بررسی نقش باکتری‌های جداشده از رسوبات خلیج‌فارس در حذف بیولوژیکی آلاینده‌های نفتی (آنتراسن)

فاطمه شاه علیان*،کارشناس ارشد آلودگی دریا،دانشگاه علوم وفنون دریایی، خرمشهر، ایران.
علیرضا صفاهیه، استادیار دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، خرمشهر، ایران.
نگین سلامات، استادیار دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، خرمشهر، ایران.
فاطمه موجودی،کارشناس ارشد آلودگی دریا، دانشگاه علوم وفنون دریایی، خرمشهر، ایران.
مصطفی زارع دوست، اداره کل بنادر و دریانوردی استان خوزستان، اداره حفاظت و ایمنی دریانوری بندرامام خمینی، ایران.

E-mail*:shahaliyanfatemeh@yahoo.com
دریافت: ۹۲/۱۱/۰۷ – پذیرش: ۹۳/۰٤/۱۲

چکیده

توسعه روزافزون صنایع مختلف منجر به ورود مقادیر زیادی ضایعات خطرناک از جمله هیدروکربن‌های نفتی به محیط‌زیست می‌شود. استفاده از روش‌های زیستی و به‌کارگیری میکروارگانیسم‌ها جهت پاک‌سازی آلاینده‌های محیطی از جمله مواد نفتی بیش از سایر روش‌ها مورد توجه است.تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آنتراسن و مقایسه توانایی آن‌ها در حذف این ماده انجام شد. به این منظور پس از نمونه‌برداری از رسوبات آلوده نفتی خلیج فارس و انجام مراحل غنی سازی، باکتری‌های مقاوم به ماده فوق جداسازی و سپس خالص سازی شدند. با مطالعه ویژگی‌های مورفولوژیکی و انجام آزمایشهای بیوشیمیایی مشخص‌شد که گونه‌ها.Psedomonasstutzeri و Alcaligenesdenitrificans هستند. بررسی میزان رشد باکتری‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتری حاکی از رشد این باکتری‌ها در سوبسترای کربنی فوق بود. اندازه‌گیری کاهش میزان سوبسترا به‌وسیله دستگاه HPLC نشان داد میزان تجزیه‌کنندگی پس از ۱۲۰ ساعت برای گونه‌های P. stutzeri و A. denitrificans به‌ترتیب ۸۰/۲۹۵ و ۳۵/۹۳۳ بوده است که در مقایسه با تجزیه‌ای که در شرایط مشابه ولی در عدم حضور این باکتری‌ها صورت گرفت نتیجه چشمگیری است. به‌طورکلی نتایج نشان‌می دهد که باکتری‌های جداشده در حذف این آلاینده از محیط کشت توانا بوده و بنابراین این گونه‌ها را برای انجام آزمایش های میدانی پیشنهاد کرده و در شرایط آلودگی بالا از آن‌ها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: رسوبات آلوده نفتی، خلیج فارس، تجزیه بیولوژیکی، آنتراسن، باکتری.

۱-مقدمه

ترکیبات آروماتیک گروهی از ترکیبات نفتی‌اند که شامل یک یا چند حلقه بنزنی می‌باشند. این ترکیبات حلالیت بسیار پایینی در آب داشته و تمایل دارند جذب ذرات معلق شده و در نهایت در رسوبات تجمع یابند (Kosaric, 2001). آروماتیک‌ها به علت حلایت در چربی، در بافت‌های جانداران تجمع یافته که می‌تواند باعث سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ممانعت از رشد شود (Yerushalmi and Guiot, 2001; Christopher et al., 2011). آنتراسن یکی از هیدروکربن‌های موجود در محیط‌زیست و یکی از ۱٦ ترکیب آروماتیک گزارش‌شده

*نویسنده مسئول

به وسیله آژانس حفاظت از محیط‌زیست آمریکا می‌باشد (Arun et al., 2011) که به‌علت داشتن خواص مشابه با سایر هیدروکربن‌های آروماتیک وجود آن در محیط‌های خشکی و آبی یک نگرانی محسوب می‌شود (Johnsen et al., 2005).

برای پاک‌سازی اکوسیستم‌های آبی از مواد نفتی روش‌های زیادی وجود دارد که در این میان استفاده از روش‌های زیستی به دلایلی از قبیل هزینه کم و سازگاری بیشتر با محیط‌زیست بیش از سایر روش‌ها مورد توجه هستند (Juhaszet et al., 2000; Kosaric, 2001; Anisuddin et al., 2005). طیف وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها می‌توانند هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کنند، اما در این بین باکتری‌های تجزیه‌کننده از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و قادر به تجزیه طیف وسیع تری از ترکیبات نفتی می‌باشند (Subarna et al., 2002). در محیط‌های دریایی، باکتری‌ها با طیفی وسیع غالب‌ترین تجزیه‌کننده‌های هیدروکربن‌ها می‌باشند و حتی در سرمای شدید قطب شمال و جنوب نیز کارایی دارند (Bognolo, 1999).

بندر امام خمینی بزرگترین بندر ایران در شمال غرب خلیج فارس واقع شده، تردد فراوان کشتی‌ها و آلودگی ناشی از سوخت آن‌ها در این بندر و وجود صنایع مختلف از جمله صنایع پتروشیمی، صنایع آلومینیوم و همچنین ورود فاضلاب‌های شهری موجب تخلیه پساب‌های آلوده به آلاینده‌های آلی از جمله هیدروکربن‌های نفتی به این بندر می‌شود. از آنجایی که آلودگی این منطقه به ترکیبات نفتی اثرات سویی را بر سلامت آبزیان و انسان بر جا می‌گذارد حذف بیولوژیکی می‌تواندبه‌عنوان یکی از روش‌های مناسب جهت کاهش این آلاینده‌ها از محیط مورد استفاده قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

نمونه برداری توسط گرب از سه ایستگاه آلوده به ترکیبات نفتی در شمال غرب خلیج فارس از رسوبات سطحی با سه تکرار صورت‌گرفت. نمونه‌های رسوب در محفظه یخ قرار گرفته و در شیشه‌های استریل درب‌دار بلافاصله به آزمایشگاه منتقل‌شدند. جهت جداسازی باکتری‌های سازگار با آنتراسن عملیات غنی سازی به منظور افزایش جمعیت این باکتری‌ها طبق روش زیر انجام گرفت. ابتدا محیط کشت پایه معدنی مایع MSM (محیطی حاوی املاح معدنی، عناصر کمیاب و آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن) در تعدادی ارلن تهیه و pH آن‌ها روی۷±۰/۵ تنظیم شد. جهت استریل‌کردن محیط کشت، ارلن ها به مدت ۲۰دقیقه در دمای۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو گردیدند. سپس، مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از مایعروییبا رقت ۰/۱ آماده شده در مرحله رقیق سازی به ارلن‌ها اضافه گردید (Nnamchi et al., 2006; Mukred et al., 2008). ترکیبات به‌کار رفته در محیط کشت پایه معدنی در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱. ترکیبات محیط‌کشت پایهٔ معدنی

مقدار	ترکیبات
۵ گرم	NH_4Cl
۲/۵ گرم	$K_2HPO_4,3H_2O$
۱ گرم	$MgSO_4,7H_2O$
۰/۰۵ گرم	$FeSO_4.7H_2O$
۰/۰۵ گرم	$CaCl_2.2H_2O$
۱۰۰ میکرولیتر	عناصر میکرو
۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر
۳۰ میلی گرم بر لیتر	آنتراسن

جدول ۲. ترکیبات عناصر میکرو

مقدار	ترکیبات
۱/۰۹ گرم	$COCl_2$
۱ گرم	$NiCl_2.\ 6H_2O$
۰/۷۷ گرم	$MnSO_4$
۰/۷ گرم	$ZnCl_2$
۰/۵ گرم	$NaMOO_4.\ 2\ H_2O$
۰/۱۶ گرم	$CuCl_2$
۰/۰۹ گرم	Se
۱۰ میلی لیتر	HCl

محیط‌ها به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، با دور ۱۵۰ rpm نگهداری شدند. با مشاهده کدورت، ۱۰ میلی‌لیتر از هر محیط کشت به محیط MSM جدید انتقال داده شد و تا سه هفته عمل تجدید کشت با شرایط فوق تکرار گردید (AL-Thani et al., 2009).یک میلی لیتر از محیط کشت مایع حاصل از آخرین مرحله غنی‌سازی روی تعدادی پتریدیش حاوی محیط کشت جامد MSMبه روش پورپلیت کشت داده و محیط‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گرادانکوبه گردیدند.باکتری‌هایی که قادر به استفاده ازآنتراسن به عنوان تنها منبع کربن بودند، به صورت کلنی‌هایی با اشکال متفاوت مشاهده شدند (Coral and Karagoz, 2005).

برای خالص سازی باکتری‌ها،کلنی‌هایی که از نظر ظاهری متفاوت بودند به‌طور متوالی روی محیط کشت جامد MSMحاوی آنتراسن به روش خطی، کشت داده و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، انکوبه شدند.این کار تا مشاهده کلنی‌های خالص هر باکتری در هر پلیت، تکرار شد (Nnamchi et al., 2006). بدین منظور سنجش رشد باکتری‌ها سوسپانسیون هر باکتری تهیه شد و به مقدار مساوی به ۱۰۰ میلی لیتر محیط MSM وارد شد. رشد باکتری ها به مدت ۱۲ روز در غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن در محیط مایع MSM توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در فواصل زمانی ٢٤ ساعته در طول موج ٦٠٠ نانومتر اندازه گیری شد (Nnamchi et al., 2006). گونه‌های باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از واکنش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و آزمون‌های رشد (اکسیداز، کاتالاز و حرکت باکتری ...) شناسایی شدند. تست‌های استاندارد از قبیل رنگ آمیزی‌گرم، شکل ظاهری و رنگ کلنی‌ها به شناسایی آن‌ها کمک‌کرد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مربوط به هر باکتری به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM حاوی آنتراسن تلقیح‌گردید. محیط‌ها به‌مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰rpm بر روی انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. در فواصل زمانی معین ۵ میلی لیتر از هر محیط کشت در لوله‌های شیشه‌ای ریخته شد. استخراج آنتراسن توسط هگزان انجام گرفت. پس از تبخیر هگزان ۵ میلی لیتر استونیتریل به نمونه‌ها افزوده شد و توسط دستگاه HPLC آنالیز گردید (Coral and Karagoz, 2005).

تجزیه و تحلیل آماری با توجه به تحلیل داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزارSPSSصورت گرفت و از آنالیز واریانس یکطرفه (One way ANOVA) برای بررسی اختلاف معنی‌داری بین غلظت آنتراسن در محیط کشت‌های حاوی باکتری و بدون باکتری استفاده گردید.

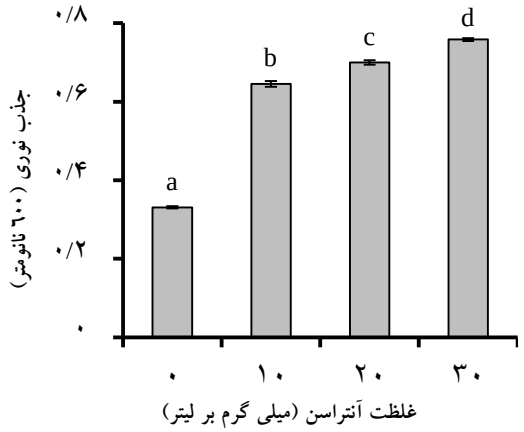
٤- نتایج

دو گونه باکتریایی بومی بندر امام خمینی قادر به تجزیه آنتراسن با استفاده از نتایج به دست آمده از تست‌های بیوشیمیایی در نهایت عنوان Psedomonasstutzeri و Alcaligenesdenitrificans شناسایی شدند.

جدول ۳. مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ۲ گونه باکتری

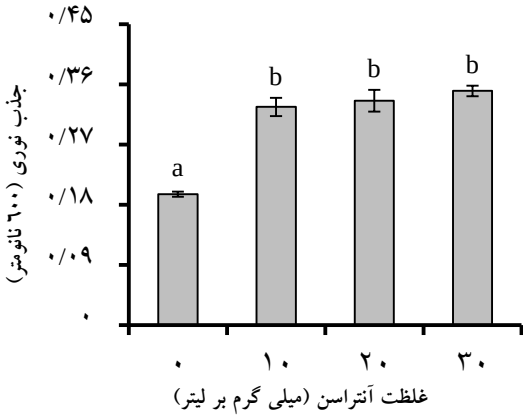
رنگ آمیزی گرم	–	–
سلول	میله‌ای	میله‌ای
اکسیداز	+	+
تولید اندول	–	–
اوره	–	+
کاتالاز	+	+
د-کربوکسیلاز	–	+
فنیل آلانین	–	–
سیمون سیترات	+	+
تخمیر لاکتوز	–	+
رشد بر محیط مکانیکی	+	–
KOH	+	+
MR	+	+
VP	-	+
SIM	+	-
TSI	+	+-
تشخیص باکتری	Psedomonasstutzeri	Alcaligenesdenitrificans

میانگین بالاترین میزان رشد باکتری P.stutzeri در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن در مقایسه با نمونه فاقد آنتراسن دارای اختلاف معنی‌داری در سطح P<۰/۰۵ بود. نتایج نشان داد که این باکتری توانایی استفاده از آنتراسن در هر سه غلظت را دارا بود اما در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر جذب نوری بیشتری را از خود نشان داد (شکل ۱).



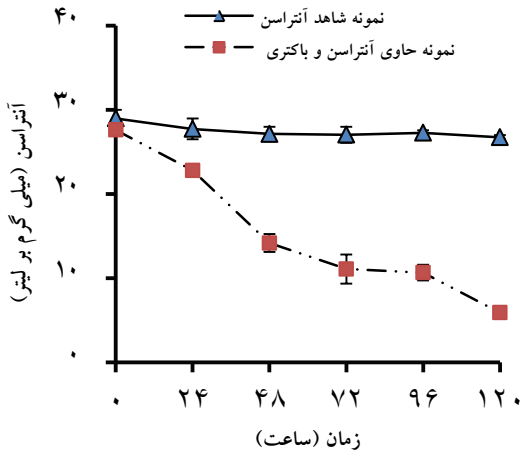
شکل ۱. مقایسه رشد باکتری P. stutzeri در غلظت‌های متفاوت آنتراسن

با توجه به شکل ۲، مقایسه میانگین حداکثر رشد باکتری A.denitrificans در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن نشان داد که با افزایش غلظت هیدروکربن در محیط رشد باکتری افزایش می‌یابد. در حالی که تفاوت معنی-داری بین بالاترین رشد باکتری در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده نشد (P>۰/۰۵). ولی میان میانگین رشد باکتری در سه غلظت و نمونه بدون آنتراسن اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵).



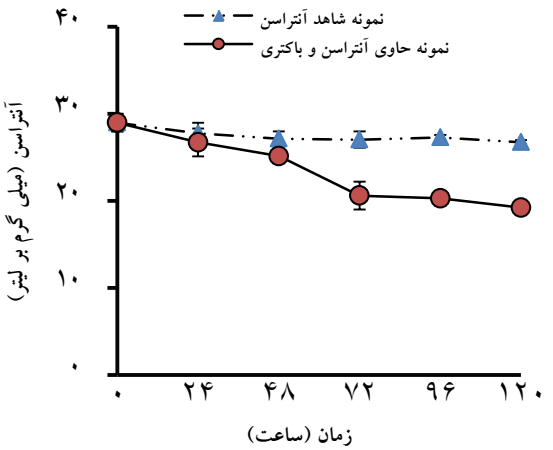
شکل ۲. مقایسه رشد باکتری A. denitrificans در غلظت‌های متفاوت آنتراسن

بر اساس شکل ۳ میزان تجزیه آنتراسن توسط باکتری P. *stutzeri* در ۲۴ ساعت ابتدایی، کم بود اما در فاصله روزهای دوم تا سوم، کاهش سریعی در غلظت آنتراسن از ۲۲/۸۲±۰/۲۵۰ به ۱۴/۱۸±۱/۵۱ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد. میزان آنتراسن در محیط کشت حاوی باکتری مذکور پس از ۱۲۰ ساعت از انکوبه همچنان کاهش یافت و به ۵/۹۱۱±۰/۴۵۸ رسید.



شکل ۳. تغییرات غلظت آنتراسن موجود در محیط کشت توسط باکتری P. stutzeri

تجزیه‌زیستی باکتری A.denitrificans در شکل ٤ نشان داده شده است. در کل کاهش قابل توجهی در میزان آنتراسن مشاهده نگردید. مقدار تجزیه هیدروکربن از محیط MSM نهایتاً پس از ۱۲۰ ساعت به ۱۹/۲۲±۰/۳۵۳ میلی‌گرم بر لیتر رسید.



شکل ٤. تغییرات آنتراسن موجود در محیط کشت توسط باکتری A.denitrificans

۵- بحث

باکتری‌ها یکی از بیشترین گونه‌هایی هستند که به‌طور گسترده‌ای در تمامی اکوسیستم‌های دریایی، آب شیرین (Salleh et al., 2002; Zahed et al, 2012) و رسوبات آلوده به هیدروکربن‌های نفتی مربوط به تانک‌های ذخیره نفت و ریزش‌های نفتی یافت می‌شوند (Kebria et al., 2009). طی مطالعات بسیار برخی از این گونه‌ها قادر به تجزیه ترکیبات نفتی هستند و با قابلیت تجزیه‌کنندگی بالا به دلیل کفایت لازم جهت حذف آلاینده‌های آلی می‌توانند راه حل مناسبی جهت پالایش محیط‌های آلوده باشند (Pandey and Jain, 2002; Khalid et al., 2004; Das et al., 2008).

در این مطالعه دو گونه باکتریایی P.stutzeri و A.denitrificans با قابلیت تجزیه آنتراسن از رسوبات بندرامام خمینی جداسازی و شناسایی شدند. همچنین Taoufik و همکاران (۲۰۰٤) باکتری Pseudomonas را از رودخانه‌ای آلوده به ترکیبات هیدروکربنی در مراکش، جداسازی و خالص سازی کردند. جنس Alcaligenes با قابلیت استفاده از ترکیبات هیدروکربنی از رسوبات آلوده به نفتی جداسازی و خالص سازی شدند (Ilori and Amund, 2000; Pandey and Jain, 2002). پژوهش حاضر نشان داد که از بین دو باکتری جداشده باکتری P. stutzeri در هر سه غلظت از رشد بهتری در محیط حاوی آنتراسن برخوردار بود. این یافته مؤید آن است که باکتری مذکور با حضور آنتراسن به عنوان منبع کربن سازگاری بهتری دارد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش باکتری P. stutzeri توانست ۸۰/۲۹۵ آنتراسن را تجزیه کند که می‌تواند به دلیل وجود پلاسمیدهای متعدد قادر به تولید آنزیم‌های گوناگون این گونه باشد که در نتیجه، فعالیت متابولیکی این دسته از باکتری‌ها بیشتر از سایر باکتری‌ها است و با سرعت بیشتری هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه می‌کنند (Banat et al, 2000; Johnsen and Karlson, 2004; Kolomytsevaa et al, 2009; Nayak et al, 2009; Zhenyong and Jonathan, 2009). Coelho و همکاران (۲۰۱۰) پتانسیل تجزیه‌زیستی را توسط جمعیت‌های باکتریایی حاضر در رسوبات مصبی در پرتقال مورد مطالعه قرار دادند.گونه‌های Pseudomonas و Klebsiella در محیط حاوی نفتالن غنی سازی گردید. به ترتیب ۳٤/۵ و ۳۱ درصد از هیدروکربن مذکور توسط دو باکتری تجزیه شدند. مطالعات نشان دادند که می توان از جنس Pseudomonas به عنوان مقاوم به آنتراسن جهت کاهش آلودگی‌های هیدروکربنی بهره برد (Al-Thani et al.,2009; Kumar et al., 2010). بررسی تجزیه آنتراسن توسط باکتری A. denitrificans نیز نشان داد که آنتراسن در محیط کشت قادر بود ۳۵/۹۳۳ درصد از این هیدروکربن را تجزیه نماید. در این راستا Walter و همکاران (۱۹۹۰) ثابت کردند که باکتری A. denitrificans که توسط روش‌های غنی سازی از خاک‌های آلوده به نفت جداسازی شده قادر بود هر روز ۰/۳ میلی‌لیتر فلورانتن را به عنوان تنها منبع کربنی مورد استفاده قرار دهد. Ilori و Amund (۲۰۰۰) باکتری‌های متعلق به جنس‌های مختلف از جمله جنس Alcaligenes با توانایی تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی پایین را از رسوبات دریایی و آب آلوده تایید کردند.Abd-Elsalam و همکاران (۲۰۰۹) باکتری‌هایی‌را از سایت‌های آلوده به مواد نفتی جداسازی کردند.

٤ سویه Escherichiacoli (EF105548)، bacterium Soil (EF105546) (EF105549)، Alcaligenessp. و Thiobactersubterraneus (EF105547) بیشترین توانایی در تجزیه آنتراسن و فنانترن را داشتند. میانگین درصد تجزیه آنتراسن در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به وسیله این گونه‌ها به ترتیب۲۸/۵۷، ۳۰/۱۹، ۲٦/۵۸ و ۳۱/۱۱ درصد گزارش شد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان که باکتری A. denitrificans، دارای نتیجه بهتر از گونه‌های مشابه به دست آمده در تحقیق ذکر شده می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش

جنس Pseudomonas بیشترین مقدار رشد و تجزیه آنتراسن را نشان داد که می‌تواند به دلیل وجود پلاسمیدهای متعدد قادر به تولید آنزیم‌های گوناگون این‌گونه باشد که در نتیجه، فعالیت متابولیکی این دسته از باکتری‌ها بیشتر از سایر باکتری‌ها است و با سرعت بیشتری هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه می‌کنند. بنابراین شناسایی باکتری‌های بومی به منظور استفاده و بهبود بخشیدن جمعیت میکروبی مناطق آلوده به هیدروکربن و امکان پاک‌سازی زیستی توسط این باکتری‌ها کمک می‌کند.

٦- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله لازم می‌دانیم از اداره کل بنادر و دریانوردی استان خوزستان واقع در بندر امام خمینی (ره) به دلیل همکاری صمیمانه آن‌ها تشکر و قدردانی نماییم.

٧- پی‌نوشت‌ها

1. Mutagenic
2. U.S.EPA
3. Mineral salt medium

٨- مراجع

-Abd-Elsalam, H.E., E.E. Hafez, A.A. Hussain, G.A. Amany and A.A. El-Hanafy., (2009) “Isolation and Identification of Three Rings Polyaromatic Hydrocarbons (Anthracene and Phenanthrene) Degrading Bacteria”, American-Eurasian Journal of Agricuttre and Environmental Science. 5(1): 31-38.

- Al-Thani, R.F., D.A.M. Abd-El-Haleem and M. Al-Shammri.,(2009) “Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils”, African Journal of Microbiology Research. 3(11): 761-766.

-Anisuddin, S., N. Alhashar and S. Tahseen., (2005) “Prevention of oil spill pollution in seawater using locally available materials”, Arabian Journal for Science Engineering. 30(2): 143-152.

-Arun, k., M. Ashok and S. Rajesh., (2011) “Crude oil PAH constitution degradation pathway and associated bioremediation microflora”, International Journal of Enviromental Science and Technology. 1(7): 1420-1439.

-Banat, I.M., R.S. Makkar and S.S. Cameotra., (2000) “Potential commercial applications of microbial surfactants”, Applied Microbiology and Biotechnology. 53: 495-508.

- Bognolo, G., (1999) “Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects”, Polish Journal of Environmental Studies. 152: 41-52.

- Christopher, W.M.L., H.B. Richard, E.G. Sharyn and L.J. Albert.,(2011) “Isolation and identification pyrene mineralization Mycobacterium spp. from contaminated and uncontaminated sources”, Applied and Environmental soil science. 2011:1-11.

- Coelho, F.J.R.C., S. Sousa, L. Santos, A.L. Santos, A. Almeida, N.C.M. Gomes and A. Cunha., (2010) “PAH Degrading Bacteria in an Estuarine System. 2Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Biological Responses to Contaminants”, pp. 77-87.

- Coral, G., S. Karagoz., (2005) “Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from a petroleum refinery.soil. Annals of Microbiology”, 55(4): 255-259.

- Das,P., S. Mukherjee and R. Sen., (2008) “Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. Chemosphere”, 72: 1229-1234.

- Ilori, M. O. N. and D.I.Amund, (2000) “Degradation of Anthracene by Bacteria Isolated from OilPolluted Tropical Soils. Zeitschrift fur Naturforschung”, 55c: 890-897.

- Johnsen, A.R. and U. Karlson.,(2004) “Evaluation of bacterial strategies topromote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons”, Applied Microbiology and Biotechnology. 63: 452-459.

- Johnsen, A.R., L.Y. Wick and L. Harms, (2005) “Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution”, 133: 71-84.

- Juhaszet, A.L., G.A. Stanley and M.L. Britz., (2000) “Degradation of High Molecular Weight PAHS in Contamination Soil by a Bacterial Consortium: Effects on Microtox and Mutagenicity Bioassays”, Bioremediation Journal. 4(4): 271-283.

- Kebria, D.Y., A. Khodadadi, H. Ganjidoust, A. Badkoubi and M.A. Amoozegar, (2009) “Isolation and characterization of a novel native Bacillus strain capable of degrading diesel fuel”,

-Pandey, G.and R. K. Jain, (2002) “Bacterial Chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation”, Applied and Environmental Microbiology. 68(12): 5789-5795.

- Salleh, A.B., F.M. Ghazali, R.N.Z. Abdrahman and M. Basri, (2002) “Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution”, Indian Journal of Biotechnology. 2: 411-425.

- Subarna, R., H. Dipak, B. Debabrata, B. Dipa and K. Ranajit, (2002) "Survey of petroleum degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve",World Journal Microbial Biotechnology. 18: 575-581.

-Taoufik, J., Y. Zeroual, A. Moutaouakkil, S. Moussaid, F.Z. Dzairi, M., Talbi, A. Hammoumi, K. Belghmi, K. Lee, M. Loutfi and M. Blaghen, (2004) “Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (Pseudomonas sp., Staphylococcus sp.) in fluidized bed bioreactor”, Annals of Microbiology. 54 (2): 189-200.

- Walter, D.W., M. Beyer and J. Klein., (1990) “Degradation of phenanthrene, fluorine and fluoranthene by pure bacterial cultures”, Applied Microbiology and Biotechnology. 32: 479-484.

- Yerushalmi, L. and S.R. Guiot., (2001) “Biodegradation of Benzene in a Laboratory-Scale BiobarrieratLowDissolvedOxygen Concentrations” Bioremediation Journal. 5(1): 63-77.

- Zahed, M.A, H.A. Aziz, M.H. Isa and L. Mohajeri (2012) “Response Surface Analysis to Improve Dispersed Crude Oil Biodegradation”, Clean Soil Air Water. 40(3): 262-267.

- Zhenyon Z. and W.Jonathan, (2009) “Biosurfactants from Acinetobactorcalcoaceticus BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene”, Environmental Technology. 30 (3): 291-299.

International Journal of Environmental Science and Technology. 6(3): 435-442.

- Khalid, M., Z. Tianling, H. Huasheng, Y. Zhiming, Y. Jianjun and H. Zhong, (2004) “Preliminary study on PAH degradation by bacteria from contaminated sediments in Xiamen Western Sea, Fujian, China”, Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 22(4): 431-435.

- Kolomytsevaa, M., D. Randazzob, B.P. Baskunova, A. Scozzafavab, F. Brigantib and L.A. Golovlevaa, (2009) “Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by Rhodococcusrhodochrous VKM B-2469”, Bioresource Technology. 100 (2): 839-844.

- Kosaric, N., (2001) “Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation”, Food Technology Biotechnolology. 39 (4): 295-304.

- Kumar, G , R. Singla and R. Kumar, (2010) “Plasmid Associated Anthracene Degradation by Pseudomonas sp”, Isolated from Filling Station Site. Nature and Science. 8(4): 89-94.

- Mukred, A. M., A. A. Hamid, A. Hamzah and W.M.W. Yusoff, (2008) “Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water”, On Line Journal Biological Science. 8(4): 73-79.

- Nayak, A.S., M.H. Vijaykumar and T.B. Karegoudar, (2009) “Characterization of biosurfactant produced by Pseudomonas sp. PNK-04 and its application in bioremediation”, International Biodeterioration and Biodegradation. 63: 73–79.

-Nnamchi, C.I., J.A.N. Obeta and L.I. Ezeogu, (2006) “Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria”, International Journal of Environmental Science and Technology.2(3): 181-190.