

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره سه، خرداد ماه ۹۹

## شناسایی باکتری‌های بومی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در منطقه ویژه

### اقتصادی پتروشیمی ماهشهر

ثنا رسولی<sup>۱</sup>

مرتضی کاشفی اصل<sup>۲\*</sup>

[mortezakashefialasl@gmail.com](mailto:mortezakashefialasl@gmail.com)

رضا مرنندی<sup>۲</sup>

مژگان امتیازجو<sup>۲</sup>

مژگان زعیم‌دار<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۸

#### چکیده

**زمینه و هدف :** گسترش آلودگی‌های نفتی خاک در عصر حاضر به دلیل استفاده از سوخت‌های فسیلی در مناطق صنعتی اثرات نامطلوبی بر انسان و محیط زیست داشته است. در این مطالعه به شناسایی باکتری‌های بومی که از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی پرداخته شده است، تا در جهت کاهش ترکیبات آلاینده هیدروکربنی به کار گرفته شوند.

**روش بررسی:** ابتدا به منظور شناسایی و جداسازی باکتری‌های بومی منطقه، نمونه برداری از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در شش ایستگاه واقع در منطقه ویژه اقتصادی پتروشیمی ماهشهر انجام یافت. رشد باکتری‌ها در محیط مایع نوترینت برآت انجام یافت. جهت کشت باکتری و دستیابی به تک کلونی در محیط جامد، از محیط کشت نوترینت آگار استفاده شد. استخراج DNA جهت شناخت گونه‌های باکتری به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام یافت. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک جهت برآورد شرایط منطقه طبق روش استاندارد اندازه‌گیری گردید.

**یافته‌ها :** نتایج حاصل از آزمایش جداسازی و رشد باکتری و خالص‌سازی و در نهایت واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و توالی‌یابی مبین حضور دو گونه باکتری در شش ایستگاه متفاوت با درصد شباهت بیش از ۹۵٪ طبق رتبه‌بندی جهانی می‌باشد. طبق نتایج حاصله درصد حذف TPH در خاک توسط باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus nakamurai* به ترتیب ۳۳/۵۰٪ و ۳۳/۰۵٪ بود.

۱- دانشجوی دکتری آلودگی‌های محیط زیست، دانشگاه آزاد واحد تهران. \* (مسئول مکاتبات)

۲- دانشیار گروه محیط زیست دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران

۳- استادیار گروه محیط زیست دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران

بحث و نتیجه گیری : باتوجه به توانایی این گونه ها در حذف TPH می توان آنها را به عنوان گونه های مناسب بومی برای این منطقه، در حذف خاک های آلوده پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی: تجزیه زیستی، *Bacillus nakamurai*، *Pseudomonas aeruginosa*، هیدروکربن های نفتی.

## Identification of Native Bacteria of Soil Contaminated with Oil Compounds in Mahshahr Petrochemical Special Economic Zone

Sana Rasouli<sup>1</sup>

Morteza Kashefi Asl<sup>2\*</sup>

[mortezakashefiasl@gmail.com](mailto:mortezakashefiasl@gmail.com)

Reza Marandi<sup>2</sup>

Mozhgan Emtiazjoo<sup>2</sup>

Mozhgan Zaeimdar<sup>3</sup>

Admission Date: January 16, 2019

Date Received: April 17, 2018

### Abstract

**Background and Objective:** The spread of soil oil pollution in the present era due to the use of fossil fuels in industrial areas has adverse effects on human and the environment. In this study we identified native bacteria from oil-contaminated soils to be used to reduce hydrocarbon contaminants.

**Method:** First, in order to identify and isolate native bacteria in the region, sampling of soils contaminated with petroleum compounds was done in six stations located in Mahshahr Petrochemical Special Economic Zone. Bacterial growth was performed in neutrite broth liquid media. Neutrite agar medium was used to culture bacteria and achieve single colony in solid medium. DNA was extracted to identify bacterial species by polymerase chain reaction (PCR) method. Soil physical and chemical properties were measured to estimate the conditions of the area according to the standard method.

**Findings:** The results of isolation and growth of bacteria and purification, and finally polymerase chain reaction (PCR), and sequencing indicated the presence of two bacterial species in six different stations with a similarity of more than 95% according to the global ranking. According to the results, the percentage of TPH removal in the field by *Pseudomonas Aeruginosa* and *Bacillus Nakamurai* was 53.50% and, 33.05%, respectively.

**Discussion and Conclusion:** Due to the ability of these species to remove TPH, they can be suggested as suitable native species for this region in the removal of contaminated soils.

**Keywords:** Biodegradation *Bacillus nakamurai*, *Pseudomonas aeruginosa*, Petroleum hydrocarbons.

---

1- Ph.D, Student of Environmental Pollution, Azad University of Tehran.

2- Associate Professor, Department of Environment, Islamic Azad University, Tehran Branch. \* (Corresponding Author)

3- Assistant Professor, Department of Environment, Islamic Azad University, Tehran Branch

## مقدمه

انتشار آن در محیط زیست اطراف مناطق پتروشیمی و پالایشگاهی و پیشگیری از حضور آلاینده ها در آب های زیرزمینی و اثرات نامطلوب آن بر مناطق و اکوسیستم و موجودات زنده شناسایی باکتری های بومی در جهت استفاده از تکنولوژی زیست پالایی به عنوان روشی کارآمد می تواند به عنوان بهترین روش نسبت به سایر روش ها انتخاب گردد. در سال های اخیر روش های بیولوژیکی در جا به دلیل صرفه اقتصادی بالا و همچنین روشی دوستدار محیط زیست با بازده حذف بالای ترکیبات نفتی در محل مورد استفاده می گیرد (۹، ۸ و ۳). با توجه به تحقیقات گسترده ای که در این زمینه انجام گرفته (جدول ۱) مناطق آلوده با میکروارگانیسم های بومی جهت حذف ترکیبات نفتی وجود دارد که نیاز به تحقیق گسترده تر و دقیق تری دارد. در راستای دستیابی به این مهم هدف از تحقیق حاضر نیز، شناسایی باکتری های بومی با پتانسیل بالا و مقاوم در برابر مواد آلی هیدروکربنی و پایدار نفتی موجود در خاک می باشد.

با گسترش صنایع نفتی و پتروشیمی و به دنبال آن ایجاد آلودگی خاک های مناطق صنعتی به ترکیبات نفتی و هیدروکربنی و در سال های اخیر جهانی شدن آن، این مسئله به یک مشکل محیط زیستی جدی تبدیل شده است (۳-۱). فعالیت های نفتی در زمینه استفاده از ترکیبات هیدروکربنی آسیب های جدی به محیط زیست اطراف این مناطق وارد آورده است. در این بین احتراق ناقص محصولات نفتی و نشت از مخازن، شایع ترین علل آلودگی خاک به ترکیبات هیدروکربنی است (۵، ۴، ۱). هیدروکربن های نفتی ترکیبات پیچیده ای هستند که از مواد متنوعی تشکیل شده اند این ترکیبات عمدتاً شامل هیدروکربن های اشباع شده، ترکیبات آروماتیک، آسفالت و رزین هستند که به طور تصادفی یا عمدی به داخل محیط زیست رها می شوند و منجر به مشکلات جدی محیط زیستی و اثرات سمی بر سلامتی می گردند (۶، ۲). حرکت پذیری آلاینده های هیدروکربنی در خاک به دلیل پتانسیل بالای آلودگی آب های زیرزمینی یکی از مشکلات اصلی در مناطق با فعالیت های پتروشیمی و پالایشگاهی می باشد (۷). به این ترتیب به دلیل ضرورت کاهش آلاینده های هیدروکربنی خاک و جلوگیری از

## جدول ۱- پیشینه پژوهش

Table 1. Literature Review.

نام نویسنده	سال نگارش	موضوع	روش	منطقه مورد مطالعه و مقایسه نتایج تحقیق
Espada et al	۲۰۱۷	آلاینده های هیدروکربنی و نفتی	روش کاهش زیستی به وسیله باکتری <i>Pseudomonas aeruginosa</i> گونه	کاهش بیش از ۸۰٪ آلاینده های نفتی در منطقه صنعتی ایتالیا
Cavalca et al	۲۰۰۰	نفت و ترکیبات هیدروکربنی بنزنی	روش <i>P.patida P.aerugino</i> کاهش زیستی به وسیله باکتری بوم	کاهش بیش از ۵۰٪ آلاینده های نفتی در منطقه صنعتی ایتالیا
Karunanithi et al	۲۰۱۷	ترکیبات هیدروکربنی و نفتی	روش کاهش زیستی به وسیله باکتری <i>Psuedomonas sp.</i> ، <i>Coryneb acterium sp.</i> and <i>Eshrechiasp</i>	میزان حذف بیش از ۵۰ درصدی ترکیبات هیدروکربنی در منطقه Coimbatore and Pollachi
علی نجفی و همکاران	۱۳۹۳	هیدروکربن های نفتی خاک	روش کاهش زیستی به وسیله <i>Psuedomonas bacillus</i> و	راندمان بالای حذف ترکیبات هیدروکربنی در منطقه پالایشگاه

کرمانشاه	باکتری‌های			
حذف کل لکه های نفتی در مدت ۱۲ روز در میدان نفتی آبتیمور غرب اهواز	روش کاهش زیستی به وسیله باکتری <i>Planococcus. sp</i>	لکه های نفتی خاک	۱۳۹۱	ابراهیم پور و همکاران
کاهش بیش از ۵۰٪ آلاینده های نفتی در خاک های اطراف چاه های نفت اهواز	روش کاهش زیستی به وسیله <i>Planococaccus. Sp</i> <i>P.aeruginosa</i>	ترکیبات نفتی خاک	۱۳۹۴	گیلاوند و همکاران

### مواد و روش ها

آزمایش های بیولوژیکی انتقال داده شد. از شش ایستگاه انتخابی مشخص شد که پنج ایستگاه بافت درشت ماسه ای و یک ایستگاه بافت ریز رسی دارد، لذا به صورت میانگین نمونه مرکب پنج ایستگاه *pS1:sub A* در نظر گرفته شد و نمونه مجزای رس *pS2:sub C* جهت سنجش سایر پارمترهای شیمیایی در نظر گرفته شد.

نمونه های خاک آلوده به ترکیبات نفتی از محل نگهداری مخازن نفتی واقع در شرکت بوعلی سینا، منطقه ویژه اقتصادی ماهشهر واقع در بندر امام خمینی استان خوزستان در شرایط استاندارد جمع آوری گردید (نقشه ۱). نمونه برداری از عمق ۳۰-۵۰ سانتی متری خاک به وزن ۵۰۰ گرم و طبق روش استاندارد در ظروف استریل شیشه ای به آزمایشگاه جهت انجام



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی بندر ماهشهر (پتروشیمی بوعلی سینا)

Figure 1. Geographic location of Mahshahr port (Bu-Ali Sina Petrochemical)

### کشت اولیه و جداسازی باکتری ها از نمونه های مورد

#### بررسی

جهت شش ایستگاه نمونه برداری شده از خاک های حاوی ترکیبات هیدروکربنی اطراف مخازن نفتی منطقه ویژه اقتصادی ماهشهر، آماده سازی محیط کشت BHI برات آغاز گردید و در شش ارلن با حجم ۳۰ ml قرار گرفت. با استفاده از پودر B5 برات از شرکت مرک آلمان در شش ارلن حجم ۳۰ ml رسانده و پس از شیک شش ارلن آماده سازی شده با شش حالت مختلف از نمک و PH قرار گرفت. Na cl در حجم های ۳gr/l و ۱۵gr/l و ۳۰gr/l و PH های متفاوت (خنثی، ۵، ۸)، آماده سازی گردید. در ادامه آماده سازی محیط کشت مایع و کشت

### اندازه گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک

خصوصیات شیمیایی خاک به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفت EC خاک برحسب  $Ms/cm$ ، هدایت الکتریکی خاک توسط دستگاه هدایت سنج اندازه گیری شد. واکنش خاک با استفاده از دستگاه PH متر، میزان کربن آلی (OC) و نیتروژن کل به روش کج‌لدال، فسفر قابل جذب  $P(AV_0)$  بر حسب  $mg/kg$ ، پتاسیم قابل جذب  $K(AV_0)$  بر حسب  $mg/kg$ ، اندازه گیری شد، در نهایت سدیم محلول  $Nat^{meq/lit}$  سنجیده شد.

Water 150ML PH 7.0+\_0.2 و سپس رنگ آمیزی

به روش گرم انجام گرفت.

استخراج DNA و شناسایی مولکولی باکتری ها با روش

### 16S r RNA PCR

از هر ایستگاه نمونه های موجود خاک، 10gr از خاک برداشته شد و با ۵ cc سرم فیزیولوژیک مخلوط گردید، جهت همگن سازی مخلوط خاک از دستگاه FUGE VORTEX استفاده گردید، مراحل طبق کیت استاندارد ( Nucleospin Microbial DNA Extraction GERMANY MACHEREY-NAGEL ) انجام گرفت. از هفت ارلن حاوی باکتری جهت استخراج DNA به نمونه ها لیزوزیم اضافه شد و در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و سپس جهت همگن سازی، در سانتریفیوژ مدل Wisepin CF-10 Feedback Control سانتریفیوژ گردید. سپس ژل الکتروفورز اگاروز انجام یافت و سپس جهت چاهک گذاری درون چاهک ژل انتقال یافت. سپس ژل از الکتروفورز خارج و به دستگاه Duct Gel جهت مشاهده طیف ها انتقال داده شد. با استفاده از توالی پرایمر

F16SrDNAGGTAGTCYAYGCMSTAAACG  
1063R16SrDNA ،۷۹۹

GACARCCATGCASCACCTG از هر توالی میزان ۳ میکرولیتر برداشته (۱۰۰ pmol/  $\mu$ l) و به وسیله ۲۷ میکرولیتر آب رقیق سازی گردید (در حد ۰/۱ رقیق سازی) و ۱ میکرولیتر (۱۰۰ pmol/  $\mu$ l) آن جهت تست PCR استفاده شد. یکی از میکروتیوپ ها به عنوان نمونه شاهد و کنترل منفی بدون حضور نمونه در نظر گرفته شد. در مرحله بعد میکروتیوپ ها در دستگاه PCR مدل (BIOER XP CYCLER) قرار گرفت. برنامه جهت ۲۵ میکرولیتر محتوی میکروتیوپ ها در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، در ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و در دمای ۵۵°C به مدت ۱ ساعت و ۲۰ دقیقه تنظیم شد. سپس ژل الکتروفورز که در مراحل قبل توضیح داده شد انجام یافت چاهک ژل پس از ۲۰ دقیقه از الکتروفورز خارج گردید و به دستگاه Gel Doc System

باکتری، 1۰ gr خاک از هر شش ایستگاه و ۱۰ ml سرم رقت سریال تهیه شد. پس از شفاف شدن لوله و رقیق سازی، ۴۰۰ ml از آن برداشت گردید و به محیط کشت های مایع PH خنثی ۵،۸، و از میزان Na cl، به میزانی که قبلاً در محیط کشت آماده سازی شده بود اضافه گردید (شامل شرایط هوازی و بی هوازی در PH ها و نمک های ذکر شده). دوازده لوله آماده شده از محیط های کشت با شرایط شرح داده شده در دو دمای ۳۰°C و ۴۲°C به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. همچنین جهت فراهم سازی شرایط بی هوازی مقداری پارافین به هر شش لوله اضافه گردید و رشد باکتری ها در ایستگاه های متفاوت به صورت درجه و میزان کدورت بررسی گردید. از محیط های براث که کشت مثبت بودند روی محیط BHI agar ساب کالچر (Sub-culture) انجام شد. سپس انکوباسیون به مدت ۷۲ ساعت در دماهای ۴۲ و ۳۰ ادامه یافت و کلنی های رشد یافته برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت.

### انتقال باکتری ها به محیط کشت حاوی مایع نفتی

از چهار لوله محیط کشت براث به صورت انتخابی از هر لوله ۲۰ ml مایع و ۵۰۰ میکرولیتر نفت به محیط کشت مایع موجود در ارلن ۵۰ ml با PH=۷ که ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C اتوکلاو شده بود اضافه گردید. آماده سازی محیط کشت دو جزئی طبق استاندارد محیط کشت دو جزئی انجام گرفت. دو جزء محیط کشت اتوکلاو شده پس از سرد شدن در کنار شعله با هم مخلوط گردید. از هر یک ۱۰ ml درون ارلن ۵۰۰ ml ریخته و ۱۰ میکرولیتر هیدروکربن های نفتی اضافه شد. از پورپلیت هایی که قبلاً کشت داده شد، یک لوپ میکروب در کنار شعله برداشته و به ظرف حاوی مواد ذکر شده اضافه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکو باتور شیکردار مدل ISH-554D در دمای ۳۷°C قرار گرفت. مواد در هفت ارلن حاوی محیط های کشت دو جزئی قرار گرفت. محیط پایه معدنی دو جزئی شامل جزء ۱: KH2PO4 2.44g Na2hpo4 5.57g NH4Cl 2.00g Water 850mL PH 7.0+\_ 0.2 جزء ۲: MgCl2.6H2O 0.20g CaCl2.2H2O 0.001g FeCl3.6H2O 0.001g MnCl2.4H2O 0.004g

نتایج GENETECH جهت مشخص شدن فرکانس قرار گرفت. در ادامه، محصولات PCR برای توالی یابی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد. سپس، توالی‌های به دست آمده در سایت EZTAXON بررسی گردیدند.

نتایج حاصل از جداسازی باکتری‌ها و تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک به شرح زیر می‌باشد.

### جدول ۲- نتایج حاصل از آنالیز خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک حاصل از جداسازی باکتری‌ها از خاک

Table 2. The results of the analysis of the physical and chemical properties of soil resulting from the isolation of bacteria from soil

EC $M_s/cm$	سدیم محلول	K(AV0) mg/kg	P(AV0) mg/kg	نیتروژن N(%)	کربن آلی OC(%)	PH	مشخصات ایستگاه‌ها
۱/۲۳	۹۶/۹	۲۱۶	۰/۲۵	۰/۰۰۱۵	۰/۰۱	۷/۸	Sub A
۷/۳۰	۹۸۱	۵۵۹	۰/۱۲	۰/۱۵	۰/۰۱	۷/۸	Sub B (P3005)

انجام یافته پس از جداسازی و خالص سازی باکتری‌های موجود در نمونه‌های خاک منطقه ویژه اقتصادی ماهشهر، پس از توالی‌یابی حاکی از حضور دو گونه باکتری سودوموناس با Hit strain name GCM 5962(T) ← و گونه باسیلوس با Hit strain name NRRLB-41091(T) ← بود که با رتبه بندی جهانی باکتریایی مطابقت داشت

نتایج تجزیه و تحلیل محیط‌های کشت و جداسازی، حاکی از روند روبه‌رشدی از باکتری‌های موجود در نمونه‌ها بود. نتایج حاصل از استخراج DNA و خالص‌سازی پس از تست PCR و توالی‌یابی حاکی از شناسایی دو گونه باکتری بوده است که در یازده نمونه از دوازده نمونه مورد بررسی، شباهت بیش از ۹۵٪ را با باکتری گونه *Pseudomonas* نشان داد. در یک نمونه از دوازده نمونه مورد بررسی شباهت بیش از ۹۵٪ را باکتری گونه *Bacillus Nakamura* نشان داد. بررسی‌های

### جدول ۳- توالی‌یابی دو گونه باکتری سودوموناس جدا شده از خاک

Table 3. Sequencing of two species of *Pseudomonas* bacteria isolated from soil

>1-10-R\_16sF

GCATGCGGGTGGGACATGAGATCTTAGCTGGCGCAAGCCTACGCGATAAGTCGACCGCCT  
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGGT  
GAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGA  
ACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGGTGGATGGCTGTCA  
A

Sequence name: 1-10-R\_16sF

Sequence details

Full name: 1-10-R\_16sF

Length: 241 bp

Orientation: Forward

Completeness: 16.6% (792 - 1032)

Database ver.: 2017.10

List of hits from EzBioCloud 16S database

Select hits by database: All, Valid names only, Excel, FASTA, EzEditor2

Tasks	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity (%)	Diff/Total nt	Hit taxonomy	Completeness (%)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JCM 5962(T)	BAMA01000316	94.98	12/239	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Ps	100.0

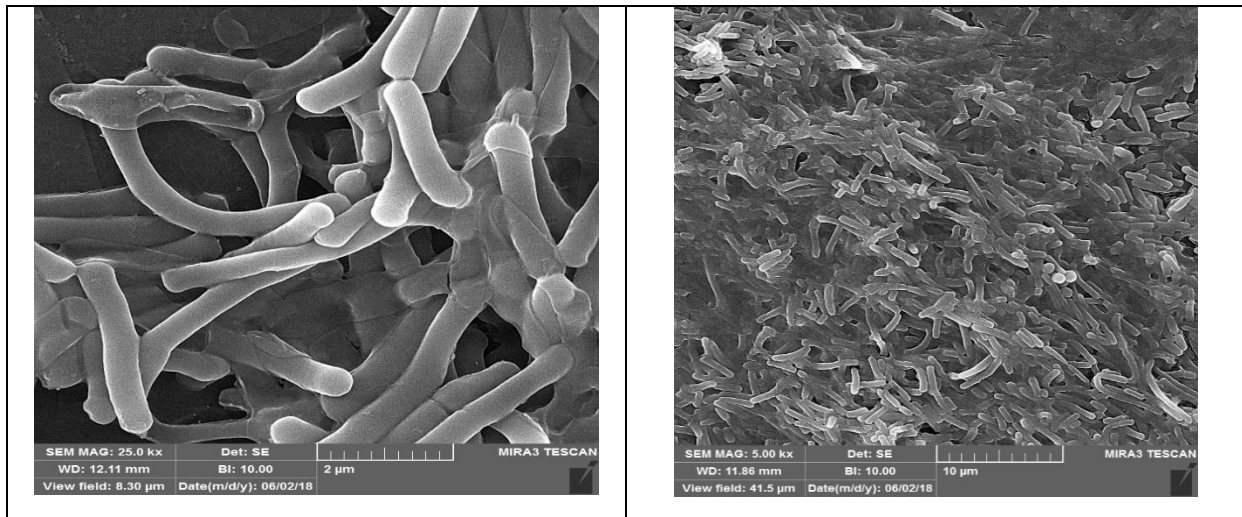


## جدول ۴- توالی یابی دو گونه باکتری باسیلوس جدا شده از خاک

Table 4. Sequencing of two species of Bacillus bacteria isolated from soil

&gt;2-4-R\_16sF

GGCGTTTGTAAGGGGGCTTGCGCTCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACATCCGC  
 CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGG  
 TGGAGCATGTGTTAATTGGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT  
 GACAATCCTAAAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGT  
 C



شکل ۲- باکتری های بومی شناسایی شده، تصویر برداری با میکروسکوپ الکترونی شکل (الف) *Bacillus nakamurai* و شکل (ب) *Pseu Aeruginosa*

Figure 2. Native-known bacterias in the area by Imaging with electron microscope. Picture (A) *Bacillus nakamurai* and Picture (B) *Pseu Aeruginosa*

## بحث و نتیجه گیری

روش استخراج DNA، سپس PCR و Sequencing جهت شناسایی باکتری های بومی انجام یافت (۱۳، ۱۵، ۱۶). همچنین با استفاده از تکنولوژی حذف زیستی به وسیله میکروارگانسیم ها نسبت به سایر روش های زیستی مانند گیاه پالایی در مدت زمان کمتری می توان به تجزیه هیدروکربن های نفتی دست یافت (۱۷-۱۸). این گونه از باکتری ها مواد آلاینده هیدروکربنی مضر را به ترکیبات کم خطری مانند CO<sub>2</sub>، H<sub>2</sub>O تبدیل می کنند و ترکیبات آلاینده را به فرم بی ضرر تبدیل

امروزه پاکسازی زیستی که در آن از باکتری ها برای تجزیه زیستی آلاینده های نفتی و سالم کردن محیط استفاده می شود، یکی از روش های بسیار کارآمد تصفیه خاک های آلوده به ترکیبات نفتی است. از آن جایی که روش پاکسازی زیستی توسط باکتری هادرمقایسه با سایر روش های حذف آلاینده های خاک، روشی دوستدار محیط زیست با پتانسیل آسیب رسانی کمتر به اکوسیستم و محیط زیست به شمار می رود (۲، ۸، ۱۲). در بررسی حاضر پس از نمونه برداری از خاک از



- Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*. 2011; 102(5):4111-6.
- Montagnolli RN, Lopes PRM, Bidoia ED. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental monitoring and assessment*. 2015; 187(1):4116.
  - Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010; 87(2):427-44.
  - Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK, Sivachidambaram P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current science*. 2008;736-47.
  - Souza EC, Vessoni-Penna TC, de Souza Oliveira RP. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *International biodeterioration & biodegradation*. 2014; 89:88-94.
  - Ławniczak Ł, Marecik R, Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013; 97(6):232
  - Zheng G, Selvam A, Wong JW. Oil-in-water microemulsions enhance the biodegradation of DDT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource technology*. 2012; 126:397-403.
  - Mulligan CN. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2009; 14(5):372-8.

می نمایند همین امر دلیل شناسایی باکتری های بومی منطقه و استفاده از آن در تحقیق های آینده در روش حذف و کاهش زیستی آلاینده ها و مطابقت آن با پروتکل ایمنی زیستی است. همچنین به دلیل پتانسیل ماندگاری این دوباکتری در منطقه آلوده به هیدرو کربن های نفتی و دمای ۵۴ درجه سانتی گراد با مدت زمان حدود ۳ ماه از سال، می توانند به عنوان گونه های تجزیه کننده آلاینده های هیدروکربنی خاک مورد استفاده قرار گیرند که همین مسئله از دلایل مهم انتخاب منطقه مورد مطالعه می باشد. طبق مطالعات گذشته میکرو ارگانسیم ها متعددی از جنس باکتریایی و قارچی مانند باسیلوس، رود و کوکوس، آلکالی ژنز و سود و مونس مورد تحقیق و شناسایی قرار گرفته اند (۱۵-۱۳). در تحقیق حاضر دو گونه باکتری به نام های باسیلوس، سودوموناس پس از مراحل جداسازی از خاک های آلوده به هیدرو کربن های نفتی شناسایی گردیدند این باکتری ها با توجه به شرایط آلوده خاک های منطقه، نسبت به سایر باکتری ها دارای پتانسیل بقای بیشتری بوده اند. شاهیان و همکاران نیز در سال ۱۳۸۹ دوسویه باکتری سودوموناس و اسپینتوباکتر در خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی شناسایی نمودند و مطالعات بسیار دیگری صورت گرفته است. تحقیق حاضر نیز در ادامه مطالعات گذشته و جهت شناسایی میکروپ های مقاوم به خاک های آلوده در منطقه می باشد تا در جهت پتانسیل کاهش آلاینده های نفتی به کار گرفته شود.

## Reference

- Silva RdCF, Almeida DG, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International journal of molecular sciences*. 2014; 15(7):12523-42.
- Zhang Z, Hou Z, Yang C, Ma C, Tao F, Xu P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated

14. Johnson AR, Wick LY, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental pollution. 2005; 133.
15. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and molecular biology reviews. 2003; 67(4):503-49.
16. Chikere C, Okpokwasili G, Chikere B. Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. African Journal of Biotechnology. 2009; 8.
17. Brooijmans RJ, Pastink MI, Siezen RJ. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. Microbial Biotechnology. 2009; 2(6):587-94.
18. Vidali M. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry. 2001; 73(7):1163-72.
10. Piróllo M, Mariano A, Lovaglio R, Costa S, Walter V, Hausmann R, et al. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. Journal of applied microbiology. 2008; 105(5):1484-90.
11. Makkar RS, Cameotra SS, Banat IM. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB express. 2011; 1(1):5.
12. A.R. FallahNosratabadResearch Assistant Prof., Soil and Water Research Institute Received: 11/05/2011; Accepted: 07/01/2012.
13. Hasanshian M, Hasanshahian O, Emtiazi G. Optimization of crude oil degradation by *Pseudomonas aeruginosa* AS and *Acinetobacter caluaceticus* BS isolated from Persian Gulf. Pet Res 2010; 63: 72-82. (In Persian)