مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

بررسی نرخ رشد و تولید بیوسورفاکتانت دو گونه *Pesudomonas aeruginosa* و *Pesudomonas putida* در خورموسی

فاطمه شاه علیان [1*]، علیرضا صفاهیه[1]، نگین سلامات[1]، فاطمه موجودی[1]، مصطفی زارع دوست[2]

[1] گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی ٦٦٩

[2] گروه محیط زیست، دانشکده محیط زیست و انرژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۳/۰۴/۱۹
اصلاح: ۹۳/۰۵/۰۲
پذیرش: ۹۳/۰۵/۰۵

کلمات کلیدی:
آروماتیک چندحلقه‌ای
خورموسی
رشد
بیوسورفاکتانت

چکیده

برای پاکسازی اکوسیستم های آبی از مواد نفتی نظیر ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای استفاده از روش‌های زیستی به دلیل هزینه کم و سازگاری با محیط زیست بیش از سایر روش‌ها مورد توجه است. قابلیت پاکسازی با تولید بیوسورفاکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها افزایش می یابد. در این تحقیق مقایسه رشد و تولید بیوسورفاکتانت باکتری‌های *Pesudomonas aeruginosa* و *Pesudomonas putida* که از نمونه رسوبات آلوده به نفت خورموسی جداسازی شده، بررسی گردید. جهت بررسی تولید بیوسورفاکتانت از سه تکنیک Aagar lysis، Drop collaps، Oil spread استفاده شد. نتایج نشان داد که هر دو گونه در محیط حاوی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن از رشد خوبی برخوردار بودند ولی بیشترین میزان رشد در هر سه غلظت در باکتری *P. aeruginosa* با تولید بیوسورفاکتانت بیشتر نسبت به باکتری *P. putida* به دست آمد.

مقدمه

ورود ترکیبات نفتی در هنگام اکتشاف، تولید، پالایش، حمل و نقل و نگهداری ترکیبات نفتی یکی از عوامل آلاینده دریاها و اقیانوس ها می‌باشد که میزان آن روز به روز در حال افزایش است (Hua, 2006). هیدروکربن‌های نفتی محلول در چربی نسبت به هیدروکربن‌های محلول در آب سمیت بیشتری دارند و قادرند در بدن موجودات زنده تجمع یابند (Maruya *et al.*, 1997; Sanghvi, 2005; Seo *et al.*, 2009). یکی از راهکارهای مقابله با آلودگی‌های زیست محیطی تصفیه میکروبی هیدروکربن‌ها (تجزیه زیستی یا Bioremediation) می باشد که بر اساس شکستن آلودگی‌های آلی در اثر فعالیت میکروارگانیسم‌هاست. تجزیه زیستی در مقایسه با سایر روش‌ها بسیار موثرتر بوده و ترکیبات سمی نفت را به محصولات غیرسمی تبدیل می‌کند (Leahy and Colwell, 1990; Vidali, 2001; Anisuddin *et al.*, 2005). میکروارگانسیم‌های مناسب برای تجزیه زیستی را می‌توان از محیط‌های آلوده جدا نمود. تاکنون تعداد زیادی از باکتری‌های تجزیه کننده اجزای نفتی جداسازی شده اند (Bognolo, 1999; Kanaly and harayama, 2000; Subarna *et al.*, 2002; Khalid *et al.*, 2004; Tabatabaee *et al.*, 2005). جنس Pesudomonas از جمله باکتری‌هایی است که در اغلب پژوهش‌های مرتبط با تجزیه زیستی معرفی شده (Guieysse *et al.*, 2004; Ilori *et al.*, 2006; Tekoriene, 2008) و مشخص شده است که این باکتری ها توانایی بالایی در استفاده از ترکیبات آروماتیک دارند (Nnamchi *et al.*, 2006). این جنس به دلیل وجود تنوع، توانایی سازشی بالا با شرایط

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: shahaliyanfatemeh@yahoo.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]

مختلف محیطی و خصوصیات ذاتی در القاء تصادفی آنزیم های مورد نیاز تجزیه زیستی بسیار مورد توجه است. همچنین چرخه تنفسی این باکتری‌ها در حضور اکسیژن به عنوان پذیرنده الکترونی شامل سیتوکروم‌های مختلف و انواع مختلفی از اکسیدازهای انتقالی متصل به اکسیژن می‌باشد که می تواند از مسیرهای بیوشیمیایی پیچیده آلاینده های نفتی را به متابولیت‌های ساده تر تبدیل و تجزیه زیستی را به نحو مطلوبتری انجام دهد (Okoh, 2003; Minoui *et al.*, 2008). معمولاً باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن با تولید بیوسورفاکتانت قادر به امولسیونه کردن هیدروکربن‌های آروماتیک در آب می‌باشند که تجزیه نفت در محیط را افزایش می‌دهند (Deziel *et al.*, 1996; Cooper and Godenbergy, 1999; Kosaric, 2001; Wick *et al.*, 2002; Sanjeet *et al.*, 2004; Muthusamy *et al.*, 2008). با مطالعات انجام شده بر روی Pesudomonas نشان داده شد که این باکتری قادر به تولید نوعی از سورفاکتانت به نام رامنولیپید است که این ماده سطح امولسیفیکاسیون هیدروکربن‌های نفتی را ارتقا بخشده لذا ترکیبات آبگریز را جهت جذب و متابولیسم در دسترس باکتری قرار می دهد (Ron and Rosenberg, 2002; Suwanwong, 2004; Anyanwu and Chukwudi, 2010). این پژوهش نیز در راستای جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی تجزیه کننده هیدروکربن آنتراسن از رسوبات آلوده به نفت منطقه خور موسی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

به منظور شناسایی و جداسازی باکتری های بومی با قابلیت مصرف آنتراسن نمونه برداری با ۳ تکرار، توسط گرب از رسوبات سطحی آلوده به نفت خور موسی در آبان ماه ۱۳۹۰ انجام گرفت. نمونه ها درون ظروف شیشه‌ای نیمه‌پر و درپیچدار حمل و به منظور هوادهی مناسب، درب آن به صورت نیمه باز گذاشته شد.

جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری‌ها

محیط‌های معدنی اولیه جهت رشد میکروارگانسیم ها تشکیل شده از ترکیب ۵ گرم NH_4CL، ۲/۵ گرم $K_2HPO_4,3H_2O$، ۱گرم $MgSO_4,7H_2O$، ۰/۰۵ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۰۵ گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن، ۱۰۰ میکرولیتر عناصر میکرو و ۱ گرم نمک دریایی در ۱ لیتر آب مقطر در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری با حجم ۱۰۰ میلی لیتر توزیع شدند (۰/۵ ±۷ :pH محیط کشت). یک گرم از هر نمونه رسوب در ۱۰ میلی لیتر محلول NaCl %0.85 w/v تهیه و رقت های 10^{-1} به محیط کشت ها اضافه گردید. محیط ها در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز قرار گرفتند. برای سازگاری باکتری با هیدروکربن آنتراسن تا ۲ هفته دیگر عمل تجدید کشت صورت گرفت. سپس به میزان ۱ میلی لیتر از آخرین کشت میکروبی به پلیت‌های حاوی پایه معدنی آگار دار منتقل و در سطح پلیت پخش گردید. از روش کشت خطی برای به دست آوردن کلنی تک استفاده شد (Nnamchi *et al.*, 2006; Mukred *et al.*, 2008). باکتری های مقاوم به آنتراسن در محیط کشت معدنی (حاوی عناصر معدنی و آنتراسن) به روش‌های معمول میکروبیولوژی شناسایی شدند (Garrity, 2005).

بررسی توان تولید بیوسورفاکتانت

باکتری های ایزوله شده، از لحاظ توان تولید بیوسورفاکتانت با استفاده از سه روش Agar lysis، Drop collaps، Oil spread مورد آزمایش قرار گرفتند (Youssef *et al.*, 2004). افزودن باکتری به محیط کشت Blood agar با ایجاد هاله روشنی در اطراف کلنی باکتری همراه است که نشان دهنده همولیز خون توسط باکتری و تولید بیوسورفاکتانت است و عدم همولیز خون نشان می دهد که باکتری مورد نظر تولید کننده بیوسورفاکتانت نمی باشد (Youssef *et al.*, 2004; Salehizadeh and Mohammadizad, 2009). در روش Drop collaps بر روی اسلاید تمیز ۲ میکرو لیتر نفت معدنی[1] ریخته شد. ۵ میکرو لیتر از محیط کشت پس از یک ساعت به سطح نفت اضافه گردید. شکل قطره نفت پس از ۱ دقیقه بررسی شد (Youssef *et al.*,

[1] Mineral Oil

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]

2004). در روش Oil spread در یک پتری دیش بزرگ ۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آب افزوده شد. به دنبال آن ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت بر سطح نفت اضافه گردید (Youssef *et al.*, 2004).

مطالعه رشد باکتری

باکتری های به دست آمده از مرحله خالص سازی به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی مایع تلقیح شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکر دار گرماگذاری شدند. ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری به ارلن‌های حاوی محیط کشت MSM [۲] با سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۱۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. شاهدها برای آزمایش شامل تمام اجزا به جز آنتراسن بودند (Malatova, 2005; AL- Thani *et al.*, 2009) و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند (Nnamchi *et al.*, 2006).

تحلیل آماری

از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها و از نرم افزار SPSS Wersion 11.5 برای تحلیل داده ها استفاده شد. برای بررسی اختلاف معنی داری بین محیط کشت های حاوی آنتراسن و نمونه فاقد آنتراسن آنالیز واریانس یکطرفه انجام شد.

نتایــج

با استفاده از تکنیک غربال سازی در محیط پایه معدنی که تنها منبع انرژی و کربن آن آنتراسن بود، دو گونه باکتری از خورموسی جداسازی شدند. نتایج بررسی ها و تست های بیوشیمیایی در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱. مشخصات بیوشیمیایی دو گونه باکتری

تست بیوشیمیایی	باکتری	
	Pseudomonas aeruginosa	*Psedomonas putida*
رنگ آمیزی گرم	-	-
شکل سلول	میله ای	میله ای
اکسیداز	+	+
تولید اندول	-	-
اوره	-+	-+
کاتالاز	+	+
د-کربوکسیلاز	-	-
فنیل آلانین	+	-
سیمون سیترات	+	+
تخمیر لاکتوز	+	-
رشد بر محیط مک کانکی	+	+
KOH	+	+
MR	+	-
VP	-	-
SIM	+	+
TSI	-	-

[2] Mineral salt medium

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]

تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. توان تولید بیوسورفاکتانت توسط دو گونه *P. aeruginosa* و *P. putida* با سه روش تایید گردید.

جدول ۲. تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری

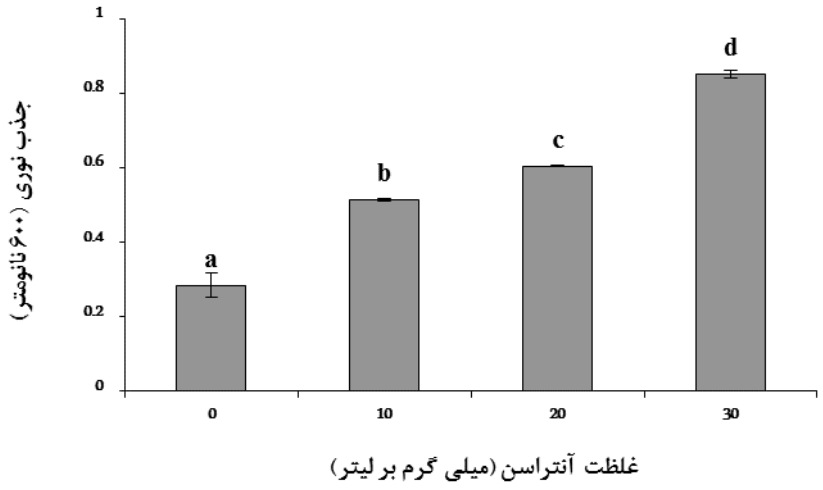
تست \ باکتری	*P.aeruginosa*	*P. putida*
Agar lysis[a]	++++	++
Drop collaps[b]	++++	++
Oil spread[c] (cm)	۳/۱	۲/۳

(a) عدم همولیز (-). همولیز ناکامل (+)، همولیز کامل با قطر دایره <۱cm (++)، همولیز کامل با قطر دایره بین ۱ cm تا ۳ (+++). همولیز کامل با قطر دایره >۳ cm (++++).

(b) پخش جزئی تا کامل نفت بر سطح محیط کشت از (+) تا (++++) امتیاز داده شد به محیط های حاوی حلقه های گرد امتیاز کمتری داده شد چرا که نشان دهنده تولید بیوسورفاکتانت اندک بود.

(c) اندازه قطر هاله شفاف ایجاد شده برسطح نفت نشان دهنده تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری دارد.

مقایسه رشد باکتری *P. aeruginosa* در محیط کشت‌های حاوی آنتراسن با غلظت‌های متفاوت و نمونه فاقد آنتراسن در شکل ۱ نشان داد که با زیاد شدن غلظت رشد باکتری به طور معنی داری (P<۰/۰۵) افزایش می یابد به طوری که بیشترین رشد باکتری مزبور در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر (۰/۸۵۲) و کمترین رشد در نمونه فاقد آنتراسن (۰/۲۸۵) مشاهده گردید.

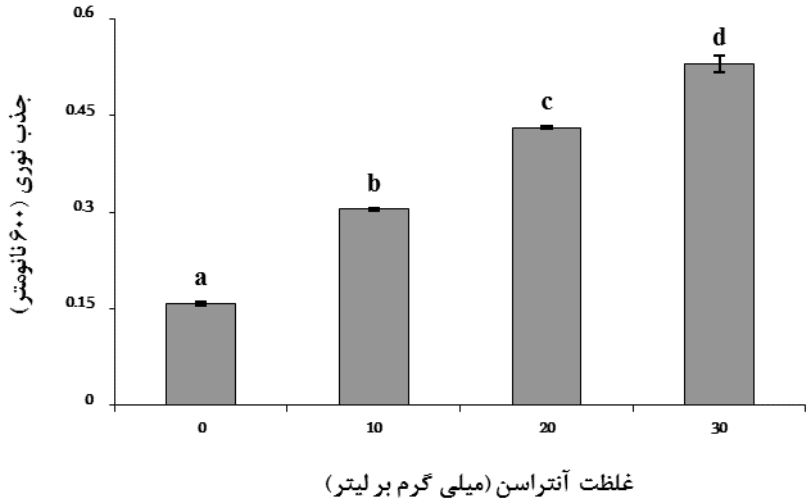


شکل ۱. مقایسه رشد باکتری *P. aeruginosa* در غلظت های متفاوت آنتراسن (Mean±SD)

مقایسه میانگین رشد باکتری *P. putida* (شکل ۲) در نمونه‌های حاوی آنتراسن در غلظت های (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر) و فاقد آنتراسن نشان دهنده رشد کمتر باکتری مذکور در غیاب آنتراسن بود. در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به سایر غلظت ها بالاترین دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ارزش ۰/۵۳۰ ثبت شد به گونه ای که بین حداکثر رشد باکتری در محیط فاقد آنتراسن با حداکثر رشد باکتری در سایر غلظت ها اختلاف معنی دار وجود داشت (P<۰/۰۵).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]



شکل ۲. مقایسه رشد باکتری *P. putida* در غلظت های متفاوت آنتراسن (Mean±SD)

بحث

در این تحقیق نمونه برداری در محدوده اسکله بارگیری مواد نفتی در منطقه بندر امام خمینی از رسوباتی که به مدت طولانی‌تر تحت تأثیر هیدروکربن ها بودند انجام گرفت. در این ارتباط نتایج کارگر و همکاران (۱۳۸۵) با آزمایش بر روی باکتری‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت در کاهش ترکیبات نفتی و Zahed و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تأثیر زمان بر روی حذف هیدروکربن‌های نفتی نشان دادند که وجود باکتری‌های تجزیه کننده در مناطق آلوده به دلیل تماس مداوم با ترکیبات نفتی بیشتر است. جنس *Pseudomonas* بارها توسط محققین از خاک، آب و رسوبات آلوده به هیدروکربن‌های نفتی جداسازی و خالص سازی شده است (Barathi and Vasudevan, 2001; Bhattacharya et al, 2002; Christopher and Christopher, 2004; Zhang et al, 2004; Moorthi *et al.*, 2008). نتایج حاصل از مجاورت آنتراسن و میکروارگانیسم های *P.aeruginosa* و *P. putida* جدا شده از رسوبات پیرامون خور موسی در روش بررسی ذی توده با استفاده از سنجش کدورت با اسپکتروفتومتر نشان داد که این باکتری ها از جذب نوری بالایی برخودار هستند. رشد هر دو گونه باکتریایی جدا شده در مطالعه حاضر موجب تغییر رنگ محیط کشت معدنی شد. تغییر رنگ محیط کشت می تواند نشان دهنده تجزیه آنتراسن یا تولید رنگدانه در این باکتری ها باشد. مطالعه رشد در محیط کشت معدنی حاوی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن نشان داد که بالاترین رشد در دو گونه مورد مطالعه در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر این هیدروکربن ظاهر شد. رشد بیشتر باکتری ها در این غلظت می تواند به دلیل وجود کربن کافی در محیط و مقاومت باکتری در برابر سمیت آنتراسن باشد. فقدان آنزیم مناسب در باکتری نیز یک علت عمده برای مقاومت آلاینده های آلی در محیط است (Machado et al, 2007).

در این مطالعه با انجام سه تکنیک (جدول ۲) ثابت شد که *P.aeruginosa* و *P. putida* جدا شده در این تحقیق مولد بیوسورفاکتانت می باشند. تولید بیوسورفاکتانت توسط گونه‌های مختلف جنس *Pseudomonas* نظیر *P. aeruginosa* (Youssef *et al.*, 2004; Rashedi *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Adebusoye *et al.* 2008; Garcia-Junco *et al.*, 2001) و گونه *P. putida* (Tuleva *et al.*, 2002; Youssef *et al.*, 2004; Adebusoye *et al.* 2008) گزارش شده است.

در بین باکتری‌های تجزیه کننده، برخی از باکتری‌ها با تولید بیوسورفاکتانت قادرند حلالیت آلاینده‌های غیرقطبی مانند هیدروکربن‌های نفتی را افزایش دهند. این عمل با افزایش دسترسی زیستی باکتری ها به آلاینده، آنها را قادر به استفاده آسان‌تر از هیدروکربن ها به عنوان منبع کربنی کرده و از طرفی منجر به کاهش سمیت این ترکیبات نیز می شود (Das and Mukherjee, 2006; Kokare *et al.*, 2007). باکتری *Pseudomonas* با تولید بیوسورفاکتانت های متنوع و با استفاده از مکانیزم‌های مختلف چسبندگی و واجذبی باعث حذف آلاینده‌های نفتی از محیط خواهد شد (Das and Mukherjee, 2007).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]

دلیل قطعی تولید بیوسورفاکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها هنوز نامشخص است. با این حال باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت در نواحی آلوده هیدروکربنی بیشتر یافت می‌شوند (Margesin and Schinner, 2001; Adebusoye *et al.*, 2008).

پژوهش حاضر نشان داد که باکتری *P. aeruginosa* با حضور آنتراسن به عنوان منبع کربن سازگاری بهتری دارد. همچنین نتایج نشان داد که گونه مذکور توانایی بیشتری در تولید بیوسورفاکتانت داشت. به نظر می رسد این ماده موجب افزایش دسترسی زیستی باکتری به آنتراسن و در نتیجه تسریع تجزیه و افزایش رشد باکتری می گردد (Okoh, 2003). Nnamchi و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که باکتری *P. aeruginosa* در استفاده از آنتراسن استعداد قابل توجهی دارد. لیکن این محققین اعلام داشتند که بین میزان رشد باکتری و غلظت آنتراسن همبستگی مستقیم معنی داری وجود دارد. قابلیت رشد گونه *P. aeruginosa* در محیط کشت حاوی نفت خام توسط Ekpo و Udofia (۲۰۰۸) به خوبی نشان داده شده است. باکتری *P. aeruginosa* بدون فاز تأخیری رشد خود را آغاز کرد و بعد از ۲۵ روز انکوبه به حداکثر رشد خود رسید. *P. putida* از دیگر گونه های جنس *Pesudomonas* است که در این مطالعه قادر به استفاده از آنتراسن بود. قبلاً نیز Roy و همکاران (۲۰۰۷) با جداسازی دو گونه *P. aeruginosa* و *P. putida* از پساب‌های شهر دهلی قابلیت آنها را در تجزیه آنتراسن و نفتالن تأیید کرده‌اند که با یافته‌های این مطالعه همخوانی دارد. نتایج حاصل از رشد نشان داد که باکتری *P. aeruginosa* در تولید بیوسورفاکتانت و استفاده از آنتراسن موجود در محیط پایه معدنی تواناتر بود که این می تواند به علت توانایی این باکتری در تولید آنزیم‌های مناسب برای تجزیه نفت خام است (Genesh and Lin, 2009). دو گروه آنزیمی مونو و دی اکسیژناز در شکست حلقه بنزنی و ادامه روند تجزیه زیستی هیدروکربن ها نقش بسیار مهمی دارند (Cerniglia, 1984). نتایج، رابطه واضح و مستقیم بین فعالیت اموالسیونه کردن و چسبندگی سلول به هیدروکربن درنتیجه تولید بیوسورفاکتانت و میزان رشد ایزوله‌ها در محیط حاوی آنتراسن را نشان داد (Ganesh and Lin, 2009).

به طور کلی در اکثر پژوهش‌های انجام شده توسط محققین جنس *Pesudomonas* جداسازی شده است که این واقعیت می‌تواند حاکی از مقاومت بالای این باکتری در برخورد با اکثر هیدروکربن‌های نفتی باشد. از این رو، می توان به کارگیری هر دو گونه با توانایی تجزیه آنتراسن و تولید بیوسورفاکتانت جدا شده در این تحقیق را در سطح میدانی آلودگی‌های نفتی ایجاد شده در خور موسی پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقایان گراوند و مریم آبادی و اداره کل بنادر و دریانوردی استان خوزستان واقع در بندر امام خمینی (ره) به دلیل همکاری صمیمانه آنها کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابـع

کارگر، م.، کفیل زاده، ف.، گودرزیان، ن.، نوحی، ا. ۱۳۸۵. شناسایی باکتری های مولد بیوسورفاکتانت و کاربرد آنها در حذف آلاینده های نفتی. علوم و تکنولوژی محیط زیست. شماره ۲، صفحات ۱۱۸-۱۰۹.

Adebusoye, S.A., Amund, O.O, Ilori, M.O., Domeih, D.O., Okpuzor, J. 2008.Growth and biosurfactant synthesis by Nigerian hydrocarbon-degrading estuarine bacteria. Revista de Biologin Tropical. 56(4): 1603-1611.

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

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

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]

Anyanwu, U., Chukwudi, U. 2010. Surface activity of extracellular products of a *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleum contaminated soil. International Journal of Environmental Sciences. 1(2): 225-234.

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

Bhattacharya, D., Sarma, P.M, Krishnan, S., Mishra, S., Lal, B. 2002. Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge contaminated sites. Applied and Environmental Microbiology. 69(3): 1435-1441.

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

Cerniglia, C.E. 1984, Aromatic hydrocarbons: metabolism by bacteria, fungi and algae, in biochemical technology. 3: 116-125.

Christopher, W.K., Christopher, L.K. 2004. Bacterial succession in a petroleum and treatment unit. Applied and Environmental Microbiology. 70(3): 1777-1785.

Cooper, D.G., Goldenbergy, V.A. 1999. Surface active agents from two Bacillus species. Applied and environmental microbiology, 189: 224-229.

Das, K., Mukherjee, A.K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtillis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology. 98: 1339-1345.

Das, K., Mukherjee, A.K. 2006. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology. 33: 22-31.

Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., Bisaillon, J.G. 1996. Biosurfactant Production by a Soil Pseudomonas Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology. 62(6): 1908-1912.

Ekpo, M.A., Udofia, U.S. 2008. Rate of biodegradation of crude oil by microorganisms isolated from oil sludge environment. African Journal of Biotechnology. 7(24): 4495-4499.

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

Garcia-Junco, M., De Olmedo, E., Ortego-Calvo, J.J. 2001. Bioavailabilityof solid and non-aqueous phase liquid-dissolved phenanthrene to the biosurfactant producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ, Environmental Microbiology. 3: 561-569.

Garrity, G.M. 2005. In Brenner, D.J., krig, N.R., Staley, J.T. (Eds). Bergeys manual of systematic bacteriology. 2nd edition. Springer, New York. 2c: 323-384.

Guieysse, B., Viklund, G., Toes, A.C., Mattiasson, B. 2004. Combined UV-biological degradation of PAHs. Chemosphere. 55: 1493-1499.

Hua, J. 2006. Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strateg. Ocean Engineering. 33: 152-167.

Ilori, M.O., Amund, D.I,. Oladipupo, O., Chika, E., Omoijiahina, J., Adekunle, A.S. 2006. Occurrence and growth potentials of hydrocarbon degrading bacteria on the phylloplane of some tropical plants. African Journal of Biotechnology. 5 (7): 542-545.

Kanaly, R.A., S. Harayama. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. Journal of bacteriology. 182(8): 2059-2067.

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

Kokare, C.R, Kadam, S.S, Mahadik, K.R., Chopade, B.A. 2007. Studies on bioemulsifier production from marine Streptomyces sp. S1. Indian Journal of Biotechnology. 6(1): 78-84.

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

Kumar, M., Leon, V., Materano, A.D.S., Ilzins, O.A. 2006. Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. Polish Journal of Microbiology. 55: 139-146.

Leahy, J.G., Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environments. Microbiology Review. 54: 305-315.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]

Machado, A.P., Brito, A.G., Rodrigues, A., Rodrigues, A.C., Noguelra, R. 2007. Growth of *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus pumilus* isolated from hydrocarbon slurries on polycyclic Aromatic Hydrocarbons. International conference on Environmental. Industrial and Applied Microbiology. pp. 193.

Malatova, K. 2005. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria from environmental habitats in western New York State. M.S. thesis. Institute of Technology Rochester. pp. 1-108.

Margesin, R., Schinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of Diesel-oil lipid contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Applied and Environmental Microbiology. 67: 3127-3133.

Maruya, K.A., Risebrough, R.W., Horne, A.J. 1997. The bioaccumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by benthic invertebrates in an intertidal marsh. Environmental Toxicology and chemistry. 6: 1087-1097.

Minoui, S., Minai-Tehrani, D., Zare, A., Ahmadi, sh. 2008. Effect of heavy crude oil on the pattern of respiratory chain of *Pseudomonas* sp. Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology. 2(1): 34-37.

Moorthi, P.S., Deecaraman, M. and Kalaichelvan, P.T. 2008. Bioremediation of Automobile oil effluent by *Pseudomonas* sp. Advanced Biotechology. pp: 34-37.

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

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: Properties. Commercial production and application. Current Science. 94(6.25): 736-747.

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

Okoh, A.I. 2003. Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. African Journal of Biotechnolology. 2(5): 104-108.

Rashedi, H., Jamshidi, E., Mazaheri Assadi, M., Bonakdarpour, B. 2005. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. International Journal of Environmental Science and Technology. 2(2): 121-127.

Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Current Opinion in Biotechnology 13: 249-252.

Roy, R., Ray, R., Chowdhury, R., Bhattacharya, P. 2007. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by mixed culture isolated from oil contaminated soil a bioprocess engineering study. Indian Journal of Biotechnology. 6: 107-113.

Salehizadeh, H., Mohammadizad, S. 2009. Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis*. Iranian Journal of Biotechnology. 7(4): 216-223.

Sanghvi, S. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination using *Mycobacterium vanbaalenii*. Biothechnology Journal. 1: 654-661.

Sanjeet, M., Priyangshu, M.S., Banwari, L. 2004. Crude oil degradation efficiency of are combinant *Acinetobacter baumannii* strain andits survival in crude oil-contaminated soil microcosm. Microbiology Letters. 235: 323-331.

Seo, J.S., Keum, Y.S., Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. International Journal of Environmental Research, Public and Health. 6: 278- 309.

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

Suwanwong, A. 2004. Induced mutation of crude oil biodegrading bacteria (*pseudomonas aeruginosa*). Thesis of master. Mahidol University. 1-133.

Tabatabaee, A., MazaheriAssadi, M., Noohi, A.A., Sajadian, V.A. 2005. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. Iranian Journal Environmental Health Science Engineering. 2(1): 6-12.

Tekoriene, R. 2008. Distribution of the genus Pseudomonas bacteria in oil-polluted soil, water, polymeric materials, plant remnants and food products. Ekol. 54(3): 143-148.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]

Tuleva B.K., Ivanov, G.R., Christova, N.E. 2002.Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. Zeitschrift fur Naturforschung. 57C: 356-360.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry. 73(7): 1163-1172.

Wick, L.Y., Ruiz de Munain, A., Springael, D., Harms, H. 2002. Responses of *Mycobacterium sp.* LB501T to the low bioavailability of solid anthracene, Applied Microbiology and Biotechnology 58: 378-385.

Youssef, N.H., Duncana, K.E., Naglea, D.P., Savagea, K.N., Knappb, R.M., McInerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of Microbiological Methods. 56: 339-347.

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

Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A.I., Drainas, C. 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. Applied Microbiology and Biotechnology. 65: 124-131.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.1.7.1]