Archive of SID
DOI: 10.22059/ijswr.2019.270499.668064 تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۰، شماره ۷، آذر ۱۳۹۸ (ص ۱۷۵۷-۱۷۴۷)

Biodegradation of Kerosene by Native Bacteria Isolated from Vegetated and Kerosene Contaminated Fields' Soil in Khuzestan Province

BIJAN KHALILIMOGHADAM[1*], ZAHRA SORKHEH[1], EBRAHIM OSDAGHI[2], HOSSEIN MOTAMEDI[3]

1. Associate Professor, Department of Soil Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
2. Graduated Student, Department of Soil Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
3. Instructor, Department of Plant Protection, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
4. Professor, Department of Biology; Research center of Biotechnology and biological Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz.

(Received: Dec. 2, 2018- Revised: Jan. 14, 2019- Accepted: Feb. 25, 2019)

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the possibility of growth of native bacteria isolated from some kerosene-contaminated soils in Khuzestan province for degradation of oil spills. After the primary stages of enrichment, isolation, and screening, bacteria were identified based on the gene sequences of 16S rRNA gene. The ability of native bacteria as the bacteria using hydrocarbons in the presence of oil products such as kerosene and crude oil at 1% concentration of solid and liquid minimum salt medium (MSM) was measured. A split-plot experiment with a factorial design was conducted with factors such as oil (kerosene and crude oil), bacteria, and time in three replicates, using the microbial inoculation inoculum (with a population of 10^8 CFU/ml) in both liquid and solid growth environments. The degradation ability of hydrocarbons in solid and liquid growth environments was investigated using colony diameter assessment and turbidity, respectively. In this research, five bacteria belonging to the genera of *Microbacterium phyllosphaerae* (ZS1.9), *Bacillus megateriuns* (ZS2.12), *Staphylococcus epidermidis* (ZS3.170), *Streptomyces albogriseolus* (ZS4.9), and *Bacillus subtilis* (ZS5. 210) were identified. The results revealed that the bacteria had the highest and lowest growth in the presence of kerosene and crude oil, respectively. Among the oil products used in this study, kerosene had the highest degradation rate. Furthermore, the ability of bacteria for degradation oil products increased by increasing incubation period. The findings of this study revealed the ability of different bacterial species in bioremediation of environmental pollution to various hydrocarbons.

Key words: hydrocarbon, kerosene, bioremediation, vegetable

*Corresponding Author's Email: khalilimoghadam@asnrukh.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه زیستی نفت سفید توسط باکتری‌های بومی جداسازی شده از خاک مزارع سبزیجات آلوده به ترکیبات نفت سفید استان خوزستان

بیژن خلیلی مقدم*[۱]، زهرا سرخه [۲]، ابراهیم اسداغی[۳] و حسین معتمدی[۴]

۱. دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

۲. دانش آموخته گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

۳. مربی سابق گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان ، اهواز، ایران

۴. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی ،دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۱- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۱۰/۲۴- تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۲/۶)

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی امکان رشد باکتری‌های بومی جداسازی شده از برخی نواحی خاک آلوده به نفت سفید واقع در استان خوزستان در تجزیه آلودگی‌های نفتی مورد بررسی قرار گرفت. پس از مراحل غنی‌سازی، جداسازی و غربالگری اولیه، بر اساس توالی ژن کدکننده 16S rRNA، باکتری‌ها شناسایی شدند. توانایی باکتری‌های بومی به عنوان باکتری‌های استفاده کننده از هیدروکربن‌ها در حضور مواد نفتی از قبیل نفت سفید و نفت خام با غلظت ۱٪ در محیط کشت نمکی حداقل(MSM) جامد و مایع اندازه‌گیری شد. آزمایش به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح فاکتوریل با عامل‌های نفت (سفید یا خام)، باکتری و زمان در سه تکرار با به‌کارگیری مایه تلقیح میکروبی (با جمعیت 10^8 CFU/ml) در هر دو محیط کشت مایع و جامد انجام پذیرفت. بررسی توانایی تجزیه‌کنندگی هیدروکربن‌ها در محیط جامد و مایع براساس کدورت‌سنج انجام پذیرفت. در نتیجه این تحقیق پنج باکتری متعلق به جنس‌های(ZS1.9) *Microbacterium phyllosphaerae*، *Bacillus megateriuns* (ZS2.12)، *Staphyloccoccus epidermidis* (ZS3.170)، *Streptomyces albogriseolus* (ZS4.9) و *Bacillus subtilis* (ZS5.210) شناسایی گردیدند. نتایج نشان داد که بیشترین رشد توسط باکتری‌ها در حضور ماده نفت سفید بود. در حالی که نفت خام کمترین رشد را داشت. از میان مواد نفتی استفاده شده بالاترین تجزیه مربوط به ماده نفت سفید بود. همچنین توانایی باکتری‌ها در تجزیه مواد نفتی با گذشت مدت زمان انکوباسیون افزایش یافت. نتایج این آزمایش توانایی گونه‌های مختلف باکتری در زیست پالایی محیط‌های آلوده شده به هیدروکربن‌های مختلف را نشان داد.

واژه های کلیدی: هیدروکربن، نفت سفید، زیست پالایی، سبزی

مقدمه

خاک یکی از منابع ارزشمند طبیعت بوده و پالاینده طبیعی محسوب می‌شود، اما مدت‌هاست که مواد نفتی و مشتقات آن در اثر استخراج، حمل و نقل، ذخیره‌سازی یا استفاده نادرست موجب آلودگی خاک شده‌اند (Sparks, 2003). در بخش‌هایی از استان خوزستان، برای مبارزه با علف‌های هرز مزارع سبزی به طور گسترده‌ای از نفت سفید به عنوان یک فرآورده نفتی ارزان و قابل دسترس استفاده می‌نمایند. نفت سفید علف‌های هرز را نابود کرده، اما به سبزیجاتی مانند جعفری و هویج آسیبی وارد نمی‌کند. این امر موجب شده تا کشاورزان به دلیل هزینه زیاد سموم کشاورزی، نفت سفید را جایگزین سموم کنند (Khodaveisi, 2012). نفت سفید، هیدروکربنی مشتق شده از تقطیر جزء به جزء نفت مایعی شفاف و نامحلول در آب و همچنین قابل اشتعال در دمای ۲۷۵ -۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و دارای بو و طعم مشخصی می‌باشد؛ اما قابل اختلاط با بسیاری از حلال‌های آلی است. از لحاظ ساختاری، عمدتاً از مولکول‌های هیدروکربن اشباع حاوی ۱۲-۱۵ اتم کربن تشکیل شده است (Cabello, 1997). نفت سفید باعث سمیت محصولات خاص با توجه به نوع و غلظت ترکیبات آروماتیک در حد متوسط تا رو به بالا در موجودات زنده می‌گردد. بخش‌های کوچکی از نفت سفید به عنوان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات آلودگی در محیط زیست توصیف شده است (Das and Tiwary, 2014). وجود هیدروکربن‌های نفتی در خاک می‌تواند سبب بروز سمیت برای انسان‌ها و سایر موجودات زنده شوند و آلودگی منابع آب را به دنبال دارند. بنابراین تخریب

* نویسنده مسئول: khalilimoghadam@asnrukh.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

زیست‌محیطی این آلودگی‌ها نیازمند راهکارهای اساسی است تا بتوان با کمترین هزینه و بدون اینکه دخل و تصرفی در اکوسیستم ایجاد شود خطر آلاینده‌ها را برطرف نمود. روش‌هایی که امروزه برای حذف آلاینده‌های نفتی بکار می‌روند متعدد هستند. آلودگی-های نفتی به سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی از محیط حذف می‌شوند (Ebrahimi Pour *et al*., 2012). در حال حاضر امید بخش‌ترین روش مواجهه با محیط زیست آلوده شده، استفاده از میکروارگانیسم‌های زیستی است که توسط آن‌ها ترکیبات آلی دارای مولکول‌های بزرگ به ترکیبات دارای مولکول‌های کوچک‌تر و ساده‌تر شکسته و تجزیه می‌شوند. زیست پالایی فن‌آوری تیمار آلودگی است که از سیستم‌های زیستی برای تسریع تخریب و یا تغییر شکل مواد شیمیایی مختلف به اشکال کم ضررتر استفاده می‌شود (Hamman, 2004؛ Atlas, 1981). پژوهش‌های متعدد انجام شده نشان می‌دهد سویه‌های مختلف باکتریایی نه تنها نسبت به آلودگی‌های نفتی مقاوم هستند بلکه برخی از آن‌ها قادرند از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و ماده غذایی استفاده کنند. بنابراین وجود این ترکیبات نه تنها مانع رشد باکتری‌ها نمی-شود بلکه موجب رشد بیشتر و سریع‌تر باکتری‌های سازگار می-شوند (Mohsenzadeh, 2011). در نتایج پژوهش Akpoveta *et al*. (2011) مشاهده شده که خاک آلوده به ۱۰ درصد نفت سفید، در ترکیب میکروبی خاک دوازده باکتری هتروتروف شناسایی شد که هشت‌تا از آن‌ها از هیدروکربن‌ها استفاده می‌کردند. باکتری-های هتروتروف مذکور در ۱۲ جنس آلکالیژنز، باسیلوس، میکروکوکوس، کروموباکتریوم، کورینه باکتریوم، سراشیا، سودوموناس، سلولوموناس، پروتئوس، فلاووباکتریوم، نوکاردیا، و آئروموناس بودند؛ که گونه‌های آلکالیژنز، باسیلوس، کروموباکتریوم، کورینه باکتریوم، سودوموناس، آئروموناس، سراشیا و فلاووباکتریوم تجزیه‌گر هیدروکربن بودند. Wongsa *et al*. (2004) مشاهده کردند که از بین پنج ایزوله ، سویه‌های *WatG* و *HokM* دو تا از بهترین تجزیه کننده‌های نفت سفید بودند که به ترتیب متعلق به گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Serratia marcescens* می‌باشند. کارایی تخریب این سویه‌ها وابسته به طول زنجیره و ساختار هیدروکربن‌ها بود.

Bacillus subtilis، *Flavobacterium lutescens*، *Micrococcus luteus*، *Corynebacterium variabilis* و *Pseudomonas fluorescens* در استفاده از محصولات نفتی تصفیه شده (بنزین، گازوئیل و نفت سفید) نشان داد که این باکتری‌ها به طور بالقوه‌ای خاک آلوده به نفت را زیست‌پالایی می-کنند (Olalemi and Arotupin, 2012). براساس سایر مطالعات انجام یافته، کارآیی روش تلقیح باکتری بومی جداسازی شده از همان محیط آلوده و به کارگیری آن در زمینه زیست پالایی نفت خام در خاک به اثبات رسیده است. دلیل این امر افزایش میزان سوخت و ساز و سازگاری ژنتیکی جمعیت میکروبی در محیط زیست خودشان گزارش شده است که نقش به سزایی در موفقیت زیست پالایی محیط‌های آلوده دارد. با توجه به اینکه، فلور-میکروبی خاک‌های آلوده در شرایط آب و هوایی و زیستی مختلف متفاوت است و همچنین عوامل مختلفی از جمله غلظت آلاینده و دمای رشد می‌تواند عملکرد تجزیه میکروبی آلاینده را تحت تأثیر قرار دهد (Mohsenzadeh, 2011). و با توجه به عدم انجام پژوهش مشابه در خاک‌های مزارع آلوده به ترکیبات نفت سفید، لزوم این تحقیق در استان خوزستان احساس می‌شود. بنابراین هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی موجود در خاک-های آلوده به ترکیبات نفت سفید استان خوزستان، بررسی رشد این باکتری‌ها در حضور نفت سفید و نفت خام و استفاده از آن‌ها به عنوان منبع کربن و نهایتاً تعیین راندمان تجزیه زیستی نفت سفید و نفت خام توسط این باکتری‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به منظور جداسازی باکتری تجزیه‌کننده نفت از خاک‌های مزارع سبزیجات برگی آلوده به نفت سفید در شهرستان شوش (′۱۴ °۴۸ طول شرقی تا ′۱۱ °۳۲ عرض شمالی)، از استان خوزستان، واقع در جنوب غربی ایران استفاده گردید. همچنین ۳۰ عدد نمونه از عمق ۱۰ سانتیمتری سطح خاک و برای هر نمونه به مقدار تقریبی ۲۰۰ گرم به طور تصادفی از محل‌های مورد مطالعه با استفاده از یک ظرف استریل، تهیه شدند. در ابتدا نمونه خاک الک شده و به طور کامل با هم مخلوط و در بطری‌های مک کارتی ۲۰ میلی‌لیتری ذخیره شدند.

جداسازی، خالص سازی، و خصوصیات فنوتیپی باکتری‌ها

به منظور رشد باکتری‌ها به میزان، یک گرم از خاک هر نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون تهیه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد. غلظت‌های مختلفی از رقت 10^{-1} تا رقت 10^{-5} تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از رقت 10^{-4}و 10^{-5}در محیط آگار مغذی کشت داده شد و در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد برای ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه شدند. کشت خالص از باکتری توسط کشت مجدد کلنی‌های کشت شده به دست آمد. سپس جدایه‌های باکتری‌های به دست آمده در بافر استریل به حالت تعلیق در آمد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده بیشتر ذخیره شدند. برای ذخیره سازی طولانی مدت، سویه‌ها در

www.SID.ir

Archive of SID

گلیسرول ۱۵ درصد و در دمای ۷۰- سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. همه‌ی باکتری‌های خالص با تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استاندارد مورد شناسایی قرار گرفتند (Schaad *et al*., 2001).

اندازه‌گیری قدرت تجزیه هیدروکربن‌ها و رشد باکتری‌ها

هر یک از باکتری‌های جدا شده از مرحله قبل در محیط مایع مغذی کشت داده شدند تا به غلظت 10^8 CFU/ml برسند. سپس ۳ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به عنوان مایه تلقیح باکتری به ارلن استریل ۲۵۰ میلی‌لیتری، دارای ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع MSM (شامل ۰/۵ گرم NaCl، ۰/۱گرم $(NH_4)SO_4$، ۰/۰۲۵گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲ گرم $NaNO_3$، ۰/۴ گرم KH_2PO_4، ۱ گرم $K_2HPO_4.3H_2O$ و pH محیط کشت بین ۷-۸) حاوی مواد نفتی با غلظت ۱٪ (نفت سفید یا نفت خام) به همراه نمونه شاهد (که فقط حاوی محیط کشت) در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ روز کشت شدند. بعد از گذشت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز از کشت باکتری‌ها در محیط کشت حاوی نفت سفید یا نفت خام، باقیمانده مواد نفتی موجود در ارلن‌ها با استفاده از تولوئن استخراج (Rahman *et al*., 2002) و میزان حذف مواد نفتی به‌وسیله روش وزن سنجی اندازه‌گیری گردید. از آنجایی‌که بخشی از کاهش مواد نفتی موجود در نمونه‌ها به دلیل تبخیر آن می‌باشد، برای اندازه‌گیری قدرت تجزیه مواد نفتی توسط هر یک از باکتری‌ها، غلظت مواد نفتی باقیمانده در هر یک از نمونه‌ها با نمونه شاهد فاقد باکتری مقایسه شد. در ضمن به منظور جلوگیری از تجزیه نوری مواد نفتی، نمونه‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شدند. میزان تجزیه بیولوژیکی با استفاده از روش وزن سنجی به صورت زیر محاسبه شد. همچنین منحنی رشد باکتری‌ها طی مدت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز با اندازه‌گیری کدورت حاصل از رشد باکتری‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری گردید (Emtiazi *et al*., 2005).

وزن نفت باقیمانده: وزن ظرف همراه با مواد نفتی – وزن ظرف خالی

مقدار تخریب نفت: وزن اولیه نفت اضافه شده به محیط – وزن نفت باقیمانده

درصد تخریب: مقدار تخریب مواد نفتی × ۱۰۰ (Subathra *et al*., 2013).

بررسی توانایی تجزیه کنندگی باکتری‌ها در محیط جامد حاوی هیدروکربن

توانایی باکتری تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها با استفاده از محیط پایه MSM آگار حاوی ۱ درصد از هر کدام از ترکیبات نفتی به‌طور جداگانه (نفت سفید یا نفت خام) اندازه‌گیری شد. ابتدا پلیت‌ها به مدت یک روز در داخل انکوباتور قرار گرفت تا ماده نفتی به خوبی جذب محیط شود. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 10^8 CFU/mبرای هر جدایه، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی بر روی محیط MSM آگار در سه نقطه کشت شد. سپس پلیت‌ها برای ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. وجود یک منطقه روشن در اطراف کلنی پس از ۷ روز نشان از عدم رشد باکتری‌های تجزیه کننده در نظر گرفته شد. همچنین قطر منطقه رشد از فاصله لبه‌های بیرونی هر کلنی به عنوان قطر منطقه تجزیه اندازه‌گیری شد. هر نمونه شامل سه تکرار بود (Subathra *et al*., 2013).

شناسایی ژنوتیپی باکتریی جداسازی شده

از تجزیه و تحلیل توالی ژن کد کننده 16S rRNA به منظور تعیین خصوصیات رده‌بندی کلنی‌های جداسازی شده، استفاده شد. بدین منظور ابتدا DNA کلنی‌های جداسازی شده با استفاده از روش CTAB استخراج شد (Winnepenninckx *et al*., 1993). سپس با استفاده از DNA استخراجی و به‌وسیله آغازگرهای عمومی رفت (*fD1* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و برگشت (*rP2* (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' بخشی از توالی ژن کد کننده 16S rRNA تکثیر شد (Weisburg *et al*., 1991). اجزاء واکنش PCR شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase و ۱۷/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. چرخه دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. پس از خالص‌سازی قطعات تکثیری با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل شرکت Gene All، قطعات به منظور تعیین توالی به شرکت محصولات PCR به شرکت Bioneer فرستاده شدند. در نهایت توالی‌های به دست آمده به‌وسیله برنامه Blastn پایگاه داده NCBI با سایر توالی‌ها مقایسه گردید. به منظور رسم درخت فیلوژنتیک، توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI هم‌تراز و آن‌هایی که شباهت بالای ۹۷٪ را نشان دادند شناسایی و سپس با استفاده از نرم‌افزار MEGA6.06 و با استفاده روش Neighbor-joining درخت فیلوژنتیک رسم گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

تحلیل آماری

این آزمایش به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح فاکتوریل با عامل‌های نفت (سفید یا خام)، باکتری Microbacterium phyllosphaerae (ZS1.9)، Bacillus megaterium (ZS2.12)، Staphyloccoccus epidermidis (ZS3.170)، Streptomyces albogriseolus (ZS4.9) و Bacillus subtilis (ZS5.210) و زمان (۷، ۱۴ و ۲۱ روز) و در سه تکرار انجام گردید. آنالیز داده‌ها با کمک نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و نرم‌افزار MSTAT-C انجام گرفت. از نرم افزار Excel نیز جهت رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

در این پژوهش به طور کلی برای جداسازی میکرب‌های تجزیه کنندهٔ ترکیبات نفتی (نفت سفید یا نفت خام) ۵ سویه باکتری شناسایی شد. برای تهیه کنسرسیوم میکربی و شناسایی، از تجزیه و تحلیل توالی ژن کدکننده 16S rRNA به منظور تعیین خصوصیات رده‌بندی کلنی‌های جداسازی شده، استفاده شد. نتایج نشان داد که گونه‌های باکتری‌های جداسازی شده متعلق به ۵گونه مختلف از *Microbacterium phyllosphaerae* (ZS1.9)، *Bacillus megaterium* (ZS2.12)، *Staphyloccoccus epidermidis* (ZS3.170) و گونه‌های *Streptomyces albogriseolus* (ZS4.9)، *Bacillus subtilis* (ZS5.210) هستند.

جدول۱. تجزیه واریانس بررسی درصد تجزیه زیستی و میزان تجزیه اولیه در محیط کشت‌های حاوی هیدروکربن

		میانگین مربعات		
	درجه آزادی	درصد تجزیه زیستی	میزان تخریب اولیه
باکتری	۴	۴۳۸/۶۰*	۲۶۸/۲۳*
نفت	۱	۷۸۴۰*	۶۷۲/۴۰*
باکتری*نفت	۴	۰	۴/۰۱*
تکرار (باکتری* نفت)	۲۰	۱۹/۶۰*	۵/۳۷*
زمان	۲	۱۴۱۱۷/۵۰*	۱۱۵/۹۰*
زمان* باکتری	۸	۰	۴۱/۴۸*
زمان*نفت	۲	۶۰۲/۵۰*	۰/۴۳ns
زمان* باکتری* نفت	۸	۰	۰/۲۱ns
خطا	۴۰	۰	۰/۹۱
ضریب تغییرات(درصد)		۰	۵

*** نشان دهنده تفاوت در سطح ۵٪ می‌باشد.**

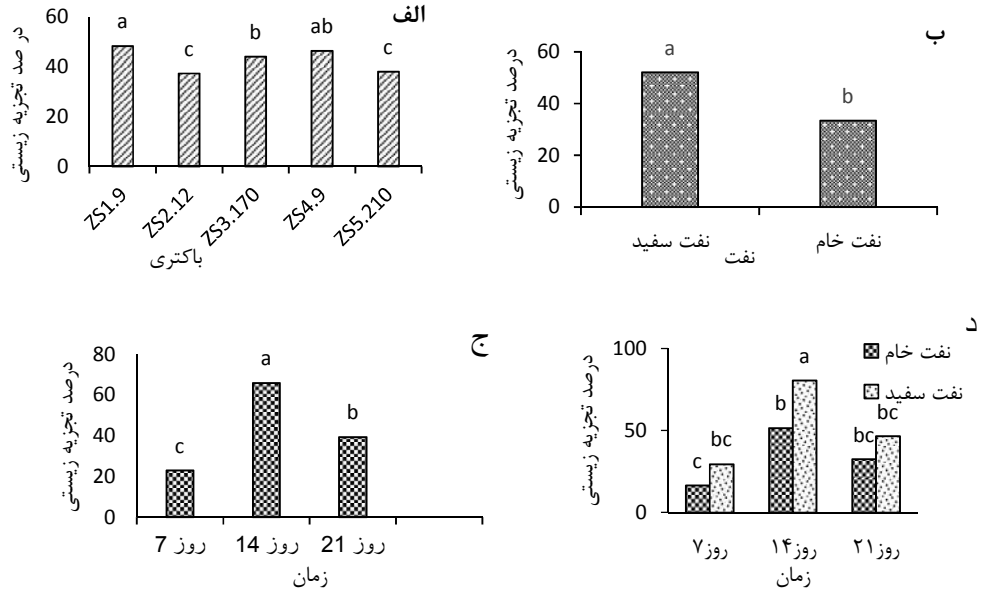
اندازه‌گیری قدرت تجزیه هیدروکربن‌ها

نتایج حاصل از تجزیه آماری و جدول (۱) تجزیه واریانس روی داده‌های مربوط به اندازه‌گیری قدرت تجزیه هیدروکربن‌ها توسط باکتری‌ها در حضور دو ماده نفتی (نفت سفید یا نفت خام) با غلظت ۱ درصد حاکی از آن است که فاکتورهای اصلی باکتری، نفت، زمان و اثر متقابل زمان در باکتری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. همچنین اثر متقابل تیمار باکتری در نفت و زمان در نفت در بررسی تجزیه زیستی باکتری‌ها با فرض صفر (نبودن تفاوت بین دو میانگین) معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر اصلی فاکتور باکتری به روش LSD نشان داد که بیشترین میانگین ۴۸/۳۳ درصد مربوط به باکتری (ZS1.9) بوده و بین این باکتری با باکتری (ZS4.9) با میانگین ۴۶/۳۳ درصد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و کمترین رشد با میانگین ۳۷/۳۳ درصد مربوط به باکتری (ZS2.12) می‌باشد (شکل ۱. الف). در بررسی مقایسه اندازه‌گیری قدرت تجزیه دو ماده نفتی (نفت سفید یا نفت خام) مشاهده شد که بیشترین تجزیه مربوط به ماده نفت سفید با میانگین ۵۲/۱۳ درصد می‌باشد و اختلاف معنی‌داری با تجزیه ماده نفت خام با میانگین ۳۳/۴۶ درصد دارد (شکل ۱. ب). از آنجایی که هیدروکربن‌ها ترکیبات غیر قطبی هستند، بنابراین میزان انحلال آن‌ها در آب بسیار پایین است و در نتیجه قابلیت دسترسی باکتری‌ها به آن‌ها به سختی خواهد بود. باکتری‌ها برای اینکه بتوانند از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده بهتری نمایند باید قادر به وارد کردن میزان بیشتری از فاز آلی (غیر قطبی) به فاز آبی (قطبی) باشند. به همین منظور هرچه سطح سلول باکتری آب گریزتر باشد یا به عبارت دیگر هیدروفوبیسیته سطح سلولی بیشتر باشد، تولید بیوسورفکتانت بیشتر می‌شود و می‌تواند میزان بیشتری از هیدروکربن‌ها را مورد استفاده قرار دهد (Adeli *et al*., 2013). باکتری‌ها بین نفت سفید و نفت خام، از نفت خام کمتر استفاده کرده‌اند. تعداد کلنی باکتری رشد یافته در محیط مایع حاوی نفت خام نسبت به نفت سفید کمتر بوده است که می‌توان آن را با دلایل زیر توجیه کرد. ماهیت مواد نفتی از هم متفاوت بوده و برخی از ترکیبات نفتی شکل خطی داشته و اصطلاحاً آلیفاتیک می‌باشند (نظیر گازوئیل) و استفاده از آن‌ها برای باکتری‌ها راحت‌تر می‌باشد. اما در مقابل برخی به دلیل وجود حلقه‌های آروماتیک سخت‌تر تجزیه می‌شوند و مشاهده می‌شود که با افزایش تعداد حلقه‌ها مقاومت ماده نفتی به تجزیه نیز افزایش می‌یابد (Ebrahimi *et al*., 2013). بررسی نتایج اثر زمان در مقایسه اندازه‌گیری قدرت تجزیه باکتری‌ها در دو ماده نفتی (نفت سفید یا نفت خام) نشان داد که زمان ۱۴ روز دارای بالاترین قدرت تجزیه با میانگین ۶۵/۹۷ درصد توسط باکتری‌ها می‌باشد. همچنین قدرت تجزیه باکتری‌ها در زمان ۱۴ روز با زمان ۷ و ۲۱ روز به ترتیب با میانگین ۲۲/۹۷ و ۳۹/۴۷ درصد تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۱. ج). Wang *et al*. (2015) یازده گونه باکتری متعلق به مناطق سردسیر را از لجن‌های نفتی جداسازی نمودند.

www.SID.ir

Archive of SID

از بین آن‌ها سه گونه متعلق به جنس‌های *Chryseobacterium*، *Bacillus* و *Pseudomonas* با توانایی بالا در تجزیه نفت خام برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. میزان تجزیه نفت خام این باکتری‌ها پس از گذشت ۸ روز و تحت شرایط دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۷، غلظت نمک ۱۰ گرم بر لیتر و غلظت نفت خام ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب ۶۲/۳، ۶۱/۶ و ۶۰/۹ برآورد شد. در بررسی میانگین اثر متقابل نفت در زمان، بالاترین میانگین مقایسه میزان قدرت تجزیه باکتری‌ها مربوط به زمان ۱۴ روز و نفت سفید با میانگین ۸۰/۴۶ درصد می‌باشد. زمان ۱۴ روز اختلاف معنی‌داری به ترتیب با زمان‌های ۷ و ۲۱ روز در نفت سفید (۲۹/۴۶و ۴۶/۴۶ درصد) و نفت خام (۱۶/۴۹ و ۳۲/۴۶ درصد) نشان داده است (شکل ۱.د). در طول زمان، تجزیه هیدروکربن‌ها در هر دو ماده نفتی (نفت سفید یا نفت خام) افزایش یافت. در ۷، ۱۴، و ۲۱ روز پس از تلقیح سویه باکتریایی، ۲۰، ۶۰ و ۴۰ درصد تجزیه مشاهده شد. به طور مداوم میزان نفت سفید تجزیه‌شده بیشتر از نفت خام بود، همان‌طور که برای باکتری، همه سویه‌ها در نفت سفید از نفت خام مؤثرتر بودند (شکل ۱.د). در پاسخ به روند تجزیه مواد نفتی بایستی به ماهیت مواد نفتی توجه نمود. در میان هیدروکربن‌های نفتی n– آلکان‌ها سریع‌تر از بقیه ترکیبات تجزیه شده و به دنبال آن آلکان‌های شاخه‌دار و ترکیبات حلقوی با وزن مولکولی پایین تجزیه می‌شوند. مقاوم‌ترین ترکیبات در مقابل تجزیه زیستی، آلکان‌های حلقوی می‌باشند. به عبارت دیگر ترکیبات اشباع شده خطی سریع‌تر تجزیه شده و هر چه ترکیب مورد نظر از نظر ساختار و ساختمان پیچیده‌تر می‌شود، نسبت به تجزیه مقاوم‌تر می‌باشد (Ebrahimi *et al*., 2013).



شکل ۱. مقایسه میانگین درصد تجزیه زیستی با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد (الف). باکتری، (ب). نفت، (ج). زمان، (د).زمان در نفت
حداقل یک حرف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ ٪ آزمون LSD است.

اندازه‌گیری قطر منطقه تجزیه

نتایج حاصل از تجزیه آماری و جدول (۱) تجزیه واریانس روی داده‌های مربوط به قطر منطقه تجزیه توسط کلنی‌های در حضور دو ماده نفتی (نفت سفید یا نفت خام) با غلظت ۱ درصد حاکی از آن است که فاکتورهای اصلی نوع باکتری، نوع ماده نفتی و همچنین فاکتور زمان و اثرات متقابل باکتری در نفت و زمان در باکتری با همدیگر در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشند. همچنین اثر متقابل تیمار زمان در نفت و زمان در باکتری در نفت مربوط به قطر منطقه تجزیه توسط کلنی‌ها معنی‌دار نبود. از نتایج آنالیز آماری چنین برآمد که بین ۵ باکتری کشت داده شده در دو محیط جامد که هر کدام شامل نفت سفید و نفت خام (۱٪ درصد) بودند، از نظر قابلیت رشد و استفاده از مواد هیدروکربن‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ وجود داشت. در این آزمایش مشاهده گستردگی در بررسی میانگین اثر متقابل باکتری در ماده نفتی قطر کلنی ۵ سویه باکتری (ZS1.9)، (ZS2.12)، (ZS3.170)، (ZS4.9) و (ZS5.210) نشان داد کلنی باکتری‌های کشت شده در نفت سفید از قطر بیشتری برخوردار بودند. کلنی (ZS3.170) نسبت به ۴ گونه باکتری دیگر بیشترین رشد قطری را در نفت سفید با میانگین ۲۹/۲۲ میلی‌متر داشت. همچنین (ZS1.9) کمترین قطر کلنی را در نفت خام با میانگین

www.SID.ir

Archive of SID

۱۳ میلی‌متر داشت (شکل ۲. الف). استفاده از روش سنجش قطر کلنی باکتری (یا تولید هاله شفاف) در انتخاب باکتری‌های کارآمد روشی مرسوم می‌باشد که ممکن است در موارد مختلف استفاده شود. نمونه بارز آن را در بررسی قطر کلنی و هاله شفاف اطراف کلنی در جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توان مشاهده نمود. Ebrahimi *et al.*, (2013) در بررسی فعالیت تجزیه زیستی گونه *Pseudomonas. lundensis* UTAR FPE2 از محیط BH به صورت مایع و جامد استفاده نمودند. آن‌ها مشاهده کردند که در محیط جامد، هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری فوق در حضور پارافین دارای قطر بیشتری بوده و در رتبه بعدی روغن معدنی و نفت خام قرار داشت. بررسی نتایج اثر متقابل نوع باکتری و زمان ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بر اندازه‌گیری اولیه میزان تجزیه هیدروکربن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به رنج‌های زمانی در نظر گرفته شده بیشترین رشد کلنی مربوط به سویه (ZS3.170) با میانگین ۳۰/۶۶ میلی‌متر در زمان ۱۴ روز است و کمترین افزایش قطر کلنی مربوط به (ZS1.9) با میانگین ۱۴/۵ میلی‌متر در زمان ۷ روز است (شکل ۲. ب). Subathra *et al.* (2013)، صد و سیزده باکتری را از مناطق آلوده به نفت سواحل شمال شرقی چنای واقع در هند جداسازی نمودند. پس از اندازه‌گیری قطر منطقه تجزیه، چهار باکتری با بیشترین قطر ناحیه تجزیه، برای انجام مراحل بعدی انتخاب گردیدند. از این چهار باکتری دو تا متعلق به جنس *Pseudomonas* و دو باکتری دیگر متعلق به جنس *Bacillus* بودند. در پژوهش آنها مشاهده شد ۱۴ روز پس از کشت بر روی محیط حاوی ۱ درصد نفت خام، قطر منطقه تجزیه برای هر کدام از باکتری‌ها به ترتیب ۱۱، ۱۰، ۹ و ۸ میلی‌متر، سرعت رشد به ترتیب ۰/۸۴، ۰/۷۸، ۰/۷۱ و ۰/۷۴ نانومتر و قدرت تجزیه به ترتیب ۲۵، ۱۰، ۱۵ و ۱۵ درصد به دست آمد. همچنین به دلیل غیر معنی‌دار بودن اثر متقابل نفت در زمان که مربوط به کارایی قطر منطقه تجزیه توسط کلنی‌ها است به بررسی جداگانه اثرات اصلی نفت و زمان این فاکتورها اقدام شد. نتایج اثر نفت (نمودار ۷-۴) بر اندازه‌گیری اولیه میزان تجزیه هیدروکربن‌ها نشان داد که نفت سفید دارای بیشترین رشد کلنی با میانگین ۲۱/۸ میلی‌متر بود. همچنین میزان رشد کلنی در نفت سفید نسبت به نفت خام با میانگین ۱۶/۳۳ میلی‌متر تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۲.ج). بررسی نتایج اثر زمان بر اندازه‌گیری اولیه میزان تجزیه هیدروکربن‌ها نشان داد که زمان ۱۴ روز دارای بیشترین رشد کلنی با میانگین ۲۱/۳ میلی‌متر بود. همچنین رشد کلنی در زمان ۱۴ روز با زمان ۷ و ۲۱ روز به ترتیب با میانگین ۱۷/۶ و۱۸/۳ میلی‌متر تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۲. د). Udgire *et al.* (2015) به ارزیابی قابلیت باکتری‌های متعلق به جنس *Bacillus* و بومی هند برای حذف نفت خام در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. آن‌ها قطر منطقه تجزیه ایجاد شده طی مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد توسط این باکتری‌ها را بین ۷/۶۷ تا ۱۱ میلی‌متر تخمین زدند. همچنین میزان تجزیه نفت خام را پس از ۲۱ روز کشت در محیط مایع و با شرایط دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دو غلظت ۱ و ۱۰٪ نفت خام به ترتیب ۶۶ و ۵۸ درصد محاسبه نمودند. محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش نوترینت آگار حاوی نفت خام بود که یک محیط کامل برای کشت باکتری می‌باشد. این در حالی است که محیط کشت مورد استفاده در پژوهش حاضر محیط حداقل بود که به جز مواد نفتی (نفت سفید یا نفت خام) منبع کربن دیگری در آن وجود نداشت. در نتیجه با توجه به انتخاب شرایط سخت‌تر برای رشد باکتری‌ها، مشاهده شد، قطر منطقه تجزیه و قدرت تجزیه باکتری‌*های* جداسازی شده در پژوهش حاضر بیشتر از پژوهش Udgire *et al.* (2015) بود.

اندازه گیری سرعت رشد

نتایج حاصل از تجزیه آماری و جدول (۲) تجزیه واریانس روی داده‌های حاصل اندازه‌گیری سرعت رشد باکتری‌ها در حضور دو ماده نفتی حاکی از آن است که فاکتورهای اصلی نوع باکتری، نوع ماده نفتی همچنین فاکتور زمان و اثرات متقابل آن‌ها با همدیگر در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. سرعت رشد باکتری‌ها مورد بررسی در ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع حداقل، با حذف هرگونه منبع کربن و استفاده از نفت سفید و نفت خام (۱درصد) به عنوان منبع کربن و انرژی، در زمان‌های ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز مورد مطالعه قرار گرفت. در بررسی میانگین اثر متقابل باکتری در ماده نفتی بیشترین میانگین (۰/۱۶۲ درصد) سرعت رشد مربوط به باکتری (ZS3.170) در حضور ماده نفت سفید می‌باشد و اختلاف معنی‌داری در حضور سایر مواد نفتی نشان داده است.

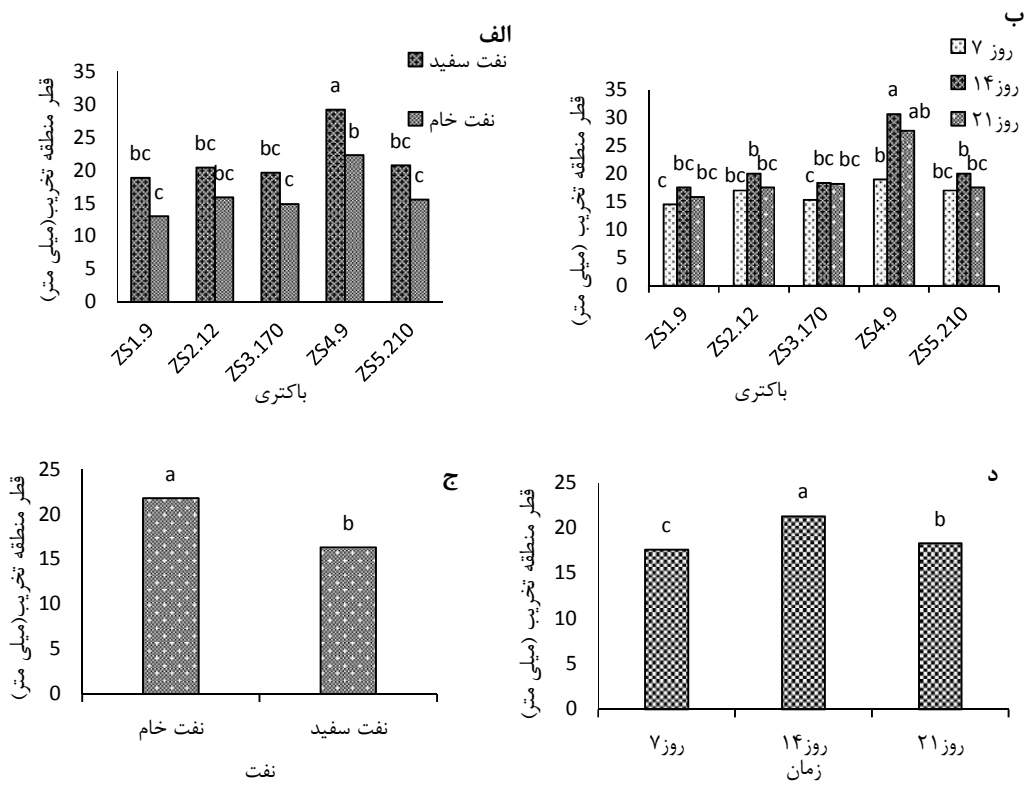
جدول ۲. تجزیه واریانس بررسی قدرت رشد باکتری‌ها در محیط کشت هیدروکربنی

		میانگین مربعات
	درجه آزادی	قدرت رشد باکتری
باکتری	۴	۰/۰۱۷*
نفت	۱	۰/۰۵۶*
باکتری*نفت	۴	۰/۰۰۶*
تکرار (باکتری* نفت)	۲۰	۰
زمان	۳	۰/۰۹۴*
زمان* باکتری	۱۲	۰/۰۰۳*
زمان*نفت	۳	۰/۰۱۳*
زمان* باکتری* نفت	۱۲	۰/۰۰۳*
خطا	۶۰	۰
ضریب تغییرات(درصد)		۱۲/۰۱۳

*** نشان دهنده تفاوت در سطح ۵٪ می‌باشد.**

www.SID.ir

Archive of SID

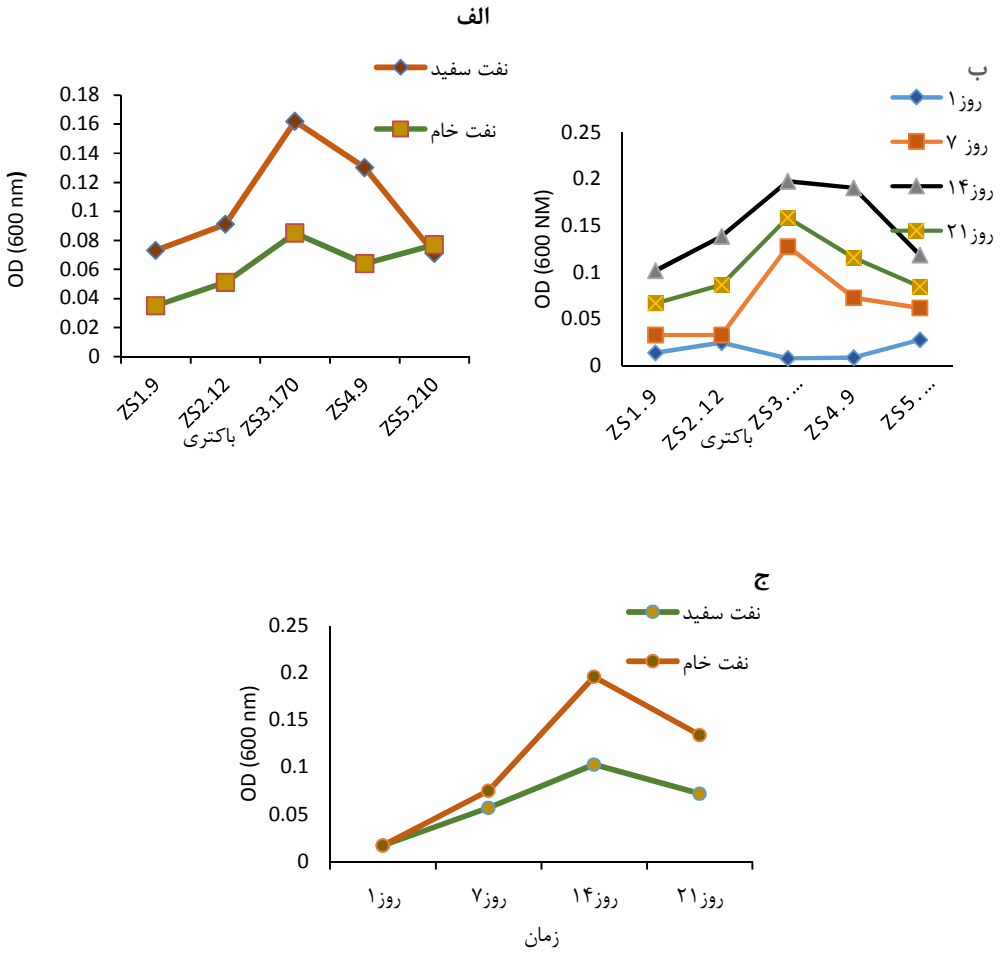


شکل ۲. مقایسه میانگین قطر منطقه تخریب با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد (الف). باکتری در نفت، (ب). باکتری در زمان، (ج). نفت، (د). زمان
حداقل یک حرف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ ٪ آزمون LSD است.

همچنین باکتری (ZS1.9) در نفت خام با میانگین ۰/۰۳۵ درصد کمترین افزایش جمعیت را داشت (شکل ۳. الف). از این مطلب می‌توان نتیجه گرفت که همه باکتری‌های مزبور قادر به تجزیه نفت خام و استفاده از منبع کربن می‌باشند که نتیجه آن افزایش در جمعیت باکتری و جذب درصد نور بیشتر می‌باشد. در بررسی اندازه‌گیری سرعت رشد باکتری‌ها اثر متقابل باکتری در زمان بالاترین سرعت رشد به ترتیب با میانگین ۰/۱۹۸ و ۰/۱۹۱ درصد مربوط به باکتری‌های (ZS3.170) و (ZS4.9) در زمان ۱۴ روز می‌باشد که اختلاف معنی‌داری نسبت به هم نشان نداده است. با افزایش زمان، جمعیت باکتری‌ها افزایش می‌یابد و این افزایش در مورد باکتری (ZS3.170) و (ZS4.9) به ترتیب نزدیک به ۲۵ و ۲۱ برابر و در مورد سه باکتری (ZS1.9)، (ZS2.12) و (ZS5.210) به ترتیب این افزایش نزدیک به ۷، ۵/۵ و ۴ برابر می‌باشد (شکل ۳. ب). در مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل فاکتور ماده نفتی در زمان، بالاترین تجزیه مربوط به ماده نفت سفید با میانگین ۰/۱۹۶ درصد در زمان ۱۴ روز به دست آمد و اختلاف معنی‌داری به ترتیب با میانگین ۰/۱۳۴ و ۰/۰۷۵ درصد نسبت به زمان‌های ۲۱ و ۷ روز نشان داد. این در حالی است که کمترین تجزیه به ترتیب با میانگین ۰/۱۰۳، ۰/۰۷۲ و ۰/۰۵۷درصد نسبت به زمان‌های ۱۴، ۲۱ و ۷ روز مربوط به ماده نفت خام بود (شکل ۳. ج). استفاده بیشتر باکتری‌ها از نفت سفید نسبت به مواد نفت خام را می‌توان با دلایل زیر توجیه کرد. ماهیت مواد نفتی از هم متفاوت بوده و برخی از ترکیبات نفتی مانند هیدروکربن‌های نفتی موجود در نفت سفید برشی از نفت خام است و دارای حدود ۹ تا ۱۶ اتم کربن است و بیش از ۸۰ درصد از آن شامل مواد و ترکیبات آلکانی می‌باشد. همچنین نفت خام عمدتاً از ترکیبات هیدروکربنی با وزن مولکولی کم تا زیاد شامل متان n– آلکان‌های آلیفاتیک، پنتان‌ها، هگزان‌ها، هپتان‌ها، پارافین‌های حلقه‌ای، ترکیبات حلقه-ای دیگر شامل سولفور، نیتروژن و فلزات سنگین (۳- .۰/۰۵ درصد) تشکیل شده است (jafari *et al*., 2016). همچنین (Bayat *et al*., 2015) مدت زمان انکوباسیون را مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که هرچه زمان ماند افزایش یابد، جمعیت میکروبی سیستم بیشتر خواهد شد که این امر به افزایش سنتز آنزیم و کارایی سیستم منجر می‌شود. همچنین سبب می‌شود میکروب‌ها فرصت بیشتری برای تلقیح و عادت کردن به آلاینده‌ها پیدا کرده و بتوانند درصد بیشتری از ترکیبات را تخریب کنند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ مقایسه میانگین اندازه‌گیری سرعت رشد باکتری‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد (الف). باکتری در نفت، (ب). باکتری در زمان، (ج).زمان در نفت

حداقل یک حرف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ ٪ آزمون LSD است.

شناسایی باکتری

جستجو در پایگاه داده NCBI بانک ژن با توالی بخشی از ژن 16S rRNA نشان داد که تمام باکتری جدا شده از توده خاک در استان خوزستان تشابه ۱۰۰٪ با گونه‌های نوع (ZS1.9) *phyllosphaerae* *Microbacterium* (ZS2.12) *Bacillus megaterium* (ZS3.170) *Staphylococcus epidermidis*، *Streptomyces albogriseolus* (ZS4.9) و *Bacillus subtilis* (ZS5.210) داشتند. همه توالی ها در بانک ژن ثبت گردید و به هر کدام شماره ای اختصاص گردید.

نتیجه‌گیری

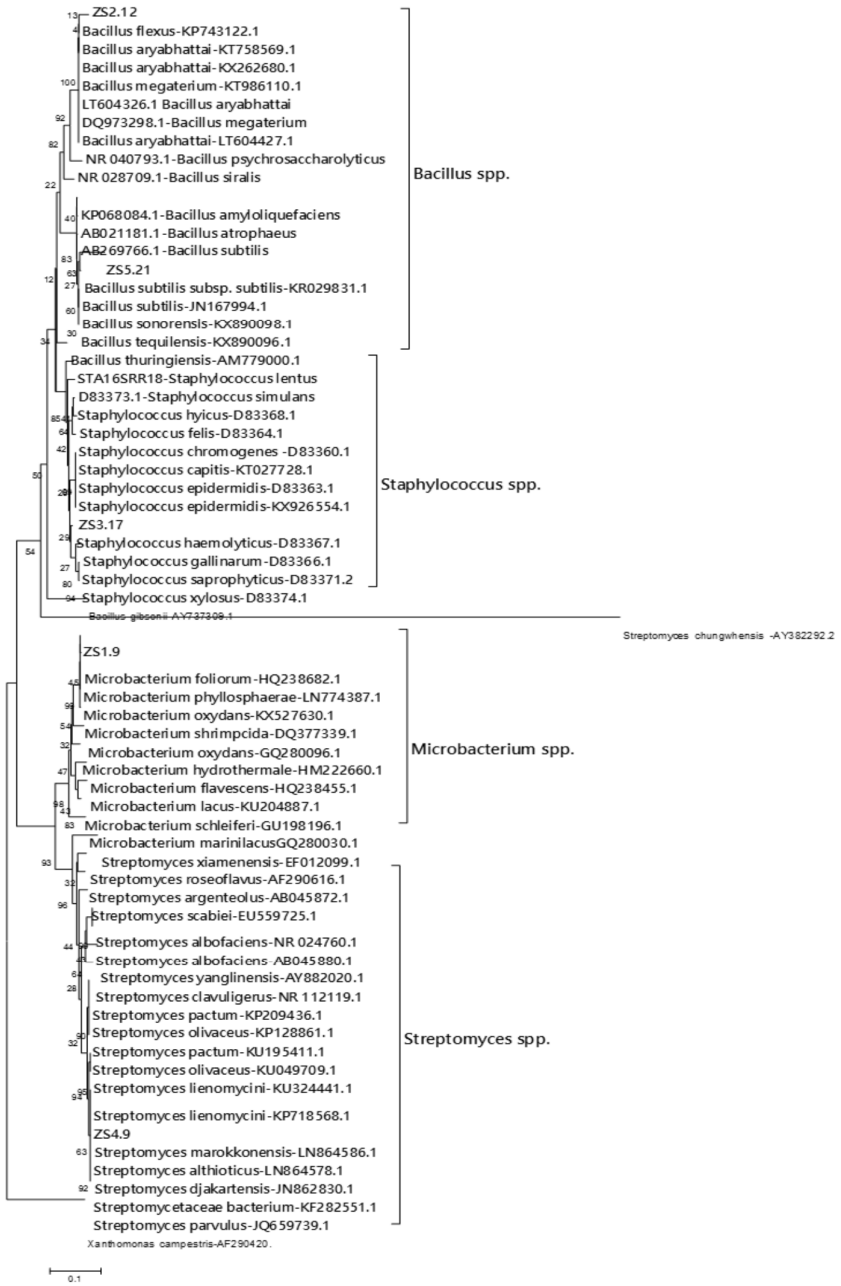
باکتری (ZS1/9) دارای بالاترین میزان تجزیه زیستی در باکتری‌ها بود (۴۸/۳۳ درصد). بیشترین درصد تجزیه زیستی مربوط به سویه‌های موجود در نفت سفید با میانگین ۸۰/۴۶ میلی‌متر در ۱۴ روز بود. در اندازه‌گیری اولیه میزان تخریب هیدروکربن‌ها مشاهده شد. کلونی باکتری‌های کشت شده در نفت سفید از قطر بیشتری برخوردار بودند. کلونی (ZS4.9) نسبت به ۴ گونه باکتری دیگر بیشترین رشد قطری را در نفت سفید با میانگین ۲۹/۲۲ میلی‌متر داشت. با توجه به رنج‌های زمانی در نظر گرفته شده، بیشترین رشد کلونی مربوط به سویه (ZS4.9) با میانگین ۳۰/۶۶ میلی‌متر در زمان ۱۴ روزه است. نتایج نشان داد باکتری‌ها در نفت سفید از افزایش جمعیت بیشتری برخوردار بودند. (ZS3.170) نسبت به ۴ گونه باکتری دیگر بیشترین افزایش جمعیت را در نفت سفید با میانگین.۰/۱۶۲ داشت. در این مطالعه با جداسازی و شناسایی گونه‌های باکتریایی که توانایی رشد و تکثیر در محیط-های آلوده به مواد نفتی را داشتند مشخص گردید که حذف این ترکیبات نفتی از محل‌های آلوده می‌تواند با استفاده از باکتری‌های

www.SID.ir

Archive of SID

بومی جداسازی شده از همان خاک صورت پذیرد. از آن جایی که بر روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی در این منطقه کاری انجام نشده است لذا تحقیق حاضر جدید می‌باشد و امید است نتایج حاصل از این پژوهش در تعیین اولویت‌های بهداشتی توسط مسئولین محیط زیست به کار برده شود.

رسم درخت فیلو ژنیک



REFERENCES

Adeli, M., Shahian, M.A. And Karimi Nick, A. (2013). Isolation, Identification and Characterization of Two Shiquan Species of the Biosurfactant Producer from the Persian Gulf. The World of Germs, 6(1). (In Farsi)

Akpoveta, O.V., Egharevba, F. and Medjor, O.W. (2011). A pilot study on the biodegradation of hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. International. *Journal of Environmental Sciences*., 2(1): 54-67.

Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol, Rev*., 45: 180-209.

Bayat, Z., SHaheyan, M.H. and Askari, M. (2015). Isolation and identification of crude petroleum degrading bacteria from the Haustrum scobina

www.SID.ir

Archive of SID

collected from the Persian Gulf (Bandar Abbas coastal area). Quarterly Journal of Biological Microorganisms., 5(17): 61- 72. (In Farsi)

Cabello, M.N. (1997). Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*., 22: 233–236.

Das, R. and Tiwary, B.N. (2014). Production of indole acetic acid by a novel bacterial strain of Planomicrobium chinense isolated from diesel oil contaminated site and its impact on the growth of Vigna radiata. *European Journal of Soil Biology*., 62: 92-100.

Ebrahimi Pour, GH. H., Marzban, A.A., karkhanh, M. And Fakhary, C. (2012). Investigation of biological removal of oil hydrocarbon contaminants by isolated bacteria from oil contaminated soils. *Journal of Microbiological Biotechnology, Islamic Azad University*., 4 (13): 13-20. (In Farsi)

Ebrahimi, M., Sarikhani, M. R. And Fallah, A.R. (2013). Investigation of Biodegradation of Petroleum Gas, Toluene and Phenanthrene Oil by Three Pantoea P and *5 Pseudomonas putida P13, Pseudomonas fluorescens CHAO agglomerans*. *Journal of Water and Soil Science*., 23(2): 29-41. (In Farsi)

Emtiazi, G., Shakarami, H., Nahvi, I. and Mirdamadian, SH. (2005). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas sp*. and transformed Escherichia coli. *African Journal of Biotechnology*., 4(2): 172-176.

Hamman, S. (2004). Bioremediation capabilities of white rot fungi. *BI570-review article*.

Jafari Hafsjani, A., Asadi Koorrchal, S.H., Omaye, M. and Bayborde, M. (2016). Journal of Soil Management and Sustainable Production., 6(4): (In Farsi)

Khodaveisi, V. (2012). Effect of soil pollution on kerosene on physiological characteristics and growth of some vegetables. Master's degree in Agricultural and Natural Resources University Ramin Khuzestan. (In Farsi)

Mohsenzadeh, F. (2011). Investigating the Effluent Efficiency of Oil Pollutants by Native Bacterial Strains Isolated from Polluted Soils in Cooling Areas (Case Study: Tabriz Refinery) Journal of Cellular and Molecular Research. *Journal of Biology.,* 27(3). (In Farsi)

Olalemi, A.S. and Arotupin, D.J. (2012). Effect of refined petroleum contamination on bacterial population and physicochemical characteristics of cultivated Agricultural soil. *Journal of microbiology, Biotechnology and Food Sciences*., 2(2): 684-700.

Rahman, K.S., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I.M.(2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource technology., 85(3): 257- 261

Schaad, N.W., Joens, J.B. and Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. *A.P.S. USA*: .373.

Sparks, D.L. (2003). Environmental Soil Chemistry. 2ed Academic Press. California. USA.

Subathra, M.K., Immanuel, G.and Suresh, A.H. (2013). Isolation and Identification of hydrocarbon degrading bacteria from Ennore creek. *Bioinformation*., 9:150

Udgire, M., Shah, N. and Jadhav, M. (2015). Enrichment, Isolation and Identification of Hydrocarbon Degrading Bacteria International. *Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*., 4: 708-713.

Wang, J., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, B.and Zhang, G. (2015). Cold-adapted bacteria for bioremediation of crude oil-contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*., 91: 2286-2297.

Weisburg, W.G., Barns, S.M. and Pelletier, D.A. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*., 173: 697–703.

Winnepenninckx, B., Backeljau, T.and Dewachter, R. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. National Institutes of *Health*., 9: 407.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I. and Okuyama, H. (2004). Isolation and Characterization of Nonel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and Serratia marcescens possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel oil, and Lubricating Oil. *Current Microbiology*., 49: 415-422.

www.SID.ir