

## Investigation of the BTEX Biodegradation by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus* sp. Under Nitrate Reducing Conditions

MINA SHAKIBA<sup>1</sup>, TEYMOUR SOHRABI<sup>2\*</sup>, FARHAD MIRZAEI<sup>3</sup>, AHMAD ALI POURBABAIE<sup>4</sup>

1. PhD Student, Irrigation and Reclamation Engineering Department, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
  2. Professor, Irrigation and Reclamation Engineering Department, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
  3. Associate Professor, Irrigation and Reclamation Engineering Department, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
  4. Associate Professor, Soil Sciences Engineering Department, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- (Received: June. 9, 2018- Revised: Oct. 23, 2018- Accepted: Nov. 3, 2018)

### ABSTRACT

Lack of oxygen and high salinity are factors that limit the biodegradation of the hydrocarbon. The electron accepters such as nitrate and salt tolerant bacteria can be used to increase the biodegradation rate in saline environment with low level of oxygen. In this paper, BTEX biodegradation by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus* sp. is investigated in microaerophilic and saline environment under nitrate reducing condition. Firstly, the ability of the above- mentioned bacteria in BTEX biodegradation was confirmed. Then, the effect of Nitrate, BTEX concentration, salinity and cell mass on BTEX degradation was studied using Taguchi method and design expert software. The results of this study showed the ability of the *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus* sp. on BTEX degradation. For 200 mg/L BTEX concentration, the high efficiency of degradation by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus* sp. could be achieved in optimum conditions; Nitrate Concentration (200 mg/L), salinity (1 and 5 %) and cell mass (1 and  $5 \times 10^7$  cell/ml) respectively.

**Key words:** BTEX, biodegradation, Nitrate, Salinity

## بررسی تجزیه زیستی BTEX توسط *Bacillus sp.* و *Bacillus thuringiensis* در شرایط کاهشی نیترات

مینا شکیب<sup>۱</sup>، تیمور سهرابی ملایوسف<sup>۲\*</sup>، فرهاد میرزایی<sup>۳</sup>، احمدعلی پوربابایی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی آبیاری و آبادانی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع

طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استاد، گروه مهندسی آبیاری و آبادانی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،

دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. دانشیار، گروه مهندسی آبیاری و آبادانی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،

دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴. دانشیار، گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه

تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۹ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۸/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۱۲)

### چکیده:

در محیط‌هایی با کمبود اکسیژن و نسبتاً شور تجزیه هیدروکربن‌های نفتی به سختی صورت می‌گیرد که با استفاده از پذیرنده‌های الکترون مانند نیترات و کاربرد باکتری‌های تجزیه‌گر و قادر به رشد در محیط‌های شور، سعی در افزایش تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی تجزیه زیستی BTEX با استفاده از *Bacillus sp.* و *Bacillus thuringiensis* تحت شرایط کاهشی نیترات در محیط آئروفیلیک و شور انجام شد. در ابتدا توانایی باکتری‌های فوق در تجزیه زیستی BTEX مورد تأیید قرار گرفت. سپس با استفاده از مدل تاگوچی و نرم‌افزار Design Expert تجزیه BTEX در شرایط محیطی مختلف با تغییر در عواملی مانند غلظت اولیه نیترات (۵۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، BTEX (۲۰۰-۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، شوری (۹/۵-۰/۵ درصد) و جمعیت سلولی ( $5 \times 10^7$  - سلول در میلی‌لیتر) بررسی شد. نتایج حاصل از تحقیق توانایی *Bacillus sp.* و *Bacillus thuringiensis* را در تجزیه زیستی BTEX نشان داد و شرایط بهینه را به منظور حداکثر تجزیه زیستی BTEX برای این دو باکتری به ترتیب در غلظت اولیه BTEX برابر ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت اولیه نیترات ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، شوری ۵ و ۹/۵ درصد و جمعیت سلولی  $5 \times 10^7$  گزارش نمود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه زیستی، BTEX، نیترات، شوری

### مقدمه

و از طریق مدیریت ضعیف در دفع و حذف آن، این آلاینده وارد محیط زیست شده و باعث ایجاد مشکلات جدی از نظر آلودگی می‌گردد. افزایش قابل توجه بار آلودگی و تخریب منابع حیاتی در اثر فعالیت‌های بشر، نیاز به مدیریت و اعمال روش‌هایی برای کاهش آلودگی را بیش از پیش ضروری ساخته است. تجزیه زیستی با استفاده از ریزجانداران به صورت یک روش مقرون به صرفه با کارایی بالا جهت حذف ترکیبات نفتی شامل BTEX به اثبات رسیده است (Atlas and Bartha, 1972).

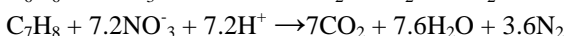
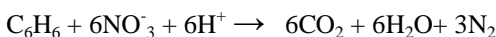
شرایط محیطی مانند شوری و مقدار در دسترس بودن اکسیژن از عوامل کنترل کننده شدت تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی می‌باشند. از آنجایی که فرآیندهای معمول میکروبی در مناطقی با شوری بالا به خوبی انجام نمی‌شود، تجزیه زیستی در این محیط‌ها تنها با استفاده از میکروارگانیسم‌های مقاوم به

ترکیبات نفتی از جمله رایج‌ترین نوع آلودگی در زیست‌بوم‌های خشکی و آبی بخصوص در مناطق نفت‌خیز می‌باشند که تهدید جدی برای اکوسیستم به شمار می‌آیند. در این میان می‌توان به BTEX که فراوان‌ترین ترکیب هیدروکربنی در آب‌های آلوده به مواد نفتی است اشاره نمود. این آلاینده شامل بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و ایزومرهای زایلن با سمیت بالا و دارای پتانسیل جهش‌زایی و سرطان‌زایی است (Fathepure, 2014). این ترکیب تک حلقه‌ای به عنوان فراوان‌ترین هیدروکربن در آب تولیدی می‌باشد (Neff, 1979). BTEX علاوه بر مصارف صنعتی در تولید بسیاری از محصولات خانگی و کشاورزی نیز کاربرد داشته

\* نویسنده مسئول: myousef@ut.ac.ir

سمی تبدیل کرده است. (Berlendis *et al.*, 2010) توانایی *Marinobacters* را بر تجزیه BTEX در شوری ۱۵-۳ گزارش نمود. *M. vinifirmus* قادر به تجزیه تمامی بنزن و تولوئن اضافه شده در طول ۳ روز بود درحالی که تجزیه ۶۵٪ از کل اتیل بنزن و ۲۰٪ از تمامی ایزومرهای زایلن در مدت ۷ روز در حضور ۶٪ از NaCl انجام شد (Berlendis *et al.*, 2010). او همچنین گزارش نمود که *M. hydrocarbonoclasticus* ۱۰٪ بنزن، ۲۰٪ از تولوئن، ۶۰٪ از اتیل بنزن و ۷۰٪ از ایزومرهای زایلن را در ۷ روز در شوری ۶٪ تجزیه می کند. (Al-Mailem *et al.*, 2013) به جداسازی *Marinobacter sedimentalis* و *Marinobacter falviformis* بر پایه توانایی آن‌ها در مصرف نرمال پارافین‌ها (n-alkanes و ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای پرداختند. این باکتری‌ها قادر به تجزیه بنزن در حضور ۶٪ از NaCl بودند. (Hassan *et al.*, 2012) نشان دادند که *Alcanivorax sp. HA03* قادر به تجزیه بنزن و تولوئن و کلرو بنزن در شوری‌های ۳ تا ۵٪ می باشد.

علاوه بر مساله شوری، کمبود اکسیژن نیز از عوامل محدود کننده‌ای است که در تجزیه زیستی BTEX باید مورد توجه قرار گیرد. هنگامی که خاک و آب زیرزمینی توسط آلاینده BTEX آلوده می شود غالباً آلودگی در منطقه بی‌هوای در محیط زیست گسترش می یابد. بنابراین اگرچه تجزیه زیستی هوای BTEX نسبت به شرایط بی‌هوای سریع تر می باشد (Maxwell & Baqai, 1995)، اما تجزیه زیستی بی‌هوای نقش مهم تری را در حذف آلودگی‌های زیستی ایفا می کند. تجزیه بی هوای BTEX برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ گزارش شد (Kuhn *et al.*, 1985)، سپس تحقیقات گسترده‌ای برای پیدا کردن باکتری قادر به تجزیه بی‌هوای BTEX، شرایط مناسب برای تجزیه و استفاده از شیوه‌های مهندسی به منظور افزایش تجزیه زیستی BTEX انجام شد (Heider *et al.*, 1999; Spormann and Widdel, 2000; Widdel and Rabus, 2001; Chakraborty and Coates, 2004; Foght, 2008; Fuchs, 2008; Carmona *et al.*, 2009) به‌طور معمول در روش‌های مهندسی با استفاده از پذیرنده‌های الکترون، شدت تجزیه زیستی در شرایط میکروآتروفیلیک و بی‌هوای را افزایش می دهند. تحقیقات انجام شده کاربرد نیترات را در افزایش تجزیه زیستی BTEX به دلیل پتانسیل بالای واکنش اکسایشی و کاهش آن نشان داده است. طبق واکنش زیر BTEX در حضور نیترات تجزیه و دی‌اکسید کربن و گاز نیتروژن تولید می شود.



شوری امکان پذیر است. علی‌رغم پژوهش‌های گسترده در زمینه شناسایی میکروارگانیسم‌های قادر به تجزیه BTEX، اطلاعات در زمینه میکروارگانیسم‌هایی که تجزیه زیستی BTEX را در محیط شور انجام دهند، بسیار اندک است. به‌علاوه تحقیقات انجام شده تاکنون، بیشتر بررسی تجزیه BTEX توسط کشت غنی‌سازی شده را نشان می دهد و این در حالی است که تحقیقات در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌های قادر به تجزیه BTEX، محدود به گزارش چند باکتری مانند پلانوکوکوس<sup>۱</sup> سویه ZD22، آرهدوموناس<sup>۲</sup> سویه Seminole، آرهدوموناس سویه Rozel، هالوکوکوس<sup>۳</sup>، هالوفراکس<sup>۴</sup>، هالوباکتریوم<sup>۵</sup> می باشد (Abed *et al.*, 2006; Newell *et al.*, 1996; Borden and Bedient, 1986; Azetsu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2006; Al-Mailem *et al.*, 2013). تأثیر شوری بر تجزیه هیدروکربن‌ها به محدوده تغییرات شوری و به شوری محیط میکروارگانیسم‌ها بستگی دارد. برخی از تحقیقات انجام شده در محیط‌های بسیار شور تأثیر منفی افزایش شوری را بر تجزیه هیدروکربن‌ها نشان داده‌اند (Fathepure, 2014) و این در حالی است که گزارش‌های حاکی از مطالعات دیگر نتایج متناقض را نشان می دهند (Minai-Tehrani *et al.*, 2009).

(Nicholson & Fathepure, 2004, 2005) تجزیه زیستی BTEX را توسط نمونه خاک آلوده به مواد نفتی و غیر آلوده در شوری بالا در اکلاهما ارزیابی کردند. کشت غنی‌شده از خاک آلوده، ترکیب BTEX را در محیط شور به میزان ۱۴/۵-۳ درصد تجزیه نمود، درحالی که کشت غنی‌شده از خاک آلوده و شور قادر به تجزیه بنزن و تولوئن در شوری بیشتر برابر ۲۳-۰ درصد بود. (Sei and Fathepure, 2009) محیط کشتی غنی‌شده از نمونه خاک‌های ایالت یوتا تهیه و توانایی آن را در تجزیه BTEX مورد ارزیابی قرار دادند. کشت حاصل به طور کامل بنزن و تولوئن را در طی ۱، ۲ و ۵ هفته در حضور ۱۴، ۲۳ و ۲۹ درصد از NaCl تجزیه نمود. در ادامه تحقیقات (Li *et al.*, 2006) سویه *Planococcus sp. ZD22* را از نمونه خاک آلوده در چین جداسازی و قابلیت آن را بر تجزیه BTEX در خاک شور ۲۵-۰٪ گزارش نمودند. این نوع سویه علاوه بر قابلیت تجزیه کلروبنزن، بروموبنزن، یدوبنزن و فلوروبنزن توانایی رشد در شرایط سخت از نظر درجه حرارت پایین و شوری بالا و pH بازی را دارد که آن را به یک گزینه مناسب برای تجزیه مواد

1. *Planococcus*
2. *Arhodomonas*
3. *Halococcus*
4. *Haloferrax*
5. *Halobacterium*

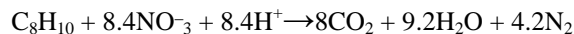
زمانی مقرون به صرفه نمی‌باشد، طرح تاگوجی به صورت روشی مناسب و کارآمد برای تعیین شرایط بهینه و با نزدیک‌ترین نتایج به روش Full Factorial از جمله روش‌هایی است که در سال‌های اخیر به طور گسترده در مطالعات میکروبیولوژی مورد استفاده قرار گرفته است (Wang et al., 2017).

هدف از این مطالعه بررسی تجزیه زیستی BTEX با وجود نیترات در شرایط نامساعد محیطی از نظر شوری و کمبود مقدار اکسیژن به طور همزمان می‌باشد. در مرحله اول توانایی باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* در تجزیه زیستی BTEX در شرایط میکروآئروفیلیک مورد بررسی قرار گرفت و به اندازه‌گیری مقدار نیترات مصرفی به منظور تأیید کاهش مقدار نیترات در نتیجه تجزیه زیستی BTEX پرداخته شد. سپس با استفاده از مدل تاگوجی و نرم‌افزار Design Expert تأثیر عامل‌های مختلف شامل غلظت نیترات، غلظت BTEX، شوری و جمعیت سلولی بر شدت تجزیه BTEX با شاخص مقدار نیترات مصرف شده بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### بررسی توانایی *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* در تجزیه زیستی BTEX

در این مرحله توانایی باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* در تجزیه BTEX در شرایط میکروآئروفیلیک توسط سنجش مقدار BTEX مصرفی مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور در ۳ بطری ۵۰ میلی‌لیتری با درپوش آلومینیومی، ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت شامل نمک‌های معدنی مطابق جدول (۱) تهیه شد (Shim et al., 2005). بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن از شرکت مرک تهیه و از هر جز به مقدار ۲/۳ میکرولیتر با استفاده از میکروسرنج به بطری‌ها تزریق شد تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای هر جز) حاصل شود. یک نمونه شاهد نیز حاوی محیط کشت معدنی و آلاینده BTEX بدون تلقیح باکتری‌ها تهیه شد. به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری، یک لوپ از باکتری مورد بررسی موجود در پلیت حاوی محیط کشت جامد، بر محیط کشت نوترینت براث در ارلن مایر تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس در محیط تریک بر روی شیکر قرار داده شد. بعد از رقیق سازی بر طبق جدول مک فارلند، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر یک از باکتری‌های رشد یافته جدا و به محیط کشت مایع تلقیح تا غلظت  $1 \times 10^7$  (سلول در هر میلی‌لیتر) به دست آید و در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس در محیط تریک به صورت ثابت نگهداری و بعد از گذشت ۲۰ روز غلظت BTEX باقیمانده اندازه‌گیری شد.



(2002) Da Silva et al. در تحقیقات خود تأثیر افزودن

سولفات، آهن چنگالیده و نیترات را در شرایط بی‌هوازی بر سرعت تجزیه BTEX ارزیابی نمودند. آن‌ها اضافه کردن گیرنده‌های الکترون را سبب افزایش تجزیه BTEX با افزایش سرعت تجزیه بی‌هوازی BTEX و همچنین سرعت بخشیدن به معدنی شدن اتانول گزارش کردند. تجزیه سریع اتانول در نزدیکی ورودی سبب تخلیه اکسیژن محلول و تحریک شرایط متاژنیک و کاهش کارایی تجزیه BTEX از بیش از ۹۹ درصد در غیاب اتانول تا متوسط ۳۲٪ برای بنزن، ۴۹٪ برای تولوئن، ۷۷٪ برای اتیل بنزن و ۳۰٪ برای زایلن شده است.

(2008) Dou et al. با افزودن غلظت‌های مختلف BTEX

به بررسی پتانسیل تجزیه بی‌هوازی توسط تقویت زیستی با کنسرسیوم سازگار شده با BTEX تحت شرایط کاهشی نیترات پرداختند. سرعت تجزیه با افزایش غلظت BTEX افزایش و به بیشترین مقدار در غلظت ۱۰۰ mg/kg of soil رسید. سپس افزایش غلظت BTEX به دلیل افزایش مقدار سمیت آن برای کشت غنی شده سبب کاهش تجزیه آن شد. (2008) Dou et al. همچنین کاهش غلظت نیترات را در طی فرآیند تجزیه زیستی BTEX نشان دادند که با افزایش مقدار تجزیه زیستی BTEX غلظت نیترات کاهش یافت.

(2015) Corseuil et al. تأثیر افزایش ظرفیت

پذیرنده‌های الکترون را با اضافه کردن نیترات به منظور سرعت بخشیدن به حذف اتانول و از بین بردن اثر بازدارنده آن بر حذف BTEX بررسی کردند. زمان حذف اتانول در مکان‌هایی که نیترات افزوده شده بود (در حدود ۱/۴ سال) و سریع‌تر از شرایط با تجزیه زیستی طبیعی (۳ سال) بود که منجر به تجزیه سریع‌تر BTEX شد.

(2010) Mazzeo et al. به بررسی تجزیه زیستی BTEX

با استفاده از باکتری‌های حاصل از پساب تصفیه‌خانه نفت پرداختند و توانایی *P. putida* را در تجزیه زیستی BTEX نشان دادند. برای ارزیابی تجزیه زیستی BTEX مقدار مصرف اکسیژن در طی انجام آزمایش‌ها اندازه‌گیری و بر اساس مصرف اکسیژن، تجزیه زیستی BTEX نتیجه‌گیری می‌شود.

موفقیت تجزیه آلودگی‌های آلی زیست محیطی در

آب‌های زیرزمینی به عوامل مختلفی مانند غلظت نیترات، غلظت BTEX، شوری و جمعیت سلولی بستگی دارد (2010) Gandolfi et al., (2003; Saeki et al., 2009; et al., Jeon et al.). بررسی تأثیر هم‌زمان عامل‌های مورد نظر به روش Full Factorial نیازمند انجام تعداد زیادی آزمایش است که از نظر منابع مالی، انسانی و

جدول ۱- نمک‌های تشکیل دهنده محیط کشت معدنی

نمک	غلظت (گرم بر لیتر)	درصد خلوص	شرکت
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (PA 1.05941)	۰/۰۰۸	>٪۹۹	Merck
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (10035-04-8)	۰/۰۰۱	>٪۹۹	Sigma
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O(10034-99-8)	۰/۰۰۹۸	>۹۹/٪۵	Sigma
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	۰/۳	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7758-11-4)	۰/۵	>٪۹۹	Sigma
NaCl (7647-14-5)	۲۰	>۹۹/٪۹۹	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7778-77-0)	۰/۵	>۹۹/٪۹۹۵	Sigma
Fe (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (7783-85-9)	۰/۰۰۲	> ۹۹/٪۹۹۷	Sigma-Aldrich
Nitriloacetic acid (139-13-9)	۲۰	>٪۹۹	Sigma-Aldrich*

### BTEX، شوری و جمعیت سلولی بر تجزیه BTEX

طرح آزمایش‌ها نوعی روش آماری برای تعیین اثر عوامل بر خواص محصول با استفاده از حداقل تعداد آزمایش‌هاست (Khayati & Barati, 2017, Tupe et al., 2007). روش تاگوچی یکی از این روش‌ها است که در آن آزمایش‌ها به شکل جدولی از آرایه‌های متعامد طراحی می‌شود. پس از انجام آزمایش‌ها مطابق شرایط طراحی شده در این جدول تجزیه و تحلیل آماری نتایج به‌منظور بررسی مقدار و نحوه اثر هر یک از عوامل روی پاسخ مورد نظر و تعیین شرایط برای رسیدن به بهترین پاسخ انجام می‌شود. در این پژوهش، با توجه به مرور مقالات انجام شده در زمینه تجزیه زیستی BTEX و مطالعه واکنش، عواملی که احتمال اثر آن بر واکنش وجود داشته انتخاب شده است. متغیرهای مستقل به‌صورت غلظت BTEX، غلظت نیترات، مقدار شوری و جمعیت میکروبی و عملکرد پاسخ (مقدار حذف BTEX) تعیین شدند. برای هر عامل سه سطح حداقل، متوسط و حداکثر طبق جدول (۲) در نظر گرفته شد و در مجموع کل آزمایش‌ها با روش تاگوچی برابر ۹ آزمایش تعیین شد.

### بررسی مقدار کاهش نیترات در طی تجزیه BTEX

بدین منظور در بطری‌های ۵۰ میلی‌لیتر با درپوش آلومینیومی، ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت معدنی شامل نمک‌های موجود در جدول (۱) تهیه شد (Shim et al., 2005). بنزن، تولوئن، اتیل‌بنزن و زایلین به بطری‌ها با استفاده از میکروسرنج تزریق تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل گردد. در ۳ بطری آزمایش با استفاده از (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> به‌عنوان منبع نیترات، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و در ۳ بطری دیگر غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ایجاد شد. دو نمونه شاهد نیز حاوی محیط کشت معدنی از هر یک از غلظت‌های نیترات و آلاینده BTEX بدون تلقیح باکتری‌ها تهیه شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر یک از باکتری‌های رشد یافته *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* به محیط کشت مایع تلقیح شد تا جمعیت ۱×۱۰<sup>۷</sup> (سلول در هر میلی‌لیتر) حاصل شود. سپس به مدت ۲۴ ساعت تکان داده شد و سپس در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس در محیط تاریک نگهداری و بعد از گذشت ۲۰ روز غلظت BTEX باقیمانده و نیترات اندازه‌گیری شد.

طرح آزمایش‌ها برای بررسی تأثیر غلظت نیترات، غلظت

جدول ۲- عوامل و سطوح در نظر گرفته شده برای انجام آزمایش‌ها

ردیف	عوامل	نماد	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
۱	غلظت BTEX (ppm)	A	۲۰۰	۵۰۰	۸۰۰
۲	غلظت نیترات (ppm)	B	۱۰۰	۳۰۰	۵۰۰
۳	شوری (درصد)	C	۰/۵	۵	۹/۵
۴	جمعیت سلولی (سلول در میلی‌لیتر)	D	۱×۱۰ <sup>۷</sup>	۳×۱۰ <sup>۷</sup>	۵×۱۰ <sup>۷</sup>

### آنالیز شیمیایی

غلظت BTEX توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 6890N مجهز به ستون HP-5، ۳۰ متری و آشکارساز (FID) اندازه‌گیری شد. دمای در محل تزریق، آشکارساز و ستون در ۲۵۰، ۳۰۰ و ۶۰ به ترتیب تنظیم شد. از گاز نیتروژن به‌عنوان گاز حامل و از گازهای اکسیژن و هیدروژن به‌عنوان سوخت برای FID استفاده شد (Khajeh and Mosavi Zadeh, 2012). غلظت نیترات با دستگاه کروماتوگرافی یونی تعیین شد. مقادیر LOD و LOQ و درصد Recovery برای بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن به‌صورت جدول (۴) می‌باشد.

جدول ۴- مقادیر LOD و LOQ و درصد Recovery برای اجزای

BTEX			
بنزن	تولوئن	اتیل بنزن	زایلن
LOQ	۰/۰۶۵	۰/۰۵۴	۰/۰۸۱
LOD	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۳
Recovery (%)			
۱۰۸/۱	۱۰۸/۳	۱۰۴/۵	۱۰۱/۱

### نتایج و بحث

#### بررسی توانایی *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* در

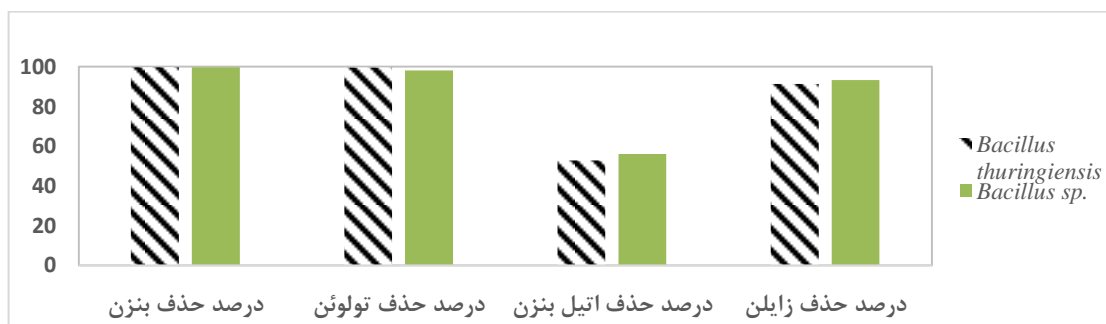
#### تجزیه زیستی BTEX

در مرحله اول توانایی باکتری *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* در تجزیه BTEX از طریق سنجش مقدار BTEX مصرفی آن‌ها بعد از گذشت ۲۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل (۱) درصد حذف بنزن و تولوئن، اتیل بنزن و زایلن توسط باکتری *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود عملکرد دو باکتری در حذف BTEX تقریباً مشابه بوده و درصد حذف بنزن، تولوئن بیش از ۹۰ درصد گزارش شد.

مقادیر نیترات و شوری و BTEX و جمعیت میکروبی که بر اساس طرح آزمایش‌ها تعیین شده بود در این مرحله به محیط معدنی تهیه شده براساس جدول (۱) اضافه گردید. از  $(NH_4)_2NO_3$  به‌عنوان منبع نیترات و از NaCl برای شوری استفاده شد (Shim et al., 2005). سه نمونه شاهد نیز بدون افزودن باکتری و با در نظر گرفتن مقادیر نیترات و شوری و غلظت BTEX مطابق جدول (۳) تهیه شد. بعد از گذشت ۱۵ روز مقدار نیترات باقیمانده در نمونه‌ها اندازه‌گیری و وارد نرم‌افزار Design Expert گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار تأثیر افزایش و کاهش غلظت نیترات، غلظت BTEX، مقدار شوری و جمعیت میکروبی بر تجزیه زیستی BTEX با سنجش مقدار نیترات مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۳- طراحی آزمایش‌ها به روش تاگوچی و آزمایش‌های کنترل

اجرا	A	B	C	D
۱	۱	۳	۳	۳
۲	۳	۲	۱	۳
۳	۲	۲	۳	۱
۴	۱	۲	۲	۲
۵	۲	۳	۱	۲
۶	۲	۱	۲	۲
۷	۳	۱	۳	۲
۸	۳	۳	۲	۱
۹	۱	۱	۱	۱
شاهد ۱	۱	۱	۱	۰
شاهد ۲	۱	۲	۱	۰
شاهد ۳	۱	۳	۱	۰



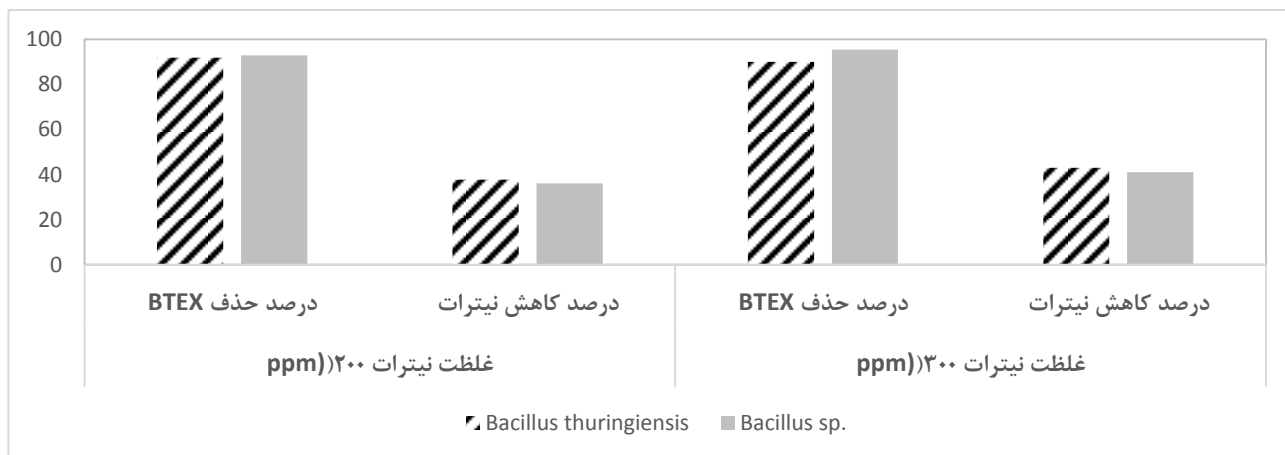
شکل ۱- درصد حذف BTEX توسط باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.*

شکل (۲) مقدار کاهش نیترات توسط *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود

به‌منظور بررسی مقدار کاهش نیترات در طی تجزیه BTEX، غلظت نیترات بعد از گذشت ۲۰ روز اندازه‌گیری شد. در

روش تاگوچی برای بهینه‌سازی تجزیه BTEX روش فاکتوریل و طرح تاگوچی برای بهینه‌سازی تجزیه زیستی BTEX مورد استفاده قرار گرفت. درایه‌های ماتریس برای طرح تاگوچی و نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده برای بررسی اثر اصلی متغیرها بر عامل هدف و به‌منظور تعیین شرایط بهینه برای تجزیه زیستی BTEX در جدول (۵) مشاهده می‌شود.

شود باکتری‌های *Bacillus sp.* و *Bacillus thuringiensis* به ترتیب ۳۶ و ۳۸ درصد از نیترات موجود را در تجزیه BTEX استفاده کرده و سبب کاهش نیترات شده‌اند که این کاهش با افزایش غلظت اولیه نیترات بیشتر شد. از مواردی که می‌توان به‌عنوان دلیل این افزایش ذکر کرد افزایش تجزیه BTEX در اثر افزایش غلظت اولیه نیترات می‌باشد.



شکل ۲- درصد حذف BTEX و کاهش نیترات توسط باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.*

جدول ۵- ماتریس طرح تاگوچی برای چهار متغیر و پاسخ اندازه‌گیری شده

کاهش غلظت نیترات (ppm) <i>Bacillus sp.</i>	کاهش غلظت نیترات (ppm) <i>Bacillus thuringiensis</i>	D $\times 10^7$ (cell/ml)	C (%)	B (ppm)	A (ppm)	اجرا
۸۲	۸۶	۵	۹/۵	۵۰۰	۲۰۰	۱
۳۸	۲۶	۵	۰/۵	۳۰۰	۸۰۰	۲
۴۰	۴۶	۱	۹/۵	۳۰۰	۵۰۰	۳
۳۸	۵۰	۳	۵	۳۰۰	۲۰۰	۴
۶۲	۷۰	۳	۰/۵	۵۰۰	۵۰۰	۵
۹	۱۰	۵	۵	۱۰۰	۵۰۰	۶
۹	۴	۳	۹/۵	۱۰۰	۸۰۰	۷
۵۶	۷۴	۱	۵	۵۰۰	۸۰۰	۸
۱۰	۸	۱	۰/۵	۱۰۰	۲۰۰	۹

(درصد) *Bacillus sp.* کاهش نیترات توسط تجزیه زیستی با باکتری  $= 40.22 + 5.11 \times A[1] - 1.22 \times A[2] - 28.89 \times B[1] + 0.44 \times B[2] - 1.56 \times C[1] - 3.89 \times C[2]$  در معادله‌های فوق به دلیل اینکه A، B و C دارای سه سطح می‌باشند بنابراین تأثیر اصلی به صورت A[1]، A[2]، B[1]، B[2]، C[1] و C[2] نشان داده می‌شود.

بررسی عوامل مؤثر در تجزیه زیستی BTEX تحلیل واریانس ارائه شده برای اثر عوامل بر کاهش نیترات برای

پاسخ آزمایش‌ها تحت شرایط آزمایش در جدول (۳) ارائه شد که از نتایج یک معادله چندجمله‌ای درجه ۱ توسط نرم‌افزار Design Expert 7.0.0 پیشنهاد شد. مدل رگرسیونی در مورد باکتری *Bacillus thuringiensis* (مدل ۱) و *Bacillus sp.* (مدل ۲) به صورت زیر می‌باشد:

(درصد) *Bacillus thuringiensis* کاهش نیترات توسط تجزیه زیستی با باکتری  $= 39.33 + 6.44 \times A[1] + 0.44 \times A[2] - 34.22 \times B[1] - 0.89 \times B[2] - 6.89 \times C[1] + 3.11 \times C[2]$

بر اساس اغتشاش روی دهد.  $R^2$  مدل ۱ و ۲ برابر ۹۸ درصد می باشد و Adeq Precision که سیگنال به نسبت اغتشاشات را بیان می کند در مدل ۱ برابر ۵۳/۱۵ بوده که بیش از ۴ می باشد و نشان دهنده سیگنال کافی و در نتیجه کاربردی بودن مدل می باشد، این حالت در مدل ۲ با مقدار ۱۱/۴۷ نیز مشاهده می شود.

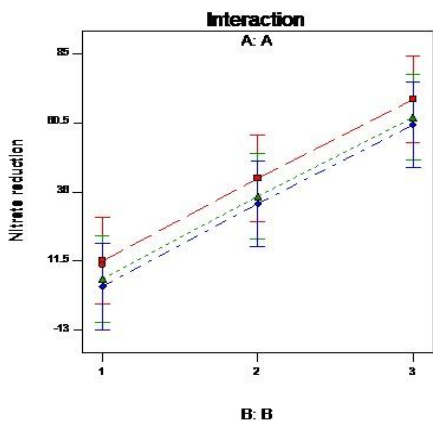
مدل های ۱ و ۲ در جدول (۶) نشان داده شده است. با توجه به مقدار P و F غلظت نیترات، غلظت BTEX در کاهش مقدار نیترات مهم می باشند. از میان این عوامل غلظت نیترات، بیشترین اثر را دارد. مقدار F برای مدل های ۱ و ۲ به ترتیب برابر ۴۲/۲۹ و ۱۶/۶۴ می باشد که نشان دهنده معنادار بودن مدل می باشد. بر اساس نتایج حاصل از تحلیل واریانس، در مدل ۱ و ۲ به ترتیب ۰/۲۴ و ۵/۸۷ درصد احتمال دارد که مقدار F مدل

جدول ۶- تحلیل واریانس برای مقدار اثر عوامل بر مقدار کاهش نیترات

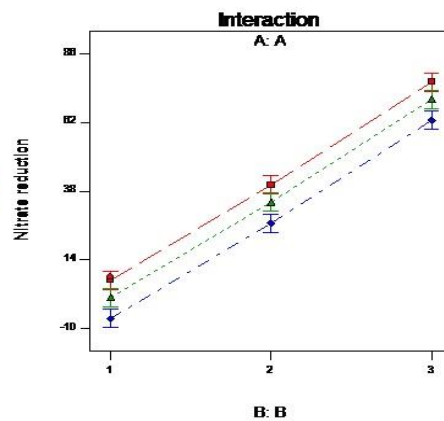
عامل	درجه آزادی		مجموع مربعات		F		P		اثر
	مدل ۱	مدل ۲	مدل ۱	مدل ۲	مدل ۱	مدل ۲	مدل ۱	مدل ۲	
مدل	۶	۶	۱۲۸۲/۶۷	۸۶۶/۸۹	۴۱۲/۲۹	۱۶/۶۴	۰/۰۱	۰/۰۴۸	معنادار
غلظت BTEX	۲	۲	۱۳۳/۷۸	۶۴/۱۱	۴۳/۰۰	۱/۲۳	۰/۰۲	۰/۰۴۵	معنادار
غلظت نیترات	۲	۲	۳۶۰۷/۱۱	۲۴۶۵/۷۸	۱۵۹/۴۳	۴۷/۱۳	۰/۰۱	۰/۰۲	معنادار
شوری	۲	۲	۱۰۷/۱۱	۷۰/۷۸	۳۴/۴۳	۱/۳۶	۰/۰۳	۰/۰۴۲	معنادار

شده است. همان طور که در شکل (۳) مشاهده می شود با افزایش مقدار BTEX درصد مصرف نیترات کاهش می یابد، علت این امر را می توان اثر سمی که غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر BTEX بر میکروارگانیسم ها دارد بیان نمود که در نتیجه سبب کاهش تجزیه زیستی و کاهش مقدار مصرف نیترات می شود. در تحقیق صورت گرفته توسط Jin et al. (2013) نیز اثر سمیت غلظت بالای BTEX بر میکروارگانیسم ها، علت کاهش تجزیه BTEX نسبت به غلظت های اولیه کمتر BTEX گزارش شد. به طور کلی غلظت BTEX تا ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش عملکرد میکروارگانیسم ها نخواهد شد و بهتر است در این حالت برای تسریع شدت تجزیه زیستی از بالاترین سطح نیترات استفاده شود.

همان طور که در شکل (۳) مشاهده می شود با افزایش غلظت اولیه نیترات، مقدار مصرف نیترات افزایش می یابد که این روند در تجزیه زیستی BTEX توسط هر دو باکتری مشابه است. این پدیده را می توان به علت افزایش مقدار تجزیه زیستی BTEX در اثر افزایش غلظت اولیه نیترات توجیه نمود. در این حالت غلظت اولیه بالای نیترات به عنوان محدود کننده تجزیه زیستی BTEX نمی باشد و با دسترس بودن نیترات به مقدار کافی واکنش تجزیه زیستی با شدت بیشتری انجام خواهد شد. (2008) Dou et al. نیز در بررسی تجزیه بی هوازی BTEX در شرایط کاهش نیترات، افزایش مقدار مصرف نیترات را توسط کنسرسیوم باکتریایی با افزایش غلظت اولیه نیترات گزارش نمودند. در شکل (۳) تأثیر غلظت اولیه نیترات بر کاهش مقدار نیترات با افزایش مقدار BTEX از سطح A1 به A3 نشان داده



(b)



(a)

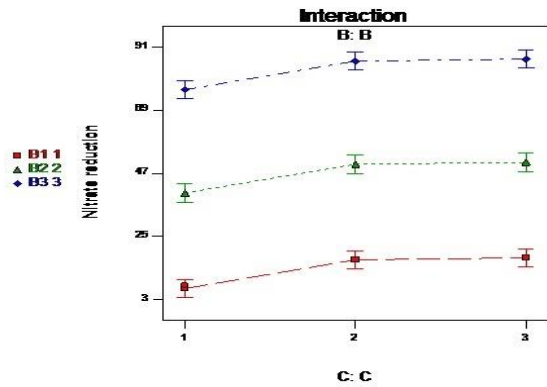
شکل ۳- اثر غلظت اولیه نیترات بر مقدار مصرف نیترات با توجه به غلظت اولیه BTEX در واکنش تجزیه زیستی BTEX توسط باکتری های *Bacillus*

(a) *thuringiensis* و (b) *Bacillus sp.*

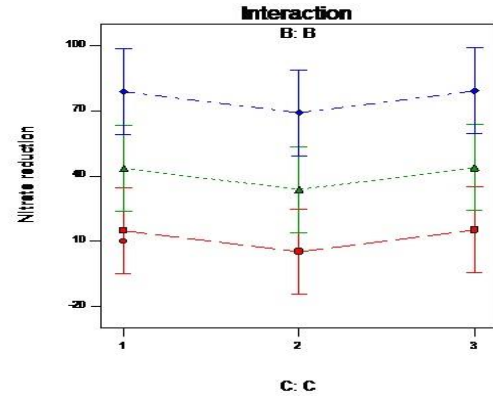


می‌توان این نتیجه را به علت افزایش عملکرد باکتری *Bacillus thuringiensis* در شوری بالا بیان نمود که سبب افزایش تجزیه زیستی BTEX شده است.

با استناد به مقدار P و F در تحلیل واریانس مربوط به اثر مقدار شوری بر درصد کاهش نیترات این تأثیر در مدل به دست آمده معنی‌دار نمی‌باشد، اما نگاه اجمالی به شکل (۴) ( نمودار نشان دهنده تأثیر میزان شوری بر درصد کاهش نیترات) مثبت بودن افزایش شوری را بر مقدار مصرف نیترات توسط باکتری



(b)

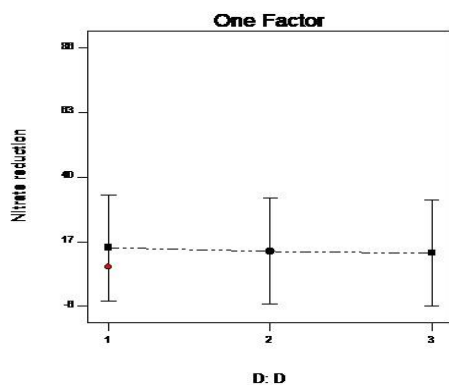


(a)

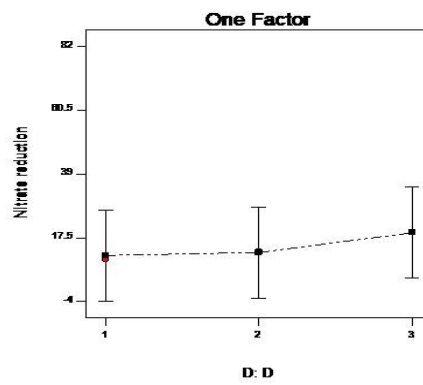
شکل ۴- اثر مقدار شوری بر مصرف نیترات با توجه به غلظت اولیه نیترات در واکنش تجزیه زیستی BTEX توسط باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* (a) و *Bacillus sp.* (b)

درصد و مقدار بیش از حد باکتری در سطح ۳ و ۵ درصد بیان نمود. روند در مورد باکتری *Bacillus sp.* متفاوت بوده و با افزایش مقدار جمعیت سلولی مقدار تجزیه زیستی افزایش می‌یابد.

در بررسی تأثیر جمعیت سلولی باکتری *Bacillus thuringiensis* بر مقدار مصرف نیترات در تجزیه زیستی BTEX در صورتی که سطوح باکتری در سطح ۱ درصد باشد بیشترین مقدار تجزیه زیستی و در نتیجه مصرف نیترات حاصل می‌شود. می‌توان علت این پدیده را کافی بودن مقدار باکتری در سطح ۱



(b)



(a)

شکل ۵- اثر جمعیت سلولی در واکنش تجزیه زیستی BTEX توسط باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* (a) و *Bacillus sp.* (b) همچنین در این مطالعه از نسبت S/N، برای ارزیابی اثر

فاکتورهای مورد بررسی بر تجزیه زیستی BTEX و انتخاب بهترین سطح برای هر عامل استفاده شد. مقادیر بالای دلتا نشان دهنده اثر قابل توجه یک عامل نسبت به سایر عوامل در عامل هدف می‌باشد. همان‌طور که در جدول‌های (۷) و (۸) مشاهده می‌شود با توجه به مقدار دلتا، عامل‌های غلظت نیترات، BTEX، شوری و جمعیت میکروبی به ترتیب دارای بیشترین اثر در تجزیه زیستی BTEX توسط باکتری‌های *Bacillus*

در شکل (۶) نسبت S/N برای هر یک از عامل‌ها در سطوح مورد بررسی نشان داده شده است. شرایطی که در آن مقدار بیشینه برای نسبت S/N حاصل گردد، به‌عنوان شرایط بهینه در تجزیه BTEX در نظر گرفته می‌شود (Kim et al. 2004). با توجه به شکل (۶) مقدار بیشینه S/N، شرایط بهینه برای تجزیه زیستی توسط باکتری *Bacillus thuringiensis* هنگامی که غلظت BTEX برابر ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت

می‌گیرد. با استفاده از نرم‌افزار Design Expert مقادیر کاهش نیترات در شرایط بهینه برای باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* به ترتیب ۸۸/۲۲ و ۷۷/۲۲ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

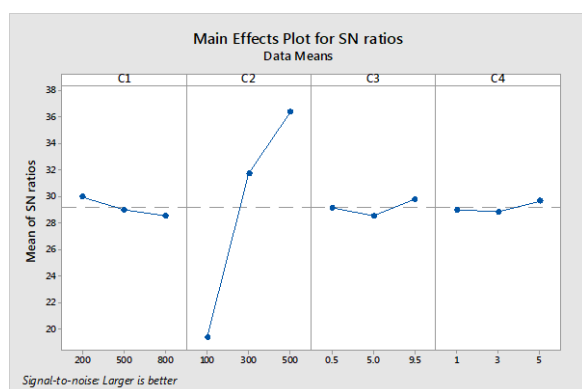
نیترات ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، شوری ۵ درصد و جمعیت میکروبی  $1 \times 10^7$  باشد، حاصل می‌گردد. برای باکتری *Bacillus sp.* نیز هنگامی که غلظت BTEX، نیترات، شوری و جمعیت میکروبی به ترتیب برابر ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۹/۵ درصد و  $5 \times 10^7$  باشد حداکثر تجزیه زیستی صورت

جدول ۷- مقادیر متوسط S/N برای هر عامل در سطح‌های مختلف در مدل ۱

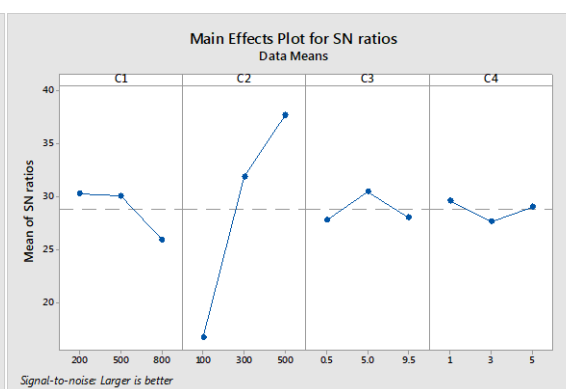
سطح	غلظت اولیه BTEX	غلظت اولیه نیترات	شوری	جمعیت میکروبی
۱	۳۰/۲۴	۱۶/۷۰	۲۷/۷۵	۲۹/۵۷
۲	۳۰/۰۵	۳۱/۸۴	۳۰/۴۵	۲۷/۶۴
۳	۲۵/۹۱	۳۷/۶۶	۲۸/۰۰	۲۹/۰۰
دلتا	۴/۳۴	۲۰/۹۶	۲/۷۰	۱/۹۳
ترتیب اثر	۲	۱	۳	۴

جدول ۸- مقادیر متوسط S/N برای هر عامل در سطح‌های مختلف در مدل ۲

سطح	غلظت اولیه BTEX	غلظت اولیه نیترات	شوری	جمعیت میکروبی
۱	۲۹/۹۶	۱۹/۳۹	۲۹/۱۵	۲۹/۰۰
۲	۲۸/۹۹	۳۱/۷۴	۲۸/۵۵	۲۸/۸۴
۳	۲۸/۵۵	۳۶/۳۶	۲۹/۸۰	۲۹/۶۵
دلتا	۱/۴۱	۱۶/۹۷	۱/۲۵	۰/۸۱
ترتیب اثر	۲	۱	۳	۴



(b)



(a)

شکل ۶- نسبت S/N برای غلظت BTEX، نیترات، شوری و جمعیت سلولی در سطوح مورد آزمایش برای *Bacillus thuringiensis* (a) و *Bacillus sp.* (b)

### نتیجه‌گیری کلی

سلولی بر مقدار مصرف نیترات و در نتیجه تجزیه زیستی BTEX مدلی برای مقدار مصرف نیترات برای هر باکتری پیشنهاد گردید. به علاوه نتایج حاکی از اثر بسیار زیاد غلظت اولیه نیترات در بین عوامل مورد بررسی بر مقدار مصرف نیترات می‌باشد. شرایط برای تجزیه زیستی BTEX توسط *Bacillus thuringiensis* در صورتی که غلظت BTEX برابر ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، نیترات ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، شوری ۵ درصد و جمعیت

در این تحقیق *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* به‌عنوان باکتری‌های توانا بر تجزیه زیستی BTEX در محیط‌های با کمبود اکسیژن و شور با عملکرد بالا معرفی شدند. این باکتری‌ها قادر به احیای تجزیه‌ای نیترات نیز می‌باشند که باعث کاهش مقدار نیترات موجود در محیط با مصرف BTEX شدند. با بررسی اثر عوامل غلظت نیترات، BTEX، شوری و جمعیت

## سپاسگزاری

این مقاله در سال ۱۳۹۶ در قالب طرح پژوهشی با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فن‌آوران کشور با عنوان مطالعات آزمایشگاهی زیست پالایی BTEX در محیط متخلخل شور و اشباع به شماره ۹۵۸۲۵۲۷۳ اجرا گردیده است و مؤلفان از مساعدت‌های آنان تقدیر می‌نمایند.

## REFERENCES

- Al-Mailem, D.M., Eliyas, M., and Radwan, S.S. (2013). Oil-bioremediation potential of two hydrocarbonoclastic, diazotrophic *Marinobacter* strains from hypersaline areas along the Arabian Gulf coasts. *Extremophiles*, 17, 463–470.
- Abed, R.M.M., Al-Thukair, A., and De Beer, D. (2006). Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 57, 290-301
- Atlas, R. M., and Bartha, R. (1972). Degradation and mineralization of petroleum in sea water, Limitation by nitrogen and phosphorous. *Biotechnology and Bioengineering*, 14(3),309-318.
- Azetsu, S., Nicholson, C., Najar, F., Roe, B., and Fathepure, B. (2009). "Physiological and genomic analysis of BTEX degradation in novel *Arhodomonas* strains, isolated from hypersaline environments," in 109th *American Society for Microbiology* (Philadelphia, PA).
- Berlendis, S., Cayol, J.-L., Verhe, F., Laveau, S., Tholozan, J.-C., Ollivier, B., et al. (2010). First evidence of aerobic biodegradation of BTEX compounds by pure cultures of *Marinobacter*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 1992–1999.
- Borden, R.C., and Bedient, P.B. (1986). Transport of dissolved hydrocarbons influenced oxygen limited biodegradation, 1. Theoretical development. *Water Resources Res.* 22, 1973-1982.
- Carmona, M., Zamarro, M., Bla'zquez, B., Durante-Rodríguez G., Jua'rez, J., Valderrama, J. (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73:71–133
- Corseuil, H.X., Gomez, D. E., Schambeck, C. M., Ramos, D. T., Alvarez. P.J.J. (2015). Nitrate addition to groundwater impacted by ethanol-blended fuel accelerates ethanol removal and mitigates the associated metabolic flux dilution and inhibition of BTEX biodegradation. *Journal of Contaminant Hydrology.* 174, 1–9
- Chakraborty, R., Coates, J.D. (2004). Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64, 437–446.
- Da Silva, M. L., & Alvarez, P. J. (2002). Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns. *Journal of Environmental Engineering-ASCE.* 128 (9), 862–867
- Dou, J., Liu X., Hu Z. (2008). Substrate interactions during anaerobic biodegradation of BTEX by the mixed cultures under nitrate reducing conditions. *J Hazard Mater*;158, 264–272.
- Dou, J., Liu X., Hu Z., Deng, D. (2008). Anaerobic biodegradation of BTEX linked to nitrate and sulfate reducing conditions. *J Hazard Mater*;158, 264–272.
- Fathepure, B. (2014). Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. Review Article. *Frontiers in Microbiology.* doi, 10.3389/fmicb.00173
- Foght, J. (2008). Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 15, 93–120
- Fuchs, G. (2008). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Ann NY Acad Sci.* 1125:82–99
- Gandolfi, I., Siculo, M., Franzetti, A., Fontanarosa, E., Santagostino, A., Bestetti, G. (2010). Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bio resource. Technol.* 101, 568–575.
- Hassan, H. A., Rizk, N. M. H., Hefnawy, M. A., and Awad, A. M. (2012). Isolation and characterization of halophilic aromatic and chloroaromatic degrader from WadiEl-Natron Soda lakes. *Life Sci. J.* 9, 1565–1570.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev.* 22,459–473
- Jin, H.M., Choi, E. J., and Jeon, C.O. (2013). Isolation of a BTEX-degrading bacterium, *Janibacter* sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. *Bioresource Technology* 145, 57–64
- Jeon, C.O., Park, W., Padmanabhan, P., Derito, C., Snape, J.R., Madsen, E.L. (2003). Discovery of a previously undescribed bacterium with distinctive dioxygenase that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13591–13596.
- Khayati, G., & Barati, M. (2017). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil: Optimization Strategy Using Taguchi Design of Experimental (DOE) Methodology. *Environ.Process.* 4:451–461
- Kuhn, E.P., Colberg, P.J., Schnoor, J.L., Wanner, O., Zehnder, A.J.B., Schwarzenbach, R.P. (1995). *www.SID.ir*

- Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater—laboratory column studies. *Environ Sci Technol.* 19,961–968.
- Khajeh, M., Mosavi Zadeh, F. (2012). Response Surface Modeling of Ultrasound- Assisted Dispersive Liquid- Liquid Microextraction for Determination of Benzene, Toluene and Xylene in water Sample. *Bull Environ Contam Toxicol.* 89,38–43.
- Li, H., Liu, Y.H., Luo,N., Zhang, X.Y., Luan, T.G., Hu, J. M., *et al.* (2006 ). Biodegradation of benzene and its derivatives by a psychrotolerant and moderately halophilic *Planococcus* sp. strain ZD22. *Res. Microbiol.* 157, 629-636.
- Mazzeo, D.E., Levy, C.E., Angelis, D.D.(2010). BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment* .408 , 4334–4340
- Minai-Tehrani, D., Minuoi, S., Herfatmanesh, A. (2009). Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil. *Bull. Environ. Contam.Toxicol.* 82, 179-184.
- Maxwell, C. R., & Baqai, H. A. (1995). Remediation of petroleum hydrocarbons by inoculation with laboratory-cultured microorganisms. In: Hinchey RE, Fredrickson J, Alleman BC (eds) *Bioaugmentation for site remediation. Battelle Press, Columbus.* 129–137.
- Neff, J.M. (1979). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, sources and biological effects, London, *Applied Science Publisher.* 350.
- Newell, C.J., McLeod, R.K., Gonzales, J.R., and Wilson, J.T. (1996). BIOSCREEN Natural Attenuation Decision Support System, User's Manual-Version 1.3, National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/600/R-96/087.
- Nicholson, C.A., and Fathepure, B.Z. (2004). Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70,1222–1225.
- Nicholson, C.A., and Fathepure, B.Z. (2005) . Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 257–262.
- Sei, A., and Fathepure, B.Z. (2009) . Biodegradation of BTEX at high salinity by an enrichment culture from hypersaline sediments of Rozel Point at Great Salt Lake. *J. Appl. Microbiol.* 107, 2001–2008.
- Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A., Matsuda, H. (2009). Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresour. Technol.* 100, 572–577
- Shim, H., Hwang, B., Lee, S. S., and Kong, S.H. (2005). Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. *Biodegradation.* 16, 319–327.
- Spormann, A.M., Widdel, F. (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation.* 11:85–105
- Tupe, S.G., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. (2007). Taguchi approach significantly increases bioremediation process efficiency: a case study with Hg (II) removal by *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology.* 0266-8254.
- Wang, Z., Lue, Z., Yan, C., Xing, B. (2017). Impacts of environmental factors on arsenate biotransformation and release in *Microcystis aeruginosa* using the Taguchi experimental design approach. *Water Research.* 118, 167-176.
28. Widdel, F., Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* 12:259–276