علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره یازده، بهمن ماه ۹۸

جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده فنل از فاضلاب پالایشگاه نفت

رمضانعلی دیانتی تیلکی [۱] *

dianati.tilaki@gmail.com

مرتضی قلعه نوئی [۲]

معصومه اسلامی فر [۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۰ **تاریخ پذیرش:۹۶/۲/۱۰**

چکیده

زمینه و هدف: فنل و مشتقات آن برای همه موجودات زنده سمی بوده و در فاضلاب پالایشگاه نفت یافت می‌شوند. جداسازی و شناسایی باکتری‌ها از فاضلاب پالایشگاه نفت به منظور شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات آروماتیک مهم است. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌ها از سیستم تصفیه فاضلاب پالایشگاه نفت تهران و تعیین میزان حذف فنل بوسیله باکتری‌ها در محیط کشت حاوی فنل بود.

مواد و روش ها: مطالعه از نوع تجربی- آزمایشگاهی بود. نمونه برداری از سیستم لجن فعال تصفیه خانه فاضلاب پالایشگاه نفت تهران در دو مرحله انجام شد. ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت حاوی فنل به مدت ۳ هفته در انکوباتور دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به فنل خو داده شدند. سپس جداسازی و شناسایی باکتری‌ها مطابق روش استاندارد انجام شد. با کشت باکتری‌های ایزوله در محیط‌های کشت حداقل حاوی غلظت های ۰/۵ تا ۱/۲گرم بر لیتر فنل به عنوان تنها منبع کربن، رشد باکتری‌ها با اندازه گیری دانسیته اپتیک در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. غلظت فنل به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از واکنشگر۴-آمینوآنتی پیرین در طول موج ۵۱۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: باکتری‌های جداشده از تصفیه خانه فاضلاب پالایشگاه نفت شامل سویه‌های سودوموناس، اسینتوباکتر، اشرشیاکلی ، انتروکوکوس و انتروباکتر بودند. سویه سودوموناس قادر به حذف کامل فنل تا غلظت ۰/۹ گرم بر لیتر، سویه‌های اسینتو باکتر و اشرشیاکلی تا غلظت ۰/۷ گرم- بر لیتر فنل را به طور کامل حذف و سویه‌های انتروکوکوس و انتروباکتر تا غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر فنل را به میزان صد در صد از محیط کشت حذف نمودند.

بحث و نتیجه گیری: سودوموناس نسبت به دیگر باکتری‌های جدا شده از فاضلاب پالایشگاه نفت بیش‌ترین میزان تجزیه فنل را در زمان کم‌تر نشان داده است.

واژه های کلیدی: باکتری، فنل، پالایشگاه، تصفیه فاضلاب

۱- دانشیار گروه مهندسی بهداشت محیط و عضو هیأت علمی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۲- کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران * (مسوول مکاتبات).

۳ - دکترای میکروبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

J. Env. Sci. Tech., Vol 22, No.11, January, 2020

Isolation and Identification of Phenol Degrading Bacteria from Oil Refinery Effluents

Ramazan.Ali Dianati Tilaki [1]
dianati.tilaki@gmail.com
Morteza Ghalenoei [2]*
Masoomeh Eslamifar [3]

Admission Date:April 30, 2017 Date Received: December 10, 2016

Abstract

Background and Objective: Phenol and its derivatives are toxic to all living organism and are found in oil refinery wastewater. Isolation and identification of bacteria from oil refinery wastewater is important to identify aromatic compounds degrading bacteria. The aims of this study were isolation and identification of bacteria from Tehran oil refinery wastewater treatment system and determine amount of phenol degradation by these bacteria.

Method: This experimental study was conducted by using two series of activated sludge samples collected from Tehran oil refinery wastewater treatment plant. Adaptation of bacteria to phenol was done by culturing in growth medium containing phenol at 30°C in incubator. After that isolation and identification of bacteria was done according to standard method. Isolated bacteria were cultured in growth medium containing different concentration (0.5- 1.2gL^{-1}) of Phenol. Bacteria growth was assayed by measuring optical density at 600nm. Concentration of Phenol in the medium growth solution was measured by spectrophotometric method using 4- Amino antipyrine as color reagent at 510 nm.

Findings: *Pseudomonas*, *Acintobacte*r, *E.coli*, *Enterococcus* and *Enterobacter spp*$_s$ were isolated from oil wastewater treatment plant. *Pseudomonas spp.* completely removed 0.9gL^{-1} of Phenol, *Acintobacter and E.coli* removed 0.7 gL^{-1}, *Enterococcus and Enterobacter* removed 0.5 gL^{-1} of Phenol from growth solution.

Discussion and conculation: *Pseudomonas spp.* isolated from oil refinery wastewater treatment plant has highest phenol removal rate in shorter contact time than other isolated bacteria.

Keywords: Bacteria, Phenol, Refinery, Wastewater treatment

1- PhD, Associate Prof., Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health,, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari- Iran*(Corresponding Authours).
2- M.Sc. Student of Environmental Health Engineering, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari-Iran.
3- PhD Student of Microbiology,Department of Environmental Health, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari- Iran.

مقدمه

فنل و مشتقات آن از جمله هیدروکربن‌های آروماتیک سمی هستند که در پساب صنایع متعددی مانند پالایشگاه های نفت، صنایع پتروشیمی، کارخانجات تولید رزین، رنگ، سموم ،داروسازی و تعدادی صنایع دیگر وجود دارد و سبب آلودگی محیط زست بویژه منابع آب می شود(۱،۲). وجود ترکیبات فنلی در محیط زیست موجب بروز تغییرات ژنتیکی (اثرات موتاژنی)، تولد موجودات ناقص (اثرات تراتوژنی) و همچنین بروز سرطان (اثرات سرطان زایی) در موجودات زنده می گردد(۳). به همین دلیل فنل درگروه آلاینده های خطرناک و در لیست آلاینده های دارای الویت سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا(EPA) قرار دارد(۴). حد اکثر غلظت مجاز فنل در پساب خروجی صنایع ۰/۵ میلی گرم برلیتر است. به دلیل تشکیل ترکیبات جانبی طی کلر زنی آب در صورت وجود فنل در آب ، بر اساس راهنمای سازمان بهداشت جهانی حداکثر مجاز غلظت فنل در آب آشامیدنی ۱ میکروگرم بر لیتر است(۵).

روش‌های مختلفی برای حذف فنل از آب و پساب شامل ازناسیون، جذب سطحی، اسمز معکوس، اکسیداسیون پیشرفته، فوتوکاتالیز و روش‌های بیولوژیکی وجود دارد. روش‌های بیولوژیکی نسبت به روش‌های فیزیکو شیمیایی در حذف آلاینده‌ها مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست می باشند (۶).

تاکنون میکروارگانیسم‌های متنوعی اعم از باکتری‌ها، مخمرها و قارچها به عنوان تجزیه کننده‌های ترکیبات آلی سمی از محیط جداسازی و بررسی شده اند ولی در این بین باکتری‌ها از اهمیت بیش‌تری برخوردارند(۷). بر اساس تئوری میکروارگانیسم‌های معدودی وجود دارندکه می‌توانند از فنل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده نمایند (۸،۹). تاکنون گونه های باکتریایی متعددی که قادر به تجزیه فنل می‌باشند جداسازی و شناسایی شده‌اند(۱۰،۱۱). این گونه‌های باکتریایی *شامل سودوموناس پوتیدا (۱۲)، آلکالیژنز(۱۳)، آسینتوباکتر(۱۴)، آگروموباکتر(۱۵)، سودوموناس آئروجینوزا(۱۶)، سودوموناس پیکتوریوم(۱۷)و باسیلوس برویس(۱۸)می باشند*. تحقیقات نشان می‌دهدکه گونه‌های میکروبی بومی، قابلیت سازگاری بیش‌تری نسبت به گونه های غیر بومی داشته و برای رفع آلودگی از محیط های به خصوصی کارایی بالاتری دارند. بنابراین شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده فنل به منظور زیست پالایی محیط‌های حاوی ترکیبات فنلی در مناطق مختلف لازم است(۲۵). علاوه بر آن جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی بومی که قادر به تجزیه بیولوژیکی مواد آلی سمی باشند می‌تواند در حوزه محیط زیست و بیوتکنولوژی مفید باشد.

در کشور ما تحقیقات محدودی در زمینه شناسایی باکتری های تجزیه کننده فنل انجام شده است که می‌توان به جداسازی و شناسایی تجزیه‌کننده فنل از پساب کارخانه گل‌گهر سیرجان (۲۱) و آب دریاچه پریشان و رودخانه کر (۲۲) اشاره نمود.

با توجه به بررسی های به عمل آمده درباره جداسازی و شناسایی باکتری ها از فاضلاب پلایشگاه نفت در کشور ما تحقیقی منتشر نشده است. با توجه به اهمیت یافتن سویه های بومی تجزیه کننده فنل در فاضلاب پالایشگاه نفت این تحقیق صورت گرفت. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری ها ازسیستم تصفیه فاضلاب پالایشگاه نفت تهران و تعیین میزان رشد و حذف فنل بوسیله باکتری‌های جدا شده بود.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی- آزمایشگاهی بود. نمونه برداری در دو مرحله از تانک هوادهی سیستم لجن فعال تصفیه خانه فاضلاب پالایشگاه نفت تهران در سال ۱۳۹۵ انجام و نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل و مورد آزمایش قرار گرفتند.

کشت باکتری های خو یافته به فنل: محیط کشت نوترینت براث شامل عصاره گوشت ۱ گرم بر لیتر ، عصاره مخمر ۲ گرم بر لیتر، پپتون ۵ گرم بر لیتر، سدیم کلرید ۵ گرم برلیتر و

محیط کشت حاوی مواد معدنی که ساخته شد شامل پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۲ گرم بر لیتر ، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۴ گرم برلیتر، منگنز سولفات مونو هیدرات ۰/۰۱ گرم بر لیتر، منیزیم سولفات ۰/۱ گرم بر لیتر، سدیم کلرید ۰/۱ گرم بر لیتر، آمونیوم سولفات ۰/۴ گرم بر لیتر، فریک کلراید ۰/۳ گرم بر لیتر و کلسیم کلراید ۰/۰۱ گرم بر لیتر با pH برابر ۶/۸ بوده است. ابتدا به ترکیب محیط های مذکور مقداری فنل با غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر اضافه و سپس استریل سازی شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه فاضلاب پالایشگاه به ۱۰۰ میلی لیتر ترکیب محیط کشت‌های مذکور اضافه و به مدت یک هفته بر روی شیکر در دمای۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. پس از یک هفته یک میلی‌لیتر از محیط کشت مذکور در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی مواد معدنی با غلظت ۰/۷ گرم بر لیتر فنل مطابق روش قبل به مدت یک هفته کشت داده شد.

این عملیات سه مرحله دیگر انجام و هر بار غلظت بیش‌تری از فنل (حداکثر ۱/۲ گرم بر لیتر) مورد استفاده قرار می‌گرفت.

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها: یک لوپ از محیط کشت مایع حاوی باکتری‌های خویافته به فنل، بر روی محیط‌های کشت نوترینت آگار و بلاد آگار به صورت جداگانه کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. سپس کلنی های حاصل از نظر مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند و ۵ کلنی شاخص از باکتری ها به صورت کلنی تک، خالص سازی و جهت شناسایی شماره گذاری گردیدند. در مرحله بعد کلنی باکتری‌های جداشده بر اساس مشاهدات مرفولوژیک و اختصاصات بیوشیمیایی تعیین هویت شدند.

بدین منظور آزمایش های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، OF،TSI، تست تخمیر قند ها، احیا نیترات، تست همولیز، تولید H_2S، هیدرولیز اوره، مصرف سیترات، تست ایندول و تست ایمویک انجام شد. همچنین برای شناسایی باکتری‌های اشریشیاکلی، انتروباکتر و اسینتوباکتر کشت در محیط‌های EMBagar و مک کانگی آگار نیز انجام شد. جهت شناسایی باکتری انتروکوکوس از محیط کشت های انتخابی و اختصاصی آزید دکستروز براث و PSE agar استفاده گردید. در بررسی وجود سودوموناس از محیط کشت آسپاراژین براث ، محیط کشت استامید براث و محیط کشت سیتریمید آگار استفاده شد. شناسایی باکتری‌ها بر اساس استانداردهای NCCL و Bergey و کتاب روش‌های استاندارد آزمایشات آب و فاضلاب صورت گرفت (۲۸،۲۹).

تعیین رشد باکتریهای ایزوله و حذف فنل : محیط کشت حداقل حاوی مواد معدنی و غلظت‌های مختلفی از فنل در محدوده ۵۰۰ الی ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری توزیع و استریل سازی شد. سپس یک لوپ کشت تازه هر باکتری جداگانه به ظروف اضافه شد. نمونه ها روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه در انکوباتور دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار داده شدند و رشد باکتری‌ها با اندازه‌گیری دانسیته اپتیک در ۶۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت(۱۰).

اندازه‌گیری غلظت فنل باقی‌مانده در محیط کشت به روش رنگ سنجی با ماده واکنش‌گر(۴-آمینوآنتی پیرین) در طول موج ۵۱۰ نانومتر صورت گرفت. در این روش حجم‌های معینی از محیط کشت برداشته و پس ازصاف کردن با فیلتر ۰/۴۵ میکرون ، در بالن ۱۰۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم می رسید و سپس به آن دو میلی لیتر محلول بافر، دو میلی لیتر محلول ۴-آمینوآنتی پیرین و دو میلی لیتر محلول پتاسیم فری سیانید اضافه و مخلوط می‌شد. پس از ۱۵ دقیقه در صورت وجود فنل در نمونه رنگ زرد مایل به قهوه ای تشکیل می شد. سپس با اسپکتروفتومتر مرئی در طول موج ۵۱۰ نانومتر میزان جذب نور قرائت می‌شد(۲۸).

یافته ها

باکتری‌های جداشده از فاضلاب پالایشگاه نفت تهران عبارت بودند از: سودوموناس، اشریشیاکلی، انتروکوکوس، اسینتوباکتر و انتروباکتر.

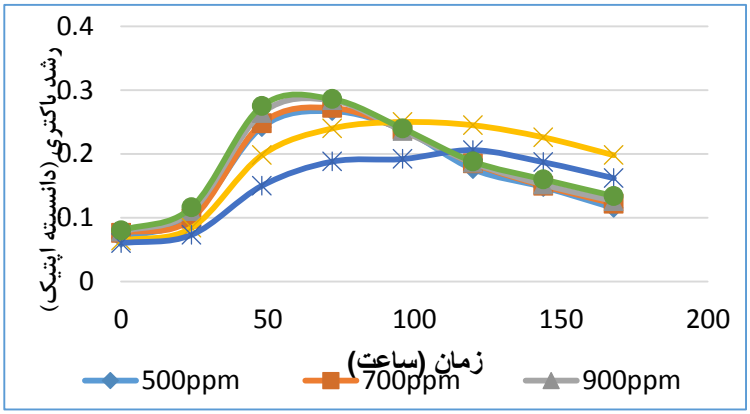
ویژگی‌های مرفولوژیکی باکتری های جدا شده در این مطالعه مطابق جدول ۱ و همچنین نتایج تست های بیوشیمیایی و تشخیصی درجدول ۲ نشان داده شده است. نمودار ۱ منحنی

رشد سودوموناس در محیط کشت حاوی غلظت های مختلف فنل را نشان می دهد همان‌گونه که ملاحظه می شود در ۲۴ ساعت ابتدای کشت این باکتری در فاز تاخیری قرار داشته و رشد قابل توجهی صورت نگرفته، اما در ۲۴ ساعت دوم فاز رشد لگاریتمی رخ داده است. در ۲۴ ساعت سوم در فاز ثابت و پس از آن وارد فاز کاهش رشد شده است. آن‌چه که قابل توجه است این است که وجود فنل در مقادیر ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر منفی قابل ملاحظه ای بر رشد باکتری سودوموناس نداشته و الگوی رشد باکتری در محیط های حاوی فنل در مقادیر ذکر شده با الگوی رشد باکتری در محیط کنترل فاقد فنل مشابه است. با افزایش غلظت فنل به ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد الگوی کاهشی را نشان می دهد .

جدول۱- ویژگی های مورفولوژیکی باکتری های جدا شده از فاضلاب پالایشگاه نفت تهران

Table1. Morphologic Characteristics of isolated bacteria from wastewater of oil refinery

ویژگی‌های کلنی روی محیط کشت های مختلف	باکتری				
	اشریشیا کلی	انتروکوکوس	انتروباکتر	سودوموناس	اسینتوباکتر
مک کانگی آگار	صورتی روشن، صاف، خشک	-	صورتی کم رنگ، موکوئیدی	کلنی کوچک، موکوئیدی	دو تیپ کلنی صورتی کم‌رنگ و بنفش روشن
ائوزین متیلن بلو آگار	کلنی های صاف، بنفش تیره همراه با تخمیر لاکتوز و دارای جلای سبز فلزی	-	کلنی های صورتی پر رنگ هسته دار، پهن با ظاهری شبیه چشم ماهی	-	-
PSE Agar	-	کلنی‌های قهوه ای، ریز، با هاله سیاه رنگ	-	-	-
Cetrimide Agar	-	-	-	کلنی های کوچک با پیگمان سبز - آبی	-
Blood Agar	بدون همولیز	مرطوب محدب،	کلنی های کوچک، سفید مایل به خاکستری	کوچک و تخت، با حاشیه موجدار	محدب، سطح صاف سفید مایل به خاکستری
وضعیت همولیز	-	بتا	گاما	بتا	-
رنگ آمیزی گرم	باسیل میله ای، گرم منفی	کوکوس، گرم مثبت	باسیل مستقیم، گرم منفی	باسیل گرم منفی	باسیل کوتاه، گرم منفی



نمودار ۱- رشد باکتری سودوموناس در غلظت های مختلف فنل در زمان های مختلف

Figure1. Growth curves of *Pseudomonas sp.*in different concentration of phenol and different contact time

جدول ۲-نتیجه آنالیز واکنش‌های بیوشیمایی گونه های باکتریایی جدا شده

Table 2. Results of biochemical test on isolated bacteria

ویژگی‌ها	نام باکتری				
	اشریشیا کلی	انتروکوکوس	انتروباکتر	سودوموناس	اسینتوباکتر
تحرک	+	-	+	+	-
تست اکسیداز	-	-	-	+	-
تست کاتالاز	+	-	+	+	+
تست متیل رد	+	-	-	-	+
ایندول	+	-	-	-	-
تست سیترات	-	-	+	+	+
تخمیر لاکتوز	+	+	+	-	-
تولیدH2S	-	-	-	-	-
اوره آز	-	-	-	-	-
تستV.P	-	+	+	-	-
TSI	A/AG	ALK	A/AG	ALK	ALK
PYR	-	+	Nd	Nd	Nd
تستOF	تخمیری	Nd	تخمیری	اکسیداتیو	اکسیداتیو

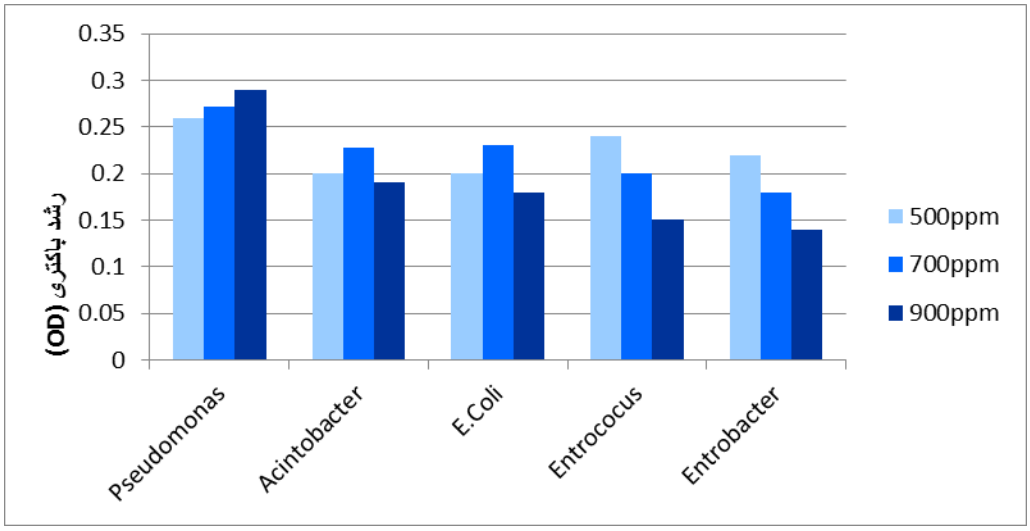
+: ، مثبت-، منفی: Nd: تعیین نشده

شکل۲- موقعیت ایستگاه های سنجش آلودگی شهر تهران (متعلق به شرکت کنترل کیفیت هوا)

Figure2. Location of Pollution measurement stations in Tehran (Owned by Air Quality Control Company)

در نمودار ۲حداکثر میزان رشد باکتری‌ها ی جدا شده از فاضلاب پالایشگاه نفت تهران بر حسب دانسیته اپتیک در ۶۰۰ نانومتر نشان داده شده است. بیش‌ترین رشد مربوط به باکتری سودوموناس در غلظت ۹۰۰ پی پی ام فنل بدست آمد. اسینتو

باکتر و اشرشیاکلی در غلظت ۷۰۰ میلی- گرم بـر لیتـر فنـل ، انتروکوکوس و انتروباکتر در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر فنـل بالاترین رشد را داشته اند. اسینتوباکتر و اشریشیاکلی در غلظت ۷۰۰ پـی پـی ام فنـل بـیش‌تـرین رشـد را داشـته انـد.



نمودار۲- میزان رشد باکتری های جدا شده از فاضلاب پالایشگاه در غلظت های مختلف فنل

Figure 2. Growth of isolated bacteria from oil refinery wastewater in different concentration of phenol

در جدول ۳ سرعت و زمان مورد نیاز برای حذف کامل فنل از محیط کشت بوسیله باکتری های مورد مطالعه را نشان می دهد. همان‌گونه که در جدول مشخص است سودوموناس با ۹/۳ پی پی ام در ساعت بالاترین نرخ حذف فنل را داشته و توانسته است در ۹۶ ساعت تماس ۹۰۰۰ پی پی ام فنل را به طور کامل از محیط کشت حذف نماید.

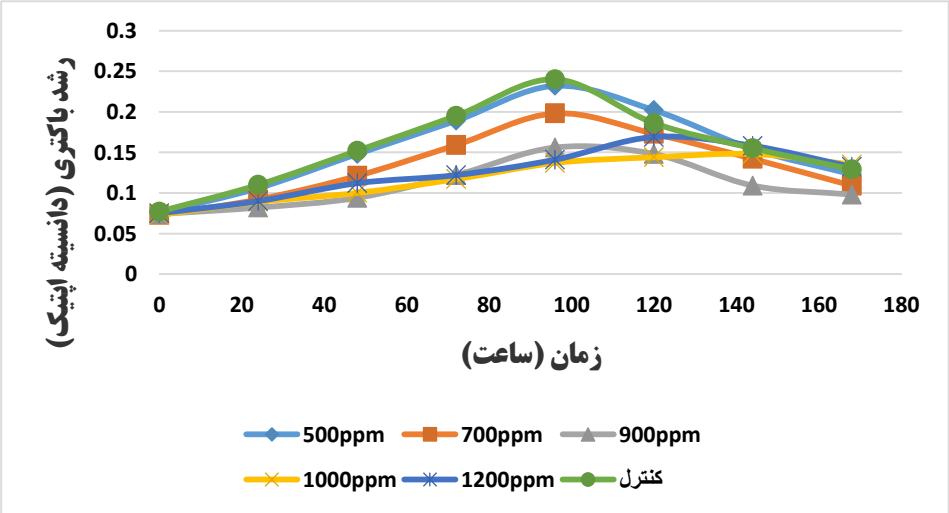
جدول ۳- میزان حذف فنل بوسیله باکتری های جدا شده از فاضلاب پالایشگاه

Table 3. Rate of phenol removal by isolated bacteria from oil refinery wastewater

غلظت فنل (پی پی ام)	نوع باکتری	نرخ حذف فنل پی پی ام بر ساعت	زمان حذف (ساعت)	راندمان حذف (درصد)
۵۰۰	*Enterobacter*	۴/۱۶	۱۲۰	۱۰۰
	Enterococcus	۴/۱۶	۱۲۰	۱۰۰
۷۰۰	*Acinetobacter*	۵/۸	۱۲۰	۱۰۰
	E.coli	۵/۸	۱۲۰	۱۰۰
۹۰۰	*Pseudomonas*	۹/۳	۹۶	۱۰۰

در نمودار ۳ میزان رشد باکتری انتروکوکوس جدا شده از فاضلاب پلایشگاه نفت در غلظت‌های مختلف فنل را نشان می‌دهد. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود حداکثر رشد این باکتری در محیط حاوی فنل ۱۰۰ ساعت پس از کشت رخ داده و پس از این زمان باکتری وارد فاز کاهش رشد شده است. الگوی رشد باکتری انتروکوکوس نشان می‌دهد که این باکتری در بین باکتری های مورد مطالعه

حساسیت بیش‌تری به فنل داشته و با افزایش غلظت فنل به ۷۰۰ و ۹۰۰ پی پی ام از رشد آن کاسته شده است.



نمودار ۳- میزان رشد باکتری انتروکوکوس جدا شده از فاضلاب پالایشگاه درغلظت های مختلف فنل بر حسب زمان

Figure 3. Growth curves of enterococcus isolated from oil refinery wastewater in different concentration of phenol

بحث

Arutchelvan و همکاران در تحقیقی با عنوان جداسازی و شناسایی باکتری‌های با توان بالا در تجزیه فنل از فاضلاب کارخانه ساخت رزین فنل – فرمالدئید گزارش نمودند که گونه های باکتریایی شناسایی شده که از فنل به عنوان تنها منبع کربن استفاده می نمودند شامل سودوموناس، سپاسیا و *باسیلوس برویس* به ترتیب قادر به حذف غلظت های ۲۵۰۰ و ۱۷۵۰ میلی گرم بر لیتر فنل در زمان تماس ۱۴۴ ساعت بوده وگزارش شده است که این باکتری ها حتی در حضور مواد سمی مانند تیوسیانات، سولفید و سیانید نیز قادر به تجزیه فنل بوده اند(۱). در تحقیق حاضرمهم‌ترین باکتری های تجزیه کننده فنل متعلق به جنس‌های سودوموناس، آسینتوباکتر، اشرشیاکلی، انتروکوکوس و انتروباکتر بوده‌اند. بالاترین میزان حذف فنل متعلق به جنس سودوموناس با غلظت ۹۰۰ میلی گرم بر لیتر بوده است. این غلظت در باکتری‌های جنس اسنیتو باکتر و اشریشیاکلی درحد متوسط و به مقدار ۷۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل ثبت گردید .کم‌ترین مقدار حذف فنل در دو جنس انتروباکتر و انتروکوکوس مشاهده شد به طوری که این دو باکتری حذف فنل را در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر انجام داده اند .وجود گونه های مختلف باکتریایی در این پژوهش نشان می دهد جمعیت میکروبی پساب پالایشگاهی منطقه مورد بررسی از تنوع خوب و مناسبی بر خوردار می باشد. این تنوع گونه ای می تواند به عنوان یک فاکتور موثر درتجزیه ترکیبات آروماتیک در پساب پالایشگاهها مورد بهره برداری قرار گیرد.

Sadia Afrin Jame و همکاران سودوموناس و آئروموناس را به عنوان باکتری‌های تجزیه کننده فنل و مونوکلروفنل ها از خاک آلوده اطراف کارخانجات نساجی، داروسازی و تعمیرگاه اتومبیل جداسازی و شناسایی نموده و گزارش نموده‌اند که آئروموناس جداسازی شده از خاک اطراف کارخانه داروسازی و سودوموناس جداشده از خاک اطراف تعمیرگاه اتومبیل طی ۷۲ ساعت قادر به تجزیه فنل و مونوکلروفنل‌ها تا غلظت

۸۰۰ پی پی ام بوده اند. سرعت تجزیه فنل در مورد گونه آئروموناس برای تجزیه ۶۰۰ پی پی ام فنل در مدت ۷۲ ساعت برابر ۱۶ پی پی ام

بر ساعت و در مورد گونه سودوموناس ۱۹ پی پی ام بر ساعت بدست آمده است(۱۹). در تحقیق حاضر نیز بیشترین نرخ حذف فنل به میزان ۹/۳ پی پی ام بر ساعت مربوط به باکتری سودوموناس بوده که قادر به تجزیه کامل ۹۰۰ پی پی ام فنل در ۹۶ ساعت بوده است.

برخی از محققین گونه های خاص باکتریایی را که دارای قدرت حذف زیستی بالایی از ترکیبات فنولی بوده‌اند شناسایی کرده‌اند. از جمله ال سید و همکارانش درسال ۲۰۰۳ گونه باکتریایی جدیدی متعلق به جنس آگروباکتریوم را از لجن فعال غنی از فنل در مصر جدا نمودند. تحقیقات آن‌ها نشان داد این گونه به میزان بالایی توانایی استفاده از منبع فنل به عنوان تنها منبع کربن مصرفی را دارا می باشد(۲۰).

Przybulewskaو همکاران در جداسازی میکروارگانیسم‌های حذف کننده فنل از بیوفیلترهای تصفیه کننده گازهای خروجی کارخانه کابل سازی دوگونه باکتریایی متداول از جنس رودوکوکوس، سودوموناس پوتیدا و یک گونه خاص باکتریایی از جنس Gordonia sputi را شناسایی نموده اند. این باکتری‌ها در محیط‌های کشت حاوی غلظت های مختلف فنل شامل ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر کشت داده شدند. در این تحقیق نشان داده شد که استفاده از کشت مخلوط این چند گونه باکتریایی در مقایسه با کشت هرگونه به طور مجزا بازده بالاتری از تخریب و حذف فنل را دارا می باشد(۲۱).

کفیل‌زاده و همکاران باکتری‌های تجزیه کننده فنل را از آب و رسوبات دریاچه پریشان جداسازی نموده و رشد آن ها را در محیط کشت حاوی فنل مورد بررسی قرار داده و گزارش نموده‌اند که گونه‌های جدا شده شامل سودوموناس و اسینتوباکتر قادر به حذف ۸۰۰ تا ۹۰۰ پی پی ام فنل، کلبسیلا، سیتروباکتر و شیگلا قادر به حذف ۶۰۰ تا ۷۰۰ پی پی ام فنل و اشریشیاکلی، سراشیا و انتروباکتر قادر به حذف ۲۰۰تا ۳۰۰ پی پی ام فنل بوده اند(۲۲).

موحدیان و همکاران در تحقیقی به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنل از سیستم لجن فعال تصفیه خانه فاضلاب اصفهان، به کمک PCR موفق به شناسایی سودوموناس پوتیدا به‌عنوان بهترین باکتری تجزیه کننده فنل شده‌اند که قادر است غلظت ۶۰۰ پی پی ام فنل را در محیط کشت معدنی طی مدت ۴۸ ساعت به طور کامل حذف نماید(۲۳).

M. Aresta و همکارانش در بررسی باکتری‌های تجزیه کننده فنل از خاک آلوده به پساب کارخانه فراوری زیتون توانستند سه گونه باکتریایی- متعلق به گونه‌های آرتروباکتر و *سودوموناس* را شناسایی نمایند. تحقیقات آن‌ها نشان داد این سه باکتری قادر به حذف منبع کربن فنلی به میزان ۷۶ درصد ظرف مدت سه روز می باشند (۲۴).

همان‌گونه که ذکر شد گونه‌های جنس سودوموناس یکی از قوی‌ترین گونه‌های باکتریایی تجزیه کننده ترکیبات نفتی در تحقیقات مختلف معرفی شده اند. توانایی سازگاری این جنس در شرایط مختلف محیطی علت فراوانی این باکتری در پساب‌های آلوده می باشد. J. Lin و همکارانش نیز در پژوهشی در سال ۲۰۰۸ توانایی حذف فنل توسط یاکتری سودوموناس از پساب صنعتی را نشان داده اند. در تحقیقات آن‌ها نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی و اسپکترومتری جرمی نشان داده است که میزان حذف فنل توسط باکتری سودوموناس فلورسنس شناسایی شده در مدت ۴۰ روز در حدود ۱۶۰۰ میلی گرم بر لیتر (۸۵/۴٪ درصد) بوده است. که نشانه توان بالای این باکتری در حذف غلظت بالای ترکیبات فنلی از پساب‌های صنعتی می-باشد (۲۵). پژوهشگرانی مانند موحدیان و کفیل زاده پراکندگی گسترده این باکتری را در پساب و خاک‌های آلوده ایران مورد بررسی قرار داده و قابلیت این باکتری را در تجزیه فنل و حذف آن به عنوان جنس غالب به اثبات رسانده اند . نتایج تحقیق حاضر نیز این یافته ها را تایید می نماید. در تحقیقات موحدیان و همکاران، بهترین باکتری های تجزیه کننده فنل که مقدار ۶۰۰-۵۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل را بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون تجزیه کردند متعلق به سویه های باکتری سودوموناس بود. با استفاده از تکنیک PCR ،از ۱۰ ایزوله خالص شده، ۶ ایزوله شناسایی شده متعلق به جنس سودوموناس پوتیدا بوده اند. تحقیقات کفیل زاده و همکاران نیز بیشترین رشد باکتری سودوموناس را در غلظت ۹۰۰میلی گرم بر لیتر پس از حدود ساعت ۲۰۰ نشان داد(۲۱،۲۲). باکتری سودوموناس جداشده از پساب پالایشگاه نفت تهران در تحقیق حاضر نیز قادر به تجزیه فنل به میزان ۹۰۰ میلی گرم بر لیتر

بوده است. در تحقیق انجام شده به وسیله مهدی حسن شاهیان و همکاران با عنوان جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده فنل از پساب کارخانه گل‌گهر سیرجان گزارش شده است که گونه‌های *سودوموناس*، نیتراتیرداکتر و سالجنتی باکتر به عنوان باکتری‌های برتر تجزیه کننده فنل شناسایی شده اند که گونه *سودوموناس* قادر به حذف ۴۰۰ پی پی ام فنل از محیط کشت بوده است(۲۶).

Zhenghui Liu و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ سویه هایی از این باکتری را از پساب آلوده جدا نموده و توانایی این باکتری را در حذف زیستی فنل به میزان ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر در ۴۸ ساعت در حدود ۹۱ درصد اثبات نموده اند (۲۷). نتایج مطالعه حاضرنشان می دهد ارتباط مستقیم بین حداکثر میزان رشد باکتری با بیش‌ترین غلظت تجزیه فنل در باکتری های مختلف وجود داشته است به طوری که ماکزیمم جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر برای هر باکتری در بالاترین غلظت تجزیه توسط آن باکتری مشاهده گردید. نکته ای که در پژوهش حاضر در مراحل رشد باکتری ها مشاهده شد این بود که جدایه‌هایی که قابلیت حذف فنل را داشته اند در غلظت‌های ۵۰۰، ۷۰۰و ۹۰۰ میلی گرم در لیترفنل به راحتی رشد کردند که دلیل آن وجود باکتری های خو یافته به فنل در فاضلاب پالایشگاه نفت می باشد.

نتیجه گیری

با جداسازی باکتری‌ها از فاضلاب پالایشگاه می‌توان گونه‌هایی را که توانایی بالاتری در حذف ترکیبات فنلی یا آروماتیک دارند شناسایی و از آن‌ها برای تجزیه زیستی فاضلاب و یا خاک آلوده به ترکیبات آروماتیک استفاده نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که طیف متنوعی از باکتری‌ها در فاضلاب پالایشگاه نفت وجود دارندکه قادر به تجزیه فنل نیز می باشند. بیش‌ترین میزان تجزیه فنل مربوط به سویه سودوموناس بوده است. انتروکوکوس و اسینتوباکتر در رتبه های بعدی از نظر تجزیه فنل قرار داشته اند.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به جهت تصویب و پشتیبانی مالی از طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌گردد.

Reference

1. Arutchelvan, V., et al., 2005. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. J. Hazard.Mater, Vol. 127, 238–243.
2. Whiteley, A.S., Bailey, M.J., 2000. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. Appl. Environ. Microbiol, vol.66, 2400–2407.
3. Hooived, M., Heederik, D.J.J., Kogevinas, M., Boffetta, P., Needham, L.L., Patterson, D.G., Bueno-de-Mesquita, H.B., 1998. Second follow-up of a dutch cohort occupationally exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and contaminants. Am J Epidemiol, 147, 891-899.
4. Environmental Protection Agency (EPA). Sampling and Analysis Procedure for Screening of Industrial Effluents for Priority Pollutants, EPA Cincinnati, OH, USA, 1977.
5. Lin, S.H., Chuang, T.S., 1994. Combined treatment of phenolic wastewater by wet air oxidation and activated sludge. Toxicol. Environ. Chem., vol. 44, 243–258.
6. Dianati tilaki, R.A., Karimpoor, S., 2010. Kinetic study on removal of phenol from water by organo-bentonite. Asian Journal of Chemistry, vol. 22. No.6. pp.4703-06.

7. Tay, S.-L., Moy, B.-P., Maszenan, A., Tay, J.-H., 2005. Comparing activated sludge and aerobic granules as microbial inocula for phenol biodegradation. Appl. Microbiol. Biotechnol, vol. 67, 708–713.
8. Barbosa, T.C.P., Luz, A.P., Bedin, M.L., Gabilan, N.H.., 1996. Effect of ceramic plant effluent on phenol degradation by Acinetobacter calcoaceticus. Int. Biodeter. Biodegr. vol. 37, 122.
9. Paller, G., Hommel, R.K.., Kleber, H.-P., 1995. Phenol degradation by Acinetobacter calcoaceticus NCIB 8250. J. Basic. Microbiol. vol. 35, 325–335.
10. Geng, A., Soh, A., Lim, C., Loke, L., 2006. Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol, vol. 71, 728–735.
11. Arutchelvan, V. et al., 2006. Kinetics of high strength phenol degradation using Bacillus brevis. J. Hazard. Mater, vol. 129, 216–222.
12. Chowdhury, MAZ., AL Mahin, A., Fakhruddin, N.M., 2006. Degradation of phenol by *Pseudomonas putida* when supplied as the sole carbon source and in the presence of glucose. *Bangladesh J Microbiol*, Vol. 23, 29-33.
13. Menke, B., Rehm, H.J., 1992. Degradation of mixture of monochlorophenols and phenols as substrates for free and immobilized cells of *Alcaligens* sp. A7-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. **37,** 665-661.
14. Ahmad, S.A., Syed MA, Arif N.M., Abdul Shukor, MY., Shamaan, NA., 2011. Isolation, identification and characterization of elevated phenol degrading Acinetobacter sp. Strain AQ5NOL 1. Aust J Basic Appl Sci, vol. 5(8), 1035-1045.
15. Quan, X., Shi, H., Zhang, Y., Wang, J., Qian, Y., 2004. Biodegradation of 2, 4-dichlorophenol and phenol in airlift inner-loop bioreactor immobilized with Achromobacter sp. Sep Purif Technol, vol. 34 (13), 97-103.
16. Ahmed, A.M., Nakhla, G.F., Farooq, S.J., 1995. Phenol degradation by Pseudomonas aeruginosa, J.Environ. Sci. Health, vol. 30, 99–107.
17. Chitra, S., Sekaran, G., Padmavathi, S., Gowri, C., 1995. Removal phenolic compounds from wastewater using mutant strain of *Pseudominas pictorium*. J. Gen. Appl. Microbiol, vol. 41, 229–237.
18. Balasankar, T., Nagarajan, S., 2000. Biodegradtion of phenol by *Bacillus brevis*. Asian Jr. Microbiol. Biotech. Env. Sci, vol. 2, 155– 158.
19. Sadia Afrin, J., 2008. Isolation and Identification of Phenol and Monochlorophenols-Degrading Bacteria: *Pseudomonas* and *Aeromonas* Species. Bangladesh J Microbiol, Vol. 25, No. 1, pp. 41-44.
20. El-Sayed, w., et al. 2003 .Isolation and identification of a novel strain of the genus Ochrobactrum with phenol-degrading activity. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 96, Issue 3, 310-312.
21. Przybulewska, K ., Wieczorek, A ., Nowak, A ., Pochrzaszcz, M.,2006.The isolation of microorganisms capable of phenol

degradation.. Polish Journa of Microbiology, vol. 55, No (1), 63-67.

22. Kafilzadeh, F., et al. 2010. Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. African Journal of Biotechnology, Vol. 9(40), pp. 6721-6726.
23. Movahedyan, H., Khorsandi, H., Salehi, R.., Nikaeen, M., detection of phenol degrading bacteria and pseudomonas putida in activated sludge by polymerase chain reaction. Journal of Environmental Health Science & Engineering, vol. 6(2), 115-120.
24. Aresta, M., Acquaviva, MI., Baruzzi, F., Cavallo, R.A., 2010. Isolation and characterization of polyphenols-degrading bacteria from olive-mill wastewaters polluted soil, World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 26, Issue 4, pp. 639–647.
25. Lin, J., Reddy, M., Moorthi, V., Qoma, B.E., 2008. Bacterial removal of toxic phenols from an industrial effluent. African Journal of Biotechnology, Vol. 7 (13), pp. 2232-2238.
26. Hasanshahian, M., Lashkari, M., Kheikhah, B., 1395. Isolation and identification of Phenol degrading bacteria from effluent factory of Golgohar Sirjan. J.Water and Wastewater, Vol.1, 49-56.
27. Zhenghui, L., Wenyu, X., Dehao, L., Yang Peng, Z., Shusi, L., 2016. Biodegradation of Phenol by Bacteria Strain Acinetobacter Calcoaceticus PA Isolated from Phenolic Wastewater. Int. J. Environ. Res. Public Health, vol.13, pp. 300.
28. Bergey, D.H., Holt, J.H., Bergeys Manual of determination Bacteriology.9thEd., Lippi cott Williams and Wikins ,Baltimore.1992
29. APHA, American Public Health Association. Standard Methods for examination of water and wastewater. 22nd Ed., AWWA, WPCF, Washington D.C.