محیط زیست طبیعی، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحات: ۱۷۲-۱۶۱

ارزیابی توانایی رشد و تجزیهٔ زیستی نفت سفید توسط چندین باکتری جداسازی شده از خاک و آب آلوده به ترکیبات نفتی

محمد مجرد[۱]، عباس عالم زاده[۲]*، گل‌آفرین قریشی[۳]، محمد جواهری[۴]

۱-کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، پژوهشگاه زیست‌فناوری، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲- دانشیار بخش زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۳- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، پژوهشگاه زیست‌فناوری، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۴- بخش گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

(تاریخ دریافت:۱۳۹۴/۴/۴ ؛ تاریخ تصویب:۱۳۹۵/۹/۱۴)

چکیده

پژوهش حاضر جهت جداسازی و شناسایی باکتری‌های مناسب زیست‌پالایی ترکیبات نفتی موجود در خاک و آب آلوده در منطقهٔ بندرعباس انجام شد. سه نمونه خاک و دو نمونه آب آلوده از پالایشگاه بندرعباس جمع‌آوری و جدایه‌هایی از آن‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد جداسازی شد. با جایگزینی عناصر کربن و گوگرد در محیط کشت باکتریایی SSM با نفت سفید (۲۰٪) قابلیت رشد جدایه‌ها در غلظت بالای نفت سفید بررسی شد. شناسایی جدایه‌ها از طریق تست‌های بیوشیمیایی، کیت شناسایی باکتری API20E و همچنین توالی‌یابی ژن 16S rDNA انجام شد و با استفاده از کروماتوگرافی گازی میزان تجزیهٔ زیستی جدایه‌ها بررسی شد. از نمونه‌های جمع‌آوری شده ۹ جدایه جداسازی و در آزمون جایگزینی عناصر مختلف در محیط کشت باکتریایی SSM با نفت سفید (۲۰٪) مشخص شد که ۴ جدایه توانایی استفاده از ترکیبات گوگردار نفت را دارند. آزمون‌های شناسایی جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌ها *Enterobacter cloacae*، *Enterobacter hormaechei* و دو جدایه *Enterobacter sakazakii* بودند. کروماتوگرافی گازی تأیید کرد که باکتری‌های *Enterobacter cloacae*، *Enterobacter hormaechei* و *Enterobacter sakazakii* به ترتیب ۳۲/۲۴، ۱۱/۹۸ و ۴۴/۹۲ درصد از نفت سفید را به عنوان منبع گوگرد در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد تجزیه کرده‌اند. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد این باکتری‌ها از قابلیت تجزیهٔ زیستی خوبی برخوردار هستند و می‌توان آن‌ها را به عنوان باکتری‌هایی با قابلیت تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفتی معرفی کرد.

کلید واژگان: زیست‌پالایی، نفت سفید، *Enterobacter cloacae*، *Enterobacter hormaechei* و *Enterobacter sakazakii*

* نویسنده مسئول: شماره تماس: ۹۸۷۱۳۲۲۸۶۱۳۴+
Email: alemzadeh@shirazu.ac.ir

۱. مقدمه

امروزه نفت خام و مشتقات آن عمده‌ترین منبع انرژی برای صنعت و زندگی روزانه هستند (Das & Chandran, 2011) و مصرف ۹۲۰۸۶ تن نفت در سال ۲۰۱۴ (Dudley, 2015) اثبات کنندهٔ این واقعیت است. استخراج، تصفیه و فرآوری، انتقال و به‌کارگیری نفت احتمال خطر آلودگی محیط را با نشت تصادفی به‌خصوص در کشورهای تولید کنندهٔ نفت افزایش می‌دهد (Tahhan *et al.*, 2011) ایران با تولید ۱/۸۲ میلیون بشکه در روز طی ۵ سال گذشته (Hafidh, 2016) که به عنوان یکی از تولید کننده‌های مهم نفت خام شناخته می‌شود، از این قاعده مستثنی نیست. آلودگی خاک، آب‌های سطحی و زیر زمینی با هیدروکربن‌های نفتی باعث آسیب گسترده به اکوسیستم می‌شود و برای جانوران، گیاهان و انسان‌ها به دلیل دارا بودن ترکیبات جهش‌زا و سرطان‌زا سمی است (Sarkar *et al.*, 2005؛ Di Martino *et al.*, 2012).

امروزه به سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیست‌پالایی[1] آلودگی‌های نفتی را از بین می‌برند (Sarkar *et al.*, 2005). زیست‌پالایی در مقایسه با سایر روش‌ها، مقرون به صرفه‌تر، کاراتر و سالم‌تر برای محیط و سلامت انسان‌ها است (Sarkar *et al.*, 2005; Crawford, 2006).

سامانهٔ اطلاع رسانی واکنش اضطراری گارد ساحلی ایالات متحده[2]، نفت سفید را به دلیل داشتن ترکیبات سمی فراوانی از قبیل هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک، بنزن، تولوئن و زایلن در ردهٔ مواد آلوده کنندهٔ محیط زیست قرار داده است (Gouda *et al.*, 2008). از طرف دیگر، نفت سفید به دلیل داشتن ترکیباتی از قبیل آلکان‌ها، آلکان‌های حلقوی، الفین‌ها با طول تقریبی زنجیرهٔ ۹ تا ۲۰ کربن (Gouda et al, 2007; Wongsa *et al.*, 2004) می‌تواند به عنوان یک ترکیب نفتی عمومی تلقی شود. به همین دلیل پژوهش پیرامون پالایش و حذف این ماده از محیط ضروری است.

باکتری‌ها به دلیل تنوع ژن‌ها و آنزیم‌های کاتابولیسمی و پتانسیل بالایی که در تجزیهٔ ترکیبات مضر دارند به عنوان یکی از بهترین گزینه‌های برای زیست‌پالایی به حساب می‌آیند. افزون بر این، باکتری‌ها از طریق تغییر در دیوارهٔ سلولی به منظور حفظ عملکردهای زیستی لازم می‌توانند به راحتی خود را با محیط سازگار کنند. باکتری‌ها همچنین می‌توانند با تولید و ترشح موادی مانند رامنولیپید باعث کاهش کشش سطحی شوند و از سوی دیگر با استفاده از پمپ‌های غشایی غلظت مواد سمی در سلول را کاهش دهند (Tyagi *et al.*, 2011). باکتری‌های مناسب برای زیست‌پالایی آلودگی‌های نفتی باید قابلیت آبگریزی، رفتار شناوری و قابلیت تجزیهٔ ترکیبات نفتی را داشته باشند (Lin *et al.*, 2009).

Head و همکاران (۲۰۰۶) پژوهش‌های متعددی را بررسی کردند و در نهایت ۷۹ باکتری را معرفی کردند که توانایی استفاده از هیدروکربن‌های نفت را به عنوان منبع کربن و انرژی دارا بودند. توانایی جنس‌های مختلف باکتریایی در تجزیهٔ زیستی نفت متفاوت است و پژوهشگران نشان داده‌اند که باکتری‌های جداسازی شده از خاک، نرخ تجزیه بین ۰/۱۳ تا ۵۰ درصد را دارا بودند (Das & Chandran, 2011).

به دلیل تأثیر عوامل مختلف محیطی از قبیل دما، رطوبت و pH در فلور طبیعی هر منطقه (Faoro *et al.*, 2010) یافتن گونه‌ها و سویه‌های بومی هر منطقه برای فرآیند زیست‌پالایی ضروری به نظر می‌رسد. بر این اساس در این پژوهش دو هدف ۱) جداسازی و بررسی خصوصیات باکتری‌های تجزیه کنندهٔ نفت از خاک و آب آلوده در پالایشگاه بندر عباس در ایران ۲) بررسی توانایی رشد و تحمل باکتری‌ها در غلظت بالای نفت سفید در غیاب منابع کربن، گوگرد یا نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت.

1. Bioremediation
2. US Coast Guard Emergency Response Notification System

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع‌آوری نمونه‌ها و ترکیبات محیط کشت

از پالایشگاه بندرعباس سه نمونه خاک و دو نمونه آب در سال ۱۳۹۰ تهیه شد. در این پژوهش ۴ محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت: آگار مغذی، LB، 2xYT و SMM[1]. محیط کشت SSM محتوی ۶ گرم K_2HPO_4، 3 گرم KH_2PO_4، 4 گرم سوکسینک اسید، ۱ گرم $(NH_4)_2SO_4$ و ۰/۲ گرم $MgSO_4$ بود که در یک لیتر آب مقطر حل شد و در نهایت pH محیط کشت با استفاده از NaOH یک مولار روی ۷ تنظیم شد (Meyer *et al.*, 1978). برای تهیهٔ محیط کشت SSM فاقد کربن، سوکسینک اسید از محیط کشت حذف شد. برای ایجاد کمترین تغییر در محیط کشت SSM فاقد منبع گوگرد از $MgCl_2$ و $(NH_4)_2PO_4$ به جای $MgSO_4$ و $(NH_4)_2SO_4$ استفاده شد. تمام محیط‌های کشت در دمای ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شدند.

۲.۲. جداسازی و شرایط کشت

جداسازی باکتری از تمامی نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد صورت گرفت. برای جداسازی باکتری ۱ گرم خاک و ۱ میلی‌لیتر آب از هر نمونه به ۱۰ میلی‌لیتر LB در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد و به مدت یک روز در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه هوادهی شد. با گذشت ۱ روز، کدر شدن محیط کشت نشان‌دهندهٔ رشد باکتری‌ها در محیط کشت بود. از کنسرسیوم باکتری‌ها سریال رقت (10^{-3} تا 10^{-7}) تهیه شد و از هر کدام ۵۰ ماکرولیتر به صورت جداگانه روی محیط آگار مغذی کشت داده شده و ۱ روز در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد رشد داده شدند. باکتری‌های غالب رشده کرده روی محیط بر اساس خصوصیات مورفولوژیک انتخاب شدند. تمام جدایه‌های انتخاب شده خالص‌سازی و با گلیسرول ۲۰٪ (حجمی/حجمی) مخلوط و در برودت ۸۰- سانتی‌گراد برای آزمایشات بعدی نگهداری شدند.

۳.۲. بررسی توانایی رشد جدایه‌ها در نفت سفید

۱.۳.۲. غلظت ۲/۵٪ نفت سفید

با این آزمایش قابلیت زنده ماندن و رشد جدایه‌ها در رقت کم نفت سفید بررسی شد. ۵ میلی‌لیتر از باکتری‌های تازه رشد کرده در محیط کشت مایع SSM با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند و رسوب باکتری‌های به‌دست آمده به نحوی در محیط کشت فاقد منبع کربن SSM به‌صورت تعلیق درآمد که جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر در حدود ۰/۴۷-۰/۵۳ شد؛ بعد از آن ۲/۵ درصد نفت سفید به این مخلوط اضافه و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد رشد داده شدند. روند رشد باکتری‌ها هر ۲۴ ساعت به مدت ۲ روز با استفاده از دستگاه UV/Vis spectrophotometer SP-3000 Plus (شرکت اپتیما، توکیو، ژاپن) بررسی شد.

۲.۳.۲. غلظت ۲۰ نفت سفید

به منظور بررسی توانایی بقای باکتری‌های جدا شده در غلظت ۲۰٪ نفت سفید جدایه‌های خالص شده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت SSM برای مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد و از هر کشت تازه در محیط کشت SSM تغییر یافته (فاقد یکی از عناصر کربن، گوگرد یا نیتروژن) به نحوی کشت داده شد که جمعیت اولیهٔ باکتری‌ها برابر ۳۰۰۰ تا ۶۰۰۰ سلول باکتری در میلی‌لیتر باشد و بعد از آن ۲۰ درصد نفت سفید به آن اضافه شد. باکتری‌ها به شیکر-انکوباتور منتقل و با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد رشد داده شدند و روند رشد آن‌ها با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب نوری توسط دستگاه UV/Vis spectrophotometer SP-3000 Plus در زمان‌های ۱۸ و ۳۶ ساعت بعد از کشت بررسی شد. در هر

1. Standard Succinate Medium

آزمایش، از محیط تغییر یافته به همراه ۲۰ درصد نفت سفید بدون اضافه کردن باکتری به عنوان کنترل منفی و از محیط کشت کامل SSM با شرایط کشت مشابه آزمایش به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

۴.۲. بررسی تجزیهٔ زیستی

برای بررسی توانایی جدایه‌های انتخاب شده در تجزیهٔ ترکیبات نفت سفید از کروماتوگرافی گازی استفاده شد. در ابتدا جدایه‌ها در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت SSM کامل در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه به مدت یک شب کشت داده شدند. سپس، باکتری‌های رشد کرده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شده و رسوب حاصل در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت SSM تغییر یافته به همراه ۱۰ درصد نفت سفید برای آزمایش در محیط بدون گوگرد به صورت تعلیق درآمد. باکتری‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه در شیکر-انکوباتور رشد داده شدند. بعد از ۷ روز نفت سفید باقی‌مانده با استفاده از ان-هگزان استخراج شد و ۱ ماکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. تمامی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Varian 3700 Gas Chromatograph (شرکت واریان، کالیفرونیا، ایالات متحدهٔ آمریکا) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای با SP-2100 on 80/100 SUPELCOPROT ٪۱۰ (شرکت سیگما-آلدریچ سوپلکو، پنسیلوانیا، ایالات متحدهٔ آمریکا) استفاده شد. از گاز هلیوم به عنوان گاز حمل کننده با سرعت ۳۰ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. دمای تزریق و دمای گیرنده به ترتیب ۲۰۵ و ۳۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود. دمای اولیه ستون ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شده و هر ۱ دقیقه ۵ درجهٔ سانتی‌گراد دما افزایش یافت تا به دمای نهایی ۲۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد رسید و در این دما به مدت ۱۰ دقیقه ثابت باقی ماند. این برنامه کروماتوگرافی گازی پیشتر توسط Wongsa و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شده بود. تجزیه و تحلیل توسط نرم‌افزار Chem Station A.08.03[847] که توسط شرکت سازندهٔ کروماتوگرافی گازی ارائه شده، انجام شد. میزان تجزیهٔ زیستی نفت سفید از مقایسهٔ سطح زیر نمودار نمونه‌ها با سطح زیر نمودار شاهد مشخص شد.

۵.۲. شناسایی ایزوله‌های انتخاب شده

شناسایی ایزوله‌های انتخاب شده از طریق تست‌های بیوشیمیایی، کیت شناسایی API (بیومریکس) و توالی یابی ژن 16S rDNA انجام شد.

آزمون گرم، هوازی/بی‌هوازی ، اکسیداز، کاتاز و قابلیت تحرک ایزوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه از کیت شناسایی API20E (بیومریکس، مارسی، فرانسه) براساس دستورالعمل سازندهٔ کیت استفاده شد و سپس نتایج به‌دست آمده به استفاده از نرم‌افزار apiweb™ که به همراه کیت ارائه می‌شود بررسی شد.

بعد از شناسایی جدایه‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی برای شناسایی بهتر آن ژن 16S rDNA آن‌ها توالی‌یابی شد. در ابتدا باکتری‌ها در ۵ میلی‌لیتر LB در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد کشت داده شدند سپس DNA ژنومی باکتری‌ها با استفاده از روش CTAB تغییر یافته استخراج شد. برای تکثیر ژن 16S rDNA با استفاده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از آغازگرهای بالادست fDI با توالی AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′-5′ و آغازگر پایین‌دست rP2 با توالی ACGGCTACCTTGTTACGACT-3′-5′ استفاده شد (Weisburg *et al.*, 1991). تمامی واکنش‌ها با استفاده از دستگاه Bioer Gene Pro PCR (شرکت بیوار تکنولوژی، پکن، چین) در حجم ۳۰ ماکرولیتر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مطابق برنامه زیر انجام شد: دمای واسرشت سازی اولیهٔ ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه با دمای واسرشت سازی ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای بسط ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت بسط

نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ژل آگار ۱ درصد و اتیدیوم برماید (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بررسی شد و سپس برای توالی‌یابی به شرکت Bio Basic کانادا ارسال شد. توالی‌های خوانده شده با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI نسخه ۹ بررسی و در نهایت با استفاده از برنامهٔ BLASTN وب‌گاه NCBI با توالی‌های موجود بانک ژن مقایسه شدند.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری را با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1.3 Portable انجام شد. برای این تحقیق طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار استفاده و مقایسهٔ میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. جداسازی و بررسی توانایی رشد جدایه‌ها در نفت سفید

نه ایزوله از تمامی نمونه‌ها جمع‌آوری شده از پالایشگاه بندرعباس در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد جداسازی شد (جدول ۱).

جدول ۱. ایزوله‌های جداسازی شده از نمونه‌های جمع‌آوری شده

ایزوله	نمونه‌ای که ایزوله از آن جدا شده است
BS1	خاکی که فرآینده زیست‌پالایی بر روی آن صورت گرفته است
BS2	خاکی که فرآینده زیست‌پالایی بر روی آن صورت گرفته است
BS5	خاکی که فرآینده زیست‌پالایی بر روی آن صورت گرفته است
CSs1	خاک سطحی آلوده به نفت خام سنگین
CSs2	خاک سطحی آلوده به نفت خام سنگین
CSs3	خاک سطحی آلوده به نفت خام سنگین
CSd2	خاک آلوده به نفت خام سنگین در عمق ۵ سانتی‌متری
CWi1	آب ورودی به تصفیه‌خانه پالایشگاه
CWo1	آب خروجی از تصفیه‌خانه پالایشگاه

** اعداد نشان دهندهٔ شماره ایزوله جدا شده از نمونهٔ مورد نظر است

۲.۳. میزان رشد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی ۲/۵ درصد نفت سفید به جای منبع کربن

رشد باکتری‌ها در محیط کشت SSM فاقد منبع کربن با جایگزینی ۲/۵٪ (حجمی/حجمی) نفت سفید نشان داد که این باکتری‌ها توانایی استفاده از نفت سفید را در غلظت پایین دارا هستند (جدول ۲).

۳.۳. میزان رشد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی ۲۰ درصد نفت سفید به جای منبع کربن

پس از تأیید توانایی رشد باکتری‌های انتخاب شده روی محیط حاوی غلظت کم نفت سفید (۲/۵٪)، توانایی رشد آن‌ها در محیط حاوی ۲۰٪ نفت سفید مورد آزمون قرار گرفت. جدول ۳ نتایج آزمون حذف سوکسینک اسید و اضافه کردن نفت سفید به عنوان تنها منبع کربن طی

۱۸ و ۳۶ ساعت نشان داده شده است. طی ۱۸ ساعت و در محیط کامل تنها ایزوله BS5 رشد نکرده بود و سایر ایزوله رشد داشتند. در دو محیط کشت دیگر یعنی محیط کشت بدون منبع کربن و همچنین محیط کشت بدون منبع کربن به همراه ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) نفت سفید شاهد رشدی نبودیم و میزان رشد هیچ یک از ایزوله‌ها بین دو محیط کشت تفاوت معنی‌داری نداشت.

طی ۳۶ ساعت تمامی ایزوله‌ها در محیط کشت کامل SSM به‌طور کامل رشد کرده بودند، با این حال تفاوت معنی‌داری بین رشد باکتری‌ها در محیط کشت کامل SSM نسبت به محیط کشت SSM فاقد منبع کربن حاوی نفت سفید و محیط SSM فاقد منبع کربن وجود نداشت.

جدول ۲. میزان جذب نوری محیط‌های کشت باکتری در محیط کشت SSM بدون منبع کربن با جایگزینی ۲/۵٪ (حجمی/حجمی) در OD_{600}.

جدایه	روز اول	روز دوم
BS1	۰/۴۷۱	۰/۵۲۷
BS2	۰/۴۷۱	۰/۵۲۷
BS5	۰/۶۹	۰/۷۲۱
CSs1	۰/۷۶۶	۰/۶۴۲
CSs2	۰/۴۶۴	۰/۵۴
CSs3	۰/۶۴۸	۰/۶۳۳
CSd2	۰/۴۱۴	۰/۵۰۷
CWi1	۰/۵۷۳	۰/۵۱۵
CWo1	۰/۷۵۷	۰/۷۸۸

جدول ۳. میزان جذب نوری برای جدایه‌های مختلف در شرایط متفاوت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر طی ۱۸ و ۳۶ ساعت.

	۱۸ ساعت			۳۶ ساعت		
جدایه	SSM	SSM^{-C}	SSM^{-C}_{+k}	SSM	SSM^{-C}	SSM^{-C}_{+k}
BS1	۰/۱۹۶۵^{a}	۰/۰۱۱۸^{b}	۰/۰۲۳^{b}	۱/۳۳۹۶^{a}	۰/۰۲۵۴^{b}	۰/۰۲۹۸^{b}
BS2	۱/۴۵۴۵۰^{a}	۰/۰۱۴۶۷^{b}	۰/۰۳۱۷۵^{b}	۱/۰۸۱۸^{a}	۰/۰۳۴۸^{b}	۰/۰۴۵۶^{b}
BS5	۰/۰۶۴^{a}	۰/۰۲۹۴^{b}	۰/۰۳۱۴^{b}	۱/۳۲۶۴۰^{a}	۰/۰۲۷۵۰^{b}	۰/۰۲۱۸۰^{b}
CSs1	۰/۱۹۱۸^{a}	۰/۰۳۲۶۷^{b}	۰/۰۳۶۰۰^{b}	۱/۴۵۱۴^{a}	۰/۰۷۰۰^{b}	۰/۰۷۲۴^{b}
CSs2	۰/۱۴۲۰۰^{a}	۰/۰۱۷۰۰^{b}	۰/۰۴۰۶۰^{b}	۱/۲۲۴۶۰^{a}	۰/۰۵۸۲^{b}	۰/۰۴۴۳^{b}
CSs3	۰/۱۵۲۷۵^{a}	۰/۰۱۲۴۰^{b}	۰/۰۳۶۸۰^{b}	۱/۳۵۹۲^{a}	۰/۰۲۴۴^{b}	۰/۰۲۳۲^{b}
CSd2	۰/۱۴۳۴۰^{a}	۰/۰۳۹۰۰^{b}	۰/۰۳۳۷۵^{b}	۱/۰۸۳۰۰^{a}	۰/۰۴۲۰۰^{b}	۰/۰۳۳۲۰^{b}
CWi1	۰/۱۵۳۵۰^{a}	۰/۰۲۲۰۰^{b}	۰/۰۳۱۷۵^{b}	۱/۱۴۶۰۰۵^{a}	۰/۰۵۶۶۰^{b}	۰/۰۶۴۵۰^{b}
CWo1	۱/۲۰۸۳۳^{a}	۰/۰۲۹۷۵^{b}	۰/۰۴۶۷۵^{b}	۱/۴۳۰۳^{a}	۰/۰۳۹۸^{b}	۰/۰۶۶۰^{b}

در هر بخش (۱۸ ساعت و ۳۶ ساعت) بین حروف کوچک مشابه در هر ردیف تفاوت معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح ۵٪ وجود ندارد.

SSM^{-C} محیط کشت SSM فاقد منبع کربن

SSM^{-C}_{+k} محیط کشت SSM فاقد منبع کربن حاوی ۲۰٪ نفت سفید

۴.۳. میزان رشد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی ۲۰ درصد نفت سفید به جای منبع گوگرد

جدول ۴ نتایج رشد جدایه‌ها را در محیط فاقد منابع گوگرد و اضافه کردن نفت سفید به جای آن طی ۱۸ و ۳۶ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که طی ۱۸ ساعت، تمامی جدایه‌ها به جز CSs2 در محیط کشت SSM فاقد منبع گوگرد به همراه نفت سفید رشد معنی‌داری نسبت به محیط کشت SSM فاقد منبع گوگرد داشته است. حتی برخی جدایه‌های در محیط کشت SSM تغییر یافته به همراه نفت سفید رشد برابر و یا بیشتری نسبت به محیط کشت کامل SSM داشتند. رشدی برای جدایه BS5 در هیچکدام از محیط کشت‌ها در ۱۸ ساعت مشاهده نشد. طی ۳۶ ساعت، تمامی جدایه‌ها در محیط کشت کامل SSM رشد مطلوبی داشتند و جدایه‌های BS1، BS2، CSd2 و CWo1 به‌طور معنی‌داری از رشد بیشتری در محیط کشت SSM فاقد منبع گوگرد به همراه نفت سفید نسبت به محیط کشت SSM فاقد منبع گوگرد برخوردار بودند، هرچند رشد هیچکدام از جدایه‌ها در محیط کشت SSM فاقد گوگرد با جایگزینی نفت سفید به اندازهٔ محیط کشت SSM کامل نبود. با توجه به نتایج به‌دست آمده جدایه‌های BS1، BS2، CSd2 و CWo1 برای شناسایی و بررسی میزان تجزیهٔ زیستی با کروماتوگرافی گازی انتخاب شدند.

جدول ۴. میزان جذب نوری برای جدایه‌های مختلف در شرایط متفاوت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر طی ۱۸ و ۳۶ ساعت.

جدایه	۱۸ ساعت			۳۶ ساعت		
	SSM	SSM^{-S}	SSM^{-S}_{+k}	SSM	SSM^{-S}	SSM^{-S}_{+k}
BS1	۰/۱۸۰۴^{a}	۰/۰۸۸۶^{c}	۰/۱۲۸۶^{b}	۱/۲۲۷۴۰^{a}	۰/۲۵۸۵۰^{c}	۰/۵۳۳۸۰^{b}
BS2	۱/۲۸۳۶۰^{a}	۰/۰۶۷۲۵^{c}	۰/۳۲۷۶۰^{b}	۱/۰۳۵۰۰^{a}	۰/۲۹۳۶۰^{c}	۰/۶۶۱۴۰^{b}
BS5	۰/۰۵۳۷۵^{b}	۰/۰۴۷۰۰^{b}	۰/۰۷۰۰^{a}	۱/۲۶۶۵۰^{a}	۰/۶۵۰۰۰^{b}	۰/۷۵۶۸۰^{b}
CSs1	۰/۱۶۴۴۰^{a}	۰/۰۶۱۴۰^{c}	۰/۱۱۲۲۵^{b}	۱/۵۶۰۴^{a}	۰/۲۷۳۴^{b}	۰/۴۴۸۰^{b}
CSs2	۰/۱۶۷۲۰^{a}	۰/۰۷۷۲۰^{b}	۰/۱۰۷۰۰^{b}	۱/۳۶۶۴۰^{a}	۰/۳۲۸۶۰^{b}	۰/۴۴۲۲۰^{b}
CSs3	۰/۱۳۲۵۰^{ab}	۰/۰۹۲۷۵^{b}	۰/۱۴۶۷۵^{a}	۱/۲۶۴۲^{a}	۰/۲۴۰۰^{b}	۰/۴۹۵۰^{b}
CSd2	۰/۱۲۰۴۰^{a}	۰/۰۷۱۰۰^{b}	۰/۱۱۸۵۰^{a}	۱/۰۶۲۰۰^{a}	۰/۲۵۵۶۰^{c}	۰/۴۳۰۶۰^{b}
CWi1	۰/۱۴۸۲۵^{b}	۰/۲۰۹۰۰^{ab}	۰/۳۱۳۵۰^{a}	۱/۰۹۴۴۰^{a}	۰/۴۷۱۲۰^{b}	۰/۴۱۳۰۰^{b}
CWo1	۱/۰۹۳۸۰^{a}	۰/۰۲۲۶^{b}	۰/۳۱۰۷۵^{b}	۱/۲۳۱۲۰^{a}	۰/۳۱۴۸۰^{b}	۰/۶۰۳۸۰^{b}

در هر بخش (۱۸ ساعت و ۳۶ ساعت) بین حروف کوچک مشابه در هر ردیف تفاوت معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح ۵٪ وجود ندارد.

SSM^{-S} محیط کشت SSM فاقد منبع گوگرد

SSM^{-S}_{+k} محیط کشت SSM فاقد منبع گوگرد حاوی ۲۰٪ نفت سفید

۵.۳. شناسایی جدایه‌های انتخاب شده

جدایه‌های BS1، BS2، CSd2 و CWo1 با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و کیت شناسایی API20E و توالی‌یابی ژن 16S rDNA شناسایی شدند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۵. مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های برگزیده

جدایه	گرم	هوازی/بی‌هوازی	اکسیداز	کاتالاز	تحرک
BS1	-	بی‌هوازی اختیاری	-	+	+
BS2	-	بی‌هوازی اختیاری	-	+	+
CSd2	-	بی‌هوازی اختیاری	-	+	+
CWo1	-	بی‌هوازی اختیاری	-	+	+

شناسایی اولیه براساس نتایج کیت کیت شناسایی API20E مشخص کرد که تمامی جدایه‌های متلعق به جنس *Enterobacter* sp. هستند. با مقایسهٔ توالی ژن 16S rDNA جدایه‌ها در پایگاه داده NCBI مشخص شد که ایزوله BS1 با توالی ژن 16S rDNA باکتری *Enterobacter cloacae*، ۹۹٪ مشابهت دارد. سویه XJUHX-4 باکتری *Enterobacter hormaechei* با توالی ژن 16S rDNA جدایه CSd2، ۹۹٪ مشابهت داشت. نتایج مقایسه برای دو جدایه BS2 و CWo1 مشخص کرد که هر دو، با باکتری (*Cronobacter sakazakii*) *Enterobacter sakazakii* به میزان ۹۵٪ مشابهت دارند. با توجه به مشابه بودن این دو جدایه بررسی میزان تجزیهٔ زیستی با کروماتوگرافی گازی تنها از جدایه BS2 استفاده شد.

۶.۳. بررسی میزان تجزیهٔ زیستی

میزان تجزیهٔ زیستی نفت سفید توسط جدایه‌های برگزیده در محیط کشت SSM فاقد منبع گوگرد که حاوی ۱۰٪ (حجمی/حجمی) نفت سفید بود پس از ۷ روز اندازگیری شد. نتایج حاصله نشان داد که باکتری‌های *E. cloacae*، *E. hormaechei* و *E. sakazakii* به ترتیب ۳۲/۲۴، ۱۱/۹۸ و ۴۴/۹۲ درصد از نفت سفید را به عنوان منبع گوگرد در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد استفاده کردند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش نه ایزوله از پنج نمونه جمع‌آوری شد. به دلیل آلودگی طولانی مدت در نمونه‌ها وجود باکتری‌های تجزیه کنندهٔ نفت در آن‌ها قابل پیش‌بینی بود. عوامل فیزیکی به‌خصوص دما نقش مهمی در تنوع میکروبی و توانایی تجزیهٔ زیستی دارد (Das and Chandran, 2011; Gouda *et al.*, 2008)، از طرف دیگر وجود اقلیم گرم بیابانی برای بندرعباس امکان یافتن ایزوله‌هایی که قابلیت تجزیهٔ نفت را در مناطقی با چنین اقلیمی افزایش می‌دهد. در بسیاری از پژوهش‌ها از خاک و آب آلوده، باکتری‌هایی که قابلیت تجزیهٔ زیستی داشتند، جداسازی شده است (Hassanshahian *et al.*, 2012; Madueño *et al.*, 2011).

نفت سفید به دلیل دارا بودن ترکیبات سمی فراوان و متنوع یک ترکیب نفتی عمومی تلقی می‌شود. برای همین در این پژوهش و بسیاری از تحقیقات دیگر به کار برده شده است (Gouda et al, 2007; Wongsa *et al.*, 2004). در پژوهش‌های مشابه برای بررسی قابلیت باکتری‌ها در تجزیهٔ ترکیبات نفتی از مشتقات نفتی دیگری چون نفت خام، نفت گاز، تولوئن و نفتالین نیز استفاده شده است (Mirdamadian *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

عدم توانایی رشد جدایه‌ها در غلظت بالای نفت سفید در محیط کشت SSM فاقد منابع کربن می‌توان از چند

جنبه بررسی کرد. نخست با بررسی نتایج به‌دست آمده از آزمون جایگزینی منبع کربن را با غلظت ۲/۵ درصد نفت سفید در محیط کشت SSM فاقد منبع کربن مشخص شد که جدایه‌ها توانایی استفاده از هیدروکربن‌های نفت در غلظت پائین را دارند (جدول ۳) با این حال، رشدی در غلظت بالای نفت سفید به جای منبع کربن مشاهده نشد. از این دو نتیجه می‌توان چنین برداشت کرد که ممکن است درصد بالای نفت سفید موجب ممانعت از رشد باکتری‌ها و عدم استفادهٔ آن‌ها از هیدروکربن‌های نفت به‌جای منبع کربن شده باشد. پیشتر پژوهشگرانی چون Gouda و همکاران (۲۰۰۷) غلظت ۲ تا ۸ درصد نفت سفید و همچنین Di Martino (۲۰۱۲) غلظت ۱۰ درصد نفت سفید را در پژوهش‌های خود استفاده کردند که کمتر از غلظت مورد استفاده در پژوهش حاضر است. استفاده از غلظت بالای نفت سفید این امکان را فراهم می‌کند تا باکتری‌هایی که توانایی زنده ماندن و فعالیت در آلودگی‌های شدید نفتی را دارند، شناسایی شوند. Mojarrad و همکاران (۲۰۱۶) و همچنین Ghoreishi و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهش مشابه‌ای چندین جدایه از جنس *Entrobacter* sp. و *Pseudomonas* sp. معرفی کردند که توانایی استفاده از غلظت ۲۰ درصد نفت سفید را به عنوان منبع کربن در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد داشتند. تفاوت این پژوهش‌ها با تحقیق حاضر تنها در دمای جداسازی و رشد باکتری‌ها بود. پس می‌توان نتیجه گرفت که دما عامل تأثیرگذار در فعالیت و زنده ماندن باکتری‌ها در آلودگی‌های شدید نفتی است. دما به طور مستقیم بر تجزیهٔ شیمیایی نفت و به طور غیر مستقیم بر تنوع و فیزیولوژی فلور میکروبی اثر می‌گذارد (Das & Chandran, 2011). از طرف دیگر در آزمون جایگزینی منبع کربن با غلظت ۲/۵ درصد نفت سفید جمعیت اولیهٔ بیشتری نسبت به آزمون ۲۰٪ نفت سفید وجود داشتند، در نتیجه این احتمال وجود دارد که جمعیت بالای سلول‌های باکتری موجب القای قدرت استفاده از هیدروکربن‌های نفت شده باشد. Liu و همکاران (۲۰۱۰) در آزمایشی با رسوب دادن باکتری‌هایی که در اواخر فاز لگاریتمی بودند و کشت آن‌ها در محیط کشت حاوی اکتادکان به‌علاوه نفت خام مشخص کردند که سویه‌ای از جنس *Alcanivorax* sp. توانایی تجزیهٔ الکان خطی و اکان شاخه دار (C13-C30) نفت خام را به عنوان منبع کربن دارا می‌باشند.

گوگرد در ترکیب با هیدروکربن‌ها در نفت وجود دارد و برخی از میکرارگانیسم‌ها می‌توانند با شکستن این ترکیبات از گوگرد موجود در آن‌ها استفاده کنند. در اکثر پژوهش‌ها هیدروکربن‌های گوگرد دار را از ترکیبات نفتی و نفت خام استخراج و سپس توانایی تجزیهٔ این ترکیبات توسط باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (Das & Mukherjee, 2007; Mishra *et al.*, 2001). در این پژوهش از ترکیبات گوگرد دار خالص شده از ترکیبات نفتی استفاده نشد و نفت سفید به‌طور مستقیم به عنوان منبع گوگرد بررسی شد تا شرایط آلودگی طبیعی برای جدایه‌ها شبیه سازی شود.

در چندین پژوهش نشان داده شد که باکتری‌هایی با قابلیت استفاده از ترکیبات نیتروژن‌دار نفت وجود دارند (Das & Mukherjee, 2007; Mishra *et al.*, 2001) ولی در پژوهش حاضر ایزوله‌ای که چنین قابلیتی داشته باشد جداسازی و شناسایی نشد. چندین دلیل می‌تواند موجب عدم کسب نتیجهٔ مطلوب در این آزمایش باشد. نیتروژن یکی از مواد معدنی ضروری برای رشد باکتری و یکی از عوامل محدود کنندهٔ فعالیت زیست‌پالایی نفت است (Evans *et al.*, 2004; Boopathy, 2000) و ممکن است ترکیبات نیتروژن دار موجود در نفت سفید منبع نیتروژن مورد نیاز باکتری‌ها را فراهم نکرده باشد و در نتیجه رشدی برای باکتری‌ها مشاهده نشد. از طرف دیگر ممکن است غلظت بالای نفت سفید (۲۰٪ حجمی/حجمی) برای جمعیت اولیهٔ ایزوله‌ها که در شرایط کمبود نیتروژن نیز هستند، کشنده بوده باشد.

گونه‌های جنس *Entrobacter* sp. در بسیاری از پژوهش‌ها به عنوان باکتری‌هایی با قابلیت تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفتی معرفی شده‌اند (Pau-Roblot *et al.*, 2013; Pelaez *et al.*, 2013). باکتری‌های تجزیه کنندهٔ نفت

توانایی تجزیهٔ حجم‌های متفاوتی از ترکیبات نفتی را دارا می‌باشند. Gouda و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که *Pseudomonas* sp. AP، *Pseudomonas* sp. CK و Gordonia sp. DM حدود ۶۵ تا ۸۵ درصد نفت سفید را در مدت ۲۱ روز تجزیه کرده‌اند. Wongsa و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که باکتری‌های تجزیه کنندهٔ نفت مورد استفاده، ۵۰ درصد غلظت ۱٪ نفت سفید را در مدت ۷ روز تجزیه کردند. با مقایسهٔ نتایج پژوهش‌های مشابه با نتایج این پژوهش و همچنین توجه به این نکته که غلظت نفت مورد استفاده برای آزمایش تجزیهٔ زیستی در این تحقیق (۱۰٪ حجمی/حجمی) بوده و مدت زمان کمتری، تنها ۷ روز برای تجزیهٔ نفت توسط باکتری‌ها در نظر گرفته شده است، می‌توان چنین عنوان کرد که این باکتری‌های شناسایی شده، باکتری‌های مناسبی برای تجزیهٔ آلودگی‌های نفتی هستند. مجرد و همکاران در دو پژوهش جداگانه گزارش کردند که *E. cloacae* و *E. hormaechei* توانستند به ترتیب ۳۲/۲۴٪ و ۱۲/۹۸٪ غلظت ۱۰٪ نفت سفید را به عنوان منبع گوگرد در مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد تجزیه کنند (Mojarrad *et al.*, 2016). با مقایسهٔ نتایج این آزمایش‌ها با پژوهش حاضر می‌توان چنین برداشت کرد که افزایش دما موجب کاهش توانایی این باکتری‌ها در تجزیهٔ نفت سفید شده است.

۵. سپاسگزاری

زحمات آقای مهندس سپهری و پالایشگاه بندرعباس و همکاری صمیمانهٔ خانم مهندس کیانی و دانشکدهٔ مهندسی شیمی، نفت و گاز دانشگاه شیراز در اجرای این پروژه قابل تقدیر و سپاسگزاری است.

References

Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology 74, 63-67.

Crawford, R.L., 2006. Bioremediation. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes, Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology. 3rd ed. Springer Science + Business Media Inc., New York, USA, Vol. 1 pp. 850-863.

Das, K., Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology 98, 1339-45.

Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnology Research International 2011, 1-13.

Di Martino, C., López, N.I., Raiger Iustman L.J., 2012 Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. International Biodeterioration & Biodegradation 67, 15-20.

Dudley B., 2015. BP Statistical Review of World Energy June 2015. BP's printed publications. Report number: 2015, 45 p.

Evans, F.F., Rosado, A.S., Sebastian, G.V., Casella, R., Machado, P.L., Holmstrom, C., Kjelleberg, S., Elsas, J.D., Seldin, L., 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. FEMS Microbiology Ecology 49, 295-305.

Faoro, H., Alves, A.C., Souza, E.M., Rigo, L.U., Cruz, L.M., Al-Janabi, S.M., Monteiro, R.A., Baura, V.A., Pedrosa, F.O., 2010. Influence of Soil Characteristics on the diversity of bacteria in the southern Brazilian Atlantic forest. Applied and Environmental Microbiology 76, 4744-4749.

Ghoreishi, G., Alemzadeh, A., Djavaheri, M., 2013. Bioremediation ability of bacteria isolated from petroleum contaminated soils using gas chromatography. Computer vision. In: Proceedings of the 1st National Bioremediation Symposium, Tehran, Iran.

Gouda, M.K., Omar, S.H., Chekroud, Z.A., Nour Eldin, H.M., 2007. Bioremediation of kerosene I: A case study in liquid media. Chemosphere 69, 1807-1814.

Gouda, M.K., Omar, S., Nour Eldin, H., Chekroud, Z., 2008. Bioremediation of kerosene II: a case study in contaminated clay (Laboratory and field: scale microcosms). World Journal of Microbiology and Biotechnology 24, 1451-1460.

Hafidh, H., 2016. OPEC Annual Statistical Bulletin 2016. Organization of the Petroleum Exporting Countries: 2016, 125 p.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S., 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin 64, 7-12.

Head, I.M., Jones, D.M., Roling, W.F.M., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. Nature Reviews Microbiology 4, 173-182.

Lin, T.C., Shen, F.T., Chang, J.S., Young, C.C., Arun, A.B., Lin, S.Y., Lai, T., 2009. Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from oil-contaminated soil. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 40, 580-582.

Liu, Y.C., Li, L.Z., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L.P., Xu, L., Shen, Q.R., Shen, B., 2010. Isolation of an alkane-degrading Alcanivorax sp. strain 2B5 and cloning of the alkB gene. Bioresource Technology 101, 310-316.

Madueño, L., Coppotelli, B.M., Alvarez, H.M., Morelli, I.S., 2011. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. International Biodeterioration & Biodegradation 65, 345-351.

Meyer, J.M., Abdallah, M.A., 1987. The fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens: biosynthesis, purification and physicochemical properties. Journal of General Microbiology 107, 319-328.

Mirdamadian, S.M., Emtiazi, G., Golabi, M.H., Ghanavati, H., 2010. Biodegradation of Petroleum and Aromatic Hydrocarbons by Bacteria Isolated from Petroleum-Contaminated Soil. Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology 1, 1-5.

Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., Lal, B., 2001. Evaluation of Inoculum Addition to Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. Applied and Environmental Microbiology 67, 1675-1681.

Mojarrad, M., Alemzadeh, A., Djavaheri, M., 2013. The effect of temperature on kerosene biodegradation ability by *Enterobacter cloacae*. Computer vision. In: Proceedings of the 1st National Bioremediation Symposium, Tehran, Iran.

Mojarrad, M., Alemzadeh, A., Ghoreishi, G., Djavaheri, M., 2016. Kerosene biodegradation ability and characterization of bacteria isolated from oil-polluted soil and water. Journal of Environmental Chemical Engineering 4, 4323–4329.

Pau-Roblot, C., Lequart-Pillon, M., Apanga, L., Pilard, S., Courtois, J., Pawlicki-Jullian, N., 2013. Structural features and bioremediation activity of an exopolysaccharide produced by a strain of Enterobacter ludwigii isolated in the Chernobyl exclusion zone. Carbohydrate Polymers 93, 154-162.

Pelaez, A.I., Lores, I., Sotres, A., Mendez-Garcia, C., Fernandez-Velarde, C., Santos, J.A., Gallego, J.L.R., Sanchez, J., 2013. Design and field-scale implementation of an “on site” bioremediation treatment in PAH-polluted soil. Environmental Pollution 181, 190-199.

Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., Birnbaum, S., 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Environmental Pollution 136, 187-195.

Tahhan, R.A., Ammari, T.G., Goussous, S.J., Al-Shdaifat, H.I., 2011. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. International Biodeterioration & Biodegradation 65, 130-143.

Tyagi, M., da Fonseca, M.M., Carvalho, C.C.R., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation 22, 231-241.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173, 697-703.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., Okuyama, H., 2004. Isolation and characterization of novel strains of Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. Current Microbiology 49, 415-422.

Zhang, Z., Gai, L., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Wang, Z., Sun, B., He, X., Tang, H., Xu, P., 2010. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. Bioresource Technology 101, 8452–8456.