علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره دو، اردیبهشت ماه ۹۹

زیست‌پالایی باکتریایی آلودگی های نفتی خاک سطحی محوطه پالایشگاه تبریز

رضوان آقامحمدی[۱]

کمال سیاه چشم[*۲]

kl_siahcheshm@tabrizu.ac.ir

غلامرضا زرینی[۳]

علی کدخدائی[٤]

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۹ **تاریخ پذیرش:۹۶/۱۱/۲۵**

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از باکتری‌ها برای پاک سازی آلودگی‌های نفتی از آب و خاک مورد توجه دانشمندان قرارگرفته است. زیرا این روش نسبت به روش‌های دیگر از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده و باعث ایجاد ترکیبات سمی در محیط نمی‌شود.

روش بررسی: در تحقیق حاضر نتایج فرایند زیست پالایی جهت شناسایی بهینه‌ترین جدایه های باکتریایی تجزیه کننده مواد نفتی در شرایط فیزیکو شیمیایی و بافتی خاک آلوده پالایشگاه تبریز ارایه شده است. برای ارزیابی نرخ حذف هیدروکربن‌ها از روش آنالیزی کروماتوگرافی گازی با آشکارساز گرمایونی (Gc-FID) استفاده شد.

یافته ها: در این مطالعه ۷ جدایه ی باکتریایی مختلف از خاک جداسازی شد و جدایه ای از *سودوموناس* با بیش ترین بازدهی معرفی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: باکتری *سودوموناس* میزان هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک را بعد از ۳۰ روز به میزان ۶۵/۲۵ درصد کاهش داد در حالی که جدایه ای از *اسینتوباکتر* توانست مجموع هیدروکربن‌های نفتی را به میزان ۴۲/۳۹ درصد کاهش دهد. باتوجه به نتایج این پژوهش، روش زیست پالایی باکتریایی برای پاک سازی هیدروکربن‌های نفتی در خاک های آلوده به دلیل سادگی اجرا، سازگاری با محیط زیست، مطمئن، ایمن و کم هزینه بودن برای انجام تحقیقات مشابه در سایر پالایشگاه‌های نفتی کشور نیز پیشنهاد می‌شود.

واژه های کلیدی: آلودگی نفتی، پالایشگاه تبریز، خاک، زیست پالایی باکتریایی.

۱- کارشناس ارشد زمین شناسی زیست محیطی، گروه علوم زمین، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- دانشیار زمین شناسی اقتصادی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. [*](مسوول مکاتبات)

۳- دانشیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۴- دانشیار زمین شناسی نفت، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

J. Env. Sci. Tech., Vol 22, No.2, April, 2020

Bacterial Bioremediation of Surficial Oil- Contaminated Soil in Tabriz Refinery Campus

Rezvan Aghamohammadi[1]
Kamal Siahcheshm[2]*
kl_siahcheshm@tabrizu.ac.ir
Gholamreza Zarrini[3]
Ali Kadkhodaie[45]

Admission Date:February 14, 2018 Date Received: August 10, 2017

Abstract

Background and Objective: Nowadays, the use of bacteria to clean oil pollution from water and soil has been considered by scientists and this method is more economical than other methods and does not cause toxic compounds in the environment.

Method: In the present study, the results of the bioremediation process have been presented to identify the most optimal bacterial isolates of petroleum degraders in physicochemical and textural conditions of contaminated soil of Tabriz refinery. Gas chromatographic analysis with thermal detection (Gc-FID) was used to evaluate the removal rate of hydrocarbons.

Findings: The 7 isolates of bacteria were purified in this study. A *Pseudomonas* isolate was introduced as a strain with the highest efficiency.

Discussion and Conclusion: After 30 days, as a result of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* performance, the amount of TPH in contaminated soil samples was decreased in rate of 65.25 and 42.39 percent, respectively. Based on this investigation, the Bacterial Bioremediation method to clean up contaminated soils by petroleum hydrocarbons due to simplicity of implementation, environmentally friendly, safety and low cost is highly proposed to conduct in other oil refineries in Iran.

Keywords: Oil pollution, Tabriz refinery, Soil, Bacterial Bioremediation.

1- M.Sc., Environmental Geology, Earth Sciences Dept., Natural Sciences Faculty, University of Tabriz.
2-Associate Professor, Economic Geology, Earth Sciences Dept., Natural Sciences Faculty, University of Tabriz.
*(Corresponding Author)
3- Associate Professor, Microbiology, Natural Sciences Faculty, University of Tabriz.
4- Associate Professor, Petroleum Geology, Natural Sciences Faculty, University of Tabriz.

مقدمه

امروزه نفت خام به عنوان یکی ازمنابع اصلی انرژی می‌باشد و از آنجایی که جایگزین مناسبی برای آن‌ها یافت نشده گرایش به استفاده از آن‌ها در آینده احساس می‌شود. آلودگی با هیدروکربن‌های نفتی ناشی از منابع صنعتی مانند پالایشگاه‌های نفت، کشتی‌سازی و یا ناشی از فرایندهای تصادفی مانند نشت از تانکرها و یا نشت از مخازن ذخیره‌سازی در آب و خاک، خطر قابل توجهی در اکوسیستم‌های دریایی و زمینی ایجاد کرده است (۱). ورود این ترکیبات به طبیعت، به سبب سمی بودن، ایجاد جهش و سرطان‌زایی برای موجودات زنده و همچنین پایداری زیاد و انباشته شدن تدریجی آن‌ها در خاک باعث اختلال در عملکرد طبیعی خاک از جمله کاهش عملکرد محصولات کشاورزی و تغییر در ویژگی‌های خاک می‌گردد (۲، ۳). روش‌های مختلفی برای حذف این آلودگی‌ها از محیط زیست وجود دارد اما این روش‌ها اغلب قادر به حذف کامل آلاینده‌ها نیستند. زیست پالایی به عنوان یک روش موثر برای پاک سازی آلودگی‌های نفتی در محیط‌های مختلف به اثبات رسیده است (۴، ۵). تجزیه میکروبی هیدروکربن‌ها باتوجه به غیر سرطان‌زا و غیرقابل‌احتراق بودن و همچنین، گستردگی و سازگاری آن با محیط‌زیست، در مقایسه با دیگر روش‌های مرسوم، مورد توجه قرار گرفته است (۶). دو روش اصلی برای زیست پالایی، تحریک زیستی[1] و تقویت زیستی[2] است. تحریک زیستی شامل اضافه کردن ترکیبات معدنی (عمدتا نیتروژن و فسفات) و کودهای آلی و تحریک رشد باکتری های تجزیه کننده نفت به منظور افزایش سرعت زیست پالایی می‌باشد (۷، ۸). ولی تقویت زیستی به اضافه کردن باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت به منظور افزایش جمعیت میکروبی گفته می‌شود. این رویکرد موفقیت قابل توجهی را در زیست‌پالایی محل‌های مختلف آلوده نشان داده است. هر چند در برخی موارد، باکتری‌های جدا شده از سایر محل‌های آلوده قادر به زندگی در محیط جدید نیستند (۷، ۹). در مطالعه کوالهو و همکاران (۱۰) پتانسیل تجزیه‌زیستی توسط جمعیت باکتریایی مورد بررسی قرار گرفته و گونه سودوموناس[3] کاهش ۳۴/۵ درصدی نفتالن را از خود نشان داد. باتوجه به نتایج پژوهش شاه علیان و همکاران (۱۱)، باکتری *P. stutzeri* توانست ۸۰/۲۹ درصد آنتراسن موجود را تجزیه کند، که می‌تواند به دلیل وجود پلاسمیدهای متعدد در این گونه از باکتری باشد که قادر به تولید آنزیم‌های گوناگون بوده است. در نتیجه، فعالیت متابولیکی این دسته از باکتری‌ها بیش تر از سایر باکتری‌ها بوده و با سرعت بیش تری هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه می‌کنند (۱۲). برای انجام عملیات پاک سازی باید ویژگی‌های خاک منطقه مورد مطالعه مورد بررسی قرار گیرد. تحقیق حاضر با هدف جداسازی مناسب‌ترین باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده‌نفت از خاک پالایشگاه تبریز به منظور کاهش یا حذف آلاینده های هیدروکربنی صورت گرفته است.

روش بررسی

نمونه برداری

جهت دراختیار داشتن ترکیب میانگین از خاک آلوده به نفت خام و خاک غیر آلوده در محوطه پالایشگاه تبریز، اقدام به نمونه برداری ۵ نقطه از خاک آلوده و ۵ نقطه از خاک غیرآلوده سطحی (۱۰ سانتی متری از سطح خاک) شد. نمونه‌ها داخل کیسه های نایلونی بسته بندی و به منظور جداسازی باکتری های خاک آلوده و مقایسه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی از جمله رطوبت، بافت، pH وEC خاک ها به آزمایشگاه منتقل گردیدند. آزمایش دانه بندی مطابق با استاندارد ASTM D422 انجام گرفت. برای تعیینpH و EC خاک منطقه از روش استاندارد ASTM D4972 استفاده شد و همچنین برای تعیین رطوبت خاک از روش استاندارد ASTM D2216استفاده شد.

جداسازی باکتری

جهت جداسازی باکتری‌های سازگار با نفت خام عملیات غنی‌سازی به منظور افزایش جمعیت این باکتری‌ها طبق روش

1- Biostimulation
2- Bioaugmentation
3- Pseudomonas sp.

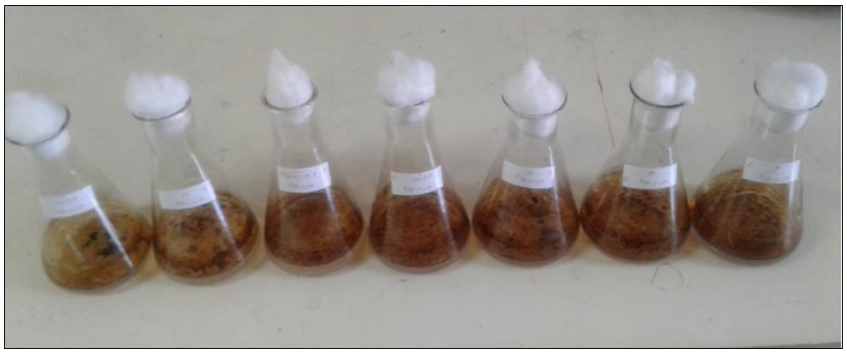
زیر انجام گرفت. ابتدا محیط کشت معدنی مایع مطابق با جدول ۱ در تعدادی ارلن آماده شد و pH محیط‌ها روی ۷ تنظیم گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C در اتوکلاو به منظور استریل کردن محیط کشت قرار داده شد. سپس ۲ گرم از نمونه خاک غیر آلوده به همراه ۱درصد نفت خام به ارلن ها اضافه شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ °C با دور rpm ۱۸۰ قرار داده شد. بعد از ده روز گرماگذاری، از مایع رویی ارلن‌ها در محیط جامد (محیط معدنی مایع، آگار و ۰/۵درصد نفت) کشت داده شد و به مدت ۲ روز داخل انکوباتور با دمای ۳۰°C قرار داده شد. باکتری‌هایی که قادر به استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن بودند به صورت کلنی‌هایی با اشکال مختلف دیده شدند.

جدول۱- ترکیبات محیط کشت معدنی مایع

Table 1. The composition of liquid mineral medium

ترکیب	مقدار (gL^{-1})	ترکیب	مقدار (gL^{-1})
$FeSO_4.7H_2O$	۰/۰۵	KH_2PO_4	۱
$CaCl_2$	۰/۰۲	NH_4NO_3	۱
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۰۵	K_2HPO_4	۱

برای خالص‌سازی باکتری‌ها کشت خطی روی محیط کشت جامد حاوی نفت و آگار صورت گرفت و پلیت‌ها در دمای ۳۰°C به مدت ۲ روز گرماگذاری شد. با مقایسه ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌های ظاهر شده روی محیط، باکتری‌های مختلف خالص‌سازی شدند. به منظور مقایسه توانایی باکتری‌ها در تجزیه‌ی ترکیبات نفتی، محیط کشت معدنی مایع به همراه ۱ درصد نفت، همانند روشی که در قبل گفته شد، در ارلن ها تهیه گردید و به هرکدام از ارلن‌ها یک نوع از باکتری‌ها اضافه گردید و در دمای ۳۰°C و دور rpm ۱۸۰ به مدت ۱۰روز در انکوباتور شیکردار قرار داده شد (شکل۱).



شکل ۱- کشت باکتری‌ها در محیط پایه معدنی

Figure 1. Bacterial culture in mineral base medium

جهت سنجش میزان کل هیدروکربن (TPH[1]) از روش آنالیزی کروماتوگرافی گازی با آشکار ساز یونی- شعله ای (GC-FID[2]) استفاده گردید. هرروز روند حذف نفت در ارلن‌ها با هم مقایسه گردید و در پایان ۱۰روز نهایتاً دو نوع باکتری که قابلیت بیش تری در استفاده و کاهش هیدروکربن های نفتی را داشتند انتخاب گردیدند.

شناسایی باکتری‌ها

1- Total Petroleum Hydrocarbons
2- Gas Chromatography with Flame Ionization Detector

با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی هم چون رنگ‌آمیزی، تست KOH، مقایسه شکل ظاهری کلنی‌ها و شکل میکروسکوپی شناسایی اولیه باکتری‌ها صورت گرفت و در ادامه شناسایی مولکولی به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز از ژن 16S rRNA توسط پرایمرهای 27F و RP2 انجام شد. مخلوط واکنشی PCR و برنامه دمایی استفاده شده جهت تکثیرDNA به ترتیب در جداول ۲ و ۳ ارایه شده است.

جدول۲- مخلوط واکنشی PCR

Table 2. Reaction mixture of PCR

مواد	حجم (µl)
PCR Buffer (10X)	۲/۵
$MgCl_2$ (50mM)	۰/۷۵
dNTP (10mM)	۰/۵
Forward Primer (10µl)	۱
Reverse Primer (10µl)	۱
ddH_2O	۱۴
Taq Pol.	۰/۲۵
Template DNA	۵
حجم نهایی	۲۵

جدول۳- برنامه دمایی استفاده شده جهت تکثیرDNA

Table 3. Temperature program used to reproduce of DNA

	واسرشت اولیه[1]	واسرشت[2]	اتصال پرایمر[3]	گسترش[4]	گسترش نهایی[5]
دما	۹۴°C	۹۴°C	۶۱°C	۷۲°C	۷۲°C
زمان	۳ دقیقه	۳۰ ثانیه	۳۰ثانیه	۲ دقیقه	۵ دقیقه
چرخه	۱		۳۵		۱

1- Primary Denaturation
2- Denaturation
3- Annealing
4- Extension
5- Final Extension

محصول حاصل از PCR[1] در ژل آگارز ۱/۵درصد بارگذاری شد که نتایج آن در ژل آگارز با ایجاد باند حدود bp ۱۵۰۰ تایید گردید. تعیین شباهت توالی‌های بدست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم افزار Blast مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی رشد باکتری‌ها در محیط خاک

در این آزمایش به منظور مقایسه‌ی توانایی رشد باکتری‌های مختلف در خاک آلوده به نفت از باکتری‌های مختلف استفاده شد. بدین منظور چهار بشر تهیه گردید داخل هرکدام از آن‌ها ۲۰۰ گرم نمونه خاک ریخته شد و بشرها در اتوکلاو استریل گردیدند، به هر نمونه خاک ۴ میلی لیتر نفت خام اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد باکتری‌های مورد نظر با ویژگی OD^{2}_{600}= ۲ به نمونه‌ها اضافه شد. به بشر اول باکتری TP1، بشر دوم باکتری TP2 و به بشر سوم هردو نوع باکتری تلقیح گردید و بشر چهارم نیز به عنوان نمونه شاهد و فاقد باکتری در نظرگرفته شد. این بشرها به مدت ۳۰روز داخل انکوباتور در دمای ۳۰°C نگهداری شدند. در پایان با روش آنالیزی GC-FID درصد کاهش TPH در نمونه‌های خاک مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

جهت ارزیابی بافت، رطوبت، میزان اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک از آزمایشات دانه بندی مکانیکی، کاهش وزن نمونه در آون، pH متر و EC متر موجود در آزمایشگاه‌های مکانیک خاک و آبشناسی دانشگاه تبریز استفاده گردید. نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده برای اندازه‌گیری مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی خاک منطقه در جدول ۴ مشاهده می‌شود. همان طور که از شکل۲ می‌توان استنباط کرد خاک منطقه مورد مطالعه از نوع ماسه با کمی گراول و طبق طبقه بندی یونیفاید از نوع SP-SM تعیین گردید. بیشتر ذرات تشکیل دهنده آن در حد ماسه بوده و ۹۱/۸۴ درصد از اجزای خاک را به خود اختصاص داده است.

1- Polymerase chain reaction
2- Optical density

جدول۴- خصوصیات خاک غیرآلوده به نفت

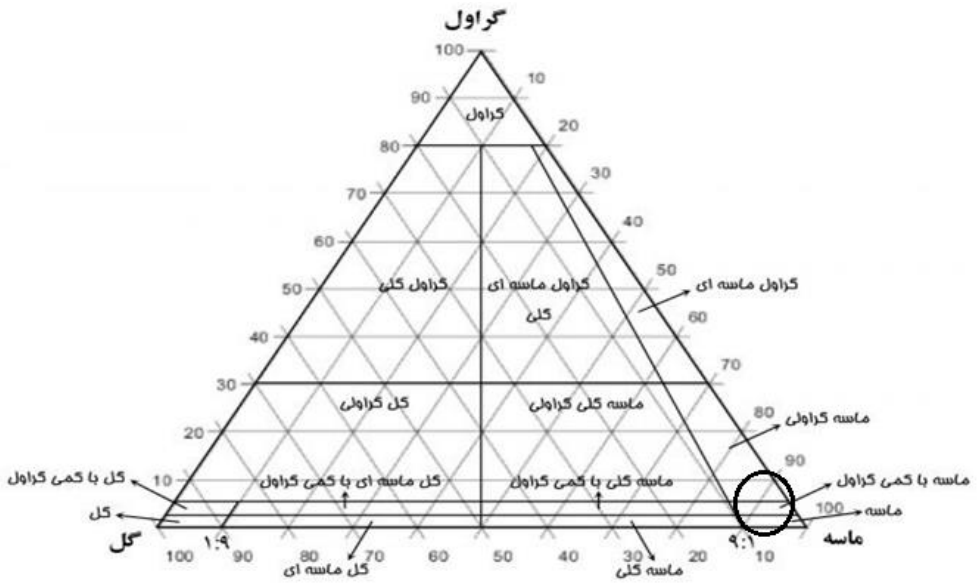
Table 4. Properties of unpolluted soil for oil

مشخصه	خاک میانگین	واحد
رس _ سیلت	۵/۳۶	درصد
ماسه	۹۱/۸۴	درصد
گراول	۳/۸۰	درصد
بافت	ماسه باکمی گراول	_
رطوبت خاک	۷/۱۴	درصد
pH	۷/۶۵	_
EC	۴/۵۸	sμ

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌ها

بعد از جداسازی باکتری‌ها و کشت خطی در چند مرحله در محیط نوترینت آگار[3]، هفت جدایه ی مختلف باکتریایی از بین ۱۱جدایه و براساس درصد کاهش میزان نفت، خالص سازی شد. نتایج حاصل از توانایی رشد باکتری‌ها در محیط معدنی مایع در جدول ۵ نشان داده شده است. دو نوع از باکتری‌ها که بالاترین توانایی تجزیه ترکیبات نفت خام را داشتند برای تهیه کنسرسیوم میکروبی و شناسایی انتخاب شدند.

3- Nutrient agar



شکل ۲- مثلث طبقه بندی رسوبات براساس اندازه ذرات تشکیل دهنده و موقعیت نمونه ها در آن

Figure 2. Triangle classification of sediments based on the size of the particle and the location of the samples

جدول۵- مقایسه توانایی رشد باکتری‌ها در محیط آلوده به نفت

Figure 5. Comparison of the ability of bacteria to grow in an oil-contaminated environment

شماره جدایه	میزان حذف نفت٪
TP1	۸۰
TP2	۷۰
TP3	۶۰
TP4	۵۵
TP5	۵۰
TP6	۳۰
TP7	۲۰

ویژگی‌های ظاهری و نتایج مربوط به شناسایی باکتری‌ها

در جدول ۶ آورده شده است.

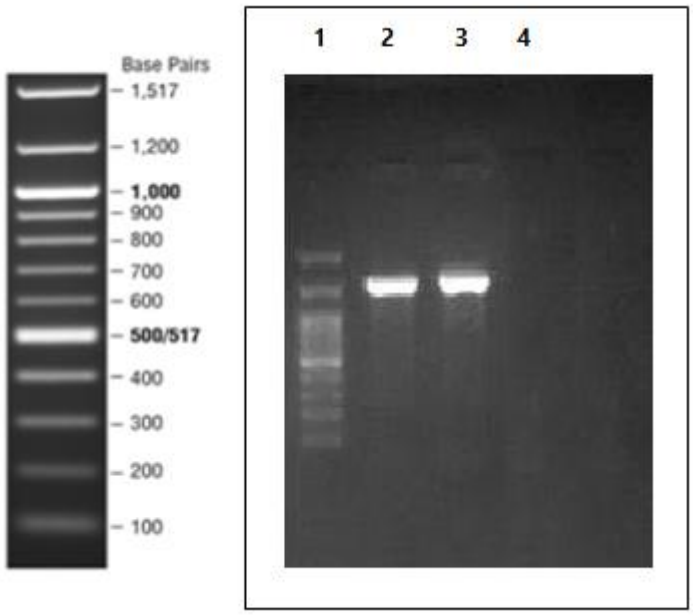
جدول۶- مشخصات باکتری‌ها در محیط کشت

Table 6. Characteristics of bacteria in culture

مشخصات	TP1	TP2
شکل ظاهری	کلنی گرد و برجسته	کلنی گرد و مسطح
رنگ کلنی	سفید	سفید
شکل میکروسکوپی	باسیل (میله‌ای)	کوکسی (دایره‌ای)
رنگ‌آمیزی گرم	منفی	منفی
تست KOH	مثبت	مثبت
PCR	*Pseudomonas stutzeri*.	*Acinetobacter junii*

شناسایی سویه‌ها

در راستای شناسایی مولکولی سویه‌ها، ابتدا استخراج DNA و سپس PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F و RP2 انجام شد. برای هر دو سویه PCR انجام شد که نتایج آن در ژل آگارز با ایجاد باند حدود bp ۱۵۰۰ تایید گردید (شکل۳).



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR

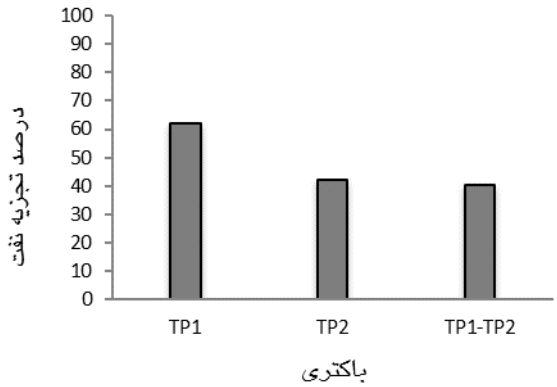
ستون ۱: DNA Ladder 100bp؛ ستون ۲: باکتری TP2؛ ستون ۳: باکتری TP1؛ ستون ۴: کنترل منفی

Figure 3. Image of gel electrophoresis of PCR products. in this profile; column 1: DNA Ladder 100bp; column 2: TP2; column 3: TP1; column 4: negative control

توالی‌یابی

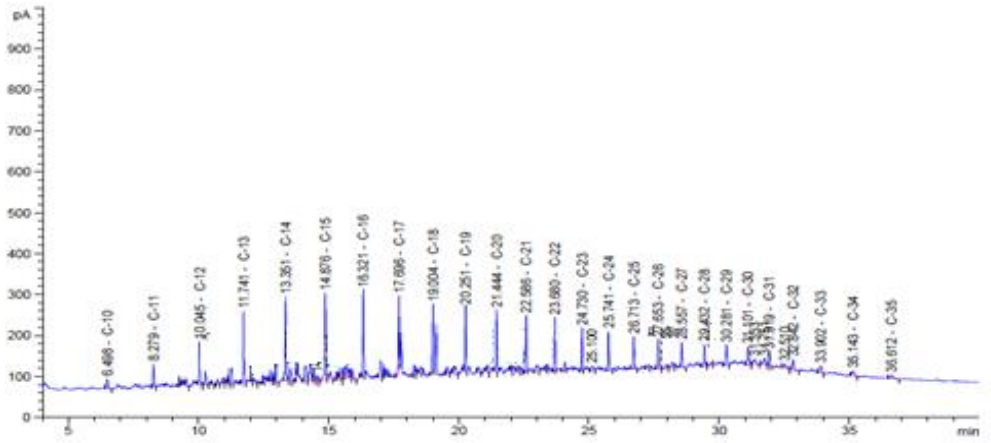
توالی‌های بدست آمده با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعات داده‌های ژنومی NCBI با استفاده از ابزار Blast مقایسه شد. نتایج حاصله نشان داد سویه TP1 به باکتری *Pseudomonas stutzeri*. به میزان ۹۹ درصد و سویه TP2 به *Acinetobacter junii* به میزان ۹۴ درصد شباهت داشتند. با توجه به شکل ۴و نتایج حاصل از کروماتوگرافی نمونه خاک‌های آلوده به نفت که نتایج آن در شکل‌های ۵، ۶ و۷ آمده است، می توان استنباط نمود که در

دمای ۳۰°C و در طول ۳۰ روز، توانایی تجزیه نفت توسط باکتری TP1، TP2 و کشت مخلوط (TP1 و TP2) به ترتیب ۶۲/۲۵، ۴۲/۳۹ و ۴۰/۲۸ درصد باشد. همان طور که مشاهده می‌شود میزان کاهش TPH توسط سویه TP1 بیش تر از سویه TP2 و کشت مخلوط دو باکتری می‌باشد. طبق شاه علیان و همکاران (۱۳۹۳) این اثر را می توان به پلاسمیدهای متعدد این گونه باکتری ها و توان تولید آنزیم های گوناگون توسط آن ها نسبت داد. اختلاف ناچیزی در کاهش درصد TPH سویه TP2 و کشت مخلوط دو باکتری دیده می‌شود که می‌توان آن را ناشی از خطای آزمایش در نظر گرفت.



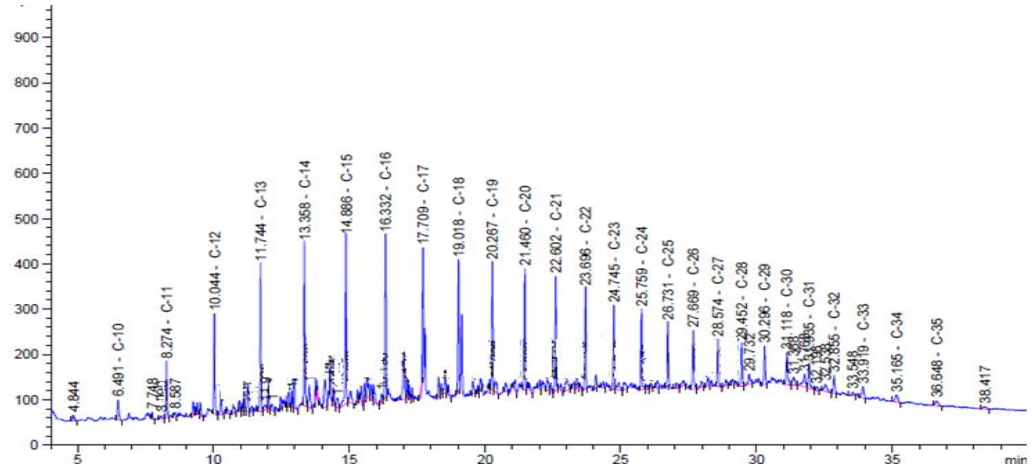
شکل۴- مقایسه رشد باکتری‌ها در شرایط دمایی و زمانی یکسان

Figure 4. Comparison of bacterial growth at the same temperature and time



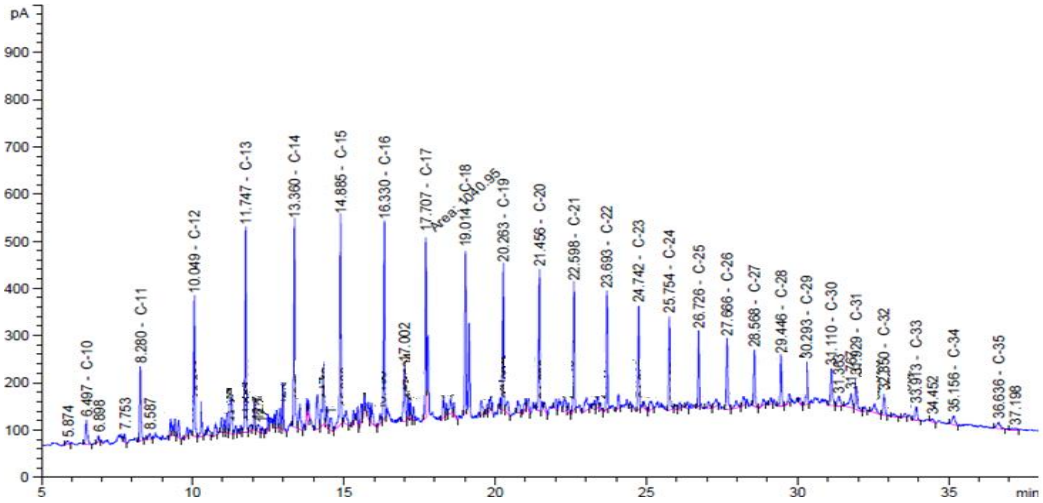
شکل ۵- طیف کروماتوگرافی هیدروکربن‌های تجزیه شده در نمونه تیمارشده با باکتری TP1

Figure 5. Chromatography spectrum of decomposed hydrocarbons in a sample treated with TP1 bacteria



شکل ۶- طیف کروماتوگرافی هیدروکربن‌های تجزیه شده در نمونه تیمارشده با باکتری TP2

Figure 6. Chromatography spectrum of decomposed hydrocarbons in a sample treated with TP2 bacteria



شکل ۷- طیف کروماتوگرافی هیدروکربن‌های تجزیه شده در نمونه تیمارشده با باکتری TP1-TP2

Figure 7. Chromatography spectrum of decomposed hydrocarbons in a sample treated with TP1-TP2 bacteria

بحث و نتیجه‌گیری

طی این پژوهش هفت سویه باکتریایی از خاک سطحی آلوده به نفت خام در محوطه پالایشگاه تبریز جداسازی شد که قابلیت تجزیه ترکیبات نفتی را داشتند. دو سویه باکتریایی که توانایی بیشتری درکاهش TPH داشتند انتخاب گردید که با انجام آزمایش PCR و نتایج حاصل از توالی یابی، شناسایی اولیه در حد جنس صورت گرفت. هر دو سویه گرم منفی بوده و بیشترین شباهت را با *Pseudomonas stutzeri* و *Acinetobacter junii* نشان دادند. نتایج بدست آمده از آنالیز GC-FID نشان داد که باکتری *سودوموناس* با قابلیت ۶۲/۳۵ درصد توانایی بیشتری نسبت به اسینتوباکتر با قابلیت ۴۲/۳۹ درصد و کشت مخلوط دو باکتری با قابلیت ۴۰/۲۸ درصد در کاهش TPH دارد.

Reference

1. Andreoni, V., Gianfreda, L., 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. Applied Microbiology and Biotechnology, 76, pp. 287-308.
2. Namkoong, W., Hwang E., Y., Park, J. S., Choi, J. Y., 2002. Bioremediation of

diesel-contaminated soil with composting. Environmental Pollution, 119, pp.23-31.

3. Alexander M, 1995. How toxic are toxic chemicals in soil. Environmental Science and Technology, 29: 2713–2717.
4. Chan, H., 2011. Biodegradation of petroleum oil achieved by bacteria and nematodes in contaminated water. Separation and purification technology, 80, pp.459-466.
5. Semprini, L., 1998. Current and potential applications of in situ bioremediation. Biotechnology for Soil Remediation, pp. 21-27.
6. Priya, N. S., Doble, M., Sangwai, J. S., 2015. Bioremediation of Costal and Marine Pollution due to Crude Oil using a Microorganism Bacillus Subtilis. Procedia Engineering, 116, pp. 213-220.
7. Abed, R. M., Al-Sabah,i J., Al-Maqrashi F,Al-Habsi, A., Al-Hinai, M., 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments: International Biodeterioration & Biodegradation 89, pp. 58-66.
8. Lee, K., Merlin, X., 1999. Bioremediation of oil on shoreline environments: development of techniques and guidelines. Pure and applied chemistry, 71, pp. 161-171.
9. Timmis, K., N and Pieper, D. H., 1999. Bacteria designed for bioremediation. Trends in biotechnology, 17, pp. 201-204.
10. Coelho, F. J. R. C., Sousa, S., Santos, L., Santos, A. L., Almeida, A., GOMES, N. C., CUNHA, Â., 2010. PAH degrading bacteria in an estuarine system. Interdisciplinary studies on environmental chemistry—biological responses to contaminants, pp77-87.
11. Shah Alian, F., Safahiyeh, A., Salamat, N., Mojudi, F., Zare Dust, M., 2015. Investigating the role of isolated bacteria from Gulf precipitates in biological removal of oil pollutants (Antracene), Journal of Environmental Science and Engineering 1(4), pp. 11-17 (In Persian).
12. Johnsen, A., R and Karlson, U., 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied microbiology and biotechnology, 63, pp. 452-459.