

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

فاطمه شاه علیان<sup>۱\*</sup>، علیرضا صفاهیه<sup>۲</sup>، نگین سلامات<sup>۲</sup>، فاطمه موجودی<sup>۲</sup>، مصطفی زارع دوست<sup>۴</sup>

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 دریانوردی 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 نهایتاً به ۰/۰۸۶ رسید. تجزیه آنتراسن به وسیله دستگاه HPLC نشان داد که پس از ۵ روز ۴۰/۸۳۳ درصد از هیدروکربن مذکور توسط این باکتری از محیط کشت حذف گردید. لذا نتایج نشان می‌دهد که باکتری جدا شده می‌تواند در محیط طبیعی نیز احتمالاً 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 می‌شوند، ناشی از تولیدات پتروشیمی و مراکز صنعتی و سایر منابع انسانی است و به همین دلیل مشکلات زیست محیطی مربوط به آلاینده‌های 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 می‌شود و شامل استفاده از توانایی میکروارگانیسم‌ها در تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی، تغییرات و تبدیلات زیستی آن‌ها و در نتیجه پاک‌سازی محیط است (Vidali, 2001; Choromet 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 بماند بستگی دارد (Choromet 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 می‌شود و با سرعت بیشتری به منظور رشد و تامین انرژی این ترکیبات را مورد استفاده قرار می‌دهند (Muligan, 1989; Kokareet 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; Johnsen et al., 2005; Katsivela et 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 میزان تجزیه آنتراسن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲. مواد و روش‌ها

**نمونه گیری:** برای انجام این پژوهش نمونه‌های رسوبات اسکله بارگیری مواد نفتی واقع در بندر امام خمینی با استفاده از قاشق‌های استریل برداشت و در بطری‌های شیشه ای استریل درب دار به آزمایشگاه منتقل گردید (Nnamchiet 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):  $2/5$  گرم  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ،  $5$  گرم  $NH_4CL$ ،  $1$  گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ،  $0/05$  گرم  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ،  $0/05$  گرم  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  و  $100$  میکرولیتر عناصر میکرو و  $(\pm 0/5pH)$  می باشد.  $30$  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  $1$  گرم از رسوب به  $100$  میلی لیتر محیط MSM با غلظت  $30$  میلی گرم بر لیتر آنتراسن اضافه شد و به مدت  $14$  روز در دمای  $30^\circ C$  روی شیکر با دور  $150$  rpm انکوبه و غنی سازی گردید. سپس  $1$  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 (Nnamchiet et al., 2006).

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

**بررسی تجزیه زیستی:** ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن تهیه و سپس ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون 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  $30^{\circ}\text{C}$  و دور  $150\text{rpm}$  منتقل شدند. برای اندازه گیری میزان آنتراسن از دستگاه KNAUER 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 بر لیتر 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  $0/086$  رسید.

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  $37^{\circ}\text{C}$  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 سوسپانسیون 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 سوسپانسیون باکتری به ۱۰۰ میلی لیتر محیط MSM حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن تلقیح شد. ارلن‌ها بر روی شیکر درون انکوباتور در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. میزان رشد باکتری هر ۲۴ ساعت یک‌بار به مدت ۱۲ روز مورد سنجش قرار گرفت (Malatova, 2005; Nnamchiet al., 2006).

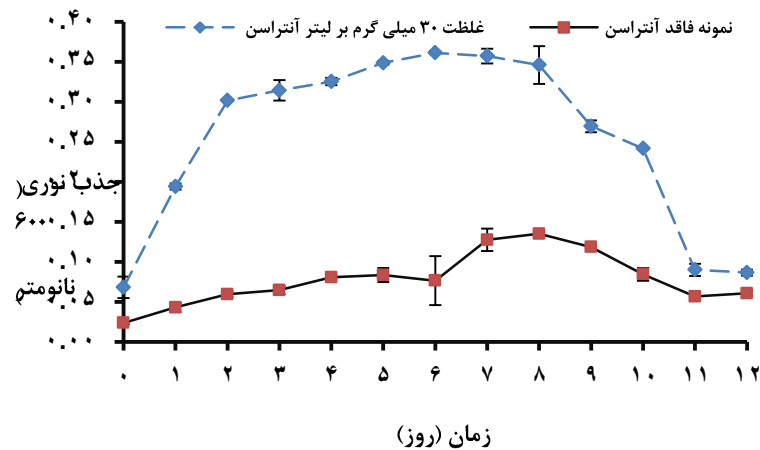
جدول ۱. خصوصیات بیوشیمیایی باکتری *B. pumilus*

تست های بیوشیمیایی	باکتری <i>Bacillus pumilus</i>
Gram reaction	+
Shape	Rods
Oxidase	+

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

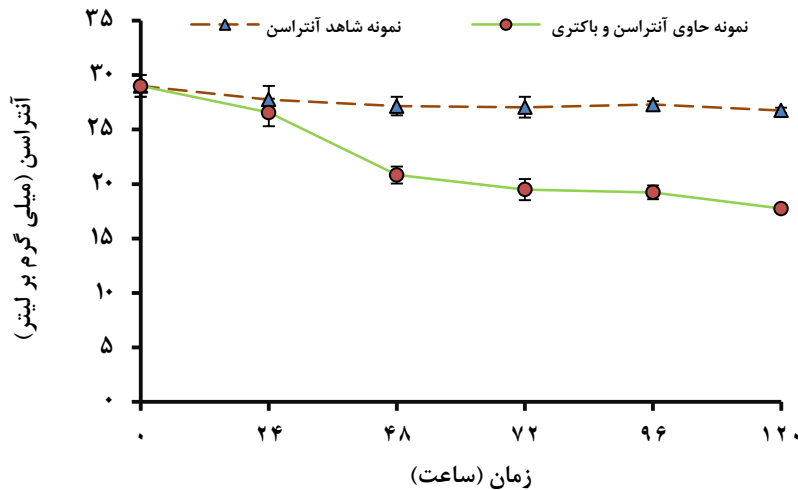
جدول ۲. سنجش ترشح بیوسورفاکتانت توسط باکتری *B. pumilus*

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

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

نهایت پس از ۱۲۰ ساعت میزان سوپسترای کربنی به مقدار  $۱۷/۷۵ \pm ۰/۳۲۳$  میلی گرم بر لیتر سنجش شد.

منحنی تغییرات غلظت آنتراسن توسط باکتری *B. pumilus* در شکل ۲ آمده است. سرعت کاهش هیدروکربن در ۲۴ ساعت اولیه بسیار پایین بود. در



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

تولید بیوسورفاکتانت و سپس کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهده کدورت 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 Sepahy و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز به دست آمد. این محققین مشاهده کردند که از ۳۵ باکتری جنس *Bacillus* جدا شده از رسوبات نفتی در جنوب ایران ۸ گونه تولید بیوسورفاکتانت را نشان دادند. 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)

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

تجزیه زیستی از جمله روش‌های بیوتکنولوژی است که می‌تواند باعث ترمیم و مدیریت بهتر اکوسیستم‌های آلوده گردد. میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها از مهمترین عوامل طبیعی تجزیه نفت به شمار می‌روند. 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 می‌دهند که بسیاری از باکتری‌ها می‌توانند 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).

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 فنانتین و پیرن را از رسوبات دریایی مناطق اندونزی جداسازی شدند. نتایج حاکی از آن بود که گونه *B. pumilus* نقش مهمی در تجزیه هیدروکربن های نفتی بازی می کند. به طور 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 بهینه سازی محیط کشت و تغییر منبع هیدروکربنی گونه مذکور تحریک شده و منجر به تولید بیوسورفاکتانت و افزایش میزان تجزیه هیدروکربنی گردد.

#### نتیجه گیری نهایی

باکتری های مولد بیوسورفاکتانت از رشد و میزان تجزیه زیستی بهتری نسبت به باکتری های 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  $17/75 \pm 0/323$  میلی گرم بر لیتر کاهش داد. بنابراین می 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 می شود. همچنین از همکاری اداره کل بنادر و دریانوردی استان خوزستان واقع در بندر امام خمینی (ره) صمیمانه قدردانی می گردد.

#### منابع

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 سوپسترای هیدروکربنی رشد کرده و موجب کدورت محیط کشت گردید.

یعقوب زاده (۱۳۸۵)، باکتری هایی را از نمونه های 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 غنی سازی جمعیت باکتری های خاک های آلوده به ترکیبات آروماتیک در محیط کشت دارای فنانتین، ۱۱ گونه مقاوم را جداسازی و خالص سازی کردند. تمامی گونه ها قادر به تجزیه محدوده وسیعی از این ترکیبات بودند. بررسی ها نشان داد جنس *Bacillus* در حضور نفتالن قادر به رشد بودند. با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر می توان 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 هیدروکربن های مورد آزمایش برخوردار بود. در این مطالعه نیز این گونه در غلظت مشابه رشد نمود و  $40/833$  درصد از آنتراسن را تجزیه کرد. طی تحقیقاتی Khanna و همکاران (۲۰۱۱) توانایی رشد *B. pumilus* (MTCC 1002) جدا شده از لجن های نفتی در حضور ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر پیرن را بررسی نمودند. این سویه ۶۴ درصد از پیرن به نحو موثری تجزیه نمود. همچنین Nanganuru و همکاران (۲۰۱۲) جنس *Bacillus* پتانسیل تجزیه زیستی ترکیبات نفتی را دارد و بیشترین مقاومت را در سطوح بالای از نفت نشان می دهد. این جنس به دلیل دارا بودن آنزیم های متعدد هیدروکربن را شکسته و مورد مصرف قرار داده و رشد قابل توجهی

- 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 spills. *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 for Cleaning 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 Nogueira, R. 2007. Growth of *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus* یعقوب زاده، ز. ۱۳۸۵. تجزیه بیولوژیکی نفتالن با استفاده از باکتری های موجود در بنادر نوشهر و امیر آباد. *مجله علوم دریایی ایران*، شماره ۱ و ۲، سال پنجم، ص. ۶۸-۷۵.
- اخوان سپهی، ع. و حقیقت، س. و پاسدار، ه. ۱۳۸۸. بررسی توانایی تولید بیوسورفاکتانت توسط *Bacillus licheniformis* و *BCRC Bacillus subtilis* HAZ2. *مجله علوم دانشگاه تهران*، شماره ۱، سال سی و پنجم، ص. ۶۷-۷۴.
- Aitken, M.D., Stringfellow, W.T., Nagel, R.D., Kazunga, C. and Chen, Sh. 1998. Characteristics of phenanthrene-degradinbacteria isolated from soils contaminated with polycyclic 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. *Environmental Toxicol. 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

- 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-preserved contaminated processwater. In proceedings of the 2001 Mississippi Water Resources Conference. Raymond, Mississippi, 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, MA Edition.
- Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., Ryckebore, J., 2001. Bioremediation of diesel oil-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., and van Hamme, 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 Microbiological Methods. 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.
- 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 microbial community in oiled mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin. 41(7): 413-419.
- Roostan, Z., Safahieh, A., Mojodi, F., Zolgharnein, H., Ghanemi, K. and Abiar, H. 2012. Phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus*



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

FatemehShahaliyan<sup>1\*</sup>, AlirezaSafahieh<sup>2</sup>, NeginSalamat<sup>۲</sup>, FatemehMojodi<sup>۲</sup>, MostafaZaredoost<sup>۴</sup>

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 could have the potential in bioremediation of this pollutant from environments.

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

---

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