Journal of Microbial World
Volume 13, No. 3, September 2020

Original Article

# Isolation of Fluorene Degrading Microorganisms from Sediments of the Southern Caspian Sea Coasts and Evaluation of Their Bioremediation Potential

**Ehteram S. Rahimi[1], Jamshid Fooladi[2], Gholamhossein Ebrahimipour[3], Mohammad Reza Soudi[4], Tayebeh Fooladi[5]**

[1]PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran .[2]Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. [4]Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University , Tehran, Iran. [5]Postdoctoral Researcher, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

## Abstract

*Background & Objectives*: Polycyclic aromatic hydrocarbons are one of the most important environmental pollutants. Bioremediation using microorganisms is a cost-effective and safe method for the removal or conversion of these pollutants to less toxic substances. This study aimed to isolate and introduce fluorene-degrading microorganisms from the southern coast of the Caspian Sea.

*Materials and Methods*: The mixed microbial culture enrichment and isolation was done in salt-based culture medium containing fluorene. The qualitative analysis of fluorene degradation in the solid basal salt medium was investigated. The rate of fluorene removal by the isolated mixed microbial culture was also determined using gas chromatography in a liquid salt base medium. The molecular identification of the fungal and bacterial isolates was performed using the sequential analysis of the ITS protected region and 16S rRNA sequencing, respectively.

*Results*: The mixed microbial culture including bacterial isolates (belonging to the genus *Pseudomonas*, *Acromobacter*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, and *Rhodococcus*) and fungal isolate (belonging to the genus *Fusarium*) was enriched and isolated. Chromatographic analysis showed that the mixed microbial culture was able to degrade 87% of fluorene (200 mg/l) in a basal salt medium at 30 °C, pH 7 and 7 days of incubation.

*Conclusion*: According to the results, the mixed microbial can remove a large amount of fluorene from the basal salt medium under the mentioned conditions and it is possible that under a similar situation, it can remove a large amount of fluorene or structurally related compounds from the contaminated area through bioremediation.

*Keywords*: Biodegradation, Fluorene, Gas chromatography, Marine environment.

**Correspondence to**: Jamshid Fooladi

Tel: +98 2185693013

E-mail: jfooladi@alzahra.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(3): 239-252.

DOI:

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 سیزهم شماره سوم (پیاپی ۴۴) پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۲۵۲-۲۳۹

Original Article

# جداسازی میکروارگانیسم های تجزیه کننده فلورن از رسوبات سواحل جنوبی دریای خزر به منظور ارزیابی توان اصلاح زیستی

**احترام سادات رحیمی[۱]، جمشید فولادی*[۲]، غلامحسین ابراهیمی پور[۳]، محمدرضا صعودی[۴] و طیبه فولادی[۵]**

[۱]دانشجوی دکترا، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران. [۲]دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران. [۳]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. [۴]استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران. [۵]محقق پسادکترا،گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران.

## چکیده

*سابقه و هدف:* هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، یکی از مهمترین آلاینده های زیست محیطی هستند. پاکسازی زیستی با استفاده از میکروارگانیسم ها، روشی مقرون به صرفه و ایمن جهت حذف و یا تبدیل این آلاینده ها به ترکیباتی با سمّیت کمتر است. این مطالعه با هدف جداسازی و معرفی میکروارگانیسم های تجزیه کننده فلورن از سواحل جنوبی دریای خزر انجام گردید.

*مواد و روش ها:* غنی سازی و جداسازی مخلوط میکروبی، در محیط کشت پایه نمکی حاوی فلورن انجام شد. تجزیه کیفی فلورن در محیط پایه نمکی جامد بررسی شد. میزان تجزیه فلورن توسط مخلوط میکروبی نیز با استفاده از کروماتوگرافی گازی در محیط پایه نمکی مایع تعیین شد. شناسایی مولکولی جدایه های باکتریایی و قارچی به ترتیب با تعیین توالی 16S rRNA و ناحیه محافظت شده ITS انجام گردید.

*یافته ها:* مخلوط میکروبی شامل سویه های باکتریایی (متعلق به جنس های *سودوموناس*، *آکروموباکتر*، *کریزئوباکتریوم*، *میکروباکتریوم* و *رودوکوکوس*) و سویه ی قارچی (متعلق به جنس *فوزاریوم*) غنی سازی و جداسازی شد. آنالیزکروماتوگرافی نشان داد که مخلوط میکروبی قادر است در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، اسیدیته ۷ و طی ۷ روز گرماگذاری، ۸۷٪ از فلورن با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر را در محیط پایه نمکی تجزیه کند.

*نتیجه گیری:* با توجه به نتایج، مخلوط میکروبی در شرایط یاد شده بخش گسترده ای از فلورن را از محیط پایه نمکی حذف می کند و در شرایط مشابه، ممکن است بتواند از طریق پاکسازی زیستی بخش چشمگیری از فلورن و یا ترکیبات دارای ساختار مشابه را از منطقه آلوده حذف کند.

*واژگان کلیدی:* تجزیه زیستی، فلورن، گاز کروماتوگرافی، محیط دریایی.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹۹ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹۹

## مقدمه

دریای خزر، بزرگترین دریاچه جهان و محصور درخشکی است که آلودگی هایی مانند پساب آلاینده های مختلف ناشی از مناطق حوزه آبریز ساحلی و نشت تولیدات نفتی از این دریا خارج نشده و در آن تجمع می یابد (۱). در حاشیه این دریا و همچنین رودهای بزرگ ورودی به آن، نظیر ولگا، دهها پالایشگاه، مجتمع پتروشیمی، صنایع سنگین و سبک، صنایع سلولزی و چوب، کارخانجات رنگ و صنایع مختلف وجود

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه الزهرا (س)، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی.
تلفن: ۰۲۱۸۵۶۹۳۰۱۳ پست الکترونیک: jfooladi@alzahra.ac.ir

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.

دارد و فاضلابهای شهری، صنعتی وکارخانجات شیمیایی ده ها شهر بزرگ به صورت تصفیه نشده به این دریا تخلیه می شوند (۲). از طرف دیگر بنادری مانند باکو نیز با بیشترین میزان آلودگی نفتی، یکی از مهمترین عوامل آلودگی نفتی دریای خزر است. با توجه به اینکه جهت جریان های دریایی در دریای خزر خلاف جهت عقربه ساعت است، بنابراین آلودگی های نفتی در سواحل شمالی این دریا از طریق چرخش های آبی به سواحل جنوبی دریای خزر خواهد رسید (۳). درحال حاضر، در سواحل جنوبی دریای خزر عملیات استخراج نفت وجود ندارد امّا فعالیت واردات مواد نفتی در این مناطق انجام شده و مناطق بندری در این سواحل در معرض آلودگی نفتی ناشی از نشت نفت در پایانه های نفتی و تخلیه غیر مجاز مواد زائد نفتی شناورهای مختلف هستند. بندر انزلی در بخش غربی سواحل جنوبی دریای خزر قرار داشته و قدیمی ترین بندر ایران در این دریا است. فعالیت های تجاری این بندر که بخشی از آن را واردات گازوییل و بنزین تشکیل می دهد، از طریق اسکله های تجاری آن انجام شده و می تواند یکی از عوامل آلوده کننده دریا باشد. تحقیقات زیست محیطی بندرانزلی به دلیل مجاورت آن با تالاب انزلی که یکی از مهمترین تالاب های جهان است، از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۴). هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons= PAHs)، دارای دو یا چند حلقه آروماتیک متصل به هم با تنظیمات ساختاری مختلف، از مهمترین آلاینده های آب، هوا و رسوبات به شمار می روند (۵). عواملی مانند ساختارشیمیایی، غلظت، پراکندگی و دسترسی زیستی PAHs، تعیین کننده پایداری آنها در محیط زیست هستند. علاوه بر این، طول مدّت پایداری PAHs در محیط تحت کنترل عواملی مانند نوع و ساختار خاک، اسیدیته، دما، میزان اکسیژن، مواد مغذّی و آب جهت فعالیت میکروارگانیسم های تجزیه کننده است (۶ و ۷). فاضلاب های صنعتی و خانگی، استخراج مواد نفتی و کارخانه های تولید کننده دارو، رنگ، پلاستیک و حشره کش از جمله عوامل اصلی ورود PAHs به محیط زیست هستند (۸). با وجود اینکه PAHs در محیط تحت تأثیر فرآیندهای مختلفی از قبیل جذب، تبخیر، تجزیه نوری و شیمیایی قرار می گیرند، امّا تجزیه زیستی مهمترین مسیر تجزیه این هیدروکربن ها است (۹). در پاکسازی زیستی، می توان با استفاده از اجزاء سلولی میکروارگانیسم ها یا فعالیت های آنها، ترکیبات سمّی را از محیط حذف و یا به ترکیبات غیر سمّی و بی خطر تبدیل کرد. پاکسازی زیستی می تواند از طریق روند طبیعی تجزیه زیستی، ایجاد شرایط محیطی مناسب و وارد کردن سویه های میکروبی غیر بومی انجام شود (۱۰). امّا سویه های میکروبی بومی هر منطقه به دلیل سازگاری بیشتر با عوامل محیطی، در پاکسازی زیستی کارایی بیشتری دارند (۱۱). باکتریها و قارچها قادرند در فرآیندهای بیوسنتزی سلولی از کربن موجود در هیدروکربن های نفتی استفاده کنند (۱۲). البته باکتریها به دلیل فراوانی زیاد، بالا بودن سرعت رشد و قابلیت استفاده از هیدروکربن های متنوع، در پاکسازی زیستی اهمیت بیشتری دارند (۱۳). فلورن (Fluorene)، یک هیدروکربن آروماتیک سه حلقه ای است که در ساختار آن دو حلقه بنزنی توسط یک حلقه پنج عضوی به هم متصل شده اند (۱۴). این هیدروکربن ازسوختن سوخت های فسیلی ایجاد شده و در اتمسفر و رسوبات دریا یافت می شود (۱۵). فلورن، به شدت سمّی بوده و می تواند بالقوّه سرطان زا باشد (۱۶ و ۱۷). هم چنین فلورن یکی از۱۶ ترکیب هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای است که در فهرست آلاینده های مهمّ سازمان حفاظت از محیط زیست ایالات متحده آمریکا قرار گرفته است و به دلیل داشتن ارتباط ساختاری با ترکیبات مهمّی مانند کربازول ها، دی بنزوتیوفن ها و دی بنزوفوران ها در مطالعات تجزیه زیستی به عنوان مدلی مفید مورد استفاده قرار می گیرد (۱۸). درپژوهش حاضر، جداسازی و شناسائی میکروارگانیسم های بومی تجزیه کننده فلورن از رسوبات سواحل جنوبی دریای خزر و ارزیابی توان آنها در اصلاح زیستی، به منظور استفاده از آنها در پاکسازی زیستی فلورن و یا ترکیبات مرتبط از لحاظ ساختاری در منطقه آلوده انجام شد.

## مواد و روش ها

*الف) نمونه برداری، انتقال و نگهداری نمونه:*

به منظور جداسازی باکتریهای تجزیه کننده فلورن، نمونه برداری از رسوبات سطحی سواحل جنوبی دریای خزر واقع در اسکله بندر انزلی با مشخصات جغرافیایی 37º 28′ 17.52″ N, 49º 27 ′78.30 ″ E در عمق حدود ۳ متری با استفاده از گرپ و در سه تکرار انجام شد. نمونه ها در شرایط استریل و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش های بعدی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه داشته شد.

*ب) غنی سازی و جداسازی مخلوط میکروبی تجزیه کننده فلورن:*

در این مرحله، ازمحیط پایه نمکی BSM (Basal Salt Medium) با pH ۷/۰±۰/۲ استفاده شد. محیط پایه نمکی در یک لیتر آب مقطر، حاوی ۲ گرم $(NH4)_2SO_4$، ۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۱/۵ گرم $Na_2HPO_4.12H_2$، ۰/۵ گرم $KH_2PO_4$، ۰/۰۱ گرم $CaCl_2.2H_2O$ و ۰/۰۰۱ گرم $FeSO_4.7H_2O$ (Merck آلمان) بود. فلورن (Merck آلمان) در استون (Scharlau اسپانیا) حل شد و پس از استریلیزاسیون با فیلتر سرسرنگی PTFE (۰/۲۲ میکرومتر) (MS آمریکا) به عنوان منبع کربن و انرژی با غلظت نهایی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در شرایط استریل به فلاسک های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیترمحیط پایه نمکی اضافه شد. حلال پراکنی در فلاسک ها قبل از تلقیح نمونه رسوب، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور شیکر ۱۵۰rpm به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سپس حدود ۲ گرم از نمونه رسوب سطحی به فلاسک ها اضافه شد و به همراه فلاسک های شاهد (۱): محیط پایه نمکی، (۲): محیط پایه نمکی+ نمونه رسوب سطحی، (۳): محیط پایه نمکی + فلورن) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰rpm به مدت ۱۰ روز و در تاریکی جهت جلوگیری از اکسیداسیون نوری، گرماگذاری شدند. در طول مراحل غنی سازی، رشد میکروبی در فلاسک ها از طریق کاهش میزان بلورهای فلورن، تغییر رنگ محیط کشت و افزایش کدورت حاصل از رشد مخلوط میکروبی بررسی شد. پس از گذشت ۱۰ روز، از ۵ میلی لیتر ازکشت غنی شده قبلی به عنوان مایه تلقیح استفاده شده و در شرایط یاد شده گرماگذاری گردید. غنی سازی تا زمان ایجاد کدورت حاصل از یک مخلوط میکروبی پایدار (در چهار مرحله) تکرار شد. توده میکروبی بدست آمده در آخرین مرحله غنی سازی به همراه ۳۰٪ گلیسرول (v/v) در دمای ۸۰- درجه سلسیوس ذخیره و نگهداری شد. در آزمایش های بعدی از این سوسپانسیون سلولی برای تلقیح به فلاسک های حاوی محیط کشت پایه نمکی و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر فلورن، جهت تهیه پیش کشت استفاده شد. هم چنین جهت جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسم ها از این سوسپانسیون سلولی، سری رقت های ده تایی در محلول سدیم کلراید ۰/۸۵٪ (w/v) استریل تهیه و بر روی محیط های کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar=NA) و پوتیتودکستروزآگار (Potato Dextrose Agar=PDA)، منتقل و پخش گردیدند. محیط های کشت به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. در ادامه خالص سازی میکروارگانیسم های رشد یافته درشرایط یادشده انجام شد.

*ج) ارزیابی کیفی تجزیه فلورن:*

جهت بررسی کیفی تجزیه فلورن توسط مخلوط میکروبی، از Spray-plate method، با اندکی تغییراستفاده شد. بدین منظور، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخلوط میکروبی غنی شده بر روی محیط پایه نمکی جامد منتقل و به صورت سطحی کشت داده شد. پس ازگذشت ۱۵-۱۰ دقیقه، محلول فلورن در استون که با فیلتر سرسرنگی PTFE (۰/۲۲ میکرومتر) استریل شده بود، بر روی محیط اسپری شد، به طوری که پس از حلال پراکنی یک لایه نازک از فلورن بر روی محیط کشت ایجاد گردد. پلیت ها به مدت ۱۰ الی ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند و روزانه از نظر ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی، که نشان دهنده مصرف فلورن می باشد، بررسی شدند. جهت اطمینان از رشد مخلوط میکروبی با مصرف فلورن به عنوان منبع کربن، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط میکروبی غنی شده بر روی محیط پایه نمکی جامد و عاری از فلورن به عنوان شاهد کشت داده شد. هم چنین برای جلوگیری

از رشد باکتری های الیگوتروف در ناخالصی های آگار، از آگارز (Cleaver Scientific انگلستان) با درجه الکتروفورز جهت تهیه محیط کشت استفاده شد (۱۹ و ۲۰). به طور مشابه ارزیابی کیفی تجزیه فلورن برای جدایه های خالص باکتریایی نیز انجام شد.

*د) ارزیابی کمّی تجزیه فلورن:*

به منظور بررسی تجزیه کمّی فلورن، پس از تهیه پیش کشت از مخلوط میکروبی در محیط پایه نمکی مایع، حجم معینی از آن به فلاسک های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت پایه نمکی مایع اضافه شد (فلورن با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، $OD_{600}$ nm نهایی محیط کشت ۰/۲) و به همراه فلاسک های شاهد (۱): محیط پایه نمکی، (۲): محیط پایه نمکی+ مخلوط میکروبی، (۳): محیط پایه نمکی + فلورن) در مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰rpm، گرماگذاری شدند. جهت ارزیابی میزان رشد میکروبی، میزان جذب نوری بر اساس میزان کدورت حاصل از رشد در طول موج ۶۰۰ نانومتر و تعداد واحد تشکیل دهنده ی کلنی (Colony Forming Unit) در روزهای ۱، ۲، ۴، ۶، ۷ (در سه تکرار) مورد بررسی قرار گرفت. به طور مشابه ارزیابی کمّی تجزیه فلورن برای جدایه های خالص باکتریایی نیز انجام شد.

*هـ) آنالیز میزان حذف فلورن:*

استخراج باقیمانده فلورن از محیط کشت در ابتدای آزمایش و در روزهای ۱، ۲، ۴، ۶ ، ۷ و بر اساس روش ارائه شده توسط Wu و همکاران (۲۰۱۰) با اندکی تغییر انجام شد. سپس آنالیز کمّی فلورن با استفاده ازکروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography=GC) انجام گردید. ابتدا به هر فلاسک، ۲۵ میلی لیتر دی کلرومتان (Chem Lab بلژیک) اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰rpm بر روی شیکر به خوبی مخلوط گردید. سپس مخلوط ایجاد شده به قیف جداکننده منتقل شده و فاز آلی و آبی از هم جدا شدند. فاز آلی برای دفعه دوم نیز توسط ۲۵ میلی لیتر دی کلرومتان استخراج گردید. در پایان، دو استخراج با هم مخلوط و توسط سولفات سدیم به طور کامل آب گیری شدند و حجم نهایی به ۵۰ میلی لیتر رسانیده شد. یک میکرولیتر از محلول نهایی استخراج، به دستگاه کروماتوگرافی گازی (Shimadzu ژاپن) مجهز به آشکار ساز FID تزریق گردید. ستون استفاده شده در دستگاه از نوع DB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵/۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر بود. دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سلسیوس و دمای آشکار ساز ۳۰۰ درجه سلسیوس بود و از گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل استفاده شد. برنامه دمایی آون ابتدا بر روی ۸۰ درجه سلسیوس تنظیم گردید، سپس با سرعت ۱۰ درجه سلسیوس در دقیقه، دما تا ۳۰۰ درجه سلسیوس افزایش یافت. آنالیز کیفی فلورن باقیمانده بر اساس زمان بازداری و آنالیز کمّی آن نیز بر اساس سطح زیر نمودار محاسبه شد. جهت دقّت در سنجش کمّی فلورن باقیمانده، از روش استاندارد خارجی (External Standard) استفاده شد. بدین منظور قبل از تزریق نمونه های مجهول به دستگاه، محلول فلورن در دی کلرو متان با غلظت های ۱۰، ۲۵، ۵۰ ، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و پس از تزریق نمونه های استاندارد به دستگاه کروماتوگرافی گازی، منحنی کالیبراسیون فلورن رسم شد (۲۱).

*و) شناسایی جدایه های غالب مخلوط میکروبی:*

شناسایی مولکولی جدایه های باکتریایی با استفاده از توالی یابی ژن های 16S rRNA انجام گردید. به این منظور سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه بر روی محیط NA در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، در آب مقطر استریل تهیه شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت GTP (پیشگامان انتقال ژن ایران) انجام گردید. کیفیّت و کمیّت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Biotek آمریکا) تعیین شد. تأیید استخراج DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (Solarbio چین) ۱٪ افقی انجام شد. جهت تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای عمومی 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و 1492R (5′-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3′) استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction=PCR) با حجم نهایی

۲۵ میکرولیتر شامل ۱۹/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X ، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (با غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم polymerase Taq DNA (با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر) (Jena Bioscience آلمان) و ۱ میکرولیتر DNA ی الگو (با غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر) انجام گردید. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر (Techne انگلستان) به صورت: ۱۰ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم گردید. پس از بررسی محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز، تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA (محصول های PCR خالص شده) با دوبار خوانش توسط پرایمرها مطابق روش سنگر توسط شرکت Bioneer Inc. انجام گردید. پس از ویرایش توالی ها با نرم افزار Bioedit، مقایسه آنها با سایر توالی های موجود در پایگاه EzBiocloud (http://www.ezbiocloud.net) و همچنین در پایگاه NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) انجام شد. هم ترازی چندتایی توالی مورد نظر با توالی گونه های نزدیک با استفاده ازآلگوریتم Clustal W موجود در نرم افزار MEGA7 تعیین و درخت فیلوژنتیکی نیز با استفاده از روش Neighbor-joining در این نرم افزار رسم شد. سطوح اطمینان شاخه ها نیز توسط آنالیز Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار تخمین زده شد. شناسایی مولکولی جدایه قارچی بر اساس آنالیز توالی ناحیه ی محافظت شده ITS (Internal Transcribed Spacer) انجام گردید. DNA ژنومی از میسلیوم های حاصل از کشت سه روزه ی قارچ در محیط YPG (Yeast Extract–Peptone–Glycerol) بر اساس روش ارائه شده توسط صبا (Saba) و همکاران (۲۰۱۶) استخراج شد (۲۲). پس از تعیین غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن، تکثیر ITS با استفاده از جفت پرایمرهای عمومی ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) و ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) انجام شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۹/۷۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (با غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر10X، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر(با غلظت ۱۰۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر DNA ی الگو (با غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNA Taq polymerase (با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر) (Jena Bioscience آلمان) تهیه شد. واکنش PCR شامل برنامه ی دمایی به صورت: ۱۰دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۶ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. مراحل بعدی نیز مطابق با شرایط یاد شده در بخش باکتریها، انجام شد.

## یافته ها

*الف) جداسازی مخلوط میکروبی تجزیه کننده فلورن:* در هر بار غنی سازی(پس از ۱۰ روز)، کاهش کریستال های فلورن و کدورت ناشی از رشد میکروبی در محیط پایه نمکی مایع مشاهده و وجود میکروارگانیسم ها نیز از طریق رنگ آمیزی گرم تأیید شد. در پایان مراحل غنی سازی، یک کشت مخلوط میکروبی تجزیه کننده ی فلورن (به نام CS-F) پس از چهار بار غنی سازی انتخابی توسط واکشت های مکرر در محیط پایه نمکی حاوی فلورن جداسازی شد. همچنین توانایی تجزیه ی فلورن توسط این مخلوط میکروبی در محیط پایه نمکی جامد حاوی فلورن از طریق تشکیل هاله ی شفافی که با انتشار رنگ زرد در اطراف آن همراه بود، تأیید شد. این مخلوط

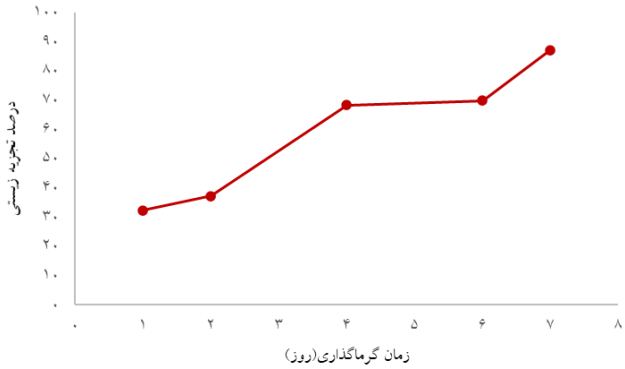
میکروبی شامل ۶ سویه ی باکتریایی (CS-F1, CS-F2, CS-F3, CS-F4, CS-F5, CS-F6) و یک سویه ی قارچی (CS-F7) بود. چهار سویه ی باکتریایی گرم منفی و دو نمونه دیگر گرم مثبت بودند. رنگ و خصوصیات ظاهری کلنی سویه های باکتریایی متفاوت بود، اما همه ی آنها میله ای شکل بودند. با وجود اینکه بررسی رشد جدایه های منفرد باکتریایی در محیط پایه نمکی جامد و مایع (حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر فلورن) نشان داد که همه ی آنها قادر به استفاده از فلورن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی هستند، اما به دلیل اینکه مخلوط میکروبی CS-F در مقایسه با جدایه های خالص شده، میزان بیشتری از فلورن را تجزیه کرده و رشد بیشتری را در محیط های یاد شده نشان داد، در ادامه ی مراحل پژوهش از این مخلوط میکروبی استفاده شد.

*ب) بررسی میزان رشد مخلوط میکروبی و میزان تجزیه فلورن:*

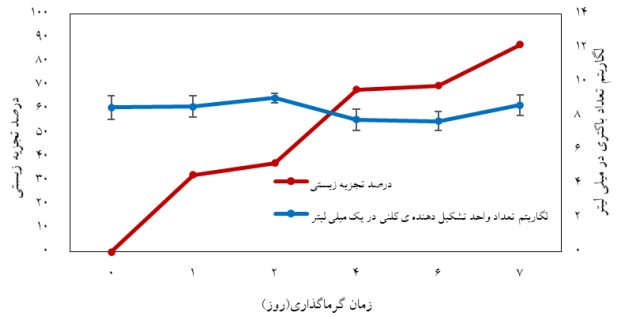
کشت مخلوط میکروبی CS-F در محیط پایه نمکی مایع (حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر فلورن) در مدت هفت روز گرماگذاری، نشان داد که با افزایش زمان، فلورن بیشتری تجزیه شده است. همانطور که در نمودار (۱) نشان داده شده است، در طی یک روز گرماگذاری حدود ۳۰٪ از فلورن تجزیه شد اما در در فاصله ی روزهای دوم تا چهارم، تجزیه ی فلورن توسط مخلوط میکروبی CS-F به مقدار قابل توجهی افزایش پیدا کرده و در روز هفتم به بالاترین مقدار خود یعنی ۸۷٪ رسیده است. هم چنین بررسی تراکم جمعیت میکروبی و میزان جذب نوری در طول دوره ی گرماگذاری، نشان داد که رابطه مستقیمی بین این دو عامل و میزان تجزیه فلورن وجود دارد. به طوری که با افزایش تراکم و کدورت میکروبی، فلورن بیشتری مصرف شده و مقدار باقی مانده ی فلورن نیز کاهش می یابد (نمودار ۲ و ۳). مقایسه کروماتوگرامهای GC برای مخلوط میکروبی CS-F نیز در مقایسه با نمونه شاهد (از طریق منحنی های کالیبراسیون فلورن) نشان داد که با مصرف فلورن، ارتفاع پیک فلورن در روز هفتم نسبت به روز اول به طرز چشمگیری کاهش یافته است (شکل ۱).

*ج) شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک جدایه های میکروبی:*

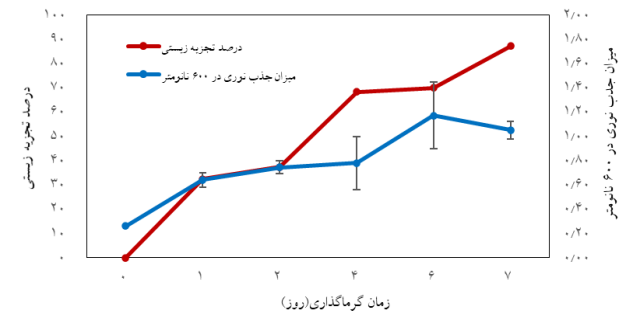
شناسایی مولکولی ۶ جدایه ی باکتریایی موجود در مخلوط



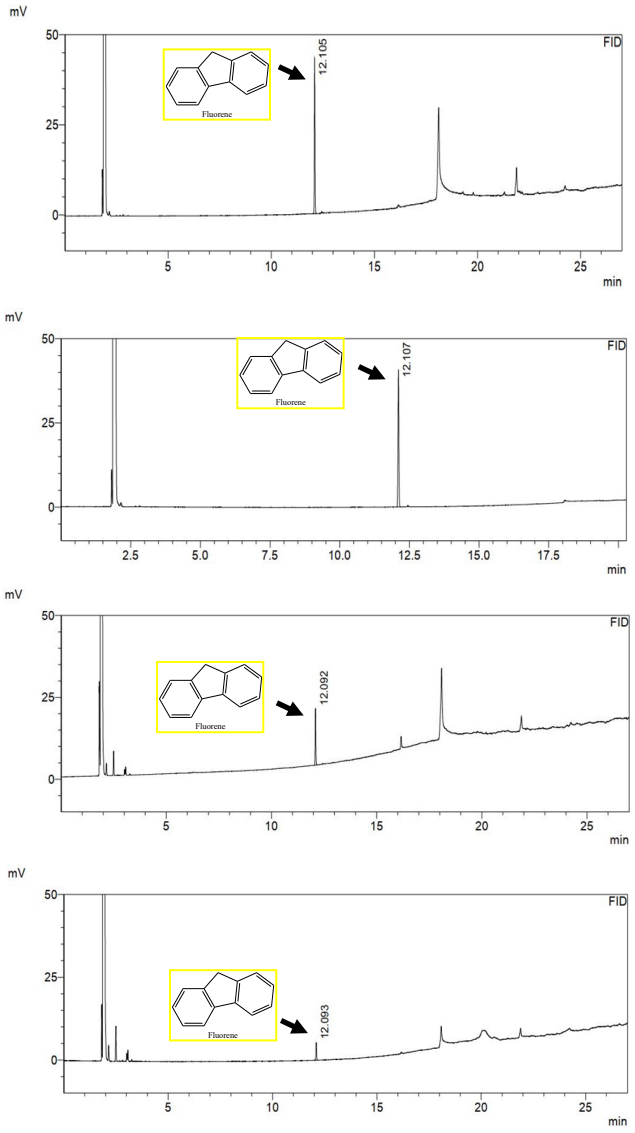

نمودار۱: بررسی درصد تجزیه ی فلورن توسط کشت مخلوط میکروبی CS-F در مدت ۷ روز (غلظت اولیه فلورن: ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، دمای گرما گذاری ۳۰ ºC و دور شیکر ۱۵۰ rpm).




نمودار۲: ارتباط بین میزان رشد مخلوط میکروبیCS-F بر اساس واحد تشکیل دهنده ی کلنی در یک میلی لیتر و درصدتجزیه فلورن در مدت ۷ روز (غلظت اولیه فلورن: ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، دمای انکوباسیون ۳۰ ºC و دور شیکر ۱۵۰ rpm).

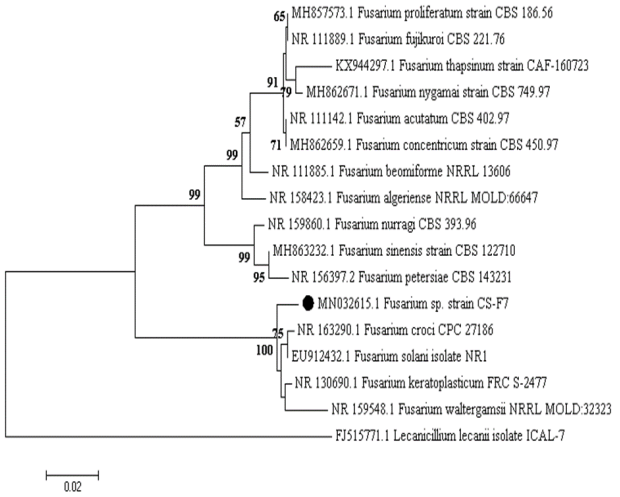



نمودار۳: ارتباط بین میزان جذب نوری کشت مخلوط میکروبیCS-F و درصد تجزیه فلورن در مدت ۷ روز (غلظت اولیه فلورن: ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، دمای گرماگذاری ۳۰ ºC و دور شیکر ۱۵۰ rpm).



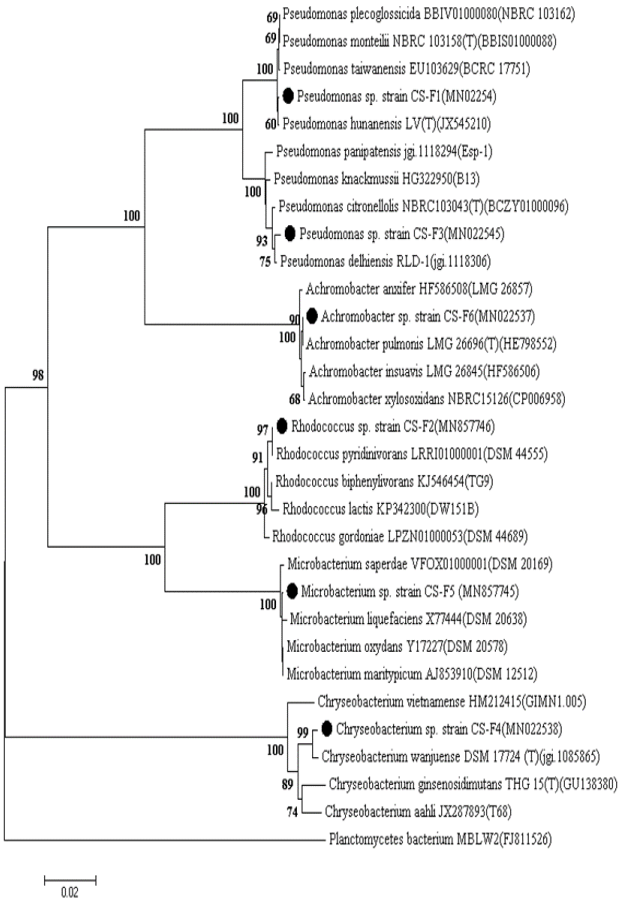

شکل ۱: کروماتوگرام های تجزیه فلورن توسط مخلوط میکروبی CS-F در روزهای اول، دوم، ششم و هفتم که با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی بدست آمده است.

میکروبی CS-F، با بررسی توالی ژن 16S rDNA انجام شد. تجزیه و تحلیل مولکولی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی EzBiocloud نشان داد که این باکتریها به چهار راسته ی مختلف تعلق دارند. همانطور که در درخت فیلوژنتیکی مشاهده می شود (شکل ۳)، جدایه های CS-F1 و CS-F3 به راسته ی سودوموناداِل *(Pseudomonadales)* و جدایه ی CS-F6 به راسته ی بورخولدریال *(Burkholderiales)* تعلق دارند. جدایه های CS-F2 و CS-F5 در راسته ی *اکتینوماِیستال*




شکل ۲: درخت فیلوژنتیک توالی های ناحیه ITS با استفاده از روش Neighbor joining و ضریب Boot Strap صد. موقعیت جدایه ی CS-F7 را در میان گونه های خویشاوند در راسته ی هایپوکرال (Hypocreales) نشان می دهد. سویه ی *Lecanicillium lecanii* isolate ICAL-7 (FJ515771.1) به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد.

*(Actinomycetales)* و جدایه ی CS-F4 نیز در راسته ی *فلاووباکتریال (Flavobacteriales)* قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جدایه های CS-F1، CS-F2، CS-F5 و CS-F6، به ترتیب بیش از ۹۹٪ به سویه های *سودوموناس هونانسیس (Pseudomonas hunanensis)*، *رودوکوکوس پیریدینی ورانس (Rhodococcus pyridinivorans)*، *میکروباکتریوم اکسیدانس (Microbacterium oxydans)* و *آکروموباکتر پولمونیس (Achromobacter pulmonics)* شباهت دارند. جدایه های CS-F3 و CS-F4 نیز به ترتیب ۹۸٪ به سویه های *سودوموناس دلهینسیس (Pseudomonas delhiensis)* و *کریزئوباکتریوم وانجوانس (Chryseobacterium wanjuens)* شباهت نشان دادند (جدول ۱). تجزیه و تحلیل توالی ناحیه ITS ریبوزومی تکثیر شده جدایه قارچی (CS-F7) در پایگاه اطلاعاتی NCBI و مقایسه آن با توالی های مشابه از طریق نرم افزار BLAST نشان داد که این جدایه به خانواده ی *نکتریاسه (Netriaceae)* و جنس *فوزاریوم (Fusarium)* تعلق دارد (شکل ۲). هم چنین این جدایه، بیش از ۹۹٪ به سویه ی *Fusarium* sp. GX1-5B شباهت دارد (جدول ۱).




شکل ۳: درخت فیلوژنتیک توالی های ژن 16S rRNA سویه های جدا شده با استفاده از روش Neighbor joining و ضریب Boot Strap صد. موقعیت جدایه های CS-F6, CS-F5, CS-F4, CS-F3, CS-F2, CS-F1 را در میان گونه های خویشاوند در بانک ژن نشان می دهد. سویه ی *Planctomycetes bacterium* MBLW2 (FJ811526) به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد.

جدول ۱: میزان شباهت سویه های باکتریایی و قارچی با نزدیکترین سویه به ترتیب در پایگاه داده EzBiocloud و NCBI.

| سویه | شماره دسترسی در Genebank | سویه نزدیک | میزان شباهت (درصد) |
|---|---|---|---|
| CS-F1 | MN022540 | *Pseudomonas hunanensis* LV(T) | 99.72 |
| CS-F2 | MN857746 | *Rhodococcus pyridinivorans* LRRI01000001 | 99.85 |
| CS-F3 | MN022545 | *Pseudomonas delhiensis* RLD-1 | 98.13 |
| CS-F4 | MN022538 | *Chryseobacterium wanjuense* DSM 17724 | 98.18 |
| CS-F5 | MN857745 | *Microbacterium oxydans* Y17227 | 99.78 |
| CS-F6 | MN022537 | *Achromobacter pulmonis* LMG 26696 | 99.78 |
| CS-F7 | MN032615 | *Fusarium* sp. GX1-5B | 99.23 |

## بحث

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، یکی از متداول ترین آلاینده های زیست محیطی هستند که به مدت طولانی در محیط پایدار هستند. شواهد نشان می دهد که در محیط های دریایی، به دلیل میل ترکیبی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به ذرات جامد، بیشترین مقدار و تجمع این آلاینده ها در رسوبات دیده می شود (۲۳). فلورن یکی از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای سبک است که به همراه مشتقاتش، همواره در نمونه های محیطی یافت می شود. وجود این ترکیبات در خاک، رسوبات و حتی ماهیها به اثبات رسیده است (۲۴). در پژوهش حاضر، جداسازی، شناسایی و بررسی توانایی تجزیه زیستی فلورن توسط میکروارگانیسم های جدا شده از رسوبات سواحل جنوبی دریای خزر انجام گردیده که به عنوان اولین گزارش از این منطقه ارائه شده است. هر چند محققین دیگر برخی از باکتری های تجزیه کننده ی نفت خام و سایر PAHs را از این محیط دریایی جداسازی و شناسایی کرده اند (۲۵). توانایی مخلوط میکروبی غنی سازی شده وجدایه های خالص باکتریایی در میزان تجزیه زیستی فلورن از نظر کیفی و کمّی به ترتیب در محیط پایه نمکی جامد و مایع حاوی فلورن سنجیده شد. مخلوط میکروبی CS-F در هر دو نوع محیط کشت، نسبت به سویه های خالص میزان بیشتری از فلورن را تجزیه کرد. شهریاری مقدم و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که سویه های خالص و کنسرسیوم باکتریایی غنی سازی شده از رسوبات خلیج نایبند قادرند در مدت ۷ روز به ترتیب حداکثر ۹٪ و ۶۴٪ از فلورن را با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر تجزیه کنند (۲۶). در پژوهش های متعددی مشخص شده است که تجزیه زیستی توسط مخلوط میکروبی نسبت به کشت خالص کاراتر است. این امر می تواند ناشی از توانایی بیشتر آنزیمی و هم چنین فرآیند های کومتابولیسمی مخلوط میکروبی نسبت به جدایه های خالص باشد (۲۷ و ۲۸). همچنین ممکن است تمام سویه های موجود در کشت مخلوط میکروبی قابلیت جداسازی و خالص سازی نداشته باشند، اما براساس شواهد این سویه ها می توانند در

جمعیت میکروبی نقش مهمی را در فرآیند تجزیه زیستی ایفا کنند (۲۹). با توجه به اینکه تنها منبع کربن در محیط کشت فلورن بود، افزایش جمعیت میکروبی نیز که تأیید کننده ی توانایی بیشتر مخلوط میکروبی CS-F در این پژوهش است، با مطالعات سایرین همخوانی دارد. به عنوان نمونه، اویهان (Oyehan) و همکاران (۲۰۱۶) دریافتند که ارتباط مستقیم و تقریباً کاملی بین تجزیه ی PAHs با وزن مولکولی پایین مانند فنانترن و جمعیت میکروبی وجود دارد (۳۰). کشت مخلوط میکروبی CS-F در محیط پایه نمکی جامد حاوی فلورن، علاوه بر ایجاد هاله ی شفاف، موجب زرد شدن رنگ محیط در اطراف هاله کشت شد. پژوهش ها نشان داده اند که ظهور رنگ زرد در محیط کشت پایه نمکی حاوی PAHs حاکی از تجزیه ی این ترکیبات و تجمع محصولات Meta cleavage است. از جمله گریفول (Grifoll) و همکاران (۱۹۹۲)، در پژوهشی نشان دادند که سویه ای از جنس آرتروباکتر در مسیر تجزیه ی فلورن، ترکیب حدواسطی به نام ۹- فلورنون تولید می کند که همراه با ظهور رنگ زرد در محیط کشت است (۲۴). بر اساس مشاهدات میکروسکوپی، همه ی جدایه های خالص شده ی باکتریایی از مخلوط میکروبی CS-F میله ای شکل بودند. در مطالعات متعددی، حضورباکتری های میله ای شکل در کشتهای میکروبی تجزیه کننده PAHs تأیید شده است (۳۱، ۳۲ و ۳۳). مطالعات نشان داده اند که شکل و روشهای غنی سازی باکتری ها بر غالب بودن باکتریهای میله ای شکل مؤثر است. بدیهی است که در مراحل غنی سازی، فقط سویه هایی انتخاب و خالص می شوند که علاوه بر اینکه قابل کشت هستند، مورفولوژی های غالب را تشکیل می دهند. در محیط های کشت غنی از مواد غذایی، باکتری های میله ای شکل به دلیل داشتن سطح بیشتر، از منابع کربن و انرژی بهتر استفاده کرده و سریع تر از باکتری های کروی شکل تکثیر می یابند (۳۴ و ۳۵). آنالیز توالی ژن 16S rRNA جدایه های خالص باکتریایی در مخلوط میکروبی CS-F نشان داد که این جدایه ها به جنس های *سودوموناس*، *آکروموباکتر*، *رودوکوکوس*، *میکروباکتریوم* و *کریزئوباکتریوم* تعلق دارند. این یافته می تواند به نوع آلودگی در منطقه و محل نمونه برداری بستگی داشته باشد. چنان که در مطالعات پیشین نشان داده شده است که تنوع کنسرسیوم های میکروبی در نواحی مختلف نمونه برداری از الگوی مشخصی پیروی نمی کند (۲۶ و۳۶). توانایی گونه های مختلفی از *رودوکوکوس* ها در تجزیه ی فلورن توسط محققین تأیید شده است. به عنوان نمونه، فینکل استین (Finkelstein) و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که سویه ای از جنس رودوکوکوس قادر است ۵۰٪ از فلورن را با غلظت ۵۰ الی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تجزیه کند (۳۷). بر اساس گزارش های ارائه شده، *سودوموناس ها* نیز در تجزیه ی فلورن و سایر PAHs توانایی بالایی دارند. رابودونیرینا (Rabodonirina) و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهشی نشان دادند که سویه ای از جنس سودوموناس قادر است فلورن و فنانترن را با غلظت ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب ۶۵-۸۶٪ و ۸۶-۹۵٪ در مدت ۷۲ روز تجزیه کند (۳۸). اگر چه تجزیه ی فلورن توسط باکتریهایی از جنس *آکروموباکتر*، *کریزئوباکتریوم* و *میکروباکتریوم* قبلاً گزارش نشده است، اما این باکتریها به عنوان باکتریهای تجزیه کننده ی PAHs شناخته و معرفی شده اند. این باکتریها توانستند PAHs دو تا چهار حلقه ای مانند نفتالن، فنانترن، فلورانتن و کربازول را در یک کنسرسیوم میکروبی یا سویه های خالص تجزیه کنند (۳۹، ۴۰، ۴۱ و۴۲). گزارش هایی نیز از تجزیه زیستی بنزوپیرن، نفتالن، آنتراسن، فنانترن، پایرن و بنزوپایرن توسط میکروباکتریوم ها ارائه شده است (۴۳ و۴۴). علاوه بر سویه های باکتریایی، حضور یک سویه ی قارچی نیز درمخلوط میکروبی CS-F تأیید شد. تحقیقات نشان داده است که توانایی بسیار کارای قارچها در تجزیه ی PAHs ناشی از تولید آنزیم های غیر اختصاصی مورد استفاده برای تجزیه ی طیف وسیعی از آلاینده ها است (۴۵ و ۴۶). با این حال در تجزیه زیستی آلاینده های آلی، کنسرسیوم های قارچی- باکتریایی بهتر از سویه های خالص عمل می کنند (۴۷). میسلیوم های قارچی مانند بزرگراه هایی منجر به پراکندگی باکتری های تجزیه کننده آلاینده در بستر اشباع نشده در آب شده و دسترسی باکتری ها به آلاینده ها را

افزایش می دهد (۴۸). همچنین باکتری ها و قارچ ها در مسیر تجزیه زیستی آلاینده های آلی، واسطه های متابولیکی مناسب برای یکدیگر ایجاد می کنند که منجر به تجزیه کامل آلاینده می شود. مطالعات متعددی تجزیه کومتابولیکی آلاینده های آلی توسط کنسرسیوم های قارچی- باکتریایی را تأیید کرده است. از جمله وانگ (Wang) و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که مخلوط قارچی-باکتریایی در مقایسه با مخلوط سویه های باکتریایی و مخلوط سویه های قارچی به میزان بیشتری پایرن را تجزیه کردند. به طوری که ۶۷٪ از پایرن را در مدت ۲۸ روز تجزیه و مصرف کردند (۴۹). هر چند در این پژوهش توانایی سویه ی خالص قارچی در تجزیه زیستی فلورن مورد بررسی قرار نگرفته است، اما افزایش تراکم سویه ی قارچی از طریق بررسی میکروسکوپی در طول دوره ی رشد مخلوط میکروبی RABA در محیط پایه معدنی مایع (حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر فلورن) نشان دهنده ی نقش مؤثر سویه ی قارچی در تجزیه ی فلورن می باشد. تجزیه و تحلیل توالی ناحیه ITS ریبوزومی تکثیر یافته از جدایه ی قارچی نشان داد که این قارچ متعلق به جنس *Fusarium* است. توانایی گونه های خاصی از این قارچ در تجزیه زیستی فلورن و سایر PAHs بررسی و گزارش شده است. از جمله، مارچاند (Marchand) و همکاران (۲۰۱۷) سویه ای ازجنس فوزاریوم را جداسازی کردند که قادر به تجزیه ی پایرن، فلورن، فنانترن و آنتراسن بود (۵۰).

## نتیجه گیری

نتایج حاصل ازپژوهش حاضر نشان داد که مخلوط میکروبی CS-F، جهت تجزیه زیستی فلورن بسیار کاراست. بنابراین، CS-F می تواند به عنوان یک مخلوط میکروبی بومی، کاندیدای مناسبی برای زیست پالایی فلورن و یا ترکیبات مرتبط از لحاظ ساختاری از سطح دریای خزر و منطقه ساحلی باشد. هر چند این امر نیازمند تحقیقات بیشتر بر روی این مخلوط میکروبی به ویژه از نظر روابط همزیستی بین جدایه ها، بهینه سازی شرایط تجزیه زیستی و سازگار با محیط زیست است.

## ملاحظات اخلاقی

نویسندگان مقاله نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

## تعارض در منافع

وجود ندارد.

## References


1. Karpinsky MG. Aspects of the Caspian Sea benthic ecosystem. Mar Pollut Bull. 1992; 24: 384-389.
2. Efendieva LM. Ecological problems of oil exploitation in the Caspian Sea area. J Petrol Sci Eng. 2000; 28: 228-231.
3. Korotenko KA, Mamedov RM, Kontar AE, Korotenko LA. Particle tracking method in the approach for prediction of oil slick transport in the sea: modelling oil pollution resulting from river input. J Mar Syst. 2004; 48: 159-170.
4. Hadizadeh Zaker N, Rahmani I, Shadi R, Moghaddam M. Concentrations and sources of petroleum hydrocarbons in the sediments of Anzali Port in the Caspian Sea in Iran. Journal of Environmental Studies. 2012; 37(60): 99-106. [In Persian]
5. Guntupalli S, Thunuguntla VBSC, Santha Reddy K, Issac Newton M, Rao CV, Bondili JS. Enhanced degradation of carcinogenic PAHs benzo (a) pyrene and benzo (k) fluoranthene by a microbial consortium. Indian J Sci Technol. 2016; 9(35).

**6.** Haritash AK, Kaushid CP. Biodegradation aspects of polyaromatic hydrocarbons (PAHs). J Hazard Mater. 2009; 169(1-3):1-15.

**7.** Hatzinger PB, Alexander M. Effect of aging on chemicals in soil on their biodegradability and extractability. Environ Sci Technol. 1995; 29(2): 537-545.

**8.** Hassanshahian M, Amini Boroujeni N. Enrichment and identification of naphthalene-degrading bacteria from the Persian Gulf. Mar Pollut Bull. 2016; 107: 59-65.

**9.** Yuan SY, Chang JS, Yue JH, Chang BV. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. Chemosphere. 2001; 43: 273-278.

**10.** Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 59(2-3):143-52.

**11.** Farhadian M, Duchez D, vachelard C, Larroche C. BTX removal from polluted water through bioleaching processes. Appl Biochem Biotechnol. 2008;151: 295-306.

**12.** Bamforth SM, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. J Chem Technol Biotechnol. 2005; 80(7):723-736.

**13.** Wolicka D, Suszek A, Borkoowski A, Bielecka A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. Bioresour Technol. 2009; 100: 3221-3227.

**14.** Salam BL, Obayori SO. Fluorene biodegradation potentials of Bacillus strains from tropical hydrocarbon-contaminated soils. Afr J Biotechnol. 2014; 134(14): 1554-1559.

**15.** Hadibarata T, Kristanti RA. Fluorene biodegradation and identification of transformation products by white-rot fungus Armillaria sp. F022. Biodegradation. 2014; 25: 373-382.

**16.** Lu H, Zhu L. Pollution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons in tobacco smoke. J Hazard Mater. 2007; 139: 193-8.

**17.** Yu H. Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. J Environ Sci Health. Part C: Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2002; 20: 149-83.

**18.** Casellas M, Grifoll M, Bayona JM, Solanas MA. New Metabolites in the Degradation of Fluorene by *Arthrobacter* sp. Strain F101. Appl Envion Microbiol. 1997; 63(3): 819-826.

**19.** Shao Z. Enrichment and Isolation of Hydrocarbon Degraders. In: Timmis KN, McGenity TJ, Van Der Meer JR, Lorenzo VD. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. 1St ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010; 3778-3785.

**20.** Kiyohara H, Nagao K, Yana K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Appl Environ Microbiol. 1982; 43(2): 454-457.

**21.** Wu YR, Luo ZH, Vrijmoed LL. Biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene by two *Fusarium solani* strains isolated from mangrove sediments. Bioresour Technol. 2010; 101: 9666-9672.

**22.** Saba F, Papizadeh M, Khansha J, Sedghi M, Rasooli M, Amoozegar MA, Soudi MR, Shahzadeh Fazeli SA. Rapid and reproducible genomic DNA extraction protocol for sequence-based identification of archaea, bacteria, cyanobacteria, diatoms, fungi, and green algae. J Med Bacteriol. 2016; 5(3-4): 22-28.

**23.** Perelo LW. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. J Hazard Mater. 2010; 177(1-3): 81-89.

**24.** Grifoll M, Casellas M, Bayona JM, Solanas MA. Isolation and characterization of a fluorene-Degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl Environ Microbiol. 1992; 58(9): 2910-2917.

**25.** Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Mar Pollut Bull. 2012a; 64:7-12.

**26.** Moghadam MS, Ebrahimipour G, Abtahi B, Ghassempour A, Seyed Hashtroodi M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. J Environ Health Sci Eng. 2014; 12(1):114.

**27.** Zafra G, Absalón ÁE, Anducho-Reyes MÁ, Fernandez FJ, Cortés-Espinosa DV. Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. Chemosphere. 2017; 172:120-126.

**28.** Salam LB, Obayori OS, Olatoye NO. Biodegradation of anthracene by a novel actinomycete, *Microbacterium* sp. isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30(1): 335-341.

**29.** Mueller JG, Chapman PJ, Blattmann BO, Pritchard PH. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. Appl Environ Microbiol. 1990; 56 (4): 1079-1086.

**30.** Oyehan TA, Al-Thukair AA. Isolation and characterization of PAH-degrading bacteria from the Eastern Province, Saudi Arabia. Mar Pollut Bull. 2016; 115(1): 39–46.

**31.** Nair D, Fernández-Acero FJ, García-Luque E, Riba I, Del Valls TA. Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria from sediments of Cadiz area (SW Spain). Environ Toxicol. 2008; 23(5): 576-582.

**32.** Casellas M, Grifoll M, Sabate J, Solanas AM. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. Can J Microbiol. 1998; 44(8):734-742.

**33.** Arulazhagan P, Vasudevan N. Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. Mar Pollut Bull. 2009; 58: 256-262.

**34.** James GA, Korber DR, Caldwell DE, Costerton JW. Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing Acinetobacter sp. J Bacteriol. 1995; 177: 907-915.

**35.** Young KD. The selective value of bacterial shape. Microbiol Mol Biol Rev. 2006; 70: 660-703.

**36.** Bacosa HP, Inoue C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. J Hazard Mater. 2015; 283: 689-697.

**37.** Finkelstein ZI, Baskunov BP, Golovlev EL, Vervoort J, Rietjens IM, Baboshin MA, Golovleva LA. Fluorene Transformation by Bacteria of the Genus *Rhodococcus*. Microbiology. 2003; 72: 660-665.

**38.** Rabodonirina S, Rasolomampianina R, Krier F, Drider D, Merhaby D, Net S, Ouddane B. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. J Environ Manage. 2019; 15(232): 1-7.

**39.** Fulekar M, H. Microbial degradation of petrochemical waste-polycyclic aromatic

hydrocarbons. Bioresour Bioprocess. 2017; 4(28): 1-16.

**40.** Oberoi AS, Philip L, Bhallamudi SM. Biodegradation of Various Aromatic Compounds by Enriched Bacterial Cultures: Part A-Monocyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Appl Biochem Biotechnol. 2015; 176(7): 1870-1888.

**41.** Guo W, Li D, Tao Y, Gao P, Hu J. Isolation and description of a stable carbazole degrading microbial consortium consisting of *Chryseobacterium* sp. NCY and *Achromobacter* sp. NCW. Curr Microbiol. 2008; 57: 251-257.

**42.** Ben Said O, Goni-Urriza MS, El Bour M, Dellali M, Aissa P, Duran R. Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. J Appl Microbiol. 2007; 104(4): 987-997.

**43.** Wang C, Li D, Wang C. Biodegradation of naphthalene, phenanthrene, anthracene and pyrene by *Microbacterium* sp. 3-28. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology. 2009; 15 (3): 361-366.

**44.** Qin W, Zhu Y, Fan F, Wang Y, Liu X, Ding A, Dou J. Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. Biochem Eng J. 2017; 121: 131-138.

**45.** Reyes-César A, Absalón ÁE, Fernández FJ, González JM, Cortés-Espinosa DV. Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30(3): 999-1009.

**46.** Marco-Urrea E, Garcia-Romera I, Aranda E. Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. N. Biotechnol. 2015; 32 (6): 620-628.

**47.** Mikeskova H, Novotny C, Svobodova K. Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 95: 861-870.

**48.** Furuno S, Pazolt K, Rabe K, Neu TR, Harms H, Wick LY. Fungal mycelia allow chemotactic dispersal of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria in water unsaturated systems. Environ Microbiol. 2010; 12, 1391-1398.

**49.** Wang S, Nomura N, Nakajima T, Uchiyama H. Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. J Biosci Bioeng. 2012a; 113: 624–630.

**50.** Marchand C, St-Arnaud M, Hogland W, Bell TH, Hijri M. Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. Int Biodeterior Biodegrad. 2017; 116: 48-57.