

بررسی تأثیر کاربرد ضایعات آلی و تلقیح باکتری رودوکوکوس در کاهش هیدروکربن‌های نفتی کل یک خاک شور آلوده

هانیه جعفری وفا^۱، احمدعلی پوربابایی^{۱*}، حسینعلی علیخانی^۱، نجمه یزدانفر^۲، مجید خانعلی^۳

^۱گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
^۲پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
^۳گروه مهندسی ماشین‌های کشاورزی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰

چکیده

پاکسازی آلودگی نفتی در محیط ناهمگون خاک با پیچیدگی‌هایی روبه‌رو است که عواملی نظیر شوری خاک و سن آلودگی به‌سختی آن می‌افزایند. این پژوهش با هدف ارزیابی تأثیر یکی از سویه‌های بومی باکتری رودوکوکوس و انواع پسماندهای آلی در کاهش هیدروکربن‌های نفتی کل یک خاک شور آلوده به نفت خام در شرایط انکوباسیون اجرا شد. بدین منظور، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل کامل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار فاکتور تلقیح باکتریایی *Rhodococcus cercidiphylli* Y1M65003 پنج‌درصد ضایعات کمپوست قارچ، پنج‌درصد باگاس نیشکر و افزودن منبع نیتروژن و فسفر با نسبت ۱:۱۰:۱۰۰ از منبع اوره و سوپرفسفات تریپل طراحی گردید. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حذف هیدروکربن‌های کل نشان داد که چهار فاکتور مورد بررسی توانستند اثر معنی‌داری ($P < 0.001$) بر کاهش هیدروکربن‌های کل خاک داشته باشند که از میان آن‌ها فاکتور تلقیح باکتریایی سهم بیشتری در واریانس متغیر وابسته داشت. اثرات متقابل مایه تلقیح باکتریایی با هر یک از فاکتورهای ضایعات کمپوست قارچ، باگاس و منبع نیتروژن و فسفر نیز بر تجزیه هیدروکربن‌های کل خاک معنی‌دار بود ($P < 0.001$). کاراترین تیمار در کاهش هیدروکربن‌های کل نفت خاک تلقیحی از فاکتورهای مایه تلقیح باکتریایی، ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر بود. این تیمار توانست در طی ۶۰ روز، ۳۵/۴ درصد از هیدروکربن‌های کل نفت خاک را کاهش دهد. نتایج نشان داد که افزودن ضایعات کمپوست قارچ و تحریک زیستی ناشی از منبع نیتروژن و فسفر می‌تواند توان باکتری رودوکوکوس را در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی افزایش دهد.

کلید واژگان: ضایعات کمپوست قارچ، باگاس، آلودگی نفتی، تحریک زیستی، تقویت زیستی

مقدمه

یکی از پیامدهای محیط‌زیستی در کشورهای تولیدکننده نفت، آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی است. این ترکیبات در خاک تجمع یافته و عملکرد اکولوژیک خاک را مختل کرده و به منابع آبی و اتمسفر راه یافته و نهایتاً وارد زنجیره غذایی انسان می‌شوند. بنابراین جامعه جهانی توجه روزافزونی به پاکسازی خاک‌های آلوده به نفت دارند (Chen et al., 2020). ایران با بیش از ۱۰۰ سال سابقه حفاری نفت و بیش از ۲۰۰۰۰ کیلومتر خط لوله، با مشکلات جدی مرتبط با آلودگی نفتی، به‌ویژه آلودگی خاک مواجه شده است (Gitipour et al., 2015).

تجزیه ترکیبات نفتی در خاک به‌دلیل آب‌گریزی، ساختار پیچیده ترکیبات، فراهمی زیستی پایین، جذب ذرات خاک، و جذب پایین و ماهیت چندانفازی خاک با دشواری روبه‌رو است (Speight and Arjoon, 2012). هر چه از آلوده شدن خاک به ترکیبات نفتی مدت زمان بیشتری بگذرد، جداسازی این ترکیبات از ماتریس خاک دشوارتر شده و زیست‌فراهمی آن برای ریزجانداران کمتر می‌شود. بنابراین افزایش سن آلودگی، سختی پاکسازی آلودگی‌های نفتی را دوچندان می‌کند (Garousin et al., 2021). از طرفی، برخی ویژگی‌های خاک مانند شوری نیز می‌توانند برای پاکسازی آلودگی‌های نفتی خاک محدودیت ایجاد کنند؛ چرا که شوری خاک تأثیر منفی روی جامعه میکروبی و زیست‌فراهمی اکسیژن و هیدروکربن دارد (Kalami and Pourbabae, 2021). در استان خوزستان مقادیر قابل توجهی خاک آلوده قدیمی به نفت خام در فضای باز انباشته شده، که سابقه آلودگی آنها به بیش از چهل سال می‌رسد. این خاک‌ها غالباً میزان آلودگی نفتی بالایی داشته و همچنین از شوری زیادی رنج می‌برند.

تاکنون روش‌های زیادی برای پاکسازی خاک پیشنهاد شده که از میان آنها افزودن میکروب‌های تجزیه‌کننده

هیدروکربن‌ها به خاک‌های آلوده به نفت روشی مؤثر و دو ستار محیط‌زیست محسوب می‌شود (Ossai et al., 2020). این استراتژی زیست‌پالایی که تحت عنوان تقویت زیستی^۱ شناخته می‌شود، مستلزم افزودن مایه تلقیح میکروبی با توانایی تخریب آلاینده‌ها و تشدید سرعت پالایش خاک است. برای این فرآیند می‌توان از باکتری‌های اگزوزن^۲، اتوکتون‌های^۳ جامعه میکروبی خاک و یا میکروب‌های دست‌کاری‌شده ژنتیکی استفاده کرد (Nwankwegu and Onwosi, 2017). یکی از باکتری‌های قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، باکتری‌های جنس *Rhodococcus* است که می‌تواند در محیط خاک آن‌ها را تخریب کند. پژوهشگران توانایی گونه‌های مختلفی از این باکتری را در تجزیه آلودگی‌های نفتی مورد بررسی قرار داده‌اند. در پژوهشی گونه *Rhodococcus hoagie* در تجزیه آلودگی نفتی مصنوعی موفق عمل کرد و توانست ۸۷ درصد آلودگی را تجزیه کند (Viesser et al., 2020). در پژوهشی دیگر روی خاک‌های استپی بیابانی آلوده به نفت، گونه *Rhodococcus erythropolis* با کمک عوامل تحریک زیستی ۴۳ درصد از آلودگی نفتی را پس از ۱۱۵ روز کاهش داد (Wei et al., 2021). در یک روش تلفیقی با گیاه پالایی، گونه *Rhodococcus ruber* قادر به حذف بیش از هفتاد درصد نفت خام در خاک آلوده شد (Abolhasani Sooraki et al., 2020). گونه *Rhodococcus erythropolis* نیز در یک خاک لوم رسی سیلتی با سن بالای آلودگی، ۳۸ درصد از هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کرد (Pacwa-Płociniczak et al., 2019). اما گزارشی درباره استفاده از این باکتری در خاک‌های لوم شنی شور با آلودگی قدیمی به نفت خام در دسترس نیست.

استفاده از عوامل تحریک زیستی^۴ می‌تواند توان باکتری را در مقابله با محدودیت‌های موجود در خاک

³Autochthonous

⁴Biostimulation

¹Bioaugmentation

²Exogenous bacteria

پالایش زیستی خاک‌های آلوده به نفت استان خوزستان مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی کارایی سویه بومی *Rhodococcus fascians* و انواع ضایعات آلی صنعتی در کاهش هیدروکربن‌های نفتی یک خاک لوم شنی شور آلوده بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک: این پژوهش روی خاک‌های دپو شده متأثر از آلودگی قدیمی نفت خام در عرض و طول جغرافیایی $31^{\circ} 22' N$ و $42^{\circ} 01' E$ واقع در اطراف چاه‌های حفاری شده متروکه در شهرستان اهواز استان خوزستان انجام گرفت. نمونه‌ها را پس از خشک شدن از الک چهار میلی‌متری عبور داده شدند. سپس ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن شامل بافت (Gee and Bauder, 1986)، EC (Rhoads, 1996)، pH (Thomas, 1996)، رطوبت ظرفیت زراعی (FC) (Wang et al., 2003; Rey et al., 2005)، هیدروکربن‌های کل نفت (Total Petroleum Hydrocarbon, TPH) (Song et al., 2008; Adesodun and Mbagwu, 2008)، کربن آلی کل (Nelson and Sommers, 1996)، نیتروژن کل (Bremner, 1996) و فسفر قابل جذب (Olsen and Sommers, 1982) اندازه‌گیری گردید (جدول ۱).

طرح آزمایشی: برای بررسی و غربالگری بهترین روش‌های زیست‌پالایی، چهار فاکتور شامل تلقیح باکتریایی (In)، باگاس نیشکر (B)، کود شیمیایی به‌عنوان منبع نیتروژن و فسفر (CF) و ضایعات کمپوست قارچ (SMC) بکار برده شدند. سطوح چهار فاکتور به شرح زیر است: تلقیح باکتریایی (In) شامل بدون تلقیح باکتریایی (In₀) و تلقیح سویه *Rhodococcus* SNP5 با ۹۵/۴۹ درصد تشابه فیلوژنی به *Rhodococcus fascians* strain LMG3623 و شماره دسترسی OL759129 در GenBank (In₁) (Nikkhah, 2015)؛ باگاس نیشکر (B) شامل بدون (B₀) و با افزودن پنج درصد وزنی باگاس نیشکر (B₁)؛ منبع نیتروژن و فسفر (CF) بدون

افزایش داده و تجزیه آلاینده در طرح‌های زیست‌پالایی را دوچندان کند (Bodor et al., 2020). در تحریک زیستی، عواملی مانند کود شیمیایی، سورفکتانت‌های زیستی، حجم‌دهنده‌ها و پسماندهای آلی که رشد و تولیدمثل ریزجانداران را تقویت کنند، به خاک افزوده می‌شود (Wu et al., 2016). برخی پسماندهای آلی حاصل از فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی در منطقه مورد مطالعه به‌وفور یافت می‌شود. در کارخانه نیشکر هفت‌تپه واقع در استان خوزستان، سالانه حدود ۲۲۰ هزار تن باگاس به‌عنوان محصول جانبی استحصال قند از نیشکر تولید می‌شود که غالباً بدون استفاده باقی می‌ماند (Mohammadi et al., 2020). همچنین سالانه ۷۰۰ تا ۸۰۰ هزار تن ضایعات کمپوست قارچ برای تولید قارچ خوراکی در ایران تولید می‌شود (<https://zaya.io/sy1ka>). این پسماند آلی سرشار از پروتئین، اسیدهای آلی، و مواد فعال زیستی بوده و نسبت به سایر پسماندهای کشاورزی از ارزش غذایی بالاتری برخوردار است (Umor et al., 2021). بنابراین تلاش شد تا از پتانسیل‌های منطقه مورد مطالعه در پاکسازی خاک آلوده استفاده شود.

بر اساس مطالب عنوان‌شده، با توجه به پتانسیل گونه‌های مختلف رودوکوکوس در پاکسازی خاک‌های آلوده به نفت و نبود گزارشی از کاربرد این باکتری در پاکسازی خاک‌های با محدودیت شوری و قدمت آلودگی، از یک سویه بومی رودوکوکوس برای زیست‌پالایی خاک مورد پژوهش استفاده شد. علاوه بر آن با در نظر گرفتن پتانسیل‌های منطقه در عرضه پسماندهای آلی، باگاس و ضایعات کمپوست قارچ به‌عنوان اصلاح‌کننده‌های شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک و منبع نیتروژن و فسفر به‌عنوان عامل تحریک زیستی برای تعدیل شرایط خاک و تشدید توان زیست‌پالایی این باکتری به کار برده شد. بدین منظور، در پژوهش حاضر از سویه بومی باکتری *Rhodococcus fascians* به‌تنهایی و در تلقیح با منبع نیتروژن و فسفر و دو پسماند آلی باگاس و ضایعات کمپوست قارچ برای

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده قدیمی به نفت خام

ویژگی	بافت	EC (dS m ⁻¹)	pH	FC %	TPH (mg.kg ⁻¹)	کربن آلی کل	نیترژن کل	فسفر قابل جذب
میزان	لوم شنی	۸۰/۶	۷/۵۲	۲۶/۲	۸۲۸۹۵	۸/۷۷	۰/۲۶۱	۰/۰۲۵

تولید قند و شکر نیشکر هفت‌تپه که حاوی ۴۵/۴ و ۰/۱۵ درصد کربن و نیترژن بود، تهیه شد (Sluiter et al., 2011). ضایعات کمپوست قارچ نیز از شرکت کشاورزی جلگه دز تهیه شد که حاوی ۲۸/۹ درصد کربن آلی (Nelson and Sommers, 1996) و ۱/۹ درصد نیترژن کل (Tandon, 2005) بود. باگاس در آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و سپس با آسیاب برقی به اندازه دو میلی‌متر خرد شد. این دو پسماند آلی به میزان پنج درصد به خاک اضافه شدند. تیمارها روی ۱۰۰ گرم خاک آلوده به نفت خام در گلدان کوچک مناسب اعمال شدند. با توجه به ترتیب تیمارهای آزمایش، فاکتور مربوط به هر واحد آزمایشی به میزان مورد نیاز به خاک اضافه و به‌طور یکنواخت با آن مخلوط شد. واحدهای آزمایشی پس از اعمال تیمارها در رطوبت ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تنظیم شده و سپس به گرمخانه منتقل شدند. گلدان‌های مذکور به مدت ۶۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت خاک ۷۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری شدند. در پایان این دوره، میزان هیدروکربن‌های کل نفت خاک اندازه‌گیری شد. به این صورت که به ۱۰ گرم خاک از هر تیمار، ۲۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان و استون با نسبت یک به یک افزوده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد و پس از ته‌نشینی با کاغذ صافی فیلتر شد. در نهایت میزان هیدروکربن‌های کل نفت عصاره خاک (Total Petroleum Hydrocarbon, TPH) از روش اسپکتروفتومتری در ۴۲۰ نانومتر محاسبه شد (Song et al., 2002; Adesodun and Mbagwu, 2008).

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور بررسی ارتباط بین صفت اندازه‌گیری شده و تیمارها از روش‌های تک متغیره و مدل

(CF₀) و همراه با افزودن نیترژن و فسفر مورد نیاز (۱/۸۲۶) گرم کود اوره و ۰/۴۲ گرم کود سوپرفسفات تریپل در ۱۰۰ گرم خاک (CF₁)؛ ضایعات کمپوست قارچ (SMC) بدون (SMC₀) و همراه با افزودن پنج درصد وزنی ضایعات کمپوست قارچ (SMC₁)، بنابراین برای ارزیابی روابط بین فاکتورهای تلقیح باکتریایی، باگاس نیشکر، منبع نیترژن و فسفر و ضایعات کمپوست قارچ و اثر آن‌ها روی کاهش هیدروکربن‌های نفتی خاک آلوده، آزمایش به صورت فاکتوریل (چند عاملی) ۲×۲×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی به اجرا درآمد. ۴۸ واحد آزمایشی برای ۱۶ تیمار مختلف (هر کدام با سه تکرار) در نظر گرفته شد.

اجرای آزمایش: به منظور تهیه مایه تلقیح باکتری رودوکوکوس، به میزان دو لوپ از کلنی باکتری تازه رشد یافته در محیط نوترینت آگار به محیط کشت نوترینت برات استریل تلقیح شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفت. سپس از مایه تلقیح آماده با جمعیت CFU/ml ۱۰^۸×۱۲/۸ به میزان ۱۰ درصد حجمی وزنی (معادل ۱۰ میلی‌لیتر به ۱۰۰ گرم خاک آلوده) (Wu et al., 2012) به تیمارها افزوده شد. نیترژن و فسفر از منبع اوره و سوپر فسفات تریپل تأمین گردید. نسبت مناسب عناصر غذایی C:N:P برای پشتیبانی از رشد ریزجانداران و پایداری فرآیند تجزیه زیستی به‌طور معمول ۱:۱۰:۱ است (EPA, 1994; Li et al., 2020). با فرض اینکه میزان هیدروکربن موجود در خاک نشان‌دهنده میزان کربن در دسترس برای تجزیه زیستی است، میزان نیترژن مورد نیاز را تخمین می‌زنند (EPA, 1994). برای تنظیم C:N:P با نسبت ۱:۱۰:۱ میزان ۱/۸۲۶ گرم کود اوره و ۰/۴۲ گرم کود سوپرفسفات تریپل در ۱۰۰ گرم خاک نیاز بود. باگاس مورد نیاز در این آزمایش از ضایعات کارخانه

خطی (GLM⁵) به صورت تجزیه واریانس چهارطرفه (Four-way ANOVA) استفاده گردید. متغیرهای مستقل در این آزمایش، تلقیح باکتریایی (دو سطح)، باگاس (دو سطح)، منبع نیتروژن و فسفر (دو سطح) و ضایعات کمپوست قارچ (دو سطح) و اثرهای آنها به صورت آزمایش فاکتوریل ۲×۲×۲×۲ (در قالب طرح کاملاً تصادفی) و متغیر وابسته شامل هیدروکربن‌های کل نفت خاک بودند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از جدول تجزیه واریانس (فاکتوریل ۲×۲×۲×۲) و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 انجام گرفت. همچنین، در ANOVA اندازه اثر جزئی (Partial Effect Size, Eta^2_p) محاسبه شد. اندازه‌گیری اندازه اثر جزئی در ANOVA، برآوردی از درجه ارتباط بین اثر و متغیر وابسته است. به عبارتی، همبستگی بین اثر و متغیر وابسته را نشان می‌دهد. در واقع می‌تواند به عنوان سهمی از واریانس متغیر وابسته که به هر اثر مربوط می‌باشد، در نظر گرفته شود و مقدار واریانس محاسبه شده برای هر اثر را تشریح می‌کند. این پارامتر از رابطه ۱ محاسبه می‌شود (Tabachnick and Fidell, 2012):

رابطه (۱)

$$Eta^2_p = \frac{SS_{effect}}{SS_{effect} + SS_{error}}$$

که در آن Eta^2_p اندازه اثر جزئی، SS_{effect} مجموع مربعات اثر و SS_{error} مجموع مربعات خطا می‌باشد.

نتایج

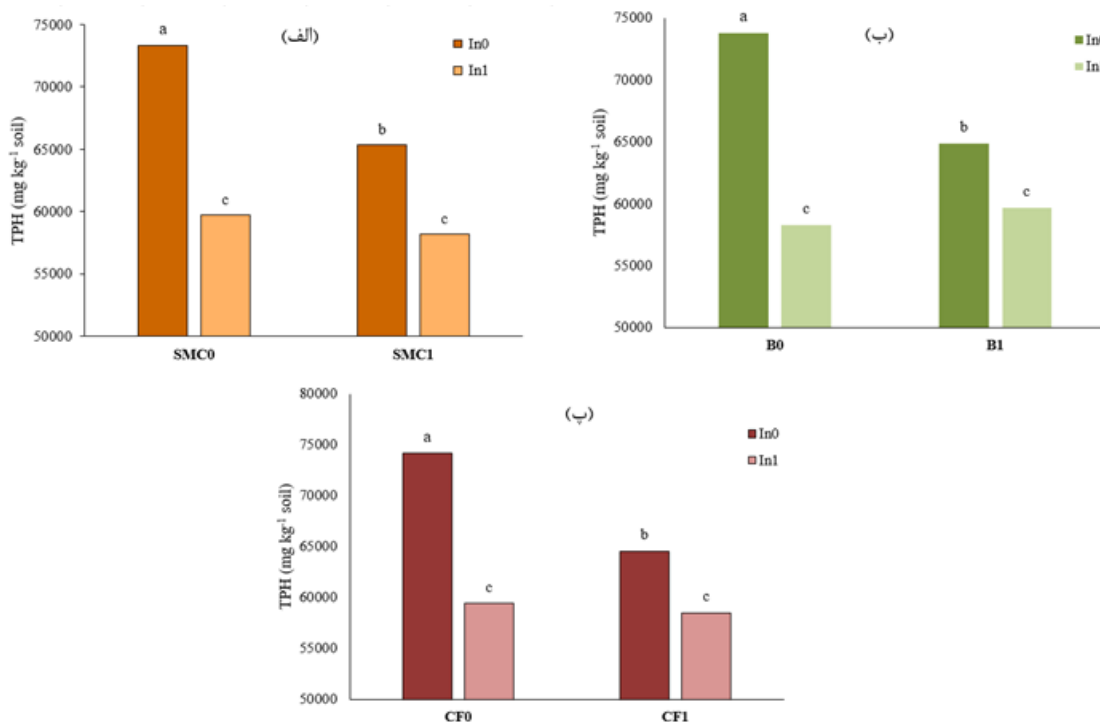
نتایج تجزیه واریانس طرح آزمایشی زیست‌پالایی خاک آلوده به نفت خام در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس این نتایج، فاکتورهای ضایعات کمپوست قارچ، تلقیح باکتریایی، باگاس و منبع نیتروژن و فسفر در سطح ۰/۱ درصد ($P < 0.01$) اثر معنی‌داری بر میزان هیدروکربن‌های کل خاک داشتند. از میان تمام فاکتورها، تلقیح باکتریایی با دارا بودن بالاترین پارامتر اندازه اثر جزئی (Eta^2_p) به میزان ۰/۷۸، بیشترین

تأثیر را در کاهش هیدروکربن‌های کل خاک داشت (جدول ۲). بر اساس پارامتر اندازه اثر جزئی (جدول ۲)، پس از فاکتور تلقیح باکتریایی، به ترتیب منبع نیتروژن و فسفر، ضایعات کمپوست قارچ و باگاس با Eta^2 جزئی ۰/۴۸، ۰/۴۳ و ۰/۳۳ بر متغیر وابسته مورد بررسی بیشترین اثرگذاری را داشتند. بررسی اثرات متقابل دوگانه نشان داد که فاکتور تلقیح باکتریایی بر هر یک از فاکتورهای باگاس ($P < 0.01$)، ضایعات کمپوست قارچ ($P < 0.01$) و منبع نیتروژن و فسفر ($P < 0.01$) اثر معنی‌دار داشت (جدول ۲). کاربرد همزمان مایه تلقیح باکتریایی با هر یک از فاکتورهای ضایعات کمپوست قارچ (شکل ۱-الف)، باگاس (شکل ۱-ب) و منبع نیتروژن و فسفر (شکل ۱-پ) به ترتیب سبب کاهش ۲۰/۱، ۱۹/۱ و ۲۰/۱ درصد از هیدروکربن‌های نفتی خاک آلوده نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین تیمارهای اثرات متقابل دو گانه با هر یک تیمارهای پسماندهای آلی و منبع نیتروژن و فسفر نیز اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۱-الف تا پ). اثرات متقابل سه فاکتور ضایعات کمپوست قارچ، باگاس و منبع نیتروژن و فسفر نیز در سطح ۰/۱ درصد ($P < 0.01$) معنی‌دار شد (جدول ۳). باگاس و منبع نیتروژن و فسفر ۱۶/۶ درصد، باگاس و ضایعات کمپوست قارچ ۱۸/۱ درصد و ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر ۲۵/۱ درصد از میزان هیدروکربن‌های کل خاک را کاهش دادند. کاربرد هر سه فاکتور نیز نسبت به تیمار شاهد ۱۱/۱ درصد از میزان هیدروکربن‌های کل خاک کم کرد (جدول ۳). اثرات متقابل چهارگانه فاکتورها در سطح یک درصد ($P < 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۴). در مقایسه میانگین این اثرات چهارگانه مشاهده شد که کاربرد همزمان هر چهار فاکتور مورد بررسی ۱۹/۵ درصد از آلودگی نفتی خاک نسبت به تیمار شاهد کاسته است (جدول ۴). همانطور که در این جدول قابل مشاهده است، افزودن همزمان ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر به میزان ۳۰/۹ درصد در کاهش هیدروکربن‌های کل نفت خاک اثرگذار بود (جدول ۴).

⁵General Linear Model

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثرات اصلی ضایعات کمپوست قارچ (SMC)، تلقیح باکتریایی (In)، باگاس (B)، کود شیمیایی به عنوان منبع نیتروژن و فسفر (CF) و اثرات متقابل آن‌ها بر هیدروکربن‌های کل نفت (TPH) در طی زمان ۶۰ روز در یک خاک آلوده قدیمی به نفت خام.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
SMC	۱	۲۶۷۷۹۵۷۶۷ (۰/۴۳)***
In	۱	۱۲۹۰۱۶۲۰۷۸ (۰/۷۸)***
B	۱	۱۷۲۲۰۹۴۴۱ (۰/۳۳)***
CF	۱	۳۳۲۹۰۲۲۰۴ (۰/۴۸)***
SMC×In	۱	۱۲۳۸۲۵۶۶۷ (۰/۲۶)**
SMC×B	۱	۱۲۵۸۵۵۴۰۷ (۰/۲۶)**
SMC×CF	۱	۱۰۷۱۹۷۱ (۰/۰۳) ^{NS}
In×B	۱	۳۱۵۶۰۲۲۲۷ (۰/۴۷)***
In×CF	۱	۲۲۴۴۲۵۵۴۳ (۰/۳۹)***
B×CF	۱	۲۷۹۰۰۸۹۳۵ (۰/۴۴)***
SMC×In×B	۱	۳۹۲۱۶۷۰ (۰/۰۱) ^{NS}
SMC×In×CF	۱	۴۸۷۳۳۵۰۸ (۰/۱۲)*
SMC×B×CF	۱	۴۰۱۱۳۱۱۳۰ (۰/۵۳)***
In×B×CF	۱	۲۸۸۲ (۸× ^{-۶}) ^{NS}
SMC×In×B×CF	۱	۱۰۲۶۸۷۵۰۱ (۰/۲۲)**
خطا	۳۲	۱۱۱۰۷۱۹۶
R ² مدل		٪ ۸۷/۷



شکل ۱- اثرات متقابل مایه تلقیح باکتریایی (In) و ضایعات کمپوست قارچ (SMC) (الف)، باگاس (B) (ب)، کود شیمیایی به عنوان منبع نیتروژن و فسفر (CF) (پ) بر میزان هیدروکربن کل نفت (TPH) در یک خاک آلوده قدیمی به نفت خام.

جدول ۳- اثر باگاس (B)، ضایعات کمپوست قارچ (SMC) و کود شیمیایی به عنوان منبع نیتروژن و فسفر (CF) بر میزان هیدروکربن کل نفت (TPH) در یک خاک آلوده قدیمی به نفت خام. اعداد میانگین (n=۳) به همراه انحراف معیار (SD) هستند.

تیمار	TPH (mg kg ⁻¹ soil)	
	B ₁	B ₀
SMC ₀ CF ₀	۶۵۹۶۳ ± ۸۷۳۳ ^{abc}	۷۲۰۳۰ ± ۱۰۲۳۳ ^a
SMC ₁ CF ₀	۵۸۹۹۴ ± ۳۹۹۷ ^{de}	۷۰۱۴۸ ± ۹۳۴۴ ^{ab}
SMC ₀ CF ₁	۶۰۰۳۵ ± ۳۸۰۵ ^{cde}	۶۸۰۲۱ ± ۸۹۴۴ ^{ab}
SMC ₁ CF ₁	۶۴۰۳۲ ± ۳۷۶۱ ^{bcd}	۵۳۹۷۸ ± ۴۵۳۱ ^e

میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) بر اساس آزمون توکی هستند.

جدول ۴- اثر ضایعات کمپوست قارچ (SMC)، تلقیح باکتریایی (In)، باگاس (B)، کود شیمیایی به عنوان منبع نیتروژن و فسفر (CF) بر میزان هیدروکربن کل نفت (TPH) در یک خاک آلوده قدیمی به نفت خام. اعداد میانگین (n=۳) به همراه انحراف معیار (SD) هستند.

تیمار	TPH (mg kg ⁻¹ soil)			
	B ₁		B ₀	
	In ₁	In ₀	In ₁	In ₀
SMC ₀ CF ₀	۵۸۸۲۵ ± ۴۶۵۹ ^{cd}	۷۳۱۰۰ ± ۴۰۱۱ ^{ab}	۶۳۲۷۷ ± ۳۵۴۳ ^{bc}	۸۰۷۸۳ ± ۲۸۷۹ ^a
SMC ₁ CF ₀	۵۶۵۵۱ ± ۳۳۸۶ ^{cd}	۶۱۴۳۸ ± ۳۲۵۳ ^{cd}	۵۹۰۹۵ ± ۲۸۷۵ ^{cd}	۸۱۲۰۱ ± ۳۰۶۴ ^a
SMC ₀ CF ₁	۵۸۱۴۸ ± ۳۰۹۳ ^{cd}	۶۱۹۲۲ ± ۳۹۹۴ ^{cd}	۵۸۶۳۷ ± ۳۸۴۷ ^{cd}	۷۷۴۰۶ ± ۲۵۴۸ ^a
SMC ₁ CF ₁	۶۵۰۱۹ ± ۴۴۲۳ ^{bc}	۶۳۰۴۵ ± ۳۸۱۳ ^{bc}	۵۲۱۷۵ ± ۳۸۳۶ ^d	۵۵۷۸۲ ± ۳۹۷۰ ^{cd}
میانگین	۵۹۶۳۶ ± ۴۷۵۵ ^C	۶۵۰۴۳ ± ۵۸۹۷ ^B	۵۹۹۶۲ ± ۴۸۶۲ ^C	۷۳۷۱۰ ± ۹۳۵۷ ^A

میانگین‌های دارای حروف مشابه بزرگ، کوچک و ایتالیک فاقد اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) بر اساس آزمون توکی هستند.

از طرف دیگر، کاربرد همزمان مایه تلقیح باکتریایی با فاکتورهای ضایعات کمپوست قارچ (۲۶/۸ درصد) و منبع نیتروژن و فسفر (۲۷/۴ درصد) نیز سودمند بود. تلقیح پسماند آلی باگاس با ضایعات کمپوست قارچ (۲۳/۹ درصد) و منبع نیتروژن و فسفر (۲۳/۳ درصد) نیز در کاهش هیدروکربن‌های کل نفت خاک مؤثر بود. همچنین مایه تلقیح باکتریایی در حضور باگاس ۲۷/۱ درصد از هیدروکربن‌های کل نفت خاک را تجزیه کرد. اما کاراترین تیمار در کاهش هیدروکربن‌های کل نفت خاک تلقیحی از فاکتورهای مایه تلقیح باکتریایی، ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر بود. این تیمار توانست در طی ۶۰ روز ۳۵/۴ درصد از هیدروکربن‌های کل نفت خاک را کاهش دهد.

حدود یک پنجم آلودگی نفتی در طی ۶۰ روز شد. با وجود شوری بالا در خاک مورد بررسی و میزان زیاد آلودگی نفتی با قدمت طولانی در آن، محدودیت‌های شدیدی برای زیست‌پالایی خاک ایجاد شده بود. درصد بالای آلودگی برای بسیاری از ریزجانداران بازدارنده است. افزایش قدمت آلودگی نیز زیست‌فراهمی آلاینده‌ها را برای ریزجانداران کم می‌کند (Garousin et al., 2021). همچنین شوری خاک تأثیر منفی بر جامعه میکروبی و زیست‌فراهمی اکسیژن و هیدروکربن دارد (Kalami and Pourbabaee, 2021). با این حال می‌توان گفت که این باکتری با وجود تمام عوامل بازدارنده زیست‌پالایی، توانست نقش مؤثری در پالایش خاک ایفا کند. بنابراین، فرض پژوهش مبنی بر سودمندی باکتری *Rhodococcus fascians* در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی یک خاک شور با آلودگی قدیمی نفت خام تأیید شد. این باکتری در محدودیت مواد غذایی و C/N بالا قادر به رشد بوده و از طرف دیگر با افزایش فراهمی

از طرف دیگر، کاربرد همزمان مایه تلقیح باکتریایی با فاکتورهای ضایعات کمپوست قارچ (۲۶/۸ درصد) و منبع نیتروژن و فسفر (۲۷/۴ درصد) نیز سودمند بود. تلقیح پسماند آلی باگاس با ضایعات کمپوست قارچ (۲۳/۹ درصد) و منبع نیتروژن و فسفر (۲۳/۳ درصد) نیز در کاهش هیدروکربن‌های کل نفت خاک مؤثر بود. همچنین مایه تلقیح باکتریایی در حضور باگاس ۲۷/۱ درصد از هیدروکربن‌های کل نفت خاک را تجزیه کرد. اما کاراترین تیمار در کاهش هیدروکربن‌های کل نفت خاک تلقیحی از فاکتورهای مایه تلقیح باکتریایی، ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر بود. این تیمار توانست در طی ۶۰ روز ۳۵/۴ درصد از هیدروکربن‌های کل نفت خاک را کاهش دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

تلقیح باکتری *Rhodococcus fascians* منجر به حذف

زیستی مؤثر در زیست‌پالایی عمل کند (Asemoloye *et al.*, 2020). همچنین قارچ‌های تجزیه‌کننده لیگنین نیز که در ضایعات کمپوست قارچ به‌وفور یافت می‌شوند در تجزیه ترکیبات پیچیده نفت خام نقش مؤثری دارند (Okarentugba *et al.*, 2015). بنابراین ضایعات کمپوست قارچ با افزودن اسیدهای آلی، آنزیم‌ها و مواد فعال زیستی، علاوه بر افزایش فراهمی عناصر غذایی و تحریک رشد ریزجانداران خاک، فراهمی هیدروکربن‌های نفتی را افزایش داده و محدودیت ناشی از قدمت آلودگی را تعدیل کرد. از سویی دیگر با تنظیم عناصر نیتروژن و فسفر در خاک آلوده، استقرار و رشد مایه تلقیح باکتریایی و همچنین جامعه میکروبی متعلق به ضایعات کمپوست قارچ را مورد حمایت قرار داده و سبب افزایش توان آن‌ها می‌گردد. بنابراین مایه تلقیح باکتریایی به‌عنوان فاکتور تقویت زیستی و ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر به‌عنوان فاکتورهای تحریک زیستی اثرات متقابل مثبتی بر همدیگر گذاشتند. در پژوهشی نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد و کاربرد همزمان مایه تلقیح مناسب و گلوکز به‌عنوان منبع غذایی، هیدروکربن‌های کل خاک را تا ۸۰ درصد تخریب کرد (Pham *et al.*, 2018).

تیمار حاصل از افزودن مایه تلقیح باکتریایی و باگاس، و همچنین مایه تلقیح باکتریایی و منبع نیتروژن و فسفر از نظر توان زیست‌پالایی در رده بعدی قرار گرفتند. باگاس با بهبود شرایط فیزیکی به‌ویژه تهویه خاک، فراهمی اکسیژن را که برای تجزیه هیدروکربن‌ها ضروری است، افزایش می‌دهد و به استقرار جامعه میکروبی و موفقیت برنامه تقویت زیستی در پالایش خاک‌های آلوده به نفت کمک می‌کند (Hamzah *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). همچنین با افزودن باگاس نیز انواع مختلفی از ریزجانداران به خاک اضافه می‌شوند که می‌توانند آنزیم‌هایی مانند پروتاز، سلولز، همی‌سلولاز، لیگنین پراکسیداز، پراکسیداز منگنز و لاکتاز تولید کنند که بر سرعت تخریب هیدروکربن‌های کل خاک مؤثر هستند (Babaei *et al.*, 2020). از طرف دیگر اغلب

عناصر غذایی مسیره‌های کاتابولیکی تجزیه آلاینده را متوقف نمی‌کند. همچنین با تولید سورفکتانت می‌تواند به سوسترای آبگریزی مانند نفت سازگار شود (Kuyukina and Ivshina, 2019).

نتایج قابل ملاحظه‌ای نیز در تأیید اثرات مثبت تحریک زیستی بر توان زیست‌پالایی این باکتری به‌دست آمد. تلفیق دو راهبرد تحریک و تقویت زیستی می‌تواند به‌طور موفقیت آمیزی در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت عمل کند (Wei *et al.*, 2021). در این پژوهش نیز تلفیق دو راهبرد تقویت زیستی (به‌کمک باکتری رودوکوکوس) و تحریک زیستی (به‌کمک ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر) اثرات مثبت معنی‌داری بر جای گذاشت. در واقع بهترین و اثرگذارترین تیمار در زیست‌پالایی خاک‌های شور آلوده به نفت خام استان خوزستان تلفیقی از فاکتورهای مایه تلقیح باکتریایی، ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر بود که توانست در طی دوره آزمایش بیش از یک سوم آلودگی نفتی را تجزیه کند. این تیمار (مایه تلقیح باکتریایی، ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر) در مقایسه با کاربرد همزمان مایه تلقیح باکتریایی و ضایعات کمپوست قارچ بسیار موفق‌تر عمل کرد که این امر، اثرات متقابل مثبت این فاکتورها را بر همدیگر نشان می‌دهد. ضایعات کمپوست قارچ و منبع نیتروژن و فسفر با تعدیل محدودیت‌های خاک آلوده مورد پژوهش، تنظیم شرایط مطلوب تجزیه، وارد کردن منابع ارزشمند غذایی و افزایش فراهمی آلاینده‌های نفتی توانستند محیط مطلوب را برای باکتری رودوکوکوس فراهم کنند و توان آن را افزایش دهند.

ضایعات کمپوست قارچ سرشار از پروتئین، آمینواسید، میسلیوم و باکتری‌ها است. قندهای مختلف، اسیدهای آلی، آنزیم‌ها و مواد فعال زیستی در طی روند رشد می‌سلیم به آن اضافه می‌شوند. این پسماند نسبت به سایر پسماندهای کشاورزی از ارزش غذایی بالاتری برخوردار است (Umor *et al.*, 2021). این پسماند آلی می‌تواند فراهمی عناصر غذایی در خاک را افزایش داده و به‌عنوان یک محرک

نیترژن و فسفر به‌عنوان محرک‌های زیستی، توانست محیط را برای استقرار و رشد باکتری رودوکوکوس در خاک شور آلوده به نفت خام بهبود بخشد. این امر منجر به رشد و فعالیت بیشتر جامعه میکروبی شده و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را افزایش می‌دهد. همچنین با توجه به پتانسیل منطقه مورد مطالعه، باید در نظر داشت که استفاده از پسماندهای آلی مذکور دارای سودمندی اقتصادی نیز است. چرا که در محل مورد مطالعه به‌وفور یافت می‌شوند و غالباً برنامه‌ی جامعی برای مدیریت آنها وجود ندارد. بنابراین کاربرد پسماندهای آلی ضایعات کمپوست قارچ و باگاس در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت می‌تواند علاوه بر ایفای نقش مؤثر در پاکسازی خاک، به مدیریت پسماندهای منطقه مورد مطالعه کمک کرده و صرفه اقتصادی برای پروژه پاکسازی خاک فراهم آورد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور برای حمایت مالی از طرح ۹۸۰۰۳۲۲۶ مصوب ۱۳۹۹/۰۳/۰۱ تشکر و قدردانی می‌گردد.

در تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی، عناصر نیترژن و فسفر در خاک با کاستی مواجه می‌شوند. این امر به ماهیت آلاینده نفت که متشکل از هیدروژن و کربن است، برمی‌گردد. به‌همین دلیل، افزودن عناصر غذایی می‌تواند به روند زیست‌پالایی کمک کرده و به سرعت آن بیفزاید (Sarkar *et al.*, 2020). بر این اساس، کود شیمیایی با تنظیم نسبت C/N اثر مثبتی بر تلقیح باکتریایی برجای گذاشت و سبب شد تا جامعه میکروبی خاک در شرایط مساعدی به رشد و فعالیت بپردازد (Obieze *et al.*, 2020).

با تمام این تفسیرها، برخی گزارش‌ها نیز حاکی از عدم تأثیر برنامه تحریک زیستی بر افزایش موفقیت فرآیند تقویت زیستی است. برای مثال در پژوهشی، باکتری *Rhodococcus erythropolis* به تنهایی در پالایش زیستی خاک آلوده به نفت موفق بوده و تفاوت چندانی با تیمار تحریک زیستی نداشت (Wei *et al.*, 2021). این اختلافات با توجه به شرایط اولیه خاک آلوده، محدودیت‌ها و موانع موجود در فرآیند زیست‌پالایی، نوع آلاینده‌ها، نوع باکتری و عامل تحریک زیستی قابل بررسی است.

به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که استفاده از پسماندهای آلی ضایعات کمپوست قارچ و باگاس، همچنین تنظیم منبع

References

- Abolhasani Sooraki, M., Poozesh, V., Salimi, F., Mehrabian, A. R., 2020. *Rhodococcus ruber* KE1 augmented phytoremediation of crude oil contamination using *Lolium perenne* and *Festuca rubra rubra*. *Advanced Research in Microbial Metabolites and Technology* 3(1), 1-18.
- Adesodun, J. K., Mbagwu, J. S. C., 2008. Biodegradation of waste-lubricating petroleum oil in a tropical alfisol as mediated by animal droppings. *Bioresource Technology* 99(13), 5659-5665.
- Asemoloye, M. D., Chukwuka, K. S., Jonathan, S. G., 2020. Spent mushroom compost enhances plant response and phytoremediation of heavy metal polluted soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 183(4), 492-499.
- Babaei, A. A., Safdari, F., Alavi, N., Bakhshoodeh, R., Motamedi, H., Paydary, P., 2020. Co-composting of oil-based drilling cuttings by bagasse. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 43(1).
- Bodor, A., Petrovszki, P., Kis, Á. E., Vincze, G. E., Laczi, K., Bounedjoum, N., Szilágyi, Á., Szalontai, B., Feigl, G., Kovács, K. L., Rákhely, G., Perei, K., 2020. Intensification of Ex Situ Bioremediation of Soils Polluted with Used Lubricant Oils: A Comparison of Biostimulation and Bioaugmentation with a Special Focus on the Type and Size of the Inoculum. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(11), 4106-4116.
- Bremner, J. M., 1996. Nitrogen total. In:

- Methods of soil analysis Part 3: Chemical methods. Soil Science Society of American and American Society of Agronomy, pp: 1085-1122.
- Chen, C., Zhang, X., Chen, J., Chen, F., Li, J., Chen, Y., Hou, H., Shi, F., 2020. Assessment of site contaminated soil remediation based on an input output life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production* 263, 121422.
- EPA, 1994. How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviewers. <https://www.epa.gov/ust/how-evaluate-alternative-cleanup-technologies-underground-storage-tank-sites-guide-corrective>. United States Environmental Protection Agency.
- Garousin, H., Pourbabae, A. A., Alikhani, H. A., Yazdanfar, N., 2021. A Combinational Strategy Mitigated Old-Aged Petroleum Contaminants: Ineffectiveness of Biostimulation as a Bioremediation Technique. *Frontiers in Microbiology* 0, 363.
- Gee, G. W., Bauder, J. W., 1986. Particle-Size analysis. In: A. Klute (Ed.), *Method of soil analysis, part 1*. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, pp. 383–411.
- Gitipour, S., Hedayati, M., Madadian, E., 2015. Soil Washing for Reduction of Aromatic and Aliphatic Contaminants in Soil. *CLEAN – Soil, Air, Water* 43(10), 1419-1425.
- Hamzah, A., Phan, C.-W., Yong, P.-H., Mohd Ridzuan, N. H., 2014. Oil Palm Empty Fruit Bunch and Sugarcane Bagasse Enhance the Bioremediation of Soil Artificially Polluted by Crude Oil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 23(7), 751-762.
- Kalami, R., Pourbabae, A., 2021. Investigating the potential of bioremediation in aged oil-polluted hypersaline soils in the south oilfields of Iran. *Environmental Monitoring and Assessment* 193(8).
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., 2019. Bioremediation of Contaminated Environments Using *Rhodococcus*. 231-270.
- Li, Q., Huang, Y., Wen, D., Fu, R., Feng, L., 2020. Application of alkyl polyglycosides for enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using *Sphingomonas changbaiensis* and *Pseudomonas stutzeri*. *Science of the Total Environment* 719, 137456.
- Liu, J., Chen, S., Ding, J., Xiao, Y., Han, H., Zhong, G., 2015. Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(24), 10839–10851.
- Mohammadi, F., Roedl, A., Abdoli, M. A., Amidpour, M., Vahidi, H., 2020. Life cycle assessment (LCA) of the energetic use of bagasse in Iranian sugar industry. *Renewable Energy* 145, 1870-1882.
- Nelson, D. W., Sommers, L. E., 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: D. L. Sparks (Ed.), *Methods of soil analysis Part 3: Chemical methods*. Soil Science Society of American and American Society of Agronomy, pp: 961-1010.
- Nikkhah, M., 2015. Study of ability of two plants, *Sparganium* (*Sparganium* sp.) and *Typha* (*Typha* sp.) rhizospheric bacteria to decolorization of some azo dyes. University of Tehran, Iran, 53 p.
- Nwankwegu, A. S., Onwosi, C. O., 2017. Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environmental Technology & Innovation* 7, 1-11.
- Obieze, C. C., Chikere, C. B., Selvarajan, R., Adeleke, R., Ntushelo, K., & Akaranta, O., 2020. Functional attributes and response of bacterial communities to nature-based fertilization during hydrocarbon remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 154, 105084.
- Okerentugba, P.O., Orji, F.A., Ibiene, A.A., Elemo, G.N., 2015. Spent mushroom compost for bioremediation of petroleum hydrocarbon polluted soil: A review. *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology* 4(1), 001-007.
- Olsen, S. R., Sommers, L. E., 1982. Phosphorus. In: A. L. Page (Ed.), *Methods of soil analysis Part 2: Chemical and microbiological properties*. Soil Science Society of American and American Society of Agronomy, pp: 403-430.
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., Hamid, F. S., 2020. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and*

- Innovation 17, 100526.
- Pacwa-Płociniczak, M., Czapla, J., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., 2019. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169, 615-622.
- Pham, V. H. T., Chaudhary, D. K., Jeong, S. W., Kim, J., 2018. Oil-degrading properties of a psychrotolerant bacterial strain, *Rhodococcus* sp. Y2-2, in liquid and soil media. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 34(2).
- Rey, A., Petsikos, C., Jarvis, P. G., Grace, J., 2005. Effect of temperature and moisture on rates of carbon mineralization in a Mediterranean oak forest soil under controlled and field conditions. *European Journal of Soil Science* 56(5), 589–599.
- Rhoads, J. D., 1996. Electrical conductivity and total dissolved solids. In: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R. H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston, M. Sumner (Eds.), *Methods of soil analysis Part 3. Soil Science Society of American and American Society of Agronomy*, pp: 417-435.
- Sarkar, J., Roy, A., Sar, P., Kazy, S. K., 2020. Accelerated bioremediation of petroleum refinery sludge through biostimulation and bioaugmentation of native microbiome. *Emerging Technologies in Environmental Bioremediation* 23–65.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2011. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP).
- Song, Y.F., Jing, X., Fleischmann, S., Wilke, B.M., 2002. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. *Chemosphere* 48(9), 993-1001.
- Speight, J.G., Arjoon, K.K., 2012. *Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products*. John Wiley and Sons, Inc.
- Tabachnick, B.G., Fidell, L.S., 2012. Using multivariate statistics (6th ed.). *New York: Harper and Row*.
- Tandon, H.L.S., 2005. *Methods of analysis of soils, plants, waters, fertilisers & organic manures*. Fertiliser Development and Consultation Organisation.
- Thomas, G.W., 1996. Soil pH and soil acidity. In: D. L. Sparks (Ed.), *Methods of soil analysis Part 3: Chemical methods*. Soil Science Society of American and American Society of Agronomy, pp. 475-490.
- Umor, N. A., Ismail, S., Abdullah, S., Huzaifah, M.H.R., Huzir, N.M., Mahmood, N.A.N., Zahrim, A.Y., 2021. Zero waste management of spent mushroom compost. *Journal of Material Cycles and Waste Management* 23(5).
- Viesser, J.A., Sugai-Guerios, M.H., Malucelli, L.C., Pincerati, M.R., Karp, S.G., Maranhão, L.T., 2020. Petroleum-Tolerant Rhizospheric Bacteria: Isolation, Characterization and Bioremediation Potential. *Scientific Reports* 10(1), 1-11.
- Wang, W. J., Dalal, R. C., Moody, P.W., Smith, C.J., 2003. Relationships of soil respiration to microbial biomass, substrate availability and clay content. *Soil Biology and Biochemistry* 35(2), 273-284.
- Wei, Y., Chen, J., Wang, Y., Meng, T., Li, M., 2021. Bioremediation of the Petroleum Contaminated Desert Steppe Soil with *Rhodococcus erythropolis* KB1 and Its Effect on the Bacterial Communities of the Soils. *Geomicrobiology Journal* 38(10), 842-849.
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., Chen, L., 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 107, 158-164.
- Wu, T., Xie, W.J., Yi, Y.L., Li, X.B., Yang, H.J., Wang, J., 2012. Surface activity of salt-tolerant *Serratia* spp. and crude oil biodegradation in saline soil. *Plant, Soil and Environment* 58(9), 412-416.