Journal of Microbial World
Volume 16, No. 4, March 2024

Original Article

Evaluation of the biodegradation of phenanthrene by *Bacillus Mojavensis* isolated from the contaminated soils of Darkhovin oil region

Maryam Abbasi[1], Farshid Kafilzadeh[2], Azar Sabokbar[3], Azam Haddai[4]

[1]Ph.D, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran.
[3] Associate Professors, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.
[4] Assistant Professors, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Bioremediation is one of the methods of cleaning the environment from petroleum compounds. The aim of this research was to identify a native phenanthrene-degrading bacterium and to investigate the optimal growth conditions for biodegradation.

Materials and Methods: Sampling was carried out from petroleum-contaminated soils in the Darkhovin oil field, Iran. After isolation and primary identification of the bacteria, the specific bacterium was selected and identified. Then, after initial examination, the amount of biosurfactant produced by the bacterium was measured using a tensiometer. The effect of temperature, time, pH, nitrate, and sodium phosphate factors at 3 different levels was investigated using the Taguchi method, and the selected bacterium was placed under the designed conditions. The amount of phenanthrene degradation was examined using GC-MS, and the obtained results were analyzed.

Results: Among the isolates, *Bacillus mojavensis* had a higher ability to degrade phenanthrene. Evaluation of the presence of biosurfactant in this bacterium showed a value of 47 mN/m. The results of analyzing the optimal conditions of *Bacillus mojavensis* for biodegradation showed a temperature of 45 °C, pH 7, nitrate 1mg/mL, sodium phosphate 0.3 mg/mL 0.3, and a time of 5 days, under which conditions 55% of phenanthrene was degraded.

Conclusion: The results of this study showed that, considering the presence of native bacteria capable of degrading phenanthrene in contaminated soils, and determining the level of nutrients, environmental factors, and other effective factors in biodegradation, it is an effective strategy to increase the rate of phenanthrene biodegradation.

Keywords: Bioremediation, Phenanthrene, *Bacillus mojavensis*, Optimization.

Received: 7 August 2023 Revised: 29 October 2023 Accepted: 25 January 2024

Correspondence to: Farshid Kafilzadeh
Tel: +98 9171140799
E-mail: f.kafilzadeh@gmail.com
Journal of Microbial World 2024, 16 (4): 288 - 299

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره چهارم (پیاپی ۵۷) زمستان ۱۴۰۲
صفحات ۲۹۹ –۲۸۸

Original Article

ارزیابی تجزیه زیستی فنانترن توسط *باسیلوس مجاونسیس* جداسازی شده از خاک‌های آلوده منطقه نفتی دارخوین

مریم عباسی[۱]، فرشید کفیل‌زاده[۲*]، آذر سبکبار[۳]، اعظم حدادی[۴]

[۱]دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران. [۲]استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران. [۳]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران. [۴]استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: تجزیه زیستی یکی از روش‌های پاکسازی محیط از ترکیبات نفتی می‌باشد. هدف از این پژوهش تحقیقی شناسایی باکتری بومی تجزیه‌کننده فنانترن و بررسی شرایط بهینه رشد به‌منظور تجزیه زیستی بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری ازخاک‌های آلوده به مواد نفتی در میدان نفتی دارخوین ایران انجام شد. پس ازجداسازی و شناسایی اولیه باکتری‌ها، باکتری شاخص انتخاب و شناسایی شد. سپس مقدار بیوسورفکتانت باکتری پس از بررسی اولیه، با دستگاه تنسیومتر اندازه‌گیری شد. بررسی اثر فاکتورهای دما، زمان، pH، نیترات و سدیم فسفات در۳ سطح مختلف با طراحی آزمایش به‌روش تاگوچی انجام گرفت و باکتری منتخب درشرایط طراحی شده قرار داده شد. میزان تجزیه فنانترن با دستگاه GC-MS بررسی ونتایج به‌دست‌آمده تجزیه وتحلیل شد.

یافته‌ها: در میان جدایه‌ها *باسیلوس مجاونسیس* دارای قدرت بیشتری در تجزیه فنانترن بود. ارزیابی حضور بیوسورفکتانت این باکتری مقدار ۴۷mN/m را نشان داد. نتایج حاصل ازتجزیه وتحلیل شرایط بهینه باکتری *باسیلوس مجاونسیس* برای تجزیه زیستی دمای۴۵ درجه سلسیوس، pH = ۷، نیترات ۱mg/mL، سدیم فسفات ۰/۳ mg/mL و زمان ۵ روز را نشان داد که در این شرایط ٪۵۵ فنانترن تجزیه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که با توجه به‌حضور باکتری‌های بومی با قابلیت تجزیه فنانترن درخاک‌های آلوده، وتعیین سطح مواد مغذی، فاکتورهای محیطی و دیگر عوامل موثردر تجزیه زیستی، یک استراتژی کارآمد به‌منظور افزایش سرعت تجزیه زیستی فنانترن می‌باشد.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، فنانترن، *باسیلوس مجاونسیس*، بهینه‌سازی.

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۵/۱۶ ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۸/۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۵

مقدمه

آلودگی‌های نفتی، یکی از مشکلات عمده تهدید کننده محیط زیست به شمار می‌رود (۱). هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای که پراکنش وسیعی در محیط زیست دارند، به‌عنوان یکی از عوامل سرطان‌زا و جهش‌زا در موجودات مطرح می‌باشند (۲). آلودگی محیط زیست به فنانترن (یکی از اعضای هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای) به‌دلیل سمیت، سرطان‌زایی و جهش‌زایی آن، از اهمیت علمی و اجتماعی برخوردار است (۳). برای حذف PAHs از محیط زیست روش‌های مختلفی استفاده می‌شود اما استفاده از

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران.
تلفن: ۰۹۱۷۱۱۴۰۷۹۹ پست الکترونیک: f.kafilzadeh@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

میکروارگانیسم‌ها برای پاکسازی این آلودگی‌ها موثرتر و ارزان‌تر می‌باشد(٤). که موجب حذف و یا تبدیل این آلاینده‌ها به ترکیباتی با سمّیت کمتر می‌شود (٥). وزن مولکولی و غلظت اولیه PAHs، با تاثیر مستقیم بر روی رشد سلولی، به‌صورت غیر مستقیم بر میزان تجزیه زیستی تاثیر می‌گذارند (٦). باکتری‌ها می‌توانند هیدروکربن‌های نفتی را به‌عنوان منابع انرژی و کربن مورد استفاده قرار داده و در نهایت تجزیه کنند. باکتری‌های تجزیه‌کننده بسته به حضور ژن و فعالیت‌های خارج سلولی آنزیمی توانایی تجزیه طیف وسیعی از ترکیبات آلی را دارند. با این وجود، شرایط محیطی متفاوت می‌تواند بر روی الگوی رشد باکتری‌ها اثر گذاشته و فرایند تجزیه را مختل و یا پیچیده کند (٧). همچنین مشاهده شده است که حضور بیوسورفکتانت‌ها در برخی از باکتری‌های تجزیه کننده موجب افزایش تجزیه زیستی نفت می‌گردد و پاکسازی محیط را تسهیل می‌کند. بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند محتویات نفت را در آب حل کنند و در نتیجه دسترسی باکتری‌ها به نفت را برای تجزیه زیستی افزایش دهند (٨). عملکرد باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها عمدتاً به حضور آنزیم‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن بستگی دارد که بیان و فعالیت آن‌ها ارتباط نزدیکی با فعالیت فیزیولوژیکی و رشد باکتری‌ها دارد. بسیاری از عوامل محیطی بر رشد باکتری‌ها و در نتیجه تجزیه زیستی تأثیر می‌گذارند که با تغییر و دستکاری این عوامل و فاکتورهای محیطی می‌توان سرعت رشد باکتری و تجزیه زیستی را بالا برد (٦و٩). برای تجزیه زیستی موفق، باید به میکروارگانیسم‌ها و همچنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی محیط دسترسی و شناخت داشته باشیم (١٠). با توجه به مطالب بیان شده شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده فنانترن و آگاهی به نیازها و ویژگی‌های آن‌ها به‌منظور تسریع در تجزیه زیستی لازم و ضروری است. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده فنانترن و بررسی شرایط بهینه رشد و اثر فاکتورها و شرایط محیطی در سرعت تجزیه زیستی بود. به‌این منظور ٥ فاکتور با سطوح مختلف و متناسب با شرایط جغرافیایی منطقه به طور همزمان مورد بررسی و میزان اثرگذاری هریک بر روی باکتری تجزیه‌کننده فنانترن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه‌ها: نمونه‌ها از خاک اطراف میدان نفتی دارخوین درحدود ٤٥ کیلومتری شمال شهر خرمشهر و ٨٥ کیلومتری جنوب غربی شهر اهواز از عمق ٥ تا ١٠ سانتی‌متری جمع‌آوری شدند. مشخصه محل‌های نمونه‌برداری نزدیکی به سایت‌های بهره‌برداری نفت و آلودگی خاک به ترکیبات نفتی بود.

ب) غنی سازی، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنانترن: از محیط کشت پایه نمکی معدنی Medium Mineral Salt (MSM) (Na2SO4 0.14gr, NH4Cl 0.53gr, CaCl2 0.15gr, MgCl2 3gr, NaCl 3gr, K2HPO4 3gr, KH2PO4 3gr) استفاده شد. برای جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های خاک، در ابتدا ٥ گرم خاک هر ایستگاه را به ١٠ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و به مدت ١٠ دقیقه در ٢٠٠٠ rmpسانتریفیوژ شد، سپس ٥٠٠ میکرولیتر از محلول رویی جمع‌آوری و به ١٠٠میلی‌لیتر محیط کشت MSM حاوی ٠/٥ گرم بر لیتر فنانترن (Merck کشور آلمان) به‌عنون منبع کربن افزوده شد (١١). این مجموعه به‌مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار با دور ١٥٠rpm، دمای ٣٠ درجه سلسیوس و تاریکی برای جلوگیری از اکسیداسیون نوری، گرماگذاری و در پایان هفته، ١٠ درصد کشت غنی‌شده پیشین به‌عنوان ماده تلقیح به محیط کشت‌های پایه جدید استفاده شد (١٢). پس از آن ١ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاصل از آخرین غنی‌سازی به روش پورپلیت بر سطح محیط کشت جامد MSM کشت داده شد. به منظور جداسازی و خالص سازی، هریک از کلنی‌ها در محیط کشت کشت جامد پایه معدنی‌حاوی فنانترن به صورت خطی‌کشت داده شدند (١١). جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند (١٣). برای بررسی توانایی تجزیه فنانترن توسط جدایه‌ها، ١/٥ میلی‌لیتر از غلظت نیم مک فارلند

هریک از باکتری‌ها در ارلن‌های حاوی محیط پایه ۰/۵ گرم بر لیتر فنانترن قرار گرفتند و کدورت نمونه پس از ۳ روز در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و جدایه قویتر انتخاب شد (۱۴). به‌منظور بررسی سینتیک رشد جدایه منتخب در ارلن‌های حاوی ۰/۸-۰/۷-۰/۶-۰/۵ گرم بر لیتر فنانترن قرار گرفت و سرعت رشد آن هر ۱۲ ساعت به مدت۷ روز در طول موج ۶۰۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۱۱). برای شناسایی دقیق‌تر باکتری روش‌های مولکولی بر مبنای توالی ژن 16S rRNA انجام شد. در ابتدا با استفاده از کیت استخراج ژنوم شرکت سیناژن، ژنوم جدایه مورد نظر با استفاده از پرایمرهای عمومی (16S_27F : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') و (16S_1492R : 5'-GGCTTACCTTGTTACGACTT-3') استخراج شد. در ادامه محصول به وسیله واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر (مدل GTC) تکثیر و سپس محصولات واکنش برای تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شدند. نتایج با نرم‌افزار بیوادیت مرتب، سپس با برنامه BLAST در پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات فناوری بررسی و درخت فیلوژنتیکی آن با نرم‌افزار مگا نسخه (e458779e63) (233140859) 10.0.3 رسم شد (۱۵).

ج) *بررسی وجود بیوسورفکتانت:* جهت ارزیابی اولیه تولید بیوسورفکتانت جدایه‌ها در محیط بلاد آگار حاوی۱۰-۵ درصد خون کشت داده شد. همولیز بتا در اطراف کلنی به‌عنوان فعالیت همولیتیک مثبت و حضور بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد. در ادامه آزمایش جهت بررسی کمیت بیوسورفکتانت، به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط پایه معدنی، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر فنانترن و ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت نیم مک فارلند اضافه و نمونه به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار گرمخانه‌گذاری شد (۱۶). در ادامه ۳۵ میلی‌لیتر از محیط جدا و به مدت ۲۵ دقیقه با ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و در ادامه کشش سطحی مایع رومانند، توسط دستگاه تنسیومتر (Switzerland, KLOT K9 KRUESS) به‌عنوان شاخص کیفیت تولید بیوسورفاکتانت با واحد اندازه‌گیری نیوتن بر متر اندازه‌گیری شد (۱۶و۱۷).

د) *تجزیه و تحلیل شرایط تخریب بهینه:* در این مطالعه برای طراحی آزمایش، از روش تاگوچی استفاده (۱۸) و پنج عامل زمان، دما، pH، غلظت نیتروژن و فسفر در سه سطح مختلف (جدول ۱) در نظر گرفته شد تا اثر هریک از عوامل و شرایط بهینه برای رشد میکروارگانیسم تعیین شود. در هر مرحله از آزمایش، از نیترات به‌عنوان منبع نیتروژن و از سدیم فسفات به عنوان منبع فسفر استفاده شد. بعد از آماده سازی محیط کشت، میکروارگانیسم انتخاب شده به هر ارلن اضافه و ارلن ها مطابق با جدول طراحی شده در شرایط تعیین شده قرار گرفتند و نتایج درروزهای ۱۵-۱۰-۵ ثبت شدند. مقدار فنانترن باقیمانده در محلول توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی – طیف سنجی جرمی(GC-MS) مدل (shimadzu- QP2010SE) اندازه‌گیری و ثبت شد (۱۹). نمونه‌ها در دمای ورودی ۳۰۰ درجه سلسیوس تزریق شدند. دمای ستون درابتدا ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه نگهداری شد، دمای ستون با افزایش دما ۲۵ درجه سلسیوس در دقیقه، به ۱۲۰ درجه سلسیوس، سپس با افزایش ۱۰ درجه سلسیوس در دقیقه، به ۱۶۰ درجه سلسیوس و در نهایت با افزایش ۵ درجه سلسیوس در دقیقه، به ۳۰۰ درجه سلسیوس افزایش و به‌مدت ۱۵ دقیقه نگهداری گردید. دمای آشکارساز در ۲۸۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. در این بررسی از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان ثابت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد (۱۹).

جدول ۱: فاکتورهای و سطوح مورد بررسی هر یک از آن‌ها.

فاکتور	سطح۱	سطح۲	سطح۳
دما	۳۰°C	۴۵°C	۷۰ °C
pH	۵	۶	۷
زمان(روز)	۵	۱۰	۱۵
منبع نیتروژن	۰/۲	۱	۲
منبع فسفات	۰/۱	۰/۲	۰/۳

ه) *تجزیه و تحلیل داده‌ها:* به‌منظور طراحی آزمایش‌ها به‌روش فاکتوریل کامل از نرم افزار Minitab 14 v محصول شرکت Minitab Inc آمریکا و جهت طراحی آزمایش‌ها به‌روش

تاگوچی وتجزیه تحلیل داده‌ها از نرم افزار Qualitek-4 استفاده شد. از نرم‌افزار اکسل(Excel) برای رسم نمودارها و از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری تجزیه واریانس (ANOVA) و دانکن (Duncan) برای تحلیل داده‌ها استفاده گردید و مرز معنی‌داری در سطح ۵٪ قرار داده شد.

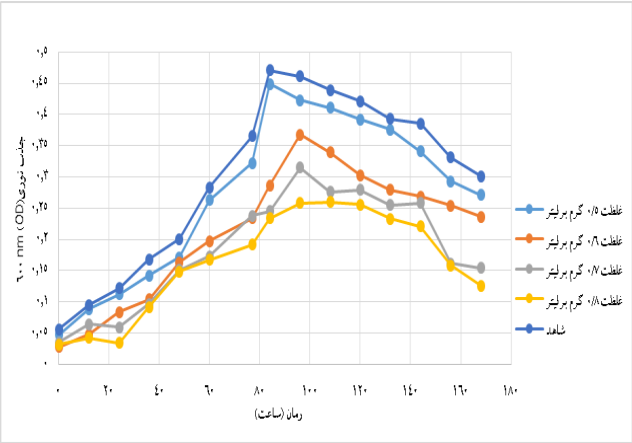
یافته‌ها

جنس‌های مختلف باکتریایی که از خاک‌های آلوده منطقه دارخوین جدا شدند، همگی رشد خوبی بر روی محیط پایه نمکی از خود نشان دادند. پس از آزمایشات معمول میکروبیولوژی و آزمون‌های تشخیص بیوشیمیایی، مشاهده شد که درصد فراوانی باکتری‌های جداسازی شده گرم مثبت ۶۸ درصد و باکتری‌های گرم منفی ۳۲ درصد بود. در بررسی اولیه قابلیت تجزیه فنانترن در باکتری‌های *باسیلوس مجاونسیس*، *باسیلوس سرئوس*، *لیزین باسیلوس اسفاریکوس*، *استافیلوکوکوس*، *سودوموناس ائرجینوسا* مشاهده شد. پس از بررسی نتایج کدورت سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ nm از میان جدایه‌های تجزیه‌کننده فنانترن، جدایه باکتریایی *باسیلوس مجاونسیس* با قابلیت تجزیه بهتر فنانترن در روز سوم با میزان ۴۳۵ nm انتخاب (جدول ۲) و درخت فیلوژنیک آن (شکل ۱) و نمودار رشد آن در غلظت‌های مختلف فنانترن رسم شد (شکل ۲).

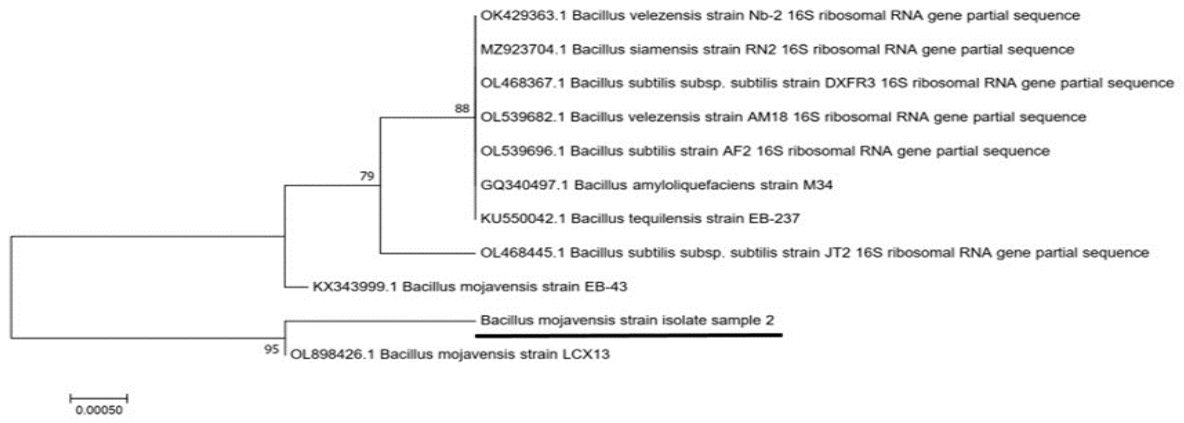
جدول ۲: مقدار تقریبی زمان و باکتری‌های تجزیه کننده فنانترن در محیط پایه.

باکتری	زمان(ساعت) ۲۴	۳۱	۴۱	۵۵	۷۲	درصد جذب نور
شاهد	-	-	-	-	-	٪۰
باسیلوس مجاونسیس	+	+	++	++	+++	٪۴۳۵
باسیلوس سرئوس	+	+	+	++	+++	٪۳۷۶
لیزین باسیلوس اسفاریکوس	+	++	++	+++	+++	٪۳۹۱
استافیلوکوکوس	+	+	+	+	+	٪۲۹۷
سودوموناس ائرجینوسا	+	++	++	++	++	٪۳۶۷

ضعیف + متوسط ++ قوی +++



شکل ۲: منحنی رشد *باسیلوس مجاونسیس* در غلظت‌های مختلف فنانترن.



شکل ۱: درخت فیلوژنتیک *باسیلوس مجاونسیس*. برای نشان دادن روابط از روش Neighbor-joining استفاده شد. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است.

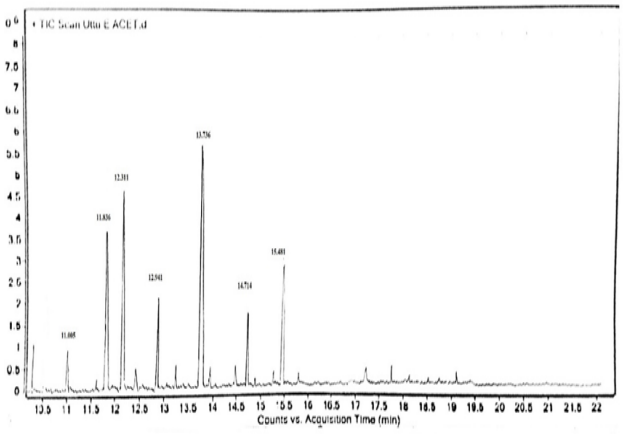
در نتایج کدورت سنجی *باسیلوس مجاونسیس* توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر، لزوم بازه زمانی ۲۴ ساعته برای رشد و قرار گرفتن باکتری در فاز لگاریتمی در تمام غلظت‌ها مشاهده شد. همچنین بیشترین جذب نوری در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر فنانترن در ساعت ۸۴ بود.

سویه جدا شده *باسیلوس مجاونسیس* در بررسی اولیه حضور بیوسورفکتانت بر روی محیط کشت بلاد آگار، فعالیت همولیتیک و منطقه‌ای واضح در اطراف کلنی خود نشان داد. در این بررسی محتوای بیوسورفکتانت توسط دستگاه تنسیومتر برای باکتری *باسیلوس مجاونسیس* ۴۷mN/m اندازه‌گیری شد. درادامه این مطالعه توانایی تجزیه بیولوژیکی فنانترن میزان اثر و مقدار بهینه هر فاکتور توسط *باسیلوس مجاونسیس* تحت شرایط قید شده و توسط دستگاه GC-MS مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۳: جدول شرایط طراحی شده و نتایج اندازه‌گیری میزان حذف فنانترن توسط *باسیلوس مجاونسیس*.

شماره	فاکتور						درصد حذف فنانترن		S/N (D)
	دما	pH	منبع فسفات	منبع نیتروژن	زمان		آزمون۱	آزمون۲	
۱	۱	۱	۱	۱	۱		۳۲	۳۴	۲۷/۳۶۰۰
۲	۲	۱	۲	۲	۲		۳۱	۳۲	۳۲/۹۷۶۵
۳	۳	۱	۳	۳	۳		۲۸	۲۹	۳۲/۱۰۷۲
۴	۱	۲	۱	۲	۲		۳۲	۳۱	۳۲/۹۷۶۵
۵	۲	۲	۲	۳	۳		۳۴	۳۱	۲۳/۷۰۵۵
۶	۳	۲	۳	۱	۱		۳۰	۳۲	۲۶/۸۱۶۹
۷	۱	۳	۲	۳	۱		۳۶	۳۵	۳۴/۰۱۴۹
۸	۲	۳	۳	۱	۲		۳۴	۳۳	۳۳/۵۱۱۲
۹	۳	۳	۱	۲	۳		۱۹	۲۲	۱۹/۷۰۳۰
۱۰	۱	۱	۳	۲	۳		۳۴	۳۵	۳۳/۷۶۶۷
۱۱	۲	۱	۱	۳	۱		۳۸	۴۰	۲۸/۸۱۱۰
۱۲	۳	۱	۲	۱	۲		۳۳	۳۴	۳۳/۵۱۱۲
۱۳	۱	۲	۲	۱	۳		۳۸	۴۰	۲۸/۸۱۱۰
۱۴	۲	۲	۳	۲	۱		۵۴	۵۵	۳۷/۷۳۸۲
۱۵	۳	۲	۱	۳	۲		۳۳	۳۲	۳۳/۲۴۸۰
۱۶	۲	۳	۳	۳	۲		۲۶	۲۷	۳۱/۴۷۵۲
۱۷	۲	۳	۱	۱	۳		۳۴	۳۳	۳۳/۵۱۱۲
۱۸	۲	۳	۲	۲	۱		۳۳	۳۵	۲۷/۶۱۹۳

در طی تجزیه فنانترن مواد 2-hydroxy-1-naphthoic acid, phthalic acid, coumarin salicylic aldehyde, salicylic acid توسط دستگاه GC-MS مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳: نمودار کروماتوگرام تجزیه فنانترن توسط باکتری *باسیلوس مجاونسیس*.

در تجزیه و تحلیل‌های آماری حاصل از این پژوهش بر روی اثر سطوح مختلف هر فاکتور در تجزیه زیستی فنانترن توسط باکتری *باسیلوس مجاونسیس* مشاهده شد که منبع فسفات اولین و موثرترین عامل در تجزیه فنانترن توسط این باکتری و با مقدار بهینه ۰/۳ mg/mL بود. دومین فاکتور موثر دما با مقدار بهینه ۴۵ °C، سومین و چهارمین فاکتور موثر به ترتیب زمان با مقدار بهینه ۳ روز و pH با مقدار بهینه ۶ مشاهده شد. آخرین و پنجمین فاکتور موثر منبع فسفات با مقدار بهینه ۱ mg/mL بود.

بحث

تجزیه زیستی، فرآیند تخریب آلاینده‌ها توسط فعالیت‌های متابولیکی میکروارگانیسم‌ها، یک روش اکولوژیک، اقتصادی و ایمن است که می‌تواند برای پاک‌سازی PAHs مورد استفاده قرار می‌گیرد(۶و۹). مطالعه و جداسازی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده PAHs، روشی با پتانسیل فوق‌العاده و جایگزینی قدرتمند برای درمان‌های زیستی خاک‌های آلوده به PAHs می‌باشد که تاکنون تحقیقات و بررسی‌های مختلفی بر روی آن انجام شده است (۱۰). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۳ توسط Aruotu و همکاران بر روی توانایی تجزیه زیستی PAHs توسط باکتری‌هایی بومی از خاک‌های آلوده در نیجریه صورت

گرفت، فراوانی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود. همچنین باکتری‌های *سودوموناس*، *میکروکوکوس* و *باسیلوس* جدایه‌های با قدرت تجزیه زیستی بهتر از میان دیگر جدایه‌ها معرفی شدند که در بین گونه‌های *میکروکوکوس* و *باسیلوس* قابلیت تولید بیوسورفکتانت نیز مشاهده شد (۲۰). در تحقیق حاضر، روش‌هایی مبتنی بر غنی‌سازی سویه‌های تجزیه‌کننده فنانترن از نمونه‌های خاک و غربالگری این سویه‌ها به منظور شناسایی و جداسازی قوی‌ترین سویه تجزیه کننده فنانترن انجام گرفت. در این بررسی باکتری‌های *سودوموناس*، *باسیلوس*، *استافیلوکوس* و لایزینی*باسیلوس* از خاک‌های آلوده جداسازی و شناسایی شدند. همچنین مشاهده شد که باکتری‌های گرم مثبت با میزان ٦٨ درصد فراوانی بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی تجزیه کننده فنانترن داشتند که با نتایج تحقیق قبل همخوانی دارد. در پژوهشی مشاهده شد که به‌طور کلی گونه‌های *باسیلوس* پتانسیل بالایی در تجزیه ترکیبات PAHs دارند و با توجه به‌اینکه تجزیه بهتر PAHs در اسیدیته بالاتر از خنثی صورت می‌گیرد، دو ویژگی تولید بیوسورفکتانت و رشد آن‌ها در شرایط قلیایی سبب شده که *باسیلوس*ها همواره گزینه مناسبی برای تجزیه PAHs باشند (۲۱). در مطالعاتی نیز مشخص شد که حضور بیوسورفکتانت و توانایی باکتری برای تولید آن، از جمله عواملی است که باعث مقاومت و اتصال سریع‌تر باکتری به کریستال‌های فنانترن و تجزیه زیستی بهتر و سریع‌تر آن می‌شود (۲۲). درمطالعه‌ای پس از بررسی حضور بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری *باسیلوس آمیلولیفکاسینس* با مقدار ۲۸/۵ mN/m، مشاهده شد که بیوسورفکتانت در تجزیه زیستی نقش به‌سزایی دارد (۱۷). در این مطالعه باکتری *باسیلوس مجاونسیس* بهترین تجزیه زیستی فنانترن را درمیان دیگر جدایه‌ها داشت که با نتایج تحقیقات صورت گرفته همخوانی دارد. در این بررسی محتوای بیوسورفاکتانت برای باکتری *باسیلوس مجاونسیس* ٤٧mN/m اندازه‌گیری شد که مطابق با تحقیقات صورت گرفته، قابلیت و توانایی این باکتری را در تجزیه بهتر فنانترن نشان می‌دهد. در تحقیقات صورت گرفته مشخص شده که واسطه‌های متابولیکی با حلالیت نسبتاً بالا که از تجزیه هیدروکربن‌های نفتی توسط باکتری‌ها تولید شده‌اند ممکن است سمیت سلولی بالاتری نسبت به مولکول‌های مادر داشته باشند که این مواد می‌توانند موجب آسیب به باکتری‌ها شوند و یا رشد و فعالیت آن‌ها رامهار کنند. در این شرایط، برخی از باکتری‌های حساس به در مواجهه با هیدروکربن‌های نفتی تا حد زیادی مهار می‌شوند اما برخی دیگر که می‌توانند به طور موثر هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه و یا از متابولیت‌های واسطه سیتوتوکسیک استفاده کنند، رشد خواهند کرد (۹و۲۳). ژائو و همکاران در سال ۲۰۱٦ مشاهده کردند که باکتری *مایکوباکتریوم* عامل اصلی تجزیه اولیه فلورانتن و تبدیل آن به واسطه‌های متابولیکی می‌باشد در حالیکه برای ادامه روند پاکسازی و تجزیه واسطه‌های متابولیکی تجزیه فلورانتن گروه متنوع‌تری از باکتری‌ها نقش دارند (۲٤). همچنین نتایج برخی از مطالعات نشان داده است که استفاده از چند باکتری سبب تجزیه زیستی بهتر آلاینده خواهد شد (۲۵). در نمودار رشد *باسیلوس مجاونسیس* در این تحقیق مشاهده شد که رشد این باکتری در ۲٤ ساعت اول پس از تلقیح کم بوده است ولی پس از آن رشد باکتری در فاز لگاریتمی و پس مدتی رشد باکتری در فاز نزولی قرار گرفت که نشانه کاهش سرعت و توانایی رشد باکتری می‌باشد. این بررسی نشان می‌دهد که ممکن است باکتری یاد شده در پی آزاد شدن واسطه‌های متابولیکی تولید شده عملکرد پایینی در رشد داشته باشد. در این مطالعه در طی تجزیه فنانترن واسطه‌های متابولیکی 2-hydroxy-1-naphthoic acid, salicylic aldehyde, salicylic phthalic acid, coumarin acid توسط دستگاه GC-MS مشاهده شد. در مطالعاتی مشاهده شد که به‌منظور سرعت بخشیدن به رشد و تخریب میکروبی و تجزیه زیستی موفق، بهتر است پارامترهای محیطی در طول تجزیه زیستی دستکاری شوند (۱۰). ازجمله این پارامترها وعوامل: دما، مواد مغذی، پذیرنده‌های الکترون و... می‌باشند که بر واکنش‌های تجزیه زیستی تأثیرگذارند (۹). در مطالعه صورت گرفته بر روی اثر دما در تجزیه زیستی مشاهده شد که دما می‌تواند علاوه بر اثر بر رشد و متابولیسم باکتری‌ها، بر روی ماتریکس خاک و تغییر

ماهیت آلاینده‌ها نیز موثر باشد و در نتیجه به‌طور غیرمستقیم بر راندمان تجزیه زیستی تأثیر بگذارد (۲۶). مشاهده شده است که افزایش دما سبب افزایش حلالیت فنانترن و در نتیجه تجزیه بهتر آن می‌شود (۲۷). در بررسی صورت گرفته توسط Liu در سال ۲۰۱۹ از میان سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس، حداکثر تخریب فنانترن توسط باکتری *بورخولدریا* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده شد (۲۸). در این بررسی باتوجه به دیگر پارامترهای محیطی و ماهیت فنانترن درمیان ۳ دمای مورد بررسی، در دمای ٤٥ درجه سلسیوس بهترین راندمان تجزیه زیستی فنانترن توسط باکتری مشاهده شد که این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه باکتریایی باشد. pH از جمله عوامل موثر در سرعت تجزیه زیستی می‌باشد که در محیط‌های آلوده به ضایعات صنعتی، به‌طور گسترده در نوسان است. درمطالعاتی که بر روی اثر pH بر تجزیه زیستی PAHs صورت گرفت مشاهده شد که سویه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده به‌طور قابل توجهی به pH < ۵ و pH > ۹ حساس می‌باشند. به‌طور کلی حذف آلاینده‌ها تحت شرایط اسیدی یا بازی شدیدا کاهش و محدوده pH مناسب برای رشد باکتری‌ها و تجزیه زیستی ۷/۳ تا ۷/۷ می‌باشد (۲۹). با این حال تجزیه زیستی فنانترن توسط *سودوموناس* حتی درpH ۱۰ مشاهده شده است (۳۰). در بررسی صورت گرفته بر میزان اثر pH در بر روی تجزیه فنانترن توسط باکتری *بورخولدریا* مشخص شد که بهترین راندمان حذف فنانترن توسط باکتری در محدوده pH ۷ صورت گرفته است و در مقادیر دیگر راندمان تخریب کاهش یافته که نشان از محدودیت برای تخریب زیستی است (۲۸). در این تحقیق مقدار مناسب و بهینه pH برای تجزیه زیستی فنانترن توسط باکتری منتخب pH ۷ بود که با تحقیقات صورت گرفته همخوانی داشت. مشخص شده است که رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده در محیط‌های آلوده به PAHs به مقادیر مناسب کربن، هیدروژن، اکسیژن، نیتروژن، گوگرد، فسفر و عناصر کمیاب وابسته است (۷). در این خصوص مطالعات آزمایشگاهی و میدانی گسترده‌ای بر روی حضور مواد مغذی صورت گرفت و در این تحقیقات مشاهده شد که افزودن منابع نیتروژن و فسفر قابل دسترس برای تحریک تجزیه زیستی نفت توسط باکتری‌های موفقیت‌آمیز است. اگرچه مقادیر هریک از عناصر مغذی با توجه به نوع و غلظت آلاینده و گونه باکتری متفاوت می‌باشد (۱۰). در مطالعه‌ای مشاهده شد که نسبت عناصر مغذی کربن نیتروژن فسفر و پتاسیم به‌ترتیب ۱۰۰:۱۰:۱:۰.۵ موجب افزایش تجزیه زیستی توسط باکتری *سودوموناس* می‌شود که این نسبت با توجه به نوع آلودگی و نوع میکروارگانسیم قابل تغییر و طراحی است (۳۱). همچنین در مطالعه دیگری مشاهده شد که افزودن محلولی از مواد مغذی با ترکیب ۷۵٪ نیتروژن، ۱۰٪ فسفر و ۱٤٪ پتاسیم موجب افزایش تجزیه زیستی فنانترن توسط مشارکت و کنسرسیوم باکتریایی می‌شود. میزان اثر عناصرمغذی موثر بر تجزیه زیستی فنانترن توسط کنسرسیوم باکتریایی به صورت N > K > P > Cl > Na > Mg مشخص شد و براساس تجزیه و تحلیل‌های صورت گرفته اثر نیتروژن ۱۲/۳ درصد و اثر فسفر۹/۲ درصد تعیین گردید (۳۲).

در این مطالعه مقدار نیترات ۱mg/mL وسدیم فسفات ۰/۳mg/mL مقادیر بهینه برای تجزیه زیستی بهتر فنانترن بود و صرف نظر از خطاهای آزمایشگاهی، برای تجزیه زیستی فنانترن، فسفات و دما مهمترین عوامل برای سویه *باسیلوس مجاونسیس* بودند. نتایج به‌دست آمده از تجزیه وتحلیل نشان داد فسفات ۲۸ درصد و منبع نیتروژن ۲ درصد در تجزیه فنانترن توسط *باسیلوس مجاونسیس* موثر بوده‌اند. تفاوت در اثرگذاری و نسبت در مقدار مواد مغذی می‌تواند به‌دلیل تفاوت در استفاده از کنسرسیوم باکتریایی و باکتری *باسیلوس مجاونسیس* به تنهایی باشد. زمان از دیگر عوامل موثر بر تجزیه زیستی می‌باشد. باکتری‌ها برای رشد و سنتز آنزیم‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها به زمان کافی نیاز دارند. اگرچه این مقدار برای هر باکتری متفاوت می‌باشد و برخی از باکتری‌ها هیدروکربن‌های نفتی را طی چند روز یا حتی کمتر از یک روز در شرایط کشت آزمایشگاهی تجزیه می‌کنند. درمطالعه صورت گرفته بر روی تجزیه زیستی توسط دو باکتری *اسفینگوبیوم* و *بورخولدریا*، باکتری *اسفینگوبیوم* در روز ۳ آزمایش ٦٥ درصد

از فنانترن را تجزیه کرد در حالیکه در همین بررسی باکتری *بورخولدریا* ۸۶ درصد از فنانترن را در مدت زمان مشابه تجزیه کرده بود (۲۸). در مطالعه دیگری نیز بهترین راندمان تجزیه فنانترن توسط باکتری *باسیلوس تورجینینیس* در روز ۵ آزمایش و به‌مقدار ۸۶ درصد گزارش شد (۳۳). در این تحقیق روز ۵ آزمایش بهترین راندمان حذف فنانترن توسط باکتری با قابلیت حذف ۵۵ درصد فنانترن مشاهده شد که با مطالعه اخیر مطابقت دارد. صرف نظر از تاثیر هر فاکتور بر روی تجزیه زیستی دیگر عوامل محیطی می‌توانند بر روی بازدهی و فرآیند تجزیه زیستی موثر باشند و ترکیب پیچیده عوامل مختلف زیستی و غیرزیستی می‌تواند عملکرد باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن نفتی را از راه‌های مختلف محدود کند. در واقع نرخ تخریب واقعی هیدروکربن نفتی در محیط، نتیجه این عوامل است که بر روی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی اثر می‌گذارند. این عوامل منجر به تفاوت و یا طولانی شدن زمان فن‌آوری تجزیه زیستی میکروبی در مقایسه با یکدیگر و یا روش‌های دیگر می‌شود (۳و۳۳). در این بررسی یک باکتری با در نظر گرفتن توانایی بیشتر در تجزیه زیستی فنانترن شناسایی و جداسازی شد و سپس تحت شرایط مجموعه‌ای از فاکتورهای محیطی به طور همزمان قرار گرفت و نرخ تجزیه فنانترن توسط باکتری مورد نظر بررسی شد. تجزیه و تحلیل‌ها نشان داد که هریک از پارامترها تاثیر معنی داری در روند تجزیه فنانترن توسط باکتری *باسیلوس مجاونسیس* داشته‌اند. در این مطالعه مشاهده شد که شرایط بهینه برای تجزیه زیستی فنانترن توسط *باسیلوس مجاونسیس*، دمای ۴۵ درجه سلسیوس، pH ۷، نیترات ۱ mg/mL، سدیم فسفات mg/mL ۰/۳ و در روز ۵ آزمایش بود که در آن ۵۵ درصد تخریب فنانترن مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به عوارض حضور فنانترن در محیط زیست حذف این آلاینده دارای اهمیت می‌باشد.در مطالعه حاضر به‌منظور تجزیه زیستی فنانترن از باکتری‌های بومی استفاده شد که روشی مقرون به صرفه و کاربردی با کمترین میزان آسیب محیط می‌باشد. نتایج این مطالعه مشخص کرد که باکتری دارای توانایی خوبی در تجزیه زیستی فنانترن می‌باشد و نشان داد که باکتری‌های بومی به دلیل قرارگرفتن در معرض آلاینده و شرایط آب و هوایی محیط، دارای انطباق لازم جهت استفاده‌های کاربردی تجزیه زیستی می‌باشند. در این تحقیق مشخص شد که با توجه به کاهش مواد مغذی لازم برای رشد باکتری‌ها در خاک‌های آلوده، شناخت و تعیین سطح بهینه مواد مغذی و فاکتورهای محیطی و دیگر عوامل اثرگذار، یک استراتژی کارآمد در افزایش سرعت تجزیه زیستی فنانترن می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمام ملاحظات اخلاقی شامل سرقت ادبی انتشار دوگانه تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی شرکت بهره برداری نفت و گاز دارخوین اساتید و کارکنان دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و واحد جهرم تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

وجود ندارد

References

1. Boroomandi N, Mahmoodi MM, Mowla D, Rezaeian AA, Boostani M. Evaluation of crude oil biodegradation by Alcanivorax dieselolei, an isolated strain from the coastal sediments of Persian Gulf. Journal of Microbial World. 2014. [In Persian].
2. Eskandari S, Hoodaji M, Tahmourespour A, Abdolahi A. Bioremediation potential of indigenous gram-positive bacteria isolated from contaminated soil with polycyclic aromatic hydrocarbons. Journal of Microbial World. 2013;6(1 (14)):34-44. [In Persian].
3. Wang Y, Liang J, Wang J, Gao S. Combining stable carbon isotope analysis and petroleum-fingerprinting to evaluate petroleum contamination in the Yanchang oilfield located on loess plateau in China. Environmental Science and Pollution Research. 2018;25:2830-41.
4. Kafilzadeh F, Amiri P, Rezaei A, Ahmadi N. BIODEGRADATION OF FLUORANTHENE BY INDIGENOUS BACTERIA ISOLATED FROM SEDIMENTS OF MANGROVE FORESTS IN PERSIAN GULF. Journal of Microbial World. 2013;6(2 (15)):157-167. [In Persian].
5. Rahimi ES, Fooladi J, Ebrahimipour G, Soudi MR, Fooladi T. Isolation of fluorene degrading microorganisms from sediments of the Southern Caspian Sea Coasts and evaluation of their bioremediation potential. Journal of Microbial World. 2020;13(13):239-52. . [In Persian].
6. Yazdian F, Rashedi H, Sepahi AA. Study of the removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a halotolerant bacteria isolated from Dehloran Oil-contaminated soil. Journal of Microbial World. 2023;16(1):42-58. [In Persian].
7. Ojuederie OB, Babalola OO. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review. International journal of environmental research and public health. 2017 Dec 4;14(12):1504.
8. Guo P, Xu W, Tang S, Cao B, Wei D, Zhang M, et al. Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain Planococcus sp. XW-1 from the cold marine environment. International journal of environmental research and public health. 2022;19(2):782.
9. Song M, Yang Y, Jiang L, Hong Q, Zhang D, Shen Z, et al. Characterisation of the phenanthrene degradation-related genes and degrading ability of a newly isolated copper-tolerant bacterium. Environmental Pollution. 2017;220:1059-67.
10. Xu X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, et al. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. Frontiers in microbiology. 2018;9:2885.
11. Bala S, Garg D, Thirumalesh BV, Sharma M, Sridhar K, Inbaraj BS, et al. Recent strategies for bioremediation of emerging pollutants: a review for a green and sustainable environment. Toxics. 2022;10(8):484.
12. Coral G, Karagoz S. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Annals of microbiology. 2005;55(4):255.
13. Al-Thani RF, Abd-El-Haleem DA, Al-Shammri M. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. African Journal of Microbiology Research. 2009;3(11):761-6.
14. De Vos P, Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology Volume Three, The Firmicutes. Dordrecht ; New York :Springer, 2009.

15. Nnamchi C, Obeta J, Ezeogu L. Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. International Journal of Environmental Science & Technology. 2006;3:181-90.
16. Bami MS, Khazaeli P, Forootanfar H, Dehghannoudeh G, Ohadi M. Isolation and Identification of Biosurfactant Producing Bacterial Strain from Saline Soil Samples in Iran; Evaluation of Factors on Biosurfactant Production. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2020;15(4). [In Persian].
17. Bodour AA, Drees KP, Maier RM. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Applied and environmental microbiology. 2003;69(6):3280-7.
18. Daneshvar N, Khataee A, Rasoulifard M, Pourhassan M. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method. Journal of Hazardous Materials. 2007; May 8;143(1-2):214-9. [In Persian].
19. Crampon M, Cébron A, Portet-Koltalo F, Uroz S, Le Derf F, Bodilis J. Low effect of phenanthrene bioaccessibility on its biodegradation in diffusely contaminated soil. Environmental Pollution. 2017;225:663-73.
20. Aruotu JO, Chikere CB, Okafor CP, Edamkue I. Microbial consortium for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation from petroleum hydrocarbon polluted soils in rivers state, Nigeria. Applied Sciences. 2023;13(16):9335.
21. Arulazhagan P, Vasudevan N. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain Ochrobactrum sp. VA1. Marine pollution bulletin. 2011;62(2): 388-94.
22. Gran-Scheuch A, Fuentes E, Bravo DM, Jiménez JC, Pérez-Donoso JM. Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from diesel fuel-contaminated Antarctic soils. Frontiers in microbiology. 2017;8:1634.
23. Hou N, Zhang N, Jia T, Sun Y, Dai Y, Wang Q, et al. Biodegradation of phenanthrene by biodemulsifier-producing strain Achromobacter sp. LH-1 and the study on its metabolisms and fermentation kinetics. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018;163:205-14.
24. Zhao J-K, Li X-M, Ai G-M, Deng Y, Liu S-J, Jiang C-Y. Reconstruction of metabolic networks in a fluoranthene-degrading enrichments from polycyclic aromatic hydrocarbon polluted soil. Journal of Hazardous Materials. 2016;318:90-8.
25. Basim Y, Mohebali G, Jorfi S, Nabizadeh R, Moghadam MA, Ghadiri A, et al. Bacterial strains diversity in contaminated soils and their potential for bioremediation of total petroleum hydrocarbons in south west of Iran. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 2022;20(2):601-8. [In Persian].
26. Abed RM, Al-Kharusi S, Al-Hinai M. Effect of biostimulation, temperature and salinity on respiration activities and bacterial community composition in an oil polluted desert soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 2015;98:43-52.
27. Okere UV, Cabrerizo A, Dachs J, Jones KC, Semple KT. Biodegradation of phenanthrene by indigenous microorganisms in soils from Livingstone Island, Antarctica. FEMS microbiology letters. 2012;329(1):69-77.

28. Liu X-x, Hu X, Cao Y, Pang W-j, Huang J-y, Guo P, et al. Biodegradation of phenanthrene and heavy metal removal by acid-tolerant Burkholderia fungorum FM-2. Frontiers in microbiology. 2019;10:408.
29. Al-Thukair AA, Malik K. Pyrene metabolism by the novel bacterial strains Burkholderia fungorum (T3A13001) and Caulobacter sp (T2A12002) isolated from an oil-polluted site in the Arabian Gulf. International Biodeterioration & Biodegradation. 2016;110:32-7.
30. Lin M, Hu X, Chen W, Wang H, Wang C. Biodegradation of phenanthrene by Pseudomonas sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014;94:176-81.
31. Peekate P, Abu G. Optimizing C: N ratio, C: P ratio, and pH for biosurfactant production by Pseudomonas fluorescens. Journal of Advances in Microbiology. 2017;7(2):1-14.
32. Kalantary RR, Mohseni-Bandpi A, Esrafili A, Nasseri S, Ashmagh FR, Jorfi S, et al. Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 2014;12:1-9. [In Persian].
33. Zheng J, Feng J-Q, Zhou L, Mbadinga SM, Gu J-D, Mu B-Z. Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2018;34:1-11.