بررسی روند رشد و تجزیه زیستی فنل به‌وسیله باکتری جدا شده از پساب صنعتی در شرایط آزمایشگاه

سمیه اسکندری [۱] مهران هودجی [۲] آرزو طهمورث پور [۳]

(دریافت ۸۸/۶/۲۵ پذیرش ۸۹/۳/۳۰)

چکیده

فنل یک ترکیب کربن‌دار است که در مقادیر بیشتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای محیط و انسان خطرناک است. بهترین روش برای تصفیه و از بین بردن فنل موجود در پساب بخش کک‌سازی کارخانه‌های ذوب فلز، تصفیه زیستی است. در این تحقیق با جداسازی باکتری‌های بومی موجود در پساب فنل‌دار کارخانه ذوب آهن اصفهان، اقدام به سازش‌پذیر کردن یک جدایه و در نهایت حذف فنل توسط این جدایه گردید. همچنین رفتار این جدایه در محیط کشت سنتزی حاوی ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل بررسی شد و مشخص شد که این جدایه پس از یک فاز تأخیری ٢٤ و ٤٨ ساعته رشد کرده و مقدار فنل را به‌ترتیب پس از ٢٦٤ و ٢٨٨ ساعت به صفر میلی‌گرم در لیتر می‌رساند. این جدایه قادر است مقدار فنل را در یک پساب طبیعی از ۲۲۳۳ میلی‌گرم در لیتر در طی مدت ۱۲۰ ساعت به صفر برساند. شناسایی این جدایه مشخص کرد یک *کوکوباسیل* گرم منفی است که احتمالاً از گونه *سدوموناس* است. با به‌کارگیری این جدایه به‌تنهایی و یا حتی ترکیبی از چند جدایه سازگار شده، می‌توان میزان فنل در این پساب‌ها را در طی مدت زمان کوتاه‌تری به صفر رساند.

واژه‌های کلیدی: تصفیه زیستی، فنل، جداسازی، باکتری، پساب

Study of Growth Process and Phenol Biodegradation by a Bacterium Isolated from Wastewater (in vitro)

Somayye Eskandary [1] *Mehran Hoodaji[2]* *Arezoo Tahmourespour[3]*

(Received Sep. 16, 2009 Accepted June 20, 2010)

Abstract

Phenol is a carbonic compound that is dangerous for humans at a concentration of 0.5 ppm in the environment. The best phenol removal from coal tar wastewaters is achieved by bioremediation. In this study, we isolated indigenous bacteria from phenolic wastewater and adapted it to a high concentration of phenol for its removal from wastewater. We also investigated the growth and removal curves of the bacteria in media with 2000 and 4000 ppm of phenol. It was observed that after lag phases of 24 and 48 hours, they grew and removed all of the phenol concentration over 264 and 312 hours. It was also found that this isolate was able to remove 2233 ppm of phenol in natural wastewater over a period of 120 hours. Identification tests showed that it is a gram-negative bactetium possibly belonging to the pseudomonas species. Phenol concentrations in wastewater can be reduced over a shorter period of time by using either this isolate alone or a group of them.

Keywords: Biodegradation, Phenol, Isolation, Bacteria, Wastewater.

۱- دانشجوی دکترای خاکشناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان (نویسنده مسئول)(۰۳۱۱) ۶۶۸۶۶۹۱ eskandary.s@gmail.com
۲- دانشیار گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان

1. Ph.D. Student of Soil Sciences, School of Agriculture and Natural Resources, Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan (Corresponding Author) (+98 311) 6686691 eskandary.s@gmail.com
2. Assoc. Prof. of Soil Science, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan
3. Assist. Prof. of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan

۱- مقدمه

فنل در حال حاضر به‌عنوان یک ماده شیمیایی سمّی در آب و فاضلاب از مهم‌ترین آلاینده‌های آلی محسوب می‌شود[۱]. این ماده سمّی از طریق پساب صنایع زغال سنگ، کک‌سازی، پتروشیمی، علف‌کشها، حشره‌کشها، آفت‌کشها، حلالها و رزین به محیط زیست وارد می‌شود [۲و۳]. رایج‌ترین روشهای تصفیه فنل عبارت‌اند از انعقاد[1]، پدیده اسمز[2]، تبادل یونی[3]، پالایش[4]، الکترودیالیز[5]، تصفیه الکتروشیمیایی[6] و شناورسازی[7]. در حالی که این روشها بسیار گران هستند و بازدهی آنها پایین است [۴، ۵ و ۶].

جزئیات تصفیه زیستی فنل توسط باکتری‌ها در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است، اما این باکتری‌ها تا غلظتهای خاصی توانستند در برابر اثر بازدارندگی فنل مقاومت کرده و دوره رشد خود را به پایان برسانند [۷]. برای مقاوم کردن باکتری‌ها به فنل و غلبه بر تأثیر بازدارندگی از رشد آن، نظریه‌های زیادی وجود دارد که یکی از این نظریه‌ها سازش دادن باکتری به مقادیر بالای فنل است [۸]. نظریه دیگر دستکاری ژنتیکی باکتری‌هاست که با استفاده از مهندسی ژنتیک، توانایی باکتری را برای رشد در مجاورت ماده ممانعت کننده بالا می‌برد [۹]. نظریه سوم نیز تثبیت کردن باکتری است[8] [۱۰]. در نهایت یکی دیگر از روشهایی که توانایی باکتری را برای مواجه شدن با مقادیر بالای فنل افزایش می‌دهد، استفاده از این ماده به‌عنوان منبع نیتروژن و یا کربن است[۱۱].

با علم به این که در سیستم‌های تصفیه بیولوژیکی، میکروارگانیسم‌ها مسئول تصفیه آلاینده‌های موردنظر هستند، لذا شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌ها گام مهمی در روند تکاملی سیستم‌های تصفیه فاضلاب به‌خصوص مواد سمّی محسوب می‌شود. تصفیه زیستی فنل توسط باکتری‌های زیادی مورد بررسی قرار گرفته است که از جمله این باکتری‌ها *سدوموناس*[9] در خاک آمریکا *اسینتوباکتر رادیوستنس*[10] در پساب پالایشگاه نفت سوئد و *آلکالیجنس فیکالیک*[11] در نمونه خاک آمازون است [۱۲، ۱۳ و ۱۴]. به‌منظور اندازه‌گیری میزان تجزیه فنل از روش اسپکتروفتومتری، کروماتوگرافی گازی و HPLC[12] استفاده می‌شود. مانازا و همکاران[13] در سال ۲۰۰۴ به باکتری‌های گرم متغیری دست یافتند که توانایی تغییر فنل را به بنزوئیک اسید دارا بودند. آنها پس از جداسازی سی نمونه باکتریایی به این نتیجه رسیدند که از این میان فقط چهار جدایه توانایی رشد در محیط حاوی ۱۵ میلی مول فنل را داشتند [۱۵].

در مطالعه حاضر از فنل به‌عنوان یک منبع کربن و انرژی استفاده شد و برای اندازه‌گیری آن از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. به‌طور کلی در این تحقیق اقدام به جداسازی و بررسی توانایی تجزیه فنل توسط یک باکتری در پساب صنعتی و مطالعه روند رشد و تجزیه فنل توسط این باکتری در محیط کشت سنتزی و پساب فنل‌دار پرداخته شد.

۲- مواد و روشها

در این تحقیق دو نمونه پساب A و B تهیه شد که به‌ترتیب اولی از ورودی استخر فنلی یعنی استخری که اضافه پساب‌های حاوی فنل به آن ریخته می‌شود تهیه شد و دومی از خروجی آب کندانسور واحد قطران بخش ککسازی کارخانه ذوب آهن اصفهان. نمونه‌ها در بطری‌های شیشه‌ای اسیدشویی شده و استریل، جمع‌آوری گردید و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

pH نمونه‌های پساب پس از انتقال به آزمایشگاه به‌وسیله دستگاه pH متر مدل ۲۶۲ کالیبره شده با محلولهای بافر، اندازه‌گیری شد[۱۶]. برای اندازه‌گیری BOD از روش تیتراسیون استفاده شد [۱۶]. برای اندازه‌گیری میزان COD از روش تقطیر برگشتی بسته استفاده شد [۱۶]. در اندازه‌گیری فنل از معرف گیبس استفاده شد. به هر نمونه ۱۵۰ میلی لیتری که در دور ۶۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شده بود، ۳۰ میلی‌لیتر $NaHCO_3$ یک مولار و ۲۰ میلی لیتر از معرف گیبس اضافه شده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر میزان فنل با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد [۱۷].

به‌منظور بررسی باکتری‌هایی که دارای قدرت تجزیه فنل هستند، از محیط کشت سنتزی حاوی ۵۳۵۰ میلی‌گرم Na2HPO4 ، ۲۶۷۰ میلی‌گرم NH4Cl، ۰/۶ میلی‌گرم CaCl2.H2O ، ۶ میلی‌گرم MgSO4 ، ۲/۴میلی‌گرم FeSO4.H2O و ۰/۰۹ میلی‌گرمMnSO4.H2O در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰۰ میلی‌گرم فنل استفاده شد و pH محیط بر روی ۷ تنظیم گردید. سپس محیط کشت در لوله‌های درپیچ‌دار به میزان ۱۰ میلی‌لیتر در هر لوله توزیع گردید و آزمایش به‌صورت سه تکرار، انجام شد. لوله‌ها بر روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی

[1] Coagulation
[2] Osmosis
[3] Ion-Exchange
[4] Ultrafiltration
[5] Electrodialysis
[6] Electrochemical
[7] Floatation
[8] Cell Immobilisation
[9] *Pseudomonas*
[10] *Acinetobacter Radioresistanse*
[11] *Alcaligenes faecalic*
[12] High Performance Liquid Chromatography
[13] Munazza et al.

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 و در پایان هر هفته در صورت مشاهده کدورت در محیط کشت، تلقیح در محیط کشت جدید صورت می‌گرفت. در نهایت باکتری‌های رشد کرده در محیط‌های مایع به محیط کشت‌های جامد حاوی فنل منتقل شدند و از طریق تهیه رقت، کلونی‌های مجزا که هر یک مربوط به یک باکتری بود، تهیه شد. سپس کلنی‌های تک جداسازی شده دوباره به محیط کشت مایع حاوی فنل منتقل شدند تا جدایه برتر انتخاب شود [۱۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۱].

پس از جداسازی جدایه‌های باکتریایی، به‌منظور غربال بهترین و قوی‌ترین جدایه، باکتری‌ها در محیط کشت مایع فنل‌دار در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل کشت داده شدند و اولین باکتری که در حداقل زمان ممکن شروع به رشد نمود و همچنین از حداکثر کدورت در مجاورت فنل برخوردار بود، به‌عنوان جدایه میکربی مناسب انتخاب گردید.

شناسایی جدایه برتر با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مناسب از جمله آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، آزمون لاکتوز، آزمون گلوکز، آزمون اوره آز، آزمون ایندول، آزمون حرکت، رشد بر روی محیط مک کانکی، رشد بر روی TSA، آزمون لیتموس میلک ، آزمون ستیرات، آزمون نیترات ردوکتاز، آزمون متیل رد و آزمون OF صورت گرفت.

باکتری‌های مقاوم که توانایی رشد بر روی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را داشتند انتخاب شده و به محیط کشت‌های مایع حاوی ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل انتقال داده شدند و سپس منحنی رشد و حذف فنل جدایه برتر به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر در دوره‌های زمانی ۲۴ ساعته رسم شد [۲۲].

به‌منظور جهت بررسی رفتار جدایه برتر در محیط کشت و پساب طبیعی حاوی فنل، از نمونه B تهیه شده از پساب واحد کک‌سازی استفاده شد. ابتدا مقدار فنل در پساب اندازه‌گیری شد و پس از استریل کردن پساب توسط اتوکلاو دوباره مقدار فنل مورد نظر به آن اضافه شد و در نهایت منحنی رشد و تجزیه فنل جدایه برتر رسم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین خصوصیات پساب

برخی از خصوصیات دو نمونه پساب از جمله BOD ، COD ، pH و مقدار فنل اندازه‌گیری شده است که به‌ترتیب مقادیر ۳۲۸/۳ میلی‌گرم در لیتر، ۱۲۷۹/۳ میلی‌گرم در لیتر ، ۷/۵۶ و ۱۲۰۷ میلی‌گرم در لیتر فنل برای نمونه پساب اولیه که به‌منظور جداسازی باکتری‌ها جمع‌آوری شده بود به‌دست آمد. همچنین برای نمونه پساب دوم که برای بررسی رفتار باکتری جمع‌آوری شده بود مقادیر COD، pH و مقدارفنل به‌ترتیب برابر ۹۸۷۰ میلی‌گرم در لیتر، ۸/۹۱ و ۲۲۳۳ میلی‌گرم در لیتر فنل اندازه‌گیری شد. در این پساب مقدار BOD تعیین نشد.

آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا[1] مقدار مجاز فنل در پساب خروجی صنایع را برابر ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین کرده است که در مورد پساب‌های مورد نظر، مقدار فنل چندین برابر مقدار استاندارد بود. مقدار بالای فنل در این پساب مانع از رشد میکروارگانیسم‌هایی می‌شود که قادر به تجزیه فنل نیستند [۲۲].

از طرفی مقدار استاندارد BOD_5 برای پساب‌های صنعتی برابر با ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و حداکثر آن بسته به نوع صنعت و شرایط فیزیکی و شیمیایی برابر با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین شده است. در این مقاله با توجه به مقدار BOD_5 این دو پساب، مقدار اندازه‌گیری شده برای پساب A بسیار بالا بود اما در مورد BOD_5 پایین پساب دوم، این طور استنباط می‌شود که BOD_5 کم نشان دهنده پاک بودن پساب و یا فقدان میکروارگانیسم‌هایی است که به مصرف اکسیژن نیاز دارند. احتمال دیگر این است که میکروارگانیسم‌ها در پساب مرده و یا در حال مرگ باشند. با توجه به بالا بودن مقدار فنل در این پساب، هر یک از این احتمالات می‌تواند صادق باشد [۲۲].

همچنین میزان استاندارد COD برای پساب‌های صنعتی ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین شده است و مقدار حداکثر آن ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است. COD هر دو پساب مورد آزمایش بسیار بالاتر از استانداردهای ارائه شده بود. بالاتر بودن میزان COD نسبت به BOD_5 به این دلیل است که وقتی ترکیبات سمّی از جمله فنل در پساب وجود داشته باشد از فعالیت میکروارگانیسم‌هایی که مواد آلی را تخریب می‌کنند، کاسته می‌شود و حضور این ترکیبات در طی انجام آزمایش باعث کاهش میزان BOD_5 می‌گردد [۲۲]. جدول ۱ انتخاب جدایه برتر از میان جدایه‌های جداسازی شده را با توجه به درصد رشد در ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل در طی ۲۴ ساعت نشان می‌دهد.

بیشترین درصد رشد را به‌ترتیب جدایه‌های ۱۵، ۷، ۱۰، ۱، ۵ و ۱۸ دارا بودند که رشد در این جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد با بقیه جدایه‌ها داشت. در نتیجه ۶۰ درصد از کل کلنی‌های جداسازی شده به‌عنوان جدایه مقاوم انتخاب شدند و از این میان جدایه شماره ۱۵ به عنوان جدایه برتر برای این مطالعه در نظر گرفته شد.

[1] US. Environmental Protection Agency (US.EPA)

جدول ۱- انتخاب جدایه برتر از میان کلیه جدایه‌ها

جدایه	جدایه ۱	جدایه ۵	جدایه ۷	جدایه ۱۰	جدایه ۱۵	جدایه ۱۸
درصد رشد پس از ۲۴ ساعت	۴۲/۵	۴۷	۱۰	۶۷/۵	۷۳/۵	۱۱

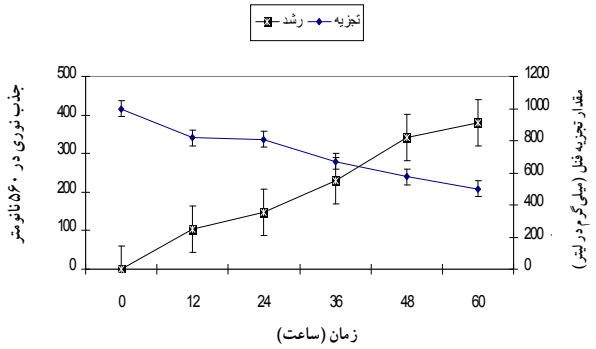
در شناسایی جدایه برتر با استفاده از آزمون گرم مشخص شد که باکتری از نوع *کوکوباسیل* گرم منفی است و در نتیجه با استفاده از کتاب مرجع برگی[1] و آزمون‌های بیوشیمیایی، نتایجی به‌دست آمد که به صورت جدول ۲ ارائه شده است. البته برای شناسایی بیشتر این باکتری نیاز به آزمون‌های شناسایی دقیق‌تر از جمله شناسایی ملکولی است.

جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی جدایه برتر

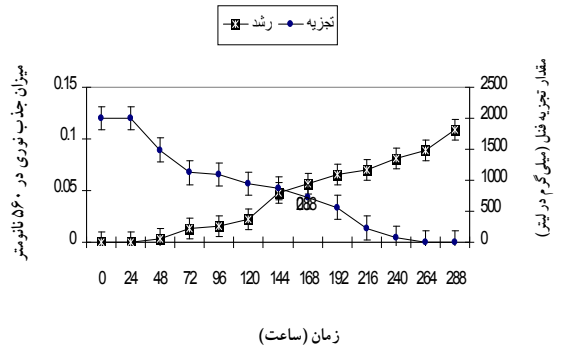
آزمون	نتیجه
آزمون کاتالاز	+
آزمون اکسیداز	+
آزمون لاکتوز	-
آزمون گلوکز	-
آزمون اوره آز	+
آزمون ایندول	-
آزمون حرکت	+
رشد بر روی مک کانکی	+
رشد بر روی TSA	+
آزمون OF	O+/F-
سوارمینگ روی TSA	-
آزمون لیتموس میلک	-
آزمون سیترات	+
آزمون نیترات	+
آزمون متیل رد	+
تولید H_2S	-
نام پیشنهادی جدایه	*سدوموناس (فلورسانس)*

در تحقیق مشابهی آیسلابی و همکاران[2] در سال ۲۰۰۰ در تحقیقی از طریق جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های آروماتیک اقدام به شناسایی این میکروارگانیسم‌ها کردند. آنها باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی و اکسیداز مثبتی را شناسایی کردند که برخی از آنها *سدوموناس*[3] و برخی *اسفنگوموناس*[4] بودند [۲۳].

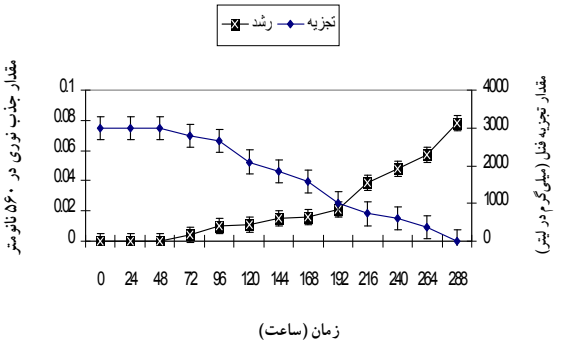
منحنی رشد و حذف فنل برای جدایه برتر در ۱۰۰۰ ، ۲۰۰۰ ، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل در شکلهای ۱ تا ۴ و مقایسه رفتار جدایه در محیط کشت سنتزی و پساب در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۱- منحنی رشد و تجزیه فنل جدایه برتر در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

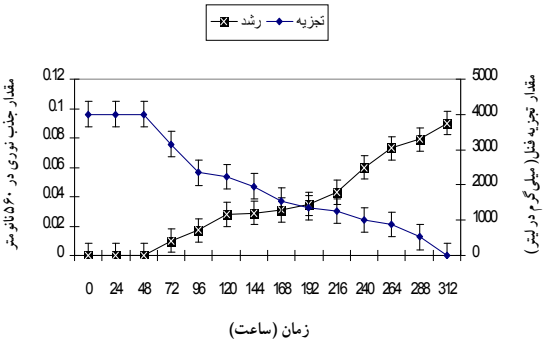


شکل ۲- منحنی رشد و تجزیه فنل جدایه برتر در ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

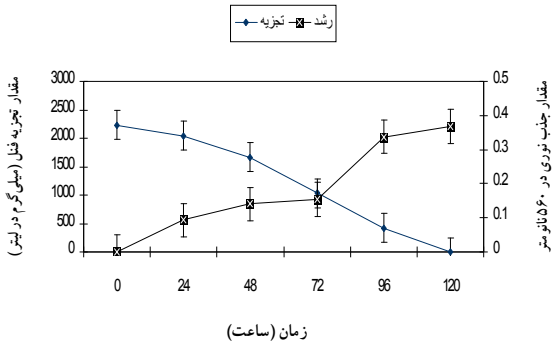


شکل ۳- منحنی رشد و تجزیه فنل جدایه برتر در ۳۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

[1] Brggeys Manual Method
[2] Aislabie et al.
[3] *Pseudomonas*
[4] *Sphangomonase*



شکل ۴- منحنی رشد و تجزیه فنل جدایه برتر در ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل



شکل ۵- منحنی رشد و تجزیه فنل جدایه برتر در پساب نمونه B تهیه شده از پساب کک سازی، حاوی ۲۲۳۳ میلی‌گرم بر لیتر فنل

چنانچه در شکلها مشاهده می‌شود، جدایه در ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل پس از ۶۰ ساعت، ۵۰ درصد از فنل را تجزیه کرده است. همچنین این جدایه می‌تواند مقدارهای ۲۰۰۰ ، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در مدت زمان به‌ترتیب ۲۶۴، ۲۸۸، ۳۱۲ ساعت به صفر برساند. با افزایش مقدار فنل مدت زمان فاز تأخیری باکتری افزایش پیدا می‌کند. به‌عنوان مثال در ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل، باکتری پس از ۳۶ ساعت شروع به رشد می‌کند. در این مرحله، باکتری در حال سازش با شرایط محیط بوده ، فعالیت متابولیک به‌شدت در حال انجام است ولی تقسیم سلولی صورت نمی‌پذیرد. با ورود باکتری به مرحله رشد لگاریتمی، تجزیه فنل که تنها منبع کربن موجود در محیط است نیز آغاز می‌گردد و پس از گذشت مدتی، میزان تجزیه فنل به حداکثر می‌رسد. این باکتری میزان ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را در مدت زمان ۳۱۲ ساعت به صفر میلی‌گرم در لیتر می‌رساند. در مطالعه مشابهی اوبیرون و همکاران[1] در سال ۲۰۰۵ تأثیر تهویه و مقدار اولیه فنل در تصفیه فنل به‌وسیله *سدوموناس فلورسنس*[2] و *سدوموناس آئروژینوس*[3] و ترکیبی از آنها را مطالعه نموده و بیان کردند که غلظت فنل ابتدا به ۱۰۰۰ و در نهایت به ۵۰۰ میلی گرم در لیتر رسیده است. این افزایش غلظت فنل سبب طولانی شدن فاز تأخیری در باکتری *سدوموناس آئروژینوس* از ۸ به ۱۶ ساعت شده است اما در مخلوط دو باکتری، فاز تاخیری فقط در ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر رخ داده است [۲۴].

چنانچه مشاهده می‌شود در این مطالعه باکتری مورد نظر مقدار ۲۲۳۳ میلی‌گرم در لیتر فنل را در یک پساب طبیعی طی مدت زمان ۱۲۰ ساعت به صفر رساند. این باکتری در شرایط پساب طبیعی در مدت زمان کمتری فنل را تجزیه می‌کند و این ممکن است به‌دلیل حضور مواد کربنه دیگر و ترکیباتی باشد که از آنها به‌عنوان منبع تغذیه استفاده کرده است.

در جدول ۳ رفتار جدایه مورد نظر در هر غلظت به‌کار برده شده از فنل در محیط کشت سنتزی در آزمایشگاه و همچنین رفتار آن در پساب طبیعی بررسی شده است.

کترشا و همکاران[4] در سال ۲۰۰۸ نمونه‌ای از *سدوموناس آئروجینوس* از پسماندهای یک منطقه صنعتی را جداسازی کردند که توانایی تجزیه فنل را تا غلظت ۱۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر، در طی مدت زمان ۱۵۶ ساعت دارا بود. آنها در طی این بررسی به این نتیجه رسیدند که عناصری مانند آهن، سرب، مس، روی و منگنز در مقادیر کم سبب می شوند که فرایند تصفیه تحریک شود [۲۵].

جدول ۳- بررسی رفتار جدایه برتر در هر غلظت از فنل و پساب طبیعی

غلظت فنل (mg/L)	فاز تاخیری (hr)	مدت زمان تصفیه (hr)	مقدار باقیمانده از فنل (mg/L)
۱۰۰۰	۵	۶۰	۵۰۰
۲۰۰۰	۲۴	۲۶۴	۰
۳۰۰۰	۴۸	۲۸۸	۰
۴۰۰۰	۷۲	۳۱۲	۰
۲۲۳۳ (پساب طبیعی)	۸	۱۲۰	۰

[1] Oboirien et al.
[2] *Pseudomonas florescence*
[3] *Pseudomonas Aerojinous*
[4] Kotresha et al.

۴- نتیجه‌گیری

در پساب مناطق صنعتی که آلوده به ماده سمّی فنل در غلظتهای بالا هستند نیز باکتری‌هایی وجود دارند که رشد کرده و قادرند تجزیه زیستی فنل را انجام دهند. افزایش غلظت فنل در محیط با افزایش سطح مقاومت باکتری‌های موجود همراه است و در طی رشد در صورتی که باکتری، منبع کربنی به‌جز فنل در دسترس نداشته باشد، از فنل به‌عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط استفاده می‌کند.

اکثر جدایه‌هایی که در پساب‌های آلوده به فنل وجود داشتند و قادر به تجزیه فنل بودند، *باسیل‌ها* و *کوکو باسیل‌های* گرم منفی بودند که در این تحقیق نیز باکتری مورد نظر از *کوکوباسیل‌های* گرم منفی شناسایی شد. با استفاده از این باکتری‌های مقاوم و ایجاد شرایط بهینه تصفیه زیستی می‌توان با صرف هزینه کمتر و مشکلات زیست محیطی کمتر ناشی از بقایای تصفیه یک ماده خطرناک، پساب‌های آلوده به این ترکیب کربنه را پالایش کرد. در این تحقیق بر روی شرایط بهینه تصفیه باکتری از جمله دمای بهینه، اسیدیته محیط، شوری پساب و حضور فلزات سنگین در پساب بحث نشد که لازم است در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

۵- مراجع

1- Loh, K.C., Chung, T.S., and Wei-Fern, A. (2000). "Immobilized cell membrane bioreactor for high strength phenol wastewater." *J. Environ Eng*., 126,75-79.

2-Bulbul, G., and Aksu, Z. (1997). "Investigation of wastewater treatment containing phenol using free and Ca-alginated gel immobilized *Pseudomonas putida* in a batch stirred reactor." *Turkish J. Eng. Environ. Sci*., 21 175-181.

3- Sung, R.H., Soydoa, V., and Hiroaki, O. (2000). "Biodegradation by mixed microorganism of granular activated carbon loaded with a mixture of phenols." *J. Biotechnology*, 22, 1093-1096.

4- Kobayashi, W., and Rittmann, B. (1982). "Microbial removal of hazardous organic compounds." *J. Environ. Sci. Technol*., 16, 170-183.

5- Gupta, V.K., Sharma, S., Yadav, I.S., and Mohan, D. (1998). "Utilization of bagasse fly ash generated in the sugar industry for the removal and recovery of phenol and P-nitrophenol from wastewater." *J. Chem. Technol. Biotechnol*., 71, 180-186.

6- Rengaraj, S., Seung-hyeon, M., Sivabalan, R., Arabindoo, B., and Murugesan, V. (2002). "Agricultural solid waste for the removal of organics: Adsorption of phenol from water and wastewater by palm seed coat activated carbon." *J. Wastewater Management*, 22, 543-548.

7- Wang, S.J., and Loh, K.C. (1999). "Modelling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation." *J. Enzyme Microbial Technology*, 25, 177-184.

8- Masque, C., Nolla, M., and Bordons, A. (1987). "Selection and adaptation of a phenol degrading strain of Pseudomonas." *J. Biotechnology*, 9, 655-660.

9- Soda, S. I.K. M., and Fujita, M. (1998). "Effects of inoculation of a genetically engineered bacterium on performance and indigenous bacteria of a sequencing batch activated sludge process treating phenol." *J. Ferment Bioengineering*, 86, 90-96.

10- Chung, T.S., Loh, K.C., and Tay, H.L. (1998). "Development of polysulfone membranes for bacteria immobilization to remove phenol." *J. Appl. Polym. Sci*., 70, 2585-2594.

11- Lob, K.C., and Tar, P.P. (2000). "Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol." *J. Environ. Contam. Toxicol*., 64, 756-763.

12- 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." *J. Applied and Environmental Microbiology*, 184, 3941-3946.

13- Pession, E., Divari, S., Griva, E., Cavaletto, M., Rossi, G.L., and Giunta, C. (2000). "Phenol hydroxylase from Acinetobacter radioresistensis a multi component enzyme." *J. Biochemistry*, 265, 162-171.

14- Eduardo, A., Baston, R., and Moon, D. (2000). "Salt tolerant phenol degrading microorganisms isolated from amazonian soil sample." *J. Applied and Environmental Microbiology*, 174, 346-352.

15- Munazza, A., Nabeela, N., Sheikh, R., and Shakeel, A. (2004). "Phenol resistant bacteria from soil: Identification- Characthtrization and genetical studies." *Pakistan J. of Biotechnology*, 36, 415-424.

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

17-Quintana, M.G., Didion, C., and Dalton, H. (1997). "Colorimetric method for a rapid detection of oxygenated aromatic biotransformation products." *J. Biotechnology Techniques*, 11, 585-587.

18-Shih, C., Davey, M., Zhou, J., Tiedje, J., and Criddle, C. (1996). "Effect of phenol feeding pattern on microbial community structure and cometabolism of trichloroethylene." *J. Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2953-2960.

19-Rigo, M., and Alegre, R.M. (2004). "Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms kinetics of the biodegradation." *J. Folia Microbiology*, 49, 41-45.

20- Tahmourespour, A. and Kasra Kermanshahi, R. (1386). "Adaptation a bacterium isolated from wastewater to heavy metal." *J. Water and Wastewater*, 61, 53-59. (In Persian)

21- Ghanavati, H., and Emtiazi, G. (1386). "Effect of phenol inhibition in removal of NH3 or nitrification process from coal tar wastewater of steal meal plant that contain high concentration of phenol and NH3." *J. Water and Wastewater*,61, 43-52. (In Persian)

22-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." *J. Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1907-1912.

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

24- Oboirien, B., Amigun, B., Ojumu, T., and Ogunkunle, O. (2005). "Substrate Inhibition kinetics of phenol egradation by *pseudomonas aeroginosa* and *pseudomonas florescence*." *J. of Biotechnology*, 4, 50-61.

25- Kotresha, D., and Vidyasagar, G. (2008). "Isolation and characterisation of phenol-degradation pseudomonas *aeroginosa* and *pseudomonas florescence*." *World J. Microbiology Biotechnology*, 24, 514-547.