علـوم محیـطی سال پنجم ، شماره چهارم، تابستان ۱۳۸۷
ENVIRONMENTAL SCIENCES Vol.5, No.4 , Summer 2008
۱۱۵-۱۲۲

جداسازی وبررسی سینتیک رشد باکتریهای گرم مثبت تجزیه کننده نفتالن (Naphthalene) از حوزه جنوبی دریای خزر

زهرا یعقوب زاده *

گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر

چکیده

نفتالن جزء آن دسته از ترکیبات آروماتیک می‌باشد که در اکوسیستم‌های آبی و خاک به‌وفور دیده می‌شود. میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده متفاوتی پتانسیل تجزیه نفتالن را دارا می‌باشند. جامعه مورد بررسی بنادر نوشهر و امیر آباد بوده نمونه‌ها ابتدا در محیط کشت پایه حاوی املاح معدنی، نفتالن و عناصر کمیاب کشت داده شده و بعد از انکوباسیون در دمای $30\ ^{\circ}C$ و دوره‌های زمانی ۷۲-۲۴ ساعت، پس از انجام تست‌های اولیه و بیوشیمیایی، باکتری‌ها در حد جنس و گونه شناسایی شدند. مرجع مورد استفاده جهت شناسایی باکتری‌های جدا شده Austin و MacFaddin بوده است. نتیجه تحقیق، جداسازی چهار گونه از باکتری‌های گرم مثبت شامل جنس‌های باسیلوس (*Bacillus sp.*)، میکروکوکوس (*Micrococcus sp.*) و پدیوکوکوس (*Pediococcus sp.*) می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که به هنگام استفاده از باسیلوس به منظور تجزیه نفتالین، با غلظت ۳۰mM در زمان صفر پس از ۳۱۲ ساعت به ۹/۴۵ mM رسیده و ۶۸/۵ درصد درصد کاهش داشته است. و با غلظت ۴۰ mM در زمان صفر پس از ۳۱۲ ساعت به ۳/۴۳ mM رسیده و ۹۱/۴۲ درصد درصد کاهش داشته است. بین باکتری‌های آزمایش شده، جنس باسیلوس از قدرت تجزیه کنندگی بیشتری برخوردار بوده است.

کلید-واژه‌ها: باکتری‌های تجزیه کننده گرم مثبت ، دریای خزر، نفتالن.

Isolation and Evaluation Their Growth Kinetic of Positive Gram Bacteria Degrader in Southern Region of the Caspian sea.

Zahra Yaghoubzadeh*
Department of Biotechnology, Ecology Research Academy of the Caspian Sea

Abstract

Naphthalene is PAHs and is distributed in aquatic and soil ecosystems. Different microorganisms are able to degradate various concentration of naphthalene. Sampling was done from two Noshar and Amirabad harbors. Samples were transferred to Ecological Academy of Caspian Sea and then were cultured in minimal basal medium included naphthalene and trace elements and were incubated in 30°C for 24-72 h. Finally, isolated colonies were identifical as primary and biochemical test. The most important of isolated positive gram bacteria were Bacillus sp, Micrococcus sp and Pediococcus sp. The results showed that concentration of 30 ,40 mM of naphthalene after 312h have been decreased to 9/45 (68/8%) and 3045(91/42%) respectively for Bacillus .

Keywords: degrader bacteria, Caspian sea, naphthalene.

* Corresponding author. *E-mail Address*: Za_yaghoub@yahoo.com

مقدمه

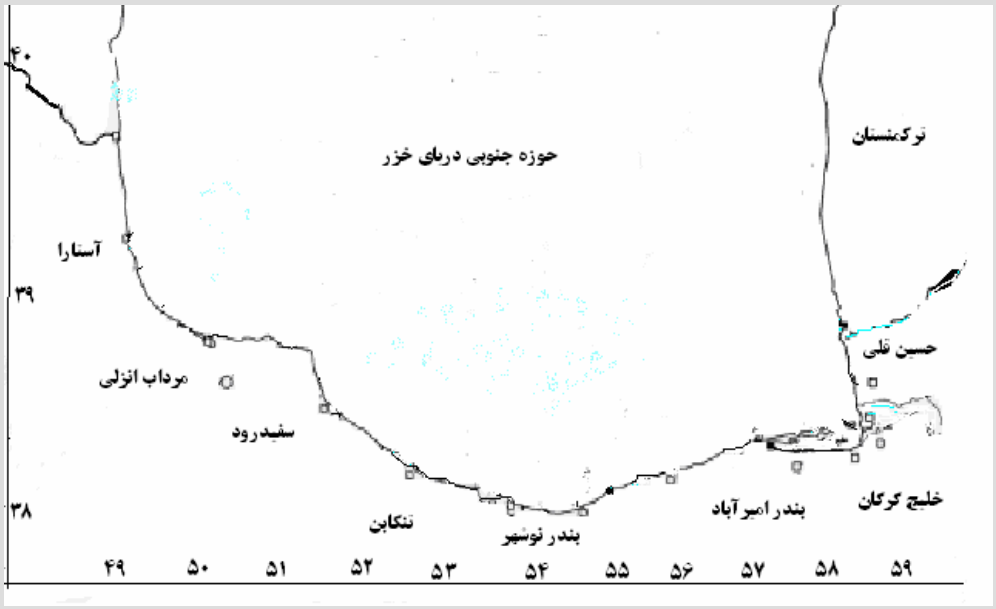
ترکیبات نفتی از مهم‌ترین آلاینده‌های شیمیایی هستند و بـه چهـار گـروه آسـفالتین‌هـا، هتروسـیکلیک‌هـا، آلیفاتیـک وآروماتیک تقسیم بندی می‌شـوند (Morrisom and Boyd, 1990) که از منابع طبیعی و مصنوعی وارد اکوسیـستم‌هـای آبـی وخاکی شده و محیط را آلـوده مـی‌نماینـد. از مهـم‌تـرین راه‌های ورود ترکیبات نفتی به محیط آبی، صنعت حمـل ونقل مـی‌باشـد(Nasrollahzadeh *et al*., 1997). تـصادفات تانکرها، نفـت سـوختی وگنـدآب، حوضـچه‌هـای تعمیـر تصادفات شناورها - تأسیسات ثابت شامل پالایشگاه‌هـای ساحلی، تولیدات دور از ساحل پایانه‌های دریـایی-سـایر منابع مثل فاضلاب انسانی ، فاضلاب صنعتی، هرزآب‌های شهری، ورودی رودخانه، عوامل ورودی از اتمسفر، دفـن در اقیانوس‌ها- بیوسنتز هیدروکربن‌ها مثـال‌هـایی از ورود ترکیبات نفتی به محیط‌هـای آبـی هـستند (Clark, 1923). دریای خزر با توجه به موقعیت جغرافیایی، وسعت، وجود ذخایر زیستی گیاهی وجانوری و منابع نفت و گاز وجـود صـنایع شـیلاتی وتـأمین مـواد پروتئینـی و صـید ماهیـان خاویاری و استحصال خاویار و ماهیان استخوانی در آمـد ارزی وحمل و نقل در یایی در مسیر اصلی ترانزیت کـالا منطقه آسیای میانه از منحصر به فـردتـرین دریاچـه جهـان است (Rezvanigilkolaei *et al*., 2005) . بنابراین ضرورت نظافت زیستگاه‌های طبیعی جمعیت‌های میکروبـی قبـل از هر کار دیگر لازم وضروری می‌باشد.

ترکیبات آروماتیک از طریق رودخانه‌های حاشیه در یای خـزر (ولگـا، اتـرک، اورال، کـورا)بـه ایـن دریـا وارد می‌شوند. با توجـه بـه پایـداری ایـن ترکیبـات (بـه‌واسـطه داشـتن حلقـه‌هـای بنزنـی)، مـی‌تـوان اذعـان نمـود کـه ترکیبات فوق از طریق چرخ‌هـای آبـی سـیکلونی وآنتـی سـیکلونی وارد حـوزه جنـوبی دریـای خـزر شـده‌انـد (Sotoudehnia *et al*., 2003). تحقیقـات انجـام شـده در ارتباط با وجود ترکیبات آروماتیک در بافت ماهی و آب حـوزه جنـوبی دریـای خـزر نـشان از وجـود ترکیبـات آروماتیـک نظیـر نفتـالن، آس نفتـالن، فلـورن، فنـانترن، آنتراسن، فلورانتن و... باغلظت‌های مختلـف از ۰/۰۰۴ تـا ۲/۸۲ ppm می‌باشد (Rezvanigilkolaei *et al*., 2005). یکی از مهم‌ترین ترکیبات آروماتیک ،نفتالن است که ترکیب دو حلقه‌ای ودارای غلظت ۰/۰۰۸ تا ۰/۶۲۸ ppm در آب حـوزه جنـوبی دریـای خـزر و غلظـت ۰/۱ تـا ۲ ppm در بافـت ماهیـان دریـای خـزر اسـتخراج شـده اسـت (Nasrollahzadeh *et al*., 1997). ترکیبـات آروماتیـک سمی، سرطان‌زا یا موتاژن هـستند (Samanta *et al*., 2002) هیدروکربن‌هـای آروماتیـک چنـد حلقـه‌ای (PAHs) در چربی حل شده و به آسانی از طریـق بافـت‌هـای مختلـف جذب شده و در بافت‌هایی که دارای چربی‌اند به آسـانی جایگزین می‌شود. نفتالن اولین گروه از PAHs اسـت کـه بـه‌عنـوان یـک آلاینـده متـداول در آب در نظـر گرفتـه می‌شود. سمیت نفتالن ثابت شده وفعالیـت کارسـینوژیک (در سرطانزایی) آن به اثبات رسیده واین ماده مهار کننده تنفسی میتوکندری است(Samanta *et al*., 2002).

هدف از این تحقیق جداسازی بـاکتری‌هـای گـرم مثبـت تجزیه کننده نفتالن، بررسی سینتیک رشـد بـاکتری‌هـای جدا شده در حضور غلظت‌های مختلف نفتالن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق جامعه مورد بررسی بنادر امیر آباد و نوشهر در استان مازندران که مجموعـا"۱۶ نمونـه از دو ایـستگاه در طـول ۴ مـاه(از آذر تـا اسـفند ۱۳۸۳) از نظـر وجـود باکتری‌های گرم مثبت تجزیه کننده نفتالن مورد ارزیـابی قرار گرفـت. نمونـه‌بـرداری بـا اسـتفاده از شیـشه‌هـای در سمباده‌ای استریل از عمق ۱۰سانتی‌متری از مناطق متفاوت انجام گرفته و سعی شد که نمونه‌برداری بیشتر از منـاطقی که آلوده به ترکیبات آلاینده بودند(در بنادر به‌خاطر تردد کشتی‌ها) اخذ گـردد. نمونـه‌هـا در کوتـاه‌تـرین زمـان بـه آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال یافته و پس ازقاطی کردن آنهـا در یـک ارلـن اسـتریل از صـافی



شکل ۱- ایستگاه‌های نمونه‌برداری بنادر امیر آباد و نوشهر در استان مازندران

میلی پور ۰/۴۵ عبور داده شد و پس از صاف کردن نمونه‌ها، کاغذ صافی حاوی رسوب میکروبی به محیط پایه حاوی املاح معدنی، عناصر کمیاب و نفتالن (به‌عنوان تنها منبع کربن) انتقال یافته و محیط حاصله به‌مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکر دار قرار داده شد. پس از مشاهده کدورت در محیط پایه معدنی، ابتداء رقت‌های سریال نمونه اولیه (10^{-6}mm-10^{-2})تهیه و در محیط کشت اختصاصی تریپتون سویا آگار وبلاد آگار کشت داد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون کلنی‌های گرم مثبت انتخاب و از نظر مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفته وپس از انجام تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های گرم مثبت از نظر جنس و گونه مشخص گردیدند(Macfaddin, 2000).

مرحله دوم آزمایش، به علت غالب بودن جنس باسیلوس، آن را در محیط TSA کشت داده وبه مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه نموده وپس از پایان زمان انکوباسیون وتهیه رقت‌های سریال (10^{-4}) درمحیط تریپتوکیس سویا آگار (TSA) کشت داده شد و تعداد کلنی‌های نهایی مشخص گردید. در کنار آزمایشات فوق، محیط پایه معدنی حاوی نفتالن به میزان ۳۰و۴۰ میلی مول(۰/۳۸۴ و۰/۵۱۲ گرم نفتالن) تهیه ورقت خاصی از باکتری(ضریبی از10^{-6}) به آن اضافه گردید.

ترکیبات محیط کشت پایه شامل : عصاره مخمر (۱ گرم)، NH4Cl (۱ گرم)، MgSO4 (۰/۱ گرم)، CaCl2 (۰/۰۴ گرم)، KH2PO4 (۰/۱ گرم)، Na2HPO4 (۰/۲ گرم) بوده که به آن عناصر کمیاب اضافه شده است. عناصر کمیاب مورد استفاده شامل : MnSO4 – 7H2O

(۳/۳ میلی گرم)، CuSO4 – 5H2O (۶/۲ میلی گرم)، ZnSO4 – 7H2O (۷/۶میلی گرم)، Na2MOO4 – 2H2O (۱۱/۷ میلی گرم)، FeSO4 - 7H2O، (۶۴/۱۶ میلی گرم) این ترکیبات را در ۱۰۰۰ml HCL ۰/۰۵ نرمال حل می کنیم (Abou seoud *et al.*, 2003 ;Annweiler *et al.*, 2000). تیمارها انتخاب شده در زمان‌های ۳۱۲، ۲۸۸، ۲۶۴، ۱۴۴، ۹۶، ۲۴، ۰ ساعت از نظر تغییرات رشد باکتری و نفتالن مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین ترتیب که برای ارزیابی رشد باکتری از محیط TSA و برای تغییرات نفتالن از دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل دستگاه Himadzu A14، دتکتور Electron Capture Detector (ECD)، هلیوم به‌عنوان گاز حامل، گاز ازن به‌عنوان make up، ستون کاپیلاری 0/53 mm ID× CB 10 30m استفاده گردید و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excell استفاده گردید.

نتایج

بیشترین باکتری‌های جدا شده مربوط به گرم مثبت‌ها جنس‌های، باسیلوس، میکروکوکوس و پدیوکوکوس بوده است. پراکنش باکتری‌های گرم مثبت تجزیه کننده نفتالن در منطقه نوشهر($۱۰^{-۶}$) بیشتراز امیر آباد ($۱۰^{۴}$–$۱۰^{۳}$) بوده

جدول۱ – پراکنش باکتری‌های گرم مثبت

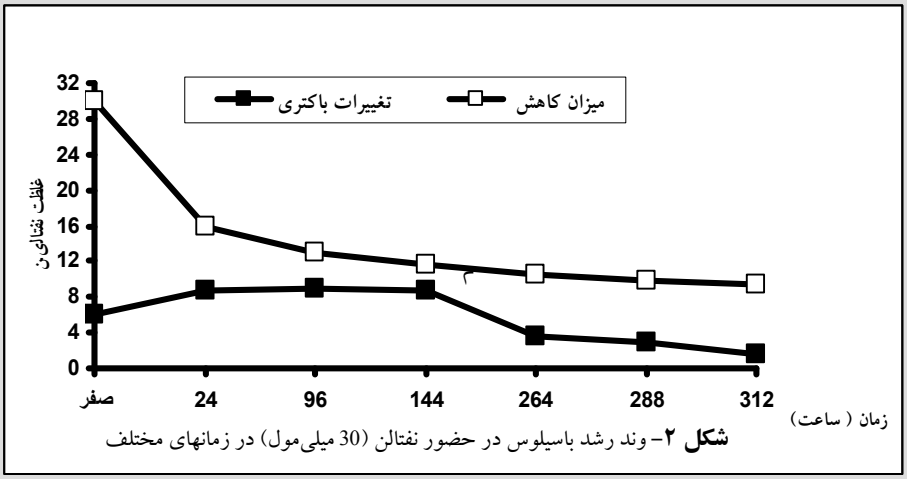
شماره نمونه	ایستگاه	باسیلوس	میکروکوکوس	پدیوکوکوس
۱	**نوشهر**	+	–	–
۲	#	+	+	–
۳	#	+	–	–
٤	#	+	+	+
٥	#	=	+	+
٦	#	+	+	–
۷	#	–	–	–
۸	#	+	+	+
۹	**امیر آباد**	+	+	–
۱۰	#	+	–	–
۱۱	#	+	+	+
۱۲	#	+	–	–
۱۳	#	–	–	–
۱٤	#	+	–	–
۱٥	#	–	+	–
۱٦	#	+	–	–

جدول ۲- شناسایی نمونه‌های باکتریایی (گرم مثبت)

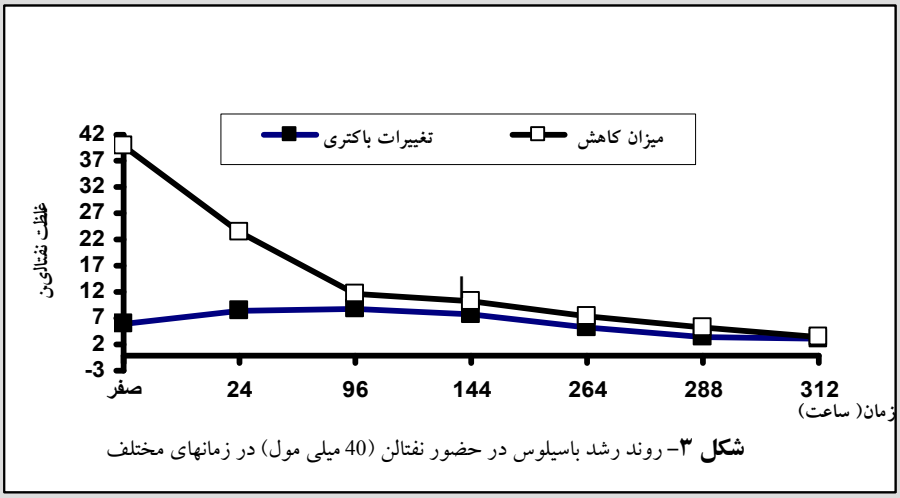
تست / باکتری	رنگ گرم	اکسیداز	کاتالاز	اندول	حرکت	OF	نیترات	سیمون سیترات	اوره	گلوکز	آرابینوز	مانیتول	ژلاتین
جنس باسیلوس	+	–	+	–	–	F	+	+	+	+	–	–	+
جنس پدیوکوک	+	–	+	–	–	F	–		–				+
جنس میکروکوک	+	+	+		–	O	–	–		–			+

است. بترتیب تعداد باکتری‌ها از بیشترین به کمترین شامل باسیلوس (10^{7}-10^{6})، میکروکوکوس (10^{5}-10^{4}) و پدیوکوکوس(10^{3}-10^{2}) بوده است. از ۱۶ نمونه مورد بررسی ۱۳ نمونه دارای باسیلوس (۸۱/۲۵ درصد) بودند. ۸ نمونه دارای میکروکوکوس (۵۰ درصد) و ۴ نمونه دارای پدیوکوکوس (۲۵ درصد) بودند. تعداد باسیلوس در حضور غلظت ۳۰ میلی‌مول نفتالن در زمان صفر cfu/ml 10^{6} بوده که پس از رشد صعودی وافزایش سه لوگی (بعد از ۹۶ ساعت) به‌تدریج کاهش یافته وبه لوگ cfu/ml 3×10^{1} در زمان ۳۱۲ رسیده است. تعداد باسیلوس در حضور غلظت ۴۰ میلی‌مول نفتالن در زمان صفر cfu/ml 10^{6} بوده که پس از رشد صعودی وافزایش دو لوگی (بعد از ۹۶ ساعت) بتدریج کاهش یافته وبه لوگ cfu/ml $1/3\times10^{3}$ در زمان ۳۱۲ رسیده است. نمودار۱ نشان می‌دهد که نفتالن با غلظت mM ۳۰ در زمان صفر پس از ۳۱۲ ساعت به mM ۹/۴۵ رسیده ودر حدود ۶۸/۵ درصد کاهش داشته است.

شکل ۳- نشان می‌دهد که نفتالن با غلظت mM۴۰ در زمان صفر پس از ۳۱۲ ساعت به mM ۳/۴۳ رسیده ودر حدود ۹۱/۴۲ درصد کاهش داشته است.



شکل ۲- روند رشد باسیلوس در حضور نفتالن (30 میلی‌مول) در زمانهای مختلف



شکل ۳- روند رشد باسیلوس در حضور نفتالن (40 میلی مول) در زمانهای مختلف

بحث

نفت حاوی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH) است، که برخی ازآن‌ها خاصیت سرطانزایی دارند (Samanta *et al.*, 2002). دراوایل دهه ۱۹۷۰، وحشت از این که PAH به‌طریقی مشابه به هیدروکربن‌های کلردار مانند DDT رفتار می‌کنند، این ترکیبات در برابر حمله باکتریایی مقاوم بوده و این ترکیبات در بافت‌های موجودات زنده دریایی با افزایش غلظت در طول زنجیره غذایی تا رسیدن به بالاترین سطوح درماهیان گوشتخوار، تجمع می‌یابند. درنتیجه، مصرف این ماهیان توسط انسان، در معرض تماس با مقادیر زیادی از این مواد سرطانزا، حتی در غیاب آلودگی آشکار نفتی، قرار می‌گیرند. خوشبختانه ثابت شد که این نگرانی‌ها بی‌اساس است مدرک کمی دال بر تجمع هیدروکربن‌های نفتی در موجودات زنده دریایی وجود دارد وغذاهای دریایی حاوی غلظت ناچیزی از PAH در مقایسه با آنچه به‌طور طبیعی در سایر مواد غذایی که در مقادیر بسیار بیشتری خورده می‌شوند. موجود است مصرف غذای دریایی بیش از ۳-۲ درصدجذب PAH از طریق رژیم غذایی عادی را شامل نمی‌شوند (Clark, 1923).

در تجزیه بیولوژیک از میکروب‌های مختلف استفاده شده و اساس کار آن استفاده از جمعیت‌های میکروبی به منظور تجزیه آلاینده‌ها بوده بنابراین ضرورت نظافت زیستگاه‌های طبیعی جمعیت‌های میکروبی قبل از هر کار دیگر لازم وضروری می‌باشد. گروه وسیع از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده PAHs، از آب‌های ساحلی و رسوبات جدا شده‌اند اغلب تجزیه کننده‌های PAH از رسوبات ساحلی باکتری‌ها هستند که نقش غالب در کاتابولیسمPAHها را دارا می‌باشند. بیشتر تجزیه کننده‌های PAH باکتریایی قادر به معدنی کردن PAHهای دویاسه حلقه‌ای هستند اگر چه تعداد کمی از تجزیه کننده‌ها می‌توانند PAHهای ۴و۵ حلقه‌ای را هم اکسید کنند. تجزیه PAH به فاکتورهایی مانند خواص فیزیکوشیمیایی PAHs ، زمان در معرض قرار گرفتن، غلظتPAHs ، وتعدادی از شرایط محیطی(اکسیژن، دما، قابلیت استفاده مواد غذایی، شوری و فعالیت حیوانات بنتیکی) و فاکتورهای فصلی بستگی دارد(Aitken , 1996). اکثر تجزیه کننده قوی نفتالن را باکتری‌های گرم منفی به‌خصوص سودوموناس‌ها تشکیل می‌دهند ولی در بین گرم مثبت‌ها باسیلوس‌ها قوی‌تر به حساب می‌آیند جنس باسیلوس جزء باکتری‌های اسپوردار هوازی بوده و به‌واسطه اسپور در محیط‌های نامناسب براحتی زنده مانده و بعد از این‌که به شرایط نامناسب محیطی سازگار شد شروع به رشد وتکثیر می‌کند این باکتری قادر به تجزیه ترکیبات آروماتیک تا سه حلقه بنزنی بوده و از آنها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کند. باسیلوس‌ها اگر محدودیتی در دستیابی به سایر منابع کربنی داشته باشند، تمایل به استفاده از ترکیبات آروماتیک خصوصا" نفتالن را دارا می‌باشد ولی اگر غلظت آن از حد معمول افزایش یابد به‌عنوان ماده سمی عمل کرده و باکتری قادر به رشد و تجزیه نخواهد بود در این صورت باکتری برای بقای خود به شکل اسپوردار در می‌آید ولی با این وجود مطالعات نشان داد که برخی از باکتری‌ها نظیر گونه‌های خاصی از سودوموناس‌ها به دلیل تولید آنزیم‌های مختلف تجزیه کننده، نسبت به باکتری‌های دیگر از ارجحیت خاصی برخوردار می‌باشند باسیلوس‌ها به لحاظ هوازی بودن، عمل تجزیه را در شرایط هوازی بهتر انجام می‌دهند.

جنس میکروکوک از باکتری‌هایی بود که از هر دو ایستگاه جدا شد. این باکتری اولا" تحمل شوری بالا را داشته و قادر به تجزیه ترکیبات آروماتیک دوحلقه بنزنی را می‌باشد. جنس پدیوکوکک جدا شده هم می‌تواند نفتالن را اکسید نماید و درمقایسه بادوباکتری بالا ضعیف‌تر عمل می‌کند. باسیلوس‌ها قادرند این ترکیبات را علاوه بر اکسید کردن آنها را به دی اکسیدکربن وآب تجزیه کنند به‌واسطه مقاومت بالای این باکتری‌ها و رشد

سریع آنها، محققین درصدند که با استفاده از مهندسی ژنتیک ژن مسئول تجزیه ترکیبات آروماتیک را به هر گونه باکتریایی دیگر انتقال دهند تا بتوان از گونه‌های جدید به‌طور گسترده در کاهش آلاینده‌ها استفاده نمایند. تحقیقات مختلفی در خصوص باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات آروماتیک و نفتالن انجام شده است. باکتری‌هایی نظیر، باکتری هوازی گرمادوست *Bacillus thermoleovorans* قادر به تجزیه نفتالن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بوده واز آن به‌عنوان تنها منبع کربن وانرژی در محیط کشت آزمایشگاهی استفاده می‌نماید این باکتری در ابتدای رشد دارای فاز سکون طولانی بوده (حدود ۲۵ ساعت) وپس از آن افزایش رشد باکتری با کاهش نفتالن همراه بوده است. پس از ۵ ساعت، سرعت رشد باکتری کاهش یافته و به حد ثابت می‌رسد. این باکتری در زمان ۵ ساعت غلظت نفتالن را ۰/۴ میکرو مول کاهش می‌دهد (Annweiler *et al.*, 1999). که با جداسازی باسیلوس در تحقیق حاضر مطابقت دارد.

باکتری باسیلوس سرئوس *Bacillus cereus* در حضور نفتالن رشد می‌کنند(Aitken *et al.*, 1998). مقادیر زیادی از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده نفتالین شامل آلکالیژنز دنیترینیکان *Alcaligenes denitrificans*، گونه مایکو باکتریوم *Mycobacterium* sp. ، گونه ردوکوکوس *Rhodococcus* sp.، کورینه باکتریوم ونال *Corynebacterium* venale، باسیلوس سرئوس *Bacillus cereus*، گونه موراگسلا *Moraxella* sp. گونه استرپتومایسز *Streptomyces* sp. جدا شده و برای معدنی شدن این ترکیبات مورد استفاده قرار گرفته‌اند(MacGillivray and Shiaris, 2000). باکتری اسفنگوموناس پاسیمومیلیس *Sphingomonas paucimobilis* سویه های BA2 وbp2 قادر به تجزیه آنتراسن وپیرن می‌باشند. وباکتری گرم مثبت *Mycobacterium* sp. ۱تا ۵۵ درصد قادر به معدنی کردن پیرن می‌باشند(Kastner et al., 1998).

که نتایج حاصل با نتایج این تحقیق در ارتباط با جداسازی باکتری‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس کوآگولانس و دو باکتری گرم مثبت دیگر مطابقت دارد. باکتری‌های غالب در نمونه‌های خاک آلوده شده به هیدروکربن‌های آلیفاتیک، آروماتیک و هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک را به دو دسته گرم مثبت و گرم منفی تقسیم کردند گرم مثبت‌ها شامل جنس نوکاردیا *Nocardia* sp.، جنس مایکوباکتریوم *Mycobacterium* sp. ، جنس کورینه باکتریوم *Cotynebacterium* sp.، جنس آرتروباکتر *Arthrobacter* sp. و جنس باسیلوس *Bacillus* sp. بودند (Fritsche and Hofrichter, 2000).

در تمام نمونه‌های مورد بررسی باکتری‌ها در فاز رشد لگاریتمی به محیط پایه معدنی حاوی نفتالن اضافه شدند. باکتری‌ها از نفتالن به عنوان تنها منبع کربن خود استفاده کرده، روند صعودی به خود گرفتند وپس از افزایش رشد وقرار گرفتن در فاز رشد ثابت، روند نزولی پیدا کردند که این تغییر با کاهش غلظت نفتالن همراه بود. این امر نشان دهنده آن است که منبع کربن مورد نیاز باکتری، در حال کاهش بود و بالطبع شرایط رشد نیز مهیا نبود. هنگام استفاده از باسیلوس در حضور غلظت ۳۰ و ۴۰mM نفتالن باکتری پس از ۲۴ ساعت، افزایش رشد داشت و با افزایش زمان انکوباسیون روند رشد باکتری کاهش پیدا کرد. به عبارت دیگر می‌توان گفت که اگر باکتری در هنگام رشد لگاریتمی اضافه شود در ۲۴ ساعت اول بیشترین فعالیت تجزیه کنندگی خود را نشان می‌دهد وغلظت نفتالن را به زیر حد استاندارد خود کاهش می‌دهد. میانگین کاهش نفتالن با غلظت ۳۰ و ۴۰mM در حضور باسیلوس به ترتیب ۶۸/۵ و ۹۱/۴۲ درصد بوده است.

منابع

Abou seoud, M. and M. Rachida (2oo3). Biodegradation of naphthalene by free and Alginate Entrapped *Pseudomonas sp. Z Naturforsch,* 58: 726-731.

Aitken, M.D., S. J. Grimberg, J. Nagel, R. D. Nagel, and W. T. Stringfellow (1996). Bacterial biodegradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and potential effects of surfactants on PAH bioavailability, university of North Carolina. *water resources research institute report,* 299.

Aitken, M. D., W. t. Stringfellow, R. D. Nagel, C. Kazunga and S-H . Chen (1998).Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *J .Microbial.*, 44: 743-752.

Annweiler, E., H. H. Richnow, G. Antranikian, S. Hebenbrock, F.W. Garms, and W. Michaelis (2000). Naphthalene Degradation and Incorporation of Naphthalene – Derived Carbon into Biomass by the Thermophile Bacillus thermoleovorans. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:518 – 523.

Clark, R.B. (1923). *Marine pollution.* Translated: zahed, M. A and Z. M. Dashtaki, Oxford: Oxford university press.

Kastner, M. et al. (1998). Impact of Inoculation protocols, salinity, and PHon the Degradation of polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into soil. Environmental Microbiology, 359-362.

Macfaddin J. F. (2000) Biochemical tests for identification of medical bacteria lippincott. *Williams & Wilkins.*

MacGillirray, A.R., M. P. Shiaris (1999). *Microbial ecology of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation in coastal sediments.* London: Chapman and Hall.

Morrison, H. and C. Boyd (1990). *Organic chimistry* Translated by: Rahimizadeh, M., Heravi, M., Bakavoli, M. Emission Corporation of Mashhad. Emission medical science.

Nasrollahzadeh, S.H, SH. Najafphor, H. Fazli (1997). *Evaluation of crude oil pollution in southern region of the Caspian Sea*. Sari: Echology Research Academy of the Cospian Sea.

Rezvanigilkolaei, S., I. Sharifpour, R. Kazemi, S. Gholamipour, A. A. Saeidi, A. R. pardakhti, H. Nasrollahzadeh, A. Hallajian, SH. Najafpour (2005) . *The survey of histopathological effects due to environmental factors on salmon (salmo turtta and perch (Sander leuioperca) in Caspian Sea*. Sari: Ecology Research Academy of the caspien sea.

Samanta (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Review trends in Biotechnology*, 20: 6.

Sotoudehnia, F., M. Ranjbar, M. Rabani, E. Varedi, (2003). Investigation of accumulation of some heavy metals(Zn, Cu, Pb, Cd) in muscle tissue of fish (Mugil auratus) in fereydonkenar. M.Sc. Thesis, Islamic Azad university of Tehran.