عزل وتشخيص البكتريا المحللة للمركبات الفينولية من المياه

سوزان كامران حسن حسن رحيم الشريفي
جامعة بغداد/ كلية الزراعة – قسم علوم الاغذية

المستخلص

تم عزل ست عزلات بكتيرية محللة للفينول من مياه الفضلة الصناعية لمصفى الدورة وشخصت باستعمال جهاز Vitek 2 System , كانت 4 من هذه العزلات *Pseudomonas fluorescens* وعزلة واحدة *Citrobacter freundii* واخرى *Serratia liquefaciens* واختيرت من بينها العزلة الاكثر قابلية على تحليل الفينول وهي العزلة *Pseudomonas fluorescens SK* اذ بلغت اعدادها 262 $\times 10^5$ و.ت.م/مللتر عند تنميتها على الفينول بأعتباره مصدراً وحيداً للكربون والطاقة.

المقدمة

يعد تلوث البيئة مشكلة من اكبر واخطر مشاكل العصر والذي شهد العالم خلاله تطورا كبيرا في جميع المستويات ومن أكثرها ضرراً على مستقبل الحياة على كوكب الارض ، ويعد التلوث المائي أحد المخاطر التي تهدد البيئة (2). اذ ان الصناعة هي من اهم وانشط المصادر المسببة لتلوث المياه، ولاسيما الصناعات التي تستعمل وتطرح العناصر الثقيلة والمركبات السامة أذّ مما لا شك فيه ان هذه المواد ذات تأثيرات ضارة وسامة عندما تنتقل الى الكائنات الحية وتستقر في انسجتها (14) . وإن ما يعظم الحالة ويدعو الى الحذر والاهتمام بالموضوع هو كون العناصر الثقيلة والمركبات السامة لا تتحلل بفعل الاحياء المجهرية ولكن تتجمع ويزداد تركيزها تدريجيا وقد تخزن في انسجة الكائنات الحية (التركيز الحياتي Bioconcentration) ، كما يمكن ان تنتقل الى مسافات بعيدة عن مصادر طرحها في الماء ومن ثم تاثيرها في الانسان عبر انتقالها عن طريق السلسلة الغذائية(26). ويعد الفينول والمركبات الفينولية من ملوثات المياه السامة ولزيادة طرح المياه الصناعية الملوثة بهذا المركب كان لابد من ايجاد طرائق كفوءة لازالة هذه الملوثات عن طريق استعمال انظمة مايكروبايولوجية لازالة المركبات السامة من المخلفات الصناعية ومن ثم طرحها الى الانهار (23).

الهدف من الدراسة :

عزل وتشخيص عزلات محلية متحملة للظروف البيئية للعراق لها القابلية على تحليل الفينول من مياه الفضلة الصناعية .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات:

جمعت عينات الماء من مصفى الدورة ,اذ اخذت من الماء الداخل لحوض المعالجة الحيوية P10. ووضعت عينات المياه في قناني زجاجية نظيفة ومعقمة وحفظت العينات في الثلاجة لحين استعمالها في عزل الاحياء المجهرية المستهلكة للفينول.

عزل البكتريا:

تم عزل البكتريا المستهلكة للمركبات الفينولية اذ وزع 90 مللتر من الوسط المغذي السائل المكون من (2غم من فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K_2HPO_4 و1 غم من كلوريد الصوديوم NaCl و0.5غم من نترات الامونيوم NH_4NO_3 و0.2 غم من كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4.7H_2O$ و 0.2 غم من كلوريد الكاليسيوم $CaCl_2.2H_2O$ و0.01 غم من كلوريد الحديديك $FeCl_3$. أذيبت المكونات في الماء المقطر واكمل الحجم الى1000 مللتر وعقم بالمؤصدة.استعمل الوسط لعزل وتنمية البكتريا المحللة للفينول بعد اضافة الفينول اليه كمصدر وحيد للكاربون (19) ووضع في دوارق مخروطية سعة 250 مللتر وتم اضافة 10 مللتر(حجم/حجم) فينول بتركيز 1% مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة, وبعد التعقيم لقحت الدوارق بمقدار 10مللتر (حجم/حجم) من عينات المياه، وحضنت الدوارق في الحاضنة بدرجة حرارة 30 م مدة 24 ساعة، ولوحظ النمو بدليل العكارة ،اخذ بالناقل قطرة واحدة من عينات المياه ونشرت على سطح الوسط Nutrient Agar وحضنت بدرجة حرارة 30 م لمدة 24 ساعة. تم انتقاء عدد من المستعمرات المختلفة مظهريا وخططت على اطباق من الوسط نفسه واعيدت العملية عدة مرات للتأكد من نقاوة المزرعة ثم زرعت العزلات على وسط المغذي الصلب Nutrient agar المائل وحفظت في الثلاجة لحين اجراء الاختبارات اللاحقة.

عزل بكتريا *Pseudomonas fluorescens*

زرع الوسط الانتقائيCVA Crystal violet agar من النماذج المشار اليها في الفقرة السابقة وبطريقة التلقيح السطحي، وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25م لمدة 48 ساعة.

جرى بعدها تحديد الخصائص المورفولوجية والمزرعية للمستعمرات النامية ثم نقلها الى أوساط غذائية صلبة وسائلة للتأكد من نقاوتها واجراء الفحوص والدراسات اللازمة لاحقاً.

تشخيص العزلات البكتيرية

تم تشخيص العزلات المحللة للفينول و درست الصفات المورفولوجية والصفات المزرعية للمستعمرات المذكورة في طرائق التشخيص القياسية وحسب المفاتيح التصنيفية المقترحة من قبل (15).

دراسة الصفات المورفولوجية

تم ملاحظة شكل المستعمرة على الوسط الغذائي الصلب وشكل حافاتها وسطحها ولونها ورائحتها وحجمها وقابلية اصطباغها بصبغة كرام وشكل الخلايا, كما اختبرت قدرتها على الحركة باستعمال طريقة القطرة المعلقة لمزروع البكتريا في الوسط المغذي المائل بعمر 18 ساعة, وفحصت المستعمرات تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV) لملاحظة التألق.

الاختبارات الكيموحيوية, وشملت ما يأتي:

1- اختبار الاوكسيديز Oxidase test

للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم Indophenol Oxidase وقد تم ذلك بزرع البكتريا على الوسط المغذي الصلب وبعد الحضن لمدة 24 ساعة عند37 م ، نقلت مستعمرة بكتيرية بوساطة الناقل الى ورقة ترشيح مرطبة حديثاً بكاشف Tetramethyl p-phenylenediaminedihy drochloride ظهور اللون البنفسجي حال مزج المستعمرة مع الكاشف دليل على انتاج هذا الانزيم (7).

2- اختبار الكاتليز Catalase test

تم الكشف عن انتاج انزيم الكاتليز اذ زرعت البكتريا على الوسط المغذي الصلب وبعد الحضن لمدة 24 ساعةعند37 م ، نقلت مستعمرة بكتيرية واحدة بوساطة الناقل ومزجت مع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3% على شريحة زجاجية نظيفة. ان ظهور الفقاعات الهوائية دلالة على ايجابية الفحص (6).

3- التحلل المائي للنشا (Hydrolysis of starch)

لقح وسط النشأ الصلب بطريقة التخطيط وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25 م لمدة 72 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن أضيف الى الطبق 10 مللتر من محلول اليود الكاشف لتحلل النشا ويستدل على النتيجة الموجبة بوجود مناطق شفافة حول

المستعمرات، وظهور لون ازرق حول المستعمرات يدل على عدم تحلل النشا وبذلك فإن النتيجة سالبة (11).

4- إنتاج صبغة الفلورسين (fluorescin) المتألقة

لقح وسط King B الصلب و حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 م لمدة 48 ساعة ، النتيجة الموجبة استدل عليها بظهور لون اصفر مخضر حول المستعمرات في الطبق تحت الضياء الاعتيادي، وتم التأكد من ذلك بوضع الأطباق تحت الأشعة فوق البنفسجية (11).

5- إنتاج صبغة البايوسيانين (Pyocyanin)

لقح وسطKing A الصلب وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25 م لمدة 48 ساعة ويستدل على النتيجة الموجبة بوجود صبغة خضراء مزرقة منتشرة في الوسط (8).

6- قابلية النمو بدرجات حرارة 4 و41 م

لقح الوسط المغذي الصلب بالمزروع البكتيري وحضنت الاطباق في درجات الحرارة المراد اختبارها لمدة (24-48) ساعة. استعمل هذا الوسط لاختبار قدرة العزلات على النمو بدرجات الحرارة (4 و41 م).

7- **فحص الأكسدة – التخمر للكلوكوز**

لقح وسط (O-F medium) بطريقة الوخز وبواقع أنبوبتين إذ أضيف الى إحد الأنبوبتين زيت معدني معقم وبارتفاع 1 سم فوق الوسط اما الأخرى فمن دون إضافة للزيت حضنت الأنابيب مع أنابيب مقارنة لكل معاملة في درجة حرارة 25 م لمدة 72 ساعة . ويدل تحول لون الأنبوبتين الى الأصفر على ان البكتريا مخمرة للكلوكوز اما في حالة كون الأنبوبة المغطاة بالزيت المعدني ذات لون اخضر والأخرى ذات لون اصفر فهذا يعني ان البكتريا مؤكسدة للكلوكوز بينما في حالة بقاء الأنبوبتين باللون الأخضر فهذا يعني ان البكتريا لا تستهلك الكلوكوز (8).

8- تحلل الجيلاتين

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الجلاتين (Gelatin hydrolysis) بطريقة الطعن Stab inoculation وحضنت في درجة حرارة 25 م لمدة (24-72) ساعة, بعدها تركت الانابيب بالثلاجة لمدة نصف ساعة. ويدل عدم تصلب الوسط (تحول قوام الوسط الى الحالة السائلة)على النتيجة الموجبة (انتاج انزيم الجيلاتينيز gelatinase).

9- النمو على بعض الأوساط الغذائية

لقحت الأوساط الغذائية الصلبة (MacConkey agar ، Gsp agar ، Cetrimide agar ، Brolacin agar) وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25 م لمدة 72 ساعة . وكان ظهور مستعمرات تتصف بخصائص مميزة يعد مؤشراً على مقدرة العزلات المدروسة على النمو في تلك الأوساط (22).

التشخيص باستعمال جهاز Vitek 2 compact system

اتبعت خطوات التشخيص على وفق تعليمات الشركة المصنعة.

أ. زرعت العينات على وسط الماكونكي الصلب وحضنت بالحاضنة لمدة 24 ساعة، بدرجة حرارة 37م.

ب. بعد ظهور النمو على الوسط الزرعي صبغت المستعمرات بصبغة كرام لمعرفة كونها سالبة او موجبة فضلا عن فحص مدى نقاوة العينة.

ت. عمل تخفيف بانبوبة خاصة للشركة المصنعة يحوي 3 مللتر من المحلول المنظم المجهز من الشركة ونقل اليه قليل من النمو بوساطة الناقل.

ث. تمت مقارنة عكورة العالق مع محلول ثابت العكورة القياسي بجهاز مقياس العكورة المجهز من الشركة حيث يكون التركيز النهائي داخل الانبوبة متراوحا ما بين 0.54 الى 0.63.

ج. وضعت الانابيب بالمحمل الخاص بها بعد ان أضيف لكل انبوبة شريط الفحص الخاص اعتماداً على التشخيص بصبغة كرام.

د. تركت الاشرطة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م، ثم قرأت بيانات كل عينة والتي تكون محفوظة على جهاز الحاسوب المرفق بجهاز الفايتيك.

اختيار افضل عزلة بكتيرية تحلل الفينول

نميت العزلات البكتيرية على وسط المرق المغذي Nutrient Broth وحضنت في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة. لقحت الدوارق الحاوية على 10 مللتر من الوسط المعدني السائل Mineral Medium Broth الذي يحوي على الفينول (100 ملغم / لتر) مصدراً وحيداً للكاربون بتركيز لقاح 10^5 x1 خلية /مللتر وحضنت في درجة حرارة 30 م لمدة 72ساعة، أجريت التخافيف العشرية ثم نقل 0.1 مللتر على الوسط المغذي الصلب Nutrient agar.بنقل 0.1 مللتر للطبق.وحضنت الاطباق في الحاضنة

بدرجة حرارة 30 م لمدة 24 ساعة , اذ لوحظت كثافة النمو بدلالة العدد الكلي للبكتريا النامية لكل مللتر.

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا:

كانت الخطوة الأولى في عملية العزل هي اختيار عينات تتوافر فيها صفات معينة وبالاتجاه الذي يخدم أهداف الدراسة ، لذا جاء الاختيار لعينات مياه الفضلة الصناعية غير المعالج من مصفى الدورة لكونها تمثل الحجر الأساس الذي تقوم عليه الدراسة الحالية فضلاً عن كونها بيئة طبيعية لوجود البكتريا المطلوبة ولاحتوائها على أغلب المتطلبات الغذائية التي تلبي حاجتها.

استخدم الوسط المعدني السائل المذكور في طريقة العمل والحاوي على 100ملغم /لتر فينول مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة لعزل البكتريا ، فأمكن الحصول على ست عزلات بكتيرية قادرة على تحليل الفينول جميعها سالبة لصبغة كرام وهذا يتفق مع النتائج التي توصل اليها الكثير من الباحثين من ان البكتريا السالبة لصبغة كرام هي السائدة في استهلاك المركبات النفطية المعقدة (9 ،1 ،17) ان سبب سيادة الانواع السالبة لصبغة كرام هو بامتلاكها نظاما" انزيميا" جيدا" في استهلاك المواد المعقدة، فضلاً عن وجود الغشاء الخارجي Outer membrane الذي يعمل على حمايتها من المؤثرات البيئة، من خلال تقليل نفاذيته لانواع مختلفة من الجزيئات، واحتواء الغلاف على الدهون التي تمكنها من الحصول على اكبر كمية من المركبات النفطية المعقدة من البيئة النامية فيها، ومن ثم اكسدتها واستغلالها مصدرا" للكاربون والطاق (25، 1).

اختيار افضل عزلة بكتيرية تحلل الفينول:

إن معدل تحلل الفينول ذو علاقة مباشرة مع نمو العزلة البكتيرية ومعدل التحلل يزداد بزيادة عدد المستعمرات البكتيرية (16) ويبين الجدول رقم (1) كثافة نمو العزلات البكتيرية كما تبين ان العزلة رقم 1 كانت ذات كفاءة نمو عالية في الوسط المعدني السائل المذكور في طريقة العمل والحاوي على 100ملغم/لتر فينول مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة بدلالة عدد المستعمرات النامية في الطبق اذ بلغت 262×10^{5} و.ت.م./مللتر . لذلك تم انتقاء العزلة الكفوءة في تحليل الفينول لاجراء الدراسات اللاحقة عليها.

جدول (1) كثافة نمو العزلات البكتيرية

رقم العزلة	عدد البكتريا و.ت.م./مللتر
1	262×10^5
2	198×10^5
3	209×10^5
4	244×10^5
5	88×10^5
6	73×10^5

تشخيص العزلة البكتيرية المنتخبة:

دراسة الصفات الموررفولوجية

لغرض الحصول على مستعمرات بكتيرية نقية ولدراسة صفاتها نقلت المستعمرات النامية على وسط Crystal Violet Agar والحاوي على 2 جزء بالمليون من مادة Crystal violet والتي تثبط نمو البكتريا الموجبة لتصبيغ كرام (11) وفي هذه الخطوة تم الحصول على البكتريا السالبة لتصبيغ كرام ،حددت مستعمرة منفردة نامية على الوسط المذكور واخذ جزء منها وفحصت قابليتها للاصطباغ بتصبيغ كرام مع ملاحظة شكل الخلايا تحت المجهر , في حالة كون الخلايا عصوية وسالبة لتصبيغ كرام ,واخذ جزء اخر من المستعمرة نفسها واجري عليه اختبار الاوكسيديز,في حالة كون النتيجة موجبة فإن هذا يعد اختبارا احتمالياً بان المستعمرة تابعة لجنس *Pseudomonas* .(4).

نمي الجزء الباقي من المستعمرة المذكورة آنفاً على الوسط Ampicillin Chloramphenicol Cyclohexamide agar الذي يحوي في تركيبه على المضادات الحيوية(Chloramphenicol Cyclohexamide , Ampicillin,) اذ ان هذا الوسط يسمح بنمو افراد المجموعة الومضائية (Fluorescent group) فقط والتابعة لجنس *Pseudomonas* والتي تشمل الانواع *P.chlororaphis* و *P.aureofaciens* *p.aeruginosa*و *P.putida,* و *P.fluorescens*, (21).

يظهر جدول (2) بعض الخصائص للبكتريا المعزولة عند فحصها تحت المجهر والتي تميزت بكونها خلايا عصوية ، سالبة لتصبيغ كرام ، مفردة أو مزدوجة ،غير مكونة للابواغ ومتحركة (باستعمال فحص القطرة المعلقة). وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره (11) و (13) حول الصفات المورفولوجية لبكتريا *P.fluorescens* .

جدول (2) : بعض الصفات المورفولوجية لبكتريا *Pseudomonas* المعزولة من المياه غير المعالجة لمصفى الدورة

الصفة	الملاحظات
قابلية الخلايا للاصطباغ بتصبيغ غرام	–
شكل الخلايا	عصوية مستقيمة
تجمع الخلايا	غالبيتها مفردة وبعضها مزدوج
الحركة	+
إنتاج الأبواغ	–

دراسة الصفات المزرعية :

عند تنمية العزلات تحت الدراسة في الوسط المغذي السائل (NB) , فإن النمو اتخذ شكلا حلقيا في الاعلى .وعند تنمية العزلات على الوسط المغذي الصلب (NA) فإن المستعمرات الناتجة اتخذت شكلا دائرياً (Circular) ذا سطح ناعم (Smooth) وكان شكل حافة المستعمرة كاملاً (Entire), ذا قوام مخاطي مع وجود رائحة غير محببة .

ان النتائج المذكورة تتفق مع ما ذكره (21 ،13) ، وأجريت للعزلات النقية دراسات إضافية باستعمال أوساط غذائية صلبة سيما Brolacin agar و Cetrimide agar و MacConkey agarو GSP agar. بغية تشخيص الجنس فضلاً عن بعض الفحوص الكيموحيوية ، واتصفت المستعمرات الناتجة بأحجام وألوان مختلفة في الأوساط المؤشرة إزاء كل منها جدول(3) ، وتتفق نتائج الجدول مع ما ذكره(22).

جدول (3): صفات بكتريا *Pseudomonas* عند نموها على بعض الأوساط الغذائية الصلبة

الوسط الغذائي	الملاحظات
Brolacin agar	مستعمرات معتمة ، خضراء – مزرقة
Cetrimide agar	مستعمرات ومضائية متألقة Fluorescent
MacConkey agar	مستعمرات بنية او عديمة اللون
GSP agar	مستعمرات كبيرة ، بنفسجية – مزرقة مع تلون المنطقة المحيطة بها باللون البنفسجي – المحمر

دراسة بعض الصفات الكيموحيوية لبكتريا *Pseudomonas*

يوضح الجدول(4) بعض الصفات الكيموحيوية للعزلة البكتيرية تحت الدراسة, والتي تميزت بكونها موجبة لفحص الاوكسيديز والكاتاليز فضلا عن كونها سالبة لفحص تحليل النشأ لعدم مقدرتها على انتاج انزيم الاميليز وهي تحلل الجيلاتين وتنمو في درجة

حرارة 4 م ولاتتمكن من النمو في درجة حرارة 41 م. ان النتائج الواردة في الجــدول (4) تتفق مع ما ورد في (13، 21).

جدول (4) بعض الفحوص الكيموحيوية لبكتريا *Pseudomonas* المعزولة من المياه غير المعالجة في مصفى الدورة.

الفحص	البكتريا المعزولة في الدراسة الحالية	Starr et. al. ,1981	Holt and Krieg, 1984
فحص الاوكسيديز	+	+	+
فحص الكاتاليز	+	+	+
فحص الاكسدة –التخمر للكلكوز	مؤكسدة	مؤكسدة	مؤكسدة
التحلل المائي للنشأ	–	–	–
التحلل المائي للجيلاتين	+	+	+
النمو في درجة حرارة 4 م	+	+	+
النمو في درجة حرارة 41 م	_	_	_
انتاج صبغة الفلورسين الومضائية	+	+	+
انتاج صبغة البايوسين	–	–	–

الفحوصات التشخيصية لبكتريا *Pseudomonas* والعزلات البكتيريـــة المعزولـــة مـــن المياه غير المعالجة في مصفى الدورة باستعمال جهاز Vitek :

يظهر الجدول (5) اجناس البكتريا تحت الدراسة والمشخصة باستعمال جهاز Vitek، بينت نتائج التشخيص ان اربع عزلات تعود لجنس *Pseudomonas fluorescens* من ضمنها العزلة البكتيرية المنتخبة للدراسة التي اعطت كفاءة نمو عالية ,وتعد بكتريا *Pseudomonas* من اشهر اجناس البكتريا المستهلكة للمركبات الاروماتية متعدد الحلقات (3)، وعزلة تعود لجنس *citrobacter*، وعزلة تعود لجنس *Serratia* إذ يتميز هذا الجنس بقابلية جيدة في استهلاك المركبات النفطـية وانتاج المســتحلبات الحيــوية Biosurfactants(24) وانتاجه للصبغات مثل صبغة البروديجيوسين prodigiosin، وصبغـــة البايرمين pyrimine.

جدول (5) اسماء اجناس البكتريا المشخصة باستعمال جهاز Vitek

رقم العزلات	اسم الجنس
.1	Pseudomonas fluorescens SK
.2	Pseudomonas fluorescens b
.3	Pseudomonas fluorescens c
.4	Pseudomonas fluorescens d
.5	Citrobacter freundii
.6	Serratia liquefaciens

اشارت الدراسات الى كفاءة الانواع التابعة لجنس *Pseudomonas* في استهلاك المركبات النفطية المختلطة ولاسيما المجموعة المنتجة للصبغات المتألقة ضمن هذا الجنس؛ وذلك لتميز افراد هذا الجنس بقابليات فسلجية ووراثية جعلته من اجناس البكتريا واسعة الانتشار في البيئات الملوثة(10) أي انها تمتلك الانزيمات المحللة لهذه المواد وقد يكون لها انظمة انزيمية مختلفة مثل انظمة الاكسدة الطرفية وتحت الطرفية Monooxygenase و Dioxygenase , ومسارات ايضية مختلفة عدة تعمل على تفكيك هذه المواد المعقدة وتحويلها الى مواد ابسط لتتمكن من الاستفادة منها،ولسلالات هذه البكتريا جينات محمولة على الدنا (DNA) الكروموسومي والبلازميدي مسؤولة عن تخليق مثل هذه الانزيمات (1،18،5)، وامتلاكها بلازميدات التفكك الحيوي (Biodegradative plasmids) المسؤولة عن تمثيل واستهلاك كثير من المركبات الملوثة للبيئة(20،3)

المصادر

1- العبيدي, امل علي (2004). العوامل المؤثرة في التحلل الحيوي لمياه مخلفات وحدة المعالجة في مصفى الدورة – بغداد. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

2- جبر ، اياد محمد (2002). التأثيرات البيئية المحتملة لتصريف المياه الصناعية على الهائمات النباتية .رسالة ماجستير كلية العلوم/جامعة بابل.

3- جمعة، ناظم حسن حيدر(2007) معالجة الملوثات النفطية بعزلات محلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المنتجة للمستحلبات الحياتية. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة بغداد.

4- سيلي ه.و.،فان ديمارك،ب.ج.(1989) الكائنات الدقيقة عمليا ،ترجمةعبد الحافظ،ع.م.،ومبارك، م.ص.م.، ومحمود،س.ع.ت.،الدار العربية للنشر والتوزيع،القاهرة.

5- نصر ، رائد بحر (2000).دراسة بكتريولوجية وراثية لبكتريا *Pseudomonas sp.* المستهلكة للمركبات الهيدروكاربونية . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد .

6- Baron ,E . J ., Peterson , L . R . , and Finegold , S . M . (1994) .Bailcy and scoffs diagnostic microbiology . 9th ed . . the C.V. Mosby ,Co ,U.S.A.

7- Collee ,J . G . , Fraser , A.G., Marmion , B.P. and Simmons , A. (1996) . Mackie and McCarthy practical medical microbiology .14th ed. Churchill Living Stone , U.S.A.
8- Cowan, S.T.(1977).Cowan and Steel's manual for the identification of medical Bacteria.2nd.ed.Cambridge University Press.Cambridge.
9- Facundo J. Marquez-Rocha ; Vanessa Hernandez-Rodriguez- and Ma.Teresa Lamela (2001).Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium water Air and Soil pollution 128:313-320.
10- Galli ,E. ; Silver ,S. and Withold ,B. (1992) . *Pseudomonas* :Molecular Biology and Biotechnology . American Society for Microbiology , Washington , D.C.
11- Harrigan, W.F. and McCance, M.E.(1976).Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press. London .New York. San Francisco.
12- Holt, J. G. and N. R. Krieg 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol.1 Williams and Wilkins. London U.K.
13- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Genus *Pseudomonas* in Bergey's Manual of determinative bacteriology. (9th). Williams, R.H. (ed). Williams Wilkins. Baltimor. USA. Pp.93-94, 150-168.
14- Krantz, D. and Kifferstein (2007). Water pollution and society. Netscape Navigator Gold, USA.
15- Macfaddin , J.F. (2000) . Biochemical tests for identification of medical bacteria .(3rd) ed., M.G. Lawrence (ed.). Lippincott and Williams , New York .
16- Mahiudddin Md. , Fakhruddin1, ANM. and Abdullah-Al-Mahin.(2011). Removal of Phenol by a soil isolated Pseudomonas fluorescens PU1. Bangladesh.
17- Nweke,C.O. and Okpokwasili,G.C. (2003) . Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil *Staphylococcus species* .African J.Biotechnology. 2(9):293-295.
18- Pattnaik,S. ; Rath,C. and Suberamanyam (1995) . Characterization of resistance to essential oils in a strain of *Pseudomonas aeruginosa (VR-6)* . Microbial. 81 (326) : 29 - 31 .
19- Rigo, M., Alegre, R. M. (2004).Isolation and Selection of phenol – Degrading Microorganisms from Industrial Wastewater and Kinetics of the Biodegradation. Folia Microbiol.49 (1),41-45.
20- Slater, J. H.; Weightman, A. and Thomas, D.J. (1988). Plasmid in : Microorganisms in action (Eds. Lynch, J.M. and Hobbies, J.) Blackkwell Scientific Oxford. pp: 44-51.
21- Starr, M.P. ; Stop, H.; Trüper, H.G. and Schlegel, H.G.(1981).The Prokaryotes. Vol.1. Springer-Verlage. Berlin,Heidelberg, New york.
22- Stolp, H. and Gadkari, D. (1981). Nonpathogenic members of the genus *Pseudomonas*. In: 'The Prokaryotes' (Eds. Starr, P.M.; Truner, H.G.; Balaws, A. and Schlegel, H.G) pp. 719-740. Vol. 1.
23- Vieira, R. H. S. F. and Volesky, B. (2000). Biosorption: a solution to pollution . Internatl Microbial . *3* : 17-24.
24- Williams ,R.P. and Qadri ,S.M.H. (1980) . The pigment of *Serratia* In the Genus *Serratia* .P: 31-75 (ed. Graeventz,A. and Rubin ,S.J.). CRC press . Florida
25- Zhang ,Y. and Miller ,R.M. (1994) . Effect of a *Pseudomonas rhamnolipid* (biosurfactant) on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2101 - 2106 .
26- Zhao , M . , Duncan , J . R . and Van , H . R . (1999) . Removal and recovery of zinc from solution and electroplating effluent using *Azolla filiculoides* . Water Res . *33*(6) :1516-1522.

Isolation and Identification of phenol degrading bacteria from water

Abstract

Six phenol degrading bacteria were isolated from the industrial sewage of Al-Doura oil refiner and identified by the developed bacterial identification technique Vitek 2 system. Four of these isolates were identified as *Pseudomonas fluorescens* , one as *Citrobacter freundii* and *Serratia liquefaciens* . The better of phenol degrading Isolate *Pseudomonas fluorescens* SK was chosen as its total number was $262x10^5$ c.f.u.\ml when they were grown in mineral medium containing phenol as carbon source.