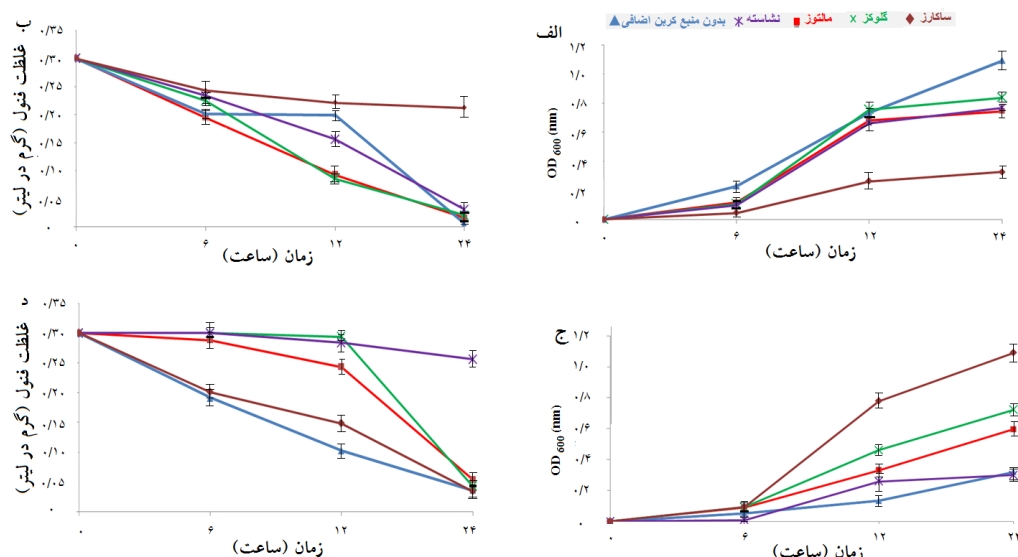


نگاره ۸: اثر منابع مختلف نیتروژن بر میزان رشد باکتری و تجزیه‌ی فنول در *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 (به ترتیب الف، ب) و در *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 (به ترتیب ج، د) در محیط کشت پایه معدنی در دمای بهینه و pH برابر با ۷ و غلظت فنول ۰/۳ گرم در لیتر.

اثر منابع مختلف کربن بر رشد جدایه‌ها و تجزیه‌ی فنول

براسای نتایج بیشترین میزان رشد و تجزیه‌ی فنول برای جدایه‌ی *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 در شرایط کشت بدون حضور منبع کربن اضافی مشاهده گردید (نگاره ۹). عملکرد بالای این جدایه در محیط‌هایی با حداقل شرایط رشد می‌تواند به عنوان مزیتی برای استفاده‌ی این جدایه در محیط‌های متفاوت باشد. در حالی‌که، بیشترین میزان رشد مربوط به جدایه‌ی *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 در حضور منبع کربن ساکارز است بیشترین میزان تجزیه‌ی فنول (نگاره ۹) توسط این جدایه در شرایط کشت بدون حضور منبع کربن اضافی مشاهده شد. از آنجا که گلوکز قندی احیاکننده و ساکارز یک دی‌ساکارید غیر احیاکننده است و با توجه به حداکثر رشد باکتری در حضور ساکارز، به‌نظر می‌رسد این جدایه تمایل بیشتری به رشد در حضور قندهای غیر احیاکننده نسبت به قندهای احیاکننده دارد. همچنین با توجه به تجزیه ساکارز به گلوکز و فروکتوز، به‌نظر می‌رسد این جدایه تمایل بیشتری به قندهای کتون‌ی نسبت به آلدیدی از خود نشان می‌دهد. در نهایت می‌توان گفت که بررسی حداکثر میزان رشد و تجزیه‌ی فنول توسط *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 در منابع متفاوت کربن نشان‌دهنده وابستگی شدید فعالیت فنولازی و رشد این جدایه به منابع کربن آلی می‌باشد به‌طوری‌که بیشترین میزان رشد و تجزیه فنول در حضور ساکارز انجام شده است. البته نتایج حاصل از مطالعه هی و همکاران (He et al., 2013) بر روی تجزیه‌ی فنول توسط باکتری *Bacillus* sp. نشان داد که میزان حذف فنول در حضور گلوکز به‌عنوان منبع کربن افزایش می‌یابد. با این‌حال، مکانیسم اثر نوع قند بر تجزیه فنول به‌ویژه در جدایه‌ی *Paenarthrobacter*

nitroguajacolicus Isolate ZNU06 قابل بررسی بیشتر است و به نظر می‌رسد که احتمالاً قندها مشابه عملکردشان در اپرون لاکتوز (*lac*)، به‌عنوان یک القاکننده عمل کرده و باعث افزایش بیان ژن‌های فنولازی در جدایه‌ها شده است (Loh & Tan, 2000).



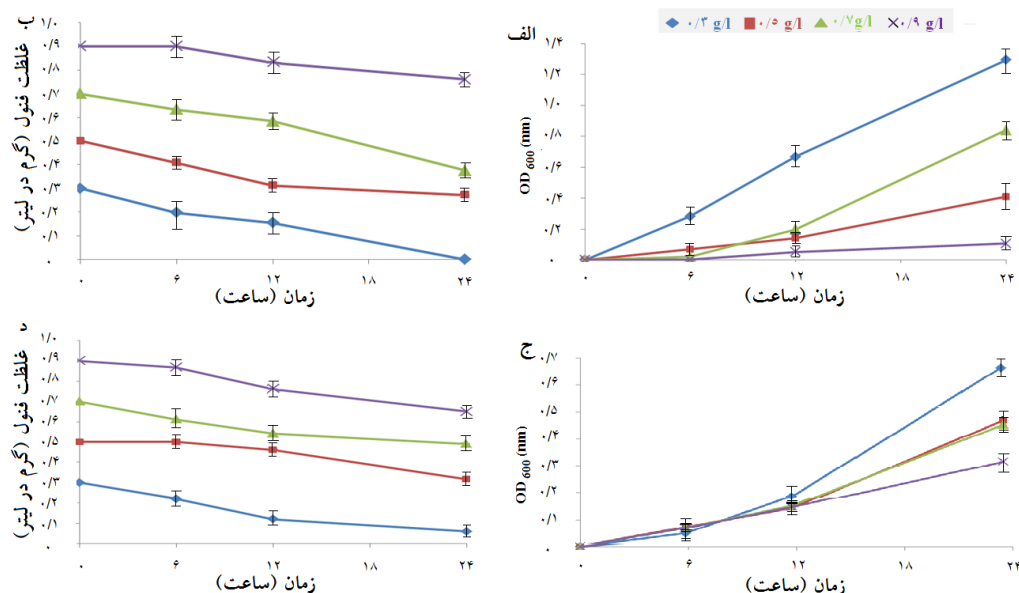
نگاره ۹: اثر منابع مختلف کربن بر میزان رشد باکتری و تجزیه‌ی فنول در *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 (به ترتیب الف، ب) و در *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 (به ترتیب ج، د) در محیط کشت پایه معدنی در دمای بهینه، pH برابر با ۷ و غلظت فنول ۰/۳ گرم در لیتر.

اثر غلظت‌های مختلف سوبسترای فنول بر رشد جدایه و تجزیه فنول

میزان رشد و تجزیه‌ی فنول جدایه‌ها در محیط‌های حاوی ۰/۳ تا ۰/۹ گرم در لیتر فنول به‌عنوان سوبسترا پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت از گرماگذاری در محیط‌های بهینه‌شده بررسی گردید. حداکثر میزان رشد و تجزیه فنول برای هر دو جدایه ۰/۳ گرم در لیتر فنول مشاهده گردید (نگاره ۱۰). در غلظت ۰/۳ گرم در لیتر فنول هر دو سویه حداکثر رشد را داشتند ولی در غلظت ۰/۹ باکتری‌ها اگرچه توانایی رشد داشتند ولی طبق نگاره ۱۰، میزان رشد جدایه‌ی اول (*Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05) بعد از ۲۴ ساعت در غلظت ۰/۹ گرم در لیتر فنول در OD₆₀₀ به ۰/۱ رسید و مصرف فنول بعد از ۲۴ ساعت تنها ۰/۱ گرم در لیتر بود در حالی‌که، در غلظت ۰/۳ گرم در لیتر در فنول در OD₆₀₀ طی ۲۴ ساعت میزان رشد باکتری‌ها به ۱/۲ افزایش یافت و میزان فنول در محیط کشت به صفر رسید. در جدایه‌ی دوم (*Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06) در غلظت ۰/۳ گرم در لیتر فنول حداکثر رشد یعنی حدود ۰/۶ را داشت ولی در غلظت ۰/۹ بعد از ۲۴ ساعت در OD₆₀₀ این رشد به حدود ۰/۳ رسید که این نشانگر مقاوم‌بودن این جدایه نسبت به سمیت فنول است. همچنین، بررسی‌ها نشان می‌دهد که مصرف فنول جدایه‌ی دوم بعد از ۲۴ ساعت ۰/۲ گرم در لیتر است. مقایسه میزان رشد این دو جدایه نشان می‌دهد که *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 نسبت به *Paenarthrobacter*

nitroguajacolicus Isolate ZNU06 توانایی رشد دو برابری در غلظت ۰/۳ گرم در لیتر فنول را دارد ولی نسبت به سمیت فنول حساس تر از جدایه‌ی دوم است.

به‌طور کلی، بررسی حذف فنول توسط این جدایه نشان داد که علی‌رغم رشدشان در غلظت‌های بالای فنول (۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گرم در لیتر)، حداکثر توانایی حذف فنول را در محیط کشت حاوی ۰/۳ گرم در لیتر فنول دارند. از این‌رو می‌توان گفت که این جدایه‌ها می‌توانند در فرایند زیست‌پالایی در مناطقی با غلظت متنوع فنول (۰/۱ الی ۰/۹) نیز مورد استفاده قرار گیرند. مقایسه نتایج قابلیت حذف فنول این پژوهش با سایر پژوهش‌ها مانند سیواسوبرامانیان و ناماسیویام (Sivasubramanian & Namasivayam, 2015)، نشان داد که قابلیت تصفیه زیستی فنول و مشتقات فنولی با استفاده از مخمرها و باکتری‌های جداسازی شده از پساب صنایع سنگین تا غلظت ۰/۵ گرم در لیتر می‌باشد که قابلیت بیشتر جدایه‌های مورد مطالعه را به اکثر جدایه‌های موجود نشان می‌دهد.



نگاره ۱۰: اثر غلظت‌های مختلف فنول (به عنوان سوبسترا) بر میزان رشد باکتری و تجزیه‌ی فنول در

Paenarthrobacter nitroguajacolicus Isolate ZNU06 (به ترتیب الف، ب) و در *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05

(به ترتیب ج، د) در محیط کشت پایه معدنی در دمای بهینه، pH برابر با ۷ و غلظت فنول ۰/۳ گرم در لیتر.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، تعداد ۵۰ جدایه برای شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنول از شیل‌های نفتی ارتفاعات غرب استان کرمانشاه جداسازی شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. با انجام آزمون، میزان رشد و حذف فنول توسط جدایه‌ها، ۲ جدایه به‌عنوان جدایه‌ی برتر برگزیده شدند که حداکثر رشد و حذف فنول را در غلظت ۰/۳ گرم در لیتر فنول داشتند، هر چند در غلظت‌های بالای فنول (۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گرم در لیتر) نیز رشد کردند. جدایه‌ی *Aneurinibacillus migulanus* Isolate

ZNU05 قابلیت حذف فنول بالایی دارد در حالی‌که جدایه‌ی *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 مقاومت بالاتری به سمیت فنول در مقایسه با جدایه‌ی اول دارد. رشد باکتری‌های مورد نظر دارای دمای بهینه ۳۵ و ۳۰ درجه سلسیوس و pH بهینه برابر با ۷ می‌باشند. بنابر مطالعات مولکولی و تعیین توالی 16S rDNA، جدایه‌ی اول از باکتری‌های *Aneurinibacillus migulanus* و جدایه‌ی دوم از باکتری‌های *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* بود. همچنین نتایج این پژوهش بیانگر این است که باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 بدون نیاز به منابع کربن اضافی، قادر به رشد و تولید آنزیم می‌باشد، در حالیکه باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 در حضور منابع کربن اضافی به‌کار رفته در کنار فنول (به‌غیر از نشاسته) توانایی تجزیه فنول را دارد و رشد بهتری را از خود نشان می‌دهد. بهترین منبع نیتروژن برای رشد باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05، آمونیوم کلرید و پیتون بود و برای باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* Isolate ZNU06 عصاره مخمر بهترین اثر را در رشد و تجزیه فنول داشت.

منابع

- Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetolu, T. and Mehmetolu, U. (2004). Kinetics model for the growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process of Biochemistry*, 39(8): 983-988.
- Abd-El-Haleem, D., Beshay, U., Abdelhamid, A.O., Moawad, H. and Zaki, S. (2003). Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. Strain W-17. *African Journal of Biotechnology*, 2(1): 8-12.
- Ajaz, M., Noor, N., Rasool, S.A. and Khan, S.A. (2004). Phenol resistant bacteria from soil: identification-characterization and genetical studies. *Pakistan Journal of Botany*, 36(2): 415-424.
- Aliakbari, N., Mirzaee, Z., Jafarian, V., Khalifeh, K. and Salehi, M. (2019). Genetic and biochemical characterization of a novel thermostable cyclomaltodextrinase from *Anoxybacillus flavithermus*. *Starch-Stärke*, 71(1-2), p.1800133.
- Alenezi, F.N., Rekik, I., Chenari Bouket, A., Luptakova, L., Weitz, H.J., Rateb, M.E., Jaspars, M., Woodward, S. and Belbahri, L. (2017). Increased biological activity of *Aneurinibacillus migulanus* strains correlates with the production of new gramicidin secondary metabolites. *Frontiers in microbiology*, 8: p 517.
- Basha, K.M., Rajendran, A. and Thangavelu, V. (2010). Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1(2): 219-234.
- Bathe, S., de Kreuk, M.K., McSwain, B.S. and Schwarzenbeck, N. (2005). *Aerobic granular sludge*. IWA Publishing.
- Besharati, H. (2015). Microbial Remediation of Petroleum Contaminated Soils and the Role of Rhizosphere in Microorganisms Efficiency. *Iranian journal of soil research*, 28(3): 573-584.
- Busse, H.J. and Wieser, M. (2018). Genus *Paenarthrobacter*: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley, pp.1-9.

- Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Patel, T.N. and Tiwari, K.K. (2010). Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater. *Journal of Environmental Biology*, 31: 293-296.
- He, X.P., Liu, J., Liu, H.J., Lang, S.S., Xu, W.H. and Huang, Z.C. (2013). Effect of conventional carbon sources on phenol degradation by *Bacillus* sp. CDQ. *Advanced Materials Research*, 726(731): 301-304.
- Joseph, I. and Chandrika, V. (1999). Biodegradation of phenol using bacteria from different brackishwater habitats. *Indian Journal of Marine Science*. 28: 438-442.
- Kiyanpour, B R., Motamedi, H, and Bamzadeh, Z. (2016) Isolation and identification of petroleum hydrocarbon degrading bacteria from oil reservoirs located at Asmari, Ahwaz. 9: 145-155.
- Kumar, A., Kumar, S. and Kuma, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, 22: 151-159.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
- Lješević, M., Gojgić-Cvijović, G., Jeda, T., Hashimoto, S., Nakano, T., Bulatović, S., Ilić, M. and Beškoski, V. (2019). Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by *Oerskovia* sp. followed by comprehensive GC× GC-TOF MS. *Journal of hazardous materials*, 363: 227-232.
- Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M. and Naidu, R. (2018). Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental technology and innovation*, 10: 175-193.
- Loh, K.C. and Tan, C.P. (2000). Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64(6): 756-763.
- Milase, R.N. (2015). Purification and characterization of catechol 1, 2- dioxygenase from *Acinetobacter* sp. Strain Y64 and *Escherichia coli* transformants. Submitted to the College of Agriculture, Science and Engineering, School of Life sciences, Discipline of Microbiology, University of KwaZulu-Natal (Westville Campus), in fulfilment of the degree of Master of Science in Microbiology, 94 p
- Mishra, V.K. and Kumar, N. (2017). Microbial Degradation of Phenol: A Review. *Journal of Water Pollution & Purification Research*, 4(1):17-22.
- Nadaf, N.H. and Ghosh J.S. (2011). Purification and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. NCIM 289. *Research Journal of Environment and Earth Science*, 3(5): 608-613.
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L. and Cox, M.M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan
- Reda, A.B. (2009). Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. *Journal of Applied Sciences Research*, 2: 197-201.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Sprin Harbor Laboratory Press, New York.
- Silva, A.S., Jacques, R.J.S., Andrezza, R., Bento, F.M., Roesch, L.F.W. and Camargo, F.A.O. (2013). Properties of catechol 1,2-dioxygenase in the cell free extract and immobilized extract of *Mycobacterium fortuitum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1): 291-297.
- Sivasubramanian, S. and Namasivayam, S.K.R. (2015). Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environmental sources. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1): 243-252.

- Smith, L.S. (1976). Evaluation of Instrument for the Determination of Phenol in Water (Vol. 1). US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory.
- Tsai, S.C. and Li, Y.K. (2007). Purification and characterization of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Candida albicans* TL3". *Archive of Microbiology*, 187: 199-206.
- Wang, C.L., You, S.L. and Wang, S.L. (2006). Purification and characterization of a novel catechol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source. *Process of Biochemistry*, 41: 1594-1601.

Screening and isolation of some phenol-degrading bacteria from petroleum-contaminated soils

F. Rabbani¹, V. Jafarian^{2*}, A. Asoodeh³

Received:2019.05.11

Accepted:2020.05.05

Abstract

This study was conducted to identify 16S rDNA in the superior phenol-degrading bacteria for phenol bioremediation purposes. Two strains were selected as superior ones with higher phenolase activity and investigated in culture media with different pHs, temperatures, and carbon and nitrogen sources. The first strain removed 100% phenol in the medium contained 0.3 g/L phenol as carbon source, 0.2 % peptone and ammonium chloride as nitrogen source after 24 h, at 35 °C in pH 7. While the second strain removed 100% phenol in the medium contained 1 % sucrose, 0.3 g/L phenol as carbon source, 0.2 % yeast extract and ammonium chloride as nitrogen source after 24 h, at 30 °C in pH 7. The results of sequencing and alignment of 16S rDNA sequence revealed that the first strain belongs to *Aneurinibacillus migulanus* and the second one to *Paenarthrobacter nitroguajacolicus*. Overall, the two selected strains from the research could be considered as an appropriate candidate in phenol bioremediation purposes.

Keywords: *Aneurinibacillus migulanus*, Bioremediation, *Paenarthrobacter nitroguajacolicus*, Phenol degradation.

1-Former Master Student, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan.

2-Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan.

*(Corresponding author: V.jafarian@znu.ac.ir)

3-Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad.