Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

Journal of Health

Vol. 7, No. 3, Summer 2016, Pages 263-275

Biodegradation of Crude Oil Contamination by a Bacterium Strain Isolated from Sediment of Arvandkenar Area

Nadalian B[1], Ebrahimipour G[2], Shahriari Mogadam M[3], Nadalian B[1]

1. Microbiology student, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University. Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University. Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Sistan va Blaoochestan, Iran.

**** Corresponding author.*** Tel: +985432232600 Fax: +985432232600 E-mail: mohsen.shahriari@uoz.ac.ir

Received: Apr 26, 2015 Accepted: Oct 2, 2015

ABSTRACT

Background & Objectives: Environmental pollution by oil and its derivatives is a serious threat to human health and the environment. Therefore, treatment of these compounds is important. In order to achieve high biodegradation efficiency, isolation of efficient bacteria as well as identifying optimal biodegradation conditions are important. The aims of the study were to isolate and identify crude oil degrading strain from surface sediments of Arvandkenar region, identifying optimal biodegradation conditions as well as evaluating degradation of different fraction of synthetic and crude oil by isolated strain.

Methods: Surface sediment samples of Arvandkenar were collected. Isolated strains were identified after enrichment of crude oil degrading bacteria in a mineral salt medium. The NH_4Cl and K_2HPO_4 concentrations were optimized to achieve the best conditions for crude oil biodegradation by isolated strain. The ability of bacterial isolate to degrade different fractions of oil was studied gravimetrically. The ability of the isolated strain to degrade hexadecane, dibenzothiophene, naphthalene, phenanthrene and pyrene was studied using Gas chromatography.

Results: Among the isolated strains, BN_2 had the highest efficiency and showed 99% similarity to *Pseudomonas aeruginosa*. BN_2 strain had the optimum function at 0.25 and 0.024g/l of NH_4Cl and K_2HPO_4, respectively and removed >80% of oil within 5 days. The results of gravimetric analysis showed isolated strain to degrade aliphatic, aromatic, resin and asphaltenes with the highest removal rate belonging to naphthalene.

Conclusions: Indigenous bacteria from surface sediments of Arvandkenar degrade crude oil. Due to high biodegradation ability of BN_2, they can be used for bioremediation of petroleum contaminated soil in the Arvandkenar region.

Keywords: Optimization; Oil Contamination; Bioremediation; Arvandkenar.

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

بررسی حذف زیستی آلاینده‌های نفتی توسط باکتری جداشده از رسوبات منطقه اروندکنار

بهاره نادعلیان[1]، غلامحسین ابراهیمی‌پور[2]، محسن شهریاری مقدم[3]*، بنفشه نادعلیان[1]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران ۲. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران ۳. استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۵٤۳۲۲۳۲۶۰۰ فکس: ۰۵٤۳۲۲۳۲۶۰۰ ایمیل: mohsen.shahriari@uoz.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آلودگی محیط با نفت و مشتقات آن تهدیدی جدی برای سلامت انسان و محیط زیست می باشد، لذا تصفیه این مواد اهمیت بالایی دارد. جهت دستیابی به کارایی بالای تصفیه زیستی، جداسازی باکتری های کارامد و همچنین شناخت شرایط بهینه مصرف این ترکیبات توسط میکروارگانیسم ها مهم می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام از رسوبات آلوده به نفت منطقه اروندکنار، تعیین شرایط بهینه و نیز ارزیابی توان سویه انتخاب شده در تجزیه ترکیبات مختلف تشکیل دهنده نفت خام بود.

روش کار: رسوبات سطحی منطقه اروندکنار نمونه برداری و پس از غنی سازی باکتری های تجزیه کننده نفت خام در محیط پایه معدنی، سویه های جداسازی شده شناسایی گردیدند. به منظور دستیابی به بهترین شرایط تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه خالص شده، غلظت منبع نیتروژن و فسفر بهینه شدند. توانایی سویه خالص شده در تجزیه ترکیبات مختلف نفت خام توسط روش وزن سنجی انجام شد. همچنین با استفاده از هگزادکان، دی بنزوتیوفن، نفتالین، فنانترن و پیرن توان سویه خالص شده در تجزیه این مواد با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی سنجیده شد.

یافته ها: از میان سویه های خالص شده، سویه BN_2 بهترین عملکرد را در تجزیه زیستی نفت خام دارا بود و به میزان ۰/۹۹ به گونه *Pseudomonas aeruginosa* شباهت نشان داد. سویه BN_2 در غلظت ۰/۲۵ گرم در لیتر کلرید آمونیم و ۰/۰۲٤ گرم در لیتر فسفات پتاسیم بهترین عملکرد را نشان داد و بالغ بر ۸۰ درصد نفت خام را در طی ۵ روز تجزیه کرد. وزن سنجی اجرای مختلف نفت خام نشان داد سویه جدا سازی شده قابلیت تجزیه زیستی هیدروکربن های اشباع، آروماتیک، رزینی و آسفالتن را دارا است. همچنین از میان ترکیبات مختلف استفاده شده بیشترین درصد حذف مربوط به نفتالین بود.

نتیجه گیری: باکتری‌های رسوبات سطحی منطقه اروندکنار دارای توان بالایی در تجزیه نفت خام می باشند. با توجه به قابلیت بالای سویه BN_2 در تجزیه اجزای مختلف تشکیل دهنده نفت خام، نتایج این مطالعه می تواند در بیورمدیشن خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در منطقه اروندکنار استفاده شود.

واژه های کلیدی: بهینه سازی، آلودگی نفتی، تصفیه زیستی، اروندکنار

دریافت: ۹٤/۲/۶ **پذیرش:** ۹٤/۷/۱۰

مقدمه

استفاده گسترده از فراورده‌های نفتی منجر به آلودگی محیط زیست شده و مشکلاتی جدی برای سلامت محیط ایجاد کرده اند (۱). فعالیت‌های صنعتی، سوخت ناقص مواد آلی، نشت نفت کش‌ها و حفر چاه‌های نفتی از عوامل عمده تولید و پخش این مواد به محیط می‌باشند. نفت خام مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات مختلف می‌باشد که بخش عمده آن را هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک تشکیل می‌دهند (۲). ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای[1] (PAHs) نیز از جمله آلاینده‌های مهم محیط زیست

[1] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

می‌باشند. این ترکیبات گروهی از ترکیبات آلی هستند که مولکول آنها از دو و یا تعداد بیشتری حلقه‌های آروماتیک (حلقه بنزنی) به هم جوش خورده تشکیل شده است (۳). ترکیبات آروماتیک به دلیل خاصیت هیدروفوبیکی بالا و حلالیت کم آن‌ها در آب تمایل شدیدی به پیوند با مواد آلی دارند در نتیجه در خاک و رسوبات تجمع می‌یابند (٤). این ترکیبات دارای سمیت بالا و همچنین دارای ویژگی‌های سرطانزایی و جهش زایی هستند و حساسیت زیست محیطی ویژه ای بر روی آنها وجود دارد. PAHs توسط آژانس حفاظت از محیط زیست (EPA)[1] جزء آلاینده‌های شاخص محیط زیست طبقه بندی شده‌اند (۵). در بین هیدروکربن‌های آلیفاتیک تشکیل‌دهنده سوخت‌های فسیلی، آلکان‌ها بخش مهمی از آنها می‌باشند. آزاد شدن این ترکیبات در محیط مشکلات جدی زیست محیطی ایجاد می‌کند و نیاز به روش‌های کارامد برای تجزیه این ترکیبات به ویژه آنهایی که دارای زنجیره بلندتری هستند وجود دارد (۶). مشکلات اکولوژیک که در نتیجه آلودگی‌های نفتی ایجاد می‌شوند نیاز به توسعه تکنولوژی‌های کارآمد جهت جهت تصفیه این آلاینده‌ها را نشان می‌دهد (۷). جهت حذف آلودگی‌های نفتی و پیامدهای ناشی از آن راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است، در دهه‌های اخیر زیست‌پالایی به دلیل هزینه‌های کم و کارایی بالا نسبت به دیگر روش‌ها ارجحیت پیدا کرده است (۸). در زیست پالایی کاتالیزورهای زیستی بر روی مواد آلاینده عمل کرده و آلاینده‌های موجود در آب، پساب، لجن، خاک و... را تغییر داده و یا از بین می‌برند و روشی عملی و اقتصادی جهت حذف بسیاری از آلاینده‌های زیست محیطی محسوب می‌شود. شناسایی تعداد زیادی از باکتری‌ها با قابلیت تجزیه زیستی ترکیبات نفتی، منجر به توسعه زیست پالایی شده و این فناوری را تبدیل به روشی رایج و کارآمد در تصفیه مناطق آلوده کرده است. میکروارگانیسم‌های مختلفی از قبیل *Pseudomonas* sp.، *Halobacterium* sp.، *Rhodococcus* sp.، *Acinetobacter* sp.، *Bacillus* sp. قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند (۹،۱۳)، اگر چه تاکنون شمار متعددی از باکتری‌های تجزیه کننده مواد نفتی جداسازی و شناسایی شده‌اند، استفاده از باکتری‌های بومی با توجه به سازگاری آنها به محیط در اولویت قرار دارد. زیست پالایی فرایندی پیچیده بوده و جهت رسیدن به بهترین نتیجه در زیست پالایی علاوه بر استفاده از باکتری‌های کار آمد، دانستن شرایط محیطی بهینه نیز پر اهمیت می‌باشند. عوامل محیطی می‌توانند نقش محرک یا بازدارنده بر روی رشد میکروارگانیسم‌ها داشته باشند. مواد مغذی برای انجام فعالیت باکتری‌ها ضروری می‌باشند و فاکتوری کلیدی در فرایند زیست پالایی هستند. با توجه به آنکه میزان کربن نفت خام بسیار بالا می‌باشد، میزان مواد مغذی از قبیل نیتروژن و فسفر برای رشد باکتری‌ها ضرروری است و کمبود آنها زیست پالایی را محدود می‌کند (١٤).

اگر چه در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی مطالعات مختلفی در ایران انجام شده است (۱۵،۱۷) اما در زمینه تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی که لازمه افزایش کارایی سویه‌های جداسازی شده و کاربردی شدن مطالعات انجام شده می‌باشد، مطالعات کمی انجام شده است و مطالعات انجام شده نیز غالباً در محیط‌های آب شور انجام شده (۱۸،۲۰) و مطالعات انجام شده در محیط‌های آب شیرین محدود است (۲۱). در این پژوهش باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌های نفتی از منطقه اروندکنار برای اولین بار جداسازی و تأثیر فاکتورهای غلظت منبع نیتروژن و فسفات معدنی در تجزیه زیستی نفت بوسیله سویه جداسازی شده بررسی شد. همچنین علاوه بر وزن سنجی میزان اجزای مختلف نفت پس از تجزیه باکتریایی، از

[1] Environmental Protection Agency

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

ترکیبات خطی و حلقوی مدل به صورت خالص استفاده و میزان تجزیه آنها توسط کروماتوگرافی گازی سنجش گردید، که می‌تواند دید بهتری نسبت به تجزیه زیستی توسط سویه خالص شده بدهد.

روش کار

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت

نمونه آب و رسوب سطحی آلوده به ترکیبات نفتی از منطقه اروندکنار جمع‌آوری و در بطری استریل ریخته شد و تا زمان جدا سازی باکتری‌ها در دمای ٤°C قرار داده شد. همچنین فاکتورهای محیطی (دما، pH و شوری) در محل اندازه‌گیری شدند. جهت خالص سازی سویه‌های تجزیه کننده نفت خام، ۵ ml از نمونه جمع‌آوری شده به ۱۰۰ ml محیط پایه معدنی[1](MSM) به همراه ۱۰ ml/l نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی اضافه گردید. سپس با استفاده از اسید کلریک ۱N، pH محیط کشت بر روی ۷ تنظیم شد. محیط‌های کشت در ارلن‌های شیاردار ۲۵۰ ml، دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱٤۰rpm گرماگذاری شد. محیط MSM حاوی ۰/۵ g K_2HPO_4، ۱ g NH_4Cl، ۰/۰۱ g $FeSO_4.7H_2O$، ۳ g NaCl، ۰/۲ g $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱ g $CaCl_2$ و همچنین ۱ ml محلول عناصر میکرو در ۱۰۰۰ ml آب شرب بود. محلول عناصر میکرو شامل ۷۰ mg $ZnCl_2$، ۱۰۰ mg $MnCl_2.4H_2O$، ۲۰۰ mg $CoCl_2.6H_2O$، ۱۰۰ mg $NiCl_2.6H_2O$، ۲۰ mg $CuCl_2.2H_2O$، ۵۰ mg $NaMoO_4.2H_2O$، ۲۶ mg $Na_2SeO_3.5H_2O$، ۱۰ mg $NaVO_3.H_2O$، ۳۰ mg $Na_2WO_4.2H_2O$، ۱ ml HCl (۲۵٪) در ۱۰۰۰ ml آب مقطر بود (۲۲). پس از مشاهده رشد در محیط کشت، ۵ ml از محیط کشت به محیط کشت دیگری (مشابه شرایط محیط کشت اولیه) اضافه و این فرایند ٤ بار تکرار گردید. در پایان ۱ ml از محیط کشت پس از تهیه رقت سریال (تا غلظت 10^{-8}) بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و در دمای ۳۰°C به مدت یک هفته گرماگذاری شدند. در پایان سویه‌های مختلف با استفاده از کشت‌های متوالی خالص سازی گردیدند (۸). جهت تعیین توان سویه‌های خالص شده در تجزیه نفت خام، باکتری‌ها ابتدا به محیط کشت نوترینت براث تلقیح و به مدت ٤۸ ساعت انکوبه شدند و از آنها (پس از رسوب داده شدن توسط سانترفیوژ یخچال دار Hermle Z323K) جهت تلقیح ارلن‌های حاوی محیط کشت پایه معدنی به همراه نفت خام (۱۰ m/l) با OD نهایی ۰/۱ استفاده گردید. پس از گذشت ۵ روز سویه‌های خالص شده از نظر قابلیت مصرف نفت خام، بر اساس ایجاد کدورت در محیط و سرعت تجزیه نفت مقایسه شدند. در پایان سویه‌ای که بیشترین توان مصرف نفت را دارا بود به عنوان سویه برتر انتخاب گردید.

شناسایی سویه منتخب

به این منظور خصوصیات مورفولوژیک باکتری از لحاظ شکل، اندازه و همچنین رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. تست‌های بیوشیمیایی باکتری مانند اکسیداز، کاتالاز، احیاءِ نیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین و مصرف اوره نیز انجام شد. برای مطالعه فیلوژنتیک باکتری بررسی توالی S ۱۶rDNA صورت گرفت. بدین منظور سویه خالص شده ابتدا در محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت High pure PCR Product محصول شرکت Roche آلمان صورت گرفت. به منظور تعیین غلظت DNA و نیز بررسی میزان خلوص آن، جذب در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. جهت تکثیر ژن ۱۶S rDNA از پرایمرهای Universal با توالی Forward: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTC -3' و Reverse: 5'- GCCTAAGGAGGT GATCCA -3' استفاده شد. مرحله واسرشت شدن ابتدایی در

[1] Mineral Salt Medium

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

دمای ۹٤ °C برای مدت ۵ دقیقه انجام شد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤°C به مدت ٤۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶°C به مدت ٤۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه Primus 25 advanced® thermocycler انجام شد (۲۳)، بعد از انجام الکتروفورز روی ژل، محصولات PCR از روی ژل بازیابی شده و قطعات تکثیرشده و خالص شده با استفاده از یک DNA Sequencer بر اساس Chain Termination Method روش سنگر و توسط شرکت سیناژن تعیین توالی شد. پس از تعیین توالی‌های مورد نظر، با استفاده از BLAST در پایگاه اطلاعاتی http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST جستجوهای همولوژی به عمل آمد.

تعیین شرایط بهینه رشد باکتری و تجزیه نفت

برای تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی نفت خام، به ترتیب تأثیر فاکتورهای غلظت منبع نیتروژن و فسفر بر رشد سویه منتخب در محیط پایه معدنی حاوی نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در ارلن‌های استریل ۲۵۰cc شیاردار مورد بررسی قرار گرفت. تلقیح باکتری به محیط‌های کشت مطابق روش ذکر شده با OD نهایی ۰/۱ در دمای ۳۵°C انجام گرفت. شرایط بهینه با بررسی کدورت سلولی به عنوان شاخص‌های رشد باکتری و سنجش میزان پروتئین تعیین شد. بدین منظور روزانه، ۱ ml از هر محیط کشت برداشته و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (۱۰۰۰۰×g) گردید. سپس رسوب باکتریایی تشکیل‌شده توسط محلول نمکی شستشو داده شده و مجدداً سانتریفوژ انجام شد. در پایان کدورت سلولی با اندازه‌گیری جذب نوری (OD) و سپس سنجش میزان پروتئین کل به روش لاری انجام گرفت. جهت تعیین بهینه مقدار نیتروژن مقادیر مختلفی از NH_4Cl برابر با ۰/۱۵، ۰/۲۰، ۰/۲۵، ۰/۳۰ و ۰/۳۵ گرم در محیط‌های کشت استفاده شد. پس از تعیین مقدار بهینه منبع نیتروژن جهت تعیین مقدار بهینه منبع فسفر مقادیر مختلفی از K_2HPO_4 برابر ۰/۰۱۸، ۰/۰۲٤، ۰/۰۳، ۰/۰۳۶ و ۰/۰٤۲ گرم در محیط‌های کشت استفاده شد (۲٤).

پروتئین سنجی

جهت سنجش میزان پروتئین کل از روش لاری استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۱ cc از محیط کشت برداشته و سانتریفیوژ انجام گردید. سپس با استفاده از NaOH ۰/۳ مولار به مدت ۹۰ دقیقه باکتری‌ها در بن ماری با دمای ۶۰°C لیز شدند. با استفاده از آلبومین سرم گاوی منحنی استاندارد پروتئین رسم و سپس، مقدار پروتئین کل تولیدی، بطور روزانه تعیین شد (۲۵).

وزن سنجی و تعیین میزان تجزیه بخش‌های مختلف نفت خام

جهت تعیین نوع و میزان ترکیبات نفتی تجزیه شده توسط سویه جداسازی شده، ابتدا محیط کشت با استفاده از ۲۰ ml کلروفرم شستشو داده شد و این مرحله ۳ مرتبه تکرار گردید. سپس بخش حل شده در کلروفرم تغلیظ (پراندن کلروفرم) و سپس توسط n هگزان به دو بخش تفکیک شد. بخشی که در n هگزان حل شده بود (هیدروکربن‌های اشباع شده، هیدروکربن‌های آروماتیک، و ترکیبات رزینی) و بخش غیر محلول در آن (آسفالتن). پس از گذراندن n هگزان از فیلتر و سپس پراندن آن، میزان آسفالتن موجود وزن و محاسبه گردید. سپس بخش محلول در n هگزان با پراندن حلال تغلیظ و در ۲۰۰ml کلروفرم به همراه ۷ گرم سیلیکاژل محلول گردید. سپس کلروفرم پرانده و با استفاده از سیلیکاژل باقی مانده ستون کروماتوگرافی پر گردید. ستون حاصل به ترتیب با سیکلو هگزان، بنزن و متانول شسته شد (سه مرتبه و هر بار با حجم ۲۰ ml). بخشهای استخراج شده بوسیله حلال‌های سیکلوهگزان، بنزن و متانول به ترتیب بخش‌های هیدروکربنهای اشباع شده، هیدروکربن‌های آروماتیک و رزینی را شامل

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

می‌شدند. کنترل بدون باکتری نیز جهت سنجش وزن اجزای مختلف نفت خام انجام گرفت. کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد (۲۶).

آنالیز کمی‌میزان تجزیه زیستی ترکیبات شاخص نفت خام

به منظور بررسی توانایی سویه مورد نظر در تجزیه اجزای مختلف نفت خام، مخلوطی از ترکیبات مهم نفت شامل هیدروکربن‌های آروماتیک، آلیفاتیک و گوگرد دار به صورت استوک غلیظ تهیه شد. این استوک حاوی: ۵۰۰ mg نفتالن، ۱۰۰ mg پیرن، ۱۰۰ mg فنانترن و ۲۵ mg دی بنزوتیوفن حل شده در ۵ml میلی لیتر هگزادکان بود. ارلن‌های شیاردار ۲۵۰ ml میلی لیتری حاوی ۱۰۰ ml میلی لیتر محیط MSM تهیه شد و ۱ ml میلی لیتر از استوک تهیه شده به عنوان تنها منبع کربن و انرژی به همه ارلن‌ها اضافه شد. این آزمایش در ۵ تکرار انجام شد. همچنین ۵ ارلن شاهد بدون تلقیح باکتری با همان غلظت در نظر گرفته شد تا اثر سایر عوامل از حذف زیستی متمایز شود.

استخراج و سنجش میزان تجزیه ترکیات ترکیبات شاخص نفت خام در محیط‌های کشت مایع

جهت استخراج ترکیبات نفتی از محیط‌های کشت ۲۵ml اتیل استات به هر ارلن اضافه و سپس ارلن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده شدند. سپس فاز محلول در اتیل استات جدا شده و فاز آبی مجدد با ۲۵ml اتیل استات جدید مخلوط و استخراج انجام شد. سپس استخراج‌های انجام شده با هم یکی شده، مقادیر کم آب باقی مانده با استفاده از اضافه کردن سولفات سدیم حذف و حجم نهایی استخراج بر روی ۵۰ml تنظیم گردید (۲۷). یک میلی لیتر از استخراج انجام شده به بطری‌های ۱/۵ ml تیره منتقل و تا زمان انجام آنالیز در فریزر نگه‌داری شدند. جهت سنجش مقادیر باقی مانده ترکیبات مختلف (هگزادکان، دی بنزوتیوفن، نفتالین، فنانترن و پیرن) در محیط‌های کشت از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 7890A مجهز به آشکارساز FID و ستون HP-5MS مویین[1] به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و ۰/۲۵ ضخامت لایه داخلی استفاده شد. از گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل استفاده و دمای محفظه تزریق و دمای آشکارساز به ترتیب بر روی ۲۸۰°C و ۳۰۰°C تنظیم گردید. دمای آون به صورت زیر بود: ۸۰°C به مدت ۲ دقیقه و سپس با سرعت ۱۰°C در دقیقه، دما به ۱۲۰°C رسید. سپس دما با سرعت ٤°C در دقیقه به ۳۰۰°C رسید و در همین دما به مدت ۱۵ دقیقه نگه داشته شد (۲۸).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت مقایسه تاثیر غلظت منبع NH_4Cl و K_2HPO_4 بر میزان OD محیط کشت و همچنین غلظت پروتئین از آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه[2] استفاده شد. کلیه آنالیزها توسط نرم افزار SPSS-16 انجام شدند.

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی سویه‌های جداسازی شده

پس از انجام غربال‌سازی باکتری‌ها در محیط پایه معدنی حاوی نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی، سویه BN_2 به عنوان سویه برتر در تجزیه ترکیبات نفتی انتخاب و برای ادامه آزمایشات در نظر گرفته شد. نتایج خصوصیات میکروسکوپی و تستهای بیوشیمیایی نشان داد، BN_2 یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، با کلنی ریز و محدب، فاقد اسپور، اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، دارای قابلیت احیای نیترات به نیتریت، ژلاتیناز مثبت، هیدرولیز نشاسته منفی و اوره آز منفی بود. تعیین توالی ژن ۱۶SrDNA و آنالیز همولوژی این ژن با استفاده از نرم افزار Blast، به میزان ۰/۹۹ به گونه *Pseudomonas aeruginosa* شباهت نشان داد.

[1] Agilent
[2] One-Way ANOVA

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

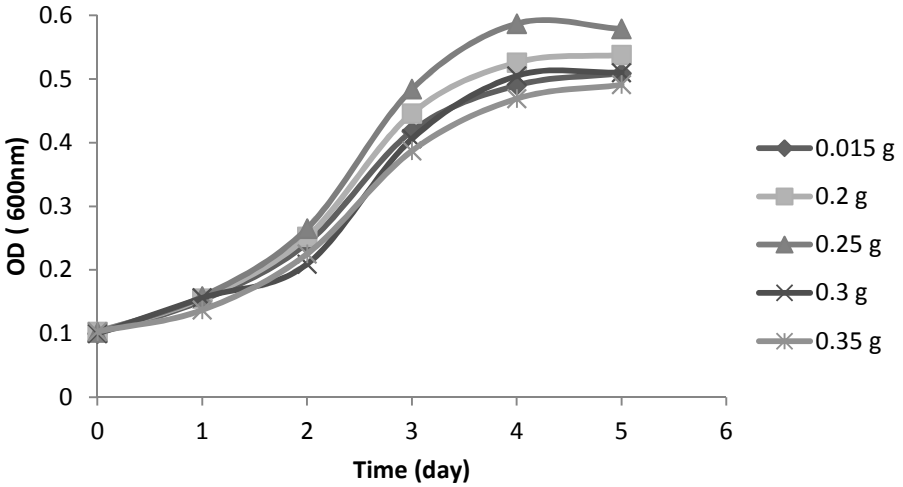
اثر غلظت منبع نیتروژن (NH_4Cl) بر رشد باکتری

نتایج نشان داد غلظت‌های مختلف منبع نیتروژن در روز دوم آزمایش تاثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بر میزان پروتئین اندازه‌گیری‌شده داشتند، در حالی که اثر معنی‌دار غلظت‌های مختلف نیتروژن بر میزان رشد (OD) در روز سوم آزمایش مشاهده گردید (جدول۱).

جدول ۱. تاثیر غلظت های مختلف NH_4Cl و K_2HPO_4 بر میزان رشد و تولید پروتئین در روزهای مختلف.

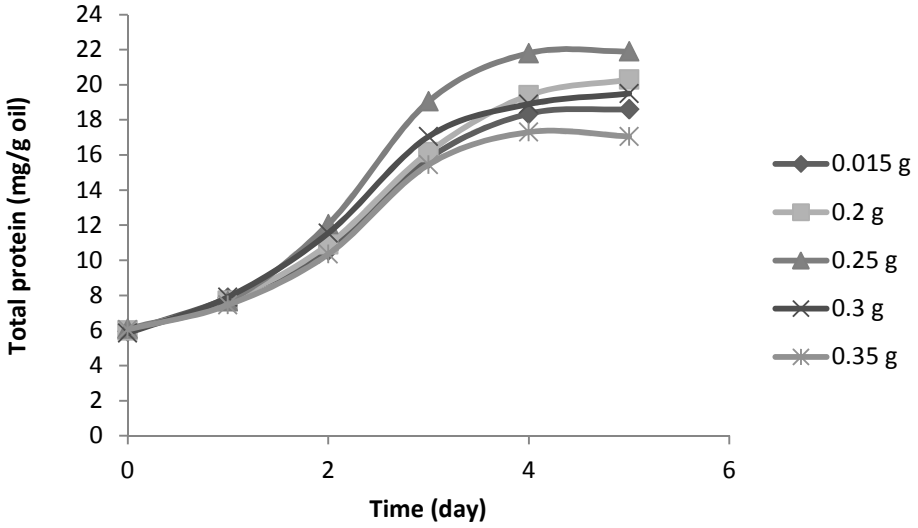
زمان (روز)	تعین غلظت بهینه NH_4Cl				تعین غلظت بهینه K_2HPO			
	Protein Concentration		Optical Density		Protein Concentration		Optical Density	
	p- value	F	p- value	F	p- value	F	p- value	F
۰	۰/۴۰۳	۱/۲۳۳	۰/۹۴۵	۰/۱۶۹	۰/۵۶۰	۰/۸۲۹	۰/۴۷۲	۱/۰۳۵
۱	۰/۶۵۶	۰/۶۴۱	۰/۲۱۳	۲/۱۴۰	۰/۲۹۹	۱/۶۳۳	۰/۴۹۴	۰/۹۸۰
۲	۰/۰۲۰	۸/۳۲۰	۰/۱۵۰	۲/۷۳۵	۰/۰۴۶	۵/۴۴۷	۰/۰۰۶	۱۳/۸۷۴
۳	۰/۰۰۱	۲۹/۵۰۴	۰/۰۰۰	۵۶/۲۳۸	۰/۰۰۵	۱۴/۹۹۰	۰/۰۰۰	۵۴/۰۳۴
۴	۰/۰۰۰	۵۱/۸۹۸	۰/۰۰۰	۸۹/۳۱۱	۰/۰۰۰	۹۷/۷۶۹	۰/۰۰۰	۱۱۵/۳۰۶
۵	۰/۰۰۰	۶۴/۶۶۵	۰/۰۰۰	۸۸/۰۸۲	۰/۰۰۰	۸۰/۳۵۵	۰/۰۰۰	۶۹/۸۳۴

باکتری در تمام مقادیر نیتروژن مورد آزمایش قادر به رشد و تجزیه نمودن نفت خام بود، اما میزان رشد و تولید پروتئین در مقادیر مختلف متفاوت بوده است. در مقدار ۰/۲۵ گرم NH_4Cl باکتری نسبت به سایر مقادیر رشد بیشتری داشت و همچنین میزان پروتئین تولیدی بیشتر بود. حداقل مقدار بهینه نیتروژن برای مصرف یک گرم نفت خام توسط باکتری معادل ۰/۲۵ گرم NH_4Cl در نظر گرفته شد (نمودار ۱ و ۲).



نمودار ۱. بررسی اثر غلظتهای مختلف منبع نیتروژن (NH_4Cl) بر رشد سویه BN_2 در تجزیه زیستی نفت خام با بررسی کدورت ایجاد شده طی ۵ روز

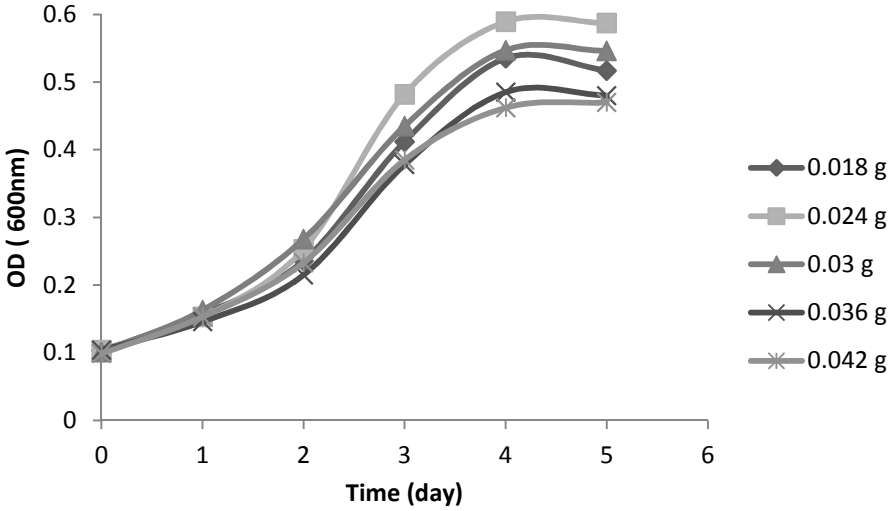
Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018



نمودار ۲. تاثیر غلظت‌های مختلف منبع نیتروژن (NH_4Cl) بر رشد سویه BN_2 در تجزیه زیستی نفت خام با بررسی مقدار پروتئین کل تولید شده طی ۵ روز

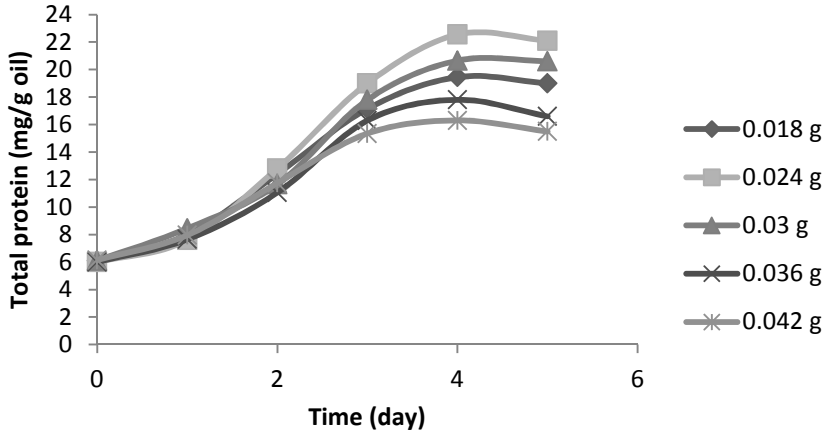
اثر غلظت منبع فسفر (K_2HPO_4) بر رشد باکتری

نتایج نشان داد غلظت‌های مختلف منبع فسفر در روز دوم آزمایش تاثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بر میزان رشد (OD) و پروتئین اندازه‌گیری‌شده داشتند (جدول ۱). باکتری در تمام مقادیر فسفر مورد آزمایش قادر به رشد و تجزیه نمودن نفت خام بود، اما میزان رشد و تولید پروتئین در مقادیر مختلف متفاوت بوده است. در مقدار ۰/۰۲٤ گرم K_2HPO_4 باکتری نسبت به سایر مقادیر رشد بیشتری داشت و همچنین میزان پروتئین تولیدی بیشتر بود. حداقل مقدار بهینه فسفر برای مصرف یک گرم نفت خام توسط باکتری معادل ۰/۰۲٤ گرم K_2HPO_4 در نظر گرفته شد (نمودار ۳ و ٤).



نمودار ۳. بررسی اثر غلظتهای مختلف منبع فسفر (K_2HPO_4) بر رشد سویه BN_2 در تجزیه زیستی نفت خام با بررسی کدورت ایجاد شده طی ۵ روز

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018



نمودار ٤. بررسی اثر غلظت‌های مختلف منبع فسفر (K_2HPO_4) بر رشد سویه BN_2 در تجزیه زیستی نفت خام با بررسی مقدار پروتئین کل تولیدشده طی ۵ روز

میزان تجزیه بخش‌های مختلف نفت توسط باکتری

نتایج نشان داد میزان اجزای مختلف نفت خام مورد استفاده شامل بخش اشباع شده ٦١/٤٤، بخش آروماتیک ٢٢/١٦، بخش رزینی ٥/٢٣ و بخش آسفالتن ١١/١٧ درصد می‌باشد. پس از ۵ روز رشد باکتری مقادیر باقیمانده این اجزاء به ترتیب به ٦/٠٧، ٧/١٠، ٤/٠٤ و ٢/٦٤ درصد رسید. سویه مذکور طی این دوره ۵ روزه رشد، ٨٠/١٥ درصد از نفت خام را به مصرف رساند و تقریبا همه بخش‌های نفت به طور قابل توجهی تجزیه شدند (جدول ٢).

جدول ٢. درصد اجزای تشکیل دهنده نفت خام و مقادیر باقیمانده هر جزء پس از رشد ۵ روزه باکتری

	اجزای نفت خام(%)	مقادیر باقیمانده(%)
مقدار کل	١٠٠	١٩/٨٥
اشباع شده	٦١/٤٤	٦/٠٧
آروماتیک	٢٢/١٦	٧/١٠
رزین	٥/٢٣	٤/٠٤
آسفالتن	١١/١٧	٢/٦٤

میزان کمی تجزیه زیستی ترکیبات شاخص نفت خام

نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی در بررسی کاهش بیولوژیک ترکیبات شاخص نفت خام به صورت درصد در جدول ٢ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین درصد حذف زیستی مربوط به نفتالین با ٩٨/٠١ درصد می‌باشد و پس از آن به ترتیب هگزادکان ٩٥/١٧ درصد و دی بنزوتیوفن ٤٨/٢٩ درصد توسط باکتری از محیط حذف شدند. همچنین مشاهده شد که توانایی باکتری در حذف فنانترن و پیرن جزئی بود (جدول ٣).

جدول ٣. درصد کاهش بیولوژیکی ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک

نوع ترکیب هیدروکربنی	درصد کاهش بیولوژیکی
هگزادکان	٩٥/١٧
نفتالن	٩٨/٠١
دی بنزوتیوفن	٤٨/٢٩
فنانترن	جزئی
پیرن	جزئی

بحث

میکروارگانیسم‌هایی که در نواحی آلوده به مواد نفتی یافت می‌شوند اغلب دارای توانایی تجزیه ترکیبات هیدروکربنی می‌باشند. در این مطالعه نیز سویه BN_2 با توانایی تجزیه زیستی نفت خام از خاک‌های آلوده به نفت منطقه اروند کنار جداسازی گردید. نتایج مطالعات مولکولی نشان داد سویهBN_2 شباهت بالایی به *Pseudomonas aeruginosa* دارد. تا کنون مطالعات مختلفی در زمینه تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه‌های خالص (٢٩) و یا مخلوط باکتری‌ها صورت گرفته است (٣٠). یکی از جنس‌هایی که قابلیت بالایی در تجزیه زیستی نفت خام دارد

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

Pseudomonas sp. است. به عنوان مثال در مطالعه ای که توسط ژانگ[1] و همکاران انجام گرفت از میان ۱۰ سویه جداسازی شده، سویه ای از گونه *P. aeruginosa* به عنوان سویه برتر انتخاب گردید (۳۱). نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نیز نشان داد کارآمد ترین سویه در تجزیه زیستی نفت خام سویه‌ای از گونه *P. aeruginosa* می‌باشد که سویه BN_2 نامیده شد. بیشترین بخش تجزیه شده از اجزای مختلف نفت خام توسط سویه BN_2 بخش آلیفاتیک (۹۱٪) و کمترین بخش مربوط به ترکیبات رزینی (۲۲/۷٪) بود. نتایج مطالعات دیگر محققین نیز نشان داده است بخش اعظم ترکیبات آلیفاتیک نفت خام به آسانی توسط باکتری‌ها تجزیه می‌شود در حالی که ترکیبات چند حلقه ای به دلیل پیچیده گی‌های ساختاری به سختی تجزیه می‌شوند (۳۲)، نتایج ما نیز نتایج این محققین را تائید می‌کند. همچنین نتایج میزان تجزیه زیستی مخلوط ترکیبات خالص (هگزادکان، دی بنزوتیوفن، نفتالین، فنانترن و پیرن) با استفاده از سویه BN_2 نیز نشان داد بخش عمده هگزادکان (۹۵/۱۷) توسط این سویه طی مدت دو هفته تجزیه می‌شود، که نشان دهند کارایی بالای این سویه در تجزیه آلکان‌ها می‌باشد. نکته قابل تامل آن است که سویه BN_2 علاوه بر ترکیبات آلیفاتیک قادر است دیگر بخش‌های تشکیل دهنده نفت خام (حلقوی، رزینی، آسفالتن) را نیز تجزیه کند. در زیست پالایی سویه‌هایی که دارای این توانایی هستند اهمیت ویژه ای دارند (۳۱). زیرا در صورت استفاده این سویه‌ها در زیست پالایی مناطق آلود، باکتری پس از مصرف بخش‌های تجزیه پذیر تر نفت خام، دیگر بخش‌ها را نیز تجزیه کرده و زیست پالایی بهتر انجام می‌شود. تا کنون در زمینه تجزیه زیستی PAHs توسط باکتری‌ها مطالعات گسترده ای در دنیا انجام شده است (۳۳). همچنین سودوموناس‌های زیادی با توانایی تجزیه PAHs شناسایی و مطالعه شده اند. به عنوان مثال *Pseudomonas sp.* NCBI 9816-4 توانایی تجزیه فلورن، دی بنزوتیوفن و دی بنزوفوران (۳٤) و *P. aeruginosa* قادر به تجزیه نفتالین (۳۵) می‌باشند. نتایج مطالعه تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد BN_2 قادر به تجزیه نفتالین و دی بنزوتیوفن می‌باشد. علی رغم آنکه در مطالعه حاضر سویه BN_2 تجزیه زیستی فنانترن و پیرن را نشان نداد، این احتمال وجود دارد که در صورت ادامه زمان آزمایش و در نتیجه اتمام دیگر منابع کربن و همچنین آداپتاسیون باکتری و این ترکیبات (بخصوص فنانترن با توجه به تجزیه پذیری راحت تر) نیز تا حدی تجزیه می‌شدند. به طور کلی تجزیه زیستی PAHs با وزن مولکولی بالا (بیشتر از سه حلقه بنزنی) برای باکتری‌ها دشوار می‌باشد و عمدتا جنس‌های متعلق به اکتینومیست‌ها از قبیل *Mycobacterium sp.* (۳۶) و *Rhodococcus sp.* (۳۷) این ترکیبات را به خوبی تجزیه می‌کنند. اگرچه گزارش‌هایی در مورد تجزیه قابل ملاحظه این ترکیبات توسط برخی از سودوموناس‌ها مانند Pseudomonas strain Jpyr-1 نیز وجود دارد (۳۸). استفاده از میکروارگانیسم‌ها در تصفیه زیستی مناطق آلوده پیچیدگی‌های خاص خود را دارد و جهت افزایش کارایی تجزیه زیستی بهینه سازی شرایط محیطی این فرایند اهمیت شایانی دارد. در مطالعه حاضر غلظت مواد مغذی از روز دوم آزمایش به بعد تاثیر معنی‌داری بر میزان رشد سویه BN_2 نشان دادند. این بدان دلیل است که در تمامی تیمارها از تعداد باکتری یکسان برای شروع آزمایش استفاده گردید، در نتیجه با ادامه آزمایش و آداپتاسیون باکتری‌ها با شرایط محیط کشت، تاثیر غلظت‌های مختلف مواد مغذی خود را نشان و تاثیر آن معنی‌دار گردید. مواد مغذی از قبیل منبع نیتروژن و فسفات از مهمترین عوامل موثر در تجزیه زیستی می‌باشند. تیمار محیط‌های آلوده با منابع نیتروژن غیر آلی منجر به افزایش رشد باکتری‌های، افزایش جمعیت

[1] Zhang

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

باکتریایی و همچنین افزایش میزان تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها می‌شود و در نتیجه راندمان تجزیه زیستی افزایش می‌یابد (۸). نتایج مشابهی نیز در مطالعه حاضر بدست آمده است. بوچز[1] و همکاران بیان کردند نسبت مولی نیتروژن/ فسفر ، ۱۰ / ۱ برای تجزیه ترکیبات نفتی بهینه می‌باشد (۳۹). لیز[2] و همکاران نیز نشان دادند نسبت مولی ۱۰ / ۱ منجر به تجزیه زیستی کارآمد فلورن توسط چندین گونه از سویه‌های *Sphingomonas sp.* می‌شود (٤٠). در این مطالعه نیز حداقل مقدار بهینه نیتروژن و فسفات برای تجزیه یک گرم نفت خام به ترتیب معادل ۰/۲۵ گرم NH_4Cl و ۰/۰۲٤ گرم K_2HPO_4 بود. نکته قابل توجه این است که با توجه به آنکه سویه‌های مختلف تحت شرایط مختلف محیطی مطالعه شده اند، انجام مقایسه میان مقادیر بهینه منابع مغذی بین سویه‌های مختلف دشوار است.

[1] Bouchez
[2] Leys

نتیجه‌گیری

رسوبات منطقه اروند کنار داری توانایی تجزیه نفت خام می‌باشند. کارامدترین سویه جدا سازی شده (BN_2) در این مطالعه سویه ای جدید از گونه *P. aeruginosa*. *با توجه به آنکه سویه* BN_2 قادر است در مدت زمان کوتاهی از تمامی‌بخش‌های نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کند، این ویژگی این سویه را انتخابی مناسب برای زیست پالایی منطقه آلوده شده به نفت خام می‌کند. همچنین با توجه به قابلیت این سویه در تجزیه ترکیبات PAHs سبک می‌تواند جهت زیست پالایی این مواد نیز بکار رود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه می‌باشد که در ٤/ ۹۲ در دانشگاه شهید بهشتی تصویب و با حمایت مالی دانشکده علوم زیستی انجام شد که نویسندگان بدین وسیله مراتب سپاس خود را اعلام می‌دارند.

References

1- Marchut-Mikolajczyk O, Kwapisz E, Wieczorek D, Antczak T. Biodegradation of diesel oil hydrocarbons enhanced with *Mucor circinelloides* enzyme preparation. International Biodeterioration and Biodegradation. 2015;104:142-148.

2- Wu M, Chen L, Tian Y, Ding Y, Dick WA. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. Environmental Pollution. 2013;178:152-158.

3- Perra G, Pozo K, Guerranti C, Lazzeri D, Volpi V, Corsolini S, Focardi S. Levels and spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in superficial sediment from 15 Italian marine protected areas (MPA). Marine Pollutions Bulletin. 2011;62(4):874-877.

4- Di Gennaro P, Franzetti A, Bestetti G, Lasagni M, Pitea D, Collina E. Slurry phase bioremediation of PAHs in industrial landfill samples at laboratory scale. Waste Management. 2008;28(8):1338-45.

5- Zhao HP, Wu QS, Wang L, Zhao XT, Gao HW. Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China. Journal of Hazardous Materials. 2009;164(2):863-9.

6- Binazadeh M, Karimi IA, Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. Enzyme and Microbial Technology. 2009;45(3):195-202.

7- Kaczorek E, Smułek W, Zgoła-Grześkowiak A, Bielicka-Daszkiewicz K, Olszanowski A. Effect of Glucopon 215 on cell surface properties of *Pseudomonas stutzeri* and diesel oil biodegradation. International Biodeterioration & Biodegradation. 2015;104:129-135.

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

8- Shahriari Moghadam M, Ebrahimipour G, Abtahi B, Khazaei N, Karbasi N. Statistical optimization of crude oil biodegradation by *Marinobacter* sp. isolated from Qeshm Island, Iran. Iranian Journal of Biotechnology. 2014;12(1):35-41.

9- Razak CNA, Wang WF, Rahman SHSA, Basri, M, Salleh AB. Isolation of the crude oil degrading marine *Acinetobacter* sp. E11. Acta biotechnological. 1999;19(3):213-223.

10- Barathi S, Vasudevan N. Bioremediation of crude oil contaminated soil by bioaugmentation of *Pseudomonas fluorescens* NS1. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 2003;38(9):1857-1866.

11- Binazadeh M, Karimi IA, Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. Enzyme and Microbial Technology. 2009;45(3):195-202.

12- Al-Mailem DM, Sorkhoh NA, Al-Awadhi H, Eliyas M, Radwan SS. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. Extremophiles. 2010;14(3):321-328.

13- Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource technology. 2011;102(2):772-778.

14-Reis I, Almeida CMR, Magalhães CM, Cochofel J, Guedes P, Basto MCP, et al. Bioremediation potential of microorganisms from a sandy beach affected by a major oil spill. Environmental Science and Pollution Research. 2014;21(5):3634-45.

15- Safahiyeh A, Mojoudi F, Zolgharnein H. Evaluation and comparison of the ability of indigenous Pseudomonas bacteria from Musa creek to remove poly aromatic compounds. Journal of environmental studies. 2011;58(3):149-158. [In Persin]

16- Ebrahimi M, Fallah AR, Sarikhani MR. Isolation and identification of oil-degrading bacteria from oil-polluted soils and assessment of their growth in the presence of gas oil. Water and soil science. 2013;23(1):109-121. [In Persin]

17- Shahaliyan F, Safahieh A, Salamat N, Mojodi F, Zaredoost M. Investigating the role of isolated bacteria from sediment of Persian Gulf in biodegradation of oil pollutants (anthracene). Science and environmental engineering. 2014;1(4):11-17. [In Persin]

18- Abolhasani A, Ebrahimipour G. Effect of mineral nitrogen and phosphate concentration on oil degradation by two bacterial isolates from Persian Gulf sediments. Environmental science. 2008;5(4):145-150. [In Persin]

19- Ebrahimpour G, Fooladi J, Ferdousi A. Study of effects of environmental factors on biodegradation of crude oil, by Pars Q2, an extreme halophilic archea bacterium and gravimetric determination of used crude oil by this bacterium under optimal conditions. Environmental science. 2006;10:59-70. [In Persin]

20- Shahriari Mogadam M, Ebrahimipour G, Abtahi B, Ghassempour A, Isolation and identification a naphthalene degrading bacteria from Nayband Bay and optimizing the biodegradation conditions. Journal of Animal Environment. 2014; 4: 69-78. [In Persin]

21- Doustaky M, Ebrahimi S, Movahedi Naeini SAR, Olamaei M. Optimization of petroleum hydrocarbon biodegradation by indigenous and non indigenous microorganisms. Journal of Water and Soil Conservation. 2013;20(4);165-181.

22- Schlegel H, Kaltwasser H, Gottschalk G. Ein submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: wachstumsphysiologische Untersuchungen. Archiv für Mikrobiologie. 1961;38(3):209-22.

23- Ebrahimipour G, Khosravi Z, Sharifi Z, Aliahmadi A, Sadeghi H. Isolation and identification of antimicrobial agent producing bacterium from frog skin and evaluation of its antimicrobial activities. Journal of Microbial Biotecnology. 2011;3(9):35-43.

24- Ebrahimipour G, Aminian M, Abolhasani Soorki A. Isolation of a Petroleum-degrading halotolerant bacterium and study the effects of environmental factors in biodegrading for environmental protection. Environmental Sciences. 2005;8:65 -74.

25- Süssmuth R, Eberspächer J, Haag R, Springer W. Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum. 1987.

Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir at 2:39 IRST on Sunday February 18th 2018

26- Thouand G, Bauda P, Oudot J, Kirsch G, Sutton C, Vidalie J. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. Canadian journal of microbiology. 1999;45(2):106-15.
27- Wu YR, Luo ZH, Vrijmoed L. Biodegradation of anthracene and benz [a] anthracene by two *Fusarium solani* strains isolated from mangrove sediments. Bioresource technology. 2010;101(24):9666-72.
28- Chen J, Wong M, Wong YS, Tam NF. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. Marine Pollution Bulletin. 2008;57(6):695-702.
29- Ferradji FZ, Mnif S, Badis A, Rebbani S, Fodil D, Eddouaouda K, Sayadi S. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). International Biodeterioration & Biodegradation. 2014;86:300-308.
30- Rahman KSM, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource technology. 2002;85(3):257-261.
31- Zhang Z, Hou Z, Yang C, Ma C, Tao F, Xu P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. Bioresource Technology. 2011;102(5):4111-4116.
32- Pasumarthi, R, Chandrasekaran, S, Mutnuri S. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. Marine pollution bulletin. 2013;76(1):276-282.
33- Colombo M, Cavalca L, Bernasconi S, Andreoni V. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenolicum* strain C3R: a feasibility study in solid-and slurry-phase microcosms. International Biodeterioration & Biodegradation. 2011;65(1):191-197.
34- Resnick SM, Gibson DT. Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816-4. Appl. Environ. Microbiol. 1996;62(11):4073-4080.
35- Karimi B, Habibi M, Esvand M. Biodegradation of naphthalene using *Pseudomonas aeruginosa* by up flow anoxic–aerobic continuous flow combined bioreactor. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 2015;13(1):26.
36- Vila J, Lopez Z, Sabate J, Minguillon C, Solanas AM, Grifoll M. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 2001;67(12):5497-505.
37- Song X, Xu Y, Li G, Zhang Y, Huang T, Hu Z. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. Marine pollution bulletin. 2011;62(10):2122-2128.
38- Ghosh I, Jasmine J, Mukherji S. Biodegradation of pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain RS1 isolated from refinery sludge. Bioresource technology. 2014;166: 548-558.
39- Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele JP. The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: Carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. Applied Microbiology and Biotechnology.1996;45(4):556-561.
40- Leys NM, Bastiaens L, Verstraete W, Springael D. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 2005;66(6):726-736.