

جداسازی باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به آنتراسن از رسوبات نفتی

بندر امام خمینی

راضیه لموچی^۱، فاطمه شاه‌علیان^{۱*}، علیرضا صفاهیه^۲، نگین سلامات^۲، فاطمه موجودی^۳، هاجر

آیبار^۴، مصطفی زارع‌دوست^۵

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی دریا گرایش آلودگی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر،

خرمشهر، ایران

۲- استادیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۳- دانشجوی دکتری محیط زیست، گروه محیط زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری آلودگی محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، تهران، ایران

۵- دانشجوی دکتری مدیریت محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، دانشکده محیط زیست و انرژی،

تهران، ایران

fatemehshahaliyan@gmail.com

چکیده

امروزه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی در تصفیه ضایعات خطرناک مانند فاضلاب‌ها، رواناب‌های صنعتی و آلاینده‌های نفتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مطالعه نمونه‌های رسوبات آلوده به نفت از بندر امام خمینی برداشت شدند. جهت جداسازی و سازگار نمودن گونه باکتری‌های موجود در رسوب با شرایط آزمایش، عملیات غنی‌سازی این میکروارگانیسم‌ها در ارلن‌های حاوی محیط کشت پایه نمکی مایع (pH: 7 ± 0.5) و غلظت ۳۰ ppm آنتراسن به‌عنوان تنها منبع کربن به مدت سه هفته انجام گرفت و در نهایت دو گونه باکتری خالص‌سازی شدند. گونه‌های *Bacillus pasteurii* و *Amphibacillus xylanus* و آمفی باسیلوس زایلانوس (به‌عنوان باکتری‌های شاخص رشد یافته در محیط کشت حاوی ۳۰ ppm آنتراسن شناسایی شدند. نتایج نشان داد که از میان این گونه‌ها باسیلوس پاستئوری با انکوباسیون در دمای ۳۰ °C و دوره زمانی ۵ روزه، سرعت رشد بیشتر و سازگاری سریعتری بر سطح محیط کشت حاوی ترکیب نفتی آنتراسن داشت.

واژه‌های کلیدی: بندر امام خمینی، باکتری گرم مثبت، رسوبات نفتی، تجزیه زیستی، آنتراسن.

مقدمه

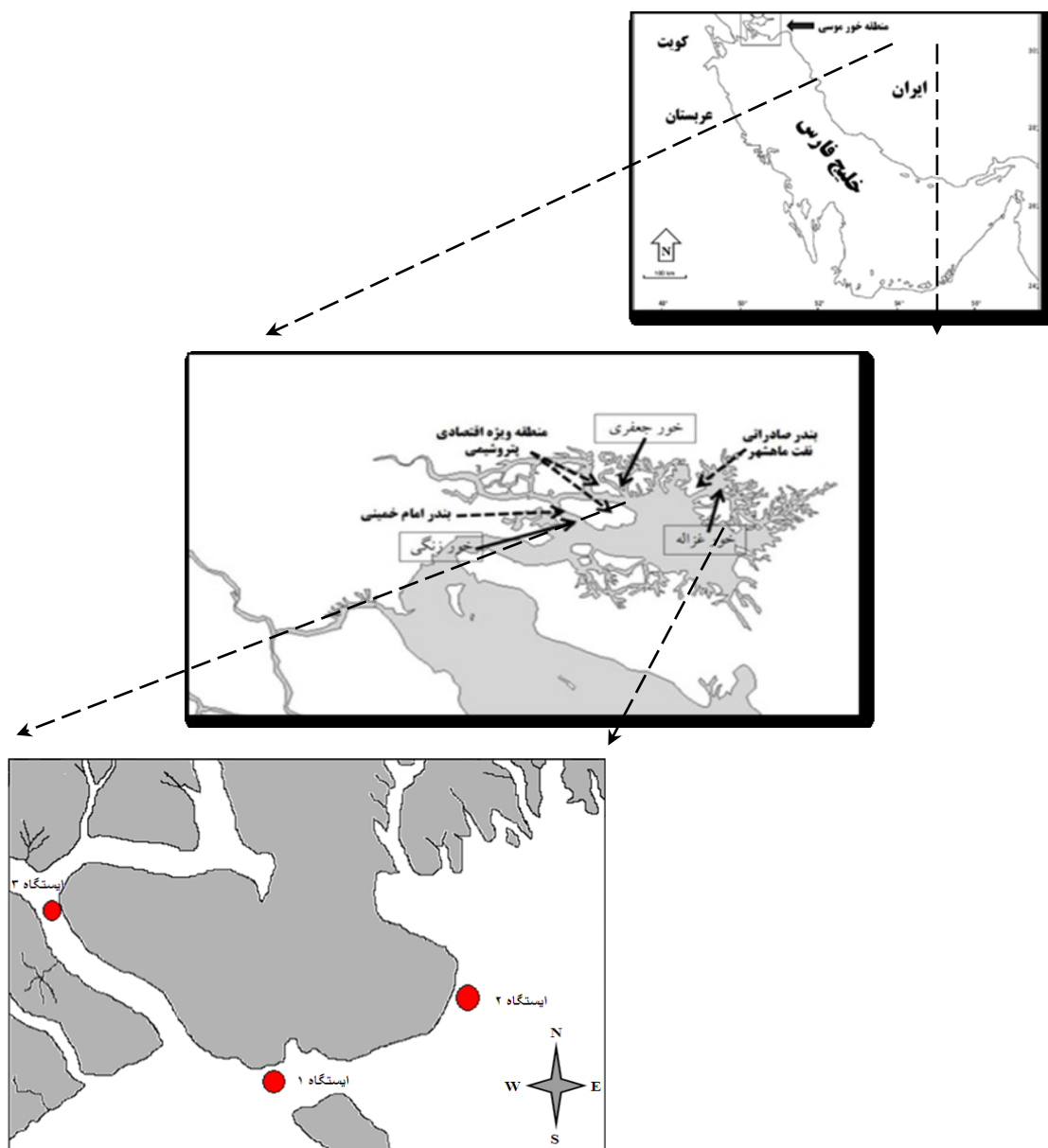
خلیج فارس یکی از مناطق نفت خیز دنیا محسوب می شود و در این ناحیه حمل و نقل بین المللی نفت به وسیله تانکرهای نفت کش، بسیار زیاد است. تمامی تانکرها از آب توازن (Ballast water) استفاده می کنند و به هنگام تخلیه این آب، محیط زیست دریایی را به نفت آلوده می سازند. علاوه بر این، تصادفات تانکرها و سوانح دریایی می توانند به شدت محیط زیست دریایی را تحت تأثیر قرار دهند (۳۱). ترکیبات نفتی محلول، می توانند در تماس با ماهی و صدف، باعث تجمع مواد شیمیایی بالقوه سرطان زا در زنجیره غذایی شوند. این ترکیبات همچنین بو و مزه ماهی را تغییر داده و آن را از نظر بهداشتی نامقبول می سازند. اثرات آلودگی نفتی بر موجودات بی حرکت و کم تحرک ساحلی مانند جلبک ها، صدف ها، حلزون ها و سایر جانداران بسیار زیاد و حائز اهمیت است (۱). تخریب زیست محیطی از جانب آلودگی های نفتی، نیاز به استراتژی های سازگار با محیط زیست را برای برطرف کردن آن ها مطرح کرده است. در این میان، تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم ها

نقش مهمی را به خصوص در تجزیه اجزای غیر فرار نفت از محیط زیست ایفا می کند (۷). باکتری ها به علت توانایی متابولیکی بالا در استفاده از کربن موجود در آلاینده های نفتی و سرعت رشد زیاد برای پاک سازی خاک های آلوده استفاده می شوند (۳۲). باکتری هایی که از بین میکروارگانیسم های بومی مناطق نفت خیز ایزوله می شوند، عمدتاً برای پاک سازی مناطق آلوده به نفت می توانند در آینده به کار گرفته می شوند (۲۴). هدف از این مطالعه نیز شناسایی باکتری های بومی و بررسی واکنش آن ها در تجزیه آنتراسن که یکی از هیدروکربن های نفتی موجود در منطقه بندر امام خمینی می باشد، است.

مواد و روش ها

نمونه برداری با ۳ تکرار، توسط ون وین گرب (۱۰) از رسوبات سطحی منطقه بندر امام خمینی از سه ایستگاه انجام گرفت (شکل ۱). نمونه های رسوب هر منطقه درون ظروف شیشه ای استریل روی یخ به آزمایشگاه انتقال یافت.

"لموچی و همکاران، جداسازی باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به آنتراسن از رسوبات نفتی بندر امام خمینی"



شکل ۱- ایستگاه‌های نمونه‌برداری

در آزمایشگاه، نمونه‌های مربوط به هر ایستگاه تحت شرایط استریل با هم ترکیب شدند. جهت سازگار نمودن میکروارگانیسم‌ها با شرایط آزمایش، ۱ گرم از رسوب هر ایستگاه به‌طور جداگانه ۱۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد به اضافه گردید (۱۷). عملیات غنی‌سازی برای جداسازی ایزوله‌های سازگار با آنتراسن انجام گرفت. ابتدا محیط کشت پایه نمکی مایع (محیطی حاوی املاح معدنی، عناصر کمیاب و ۳۰ ppm آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن) در تعدادی ارلن تهیه و pH آن‌ها روی 7 ± 0.5 تنظیم شد. سپس ارلن‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول حاوی رسوب و کلرید سدیم (رقت ۰/۱) به ارلن‌ها اضافه گردید (۲۰ و ۲۱).

بعد از یک هفته انکوباسیون در دمای 30°C و دور ۱۵۰ rpm، با مشاهده کدورت، ۱۰ میلی لیتر از هر محیط کشت به محیط پایه جدید انتقال داده شد و تا سه هفته این عمل تکرار شد (۴). جهت خالص‌سازی ایزوله‌ها ۱ میلی

لیتر از آخرین محیط کشت مایع مرحله غنی سازی بر روی پتری‌دیش حاوی محیط کشت پایه نمکی جامد کشت داده و به‌مدت ۵ روز محیط‌ها در دمای 30°C انکوبه شدند (۶). کلنی‌هایی که از نظر ظاهری متفاوت بودند به روش خطی روی محیط کشت جامد پایه حاوی آنتراسن کشت داده شد. این کار تا مشاهده کلنی‌های خالص هر باکتری در هر پلیت، تکرار شد (۲۱).

شناسایی باکتری‌ها

گونه‌های باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و آزمون‌های رشد (اکسیداز، کاتالاز و حرکت باکتری ...) و براساس کتاب رده‌بندی سیستماتیک باکتری‌ها (Bergey's) شناسایی شدند (جدول ۱). تست‌های استاندارد از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، شکل ظاهری و رنگ کلنی‌ها به شناسایی آن‌ها نیز کمک کرد (۹ و ۲۵).

"لموچی و همکاران، جداسازی باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به آنتراسن از رسوبات نفتی بندر امام خمینی"

جدول ۱- نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده

باکتری		تست
<i>Amphibacillus xylanus</i>	<i>Bacillus pasteurii</i>	
+	+	رنگ آمیزی گرم
میله ای	میله ای	شکل سلول
-	+	اکسیداز
-	-	تولید اندول
-	-	اوره
-	+	کاتالاز
+	+	د-کریوکسیلاز
-	-	فنیل آلانین
-	-	سیمون سترات
+/-	+	تخمیر لاکتوز
-	-	رشد بر محیط مک کانکی
-	-	KOH
+	+/-	MR
+	-	VP
-	-	SIM
+	-	TSI

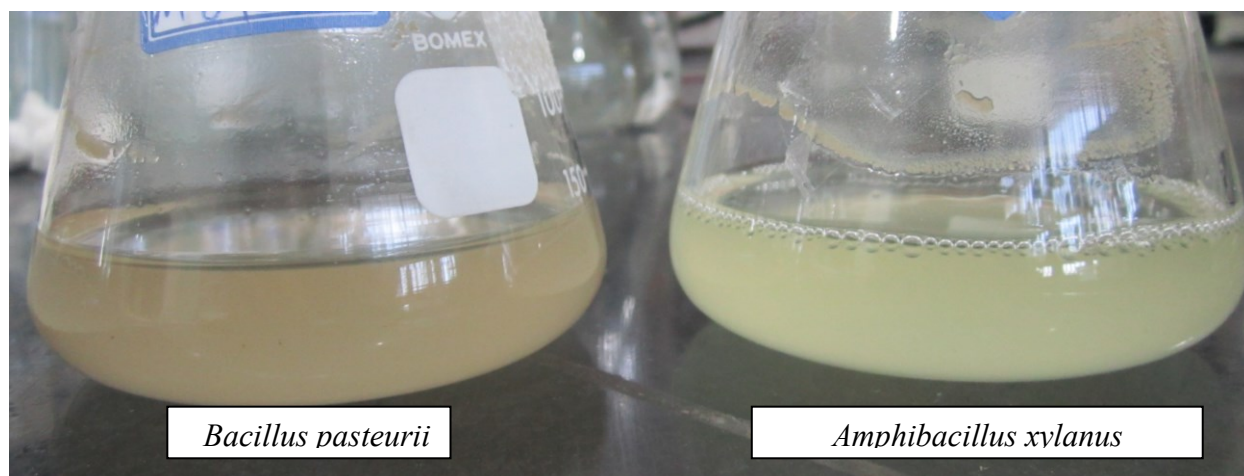
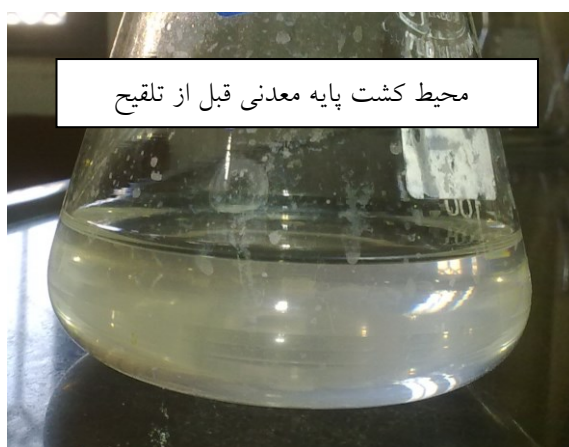
نتایج

آنتراسن را به عنوان تنها منبع کربنی داشته باشند. از این رو جمعا دو کلنی متفاوت جداسازی شد.

اولین هدف این تحقیق جداسازی و خالص سازی باکتری‌هایی بود که توانایی استفاده از

گویای رشد باکتری ها و ازدیاد آن‌ها در محیط کشت و نیز ایجاد متابولیت های ثانویه و گاهی اوقات رنگی در طول رشد باکتری ها و تجزیه سوبسترا می باشد (شکل ۲).

همچنین رشد باکتری باسیلوس پاستئوری موجب تغییر رنگ محیط کشت از شیری شفاف به قهوه ای زرد شد ولی باکتری آمفی باسیلوس زایلانوس تنها رنگ محیط کشت را اندکی کدر کرد. تغییر رنگ محیط کشت



شکل ۲- رنگ محیط کشت باکتری های ایزوله شده در اثر شدت رشد آن‌ها

"لموچی و همکاران، جداسازی باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به آنتراسن از رسوبات نفتی بندر امام خمینی"



Bacillus pasteurii



Amphibacillus xylanus

شکل ۳- کلنی‌های دو گونه باکتری

در کتاب باکتریولوژی برگگی (۹) مقایسه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

کشور ایران با توجه به داشتن مخازن نفتی، پالایشگاه‌ها و خطوط مربوط به انتقال نفت در معرض آلودگی‌های نفتی آب و خاک قرار دارد. حذف زیستی در مقایسه با دیگر روش‌های پاکسازی، راندمانی بالاتر با هزینه‌ای کمتر را نشان می‌دهد که از طریق انتخاب میکروارگانیسم‌های مناسب و بومی، هزینه‌ها به میزان بیشتری کاهش می‌یابد (۱۱ و ۲۷). یکی از فعال‌ترین میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات PAH، باکتری‌ها هستند (۱۳)، ۱۸ و ۱۹). جوامع میکروبی تجزیه‌کننده، در مناطق آلوده نسبت به مناطق غیرآلوده از رشد بیشتری برخوردارند و مناطق غیرآلوده یا با آلودگی کمتر اغلب دارای باکتری‌های اندک یا

باسیلوس پاستئوری گونه مقاوم به آنتراسن که در مقایسه با باکتری آمفی‌باسیلوس زیلانوس سریعتر بر روی محیط کشت حاوی آنتراسن خود را نشان داد و با سرعت بیشتری بر روی محیط کشت حاوی این ترکیب گسترش یافت. این باکتری بعد از ۲۴ ساعت روی پلیت آلوده به آنتراسن ظاهر و بعد از گذشت ۴۸ ساعت تمام سطح پلیت را پوشانده است. در حالی که باکتری آمفی‌باسیلوس زیلانوس با گذشت ۴۸ ساعت بر سطح پلیت ظاهر و به آرامی بر روی آن گسترش یافت (شکل ۳).

در راستای شناسایی باکتری‌های ایزوله شده، واکنش هر باکتری در هر محیط کشت با توجه به تغییر رنگ، pH یا تولید H_2S با علامت مثبت یا منفی مشخص شد (جدول ۱). سپس پاسخ باکتری با کلیدهای شناسایی مطرح شده

اصلاً بدون باکتری‌های تجزیه کننده‌اند. از آن جایی که باکتری‌های بومی مناطق آلوده به طور مدام در تماس با ترکیبات آروماتیکی هستند پس این باکتری‌ها به نحوی باید قادر به رشد در محیط حاوی این ترکیبات باشند. رشد گونه‌ها در محیط حاوی ترکیبات نفتی حاکی از مقاومت آن‌ها به این آلاینده می باشد. گونه‌های مقاوم قادرند از این ترکیبات به عنوان منبع غذایی جهت رشد و نمو استفاده نموده و با شکستن ساختار آن‌ها منجر به کاهش و حذف آلاینده‌های نفتی در محیط شوند. پژوهشگران زیادی توانایی تجزیه ترکیبات آروماتیک توسط این میکروارگانیسم‌ها را مربوط به آنزیم‌هایی می‌دانند که توسط پلاسمیدها کد می‌شود (۴). در این رابطه Geiselbrecht و همکاران (۱۹۹۶) نیز با شمارش باکتری‌های تجزیه‌کننده نفتالن و فناترن موجود در رسوبات آلوده پوگت سوند دریافتند که در هر گرم از وزن خشک رسوبات مناطق نفتی ۱۰۴ تا ۱۰۷ باکتری موجود می‌باشد، در حالی که در هر گرم از وزن خشک رسوبات یک سایت غیر آلوده ۱۰۳ تا ۱۰۴ باکتری وجود داشت (۱۰). بنابراین جداسازی و شناسایی باکتری‌های

تجزیه کننده PAH اولین گام جهت فهم روند تجزیه و سرنوشت آن‌ها در محیط می باشد (۱۵). باکتری باسیلوس پاستئوری موجود در خاک است که به علت توانایی در ته نشینی کربنات کلسیم، نقش مهمی در از بین بردن شکاف و ترک موجود در ساختارهای گرانیتی و بتنی دارد (۳). این باکتری برای رشد خود به شدت نیازمند اوره یا آمونیوم و محیط کاملاً قلیایی می باشد (۱۶).

آمفی باسیلوس زیلانوس به خانواده باسیلوس و از جمله باکتری‌های نمک دوست یا تحمل کننده شوری می باشند. اگر چه این باکتری فاقد سیستم تنفسی و پروتئین هم مانند کاتالاز است اما قادر به رشد در هر دو شرایط هوازی و بی هوازی می باشد. این باکتری در شرایط هوازی و بی هوازی دارای نرخ رشد و محصول سلولی یکسان است که به علت وجود مسیرهای تامین انرژی در هر دو حالت هوازی و بی هوازی می باشد (۱۹).

در این تحقیق باکتری باسیلوس پاستئوری و آمفی باسیلوس زیلانوس قادر بودند ترکیبات سمی هیدروکربن آنتراسن را به بیوماس میکروبی تبدیل نماید. این بیوماس به دلیل بی خطر بودنش می‌تواند به عنوان کود بیولوژیکی

"لموچی و همکاران، جداسازی باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به آنتراسن از رسوبات نفتی بندر امام خمینی"

و نیز شروع‌کننده زنجیره غذایی به حساب آید. ایزوله‌های تحقیق حاضر در مرحله غنی سازی طی دوره زمانی ۲۱ روزه توانستند خود را با محیط کشت جدید آزمایشگاهی وفق دهند اما با کشت‌های انجام شده طی عمل خالص‌سازی، این زمان به ۳ روز کاهش پیدا کرد. دلیل این سازش ممکن است بخاطر ایجاد تغییرات در سلول باکتری و سنتز آنزیم های جدید به وسیله میکروارگانیسم‌ها باشد (۳۰).

Bacillaceae به دلیل داشتن آنزیم‌های متعدد توان بالقوه‌ای در حذف آلاینده های نفتی به ویژه PAH دارا می‌باشند. فعالیت متابولیکی این دسته از باکتری‌ها باعث شده که با سرعت بیشتری هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کنند. توان تجزیه‌کنندگی جنس باسیلوس در نتایج تحقیقات محققان مختلفی اشاره شده است.

Zhuang و همکارانش (۲۰۰۳) نیز جنس‌های میکروکوکوس، باسیلوس و استافیلوکوکوس را از رسوبات دریایی مناطق جذر و مدی گرمسیری آلوده به نفت جداسازی کردند. این باکتری‌های گرم مثبت، جمعا بیش از ۶۹٪ از جمعیت میکروارگانیسم ها را در منطقه مذکور، تشکیل داده اند (۳۳).

Survery و همکاران در سال ۲۰۰۴ به روی خاک نزدیک به چند پمپ بنزین در شهر کراچی تحقیقی انجام دادند که موفق به جداسازی و شناسایی ۶۰ سویه باکتری شدند که اکثر آنها از جنس باسیلوس بودند و توانایی حذف هیدروکربن‌های مورد آزمایش را داشتند (۲۶). Hunter و همکاران (۲۰۰۵) توانستند باکتری‌هایی باکتری باسیلوس با قابلیت تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک را از خاک‌های آلوده جداسازی کنند. این جنس پس از چهار روز انکوباسیون، توانست به ترتیب ۴۰ و ۵۰ درصد از هیدروکربن موجود در محیط کشت را تجزیه نماید. ژن‌های این باکتری‌ها قادرند کاتالیزهای بیولوژیکی تولید کنند و مواد شیمیایی خطرناک را، اکسید، احیا، دهاالوژنه و هیدرولیز کرده و با تولید ترکیبات حد واسط می‌توانند مواد آلی را تجزیه کرده و آب، دی‌اکسید کربن و موادی با سمیت کمتر تولید نمایند (۱۲ و ۲۳).

همچنین Toledo و همکاران (۲۰۰۶) نیز ۱۴ سویه باکتری گرم مثبت (۳ سویه میکروکوکوس، ۱۱ سویه باسیلوس) را از نمونه‌های خاک نفتی جداسازی و شناسایی کردند (۲۸). طبق گزارشات در طلایی و

عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن شناخته شدند.

نتیجه‌گیری

باکتری‌های جداسازی شده در این تحقیق قادر بودند در حضور آنتراسن بخوبی رشد کنند. لذا می‌توان آن‌ها را به منظور رفع آلودگی‌های نفتی آب‌ها، سواحل، رسوبات و خاک‌های شور و شیرین نسبتاً گرم، همچنین به منظور استفاده صنعتی در آینده پیشنهاد نمود.

تشکر و قدرانی

کلیه آزمایش‌های مربوط به سنجش در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر صورت گرفت. به این وسیله از حمایت‌های اجرایی این دانشگاه سپاسگزاری می‌شود. لازم می‌دانیم از اداره کل بنادر و دریانوری استان خوزستان واقع در بندر امام خمینی به دلیل همکاری در نمونه‌برداری قدرانی و تشکر کنیم.

همکاران (۱۳۸۷) از چهار منطقه آلوده به ترکیبات نفتی نمونه‌برداری نموده و میکروارگانیزم‌های قادر به زندگی در مجاورت نفت خام را جداسازی و خالص سازی کردند. در این مطالعه ۱۴ میکروارگانیزم از نمونه‌ها جداسازی گردید. باکتری‌های A-3 و A-14 به ترتیب با ۸۹ و ۸۶ درصد کاهش ترکیبات آروماتیک بیشترین کارایی را در تجزیه ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام دارا بودند (۲).

در تحقیق دیگری که توسط Arbabi و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد عملیات تجزیه فنانترین از دو سایت آلوده به نفت خام در ایران بررسی شد (۵). Reda در سال ۲۰۰۹ خاک‌های آلوده به نفت را مورد بررسی قرار دادند که باکتری‌های تجزیه‌کننده جدا سازی شده شامل باکتری‌های سودوموناس، باسیلوس، میکروکوکوس بودند (۲۲). Eduok و همکاران در سال ۲۰۱۰ یک مانگرو در نیجریه را مورد بررسی قرار دادند و باکتری‌های تجزیه‌کننده PAH را جداسازی و شناسایی کردند که در بین آن‌ها گونه باسیلوس هم حضور داشت (۸). در این تحقیق هم باکتری‌های جنس باسیلوس به

"لموچی و همکاران، جداسازی باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به آنتراسن از رسوبات نفتی بندر امام خمینی"

References

فهرست منابع

۱. کلارک، آر. (۱۳۷۹). آلودگی دریا. ترجمه محمد علی زاهد، محمدی دشتکی، ز. انتشارات نسق و نقش مهر. چاپ اول، ص ۲۶۴-۲۶۷.
۲. طلایی ا.، جعفرزاده ن.، طلایی م.، بهشتی م. (۱۳۸۷). کاربرد سودوموناس آئروژنوز در تجزیه ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام شناور بر روی سطح آب. یازدهمین همایش ملی بهداشت محیط زاهدان، ۷ تا ۹ آبان. زاهدان.
3. Achal V., Mukherjee A., Basu P.C. and Reddy M.S. (2009). Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. J Ind Microbiol Biotechnol. 36: 433-438.
4. Al-Thani R.F., Abd-El-Haleem D.A.M. and 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.
5. Arbabi M., Nasser S. and Anyakora C. (2009). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum contaminated soils. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 28(3): 53-59.
6. Coral G and Karagoz S. (2005). Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from a petroleum refinery soil, Annals of Microbiology. 55 (4): 255-259.
7. Ebrahimi S., Ladan Sh and Malekoti M.J. (2009). Feasibility of Different Petroleum Pollutants Remediation in soil and an algorithm based on the type of pollutants. 11th Soil Science Congress of Iran, Gorgan. Iran. Pp: 21-23.
8. Eduok S.I., Ebong G.A., Udoinyang E.P., Njoku J.N. and Eyen E.A. (2010). Bacteriological and polycyclic aromatic hydrocarbons accumulation in mangrove oyster from Douglas creek. Nigeria, Pakistan Journal of Nutrition. 9(1): 35-42.
9. Garrity G.M. (2005). In D.J. Brenner, N.R. Krieg and J.T. Staley(ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Springer. New York. 2c:323-384.
10. Geiselbrecht A.D., Herwig R.P., Deming J.W. and Staley J.T. (1996). Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments. Appl. Environ. Microbiol. 62(9): 3344-3349.

11. Hanson K.G., Nigam A., Kapadia M. and Desai A.J. (1997). Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3, Current Microbiology. 35: 191-193.
12. Hunter R.D., Ekunwe S.I., Dodor D.E., Hwang H.M. and Ekunwe L. (2005). *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo[a]pyrene. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2(2): 267-71.
13. Johnsen A.R., Wick L.Y. and Harms L. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution. 133: 71-84.
14. Kayode T.M., Eniola K.I.T., Olayemi A.B. and Igunnugbemi O.O. (2008). Response of Resident Bacteria of a Crude Oil-Polluted River to Diesel Oil. Am-Euras. J. Agron. 1(1): 06-09.
15. Khalid M., Tianling Z., Huasheng H., Zhiming Y., Jianjung Y. and Zhong H. (2004). Preliminary study on PAH degradation by bacteria from contaminated sediment in Xiamen Western sea, Fugian, china. chin.J.Oceaned. Limnol. 22(4): 431-435.
16. Klein M., Kaltwasser H. and Jahns T. (2002). Isolation of a novel, phosphate-activated glutaminase from *Bacillus pasteurii*, FEMS Microbiology Letters. 206: 63-67.
17. Kumar M., Leon V., Materano A.D.S. and 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.
18. Leung M. (2004). Bioremediation: Techniques for Cleaning up a mess. BioTeach Journal. 2:18-22.
19. Mochizuki D., Arai T., Asano M., Sasakura N., Watanabe T., Shiwa Y., Nakamura S., Katano Y., Fujinami S., Fujita N., Abe A., Sato J., Nakagawa J. and Niimura Y. (2014). Adaptive response of *Amphibacillus xylanus* to normal aerobic and forced oxidative stress conditions. Microbiology 160: 340-352.
20. Mukred A.M., Hamid A.A., Hamzah A. and 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.
21. Nnamchi C.I., Obeta J.A.N. and 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.
22. Reda A.B. (2009). Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. Journal of Applied Sciences Research. 5(2): 197-211.

"لموچی و همکاران، جداسازی باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به آنتراسن از رسوبات نفتی بندر امام خمینی"

23. Samanta S.K., Singh O.V. and Jain R.K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends in Biotechnology. 20: 243-248.
24. Seyed Alikhani S., Shorafa M. and Asgharzade A. (2009). Treatments efficiency of bacterial production internal on biological treated of hydrocarbon contaminated soil. National energy congress. Tehran, Iran. 7: E05104.
25. Sneath P.H.A., Mair N.S. and Holt J.G. (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology .Vol 2, Williams and Wilkinks. London. Pp: 965-1599.
26. Survery S., Ahmad S., Subhan S., Ajaz M. and AjazRasool S. (2004). Hydrocarbon degrading bacteria from Pakistani soil: isolated, identification, screening and genetical studies. Pakistan Journal of Biological Science 7(9): 1511-1522.
27. Swannell R.P.J., Lee K. and McDonagh M. (1996). Field evaluation of marine oil spill bioremediation, Microbiological Reviews. 60 (2): 342-365.
28. Toledo F.L., Calvo C., Rodelas B. and Gonzalez-Lo pezJ. (2006). Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities, Systematic and Applied Microbiology, 29: 244-254.
29. Vallero A.D. (2010). Environmental Biotechnology: A Biosystems Approach, 1 St .Elsevier Academic Press, Burlington, MA Edition.
30. Wain M., Tindall B.J., Schumann P. and Ingvorsen K. (1999). *Gracilibacillus* gen. Nov., with descriptiono *gracilibacillus halotolerans* gen. Ov; tranfer of *bacillus salexigens* to the genus *salibacilus* gen. Nov., as *sallibacillus salexigens* comb. Nov., International journal of systematic bacteriology. 49: 821-831.
31. Wolfe D.A., Hameedi M.J., Galt J.A., Watabayashi G., Short J., O'Claire C., Rice S., Michel J., Payne J.R., Braddock J., Hanna S. and Sale D. (1994). The fate of oil spilled from Exxon Valdz, Environmental Science and Technology (ACS Publications). 28: 560-A-568A.
32. Wolicka D., Suszek A., Borkowski A. and Bielecka A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. Biortech. 100: 3221-3227.
33. Zhuang W.Q., Tay J.H., Maszenan A.M., Krumholz L.R. and Tay S.T.L. (2003). Mportance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. Letters in Applied Microbiology. 36: 251-257.

Isolation of anthracene resistant positive gram bacteria from Imam Khomeini Port oil polluted sediments

Razieh Lamoochi¹, Fatemeh Shahaliyan^{1*}, Alireza Safahieh², Negin Salamat²,
Fatemeh Mojodi³, hajar Abyar⁴, Mostafa Zaredoost⁵

- 1- M.Sc. Student, Department of Marine Biology, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr
- 2- Assist. Prof., Department of Marine Biology, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Khorramshahr
- 3- Department of Environmental Sciences, Natural Resources Faculty, University of Tehran, Karaj
- 4- PhD student in Environmental pollution, Tarbiat Modarres University, School of Natural Resources and Marine Sciences
- 5- PhD Student in Environmental Management, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Faculty of Environment and Energy

fatemehshahaliyan@gmail.com

Abstract

Today's most of microorganisms are used for purification of hazard waste such as municipal and industrial waste water and oil contaminants. In this study 2 bacterial species were isolated and purified in hydrocarbon (anthracene) containing media from oil polluted sediment of Imam Khomeini port. *Bacillus pasteurii* and *Amphibacillus xylanus* species were identified as indicator degrading bacteria in media containing 30 ppm anthracene. Results showed among these bacteria, *Bacillus pasteurii* had faster growth and compatibility on solid medium containing anthracene oil hydrocarbon for 5 days at 30°C incubation.

Keywords: Imam Khomeini port, Positive Gram Bacteria, Oil Polluted Sediments Bioremediation, Anthracene.