

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره دو، اردیبهشت ماه ۹۹

زیست پالایی باکتریایی آلودگی های نفتی خاک سطحی محوطه پالایشگاه تبریز

رضوان آقامحمدی^۱

کمال سیاه چشم^{۲*}

kl_siahcheshm@tabrizu.ac.ir

غلامرضا زرینی^۳

علی کدخدائی^۴

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از باکتری‌ها برای پاک سازی آلودگی‌های نفتی از آب و خاک مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. زیرا این روش نسبت به روش‌های دیگر از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده و باعث ایجاد ترکیبات سمی در محیط نمی‌شود. **روش بررسی:** در تحقیق حاضر نتایج فرایند زیست پالایی جهت شناسایی بهینه‌ترین جدایه های باکتریایی تجزیه کننده مواد نفتی در شرایط فیزیکی شیمیایی و بافتی خاک آلوده پالایشگاه تبریز ارایه شده است. برای ارزیابی نرخ حذف هیدروکربن‌ها از روش آنالیزی کروماتوگرافی گازی با آشکارساز گرمایونی (GC-FID) استفاده شد. **یافته ها:** در این مطالعه ۷ جدایه ی باکتریایی مختلف از خاک جداسازی شد و جدایه ای از سودوموناس با بیش ترین بازدهی معرفی شد.

بحث و نتیجه گیری: باکتری سودوموناس میزان هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک را بعد از ۳۰ روز به میزان ۶۵/۲۵ درصد کاهش داد در حالی که جدایه ای از /سینتوباکتر توانست مجموع هیدروکربن‌های نفتی را به میزان ۴۲/۳۹ درصد کاهش دهد. باتوجه به نتایج این پژوهش، روش زیست پالایی باکتریایی برای پاک سازی هیدروکربن‌های نفتی در خاک های آلوده به دلیل سادگی اجرا، سازگاری با محیط زیست، مطمئن، ایمن و کم هزینه بودن برای انجام تحقیقات مشابه در سایر پالایشگاه‌های نفتی کشور نیز پیشنهاد می‌شود.

واژه های کلیدی: آلودگی نفتی، پالایشگاه تبریز، خاک، زیست پالایی باکتریایی.

- ۱- کارشناس ارشد زمین شناسی زیست محیطی، گروه علوم زمین، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
- ۲- دانشیار زمین شناسی اقتصادی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. * (مسوول مکاتبات)
- ۳- دانشیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
- ۴- دانشیار زمین شناسی نفت، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

Bacterial Bioremediation of Surficial Oil- Contaminated Soil in Tabriz Refinery Campus

Rezvan Aghamohammadi¹

Kamal Siahcheshm^{2*}

kl_siahcheshm@tabrizu.ac.ir

Gholamreza Zarrini³

Ali Kadkhodaie⁴⁵

Admission Date: February 14, 2018

Date Received: August 10, 2017

Abstract

Background and Objective: Nowadays, the use of bacteria to clean oil pollution from water and soil has been considered by scientists and this method is more economical than other methods and does not cause toxic compounds in the environment.

Method: In the present study, the results of the bioremediation process have been presented to identify the most optimal bacterial isolates of petroleum degraders in physicochemical and textural conditions of contaminated soil of Tabriz refinery. Gas chromatographic analysis with thermal detection (Gc-FID) was used to evaluate the removal rate of hydrocarbons.

Findings: The 7 isolates of bacteria were purified in this study. A *Pseudomonas* isolate was introduced as a strain with the highest efficiency.

Discussion and Conclusion: After 30 days, as a result of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* performance, the amount of TPH in contaminated soil samples was decreased in rate of 65.25 and 42.39 percent, respectively. Based on this investigation, the Bacterial Bioremediation method to clean up contaminated soils by petroleum hydrocarbons due to simplicity of implementation, environmentally friendly, safety and low cost is highly proposed to conduct in other oil refineries in Iran.

Keywords: Oil pollution, Tabriz refinery, Soil, Bacterial Bioremediation.

1- M.Sc., Environmental Geology, Earth Sciences Dept., Natural Sciences Faculty, University of Tabriz.

2- Associate Professor, Economic Geology, Earth Sciences Dept., Natural Sciences Faculty, University of Tabriz.

*(Corresponding Author)

3- Associate Professor, Microbiology, Natural Sciences Faculty, University of Tabriz.

4- Associate Professor, Petroleum Geology, Natural Sciences Faculty, University of Tabriz.

مقدمه

قرار گرفته و گونه سودوموناس^۳ کاهش ۳۴/۵ درصدی نفتان را از خود نشان داد. باتوجه به نتایج پژوهش شاه علیان و همکاران (۱۱)، باکتری *P. stutzeri* توانست ۸۰/۲۹ درصد آنتراسن موجود را تجزیه کند، که می تواند به دلیل وجود پلاسمیدهای متعدد در این گونه از باکتری باشد که قادر به تولید آنزیم های گوناگون بوده است. در نتیجه، فعالیت متابولیکی این دسته از باکتری ها بیش تر از سایر باکتری ها بوده و با سرعت بیش تری هیدروکربن های نفتی را تجزیه می کنند (۱۲). برای انجام عملیات پاک سازی باید ویژگی های خاک منطقه مورد مطالعه مورد بررسی قرار گیرد. تحقیق حاضر با هدف جداسازی مناسب ترین باکتری های بومی تجزیه کننده نفت از خاک پالایشگاه تبریز به منظور کاهش یا حذف آلاینده های هیدروکربنی صورت گرفته است.

روش بررسی

نمونه برداری

جهت دراختیار داشتن ترکیب میانگین از خاک آلوده به نفت خام و خاک غیر آلوده در محوطه پالایشگاه تبریز، اقدام به نمونه برداری ۵ نقطه از خاک آلوده و ۵ نقطه از خاک غیر آلوده سطحی (۱۰ سانتی متری از سطح خاک) شد. نمونه ها داخل کیسه های نایلونی بسته بندی و به منظور جداسازی باکتری های خاک آلوده و مقایسه ویژگی های فیزیوشیمیایی از جمله رطوبت، بافت، pH و EC خاک ها به آزمایشگاه منتقل گردیدند. آزمایش دانه بندی مطابق با استاندارد ASTM D422 انجام گرفت. برای تعیین pH و EC خاک منطقه از روش استاندارد ASTM D4972 استفاده شد و همچنین برای تعیین رطوبت خاک از روش استاندارد ASTM D2216 استفاده شد.

جداسازی باکتری

جهت جداسازی باکتری های سازگار با نفت خام عملیات غنی سازی به منظور افزایش جمعیت این باکتری ها طبق روش

امروزه نفت خام به عنوان یکی از منابع اصلی انرژی می باشد و از آنجایی که جایگزین مناسبی برای آن ها یافت نشده گرایش به استفاده از آن ها در آینده احساس می شود. آلودگی با هیدروکربن های نفتی ناشی از منابع صنعتی مانند پالایشگاه های نفت، کشتی سازی و یا ناشی از فرایندهای تصادفی مانند نشت از تانکرها و یا نشت از مخازن ذخیره سازی در آب و خاک، خطر قابل توجهی در اکوسیستم های دریایی و زمینی ایجاد کرده است (۱). ورود این ترکیبات به طبیعت، به سبب سمی بودن، ایجاد جهش و سرطان زایی برای موجودات زنده و همچنین پایداری زیاد و انباشته شدن تدریجی آن ها در خاک باعث اختلال در عملکرد طبیعی خاک از جمله کاهش عملکرد محصولات کشاورزی و تغییر در ویژگی های خاک می گردد (۲).^۳ روش های مختلفی برای حذف این آلودگی ها از محیط زیست وجود دارد اما این روش ها اغلب قادر به حذف کامل آلاینده ها نیستند. زیست پالایی به عنوان یک روش موثر برای پاک سازی آلودگی های نفتی در محیط های مختلف به اثبات رسیده است (۴، ۵). تجزیه میکروبی هیدروکربن ها باتوجه به غیر سرطانزا و غیر قابل احتراق بودن و همچنین، گستردگی و سازگاری آن با محیط زیست، در مقایسه با دیگر روش های مرسوم، مورد توجه قرار گرفته است (۶). دو روش اصلی برای زیست پالایی، تحریک زیستی^۱ و تقویت زیستی^۲ است. تحریک زیستی شامل اضافه کردن ترکیبات معدنی (عمدتا نیتروژن و فسفات) و کودهای آلی و تحریک رشد باکتری های تجزیه کننده نفت به منظور افزایش سرعت زیست پالایی می باشد (۷).^۸ ولی تقویت زیستی به اضافه کردن باکتری های تجزیه کننده نفت به منظور افزایش جمعیت میکروبی گفته می شود. این رویکرد موفقیت قابل توجهی را در زیست پالایی محل های مختلف آلوده نشان داده است. هر چند در برخی موارد، باکتری های جدا شده از سایر محل های آلوده قادر به زندگی در محیط جدید نیستند (۷، ۹). در مطالعه کوالهو و همکاران (۱۰) پتانسیل تجزیه زیستی توسط جمعیت باکتریایی مورد بررسی

1- Biostimulation

2- Bioaugmentation

3- Pseudomonas sp.

۱۸۰ قرار داده شد. بعد از ده روز گرماگذاری، از مایع رویی ارلن‌ها در محیط جامد (محیط معدنی مایع، آگار و ۰/۵ درصد نفت) کشت داده شد و به مدت ۲ روز داخل انکوباتور با دمای 30°C قرار داده شد. باکتری‌هایی که قادر به استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن بودند به صورت کلنی‌هایی با اشکال مختلف دیده شدند.

زیر انجام گرفت. ابتدا محیط کشت معدنی مایع مطابق با جدول ۱ در تعدادی ارلن آماده شد و pH محیط‌ها روی ۷ تنظیم گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C در اتوکلاو به منظور استریل کردن محیط کشت قرار داده شد. سپس ۲ گرم از نمونه خاک غیر آلوده به همراه ۱ درصد نفت خام به ارلن‌ها اضافه شد و در انکوباتور شیکردار در دمای 30°C با دور rpm

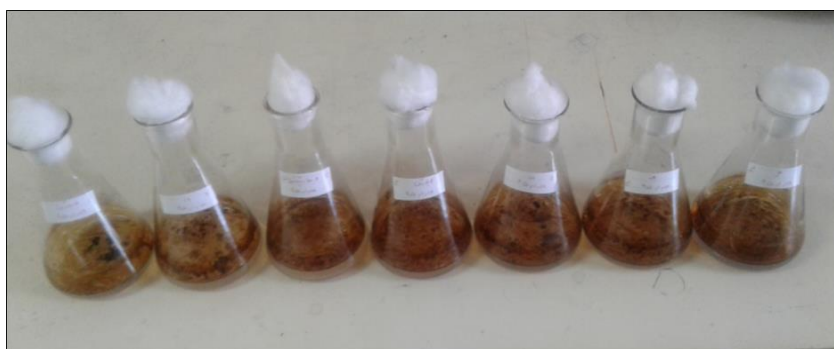
جدول ۱- ترکیبات محیط کشت معدنی مایع

Table 1. The composition of liquid mineral medium

ترکیب	مقدار (gL^{-1})	ترکیب	مقدار (gL^{-1})
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۵	KH_2PO_4	۱
CaCl_2	۰/۰۲	NH_4NO_3	۱
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۵	K_2HPO_4	۱

در تجزیه‌ی ترکیبات نفتی، محیط کشت معدنی مایع به همراه ۱ درصد نفت، همانند روشی که در قبل گفته شد، در ارلن‌ها تهیه گردید و به هرکدام از ارلن‌ها یک نوع از باکتری‌ها اضافه گردید و در دمای 30°C و دور rpm ۱۸۰ به مدت ۱۰ روز در انکوباتور شیکردار قرار داده شد (شکل ۱).

برای خالص‌سازی باکتری‌ها کشت خطی روی محیط کشت جامد حاوی نفت و آگار صورت گرفت و پلیت‌ها در دمای 30°C به مدت ۲ روز گرماگذاری شد. با مقایسه میکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌های ظاهر شده روی محیط، باکتری‌های مختلف خالص‌سازی شدند. به منظور مقایسه توانایی باکتری‌ها



شکل ۱- کشت باکتری‌ها در محیط پایه معدنی

Figure 1. Bacterial culture in mineral base medium

استفاده گردید. هرروز روند حذف نفت در ارلن‌ها با هم مقایسه گردید و در پایان ۱۰ روز نهایتاً دو نوع باکتری که قابلیت بیش تری در استفاده و کاهش هیدروکربن‌های نفتی را داشتند انتخاب گردیدند.

شناسایی باکتری‌ها

جهت سنجش میزان کل هیدروکربن (TPH) از روش آنالیزی کروماتوگرافی گازی با آشکار ساز یونی- شعله ای (GC-FID)

1- Total Petroleum Hydrocarbons
2- Gas Chromatography with Flame Ionization Detector

با استفاده از آزمایش های بیوشیمیایی هم چون رنگ آمیزی، تست KOH، مقایسه شکل ظاهری کلنی ها و شکل میکروسکوپی شناسایی اولیه باکتری ها صورت گرفت و در ادامه شناسایی مولکولی به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز از ژن

با استفاده از آزمایش های بیوشیمیایی هم چون رنگ آمیزی، تست KOH، مقایسه شکل ظاهری کلنی ها و شکل میکروسکوپی شناسایی اولیه باکتری ها صورت گرفت و در ادامه شناسایی مولکولی به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز از ژن

جدول ۲- مخلوط واکنشی PCR

Table 2. Reaction mixture of PCR

حجم (μl)	مواد
۲/۵	PCR Buffer (10X)
۰/۷۵	MgCl ₂ (50mM)
۰/۵	dNTP (10mM)
۱	Forward Primer (10μl)
۱	Reverse Primer (10μl)
۱۴	ddH ₂ O
۰/۲۵	Taq Pol.
۵	Template DNA
۲۵	حجم نهایی

جدول ۳- برنامه دمایی استفاده شده جهت تکثیر DNA

Table 3. Temperature program used to reproduce of DNA

گسترش نهایی ^۵	گسترش ^۴	اتصال پرایمر ^۳	واسرشت ^۲	واسرشت اولیه ^۱	
۷۲°C	۷۲°C	۶۱°C	۹۴°C	۹۴°C	دما
۵ دقیقه	۲ دقیقه	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۳ دقیقه	زمان
۱		۳۵		۱	چرخه

- 1- Primary Denaturation
- 2- Denaturation
- 3- Annealing
- 4- Extension
- 5- Final Extension

جدول ۴- خصوصیات خاک غیر آلوده به نفت

Table 4. Properties of unpolluted soil for oil

واحد	خاک میانگین	مشخصه
درصد	۵/۳۶	رس _ سیلت
درصد	۹۱/۸۴	ماسه
درصد	۳/۸۰	گراول
-	ماسه با کمی گراول	بافت
درصد	۷/۱۴	رطوبت خاک
-	۷/۶۵	pH
μm	۴/۵۸	EC

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌ها

بعد از جداسازی باکتری‌ها و کشت خطی در چند مرحله در محیط نوترینت آگار^۳، هفت جدایه ی مختلف باکتریایی از بین ۱۱ جدایه و براساس درصد کاهش میزان نفت، خالص سازی شد. نتایج حاصل از توانایی رشد باکتری‌ها در محیط معدنی مایع در جدول ۵ نشان داده شده است. دو نوع از باکتری‌ها که بالاترین توانایی تجزیه ترکیبات نفت خام را داشتند برای تهیه کنسرسیون میکروبی و شناسایی انتخاب شدند.

محصول حاصل از PCR^۱ در ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد که نتایج آن در ژل آگارز با ایجاد باند حدود ۱۵۰۰ bp تایید گردید. تعیین شباهت توالی‌های بدست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم افزار Blast مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی رشد باکتری‌ها در محیط خاک

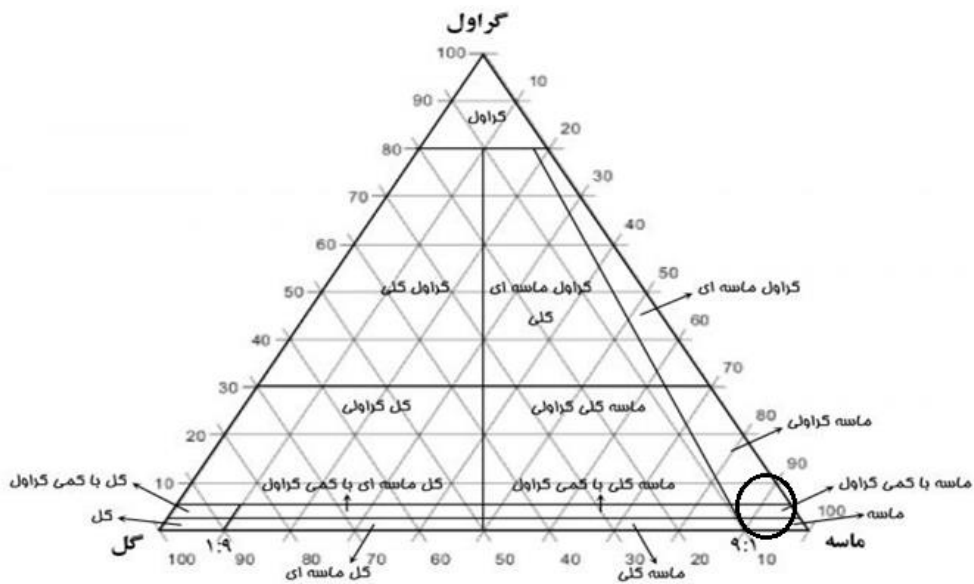
در این آزمایش به منظور مقایسه‌ی توانایی رشد باکتری‌های مختلف در خاک آلوده به نفت از باکتری‌های مختلف استفاده شد. بدین منظور چهار بشر تهیه گردید داخل هر کدام از آن‌ها ۲۰۰ گرم نمونه خاک ریخته شد و بشرها در اتوکلاو استریل گردیدند، به هر نمونه خاک ۴ میلی لیتر نفت خام اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد باکتری‌های مورد نظر با ویژگی $OD_{600} = 2$ به نمونه‌ها اضافه شد. به بشر اول باکتری TP1، بشر دوم باکتری TP2 و به بشر سوم هر دو نوع باکتری تلقیح گردید و بشر چهارم نیز به عنوان نمونه شاهد و فاقد باکتری در نظر گرفته شد. این بشرها به مدت ۳۰ روز داخل انکوباتور در دمای 30°C نگهداری شدند. در پایان با روش آنالیزی GC-FID درصد کاهش TPH در نمونه‌های خاک مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

جهت ارزیابی بافت، رطوبت، میزان اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک از آزمایشات دانه بندی مکانیکی، کاهش وزن نمونه در آون، pH متر و EC متر موجود در آزمایشگاه‌های مکانیک خاک و آبشناسی دانشگاه تبریز استفاده گردید. نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده برای اندازه‌گیری مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی خاک منطقه در جدول ۴ مشاهده می‌شود. همان طور که از شکل ۲ می‌توان استنباط کرد خاک منطقه مورد مطالعه از نوع ماسه با کمی گراول و طبق طبقه بندی یونیفاید از نوع SP-SM تعیین گردید. بیشتر ذرات تشکیل دهنده آن در حد ماسه بوده و ۹۱/۸۴ درصد از اجزای خاک را به خود اختصاص داده است.

3- Nutrient agar

1- Polymerase chain reaction
2- Optical density



شکل ۲- مثلث طبقه بندی رسوبات براساس اندازه ذرات تشکیل دهنده و موقعیت نمونه ها در آن

Figure 2. Triangle classification of sediments based on the size of the particle and the location of the samples

جدول ۵- مقایسه توانایی رشد باکتری ها در محیط آلوده به نفت

Figure 5. Comparison of the ability of bacteria to grow in an oil-contaminated environment

میزان حذف نفت. %	شماره جدایه
۸۰	TP1
۷۰	TP2
۶۰	TP3
۵۵	TP4
۵۰	TP5
۳۰	TP6
۲۰	TP7

ویژگی های ظاهری و نتایج مربوط به شناسایی باکتری ها

در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶- مشخصات باکتری‌ها در محیط کشت

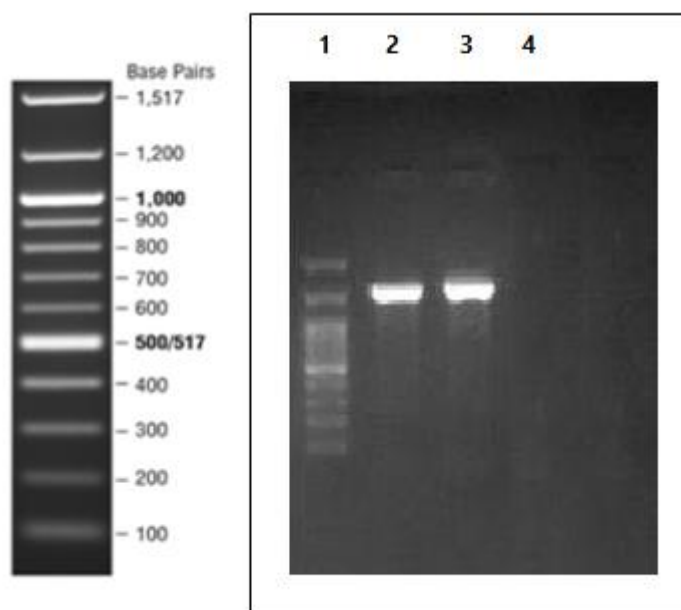
Table 6. Characteristics of bacteria in culture

TP2	TP1	مشخصات
کلنی گرد و مسطح	کلنی گرد و برجسته	شکل ظاهری
سفید	سفید	رنگ کلنی
کوکسی (دایره‌ای)	باسیل (میله‌ای)	شکل میکروسکوپی
منفی	منفی	رنگ آمیزی گرم
مثبت	مثبت	تست KOH
<i>Acinetobacter junii</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> .	PCR

شناسایی سویه‌ها

انجام شد. برای هر دو سویه PCR انجام شد که نتایج آن در ژل آگارز با ایجاد باند حدود ۱۵۰۰ bp تایید گردید (شکل ۳).

در راستای شناسایی مولکولی سویه‌ها، ابتدا استخراج DNA و سپس PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F و RP2



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR

ستون ۱: DNA Ladder 100bp؛ ستون ۲: باکتری TP2؛ ستون ۳: باکتری TP1؛ ستون ۴: کنترل منفی

Figure 3. Image of gel electrophoresis of PCR products. in this profile; column 1: DNA Ladder 100bp; column 2: TP2; column 3: TP1; column 4: negative control

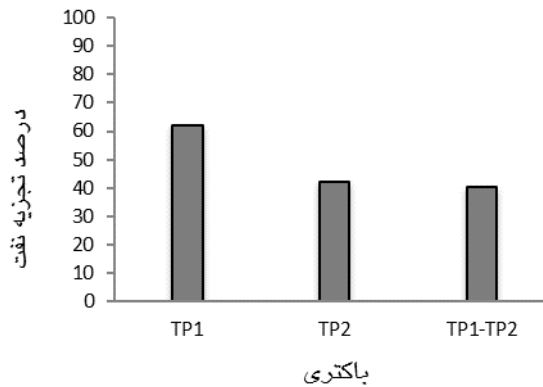
توالی‌یابی

TP2 به *Acinetobacter junii* به میزان ۹۴ درصد شباهت داشتند. با توجه به شکل ۴ و نتایج حاصل از کروماتوگرافی نمونه خاک‌های آلوده به نفت که نتایج آن در شکل‌های ۵، ۶ و ۷ آمده است، می‌توان استنباط نمود که در

توالی‌های بدست آمده با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعات داده‌های ژنومی NCBI با استفاده از ابزار Blast مقایسه شد. نتایج حاصله نشان داد سویه TP1 به باکتری *Pseudomonas stutzeri* به میزان ۹۹ درصد و سویه

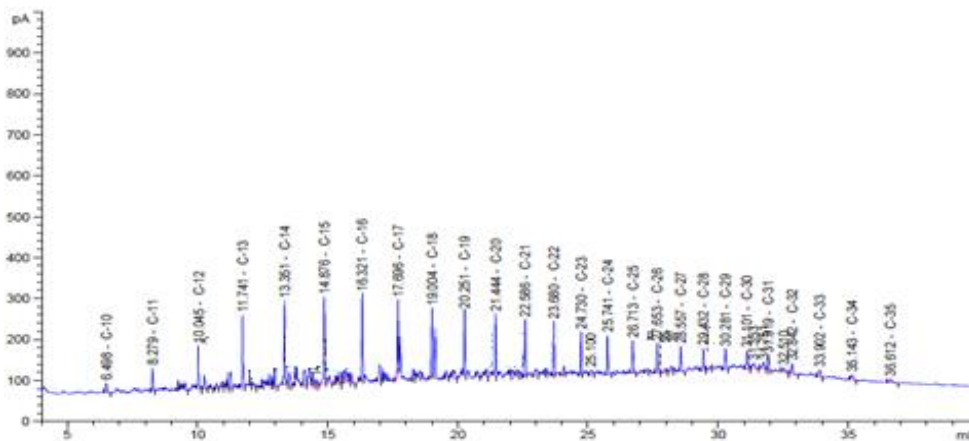
متعدد این گونه باکتری ها و توان تولید آنزیم های گوناگون توسط آن ها نسبت داد. اختلاف ناچیزی در کاهش درصد TPH سویه TP2 و کشت مخلوط دو باکتری دیده می شود که می توان آن را ناشی از خطای آزمایش در نظر گرفت.

دمای ۳۰°C و در طول ۳۰ روز، توانایی تجزیه نفت توسط باکتری TP1، TP2 و کشت مخلوط (TP1 و TP2) به ترتیب ۶۲/۲۵، ۴۲/۳۹ و ۴۰/۲۸ درصد باشد. همان طور که مشاهده می شود میزان کاهش TPH توسط سویه TP1 بیش تر از سویه TP2 و کشت مخلوط دو باکتری می باشد. طبق شاه علیان و همکاران (۱۳۹۳) این اثر را می توان به پلاسمیدهای



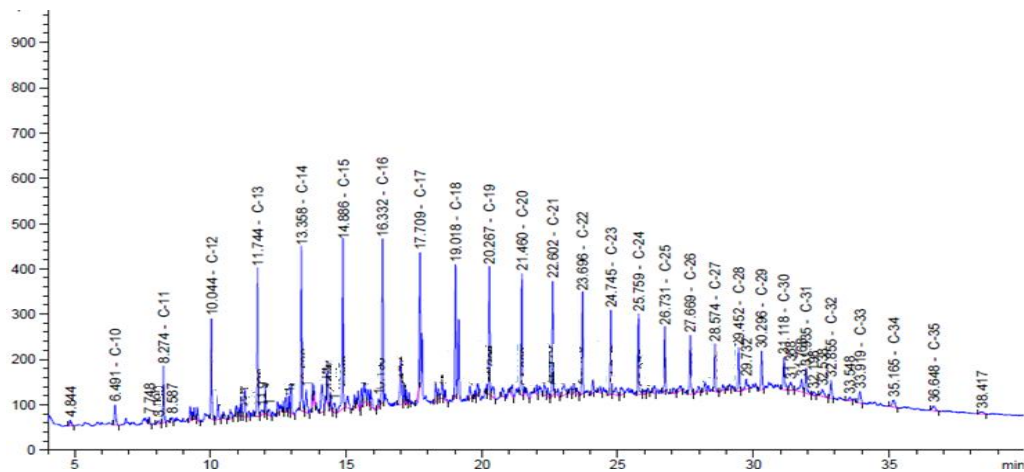
شکل ۴- مقایسه رشد باکتری ها در شرایط دمایی و زمانی یکسان

Figure 4. Comparison of bacterial growth at the same temperature and time



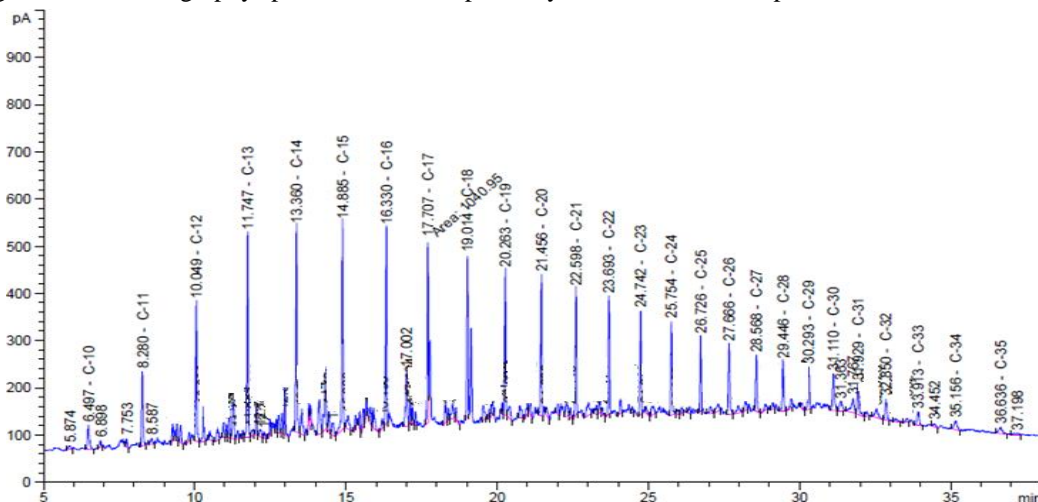
شکل ۵- طیف کروماتوگرافی هیدروکربن های تجزیه شده در نمونه تیمار شده با باکتری TP1

Figure 5. Chromatography spectrum of decomposed hydrocarbons in a sample treated with TP1 bacteria



شکل ۶- طیف کروماتوگرافی هیدروکربن‌های تجزیه شده در نمونه تیمار شده با باکتری TP2

Figure 6. Chromatography spectrum of decomposed hydrocarbons in a sample treated with TP2 bacteria



شکل ۷- طیف کروماتوگرافی هیدروکربن‌های تجزیه شده در نمونه تیمار شده با باکتری TP1-TP2

Figure 7. Chromatography spectrum of decomposed hydrocarbons in a sample treated with TP1-TP2 bacteria

بحث و نتیجه‌گیری

۴۲/۳۹ درصد و کشت مخلوط دو باکتری با قابلیت ۴۰/۲۸ درصد در کاهش TPH دارد.

طی این پژوهش هفت سویه باکتریایی از خاک سطحی آلوده به نفت خام در محوطه پالایشگاه تبریز جداسازی شد که قابلیت تجزیه ترکیبات نفتی را داشتند. دو سویه باکتریایی که توانایی بیشتری در کاهش TPH داشتند انتخاب گردید که با انجام آزمایش PCR و نتایج حاصل از توالی یابی، شناسایی اولیه در حد جنس صورت گرفت. هر دو سویه گرم منفی بوده و بیشترین شباهت را با *Pseudomonas stutzeri* و *Acinetobacter junii* نشان دادند. نتایج بدست آمده از آنالیز GC-FID نشان داد که باکتری سودوموناس با قابلیت ۶۲/۳۵ درصد توانایی بیشتری نسبت به اسینتوباکتر با قابلیت

Reference

1. Andreoni, V., Gianfreda, L., 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, pp. 287-308.
2. Namkoong, W., Hwang E., Y., Park, J. S., Choi, J. Y., 2002. Bioremediation of

8. Lee, K., Merlin, X., 1999. Bioremediation of oil on shoreline environments: development of techniques and guidelines. *Pure and applied chemistry*, 71, pp. 161-171.
9. Timmis, K., N and Pieper, D. H., 1999. Bacteria designed for bioremediation. *Trends in biotechnology*, 17, pp. 201-204.
10. Coelho, F. J. R. C., Sousa, S., Santos, L., Santos, A. L., Almeida, A., GOMES, N. C., CUNHA, Â., 2010. PAH degrading bacteria in an estuarine system. *Interdisciplinary studies on environmental chemistry—biological responses to contaminants*, pp77-87.
11. Shah Alian, F., Safahiyeh, A., Salamat, N., Mojudi, F., Zare Dust, M., 2015. Investigating the role of isolated bacteria from Gulf precipitates in biological removal of oil pollutants (Antracene), *Journal of Environmental Science and Engineering* 1(4), pp. 11-17 (In Persian).
12. Johnsen, A., R and Karlson, U., 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied microbiology and biotechnology*, 63, pp. 452-459.
3. Alexander M, 1995. How toxic are toxic chemicals in soil. *Environmental Science and Technology*, 29: 2713–2717.
4. Chan, H., 2011. Biodegradation of petroleum oil achieved by bacteria and nematodes in contaminated water. *Separation and purification technology*, 80, pp.459-466.
5. Semprini, L., 1998. Current and potential applications of in situ bioremediation. *Biotechnology for Soil Remediation*, pp. 21-27.
6. Priya, N. S., Doble, M., Sangwai, J. S., 2015. Bioremediation of Costal and Marine Pollution due to Crude Oil using a Microorganism *Bacillus Subtilis*. *Procedia Engineering*, 116, pp. 213-220.
7. Abed, R. M., Al-Sabah, J., Al-Maqrashi F, Al-Habsi, A., Al-Hinai, M., 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments: *International Biodeterioration & Biodegradation* 89, pp. 58-66.