Bioremediation of Oil Spill in Sea Shores of Saudi Arabia

By
Shatha Farouk Q. Morad
Bachelor of Science Botany

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science in Biology (microbiology)

Supervised by
Dr. Kawther El said Fahmi El Shinnawi
Associate Professor of Bacteriology

Faculty of science
King Abdul Aziz University
Jeddah – Saudi Arabia
Jamad alaker 1431 – June 2010

المعالجة البيولوجية للملوثات النفطية في بعض شواطئ المملكة العربية السعودية

إعداد

شذى فاروق قربان مراد

بكالوريوس أحياء نبات

بحث مقدم لنيل درجة الماجستير في العلوم

(أحياء /تخصص أحياء دقيقة)

إشراف

د. كوثر السيد فهمي الشناوي

أستاذ بكتريولوجي مشارك

كلية العلوم للبنات

جامعة الملك عبد العزيز

جدة-المملكة العربية السعودية

جماد الاخر1431هـ – يونيو 2010م

TABLE OF CONTENTS

Examination committee approval ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Dedication..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Acknowledgement ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Acknowledgement to King Abdul-Aziz City ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Arabic Acknowledgement to King Abdul-Aziz City..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Abstract: **11**
Arabic Abstract **11**
Table of contents ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
List of table..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
List of figures ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
List of pictures..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Chapter I ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Introduction..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Chapter II..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
Literature Review..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Benefit of petroleum..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Saving our resources ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Petroleum as problem..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Reducing hydrocarbon ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Facts and effects..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Soil ‘s physicochemical characteristics..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Effect of petroleum on microbial communities: ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
An important consideration ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Various studies..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
hydrocarbon metabolism ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Aim of work ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
Chapter III ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
Materials & Methods..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
1 : Materials ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**

1. Oil : ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2. Media used : ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
3. Solutions: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2: Methods: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.1. Ecological studies: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.1.1.Soil samples collections: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.1. 2. Soil analysis: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.1. 3.Climate: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.2 Microbiological analysis: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.2.1. Determination of the total viable microbial count and total viable oil degrading microorganisms: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.2.2. Detection of activities of certain physiological groups ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.2.2.2. Proteas producers ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.2.2.3. Lipase produces ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. Identification of the isolated microorganisms: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. Identification of the Bacterial isolated ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3.1.1. Staining techniques: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. Conventional tests: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3.1. 2. 1.Aesculin hydrolysis: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 2.Ammonia test : ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 3.Arginine hydrolysis: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 4.Carbohydrate fermentation and oxidation: خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 5.Casein hydrolysis: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 6.Catalse test: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 7.Citrate utilization: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3.1.2.8.Coagulase test: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 9. Hydrogen sulphide production: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 10.Indole formation: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 11.KCN test: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 12.Lipolytic activity: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 13.Methyl red test: ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 14.Nitratase test (nitrate reduction): ..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 15.Oxidase test (cytochrome oxidase test): خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 16.Phenylalanine test (PPA or PPD test): .... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.

2.3. 1. 2. 17.Phosphatase test:..................................خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 18.Starch hydrolysis: ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 19.Tyrosine decomposition:.......................خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 20.Urease test:...خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 2. 21.Voges Proskauer Reaction(VP test) ......خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 3. Mycological methods: ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 3.1.Yeasts...خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 3.2.Fermentation test: ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 1. 3.3.Auxanograms: ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2. Identification of the isolated Actinomyces جعية غير معرّفة.
2.3. 2. 1. identification of genera :...............................خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2. 1.1. cover slip culture technique ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2. 1.2.Electresm microscopy photography technique.خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2. 1.3. Total cell hydrolysate analysis: ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2. 1.3.1. Hydrolysis for diaminopimelic acid detection:-خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2. 1.3.2. Hydrolysis for cell suger detection : خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2.1.3.3. Methods for the classification of the genus *Streptomyces*:.ة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2. 1.3.3.1 Morphological characterization ..خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3. 2.1.3.3.2 Physiological charateristics ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
2.3.3. Identification of the isolated Fangul: جعية غير معرّفة.
2.4. Biodegradation activities:- ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
1-Isolation and purification of the oil- degrading microorganisms: جعية غير معرّفة.
2-Biodegradation activities of the active isolates cultures جعية غير معرّفة.
2.5. Factor affecting the biodegradation activities for the most active strain.الإشارة المرجعية غير معرّفة.
1. Effect of pH:………………………………………………………….. جعية غير معرّفة.
2. Effect of different concentrations of $NaNO_3$ and K_2HPO_4 :……….. جعية غير معرّفة.
3. Effect of different concentrations of petroleum oil: جعية غير معرّفة.
2.6 Effect of inoculation by certain active organisms on the biodegradation capacity in sandy soil: ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
Statistical analysis: ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
Chapter IV ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
Results ……………………………………………………….. خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
Section 1: ....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.

1. Soil Analysis; .....**خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
A- physical analysis: **رجعية غير معرّفة.**
B- Chemical analysis : **رجعية غير معرّفة.**
2. Microbiological analysis : .....**خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
2.1.Total viable counts of mesophilic heterotrophic microorganisms in the *Chenopodiaceae* rhizospher and soil samples of this community at non polluted and polluted locations:.....**رجعية غير معرّفة.**
3. Characterization and identification of microorganisms.....**خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
First group including : Gram positive bacterial **رجعية غير معرّفة.**
Second group Including: Gram Negative bacteria **رجعية غير معرّفة.**
Third group Including: Fungal isolates **رجعية غير معرّفة.**
4. Bacterial genera according to the site of isolation and occurrence as follows.**ارة المرجعية غير معرّفة.**
5. The results of Biodegradation activities of the bacterial strains were recorded in Table (12).....**خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
6. Factor affecting the biodegradation activities for the most active strain.**لأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Effect of inoculation by certain active organisms on the biodegradation capacity in sandy soil: .....**خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Chapter V.....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
General Discussion ..... **خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Importance of Biodegradation process:.....**خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Chemical composition of oil or hydrocarbons:.....**خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.**
Recommendations..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
Chapter VI .....خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
References..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
الملخص.....7

المعالجة البيولوجية للملوثات النفطية في بعض شواطئ المملكة العربية السعودية

المستخلص:

تعتبر المملكة العربية السعودية من اكبر الدول المنتجة و المصدرة للنفط لذا هي عرضة لمخاطر التلوث النفطي و الذي يعد من الأخطار التي تهدد صحة الإنسان والبيئة عامة, فكان من الأهمية أن يتم دراسة المعالجة البيولوجية للملوثات النفطية والتي تعتمد على فعالية الأحياء الدقيقة والمستوطنة طبيعيا في البيئات النفطية و التي اثبت جدارتها في هضم و تحليل الملوثات النفطية.

وقد تم اختيار خليج مردومة بالمنطقة الشرقية من المملكة العربية السعودية لدراسة التلوث النفطي على شاطئ الخليج العربي.

حيث تم في هذه الدراسة تقدير الأعداد الميكروبية الموجودة في التربة غير الملوثة و التربة الملوثة و منطقة الجذور. و سجلت البكتيريا الموجبة لصبغة جرام أعلى تركيز في التربة غير الملوثة في حين كانت البكتيريا السالبة لصبغة جرام ثم الفطريات هي الأكثر سيادة في التربة الملوثة، وقد ظهرت سيادة الاكتينوميسيتات في منطقة الجذور. و تم عزل وتعريف 72 سلالة مكروبيه الممثلة إلى مستوى الجنس; أظهرت هذه السلالات بوضوح قدرتها المتميزة على تحليل مشتقات الزيت الخام (المركبات الهيدروكربونية) بتتبع اختفاء جميع مركبات الالكينات العادية و الحلقية باستخدام جهاز الكروماتوغراف الغازي. وسجلت بكتيريا Bact.No.4 (نوع جديد) أعلى نسبة هضم للزيت و مشتقاته وتم دراسة العوامل التي تؤثر على النشاط التحللي لهذه البكتيريا حيث استطاعت هضم 80.8 % من النفط الخام خلال 21 يوم عند تركيز الأيون الهيدروجيني ويكافئ 7.2 و في وجود المخصبات النيتروجينية 1% من نترات الصوديوم وأيضا المخصبات الفسفورية 0.8% من فسفور بوتاسيوم احادي الهيدروجين. وفي تجربة تطبيقية و التي صممت على تربة صحراوية تم تلويثها 2% من الزيت الخام و اختبرت كفاءة التحلل البيولوجي لهذه الملوثات عند الحقن المكروبي بواسطة البكتيريا النشطة Bact.No.4 و أيضا الحقن بمزرعة مختلطة من (بكتيريا Bact.No.4 و فطر White rot وإستريتوميسيس) وأيضا تم تقدير التحلل البيولوجي عند الحقن المكروبي بالفلورا المكروبية الكاملة حيث تمكنت من إزالة 99% من الزيت الخام و86.5% من الهيدروكربونات المشبعة و28.8% من المركبات الاروماتية في نهاية 63 يوم من التحضين. مما يثبت كفاءة الحقن الميكروبي في التخلص من الملوثات النفطية و مشتقاتها.

الملخص

أصبحت مشكلات البيئة تحظى باهتمام الدول الصناعية المتقدمة وكذلك الدول النامية التي تسعى إلى تحقيق نمو اقتصادي واجتماعي وتقني . ونتيجة لهذا السعي أصبح الوسط الطبيعي عرضه لمخاطر الاستغلال والتنمية غير الرشيدة فاخذ الإنسان في استغلال موارد بيئته الطبيعية وخاصة موارد الطاقة غير المتجددة . فأدخل إلى البيئة الكثير من الملوثات مما كان له آثار بعيدة المدى على التوازن البيئي الطبيعي ، إضافة إلى الكثير من المشاكل البيئية المعقدة والتي تنذر بأخطار جسيمة فضلا عن صعوبة علاجها أو التخلص منها .

الملوثات النفطية هي ومن الملوثات البيئية الخطرة كونها مسببة للسرطانات والطفرات. وتهدف هذه الدراسة لتقدير الأعداد الميكروبية ونشاطها وقدرتها على الهضم والتخلص من الملوثات النفطية على الشاطئ الشرقي في المملكة العربية السعودية وقد تضمنت هذه الدراسة الآتي:

1 -دراسة تقدير أعداد الكائنات الدقيقة في تربة منطقة خليج مردومة والتي تبتعد 25 كم من مدينة الجبيل الصناعية في المملكة العربية السعودية.

2 -تم تقدير الأعداد الميكروبية في ثلاث عينات من التربة ؛ هي تربة غير ملوثة بالنفط كعينة ضابطة (S0) وعينة من جذور النبات السائد في المنطقة ذاتها حيث كان ينتمي إلى الفصيلة الكينوبيدية نبات الخريز salsola baryosma of chenopodiaceae (R4) وعينة من تربة شديدة التلوث بالنفط الخام (S5)

3 -سجلت مجموعة البكتريا غير ذاتية التغذية أعلى نسبة تواجد خلال فصل الشتاء حيث كانت الأعداد ($929.9\pm0.01X10^6$) لكل جرام تربة مجففة من التربة غير الملوثة بالنفط كما سجلت عينة الجذور أعلى الأعداد في المنطقة الملوثة بالنفط ($522.2\pm0.01X10^6$) فكان العدد في التربة الملوثة بالنفط الخام ($471.3\pm0.01X10^6$).

4 -عند دراسة تأثير البيئات الغذائية على معدل تواجد وتركيز أعداد المجموعات الميكروبيـــة , كانت بيئة الاجار المغذي (NAY) هي انسب البيئات حيث ظهر عليهـــا أعلـــى الأعـــداد لمجموعة البكتريا .

حيث سجلت مجموعة الفطريات والاكتينوميسيتات أعلى أعداد لهم على البيئات المعدنية (بيئة CZP وبيئة ISP).

5 -تم عزل وتعريف 72 عزله ميكروبية منها 53 عزله بكتيرية بنسبة تقدر (73.6%) . طبقـــا لمفاتيح التعريف العالمية فقد تم تعريف البكتريا إلى مستوى الجنس , حيث كانت تنتمي ستة عشر جنسا مختلفا منهم تسع أجناس ضمن مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة جرام هي:

Micrococcus., Bacillus, Thiobacillus, Arthrobacter, Corynebacterium, Rhodobacter, Streptomyces, Nocardia and *Saccharomyces*

كما تم عزل وتعريف سبعة أجناس تنتمي إلى مجموعة البكتريا السالبة لصبغة جرام هي:

Pseudmonas, Alcaligeres, Acimetobacter, Flavobacterium, Sphingomoras Salinicoccus and Bacti strain No4.

وأيضا تم تعريف خمسة عشره عزلة فطرية ينتمي للأجناس الآتية:

Aspergillus, White rot, pilobolusa, Scopulariopsis, Cunninghamella, Curvularia, Penicillium, Neurospora, Scedosporium, Saccraromyas, Yeast like fungi, Thamnidium, Pithomyces and stachybotrys.

6 -وقد سجل سيادة ثلاثة أجناس بكتيرية موجبة لصبغة جرام في التربة غيـــر الملوثـــة هـــي *Bacillus , Arthrobacter* and *Rhodobacter* بنسبة (من20-14%) في حين سادت البكتريا السالبة لصبغة جرام في التربة الملوثة بالنفط وأظهرت تأقلم هذه المجموعـــة مـــن

البكتريـــا فـــي ظـــروف التلـــوث حيـــث تواجـــد bact. No. 4 بنســـبة 2% وجـــنس *pseudomonas* بنسبة 18% ثم الكوريني باكتيريم *Corynebacterium* بنسبة 14%.

أما عن توزيع وانتشار بكتريا الاكتينوميسيتات فقد تميزت بتواجدها في منطقة الجذور وكان جنس *Streptomyces* هو الأكثر انتشارا ثم جنس *Nocardia* .

7 -تم دراسة العوامل التي تؤثر على قدرة نشاط الكائنات المحللة لنفط الخام فقد سجلت بكتريـــا bact No4 أعلى نشاط لها عند ph=7.2 وتركيز المخصبات النتروجينيـــة والفوســـفورية بتركيز 5.جم من نترات الصوديوم و 2.جم فوسفات البوتاسيوم أحادي الهيدروجين.

8 -وقد ثبت نجاح الحقن الميكروبي بالكائن النشط بصورة نقيه وفي مزرعة مختلطـــة لزيـــادة المقدرة على هضم النفط الخام ومشتقاته.

وفي تجربة تطبيقية لتربة تم تلويثها بتركيز 2% من زيت البترول السعودي وأضافه المخصـــبات التتروجينية والفسفورية بتركيزات مثالية فسجلت البكتريا النشطة bac No4 زيادة كبيرة في القدرة على هضم من النفط الخام (80.8%) وعند حقن تربة تم تلويثها بحوالي 2% من النفط بمزرعة مختلطة من streptomyces , white rot , bact No4 .

وأيضا تم الحقن بمزرعة مختلطة بالفلورا الميكروبية (التربة) وبعد فترة التحضين تم الكشف عـــن كميات الزيت المتحللة على فترات زمنية متتالية وهي 36,42,21 يوم وكان أعلى نسبة هضم فـــي نهاية فترة 36 يوم حيث تم إزالة 99% من الزيت الخام وحوالي 86,5% مـــن الهيـــدروكربونات المشبعة إضافة إلى 28,8% من الهيدروكربونات الاروماتية وأيضـــا تـــم تتبـــع تحلـــل مشـــتقات الهيدروكربونات الاليفاتية بواسطة جهاز الكروماتوغرافي الغازي للكائنات النشطة.

Bioremediation of Oil Spill in Sea Shores of Saudi Arabia

Abstract:

Kingdom of Saudi Arabia is one of the biggest countries in producing and exporting petroleum. So it has become prone to increasing the scope of oil pollutants which is started to become more clear about their bad effect to the natural environment and being dangerous to human health. It was very important to study the biodegradation effect on oil spills defending on the activation the normal flora of a natural environment or by the action of active selective microorganisms which able to degrade these pollutant. The location under study was Marduma bay, at the eastern Saudi Arabia shore. It was chosen to study this location as a part of oil spill of Arabian Gulf region. In this study, the Total viable microorganisms were counted in non contamination soil, contamination soil and rhizosphere. The higher concentration of microorganisms were recorded as follow; gram positive bacteria in non contamination soil, gram negative bacteria and fungi in contamination soil and actinomycetes in rhizosphere. Seventy two from Representative colonies were isolated, identified to the genes level. All active strains were studied for their ability to degrade crude oil and its fractions alkans fractions were followed by G.C. analysis. The most active strains was use to study the factors affecting the biodegradation activities. It was Bact. strain No.4 which able to degrade a bout 80.8 % of crude oil during 21 days at pH 7.2 and in presence of 1% of nitrogen fertilizers ($NaNO_3$) and 0.8% of (K_2HPO_4) as phosphorous fertilizers.

An applied experiment was design by polluting a sandy soil with 2% crude oil and were tested to study the effect of microbial seeding by the following;

1- The most active Bact.No.4.

2- A mixed culture of Bact.No.4, white rot and Streptomyces.

3- seeding by the total flora.

Which made a removement of 99% of crude oil, 86.5% of hydrocarbons and 28.8% of aromatic at the end of 63 days of the incubation process.

It was recorded the efficacy of microbial seeding to degrade oil and its fraction**.**

Recommendations

Recent increases in public awareness pollution have served to lift it high into the political agenda. The need for effective pollution- control technology even more urgent.

The application of biotechnology for the decontamination of hydrocarbon in soil and ground-water, throughout the industrialized world rapidly gaining, although physical methods including thermal destruction, chemical methods (detergents. Solvent). The most economically effective is the biological methods for any biological process, bacteria and microorganisms which convert the chemical pollutant into biomass, carbon dioxide and water is our tools.

I Process of optimization :

Before one is able to implement a biological treatment system, several major questions must be answered in order to establish a biotreatment program, as follows:

1. Contaminant identification.
2. Contaminant biodegradability.
3. Soil nature.
4. Nuntrient availability (specially nitrogen source.
5. Oxygen availability.
6. Temperature profile.
7. Moisture content.
8. PH profile.

II Enhanced land forming

Enhanced land forming involves : The intimate mix of soil microflora and microbial inoculums and the correct nutrient blend in order to achieve maximum degradation of the pollutants maximum degradation of the pollutants. This occurs by the following:

1. Identification and quantification of the contamination.
2. Determined requirements of C:N:P ration.
3. Biofeasiblity study including:
    * Substrate/creation
    * Biodegradation assay.
    * Total plate count.

The microbiological and chemical profile have been determined an implementation plan can be developed for biological treatment .

Environmental protection Agency in USA (2004)EPA/July 2004, recorded the treatment options including natural attenuation, phytoremediation and/or bioremediation and microbial amendents. This associated with pre-treatment assessment by evaluation of whether bioremediation based on the biodegradability of oil spilled, and oxygen availability, nutrient con centration and environmental factors (PH, temperature and ecological analysis) to achieve a successful treatment for oil spill pollution.