چگونگی تغییر و تبدیل زیستی آلکان‌های خطی تحت تاثیر کنسرسیوم‌های بومی

فریده قوی‌پنجه*، محمد پازوکی، ژیلا ضیائی‌راد، آذرمیدخت حسین‌نیا

کرج، پژوهشگاه مواد و انرژی

پیام نگار: **f-ghavipanjeh@merc.ac.ir**

زمان دریافت: ۱۳۸۸/۶/۲۱

زمان پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲

چکیده

هدف از این مقاله بررسی تغییر و تبدیل آلکان‌های خطی زنجیره بلند تحت تاثیر تعدادی کنسرسیوم بومی می‌باشد. در این پژوهش از ۳ کشت مخلوط میکروبی که قبلاً در پژوهش‌های دیگری به دست آمده، در محیط کشت معدنی مناسب به همراه مخلوط‌های مختلفی از اکتادکان، نونادکان، ایکوزان و دودکان استفاده شده و پس از یک هفته گرماگذاری و جداسازی فازهای آلی، میزان تغییر و تبدیل زیستی با استفاده از دستگاه GC-MS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهند که برخی ترکیبات اکسیدی اغلب الکل نوع اول و اسید چرب و به مقدار کمتری ترکیبات شاخه دار و گاهی ترکیبات حلقوی ظاهر شده‌اند. همچنین، پودر سفید رنگی پس از تیمار زیستی تشکیل گردید که آنالیز FTIR وجود پیوندهای الکلی، اسیدی، اتری و آلدهیدی را در این ترکیب نشان داد که مبین یک ترکیب پلیمری ناشی از پلیمریزاسیون اسیدها و الکل‌های میانی تولید شده در اثر فعل و انفعال میکروارگانیزم‌ها است.

کلمات کلیدی: نرمال آلکان ، کشت مخلوط میکروبی، تغییر و تبدیل زیستی، هیدروکربن خطی

۱- مقدمه

آلکان‌ها به عنوان پارافین‌ها نیز شناخته می‌شوند که نشان دهنده بی‌میلی این ترکیبات جهت مشارکت در واکنش‌ها می باشد [۱]. از آنجا که آلکان‌ها منبع غذایی خوبی برای میکروارگانیسم‌ها می‌باشند، بسیاری از این موجودات استفاده از مکانیسمی جهت مصرف کردن این منبع را ضروری می‌دانند [۲]. از این رو، تجزیه زیستی آلکان‌ها پدیده‌ای رایج در طبیعت است.

اولین مرحله در تجزیه هوازی، استفاده از مولکول اکسیژن به عنوان پذیرنده الکترون انتهای شاخه و در نتیجه تبدیل نرمال آلکان به الکل‌های نوع اول است. در تجزیه بیولوژیکی آلکان‌ها ممکن است گروه هیدروکسیل در مرحله اول به انتهای شاخه متصل شود که به آن مسیر ترمینال گویند و یا ممکن است به میانه شاخه متصل شود که به آن مسیر ساب ترمینال گویند. آلکان‌هایی با زنجیره کوتاه، بیشتر تمایل به پیمودن مسیر متابولیکی ترمینال را دارند [۳]. از جمله شواهد موجود برای مسیر ساب ترمینال در اکسیداسیون آلکان‌های بلند رشته را می‌توان در باکتری‌هایی نظیر سودوموناس[1]، باسیلوس[2] و پنیسیلیوم[3] [۴] و همچنین یک گونه رودوکوکوس[4] مشاهده کرد [۶و۵].

1. *Pseudomonas*
2. *Bacillus*
3. *Penicillium*
4. *Rhodococcus* Sp. Strain Q15

چرچیل و همکاران در سال ۱۹۹۹ یک گونه باکتری مایکوباکتریوم سویه CHI [1] را جدا کردند که قادر به استفاده از آلکان‌های شاخه دار و n- آلکان‌ها (پریستان، دودکان و هگزاگونال) که در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مایع هستند و نیز آلکان‌های جامد (اکتادکان، دوکوزان و اکتاکوزان) به عنوان تنها منبع کربن و انرژی است [۲].

باکتری سودوموناس فلورسانس [2] سرعت تجزیه زیستی بالایی تا حد ۶۵٪ را در طول ۸ روز برای آلکان‌های خطی در محدوده $n-C_{14} - n-C_{18}$ داشته است. در حالی که سویه Al-12 (جدا شده از یک آبگیر ناحیه اسلوونیا) قادر به تجزیه ۷۰٪ از هیدروکربن‌های آلیفاتیک موجود در مخلوط پیچیده روغن موتور در محدودهٔ n-C15-n-C22 در طول ۵ روز بوده است [۷].

باکتری سودوموناس سویه *C12B* قادر به رشد روی آلکان‌های خطی از نونان الی تری‌دکان است. این باکتری می تواند آلکن‌ها را نیز اکسید کند. این باکتری، روش معمول تجزیه زیستی را که شامل اکسیداسیون اتم کربن اولیه برای تشکیل الکل و آلدهید و اسید کربوکسیلیک اولیه می باشد، به کار می گیرد [۸]. با این حال، اگر چه هیدروکربن‌های آلیفاتیک به وسیله محدودهٔ متنوعی از میکروارگانیسم‌ها جذب می‌شوند اما همه گونه‌ها قادر به استفاده از آن‌ها به عنوان سوبسترای رشد نمی‌باشند [۸].

در این مقاله، تغییر و تبدیل آلکان‌های خطی تحت تاثیر تعدادی از کنسرسیوم‌های بومی جدا شده از محیط‌های نفتی، مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این کار بررسی ترکیبات میانی و نهایی تشکیل شده در این فرایند است تا شناخت بهتری از عملکرد این میکروارگانیزم‌ها در راستای شکست آلکان‌های خطی سنگین به آلکان‌های سبک‌تر حاصل شود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ مواد و لوازم مورد نیاز

مواد لازم از اقلام مورد نیاز جهت تهیه محیط‌های کشت شامل: نمک طعام، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات منیزیم، سولفات آمونیوم، کلرید منیزیم، کلرید کلسیم، نیترات کلسیم، سولفات منگنز، کلرید منگنز، کلرید روی، کلرید کبالت، مولیبدات سدیم، کلرید روی، سولفات منگنز، اسید سولفوریک، سولفات آهن از مارک شرکت تجاری مرک مورد استفاده قرار گرفته است.

سوبستراهای مورد نظر جهت انجام بررسی ها، آلکان‌های خطی از جمله نرمال اکتا دکان، نرمال تترا کوزان، نرمال دوکوزان و نرمال نونا دکان می باشند که همگی از مارک شرکت تجاری مرک تهیه شده‌اند.

در این تحقیق، از کنسرسیوم‌های میکروبی بومی که در پروژه‌ی مشابه دیگری در زمینه تجزیه یک برش سنگین نفتی به دست آمده‌اند، استفاده شده است [۱۰و۹]. کنسرسیوم‌های مزبور از خاک‌های آلوده‌ی نفتی از پالایشگاه‌های مختف تهیه شده‌اند. این کنسرسیوم‌ها در واقع مخلوطی از میکروارگانیزم‌هایی هستند که قبلاً با خوراک واحد آیزوماکس پالایشگاه تهران که مخلوط بسیار پیچیده‌ای از آلکان‌ها، آروماتیک‌ها و رزین‌ها می‌باشد، تطبیق یافته‌اند و لذا توانایی تغییر و تبدیل ترکیبات نفتی را دارا می‌باشند. کنسرسیوم‌های مورد استفاده عبارتند از: کنسرسیوم‌های ۱۱۰ و ۱۱۲ (تهیه شده از خاک‌های آلوده پالایشگاه شیراز)، کنسرسیوم ۲۰۵ (از خاک آلوده پالایشگاه اصفهان)، کنسرسیوم ۵۲ (از خاک آلوده پالایشگاه آبادان) و کنسرسیوم ۱۳ (از خاک آلوده پالایشگاه اراک).

برای کشت میکروارگانیزم‌ها از یک محیط کشت معدنی عمومی شامل؛ K_2HPO_4(g/l):۲/۷۵، KH_2PO_4(g/l):۲/۲۵، $(NH_4)_2SO_4$(g/l):۱، $MgSO_4.7H_2O$(g/l):۰/۲، NaCl(g/l):۰/۱، FeCl3.6H2O(g/l):۰/۰۲، CaCl2.2H2O(g/l):۰/۰۱ استفاده شد. pH محیط کشت برابر ۶/۸ الی ۷ تنظیم گردید.

۲-۲ روش آزمایش

در مرحله اول، ۵ کنسرسیوم مورد نظر با اکتادکان به عنوان سوبسترا مورد آزمایش قرار گرفته و با توجه به نتایج حاصله یکی از آن‌ها به عنوان کنسرسیوم مناسب جهت آزمایش‌های بعدی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. مرحله بعدی، کشت کنسرسیوم انتخابی با آلکان‌های خطی دیگر و بررسی میزان تغییرات ایجاد شده بر روی آلکان هاست. در این حالت، کنسرسیوم مورد نظر در محیط‌های کشت جداگانه حاوی اکتادکان، مخلوط اکتادکان و هگزان، مخلوط اکتادکان و نونادکان و مخلوط اکتادکان، نونادکان، ایکوزان و دودکان، کشت شده و تغییرات ایجاد شده بر روی آلکان‌ها مورد

1. *Mycobacterium* Sp. Strain CHI
2. *Pseudomonas fluorescence*

بررسی قرار گرفت. همچنین، یک سویه خالص به نـام سـودوموناس پوتیدا به عنـوان شـاخص در همـان شـرایط آزمایـشی کنـسرسیوم انتخابی، کشت داده شد.

۲-۳ روش کشت

ابتدا، رشد کنسرسیوم‌های میکروبی مورد نظر، بر روی اکتادکان بـه عنوان سوبسترا مورد بررسـی قـرار گرفـت. مقـدار ml ۴۰ از محـیط کشت در ارلـن مایرهـای ml ۲۵۰ در دمـای ^{o}C ۱۲۱ بـه مـدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شـده و پـس از سـرد شـدن حـدود ۰/۵ گـرم نرمـال اکتادکان به عنوان سوبسترا در شرایط استریل به آن اضـافه کـرده و حدود ml ۱ از کنسرسیوم‌های ۱۱۰، ۱۱۲، ۲۰۵، ۱۳و ۵۲ به عنـوان منبع میکروارگانیسم به طور جداگانه به ارلن‌ها اضافه گردید. ارلن‌ها در دمای ^{o}C ۳۰ بر روی همزن با دور ۱۶۰rpm به مـدت یـک هفتـه گرماگذاری شدند. پس از این مدت شرایط ظاهری نمونه‌ها بررسی و کنسرسیوم‌های ۲۰۵ و ۵۲ با توجه به خواص ظـاهری ماننـد تغییـر رنگ و میزان کدورت آن، برای کشت مجدد انتخاب شده و در نهایت به منظور بررسی تغییرات بوجود آمده در فاز آلی، مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به تاثیر بیشتر کنسرسیوم ۲۰۵ بـر روی اکتادکـان، آزمایش‌های بعدی با استفاده از این کنسرسیوم انجام گرفت.

در آزمایش‌های مرحله دوم، تاثیر کنسرسیوم میکروبی ۲۰۵ بـر روی آلکان اکتادکان و مخلوط چند آلکان با طول زنجیره‌هـای متفـاوت و مقایسه آن‌ها با یک سویه باکتری خالص سودوموناس پوتیـدا مـورد بررسی قرار گرفت. مقدار آلکان افزوده شده به محـیط کـشت بـه ۲ گرم در ۴۰ میلی لیتر محیط کشت، افزایش یافت. آزمـایش‌هـا در ۴ حالت مختلف سوبسترا، انجام گرفتند که عبارتند از:

- حالت اول: اکتادکان
- حالت دوم: مخلوط اکتادکان و ۱/۵ میلی لیتر هگزان
- حالت سوم: مخلوطی از آلکان اکتادکـان و آلکـان نونادکـان بـه نسبت وزنی مساوی
- حالت چهارم: مخلوط چهار آلکان اکتادکان، نونادکان، دوکوزان و تتراکوزان به نسبت وزنی مساوی

سپس به همه ارلن‌ها ۱ میلی لیتر از میکروارگانیزم مورد نظر افزوده شد و ارلن‌ها در دمـای ^{o}C ۳۰ بـر روی هـمزن بـا دور rpm ۱۶۰ بـه مدت ۵ روز گرماگذاری شدند.

۲-۴ اندازه گیری‌ها

پس از جداسازی فاز آلی از آبی بـا اسـتفاده از حـلال‌هـای هگـزان، کلروفرم و دی اتیـل اتـر [۱۲و۱۱]، فازهـای آلـی نمونـه‌هـا توسـط دستگاه GC-MS مورد آنالیز دستگاهی قرار گرفتنـد. بـا اسـتفاده از سانتریفوژ (۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه)، زیست تـوده از فاز آبی جدا گردید و پس از آن دو مرتبه با ۱۰ میلی لیتر اسـتون و ۳ مرتبه با محلول بافر فسفات شستشو داده شد و پـس از خـشک شدن در آون ^{o}C ۱۰۵ به مدت ۲۴ ساعت، توزین گردید [۱۱].

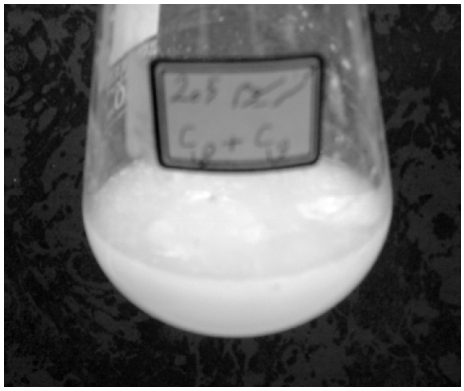
دستگاه GC-MS مورد استفاده مدل Agilent Technologies 6890 N با آشکارسـاز (دتکتـور) Mass Selective مـدل 5973 Network و ستون کروماتوگرافی موئینه HP-5 به طول ۳۰ متـر و قطـر داخلـی ۰/۲۵ میلی‌متر می‌باشد که برای آنالیز ترکیبات موجود در نمونـه‌هـا در دمای ^{o}C ۱۰۰ به مدت ۳ دقیقـه و افـزایش دمـا (^{o}C/min) ۱۰ تـا دمای ^{o}C ۳۰۰ استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

در مرحله اول آزمایش ها، از بین کشت کنسرسیوم‌های ۱۱۰، ۱۱۲، ۲۰۵، ۱۳و ۵۲ در حضور اکتادکان، کنسرسیوم ۲۰۵ بیشترین تغییر را از نظر ظاهری (تغییر رنگ و کدورت محیط) ایجاد کرده بـود کـه در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

در مرحله دوم که کشت کنسرسیوم ۲۰۵ در مخلوط‌های مختلفی از آلکان‌های خطی می‌باشد، پس از گذشت مدت گرماگذاری مـشاهده گردیـد کـه از بـین حالـت‌هـای مختلـف کـشت کنـسرسیوم ۲۰۵، حالت‌های اول، دوم و سوم از نظر ظاهری نـسبت بـه نمونـه شـاهد، تغییرات شدیدتری نشان دادند. شکل (۱) تغییـرات ظـاهری ایجـاد شده در اثر کشت کنسرسیوم ۲۰۵ در حالت سوم (مخلوط اکتادکان و نونان) را به طور نمونـه، نـشان مـی‌دهـد. همـانطور کـه در شـکل مشخص است مخلوط شیری رنگی ایجاد شده اسـت، در حـالی کـه نمونه شـاهد (شـکل (۲)) تغییـری را نـشان نمـی‌دهـد. همچنـین، تغییـرات ظـاهری کنـسرسیوم ۲۰۵ در مقایـسه بـا سـویه خـالص *سودوموناس پوتیدا* به طور قابل توجهی در تمـامی حـالات بـه‌ویـژه سـه حالـت اول، بیـشتر بـود. فـاز آبـی نمونـه‌هـای تیمـار شـده بـا *سودوموناس* نیز تا حدودی کدر شـده در حـالی کـه در نمونـه‌هـای تیمار شده با کنسرسیوم ۲۰۵ در سه حالت اول، فازهای آبی و آلـی

کاملاً با هم مخلوط بوده و شیری رنگ می‌باشد و در حالت چهارم (مخلوط چهار آلکان)، فاز آبی تا حدودی کدر است. نمونه‌های شاهد (بدون میکروارگانیزم) تغییری نکرده‌اند.



شکل ۱- نمونه تیمار شده با کنسرسیوم ۲۰۵ در حالت سوم

وزن زیست توده حاصل از هر نمونه در جدول (۱) آمده است. همان‌گونه که در جدول مشخص است در سه ردیف اول، وزن زیست توده بیش از سایر موارد است که نشان دهندهٔ رشد بیشتر میکروارگانیزم‌ها در سوبسترای مربوطه می‌باشد. پس از جداسازی فاز آلی از آبی رسوب سفید رنگی حاصل شد که نه در فاز آلی و نه در فاز آبی، قابل حل نبود. در مراحل بعد، ماده جامد، توسط دستگاه FTIR آنالیز گردید که وجود پیوندهای الکلی، اسیدی، اتری و آلدهیدی در آن محرز گردید. از آن جایی که اسیدهای چرب تولید شده در حین اکسیداسیون زیستی آلکان‌ها به عنوان محصولات میانی قادر به پلیمریزه شدن هستند، این اسیدها با الکل‌های

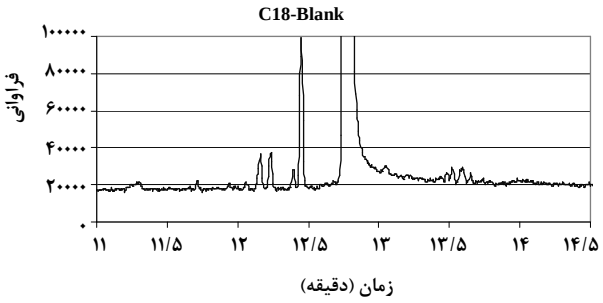
شکل۲- نمونه شاهد در حالت سوم

تولیدی در مراحل اولیه تجزیه زیستی تشکیل مونومرهای پلی استر می دهند و در مراحل بعدی این مونومرها تبدیل به پلیمر می شوند [۱۴و۱۳].

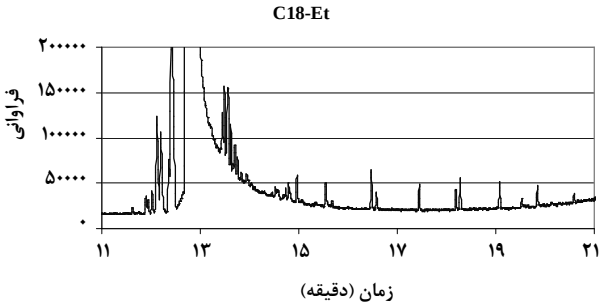
شکل (۳) کروماتوگرام نمونه شاهد در حالت دوم کشت را نشان می‌دهد. کروماتوگرام فاز آلی تیمار شده با کنسرسیوم ۲۰۵ حاوی اکتادکان و هگزان (حالت دوم) در شکل (۴) نشان داده شده است.

جدول ۱- وزن زیست توده اندازه گیری شده پس از تیمار زیستی

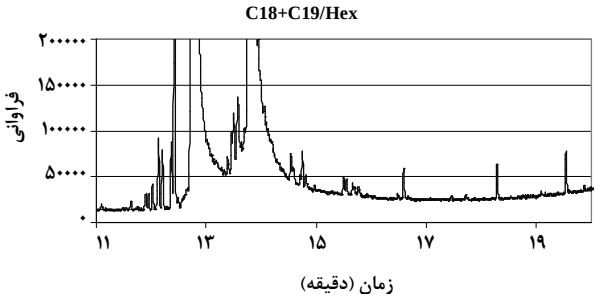
ردیف	نام کنسرسیوم	نام آلکان	وزن زیست توده (گرم)
۱	۲۰۵	اکتادکان	۰/۰۸۴۰۷
۲	۲۰۵	اکتادکان + هگزان	۰/۰۶۷۸
۳	۲۰۵	اکتادکان + نونادکان	۰/۰۷۹۱۶
۴	۲۰۵	اکتادکان + نونادکان + دوکوزان + تتراکوزان	۰/۰۱۵۸۸
۵	*سودوموناس*	اکتادکان	۰/۰۱۶۴
۶	*سودوموناس*	اکتادکان + هگزان	۰/۰۱۴۵
۷	*سودوموناس*	اکتادکان + نونادکان	۰/۰۱۵۶
۸	سودوموناس	اکتادکان + نونادکان + دوکوزان + تتراکوزان	۰/۰۱۷۸



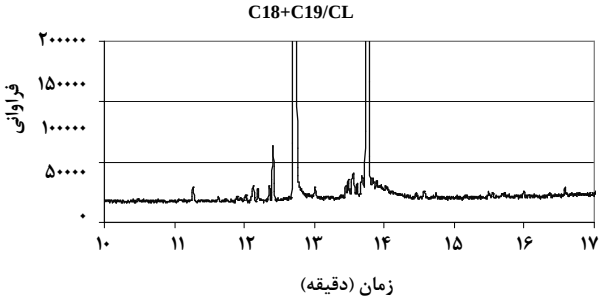
شکل ۳- کروماتوگرام فاز آلی نمونه شاهد در حالت دوم



شکل ۴- کروماتوگرام فاز آلی تیمار شده با کنسرسیوم ۲۰۵ در حالت دوم



شکل ۵- کروماتوگرام فاز آلی تیمار شده با کنسرسیوم ۲۰۵ در حالت سوم



شکل ۶- کروماتوگرام فاز آلی شاهد در حالت سوم

همانطور که در شکل (۴) پیک کروماتوگرام فاز آلی تیمار شده با کنسرسیوم ۲۰۵ در حضور اکتادکان و هگزان مشاهده می شود، تا قبل از دقیقه ۱۴/۵، پیک‌ها مشابه پیک‌های نمونه شاهد (شکل (۳)) می‌باشند. اما، از دقیقه ۱۴/۵ به بعد پیک‌های جدیدی ظاهر شده اند. مطابق بانک اطلاعات دستگاه GC-MS، پیک ظاهر شده در زمان ۱۵/۵۴ دقیقه سیکلوتترادکان[1]، پیک ظاهر شده در زمان ۱۵/۶۸ دقیقه هپتاکوزان[2]، پیک ظاهر شده در زمان ۱۶/۴۷ دقیقه پالمتیک اسید[3]، پیک ظاهر شده در زمان ۱۶/۵۷ دقیقه اکتاکوزان[4]، پیک ظاهر شده در زمان ۱۷/۴۴ دقیقه اکتادکان و به احتمال زیاد مشتقات اکتادکان، پیک ظاهر شده در زمان ۱۸/۱۸ دقیقه اکتادکانوئیک اسید بوتیل استر[5]، پیک ظاهر شده در زمان ۱۸/۲۷ دقیقه تتراکوزان و پیک‌های ظاهر شده در زمان‌های ۱۹/۰۷ و ۱۹/۵۹ دقیقه به عنوان ایکوزان شناسایی شده‌اند. شناسایی این ترکیبات بعضا به دلیل مقدار کم آن‌ها دقیق نبوده است.

در کروماتوگرام فاز آلی نمونه ۲۰۵ حاوی آلکان اکتادکان و نونادکان (حالت سوم)، همانطور که در شکل (۵)مشاهده می‌شود، بزرگترین پیک مربوط به اکتادکان است که در زمان بازداری ۱۲/۸۴ دقیقه ظاهر شده و مقدار آن ۵۱/۳۷٪ می‌باشد. سپس پیک دیگری در زمان ۱۳/۸۸ دقیقه به مقدار ۴۸/۴۲٪ ظاهر شده که مربوط به نونادکان است و در زمان ۱۲/۴۲ دقیقه نیز یک پیک ظاهر شده که ۳-متیل هپتادکان می‌باشد که در شاهد نیز وجود دارد (شکل (۶)). پیک‌های ظاهر شده در زمان‌های ۱۵/۵۲ و ۱۵/۶۸ دقیقه در نمونه مربوط به ترکیبات الکلی است و پیک‌های ظاهر شده در زمان‌های ۱۶/۵۱ و ۱۸/۳۲ دقیقه توسط دستگاه به درستی قابل تشخیص نبود.

در کروماتوگرام فاز آلی نمونه ۲۰۵ حاوی آلکان‌های اکتادکان، نونادکان، دوکوزان و تتراکوزان (حالت چهارم)، در مقایسه با شاهد آن، برخی پیک‌های جزئی مشاهده گردید که مقادیر آن‌ها ناچیز می‌باشند. پیک‌های مربوط به اکتادکان و نونادکان در این نمونه نسبت به پیک‌های متناظر در نمونه شاهد کاهش یافته‌اند. در کروماتوگرام فاز آلی سایر نمونه‌های تیمار شده با کنسرسیوم ۲۰۵ و

1.Cyclotetradecane
2.Heptacosane
3. Palmitic Acid
4. Octacosane
5. Octadecanoic Acid, Butyl Ester

سویه *سودوموناس پوتیدا* تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با شاهد آنها مشاهده نگردید.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان می‌دهند که کنسرسیوم ۲۰۵ می‌تواند بر روی اکتادکان به خوبی رشد کرده و آن را به ترکیبات اکسیدی نظیر الکل، الدهید و اسید تبدیل کند. همچنین نتایج نشان می‌دهند که افزودن هگزان جهت افزایش تغییر و تبدیلات، تاثیری ندارد. در حالتی که اکتادکان و نونادکان به عنوان سوبسترا در حضور کنسرسیوم ۲۰۵ مورد استفاده قرار گرفته‌اند نیز تغییرات مشابهی به چشم می‌خورد اما در حضور چهار الکان تغییرات بوجود آمده، کاهش نشان می‌دهد. مقایسه تغییرات حاصل در هر چهار حالت با نمونه‌های مربوط به سودوموناس پوتیدا نشان می‌دهد که کنسرسیوم بومی ۲۰۵ تاثیر بسیار بیشتری داشته است.

با توجه به اینکه در هنگام جداسازی فازهای آلی و آبی پودر سفیدی ایجاد می‌شود که نه در فاز آلی و نه در فاز آبی قابل حل است، به نظر می‌رسد که این پودر محصول عمدهٔ تغییرات ناشی از میکروارگانیزم‌هاست که به دلیل عدم انحلال کامل در حلال، توسط دستگاه GC-MS قابل تشخیص نیست.

۵- تشکر و قدردانی

در این ارتباط، از پژوهشگاه مواد و انرژی جهت تامین مالی و امکانات مورد نیاز تحقیق، سپاسگزاری و تقدیر به عمل می‌آید.

مراجع

[1] J. A. Labinger, J. E. Bercaw, "Understanding and exploiting C-H bond activation", Nature, 417,507-514, (2002).

[2] SH. Churchill, J.P. Harper, P.F. Churchill, "Isolation and characterization of a mycobacterium species capable of degrading three and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons", Applied and Environmental Microbiology, 65, 549-552, (1999).

[3] W. Ashraf, A. Mihdhir, J.C. Murrell, "Bacterial oxidation of propane", FEMS Microbiology Letters, 122, 1-6, (1994).

[4] L.N. Britton, "Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons", In D.T. Gibson (ed.), Microbial Degradation of Organic compounds, Marcel Dekker, New york, N.Y., 13, 89-129, (1984).

[5] L. G. Whyte, J. Hawari, E. Zhou, L. Bourbonniere, W.E. Inniss, CH.W. Greer, "Biodegradation of variable-chain-Length alkanes at low temperatures by a *psychrotrophlic rhadococcus* sp.", Applied and Environmental Microbiology, 64, 2578-2584, (1998).

[6] J.B. Van Beilen, T.H. Smits, L.G. Whyte, S. Schorcht, M. Röthlisberger, T. Plaggemeier, K.H. Engesser, B. Witholt, "Alkane hydroxylase homologues in gram-positive strains", Environmental Microbiology, 4 (11), 676–682, (2002).

[7] K. Plohl, H. Leskovsek, M. Bricelj, "Biological Degradation of Motor Oil in weter", Acta Chim. Slov., 49, 279-289, (2002).

[8] J. Kas, J. Burkhard, K. Demnerova, J. Kostal, T. Macek, M. Mackova, J. Pazlarova, "Perspectives in Biodegradation of alkanes and PCBs", Pure and Appl. Chem., 69 (11), 2357-2369, (1997).

[۹] قوی پنجه ف.، پازوکی م.، شایگان ج.، "بررسی تاثیر میکروارگانیزم‌ها در کراکینگ خوراک واحد هایدروکراکینگ"، گزارش فاز اول، پژوهشگاه مواد و انرژی، شرکت ملی پالایش و پخش فراورده‌های نفتی، (۱۳۸۴).

[۱۰] شایگان ج.، قوی پنجه ف.، پازوکی م.، حسین نیا آ.، "مطالعات تجربی اولیه در بررسی امکان دستیابی به فناوری زیستی در تبدیل برش‌های سنگین به سبک در پالایشگاههای ایران"، فرایند نو، سال اول، شماره ۵، ۴۸-۴۳، (۱۳۸۵).

[11] L. Chrzanowski, M. Owsianiak, B. Wyrwas, A. Aurich, A. Szulc, A. Olsanowski, "Adsorption of Sodium Dodecylbenzenesulphonate(SDBS) on *Candida maltosa* EH 15 Strain : Influence on cell Surface Hydrophobicity and n-alkanes Biodegradation", Water, Air & Soil Pollution, 196 (1-4), 345-353, (2009).

[12] H.S. Kim, S.B. Kim, S.H. Park, H.M. Oh, Y.I. Park, C.K. Kim, T. Katsuragi, Y. Tani, B.D. Yoon, "Expression of sfp gene and hydrocarbon degradation by *Bacillus subtilis*". Biotechnology Letters, 22, 1431-1436, (2000).

[13] R.G. Lageveen, G.W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, B. Witholt, "Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-I-3-Hydroxyalkanoates and Poly-I-3-Hydroxyalkenoates", Applied and Environmental Microbiology, 2924-2932, (1988).

[14] G. Odian, "Principles_of_Polymerization", 4th Ed, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, p 40, (2004).