نشریه دانش آب و خاک / جلد23 شماره1صفحه‌های 109 تا 121 / سال 1392

جداسازی و شناسایی برخی از باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های آلوده به مواد نفتی و بررسی توان رشد آن‌ها در حضور گازوئیل

میترا ابراهیمی [1*]، علیرضا فلاح [2]، محمدرضا ساریخانی [3]

تاریخ دریافت: 90/06/12 تاریخ پذیرش: 90/11/05

[1] دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

[2] استادیار گروه علوم خاک، بخش بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات آب و خاک تهران

[3] استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

[*] مسئول مکاتبه: Email: mtrr_ebrahimi@yahoo.com

چکیده

کاربرد فراوان مواد نفتی در ایران سبب آلودگی بسیاری از زیستگاه‌ها به مواد نفتی شده است. زیست بهسازی و بهره‌گیری از باکتری‌ها در راستای کاهش آلودگی‌های نفتی روشی کم هزینه و سازگار با محیط زیست می‌باشد. از اینرو، غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیب‌های نفتی از نمونه‌های آلوده به نفت منطقه بوشهر در محیط کشت بدون کربن آلی انجام شد. در این پژوهش، 19 سویه باکتری گرم منفی به نام‌های PDB1-19 از نمونه خاک آلوده به مواد نفتی جداسازی شد و شناسایی جدایه‌ها با بهره‌گیری از کیت‌های تشخیصی و روش مولکولی نشان داد که آن‌ها شامل جنس‌ها و گونه‌های باکتریایی *Stenotrophomonas maltophilia*، *Ralstonia* sp.، *Vibrio* sp.، *Sphingobacterium* sp.، *Zymomonas* sp.، *Pseudomonas aeruginosa*، *Paracoccus* sp.، *Pantoea* sp.، *Achromobacter xylosoxidans*، *Acinetobacter johnsonii*، *Serattia odorifera*، *Pseudomonas alcaligenes*، *Entrobacter cloacae*، *Pseudomonas stutzeri* و *Chryseobacterium* sp. می‌باشند. کارآیی این سویه‌ها در ارلن‌های دارای محیط کشت مایع حداقل، با حذف هر گونه منبع کربن و بهره‌گیری از گازوئیل به عنوان منبع کربن و انرژی، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با کاربرد دو تکرار بررسی شد. در این بررسی تیرگی محیط کشت مایع در طول موج 600 nm در زمان‌های 0، 48، 168، 216 و 312 ساعت سنجیده شد و به عنوان شاخص رشد باکتری و تجزیه گازوئیل توسط باکتری اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری نشان داد که فاکتورهای آزمایشی مانند سویه باکتری، زمان و اثر متقابل آن‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. این باکتری‌ها توانستند در حضور ترکیب‌های نفتی همانند گازوئیل به صورت چشم‌گیری رشد نمایند و از میان سویه‌های باکتری، سویه *Chryseobacterium* sp. اختلاف معنی‌داری با دیگر سویه‌ها از لحاظ رشد در حضور گازوئیل داشت و با گذشت زمان (اندازه‌گیری پنجم) رشد آن بیشتر شد، نتایج اثر متقابل باکتری و زمان نیز نشان‌دهنده این یافته بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت، تجزیه زیستی، شناسایی مولکولی، گازوئیل، محیط حداقل.

Isolation and Identification of Oil-Degrading Bacteria from Oil-Polluted Soils and Assessment of Their Growth in the Presence of Gas Oil

M Ebrahimi[1*], AR Fallah [2], MR Sarikhani[3]

Received: 3 September 2011 Accepted: 25 January 2012
[1-] PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agric., Bu-Ali Sina Univ., Hamadan. Iran.
[2-] Assist. Prof., of Soil Biology, Dept. of Soil Biology, Soil and Water Research Institute, Iran.
[3-]Assist. Prof., of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz. Iran.
*Corresponding Author Email: mtrr_ebrahimi@yahoo.com

Abstract

Oil contamination in Iran due to high application of oil compounds, is one of the most dangerous pollution factors. Bioremediation is a prime strategy for remediation, by which the pollutants can be removed by making use of microorganism or any biological process that employes microorganisms or their enzymes to rehabilitate the environment altered by the contaminants. With regards to the importance of this method, screening and isolation of oil-degrading bacteria from contaminated site of Bushehr province were done in Carbon Free Minimal Medium enriched by gas oil. In this study 19 isolates of bacteria (PDB 1-19) were isolated, and the molecular and kit identifications showed different genus and species such as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia* sp., *Vibrio* sp., *Sphingobacterium* sp., *Zymomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Paracoccus* sp., *Pantoea* sp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter johnsonii*, *Serattia odorifera*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Entrobacter cloacae*, *Pseudomonas stutzeri* and *Chryseobacterium* sp.. In order to determine the efficiency of these bacteria in hydrocarbon-degradation an inoculum of pure culture of bacteria containing 10^8 cfu/ml was used in liquid assay, which was performed in factorial experiment based on completely randomized design with 2 replications. Utilization of hydrocarbon sources was again detected in CFMM broth supplemented with 2% gas oil where the growth turbidity (OD_{600nm}) as an indicator for utilization of hydrocarbon and bacterial growth was measured at different times of 0, 48, 168, 216 and 312hr. Results showed that in CFMM broth assay all main factors including bacteria and time as well as their interaction were significant ($p<0.01$). These bacteria were effectively able to mineralize gas oil and among bacteria, best results was achieved by *Chryseobacterium* sp.. The ability of bacterial isolates for degradation of oil-compounds increased by increasing time of incubation.

Keywords: Bioremediation, Gas oil, Minimal Medium, Molecular identification, Oil-degradation bacteria.

مقدمه

خاک یکی از سرمایه‌های ارزشمند طبیعت بوده و به عنوان پالاینده طبیعی بشمار می‌آید. اما مدت‌ها است که مواد نفتی و مشتقات آن پس از برداشت، ترابری و نگهداری در انبارها یا بهره‌گیری نادرست موجب آلودگی خاک شده است (عبدالسلام و همکاران 2009، اسپارکس 2003). نفت خام ترکیب پیچیده‌ای است و شامل هیدروکربن‌های زنجیره‌ای ساده، زنجیره‌ای شاخه‌دار و یا زنجیره‌ای حلقوی (ساده و آروماتیک) می‌باشد (پاریش و همکاران 2005، سرنیگلیا 1992، آدام و همکاران 2002، کلارک 1986). بهسازی و کاهش آلودگی از خاک‌های آلوده یکی از گام‌های پایه‌ای در داشتن محیط زیست سالم و پایدار می‌باشد، چرا که آلاینده‌های گوناگون با کاستن منابع در دسترس، تولید را با آسیب‌هایی جبران ناپذیر روبرو می‌سازند. گسترش علم و دانش بشر و توجه به بهبود شرایط زیست‌محیطی و نیز کاربرد بهینه از امکانات محیطی، پژوهندگان را بر آن داشته تا روش‌های مناسبی را برای از بین بردن این آلودگی‌های زیانبار ارزیابی کنند. یکی از روش‌های بازیابی این مناطق و وارد نمودن آن‌ها در چرخه کشاورزی، کاهش و زدودن آلاینده‌ها با روش‌های زیستی یا غیر زیستی است که از این میان روش تجزیه زیستی با توجه به بهره‌گیری از توان طبیعی و توانایی‌های نهفته طبیعت بیشتر مورد توجه بوده است (انیفید و همکاران 2007).

زیست‌بهسازی به عنوان راهکاری شایسته برای بهسازی خاک‌های آلوده می‌باشد. زیست‌بهسازی یک واژه همه گیر برای زدودن و کاهش آلودگی محیط زیست با فرایندهای بیولوژیکی و به کمک ریزجانداران و بویژه باکتری، قارچ و مخمر در خاک‌ها و آب‌های آلوده می‌باشد (مینایی تهرانی و همکاران 1384). مهمترین عامل در انجام زیست‌بهسازی، دست‌یابی به جدایه‌های میکروبی فعال در تجزیه مواد آلاینده می‌باشد (زانگ یانگ 2007). باکتری‌های گرم مثبت به ویژه *Bacillus* sp. در فرایندهای زیست‌بهسازی کارایی ویژه‌ای دارند (گانش و لین 2009). گروه گسترده‌ای از باکتری‌ها همانند گونه‌های *Pseudomonas*، *Acinetobacter*، *Alcaligenes*، *Nocardia* و *Rhodococcus* توان تجزیه زیستی هوازی ترکیب‌های نفتی را دارند (انیفید و ابوبکر 2007، کااو 2007). از میان باکتری‌ها، باکتری *Pseudomonas* از جمله جنس‌هایی است که بررسی‌های فراوانی بر روی آن برای تجزیه شمار فراوانی از ترکیب‌های نفتی از جمله آروماتیک‌ها انجام گرفته است (کااو و همکاران 2009، ساریخانی و همکاران 2011). در بررسی‌های گوناگون از باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها مانند *Arthrobacter*، *Alcaligenes*، *Acinetobacter*، *Achromobacter*، *Pseudomonas*، *Nocardia*، *Flavobacterium*، *Escherichia coli*، *Coryneforms* و *Bacillus* درمحیط‌های آبی و خاکی آلوده نام برده شده است (انیفید و ابوبکر 2007، کااو و همکاران 2009، کوساریک و امریتوس 2001، عباسی و شکویرات 2007، براتی و واسودوان 2001).

ویسن و همکارانش (1991) در بررسی خود گونه *Alcaligenes denitrificans* را شناسایی نمودند که توان تجزیه زیستی فلورانتن[1] به اندازه 0/3 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در هر روز را داشت. این سویه باکتری همچنین توان تجزیه دیگر PAH[2]ها همانند پیرن و بنزوآنتراسن را نیز داشت. تجزیه ترکیبات مشابه دیگری مانند فلورانتن به کمک باکتری‌های دیگری مانند جنس *Mycobaterium* نیز گزارش شده است (کانالی و هارایاما 2000).

کالدینی و همکاران (1995) موفق به جداسازی گونه باکتری *Pseudomonas fluorescence* شدند که قادر به بهره‌گیری از کریزن[3] و بنزوانتراسن[4] به عنوان منبع کربن و انرژی بودند. سوپاکا و همکارانش (2001)

[1] Fluoranthene
[2] Polyaromatic hydrocarbons
[3] Chrysene
4 Benz[a]anthracene

جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده فنانترن به نام *Sphingomonas* را گزارش نموده و عنوان داشتند که این باکتری قادر به تجزیه ترکیبات حلقوی دیگر نیز می‌باشد.

همچنین باکتری‌هایی با قابلیت‌های متفاوت وجود دارند که می‌توانند دیگر مواد نفتی را تجزیه نمایند. باکتری سرمادوست گونه *Rhodococcus* جدا شده از آب زیرزمینی که قادر به رشد تحت دمای 4 تا 30 درجه سلسیوس بوده و قادر به تجزیه هیدروکربن‌ها همانند نفت خام، روغن دیزل و گازوئیل می‌باشد (هیووک و همکاران 2006).

در پژوهشی ابراهیمی‌پور و همکاران (1384) از یک چشمه آب شیرین در پیرامون دزفول یک سویه باکتریایی گرم مثبت بردبار در برابر شوری[1] جداسازی نمودند و گزارش کردند که آن سویه ترکیب‌های نفتی را را به شکل کارآمدی معدنی می‌نماید. آن‌ها سویه یادشده را در ارلن‌های دارای محیط نفت به عنوان تنها منبع کربن و انرژی رشد دادند و ساخت زیتوده میکروبی که نشان دهنده تجزیه شدن نفت بود را در طول موج 650 نانومتر اندازه‌گیری نمودند.

در پژوهش دیگری فلور باکتری‌های گرم مثبت تجزیه کننده فنانترن را امیر مظفری و همکاران (1385) در بندرهای امیر آباد و نوشهر بررسی کردند. آن‌ها برای این منظور از محیط پایه دارای ترکیب‌های معدنی، عناصر کمیاب و فنانترن برای کشت نمونه‌های آب برداشت شده از این بنادر استفاده کرده و پس از کشت‌های پی در پی در محیط‌های ویژه و انجام آزمون‌های اولیه و بیوشیمیایی، باکتری‌های گرم مثبت جدا شده را در حد جنس و گونه شناسایی کردند. آزمایش نشان داد که از 16 نمونه باکتری‌های گرم مثبت تجزیه کننده فنانترن جداسازی شده، 9 نمونه آن از جنس *باسیلوس* و 7 نمونه از جنس کورینه *باکتریوم* بوده است.

[1] Halotolerant

برای بهره‌مندی بیشتر از توان ریزجاندارن خاک در زدودن و کاهش آلاینده‌های نفتی، جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی و به دنبال آن خالص‌سازی، شناسایی و بررسی توان آن‌ها در تجزیه مواد نفتی گوناگون مورد توجه می‌باشد. در این راستا، این پژوهش با هدف جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های آلوده به مواد نفتی استان بوشهر و همچنین بررسی توان سویه‌ها در رشد و احتمالاً تجزیه مواد نفتی مانند گازوئیل در شرایط آزمایشگاه و تلاش برای گزینش سویه برتر انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و ساخت سوسپانسیون خاک

تعداد 20 نمونه خاک از عمق 30-0 سانتی‌متر زمین‌های آلوده به مواد نفتی در استان بوشهر گردآوری شد. برای ساخت سوسپانسیون میکروبی و غنی‌سازی باکتری‌های نمونه نفتی از محیط حداقل بدون کربن (CFMM)[2] (سوپاکا و همکاران 2001) به گونه‌ای که در زیر شرح داده می‌شود، بهره‌گیری شد. یک گرم خاک آلوده درون 25 میلی‌لیتر از محیط بالا در شرایط سترون درون ارلن مایر افزوده گردید و در شرایط دمای 28 درجه سلسیوس و تکان دادن با دور 150 rpm برای 24 ساعت انکوبه شد. بعد از ساخت سوسپانسیون میکروبی اولیه برای غنی‌سازی کشت میکروبی و جداسازی باکتری‌ها، مایه‌زنی 5 میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به 45 میلی‌لیتر از محیط کشت CFMM با 2 درصد از ماده نفتی (گازوئیل) انجام شد. شرایط تکان دادن و دمای انکوباسیون مانند بالا بوده و برای یک هفته انکوباسیون انجام پذیرفت. با دیدن تیرگی و رشد باکتری، برای جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده مواد نفتی اقدام به ساخت سری رقت از نمونه‌ها گردید و از رقت‌های مناسب

[2] Carbon Free Minimal Medium

(10^{-5} تا 10^{-8}) به میزان 100 میکرولیتر بر روی پلیت-های دارای محیط جامد CFMM به همراه ماده نفتی گازوئیل انتقال داده شد. پلیت‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس انکوبه شدند.

خالص‌سازی و شناسایی باکتری‌ها

با دیدن رشد کلنی باکتری در درون پلیت‌ها با توجه به ریخت‌شناسی کلنی باکتری‌ها و ویژگی‌هایی مانند ریخت، کناره، خشکی و رنگ کلنی‌ها اقدام به جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های رشد یافته بر محیط CFMM شد. در جریان خالص‌سازی باکتری‌ها و کشت آن‌ها از محیط نوترینت آگار بهره‌گیری شد و در پی آن آزمون‌های بیوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، آزمایش ساخت رنگ فلورسانس، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز (شاد 1988، جرهاردت 2006) و انجام برخی آزمون‌های پیشرفته با کیت‌های شناسایی شرکت Himedia انجام شد. برای بهره‌گیری از کیت شناسایی باکتری از کشت تازه باکتری‌ها استفاده شد، برای این کار از تک کلنی باکتری کشت شده (شبانه) در محیط NB استفاده شد و سپس مایه‌زنی دوباره از رشد شبانه باکتری‌ها در محیط NB جدید انجام پذیرفت تا در مدت 4-3 ساعت OD پدید آمده از رشد باکتری‌ها به حدود 0/8 برسد. سپس 50-40 میکرولیتر از آن روی کیت‌ها گذاشته شد. برای بررسی نتایج برای 48-24 ساعت در داخل انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس گذاشته شد و داده‌های آن با جدول کیت مقایسه گردید.

شناسایی مولکولی باکتری‌ها در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به صورت زیر انجام شد. برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها به روش 16S rRNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R خریداری شده از شرکت ژن فناوران استفاده شد (جدول 1). برنامه PCR بکاررفته دارای 30 چرخه بود که در دستگاه ترموسایکلر Flexigene این چرخه‌ها شامل، یک چرخه نخستین با دمای 95 درجه سلسیوس برای 4 دقیقه، در پی آن دمای 94 درجه سلسیوس برای 1 دقیقه، دمای 53 درجه سلسیوس (دمای پیوند آغازگر) برای 1 دقیقه و دمای فراوان شدن 72 درجه سلسیوس برای 1 دقیقه بود که در پایان یک چرخه اضافی دمای 72 درجه سلسیوس برای 10 دقیقه نیز انجام شد. یادآور شود که برای انجام PCR از تک کلنی باکتری‌ها بهره‌گیری شد و بدین گونه از استخراج DNA ژنومی باکتری چشم پوشی شد. نوارهای پدیدارشده (نزدیک 1500 جفت باز) پس از ران شدن محصول PCR بر روی ژل آگاروز ریکاوری شدند و خالص‌سازی DNA به کمک کیت Roche انجام پذیرفت. برای انجام همسانه‌سازی و توالی‌یابی DNA از ناقل pTZR57R/T بهره‌گیری شد و واکنش پیوستن[1] در کنار این ناقل انجام شد. سپس فراورده بالا برای تراریختی یاخته‌های مستعد[2] *E. coli* DH5α بهره‌گیری شد. پس از انجام آزمایش‌های تائیدی مانند کلنی PCR، استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی، توالی‌یابی نمونه‌ها انجام پذیرفت (سمبروک و راسل 2001). پس از توالی یابی نمونه‌ها، توالی‌های مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI[3]، Blastn[4] شدند و به بررسی یافته‌های آن‌ها پرداخته شد.

بررسی کارایی در محیط مایع

برای انجام آزمایش و داشتن کشت تازه، در آغاز باکتری‌های مورد نظر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار کشت داده شدند، سپس از تک کلنی برای مایه‌زنی محیط نوترینت مایع بهره‌گیری شد. از کشت‌های شبانه باکتری‌ها با تیرگی یکسان (OD=1)، 1 میلی‌لیتر از باکتری رشد یافته را درون ویال 1/5 میلی‌لیتر ریخته بعد در درون دستگاه سانتریفیوژ با دورrpm 4000 برای 3 دقیقه سانتریفیوژ کرده تا باکتری ته نشین شود (ماندری و لین 2007). پس از ته‌نشینی، محلول رویی را دور ریخته و ته‌نشست

[1] Ligation reaction
[2] Transformation of competent cell
[3] National center for biotechnological information
[4] Basic local alignment search tool (for Nucteotide)

باکتری را با حدود 750 میکرولیتر محیط CFMM دوباره حل نموده و سپس به درون ارلن مایر250 میلی‌لیتری دارای 50 میلی‌لیتر محیط کشت CFMM دارای 2 درصد گازوئیل افزوده شد. برای بررسی کارآیی جدایه‌های باکتری در تجزیه زیستی گازوئیل از محیط مایع CFMM دارای گازوئیل استفاده شد. تمامی ارلن‌ها برای تقریباً دو هفته بر روی شیکر انتقال داده شدند و در این مدت در زمان‌های گوناگون (0، 48، 168، 216 و 312 ساعت) اقدام به اندازه‌گیری OD در 600 نانومتر شد (امتیازی 2005). آنالیز آماری داده‌های مربوط به آزمایش یادشده (آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی) با بهره‌گیری از نرم‌افزار MSTATC انجام پذیرفت.

جدول 1- آغازگرهای عمومی برای تکثیر بخش 16S rDNA باکتری‌ها.

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای پیوند
27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'	T_m:53
1492R	5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'	

جدول 2- تجزیه واریانس داده‌های (تبدیل شده) توان رشد باکتری‌ها در محیط مایع حداقل دارای گازوئیل.

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F
فاکتور باکتری	18	28/432	1/580	44/544**
فاکتور زمان	4	34/449	8/612	242/868**
اثر متقابل باکتری× زمان	72	16/346	0/227	6/402**
خطا	95	3/369	0/035	
جمع	189	82/596		

ضریب واریانس: 20/78%، **: معنی‌دار در سطح 1 درصد

نتایج و بحث

غربالگری، جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها از 20 نمونه خاک مربوط به خاک‌های‌آلوده منجر به شناسایی 19 جدایه شد. آزمایش‌های اولیه نشان داد که همه باکتری‌ها گرم منفی، بدون اسپور و کاتالاز مثبت هستند و برخی از آن‌ها اکسیداز منفی و مثبت بعلاوه تعدادی دارای توان ساخت رنگدانه در محیط king-B می‌باشند. شناسایی مولکولی به روش 16S rRNA انجام پذیرفت که در شکل 1 نمونه‌ای از محصول PCR مربوط به تکثیر ژن رمزکننده این قطعه آورده شده است. افزون بر روش یادشده بهره‌گیری از کیت Himedia برای شناسایی باکتری‌ها نیز بهره گرفته شد که در شکل 2 آورده شده است. اطلاعات مربوط به باکتری‌های شناسایی شده در این تحقیق در جدول 3 آورده شده است که شامل 15 جنس و گونه باکتریایی گوناگون به نام‌های *Stenotrophomonas maltophilia*، *Ralstonia* sp.، *Vibrio* sp.، *Sphingobacterium* sp.، *Zymomonas* sp.، *Pseudomonas aeruginosa*، *Paracoccus* sp.، *Pantoea* sp.، *Achromobacter xylosoxidans*، *Acinetobacter johnsonii*، *Serattia odorifera*، *Pseudomonas alcaligenes*، *Entrobacter cloacae*، *Pseudomonas stutzeri*، *Chryseobacterium* sp. می‌باشد.

در این بررسی برای جداسازی گونه‌های باکتریایی توانمند تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های آلوده، از محیط کشت حداقل بدون منبع کربن CFMM استفاده شد که در آن مواد نفتی مناسب جایگزین منابع کربن حذف شده از محیط گردید. لذا برای این منظور از ماده نفتی گازوئیل به میزان یک درصد و نهایتاً دو درصد به عنوان منبع هیدروکربنی و محیط CFMM جامد برای تهیه محیط کشت باکتری‌ها استفاده شد. چون محیط حداقل مورد استفاده عاری از هر گونه منبع کربن بود و گازوئیل به عنوان تنها منبع هیدروکربنی در این محیط محسوب می‌شد، لذا می‌توان گفت که باکتری‌هایی که قدرت بقاء و بهره‌گیری از گازوئیل در این محیط را داشته باشند توانایی رشد را خواهند داشت. بهره‌گیری از چنین روشی در کارهای دیگر محققان نیز دیده می‌شود به صورتی‌که سوپاکا و همکاران (2001) با بهره‌گیری از محیط کشت CFMM و بهره‌گیری از فنانترن به عنوان منبع کربن توانستند باکتری *Sphingomonas*sp را از خاک‌های آلوده به مواد نفتی جداسازی نمایند. هیووک و همکاران (2006) با بهره‌گیری از محیط کشت حداقل [1] BH وگازولین یا روغن دیزل به عنوان منبع کربن در این محیط، باکتری *Rhodococcus* sp. را از آب‌های زیرزمینی آلوده به مواد نفتی جداسازی نمودند.

لیانگلی و هونگچن (2009) گزارش کردند که باکتری‌های *Pseudomonas stutzeri* و *Pseudomonas aeruginosa* قادر به تجزیه زیستی فنانترن می‌باشند و باکتری‌های *Stenotrophomonas maltophilia* و*Pseudomonas alcaligenes* قادر به تجزیه فلورانتن هستند. سوزئو و همکاران (2009) نشان دادند که باکتری از جنس *Achromobacter* sp. و *Chryseobacterium* sp. قادر به تجزیه زیستی کربازول می‌باشند و باکتری *Pseudomonas stutzeri* قادر به تجزیه پیرن، باکتری *Ralstonia* sp. قادر به تجزیه نفتالین و دی بنزوآنتراسن می‌باشد.

یوسفی کبریا و همکاران (2009) با جداسازی و بررسی ویژگی‌های باکتری‌های تجزیه کننده روغن دیزل از خاک‌های آلوده به این مواد گزارش کردند که باکتری بومی *Bacillus* نسبت به دیگر میکروارگانیسم-های خاک نقش مهمی در زیست بهسازی روغن دیزل دارد و گونه جداسازی شده با نام *B. cereus* توانایی تجزیه روغن دیزل را به میزان 85/20 درصد دارا می‌باشد.

اکوه و همکاران (2001) با جداسازی گونه *Burkholderia cepacia* از خاک‌های آلوده به نفت خام سنگین در نیجریه و بررسی توانایی آن در تجزیه زیستی اینگونه مواد نشان دادند که این باکتری توان بهره‌گیری از نفت خام سنگین به عنوان منبع کربن آلی را دارد، همچنین فراوانی این باکتری در مدت زمان 15 روز از 10^5 CFU/ml به 10^8 CFU/ml افزایش یافت.

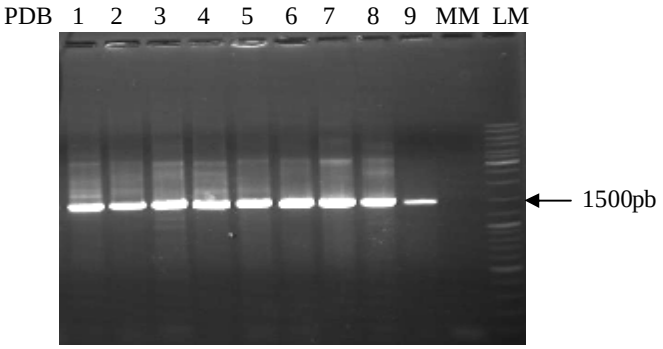
کارایی تجزیه گازوئیل

برای بررسی کارایی جدایه‌های به دست آمده در استفاده و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی از مقایسه میزان تیرگی یا کدورت پدید آمده از رشد آن‌ها در محیط کشت مایع حداقل دارای گازوئیل، بهره‌گیری شد. میزان تیرگی پدید آمده در محیط کشت پس از زمان یاد شده، نمایانگر میزان رشد باکتری است. از آنجایی که تنها منبع کربن آلی این محیط، گازوئیل (با نسبت 2% حجمی) است، بنابراین افزایش تیرگی نشان دهنده رشد و تغذیه باکتری‌ها از گازوئیل است. نتایج آنالیز آماری نشان داد که فاکتورهای باکتری، زمان و اثر متقابل آن‌ها (باکتری× زمان) در سطح 1% معنی‌دار می‌باشند (جدول 2). مقایسه میانگین فاکتورهای معنی‌دار به روش دانکن نشان داد که با گذشت زمان بهره‌گیری از گازوئیل به عنوان تنها ماده کربنی در محیط افزایش می‌یابد و تجزیه این ماده رشد بیشتر باکتری را به دنبال دارد.

[1] Bushnell Hass

جدول 3- باکتری‌های شناسایی شده و برخی از ویژگی‌های آن‌ها.

باکتری	شکل باکتری	رنگامیزی گرم	تست اسپور	تست اکسیداز	تست کاتالاز	ایجاد رنگدانه	پس از تکمیل شناسایی (مولکولی و بیوشیمیایی)
PDB1	کوکوباسیل	-	-	-	+	-	*Stenotrophomonas maltophilia*
PDB2	کوکوباسیل	-	-	+	+	-	*Ralstonia sp.*
PDB3	باسیل	-	-	+	+	+	*Vibrio sp.*
PDB4	باسیل	-	-	+	+	-	*Sphingobacterium sp.*
PDB5	کوکسی	-	-	-	+	-	*Zymomonas sp.*
PDB6	باسیل	-	-	+	+	+	*Pseudomonas aeruginosa*
PDB7	باسیل	-	-	+	+	-	*Paracoccus sp.*
PDB8	کوکسی	-	-	+	+	-	*Sphingobacterium sp.*
PDB9	باسیل	-	-	+	+	+	*Pantoea sp.*
PDB10	باسیل	-	-	+	+	-	*Achromobacter xylosoxidans*
PDB11	باسیل	-	-	+	+	+	*Pseudomonas aeruginosa*
PDB12	کوکسی	-	-	-	+	-	*Acinetobacter johnsonii*
PDB13	کوکسی	-	-	-	+	-	*Acinetobacter johnsonii*
PDB14	کوکوباسیل	-	-	-	+	-	*Serattia odorifera*
PDB15	کوکوباسیل	-	-	+	+	+	*Pseudomonas alcaligenes*
PDB16	باسیل	-	-	-	+	-	*Entrobacter cloacae*
PDB17	باسیل	-	-	+	+	+	*Pseudomonas aeruginosa*
PDB18	باسیل	-	-	+	+	+	*Pseudomonas stutzeri*
PDB19	کوکوباسیل	-	-	+	+	+	*Chryseobacterium sp.*



شکل 1- محصول PCR بدست آمده تکثیر ژن رمزکننده 16S rDNA. نردبان مولکولی با اندازه بین 100 تا 10000 جفت باز (LM)، محلول دارای تمام اجزاء واکنش به جز DNA باکتریایی (MM) و نمونه‌های باکتری با نام‌گذاری PDB1-9.

شکل 2- نمونه‌ای از کیت شناسایی باکتری Himedia بکاررفته در این آزمایش. تصویر بالایی پیش از مایه‌زنی و تصویر پائین پس از مایه‌زنی کشت باکتری می‌باشد.

از میان اثرات متقابل (ترکیب تیماری باکتری× زمان) بالاترین میانگین‌ها مربوط به زمان پنجم اندازه گیری (312 ساعت) بود. با توجه به جدول 4 مشاهده می‌شود که با گذشت زمان کدورت پدید آمده از رشد باکتری در محیط افزایش می‌یابد به صورتی‌که کمترین میزان آن در زمان‌های ابتدایی آزمایش (زمان صفر و 48 ساعت) و با گذشت زمان بر مقدار آن افزوده شده است و تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های 168، 216 و 312 ساعت از نظر آماری وجود دارد. این نتایج در مقایسه اثر ساده فاکتور زمان نیز به دست آمد (شکل نشان داده نشده است). از میان باکتری‌ها بیشترین رشد و به عبارتی استفاده از گازوئیل مربوط به باکتری *Acinetobacter johnsonii* سویه PDB13 بود (OD:2/366) که بعد از 312 ساعت انکوباسیون حاصل شد (جدول 4). ترتیب قرارگیری باکتری‌های دیگر در همین مدت زمان به صورت زیر بود هرچند میان آن‌ها ناهمانندی چشم‌گیری با *Acinetobacter johnsonii* PDB13 دیده نشد، به ترتیب باکتری‌های *Entrobacter cloacae*، *Chryseobacterium* sp.، *Pseudomonas aeruinosa* PDB11، *Pantoea* sp. و *Achromobacter xylosoxidans* با کدورتهای برابر با 2/231، 2/002، 1/922، 1/687 و 1/607 در این رتبه بندی قرار گرفتند. در این میان کمترین رشد و تجزیه در حضور گازوئیل برای باکتری‌های *Stenotrophomonas maltophilia*، *Ralstonia* sp، *Sphingobacterium* sp. و *Paracoccus* sp. به دست آمد (جدول 4).

قابل ذکر است که در این آزمایش از دو سویه *Acinetobacter johnsonii* به نام‌های PDB12 و PDB13 استفاده شد که سویه PDB13 دارای بالاترین رشد بعد از گذشت 312 ساعت در میان باکتری‌ها بود. روند تغییرات رشد این دو باکتری تا زمان سوم مشابه هم بوده و تفاوتی مشاهده نمی‌شود اما در زمان‌های 216 و 312 ساعت سویه PDB13 رشد چشم‌گیری از خود نشان داد. این موضوع در ارتباط با سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* نیز مشاهده شد به صورتی‌که بین سویه PDB11 و PDB17 در هیچ یک از زمان‌های پنجگانه اختلافی آماری مشاهده نشد اما سویه PDB6 تنها در زمان پنجم با دو سویه دیگر این باکتری رشد کمتری را نشان داد (جدول 4).

از میان باکتری‌هایی که توان استفاده از گازوئیل را به عنوان منبع کربن داشتند و رشد مطلوبی را نشان دادند (*Acinetobacter johnsonii* PDB13، *Entrobacter*

cloacae، *Chryseobacterium* sp.، *Pseudomonas aeruginosa* PDB11، *Pantoea* sp. و *Achromobacter xylosoxidans*) در همه آن‌ها به جز *Acinetobacter johnsonii* PDB13 رشد باکتری در زمان چهارم و پنجم اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما در مورد این باکتری رشد باکتری در زمان چهارم کاهش چشم‌گیری نسبت به زمان پنجم داشته است. این در حالی است که از میان همین باکتری‌ها، بیشترین رشد (OD:1/583) در زمان چهارم (216 ساعت) مربوط به باکتری *Chryseobacterium* sp. بوده است. آنچه از یافته‌های این پژوهش برمی‌آید آن است که از میان دیگر باکتری‌ها، باکتری *Chryseobacterium* sp. توان بیشتری برای رشد بر روی ماده نفتی مورد آزمایش دارد و این مطلب با مشاهده رشد این باکتری در زمان‌های سوم (OD:1/465)، چهارم (OD:1/583) و پنجم (OD:2/002) با توجه به جدول 4 قابل استنباط می‌باشد.

جدول 4- میانگین رشد باکتری‌ها (چگالی نوری) در محیط مایع در حضور گازوئیل (اثر متقابل باکتری در زمان).

باکتری	زمان صفر	48 ساعت	168 ساعت	216 ساعت	312 ساعت
Stenotrophomonas maltophilia	۰/۰۱۱ (۰/۰۰۱) q	۰/۰۱ (۰/۰۰۴) q	۰/۰۲۶ (۰/۰۲۰) o-q	۰/۰۴۴ (۰/۰۰۹)m-q	۰/۰۴۷ (۰/۰۱۵) m-q
Ralstonia sp.	۰/۰۱۵ (۰/۰۰۳) q	۰/۰۱۲ (۰/۰۰۸) q	۰/۰۱۶ (۰/۰۰۵) q	۰/۰۵۸ (۰/۰۰۸) m-q	۰/۰۶۱ (۰/۰۰۲) m-q
Vibrio sp.	۰/۰۳۴ (۰/۰۰۲) n-q	۰/۰۶۱ (۰/۰۰۶) m-q	۰/۲۰۱ (۰/۱۳۰) l-q	۰/۲۹۴ (۰/۰۳۳) l-q	۰/۵۶۵ (۰/۱۸۳) i-q
Sphingobacterium sp.	۰/۰۱۸ (۰/۰۰۴) q	۰/۰۳۶ (۰/۰۱۵) n-q	۰/۰۲۷ (۰/۰۲۱) o-q	۰/۰۳۶ (۰/۰۴۴) n-q	۰/۰۹۴ (۰/۰۵۴) m-q
Zymomonas sp.	۰/۰۳۶ (۰/۰۰۹) qr	۰/۰۴۶ (۰/۰۰۷) p-r	۰/۰۵۳ (۰/۰۰۹) o-r	۰/۰۷۳ (۰/۰۳۴) n-r	۰/۴۱۱ (۰/۰۶۰) i-r
Pseudomonas aeruginosa PDB6	۰/۰۱۹ (۰/۰۰۲) r	۰/۲۷۸ (۰/۰۷۸) m-r	۰/۵۳۶ (۰/۰۷۶) k-r	۰/۵۶۹ (۰/۰۱۴) j-r	۱/۰۰۹ (۰/۱۵۹) e-m
Paracoccus sp.	۰/۰۱۸ (/۰۰۴) r	۰/۰۱۸ (۰/۰۰۷) r	۰/۰۲۴ (۰/۰۲۵) r	۰/۰۶۶ (۰/۰۵۰) o-r	۰/۰۵ (۰/۰۲۴) o-r
Sphingobacterium sp.	۰/۰۵۳ (۰) o-r	۰/۰۴۴ (۰/۰۰۷) p-r	۰/۸۶۹ (۰/۰۹۸) f-q	۰/۹۳۱ (۰/۰۴۵) e-m	۱/۳۹۷ (۰/۲۷۸) c-i
Pantoea sp.	۰/۰۳۲ (۰/۰۰۹) qr	۰/۰۵۹ (۰/۰۰۳) o-r	۰/۸۱ (۰/۱۴۷) f-r	۰/۹۷۸ (۰/۲۶۴) e-m	۱/۶۰۷ (۰/۳۰۴) a-f
Achromobacter xylosoxidans	۰/۰۲۷ (۰) r	۰/۰۵۷ (۰/۰۴۳) o-r	۰/۷۸۳ (۰/۰۴۲) g-r	۰/۸۸۴ (۰/۱۳۷) f-n	۱/۶۸۷ (۰/۲۰۴) a-e
Pseudomonas aeruginosa PDB11	۰/۰۲ (۰/۰۰۲) r	۰/۰۶۹ (۰/۰۱۴) o-r	۱/۲۱۳ (۰/۰۴۶) c-l	۱/۲۶۶ (۰/۱۰۰) c-k	۱/۹۲۲ (۰/۲۱۷) a-d
Acinetobacter johnsonii PDB12	۰/۰۳۲ (۰/۰۰۲) qr	۰/۰۴۲ (۰/۰۱۲) p-r	۰/۵۵۱ (۰/۰۵۷) k-r	۰/۶۲۴ (۰/۰۱۱) i-r	۰/۹۴۶ (۰/۰۵۶) e-m
Acinetobacter johnsonii PDB13	۰/۰۳۸ (۰/۰۰۸) qr	۰/۰۵ (۰/۰۱۶) o-r	۰/۸۷۷ (۰/۱۲۹) f-o	۱/۵۱۶ (۰/۱۴۳) b-h	۲/۳۳۶ (۰/۲۵۸) a
Serattia odorifera	۰/۰۶۷ (۰/۰۰۳) o-r	۰/۰۹۹ (۰/۰۰۷) n-r	۰/۵۶۶ (۰/۱۱۸) f-r	۰/۸۷۳ (۰/۲۲۷) f-p	۱/۲۵۸ (۰/۰۹۸) c-k
Pseudomonas alcaligenes	۰/۰۵۱ (۰/۰۰۶) o-r	۰/۰۶۵ (۰/۰۱۹) o-r	۰/۳۵۷ (۰/۰۸۳) m-r	۰/۷۶۲ (۰/۱۲۷) h-r	۱/۵۰۷ (۰/۱۸۳) b-n
Entrobacter cloacae	۰/۰۷۵ (۰/۰۱۳) n-r	۰/۰۵۹ (۰/۰۲۲) o-r	۰/۶۱۱ (۰/۱۰۴) i-r	۱/۴۷۴ (۰/۲) b-n	۲/۲۳۱ (۰/۳۴۷) ab
Pseudomonas aeruginosa PDB17	۰/۰۲۸ (۰/۰۱۸) r	۰/۰۳۳ (۰/۰۲۳) qr	۱/۲۳۴ (۰/۲۰۶) c-k	۱/۳۱۱ (۰/۴۶۳) c-k	۱/۲۰۳ (۰/۲۱۴) d-l
Pseudomonas stutzeri	۰/۰۴۱ (۰/۰۳۴) p-r	۰/۰۲۶ (۰/۰۰۲) r	۰/۶۵ (۰/۱۰۸) i-r	۰/۸۸ (۰/۰۶۹) f-n	۱/۳۷۶ (۰/۱۸۵) c-j
Chryseobacterium sp.	۰/۰۴۴ (۰/۰۰۵) p-r	۰/۰۳۷ (۰/۰۱۴) qr	۱/۴۶۵ (۰/۱۲۰) b-h	۱/۵۸۳ (۰/۱۸۵) b-g	۲/۰۰۲ (۰/۱۵۵) a-c

(اعداد داخل پرانتز انحراف معیار می‌باشد)

کیریمورا و همکاران (1999) موفق به جداسازی سویه *Sphingomonas* sp. شدند که قادر به بهره‌گیری از کربازول و دیگر ترکیب‌های نفتی مانند n – هگزادکان بود. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که با تغییر میزان OD محیط و افزایش رشد باکتری میزان تجزیه مواد نفتی افزایش می‌یابد. امتیازی و همکاران (2005) نیز تجزیه ترکیبات گوناگون نفتی را به وسیله سویه *Pseudomonas* در مدت زمان 9 روز از طریق منحنی رشد باکتری (OD_{600nm}) بررسی نمودند، سویه یادشده از مواد نفتی موجود به عنوان منبع کربن و انرژی

بهره‌گیری نموده و بیشترین رشد (OD) حدود 0/8 در فاصله زمانی 5 روز در حضور ماده نفتی اکتادکان و دودکان نشان داد این در حالی بود که بیشترین رشد باکتری در حضور ماده نفتی اکتان تنها 0/28 OD_{600nm}= بود.

نتیجه‌گیری کلی

نخستین گام در بهره‌گرفتن از توان میکروبی خاک برای بهسازی زیستی آلاینده‌های آلی غربالگری و شناسایی آن‌ها می‌باشد. در این پژوهش با غربالگری باکتری‌ها در محیط حداقل بدون کربن و جایگزین نمودن آن با مواد نفتی 19 سویه باکتری جداسازی و خالص‌سازی شد. شناسایی باکتری‌ها به روش مولکولی و تست‌های بیوشیمیایی تکمیلی نشان داد که باکتری‌های گوناگونی جداسازی شده‌اند که بیشتر از گروه باکتری‌های گرم منفی هستند. پس از بررسی توان رشد 19 سویه باکتری در محیط دارای گازوئیل، نتایج نشان داد که بالاترین رشد باکتری و شاید تجزیه گازوئیل در زمان انجام آزمایش مربوط به سویه گرم منفی *Chryseobacterium* sp. با رنگدانه زرد مایل به قهوه‌ای و با کلنی‌های کروی شکل می‌باشد. این سویه از لحاظ رشد و شاید تجزیه گازوئیل در زمان‌های سوم، چهارم و پنجم دارای رشد بالایی بود هر چند با برخی از باکتری‌ها از قبیل *Acinetobacter johnsonii* PDB13، *Entrobacter cloacae*، *Pseudomonas aeruinosa* PDB11، *Pantoea* sp. و *Achromobacter xylosoxidans* در برخی از زمان‌های ذکر شده تفاوت چشم‌گیری نشان نداد.

منابع مورد استفاده

ابراهیمی پور غ، امینیان م و ابوالحسنی سورکی ع، 1384. جداسازی یک باکتری هالوتولرانت نفت‌خوار و بررسی اثر فاکتورهای محیطی در تجزیه زیستی نفت خام به منظور حفظ محیط زیست. مجله علوم محیطی. شماره 8. صفحه های 74-65.

امیرمظفری ن، نوری ن و صفری ر، 1385. فون باکتری‌های گرم مثبت تجزیه کننده فنانترن از آبهای بنادر امیرآباد و نوشهر و مقایسه آن‌ها از نظر اصلاح زیستی. علوم و تکنولوژی محیط زیست. شماره 29. صفحه های 101-108.

مینایی‌تهرانی د، حرفت منش ع، و آذری دهکردی ف، 1384. مطالعه تجزیه زیستی نفت خام سنگین در خاک با مقیاس پایلوت. مجله علوم محیطی. شماره 10. صفحه های 82-71.

Abbassi BE and Shquirat WD, 2007. Kinetics of indigenous isolated bacteria used for ex-situ bioremediation of petroleum contaminated soil. Environment Science 2(6): 761-766.

Abd-Elsalam HE, Hafez EE, Hussain AA, Amany GA and Hanafy AA, 2009. Isolation and identification of Three- rings polyaromatic hydrocarbons (Anthracene and phenanthrene) degrading bacteria. American- Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science 5(1): 31-38.

AdamG, Gamoh K, Morris D and Duncan H, 2002. Effect of alcohol addition on the movement of petroleum hydrocarbon fuels in soil. The Science of the Total Environment 286(1-3):15-25.

Barathi S and Vasudevan N, 2001. Utilization of petroleum hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum contaminated soil. Environment International 26: 413-416.

Caldini G, Cenci G, Manenti R and Morozzi G, 1995. The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilize chrysene and other four- ring polynuclear aromatic hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology 44: 225-229.

Cao B, Nagarajan K and Cheeloh K, 2009. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for bimolecular approaches. Applied Microbiology and Biotechnology 85: 207-228.

Cerniglia CE, 1992. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3: 351-368.

Clark RB, 1986. Marine Pollution. Oxford University Press. USA

Emtiazi G, Shakarami H, Nahvi I and Mirdamadian SH. 2005. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology 4(2): 172-176.

Ganesh A and Lin J. 2009. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram- positive isolation African Journal of Biotechnology 8(21): 5847-5854.

Gerhardt P, 2006. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Heewook R, Joo YH, Youn-Jooan and Sukcho K, 2006. Isolation and characterization of Psychrotrophic and halotolerant *Rhodococcus* sp. Yhlt-2. J. Microbiology and Biotechnology 16 (4): 605-612.

Kanaly RA and Hrayama S, 2000. Biodegradation of high – Molecular- Weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. Journal of Bacteriology 182(8): 2059-2067.

Kirimura K, Nakagawa H, Tsuji K, Kazuya M, Kurane R and Usami S, 1999. Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas* sp. CDH-7. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 63(9): 1563-1568.

Kosaric N, 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technology and Biotechnology 39(4): 295-304.

Liangli J and Hungchen B, 2009. Surfactant mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Materials 2: 76-94.

Mandari T and Lin J, 2007, Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms n Kwazulu- Natal, South Africa. African Journal of Biotechnology 6(1): 023-027.

Okoh A, Ajisebutu S, Babaloa G and Trejo-hernandez MR. 2001. potential of *Burkholderia cepacia* RQ1 in the biodegradation of heavy crude oil. International Microbiology 4: 83-87.

Onifade AK and Abubakar FA, 2007. Characterization of hydrocarbon- degrading microorganisms isolation from crude oil contaminated soil and remediation of the soil by enhanced natural attenuation. Research Journal of biological sciences 2(1): 36-40.

Parrish Z, Banks D, Katherine Schwab M and Paul A, 2005. Assessment of contaminant liability during phytoremediation of poly cyclic aromatic hydrocarbon impacted soil. Environmental Pollution 137: 187-197.

Sambrook J and Russell DW, 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sarikhani MR, Ebrahimi M and Fallah AR, 2011. Comparison of hydrocarbon-degradation by isolates of *Pseudomonas fluorescens* Chao, *P. putida* P13 and *Pantoea agglomerans* P5 in presence of gas oil, toluene and phenanthrene. 4th International Conference on Environmental Industerial and Applied Microbiology, 14-16 September, Malaga, Spain.

Schaad NW, 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd edition, APS Press. St.Paul, MN, USA.

Sparks DL, 2003. Environmental Soil Chemistry. 2nd edition. Academic Press. USA.

Supaka N, Pinphanichakam P, Pattaragulwanit K, Thaniyavah S, Omori T and Juntonggjin K, 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene degrading sphingomonas sp. Strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. Research Article Science Asia 27: 21-28.

Suseo J, Sookeum Y and li QX. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. International Journal Environment Research Public Health 6: 278-309.

Weissenfels WD, Beyer M, Klein J and Rehm HJ, 1991. Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products. Applied Microbiology 34: 528-35.

Yousefi kebria D, Khodadadi A, Ganjidoust H, Badkoubi A and Amoozegar MA. 2009. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. International Journal of Environment Science and Techniques 6(3): 435-442.

Zongqiang GK, Berndt- Michael A and Peijumli W, 2007. Activated carbon adsorption of PAHs from vegetable oil used in soil remediation. Journal of Hazardous Material 143(2): 372-378.