Journal of Health in the Field, Vol.9, No.2, Summer 2021 Research Article

Removal of petroleum hydrocarbon from water by using isolated bacteria from diesel contaminated soils

Ramazan Ali Dianati Tilaki[1], Kobra Zabihzadeh[2*], Masoumeh Eslamifar[3]

1- Associate professor, department of environmental health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari-Iran
2- Msc. Student of environmental health engineering, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari-Iran
3- PhD. Candidate in Microbiology, Faculty of health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari-Iran

Abstract

Background and Aims: Removal of low concentrations of petroleum hydrocarbons from water by physico-chemical methods encounters many limitations. The aim of this study was thus isolation and identification of bacteria from soils contaminated with total petroleum hydrocarbons (TPH). Removal efficiency of low concentrations of hydrocarbons from water using isolated bacteria was also determined.
Materials and Methods: TPH concentrations of 100, 500 and 1000 ppm in water were examined. Bacteria were identified and isolated from diesel-contaminated soil. Isolated bacteria were cultured separately in medium containing water with certain concentrations of TPH. At predetermined contact times (2, 5, 7 and 14 days), the total amount of TPH remained in the water was measured using standard methods.
Results: At 100 ppm TPH in water and within 48 hours, the highest removal efficiency of TPH about 65% was obtained by *Alkaligenes faecalis*. Likewise, the lowest removal performance of TPH, approximately 20%, was obtained by *Pseudomonas aeruginosa* at this concentration. The highest and lowest removal efficiency of TPH from water at 500 ppm by was achieved by *Enterobacter* (40%) and *Alkaligenes* (20%) following 48 h, respectively. At the highest concentration of TPH in water (1000 ppm) and after 48 h, the highest removal rate about 30% was obtained by *Enterobacter*. for the removal efficiency appeared to increase with the increase of contact time, in which the maximum removal efficiency was about 90% (at 100 and 500 ppm concentrations) and about 50% (at 1000 ppm concentrations) after 14 days.
Conclusion: Bacteria isolated from contaminated soil can be used to remove low concentrations of petroleum compounds from water.

Keywords: Petroleum compounds, Water, Bacteria, Removal

Please Cite this article as: Dianati Tilaki RA, Zabihzadeh K, Eslamifar M. Removal of petroleum hydrocarbon from water by using isolated bacteria from diesel contaminated soils. Journal of Health in the Field. 2021; 9(2):1-11.

Corresponding Author: Msc. student of environmental health engineering, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari-Iran.

Email: kobrazabihzadeh@yahoo.com

DOI: https://doi.org/10.22037/jhf.v9i2.32788

Received: 23 December 2020

Accepted: 12 January

مقاله پژوهشی

فصلنامه بهداشت در عرصه
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- دانشکده بهداشت و ایمنی
دوره ۹ شماره۲، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۱ تا ۱۱

حذف ترکیبات نفتی از آب با استفاده از باکتری‌های جداسازی شده از خاک آلوده به سوخت دیزل

رمضانعلی دیانتی تیلکی [۱]، کبری ذبیح زاده*[۲]، معصومه اسلامی فر[۳]

۱- دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت،دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲- دانشجوی کارشناسی مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳- کارشناس میکروبیولوژی،گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

چکیده

زمینه و اهداف: حذف غلظت‌های کم هیدروکربن های نفتی از آب به روش های فیزیکی- شیمیائی با محدودیت های زیادی روبرو می باشد. لذا هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسائی باکتری‌ها از خاک آلوده به ترکیبات نفتی (TPH) و تعیین میزان حذف ترکیبات نفتی از آب با استفاده از باکتریهای جداسازی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها :غلظت‌های ۱۰۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰پی پی ام TPH در آب مورد آزمایش قرار گرفت. باکتری‌ها از خاک آلوده به گازوئیل شناسائی و جداسازی شدند و به صورت جداگانه در محیط کشت حاوی آب دارای غلظت‌های معین TPH قرار گرفتند. در زمان‌تماس های ۲، ۵، ۷ و ۱۴ روز مقدار کل ترکیبات نفتی باقیمانده در آب به روش استاندارد اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: برای غلظت ۱۰۰ پی پی ام TPH در آب ، طی ۴۸ ساعت زمان تماس، بیشترین حذف TPH بوسیله آلکالیژنز فکالیس به میزان ۶۵ درصد و کمترین حذف مربوط به سودوموناس آئروژینوزا به میزان حدود ۲۰درصد بود. میزان حذف TPH توسط انتروباکتر و آلکالیژنز در غلظت ppm ۵۰۰ و زمان تماس مشابه، به ترتیب حدود ۴۰ و ۲۰ درصد و برای غلظتppm ۱۰۰۰ در زمان تماس ۴۸ ساعت بیشترین حذف به میزان حدود ۳۰ درصد مربوط به باکتری انتروباکتر بود. در زمان تماس ۱۴روز حداکثر میزان حذف حدود ۹۰ درصد (برای غلظت‌های ppm ۱۰۰ و ۵۰۰) وحدود ۵۰ درصد (برای غلظت ppm ۱۰۰۰) بود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از باکتریهای جداسازی شده از خاک آلوده می توان غلظت‌های کم ترکیبات نفتی را از آب حذف نمود.

کلیدواژه‌ها: ترکیبات نفتی، آب ، باکتری، حذف

* **نویسنده مسئول:** دانشجوی کارشناسی مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران.
Email: kobrazabihzadeh@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲

مقدمه

آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی به هیدروکربن‌های نفتی از طریق نشت از مخازن ذخیره، ایستگاه‌های بهره‌برداری و بارگیری، حمل و نقل مواد نفتی، لوله‌های انتقال، جایگاه‌های عرضه سوخت، پساب پالایشگاه های نفت می‌باشند [۱]. به دلیل مخاطرات ترکیبات نفتی، حد مجاز آن در آب‌های زیرزمینی برای گازوئیل و بنزین به ترتیب ۱۰۰ و ۲۲۰ میکروگرم بر لیتر می‌باشد [۲]. همچنین حداکثر غلظت مجاز کل ترکیبات نفتی (TPH) در پساب تخلیه شونده به محیط (شامل محیط‌های آبی مانند دریا) در کشورمان بر اساس کنوانسیون کویت ۱۵ میلی گرم بر لیتر می‌باشد [۳]. در یک تحقیق غلظت TPH در نمونه‌های رسوب اخذ شده در سواحل بندرانزلی در محدوده ۷/٦ تا ۲۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد [٤]. در مطالعه دیگری، آلاینده‌های نفتی در آب زیرزمینی اطراف پالایشگاه اراک اندازه‌گیری شد و میانگین غلظت ترکیبات نفتی در مکان مورد مطالعه ۷٦ میکروگرم بر لیتر به‌دست آمد [٥]. همچنین در مطالعه دیگری میانگین غلظت هیدروکربن‌های نفتی در نمونه‌های رسوب اخذ شده در منطقه خور موسی ماهشهر به میزان ٤۲ میلی گرم بر کیلوگرم به دست آمد [٦].

روش‌های جمع‌آوری، حذف و پاکسازی آلودگی‌های نفتی از آب شامل جمع‌آوری از سطح آب به وسیله پمپ مکش، جذب فیزیکی به وسیله مواد جاذب، استفاده از عوامل بیولوژیکی و میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، تبخیر ترکیبات نفتی، تبدیل آلودگی‌های نفتی به ترکیبات دیگر با روش‌هایی مانند فتواکسیداسیون و استفاده از تکنولوژی لیزر می‌باشد. در روش تجزیه زیستی از میکروارگانیسم‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، گیاهان سبز و آنزیم‌ها برای حذف آلودگی نفتی استفاده می‌شود [۷]. فرآیندهای زیستی شامل پالایش زیستی (Bioremediation) به معنی تجزیه، تخریب و یا کاهش سمیت آلاینده‌ها با استفاده از میکروارگانیسم‌ها و گیاه‌پالایی (Phytoremediation) به معنی استفاده از گیاهان در جذب، کاهش غلظت و یا تصفیه آلاینده‌ها می باشد. تحقیقات مختلفی در باره روش گیاه پالائی در حذف ترکیبات نفتی صورت گرفته است [۸]. همچنین مطالعات متعددی در زمینه حذف بیولوژیکی ترکیبات شیمیائی نظیر فتالات ها [۹]، تصفیه زیستی فلزات سنگین [۱۰]، و استفاده از باکتری‌ها در حذف فلزات سنگین سمی مانند کادمیوم [۱] . میکروارگانیسم‌های زیادی در تجزیه ترکیبات نفتی می‌توانند فعالیت نمایند که از بین آن‌ها سودوموناس‌ها، آرتروباکترها وآکروموباکترها، آئروموناس، موراکسلا، بیژرینکیا، فلاووباکتر، کوروباکتریا، نوکاردیا، کورینه باکتریا، اسینتوباکتر، باسیلوس‌ها، سیانوباکترها و قارچ‌هایی مانند آسپرژیلوس آکراسئوس، میسلیوم، پنی سیلیوم و پسیلومایسس در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی نقش اساسی دارند [۱۲،۱۳]. هیچکدام از روش‌های فیزیکی و شیمیائی موجود و مورد استفاده قادر به حذف کامل و صد در صد ترکیبات نفتی از آب نمی‌باشند [۱٤]، لذا در آلودگی‌های نفتی منابع آب، پس از کاربرد روش‌های مرسوم جمع‌آوری و حذف ترکیبات نفتی، همواره مقادیر کمی نفت بصورت امولسیون شده در آب باقی می‌ماند که موثرترین روش حذف ترکیبات نفتی باقیمانده کاربرد روش‌های بیولوژیکی در حذف کامل ترکیبات نفتی می‌باشد[۱٥].

در یک مطالعه از خاک‌های آلوده به نفت سفید و روغن موتور، سودوموناس آلکالی‌ژنز، باسیلوس سرئوس و باسیلوس کوآگولانس و از خاک‌های آلوده به روغن موتور و گازوئیل، سودوموناس آلکالی‌ژنز و از خاک‌های آلوده به نفت سفید و گازوئیل آلکالی‌ژنز یوتروفا، سودوموناس آلکالی‌ژنز و سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شدند که همگی توانستند ترکیبات نفتی را به خوبی حذف نمایند [۱٦]. در مطالعه دیگری یک سویه باکتریایی گرم مثبت هالوتولرانت از جنس استرپتومایسس از مخازن نفتی آسماری اهواز جداسازی شد که قادر به تجزیه نفت بود. این باکتری توانست هیدروکربن‌های موجود در محیط پایه نمکی را در مدت ۱۰ روز حذف نماید [۱۷].

براساس تحقیقات صورت گرفته، روش تلقیح باکتری‌های بومی جداسازی شده از محیط‌های آلوده و کاربرد آن در زیست پالایی هیدروکربن‌های نفتی در خاک به عنوان یک روش کارآمد اثبات شده است [۱۸]. شرایط آب و هوایی و زیستی مختلف بر روی فلور میکروبی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی تاثیر بسزایی دارد. میکروارگانیسم‌های زیادی در تجزیه ترکیبات نفتی می‌توانند

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

فعالیت نمایند لذا تحقیقات در جهت دست‌یابی به سویه‌های جدید باکتریایی با قابلیت تجزیه ترکیبات نفتی می‌تواند نقش موثری در ارتقا روش‌های زیست پالایی داشته باشد. همچنین فاکتورهای مختلفی مانند غلظت آلاینده و دمای رشد می‌تواند عملکرد تجزیه میکروبی آلاینده را متفاوت سازد. هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری‌های بومی موجود در خاک آلوده به گازوئیل، شناسایی باکتری‌های دارای توان تجزیه بیولوژیکی نفت و همچنین مشخص نمودن قابلیت این باکتری‌ها در حذف ترکیبات نفتی با غلظت پائین از آب بوده است.

مواد و روش‌ها

به منظور تامین باکتری‌های خو یافته به ترکیبات نفتی، خاک آلوده به ترکیبات نفتی از عمق ۳۰-۱۰ سانتی‌متری اطراف محل قرارگیری پمپ آب دیزلی گه سالیان متمادی به دلیل ریزش گازوئیل در معرض آلودگی نفتی بوده گردآوری شد. نمونه خاک در ظرف استریل روی یخ نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شد.

فرایند کشت میکروارگانیسم‌ها در دو مرحله شامل کشت در محیط مایع و کشت در محیط جامد صورت گرفت. برای ساخت سوسپانسیون میکروبی و غنی سازی باکتری‌ها، از محیط حداقل استفاده شد. یک گرم از خاک آلوده درون ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه (شامل ۱ گرم KH_2PO_4، ۱ گرم K_2HPO_4 ، ۱ گرم NH_4NO_3، ۰/۲گرم $MgSO_4,7H_2O$ ، ۵ میلی‌گرم $FeCl_3$، ۲۰ میلی‌گرم $CaCl_2$ در حجم کل یک لیتر) در شرایط سترون درون ارلن مایر اضافه شد و در دمای ۰/۵±۳۵ درجه سانتیگراد و تکان دادن با دور ۱۶۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت [۱۹]. بعد از ساخت سوسپانسیون میکروبی اولیه برای غنی‌سازی کشت میکروبی و جداسازی باکتری‌ها، ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به ۴۵ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه با ۲ درصد از گازوئیل انتقال داده شد. شرایط تکان دادن و دمای انکوباسیون مانند فوق بود و به مدت یک هفته انکوباسیون انجام گرفت.

با دیدن تیرگی و رشد باکتری‌ها، برای جداسازی و خالص‌سازی آن‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) پخش شد و پس از رشد در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، هر کلنی به صورت مجزا کشت و خالص سازی گردید.

باکتری‌های کشت داده شده قادرند از نفت به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند. همچنین چون این باکتری‌ها از خاک آلوده به مواد نفتی جداسازی شده‌اند؛ لذا می‌توان انتظار داشت که آن‌ها با شرایط آلوده خو یافته و روی محیط انتخابی رشد نمایند که این امر از مزایای این روش می‌باشد [۲۰].

شناسایی اولیه باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از محیط‌های کشت افتراقی و اختصاصی باکتری‌ها، رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی اختصاصی صورت گرفت. محیط‌های کشت مورد استفاده شامل تریپتون سوی براث، ائوزین متیلن بلو آگار، بلاد آگار، نوترینت آگار، مک کانگی آگار و استامید براث می‌باشد. بعد از انتقال نمونه‌ها، محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور نگهداری شدند و کلنی‌های حاصل مورد بررسی مورفولوژیکی مانند شکل، رنگ، اندازه و خشکی قرار گرفت. سپس رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی بر روی آن‌ها انجام شد. برای شناسایی گونه‌ها مطابق با متد میکروب‌شناسی برگی تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی مانند کاتالاز، احیای نیترات، بررسی حرکت، اکسیداز، تخمیر قندها، سیمون سیترات، اوره آز، MRVP، SIM، TSI، تولید اندول، هیدرولیز نشاسته و سایر تست‌های تشخیصی استاندارد استفاده شد.

روش کشت باکتریائی

ابتدا غلظت‌های مختلف گازوئیل شامل ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm در آب مقطر حاوی محیط کشت مینرال ایجاد شد. سپس درصد حذف گازوئیل به صورت کمی با مقایسه با نمونه شاهد محاسبه شد. محتویات ظرف شاهد مشابه ظروف نمونه بود به جز اینکه کشت میکروبی در آن انجام نشده بود و به این علت درنظر گرفته شد که مقداری از ترکیبات نفتی به دلیل فرار بودن از طریق تبخیر خارج می‌شوند[۲۱]. ظروف آزمایش حاوی ۱ لیتر آب مقطر، ۵۰ میلی لیتر محیط مینرال و ۰/۵گرم گلوکز بود که با اضافه نمودن مقادیر مناسب گازوئیل غلظت‌های مورد آزمایش ساخته شد [۲۲]. این ظروف قبل از اضافه نمودن گونه‌های باکتریایی در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۲ بار به مدت

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

۱۵ دقیقه استریل شدند تا محیط عاری از هرگونه میکروارگانیسمی شود. سپس به هر یک از ظروف به صورت جداگانه دو کلنی از باکتری‌های جداسازی و شناسایی شده اضافه شد. این عمل برای هر سه غلظت مورد نظر گازوئیل نیز تکرار شد. گازوئیل مورد استفاده نیز قبل از انجام آزمایش‌ها، جهت استریل‌سازی از فیلتر غشایی با منافذ ۰/٤٥ میکرون عبور داده شد تا باکتری‌های احتمالی موجود در آن حذف گردد [۲۳]. ظروف آزمایش در انکوباتور با دمای ۳۱ درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا باکتری‌ها بتوانند رشد کرده و گازوئیل را مورد تجزیه قرار دهند. در روزهای ۲، ۵، ۷ و ١٤ از ظروف مورد و شاهد، نمونه تهیه گردید. از آنجایی که بیشترین درصد حذف TPH توسط اکثر باکتری‌ها طی حدود ١٤ روز اتفاق می‌افتد؛ لذا زمان کل تماس باکتری‌ها با ترکیبات نفتی ١٤ روز انتخاب شد [٢٤].

روش اندازه‌گیری TPH در آب

برای اندازه‌گیری مقدار TPH باقیمانده در آب از روش استاندارد ASTM به شماره D7066 استفاده شد. این روش قادر است بر اساس جذب نور فرو سرخ (IR) در طول موج ٣/٤ میکرون (عدد موجی Cm^{-1} ۲۹۳۰) ، ترکیبات نفتی استخراج شده از آب را در محدوده غلظتی ۵ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اندازه‌گیری نماید[۲۵].

نمونه‌برداری

برای جمع‌آوری نمونه، هر بار حجم ۱۰ میلی‌لیتر نمونه آب از ظروف مورد و شاهد برداشته و به بطری‌های شیشه‌ای درپوش‌دار منتقل می‌شد. قبل از نمونه‌برداری، شیشه‌ها و درپوش‌ها با حلال تتراکلرواتیلن شستشو داده می‌شد. سپس نمونه‌ها با مقدار کافی اسیدسولفوریک به pH معادل ۲ یا پایین‌تر رسانیده و تا زمان استخراج در یخچال نگهداری می‌شد.

استخراج

نمونه‌ها به وسیله یک قیف تمیز از بطری نمونه به یک دکانتور منتقل شد. ۱۵ میلی لیتر حلال به نمونه افزوده شده و درب آن بسته و تکان داده شد تا تمامی سطوح داخلی بطری شسته شود. دکانتور به مدت ۲ دقیقه تکان داده شد. جهت تهویه مقطعی، درب دکانتور در زیر هود چند بار باز و بسته شد. بعد از این مدت دکانتور کنار گذاشته شد تا فازها از هم جدا شوند. حلال در فاز پایینی قرار می‌گیرد. سپس فاز حلال از یک فیلتر عبور داده و به یک فلاسک از پیش شسته شده به حجم ۵۰ میلی‌لیتر انتقال داده می‌شود. در حین عبور حلال از فیلتر، از سولفات سدیم استفاده می‌شود تا از ورود آب به داخل فلاسک جلوگیری شود. برای این منظور یک گرم سولفات سدیم در داخل فیلتر کاغذی ریخته می‌شود و حلال از آن عبور داده می‌شود. استخراج در دو مرحله دیگر و هر بار با ۱۵ میلی‌لیتر از حلال و یک گرم سولفات سدیم تازه تکرار شده و در هر بار استفاده سولفات سدیم دور ریخته می‌شود و عصاره در فلاسک حجمی جمع‌آوری می‌گردد. اگر عصاره استخراج شده شیری رنگ باشد، به معنی وجود آب است که در این صورت باید عصاره مجددا از سولفات سدیم تازه عبور داده شود.

یافته‌ها

پس از کشت باکتری‌ها و جداسازی آن‌ها، ۵ گونه باکتری شناسایی و از شماره ۱ تا ۵ نام گذاری شد (جدول۱). این ۵ گونه عبارت بودند از A_1: آلکالیژنز فکالیس، A_2: انتروباکتر آئروژنزا، A_3: اسینتوباکتر ، A_4: پروتئوس، A_5: سودوموناس آئروژنزا.

با توجه به شکل ۱، پس از ٤٨ ساعت، باکتری آلکالیژنز و سودوموناس به ترتیب بیشترین (٦٤/٩٪) و کمترین (۱۹/۷٪) حذف ترکیبات نفتی را داشته‌اند. بعد از گذشت یک هفته همه باکتری‌ها روند افزایش درصد حذف را داشته‌اند که بیشترین حذف مربوط به باکتری‌های انتروباکتر و اسینتوباکتر (۸۷٪) و کمترین حذف مربوط به سودوموناس (٤٧٪) بود. پس از گذشت ١٤روز باکتری‌های انتروباکتر، آلکالیژنز و اسینتوباکتر حذف چندانی نداشتند ولی پروتئوس درصد حذف بیشتری را نشان داد. به طورکلی در پایان دوره آزمایش، بیشترین درصد حذف در روز چهاردهم مربوط به آلکالیژنز فکالیس به میزان ۸۹/۳٪ و کمترین مربوط به سودوموناس به میزان ۵۳/۸٪ می‌باشد. باکتری سودوموناس نسبت به سایر باکتری‌ها با سرعت کمتری غلظت ppm ۱۰۰ گازوئیل را حذف کرده است.

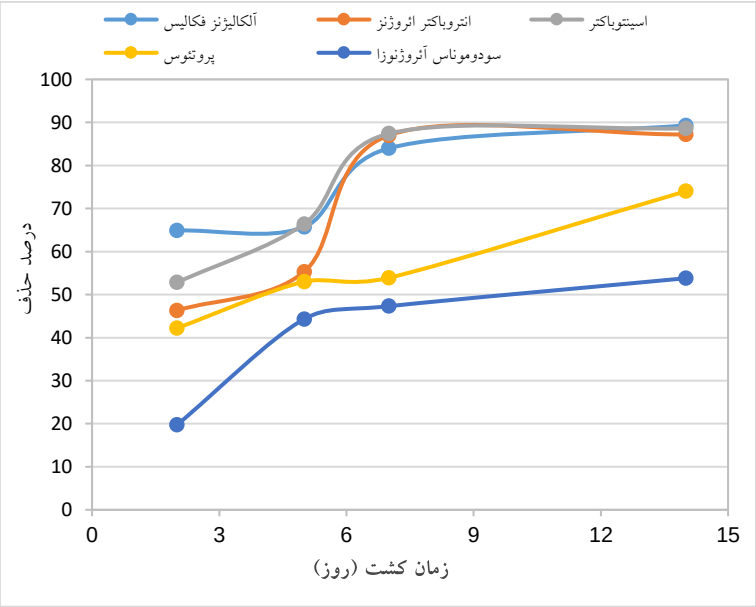
این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده از خاک آلوده به مواد نفتی

Table1-Result of biochemical tests of bacteria isolated from oil-contaminated soil

جدایه‌ها	تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی																							
	GR	XI	MOT	NI	LYS	GLU	XYS	ORN	H_2S	MAN	XL	IND	UR	MR	VP	CIT	MAL	SUC	LAC	TSI	GEL	STH	CAT
A_1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	N	-	-	+
A_2	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	A/A	+	-	+
A_3	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	N	-	-	-	-	-	-	-	-	K/K	-	-	+
A_4	-	-	+	+	-	+	N	N	+	_	N	+	+	+	-	-	+	-	-	A/A	+	-	-
A_5	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	K/K	+	-	+

Test: GR = Gram Reaction, XI= Oxidase, MOT= Motility, NI= Nitrate, LYS= Lysine, GLU= Glucose, XYS= Xylose, ORN= Ornithine, H2S, MAN= MANOSE, XL= XYLASE, IND= Indole, UR= Urease, VP= Voges-Proskauer, CIT= Citrate, MAL= Maltose, SUC= Sucrose, LAC= Lactose, STH= Starch Hydrolysis, CAT = Catalase, TSI= Triple Sugar Iron Agar, GEL = Gelatin Hydrolysis



شکل ۱- تاثیر نوع باکتری بر میزان حذف TPH با غلظت اولیه ppm۱۰۰در زمان‌های کشت متفاوت

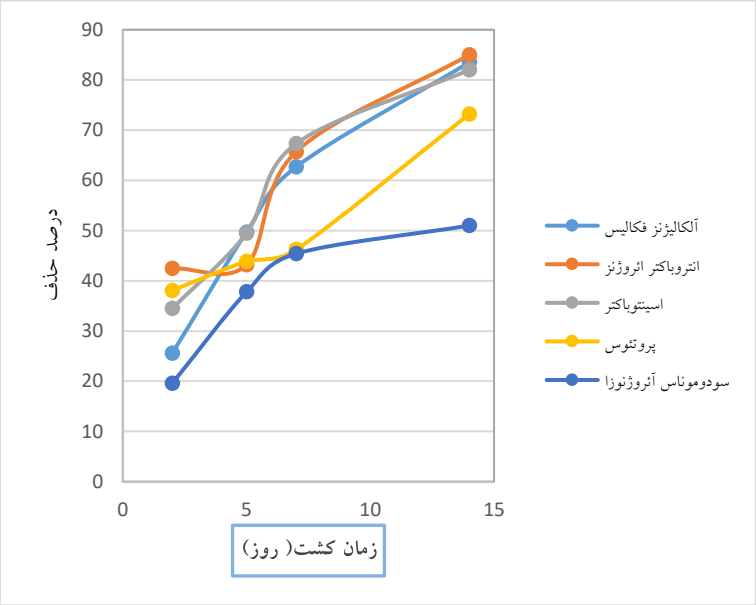
Figure 1- Effect of bacterial type on TPH removal rate with initial concentration of 100 ppm at different times

شکل ۲ نشان می‌دهد که وقتی غلظت اولیه ترکیبات نفتی در آب افزایش یابد، زمان مورد نیاز برای حذف تقریبا نیمی از این ترکیبات نیز افزایش خواهد یافت. در غلظت اولیه ppm ۵۰۰ گازوئیل، این زمان حدودا یک هفته است. در این زمان، بیشترین میزان حذف مربوط به اسینتوباکتر (۶۷/۳٪) و کمترین مربوط به سودوموناس (۴۵/۴٪) بود. با افزایش زمان، میزان حذف در همه باکتری‌ها افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین حذف در روز چهاردهم مربوط به انتروباکتر به میزان ۸۵٪ و کمترین آن مربوط

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

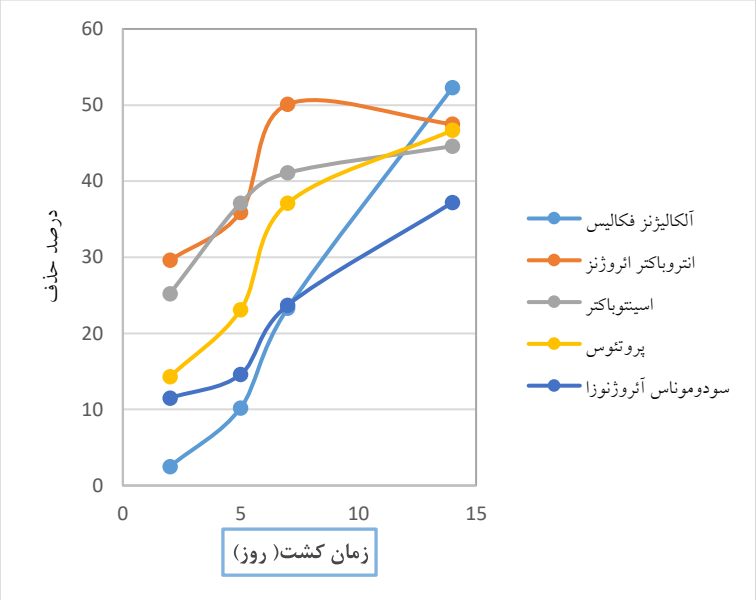
به سودوموناس به میزان ۵۱٪ است. در روز چهاردهم باکتری‌های آلکالیژنز و اسینتوباکتر نیز توانسته‌اند، به ترتیب با ۸۳/۵٪، ۸۳٪ و ۸۲ ٪، حذف بسیار خوبی را نشان دهند.

با توجه به شکل ۳، مشخص می‌شود که انتروباکتر پس از گذشت یک هفته توانسته است نیمی از غلظت اولیه گازوئیل را حذف نماید. پس از آن باکتری‌های اسینتوباکتر و پروتئوس به ترتیب با ۴۱٪/۱ و ۳۷/۱٪ توانسته‌اند گازوئیل را حذف نمایند. باکتری‌های آلکالیژنز و سودوموناس هر دو با ۲۳٪ حذف کمترین مقدار حذف را به خود اختصاص داده‌اند. باکتری آلکالیژنز در روز چهاردهم بیشترین حذف (۵۲/۳٪) و سودوموناس کمترین حذف (۳۷٪/۲) را در غلظت ppm ۱۰۰۰ داشته‌اند.



شکل ۲- تاثیر نوع باکتری بر میزان حذف TPH با غلظت اولیه ppm۵۰۰ در زمان‌های کشت متفاوت

Figure 2. Effect of bacterial type on TPH removal with initial concentration of 500 ppm at different times



شکل ۳- تاثیر نوع باکتری بر میزان حذف TPH با غلظت اولیهppm ۱۰۰۰ در زمان‌های کشت متفاوت

Figure 3. Effect of bacterial type on TPH removal with initial concentration of 1000 ppm at different times

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

بحث

تحقیقات زیادی روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت از محیط‌های دریایی و خشکی صورت گرفته است. در این مطالعات از میکروارگانیسم‌های بومی خو یافته با ترکیبات نفتی استفاده شده است که یکی از مهمترین عوامل تجزیه و حذف این ترکیبات از محیط به شمار می‌آیند. این میکروارگانیسم‌ها در شرایط طبیعی کارایی پایینی داشته و به سختی در محیط رشد می‌کنند اما چنانچه شرایط محیطی مناسب برای رشد سریع‌تر آن‌ها فراهم شود، قادرند با سرعت بیشتری ترکیبات نفتی را تجزیه کرده و به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار دهند [۲۶]. در مطالعه حاضر، ۵ گونه تجزیه کننده نفت از خاک آلوده به گازوئیل جداسازی شد که شامل آلکالیژنز فکالیس، انتروباکتر آئروژنز، اسینتوباکتر، پروتئوس، سودوموناس آئروژنزا بودند.

انیفید و ابوبکر در بررسی خود گونه‌های سودوموناس، اسینتوباکتر، نوکاردیا،آلکالیژنز و رودوکوکوس را شناسایی نمودند که همگی قابلیت تجزیه زیستی هوازی ترکیبات نفتی را داشتند [۲۷]. در تحقیق دیگری که توسط پورسلیمان و همکارانش انجام شد، نتایج نشان داد که اسینتوباکتر KA2 می‌تواند نفت خام و ترکیبات نفتی را تجزیه کند[۲۸]. کفیل زاده و همکارانش، انتروباکتر را به عنوان تجزیه کننده خوب ترکیبات هیدروکربنی معرفی کرده‌اند[۲۹] که می‌تواند با تولید آنزیم آلکان هیدروکسیلاز به خوبی آلکان‌ها را تجزیه نماید [۳۰]. همچنین درویشی و همکارانش، اینتروباکتر کولاکا را از خاک‌های آلوده به نفت سنگین حوزه سروش جداسازی کرده‌اند و به این نتیجه رسیده‌اند که این باکتری قدرت بسیار زیادی در تجزیه نفت سنگین داشته است [۳۱]. در تحقیق دیگری که توسط Hua در چین انجام شده است اینتروباکتر کولاکا از خاک‌های آلوده نفتی چین جداسازی شد که توانست نفت خام را تجزیه نماید [۳۳،۳۲]. حسن شاهیان از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در استان خوزستان باکتری‌های آکروموباکتر، انتروباکتر و کلبسیلا را جدا کرد که بر اساس نتایج، بیشترین درصد حذف گازوئیل به میزان ۷۲٪ مربوط به انتروباکتر بود [۳٤]. لذا با توجه به تحقیقات زیادی که در نقاط مختلف دنیا بر روی انتروباکترها انجام شده است، می‌توان دریافت که این باکتری‌ها ترکیبات نفتی را به خوبی تجزیه می‌کنند. در تحقیق حاضر نیز این باکتری جداسازی شد که توانست بیش از ۸۰٪ گازوئیل اولیه را در غلظت‌های ۱۰۰ و ppm ۵۰۰ حذف کند. این میزان در غلظت ppm ۱۰۰۰ بیش از ۳۰٪ بود که نشان می‌دهد این باکتری غلظت‌های کمتر را بهتر حذف می‌نماید.

در تحقیق دیگری Sathish در سال ۲۰۰۸ باکتری سودوموناس آئروژینوزا سویه BPS1-8 را جداسازی کرد که توانست ۷۷ درصد از نفت را در مدت ۷ روز تجزیه کند [۳۵]. حسن شاهیان و همکاران نیز در سال ۱۳۸۹ بیشترین مقدار تجزیه نفت را توسط سودوموناس به میزان ٤۱ درصد گزارش دادند. آن‌ها همچنین توانستند توانایی اسینتوباکتر را در تجزیه ترکیبات نفتی نشان دهند [۳٦]. Amr و همکاران توانستند با استفاده از سودوموناس آئروژینوزا، ۹۸/۷۷٪ درصد TPH را بعد از ۹۰ روز حذف نمایند [۳۷]. در تحقیق دیگری یوسفی و همکاران در سال ۱۳۹۳ چهار باکتری سودوموناس پوتیدا، اکروباکتریوم هماتوفیلوم، کلبسیلا اکسیتوکا و انتروکوکوس را از مصب رودخانه تجن جداسازی کردند که درصد حذف آنتراسن توسط آن ها به ترتیب ٤۳/۵۱، ٤۳، ٤۵ و ٤۸ درصد به دست آمد[۳۸]. گیلاوند و همکاران در سال ۱۳۹٤ مقدار تجزیه نفت خام در مدت ۱٤ روز توسط باکتری سودوموناس را به میزان ۵۹/٦٪ گزارش دادند [۳۹]. در پژوهشی دیگر محسن زاده موفق به جداسازی سودوموناس از خاک آلوده پالایشگاه تبریز شد که این گونه توانست ۸۹/۵٪ از غلظت ۰/۵٪ نفت خام را حذف کند [٤۰]. رسولی و همکارانش در سال ۲۰۲۰، سودوموناس آئروژینوزا را از خاک آلوده به ترکیبات نفتی در شش ایستگاه واقع در منطقه ویژه اقتصادی پتروشیمی ماهشهر، شناسایی کردند. طبق نتایج حاصله درصد حذف TPH توسط این باکتری ۵۰/۳۳٪ بوده است که می توان آن را به عنوان گونه مناسب بومی برای این منطقه در حذف خاک‌های آلوده پیشنهاد کرد [٤۱]. همان‌گونه که از نتایج تحقیق حاضر برمی‌آید، سودوموناس آئروژینوزای موجود در خاک آلوده به گازوئیل، قادر به تجزیه گازوئیل در حد قابل قبولی می‌باشد. این گونه توانسته است تقریبا نیمی از غلظت اولیه گازوئیل را در طی ۱٤ روز حذف نماید.

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

نریمانی و همکاران در سال ۱۳۹۳، سودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر را از مناطق آلوده پلدختر شناسایی کردند. آن‌ها سودوموناس را به عنوان توانمندترین گونه باکتری در تجزیه ترکیبات نفتی معرفی کردند و علت آن را توانایی سازگاری بالای این جنس در اغلب مناطق آلوده به ترکیبات نفتی دانسته‌اند [٤٢]. ابراهیمی و همکارانش در بررسی خود باکتری‌های اسینتوباکتر، انتروباکتر و سودوموناس را شناسایی نمودند که می‌توانند در حضور گازوئیل رشد بسیار خوبی داشته باشند. اسینتوباکتر بیشترین رشد را بعد از ۱۳ روز انکوباسیون داشت[٤٣]. البته در تحقیق حاضر اسینتو باکتر توانمندی بیشتری نسبت به *سودوموناس* در تجزیه گازوئیل داشته است. ویسن و همکاران موفق به جداسازی گونه باکتری آلکالیژنز دنیتریفیکانس شدند که قادر به تجزیه زیستی فلورانتن به مقدار ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در هر روز بود. همچنین آن‌ها گزارش کردند که این باکتری می‌تواند سایر PAHها مانند پیرن و بنزوآ آنتراسن را نیز تجزیه کند [٤٤]. Kayoed و همکاران در سال ۲۰۰۸، انتروباکتر آئروژنز، پروتئوس، اسینتوباکتر، آلکالیژنز و سودوموناس فلوئورسنس را از رسوب و آب رودخانه آلوده شده با ترکیبات نفتی جداسازی نمودند. آن‌ها میزان کارایی اسینتوباکتر، آلکالیژنز و سودوموناس را بیشتر از سایر گونه‌ها گزارش کردند. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که گونه‌های انتروباکتر آئروژنز و پروتئوس در غلظت‌های بالا نمی‌توانند به خوبی گازوئیل را تجزیه نمایند[٤٥]. Patience و همکارانش در سال ۲۰۱۰ میزان کارایی پروتئوس ولگاریس را در حذف نفت خام به میزان ۷۸ درصد، کروزون به میزان ۷۹٪ گازوئیل را معادل ۷۳/۸۸٪ گزارش کردند [٤٦]. Balogun و همکارانش در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که گونه پروتئوس میرابیلیس می‌تواند هیدروکربن‌های نفتی را به خوبی تجزیه نماید [٤٧].

با مقایسه فعالیت این باکتری‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که انتروباکتر در مقایسه با آلکالیژنز در زمان کمتری به حذف نیمی از غلظت اولیه گازوئیل رسیده است. بنابراین برای کارهای تحقیقاتی که نیاز به زمان کمتری دارد، می‌توان از انتروباکتر آئروژنز به جای آلکالیژنز فکالیس استفاده نمود. به طور کلی، می‌توان دریافت که با افزایش درصد آلاینده، ظرفیت جذب باکتری‌ها کاهش یافته و در نتیجه مقدار جذب کاهش می‌یابد. همان گونه که از نتایج این تحقیق نیز برمی‌آید، هر چه غلظت اولیه گازوئیل در نمونه‌ها بیشتر می‌شود، درصد حذف آن نیز توسط باکتری‌ها کاهش می‌یابد. در این مطالعه، با توجه به پژوهش‌های بسیاری که بر روی برخی از شرایط تاثیرگذار تجزیه نفت، انجام شده است، بررسی‌های لازم صورت گرفت. در تحقیقی با عنوان بررسی پتانسیل حذف میکروبی خاک‌های آلوده به گازوئیل در شهر همدان که توسط محسن‌زاده و همکارش انجام شد، بررسی‌ها نشان داد که عامل زمان، غلظت آلاینده، نوع باکتری و اثر تعاملی آن‌ها تاثیر بسیار زیادی بر روی میزان حذف ترکیبات نفتی دارند [٤٨].

سرعت مصرف بسیاری از ترکیبات آلی توسط جمعیت‌های میکروبی، بستگی به غلظت آن‌ها در اکوسیستم دارد. در پژوهش حسن شاهیان و همکاران اثر غلظت‌های ۱ تا ٤ درصد نفت بر روی میزان تجزیه بررسی شد. آن‌ها گزارش کردند که بهترین میزان تجزیه نفت در غلظت ۱٪ انجام می‌شود. غلظت بالای هیدروکربن‌ها ممکن است باعث تجمع و سنگین شدن آن‌ها و بدین ترتیب باعث عدم پخش مناسب لکه‌های نفتی روی آب و کمبود اکسیژن و غذای در دسترس برای تجزیه بیولوژیکی شود [١٦]. در تحقیق محسن‌زاده افزایش غلظت آلاینده از ۳٪ به بالا سبب کاهش کدورت در برخی از نمونه‌ها شده بود که می‌تواند سبب کاهش کارایی حذف میکروبی آلاینده در این غلظت شود [٤٩]. اگر غلظت آلاینده بیش از حد آستانه باشد، موجب جلوگیری از تجزیه می‌شود و این به دلیل افزایش اثر سمیت ترکیبات نفتی در غلظت‌های بالا و محدودیت اکسیژن و غذا برای مصرف میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده می‌باشد [١٦]. در نتیجه یکی از فاکتورهای مهم در سرعت تجزیه بیولوژیکی، غلظت هیدروکربن در سیستم است. به طور مشابه، غلظت بسیار پایین گازوئیل با وجود این که برای میکروارگانیسم‌ها سمی و کشنده نیست، می‌تواند کاهش بیولوژیکی را محدود کند زیرا ممکن است تهیه کربن برای پشتیبانی رشد میکروبی مشکل باشد. بنابراین سرعت مصرف بسیاری از ترکیبات آلی توسط جمعیت‌های میکروبی، بستگی به غلظت اولیه آن‌ها در اکوسیستم

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

دارد. در این مطالعه، اثر غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ppm ۱۰۰ بر میزان حذف گازوئیل توسط باکتری‌های جداسازی شده بررسی شد. همان‌گونه که از نتایج مشخص می‌شود، تمام باکتری‌های جداسازی شده بیشترین میزان حذف را در غلظت ppm ۱۰۰ دارند و با افزایش غلظت، میزان حذف گازوئیل کاهش می‌یابد. براساس گزارش یوسال و تورکمان، با افزایش زمان ماند، جمعیت میکروبی سیستم افزایش می‌یابد که این امر سبب افزایش سنتز آنزیم و کارایی سیستم شده و میکروب‌ها نیز فرصت بیشتری برای تلقیح و خو یافتن به آلاینده می‌یابند و می‌توانند درصد بیشتری از ترکیبات نفتی را تجزیه نمایند [۵۰]. در این پژوهش، همه ظروف به مدت دو هفته در انکوباتور قرار داده شدند و مشخص شد که میزان حذف گازوئیل با افزایش زمان انکوباسیون، افزایش یافته است.

نتیجه گیری

حذف ترکیبات نفتی از آب در غلظت های پائین (کمتر از ۰/۱٪)، که به روش های فیزیکی – شیمیائی مقرون به صرفه نمی‌باشد را می‌توان با استفاده از باکتری‌های جداسازی شده از خاک آلوده به ترکیبات نفتی انجام داد. باکتری‌های جدا شده از خاک آلوده به ترکیبات نفتی، همگی قابلیت خوبی در حذف این ترکیبات از محیط آب بخصوص در غلظت‌های پائین نشان دادند. در تحقیق حاضر باکتری پروتئوس در خاک آلوده به ترکیبات نفتی جدا شده که بر اساس بررسی متون به عمل آمده در تحقیقات قبلی کمتر در خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی شناسایی و جداسازی شده است. در این تحقیق باکتری پروتئوس جداسازی شده توانست ترکیبات نفتی را به میزان قال ملاحظه‌ای از آب حذف نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از بودجه تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران با شماره طرح ۱۲۵۷ انجام شده است. بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه تشکر می‌نماید.

Refrences

1-Daneshfar M, Arjmand M, Pahlavanzadeh H. Investigating and selecting the appropriate water treatment system for oil production for use in oil rigs. Scientific Journal of Oil & Gas Exploration & Production 1393; 114:52-61 (In Persian).

2-World Health Organization.(2008,May), Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, petroleum products in drinking water,WHO/SDE/WSH/05.08/123

3- Rezaei B, Nakhaei. Reuse of Produced Water in Oil and Gas Field.Journal of Farayandno 2016; 11(54):5-15 (In Persian).

4-Hajizadeh zaker N, Rahmani I, Moghaddam M, Shadi R, Abbasi A. Concentration and origin of petroleum hydrocarbons in the sediments of Anzali port. Journal of Environmental Studies 1390; 37(60):99-106 (In Persian).

5-Askarzadeh Torghabeh H, Bazrafshan A A, Hajipour Fard H. Investigation of oil pollutants in groundwater in Arak refinery. Journal of Environmental Studies 2003; 32:56-67 (In Persian).

6-Vaezi A, Karbassi A, Valikhani Samani, Heidari M, Fakhraee M, Rahmati A. Zonning, distribution and sources of TPH and heavy metals in Mahshahr Bay sediments, Persian Gulf. Journal of Environmental Science and Technology 2014; 16(1):1-19 (In Persian).

7-Mohammed M. Amro. Treatment Techniques of Oil-Contaminated Soil and Water Aquifers, International Conf. on Water Resources & Arid Environment 2004. Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia.

8-Yavari S, Malakahmad A, Nasiman B. Sapari,2015, A Review on Phytoremediation of Crude Oil Spills. Water, Air, Soil & Pollution 2015; 226(8):1-18.

9-Ahmadi, E., Gholami, M., Farzadkia, M., Nabizadeh, R., Esraphili, A., & Azari, A. (2015). Evaluation of Diethyl phthalate and Diallyl phthalate biodegradation mechanisms in the treatment of synthetic wastewater. Journal of Behdasht Dar Arseh (i.E., Health in the Field), 2(1), 10-18. https://doi.org/10.22037/jhf.v2i1.5672

10-Eslami, A., & Nemati, R. (2016). Removal of Heavy metal from aqueous environments using Bioremediation technology – review. Journal of Behdasht Dar Arseh (i.E., Health in the Field), 3(2), 43-51. https://doi.org/10.22037/jhf.v3i2.10851

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

11-Samadi, M., Alikhani, M., Rahmani, A., & Taherkhani, F. (2015). Isolation, characterization and tolerance survey of bacterial strains to cadmium in soils receiving Hamadan industrial parks wastewater treatment plant effluent. Journal of Behdasht Dar Arseh (i.E., Health in the Field), 2(1), 60-66. https://doi.org/10.22037/jhf.v2i1.6167
12-Fearing DA. The Study of petroleum hydrocarbon removal from water by Vetiver Grass (Vetiveria Zizanioides). [dissertation]. Mazandaran University of Medical Science Faculty of Health. 1396; p:13-82
13-Thapa B, Kumar KCA, Ghimire A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology 2012; 8(1):164-170
14- Mohammadi L, Rahdar A, Bazrafshan E, Dahmardeh H, Susan AB, Kyzas G. Petroleum hydrocarbon removal from wastewaters: A review. Processes 2020; 8(4):447. doi.org/10.3390/pr8040447.
15- Jain M, Majumder A, Ghosal PS, Gupta AK. A review on treatment of petroleum refinery and petrochemical plant wastewater: a special emphasis on constructed wetlands. Journal of Environmental Management 2020; 272:111057. doi.org/10.1016/j. jenvman.2020.111057.
16-Mohsenzadeh F. Study of biodegradation ability of some petroleum derivatives by native bacteria isolated from plants rhizosphere. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 2017; 30(1):66-76 (In Persian).
17-Kianpour Barjoei R, Motamedi H, Bamzadeh Z. Isolation and identification of petroleum hydrocarbon degrading bacteria from oil reservoirs located at Asmari, Ahwaz. Journal of Microbial World 2016; 9(2):145-155 (In Persian).
18- Ijah U, Antai S. Removal of nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. International Biodeterioration& Biodegradation 2003; 51(2): 93-9.
19- Fosso-Kankeu E, Marx S, and Brink A. Adaptation Behaviour of Bacterial Species and Impact on the Biodegradation of Biodiesel-Diesel. Brazilian Journal of Chemical Engineering 2017; 34(2):469 – 480.
20-Najafi S. A. Elimination of oil pollutants using microorganisms. Scientific Journal of Oil & Gas Exploration & Production 1393; 110:27-31 (In Persian).
21- Arbabi, M., Naseri, S. and Chimezie, A., Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in petroleum contaminated soils, Iran. J. Chem. Chem. Eng.,2009; 28(3), 53-59
22-Mohana S, Desai C, Madamwar D. Biodegradation and decolourization of anaerobically treated distillery spent wash by a novel bacterial consortium. Bioresource Technology 2007; 98(2):333-9.
23-Mohsenzadeh F, Nasseri S, Mesdaghinia A, Nabizadeh R, Zafari D, Chehregani A. Phytoremediation of petroleum contaminated soils: Prescreening for suitable plants and rhizospheral fungi.Journal of Toxicological & Environmental Chemistry 2009; 91(8):1443-53(In Persian).
7(7):490-493.
24- Gibbs C. Quantitative studies on marine biodegradation of oil I. Nutrient limitation at 14° C. Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences 1975;188(1090):61-82.
25- ASTM standards:D7066 .Standard Test Method for dimer-trimer of chlorotrifluoroethylene (S-316) Recoverable Oil and Grease and Nonpolar Material by Infrared Determination. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2015
26- Naseri S, Mesdaghinia A, Omrani GH, Rezaei S, Nadafi K, Younesian M, Arbabi M. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons of PAHs from soils contaminated with petroleum compounds by microbial consortium. medical University Tehran. Final report of the research project.2009
27-Onifade AK, Abubakar FA. Characterization of hydrocarbon- degrading microorganisms' isolation from crude oil contaminated soil and remediation of the soil by enhanced natural. Research Journal of Biological Sciences 2007; 2(2):149-155.
28-Poorsoleiman M.S, Hosseini S.A, Etminan A.R, Abtahi H, Koolivand A.R. The Efficiency of acinetobacter radioresistens strain KA2 isolated from oily sluge for degradation of crude oil. Journal of Arak University of Medical Sciences 2019; 22(5):74-883 (In Persia).
29- Kafilzadeh F, Sahragard P, Jamali H, Tahery Y. Isolation and identification of hydrocarbons degrading bacteria in soil around Shiraz Refinery. African Journal of Microbiology Research 2011; 5(19):3084-9.
30- Fusey P, Oudot J. Relative influence of physical removal and biodegradation in the depuration of petroleum-contaminated seashore sediments. Marine Pollution Bulletin 1984; 15(4):136-41.
31- Darvishi P, Mowla D, Ayatollahi S, Niazi A. Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an efficient strain, ERCPPI-1. Desalination and Water Treatment 2011; 28(1-3):46-54 (In Persian).
32- Hua X, Wu Z, Zhang H, Lu D, Wang M, Liu Y, Liu Z. Degradation of hexadecane by Enterobacter

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.

cloacae strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. Chemosphere 2010; 80(8):951-6.
33- Saadoun I, Mohammad MJ, Hameed KM, Shawaqfah Ma. Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia region). Brazilian Journal of Microbiology 2008; 39:453-6.
34- Hasan Shahian M. Isolation and characterization of diesel-oil degrading bacteria from petroleum contaminated soil at Khozestan provenance. Biological Journal of Microorganism 1395; 5(19):93-104 (In Persian).
35- Sathishkumar M, Binupriya AR, Baik SH, Yun SE. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. Clean 2008; 36(1):92-96.
36- Hasanshahian M, Hasanshahian O, Emtiazi G. Optimization of crude oil degradation by Pseudomonas aeruginosa AS and Acinetobacter calcuaceticous BS isolated from Persian Gulf. Petroleum Research 2010;20(63):72-81 (In Persian).
37- Amr H. Gouda, Ahmed S. El-Gendy, Taha M. Abd El-Razek, and Hesham I. El-Kassas. Evaluation of Phytoremediation and Bioremediation for Sandy soil contaminated with Petroleum Hydrocarbons. International Journal of Environmental Science and Development.2016; 7(7):826
38- Yousefi Z, Safari R, Sarvi S, Mohammadpour Tahmtan RA, Rostamali E. Anthracene biodegradation by bacteria isolated from Tajan river estuary. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2014; 24(118):111-22 (In Persian).
39- Gilavand F, Ebrahimipour G, Karkhane M, Marzban A. Evaluation of aliphatic and aromatic compounds degradation by indigenous bacteria isolated from soil contaminated with petroleum. Journal of Environmental Health Enginering 2015; 3(1):42-50 (In Persian).
40- Mohsenzadeh F. The study of microbial removal efficiency of crude oil in contaminated soils of cold climates areas (case study: Tabriz refinery). Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 2015; 27(3):406-17 (In Persian).
41- Rasuli S, Kashefi Alasl M, Marandi R, Emtiazjou M, Zaeimdar M. Identification of native bacteria of soil contaminated with oil compounds in Mahshahr petrochemical special economic zone. Journal of Environmental Science and Technology 2020; 22(3):277-86 (In Persia).
42- Narimany S, Bazgir E, Mirzaee Najafgholi. Identification of oil degrading bacteria from Poldokhtar polluted areas and investigation of factors affecting their degradation performance. Journal of Agricultural Biotechnology 2014; 13(2):11-19 (In Persian).
43- Ebrahimi M, Fallah A R, Sarikhani M H. Isolation and identification of oil-degrading bacteria from oil-polluted soils and assessment of their growth in the presence of gas oil. Journal of Water and Soil Science (Agricultural Science) 1392; 23(1):109-121 (In Persian).
44- Weissenfels W, Beyer M, Klein J, Rehm H. Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products. Applied Microbiology and Biotechnology 1991; 34(4):528-35.
45- Kayode-Isola T, Eniola K, Olayemi A, Igunnugbemi O. Response of resident bacteria of a crude oil-polluted river to diesel oil. American-Eurasian Journal of Agronomy. 2008; 1(1):6-9.
46- Olajide PO, Ogbeifun L. Hydrocarbon biodegrading potentials of a proteus vulgaris strain isolated from fish samples. American Journal of Applied Sciences 2010; 7(7):922-8.
47- Balogun S, Shofola T, Okedeji A, Ayangbenro A. Screening of hydrocarbonoclastic bacteria using Redox indicator 2, 6-dichlorophenol indophenol. Global NEST Journal 2015; 17(3):565-73.
48- Mohsenzadeh F. Study of biodegradation ability of some petroleum derivatives by native bacteria isolated from plants rhizosphere. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 2017; 30(1):66-76 (In Persian).
49- Mohsenzadeh F. Study of biodegradation ability of some petroleum derivatives by native bacteria isolated from plants rhizosphere. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 2017; 30(1):66-76 (In Persian).
50- Uysal A, Turkman A. Biodegradation of 4- Cp in an activated sludge reactor: effect of biosurfactant and the sludge age. Journal of Hazardous Material 2007; 21:71- 6.

این کار از مجوز Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) تبعیت می‌کند.