Archive of SID

فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال دوم، شماره ۶، بهار ۱۳۸۹

بررسی قابلیت تجزیه بیولوژیکی نفتالین با استفاده از جمعیت میکروبی خاک استان آذربایجان شرقی

خسرو صدیق بیان[1*]، علیرضادهناد[2]، ناصرمدیر شهلا[3]،عبدالحسین ناصری[4] و هایده مبین[5]

۱ .دانشکده پزشکی و میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحدزنجان، نشانی مکاتبه: تبریز- چهارراه ابوریحان- آبادانی مسکن- دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، نشانی اینترنتی: sadighbayan@yahoo.com *۲. مدیریت منطقه شمال غرب و غرب کشور،۳. گروه شیمی کاربردی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز،۴. گروه شیمی کاربردی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز،۵. دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز*

چکیده

هیدروکربن‌های آروماتیک پلی سیکلیک (PAH) مانند آنتراسن, نفتالین و بنزن از مهمترین آلاینده‌های سمی و سرطان‌زا می‌باشند که در بسیاری از موارد، در اثر دفع پسماندهای صنایع نفت و پتروشیمی آثار سوء فراوانی به محیط زیست وارد می‌سازند. جهت پاکسازی این مواد از خاک، روشهای بیولوژیکی و استفاده از پتانسیل میکروارگانیسم‌های بومی خاک، دراولویت قراردارند که طی این روش ها، ارگانیسمها با تغذیه از کربن این مواد، آب، دی اکسیدکربن و بیومس تولید می‌کنند. شایان ذکر است که همواره نتیجه biodegredation کامل، تولید آب و دی اکسیدکربن نیست. در این مطالعه توانایی ارگانیسمهای جدا شده از خاک مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی در تجزیه نفتالین (بعنوان الگوئی از هیدروکربنهای آروماتیک) مورد بررسی قرار گرفت. میکروارگانیسم های مذکور در محیط کشت YGM آگار جداسازی و خالص شد. نفتالین با غلظت ۱۰۰۰میلی‌گرم در یک لیتر از محیط مولر هینتون براث تهیه و به مقدار ثابتی از باکتری اضافه گردید و به مدت یک هفته در ۲۸°C و شیکر ۱۲۰ rpm تیمار و میزان تخریب این ماده با اسپکتروفتومتر دو شعاعی ارزیابی شد. تعداد ۴۰سوش باکتری جدا و در غلظت فوق ۳۷باکتری موثر شناسایی شد و میزان تخریب نفتالین از ۲/۹ تا ۲/۹۲ درصد تعیین وتعداد ۶ سوش باکتری باعث تجزیه بیش از ٪۵۰ نفتالین گردیدند. با این روش پاکسازی بیولوژیکی، قادر خواهیم بود نفتالین موجود در خاکهای آلوده و پساب ها را تجزیه، تخریب و در نهایت خاک های آلوده را بازیافت و سالم نمائیم.

واژگان کلیدی: میکروارگانیسم های خاک، تخریب بیولوژیکی، نفتالین، پاکسازی زیستی.

مقدمه

هیدروکربنهای آروماتیک پلی سیکلیک (PAH) از دو یا چند حلقه شش عضوی تشکیل شده‌اند که این حلقه‌ها توسط اشتراک یک جفت اتمهای کربن بین حلقه‌ها به هم متصل‌شده‌اند. ساده‌ترین عضو این گروه نفتالین ($C_{10}H_8$)است که در ساختمان مولکولی آن به کربنهای مشترک بین دو حلقه، اتم هیدروژن متصل نیست(۱)، نفتالین ترکیب کریستالی سفید ،جامد و فراری می‌باشد که محلول در بنزن، الکل، اتر، تولوئن و نامحلول در آب بوده وزن مخصوص آن در دمای ۲۰/۴°C، ۱/۱۴۵ دالتون می‌باشد. دارای نقطه ذوب ۴/۸۰°Cو نقطه‌جوش ۹۶/۲۱۷°C و یک ماده سمی بوده و میزان آلوده‌کننده آن در هوا معادل ۱۰ppm می‌باشد (۲و۳). هیدروکربن‌های آروماتیک جزء آلاینده‌های نفتی می‌باشند که از منابع مختلف شامل صنایع پتروشیمی، فاضلابهای صنعتی و خانگی، استخراج مواد نفتی،داروسازی، رنگ، پلاستیک، حشره‌کش و غیره وارد اکوسیستم‌های آب و خاک می‌شوند و بطور مستقیم به انسان منتقل و عوارضی از

www.SID.ir

Archive of SID

جملـه سـرطان را منجـر مـی‌گردنـد(۴، ۵ و۶). تـاکنون ۱۶ترکیـب PAH در فهرسـت سـازمان حفاظـت محـیط زیست آمریکا، بعنوان آلاینده‌های مهم آورده شده است. از مهمترین آنها مـی‌تـوان بـه نفتـالین، آنتراسـن، فنـانترن، فلورن، کریزن، فلورانتن، پیرن و مشتقات آنها اشـاره کـرد (۷،۸ و۹).

راههای اصلی جذب این مواد به بدن از طریق تنفسـی و پوستی است. سمیت آنهـا بـه ترکیـب فیزیکوشـیمیایی، سمیت ذاتی، متابولیتها و داروهای کلینیکی بسـتگی دارد. برای حلالهایی مثـل بنـزن و اسـتیرن، متابولیتهـا سـموم اصلی هستند(۱۰).

عمده‌ترین ارگانهای هدف بـرای ترکیبـات آروماتیـک، سیستم عصبی، کبـد، کلیـه‌هـا، پوسـت، شـش‌هـا، غشـاء مخاطی راههای هوایی، چشم‌ها هستند (۱۱). مواجهه حاد و مزمن با غلظت‌هـای سـمی از حلالهـای تنفسـی ممکـن است باعث آشفتگی رفتاری، آتروفـی مغـزی، عملکـرد بـد مغـزی، دیـوانگی و ... شـود. ترکیبـات آروماتیـک پلـی سیکلیک، چربی‌دوست هستند. بنابراین علاقه به بافتهای با محتوی چربی بالا مثل مغز و کبد دارنـد(۱۲و۱۳). جـذب پوستی به متغیرهایی مثـل غلظـت حـلال، مـدت تمـاس، ضخامت، شرایط و میزان عروق پوستی، سطح در دسترس، مرتبط است. سوختگی، آسـیب‌هـا و دانـه‌هـای پوسـتی و افزایش دمای پوست بدلیل افزایش جریان خون به پوسـت جذب حلال را افزایش مـی‌دهـد(۱۴). ازآنجاکـه ترکیبـات آروماتیک از مشتقات نفت و محصولات آن مـی‌باشـند لـذا توجه به صنعت نفت، پتروشیمی و فرآوری و آلـودگی‌هـای مربوطه ضروری به نظر می‌رسد(۱۵). نفت خام بـا بـیش از ۳۴۰ فرآورده یکی از اصلـی‌تـرین منـابع انـرژی و نیـروی محرکه اقتصـادی جهـانی اسـت و ایـران ۹ درصـد از کـل مخازن نفتی جهان را در اختیار دارد. آلـودگی‌هـای نفتـی تقریباً یک پیامد اجتناب ناپذیر از افزایش سریع جمعیت و مصرف انرژی است. مواد نفتی و مشتقات آنها در اثر حمـل و نقل یا ذخیره‌سازی ممکن است موجـب آلـودگی خـاک شود هر قدر مواد نفتی بـه عمـق بیشـتری از خـاک نفـوذ کنند رفع آن آلودگی مشکل‌تر خواهد بود(۱۶و۱۷). برخی از باکتریها و میکروارگانیسم‌ها در خاک می‌تواننـد موجـب تجزیـه مـواد نفتـی شـوند (۱۸و۱۹). پاکسـازی زیسـتی (Bioremediation) یکی از روشـهای اصـلی پاکسـازی محیطی می‌باشد که در این روش از موجودات زنـده بـویژه باکتری ها، قارچ‌ها و گیاهان به منظور تجزیه آلاینـده‌هـای محیطـی و تبـدیل آنهـا بـه ترکیبـات غیرسـمی اسـتفاده مـی‌شـوند(۲۰و۲۱). ایـن میکروارگانیسـم‌هـا ترکیبـات هیـدروکربنی را بـه دی اکسـید کـربن، بیـومس و یـا محصولات دیگر تبدیل می‌کنند. کارایی و سـرعت فرآینـد تجزیه هیدروکربن‌ها به نوع ترکیبات آلاینده، طبیعت ماده آلوده شده با ترکیبات نفتی، شرایط محیطـی و ویژگیهـای جمعیـت میکروبـی بسـتگی دارد(۵ و ۲۲). اصـولاً میکروارگانیسمها به کمک ۳ فرآورده اصلی قادر به تجزیـه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند:

۱-آنزیمها: آنـزیم‌هـای مونواکسـیژناز و دی اکسـیژناز مهمترین آنزیم‌های مـوثر در تجزیـه هیـدروکربنها بـوده و فرآورده حاصل از این آنزیم‌ها، الکل‌ها هستند(۲۰و۲۳).

۲- *بیوسورفکتانتها*: مـواد بیولوژیـک دارای گروههـای آب دوست و آب گریز در سطح سلول هستند کـه بوسـیله تعداد زیادی از میکروارگانیسمها تولید می‌شوند بـر اسـاس ساختار شیمیایی به گروههای گلیکولیپیدی، فسفولیپیدی، اسیدهای چرب و لیپوپلی‌ساکاریدها طبقه‌بندی می‌شـوند. بیوسورفکتانت ها از طریق امولسیونه کـردن و آزاد کـردن هیدروکربنهای جـذب شـده بـه مـواد آلـی خـاک، سـبب افزایش غلظت آبی ترکیبـات هیـدروفوبیک شـده و باعـث افزایش سرعت انتقال جرم می‌شـود و بـه ایـن وسـیله بـه تسریع تجزیه زیستی کمک می‌کنند (۲۴،۲۵و۲۶).

۳- *اسیدها و حلال هـا*: بسـیاری از میکروارگانیسـمها قادرند با استفاده از هیدروکربنها به عنـوان منبـع کـربن و انرژی، اسیدها و حلالهای مختلف نظیر استن، اتر، بنـزن و اسـید اگزالواسـتیک تولیـد کننـد کـه باعـث حـل شـدن هیدروکربنهای نفتی مـی‌شـود(۲۷). میکروارگانیسـم‌هـای متعددی در این عمل نقش دارند که مهمترین آنها عبارتند از:

Pseudomonas – Bacillus-Rhodococcus-Mycobacterium- Acinetobacter-Staphylococcus - clostridium – Proteus – Micrococcus (۶،۲۳،۲۸،۲۹و ۳۰)

اصولاً هیچ میکروارگانیسمی به تنهایی قادر بـه تجزیـه کامل هیدروکربنهای نفتی به دی اکسـید کـربن و آب بـه عنوان محصول نهایی نیسـت. امـروزه بـا کمـک مهندسـی

www.SID.ir

Archive of SID

ژنتیک چندین پلاسمید را درون باکتری‌ها به خصوص سودوموناس قرار داده‌اند تا بتوانند چندین مشتق نفتی را بطور همزمان تجزیه کنند. محققان کانادایی چهار پلاسمید *PKT230*، *PPK2033*، *PHG-2*، *PAC25* را درون سودوموناس پوتیدا قرار داده و سویه‌ای از مهندسی ژنتیک شده را تولید کرده‌اند که قادر است بطور همزمان نفتالین، پارافین، بنزن و آسفالتن را تجزیه کند (۱۴و۳۰).

این مطالعه در نظر دارد توانایی ارگانیسمهای جدا شده از خاک مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی در تجزیه نفتالین رامورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش ها

در این مرحله از دو نوع خاک زراعی وبایراستان آذربایجان شرقی جهت ایزوله کردن باکتریهای موثرنمونه برداری شد. پس از کندن گودالی به عمق ۳۰ سانتیمتر در ناحیه مشخص، در حدود ۴۰۰ گرم خاک نمونه‌برداری شده در پاکت‌های پلاستیکی در باز (جهت تبادل اکسیژن) ریخته و به آزمایشگاه منتقل گردید. اطلاعات هر نمونه شامل محل نمونه‌برداری، ارتفاع، طول و عرض جغرافیایی روی هر پاکت الصاق شد). پس از تهیه رقت 10^{-1} تا 10^{-4} از نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی، از هر کدام از رقت‌ها ۱۰۰میکرو لیتر در پلیت حاوی Starch Casein agar کشت داده و در دمای $28^{\circ}C$ به مدت یک هفته در انکوباتور (Inculab ساخت کشور ژاپن) قرار داده شد. سپس کلنی‌های رشد یافته جهت تقویت و خالص‌سازی در محیط Yeast Glucose Malt Agar با شرایط انکوباسیون فوق کشت داده شد (۵،۲۰ و۳۱). در لوله‌های فالکون در پیچدار برروی ۲۵میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث در شرایط استریل ۲۵میلی گرم از نفتالین خالص، توزیع و اضافه گردید(۱۵،۱۶ و۱۸). سپس از هرکدام از باکتریهای خالص شده در محیط کشت Tryptic Soy Broth سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند تهیه شده و به میزان ۵/۰ میلی لیتراز آن به داخل لوله فالکون اضافه شد. لوله‌های فالکون در داخل انکوباتور شیکردار(ساخت شرکت پارس آزما_ایران) دردمای $28^{\circ}C$و ۱۲۰دور در دقیقه به مدت یک هفته قرارداده شد تا باکتری ها بتوانند نفتالین موجود راتجزیه کنند (۱۴،۱۸و ۳۲).

پس از این مدت محتویات لوله‌های فالکون درداخل هود و در شرایط استریل، به یک قیف دکانتاسیون ۱۰۰میلی لیتری منتقل شده و جهت جداسازی نفتالین باقیمانده، از حلال آلی تولوئن، استفاده شد. با افزودن ۱۰سی سی تولوئن به قیف و چند بار بهم زدن دو فاز تشکیل شد. فاز پائین شامل محیط کشت و باکتریها بوده و فاز بالایی شامل تولوئن و نفتالین باقیمانده بوده است(۱۶و۲۰). فاز رویی را در یک شیشه درب دار جمع‌آوری کرده و تا موقع قرائت میزان OD (جذب نوری) در یخچال $4^{\circ}C$ نگهداری شد. جهت سنجش OD نمونه‌ها، ابتدا باید میزان حداکثر جذب نوری (λ_{max}) نفتالین مشخص شود برای این منظور استاندارد رقت‌های مختلف از نفتالین در تولوئن تهیه شده و جذب نوری آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر دو شعاعی (Shimadzu ساخت ژاپن) در مقابل محلول بلانک (تولوئن خالص) قرائت و میزان λ_{max} نفتالین تعیین شد. سپس در این طول موج، جذب نوری نمونه‌های مورد آزمایش را یادداشت کرده و با توجه به منحنی رسم شده میزان متفاوت کاهش نفتالین در نمونه‌های مختلف مشاهده گردید(۸ ، ۱۳و۳۱). درصد تخریب نفتالین توسط باکتریها از رابطهٔ مقابل محاسبه می شود:

$$\text{درصد تخریب} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

A_1: جذب هیدروکربن قبل از تخریب

A_2: جذب هیدروکربن بعداز تخریب توسط میکروارگانیسم

نتایج وبحث

در اثر کشت نمونه‌های مختلف خاک، ۴۰سوش باکتری خالص بدست آمد. پس از مراحل تیمار باکتریهای جدا شده با مقدار مشخص نفتالین، ۳۷سوش باکتریایی توانایی تجزیه و تخریب نفتالین در شرایط *In-vitro* را نشان دادند. با اندازه‌گیری جذب نوری استاندارد نفتالین در مقابل بلانک در محدوده طول موج ۵۰۰ nm-۲۵۰، λ_{max} نفتالین ۲۸۸ nmتعیین شد(نمودار ۱). طیف جذبی نمونه‌ها پس از تیمار میزان معینی از نفتالین با باکتریهای مختلف و استخراج نفتالین باقی مانده، در طول

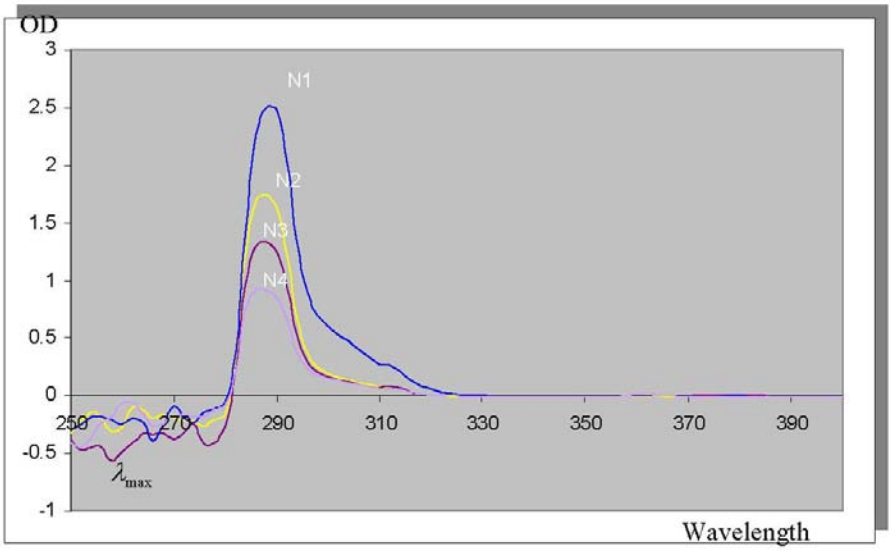
www.SID.ir

Archive of SID

موج ۲۸۸قرائت و یادداشت شد(نمودار ۲ و جدول ۱).

با استفاده از فرمول $\frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$ = درصد تخریب نفتالین توسط میکروارگانیسم‌های مختلف را مشخص نمودیم.

یافته‌ها حکایت از درصدهای مختلف تخریب از۲/۹ تا ۹/۹۲ درصد نفتالین اولیه دارند (جدول ۲).

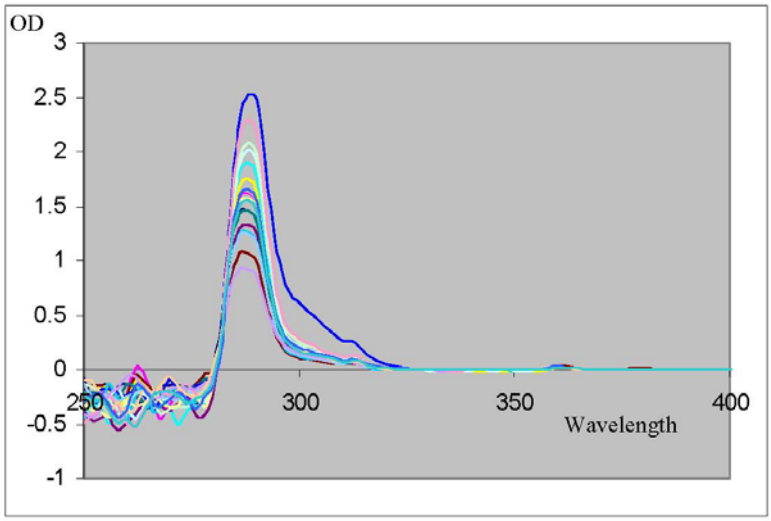


نمودار ۱. تعیین λ_{max} نفتالین

OD (N_1=2.429 ، N_2=1.747, N_3=1.333, N_4=0.913)

با غلظتهای(N_1=1 ، N_2=0.75 ، N_3=0.5, N_4=0.25 ،1mg/ ml)

اصلاح زیستی یک فرآیند طبیعی است که توسط این روش، به جای آن که آلاینده‌ها را به سادگی دفن کرده و مسئولیت حذف آنها را به نسل بعدی بسپاریم ،بازیافت می‌شوند. به علاوه از دیدگاه عمومی، اصلاح زیستی مطلوب تر است و بسیاری از سازمان‌های جهانی استفاده از آن را برای اصلاح مکان های آسیب دیده به وسیله آلاینده های محیطی ترویج می کنند. یکی از بهترین راه کارهای اصلاح زیستی، روش های بیولوژیک و استفاده از میکروارگانیسم ها می‌باشد. باکتری ها به علت داشتن آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده نسبت به سایر میکروارگانیسم ها از اهمیت بیشتری برخوردارند(۱۸و۱۹).



نمودار ۲. نمونه ای از طیف جذبی نفتالین (بااسپکتروفتومتر دو شعاعی) پس از تیمار توسط برخی از سوش های میکربی

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به نتایج این تحقیق و مطالعات انجام شده، باکتریهای خاک کم وبیش پتانسیل تجزیه وتخریب هیدروکربنهای آروماتیک پلی سیکلیک را دارند. L.Feijoo-Siota و همکاران (۲۰۰۸) میزان تجزیه بیولوژیکی نفتالین را با استفاده از یک باکتری *Pseudomonas stutzeri* در عرض ۶ روز حدود ٪۹۳ تعیین نمودند (۱۳). Vanessa Leonardi و همکاران (۲۰۰۷) در تجزیه هیدروکربنهای آروماتیک پلی سیکلیک در خاکهای صنعتی آلوده قدیمی نشان دادند که میکروارگانیسم‌ها باعث تخریب ۷۳- ۵۸درصد از PAHهای ۳و ۴حلقه‌ای در دو نمونه خاک در عرض ۷روز می‌باشند(۱۲). Andrei E Filonor و همکاران (۲۰۰۷) تخریب بیولوژیکی نفتالین توسط *Pseudomonas putida*G_7 در خاک را بررسی کردند و میزان تخریب نفتالین در نمونه خاک بعد از ۵ روز ۹۵ درصد و بعد از ۶ روز عاری از نفتالین شد(۱۴). Mahmoud Abou Seoud و همکاران (۲۰۰۲) با طراحی بیوراکتور و با تلقیح گونه‌ای از سودوموناس در آن، در طول مدت ۵-۷ روز قادر به تخریب و تجزیه حدود ۶۰ درصد از نفتالین گردیدند(۲۲). J. Envir. (۲۰۰۱) جهت پاکسازی بیولوژیکی نفتالین با استفاده از یک راکتور و یک سوش فلاووباکتریوم میزان تخریب را معادل ۲/۰میلی‌گرم در لیتر در یک مدت یک ساعت ارزیابی کرد(۳). Barathi و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از *Pseudomonas fluorescens* در تحقیق خود در تجزیه بیولوژیکی خاکهای آلوده نفتی دریافتند که این سوش قادر است n- آلکانهای زنجیره کوتاه و بلند و همچنین تعدادی از هیدروکربنهای آلیفاتیک و آروماتیک تجزیه و تخریب کند (۱۶). Jussara P. Del Arco و همکاران (۱۹۹۹) در تحقیق خود نشان دادند مخلوطی از باکتریهای بومی در رسوبهای شنی از مناطق نفت‌خیز عربی باعث پاکسازی ۴۲/۹ ۹/۱۱- درصد از آلودگی می‌شوند این باکتریها از فسفات و نیترات به عنوان منبع تغذیه استفاده می‌کنند (۸). با توجه به تحقیقات مذکور، طرح انجام یافته، نتایج مشابه و تأیید کننده داشته است و از این نظر که از میکروارگانیسم‌های بومی و وحشی موجود در خاکهای مناطق استان آذربایجان شرقی استفاده گردیده است دارای جنبه نوآوری می‌باشد.

جدول۱. تغییرات جذب نوری نفتالین در طول موج ۲۸۸ نانومتر

ردیف	سوش میکروبی	جذب نوری (OD)	ردیف	سوش میکروبی	جذب نوری (OD)
1	g_1	1.464	21	M_{31}	1.600
2	g_2	1.616	22	M_{58}	1.649
3	g_3	1.747	23	M_{60}	1.547
4	g_4	1.896	24	M_{61}	2.497
5	g_5	1.333	25	M_{65}	1.505
6	g_6	1.071	26	M_{66}	0.63
7	g_7	1.461	27	C_2	1.990
8	g_8	2.5	28	C_7	1.722
9	g_9	1.262	29	C_{15}	2.23
10	g_{10}	2.011	30	C_{17}	1.764
11	g_{11}	2.084	31	C_{18}	1.88
12	g_{12}	1.578	32	B_2	1.519
13	g_{13}	1.24	33	B_7	1.559
14	g_{14}	2.296	34	B_{19}	1.808
15	F_6	1.7	35	B_{20}	0.176
16	F_9	1.642	36	B_{25}	2.192
17	F_{10}	0.913	37	B_{27}	0.753
18	F_{11}	1.142	38	B_{33}	1.717
19	F_{12}	1.417	39	A_1	2.5
20	F_{13}	1.417	40	A_2	1.345

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲. درصد تخریب نفتالین

ردیف	سوش میکروبی	درصد تخریب	ردیف	سوش میکروبی	درصد تخریب
1	g_1	41.4	21	M_{31}	36
2	g_2	35.3	22	M_{58}	34
3	g_3	30.1	23	M_{60}	38.1
4	g_4	24.1	24	M_{61}	0
5	g_5	46.6	25	M_{65}	39.8
6	g_6	57.1	26	M_{66}	74.8
7	g_7	41.3	27	C_2	20.4
8	g_8	0	28	C_7	31.1
9	g_9	49.5	29	C_{15}	10.18
10	g_{10}	19.6	30	C_{17}	29.4
11	g_{11}	16.6	31	C_{18}	24.8
12	g_{12}	36.8	32	B_2	39.2
13	g_{13}	50.4	33	B_7	37.6
14	g_{14}	9.2	34	B_{19}	27.6
15	F_6	32	35	B_{20}	92.9
16	F_9	43.6	36	B_{25}	12.3
17	F_{10}	63	37	B_{27}	69.8
18	F_{11}	54.3	38	B_{33}	31.3
19	F_{12}	34.3	39	A_1	0
20	F_{13}	43.3	40	A_2	46.2

تشکر و قدردانی

از کلیه اساتید وهمکاران گرامی در آزمایشگاههای دانشکده پزشکی و شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب کشور که ما را در انجام این پروژه یاری دادند، صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می نماید.

منابع:

1. Fedorak WA, (1981). Degradation of aromatics and saturates in crude oil by soil enrichments.*Water Air Soil Pollution*. **16**: 367-375.
2. Hawley, G. (1981).The condensed chemical dictionary, 10th Edition, New York, *Van Nostrand Reihold company*, 713.
3. Wang SY; Cumaraswamy V, (2001). Biodegradation of Naphthalene-contaminated Soils in Slurry Bioreactors. *J. Envir. Engrg.* **127**: 748-754.
4. Wilfred F. M; Roling, Ian M; Head, Steve R, (2003). The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects, *Research in Microbiology*, **154**: 321-328.
5. Saumyen G; Peters C. A, (1998). Multisubstrate Biodegradation Kinetics of Naphthalene, Phenanthrene, and Pyrenen Mixctures, *Enzyme and Microbial Technology*. **22**:235-238.
6. Vaneechoutte, M; Baldi. F; Pepi. M, (1999). Oil degrading *Acinetobacter* strain RAG-1, *Research in Microbiology*. **150**: 69-73.
7. Zaidi, R; Imam, H, (1999). Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the caribben coastal water. *Pollut. Bull.* **38**(8): 737-742.
8. Jussara P; Francisca P, (1999). Biodegradation of crude oil in sandy sediment, *International Biodeterioration & Biodegradation.* **44**: 87-92.
9. Bouwer E. J; Zang, (2003). Biotreatment of PAH-Contaminated Soils/sediments, *Ann NY Acad Sci* . **829**: 103- 1 17.
10. Barathi S; Vasuedvan. M, (2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseduomonas fluorescens* isolated from petroleum – contaminated soil, *Environment Interntioanal.* **26**: 413-416.
11. Seksen P; Sudarat S, (2007). Quantiative detection of the oil-degrading bacterium Acinetobacter sp. Strain MUB1 by hybridization probe based real-time PCR. *Microbial Research*, **186**:224-226.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Vanessa L, (2007). Bioavailability modification and fungal biodegradation of PHAs in aged industrial soils. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **60**: 165-170.
13. Feijoo-S, Rosa-Dos- S, (2008). Biodegradation of Naphthalene by Pseudomonas stutzeri in Marine Environments: Testing cells entrapment in calcium alginate for use in water. *Detoxification Bioremediation Journal.* **12**: 185-192.
14. Filonov A; Puntus, V, (2004). Efficiency of naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 in soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnolog*. **79**: 562-569.
15. Chanieau, C.H; Rougeux, G; Yepremian, C, (2005). Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil, *Soil Biology and Biochemistry.* **37**: 1490-1497.
16. Sisler, F; Zobell, D, (1987). Microbial utilization of carcinogenic hydrocarbon. *Science*. **106**: 521-2.
17. Dibyendu S; Michael F; Stuart B, (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils. *Environmental pollution.* **136**: 187-195.
18. Southam G; Whitney M; Knickerbocker C, (2001). Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria- oil interface: implications for bioremediation*International Biodeterioration & Biodegradation,* **47**: 197-201.
19. Fenyvesi E; Gruiz K ,(2005). Biodegradation of cyclodextrins in soil, *Chemosphere*, **60**:1001-1008.
20. Bardi L; Mattei A; Staffan S, (2000). Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability, *Enzyme and Microbial Technology,* **27**: 709-713.
21. Alexander. M, (1977). Introduction to soil microbiology, John willey.
22. Abou Secound M; Maachi R, (2003). Biodegradation of Naphthalene by Free and Alginate Entrapped Pesudomonas sp, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **72**:726-731.
23. Farinazleen M; Raja Noor Z, (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium, *International Biodeterioration & Biodegradation,* 54: 61-67.
24. Tiehm, A. (2005); Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbone in the presence of synthetic surfactant, *Apple. Environ. Microbiol.* **89**: 258-263.
25. Jonathan D; Van H; Ajay S; Owen P. Ward, (2006). Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology, *Biotechnology Advances,* **24**: 604-620.
26. Ajay S; Jonathan D; Owen P, (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances,* **25**:99-121.
27. John O. H, (1957). Respiration studies of a Micrococcus capable of oxidizing hydrocarbons, *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 70: 457-463.
28. Plotnikova, E. G; Altyntseva, O. V, (2001). Bacteria degraders of polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from salt contaminated soil and bottom sediment in salt mining areas. *Microbiology (Moscow)* **70**: 51-58.
29. Juhasz, A. L; Britz, M. L; Stanley, G. A., (2005). Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Pseudomonas cepacia. *J Apple. Microbiol.* **83**: 189- 198.
30. Filonov, A. E; Puntus, I.F; Karpov, A.V, (2003). Growth and survival of pseudomonas putida strains degrading naphthalene in soil model systems with different moisture levels. Proc. *Biochem.* **43**: 303- 308.
31. Li, W., Suzelle, B; Jin-Woo, K, (2006). Biodegradation of pentyl amine and aniline from petrochemical wastewater, *J. Environmental Management*, **83**:191-197.
32. Lazar, S; Mobrota, A;. Voicu, M., (1999). Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. *Journal of Petroleum Science and Engineering,* **22**: 151-160.

www.SID.ir