بررسی اثر غلظت فنل بر رشد، تنفس و تشکیل بیوفیلم باکتری‌های تجزیه کننده فنل در پساب کارخانه ذوب‌آهن اصفهان

ناصر گلبانگ* مهدی حسن شاهیان** گیتی امتیازی***

(دریافت ۸۳/۲/۱ پذیرش ۸۳/۹/۳۰)

چکیده

ترکیبات فنلی، فنل و مشتقات فنل، آلوده‌کننده‌های محیطی هستند که در پساب‌های صنعتی مختلف مانند تبدیلات زغال سنگ، پالایشگاه نفت، کارخانه‌های شیمیایی و پتروشیمی وجود دارند. حضور این ترکیبات در پساب کارخانه ذوب‌آهن اصفهان خطر جدی برای محیط زیست منطقه در پی دارد. بهترین و کم هزینه‌ترین روش تصفیه پساب‌های آلوده به فنل و ترکیبات فنلی استفاده از روش‌های تصفیه زیستی است. در این تحقیق، ۱۵ سویه باکتریایی تجزیه کننده فنل از مکان‌های مختلف کارخانه ذوب‌آهن اصفهان جدا سازی گردید . از بین این ۱۵ سویه باکتریایی، ۵ سویه به عنوان سویه‌های غالب با نام سویه‌های B3, C1, C4, C7, D14 شناخته شدند، که قابلیت بالایی برای حذف فنل نشان می‌دادند. سپس اثر غلظت‌های مختلف فنل (۹۰۰-۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) بر میزان رشد، تنفس و تشکیل بیو فیلم این ۵ سویه بررسی شد . نتایج حاکی از آن بود که کلیه سویه‌ها تا غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل، رشد و حذف فنل مناسبی نشان می‌دادند؛ اما در این بین میزان رشد سویه B3 در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بالاتر از چهار سویه دیگر بود و همین سویه، بالاترین بیو فیلم را در این غلظت تشکیل می‌داد. تنفس سویه‌ها در غلظت‌های فزاینده فنل متناسب با رشد آن‌هاست به طوری که اکثر سویه‌ها بالاترین تنفس را در غلظت ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل نشان می‌دادند و در همین غلظت بالاترین رشد و بیو فیلم را داشتند. دوره انکوباسیون نیز تأثیر به سزایی بر حذف فنل سویه‌ها داشت، بدین صورت که در دوره انکوباسیون ۲۴ ساعته تنها تا غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تجزیه می‌گردید؛ اما با افزایش این زمان به ۴۸ ساعت، فنل به طور کامل تا غلظت ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تجزیه می‌گردید. با به کارگیری این سویه‌ها در حوضچه‌های تصفیه فنل کارخانه ذوب‌آهن می‌توان میزان آلودگی فنلی این کارخانه را به طور قابل توجهی کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: فنل، آلودگی فنلی، تجزیه زیستی ، بیو فیلم، تنفس

Effect of Phenol Concentration on Growth, Respiration and Biofilm Formation of Phenol-Degrading Bacteria in Isfahan Steal Plant Wastewater

Golbang, N. (Ph.D), Shaheian, H.M. (M.Sc.), and Emtiazi, G. (Ph.D)
Dept. of Biology, University of Isfahan

Abstract

Phenol and phenolic compounds are environmental pollutants that are found in industrial wastewater of oil refineries, coal tar, and chemical plants. Presences of these compounds in Isfahan steal plant have serious consequences for regional environment. Biodegradation is the best and economic method for refinement of phenol contaminated sites. In this research 15 phenol-degrading bacteria strains were isolated from different sites of Isfahan steal plant wastewater. Five dominant strains named as B3, C1, C4, C7 and D14 that had high capacity

* استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان
** دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی
*** استاد گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان

to eliminate phenol. Effects of different concentrations of phenol (100-900 mg/ml) on growth. Respiration and biofilm formation of 5 dominant strains were investigated. All strains grown well up to 500 mg/l of phenol concentration and eliminated it. Strains B3 had the most growth and biofilm formation on 300 mg/l. The majority strains had the best respiration growth and biofilm formation in 400-500 mg/l of phenol concentration. At 24 hours incubation time up to 500 mg/l phenol of phenol was degraded and at 48 hours incubation time 900 mg/l of phenol was degraded. By using these strains it could be possible to reduce phenol pollutant in phenol refinement pools of the Isfahan steal plant.

مقدمه

طی قرن بیستم پیشرفت سریع کارخانه‌های شیمیایی موجب تولید ترکیبات شیمیایی متعددی شده که باعث تغییر در شیوه زندگی انسان شده‌اند. تولید ترکیبات شیمیایی مختلف در مقیاس زیاد یک تهدید جهانی برای محیط زیست می‌باشد[۲و۴]. ترکیبات فنلی، فنل و فنل‌های جایگزین شده آلوده کننده‌هایی هستند که از پساب کارخانه‌های زغال سنگ، کارخانه‌های نفتی و پتروشیمی و کارخانه‌های شیمیایی وارد محیط زیست می‌شوند. فنل‌ها هم‌چنین برای ساخت رزین‌ها ، پلاستیک‌ها ، ضد عفونی کننده‌ها، محافظت کننده‌های چوب و رنگ‌ها استفاده می‌شوند[۱۵،۷و ۱۶]. کارخانه ذوب‌آهن اصفهان به دلیل استفاده از زغال سنگ، آلودگی فنلی بالایی دارد. بسیاری از ترکیبات فنلی به وسیله آژانس‌های حفاظت محیطی جزء آلوده کننده‌های اولیه به حساب آمده‌اند. این آژانس مقدار مجاز فنل در آب آشامیدنی را حداکثر ۲-۱ میکروگرم بر لیتر و مقدار مجاز فنل در خروجی پساب صنایع را ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر تعیین کرده است[۱۰]. بنابراین تصفیه این پساب‌ها به دلیل سمیت بالای ترکیبات اهمیت زیادی دارد. تصفیه زیستی، روشی است که از پتانسیل میکروارگانیسم‌ها برای پاک کردن محیط‌های آلوده استفاده می‌کند.

پساب‌های حاوی ۴۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل برای تصفیه زیستی مناسب هستند. در بین میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌ها اهمیت خاصی در تصفیه زیستی پساب‌های آلوده به فنل دارند. تا کنون تعداد زیادی از باکتری‌های تجزیه کننده فنل جدا شده و راه‌های تجزیه فنل مطالعه گردیده‌اند[۱۱]. تجزیه هوازی ترکیبات فنلی به وسیله هیدروکسیلاسیون حلقه که منجر به ایجاد کاتکول می‌شود، شروع می‌گردد. این مرحله به وسیله آنزیم فنل هیدروکسیلاز کاتالیز می‌شود ، سپس در باکتری‌های مختلف از طریق مسرارتو یا متا ، کاتکول به واسطه‌های چرخه کربس تبدیل شده و وارد متابولیسم باکتری می‌شود[۸ و۱۲]. از جمله پژوهش‌های انجام شده در این زمینه می‌توان به تصفیه زیستی پساب آلوده به فنل کارخانه‌های شیمیایی در ژاپن توسط واتانابه[1] و همکاران با استفاده از لجن فعال در سال ۱۹۹۹ اشاره کرد. آن‌ها توانستند غلظت فنل را در خروجی پساب با استفاده از باکتری‌های لجن فعال تا حد قابل توجهی کاهش دهند[۱۳]. اهداف این تحقیق عبارتند از :

۱- بررسی اثر غلظت‌های مختلف فنل بر رشد باکتری‌های تجزیه کننده فنل که در پساب ذوب‌آهن به طور طبیعی وجود دارند. ۲- تعیین حداکثر مقداری از فنل که باکتری‌ها قادر به تجزیه آن باشند. ۳- بررسی اثر زمان انکوباسیون بر تجزیه فنل توسط باکتری‌های تجزیه کننده. برای دست‌یابی به این اهداف سه فاکتور اساسی یعنی رشد، تنفس (زنده ماندن) و تشکیل بیوفیلم به وسیله این باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف فنل مورد بررسی قرار گرفت. با دانستن این اطلاعات می‌توان تصفیه زیستی بهتری از پساب آلوده به فنل کارخانه به دست آورد.

مواد وروش‌ها

نمونه‌برداری

مناطقی که برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل از آن‌ها نمونه‌برداری صورت گرفته عبارتنداز :

- خروجی آب کندانسور واحد قطران واقع در بخش کک‌سازی.
- ورودی حوضچه تصفیه فنل واقع در بخش کک‌سازی.
- خاک آغشته به قیر اسیدی واقع در بخش کک‌سازی.

از هر منطقه ذکر شده دو بار نمونه‌برداری شد و در مجموع ۶ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت.

جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل

به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل یک میلی‌لیتر از نمونه پساب یا یک‌گرم از خاک آلوده در داخل

[1] Watanabe

محیط فنل براث تلقیح شد. پس از آن که نمونه‌ها بر روی شیکر با دور rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه تکان خورد، یک میلی‌لیتر ازاین محیط به یک محیط فنل براث جدید منتقل شد و این عمل تا چهار تلقیح انجام گردید و در نهایت باکتری‌های تجزیه کننده که در محیط فنل براث رشد کرده بودند، بر روی محیط فنل آگار جداسازی شدند[۱۴]. شناسایی باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی طبق دستورالعمل برگی[1] انجام شد[۵].

رشد و حذف فنل سویه‌ها

منحنی رشد سویه‌ها در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل با اندازه‌گیری جذب نوری و کدورت سنجی در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. هم‌چنین غلظت باقی‌مانده فنل در محیط کشت طی رشد باکتری‌ها با معرف گیبس (۲و۴ دی کلرو کینون ۴-کلرو ایمید) سنجش شد[۹].

اثر غلظت‌های مختلف فنل بر روی رشد و تشکیل بیو فیلم باکتری‌های جداسازی شده

باکتری‌های جداسازی شده در غلظت‌های مختلف فنل از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تا ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۰ درجه رشد سویه‌ها در هریک از غلظت‌های فنل اندازه‌گیری شد. با کم کردن شاهد، منحنی رشد سویه‌ها در غلظت‌های مختلف فنل به دست آمد. برای بررسی میزان تشکیل بیوفیلم در غلظت‌های مختلف فنل، محیط کشت و سویه‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، خالی شد و دوبار برای حذف باکتری‌های آزاد با بافر PBS شست و شو داده شد؛ سپس بیوفیلم ایجاد شده در هر یک از غلظت‌های فنل با رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و اندازه‌گیری جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر مشخص گردید[۳].

اندازه‌گیری تنفس و زنده ماندن سویه‌ها در غلظت‌های مختلف فنل

برای اندازه‌گیری میزان تنفس و زنده ماندن سویه‌ها در غلظت‌های فزاینده فنل، از رنگ تنفس (تری‌فنیل تترازولیوم کلراید)[2] TTC استفاده گردید. بدین صورت که بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، رنگ تنفس TTC به محیط کشت اضافه گردید و رنگ قرمز ایجاد شده در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد؛ کم کردن از شاهد میزان تنفس و زنده ماندن سویه‌ها در غلظت‌های مختلف فنل مشخص شد[۱و۶].

نتایج و مشاهدات

خصوصیات باکتری‌های جداسازی شده

پس از تلقیح‌های متعدد نمونه‌های پساب و خاک، ۱۵ سویه باکتریایی به صورت ایزوله جداسازی شد، از بین این ۱۵ سویه باکتریایی، ۵ سویه که قابلیت بهتری برای حذف فنل داشتند، به عنوان سویه های B3, C1, C4, C7, D14 برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. خصوصیات این ۵ سویه در جدول ۱ آمده است. همه سویه‌ها گرم منفی بوده و رشد در شرایط هوازی مثبت و عدم رشد در شرایط بی‌هوازی را نشان می‌دادند. تست اکسیداز و کاتالاز برای کلیه سویه‌ها مثبت بود اما سویه‌ها در تست O/ F و تولید اسید از گلوکز با همدیگر اختلاف نشان می‌دادند. برای شناسایی پسودوموناس پوتیدا[3] که اهمیت خاصی در تجزیه فنل دارد، در بین ایزوله‌ها آزمایش‌های بیوشیمیایی بیشتری انجام شد که از بین ۵ سویه، سویه‌های B3 و C7 به عنوان پسودوموناس پوتیدا شناخته شدند. آزمایش‌های بیوشیمیایی برای این دو سویه در جدول ۲ نشان داده شده است.

منحنی رشد و حذف فنل سویه ها

کلیه سویه‌ها الگوی رشد یکسانی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل نشان می‌دادند. منحنی رشد و حذف فنل سویه‌ها در شکل ۱ آمده است. همان طور که در شکل دیده می‌شود، سویه‌ها بعد از ۲۴ ساعت از زمان شروع رشد تنها غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل را در محیط کشت باقی می‌گذارند و هنگامی که غلظت فنل در محیط کاهش می‌یابد، رشد سویه‌ها به حالت یکنواختی می‌رسد.

[1] Bergy

[2] Triphenyl Tetrazolium Chloride

[3] Pseudomonas Putida

جدول ۱- خصوصیات پنج سویه غالب

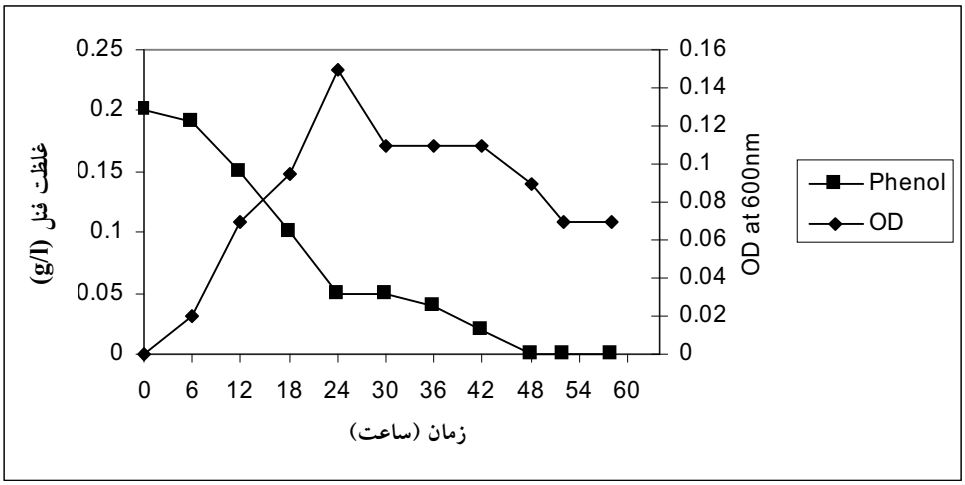
نام سویه	شکل وگرم	اکسیداز	کاتالاز	حرکت	تولید اسید از گلوکز	تست O/F	رشد بی هوازی
B3	باسیل گرم منفی کلنی کرمی	+	+	+	+	O^+/F^-	–
C7	کوکو باسیل گرم منفی کلنی کرمی	+	+	+	+	O^+/F^-	–
C1	کوکسی گرم منفی کلنی زرد	+	+	+	–	O^+/F^+	–
C4	دیپلوکوکسی گرم منفی کلنی سفید	+	+	+	—	O^+/F^-	–
D14	باسیل ریز پلی مورف گرم منفی کلنی لعابی	+	+	+	–	O^-/F^-	–

جدول ۲- آزمایش های بیوشیمیایی جهت شناسایی پسودوموناس پوتیدا در بین سویه‌ها

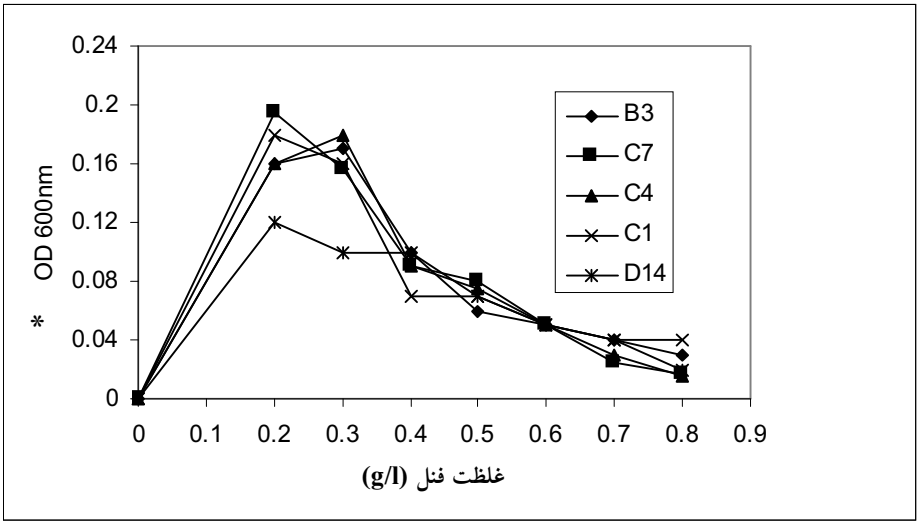
تست بیوشیمیایی	سویه B3	سویه C7
تولید H_2S	–	–
تست سیمون سیترات	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+
تولید اسید از :		
گلوکز	+	+
زیلوز	+	+
مالتوز	–	–

اثر غلظت های مختلف فنل بر روی رشد و تشکیل بیو فیلم سویه‌ها

رشد و تشکیل بیوفیلم سویه‌ها در غلظت‌های ۹۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل مطالعه شد. نتایج حاصل از رشد سویه‌ها در شکل ۲ و داده‌های حاصل از تشکیل بیو فیلم سویه‌ها در شکل ۳ آمده است. همان طور که در شکل مشخص است، هر ۵ سویه تا غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل رشد داشته و بالاتر از این غلظت رشد آن‌ها مهار می‌شود. اما در بین این ۵ سویه مشا هده شد که سویه B3 و C7 نسبت به بقیه رشد بالاتری نشان می‌دهند. نتایج حاصل از تشکیل بیو فیلم با رشد سویه‌ها مطابقت دارد؛ به طوری که با افزایش غلظت فنل از چسبندگی سویه‌ها به سطوح کاسته می‌شود و حداکثر تشکیل بیوفیلم سویه‌ها در غلظت ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر صورت می‌گیرد. سویه B3 و C7 که با لاترین رشد را در بین سویه‌ها داشتند، بالاترین میزان بیو فیلم را نیزدر غلظت ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تشکیل می‌دهند. سویه C1 چسبندگی مناسبی به سطوح نشان نمی‌دهد؛ بنابراین مناسب برای تشکیل بیوفیلم نیست.

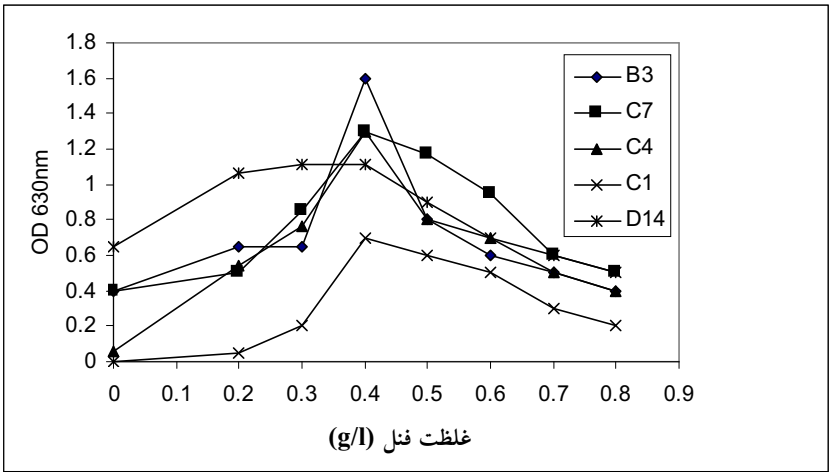


شکل ۱- منحنی رشد و حذف فنل سو یه ها

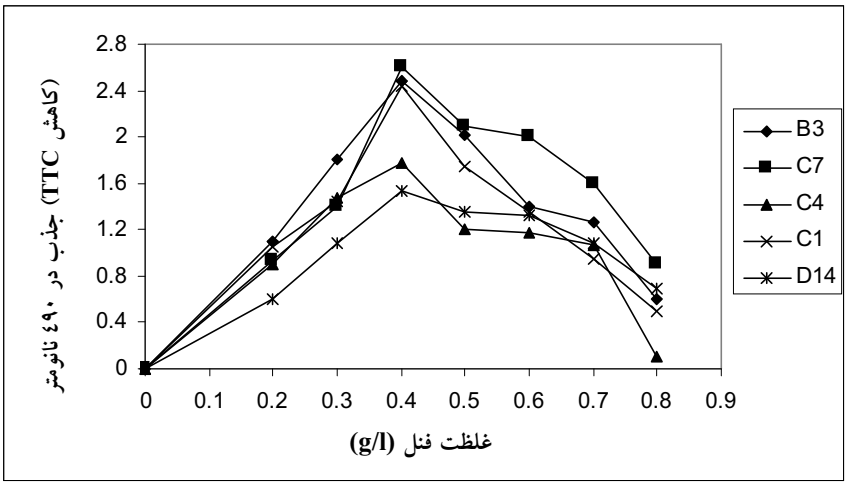


(واحد اندازه‌گیری جذب نور در دستگاه اسپکتر و فوتومتری است) *OD = Optical Density

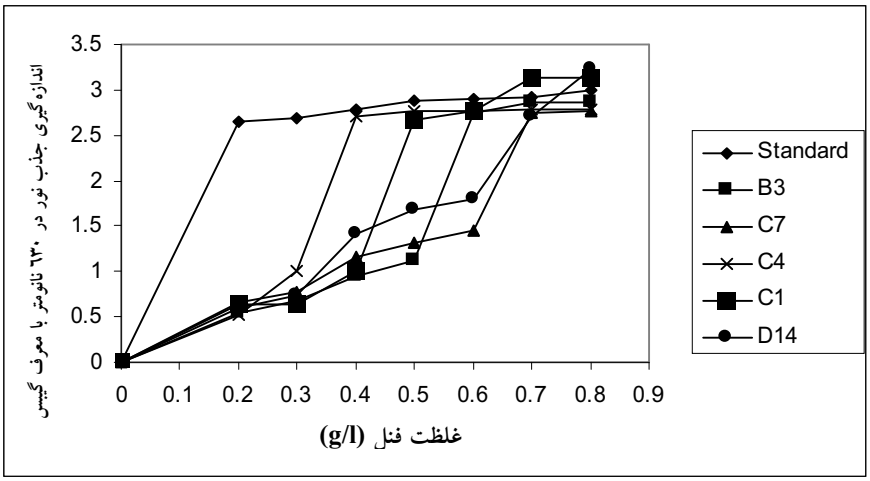
شکل ۲- مقایسه رشد در پنج سویه غالب



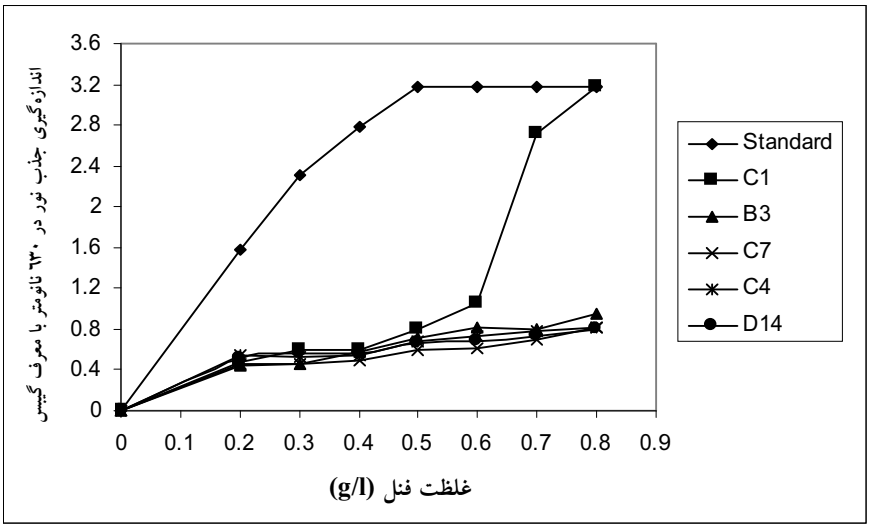
شکل ۳- مقایسه تشکیل بیوفیلم در پنج سویه غالب



شکل ٤- مقایسه میزان تنفس در پنج سویه غالب



شکل ٥ (الف)- حذف فنل در زمان انکوباسیون ٢٤ساعته در پنج سویه غالب



شکل ٥ (ب)- مقایسه حذف فنل در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعته در پنج سویه غالب

میزان تنفس و زنده ماندن سویه‌ها در غلظت‌های مختلف فنل

اثر افزایش غلظت فنل بر میزان تنفس و زنده ماندن ۵ سویه B3, C1, C4, C7, D14 مطالعه گردید و مشاهده شد که هر ۵ سویه تا غلظت ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل افزایش تنفس نشان می‌دهند و در بیشتر از این غلظت، از میزان تنفس و زنده ماندن آنها کاسته می‌شود که این نتیجه با نتایج حاصله از تشکیل بیو فیلم و رشد سویه‌ها همخوانی دارد. اما در بین سویه‌ها B3 و C7 میزان تنفس با لاتری نسبت به بقیه سویه‌ها در غلظت ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم فنل نشان می‌دادند. نتایج حاصل از اثر افزایش غلظت فنل بر میزان تنفس سویه‌ها در شکل ۴ آمده است.

اثر زمان انکوباسیون بر روی حذف فنل

میزان حذف فنل سویه‌ها در غلظت‌های مختلف فنل در دو زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته بررسی شد. مشاهده گردید که بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان انکوباسیون، سویه‌ها تنها تا غلظت ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حذف مناسبی نشان می‌دهند، اما با افزایش زمان انکوباسیون به ۴۸ ساعت و سنجش مقدار فنل با قی‌مانده در محیط کشت، مشاهده شد که به جز سویه C1 بقیه سویه‌ها تا غلظت ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل را به طور کامل تجزیه کرده‌اند. نتایج حاصل از حذف فنل و غلظت فنل در دو زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته در شکل ۵ آمده است.

در پایان بخش نتایج لازم به ذکر است که چون رشد، تنفس و تشکیل بیوفیلم در غلظت‌های مختلف فنل، الگوی یکسانی نشان می‌دهند، پس هر سه فاکتور همدیگر را تأیید می‌کنند. یعنی صحت نتایج حاصل از رشد سویه‌ها با تشکیل بیوفیلم و تنفس آن‌ها در غلظت‌های مختلف فنل تأیید می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری

همان طور که در قسمت‌های قبلی ذکر شد، آلودگی فنلی خطر بزرگی برای محیط زیست مناطقی که کارخانه‌های شیمیایی در آن است دارد. به همین دلیل تجزیه فنل از پساب این کارخانه‌ها حایز اهمیت زیادی است. روش‌های متعددی برای تصفیه پساب‌های آلوده به مواد فنلی وجود دارد که از جمله این روش‌ها می‌توان روش‌های فیزیکی و شیمیایی را مثال زد. اما این روش‌ها به دلیل پر هزینه بودن و ایجاد مواد واسطه خطرناک زیاد مؤثر نمی‌باشند. هم اکنون تصفیه پساب‌های آلوده به ترکیبات فنلی با به کارگیری روش‌های تصفیه زیستی مورد توجه قرار گرفته است.

باکتری‌ها و به ویژه جنس پسودوموناس در تصفیه زیستی اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق، ۱۵ سویه باکتریایی تجزیه کننده فنل جدا سازی شد. از بین این سویه‌ها، ۵ سویه به عنوان سویه‌های برتر در تجزیه فنل انتخاب شدند، که دو سویه نیز به عنوان پسودوموناس پوتیدا شناسایی گردید. جدا سازی سویه‌های پسودوموناس به عنوان تجزیه کننده فنل به وسیله کوتنی[1] و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش شده است. واتانابه و همکاران در سال ۱۹۹۹، اثر باردهی فنل بر روی باکتری‌های تجزیه کننده فنل که در لجن فعال حضور داشتند را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بالاتر از غلظت ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل در کشت ناپیوسته از باکتری‌های لجن فعال، اثر منفی روی جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده دارد و رشد آن‌ها را به میزان زیادی کاهش می‌دهد.

جانسن[2] و همکاران در سال ۲۰۰۲، رشد میکروبی روی ترکیبات آروماتیک چند حلقه را با روش میکروپلیت بررسی کردند. آن‌ها در تحقیق خود از زنگ wst-1 استفاده کردند، اما تاکنون تحقیقی که با روش میکروپلیت، رشد میکروبی را در حضور فنل بررسی کند، انجام نشده است.

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف فنل بر روی رشد، تنفس و تشکیل بیو فیلم ۵ سویه غالب در تجزیه فنل، حاکی از آن بود که این سویه‌ها تنها قادر به تجزیه غلظت ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل هستند و بالاتر از این غلظت در طی ۲۴ ساعت اولیه انکوباسیون، رشد و حذف فنل نا چیزی دارند؛ اما با گذشت زمان و طولانی‌تر شدن مدت انکوباسیون به ۴۸ ساعت، سویه‌ها قادرند با غلظت‌های بالا تطابق حاصل کرده و در این غلظت‌ها رشد کنند و فنل را تجزیه نمایند. در کل، نتایج این پژوهش نشان داد که برای دست‌یابی به تصفیه زیستی مؤثری از فنل‌ها و مشتقات فنلی در پساب کارخانه، بایستی نکات زیر را مورد توجه قرار داد:

- میزان فنل موجود در پساب ورودی به حوضچه تصفیه فنل نباید بیش از ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باشد؛ زیرا همان

[1] Koutnay
[2] Johnsen

طور که در نتایج آمد بالاتر از ایـن غلظـت اثـر منفـی بـر روی رشد باکتری‌های تجزیه کننده دارد.

- بایستی زمان هوادهی حوضچه تصفیه فنل همراه با تلقیح مجدد باکتری‌ها را افزایش داد؛ زیرا در این پژوهش ثابت شـد که زمان انکوباسیون تأثیر به سزایی در حذف غلظت‌های بالای فنل دارد. در پایان پیشنهاد مـی‌شـود کـه چنانچـه بیـوفیلم ایـن باکتری‌ها تشکیل شود و در راه حوضچه ورودی فنل قرار گیرد، حذف بسیار مؤثرتری نسبت به باکتری‌های آزاد خواهیم داشت که این نیارمند تحقیقات بیشتر در این زمینه است.

منابع

1- Alef., K., and Nanniper., P., (1995). "*Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry",* pp. 220-231, Academic Press, New York.

2- Annaduraia., G., Shin Juang., R. and Duu., J., (2002). "*Microbiological Degradation of Phenol Using Mixed Liquors of Pseudomonas Putida and Activated Sludge"*, Waste Management, Vol. 22, pp. 703-710.

3- Doyle., A., and Grifiths., J.B., (1998). "*Biotechnology",* pp. 77-79, John Willy and Son, New York.

4- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister. U., and Heinaru. A., (2000). "*Three Type of Phenol and P-Cresol Polluted with Phenolic Compounds Catabolism in Phenol and P-Cresol-Degrading Bacteria Isolated from River Water Continuously Polluted with Phenolic Compounds",* FEMS Microbiology Ecology, Vol. 31, pp. 195-205.

5- Holt., S.G., Kriey, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T., (1998). "*Bergey, S. Manual of Determinative for Bacteriology ",* Williams and Wilkins, New York.

6- Johnsen, A., Bendixen, K., and Karlson, U., (2002)*. "Detection of Microbial Growth on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Microtiter Plates by using the Respiration Indicator WST-1* ", Applied and Environmental Micorbiology, Vol. 68, pp. 2683-2689.

7- Koutny, M., Ruzicka, J., and Chlachula, J., (2003). "*Screening for Phenol- Degrading Bacteria in the Pristine Soils of South Siberia",* Applied Soil Ecology, Vol. 23, pp. 79-83.

8- Neujahr, H. Y., and Gaal, A., (1973). "*Phenol Hydroxylase from Yeast ",* Eur. J. Biochem, Vol. 58, pp. 351-357.

9- Quintana, M.G., Didion, C., and Falton, H., (1997). "*Colorimetric Method for a Rapid Detection of Oxygenated Aromatic Biotransformation Products",* Biotechnology Technique, Vol. 11, pp. 585-587.

10- Sal, C.S.A., and Boaventura, R.A.R., (2001). "*Biodegradation of Phenol by Pseudomonas Putida DSM 548 in a Trickling bed Reactor",* Biochemical Engineering Journal, Vol. 9, pp. 211-213.

11- Selvaratnam, S., Schoedel, B.A., Mcfarland, B.L., and Kulpa, C.F., (1997). "*Application of the Polymerase chain Reaction (PCR) and Reverse Transcriptase PCR for Determining the Fate of Phenol-Degrading Pseudomounas Putida ATCC 11172 in a Bioaugmented Sequencing Batch-teactor",* Appl Microbio Biotechnol, Vol. 47, pp. 236-240.

12- Wagner, K., Schwarz, T., and Kaufmann, M., (1999). "*Phenol Degradation by an Enterobacterium Klebsiella Strain Carries a TOL-Like Plasmid and a Gene Encoding a Novel Phenol Hydroxylase",* Canadian Journal of Microbilogy, Vol. 45, pp. 162-171.

13- Watanabe, K., Teramoto, M., and Harayama, S., (1999). "*An Outbreak of Nonflocculating Catabolic Populations Caused Thebreakdown of a Phenol- Digesting Activated-Sludge Process",* Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, pp. 2813-2819.

14- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., and Harayama, S., (1998). "*Molecular Detection, Isolation, and Physiological Characterization of Functionally Dominant Phenol- Degrading Bacteria in Activated Sludge",* Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, pp. 4396-4402.

15- Watanabe, K., Yamamoto, S. Hino, S., and Harayama, S., (1998). "*Population Dynamics of Phenol-Degrading Bacteria in Activated Sludge Determined by GyrB-targeted Quantitative PCR"*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, pp. 1203-1209.

16- Whiteley, A.S., Wiles, S., Lilley, K. Philip, J., and Babailey, M.J., (2002)."*Ecological and Physiological Analyses of Pseudomonad Species within a Phenol Remediation System",* Journal of Microbiological Methods, pp. 44, 79.