View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

بررسی توانایی حذف بیولوژیکی آنتراسن توسط باکتری *Bacillus pumilus* جداسازی شده از رسوبات نفتی بندر امام خمینی

فاطمه شاه علیان[۱*]، علیرضا صفاهیه[۲] ، نگین سلامات[۲]، فاطمه موجودی[۳]، مصطفی زارع دوست[۴]

۱. گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲. اداره کل بنادر و دریانوردی استان خوزستان، اداره حفاظت و ایمنی دریانوری بندر امام خمینی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۱۳

چکیده

آلودگی‌های نفتی در سر تا سر دنیا یکی از موضوعات مهم تحقیقات زیست محیطی هستند که به دلیل سمیت‌شان مشکلات بسیاری را ایجاد کرده‌اند.هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک‌های آلوده، رسوبات و آب می‌تواند تحت تاثیر میکروارگانیسم‌ها تجزیه شوند. حذف هیدروکربن‌ها از محلول‌های آبی با استفاده از کشت باکتریایی نیز امکان پذیر است.در این پژوهش نیز توانایی حذف آنتراسن از محلول حاوی هیدروکربن مذکور توسط گونه *Bacillus pumilus* جدا شده از رسوبات نفتی بندر امام خمینی مورد بررسی قرار گرفت.این باکتری با عدم ایجاد هاله در محیط کشت بلاد آگار، عدم پخش نفت معدنی و ایجاد هاله ای با قطر ۰/۵ سانتی متر بر روی سطح نفت خام به عنوان گونه غیر مولد بیوسورفاکتانت شناسایی گردید.میزان جذب نوری این گونه در نمونه حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن نهایتاًبه ۰/۰۸۶ رسید.تجزیه آنتراسن به‌وسیله دستگاه HPLC نشان داد که پس از ۵ روز ۴۰/۸۳۳ درصد از هیدروکربن مذکور توسط این باکتری از محیط کشت حذف گردید. لذانتایج نشان می‌دهد که باکتری جدا شده می تواند در محیط طبیعی نیز احتمالا رفتار مشابهی را نشان دهد و توانایی حذف این آلاینده را از محیط‌های آلوده خواهد داشت.

واژگان کلیدی:رشد، بیوسورفاکتانت، تجزیه،*B. pumilus*

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

۱. مقدمه

امروزه نفت و محصولات جانبی آن به دلیل کاربردهای گسترده در صنایع مختلف، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده‌اند(Cameotra and Makkar, 2010). اکثر ترکیبات نفت خام و هیدروکربن‌های چند حلقه ای که در منابع مختلف آبی مشاهده می شوند، ناشی از تولیدات پتروشیمی و مراکز صنعتی و سایر منابع انسانی است و به همین دلیل مشکلات زیست محیطی مربوط به آلاینده های نفتی به سرعت در حال افزایش است(Beckles*et al*., 1998; Oberdorster*et al*., 2000).واضح است که بین سلامتی انسان و محیط زیست ارتباط مستقیمی وجود دارد؛از این رو باید به دنبال به حداقل رساندن اثرات سوء ناشی از نشت نفت بر محیط زیست باشیم. تجزیه بیولوژیکی یکی از روش‌های زیستی کاهش آلاینده‌ها موجود در هوا، آب و خاک محسوب می شود و شامل استفاده از توانایی میکروارگانیسم‌ها در تجزیه‌آلاینده‌های هیدروکربنی، تغییرات و تبدیلات زیستی آن‌ها و در نتیجه پاک‌سازی محیط است (Vidali, 2001; Chorom*et al*., 2010). موفقیت در تجزیه زیستی به فاکتورهایی از جمله رشد و بقای میکروبی، قابلیت میکروارگانیسم‌ها در تماس با سوبسترای مورد تجزیه، اندازه جمعیت میکروبی و شرایط محیطی که موجود بتواند در آن زنده بماندبستگی دارد (Chorom*et al*., 2010: Vallero, 2010). علاوه بر آن میلیون‌ها گونه بومی میکروبی در محیط وجود دارند که با ترشح بیوسورفاکتانت باعث تسهیل در جذب ترکیبات نفتی می شود و با سرعت بیشتری به منظور رشد و تامین انرژی این ترکیبات را مورد استفاده قرار می‌دهند (Muligan. 1989; Kokare*et al*., 2007; Muthusamy*et al*., 2008).آزمایشات نشان داده‌اند که تجزیه ترکیبات چند حلقه‌ای با وزن مولکولی پایین را عمدتاً باکتری‌ها به عهده دارند (Gibbons and Westermeyer, 1991; Ward et al., 2003;Leung, 2004;Johnsenet al., 2005;Katsivelaet*al*., 2005;Vallero, 2010).به علت حضور هیدروکربن‌ها در منطقه اسکله بارگیری مواد نفتی واقع در بندر امام خمینی در این بررسی اقدام به جداسازی باکتری‌های بومی دریایی مصرف کننده هیدروکربن سه حلقه‌ای (آنتراسن) گردید. همچنین سنجش تولید بیوسورفاکتانت و ارزیابی پتانسیل کاربردی آن در مبزان تجزیه آنتراسن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش ها

نمونه گیری: برای انجام این پژوهش نمونه‌های رسوبات اسکله بار گیری مواد نفتی واقع در بندر امام خمینی با استفاده از قاشقک‌های استریل برداشت و در بطری‌های شیشه ای استریل درب دار به آزمایشگاه منتقل گردید(Nnamchi*et al*., 2006).

محیط کشت: از محیط کشت پایه نمکی (MSM) برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده استفاده شد. محیط کشت MSM شامل ترکیبات (گرم بر لیتر آب مقطر): ۲/۵ گرم$K_2HPO_4,3H_2O$، ۵ گرم NH_4CL، ۱گرم $MgSO_4,7H_2O$، ۰/۰۵ گرم$FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۵ گرمCaCl2.2H2O و ۱۰۰ میکرولیتر عناصر میکرو و (۷± ۰/۵pH) می باشد. ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن به عنوان منبع کربنی به محیط کشت اضافه گردید (Francyand Thomas, 1991).

کشت میکروبی: نمونه‌های رسوب برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده آنتراسن مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ۱ گرم از رسوب به ۱۰۰ میلی لیتر محیط MSM با غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسناضافه شد و به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰°C روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm انکوبه و غنی سازی گردید. سپس ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری به روش Pour plate بر روی محیط کشت MSM حاوی آگار کشت داده شد. خالص سازی باکتری به صورت مکرر با روش خطی صورت گرفت (Nnamchi*et al*., 2006).

شناسایی باکتری تجزیه کننده: با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و کتاب رده بندی

سیستماتیک باکتری‌ها (Bergey's) شناسایی باکتری جداسازی شده انجام گرفت (Garrity, 2005).

سنجش بیوسورفاکتانت: برای سنجش بیوسورفاکتانت از روش محیط بلاد آگار، پخش قطره (Drop collaps) و پخش روغن استفاده شد. فعالیت همولیتیک به وسیله کشت باکتری بر روی محیط بلاد آگار در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. وجود هاله شفاف نشان دهنده تولید بیوسورفاکتانت است. پخش نفت معدنی توسط باکتری در روش Drop collaps مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا ۲ میکرولیتر نفت معدنی را به مدت ۱ ساعت روی اسلاید تمیز قرار داده و یک دقیقه پس از افزودن ۵ میکرو محیط کشت دارای باکتری شکل قطره مشاهده گردید. پخش نفت معدنی توسط باکتری تولید بیوسورفاکتانت را نشان می دهد. در روش پخش روغن ۲۰ میکرو لیتر نفت خام را درون یک پتری دیش حاوی ۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر ریخته شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر از سوسپاسیون باکتری به سطح پتری دیش به آرامی اضافه و پس از ۵ دقیقه قطر هاله ایجاد شده بررسی گردید(Youssef *et al.*, 2004).

رشد باکتری: ۳ میلی لیتر از سوسپاسیون باکتری به ۱۰۰ میلی لیتر محیط MSM حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیترآنتراسن تلقیح شد. ارلن‌ها بر روی شیکر درون انکوباتور در دمای ۳۰°C قرار داده شدند. میزان رشد باکتری هر ۲۴ ساعت یک‌بار به مدت ۱۲ روز مورد سنجش قرار گرفت (Malatova, 2005; Nnamchi*et al.*, 2006).

بررسی تجزیه زیستی: ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن تهیه و سپس ۵۰۰ میکرولیتر سوسپاسیون باکتری به آن تلقیح گردید. به منظور اطمینان از تجزیه بیولوژیکی یک نمونه شاهد فاقد باکتری با تمامی شرایط نمونه‌ها در نظر گرفته شد. ارلن های حاوی نمونه‌ها و شاهد به مدت ۵ روز به انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpmمنتقل شدند. برای اندازه گیری میزان آنتراسن از دستگاهKNAUER HPLC استفاده شد (Coral and Karagoz, 2005).

۳. نتایج

پس از خالص سازی کلنی برداشت شده از آخرین مرحله غنی سازی،یک باکتری میله‌ای گرم مثبت با توانایی رشد در غلظت ۳۰ میلی گرم برلیتر آنتراسن مشاهده گردید. با انجام مراحل شناسایی‌شان داده شد که گونه مذکور*Bacillus pumilus* است(جدول ۱).

جهت سنجش تولید بیوسورفاکتانت از کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت MSM حاوی هیدروکربن آنتراسن استفاده شد. نتایجی که در جدول ۲ گزارش شده گواه بر این است که باکتری مورد نظر به دو روش پاسخ منفی داده و بر روی نفت خام نیز هاله‌ای با قطر اندک را تشکیل داد که نشانه عدم تولید بیوسورفاکتانت است.

منحنی رشد باکتری*B. Pumilus*(شکل ۱)، تاخیری در رشد باکتری نشان نداد؛رشد باکتری تا روز هشتم به صورت صعودی ادامه یافت. در محدوده روز دهم تا یازدهم کاهش سریعی در رشد باکتری دیده شد. در نهایت میزان جذب نوری در نمونه حاوی آنتراسن به میزان ۰/۰۸۶ رسید.

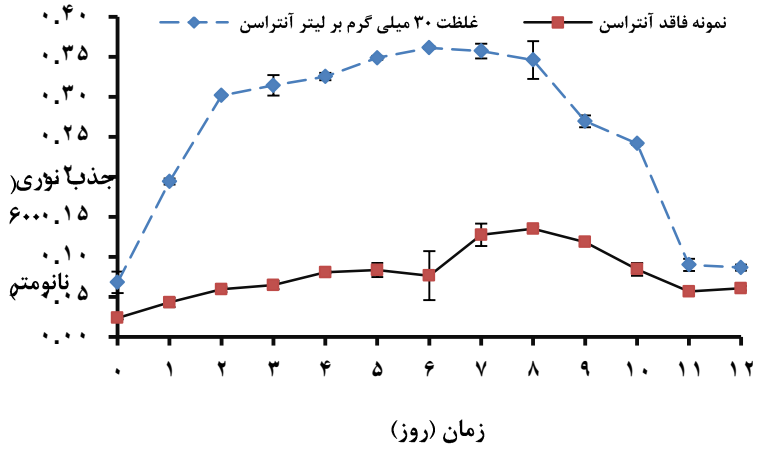
جدول ۱. خصوصیات بیوشیمیایی باکتری *B. pumilus*

تست های بیوشیمیایی	باکتری *Bacillus pumilus*
Gram reaction	+
Shape	Rods
Oxidase	+

Indole	-
urease	-
catalase	+
PD	+
Decarboxylase	+
Citrate	+
Lactose	+
MacConkey	+
KOH	-
MR	-
VP	-
SIM	+
TSI	+

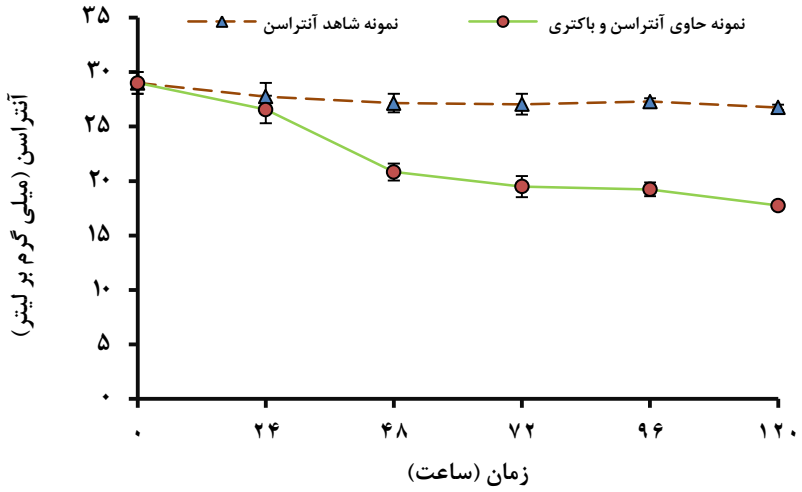
جدول ۲. سنجش ترشح بیوسورفاکتانت توسط باکتری *B. pumilus*

رشد باکتری بر روی محیط بلاد آگار	-
پخش نفت معدنی (Drop collapse)	-
پخش روغن (هاله ایجاد شده (cm))	۰/۵



شکل ۱. منحنی رشد باکتری *B. pumilus* در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن

منحنی تغییرات غلظت آنتراسن توسط باکتری *B. Pumilus* در شکل ۲ آمده است. سرعت کاهش هیدروکربن در ۲۴ ساعت اولیه بسیار پایین بود. در نهایت پس از ۱۲۰ ساعت میزان سوبسترای کربنی به مقدار ۰/۳۲۳±۱۷/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر سنجش شد.



شکل ۲. تغییرات غلظت آنتراسن موجود در محیط کشت توسط باکتری *B. pumilus*

۴. بحث و نتیجه گیری

تجزیه زیستی از جمله روش‌های بیوتکنولوژی است که می تواند باعث ترمیم و مدیریت بهتر اکوسیستم‌های آلوده گردد. میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها از مهمترین عوامل طبیعی تجزیه نفت به شمار می روند. تاثیر زمان بر روی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی اهمیت بسزایی دارد و نرخ تجزیه با افزایش محدوده زمانی همبستگی مثبتی را نشان می‌دهد به همین دلیل میزان رشد باکتری‌ها همراه با سازگاری با شرایط محیطی نیز افزایش می‌یابد(Phillips *et al.*, 2000; Ramsay *et al.*, 2000; Van Gestel*et al.*, 2001; Sang-Hwan *et al.*, 2007).پژوهش‌های بسیاری نشان می دهند که بسیاری از باکتری‌ها می توانند تولید کننده بیوسورفاکتانت باشند (Calvo*et al.*, 2004; Bayoumi, 2009; Liu *et al.*, 2010;Plaza *et al.*, 2011) و ترشح این ترکیبات غالباً لیپیدی به افزایش و جذب موثر لجن‌های نفتی توسط باکتری کمک می‌کنند (Leahy *et al.*, 1990; Cort and Bielefeldt, 2000; Shiohara*et al.*, 2001).باکتری‌های جنس Bacillus در محدوده وسیعی از مناطق مختلف آلوده نفتی بارها جداسازی شده‌اند (Sepahy*et al.*, 2005; Tabatabaee et al., 2005; Das and Mukherjee, 2006; Das et al., 2008; Roostan*et al.*, 2012).در این پروژه در ابتدا تولید بیوسورفاکتانت و سپس کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهده کدروت محیط کشت و ازدیاد تعداد سلول‌های باکتری بیانگر این است که *B. pumilus* جدا شده توانسته از آنتراسن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نماید. این باکتری دریایی قادر به سنتز بیوسورفاکتانت نبوده ولی به محض ورود در محیط آنتراسنی شروع به رشد نموده به طوری که بالاترین دانسیته نوری با ارزش ۰/۳۶۱ بعد از ۶ روز مشاهده گردید. چنین نتیجه‌ای توسط Sepahyو همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز به دست آمد. این محققین مشاهده کردند که از ۳۵ باکتری جنس *Bacillus* جداشده از رسوبات نفتی در جنوب ایران ۸ گونه تولید بیوسورفاکتانت را نشان ندادند. همچنین اخوان سپهی و همکاران در سال ۱۳۸۸، ۶۰ سویه از *Bacillus* را از مناطق آلوده به ذخایر نفتی مسجد سلیمان و پالایشگاه نفت تهران جداسازی نمودند. تاثیر pH، غلظت‌های نمکی متفاوت، دما و منابع مختلف کربن و نیتروژن را در رابطه با تولید بیوسورفاکتانت مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که افزودن مواد تکمیل کننده به محیط کشت MSM راندمان تولید بیوسورفاکتانت را افزایش خواهد داد.همچنین Kaushish و همکاران (۲۰۱۲) رشد باکتری *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447)

در محیط کشت حاوی ۲ درصد نفت دیزل را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این باکتری با مصرف و استفاده از منبع انرژی سوبسترای هیدروکربنی رشد کرده و موجب کدورت محیط کشت گردید.

یعقوب زاده (۱۳۸۵)، باکتری هایی را از نمونه‌های آب دریای خزر پس از غنی سازی در محیط آگار دار حاوی نفتالن جداسازی کرد. از بین باکتری های مورد آزمایش، جنس *Bacillus*از قدرت تجزیه کنندگی بیشتری برخوردار بودند. Aitken و همکاران (۱۹۹۸)، با غنی‌سازی جمعیت باکتری‌های خاک‌های آلوده به ترکیبات آروماتیک در محیط کشت دارای فنانترن، ۱۱گونه مقاوم را جداسازیو خالص‌سازی کردند. تمامی‌گونه‌ها قادر به تجزیه محدوده وسیعی از این ترکیبات بودند. بررسی‌ها نشان داد جنس *Bacillus* درحضورنفتالن قادر به رشدبودند. با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر می‌توان گفت که نتایج این مطالعه قابل قیاس با پژوهش های مذکور می باشد.

Machado (۲۰۰۷) رشد باکتری های *B. pumilus* را در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر بر تعدادی هیدروکربن از جمله آنتراسن ارزیابی کرد. باکتری از رشد قابل توجهی بر روی هیدروکربن‌های مورد آزمایش برخوردار بود. در این مطالعه نیز این گونه در غلظت مشابه رشد نمود و ۴۰/۸۳۳ درصد از آنتراسن را تجزیه کرد.طی تحقیقاتی Khanna و همکاران (۲۰۱۱) توانایی رشد *B. pumilus*(MTCC 1002) جدا شده از لجن‌های نفتی در حضور۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر پایرن را بررسی نمودند. این سویه ۶۴ درصد از پایرن به نحو موثری تجزیه نمود. همچنینNanganuru و همکاران (۲۰۱۲)جنس*Bacillus*پتانسیل تجزیه زیستی ترکیبات نفتی را دارد و بیشترین مقاومت را در سطوح بالایی از نفت نشان می‌دهد. این جنس به دلیل دارا بودن آنزیم‌های متعدد هیدروکربن را شکسته و مورد مصرف قرار داده و رشد قابل توجهی را نشان می دهد. گونه *B. subtilis* مورد آزمایش قرار گرفت و توانست در محدوده زمانی ۱۰ روز انکوباسیون ۷۱ درصد نفت موجود در محیط کشت را تجزیه نماید.طی آزمایشات Yuliani و همکاران (۲۰۱۲) پنج باکتری گرم مثبت تجزیه کننده فنانترن و پایرن را از رسوبات دریایی مناطق اندونزی جداسازی شدند. نتایج حاکی از آن بود که گونه *B. pumilus* نقش مهمی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی بازی می‌کند. به‌طور کلی با توجه به اطلاعات به دست آمده در این مطالعه، مشخص شد که گونه *B. pumilus* با وجود رشد و تجزیه در محلول حاوی آنتراسن قادر به تولید بیوسورفاکتانت نبود. اما این امکان وجود دارد که با بهینه‌سازی محیط کشت و تغییر منبع هیدروکربنی گونه مذکور تحریک شده ومنجر به تولید بیوسورفاکتانت و افزایش میزان تجزیه هیدروکربنی گردد.

نتیجه گیری نهایی

باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت از رشد و میزان تجزیه زیستی بهتری نسبت به باکتری‌های غیر مولد برخوردارند اما دست آوردهای این مطالعه بیانگر این مسئله بود که گونه *B. pumilus* فاقد قدرت تولید بیوسورفاکتانت در محیط حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن قادر به رشد بوده و پس از ۱۲۰ ساعت غلظت نهایی هیدروکربن مذکور را در محیط کشت به ۱۷/۷۵±۰/۳۲۳ میلی گرم بر لیتر کاهش داد.بنابراینمی توان از این باکتری در حذف آلاینده های نفتی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

کلیه آزمایش های مربوط به سنجش در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر صورت گرفت. به این وسیله از حمایت های اجرایی این دانشگاه سپاسگزاری می‌شود. همچنین از همکاری اداره کل بنادر و دریانوردی استان خوزستان واقع در بندر امام خمینی(ره) صمیمانه قدردانی می گردد.

منابع

یعقوب زاده، ز. ۱۳۸۵. تجزیه بیولوژیکی نفتالن با استفاده از باکتری های موجود در بنادر نوشهر وامیر آباد. مجله علوم دریایی ایران،شماره ۱ و۲، سال پنجم، ص. ۷۵-۶۸.

اخوان سپهی، ع. و حقیقت، س. و پاسدار، ه. ۱۳۸۸. بررسی توانایی تولید بیوسورفاکتانت توسط *Bacillus licheniformis* BCRCو *Bacillus subtilis* HAZ2. مجله علوم دانشگاه تهران،شماره ۱، سال سی و پنجم، ص. ۷۴-۶۷.

Aitken, M.D., Stringfellow, W.T., Nagel, R.D., Kazunga, C. and Chen, Sh. 1998. Characteristics of phenanthrene-degradinbacteria isolated from soils contaminated withpolycyclic aromatic hydrocarbons. Can. J.Microbiol. 44: 743-752.

Bayoumi, R.A. 2009. Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. J. Appl. Sci. Research. 5 (2): 197 -211.

Beckles, M. D., Ward, C. H., Hughes, J. E. 1998. Effect of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and sediments of fluoromethane biodegradation pattern.EnvironmentalToxicol.Chem.17: 1246-1257.

Calvo, C., Toledo, F.L. and Gonzalez-lopez, J. 2004. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. J.biotechnol. 109: 255-262.

Cameotra, S.S. and Makkar, R.S. 2010. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. Pure Appl. Chem. 82(1): 97–116.

Chorom, M., Sharifi, H.S., Motamedi, H. 2010.Bioremediation of a crude oil pollution application of fertilizations.Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng. 7(4): 319-326.

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

Cort, T. and Bielefeldt, A. 2000.Mechanism of non-ionic surfactant inhibition of pentachlorophenol biodegradation.In proceeding of the 2000 conference on hazardous waste research, Denver, Colorado, USA.

Das, K. and 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.

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

Francy, D.S. and Thomas, V. 1991.Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria.J.of industrial Microb. 8: 237-46.

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

Gibbons, G.H. and Westermeyer, W.E. 1991. Bioremediation for oil spils.The Office of Technology Assessment (OTA), pp.4-13.

Johnsen, A.R., Wick, L.Y. and Harms, L., 2005.Principles of microbial PAH-degradation in soil.Environm.Pollut. 133: 71-84.

Katsivela, E., Moore, E.R.B. and Kalogerakis, N. 2005. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons: specificity among bacteria isolated from refinery waste sludge. Water,Air and Soil Pollut.3: 103 -115.

Kaushish, L.M, Ashutosh, B., Kumar, B.K. and Koushalya, D. 2012. The study of growth kinetics of *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447) using diesel as the sole carbon and energy source. Int. J. Environ. Sci. 3(1): 20-27.

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

Leahy, J.G. and R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54(3): 305-315.

Leung, M. 2004. Bioremediation: Techniques forCleaning up a mess. BioTeach Journal. 2:18-22.

Liu, W., Luo, Y., Teng, Y., Li, Z. and Ma, L.Q. 2010.Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. Environ Geochem Health. 32: 23-29.

Machado, A.P., Brito, A.G., Rodrigues, A., Rodrigues, A.C. and Noguelra, R. 2007. Growth of *Alcaligenesfaecalis* 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.

Muligan, C. 1989. Enhanced Biosurfactant production by a mutant *B.subtilis* strain, Applied Microbiol.Biotechnol. 31: 486-489.

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

Nanganuru, H.Y., Korrapati, N. and Prakash, B.M. 2012. Studies on the Potential of bacillus subtilis in the Biodegradation of Engine oil.JCBSC. 2(3): 1599-1603.

Nnamchi, C.I., Obeta, J.A.N., Ezeogu and L.I. 2006.Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria.Int. J. Environ. Sci. Tech. 2(3): 181-190.

Oberdorster, E., Cheek, A.O. 2000.Gender benders at the beach, endocrine disruption in marine and estuarine organisms.Environmental Toxicol.Chem. 20(4): 23-36.

Phillips, T.M., Liu, D., Seech, A.G., Lee, H. and Trevors, J.T. 2000.Monitoring bioremediation in creosote- contaminated soils using chemical analysis and toxicology tests.J.Ind. Microbiol. Biotechnol.65: 627.

Plaza, G.A., Pacwa-Plociniczak, M., Piotrowska-Seget, Z. and Cameotra, S.S. 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. Int.J.Mol.Sci. 12: 633-654.

Khanna, P., Goyal, D., Khanna, S. 2011.Pyrene Degradation by *Bacillus pumilus*Isolated from Crude Oil Contaminated Soil.Polycyclic Aromatic Compounds.31(1): 1-15.

Ramsay, A. M., Swannell.Warren, P.J., Duke, A.Sh.,T.Hill, R. 2000. Effect of bioremediation on the microbialcommunity in oiled mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin. 41(7): 413-419.

Roostan, Z., Safahieh, A., Mojodi, F., Zolgharnein, H., Ghanemi, K.andAbiar, H. 2012.Phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*isolated from Persian gulf sediments. Afr. J. Microbiol. 6(21): 4585-4591.

Sang-Hwan, L., Seokho, L., DaeYaeon, K., jeong- gyu, K. 2007.Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient condition.J. hazard.mater. 143:65-72.

Sepahy, A.A., MazaheriAssadi, M., Saggadian, V. and Noohi, A., 2005. Production of biosurfactant from Iranian oil fields by isolated Bacilli. Int. J. Environ. Sci. Tech. 1(4): 287-293.

Shiohara, K., Diehl, S.V. and Borazjani, H. 2001. Use of commercial surfactants for enhanced biodegradation of organic wood-preservative contaminated processwater.In proceedings of the 2001 Mississipi Water Resources Conference.Raymond, Mississipi, USA.

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

Vallero, A. D. 2010. Environmental Biotechnology: A Biosystems Approach, 1 St.Elsevier Academic Press, Burlington, MAEdition.

Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., Ryckebore, J., 2001. Bioremediation of dieseloil-contaminated soil by composting with biowaste.Environm.Pollut. 125 (5): 361-368.

Vidali, M. 2001. Bioremediation.An overview.Pure Appl. Chem. 73(7): 1163–1172.

Ward, W., Singh, A.,andvanHamme, J. 2003. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste.J. Ind. Microbiol, Biotechnol.30: 260.

Youssef, N.H., Duncana, K.E., Naglea, D.P., Savagea, K.N., Knappb, R.M. and McInerney, M.J. 2004.Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms.Journal of MicrobiologicalMethods.56(3): 339– 347.

Yuliani, H., Sahlan, M., Hermansyah, H. and Wijanarko, A. 2012. Selection and Identification of Polyaromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria.World Applied Sciences Journal. 20 (8): 1133-1138.

Evaluation of biological removal of anthracene by a Bacillus pumilus strain isolated from oil sediments of Imam Khomeini port

FatemehShahaliyan[1*], AlirezaSafahieh[2], NeginSalamat[۲], FatemehMojodi[۳], MostafaZaredoost[۴]

1. Department of Marine Biology, Faculty of Marine science Khorramshahr University of marine science and technology, Iran
2. Head of maritime safety and environmental protection department, Imam Khomeini Port, Iran

Abstract

Due to their toxicities, oil pollutions and its derivatives such as anthracene are one of the most important issues of environmental researches all over the world. Oil hydrocarbons in contaminated soils, sediments and water can be degraded by microorganisms. Removal of hydrocarbons from aqueous solutions is also possible using cultured bacteria. In this study, the anthracene bioremediation by *Bacillus pumilus* isolated from oil sediments of Imam Khomeini port, was investigated. This bacterium made no clear halo on blood agar medium and couldn't disperse the mineral oil but created a halo with a diameter of 0.5 cm on the surface of crude oil. As a result, the bacterium was detected as a non-producing biosurfactant species. The optical density of this species in the sample containing 30 mg/l of anthracene finally reached to 0.086. Measurement of anthracene degradation by HPLC showed that %40.833 of mentioned hydrocarbon was removed after 5 days. Therefore, the results indicate that the isolated bacterium can probably behave the same in the natural environment and couid have the potential in bioremediation of this pollutant from environments.

Keywords: Growth, Biosurfactant, Biodegradation, *B. pumilus*

*Corresponding author, E-mail:shahaliyanfatemeh@yahoo.com