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 [۱]

مرتضی کاشفی اصل [۲] *

mortezakashefialasl@gmail.com

رضا مرندی [۲]

مژگان امتیازجو [۲]

مژگان زعیم دار [۳]

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۸ **تاریخ پذیرش:۹۷/۱۰/۲۶**

چکیده

زمینه و هدف : گسترش آلودگی های نفتی خاک در عصر حاضر به دلیل استفاده از سوخت های فسیلی در مناطق صنعتی اثرات نامطلوبی بر انسان و محیط زیست داشته است. در این مطالعه به شناسایی باکتری های بومی که از خاک های 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 باکتری های بومی منطقه، نمونه برداری از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی در شش ایستگاه واقع در منطقه ویژه اقتصادی پتروشیمی ماهشهر انجام یافت. رشد باکتری ها در محیط مایع نوترینت براث انجام یافت. جهت کشت باکتری و دستیابی به تک کلونی در محیط جامد، از محیط کشت نوترینت آگار استفاده شد. استخراج DNA جهت شناخت گونه های باکتری به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) انجام یافت. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک جهت برآورد شرایط منطقه طبق روش استاندارد اندازه گیری گردید.

یافته ها : نتایج حاصل از آزمایش جداسازی و رشد باکتری و خالص سازی و در نهایت واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) و توالی یابی مبین حضور دو گونه باکتری در شش ایستگاه متفاوت با درصد شباهت بیش از ۹۵ ٪ طبق رتبه بندی جهانی می باشد. طبق نتایج حاصله درصد حذف TPH درخاک توسط باکتری های *Peseudomons aeruginosa* و *Bacillus nakamurai* به ترتیب۳۳/۵۰٪ و ۳۳/۰۵ ٪ بود.

۱- دانشجوی دکتری آلودگی های محیط زیست،دانشگاه آزاد واحد تهران. *(مسوول 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*، *Peseudomons aeruginosa* ، هیدروکربن های نفتی.

J. Env. Sci. Tech., Vol 22, No.3, May, 2020

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

Sana Rasouli[1]
MortezaKashefi Asl [2*]
mortezakashefialasl@gmail.com
Reza Marandi[2]
Mozhgan Emtyazjoo[2]
Mozhgan Zaeimdar[3]

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 *Peseudomons 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*, *Peseudomons 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

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(۱,۴,۵). 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(۲,۶). 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 هیدرو کربنی خاک و جلوگیری از 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 اخیروش 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(جدول۱) 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 پتاسیل بالا و مقاوم در برابر موادآلی هیدروکربنی و پایدار نفتی موجود در خاک می باشد.

جدول۱- پیشینه پژوهش

Table1. 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 Pseudomonas بومی گونه aerugionosa	کاهش بیش از ۸۰٪ آلاینده های نفتی در منطقه صنعتی ایتالیا
Cavalca et al	۲۰۰۰	نفت و ترکیبات هیدروکربنی بنزنی	روش P.patida P.aerugino 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 Psuedomonas sp, Coryneb acterium sp. and Eshrechiasp	میزان حذف بیش از ۵۰ درصدی ترکیبات هیدروربنی Coimbatore and Pollachi در منطقه
علی نجفی و همکاران	۱۳۹۳	هیدروکربن های نفتی خاک	روش کاهش زیستی به وسیله Psuedomonas و bacillus	راندمان بالای حذف ترکیبات هیدروکربنی در منطقه پالایشگاه

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

مواد و روش ها

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 ۳۰-۰ سانتی متری خاک به وزن ۵۰۰ گرم و طبق روش استاندارد در ظروف استریل شیشه ای به آزمایشگاه جهت انجام 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 مجزا ی رس pS2:subC جهت سنجش سایر پارمترهای شیمیایی در نظر گرفته شد.

شکل۱- موقعیت جغرافیایی بندرماهشهر(پتروشیمی بوعلی سینا)

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

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.) 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.

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 براث آغاز گردید و در شش ارلن با حجمml ۳۰ قرار گرفت. با استفاده از پودر B5 براث از شرکت مرک آلمان درشش ارلن حجمml ۳۰ 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

باکتری ، با 10 gr خاک از هر شش ایستگاه و ۱۰m l 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 و۴۲ °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

ازچهار لوله محیط کشت براث به صورت انتخابی از هر لوله ۲۰ml مایع و ۵۰۰ میکرولیتر نفت به محیط کشت مایع موجود در ارلن۵۰ ml با PH=۷ که ۱۵ دقیقه در°C ۱۲۱ 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 یکml ۱۰ درون ارلن ml ۵۰۰ 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 درانکو باتور شیکردار مدلISH-554D در دمای ۳۷°C قرار گرفت. مواد درهفت ارلن حاوی محیط های کشت دو جزئی قرار گرفت. محیط پایه معدنی دو جزئی شامل جزء۱: NH4Cl 5.57g Na2hpo4 2.44g KH2PO4 2.00g جزء Water 850mL PH 7.0+_ 0.2 :2 CaCl2.2H2O 0.001g MgCl2.6H2O 0.20g FeCl3.6H2O 0.001g MnCl2.4H2O 0.004g Water 150ML PH 7.0+_0.2 وسپس 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 cc ۵ 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 Wisespin 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 ۷۹۹، 1063R16SrDNA GACARCCATGCASCACCTG از هر توالی میزان ۳ میکرولیتر برداشته (۱۰۰ pmol/ µl)و به وسیله ۲۷ میکرولیتر آب رقیق سازی گردید(در حد ۰/۱ رقیق سازی) و ۱ میکرولیتر (۱۰۰ pmol/ µl) 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 دمای۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، در°C ۵۵ به مدت ۳۰ ثانیه، در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در°C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و در دمای°C ۵۵ 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

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

نتایج

نتایج حاصل از جداسازی باکتری ها و تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک به شرح زیر می باشد.

جدول۲- نتایج حاصل از آنالیز خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک حاصل از جداسازی باکتری ها 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

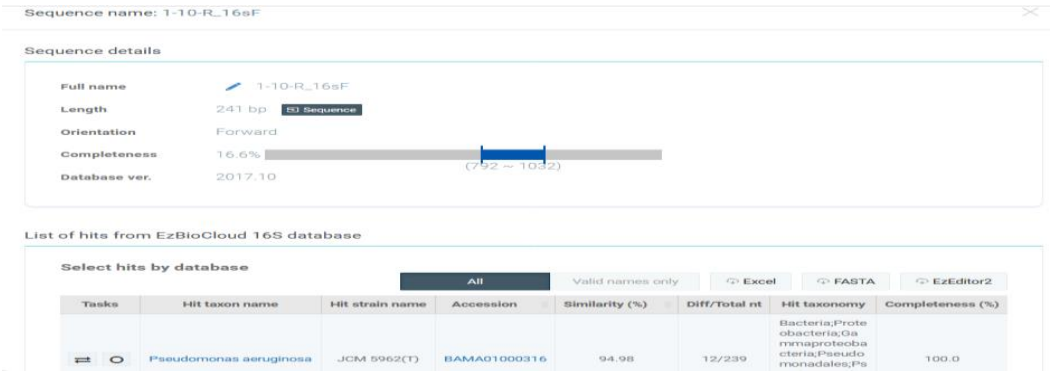
مشخصات ایستگاه ها	PH	کربن آلی OC(٪)	نیتروژن N(٪)	P(AV0) mg/kg	K(AV0) mg/kg	سدیم محلول	EC Ms/cm
Sub A	۷/۸	۰/۰۱	۰/۰۰۱۵	۰/۲۵	۲۱۶	۹۶/۹	۱/۲۳
Sub B (P3005)	۷/۸	۰/۰۱	۰/۱۵	۰/۱۲	۵۵۹	۹۸۱	۷/۳۰

نتایج تجزیه و تحلیل محیط های کشت و جداسازی،حاکی از روند روبه رشدی از باکتری های موجود در نمونه ها بود. نتایج حاصل از استخراج DNA و خالص سازی پس از تست PCR و توالی یابی 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 Nakamurai* نشان داد.بررسی های انجام یافته پس از جداسازی و خالص سازی باکتری های موجود در نمونه های خاک منطقه ویژه اقتصادی ماهشهر، پس از توالی یابی حاکی از حضور دو گونه باکتری سودوموناس با Hit strain name GCM 5962(T)← و گونه باسیلوس با Hit strain nameNRRLB-41091(T)← بود که با رتبه بندی جهانی باکتریایی مطابقت داشت

جدول۳- توالی یابی دو گونه باکتری سودوموناس جدا شده از خاک

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

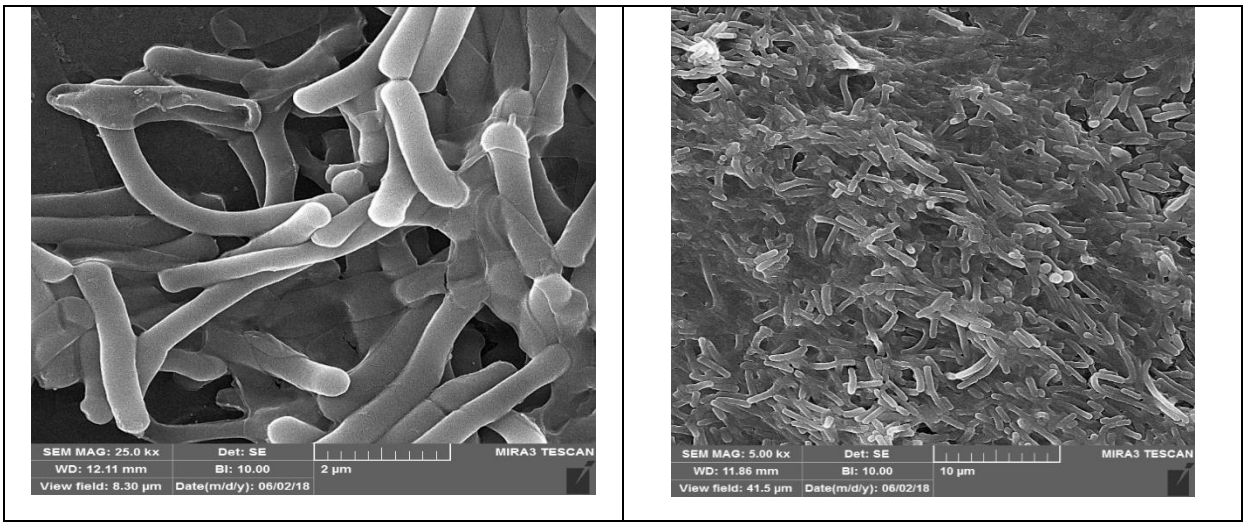
```
>1-10-R_16sF
GCATGCGGGTGGGACATGAGATCTTAGCTGGCGCAAGCCTACGCGATAAGTCGACCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGA
ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGGTGGATGGCTGTCA
A
```



جدول۴- توالی یابی دو گونه باکتری باسیلوس جدا شده از خاک

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

```
>2-4-R_16sF
GGCGTTTGTAAGGGGGCTTGCGCTCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACATCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT
GACAATCCTAAAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGT
C
```



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

Figure2. Native-known bacterias in the area by Imaging with electron microscope. Picture (A) *Bacillus nakamurai* and Picture *(B) Pseu Aeruginosa*

بحث و نتیجه گیری

امروزه پاکسازی زیستی که درآن 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 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 میکروارگانیسم ها نسبت به سایر روش های زیستی مانند گیاه پالایی در مدت زمان کمتری می توان به تجزیه هیدروکربن های نفتی دست یافت (۱۸-۱۷). این گونه از باکتری ها مواد آلاینده هیدروکربنی مضر را به ترکیبات کم خطری مانند CO_2،H_2O تبدیل می کنند و ترکیبات آلاینده را به فرم بی ضرر تبدیل

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 ارگانیسم ها متعددی از جنس باکتریایی و قارچی مانند باسیلوس، رود و کوکوس، آلکالی ژنز و سود و موناس مورد تحقیق و شناسایی قرار گرفته اند(۱۵-۱۳). در تحقیق حاضر دو گونه باکتری به نام‌های باسیلوس، سودوموناس پس از مراحل جداسازی از خاک‌های 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 پتاسیل بقای بیشتری بوده اند. شاهیان و همکاران نیز در سال ۱۳۸۹ دوسویه باکتری سودوموناس و اسینتوباکتر 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 میکروب های مقاوم به خاک های آلوده در منطقه می‌باشد تا در جهت پتاسیل کاهش آلاینده های نفتی به کار گرفته شود.

Reference

1. 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.
2. 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 Pseudomonas aeruginosa DQ8. Bioresource Technology. 2011; 102(5):4111-6.
3. 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.
4. 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.
5. Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK, Sivachidambaram P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. Current science. 2008:736-47.
6. Souza EC, Vessoni-Penna TC, de Souza Oliveira RP. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. International biodeterioration & biodegradation. 2014; 89:88-94.
7. Ławniczak Ł, Marecik R, Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. Applied microbiology and biotechnology. 2013; 97(6):232
8. Zheng G, Selvam A, Wong JW. Oil-in-water microemulsions enhance the biodegradation of DDT by Phanerochaete chrysosporium. Bioresource technology. 2012; 126:397-403.
9. Mulligan CN. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2009; 14(5):372-8.

10. Pirôllo 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 calcuaceticous BS isolated from Persian Gulf. Pet Res 2010; 63: 72-82. (In Persian)
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.