Journal of Arak University of Medical Sciences

December & January 2019. Vol 22. Issue 5

Archive of SID

Research Paper

The Efficiency of *Acinetobacter Radioresistens* Strain KA2 Isolated From Oily Sludge for Degradation of Crude Oil

Mohammad Saeed Poorsoleiman[1], Seyed Ahmad Hosseini[1], Alireza Etminan[2], Hamid Abtahi[3], *Ali Koolivand[4]

1. Department of Natural Resources and Environment, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.
2. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.
3. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Poorsoleiman SM, Hosseini SA, Etminan A, Abtahi H, Koolivand A. [The Efficiency of *Acinetobacter Radioresistens* Strain KA2 Isolated From Oily Sludge for Degrading of Crude Oil(Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2019; 22(5):78-89. https://doi.org/10.32598/JAMS.22.5.78

https://doi.org/10.32598/JAMS.22.5.78

CC BY NC

Article Info:

Received: 29 May 2019

Accepted: 21 Sep 2019

Available Online: 01 Dec 2019

Key words:

Oily sludge; Bacterial isolation; Bioremediation; Petroleum hydrocarbons

ABSTRACT

Background and Aim The widespread application of crude oil and its products has caused numerous environmental pollutions. This study aimed to isolate, identify, and determine a bacterial strain's potential of oil degradation isolated form oily sludge.

Methods & Materials After preparing the oily sludge in the sterile containers and cultivating in Bushnell-Haas medium, 24 distinct bacterial colonies were obtained. After performing biochemical and molecular tests, the "Acinetobacter radioresistens strain KA2" with the highest growth rate and crude oil degradation was selected. Then, degradation of various concentrations of crude oil at different PHs (5, 6, 7, 8 and 9), bacterial adherence to hydrocarbons and emulsification index of the selected strain were measured. Total petroleum hydrocarbons were determined by gas chromatography.

Ethical Considerations This study has been approved by the Research Ethics Committee of Islamic Azad University of Kermanshah Branch (Code: 19250587962001).

Results The results indicated that the removal efficiency of crude oil at concentrations of 1, 2, 3, 4, and 5% were 65.24, 76.14, 53.81, 31.84, and 25.21%, respectively. Crude oil removal at pH values of 5, 6, 7, 8, and 9 was 42.4, 69.16, 65.24, 59.41 and 48.24%, respectively. Bacterial adherence to hydrocarbons and emulsification index of the isolated strain were calculated to be 13.69 and 59.14%.

Conclusion The isolated bacterium is an efficient strain in treating the crude oil and petroleum compounds.

Extended Abstract

Introduction

The widespread use of crude oil and its products has caused numerous environmental pollutions. One of such admixtures is the sludge found at the bottom of the crude oil storage tanks, i.e. a sticky and relatively solid compound. This sludge is formed by crude oil storage in refinery tanks. The discharge of this oily sludge into the soil poses great risks to the environment and human health; it enters volatile hydrocarbons into the air and leaks pollutants into groundwater and soil. Various biochemical technologies, such as heat treatment, stabilization, and incineration, are used to remove this pollutant from regions with the relatively low area; however, these methods are not economical for eliminating widespread pollution. As a result,

* *Corresponding Author:*
Ali Koolivand, PhD.
Address: Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Tel: +98 (863) 3686443
E-mail: alikoulivand@arakmu.ac.ir

www.SID.ir

more efficient economical methods, like bioremediation, are required. The bioremediation of petroleum-contaminated environments is a modern approach to clean these areas and reduce environmental pollution.

Due to the different resistance of crude oil compounds to biodegradation, the isolation and screening of resistant and high yielding microbial strains are essential. If the selected strain is capable of consuming and decomposing petroleum compounds, petroleum hydrocarbons are used as a source of carbon and energy along with the mineral nutrients required to make their biomass. Thus, as the microbes grow, the contamination is gradually removed from the environment. Microorganisms living in petroleum-contaminated environments are more capable of decomposing hydrocarbons; therefore, to remove oil contamination, selecting microorganisms from natural environments, i.e. more enzymatic than other microorganisms, is highly cost-effective. This study aimed to isolate, identify, and determine the metabolic properties of a native resistant bacteria capable of degrading oil sludge.

Materials and Methods

Bushnell-Haas medium was used for the isolation and screening of oil-degrading bacteria. After the initial isolation of 24 bacteria from the oil sludge, Acinetobacter radioresistens strain KA2 with the highest growth and degradation ability was selected. To ensure the concentration and quality of the extracted bacterial DNA, the absorbance ratio of the samples at a wavelength of 260 and 280 nm was measured by a UV spectrophotometer. The 16s rRNA sequences were used for the identification of the molecular form of bacteria; thus, the DNA extracted from this bacterium was applied for Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis. Then, the degradation of various concentrations of crude oil at different PHs (5, 6, 7, 8, & 9), bacterial adherence to hydrocarbons (BATH), and the emulsification index of the selected strain were measured.

Results

Isolated strain characteristics for crude oil degradation were determined by 16S rRNA gene sequencing. Sequence-similarity search in NCBI Genbank suggested that the isolated bacterium was Acinetobacter radioresistens strain KA2. The reported number for the isolated bacterium was MK127544. The obtained results revealed that the degradation efficiency of the isolated strain for the crude oil at the concentrations of 1%, 2%, 3%, 4%, and 5%, after 7 days of incubation were 65.24, 76.14, 53.81, 31.84, and 25.21%, respectively; therefore, the decomposition of petroleum hydrocarbons was affected by its initial concentration, where the high concentrations of crude oil decreased the decomposition rate. We also observed that the initial crude oil concentration of 2% was the most appropriate concentration for bacterial growth in consuming petroleum hydrocarbons efficiently. Crude oil degradation at pH values of 5, 6, 7, 8, and 9 was equal to 42.4, 69.16, 65.24, 59.41, and 48.24%, respectively. Crude oil degradation and bacterial growth rates significantly reduced at pH values of 5 and 9, respectively. The emulsification index was calculated to investigate the potential of the strain in biosurfactant production. The obtained emulsification index for the study strain was equal to 59.14%. The biosurfactant reduces the surface tension between the liquid and solid phases and increases the amount of emulsification; therefore, the intracellular absorption and degradation of petroleum hydrocarbons improve. The BATH of the isolated strain was also calculated to evaluate the bacterial affinity to petroleum hydrocarbons. The obtained BATH was equal to 13.69%. Therefore, the bacterial tendency to attach to petroleum compounds improved the decomposition of petroleum hydrocarbons.

Conclusion

Oil sludge in the petrochemical industries could be efficiently treated by biodegradation as an economical and environmental-friendly method; Acinetobacter radioresistens strain KA2 could be used in this regard.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study has been approved by the Research Ethics Committee of the Islamic Azad University of Kermanshah Branch (Code: 19250587962001).

Funding

This study was extracted from a PhD. thesis of Mohammad Saeed Poorsoleiman in Department of Natural Resources and Environment, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, and received financial support from the Islamic Azad University of Kermanshah Branch.

Authors' contributions

Investigation, analysis, and initial draft preparation: Mohammad Saeed Poorsoleiman; Conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, resources, original draft preparation, writing-review & editing, visualization, supervision: Seyed Ahmad Hosseini, Alireza Etminan, Hamid Abtahi, and Ali Koolivand.

www.SID.ir

Archive of SID

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the personnel of Arak University of Medical Sciences and Islamic Azad University of Kermanshah Branch for their valuable cooperation.

www.SID.ir

شناسایی و بررسی کارایی باکتری بومی Acinetobacter radioresistens strain KA2 جداسازی‌شده از لجن‌های نفتی جهت تجزیه نفت خام

محمدسعیدپورسلیمان[۱]، سید احمد حسینی[۱]، علیرضا اطمینان[۲]، حمید ابطحی[۳]، *علی کولیوند[۴]

۱. گروه منابع طبیعی و محیط زیست، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.
۲. گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.
۳. مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.
۴. گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۰۸ خرداد ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۳۰ شهریور ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۰ آذر ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف افزایش روزافزون استفاده از نفت و ترکیبات نفتی باعث آلودگی‌های زیست‌محیطی عدیده‌ای شده است. این پژوهش با هدف جداسازی، شناسایی و تعیین پتانسیل تجزیه نفت، توسط گونه باکتریایی بومی لجن نفتی انجام شد.

مواد و روش‌ها پس از تهیه لجن نفتی در ظروف استریل و کشت در محیط بوشنل هاس، ۲۴ باکتری با تمایز کلونی به دست آمد. پس از شناسایی گونه‌های جداشده با تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی، گونه Acinetobacter radioresistens strain KA2 که بیشترین رشد و توانایی حذف نفت خام را داشت انتخاب شد. در ادامه، تجزیه غلظت‌های مختلف نفت خام در pHهای مختلف (۵، ۶، ۷، ۸ و ۹)، شاخص امولسیون‌کنندگی و چسبندگی سلولی به هیدروکربن گونه انتخابی سنجش شد. سنجش کل هیدروکربن‌های نفتی با استفاده از دستگاه گازکروماتوگراف انجام گرفت.

ملاحظات اخلاقی این مطالعه با کد ۱۹۲۵۰۵۸۷۹۶۲۰۰۱ در کمیته پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه به ثبت رسیده است.

یافته‌ها نتایج نشان دادند که راندمان حذف غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد نفت خام توسط گونه جداسازی‌شده پس از هفت روز انکوباسیون برابر با ۶۵/۲۴، ۷۶/۱۴، ۵۳/۸۱، ۳۱/۸۴ و ۲۵/۲۱ درصد بود. میزان حذف نفت خام در pHهای معادل ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ به ترتیب معادل ۴۲/۰۴، ۶۹/۱۶، ۶۵/۲۴، ۵۹/۴۱ و ۴۸/۲۴ درصد بود. مقدار شاخص امولسیون‌کنندگی و چسبندگی سلولی سویه جداشده در این تحقیق برابر با ۵۹/۱۴ و ۱۳/۶۹ درصد به دست آمد.

نتیجه‌گیری باکتری جداشده می‌تواند به عنوان یک گونه کارآمد در تصفیه نفت خام و ترکیبات نفتی استفاده شود.

کلیدواژه‌ها:
لجن نفتی، جداسازی باکتری، زیست‌پالایی، هیدروکربن‌های نفتی

مقدمه

در بسیاری از جوامع امروزی آلودگی زیست‌محیطی به یکی از چالش‌های مهم و نگران‌کننده تبدیل شده است. انسان در اثر فعالیت‌های روزمره خود مقادیر قابل توجهی از آلاینده‌ها را به منابع خاک و آب وارد می‌کند که باعث ایجاد تغییرات قابل ملاحظه و مشهود در محیط زیست می‌شود. یک دسته از این آلاینده‌ها، فراورده‌های نفتی است که برخی از آن‌ها دوام بالایی دارند [۱، ۲]. ورود این ترکیبات به طبیعت به سبب سمی‌بودن و ایجاد جهش و سرطان‌زایی برای موجودات زنده، از مهم‌ترین نگرانی‌های محیط زیستی است [۳، ۴]. این دسته از آلاینده‌های آلی پایداری زیادی در محیط زیست دارند و انباشته‌شدن تدریجی آن‌ها موجب اختلال در کارکرد طبیعی اکوسیستم‌های آبی و خاکی می‌شود. بنابراین نیاز به تصفیه محیط‌های آلوده، برای رفع آلودگی‌های مربوطه کاملاً ضروری است [۵، ۶].

فناوری‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی همچون تصفیه حرارتی، تثبیت و سوزاندن جهت حذف این نوع از آلودگی از مناطق با وسعت نسبتاً کم کاربرد دارند. با این حال، این روش‌ها برای حذف آلودگی‌های گسترده، صرفه اقتصادی ندارند [۷-۹]. در نتیجه نیاز به روش‌های دیگری همچون زیست‌پالایی کاملاً محسوس است. زیست‌پالایی محیط‌های آلوده به مواد نفتی از جمله روش‌های کارآمد در زمینه پاک‌سازی محیط‌های آلوده به مواد نفتی و کاهش آلودگی‌های محیط زیست است. راندمان بالا، سازگاری با محیط زیست و اقتصادی‌بودن از جمله مزایای

* نویسنده مسئول:
دکتر علی کولیوند
نشانی: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت محیط.
تلفن: ۳۶۸۶۴۴۳ (۸۶۳) ۹۸+
پست الکترونیکی: alikoulivand@arakmu.ac.ir

www.SID.ir

روش‌های زیست‌پالایی است [۶، ۱۰]. بنابراین در سالیان اخیر تحقیقات مختلفی در خصوص زیست‌پالایی ترکیبات نفتی انجام شده است که از مهم‌ترین آن‌ها میتوان به مطالعات وارجانی [۱]، ژانگ و همکاران [۳] و ژائو و همکاران [۱۱] اشاره کرد.

با توجه به مقاومت متفاوت ترکیبات نفت خام نسبت به تجزیه زیستی، جداسازی و غربالگری سویه‌های میکروبی مقاوم و پربازده کاملاً ضروری است. اگر سویه منتخب قادر به مصرف و تجزیه ترکیبات نفتی باشد، هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی، به همراه مواد غذایی معدنی مورد نیاز سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد تا توده زیستی خود را تشکیل دهد. به این ترتیب در عین حال که میکروب رشد می‌کند، به‌تدریج آلودگی نیز از محیط حذف می‌شود [۶، ۱۱]. میکروارگانیسم‌هایی که در محیط‌های آلوده به مواد نفتی به سر می‌برند، قابلیت بیشتری در تجزیه هیدروکربن‌ها دارند و بنابراین برای حذف آلودگی نفتی، انتخاب میکروارگانیسم‌ها از محیط‌های طبیعی که قابلیت آنزیمی بیشتری از میکروارگانیسم‌های دیگر دارند بسیار مقرون‌به‌صرفه‌است [۵، ۱۲].

هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند توسط میکروارگانیسم‌های مختلفی تجزیه شوند که از این میان باکتری‌ها و قارچ‌ها فعال‌ترین عوامل تجزیه‌کننده نفت و نیز آغازگر فرایند تجزیه نفت معرفی شده‌اند. نوع، درصد و تنوع قارچ‌ها و باکتری‌ها در محیط‌های آب و خاک متفاوت است و در محیط‌های متفاوت و شرایط و فصول مختلف، گونه‌های مختلفی را می‌توان مشاهده کرد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی شامل باسیلوس، آرتروباکتر، آلکالیژنز، استینوباکتر، اکرومولاکتر، کورینه باکتریوم، کلستریدیوم، سیتروباکتر، فلاووباکتریوم، اشرشیا، انتروباکتر، دسولفوویبریو، متانوباکتریوم، سودوموناس، نوکاردیا و تیوباسیلوس است که در این میان استنوباکترها از فراوان‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت به شمار می‌آیند. بنابراین استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی دارای قابلیت بالا در زیست‌پالایی نفت خام سازگار با شرایط محیطی موجود، می‌تواند یک روش مناسب در حذف ترکیبات نفتی از مکان موردنظر باشد [۱، ۱۳-۱۶].

با توجه به نفت‌خیزبودن ایران و لزوم زیست‌پالایی ترکیبات نفتی تخلیه‌شده به محیط زیست، مطالعه حاضر با هدف جداسازی، شناسایی و تعیین پتانسیل تجزیه نفت توسط گونه باکتریایی بومی (Acinetobacter radioresistens strain KA2) لجن نفتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها

نمونه لجن نفتی مورد استفاده در این تحقیق از بخش فرایندی پالایشگاه نفت امام خمینی (ره) شازند به صورت تصادفی تهیه شد. میزان رطوبت و pH لجن مربوطه به ترتیب برابر ۲۷/۶۳ درصد و ۶/۱۰ بود. برای جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از محیط کشت اختصاصی بوشنل هاس استفاده شد. در ابتدا ۰/۳۲۷ گرم از محیط به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و پس از اتوکلاو، سیکلوهگزامید با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر جهت ممانعت از رشد قارچ اضافه شد. محیط‌های کشت بدون سیکلوهگزامید هم تهیه شد تا بتوان گونه‌های قارچی بومی را نیز جدا کرد. سپس از نمونه‌های لجن نفتی به میزان پنج گرم به داخل هرکدام از این محیط‌ها جهت غنی‌سازی اولیه تلقیح شد و به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار با ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت یک هفته میزان پنج میلی‌لیتر برداشت و به محیط‌های جدید که مشابه قبل تهیه شده بودند، اما دارای یک درصد نفت خام استریل به عنوان منبع کربن بودند، تلقیح شد. همچنین پس از یک هفته انکوباسیون، مجدداً نمونه‌ها در محیط جدید پاساژ داده شدند. این روند تا سه مرحله تکرار شد تا کدورت به‌دست‌آمده ناشی از رشد باکتری‌ها باشد و آلودگی ترکیبات دیگر در نمونه کاهش یابد. از پاساژ نهایی، میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت خطی داده شد و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. درنهایت برای خالص‌سازی، از هر کلنی متفاوت، یک کشت ایزوله خطی بر روی مولر هینتون آگار و به صورت جداگانه تهیه شد.

سپس برای تأیید توانایی میکروارگانیسم‌های جداشده جهت تجزیه نفت، مجدداً هرکدام از میکروارگانیسم‌ها در محیط بوشنل هاس آگار حاوی یک درصد نفت خام، به مدت یک هفته کشت داده شدند. درنهایت ۲۴ باکتری از نمونه‌های رشدیافته به محیط بوشنل هاس براث واجد یک درصد نفت، جدا و تلقیح شدند که به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند. بعد از این مدت، چگالی نوری (OD) هرکدام از محیط‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سویه‌ای که بیشترین چگالی نوری و قابلیت تجزیه نفت را داشت برای ادامه تحقیق، مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی باکتری جداشده

برای شناسایی باکتری جداشده از آزمایش‌های اولیه رنگ‌آمیزی گرم، مورفولوژی کلنی، حرکت، اکسیداز، کاتالاز، احیای نیترات، سیترات، اوره، تولید H2S، تولید اندول و تست TSI استفاده شد. پس از آن، جهت جداسازی DNA باکتری، در ابتدا باکتری در محیط نوترینت براث در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۶۰دقیقه در دور، به مدت ۲۴ ساعت آنکوبه شد. سپس یک میلی‌لیتر از محیط‌های کشت واجد باکتری در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و با ۱۴ هزاردور در دقیقه به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته و رسوب

www.SID.ir

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها

Primer	Sequence	Length (bp)	GC content (%)	Water/Tube (µl)
27F	5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′	۲۰	۵۰	۱۰۷/۳۵
1492R	5′-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3′	۲۱	۴۲/۸۵	۲۱۴/۷۴

نگهداری شد. با توجه به اینکه هدف، شناسایی مولکولی باکتری، با استفاده از توالی 16s rRNA بود، نمونه DNA استخراج‌شده از این باکتری جهت PCR به کار رفت. برای انجام فرایند PCR از محصولات شرکت سیناژن استفاده شد. پرایمرها به سفارش شرکت سیناژن برای شناسایی ژن 16s rRNA تهیه شد که خصوصیات آن در جدول شماره ۱ آورده شده است.

پس از این مراحل، میکروتیوب‌ها درون دستگاه PCR قرار دادهشدند و به دستگاه برنامه موردنظر داده شد. برنامه مورد استفاده در این بررسی به این صورت بود: دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت پنج دقیقه (جهت دناتوره)، دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه (جهت بازشدن دو رشته DNA)، دمای۵۳ درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه (اتصال پرایمرها)، دمای ۷۲ درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه (پلیمریزه‌شدن توسط آنزیم)، ۳۵ بار تکرار سیکل از مرحله دو تا چهار و درنهایت دمای۷۲ درجه سلسیوس، به مدت پنج دقیقه تا تمام رشته ها کامل شوند. محصول PCR درنهایت در ژل اگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شد و در زیر نور UV، توالی حاصل با توالی‌های مارکر مقایسه شد. به دلیل وجود باندهای اضافی در کنار باند موردنظر، در مرحله بعدی، محصول PCR با استفاده از کیت، خالص‌سازی شد. خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR شرکت سیگما الدریچ انجام گرفت. نمونه خالص‌شده جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک ژنی بلاست شده و همولوژی آن بررسی شد و قرابت‌های بالاتر از ۹۸ درصد به عنوان جنس و گونه باکتری‌های جداسازی شده، انتخاب شدند [۱۷].

بررسی میزان رشد باکتری شناسایی‌شده

در این مرحله نمونه ایزوله‌شده در محیط نوترنیت براث کشت داده شد و در غلظت ۰/۵ مک‌فارلند، در محیط بوشنل هاس دارای یک درصد نفت کشت داده شد. سپس به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۲۰ دور در دقیقه آنکوبه شد و میزان کدورت با قرائت جذب نوری در زمان‌های ۲، ۴، ۷ و ۱۰ و ۱۲ روز بعد از انکوباسیون، بررسی شد. این تست، سه بار تکرار شد و میانگین جذب نوری در زمان‌های مورد بررسی، محاسبه شد. سپس باکتری به صورت کشت خالص در محیط نوترنیت براث با غلظت نهایی ۰/۵ مک فارلند (۱/۵ × ۱۰۸ CFU/mL) تهیه شد و برای بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

شاخص امولسیون کنندگی[1]

باکتری جداسازی‌شده ابتدا در محیط نوترینت براث در دمای ۳۰درجه سلسیوس و ۱۲۰ دور در دقیقه، به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. پس از این مدت، به چهار میلی‌لیتر از محیط کشت واجد باکتری رشدیافته، شش میلی‌لیتر نفت سفید استریل اضافه شد و ترکیب حاصل به مدت دو دقیقه با سرعت بالا با ورتکس مخلوط شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت به صورت ساکن در دمای محیط قرار داده شدند و پس از آن فعالیت امولسیون‌کنندگی با فرمول شماره ۱ به دست آمد [۱۸، ۱۹].

$$۱.\ E_{24}=\frac{\text{ارتفاع ناحیه امولاسیون شده}}{\text{کل ارتفاع مایع}}\times ۱۰۰$$

سنجش چسبندگی سلولی به هیدروکربن[2]

ابتدا باکتری ایزوله‌شده در محیط نوترینت آگار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس یک کلنی از باکتری در ۹ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه شده و به‌شدت ورتکس شد و جذب نوری آن در حدود ۰/۳ تنظیم شد (OD_1). سپس به نمونه ۲۰۰ میکرولیتر هگزادکان اضافه و به مدت دو دقیقه ورتکس با سرعت بالا صورت گرفت و پس از آن اجازه داده شد تا فاز هیدروکربنی جدا شود. سپس کدورت فاز آبی (لایه زیری) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (OD_2). نتایج به صورت اختلاف درصد جذب فاز آبی بعد از تیمار، نسبت به جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی تعیین شد. با استفاده از فرمول شماره ۲ میزان BATH نمونه محاسبه شد [۲۰].

$$۲.\ BATH=\frac{OD1+OD2}{OD1}\times 100$$

ارزیابی اثر غلظت نفت و pH

باکتری جداشده از نظر رشد و میزان تجزیه نفت در pHهای مختلف (۵، ۶، ۷، ۸، ۹) مورد بررسی قرار گرفت. در این تست، باکتری در محیط بوشنل هاس دارای یک درصد نفت که pH آن توسط HCl 1N و NaOH 1N، تنظیم شده بود، به مدت یک

1. Emulsification index
2. Bacterial adhesion to hydrocarbon

www.SID.ir

Archive of SID

هفته در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کشت داده شدند. پس از این مدت، رشد باکتری از لحاظ ایجاد کدورت و میزان حذف نفت ارزیابی شد. به منظور ارزیابی میزان رشد و حذف نفت توسط سویه جداشده در غلظت‌های مختلف نفت، باکتری در محیط بوشنل هاس براث حاوی غلظت‌های ۱ تا ۵ درصد نفت با pH برابر با ۷ تلقیح شد. پس از ۷ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۲۰ دور در دقیقه، رشد باکتری از طریق خواندن جذب نوری و میزان تجزیه نفت تعیین شد. در کلیه آزمایشات محیط بدون تلقیح باکتری به عنوان تست شاهد استفاده شد و کلیه نتایج ارائه‌شده به نسبت نمونه‌های شاهد محاسبه شده است.

سنجش حذف نفت خام به روش گاز کروماتوگرافی

پس از دوره انکوباسیون، محیط کشت به قیف جداکننده جهت جداسازی فاز آلی از فاز آبی منتقل شد. سپس فاز آلی که حاوی نفت حل‌شده در دی‌کلرو متان بود، درون ارلن ریخته شد و سه گرم سولفات سدیم جهت جذب آب باقی‌مانده به ارلن اضافه شد و به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شد. سپس محتویات ارلن از کاغذ واتمن شماره یک عبور داده شد و در دمای محیط جهت تبخیر دی‌کلرو متان قرار گرفت. پس از تبخیر دی‌کلرو متان ، مجدداً سه میکرولیتر دی‌کلرو متان به یک میکرولیتر نفت باقی‌مانده اضافه شد و توسط دستگاه GC مورد آنالیز قرار گرفت. شرایط دمایی و بهره‌برداری از دستگاه GC در مقالات قبلی [۲۲، ۲۱] به تفصیل توضیح داده شده است.

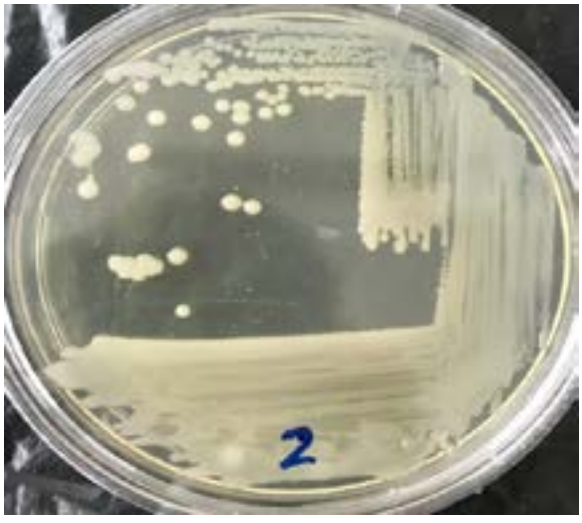
یافته‌ها

تصویر شماره ۱ و ۲ بخشی از مراحل کشت جهت جداسازی گونه باکتری را از لجن نفتی نشان می‌دهد. در این مطالعه هیچ گونه قارچی از لجن نفتی مربوطه شناسایی نشد. نتایج حاصل از میزان رشد و حذف نفت توسط سویه جداشده در pHهای مختلف (۵، ۶، ۷، ۸، ۹) پس از هفت روز انکوباسیون در دمای ۳۰درجه سلسیوس و ۱۲۰ دور در دقیقه در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از میزان رشد و حذف نفت توسط سویه جداشده در غلظت‌های ۱ تا ۵ درصد نفت با pH برابر هفت، پس از هفت روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۲۰ دور در دقیقه در تصویر شماره ۴نشان داده شده است.

بحث

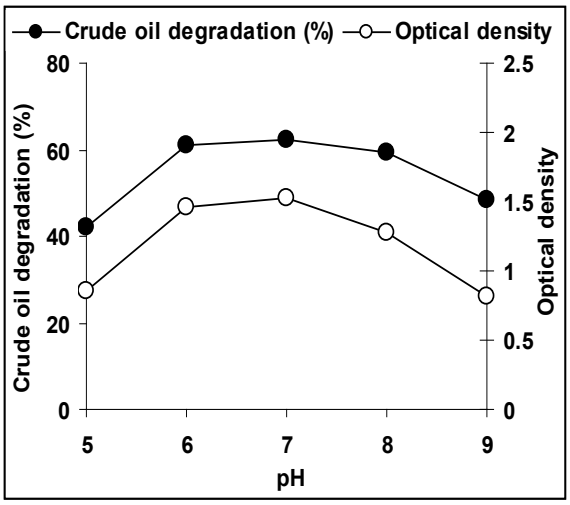
مشخصات سویه جداشده برای حذف نفت خام توسط تحلیل توالی ژن 16S rRNA تعیین شد. جست‌وجوی تشابه در بانک ژن NCBI نشان داد که باکتری جداسازی‌شده Acinetobacter radioresistens strain KA2 است. عدد دسترسی ژن 16SrRNA بانک ژن NCBI گزارش شده در این مقاله، برای باکتری جداشده MK127544 است. قابلیت این سویه در تجزیه بیولوژیکی نفت خام نشان داد میزان کدورت باکتری جداشده (OD 600) در زمان‌های ۲، ۴، ۷ و ۱۰ و ۱۲ روز بعد از انکوباسیون به ترتیب برابر با ۰/۲۹، ۰/۸۶، ۱/۵۲، ۱/۵۵ و ۱/۲۵ بود. بنابراین فاز رشد لگاریتمی گونه جداشده در فاصله زمانی ۷ تا ۱۰ روز اتفاق می‌افتد. به همین دلیل دوره انکوباسیون آزمایشات تجزیه نفت برابر با هفت روز انتخاب شد. نتایج نشان داده شده در تصویر شماره ۳ نشان می‌دهد که باکتری جداسازی‌شده قابلیت رشد و تجزیه نفت خام در غلظت اولیه یک تا پنج درصد را دارد. بنابراین، باکتری جداشده می‌تواند هیدروکربن نفتی را به عنوان منبع مجزای کربن استفاده کند. توانایی جنس Acinetobacter در تجزیه ترکیبات نفتی در چندین مقاله گزارش شده است [۱۵، ۲۳، ۲۴].

تصویر ۱. تصویری از محیط کشت باکتری بعد از یک هفته انکوباسیون (شماره ۱. بدون سیکلوهگزامید، شماره ۲. حاوی سیکلوهگزامید)



تصویر ۲. کلنی شاخه‌های جداشده بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار

www.SID.ir

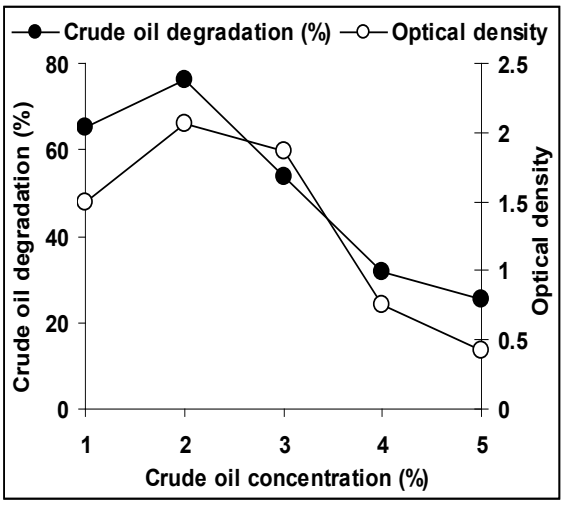


تصویر ۳. اثر pH بر میزان رشد و حذف نفت خام توسط باکتری جداشده

E24 برای بررسی قابلیت سویه در تولید بیوسورفکتانت نیز محاسبه شد. سویه جداشده در این تحقیق دارای شاخص امولسیون‌سازی ۵۹/۱۴ درصد بود. کای و همکاران [۲۵] نیز گزارش کردند که سویه Acinetobacter قابلیت امولسیون‌سازی بالایی (۶۲/۵) برای هگزادکان دارد. به دلیل اینکه بیوسورفکتانت کشش سطحی را بین فازهای مایع و جامد کاهش داده و میزان امولسیون‌سازی را افزایش می‌دهد، جذب درون‌سلولی و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی بهبود می‌یابد. مقدار BATH نیز برای ارزیابی تمایل باکتری به هیدروکربن‌های نفتی تعیین شد. این مقدار برای سویه جداشده ۱۳/۶۹ درصد به دست آمد. بنابراین تمایل باکتری برای چسبیدن به ترکیبات نفتی منجر به بهبود تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌شود.

از آنجایی که pH اولیه لجن نفتی برابر با ۶/۱۰ بود و pH محیط کشت، عامل مهمی در متابولیسم باکتری و حلّالیت هیدروکربن‌های نفتی است، بنابراین میزان رشد و تجزیه نفت در pHهای مختلف (۵، ۶، ۷، ۸، ۹) توسط باکتری جداشده مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، باکتری جداسازی‌شده قابلیت تجزیه نفت خام و رشد در مقادیر pH در محدوده ۶ الی ۸ را از خود نشان داد (تصویر شماره ۴). همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، بالاترین تجزیه نفت خام به ترتیب در مقادیر pH معادل ۷ ، ۶ و ۸ معادل با ۶۲/۲۴ ، ۶۱/۱۳ و ۵۹/۴۱ درصد بود. میزان حذف نفت خام و رشد باکتری به طور قابل توجهی در مقادیر pH معادل ۵ و ۹ کاهش یافت. این نتایج مطابق با یافته‌های مونگچیندا و همکاران [۵] و همچنین وانگ و همکاران [۲۶] بود که در حالت کلی، باکتری‌ها مقادیر pH خنثی را برای رشد و تخریب هیدروکربن‌های نفتی ترجیح می‌دهند.

تصویر شماره ۴ نشان می‌دهد گونه جداسازی‌شده قادر به



تصویر ۴. اثر غلظت اولیه نفت بر میزان رشد و حذف نفت خام توسط باکتری جداشده

تخریب نفت خام در محیط مایع در غلظت‌های معادل یک الی پنج درصد است. پس از هفت روز به ترتیب ۶۵/۲۴، ۷۶/۱۴، ۵۳/۸۱، ۳۱/۸۴ و ۲۵/۲۱ درصد از غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد نفت خام حذف شد. بنابراین، تجزیه هیدروکربن‌های نفتی تحت تأثیر غلظت اولیه‌ی آن قرار دارد؛ به طوری که غلظت‌های بالای نفت خام منجر به کاهش میزان تجزیه می‌شود.

در مطالعه حاضر مشاهده شد که سطح اولیه نفت خام معادل ۲ درصد مناسب‌ترین غلظت برای رشد باکتری است تا هیدروکربن‌های نفتی را به طور کارآمدی مصرف کند. از طرف دیگر، باکتری جداسازی‌شده در سطح بسیار پایین (یک درصد) نفت خام، رشد کمتری داشت و نفت خام را نیز به میزان کمتری تجزیه کرد. وارجانی و یوپاسانی [۲۷] نیز گزارش کردند که غلظت‌های بسیار پایین نفت خام می‌تواند تجزیه زیستی را محدود کند، زیرا منبع کربنی که از رشد جمعیت میکروبی حمایت می‌کند، ممکن است بسیار اندک باشد. در غلظت‌های بسیار بالا (۴ و ۵ درصد) هم میزان رشد و تجزیه نفت کاهش یافت که به علت سمیت هیدروکربن‌های نفتی بود. آوشتی و همکاران [۲۸] نیز گزارش کردند که در غلظت پنج درصد نفت میزان حذف بسیار کاهش یافت. در این تحقیق، چنین نتیجه‌گیری شد که مقادیر بهینه غلظت نفت خام برای پشتیبانی از رشد باکتری و حذف آلاینده معادل ۲ الی ۳ درصد است. این غلظت از نفت خام معادل با TPH برابر با ۲۰ تا ۳۰کیلوگرم بر گرم است. بنابراین می‌توان در فرایندهای مقیاس بزرگی همچون فرایند کمپوست با تنظیم میزان اختلاط لجن نفتی با کمپوست به این غلظت مطلوب رسید و به طور عملی و کاربردی در مقیاس کامل تصفیه لجن‌های نفتی را انجام داد. گزارشات متعددی در

www.SID.ir

Archive of SID

خصوص موفقیت‌آمیزبودن تصفیه و اصلاح زیستی لجن‌های نفتی در مقیاس کامل و با استفاده از باکتری‌های بومی جداسازی‌شده وجود دارد.

و همکاران [۲۹] در سال ۲۰۱۹ توانایی گونه جداسازی حاضر را در ترکیب با گونه Sphingomonas olei strain KA1 در تصفیه غلظت‌های بالای لجن نفتی در فرایند کمپوست گزارش کردند. بر اساس نتایج مشخص شد که ترکیب این دو گونه به عنوان کنسرسیوم میکروبی قادر بود میزان TPH در گستره ۱۰ تا ۵۰ کیلوگرم بر گرم را در محدوده ۹۴/۲۴-۶۰/۱۴ درصد کاهش دهد. ماتسوی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ تجزیه بیولوژیکی آلکان‌های با زنجیره بلند را از لجن‌های نفتی انجام دادند و چنین گزارش کردند که باکتری‌های گوردینا، سودوموناس و استینوباکتر نقش اصلی را در تجزیه داشتند [۳۰].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق، لجن‌های نفتی موجود در صنایع نفت و پتروشیمی را می‌توان با فرایند تجزیه زیستی به عنوان یک گزینه اقتصادی و سازگار با محیط زیست با استفاده از گونه Aci-netobacter radioresistens strain KA2 به طور کارآمدی تصفیه کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد ۱۹۲۵۰۵۸۷۹۶۲۰۰۱ در کمیته پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه به ثبت رسیده است.

حامی مالی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای محمدسعید پورسلیمان با عنوان «بررسی کارایی فرایند کمپوست دومرحله‌ای در زیست‌پالایی لجن‌های نفتی توسط باکتری بومی جداشده از لجن نفتی» در مقطع دکترا بوده است که با حمایت مالی دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه اجرا شد.

مشارکت نویسندگان

تحلیل، تحقیق و بررسی، منابع و نگارش پیش‌نویس: محمد سعید پورسلیمان؛ سید احمد حسینی: مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، اعتبارسنجی، تحلیل، تحقیق و بررسی، منابع، نگارش پیش‌نویس، ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته و بصری‌سازی، نظارت؛ مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، اعتبار سنجی، تحلیل، تحقیق و بررسی، منابع، نگارش پیش‌نویس، ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته، بصری سازی، نظارت: سید احمد حسینی و علیرضا اطمینان؛ مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، اعتبارسنجی، تحلیل، تحقیق و بررسی، منابع، نگارش پیش‌نویس، ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته، بصری‌سازی، نظارت: حمید ابطحی؛ مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، اعتبارسنجی، تحلیل، تحقیق و بررسی، منابع، نگارش پیش‌نویس، ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته، بصری‌سازی، نظارت: علی .

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص این پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه کارکنان و پرسنل محترم دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اراک و دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه که برای انجام این تحقیق کمک کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

www.SID.ir

References

[1] Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresour Technol. 2017; 223:277-86. [DOI:10.1016/j.biortech.2016.10.037] [PMID]

[2] Koolivand A, Naddafi K, Nabizadeh R, Saeedi R. Optimization of combined in-vessel composting process and chemical oxidation for remediation of bottom sludge of crude oil storage tanks. Envir Technol. 2018; 39(20):2597-603. [DOI:10.1080/09593330.2017.1362037] [PMID]

[3] Zhang C, Qi J, Cao Y. Synergistic effect of yeast-bacterial co-culture on bioremediation of oil-contaminated soil. Bioremed J. 2014; 18(2):136-46. [DOI:10.1080/10889868.2013.847402]

[4] Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C. PAH biotransformation and sorption by Fusarium solani and Arthrobacter oxydans isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. Int Biodeterior Biodegradation. 2012; 68:28-35. [DOI:10.1016/j.ibiod.2011.10.012]

[5] Muangchinda C, Rungsihiranrut A, Prombutara P, Soonglerdsongpha S, Pinyakong O. 16S metagenomic analysis reveals adaptability of a mixed-PAH-degrading consortium isolated from crude oil-contaminated seawater to changing environmental conditions. J Hazardous Mater. 2018; 357:119-27. [DOI:10.1016/j.jhazmat.2018.05.062] [PMID]

[6] Zhang Y, Zhao Q, Jiang J, Wang K, Wei L, Ding J, et al. Acceleration of organic removal and electricity generation from dewatered oily sludge in a bioelectrochemical system by rhamnolipid addition. Bioresour Technol. 2017; 243:820-7. [DOI:10.1016/j.biortech.2017.07.038] [PMID]

[7] Mnif I, Mnif S, Sahnoun R, Maktouf S, Ayedi Y, Ellouze-Chaabouni S, et al. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: Comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. Environ Sci Pollut Res Int. 2015; 22(19):14852-61. [DOI:10.1007/s11356-015-4488-5] [PMID]

[8] Koolivand A, Godini K, Saeedi R, Abtahi H, Ghamari F. Oily sludge biodegradation using a new two-phase composting method: Kinetics studies and effect of aeration rate and mode. Process Biochemistry. 2019; 79:127-34. [DOI:10.1016/j.procbio.2018.12.003]

[9] Koolivand A, Naddafi K, Nabizadeh R, Jafari A, Nasseri S, Yunesian M, et al. Application of hydrogen peroxide and fenton as pre-and post-treatment steps for composting of bottom sludge from crude oil storage tanks. Petroleum Sci Technol. 2014; 32(13):1562-8. [DOI:10.1080/10916466.2012.697961]

[10] Koolivand A, Abtahi H, Godini K, Saeedi R, Rajaei MS, Parhamfar M. Biodegradation of oil tank bottom sludge using a new two-phase composting process: Kinetics and effect of different bulking agents. J Mater Cycles Waste Manag. 2019; 21:1280-90. [DOI:10.1007/s10163-019-00881-x]

[11] Zhao Y, Bai Y, Guo Q, Li Z, Qi M, Ma X, et al. Bioremediation of contaminated urban river sediment with methanol stimulation: Metabolic processes accompanied with microbial community changes. Sci Total Envir. 2019; 653:649-57. [DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.10.396] [PMID]

[12] Demichelis F, Pleissner D, Fiore S, Mariano S, Navarro Gutiérrez IM, Schneider R, et al. Investigation of food waste valorization through sequential lactic acid fermentative production and anaerobic digestion of fermentation residues. Bioresour Technol. 2017; 241:508-16. [DOI:10.1016/j.biortech.2017.05.174] [PMID]

[13] Wallace T, Gibbons D, O'Dwyer M, Curran TP. International evolution of Fat, Oil and Grease (FOG) waste management-A review.J Envir Manage. 2017; 187:424-35. [DOI:10.1016/j.jenvman.2016.11.003] [PMID]

[14] Khan S, Afzal M, Iqbal S, Khan QM. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. Chemosphere. 2013; 90(4):1317-32. [DOI:10.1016/j.chemosphere.2012.09.045] [PMID]

[15] Roy A, Dutta A, Pal S, Gupta A, Sarkar J, Chatterjee A, et al. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. Bioresour Technol. 2018; 253:22-32. [DOI:10.1016/j.biortech.2018.01.004] [PMID]

[16] Koolivand A, Rajaei MS, Ghanadzadeh MJ, Saeedi R, Abtahi H, Godini K. Bioremediation of storage tank bottom sludge by using a two-stage composting system: Effect of mixing ratio and nutrients addition. Bioresour Technol. 2017; 235:240-9. [DOI:10.1016/j.biortech.2017.03.100] [PMID]

[17] Chen W, Li J, Sun X, Min J, Hu X. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium Dietzia species CN-3. Int Biodeterior Biodegradation. 2017; 118:110-8. [DOI:10.1016/j.ibiod.2017.01.029]

[18] Bayat Z, Hassanshahian M, Hesni MA. Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel Mactra stultorum collected from the Persian Gulf. Mar Pollut Bull. 2016; 105(1):120-4. [DOI:10.1016/j.marpolbul.2016.02.042] [PMID]

[19] Patowary K, Patowary R, Kalita MC, Deka S. Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. Front Microbiol. 2017; 8:1-14. [DOI:10.3389/fmicb.2017.00279] [PMID] [PMCID]

[20] Das R, Kazy SK. Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: Prospects for in situ bioremediation. Environ Sci Pollut Res. 2014; 21(12):7369-89. [DOI:10.1007/s11356-014-2640-2] [PMID]

[21] Koolivand A, Naddafi K, Nabizadeh R, Nasseri S, Jafari AJ, Yunesian M, et al. Degradation of petroleum hydrocarbons from bottom sludge of crude oil storage tanks using in-vessel composting followed by oxidation with hydrogen peroxide and fenton. J Mater Cycles Waste Manage. 2013; 15(3):321-7. [DOI:10.1007/s10163-013-0121-1]

[22] Koolivand A, Naddafi K, Nabizadeh R, Nasseri S, Jafari AJ, Yunesian M, et al. Biodegradation of petroleum hydrocarbons of bottom sludge from crude oil storage tanks by in-vessel composting. Toxicol Envir Chemistry. 2013; 95(1):101-9. [DOI:10.1080/02772248.2012.753073]

[23] Grace Liu PW, Chang TC, Whang LM, Kao CH, Pan PT, Cheng SS. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. Int Biodeterior Biodegradation. 2011; 65(8):1119-27. [DOI:10.1016/j.ibiod.2011.09.002]

[24] Wu M, Ye X, Chen K, Li W, Yuan J, Jiang X. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. Envir Pollution. 2017; 223:657-64. [DOI:10.1016/j.envpol.2017.01.079] [PMID]

[25] Cai Q, Zhang B, Chen B, Zhu Z, Lin W, Cao T. Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. Mar Pollut Bull. 2014; 86(1-2):402-10. [DOI:10.1016/j.marpolbul.2014.06.039] [PMID]

[26] Wang F, Li C, Wang H, Chen W, Huang Q. Characterization of a phenanthrene-degrading microbial consortium enriched from petrochemical contaminated environment. Int Biodeterior Biodegradation. 2016; 115:286-92. [DOI:10.1016/j.ibiod.2016.08.028]

[27] Jahromi H, Fazaelipoor MH, Ayatollahi S, Niazi A. Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. Fuel (Part A). 2014; 117:230-5. [DOI:10.1016/j.fuel.2013.09.085]

www.SID.ir

[28] Awasthi MK, Selvam A, Chan MT, Wong JWC. Bio-degradation of oily food waste employing thermophilic bacterial strains. Bioresour Technol (Part A). 2018; 248:141-7. [DOI:10.1016/j.biortech.2017.06.115] [PMID]

[29] Koolivand A, Abtahi H, Parhamfar M, Didehdar M, Saeedi R, Fahimirad S. Biodegradation of high concentrations of petroleum compounds by using indigenous bacteria isolated from petroleum hydrocarbons-rich sludge: Effective scale-up from liquid medium to composting process. J Envir Manage. 2019; 248:109228. [DOI:10.1016/j.jenvman.2019.06.129] [PMID]

[30] Ma XK, Ding N, Peterson EC. Bioaugmentation of soil contaminated with high-level crude oil through inoculation with mixed cultures including Acremonium sp. Biodegradation. 2015; 26(3):259-69. [DOI:10.1007/s10532-015-9732-7] [PMID]

www.SID.ir

Archive of SID

This Page Intentionally Left Blank

www.SID.ir