

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Биологический факультет

Кафедра биоинженерии

Реферат по теме:

Микробиологическая очистка нефтяных разливов

Выполнил студент
I курса магистратуры
Кристовский Н.В.

Москва, 2022

Содержание:

1. Введение.....	3
2. Влияние основных нефтехимических загрязняющих веществ на здоровье человека и окружающую среду.....	5
3. Технологии обработки и деградации нефтехимических отходов.....	6
4. Способ биоремедиации нефтехимических отходов.....	8
4.1 Бактерии.....	10
4.1.1 Аэробная деградация нефтехимических отходов.....	11
4.1.2 Анаэробная деградация нефтехимических отходов.....	13
4.2 Водоросли.....	14
4.3 Генетически модифицированные организмы (ГМО).....	15
5. Обсуждение.....	16
6. Заключение.....	17
7. Литература.....	18

1. Введение

Деятельность человека по добыче энергоемких ресурсов, таких как полезные ископаемые, сырая нефть, природный газ и т. д. Модернизировала наше общество и сделали нашу жизнь более комфортной. Однако, за счет этого возросло загрязнение окружающей среды в несколько раз. Основные отходы нефтяной промышленности это: бензол, толуол, этилбензол и ксилол (BTEX). Эти соединения классифицируются как опасные отходы. Они являются канцерогенными и оказывают неблагоприятное воздействие на здоровье человека и окружающую среду. Они вносят значительный вклад в загрязнение поверхностных и грунтовых вод (Stasik et al., 2015). Кроме того, недавние исследования показали, что BTEX и другие нефтехимические соединения также в изобилии присутствуют в городском атмосферном воздухе, в основном это компоненты бензина, получаемого из сырой нефти. Эти соединения отрицательно влияют на здоровье нашей планеты, а значит, требуют срочного обезвреживания и переработки.

Методы, доступные и используемые для деградации BTEX и других нефтехимических отходов продукты могут быть разделены на физические, химические и биологические, в зависимости от вида и состава отходов. Физические методы, такие как гравитационная сепарация, адсорбция, мембранное разделение, обратный осмос (RO), нано-фильтрация (NF), ультрафильтрация (UF) и микрофильтрация (МФ) все чаще применяется для очистки нефтесодержащих сточных вод. Однако эти методы имеют различные ограничения, такие как производство больших объемов шлама (Шлам — представляет собой полутвердую суспензию, которая может быть получена в результате ряда промышленных процессов, например, при очистке сточных вод), высокая стоимость оборудование, высокие эксплуатационные расходы и т.д. (Shariati et al., 2011).

Химические методы, такие как осаждение, электрохимические процессы, процесс Фентона и продвинутые окислительные процессы (фотокаталитическая деградация, ультразвук) производят низкое количество шлама, но потребляют большое количество химикатов, требуют квалифицированного рабочего персонала, имеют высокую стоимость эксплуатации и технического обслуживания, что делает процесс менее экономически жизнеспособным.

Биологические методы переработки нефтехимических отходов включают биопленки, струйные фильтры, наработку микробиологических культур в био-реакторах, биологические аэрированные фильтры и др. (Riser-Roberts, 1998).

Биоремедиация — это процесс, при котором метаболические и ферментные возможности микробов используются для детоксикации и минерализации загрязняющих веществ, что в конечном итоге приводит к их деградации. Биоремедиация может проводиться *in-situ* и *ex-situ*. Когда биоремедиация происходит сама по себе, это называется естественным ослаблением. Однако, когда питательные вещества добавляются извне, чтобы стимулировать природные микроорганизмы, которые способны к биоремедиации, этот процесс называют биостимуляцией. Если для обработки загрязнений вводятся определенные микробы, процесс называется биоаугментация. Биодegradация нефтехимических отходов местными микробами это один из самых экологичных способов для рекультивации нефтехимических загрязняющих веществ. Наиболее привлекательным преимуществом биоремедиации является производство основных безвредных элементов, таких как углерод, азот и водород, в качестве конечных продуктов, которые легко ассимилируются в окружающей среде. Кроме того, эффективность биоремедиации природными микроорганизмами может быть значительно повышена за

счет оптимизации некоторых факторы, таких как адсорбция, массоперенос и биодоступность.

2. Влияние основных нефтехимических загрязняющих веществ на здоровье человека и окружающую среду

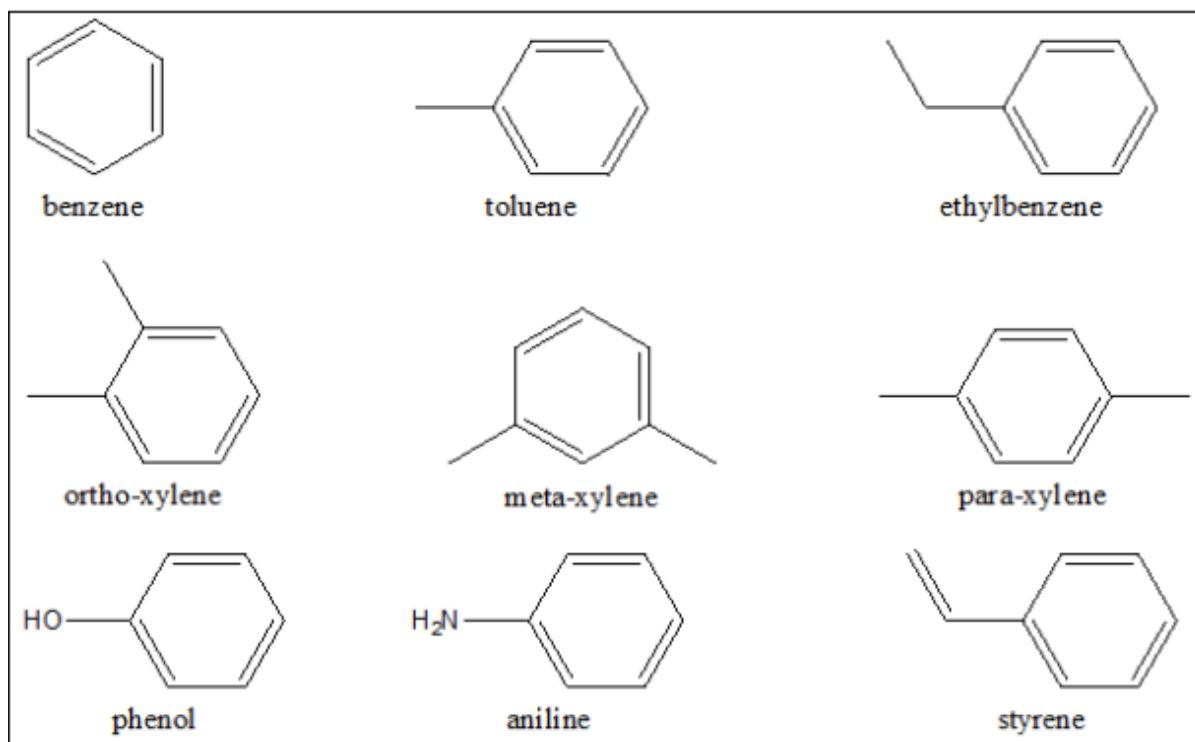


Рисунок 1. Часть соединений из нефтехимических растворов, которые являются токсичными для окружающей среды.

Эти соединения считаются чрезвычайно вредными при различных заболеваниях. Их воздействие, приводит к некоторым болезням, таким как лейкемия, лимфома, хромосомные мутации, повреждение ДНК лимфоцитов человека и клеток легких человека (с помощью бензола и толуола) (Pariselli et al., 2009). Были проведены различные исследования по проверки генотоксичность углеводородов как для человека, так и для растений (Singh et al., 2011). Исследования показали стимуляцию апоптоз у *Drosophila melanogaster* и повышение уровня цитохрома P₄₅₀ (Singh et al., 2011). Более того, большинство полициклических ароматических

углеводородов (ПАУ) обладают высокой растворимостью в липидах, что приводит к значительному всасыванию в желудочно-кишечном тракте млекопитающих и накапливается в различных тканях организма, особенно в организме жировых тканях. Метаболизм накопленных углеводородов происходит путем окисления или гидроксирования через цитохром P₄₅₀ — опосредованная ферментативная система оксидазы. Эта система приводит к формированию эпоксидов, фенолов и побочных продуктов в виде сульфатов, глюкуронидов или конъюгатов глутатиона, а также дигидро-диолы (Stegeman et al., 2001).

3. Технологии обработки и деградации нефтехимических отходов

Различные методы обработки, используемые для деградации нефтехимических отходов, могут быть классифицируются по следующим трем категориям: физическая, химическая и биологическая. Для выбора наиболее перспективной технологии смотрят на экономическую эффективность, возможность повторно использовать загрязненное пространство, побочные продукты при длительная эксплуатации. В категории физических методов адсорбция и коагуляция являются наиболее широко используемыми методами. Растворенные органические вещества легко адсорбируются на активированном угле, органо-глине, сополимерах, цеолите и других смолах. Органические соединения и некоторые тяжелые металлы присутствующий в нефтехимических отходах адсорбируется на пористых поверхностях активированного угля. Активированный уголь может быть использован для удаления растворимых соединений ВТЕХ, в то время, как органо-глина может быть использована для удаления нерастворимых свободных углеводородов. Органо-глина производится смешиванием натриевой монтмориллонитовой глины и катионной четвертичной аминной соли. Когда органо-глина и активированный уголь используется совместно, концентрация углеводородов в воде падает

значительно ниже приемлемых стандартов качества воды. Сополимерные гранулы получают суспензионной полимеризацией метилметакрилата и дивинилбензола. Эти сополимеры могут снизить содержание масла в нефтехимических отходах почти на 85%. Цеолиты представляют собой ионообменные смолы и являются гидрофобными по своей природе. Цеолитовые гранулы в виде неподвижного слоя могут быть использованы для поглощения растворенных органических соединений из нефтехимических отходов. Для этого также можно использовать заполненную смолой колонну. Оба этих способа адсорберы могут быть возобновлены путем промывки кислотным раствором. Однако, химические отходы в процессе промывки создают новые проблемы. Кроме того, взвешенные частицы, присутствующие в нефтехимических отходах, могут закупоривать поры и снижать эффективность удаления.

Испарение, осаждение растворенного воздуха, электродиализ, замораживание и оттаивание являются другими широко используемыми методами физической обработки. Другие передовые методы включают применение мембранной технологии (Rahman and Al-Malack, 2006).

Наиболее распространенным химическим процессом используемым для очистки сточных вод является окисление (Abdelwahab et al., 2009), однако с этим связаны различные проблемы. Например, требование чрезмерного количества химических веществ, низкая скорость реакции, а производство шлама, требующего дальнейшей обработки, является основной проблемой, связанной с химическими процессами (Guo and Al-Dahhan, 2005). В последнее время продвинутые окислительные процессы (AOPs). Например, фотокаталитическая деградация, каталитическое окисление влажным воздухом с помощью микроволн, процесс Фентона и др. Гетерогенная фотокаталитическая деградация — было установлено, что это высокоэффективная технология очистки (Puma and Yue, 2003) из-за ее способности полностью минерализовать органические загрязнители.

Кроме того, катализатор не токсичен, легко доступен и сам процесс экономически выгоден (Gaya and Abdullah, 2008). Однако высокая затраты на техническое обслуживание, потребность в квалифицированной рабочей силе и производство высокотоксичных промежуточных продуктов приводит к дальнейшему увеличению загрязнения окружающей среды несколькими основными методами очистки окружающей среды.

Помимо этих обычных физических и химических методов, различные биологические методы такие как биопленки, струйные фильтры, наработка микробиологических культур в био-реакторах, биологические аэрированные фильтры, биоремедиация, биоаугментация и другие биологические методы используют разнообразные метаболические и ферментативные возможности микроорганизмов по детоксикации и минерализации загрязняющих веществ. Эти микроорганизмы используют углерод, содержащийся в нефтехимических отходах. В процессе метаболизма нефтехимические отходы разлагаются до менее вредных продуктов. Таким образом, вредные загрязнения подвергаются биотрансформации. Биологические методы имеют низкие эксплуатационные расходы и, поскольку они предполагают прямую деградацию загрязняющих веществ, то нет опасности образования более токсичных промежуточных продуктов.

4. Способ биоремедиации нефтехимических отходов

В 1928 году Gray и Thronton обнаружили способность микроорганизмов разлагать ВТЕХ соединения встречающиеся в почве. Так появилась на свет концепция биоремедиации. Сегодня, биоремедиация — это широко используемый процесс деградации нефтехимических отходов. В этом процессе, микроорганизмы эффективно разлагают углеводородные загрязняющие вещества, присутствующие в нефтехимических отходах, перерабатывая их в углекислый газ (CO_2), неорганические соединения,

воду и клеточный белок. Другими словами, превращают сложные органические загрязнители в более простые органические соединения.

Микроорганизмы способны делать это, потому что они приспособились к такой окружающей среде. Уязвимость углеводов к микробной деградации, таких как линейные алканы, разветвленные алканы, циклические алканы и малые ароматические соединения является серьезной проблемой при хранении нефтепродуктов и их обработке (Ulrici, 2000). Ароматические соединения обычно они атакуются грибами и бактериями с помощью фермент оксигеназы. В этом процессе образуются такие соединения, как катехол и протокатехуат в качестве промежуточных продуктов.

Различные микробные роды обладают способностью разлагать нефтехимические загрязнители. Бактерии считаются наиболее активными и первичными агентами нефтехимической деградации. Родами грибов являются *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium* и дрожжи. Группа дрожжей состоит из таких родов, как *Candida*, *Yarrowia* и *Pichia* (Chaillan et al., 2004). В некоторых случаях различные микробы сосуществуют вместе (микробный консорциум и биопленки) для деградации нефтехимических отходов. Было обнаружено, что микробный консорциум *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* и *Rhodococcus* значительно более эффективен для алкилароматической деградации в морских отложениях по сравнению с одиночными штаммами (Jones et al., 2007). Это связано с широкими ферментативными возможностями консорциума что увеличивает скорость деградации. Различные бактерии, которые могут быть использованы для деградации нефтехимические отходы подробно рассматриваются ниже.

4.1 Бактерии

Бактерии являются наиболее активной микробной группой для деградации ВТЕХ и других нефтехимических загрязнителей. Исследователи выявили более 200 видов аэробных и анаэробные бактерии, обладающие способностью разлагать нефтехимические углеводороды. Многие виды бактерий обладают способностью метаболизировать органические загрязнители, но нет ни одного вида, который обладал бы ферментативной способностью разлагать все нефтехимические отходы, присутствующие в загрязненной почве. Именно смешанные бактериальные сообщества обладают необходимым потенциалом биodeградации. Аэробные грамотрицательные псевдомонады не проявляют ферментативной активности, но два вида группы, *P. putida* и *P. fluorescens* обладают самым высоким потенциалом биodeградации.

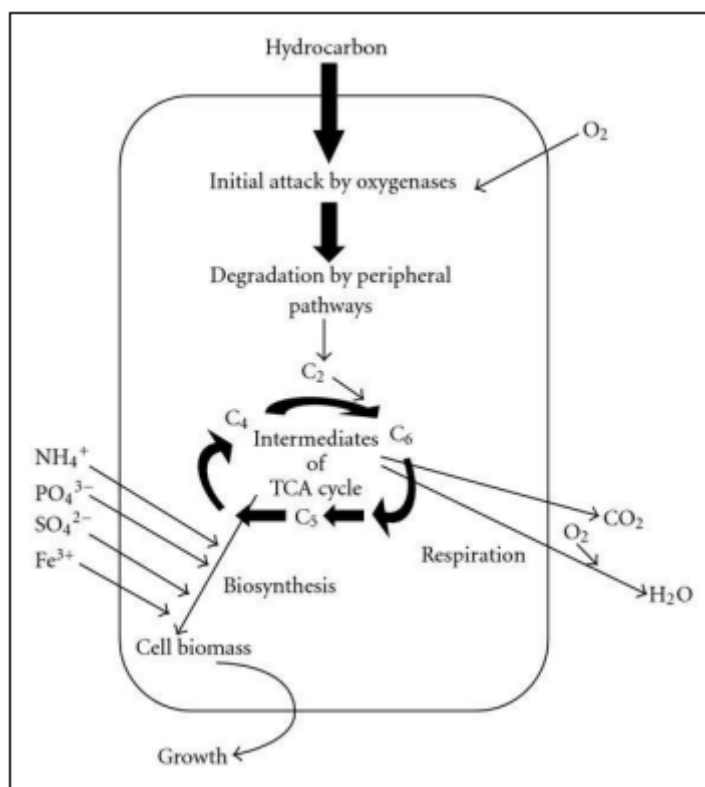
Ароматические углеводороды инертны к простому окислению-восстановлению и требуют сложных стратегий разложения. *P. putida* является наиболее часто используемой бактерией для разложения ароматических углеводородов (Otenio et al., 2005). Она непатогенная и демонстрирует разнообразные метаболизмы по сравнению с другими видами бактерий. Эта грамотрицательная бактерия обладает способностью метаболизировать соединения ВТЕХ и другие ароматические углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии (Mazzeo et al., 2010). Также было показано, что он действует как почвенный инокулянт для обработки загрязненных нафталином почв (Gomes et al., 2005), а также способен превращать стирольное масло в биоразлагаемые полигидроксиалканоаты (Ward et al., 2006). Бензопирен и ПАУ являются одними из наиболее канцерогенных и токсичных нефтехимических загрязнителей. Некоторые исследования показали, что бактерии могут разлагать эти нефтехимические соединения при

выращивании на альтернативном источнике углерода в жидкой культуре (Ye и др., 1995). В недавних исследованиях, проведенных для обеззараживания загрязненных ПАУ систем грунтовых вод, использовалась смешанная культура бактерий из родов *Acinetobacter* и *Klebsiella*. При использовании этих штаммов бактерий в течение 6 месяцев произошло значительное снижение общего содержания ПАУ до 98%. Концентрация ПАУ с тремя и четырьмя кольцами снизилась до 0,5% от первоначального количества, в то время как концентрация высоко канцерогенных ПАУ с пятью-семью кольцами снизилась. уменьшено до 3% от исходного содержания (Daane et al., 2001). Бактерия *Bacillus hexabovogum* может расти аэробно в среде, содержащей смесь толуола и ксилола, и способствовать разложению соединений ВТЕХ (Daane et al., 2001). В следующих разделах объясняется аэробная и анаэробная деградация нефтехимических загрязнителей.

4.1.1 Аэробная деградация нефтехимических отходов

В аэробных условиях кислород (O_2) является мощным окислителем для расщепления кольца ароматические нефтехимические соединения. Кислород служит не только конечным акцептором электронов, но также является со-субстратом для некоторых ключевых катаболических процессов (Díaz et al., 2013).

Аэробная деградация ароматических нефтехимических отходов в основном начинается с реакции фермента диоксигеназы с ароматическими кольцами, в результате получают *цис*-дигидродиолы. Далее следует дегидрирование *цис*-дигидродиолов до 1,2-дигидроксисоединений дегидрогеназой, наконец затем следует метаболизм 1,2-дигидроксисоединений (Goyal et al., 1997). Соединения ВТЕХ в основном деградируются аэробным путем.



На рис. 5 показан основной принцип аэробной деградации углеводородов микроорганизмами.

Бензол разлагается до катехола. Толуол может разлагаться различными способами, некоторые из которых включают 3-метилкатехол в качестве промежуточного продукта. Точно так же существуют различные пути биодegradации этилбензола, некоторые из которых включают 3-этилкатехол как промежуточное звено. Разложение ксилола — сложный процесс, поскольку ксилолы метаболизируются до монометилованных катехолов. Ароматическое кольцо замещенных катехолов позже расщепляется под действие фермента диоксигеназы. Аэробная деградация алкилированных фенолов осуществляется двумя путями:

- 1) гидроксирование до катехолов с последующим расщеплением экстрадиольного кольца.
- 2) окисление метильной группы до карбоксильной с последующим гидроксированием до гидрохинонов и расщеплением по гентизатному

пути (*Poh et al., 1988*).

Хемоорганотрофные виды бактерий разлагают органические загрязнители, используя большое количество природных и ксенобиотических соединений в качестве источников углерода и доноров электронов для выработки энергии (*Evans et al., 2003*).

Некоторые бактерии разлагают только специфические, более легко разлагаемые нефтехимические соединения например, нафталин и фенантрен. Бактерия *P. paucimobilis* штамма EPA 505 способна разлагать нефтехимические соединения, такие как пирен, флуорантен, хризен, бензопирен и бензофлуорантен (*Ye et al., 1995*). Грамположительные штаммы *Mycobacterium* sp. способны разлагать пирен, бензантрацен и бензопирен (*Schneider et al., 1996*).

4.1.2 Анаэробная деградация нефтехимических отходов

Нефтехимические соединения часто образуют и присутствуют в бескислородной среде, что обуславливает необходимость анаэробной биоремедиации. Анаэробная деградация нефтехимических отходов хорошо изучена различными исследователями (*Stasik et al., 2015*). Многие разновидности микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и водоросли, обладают способностью разлагать ВТЕХ и других нефтехимических загрязнителей в анаэробных условиях. Следовательно, при анаэробном разложении используются общие для всех промежуточные продукты, которые содержат заместители, обладающие эффектом отвода электронов, для облегчения переноса электронов в кольцо. Наиболее распространенным промежуточным продуктом является бензоил-КоА, в котором карбокси-тиоэфир действует как электроноакцепторная группа. Анаэробная биodeградация соединений ВТЕХ важна, поскольку соединения ВТЕХ обнаруживаются в основном в условиях ограниченного доступа кислорода, таких как отложения природных водоемов, грунтовые

воды, а иногда даже в почве. *Dechloromonas spp.* JJ и RCB (культивированные на усиленном клостридиальном бульоне) полностью минерализуют бензол с помощью бензоил-КоА в анаэробных условиях (Chakraborty and Coates, 2005). Фактически, бензоил-КоА является общим промежуточным продуктом при анаэробном биодеградациии бензола, толуола и этилбензола. Ароматическое кольцо бензоил-КоА восстанавливается и в конечном итоге превращается в фермент ацетил-КоА. Некоторые микроорганизмы обладают способностью анаэробно метаболизировать ксилол. Эти микробы являются штаммами денитрифицирующих бактерий и способны использовать м-ксилол в качестве субстрата для своего роста. *Dechloromonas* RCB обладает способностью разлагать все три изомера ксилола в анаэробных условиях (Chakraborty and Coates, 2005). Но этот путь анаэробного разложения ксилола не очень хорошо известен.

Биодегградация фенола в анаэробных условиях: обычно происходит карбоксилирование фенола, за которым следует его дегидроксилирование и, расщепление кольца после частичного восстановления (Brackmann and Fuchs, 1993).

4.2 Водоросли

Водоросли и цианобактерии (сине-зеленые водоросли) также могут окислять и разлагать нефтехимические отходы. Известно, что некоторые эукариотические водоросли и цианобактерии окисляют ПАУ до гидроксильированных промежуточных продуктов в фотоавтотрофных условиях. Исследование, включающее разложение продуктов нефтехимии, таких как флуорантен, пирен и смесь флуорантен-пирена, такими водорослями, как *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* и *Selenastrum capricornutum* показали, что эффективность разложения зависит от вида водорослей и типа взаимодействия водорослей

с токсикантами. Удаление ПАУ из смеси за семь дней эксперимента составило 78% и 48%, для *S. capricornutum* и *C. vulgaris* соответственно. Эффективность удаления была выше для смеси флуорантен-пирен по сравнению с отдельными соединениями, что позволяет предположить, что присутствие одного ПАУ стимулировало удаление другого ПАУ (Lei et al., 2007).

Другое исследование включало биodeградацию фенантрена и флуорантена водорослями, культивируемыми на воде из экосистемы мангровых зарослей. Идентифицированные виды микроводорослей, *S. costatum* и *Nitzschia sp.*, были способны накапливать и разлагать оба типичных ПАУ одновременно. Способность к деградации и накоплению у *Nitzschia sp.* была выше по сравнению с таковой у *S. costatum* (Hong et al., 2008).

Сообщалось также об окислении нафталина и фенантрена цианобактериями до метаболитов, подобных тем, которые образуются грибами и млекопитающими. В одном из исследований зеленые водоросли *Selenastrum capricornutum* использовали для окисления бензопирена до изомерных цис-дигидродиолов, что аналогично бактериальным метаболитам. Чистая культура водорослей *Prototheca zopfii* обладает способностью утилизировать сырую нефть, смешанный углеводородный субстрат и интенсивно разлагать n-алканы, изоалканы, а также ароматические углеводороды.

4.3 Генетически модифицированные организмы (ГМО)

Генетически модифицированные организмы (ГМО) могут быть ответом на вопрос об эффективном и экономически целесообразном процессе биоремедиации. В лабораторных условиях генетически модифицированные микроорганизмы могут значительно повысить эффективность биodeградации нефтехимических отходов. ГМО, такие как *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida* и т.д. играют

важную роль в разложении нефтехимических отходов, особенно соединений ВТЕХ (Das and Chandran, 2010). Сообщается, что различные ГМО, особенно бактерии и грибы, вызывают разложение некоторых ксенобиотических органических соединений из окружающей среды. Они также могут быть использованы для мониторинга реакции на стресс-деформацию и оценки токсичности в процессах биodeградации. Однако различные экологические и экологические проблемы являются основными препятствиями для тестирования ГМО в полевых условиях.

5. Обсуждение

Многочисленные аэробные и анаэробные микроорганизмы обладают потенциалом для разложения нефтехимических отходов, но для преодоления всех связанных с этим ограничений и эффективного разложения всех углеводов и связанных с ними загрязняющих веществ необходимо разработать передовые стратегии биоремедиации. Разработка гибридных путей путем генетических манипуляций с микроорганизмами является одним из перспективных методов, который позволил бы радикально улучшить процесс биоремедиации. Это помогло бы продуцировать микроорганизмы, которые могут бороться с многочисленными загрязнителями, и привело бы как к горизонтальной, так и к вертикальной эволюции катаболических путей. Горизонтальная эволюция означала бы расширение катаболических путей за счет использования ферментов с широкой специфичностью к субстрату, в то время как вертикальная эволюция означала бы расширение диапазона субстратов, которые микроорганизм может разлагать, используя ферменты, которые направляют различные химические вещества в центральные катаболические пути. Однако нынешние усилия по конструированию таких гибридных путей в основном ограничены, главным образом из-за ограниченного числа ферментов, доступных для использования .

Биоремедиация и фиторемедиация (удаление загрязняющих веществ растениями) часто рассматриваются как независимые подходы. Но взаимодействие между микробами и растениями может быть использовано для эффективного разложения загрязняющих веществ. Хлорированные органические соединения, такие как трихлорэтилен, могут быть удалены с помощью деревьев, колонизированных эндофитами (Liu и др., 2007). Было показано, что можно выделить сфингомонад, которые, как известно, колонизируют корни растений, и использовать их для разложения линдана (Boltner et al., 2008). Одной из областей биоремедиации, которая в основном остается нетронутой, является разработка путей анаэробной деградации в подходящих хозяевах. Это помогло бы получить новые штаммы, которые были бы способны разрушать различные стойкие соединения.

6. Заключение

Утилизация нефтехимических отходов — одна из самых серьезных проблем, с которыми сегодня сталкиваются экологи. Поскольку большинство методов физической и химической обработки имеют существенный недостаток, заключающийся в образовании другого типа отходов, требующих дальнейшего переработки, методы биологической очистки, такие как биоремедиация, выглядят очень многообещающими.

Биоремедиация не только экономически эффективна, но и приводит к полной минерализации нефтехимических загрязняющих веществ и получению экологически чистых конечных продуктов. С помощью биоремедиации стало возможным лечить загрязнители, которые когда-то считались неразлагаемыми. Это, несомненно, перспективный и экономически целесообразный метод обращения с нефтехимическими отходами. Биоремедиация доказала свой огромный успех в лабораторных условиях, а также во многих случаях в естественной среде. На

загрязненных участках по всему миру осуществляется несколько процессов биоремедиации *in situ* и *ex-situ*. Многие из них оказались весьма успешными при удалении как органических, так и неорганических загрязняющих веществ. Однако было также много неудач. Во многих случаях, микробные сообщества просто не смогли работать в полевых условиях так, как ожидалось. Это говорит нам о том, что есть потребность в исследовательских работах нацеленных на изучения работы отдельных видов микроорганизмов в сообществах микроорганизмов.

7. Литература:

1. Abdelwahab, O., Amin, N. K., and El-Ashtoukhy, E. Z. (2009). Electrochemical removal of phenol from oil refinery wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2), 711-716
2. Boltner, D., Godoy, P., Muñoz-Rojas, J., Duque, E., Moreno-Morillas, S., Sánchez, L., & Ramos, J. L. (2008). Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microb. Biotechnol.* 1, 87–93.
3. Brackmann, R., and Fuchs, G. (1993). Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 213(1), 563-571.
4. Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y. H., Grimont, P., Saliot, A., and Oudot, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbondegrading microorganisms. *Research in Microbiology*, 155(7), 587-595.
5. Chakraborty, R., and Coates, J. D. (2005). Hydroxylation and carboxylation—two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5427-5432.
6. Daane, L. L., Harjono, I., Zylstra, G. J., and Häggblom, M. M. (2001). Isolation and characterization of polycyclic aromatic

- hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2683-2691.
7. Das, N., and Chandran, P. (2010). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
 8. Díaz, E., Jiménez, J.I., and Nogales, J. (2013). Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 24(3), 431-442.
 9. Evans, G. M., and Furlong, J. C. (2003). *Environmental biotechnology: theory and application*. IK International Pvt Ltd.
 10. Gomes, N. C., Kosheleva, I.A., Abraham, W.R., and Smalla, K. (2005). "Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community". *FEMS Microbiology Ecology* 54 (1): 21–33.
 11. Goyal, A. K., and Zylstra, G. J. (1997). Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(5-6), 401-407.
 12. Guo, J., and Al-Dahhan, M. (2005). Catalytic wet air oxidation of phenol in concurrent downflow and upflow packed-bed reactors over pillared clay catalyst. *Chemical engineering science*, 60(3), 735-746.
 13. Hong, Y. W., Yuan, D. X., Lin, Q. M., and Yang, T. L. (2008). Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, 56(8), 1400-1405.
 14. Jones, D. M., Head, I. M., Gray, N. D., Adams, J. J., Rowan, A. K., Aitken, C. M., Bennett, B., Huang, H., Brown, A., Bowler, B.F.J., and Oldenburg, T., (2008). Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 451(7175), 176-180.

15. Lei, A. P., Hu, Z. L., Wong, Y. S., and Tam, N. F. Y. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource technology*, 98(2), 273-280
16. Liu, L., Jiang, C. Y., Liu, X. Y., Wu, J. F., Han, J. G., and Liu, S. J. (2007). Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants. *Environ. Microbiol.* 9, 465–473.
17. Mazzeo, D. E. C., Levy, C. E., de Angelis, D. D. F., and Marin-Morales, M. A. (2010). BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the total environment*, 408(20), 4334-4340.
18. Otenio, M. H., Silva, M. T. L. D., Marques, M. L. O., Roseiro, J. C., and Bidoia, E. D. (2005). Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3), 258-261.
19. Pariselli, F., Sacco, M. G., Ponti, J., and Rembges, D. (2009). Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(4), 381-386.
20. Poh, C. L., and Bayly, R. C. (1988). Regulation of isofunctional enzymes in *Pseudomonas alcaligenes* mutants defective in the gentisate pathway. *Journal of applied bacteriology*, 64(5), 451-458.
21. Puma, G. L., and Yue, P. L. (2003). Modeling and design of thin-film slurry photocatalytic reactors for water purification. *Chemical engineering science*, 58(11), 2269-2281.
22. Rahman, M. M., and Al-Malack, M. H. (2006). Performance of a crossflow membrane bioreactor (CF-MBR) when treating refinery wastewater. *Desalination*, 191(1), 16-26.
23. Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. CRC press.
24. Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., and Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz [a] anthracene, and benzo [a] pyrene

- by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 13-19.
25. Shariati, S. R. P., Bonakdarpour, B., Zare, N. and Ashtiani, F. Z. (2011). The effect of hydraulic retention time on the performance and fouling characteristics of membrane sequencing batch reactors used for the treatment of synthetic petroleum refinery wastewater. *Bioresource Technology* 102(17), 7692-7699.
26. Singh, M. P., Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A. K., Mudiam, M. K. R., Patel, D. K., Ram, K. R., and Chowdhuri, D. K. (2011). Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicology and applied pharmacology*, 253(1), 14-30
27. Stasik, S., Wick, L. Y., and Wendt-Potthoff, K. (2015). Anaerobic BTEX degradation in oil sands tailings ponds: Impact of labile organic carbon and sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere* 138(0), 133-139.
28. Ulrici, W. (2000). Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. *Biotechnology Set*, Second Edition, 5-41.
29. Ward, P. G., Goff, M., Donner, M., Kaminsky, W., & O'Connor, K. E. (2006). A two step chemo-biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic. *Environmental science & technology*, 40(7), 2433-2437.
30. Ye, D., Siddiqi, M. A., Maccubbin, A. E., Kumar, S., and Sikka, H. C. (1995). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental science & technology*, 30(1), 136-142.