جداسازی و بررسی پتانسیل بیولوژیکی باکتریهای تجزیه کننده فنانترن

نفیسه نوریه[1]، سیمین ناصری[2]، روشنک رضایی کلانتری[3]، کاظم ندافی[4]، امیرحسین محوی[5]، محمد خزائی[6]

1- مربی، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
2- استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
3- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران
4- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
5- دانشیار گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
6- کارشناس ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم

یافته / دوره یازدهم / شماره 3 / پاییز 88 / مسلسل 41

چکیده

دریافت مقاله: 8/3/11، پذیرش مقاله: 88/5/13

مقدمه: هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از مواد شیمیایی بالقوه خطرناک برای محیط زیست بوده و موجب نگرانی های بهداشتی می شوند. این ترکیبات به علت دارا بودن ویژگا های سمیت، جهش زایی و سرطان زایی توسط USEPA در ردیف آلاینده های مقدم قرار گرفته اند. هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به سختی تجزیه پذیر هستند. کاربرد فرایند اصلاح زیستی (Bioremediation) برای حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از خاک های آلوده یکی از گزینه های اقتصادی و مطلوب می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه فنانترن (ترکیب سه حلقه ای از ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای) به عنوان نماینده این ترکیبات انتخاب گردید و در دو دامنه غلظت (100mg/kg و 500mg/kg) مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا میکروارگانیسم های تجزیه کننده هیدروکربن های حلقوی جداسازی و پس از سازگاری وغنی سازی، باکتریها شناسایی شدند. آنالیز باکتری به روش تست تأییدی و کیت api انجام گرفت وچهار باکتری سودوموناس spp، باسیلوس، سودوموناس آئروژنوزا و اسینتوباکتر تشخیص داده شد. فنانترن موجود در خاک با استفاده از روش التراسونیک استخراج شد و جهت سنجش میزان فنانترن از دستگاه HPLC استفاده گردید.

یافته ها: بررسی مطالعات اصلاح زیستی در خاکهای آلوده به فنانترن نشان داد که حذف موثر فنانترن توسط باکتری سودوموناس بیشتر از باکتری های دیگر است. همچنین حذف موثر در 45 روز اول اتفاق می افتد و سپس میزان حذف کاهش می یابد. از یافته های دیگر در این مطالعه این بود که غلظت پایین فنانترن سریعتر از غلظت بالا حذف می شود و همچنین مقایسه تجزیه زیستی فنانترن توسط گونه های خالص و کنسرسیوم نشان داد که سرعت حذف فنانترن توسط کنسرسیوم در ابتدای فرایند از باکتری های دیگر بیشتر است.

بحث و نتیجه گیری: نتایج حاصل نشان داد باکتریهای جداسازی شده از محیط کشت غنی شده به جز سودوموناس که تنها توانایی تجزیه نفتالین را دارد، توانایی تجزیه هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه ای را از خود نشان دادند. جمعیت باکتریها در طول هفته اول کاهش و سپس رو به افزایش گذاشت. کاهش اولیه می تواند به دلیل مواجهه با فنانترن باشد اما باکتریها از محیط هایی که تنها منبع کربن آنها فنانترن بوده توانایی تکثیر مجدد را دارند.

واژه های کلیدی: فنانترن، تجزیه بیولوژیکی، هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، باکتری های تجریه کننده فنانترن

آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
پست الکترونیک: naserise@tums.ac.ir

مقدمه

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAH) [1] یکی از متداولترین آلاینده هایی هستند که در خاک یافت می شوند. عمده ترین عامل تولید و پخش این ترکیبات فعالیت های صنعتی انسان مانند سوخت ناقص مواد آلی در طی فرآیند تجزیه حرارتی[2]، ریخته شدن نفت از نفتکش ها، پالایشگاه ها و حفر چاه های نفتی می باشد. ترکیبات آروماتیک حلقوی همچنین بر اثر اتفاقات طبیعی مانند آتش سوزی جنگل ها، فعالیت های آتشفشانی و بعضی از آنها بر اثر فرآیندهایی با منشأ زیستی حاصل می شوند (1و2و3).

اغلب ترکیبات چند حلقه ای دارای خواص نامطلوب سمی[3]، جهش زائی[4] و سرطانزایی[5] هستند. لذا بازیافت، تصفیه و دفع این مواد اهمیت زیادی دارد. آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا ترکیبات PAHs را از سال 1970 به عنوان آلاینده های اولیه طبقه بندی نموده است (4و5).

ترکیبات نفتی به روش های مختلف فیزیکی، شیمیایی، تخریب حرارتی و زیستی قابل حذف هستند. کلیه این روش ها گران قیمت و در بسیاری از مواقع ناکارا هستند. استفاده از فرآیندهای زیستی به دلیل توانایی این فرآیندها در تجزیه ترکیبات خطرناک بیشتر از سایر روش ها مورد توجه قرار گرفته است. در میان روش های تجزیه زیستی[6]، روش اصلاح زیستی[7] به عنوان یک روش مؤثر و مقرون به صرفه توصیه شده است (6).

در سالهای اخیر اصلاح زیستی از یک فناوری ناشناخته رشد کرد به طوری که در حال حاضر یکی از فناوری های اصلی برای رفع آلودگی به شمار می رود (7). در این روش میکروارگانیسم ها مانند باکتریها و قارچها ترکیبات PAHs را به ترکیبات آلی دیگر و یا محصولات نهایی معدنی مانند دی اکسید کربن و آب تبدیل می کنند (8).

ایتکن و همکارانش در سال 1998 تعدادی باکتری را که قادر به تجزیه این ترکیبات بودند از محل های آلوده جدا کردند (9). هچنین مطالعات دیگری توسط مولر و همکارانش در سال 1989 انجام گرفت که منجر به شناسایی باکتری های تجزیه کننده این ترکیبات از خاک شد (10).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتریهای تجزیه کننده فنانترن از خاک آلوده به ترکیبات نفتی و بررسی پتانسیل بیولوژیکی این باکتریها می باشد. در این تحقیق فنانترن (یک ترکیب سه حلقه ای از ترکیبات PAHs) به عنوان نماینده این ترکیبات انتخاب گردید.

این ماده با توجه به خواص شیمیایی و سرطانزایی معمولا" در تحقیقات زیست پالایی به عنوان سوبسترای میکروبی برای مطالعات متابولیسم ترکیبات PAHs مورد استفاده قرار می گیرد (11).

مواد و روش ها

این پژوهش در چند مرحله ی جداسازی، غنی سازی و شناسایی باکتریها و بررسی توانایی آنها در تجزیه فنانترن انجام شد. جداسازی میکروارگانیسمها از خاک آلوده به ترکیبات نفتی از نمونه های خاک آلوده به ترکیبات نفتی در اطراف پالایشگاه تهران به عنوان منبع جداسازی میکروارگانیسم ها استفاده شد. جهت جداسازی اولیه و بررسی وجود یا عدم وجود هر نوع میکروارگانیسم در خاک به شرح زیر عمل شد. 15 گرم خاک آلوده به 150 میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل در یک ارلن

1. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
2. Pyrolysis
3. Toxic
4. Mutagenic
5. Carcinogenic
6. Biodegradation
7. Bioremediation

250 میلی لیتری اضافه و بر روی یک همزن مغناطیسی به مدت 24 ساعت قرار داده شد. بعد از 30 دقیقه ته نشینی، سوسپانسیون یکنواختی حاصل شد، سپس از محلول رویی جهت مرحله سازگاری و غنی سازی استفاده گردید (12و13).

به منظور غنی سازی و سازگاری میکروبی 2 میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از مرحله قبل به 100 میلی لیتر محیط کشت پایه معدنی[1] اضافه شد. سپس به این محلولها فنانترن اضافه گردید به طوری که غلظت حاصل به 50 و 100 میلی گرم در لیتر رسید. نمونه ها در انکوباتور شیکردار در دمای 25 درجه سانتی گراد در حدود 2 ماه نگهداری شدند، برای تأمین مواد مغذی و منبع کربن کافی، هر 5 الی 7 روز یک بار محیط تازه گردید به طوری که 2 میلی لیتر از محیط قبلی به محیط جدید اضافه می شد (13).

محیط کشت پایه معدنی حاوی: (گرم بر لیتر)

K2HPO4 0/8، KH2PO4 0/2، KNO3 1، 0/2 MgSO4. 7H2O، CaCl2. 2H2O 0/1، NaCl 0/1، FeCl3. 6H2O0/01 و یک میلی لیتر محلول عناصر کم مقدار[2].

عناصر کم مقدار حاوی: (میلی گرم بر لیتر)

MnCl2 2H2O .23، MnCl4 30، H3BO3 32، 39. CoCl2 2H2O، ZnCl2 50، 30. NaMnO4 2H2O، 20 NiCl2 (14).

پس از سازگاری میکروبی و غنی سازی، خانواده باکتری ها مورد شناسایی قرار گرفتند. برای این منظور ابتدا با استفاده از محیط رشد جامد (BHI) [3] کلنی تک بدست آمد. به منظور تشخیص سوشهای مورد نظر، باکتری ها بر روی محیطهای افتراقی رشد داده شدند. برای تشخیص گونه های باکتری گرم مثبت، ازتست کاتالاز و دیسک مخصوص با سیتراسین 0/4% واحدی و سپس آزمایش تخمیر گلوکز استفاده شد.

برای تشخیص باکتری های گرم منفی پس از انجام آزمایشات افتراقی وبررسی رشد آنها تا حدودی به تشخیص نوع باکتری نزدیک شده و برای تشخیص قطعی از پلاک api 20 E ver. 3 استفاده شد (15و16).

در مرحله تجزیه زیستی فنانترن توسط چهارگونه باکتریایی جداسازی شده و یک نمونه مخلوط مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه زیستی فنانترن توسط گونه های باکتری شناسایی شده طی مراحل زیر انجام گرفت: 40 گرم خاک تمیز و عاری ازموادنفتی به فنانترن آلوده شد به طوری که غلظتهای 100و500mg/kg حاصل گردید.

جهت تهیه خاک تمیز و عاری از مواد نفتی در این مرحله ابتدا خاک از الک 2 میلی متر عبورداده شد سپس چند مرحله با دی کلرومتان صنعتی و در مرحله آخر با دی کلرومتان با خلوص 99% شستشوداده شد؛ ودرانتها خاک در زیر هود قرار داده شد تا دی کلرومتان تبخیر شود (17). و سپس جهت اطمینان ازعدم حضور هرگونه مواد نفتی عمل استخراج و سنجش آلاینده برروی آن انجام گرفت.

باکتری ها به ارلن های حاوی محیط کشت معدنی تلقیح شدند. برای تلقیح کلنی ها از روی نوترینت آگار برداشته و به محلول سرم فیزیولوژی (8/5گرم درلیترنمک طعام) سترون منتقل شد. میزان تلقیح باکتری طوری تنظیم شد که محلول در طول موج 630 نانومتر جذب نوری تقریبا"برابر یک داشته باشد (14).

خاک حاوی فنانترن به ارلن های حاوی 400 میلی لیتر محیط کشت معدنی استریل اضافه شد.

به منظور اطمینان ازتجزیه بیولوژیکی، برای هر نمونه، یک شاهد که تمامی شرایط آن با نمونه ها یکسان بوده و فقط

1. Mineral Salt Medium (MSM)
2. Trace element
3. Brain Heart Infusion Agar

باکتری به آن تلقیح نشده بود، به کار رفت و نتایج به دست آمده نسبت به شاهد سنجیده شد.

ارلن های حاوی نمونه و شاهد بر روی همزن با سرعت180 دور در دقیقه قرار داده و در دمای محیط میزان تجزیه فنانترن بررسی شد (13).

فنانترن موجود در خاک با استفاده از روش التراسونیک طبق روش 3550B EPA استخراج شد. ابتدا نمونه سانتریفوژ شد تا آب از خاک جدا شود. به آب جدا شده 2 میلی لیتر استونیتریل اضافه شد، از محلول رویی جهت مشخص شدن مقدار فنانترن در محیط مایع استفاده گردید. به نمونه های خاک 2 گرم سولفات سدیم اضافه شد تا کاملا"خشک شود سپس 10 میلی لیتر استونیتریل اضافه گردید سپس نمونه ها به مدت یک ساعت داخل حمام التراسونیک قرارداده شدند، بعد از 15 دقیقه ته نشینی، نمونه ها را سانتریفوژ و از محلول رویی جهت سنجش استفاده شد (18).

جهت سنجش میزان فنانترن از دستگاه HPLC[1] ستون C18 ultra sep ES PAH QC specia 6o×2mm ID استفاده گردید (19). سرعت دبی عبور: 0/3 میلی لیتردردقیقه، طول موج 254 نانومتر، نسبت استونیتریل به آب 95: 5 و میزان تزریق 100 میکرولیتر تنظیم گردید.

برای بررسی جمعیت میکروبی از روش شمارش میکروبی[2] و (MPN)[3] استفاده شد (20).

یافته ها

راندمان حذف فنانترن توسط باکتریهای مجزا و مخلوط در غلظت پایین (100mg/kg) بیشتر از غلظت بالا (500mg/kg) می باشد (جدول 1). همچنین راندمان کاهش فنانترن در باکتریهای سودوموناس در هر دو غلظت بیشتر از سایر باکتریها می باشد.

جدول شماره 1- نتایج حاصل از تجزیه فنانترن توسط باکتریهای مجزا و مخلوط

غلظت اولیه فنانترن (mg/kg)	نوع باکتری	راندمان کاهش فنانترن (%)
100	*Pseudomonas. SPP*	84/35
	Bacillus	60/75
	Pseudomonas aeruginosa	80/85
	Acinetobacter	62/25
	Consortium	79/35
	Blank	8
500	*Pseudomonas. SPP*	74/85
	Bacillus	51/14
	Pseudomonas aeruginosa	71/74
	Acinetobacter	54/55
	Consortium	68/48
	Blank	6

در نمودار (1) و نمودار (2) روند کاهش غلظت فنانترن در مقایسه با زمان نشان داده شده است، مشاهده می شود کاهش غلظت فنانترن تا روز 45 از سرعت خوبی برخوردار است اما بعد از 45 روز از سرعت کاهش فنانترن کاسته می شود. همچنین در ابتدای زمان حذف (حدود 40 روز) سرعت کاهش فنانترن توسط باکتریهای مخلوط بیش از سایر باکتریها است. نمودار های 3 و 4 تغییرات جمعیت باکتریها در طی مدت 60 روز را نشان می دهند، در این نمودارها مشاهده می شود که شدت تغییرات جمعیتی در مخلوط باکتریها نسبت به سایر باکتریها کمتراست.

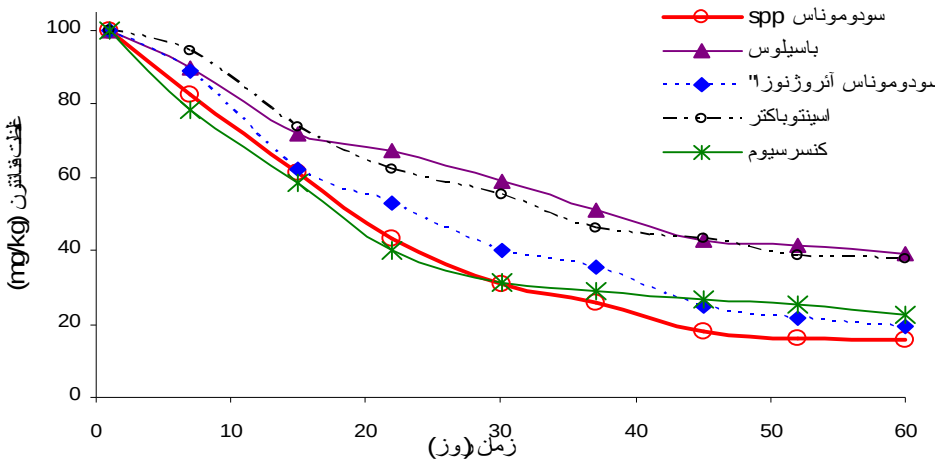
همانطور که در جدول (1) مشخص است راندمان حذف فنانترن توسط *Pseudomonas SPP* و *Pseudomonas*

۱. High Performance Liquid Chromatography

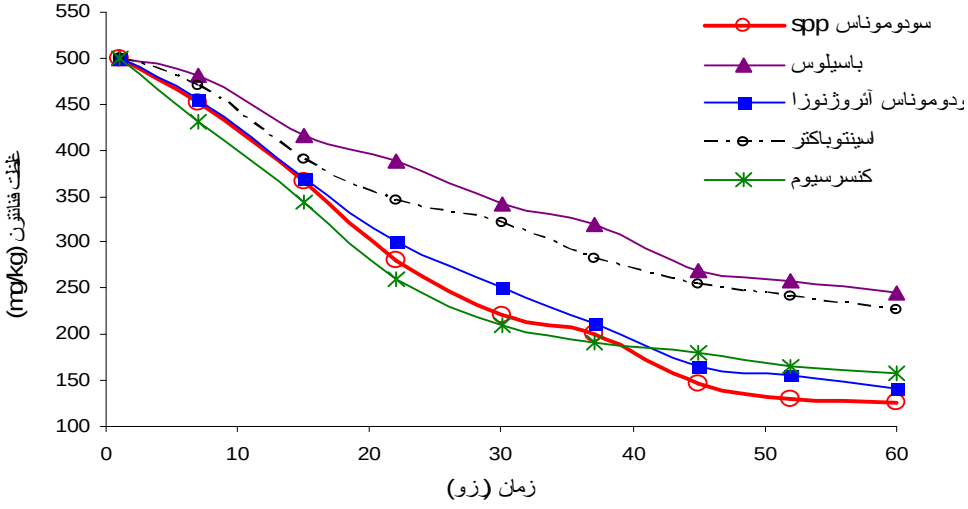
۲. Plate Count

۳. Most Probable Number

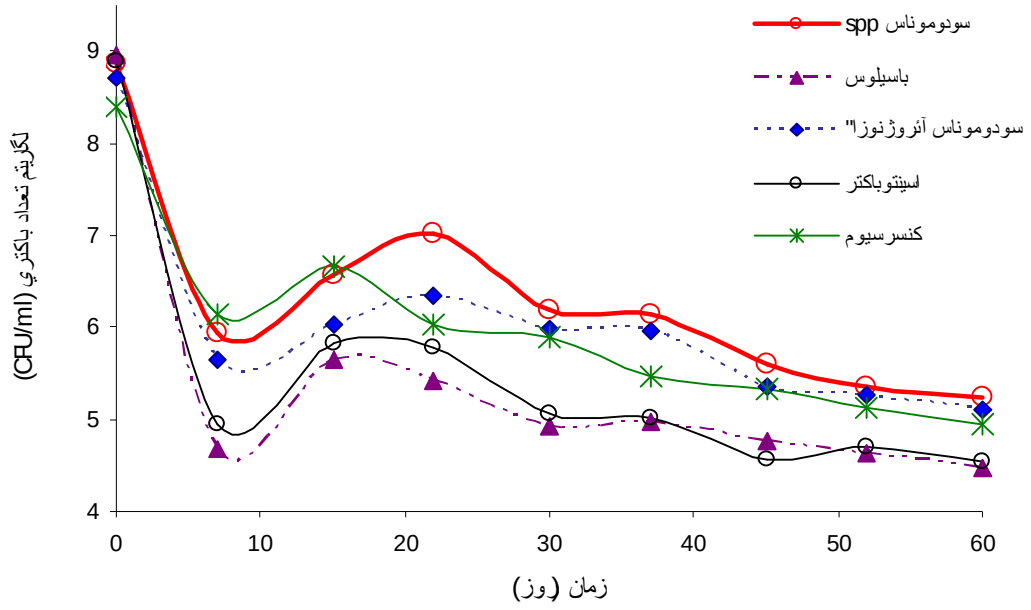
aerugenisa بیش از باکتریهای دیگر می باشد. همچنین نتایج حاصل از بررسی آماری T مستقل و زوج که با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه یازدهم مورد تحلیل آماری قرار گرفت، نشان داد که توانایی تجزیه باکتریهای سودوموناس نسبت به باکتریهای مخلوط اختلاف معنی داری ندارد ($p>0/05$) اما نسبت به باکتریهای دیگر اسینتو باکتر و باسیلوس اختلاف معنی داری دارد ($p<0/05$).



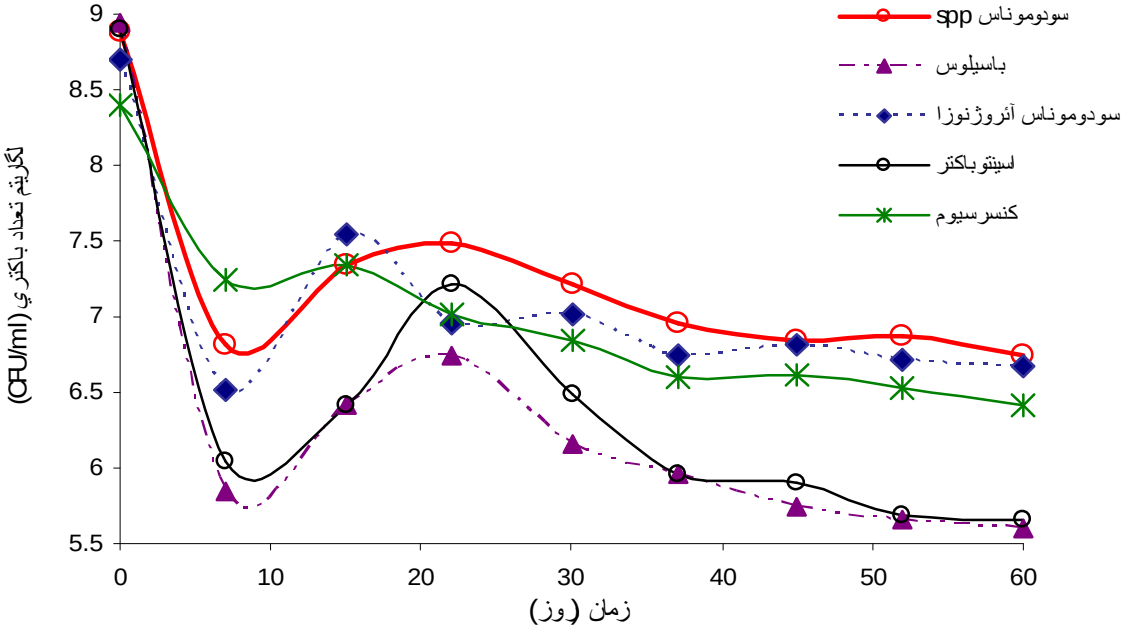
نمودار شماره 1- روند کاهش غلظت فنانترن در مقایسه زمان با غلظت اولیه 100 mg/kg



نمودار شماره 2- روند کاهش غلظت فنانترن در مقایسه زمان با غلظت اولیه 500 mg/kg



نمودار شماره 3- تغییرات جمعیت باکتریها در طی مدت 60 روز با غلظت اولیه 100 **mg/kg**



نمودار شماره 4- تغییرات جمعیت باکتریها در طی مدت 60 روز با غلظت اولیه 500 **mg/kg**

بحث و نتیجه گیری

پس از دو ماه غنی سازی، محیط کشت حاوی فنانترن، 4 گونه باکتری جدا سازی و خالص سازی شد. جنس 4 باکتری به ترتیب: سودوموناسSPP، باسیلوس، سودوموناس آئروژنوزا، اسینتو باکتر تشخیص داده شد. از میان این باکتریها سودوموناس در ردیف جنسهای باکتریایی معروف بوده و بسیاری از مطالعات قبلی نیز منجر به جداسازی گونه هایی از جنس این باکتری شده است. اولین گونه ی سودوموناس توسط بارسلی در سال 1975 جداسازی شد که تنها توانایی تجزیه نفتالین را داشت (21). همچنین لایل و همکاران (1997) تجزیه بیولوژیکی هیدروکربن های نفتی توسط گونه های سایکروتروفیک سودوموناس را مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق سه نوع باکتری سایکروتروف تجزیه کننده هیدروکربن، از خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی جداسازی و تخلیص شدند. یکی از گونه ها *Pseudomonas SPP* بود (22). تحقیقات دیگر نیز نشان داد که بیشتر گونه های این باکتری به جزء گونه *Pseudomonas fluoresens* توانایی تجزیه هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه ای را از خود نشان دادند (23).

یکی از اهداف این تحقیق بررسی و مقایسه میزان تجزیه زیستی فنانترن توسط 4 گونه باکتری جداسازی شده از خاکهای آلوده پالایشگاه نفت تهران و انتخاب بهترین گونه های تجزیه کننده بود. از آنجایی که پژوهشگران معتقدند تجزیه زیستی تنها با حضور مخلوطی از گونه های کارآمد امکان پذیر است و قدرت تجزیه زیستی گونه های مجزا و خالص محدود می باشد (24)، لذا در این مطالعه تجزیه فنانترن توسط مخلوط باکتریها (کنسرسیوم) نیز مورد سنجش قرار گرفت.

همچنین مشاهده می شد که راندمان حذف در غلظت پایین بیشتر می باشد. دلیل کاهش راندمان حذف فنانترن در غلظت 500mg/kg نسبت به غلظت 100mg/kg را می توان به سمیت فنانترن بر روی باکتری ها و از بین رفتن تعدادی از باکتریها و کاهش جمعیت آن ها اشاره نمود. ونگ و همکارانش مقدار حذف فنانترن را در بیوراکتور دوغابی برای غلظت های پایین (100 mg/Lit و 500) بیشتر از غلظتهای بالا (mg/Lit 1000) گزارش کرده اند (25).

در نمودارهای 1 و 2 مشاهده می شود که در مورد همه باکتریهای تخلیص شده و کنسرسیوم میزان کاهش فنانترن بعد از 45 روز بسیار کم شده و تقریباً ثابت است. چنین روند تغییرات فنانترن در غلظت 500 mg/kg نیز مشاهده می شود. می توان نتیجه گیری نمود که زمان ماند بیش از 45 روز کاهش آلودگی قابل ملاحظه ای به دنبال ندارد. مقایسه تجزیه فنانترن توسط باکتری های خالص و کنسرسیوم نشان می دهد که در 5 هفته اول سرعت کاهش فنانترن توسط کنسرسیوم بیشتر از سایر باکتری هاست. ولی بعد از 5 هفته این میزان تجزیه ثابت شده و کارایی حذف توسط جنسهای سودوموناس از کنسرسیوم پیشی گرفتند هر چند این اختلاف معنی دار نیست ($p>0/05$). در این زمینه تحقیقی صورت گرفته است که نشان می دهد پیمودن مسیر بیوشیمیایی تجزیه توسط یک باکتری به دشواری انجام می شود و گاه غیر ممکن است اما با حضور مخلوط چند باکتری، ترکیبات واسطه ای که در مسیر تجزیه تولید میشوند، توسط باکتری های دیگر تجزیه می شوند (23).

همان طور که در نمودار های 3 و 4 مشخص شده است جمعیت باکتریها در طول هفته اول کاهش و سپس رو به افزایش گذاشت. کاهش اولیه می تواند به دلیل مواجهه با فنانترن باشد اما از آنجایی که این باکتریها از محیط هایی که تنها منبع کربن آنها فنانترن بوده است جداسازی شده اند توانایی تکثیر مجدد را داشته اند به طوری که بعد از یک هفته جمعیت آنها رو به افزایش گذاشت و به حد قابل قبول 10^5-10^6 رسید. بعد از اینکه جمعت باکتریها به حد اکثر رشد رسید

جمعیت رو به کاهش گذاشته طوری که در جنسهای سودوموناس این کاهش از سرعت کمی برخوردار است اما در مورد باکتری باسیلوس و اسینتوباکتر سرعت کاهش جمعیت بیشتر است. در مورد کنسرسیوم نیز کاهش رشد را شاهد هستیم ضمن آنکه تغییرات رشد نسبت به باکتریهای خالص از دامنه تغییرات کمتری برخوردار است. تحقیقی که توسط هوانگ و همکارانش (26) در این زمینه انجام شده است نشان داد که در حذف زیستی فنانترن ابتدا کاهش رشد باکتری و سپس افزایش رشد را نشان داده، طوری که در روز هفتم حداکثر رشد باکتری $7/7 \times 10^6 CFU/ml$ بوده است و این رشد در طول زمان حذف به طور ناگهانی کاهش پیدا نکرده بلکه با سرعت کم رو به کاهش است (26).

References

1. Morzik A, piotrowska-seget z, Labuzek S. Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Hydrocarbons. Journal of Environmental studies, 2003; 12 (1) : 15-25
2. Liebeg E, Cutright T. J. The investigation of enhanced bioremrdiation througt the addition of macro and micro nutrients in a PHA contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradiation, 1999; 44: 55-64
3. Zhao H, Wang L, Ren J, Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains Sphingomonas. ZP1 and Tistrella. ZP5. Journal of Hazardous Material. 2008; 152 (3) : 1293-1300
4. Amellal N, Portal D, Berthelin J, Efect of soil structure on bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. Applied Geochemistry 2001; 16: 1611- 1619
5. Sapanaro S, Bonomo L, Petruzzelli G. Polycyclic hydrocarbons (PAH) slurry phase bioremediation of a manufacturing gas plant (MGP) site aged soil. Water Air and pollution. 2002; 134: 219-236
6. Cha D. K, Song J. S. Treatment technologies. Water Environment Research. 1997; 69 (4) : 676-689
7. Cookson J. T. Bioremediation engineering design and application. MC Graw Hill. New York; 1995
8. Lundstedt S. Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. Department of Chemistry environmental chemistry, umea university, SWEDEN; 2003
9. Guo L, Zhou Y. s, Wong L. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Marin Pollution Bulletin; 2005 (51) : 1054-1061
10. Muller J. G, Champman P. J. Action of a fluranthene creosotr. Journal of Applied Environmental Microbiology. 1989; 55 (12) : 3085-3090
11. Samanata S. K, Chakraborti A. K. Degradation of phenanthrene by different bacteria Evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. Appl Microbiol Biotecnol. 1999; 53 (1) : 98-107
12. Kastner M, Breure MJ, Maharo B. Impact of Inoculation Protocol, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. Applied Environmental Microbiology. 1998; 64 (1) : 359-362
13. Rezaei, kalantary R, Bakoubi A. Bioremediation of anthracene in supper saturated media by mixed culture. modares technical and engineering. 2004; 14: 39-48
14. Ressler B. P, Kneifel H. Bioavailability of polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Formation of humic Acid-Like Residues During Bacterial PAH Degradation. Applied and Environmental Microbiology. 1999; 53: 85-91

15. Analytical Profile Index (API) 20E. Manual Procedure for Bacteriological Identification. 2000; #2019
16. Bailey and scott. Diagnostic Microbiology. 8ed; 1999
17. Rezaei, Kalantary R. Effect of humic compounds on bioremediation of petroleum contaminated soils. department of civil engineering tarbiyat modares university, Iran; 2003
18. EPA. ultrasonic extraction. 1996; Method # 3550B
19. Arbabi M. removing of polycyclic Aromatic Hydrocarbons from petroleum contaminated soil by microbial consortium. department of Tehran university; 2006
20. APHA AWWA WEF. Standard methods for the Examination of water and wastewater 20ed. USA; 2002
21. Wattiau P. Microbial Aspects in Bioremediation of Solid Polluted by Polyaromatic Hydrocarbons. Biotecnology for Environmrnt: Sterategy and Fundamentals. 2002; 69-89
22. Lyle G, charles W. Bioaugmentation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic Pseudomonas strains possessing both alkans and naphthalene catabolic pathway. Applied and Environ. Microbiol. 1997; l. 63: 3414-3423
23. Leblond JD, Schultz TW. Observation on the Preferential Biodegradation of selected Components of polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixture. Chemosphere. 2000; 42: 333-343
24. Ringelberg DB, Talley JW. Succession of Phenotypic Genotypic and Metabolic Community Characteristics during In Vitro Bioslurry Treatment of polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contaminated Sediments. Applied and Environmental Microbiology. 2001; 67: 1542-1550
25. wong JWC, Lai KM, Wan CK, Ma KK, Fang M. 2001. Isolation and optimization Of PAH-degradative bacteria from contaminated for PAHs Bioremediation. Water Air and Soil Polution. 2001; 139: 1-3
26. Hwang S, Cutright TJ. Biodegradiation of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. chemosphere. 2002; 47 (9) : 891-899