نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، شماره ویژه: پژوهش‌های فیزیولوژی گیاهی، سال نهم، شماره ویژه بهار ۱۳۹۳ / صفحات: ۴۷-۴۰

بررسی تجزیه زیستی هگزادکان توسط سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 و اثر آن بر میزان رشد، رنگیزه‌ها و فتوسنتز

رویا غفاری*[1]، ندا سلطانی[2]، مهناز مظاهری اسدی[3]

[1]کارشناس‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

[2]دانشیار، گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، تهران

[3]دانشیار، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، تهران

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲۳

چکیده

نفت به‌عنوان یک ترکیب آلی، اصلی‌ترین ماده‌ای است که نه تنها تامین‌کننده انرژی بلکه ماده اولیه ساخت بسیاری از موارد مورد نیاز بشر امروزی محسوب می‌شود ولی متاسفانه در مراحل مختلف استخراج، انتقال و پالایش هیدروکربن‌های نفتی منجر به آلودگی سطح وسیعی از محیط زیست می‌گردد. در این مطالعه به بررسی میزان تجزیه زیستی هگزادکان به عنوان یکی از آلاینده‌های نفتی توسط سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 و اثر آن بر میزان رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فتوسنتز در این سیانوباکتری پرداخته شده است. این سیانوباکتری پس از خالص‌سازی در محیط کشت جامد؛ به محیط BG11 مایع منتقل گردید. پس از آن نمونه خالص شده توسط هگزادکان ۱٪ تیمار گردید. میزان تجزیه هگزادکان به روش آنالیز گاز کروماتوگرافی (GC)، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل و فیکوبیلی پروتئین با روش اسپکتروفتومتری و نرخ فتوسنتز به‌وسیله دستگاه Oxyview اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله حاکی از آن است که هگزادکان به میزان قابل توجهی توسط این سیانوباکتری تجزیه شده است. میزان کلروفیل، فتوسنتز و فیکوبیلی پروتئین در شاهد بیشتر بود. این نتایج بیانگر پتانسیل سیانوباکتری مذکور در تجزیه زیستی آلودگی های ناشی از هیدروکربن آلیفاتیک و استفاده از آن به عنوان منبع کربن است.

واژگان کلیدی: فیکوبیلی پروتئین، کروماتوگرافی گازی، کلروفیل، هیدروکربن آلیفاتیک.

مقدمه

یکی از معضلاتی که بشر امروزی با آن روبرو است، آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از رشد سریع جمعیت، صنعتی شدن و توسعه تکنولوژی می‌باشد. آثار زیانبار ناشی از این آلودگی‌ها در بخش‌های مختلف زندگی گریبان‌گیر انسان‌ها می‌باشد. این آلودگی ها از منابع مختلفی ناشی می‌گردد که از جمله می‌توان به آلودگی‌های نفتی اشاره نمود. نظر به مضرات نشت و گسترش این نوع آلودگی‌ها بر محیط زیست، امروزه از روش‌های مختلفی برای مرتفع ساختن آن استفاده می‌گردد که از جمله آن‌ها می‌توان به روش‌های حرارتی، فیزیکوشیمیایی و بیولوژیک اشاره کرد (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۷). روش‌های زیستی که امروزه استفاده می‌گردند، با بهره‌مندی از علم جدید بیوتکنولوژی، فاقد آثار سوء بوده و بسیار کم هزینه می‌باشند. اساس این روش استفاده از

*نویسنده مسئول: ghafari.r1366@gmail.com

میکروارگانیسم‌ها در تجزیه ترکیبات نفتی است. تاکنون از تعدادی باکتری‌ها (Stephen and ManNaughton, 1999; Alexander, 1994; Rittmann, 1993)، قارچ‌ها (Coulibaly et al., 2003) و اخیراً گیاهان عالی در فرآیند بهبود زیستی استفاده شده است (Machete et al., 1997).

نفت خام یک ترکیب پیچیده از هزاران ترکیباتی است که می‌تواند بالقوه توسط گروه بزرگی از میکروارگانیسم‌های خاک و آب تجزیه شود. ریزجلبک‌ها تجزیه کننده هیدروکربن‌ها هستند و بخش مهمی از اکوسیستم خاک را تشکیل می‌دهند که بخش قابل توجه (۲۷ درصد) زی توده میکروبی خاک را تشکیل می‌دهند که به‌دلیل حساسیت به آلودگی‌های متعدد در محیط کشت خود، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان بیواندیکاتور آلودگی استفاده کرد (Megharaj et al., 2000). رفتار این میکروارگانیسم‌ها مقاومت و بردباری بالای این موجودات را در شرایط افراطی محیطی نشان می‌دهد (Diestra et al., 2007). گذشته از آسیب‌های جدی که هیدروکربن‌های نفتی به محیط وارد می‌کنند بررسی اثرات سمی آن‌ها روی میکروارگانیسم‌های خاک و فعالیت آن‌ها اهمیت دارد. اثرات هیدروکربن‌های نفتی به ویژه نفت خام در جلبک‌های دریا و آب شیرین مطالعه شده است (Atlas and Bragg, 2009; Kumar et al., 2009; Dubey et al., 2011; Agbozu and Opuene, 2009;) ولی اطلاعاتی درباره اثرات نفت روی جمعیت سیانوباکتری‌ها و جلبک‌ها در اکوسیستم‌های خاک در ایران و سطح بین‌المللی کمتر منتشر شده است.

شواهد روزافزون نشان از نقش موجودات فتوسنتز کننده خصوصاً سیانوباکتری‌ها در اکسیداسیون و تجزیه هیدروکربن‌ها وجود دارد (Al-Hasan et al., 2001; Raghukumar et al., 2001). این سیانوباکتری‌ها قادر به فتوسنتز، مصرف و اکسید کردن n– آلکان‌ها هستند که این فرایند با اکسیداسیون آن‌ها به اجزایی با وزن مولکولی کمتر یا با تغییر آن به اجزایی با قطبیت بیشتر انجام می‌پذیرد. نشان داده شده است که گونه‌های متفاوت ریزجلبکی به طور طبیعی هم ترکیبات آروماتیک و هم آلیفاتیک هیدروکربن‌ها را تجزیه می‌کنند (Gamila et al., 2003).

از جمله هیدروکربن‌های نفتی که ریز جلبک‌ها قادر به تجزیه آن‌ها می‌باشند، می‌توان به هگزادکان اشاره کرد. هگزادکان که کتان نیز نامیده می‌شود ترکیبی شیمیایی شامل یک زنجیره ۱۶ کربنی می‌باشد که شکل ظاهری این ترکیب، مایع شفاف بی‌رنگ است و از ترکیبات آلیفاتیک نفتی محسوب می‌شود (www.wikipedia.com).

سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته است از خانواده Oscillatoriacae از سیانوباکتری‌های ریسه‌ای است (سلطانی و غفاری، ۱۳۹۱). Abed در سال ۲۰۱۰؛ بر میزان تجزیه هگزادکان و چندین ترکیب نفتی دیگر توسط این میکروارگانیسم‌ها پرداخته است. همچنین Abed و Köster (۲۰۰۵) نیز بررسی‌هایی پیرامون نقش ریزجلبک ها در تجزیه ترکیبات نفتی انجام داده‌اند.

هدف از این پژوهش، مطالعه و بررسی میزان تجزیه زیستی هگزادکان توسط سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 جداسازی شده از سواحل جزیره خارک و اثر آن بر میزان رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی نظیر کلروفیل، فیکوبیلی پروتئین‌ها و نیز نرخ فتوسنتز بود.

مواد و روش‌ها

نمونه سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 از سواحل جزیره خارک جمع‌آوری گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط‌های کشت جامد کشت داده شد. پس از پاساژهای متوالی

کلنی‌های خالص مربوط به نمونه جداسازی شده و بر روی پلیت‌های مجزا قرار داده شدند (Andersen, 2005). سپس نمونه‌ها به محیط کشت تخصصی مایع BG11 منتقل شدند. پس از آن تیمار ۱ درصد هگزادکان در محیط کشت BG11 به ریز جلبک مورد نظر داده شد و تحت شرایط مطلوب کشت از نظر دما ۳۰±۲°C، نور ٦۰ میکرومول فوتون برمتر مربع بر ثانیه، pH ۷ و هوادهی قرار گرفت.

رشد سیانوباکتری از طریق میزان جذب نوری در طول موج ۷۵۰ nm طی ۱۱ روز، هر دو روز یک‌بار اندازه‌گیری شد. سپس منحنی رشد سیانوباکتری مذکور رسم شد و نرخ رشد نمونه بر این اساس محاسبه گردید. برای سنجش مقدار کلروفیل از روش Marker (۱۹۷۲) استفاده شد. بدین منظور پس از عصاره گیری با متانول، جذب در طول موج ٦٦٥ nm خوانده شد و مقدار کلروفیل محاسبه گردید.

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت فتوسنتزی از دستگاه اکسی ویو استفاده شد. در این روش از تزریق ۲ mL سوسپانسیون جلبک استفاده گردید و میزان تصاعد اکسیژن در ۱ دقیقه محاسبه شد (Dodds, 1989). برای اندازگیری میزان فیکوبیلی‌پروتئین‌های مختلف از روش Wyman و Fay (۱۹۸٦) استفاده شد. بدین منظور نمونه سیانوباکتری به مدت ۲ ساعت در تاریکی و یخچال (٤ درجه سانتیگراد)، با کمک گلیسرول تحت فشار اسمزی شدید قرار گرفت. جذب آن‌ها در مقابل شاهد مناسب در طول موج‌های ۷۵۰، ٦٥۲، ٦۱٥ و ٥٦۲ نانومتر خوانده شد.

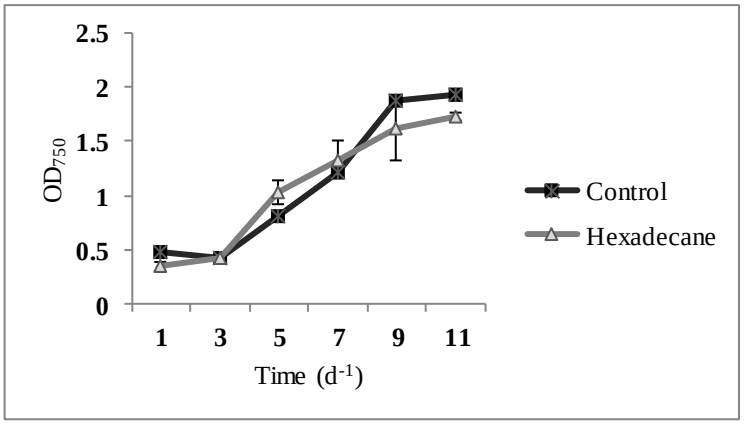
به‌منظور بررسی توانمندی سیانوباکتری موردنظر در تجزیه هگزادکان به‌عنوان شاخص آلاینده نفتی در این مطالعه، سنجش توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی و با ستون و استانداردهای تخصصی مربوط به هگزادکان مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی توانایی سیانوباکتری در تجزیه هگزادکان محیط کشت BG11 تهیه شد و میزان فعالیت تجزیه‌ای این سیانوباکتری با استفاده از آنالیز GC تعیین شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی مورد استفاده در این پژوهش Shimadzu مدل 15A، با دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای (FID) و ستون Rtx-5Ms به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر بود. پس از گذشت ٤ روز از افزودن هگزادکان به محیط کشت سیانوباکتری آنالیز GC انجام گردید.

اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزارهایی مانند Excel، SPSS مورد تجزیه و تحلیل فیزیولوژیکی قرار گرفت. آنالیزهای آماری بر اساس سه تکرار در هر آزمون و آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و طرح Tukey انجام شد.

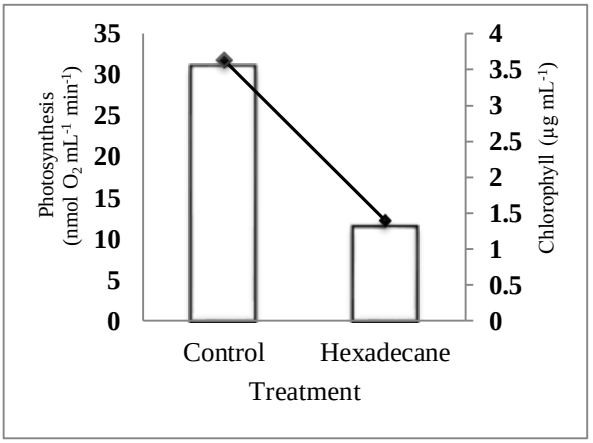
نتایج

ماکزیمم نرخ رشد نمونه سیانوباکتری در این مطالعه به میزان $۰/٤۳\ d^{-1}$ تحت تیمار هگزادکان بود. که این میزان در آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری در مقایسه با نرخ رشد نمونه شاهد به میزان $۰/۱۹\ d^{-1}$ از خود نشان نداد.

نتایج فیزیولوژیکی رشد نشان داد نه تنها هگزادکان بازدارنده رشد نبوده است بلکه باعث رشدی مانند شاهد در نمونه سیانوباکتری مورد تحقیق شد بیانگر توانایی سیانوباکتری در استفاده از منبع کربن آلی به خوبی منبع کربن معدنی است (شکل ۱).



شکل ۱: منحنی رشد نمونه *Schizothrix vaginata* ISC108 در شاهد و تیمار هگزادکان



شکل ۲: میزان کلروفیل و فتوسنتز نمونه *Schizothrix vaginata* ISC108 در شاهد و تیمار هگزادکان

شکل ۲، نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان کلروفیل را در نمونه شاهد و نیز تحت تیمار هگزادکان نشان می‌دهد. بیشترین محتوای کلروفیل با میزان ۳/٦٤ µg mL^{-1} مربوط به نمونه شاهد بود. با توجه به نتایج آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری بین مقدار کلروفیل نمونه‌ی شاهد با تیمار ۱٪ هگزادکان مشاهده شد. همچنین در این شکل میزان فتوسنتز بالاتر در تیمار ۱ درصد هگزادکان در مقایسه با نمونه شاهد نشان داده شد. نتایج آنالیز آماری حاکی از آن است اختلاف معنی داری بین نمونه شاهد و تیمار هگزادکان در این خصوص نیز وجود داشت.

جدول ۱: مقادیر رنگیزه های فیکوبیلی پروتئینی در *Schizothrix vaginata* ISC108 در نمونه شاهد و تیمار هگزادکان

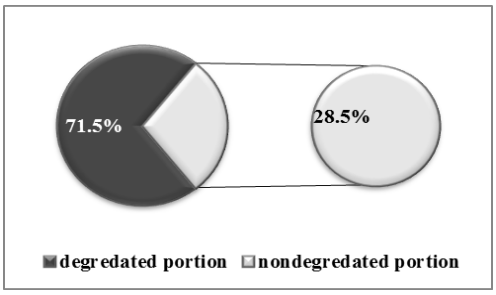
تیمار	APC*	PC†	PE‡	PBP§
شاهد	۳۵/۱٤ ± ۱/۳۰ a	۲۲/۱۰ ± ۰/۷۵ a	۱/۱۷ ± ۰/۰٦ a	٦٤/۸۳ ± ٤/۲٦ a
هگزادکان	۱٦/۵۹ ± ۲/۱۰ c	۷/۰۲ ± ۲/۹٤ b	۱/۰۱ ± ۰/۸٦ a	۲۸/۹٤ ± ۳/۱۱ b

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است؛ داده‌ها X ±SE را نشان می‌دهند.

* APC: Alophycocyanin
† PC: Phycocyanin
‡ PE: Phycoerithrin
§ PBP: Phycobiliproteins

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، میزان کلیه فیکوبیلی پروتئین‌ها (به استثای فیکواریترین) در نمونه شاهد نسبت به تیمار هگزادکان بیشتر بود. همان‌گونه که مشاهده می‌شود بین تمامی رنگیزه‌ها به جز فیکواریترین، اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

هم‌چنین در این پژوهش به بررسی توانمندی سیانوباکتری مورد آزمایش در تجزیه هگزادکان پرداخته شد که بدین منظور از روش آنالیز کروماتوگرافی گازی (GC) استفاده گردید. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد این سیانوباکتری، آلاینده نفتی هگزادکان را به میزان زیادی (۷۱/۵ درصد) تجزیه کرده است.



شکل ۳: میزان تجزیه هگزادکان توسط *Schizothrix vaginata* ISC108 (٪)

بحث

در سال‌های اخیر، در ایران رویکرد پژوهش‌های جدید به طرف مسائل زیست محیطی بوده است. ولی بیشتر این تحقیقات متمرکز بر میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها یا قارچ‌ها می‌باشد. استفاده از ریزجلبک‌ها به عنوان منابع طبیعی برای تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی بسیار کم مورد توجه بوده است. مطالعه حاضر، جزو اولین تحقیقاتی است که در این حوزه در ایران انجام گرفته است.

بر اساس نتایج به دست آمده، میزان رشد سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 تحت تیمار هگزادکان مانند شاهد بوده که این امر نشان‌دهنده مقاومت نمونه سیانوباکتری به حضور هیدروکربن نفتی است که مطابق با یافته‌های Abed (۲۰۱۰) در سویه *Synechocystis* می‌باشد. هم‌چنین Gamila و همکاران (۲۰۰۳) نیز مطالعاتی در این خصوص در سویه‌های *Oscillatoria* و *Anabaena* با تیمار نفت خام انجام داده‌اند. در سویه‌های مذکور افزایش زی‌توده نسبت به نمونه شاهد در پی افزودن ۰/۱ درصد نفت خام دیده شده است، این در حالی است که رشد بیشینه متفاوت بوده است. اگرچه میزان جذب نوری و در نتیجه رشد سیانوباکتری در تیمار هگزادکان افزایش داشت اما این افزایش از روز پنجم پس از تیماردهی ایجاد شده است. این مطابق نتیجه مطالعه Kumar و همکاران (۲۰۰۸) می باشد که اظهار داشتند پس از ۷-۱۵ روز از تیماردهی، تمام سلول‌های تیمار داده شده شروع به رشد در این محیط کشت کردند این می‌تواند به دلیل تحریک تغییرات باشد که سلول‌ها را قادر به تنظیم تغییرات در شرایط فیزیولوژیکی متفاوت کرده است. پس می‌توان نتیجه گرفت که سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* به مدت پنج روز در حال سازگار شدن با شرایط ایجاد شده در پی افزودن هگزادکان به محیط کشت خود بوده است.

بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش میزان کلروفیل در تیمار هگزادکان، میزان این رنگیزه در حضور هگزادکان ۱ درصد کاهش یافته است. این نتایج نشان‌دهنده آن است که افزودن هگزادکان به میزان ۱ درصد به محیط کشت *Schizothrix vaginata* منجر به کاهش محتوای کلروفیلی در این سیانوباکتری بوده است. کاهش در محتوای کلروفیل می‌تواند به دلیل مهار بیوسنتز کلروفیل باشد که با مهار آلفا آمینولوولونیک اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز ایجاد شده باشد. این نتایج با یافته‌های Sundaram (۲۰۰۱) مطابقت دارد که نشان داده

آلاینده‌های محیطی از قبیل بنزن و تولوئن در غلظت‌های بالا منجر به کاهش مقدار کلروفیل و غیرفعال‌شدن فرآیندهای حیاتی از قبیل فتوسنتز و جذب نیترات شوند.

در سیانوباکتری‌ها فیکوبیلی پروتئین‌ها که به سطح استرومایی غشای تیلاکوئیدی متصل‌اند به عنوان گیرنده‌های اولیه نوری برای فتوسیستم Π عمل می‌کنند. ساختار و عملکرد فیکوبیلی پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌های گوناگون متفاوت است. در حالی‌که تمام سیانوباکتری‌ها فتواتوتروف هستند بسیاری از آن‌ها می‌توانند از اجزای DOC (کربن آلی محلول) برای رشد هتروتروفی یا میکسوتروفی در نور استفاده کنند (Al Hasan et al., 2001).

در این پژوهش میزان رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 در تیمار هگزادکان ۱ درصداندازه‌گیری شد. در پی افزودن هگزادکان، این رنگیزه‌ها روند کاهشی مشابهی را دنبال کردند. نتایج حاصل از این پژوهش مطابق نتایج Suamya و Sundaram (۲۰۰۱) است که بر روی اثر تولوئن، بنزن و زایلن بر میزان رنگیزه‌هایی از قبیل کلروفیل، کاروتنوئید و فیکوسیانین ٤ گونه سیانوباکتری *Nostoc muscorum, Synechococcus* PCC7942, *Spirulina platensis, Anabaena cylindrica* انجام شد.

نتایج به‌دست آمده از تاثیر غلظت ۱ درصد هگزادکان بر فعالیت فتوسنتزی سیانوباکتری مورد نظر نشان داد میزان فعالیت فتوسنتزی در تیمار هگزادکان ۱ درصد در مقایسه با نمونه شاهد دارای اختلاف کاهشی معنادار بوده و کاهش یافته است. این نتیجه مطابق با نتایج Suamya و Sundaram (۲۰۰۱) از بررسی اثرتولوئن، بنزن و زایلن به محیط سویه‌های سیانوباکتری‌ها است. همچنین با نتایج Altamirano و همکاران (۲۰۰۰) بر روی *Ulva rigida* نیز مطابقت دارد. اثر تحریک کنندگی یا مهار فتوسنتز توسط هگزادکان، ممکن است به‌دلیل تغییرات در نفوذ پذیری غشاء باشد. غلظت‌های پائین موجب افزایش نفوذپذیری غشا می‌شود در حالی‌که غلظت‌های بالا در نفوذپذیری غشا اختلال ایجاد می کنند (Vanoverbeak and Blondeau, 1954).

بر اساس نتایج به‌دست آمده از آنالیز گاز کروماتوگرافی، سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* ISC108 توانمندی بسیاری در تجزیه هگزادکان دارد. در گذشته نتایج مشابهی از بررسی توانایی آلودگی‌های هیدروکربنی توسط سیانوباکتری‌ها به دست آمده است، به طور مثال Ibraheem (۲۰۱۰)پژوهشی در جهت مقایسه تجزیه اجزای آلیفاتیک نفت خام بین ۳ سیانوباکتری *Nostoc* sp., *Phormidium* sp. و *Anabaena* sp. ISC55 انجام داد.

سیانوباکتری‌هایی از قبیل *Anabaena cylindrical, P.faveolarum, Oscillatoria* sp. و *Agmenellum quadraplicatum* قادر به تجزیه ترکیبات مختلف آروماتیک و آلیفاتیک هستند (Cerniglia et al., 1980). سیانوباکتری‌ها با باکتری‌های تجزیه کننده نفت همکاری می‌کنند و توسط پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی خود از شسته شدن آن‌ها جلوگیری می‌کنند، هم‌چنین سیانوباکتری‌ها برای این باکتری‌ها اکسیژن و نیتروژن تثبیت شده را فراهم می‌کنند. این نقش غیر مستقیم سیانوباکتری‌ها در موفقیت مراحل زیست‌پالایی بسیار مهم است (Abed et al., 2002).

نتیجه‌گیری نهایی

مشاهدات فیزیولوژیکی و بررسی‌های گاز کروماتوگرافی، این نظر را تایید می‌کند که سیانوباکتری مورد مطالعه قادر است زندگی هتروتروفی داشته و از هیدروکربن‌های نفتی نظیر

هگزادکان به عنوان منبع کربن استفاده کند که این عمل را طی فرآیند اکسیداسیون این ترکیب آلیفاتیک نفتی انجام می‌دهد. لذا از آن‌جایی که نفت یک فرآورده سمی برای سیستم های بیولوژیک و یکی از آلوده‌کننده‌های اصلی اکوسیستم‌های زیستی محسوب می‌شود، نتایج حاصل از این آزمایش می‌تواند بیانگر پتانسیل این سیانوباکتری برای استفاده از آن به‌عنوان شاخصی جهت تجزیه زیستی آلودگی‌های نفتی در مناطق آلوده باشد.

منابع

سلطانی، ن.، بافته چی، ل. و شکروی، ش. (۱۳۸۷). بررسی روش‌های زیست محیطی، بهبود کیفیت و تصفیه ترکیبات نفتی با استفاده از ریزجلبک‌ها. طرح پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی شهید بهشتی.

سلطانی، ن. و غفاری، ر. (۱۳۹۱). بیولوژی و فیزیولوژی جلبک‌ها. انتشارات جهاد دانشگاهی شهید بهشتی. صفحات ۳۳-۲۵.

Abed, R.M.M. (2010). Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. International Biodeterioration and Biodegradation. 64: 58-64

Abed, R.M.M. and Köster, J. (2005). The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. International Biodeterioration & Biodegradation. 55: 29-37

Abed, R.M.M., Safi, N.M.D., Köster, J., Beer, D de., El-Nahhal, Y., Rullkötter, J. and Garcia-Pichel, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. Applied and Environmental Microbiology. 68: 1674-1683

Agbozu, I.E. and Opuene, K. (2009). Occurrence and diagenetic evolution of perylene in the sediments of Oginigba Creek, Southern Nigeria. International Journal of Environmental Research. 3 (1): 117-120.

Alexander, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. Academic press, San Diego (CA, USA)

Al-Hasan, R.H., Khanafar, M., Eliyas, M. and Radwan, S.S. (2001). Hydrocarbon accumulation by picocyanobacteria from Persian Gulf. Journal of Applied Microbiology. 91: 533-540

Altamirano, M., Flores-Moya, A. and Figueroa, F.L. (2000). Long-term effects of natural sunlight under various ultraviolet radiation conditions on growth and photosynthesis of intertidal *Ulva rigida* cultivated in situ. Botanica Marina. 43: 119-126

Andersen, R.A. (2005). Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press.

Atlas, R. and Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the Exxon Valdez experience. Microbial Biotechnology. 2(2): 213–221.

Cerniglia, C.E., Baalen, C.V. and Gibson, D.T. (1980). Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JCM. Journal of General Microbiology. 116:485–494

Coulibaly, L., Gourene, G. and Agathos, N.S. (2003) Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. African Journal of Biotechnology. 2 (12): 620-630.

Diestra, E., Esteve, I., Castell, O. and Solé, A. (2007). Ultrastructural changes in *Microcoleus chthonoplastes* growing in the presence of crude oil. Applications for ecological studies. Modern Research and Educational Topics in Microscopy. 453-460.

Dodds, W.K. (1989). Microscale vertical profiles of N_2 fixation, photosynthesis, O_2, chlorophyll *a* and light in a cyanobacterial assemblage. Applied and Environmental Microbiology. 55:882-886.

Dubey, S.K., Dubey, J., Mehra, S., Tiwari, P. and Bishwas, A.J. (2011). Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. African Journal of Biotechnology. 10(7): 1125-1132.

Gamila, H.A., Ibrahim, M.B.M. and Abd El-Ghafar, H.H. (2003). The role of cyanobacteria isolated strains in the biodegradation of crude oil. International Journal of Environmental Studies. 60: 435-444.

Ibraheem, M.I. (2010). Biodegrationability of hydrocarbons by cyanobacteria. Phycology Society of America. Journal of Phycology. 46: 818–824

Raghukumar, C., Vipparty, V. and David, J.J. (2001). Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 57(3): 433-436.

Rittmann, B.E. (1993). In situ Bioremediation: when Does It work? National Academy press, Washington DC (USA).

Stephen, J.R. and MacNaughton, S.J. (1999). Developments in terrestrial bacterial remediation of metals. Current Opinion in Biotechnology. 10 (3): 230-233.

Sundaram, S. and Soumya, K.K. (2001). Study of physiological alterations in cyanobacterium under organic stress. American Journal of Plant Physiology. 6(1): 1-16

Van Overbeek, J. and Blondeau, R. (1954). The mode of action of phytotoxic oils. Weeds. 3:55-65

Wyman, M. and Fay, P. (1986). Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (cyanobacteria). I. The influence of light quantity. Proceedings of the Royal Society of London. 227:367-380

Kumar, S., Habib, K. and Fatma, T. (2008). Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen – fixing cyanobacteria. Science of Total Environment. 403: 130-138.

Kumar, S., Muralitharan, G. and Thajuddin, N. (2009). Screening of hypersaline cyanobacterium, *Phormidium tenue*, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. Biotechnology Letters. 150: 1997-2008.

Machete, M., Noll, H., Behrens, H. and Kettrup, A. (1997). Degradation of Phenanthrene and hydraulic characteristics in a constructed wet land. Water Research. 31 (3): 554-560.

Marker, A.F.H. (1972). The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. Freshwater Biology. 2: 361-385.

Megharaj, M., Singleton, I., McClure, N.C. and Naidu, R. (2000). Influence of Petroleum Hydrocarbon Contamination on Microalgae and Microbial Activities in a Long-Term Contaminated Soil. Environmental Contamination and Toxicology. 38: 439-445.