عزل وتشخيص بكتريا مكسرة للفينول من ترب محلية في محافظة بابل

فرح طارق عبد الرضا

جامعة بابل / كلية العلوم

Farahtariq472@yahoo.com

الخلاصة

عزلت (٨) عزلات بكتيرية مكسرة للفينول من الترب الزراعية والترب الملوثة بمخلفات زيوت محركات الديزل من محطة محلية لتوليد الطاقة الكهربائية في محافظة بابل وقد شخصت هذه العزلات اعتماداً على الصفات الزرعية والفحوصات البايوكيمياوية. اظهرت النتائج ان خمسة منها تعود الى *B. subtilis* وعزلتين تعود الى *P. aeruginosa* من الترب الزراعية وعزلة واحدة من الترب الملوثة بمخلفات زيوت الديزل تعود الى *P. aeruginosa*. درست قابلية هذه العزلات على تحمل التراكيز المختلفة من الفينول ١٠-١٠٠ ملغم /لتر وقد نمت جميع العزلات على هذه التراكيز الا ان التركيز ٢٠ ملغم/لتر كان الامثل لنموها بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm للمزروع البكتيري بعد ٤٨ ساعة من الحضانة عند درجة حرارة ٣٧°.

الكلمات الدالة : التحليل البيولوجي , والفينول , والتربة الملوثة

Abstract

Eight bacterial isolated of phenol biodegrading were isolated from agricultural and oily polluted soils. These isolates were identified according to cultural features and biochemical tests. The results showed that five isolates were belonged to *Bacillus subtilis* while two isolates belonged to *P. aernginosa* from agricultural soils and one isolate form oily polluted soil. The ability of these isolate to tolerant phenol concentration from 10-100mg/L. All of these isolates were tolerant to these concentration but the concentration was studied 20mg/L was the most prefer concentration due to the absorbance on 600nm for 84hr old bacterial culture at 37c°.

Key words. Biodegradation , phenol, polluted soils

المقدمة

تطرح اعداد هائلة من المركبات العضوية منذ مطلع الثورة الصناعية التي يتم تخليقها كيميائيا والكثير منها تتحرر كفضلات (Fernondo and Aust , 1994) والفينول احد هذه الملوثات البيئية السامة الاكثر شيوعاً ومصنفة ضمن المواد الخطرة على صحة الانسان والاحياء الاخرى (EPA, 2003) لان الكثير منها تمتلك القابلية على البقاء وعدم التفكك في البيئة ولها القابلية على الانتقال (Biotransformation) والتراكم (bioaccumulation) الحيوي في انسجة الانسان والحيوان وزيادة تراكيزها في السلسلة الغذائية (biomagnification) (Dos Santos *et al*., 2009) .

الفينول هو مركب اروماني (AroH) وهي عبارة عن جزيئات تتكون من مجموعة هيدروكسيل مرتبطة بحلقة بنزين وهو شديد السمية ويوجد بتراكيب مختلفة او مرتبطة بمركبات اخرى (EPA , 2003) .الفينول هو سائل او صلب ذو درجة انصهار واطئة لكن درجة غليانه عالية بسبب الاصرة الهيدروجينية فيه وله القابلية على الذوبان في الماء ويرجع ذلك الى قدرته على تكوين اصرة هيدروجينية مع الماء. وجوده في البيئة يرجع الى طرحه من مصادر صناعية ويطرح الى الماء كمخلفات مصانع الادوية واللدائن والمنتجات الخشبية ومصانع الاصباغ والاوراق (0.1-1600 mg/L) وعمليات تكرير النفط (6-500 mg/L) وعمليات التعدين Coal processing (28-3900 mg/L) و (9-6800 mg/L) والصناعات البتروكيمياوية (208- 1220 mg/L) (Busca *et al*., 2008) .

اما المصادر الطبيعية للفينول تشمل تلك المتكونه نتيجة حرائق الغابات والانبعاث الطبيعي للفينول عند استعمال الاسفلت كمواد لاصقة في المدن عند وجود الفينول في الماء يعطي طعم كربوني وله تاثيرات سامة على الاحياء المائية المختلفة (Ghadhi and Sangodker , 1995).

يمكن للمخلفات الفينولية ان تزال من البيئة بواسطة مجموعة من المعاملات الفيزيوكيميائية مثل الادمصاص (Adsorption) والتناضح العكسي الازموزي (revere osmosis) والاكسدة الالكتروكيتية electrolytic oxidation والتحلل الضوئي (photocatalysis) لكن هذه المعالجات غير عملية بسبب كلفاتها العالية وتكوينها مركبات سامة اخرى فمثلا الفينول يتحول نتيجة الكلورة الى مركب سام اخر يسمى كلوروفينول (Marrot *et al*., 2006) .

اما التفكك الحيوي للفينول فهو خطوه جديدة للتخلص من المركبات الخطرة الموجودة والمتراكمة في البيئة ومنها الفينول ومشتقاته الاخرى هناك اعداد كبيرة من الاحياء المجهرية التي لها القابلية على تكسير الفينول ومركباته ومن مصادر مختلفة والتخلص منها وتشمل هذه الاحياء مجاميع من البكتريا والفطريات والطحالب والبكتريا لها اهمية خاصة في هذا الموضوع والتفكك الحيوي (Biodegradation) يوصف بانه التعدين الكامل للمركبات المعقدة الى مركبات ابسط تركيباً او تعقيداً مثل CO_2 و NO_3 و H_2O ومركبات لاعضوية اخرى ويمكن ان يعرف التكسر الحيوي بانه التفكك الكامل واعادة الجزيئات العضوية الى مكوناتها المعدنية (Atlas and Bartha , 1998).

والتفكك الحيوي للفينول يمكن ان يحدث نتيجة فعل عدد كبير من الاحياء المجهرية تشمل انواع البكتريا مثل *Alcaligenes* sp., *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* spp , *Bacillus* spp- واثبتت الدراسات عن التفكك الحيوي للفينول ان جنس *Psendomonase* واسع التطبيق على تفكك المركبات الفينولية وتعود قابلية الـ*Pseudomonas* على النمو على مختلف المركبات العضوية الى امتلاكها ميكانيكية انزيمية مناسبة (Prieto *et al*.,2002) .

الهدف الرئيسي من البحث هو التحري عن وجود عزلات بكتيرية مكسره للفينول واختيرت الترب الزراعية كمصدر لهذه العزلات لكونها غنية بالمركبات الفينولية التي تفرزها النباتات واختيرت التربة الملوثة بمخلفات الديزل لكونها غنية بالملوثات التي تصدرها مخلفات زيوت محركات الديزل التابعة لمحطة محلية لتوليد الطاقة الكهربائية.

المواد وطريقة العمل

جمع العينات

جمعت 5 نماذج تربة من مناطق متفرقة من محافظة بابل في اكياس نايلون معقمة ونموذج واحد جمع من تربة ملوثة بالديزل من محطة توليد الطاقة الكهربائية المحلية و ٤ نماذج من ترب زراعية ونقلت الى المختبر المايكروبايولوجي في قسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة بابل.

عزل البكتريا المكسرة للفينول

وزن ١٠ غرام من كل عينة تربة وعلقت في ١٠٠ مل من وسط(Mineral salt medium (MSM يحتوي على المكونات غم/لتر التالية اعتمادا على (Goulding *et al*., 1988)

NaH_2PO_4, (4.45) K_2HPO_4 (4.36) , $(NH_4)_2SO_4$, (1.26) ,$MgSO_4.6H_2O$ (0.912)

مع اضافة ١٠ مل من محلول الاملاح الضئيلة traceelementsolution يحتوي على الاملاح التالية (غم / ١٠٠) : $FeSO_4 7H_2O$. (0. 1) , $Na_2MoO_4 2H_2O$.(0.37) , $MnCl_2$ (0.02), $CaCl_2.2H_2O$ (4.77) ,$CoCl_2.6H_2O$(0.37)

ضبط الاس الهيدروجيني pH للوسط الى 7.0 وعقم بجهاز الوصدة بدرجة 121c لمدة 15min ثم اضيف الفينول بتركيز 50 ملغم / لتر كمصدر للكاربون والطاقة ثم حضن الوسط الزرعي MSM السائل في دورق زجاجي سعة 250 ml في جهاز الحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة لمدة اسبوع واحد بدرجة حرارة37c ينقل مقدار 5ml من مزروع MSM بعد انتهاء عملية الحضن الى وسط MSM جديد مضاف له والفينول بتركيز 50mg\L وحضن كذلك لمدة اسبوع فقط بدرجة 37c في جهاز الخاصة الهزازة بسرعة 120 دورة / دقيقة تعاد هذه الخطوة مرة اخرى لغرض التأكد من عزل المجاميع البكتيرية القادرة على تكسير الفينول المستعمرات المعزولة تنقل الى وسط Nutrient agar plate بطريقة التخطيط للحصول على مستعمرات نقية معزولة وحضن بدرجة حرارة 30c لمدة يوم واحد المستعمرات المعزولة النقية تنقل الى وسطMSM agar مضاف اليه الفينول بتركيز 50mg\L وتحفظ بطريقة الزرع المائل في الثلاجة وبدرجة 4c.

تشخيص العزلات

صنفت العزلات على اساس الصفات الزرعية والفحوصات البايوكيميائية اعتمادا على (Macfaddin ,2000) .

دراسة القابلية التكسيرية للعزلات البكترية

نميت العزلات البكتيرية في وسط Nutrient broth لمدة يوم واحد بدرجة حرارة 37c في حاضنة هزازة بسرعة 120دورة م/دقيقة بعد ٢٤ ساعة من الحضن الزرع ينقل الى وسط MSM مضاف اليه الفينول بتركيز10mg\L ونميت في حاضنة هزازة بسرعة 120 دورة /دقيقة بدرجة حرارة 37c لمدة 48 ساعة . انبوب السيطرة يتكون من جميع مكونات وسط MSM مع الفينول فقط واعيدت الخطوات اعلاه لعمل تراكيز مختلفة من الفينول من ١٠-١٠٠ ملغم / لتر تحضن الانابيب ذات التراكيز المختلفة من الفينول لكل عزلة بكتيرية بدرجة حرارة 37c لمدة يومين في حاضنة هزازه بسرعة ١٢٠ دورة / دقيقة ايام.حسب مقدار نمو البكتيريا (العزلات) بدلالة قياس الامتصاصية عند الطول الموجي.(600nm) بجهاز المطياف الضوئي .

النتائج والمناقشة

تم عزل 8 عزلات بكتيرية من الترب الزراعية مكسرة للفينول شخصت اعتماداً على الصفات المورفولوجية والفحوصات البايوكيمياوية الى ٥ منها تعود الى جنس *B.subtilis* وعزلتين تابعة الى جنس *P.aeruginosa* اما التربة الملوثة بمخلفات زيوت الديزل فعزلت منها عزله واحدة شخصت على انها تعود الى جنس *P. aeruginosa*.

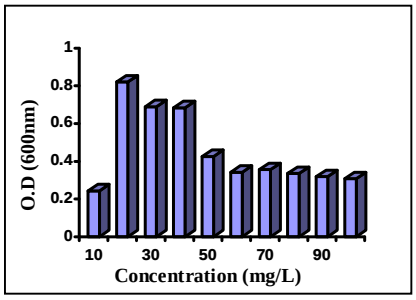
جدول (١): الانواع البكتيرية المعزولة من الترب الملوثة من مواقع مختلفة في مدينة الحلة

الرمز	العزلة	مكان الجمع
BS_1	*B. subtilis*	جمعية 1
BS_2	*B. subtilis*	جمعية 2
BS_3	*B. subtilis*	بكرلي 1
BS_4	*B. subtilis*	كرامة 1
BS_5	*B. subtilis*	كرامة 2
PA_1	*P. aeruginosa*	جمعية 1
PA_2	*P. aeruginosa*	جمعية 2
PAP_1	*P. aeruginosa*	بكرلي 2

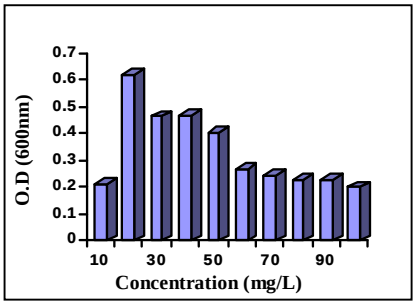
جدول (٢) : تشخيص العزلات البكترية المكسرة للفينول اعتماداً على الفحوصات البايوكيميائية .

Test	*B. subtilis*	*P. aeruginosa*
Gram stain	+	-
Calalase	+	+
Oxidase	-	+
Motilily	-	+
Gelatin hydrolysis	-	+
Citrate	-	+
Nitrate reduction	-	-
Glucose oxidation	+	+
Lactose	-	-
Mannose	+	-
Arabinose	-	+
Raffinose	-	-
Xylose	-	-
Sucrose	+	-
Maltose	-	-
Mannitol	+	+
Galactose	+	+
Fructose	+	+
Ribose	-	-
Urea hydrohysis	-	-
Lysin decarboxylase	+	-
Arginine dihydrolase	-	+
Ornithine hydrolysis	+	-
Starch hydrolysis	+	-

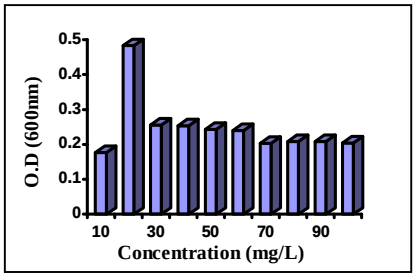
ودرست قابلية العزلات البكتيرية الثمانية على النمو بتراكيز من الفينول ١٠- ١٠٠ ملغم/لتر وكانت جميع العزلات لها اقصى نمو عند التركيز ٢٠ ملغم/لتر بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600 nm وتتناقص هذه القابلية مع زيادة تركيز الفينول الاشكال (١ و ٢ و ٣ و ٤ و ٥ و٦ و٧ و٨) .



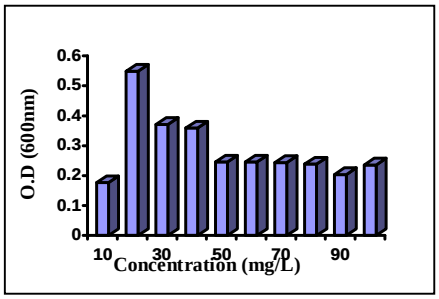
شكل (١): يمثل نمو العزلة BS_1 في تراكيز مختلفة من الفينول بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm



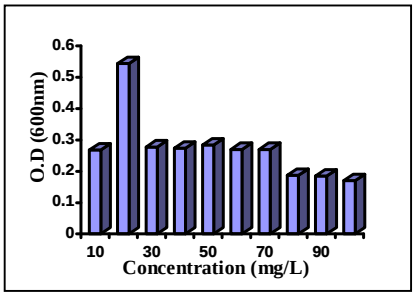
شكل (2): يمثل نمو العزلة BS_2 في تراكيز مختلفة من الفينول بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm



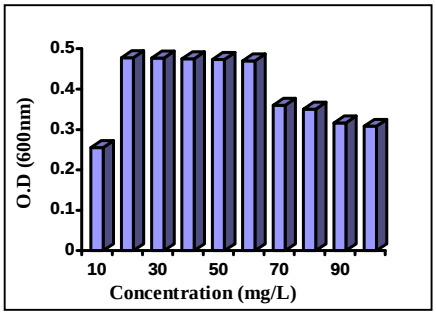
شكل (٣): يمثل نمو العزلة BA_1 في تراكيز مختلفة من الفينول بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm



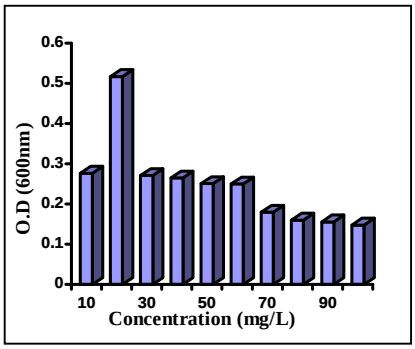
شكل (4): يمثل نمو العزلة BS_3 في تراكيز مختلفة من الفينول بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm



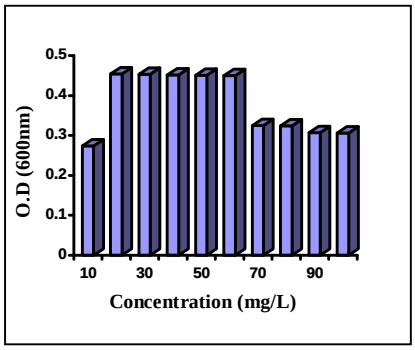
شكل (٥): يمثل نمو العزلةBS_4 في تراكيز مختلفة من الفينول بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm



شكل (6): يمثل نمو العزلة BS_5 في تراكيز مختلفة من الفينول بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm



شكل (7): يمثل نمو العزلة BA_2 في تراكيز مختلفة من الفينول بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm



شكل (8): يمثل نمو العزلة PAP_1 في تراكيز مختلفة من الفينول بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm

ونتائج البحث تتفق مع نتائج بحوث ودراسات اخرى واغلب هذه الدراسات

عزلت انواع تعود الى جنس *Pseudomonas* وتنتمي الى عائلة *Pseudomnaceae* منها Kounty وجماعته (2003) عزلوا بكتريا مكسرة للفينول من الترب السيبيرية وكانت اغلب العزلات تعود الى جنس*Pseudomonas* وخاصة النوع *P. putida* .

اثبتت دراسات Williams and Sayers (1994) Torres وجماعتــه (1999) ، Powlowski and Shingler (1994) وجود انظمة التخلص من الفينول في عزلات *Pseudomonas* الفسلجية والبيئية ووجدوا هناك تنوع كبير يدعم امكانية هذه الكائنات في الأنظمة المعقدة لتكسير الفينول و وجود تنوع وراثي ومظهري لأنواع البكتيريا *Pseudomonas* وتعتبر من اكثر العزلات تكسيراً للفينول. وقد توصل كل مــن Whiteley and Mark (2000) الى نتيجة انه عند زيادة تركيز ملوث ما يسبب انتخاب مجتمع مــايكروي مكسر مع قلة التنوع فيه او انتخاب مجاميع اكثر مقاومة مع المقارنة بالمجتمع المــايكروبي غيــر المكســر للملوثات نتائج هذا البحث اتفقت مع كثير من الدراسات التي اثبتت قابلية *Bacillus* على تكسير الفينول فمثلاً Ajaz وجماعته(2004) عزلوا انواع تابعة لجنس*Bacillus* مكسرة للمركبات الفينولية من الترب الملوثــة بالمشتقات النفطية.

Kalfilzadeh وجماعته (2010) عزلوا ست عزلات بكتيرية من مخلفات مصافي تكرير النفط في ايران وكانت اغلب العزلات تنتمي الى جنس *Pseudomonas* ودرست قابلية نمو هذه العزلات على تراكيز مختلفة من الفينول 0.2-0.9 غم/ لتر بدلالة قياس الامتصاصية على طول موجي 600nm ولوحظ ايضاً ان اقصى امتصاصية عند تركيز 0.2-0.5 غم/ لتر واقصى نمو عند تركيز 200 mg/L بعد ٤٨ ساعة من الحضانة.

Concentration mg/L

Molhite وجماعته في (2010) اثبتوا نمو العزلة *Streptococcus epidermis* فــي الفينــول بتركيز اعلى من 200 ملغم/لتر ولوحظ ايضاً نقصان في نموها بزيادة تركيز الفينول.

درس Zhang (2013) درسوا قابلية *B. cereus* المعزولة من مخلفات المياه الحاوية على الفينول على النمو بتراكيز مختلفة من الفينول ووجدوا ان التركيز الامثل لنموها هو 0.02 ملغم/ لتر.

Annadvria وجماعته (2007) درسوا قابلية *p. pictorum* على تكسير الفينول ووجد لها القابلية على تكسير الفينول بالتركيز 200 ملغم / لتر بدلالة اقصى نمو للبكتريا.

اثبت Mahiuddin وجماعته (2012) قابلية العزلة *P. fluoreseens* على النمو بتركيز اكثر من 1000ppm من الفينول.

Naresh وجماعته (2012) درسوا قابلية عزلة بكتيرية معزولة من المخلفات المائية في الهند على تكسير الفينول في الزرع البكتيري الهزاز ولوحظ قابلية هذه البكتريا على التكسير التــام للفينــول بتركيــز 1000ppm بعد اربعة ايام في الحضانة.

Sexena وجماعته (2013) عزلوا بكتريا من التربة الملوثة بمخلفات البترول . *Acinetobacter* sp. واثبتوا قابلتها على تكسير الفينول بتركيز 9.5 mM .

عزل Ahmed وجماعته (2011) ١١٠ عزلة بكتيرية من مواقع صناعية وزراعية في ماليزيا لهــا القابلية على تكسير الفينول في وسط الاملاح السائل ستة من هذه العزلات تابعة الى جنس *Acietobacter* sp. لها القابلية العالية على تكسير الفينول بتركيز 1500mg/L .

عزل Reda وجماعته (2010) ثمان عزلات بكتيرية مكسرة للفينول تعود الى جنس *B. subtilis* و *B. firmus* و *B. laterosporus* و *B. putida* و *B. licheniformis* و *p. alcaligens* و *Aciantobacter* من الماء والقرب الملوثة وكانت *B. laterosporus B. subtilis* تمتلك قابلية تكسيرية عالية بدلالة قياس النمو والمحتوى البروتيني .عزل Dokic وجماعته (2011) عزلتين تعودان الى جـــنس *Bacillus sp*. لها القابلية على تكسير مركبات اروماتية متعددة ومن ضمنها الفينول .

Reference

Agency for Toxic Sustances and Disease Registry. (2003). Medical Management Guidelines for phenol.http:/www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg115.html.

Ahmed, SA ., Mohd AS., Noorliza Mat Arif , Mohd YAS and Nor AS. (2011).Isolation , Identification and characterization of Elevated phenol Degrading Acinetobacter sp. Strain AQ5 NOL1 . Australain Journal of Basic and Applied Sciences , 5 (8) :1035 – 1045.

Ajaz, M. Noor N, Alazrasool S, and Khan S A. (2004). Phenol Resistant bacteria from soil : identification –characterization and general studies.Pak .J.Bot., 36(2) : 415-424.

Annadvrai, G. Ling, LY. and Fwulee, J. (2007). Biodegration of phenol by a bacterial strain isolated from a phenol contaminated site in India. I Research Journal of Environment Scien ces Vol. (1); 46-49.

Atlas , R M. and Bartha R. (1998). In Microbial Ecology . Fundamentals and applications 4h Edition Bajamin and Cummings Science publishing, California .

Bayoumi ,R A. and Abul – Hamd, A T. (2010) .Optimization of Baccterial Biodegradation of Toluene and Phenol Under Different Nutritional and Environmental Conditions Journal of Applied Sciences Research . 6 (8) :1086 - 1095.

Busca, G. Berardinelli, S. Resini C., and Arrighi L. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. J. Hazard Mater 160, 265-288.

Dokic L, Narancic T., Nikodinovic -Runic,J., Bajkic S, and Vailjevic B. (2011). Four *Bacillus* sp. Isolates capable of degrading phenol, toluene, Biphenyl, naphthalene and other aromatic compounds exhibit different aromatic catabolic potentials. Arch. Biol. Sci, Belgrade, 63(4). 1057-1067.

Dos Santos ,V L. de Souza Monterio A, Braga DT, and Santoro MM. (2009). Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FEB isolated from industrial effluents. J. Hazard Mater,161, 1413-1420.

Fernando, T. and Aust SD (1994) Biodegradation of toxic chemicals by white rot fungi. In : Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals.Chaudhry- GR. Ed. (Discoorides Press, Portland, or), pp. 386-387.

Ghadhi, SC. and Sangodkar, UMX. (1995). Potentials of *Pseudomnas cepacia* PAA in bioremediation of aquatic wastes containing phenol. Proceeding of National symposium frontiers in applied and environmental microbiology 11-13, Dec. cochin.

Goulding ,C. ,Gillen C J., and Bolton E. (1988). Biodegradation of subatituted benzenes. J. Appl. Bacteriol. 65:1-5.

Gurjealakshmi, G. and Oreil, P. (1988). Isolation of phenol degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. Appl. Environ. Microbial. 55(2): 500-502.

Kafilzadeh, F., Farhangdoost, MA. and Tahery, Y. (2010) .Isolation and Identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay.African Journal of Biotechnology .9 (40) .6721-6726.

Kounty, M. ,Ruzicka J. and Chlachula, J. (2003). Screening for phenol- degrading bacteria in the pristine solids of south Siberia.Appl. Soil Ecol. 23: 79- 83.

Leonard, D. Ben C Y. , Destnehaut, C. Lindley, ND. and Queinnec , I.(1999b). phenol degradation by *Ralatonia eutropha* calorimetric determination of 2-hydroxymueonic semialdehyde accumulation by fed batch fermentation. Biotechnol. Bioeng . 65 (4): 407-414.

MacFaddin, J F. (2000) Biochemical test identification of medical bacteria Williams and Wilkins. London.

Mahiuddin MD., Fakhruddin, ANM. and Al- Mahin, A. (2012).Degradation of phenol Via Meta Clearage pathway by Pseudomonas fluorescens PU1. ISRN Microbiology.

Marrot B, Barrios- Martinez A, Moulin P. and Roche N (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an Immersed membrane bioreactor. Biochem Eng. J. 30, 174-183.

Mohite, BV. Ejalgaonwala, R., Pawar, S. and Morankar , A. (2010). Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. Innorative Romanian Food Biotechnology . (7) : 61-65.

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 Enviromment Sciences.. 1 (1): 46-49.

Powlowski, J. and Shingler , V. (1994). Genetic S. and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonase* sp. CF600. Biodegradation, 5: 219-236.

Prieto M B., Hidalgo, A., Rodriguezfc – serra J L. and Llama ,M J. (2002). Biodegradion of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropitics* UPV-1 immobilizef in air- stirred reactor with clarifier. Appl. Microbial. Biotechnol. 58: 583-859.

Prpich, G P. and Daugulis ,A J. (2005). Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid- liquid two phase partitioning bioreactorBiodegradation 16: 329-339.

Roche, N (2006) .Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an Immersed membrane bioreactor .Biochem .Eng.J .30: 174-183.

Sexena, M . Gupta, S. ,Mohmood U. ,M. , Kumar, R. and Kumar A. (2013) .Identification and genetic characterization of phenol –degrading bacterium isolated from Oil contaminated soil.African Journal of Biotechnology 12 (8) :791-797.

Torres, LG., Chao, C. and Chao, W. (1999). Methods for DNA extraction from various soils.J. Appl. Microbiol. 88. 937-943.

Whiteley. A. and Mark ,J. (2000). Bacterial Community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2401-2407.

Williams P. A. and Sayers , J R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. Biodergadation , 5: 195-217.

Zhang Y , Lu, D., Ju ,T., Wang L, Lin S , Zhao Y , Wang C , He H and DU ,Y. (2013). Biodegradation of Phenol Using *Baillus* WJ1 and Evalation of Degradation Efficieny .Based on a Graphene – Modified Electrode. Int. J. Electrochom. Sci., 8: 504-519.