Journal of Microbial World
Volume 13, No. 1, April 2020

Original Article

Screening of crude oil degrading bacteria from industrial effluents in Shiraz

Hajar Moradi[1], Mehdi Hassanshahian[2]

[1]MSc, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[2]Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Pollution of the environment with petroleum and its derivatives is a serious threat to human health and the environment, so treatment of these substances is of great importance. The bioremediation process is defined as the use of microorganisms to remove many industrial effluents, including petroleum products. The aim of this research is the isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from some industrial sewage in Shiraz.

Material & Methods: This study was performed to isolate crude oil degrading bacteria from some industrial areas of Shiraz. To investigate the effect of crude oil on the frequency and variety of microbial populations of soil and water sampling, identification and counting of crude-oil degrading bacteria and heterotrophic bacteria were performed by CFU and MPN methods. Preliminary identification of the strains was carried out based on biochemical characteristics. Then properties such as oil-spreading, emulsifying activity, growth and degradation rate of these bacteria were investigated.

Results: After screening, it was found that 20 strains were capable of growing and decomposing crude oil. The highest oil-spreading, bacterial adhesion to hydrocarbon, emulsifying activity were related to PE_3, SN_1, DS_1, 23%, 16% and 22%, respectively. Using these results seven suitable strains were selected and crude oil removal rates determined by spectrophotometric and gravimetric methods for each strain. One strain with the highest rate of crude oil degradation was *Cellulosimicrobium cellulans* by molecular method. This strain had the best efficiency of degradation (67 %) in 1.5 parentage of crude oil. By optimization of factors affecting crude oil degradation such as carbon source, nitrogen source, time and mixed culture the best degradation (100%) was take place.

Conclusion: The results of this study showed that the use of these microorganisms by creating optimal conditions can be an important step in the removal and control of oil pollution.

Keywords: Biodegradation, Hydrocarbons, Bacterial Isolation, Crude Oil.

Correspondence to: Mehdi Hassanshahian

Tel: +98 9132906971

E-mail: mshahi@uk.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(1): 58-69.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزدهم شماره اول (پیاپی ۴۲) بهار ۱۳۹۹
صفحات ۶۹-۵۸

Original Article

غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام فاضلاب‌های صنعتی شیراز

هاجر مرادی[۱]، مهدی حسن شاهیان[۲*]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲]استاد، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی محیط زیست با نفت و مشتقات آن تهدیدی جدی برای سلامت انسان و محیط زیست می‌باشد. با استفاده از فرایند زیست پالایی، امکان حذف بسیاری از آلاینده‌های زیست محیطی به ویژه فاضلاب‌های صنعتی وجود دارد. این مطالعه با هدف جداسازی و تعیین ویژگی های باکتری های تجزیه کننده نفت خام در برخی از فاضلاب های صنعتی شیراز انجام شد.

مواد و روش ها: در این پژوهش به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام نمونه برداری از برخی فاضلاب‌های صنعتی در شیراز انجام شد. به منظور بررسی اثر نفت خام بر روی فراوانی و تنوع جمعیت میکروبی نمونه‌های خاک، نمونه برداری از پساب و لجن نفتی انجام شد. شناسایی و شمارش باکتری‌های تجزیه کننده و هتروتروف با روش‌های رقت تدریجی و بیشترین شمارش احتمالی (MPN) انجام شد. پس از غربالگری مشخص شد که ۲۰ سویه توانایی رشد و تجزیه نفت خام را دارند. شناسایی مقدماتی سویه‌های جداشده بر اساس آزمون های بیوشیمیایی انجام شد. سپس ویژگی هایی مانند گسترش قطره، فعالیت امولسیون کنندگی و میزان رشد و تجزیه در این باکتری‌ها بررسی شد.

یافته ها: بیشترین گسترش قطره، هیدروفوبیسیته سلولی، فعالیت امولسیون کنندگی در جدایه های PE3، SN1 و DS1 به ترتیب ۲۳، ۱۶ و ۲۲ درصد بود. با استفاده از این نتایج هفت سویه مناسب انتخاب شدند و میزان حذف نفت خام با روش اسپکتروفتومتری و گراویمتری مشخص گردید. سپس با روش مولکولی تعیین هویت سویه *سلولومیکروبیوم سلولانس* (*Cellulosimicrobium cellulans*) دارای بیشترین میزان تجزیه نفت خام انجام شد. این سویه بهترین عملکرد در تجزیه (۶۷٪) را در غلظت ۱/۵ درصد نشان داد. با بهینه سازی برخی عوامل موثر بر روی تجزیه نفت خام مانند کشت مخلوط، منبع کربن، منبع ازت و زمان، حداکثر تجزیه نفت خام (۱۰۰٪) حاصل گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که با بهینه سازی شرایط میکروارگانیسم های جداشده در این پژوهش، امکان حذف و کنترل آلوگی نفتی وجود دارد.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، هیدروکربن، جداسازی باکتری، نفت خام.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۸

مقدمه

نفت خام یک مخلوط پیچیده طبیعی از ترکیبات هیدروکربنی و غیرهیدروکربنی است. محصولات مبتنی بر نفت، منبع اصلی انرژی برای صنعت و زندگی روزمره می‌باشند. با این حال امروزه آلودگی محیط زیست توسط هیدروکربن‌های نفتی و

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۱۳۲۹۰۶۹۷۱ پست الکترونیک: mshahi@uk.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

اثرات نامطلوب آن در میان مشکلات فراوان محیط زیست قابل توجه است. یکی از دلایل عمده نگرانی‌ها در دوران اخیر حضور هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای (Poly Aromatic Hydrocarbons) مانند آنتراسن، فنانترن، بنزوپیرن و بنزوآنتراسن در آب و فاضلاب است. برخی از این ترکیبات سرسخت و بالقوه سرطان‌زا هستند و توانایی تجمع زیستی در زنجیره‌های مواد غذایی را دارند (۱). آلودگی نفتی از راه نشت، فروش و استفاده از فرآورده‌های نفتی، شکستگی خط لوله و ریختن از مخازن تانک‌ها صورت می‌گیرد. همچنین اضافه کردن مواد نفتی به خاک به عنوان یک سیاست عمدی دفع زباله منجر به آلودگی می‌شود. در مناطق به شدت آلوده شده، اثرات زیان‌آور فوری بر زندگی گیاهان و جانوران به ویژه کشاورزی دارد. علاوه بر اثرات آن بر گیاهان و حیوانات، آلودگی نفتی جمعیت‌های میکروبی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. اثر نفت روی جمعیت‌های میکروبی به ترکیب شیمیایی نفت و گونه‌های میکروارگانیسم‌های موجود بستگی دارد. وجود این آلاینده‌ها در محیط زیست علاوه بر تاثیر گسترده بر اکوسیستم منطقه، با گذشت زمان و ورود به چرخه غذایی، به جوامع انسانی نیز راه می یابند و به این ترتیب سلامت انسان‌ها را تهدید می‌کنند (۲ و ۳). افزایش فرایند صنعتی شدن در سراسر جهان منجر به تولید فاضلاب صنعتی در مقادیر زیادی با محتوای آلی شده است که در صورت تصفیه نشدن مناسب، می تواند منجر به تولید قابل توجهی از انرژی شود. همواره صنعتی شدن و شهرنشینی سریع افزایش میزان آلودگی آب را به دنبال دارد. توسعه سریع اقتصادی و افزایش سطح زندگی مردم موجب افزایش سریع تعداد صنایع نفتی و پتروشیمی در سراسر جهان شده است. حجم زباله‌های نفتی با ۵ میلیون متر مکعب با افزایش محتوای متوسط تا ۵۰ درصد در سال افزایش یافته است. فاضلاب پتروشیمی‌ها حاوی مواد سمی مانند مواد سنگین آلی، چربی‌ها، روغن و گریس، اسید های چرب، ترکیبات نیتروژنی می‌باشند. این ترکیبات مانع از رشد گیاهان و حیوانات و همچنین مضر برای انسان می‌باشند. همچنین فاضلاب‌های نفتی حاوی مقادیر زیاد روغن است (۲). زباله‌های حاوی روغن و گریس تولید شده از پتروشیمی‌ها، آلودگی‌های خطرناک هستند به ویژه هنگامی که به محیط‌های آبزی تزریق می‌شوند که در آن‌ها موجب مسمومیت موجودات آبزی و سایر آسیب‌های زیست محیطی می‌شوند. روغن و گریس در طبیعت چسبنده هستند که به دلیل تمایل به تجمع، موجب مسدود کردن لوله‌های تخلیه و خطوط فاضلاب، ایجاد بوی ناخوشایند و در شرایط بی‌هوازی پوسیدگی خطوط فاضلاب می شوند. همچنین ترکیبات یاد شده در تصفیه فاضلاب شهری موثر هستند، زیرا به صورت یک لایه در بالای آب شناور می‌شوند (۳). آلودگی‌های نفتی به روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی پاکسازی می‌شوند. روش های فیزیکی مانند سوزاندن می تواند موجب نابودی ارگانیسم های بومی به ویژه میکروب‌های تجزیه کننده نفت، افزایش سمیت نفت باقی مانده و همچنین آلودگی هوا می گردد. روش‌های شیمیایی شامل تزریق مستقیم اکسید کننده‌های شیمیایی به محیط منجر به تغییر ماهیت طبیعی محیط می‌شوند. روش‌های شیمیایی ممکن است فعالیت‌های میکروبی را از طریق آسیب به غشای سلولی یا آنزیم‌های ضروری مهار کنند (٤). به دلیل مشکلات مرتبط با روش‌های فیزیکی و شیمیایی به یک رویکرد ایمن‌تر و ارزان‌تر برای تجزیه آلودگی محیط زیست نیاز است. استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای حذف موثر آلودگی هیدروکربنی از خاک توسط محققین متعدد در نظر گرفته شده است، چرا که آلودگی‌زدایی خاک آلوده به وسیله روش‌های دیگر منجر به تولید ترکیبات سمی می‌شود و این روش‌ها غیراقتصادی نیز می‌باشند، همچنین روش‌های زیستی مقرون به صرفه تر و کارآمدتر از روش‌های فیزیکی و شیمیایی هستند (۵). فاضلاب‌های نفتی معمولا حاوی چربی مانند آلکان‌ها و اسید چرب زنجیره بلند است. لیپیدهایی که در فاضلاب وجود دارد به سختی تجزیه می‌شوند، زیرا در آب حل نمی‌شوند و از فرآیندهای متانوژنیک جلوگیری می‌کنند. متابولیسم لیپید شامل چندین مرحله شامل امولسیون کننده و تخریب می‌باشد. پس از تخریب مسیر، لیپید به گلیسرول و اسید چرب تبدیل می‌شود. سپس اسید چرب‌ها از طریق مسیر اکسیداسیون بتا به

استیل CoA تبدیل می‌شود و در نهایت به چرخه TCA وارد می‌شود. بسیاری از میکروارگانیسم‌هایی که از نمونه‌های خاک و آب جدا شده‌اند، توانایی جمع‌آوری و حذف ترکیبات نفتی فاضلاب را دارند. آنزیم‌های میکروبی در تصفیه بیولوژیکی شامل اکسیدوردوکتازهای میکروبی، لاکاس‌های میکروبی، پراکسیدازهای میکروبی،آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی. این مکانیسم برای تخریب زیستی نشت نفت و سموم ارگانوفسفره و کربامات موثر است (٦). فاضلاب‌های صنعتی در مکان‌های گوناگونی در شیراز تولید می‌شوند. از این مکان‌ها می‌توان پتروشیمی شیراز، کارخانه تولید روغن نرگس در شیراز و کارخانجات تولید کود شیمیایی را نام برد. علاوه بر این شهرک صنعتی بزرگ شیراز که واقع شرق شهر شیراز، بزرگ ترین و مهمترین شهرک صنعتی استان فارس است. این شهرک با وسعت تقریبی ١٤٠٠ هکتار یکی از بزرگترین و مهمترین شهرک‌های صنعتی کشور محسوب می‌شود. در مناطق صنعتی شیراز مکان های مختلفی مانند فاضلاب‌ها و خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی و روغنی وجود دارد که با استفاده از جداسازی میکروارگانیسم‌های آن‌ها می توان به منظور پاکسازی و تصفیه آلودگی نفتی استفاده نمود (٧). شرکت پتروشیمی شیراز به عنوان اولین واحد تولیدی صنایع پتروشیمی ایران در سال ١٣٤٢ به منظور تولید کودهای شیمیایی ازته آغاز به فعالیت نمود. در این پتروشیمی آمونیاک ، اوره ، اسید نیتریک ، و نیترات آمونیوم، کلر آلکالی، متانول، پرکلرین و آرگون تولید می شود. شرکت روغن نباتی شیراز در سال ١٣٣٣ با عنوان کارخانه پنبه پاک کنی در حومه شهر شیراز احداث گردید. پس از آن با افزایش گرایش و رغبت عموم مردم به جایگزینی روغن‌های نباتی بجای روغن‌های حیوانی، فرآیند تصفیه این کارخانه با ظرفیت ٦٠ تن در روز راه اندازی و بتدریج به ظرفیت کنونی ٤٠٠ تن در روز که شامل تصفیه و بسته بندی انواع روغن‌های نباتی مایع، جامد مصرف خانوار، مارگارین و روغن‌های ویژه صنف و صنعت می‌باشد افزایش یافت (٧). هدف از این پژوهش، بررسی پراکندگی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام در فاضلاب‌های صنعتی شیراز است که دارای آلودگی نفتی بالایی می‌باشند. همچنین غربالگری و بدست آوردن سویه‌های بومی با قابلیت تجزیه بالای نفت خام از دیگر اهداف این تحقیق بود. در نهایت سنجش اثر عوامل محیطی بر روی میزان تجزیه پذیری نفت خام توسط سویه‌های برتر انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری: نمونه‌های خاک (٢ نمونه)، لجن نفتی (١ نمونه) و پساب (٢ نمونه) ازسه منطقه آلوده به مواد نفتی در شیراز جمع‌آوری شدند. مناطق نمونه برداری شامل پتروشیمی شیراز، شهرک صنعتی شیراز و کارخانه روغن گل نرگس بودند. نمونه برداری از عمق ١٠-٥ سانتی متری خاک به میزان ٥٠٠ گرم در شرایط کاملا استریل انجام گرفت و در کیسه‌های پلاستیکی پلی اتیلن استریل در دمای ٤ °C تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شدند (٨). نمونه‌های پساب میزان ٣٠٠ میلی لیتر در جدول (١) مناطق نمونه برداری با اشاره به نام اختصاری نشان داده شده است. بیشتر نمونه های جمع آوری شده مربوط به پساب بود و اکثر نمونه ها دارای آلودگی شدید هیدروکربنی بودند.

ب) شمارش تعدادکل هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها: تجزیه و تحلیل اولیه نمونه‌ها با شمارش تعداد کل باکتری‌های هتروتروف و تجزیه کننده در نمونه‌های آلوده انجام شد. ابتدا ١٠ گرم از خاک‌های آلوده و ١٠ میلی‌لیتر از پساب در ١٠٠ میلی لیتر بافر فسفات نمکی حل شده و به مدت ٦٠ دقیقه در انکوباتور شیکر دار با دور ١٦٠ rpm و دمای ٣٠ °C قرار داده شدند. سپس درون لوله‌های آزمایش به میزان ٩ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی ریخته شد. برای شمارش باکتری‌های هتروتروف پس از رقت سازی‌های متوالی ١ میلی‌لیتر از

جدول ١: مناطق نمونه برداری.

نام اختصاری	منطقه نمونه برداری
DS	لجن نفتی پتروشیمی
AS	پساب واحد تولید کود
PE	خاک پتروشیمی
PC	خاک کارخانه روغن نرگس
SN	پساب کارخانه روغن نرگس

سوسپانسیون تهیه شده در رقت‌های 10^{-5} و 10^{-6} تهیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها در پلیت‌های حاوی نوترینت آگار کشت سفره‌ای داده شد و برای شمارش باکتری‌های تجزیه کننده رقت 10^{-1} و 10^{-2} تهیه گردید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها در پلیت‌های بوشنل هاس آگار حاوی نیم درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کربن محیط کشت سفره‌ای داده شد. پس از گرماگذاری در دمای ۳۰ °C و پس از ۴۸-۲۴ ساعت شمارش کلنی باکتری‌های هتروتروف، و پس از ۱۰ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ °C شمارش کلنی باکتری‌های تجزیه کننده انجام شد. تعداد کلنی در هر گرم خاک طبق فرمول زیر محاسبه شد (۹).

۱۰× عکس رقت×میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده cfu/g

=

ج) شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها: شمارش باکتری ها با استفاده از روش بیشترین شمارش احتمالی (Most Probable Number=MPN) انجام شد. برای این منظور، ابتدا ۱۰ گرم از خاک های آلوده و ۱۰ میلی‌لیتر از پساب در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات حل و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ °C قرار داده شدند. سپس ۱ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده به درون لوله های حاوی ۹ میلی لیتر بافر فسفات منتقل شد. برای شمارش باکتری های هتروتروف رقت های 10^{-5}-10^{-7} ایجاد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت ها در میکروپلیت های ۲۴ خانه حاوی ۱۸۰۰ میکرولیتر نوترینت براث، و برای شمارش باکتری های تجزیه کننده رقت های 10^{-2} -10^{-4} تهیه و در میکروپلیت های حاوی ۱۸۰۰ میکرولیتر بوشنل هاس براث دارای نیم درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در شرایط کاملا استریل ریخته شد. هر رقت دارای ۳ تکرار بود و MPN بصورت ۳ تایی انجام شد. سپس میکرو پلیت ها جهت شمارش هتروتروف ها به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ °C و میکرو پلیت ها جهت شمارش تجزیه کننده ها به مدت ۴ روز در دمای ۳۰ °C گرماگذاری شدند. پس از انکوباسیون، ایجاد کدورت در مقایسه با شاهد به عنوان شاخص مثبت آزمایش MPN به حساب آمد و با استفاده از نرم افزار *MPN calculator version 23* تعداد باکتری ها در هر گرم خاک محاسبه گردید (۱۰ و ۱۱).

د) جداسازی و غربالگری باکتری های تجزیه کننده نفت خام: به منظور جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت، ۱۰ گرم از نمونه های خاک و ۱۰ میلی لیتر از پساب به ۱۰۰ میلی لیتر محیط بوشنل هاس براث حاوی نیم درصد نفت خام در فلاسک های ارلن مایر در شرایط کاملا استریل اضافه شد. سپس در شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰ °C به مدت ۱۰ روز قرار داده شدند. پس از ۱۰ روز با توجه به غلظت های خاک در نمونه های مختلف به میزان ۵ و ۱۰ میلی لیتر از محیط به محیط بوشنل هاس براث تازه حاوی نیم درصد نفت خام منتقل گردید. از پاساژ پایانی (پاساژ سوم)، پس از رقت سازی های متوالی با توجه به غلظت نمونه ها، از رقت های 10^{-3} -10^{-6} میزان ۱۰۰ میکرولیتر به محیط نوترینت آگار(NA) تلقیح و به صورت کشت سفره ای پخش شد. پس از رشد در دمای ۳۰ °C پس از ۲۴ ساعت کلنی های متفاوتی از نظر مورفولوژی مشاهده شدند که هر کدام از این کلنی ها در پلیت های NA جدید خالص سازی و در دمای ۴ °C نگهداری شدند. ذخیره سازی باکتری ها نیز در گلیسرول با غلظت ۳ درصد در دمای ۲۰- °C برای توصیفات بعدی قرار گرفت (۱۲ و ۱۳). برای غربالگری باکتری های تجزیه کننده بدست آمده از روش های سنجش فعالیت امولسیون کنندگی (E_{24}) و آزمون گسترش قطره نفت بر اساس پروتکل‌های شرح داده شده قبلی انجام شد.

ه) شناسایی بیوشیمیایی باکتری ها: برای شناسایی بیوشیمیایی باکتری های تجزیه کننده نفت خام جدا شده از منابع یاد شده، آزمون های اولیه بیوشیمیایی رنگ‌آمیزی گرم، شکل کلنی، شکل میکروسکوپی، اکسیداسیون/ فرمانتاسیون (O/F)، تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، حرکت، تولید سولفید هیدروژن، اندول (SIM) و سیمون سیترات آگار استفاده گردید (۱۴).

و) شناسایی مولکولی: برای شناسایی مولکولی تکثیر قسمتی از ژن 16S rRNA توسط پرایمرهای Forward Primer: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ و Reverse Primer:

5′-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3′ انجام شد. برنامه PCR برای تکثیر ژن در شرایط دمایی: واسرشت سازی ۹٤ °C به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها ۵۵ °C به مدت یک دقیقه و گسترش ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ انجام شد. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس باند ۱٤۰۰ bp از ژل آگاروز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاژ (K0513) استخراج و به منظور تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست شد و همولوژی آن‌ها بررسی گردید . قرابت بالاتر از ۹۸ درصد به عنوان جنس و گونه باکتری مجهول در نظر گرفته شد (۱۵).

ز) سنجش میزان حذف نفت: ابتدا یک کشت ۲٤ ساعته از باکتری در محیط NB در لوله های ۱۰ میلی لیتری تهیه شد. در مرحله بعد وزن ارلن های خشک اندازه گیری و ۱۰۰ میلی لیتر محیط بوشنل هاس براث تهیه و در شرایط استریل سوسپانسیون باکتری به ارلن های حاوی محیط BHB اضافه شد. در مرحله بعد به هر ارلن نیم درصد نفت خام اضافه و در ارلن ها با استفاده از فویل آلومینیومی و پنبه استریل بسته شد و در دستگاه شیکر انکوباتور با دور ۱٦۰ rpm و دمای ۳۰ °C در شرایط استریل به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. پس از ۱۵ روز، جذب کمی و کیفی نمونه ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس ۵۰ میلی لیتر محلول دی کلرومتان (DCM: Dichloromethane) به ارلن های حاوی محیط کشت و نفت اضافه شد و با یکدیگر مخلوط شدند. سپس محتویات ارلن به درون قیف جدا کننده منتقل و به آرامی هم زده شدند تا فاز آبی (بالا) و آلی (پایین) به خوبی از یکدیگر جدا شوند. سپس فاز آلی (DCM و نفت) به درون ارلن هایی که وزن خشک شان از قبل اندازه گیری شده بود، ریخته شد. پس از آن ۱ میلی لیتر از محلول با ۲ میلی لیتر DCM مخلوط و کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج ٤۲۰ نانومتر تعیین گردید (روش اسپکتروفتومتری). سپس فاز آلی در معرض هوا قرار گرفت تا دی کلرومتان آن تبخیر شود. نفت مصرف شده با کم کردن هیدروکربن های باقی مانده از وزن اصلی هیدروکربن های نفتی به عنوان شاهد محاسبه شد و از فرمول زیر به منظور محاسبه درصد حذف نفت خام (نفت باقی مانده) استفاده شد (۱٦).

۱۰۰× میزان جذب شاهد/میزان جذب نمونه میزان جذب شاهد = درصد حذف نفت خام

ح) بهینه سازی تجزیه نفت خام توسط باکتری های برتر تجزیه کننده: اثرات غلظت، زمان، مواد مغذی (منبع نیتروژن و کربن) و کشت مخلوط بر روی تجزیه نفت خام توسط سویه‌های برتر مورد بررسی قرار گرفت. در مورد اثر غلظت از غلظت‌های ۱/۵، ۳، ٤/۵ و ٦ درصد نفت خام استفاده شد. برای بررسی اثر مواد مغذی توسط باکتری ها ۱ گرم پپتون (منبع نیتروژن)، ۱ گرم گلوکز (منبع کربن) و ۱ گرم پپتون + ۱ گرم گلوکز (منبع نیتروژن و کربن) به ارلن ها اضافه و کشت تازه باکتری به ارلن ها اضافه شد. برای بررسی اثر کشت مخلوط کشت تازه باکتری های مختلف همراه هم به ارلن های حاوی محیط کشت اضافه شدند. برای بررسی اثر زمان باکتری ها بدون اضافه کردن مواد مغذی به ارلن های حاوی محیط کشت اضافه شدند. در مرحله آخر نیم درصد نفت خام فیلتر شده به ارلن ها اضافه و درب ارلن ها با درپوش استریل بسته شد. سپس ارلن ها در انکوباتور شیکر دار با دور ۱٦۰ rpm و دمای ۳۰ °C قرار گرفتند. پس از گذشت ۳۰ روز نتایج اثر زمان و پس از گذشت زمان ۱۵ روز سایر شرایط موثر بر رشد کمی (OD_{600}) و کیفی باکتری ها و میزان حذف نفت خام توسط آن ها (OD_{420}) مورد بررسی قرار گرفت. میزان حذف نفت خام با روش اسپکتروفتومتری و گراویمتری مشخص گردید (۱۷).

نتایج

الف) شمارش باکتری های هتروتروف و تجزیه کننده: نتایج حاصل از شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌های نفت خام با دو روش رقت تدریجی و شمارش حداکثر احتمالی در مناطق مختلف نمونه برداری در جدول (۲) نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین باکتری هتروتروف

به ترتیب مربوط به نمونه لجن نفتی پتروشیمی (DS) و خاک کارخانه روغن نرگس (PC) می‌باشند و بیشترین و کمترین تراکم باکتری‌های تجزیه کننده نیز مربوط به همین دو نمونه بود. در روش شمارش حداکثر احتمالی ایجاد کدورت در رقت های تهیه شده به عنوان شاخص مثبت MPN در نظر گرفته شد. تطابق بین دو روش شمارش از نظر نمونه هایی که واجد بالاترین و پایین ترین کمیت از تجزیه کننده و هترو تروف ها بودند دیده شد.

ب) غربالگری باکتری‌ها تجزیه کننده نفت خام: ۲۰ سویه باکتری تجزیه کننده نفت خام از نمونه های آلوده به نفت جداسازی شد. این سویه‌ها بر اساس رشد در محیط حاوی نفت خام به عنوان تنها منبع کربن، حذف کیفی نفت، فعالیت امولسیونه کنندگی (E_{24}) و گسترش نفت مورد غربالگری قرار گرفتند. نتایج حاصله از غربالگری در جدول (۳) آمده است. با توجه به نتایج حاصله ۷ سویه که در همه شاخص‌ها دارای ارزش بالاتری بودند برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. بیشترین میزان فعالیت امولسیون کنندگی اختصاصی و غیر اختصاصی به ترتیب مربوط به سویه های

جدول ۲: شمارش تعداد کل هتروتروف ها و تجزیه کننده ها.

نمونه	تعداد کل هتروتروف ها بر حسب cfu/g	تعداد کل تجزیه کننده ها بر حسب cfu/g	تعداد کل هتروتروف ها MPN cell/g	تعداد کل تجزیه کننده ها MPN cell/g
SN	۱/۳۵×۱۰^{۷}	۱/۷۹×۱۰^{۵}	۱/۵×۱۰^{۷}	۱/۵×۱۰^{۶}
AS	۳/٤٥×۱۰^{۷}	۱/۰۹×۱۰^{۵}	۱/۱×۱۰^{۷}	٤/۳×۱۰^{٤}
DS	۳/٦۷×۱۰^{۸}	٦/٦٥×۱۰^{٤}	۱/۱×۱۰^{۷}	۱/۱×۱۰^{۸}
PE	۲/٥٥×۱۰^{۷}	۳/٥٥×۱۰^{۳}	۰/۳×۱۰^{۵}	۱/۱×۱۰^{۸}
PC	۲/۱×۱۰^{۳}	۱/۳×۱۰^{۳}	۱/۱×۱۰^{٦}	۰/۲۳×۱۰^{۱}

جدول ۳: رشد، فعالیت امولسیون کنندگی (E_{24}) و آزمون گسترش نفت.

نام سویه	نوع امولسیون *	رشد به صورت کیفی *	OD-600	(E24٪) اختصاصی	(E24٪) غیر اختصاصی	oil-spreading (mm)
SN1	لخته ای	+++ برتر	۰/٥۷	–	–	۱۰
SN2	امولسیون کامل	+++ برتر	۰/۹۳	۹	–	۱۲
SN3	لخته ای	+++	۰/۸۰	۷	–	–
AS1	پراکنده	+++	۱/٥٤	–	٤	۱۷
AS2	–	++	۰/۳۹	–	–	–
AS3	گلوله ای	+++ برتر	۱/۲٥	–	۷	۱۱
AS4	–	++	۰/۲۷	–	–	۷
DS1	کامل	+++	۰/٥۰	۲۲	۱۲	–
DS2	پراکنده	+++ برتر	۱/۱٦	–	–	–
DS3	لخته ای	+++	۰/٤۸	–	–	۱۷
DS4	–	+++ برتر	۰/٦٤	۱۸	۲۳	۱۰
DS5	–	–	۰/۹۰	–	–	–
PE1	پراکنده	++	۰/٥٤	–	–	–
PE2	–	–	۰/۳۷	–	–	–
PE3	کامل	+++ برتر	۰/۷۱	۱٦	–	۲۳
PE4	کامل ذره ای	++++ برتر	۱/۰٦	۱۰	–	۱۲
PC1	–	+++	۱/۲۱	–	–	–
PC2	–	–	۰/۰۳	–	–	–
PC3	گلوله ای	+++ برتر	۰/۸۰	–	۱۰	۱۰
PC4	کامل	+++ برتر	۱/۱۹	–	–	۱۰

*: توضیحات: در رشد کیفی : نماد– به معنای عدم رشد، + به معنای رشد کم و +++ به معنای رشد زیاد در بقیه آزمون ها: نماد– به معنای منفی بودند.

**: نوع امولسیون: براساس شکل امولسیون، کامل به صورت توده ای یک جا جمع شده و ناقص به صورت پراکنده پخش شده است.

DS_1 و DS_4 و گسترش قطره مربوط به سویه PE_3 بود.

ج) شناسایی بیوشیمیایی: پس از غربالگری اولیه، تست های بیوشیمیایی جهت شناسایی سویه های برتر انجام شد. این نتایج نشان می دهد که سویه ها در برخی صفات بیوشیمیایی با یکدیگر تفاوت دارند و برخی با یکدیگر مشابه هستند.

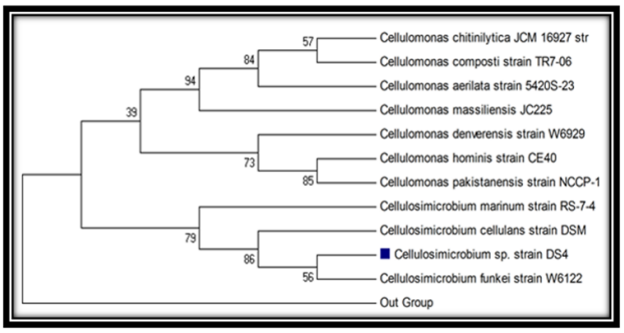
د) میزان رشد و حذف نفت خام توسط سویه های برتر: میزان رشد سویه‌های برتر با خواندن جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. در جدول ٤ میزان رشد به صورت کمی و کیفی و درصد حذف نفت خام با هر دو روش توسط هر سویه آمده است. نتایج حاصله از این جدول نشان داد نمونه DS_4 فوق برتر و بدون مشاهده هیچ گونه نفت در سطح ارلن و دارای بیشترین درصد تجزیه در OD_{420} با ٦٢ درصد داشته است و به عنوان برتر تجزیه کننده شناخته شده و به منظور تعیین توالی انتخاب شدند.

ه) شناسایی مولکولی سویه‌های برتر تجزیه کننده نفت خام: سویه DS_4 که بعنوان بهترین سویه تجزیه کننده نفت خام در آزمایشات قبلی شناخته شده بود با تکثیر ژن 16S rRNA مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. این سویه واجد باند ۱٤۰۰ جفت بازی بودند. نتایج حاصله از تعیین توالی نشان داد که سویه DS_4 بالاترین همسانی آن پس از بلاست کردن با جنس و گونه *سلولومیکروبیوم سلولانس* (*Cellulosimicrobium cellulans*) تطابق دارد. شماره دست یابی توالی این سویه در پایگاه EMBL، LK391635 می باشد. درخت فیلوژنی این سویه در شکل (۱) نشان داده شده است.

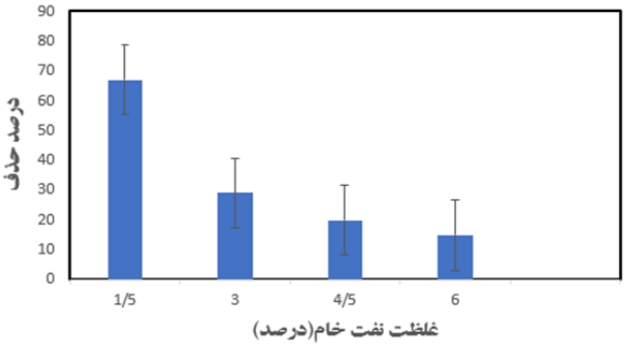
و) بهینه سازی تجزیه نفت خام توسط باکتری های برتر تجزیه کننده: اثر چهار غلظت نفت بر روی تجزیه نفت خام به وسیله سویه برتر DS_4 بررسی شد (شکل ۲). همان طور که در این شکل مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نفت خام از ۱/۵ درصد به ٦/۵ درصد تجزیه به طور محسوسی کاهش نشان داد. سویه DS_4 در همه غلظت‌ها توانایی تجزیه داشت. اما بهترین غلظت تجزیه کنندگی ۱/۵ درصد نفت بود. نتایج حاصله از سایر عوامل مورد بررسی در شکل ۳ و ٤ آمده است. نتایج نشان داد که تقریبا تمامی سویه ها رشد قابل توجهی را

جدول ٤: میزان رشد و درصد حذف نفت خام توسط سویه های برتر پس از ۱۵ روز.

نام نمونه	OD600	کیفی	درصد تجزیه نفت با روش اسپک	درصد تجزیه با روش گراویمتری
SN2	۰/۵۳	++، گلوله‌های نفتی ریز زیاد	۳۵	۲۵
AS3	۲/۱۱	+++، امولسیون نیمه کامل	٥٦	٥۳
DS2	۰/۹۱	+++، امولسیون کامل	٦۰	٥٦
DS4	۰/۹٤	+++، فاقد نفت، کدورت بالا	٦٢	٦۱
PE3	۰/٤٥	++، ایجاد گلوله‌های متوسط نفتی	۰	۱٤
PE4	۰/۷۱	++، ایجاد گلوله‌های متوسط نفتی	٥٢	٤۸
PC4	۰/۷٦	++، فاقد گلوله نفتی	۳٤	۲۲



شکل ۱: درخت فیلوژنی سویه برتر با استفاده از روش Neighbor-Joining و ضریب Boot Strap صد گروه خارجی *E. coli* PTCC1345 بود.



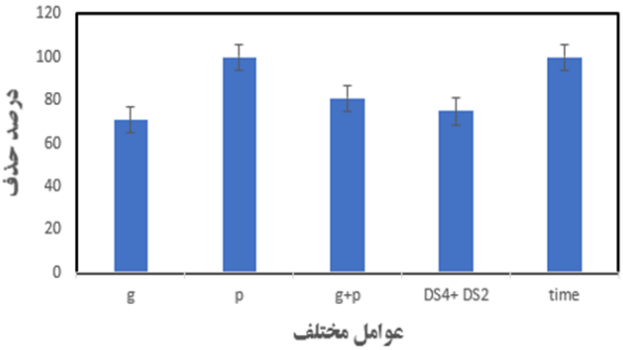
شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف نفت خام بر روی میزان تجزیه نفت خام در سویه DS_4.

در حضور منابع اضافی کربن از خود نشان دادند و رشد در حضور پپتون و گلوکز به خوبی صورت گرفته و تقریبا تجزیه بطور کامل انجام گرفته است. *سلولومیکروبیوم سلولانس* سویه DS_4 در تمامی شرایط نفت را به طور کامل تجزیه نمود. اثر

کشت مخلوط زمان تجزیه را از ۳۰ روز به ۳ روز کاهش داد که برتری کشت مخلوط دو سویه DS_4 و DS_2 را در تجزیه نـفـت خام نشان می دهد.

بحث

منظور از بیولوژیک‌سازی، استفاده از سیستم‌های بیولوژیکی برای از بین بردن یا کاهش غلظت مواد زائد خطرناک از فاضلاب‌های آلوده است. بسیاری از مقالات پتانسیل میکروارگانیسم‌ها را برای تجزیه نفت در آزمایشگاه‌ها و فاضلاب ثبت کرده‌اند. نفت خام مخلوط پیچیده اما زیست تخریب پذیر از هیدروکربن‌ها است و مشاهده شده که تخریب هیدروکربن می‌تواند در اکثر و یا بیشتر انواع محیط‌ها غنی شده صورت گیرد که به توسعه روش‌های تصفیه زیستی نفت کمک کرده است (۱۸). استفاده گسترده از فرآورده های نفتی منجر به آلودگی خاک و محیط آبزی می شود. این مساله نتیجه تهدیدی جدی از نظر سلامتی بر همه اشکال زندگی از جمله انسان به شمار می‌آید. اصلاح زیستی یک روش مقرون به صرفه و بی خطر از نظر زیست محیطی برای اصلاح فاضلاب آلوده نفتی در نظر گرفته شده است. بنابراین، جداسازی میکروارگانیسم های تجزیه کننده نفت و بهینه سازی شرایط برای فرآیند تجزیه از جنبه های مهم میکروبیولوژی می باشد (۱۹). در این تحقیق کمیت باکتری های تجزیه کننده نفت خام و هتروتروف در فاضلاب‌های صنعتی مختلف شیراز ارزیابی شد. نتایج حاصله نشان داد که باکتری های هتروتروف نسبت به تجزیه کننده کمیت بالاتری در همه خاک ها داشتند. این نتیجه را می توان به این صورت تفسیر کرد که باکتری‌های هتروتروف موجود در خاک از سایر منابع کربنی موجود در خاک استفاده می‌کنند، اما باکتری های تجزیه کننده تنها از نفت به عنوان تنها منبع کربن استفاده می‌کنند. از این رو کمیت هتروتروف‌ها بیشتر از تجزیه کننده‌ها خواهد شد. سایر محققین نیز نتیجه مشابهی از تعیین کمیت این دو گروه از باکتری ها در فاضلاب های صنعتی گزارش کرده اند. به عنوان نمونه، نتایج پژوهش اسیدافه (Esedafe) و همکاران (۲۰۱۵) با ارزیابی نمونه‌های خاک آلوده پالایشگاه واری (Warri) و نمونه پساب پالایشگاه پتروشیمی نشان داد که تعداد کل باکتری‌های هتروتروف نمونه خاک $۲/۷ \times ۱۰^{۶}$ CFU/ml، در نمونه آب $۳/۲ \times ۱۰^{۶}$ CFU/ml و شمار باکتری‌های تجزیه کننده در نمونه‌های خاک



شکل ۳: اثر برخی عوامل (منبع کربن، ازت، کشت مخلوط و زمان) بر روی میزان تجزیه نفت خام توسط سویه DS_4.

شکل ٤: ارزیابی تاثیر عوامل مختلف (منبع کربن، ازت، کشت مخلوط و زمان) بر روی تجزیه نفت خام.

$۲/۰ \times ۱۰^{۳}$ CFU/ml و در نمونه آب $۱/۰ \times ۱۰^{۳}$ CFU/ml است (۲۰). در این تحقیق از فاضلاب های صنعتی مورد بررسی ابتدا ۲۰ باکتری تجزیه کننده نفت خام جداسازی شد. پس از انجام آزمون های غربالگری تعداد ۷ باکتری که برتر از نظر تجزیه نفت خام انتخاب شدند. میزان رشد و حذف نفت خام توسط این هفت سویه برتر انجام شد و یک سویه بعنوان برترین سویه‌ها تجزیه کننده نفت خام مشخص شد. این سویه‌ها متعلق به جنس *سلولومیکروبیوم* بود. گزارش های زیادی در مورد جداسازی باکتری های تجزیه کننده از فاضلاب های صنعتی در ایران و سایر مناطق دنیا وجود دارد. به عنوان نمونه، چیکری (Chikere) و همکاران (۲۰۱٤) تعداد ٤۷ باکتری تجزیه کننده نفت خام از فاضلاب صنعتی در نیجریه جداسازی نمودند. باکتری های گزارش شده توسط آن‌ها اکثریت باکتری‌ها گرم منفی و در گروه *پروتئوباکتریا* و تعداد کمی گرم مثبت بودند. در کل ۳۰ سویه توانایی استفاده از نفت خام را داشتند و پس از شناسایی در جنس‌های *باسیلوس*، *پروتئوس*، *کلبسیلا*، *سودوموناس*، *میکروکوکوس*، *سراشیا*، *انتروباکتر*، *فلاوباکتریوم*، *کورینه باکتریوم* و *آزتوباکتر* قرار گرفتند. این مطالعات با نتایج بدست آمده در این تحقیق که اکثر باکتری‌های جداسازی شده گرم منفی بودند، هم خوانی دارد (۲۱). سویه DS_4 در این تحقیق به عنوان *سلولومیکروبیوم سلولانس* به صورت مولکولی شناسایی گردید. محققین مختلفی نیز موفق به جداسازی آن از سایر محیط‌های آلوده به نفت و کاربرد آن در تجزیه زیستی نفت خام شده‌اند. آزمون های تجزیه زیستی توسط شیب (Shaieb) و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که *سلولوموناس سلولانس* پس از ۱۵ روز در کشت بسته، موجب تجزیه هیدروکربن‌ها با کاهش غلظت کل هیدروکربن نفت خام به میزان ۱۸/۸٦درصد می‌شود (۲۲). نکیم (Nkem) و همکاران (۲۰۱٦) موفق به جداسازی دو باکتری بومی تجزیه کننده هیدروکربن از توده‌های نفتی نمونه در ساحل Terengguan، شبه جزیره مالزی شدند. این سویه ها پس از شناسایی در جنس‌های *سلولومیکروبیوم سلولانس* و *آسینتوباکتر بامانی* (*Acinetobacter baumannii*) قرار گرفتند. سویه *سلولوموناس سلولانس* در محیط ۲ درصد دیزل قادر به تجزیه ٦٤/٤ درصد و *آسینتوباکتر بامانی*، ۱/۵۸ درصد بود (۲۳). سالیوا (Sevilla) و همکاران (۲۰۱۸) خاک‌های جنگلی استوایی در کارائیب کلمبیا را مورد تحقیق قرار دادند. با توجه به توالی نوکلئوتید ژن کدگذاری شده برای 16S rRNA، سویه‌ها متعلق به اعضای جنس *سلولومیکروبیوم* گزارش نمودند. آلکان‌ها توسط هر کدام از سویه‌ها بین ٦٤/۹ تا ۱۰۰ درصد تجزیه شدند (٢٤). از میان عوامل مورد بررسی در افزایش تجزیه پذیری نفت خام بهترین عامل استفاده از کشت مخلوط بود. دلیل این مساله، افزایش کارایی و بهبود تجزیه در شرایط مخلوط باکتری ها است. در این شرایط مخلوط باکتریایی با ترکیب شناخته شده که هیدروکربن‌های آروماتیک در نفت را کاهش دهد، بیشتر مورد نظر است. در واقع، از آنجا که یک گونه تنها می‌تواند طیف محدودی از اجزای هیدروکربنی را متابولیزه کند، اما مخلوط گونه‌های باکتریایی مختلف با ظرفیت‌های آنزیمی وسیع، معمولا در تجزیه نفت نقش بیشتری خواهند داشت. این مساله در پژوهش حاضر نیز تایید گردید. با توجه به اینکه ایران یک کشور نفت خیز و دارای پالایشگاه‌های در حال توسعه است و فاضلاب‌های صنعتی زیادی تولید می‌شود. از این رو با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات تجربی می توان نتیجه‌گیری کردکه فناوری تصفیه زیستی به دلیل سادگی و عدم نیاز به سرمایه‌گذاری بالا یکی از بهترین و کم هزینه‌ترین روش‌های تجزیه آلاینده‌های محیطی در فاضلاب‌های صنعتی می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باکتریهای تجزیه کننده نفت خام دارای تنوع مناسبی در فاضلاب های صنعتی شیراز هستند و همچنین از کمیت مناسبی برخوردار می باشند. با بکارگیری این باکتریها در مقیاس صنعتی می توان هیدروکربن های نفتی را در فاضلاب های صنعتی بطور قابل توجهی کاهش داد. هر چند این امر نیازمند تحقیقات بیشتر در این زمینه و در سطح میدانی است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است که بدین وسیله از معاونت پژوهشی تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Xia M, Fu D, Chakraborty R, Singh RP, Terry N. Enhanced crude oil depletion by constructed bacterial consortium comprising bioemulsifier producer and petroleum hydrocarbon degraders. Bioresour Technol Rep. 2019; 282: 456-463.
2. Cameotra SS, Singh P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. Int Biodeterior Biodegradation. 2008; 62(3): 274-280.
3. Hassanshahian M, Tebyanian H, Cappello S. Isolation and characterization of two crude-oil degrading yeast strains, Yarrowia lipolytica PG-20 and PG-32 from Persian Gulf. Mar Pollut Bull.2012; 64: 1386–1391.
4. Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Mar Pollut Bull. 2012; 64: 7–12.
5. Hassanshahian M, Ahmadinejad M, Tebyanian H, Kariminik A. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). Mar Pollut Bull. 2013; 73: 300–305.
6. Shen T, Pi Y, Bao M, Xu N, Li Y, Lu J. Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. Environ Sci Process Impacts. 2015; 17(12): 2022-2033.
7. Sheari Moghadam. A. The History of petrochemical plants in Iran. Hirman Publicatio. 2013; 4: 245pp.
8. Hesham AE, Alrumman SA, Al-Amari JA. 16S rDNA Phylogenetic and RAPD–PCR Analyses of Petroleum Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Degrading Bacteria Enriched from Oil-Polluted Soils. Arab J Sci Eng. 2016; 41(6): 2095-2106.
9. Balba MT, Al-Awadhi N, Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. J Microbiol Methods. 1998; 32(2): 155-164.
10. Hassanshahian M, Emtiazi G, Kermanshahi RK, Cappello S. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. Soil Sediment Contam. 2010; 19(3): 277-291.
11. Wrenn BA, Venosa AD. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon

degrading bacteria by a most-probable-number procedure. Can J Microbiol 1996 Mar 1; 42(3): 252-258.

12. Russel M, Li X, Qu M, Wu M, Liu L, Alam MM. Exploring the novel indigenous strains for degrading the crude oil contaminants in soil sample. Int J Environ Sci Technol. 2018: 1-12.

13. Sun W, Dong Y, Gao P, Fu M, Ta K, Li J. Microbial communities inhabiting oil-contaminated soils from two major oilfields in Northern China: Implications for active petroleum-degrading capacity. J Microbio. 2015 Jun 1; 53(6): 371-378.

14. Hassanshahian M, Zeynalipour M, Hosseinzadeh Musa F .Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). Mar Pollut Bull. 2014; 82: 39–44.

15. Hassanshahian M, Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, Cappello S. Using Real-Time PCR to assess changes in the crude oil degrading microbial community in contaminated seawater mesocosms. Int Biodeterior Biodegradation. 2014; 93: 241–248.

16. Latha R, Kalaivani R. Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. Eur J Exp Biol. 2012; 3(5): 2789-2795.

17. Hassanshahian M. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). Mar Pollut Bull. 2014; 86: 361–366.

18. Dadrasnia A, Usman MM, Wei KS, Velappan RD, Jamali H, Mohebali N, Ismail S. Native soil bacterial isolate in Malaysia exhibit promising supplements on degrading organic pollutants. Process Saf Environ Prot. 2016 Mar 1; 100: 264-271.

19. Bell KS, Philp JC, Aw DW, Christofi N. The genus *Rhodococcus*. J Appl Microbiol. 1998; 85 (2): 195-210.

20. Esedafe W, Fagade O, Umaru F, Akinwotu O. Bacterial Degradation of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) -Fraction of Refinery Effluent. Int J Environ Bioremediat Biodegrad. 2015; 3, 1: 23-27.

21. Chikere C, Ekwuabu C. Culture-dependent characterization of hydrocarbon utilizing bacteria in selected crude oil-impacted sites in Bodo, Ogoniland, Nigeria. Afr J Environ Sci Tech. 2014 ; 8(6): 401-406.

22. Shaieb F, Elghazawani A, Issa A. Studies on crude oil degrading Bacteria isolated from Libyan desert. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2015; 4(2): 920-927.

23. Nkem B, Halimoon N, Yusof F, Johari W, Zakaria M, Reddy S. Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach, Malaysia. Mar Pollut Bull . 2016 ; 107(1): 261-268.

24. Sevilla A, Ceballos L, Ballestas I, Rojas W, Restrepo J, Verbel J. Biodegradation of biodiesel-oil by *Cellulosimicrobium* sp. Isolated from Colombian Caribbean soils. Environ Technol. 2018: 1-23.