Journal of Natural Environment

Online ISSN: 2423-7817

University of Tehran Press

Homepage: https://jne.ut.ac.ir/

Bioaugmentation of in-situ degradation of petroleum hydrocarbon from soil by indigenous microbial consortium

Zahra Hozhabri[1] | Alireza Habibi[2]✉ | Ali Beheshti Ale Agha[3] | Rouhallah Sharifi[4]

1. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: z.hozhabri@stu.razi.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Petroleum and Chemical Engineering, Faulty of Enginnering, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: a.habibi@razi.ac.ir
3. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: beheshti@razi.ac.ir
4. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: r.sharifi@razi.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received 17 March 2022

Received in revised form 14 July 2022

Accepted 22 August 2022

Published online 5 May 2023

Keywords:

Indigenous bacteria,

Biodegradation,

Removal of hydrocarbon pollutants,

Microbial consortium.

ABSTRACT

Removals of petroleum contaminants from soil is an environmental necessity due to the negative impacts on human and other living organisms. In environmental and economic aspects, biodegradation is the best treating methods for in-situ removal of hydrocarbons from contaminated soil. In this method, application of indigenous microorganisms could minimize perturbation of the soil ecosystem, and thus the treated soil could maintain biological activities for agriculture prepuces after the treatment. In this study, the potential of removal of crude oil contamination from soil by biodegradation process was evaluated in mud pit zones in Naft Shahr resource. In order to evaluate biostimulation, two treatments were applied; plowing alone and plowing together with 0.1 kg/m^2 of urea as a source of nitrogen. In order to evaluate bioagumentation, in addition to plowing and adding urea, a suspension of native microbial consortium (consisting of *Bacillus thuringiensis*, *Arthrobacter citreus*, and *Candida catenulata* (a biosurfactant producer yeast)) was added to the soil in an amount of 100 mL/m^2. The results indicated that the total petroleum hydrocarbon (TPH) removal was increased from 10.73% to 53.83% after 120 days by the biostimulation treatment. Also, bioagumentation could remove up to 74% of TPH at the same conditions. In this study, removals of main heavy hydrocarbons (> C_{12}) and higher biodegradation rate were the advantages of bioagumentation process by the microbial consortium.

Cite this article: Hozhabri, Z., Habibi, B., Beheshti Ale Agha, A., & Sharifi, R. (2023). Bioaugmentation of In-situ degradation of petroleum hydrocarbon from soil by indigenous microbial consortium. *Journal of Natural Environment*, 76 (1), 93-103. DOI: http//doi.org/10.22059/jne.2022.340663.2419

© The Author(s). Publisher: University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/jne.2022.340663.2419

محیط زیست طبیعی

شاپای الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۸۱۷

Homepage: https://jne.ut.ac.ir/

انتشارات دانشگاه تهران

تشدید زیستی تجزیهٔ هیدروکربن‌های نفتی خاک به روش درمحل با استفاده از کنسرسیوم میکروبی بومی

زهرا هژبری[۱] | علیرضا حبیبی[۲]✉ | علی بهشتی آل‌آقا[۳] | روح‌الله شریفی[۴]

۱. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: z.hozhabri@stu.razi.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه مهندسی شیمی و نفت، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: a.habibi@razi.ac.ir

۳. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: beheshti@razi.ac.ir

۴. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: r.sharifi@razi.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۳۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۲/۱۵

کلیدواژه‌ها:

باکتری‌های بومی،

پالایش زیستی،

حذف آلودگی نفتی،

کنسرسیوم میکروبی.

چکیده

حذف آلاینده‌های نفتی از خاک با توجه به اثرات ناخوشایندی که بر انسان و سایر موجودات زنده می‌گذارند، یک ضرورت محیط زیستی است. پالایش زیستی یکی از بهترین روش‌های تیمار به‌لحاظ ملاحضات محیط زیستی و اقتصادی، برای حذف درمحل هیدرورکربن‌ها از خاک‌های آلوده است. در این روش، استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی می‌تواند حداقل آشفتگی در زیست‌بوم خاک ایجاد کند بنابراین خاک تیمارشده، فعالیت زیستی خود را برای انجام امور کشاورزی، حفظ می‌نماید. در این پژوهش، امکان تجزیهٔ زیستی هیدورکربن‌های نفتی از خاک‌های آلوده در حوضچه‌های گل حفاری موسوم به مادپیت واقع در منطقهٔ بهره‌برداری نفت‌شهر استان کرمانشاه، توسط میکروارگانیسم‌های بومی انجام گرفت. به‌منظور ارزیابی تحریک زیستی، دو تیمار شخم تنها و شخم همراه با kg/m^2 ۰/۱ اوره به‌عنوان منبع تأمین‌کنندهٔ نیتروژن اعمال شد. به‌منظور ارزیابی تشدید زیستی علاوه بر شخم و افزودن اوره، سوسپانسیون کنسرسیوم میکروبی بومی (متشکل از گونه‌های باکتریایی *Bacillus thuringiensis* و *Arthrobacter citreus* و گونهٔ مخمر تولیدکنندهٔ بیوسورفکتانت *Candida catenulata* به مقدار ۱۰۰ mL/m^2 به خاک افزوده شد. نتایج نشان داد که در تیمار تحریک زیستی با انجام شخم زدن و افزودن اوره در مقایسه با شاهد، درصد حذف هیدروکربن‌های نفتی از ٪۱۰/۷۳ به ٪۵۳/۸۳ طی مدت ۱۲۰ روز افزایش می‌یابد. همچنین فرآیند تشدید زیستی توانست در حذف مؤثر ترکیبات نفتی به‌میزان ٪۷۴ طی مدت مشابه مؤثر باشد. حذف قسمت عمدهٔ هیدروکربن‌های سنگین ($>C_{12}$)، و سرعت تجزیهٔ زیستی بالاتر از مزایای استفاده از فرآیند تشدید زیستی توسط کنسرسیوم میکروبی در کار حاضر بود.

استناد: هژبری، زهرا؛ حبیبی، علیرضا؛ بهشتی آل‌آقا، علی و شریفی، روح‌الله (۱۴۰۲). تشدید زیستی تجزیهٔ هیدروکربن‌های نفتی خاک به روش درمحل با استفاده از کنسرسیوم میکروبی بومی. *محیط زیست طبیعی*، ۷۶ (۱)، ۱۰۳-۹۳.

DOI: http//doi.org/10.22059/jne.2022.340663.2419

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

مقدمه

انتشار مواد نفتی به خاک در مراحل استخراج، فرآوری، انتقال و نیز نگهداری، امری شایع و اغلب گریزناپذیر است. مواد نفتی با وزن مولکولی بالا اغلب به‌دلیل تعامل اندک با محیط آبی برای مدت طولانی در خاک منطقهٔ آلوده‌شده باقی می‌مانند و به لایه‌های زیرین نفوذ می‌کنند. مواد نفتی هرچه در عمق بیشتری از خاک نفوذ کنند، از بین بردن آن‌ها سخت‌تر است (Bento *et al*., 2005). آلاینده‌های نفتی آروماتیک نه‌تنها باعث آلودگی خاک و کاهش تنوع میکروبی آن می‌شوند، بلکه از طریق نشر به آب‌های سطحی و زیرزمینی، باعث آلودگی منابع آب و زمین‌های پایین‌دست می‌شوند. این ترکیبات، سمیت بالایی دارند و از طریق گردوخاک مناطق آلوده، چرای دام و حتی آلودگی اتمسفر در نتیجه تبخیر، وارد چرخهٔ غذایی می‌شوند و مشکلات زیادی برای سلامت انسان به‌وجود می‌آورند (Das and Chandran, 2011; Dongfeng *et al*., 2011). آلاینده‌های نفتی از سوی سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا به‌عنوان آلاینده‌های اولویت‌دار جهت حذف از منابع طبیعی، طبقه‌بندی شدند. براساس گزارش‌هیا داده‌شده، بیش از ۱۵۰۰۰۰۰ مترمکعب از خاک‌های کشور با نفت و مشتقات نفتی آلوده شده‌اند و اثرات مخرب هیدروکربن‌های نفتی، ضرورت پاک‌سازی آلودگی‌های نفتـی را بـیش از پـیش مورد توجه قرار داده است (Hassanshahian *et al*., 2012). حذف این آلاینده‌ها، کمک شایان توجه‌ای به حفظ اکوسیستم و بازیابی اراضی آلوده خواهد کرد.

در روش‌های حذف فیزیکی، از ویژگی‌های فیزیکی آلاینده‌ها مانند ویسکوزیته، حلالیت، چگالی و حالت فیزیکی آلاینده‌ها استفاده می‌شود. معمولاً روش‌های فیزیکی پاک‌سازی خاک‌های آلوده روش لندفیل[1]، سوزاندن یا تصفیهٔ حرارتی است (Chandra *et al*., 2013). روش لندفیل، نوعی سیستم دفن بهداشتی مواد آلوده است که تعادل اکولوژیک محیط را برهم می‌زند. میکروارگانیسم‌های که توانایی تجزیهٔ زیستی نفت را دارند، در روش سوزاندن از بین می‌روند و سمیت نفت باقیمانده، افزایش می‌یابد همچنین باعث آلودگی هوا نیز می‌شود (Hamby, 1996). روش تصفیهٔ حرارتی، شامل گرم کردن خاک تا دمای نزدیک به ۶۰۰°C است تا آلاینده‌ها به شکل گازی تبدیل شوند. این روش‌ها بسیار گران و غیراقتصادی هستند (Das and Chandran, 2011; Hassanshahian *et al*., 2012). روش‌های شیمیایی نیز مانند استفاده از حلال‌ها و مواد اکسنده برای حذف هیدروکربن‌های نفتی از محیط زیست، به‌دلیل اثرات جانبی که بر روی اکوسیستم دارند و یا سمیت موادی که گاهی اوقات خطرناک‌تر از آلودگی نفتی می‌باشد، مطلوب نیستند (Hamby, 1996). از این‌رو، روش‌های حذف فیزیکی–شیمیایی در سطوح کم و آلودگی‌های شدید کاربرد دارند ولی در حجم‌های زیاد بسیار گران‌قیمت و ناکارآمد هستند (Das and Chandran, 2011; Varjani and Upasani, 2016). امروزه از روش‌هایی که به‌صورت طبیعی هیدروکربن‌ها را تجزیه می‌کنند، استفاده می‌شود. برخی از گیاهان و میکروارگانیسم‌های خاک، می‌توانند طی فرآیند تجزیهٔ زیستی به‌صورت کارآمد و با هزینهٔ پایین آلودگی‌های نفتی را در سطح وسیع، تجزیه یا سمیت‌زدایی کنند (Ahamed *et al*., 2010). در فرآیند تجزیهٔ زیستی، میکروارگانیسم از هیدروکربن نفتی به‌عنوان منبع کربن و انرژی مصرف کرده و موجب تغییر ساختار آن‌ها از حالت خطرناک به کم‌خطر یا بی‌خطر می‌گردد.

به‌طور طبیعی، در مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، میکروب‌ها با شرایط سازگار شده و در اثر تغییرات ژنتیکی، توانایی تجزیه و حتی تغذیه از هیدروکربن‌های نفتی به‌ویژه ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک را پیدا می‌کنند (Haque *et al*., 2022). البته درصد کمی از میکروب‌های محیط می‌توانند باعث حذف ترکیبات نفتی شوند و از این‌رو است که اغلب سرعت تجزیهٔ زیستی پایین است (Zhen *et al*., 2020). ترکیب نفت‌خام وابستگی بالایی به مکان، عمر و عمق مخزن نفتی دارند و نوع هیدروکربن با توجه به وزن مولکولی و نوع ساختار از میزان تجزیه‌پذیری متفاوتی برخوردار است (Haque *et al*., 2022). ترکیبات هیدروکربنی خطی اغلب راحت‌تر از ترکیبات حلقوی تجزیه می‌شوند. اما در ترکیبات خطی نیز، ترکیبات با زنجیر بلند به‌دلیل ماهیت آبگریزی زیاد، دسترسی زیستی محدودی دارند و از سرعت تجزیهٔ کمتری نسبت به هیدروکربن‌های خطی با طول زنجیر متوسط برخوردار هستند (Feng *et al*., 2021). هیدروکربن‌های خطی کوتاه زنجیر (اغلب $<C_6$) نیز عموماً نقش مهار کننده‌ای بر رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده دارند (Haque *et al*., 2022). بنابراین میکروب‌های یک منطقهٔ آلوده به‌دلیل سازگاری زیستی که در طول زمان یافته‌اند، بیشترین کارایی را در همان منطقه دارند. یکی از بهترین روش‌های حذف آلودگی خاک، تشدید تجزیهٔ

[1]Land fill

زیستی[2] آلاینده‌ها درمحل وقوع آلودگی و با استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی است که حداقل آشفتگی در زیست‌بوم خاک ایجاد می‌کنند (Hassanshahian and Boroujeni, 2016; Habibi and Babaei, 2017). در این‌حالت، سویه‌های بومی از مناطق آلوده جداسازی می‌شود و کارایی آن‌ها در شرایط مختلف ارزیابی می‌گردد. در نهایت، این سویه‌ها در حجم بالا تولید و در مناطق آلوده پخش می‌گردد.

میکروب‌های متنوعی از گروه باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها در پالایش آلودگی‌های نفتی نقش دارند ولی براساس گزارش‌های متعدد، باکتری‌ها، عمده‌ترین گروه میکروبی در پالایش زیستی آلودگی‌های نفتی هستند (Abbasian *et al*., 2015; Haque *et al*., 2022). البته هر گونه یا سویهٔ میکروبی توانایی ویژه‌ای در حذف گروهی از هیدروکربن‌ها را پیدا کرده است. برخی ترکیبات آلیفاتیک را به‌خوبی تجزیه می‌کنند و برخی ترکیبات تک‌حلقوی یا چندحلقوی و برخی نیز روی رزین‌ها عمل می‌کنند. باکتری‌های مثل *آکروموباکتر*، *اکتینوباکتر*، *فلاوباکتریوم*، *سودوموناس*، *باسیلوس* و *متیلوباکتریوم* و قارچ‌هایی مثل *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم*، *فوزاریوم* و *پسیلومایسز* و مخمرهایی مثل *Candida*، *Rhodotorula* و *Pichia* به‌عنوان عوامل پالایش زیستی مشتقات نفتی گزارش شده‌اند (Das and Chandran, 2011; Abbasian *et al*., 2015; Haque *et al*., 2022).

با توجه به ماهیت آب‌گریز ترکیبات نفتی و محدودیت دسترسی زیستی میکروارگانسیم‌ها به هیدروکربن‌ها، خصوصاً در خاک، در بسیاری از مطالعات استفاده از سورفکتانت‌های شیمیایی و سورفکتانت‌هایی با منشاء زیستی مورد توجه قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، افزودن ۱/۵ گرم بیوسورفکتانت سوفورولیپیدی به‌ازای هر یک کیلوگرم خاک آلوده، موجب شد تا میزان بازدهٔ حذف کل هیدروکربن‌ها از مقدار ٪۴۴/۵ به ٪۵۷/۷ با استفاده از یک کنسرسیوم بومی افزایش یابد (Feng *et al*., 2021). بدون افزودن کنسرسیوم میکروبی بومی، بازدهٔ حذف تنها در حدود ٪۱۲/۲ گزارش شد (Feng *et al*., 2021). اخیراً نیز گونهٔ بومی از جنس *Enterobacter* برای تشدید تجزیهٔ زیستی آلودگی‌های هیدروکربنی از خاک مورد استفاده قرار گرفته است و نتایج، افزایش ٪۵۳/۱۳ در بازدهٔ حذف کل هیدروکربن‌های نفت‌خام را با استفاده از این گونه نشان داد (Sun *et al*., 2022). بررسی مشخصات مولکولی از وجود آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیکی (ژنوم *ppa* و *hpa*) و نیز ژنوم تجزیه‌کنندهٔ اسیدهای چرب (*fad-gene cluster*) در گونهٔ *Enterobacter* sp. SAVR S-1 با توانایی همزمان حذف ترکیبات خطی و حلقوی، نقش مؤثری در حذف آلودگی‌های نفتی از خود نشان داد (Sun *et al*., 2022). همچنین بررسی بیشتر جمعیت میکروبی خاک در این تحقیق نشان داد که افزودن *Enterobacter* sp. در پویایی جمعیت تجزیه‌کنندهٔ بومی خاک و نیز افزایش میزان آنزیم‌های تجزیه‌کننده مؤثر بوده است (Sun *et al*., 2022).

استفاده از گونه‌های میکروبی توانمند در حذف ترکیبات نفتی که می‌توانند در مسیر تجزیهٔ هیدروکربن‌ها، تولید بیوسورفکتانت کنند، روش دیگری است که در فرآیند تشدید زیستی مورد توجه قرار گرفته است. در این روش، افزایش دسترسی زیستی به هیدروکربن‌ها با تولید بیوسورفکتانت توسط گونه‌های میکروبی که جهت تشدید زیستی به خاک افزوده شده است، صورت می‌گیرد. بسیاری از باکتری‌ها همانند *باسیلوس*‌ها و *سودوموناس*‌ها و مخمرها خانواده *کاندیدا* برای این منظور کاربرد گسترده ای دارند (Wang *et al*., 2022).

در این تحقیق، امکان تحریک تجزیهٔ زیستی[3] هیدورکربن‌های نفتی از خاک‌های آلوده در حوضچه‌های گل حفاری موسوم به مادپیت[4] واقع در منطقهٔ بهره‌برداری نفت‌شهر استان کرمانشاه، توسط سلول‌های محیطی با انجام عملیات آبیاری، شخم‌زدن، و افزودن اوره به‌عنوان منبع تأمین‌کنندهٔ نیتروژن، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، به‌منظور بررسی عملکرد فرآیند تشدید زیستی، کنسرسیوم میکروبی متشکل از گونه‌های باکتریایی جداسازی شده بومی از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در همراهی با گونهٔ مخمر تولید کننده بیوسورفکتانت (*Candida catenulata*) مورد استفاده قرار گرفت.

[2]Bioaugmentation
[3]Biostimulation
[4]Mud pit

جدول ۱. نوع تیمارهای بررسی شده در تجزیهٔ زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی

نوع تیمار	نام تیمار	آبیاری	شخم زدن	افزودن اوره	افزودن کنسرسیوم بومی
بهبود شرایط محیطی با تنظیم رطوبت اولیه	شاهد	√	×	×	×
تحریک تجزیه زیستی با شخم زدن	الف	√	√	×	×
تحریک تحریک زیستی با افزودن اوره	ب	√	√	√	×
تشدید تجزیه زیستی با کنسوسیوم میکروبی بومی	ج	√	√	√	√

روش‌شناسی پژوهش

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این مطالعه، مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت *Candida catenulata* با شمارهٔ دسترسی KP324968 (Babaei and Habibi, 2018) و دو باکتری *Bacillus thuringiensis* (MN704408.1) و (MT786388) *Arthrobacter citreus* بود که پیش از این توسط همین گروه، از خاک‌های آلودهٔ منطقهٔ نفت‌شهر جداسازی و شناسایی شدند و توانایی آن‌ها در حذف ترکیبات نفت خام به اثبات رسیده بود.

مطالعات تجزیهٔ زیستی ترکیبات نفت خام از خاک‌های آلودهٔ منطقهٔ بهره‌برداری نفت‌شهر در استان کرمانشاه (۳۳٫۹۹۹۰° شمالی، ۴۵٫۴۹۳۴° شرقی)، از تیرماه ۱۴۰۰ و بر روی یکی از مادپیت‌های واحد بهره‌برداری به‌وسعت ۳۰×۴۰m، به مدت ۱۲۰ روز انجام شد. به‌منظور تسطیح و یکنواخت‌سازی آلودگی نفتی در خاک از بولدزر استفاده شد و برای مقایسهٔ عملکرد تجزیهٔ زیستی این زمین آلوده به چهار قطعهٔ کوچک‌تر با ابعاد ۳۰×۱۰m تقسیم شد. یکی از قطعات به‌عنوان شاهد انتخاب شد و بر روی سه قطعهٔ دیگر، یکی از تیمارهای "الف"، "ب" و "ج" انجام گرفت (جدول ۱). در قطعه‌زمین شاهد، هیچ‌گونه عملیاتی به‌غیر از تنظیم رطوبت در سطح ۵٪ وزنی، به‌منظور بهبود شرایط محیطی میکروارگانیسم‌های طبیعی موجود در خاک[5] صورت نگرفت. برای آبیاری از سیستم اطفای حریق ماشین‌های آتش‌نشانی استفاده شد. بررسی اثر تهویهٔ خاک به‌منظور تحریک میکروارگانیسم‌های هوازی موجود در خاک با انجام تیمار "الف" و توسط شخم‌زدن انجام شد. عملیات زیرورو کردن خاک آلوده تا عمق ۲۰cm توسط تراکتور با استفاده از پنجه‌غازی انجام شد و سپس آبیاری انجام شد. اثر افزودن اوره به‌عنوان منبع نیتروژن در تیمار جداگانه‌ای با عنوان تحریک تجزیهٔ زیستی با افزودن اوره (تیمار ب) مورد بررسی قرار گرفت. زیرا، نتایج مطالعات پیشین توسط گروه حاضر، نشان داد که محتوای مواد آلی از جمله منبع نیتروژن خاک منطقه برای حذف هیدروکربن‌های موجود در خاک کافی نیست. بنابراین با افزودن محلول اوره عملیات تحریک زیستی انجام شد. در این تیمار، بعد از عملیات شخم‌زدن، آبیاریصورت گرفت و سپس کود اوره به‌میزان ۰/۱ kg/m^2 به‌صورت محلول در آب و با استفاده از آبپاش به خاک اضافه شد. نقش افزودن کنسرسیوم میکروبی بومی جداسازی شده با تیمار تشدید تجزیهٔ زیستی (تیمار "ج") مورد بررسی قرار گرفت. در تیمار "ج"، بعد از عملیات شخم‌زدن، آبیاری انجام شد، سپس کود اوره به‌صورت محلول در آب به‌میزان ۰/۱ kg/m^2 و کنسرسیوم میکروبی متشکل از مخمر *Candida catenulata* با جمعیت 1×10^5 CFU/mL و دو باکتری *Bacillus thuringiensis* و*Arthrobacter citreus* با جمعیت 1×10^9 CFU/mL و با میزان ۱۰۰ mL/m^2 به‌صورت اسپری به خاک افزوده شد. برای تهیهٔ کنسرسیوم میکروبی، از محیط کشت نوترینت براث[6] برای کشت باکتری‌ها و از محیط کشت مایع عصارهٔ سیب‌زمینی–گلوکوز برای کشت مخمر استفاده شد. سلول‌ها به‌طور جداگانه در فلاسک‌های ۵۰۰mL درون یک انکوباتور همزن‌دار با دمای ۳۰°C و ۱۸۰rpm به مدت ۲۴h کشت داده شدند. سپس، سلول‌های رشدیافته تنظیم جمعیت شدند و به نسبت برابر باهم مخلوط و کنسرسیوم نهایی را تشکیل دادند.

جهت تعیین محتوای کل هیدروکربن‌های نفتی[7] (TPH) موجود در خاک، استخراج هیدروکربن‌های نفتی توسط حلال هگزان و با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد (Rahbari-Sisakht *et al*., 2017). بدین‌منظور، ۱۰۰g از هر نمونه خاک وزن شد و داخل محفظهٔ دستگاه سوکسله گذاشته شد و استخراج هیدروکربن‌ها به‌مدت ۳h به انجام رسید. برای هر نمونه، ۳ تکرار صورت گرفت و مقادیر اندازه‌گیری شده متوسط±خطا گزارش شد. جهت اطمینان از تعیین درصد حذف TPH علاوه بر روش وزن‌سنجی، از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. در روش وزن‌سنجی، خاک‌ها پس از استخراج هیدروکربن، به‌مدت ۲۴h درون یک آون با

[5]Bioattenuation
[6]Nutrient broth
[7]Total petroleum hydrocarbons

دمای ۱۰۰°C خشک شدند و از تفاضل کاهش وزن حاصل درصد حذف TPH از رابطهٔ ۱ تعیین شد. در روش اسپکتروفتومتری، چگالی نوری[8] (OD) محلول حاصل از سوکسله پس از عبور از کاغذ صافی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰nm اندازه‌گیری شد (Rahman *et al*., 2002). برای کالیبراسیون بر اساس روش استاندارد (EPA 418.1)، مقادیر مختلفی از نفت‌خام در حلال هگزان حل شد و چگالی نوری محلول‌های حاصل، تعیین شد. در نهایت، میزان حذف TPH با استفاده از رابطهٔ ۱ تعیین شد.

رابطهٔ ۱

$$\text{بازدهٔ حذف}(\%) = 100 \times \frac{S_0 - S}{S_0}$$

در این رابطه، S_0 و S به‌ترتیب مقادیر TPH در ابتدا و پس از هر تیمار است.

برای تفکیک هیدروکربن‌های آلوده‌کننده خاک به ترکیبات اشباع، آروماتیک، رزین و آسفالتین و اندازه‌گیری آن‌ها از روش استاندارد ASTM D4124–09 موسوم به SARA[9] استفاده شد (Fan and Buckley, 2002). در این روش، ۱۰g از ترکیبات نفتی استخراج شده با نرمال هپتان مخلوط شده و آسفالتین آن به‌صورت رسوب، جدا شد. میزان آسفالتین، با اندازه‌گیری وزن رسوب مشخص شد. هیدروکربن‌های محلول در هپتان با استفاده از تبخیرکنندهٔ تحت خلاء جداسازی و وزن گردید. مقدار ۲g از این هیدروکربن‌های باقیمانده، به یک ستون کروماوگرافی پرشده از سیلیکا فعال شده که با نرمال هپتان اشباع بود، اضافه شد. به‌ترتیب ترکیبات اشباع با ۱۰۰mL نرمال هپتان، ترکیبات آروماتیک با ۱۰۰ mL تولوئن، و در سه مرحله ترکیبات قطبی/رزین‌ها توسط ۱۰۰mL محلول متانول– تولوئن (نسبت ۵۰:۵۰)، ۱۰۰mL کلروفرم و ۱۰۰mL استونیتریل در ستون جداسازی گردید (Fan and Buckley, 2002). حجم‌های خروجی از ستون برای ترکیبات به‌صورت جداگانه جمع‌آوری شد. برش‌ها در تبخیرکنندهٔ تحت خلاء از حلال، عریان‌سازی و وزن گردید. محتوای ترکیبات اشباع، آروماتیک، و رزین‌ها با توجه به درصد وزنی باقیمانده برش‌ها نسبت به وزن کل نمونه محاسبه شد.

برای تعیین کیفیت هیدروکربن‌ها از دستگاه کروماتوگرافی گازی[10] مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) استفاده شد. هلیوم به‌عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت. برنامهٔ دمایی آون دستگاه بدین‌صورت بود: ابتدا یک دقیقه در دمای ۱۹۰°C، سپس با سرعت ۱/۵ °C/min تا ۲۱۵°C افزایش یافت و به مدت ۱۰min در این دما نگه داشته شد. پیک‌های به‌دست‌آمده با شاهد مقایسه شد (Habibi and Babaei, 2017).

یافته‌های پژوهش و بحث

در جدول ۲، خصوصیات خاک منطقهٔ بهره‌برادری نفت‌شهر به‌لحاظ اجزای تشکیل‌دهنده و نوع بافت، ارائه شده است. نتایج نشان داد که خاک نفت‌شهر را می‌توان در دستهٔ خاک‌های لومی تقسیم‌بندی نمود. از ویژگی‌های خاک‌های لومی، دسترسی ریشه گیاهان به مواد مغذی، آب‌وهوا است زیرا بافت خاک لومی، متخلخل است به‌طوری که آب با سرعت مناسب (نه خیلی سریع و نه خیلی کند) در آن حرکت می‌کند تا گیاهان بتوانند به آسانی به آب دسترسی داشته باشند. از این‌رو، خاک منطقهٔ مستعد جهت کشت گیاهان است. اما به‌لحاظ اقلیمی، منطقهٔ نفت‌شهر گرم و خشک می‌باشد و متوسط بارش سالیانه آن ۱۱۰/۶mm است. دمای در روزهای تابستان در اواسط روز به بالای ۵۰°C می‌رسد. بارش کم، گرمای زیاد، شوری و کم بودن مواد آلی خاک شرایط نامناسبی برای رشد گیاهان و میکروارگانیسم‌های محیطی فراهم می‌کند، به‌طوری‌که در منطقه، جز تعدادی از گونه‌های گیاهی گرمادوست و شوری‌پسند همانند خارشتر، گلرنگ وحشی، علف‌شور و گرامینه‌ها، مشاهده نمی‌شود. با این‌وجود، در نمونه‌گیری‌های قبلی از خاک‌های منطقه، گروه کاری حاضر، موفق به جداسازی ۱۲۶ سویه میکروبی متفاوت شدند که نشان‌گر تنوع زیستی میکروارگانیسم-های موجود در خاک منطقه است. از میان این تنوع میکروبی موجود در خاک، تنها تعداد کمی می‌توانند غلظت بالای هیدورکربن‌های

[8]Optical density
[9]Saturated-Aromatic-Resin-Asphaltene
[10]Gas chromatography

جدول ۲. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک منطقهٔ نفت‌شهر

خصوصیات خاک	نوع بافت	شن (٪)	سیلت (٪)	رس (٪)	کربنات کلسیم (٪)	کربن آلی (٪)	pH	EC (دسی زیمنس بر متر)
مقدار	لومی	۴۶/۰	۳۵/۶	۱۸/۲	۲۴/۳	۰/۲۵	۷/۰	۳/۷

نفتی در خاک را تحمل کنند و قادرند تا ترکیبات هیدروکربنی را به‌عنوان منبع کربن استفاده نمایند. از ۱۲۶ گونه جداسازی شده، ۸ گونه توانایی حذف ترکیبات نفت‌خام را داشتند و از بین آن‌ها، دو باکتری *Bacillus thuringiensis* و *Arthrobacter citreus* بهترین عملکرد را در حذف همزمان ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک نفتی داشتند به همین دلیل برای تهیهٔ کنسرسیوم میکروبی انتخاب شدند. جنس *Arthrobacter* یکی از فراوان‌ترین باکتری‌های خاک است که مقاومت بالایی به شرایط سخت محیط زیستی مانندکمبود موادغذایی، رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ترکیبات سمی دارد. براساس مطالعات پیشین، این باکتری همچنین توانایی بالایی در تجزیهٔ زیستی طیف وسیعی از آلاینده‌های خاک از جمله هیدروکربن‌های آروماتیک و آلیفاتیک را دارد (Baxi *et al*., 2019). سویه‌های *Bacillus* نیز توانایی بالایی در استفاده از هیدروکربن‌های آروماتیک و آلیفاتیک به‌عنوان منبع کربن را دارند و قادر به تولید بیوسورفکتانت در فرآیند اکسایش ترکیبات آلکانی هستند (Ferreira *et al*., 2016). سویه‌های *Bacillus* همچنین با سنتز آنزیم‌های مرتبط با تولید اندوسپور، قادر به تحمل محیط‌های نامساعد هستند (Eskandari *et al*., 2017). باکتری *Bacillus thuringiensis* به‌عنوان کنترل‌کنندهٔ آفات گیاهی شناخته می‌شود و در مطالعهٔ حاضر، از ریزوسفر گیاهان منطقه جدسازی شد. بررسی اثر متقابل این باکتری‌ها در همراهی با مخمر تولیدکنندهٔ بیوسورفکتانت (*Candida catenulata*) که در کارهای پیشین توانایی آن در حذف ترکیبات هیدروکربنی به اثبات رسیده بود (Joo *et al*., 2008; Habibi and Babaei, 2017) موجب شد تا در تهیهٔ کنسرسیوم از این سه میکروارگانیسم استفاده شود.

نتایج سنجش میزان آلودگی نشان داد که میزان آلودگی در خاک به‌طور متوسط ۶/۴۹۷W% بود. وجود این میزان از هیدروکربن در خاک موجب آب‌گریزی شدید خاک، و پس‌زدن آبیاری می‌گردد (Malina and Zawierucha, 2007). بررسی بیشتر با استفاده از روش آنالیز SARA که نتایج ان در جدول ۳ ارائه شده است، نشان داد که سهم عمدهٔ هیدروکربن‌های آلاینده؛ مربوط به هیدروکربن‌های اشباع به‌میزان ٪۹۵/۱۱ بوده است و پس از آن، آروماتیک‌ها با ٪۴/۲۷ بیشترین ترکیبات آلاینده را تشکیل دادند. محتوای رزین‌ها ٪۰/۶۲ تعیین شد و محتوای آسفالتینی در خاک قابل ملاحظه نبود.

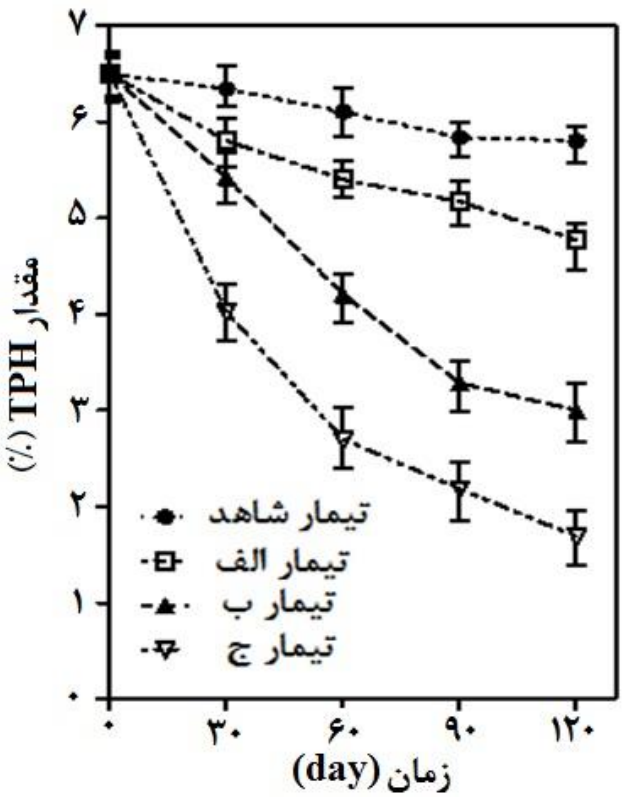
نتایج تیمارهای تجزیهٔ زیستی در طول ۱۲۰ روز، در شکل ۱ ارائه شده است. همان‌طور که نتایج در آزمایش شاهد نشان می‌دهد، انجام آبیاری در ابتدا فرآیند تجزیهٔ زیستی، موجب فعال شدن میکروارگانیسم‌های محیطی توانمند در حذف ترکیبات نفتی شده است. اما میزان کاهش TPH در نمونهٔ شاهد با گذشت زمان به‌کندی صورت گرفته است، که نشان می‌دهد جمعیت کمی از میکروارگانیسم‌های محیط می‌توانند در حذف هیدروکربن‌های آلاینده مشارکت نمایند (Malina and Zawierucha, 2007) .درصد حذف TPH پس از ۱۲۰ روز در نمونهٔ شاهد، ٪۱۰/۷۳ بود.

به‌منظور بررسی اثر تهویه (اکسیژن‌رسانی) بر عملکرد سلول‌های محیطی، عملیات شخم‌زدن در تیمار "الف" انجام شد. نتایج شکل ۱ برای این تیمار نشان می‌دهد که با زیر و رو شدن سطح خاک آلوده و افزایش دسترسی به اکسیژن، توانایی سلول‌های محیطی برای اکسایش هیدروکربن‌ها افزایش یافته است. دلیل اهمیت شخم‌زدن بر تجزیهٔ زیستی خاک آلوده به‌دلیل آن است که سرعت اکسایش هوازی ترکیبات نفتی در مقایسه با تجزیه بی‌هوازی است. از این‌رو، دسترسی به اکسیژن روند تجزیهٔ زیستی را تسریع نموده است (Varjani and Upasani, 2019). در خاک‌های آلوده به غلظت بالای مواد نفتی، خلل و فرج خاک توسط مواد هیدروکربنی مسدود می‌شود به همین دلیل محدودیت دسترسی به اکسیژن تشدید می‌گردد. پس از ۱۲۰ روز از تجزیهٔ زیستی با تیمار الف، حذف TPH به مقدار ٪۲۶/۵۸ مشاهده شد که در مقایسه با نمونهٔ شاهد، دارای سرعت حدود ۲/۶ برابر بود.

محدودیت در وجود و یا دسترسی به سایر مواد مغذی مورد نیاز برای رشد و متابولیسم سلولی موجب کاهش عملکرد تجزیه زیستی شود (Varjani and Upasani, 2019). از این‌رو، در تیمار ب، اثر افزودن اوره به‌عنوان منبع نیتروژن سلولی، مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۱ ارائه شده است. افزایش سرعت کاهش TPH در آغاز تیمار "ب"، به‌طور محسوسی نشان‌گر محدودیت تأمین منبع نیتروژن برای سلول‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی در خاک است. این روند سریع حذف TPH، در

جدول ۳. نتایج آنالیز SARA بر روی هیدروکربن‌های موجود در خاک آلوده

نوع هیدروکربن	مقدار (W٪)
ترکیبات اشباع	۹۵/۱۱
ترکیبات آروماتیک	۴/۲۷
رزین‌ها	۰/۶۲
ترکیبات آسفالتینی	ناچیز



شکل ۱. روند زمانی کاهش مقدار TPH از خاک آلوده در تیمارهای اعمال شده

ادامه و پس از ۹۰ روز از تیمار "ب"، دارای یک افت شد که می‌تواند ناشی از محدودیت دوبارهٔ منبع نیتروژن و یا تولید محصولات بازدارنده در نتیجه شکست هیدورکربن‌های اولیه باشد. مقایسهٔ تیمار "الف" و "ب" نشان می‌دهد که تحریک زیستی میکروارگانیسم‌های محیطی با افزودن اوره به‌طور محسوسی بر کاهش TPH مؤثر است؛ به‌طوری که درصد حذف TPH در تیمار "ب" پس از ۱۲۰ روز، ٪۵۳/۵۸ بود.

برای افزایش سرعت تجزیهٔ زیستی استفاده از عملیات تشدید زیستی راهکاری است که در مطالعات تجزیهٔ زیستی آلاینده‌ها دنبال می‌شود. از این‌رو، در تحقیق حاضر، از کنسرسیوم میکروبی متشکل از سلول‌هایی که قبلاً از خاک آلودهٔ منطقهٔ نفت شهر، جداسازی شده بود در تیمار "ج" مورد استفاده قرار گرفت. همان‌طورکه در شکل ۱ مشخص است، افزودن کنسرسیوم میکروبی موجب تشدید حذف TPH شده است و سرعت تجزیهٔ زیستی در طول مدت ۶۰ روز اول فرآیند، تا دو برابر افزایش می‌یابد. پس از ۶۰ روز سرعت تجزیهٔ زیستی در تیمار "ج" کاهش نشان داد که می‌تواند به دلیل بیان شده در خصوص مشاهدهٔ رفتار در تیمار "ب" باشد زیرا روند مصرف TPH در تیمار "ج" بیشتر از تیمار "ب" است، بنابراین، اثرات محدودیت منبع نیتروژن و یا تولید محصولات بازدارندهٔ رشد سریع‌تر با ادامهٔ روند تجزیهٔ زیستی، مشاهده می‌شود. میزان حذف TPH، پس از ۱۲۰ روز از تیمار "ج" به ٪۷۴ رسید که ٪۳۸ افزایش عملکرد در مقایسه با تیمار "ب" را نشان می‌دهد.

بررسی بیشتر از عملکرد تشدید تجزیهٔ زیستی با کنسرسیوم میکروبی بومی (تیمار "ج") در خصوص حذف کیفی هیدروکربن‌های نفتی در جدول ۴ ارائه شده است. جایی که مقایسهٔ میزان ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ آلاینده قبل و بعد از این تیمار، نشان می‌دهد که

جدول ٤. ترکیب درصد آلاینده‌های نفتی خاک قبل و بعد از ۱۲۰ روز از تیمار تشدید تجزیهٔ زیستی توسط کنسرسیوم میکروبی بومی

ترکیب	مقدار اولیه (W٪)	پس از ۱۲۰ روز از تشدید تجزیه زیستی توسط کنسرسیوم میکروبی بومی(W٪)
ایزوپنتان‌ها	۴/۲۷	۰/۱۰
نرمال پنتان‌ها	۴/۲۸	۰/۱۵
هگزان‌ها	۶/۷۵	۳۵/۷۵
هپتان‌ها	۷/۱۳	۴۷/۳۰
اکتان‌ها	۹/۱۸	۱/۲۵
نونان‌ها	۱۰/۲۰	۰/۲۵
دکان‌ها	۵/۲۵	۰/۵۵
اندکان‌ها	۵/۱۴	۰/۶۰
دودکان‌ها و سنگین‌تر	۴۷/۸۰	۱۴/۰۵

بخش عظیمی از آلاینده‌های سبک و سنگین حذف شدند. در نتیجه شکست زنجیرهای بلند هیدروکربنی اولیه توسط سیستم‌های آنزیمی میکروبی، هیدروکربن‌های سبک‌تر شامل هگزان‌ها و هپتان‌ها تشکیل می‌شوند. به‌همین دلیل، افزایش نسبی محتوای این ترکیبات پس از عملیات تجزیهٔ زیستی مشاهده می‌شود. ذکر این نکته ضروری است که با افزایش طول زنجیر در هیدورکربن‌های نفتی، میزان آب‌گریزی آن‌ها افزایش یافته و این امر موجب کاهش سرعت تجزیهٔ زیستی آن‌ها می‌شود. از این‌رو، شکست هیدروکربن‌ها به زنجیرهای کوتاه‌تر، مسیر شکست هیدروکربن‌ها را تسریع می‌نماید. تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که گونه‌های مخمر *Candida* با تولید بیوسورفکتانت در نتیجهٔ اکسایش اولیهٔ ترکیبات آلکانی، امکان دسترسی زیستی به هیدروکربن‌ها را خصوصاً برای سلول‌های که توانایی تولید بیوسورفکتانت ندارد، افزایش دهند (Ebadi *et al*., 2017; Babaei and Habibi, 2018). گونه‌های مخمری با توانایی اکسایش هیدروکربن‌های نفتی از سیستم آنزیمی قدرتمندی برای شکست هیدروکربن‌های سنگین برخوردارند و می‌توانند به‌عنوان آغازگر فرآیند شکست هیدروکربن‌های سنگین، سهم مهمی در پیشرفت فرآیند تجزیهٔ زیستی و هموار ساختن تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌ها توسط سایر گونه‌های ازجمله باکتری‌ها را فراهم کنند (Habibi and Babaei, 2017). از سوی دیگر باکتری‌ها با سرعت رشد بالا، می‌توانند در ادامهٔ فرآیند تجزیهٔ زیستی نقش مؤثری داشته باشند و ترکیبات حدواسط تولید شده را با سرعت مناسبی از محیط حذف نمایند. در بسیاری از مطالعات دیده شده است که افزودن میکروارگانیسم به‌منظور تشدید تجزیهٔ زیستی، موجب تحریک و فعال‌شدن سلول‌های طبیعی خاک شوند زیرا ممکن است این میکروارگانیسم‌های طبیعی، توانایی حذف ترکیبات سنگین اولیه را نداشته باشند و یا غلظت بالای آلاینده‌ها موجب بازدارندگی عملکرد آن‌ها شده باشد. اما با آغاز فرآیند تجزیهٔ زیستی توسط گونه‌هایی که با عملیات تشدید زیستی به خاک افزوده شدند، غلظت کل آلاینده‌ها کاهش یافته و به مرور گونه‌های محتمل به‌صورت فعالی در فرآیند تجزیهٔ زیستی نقش خود را ایفا می‌کنند (Sun *et al*., 2022). انتظار می‌رود که با ادامهٔ فرآیند تجزیهٔ زیستی، بخش زیادی از ترکیبات هیدروکربنی باقیمانده در خاک تیمارشده، همچون هگزان‌ها و هپتان‌ها توسط جمعیت باکتریایی خاک حذف شوند (Haque *et al*., 2022).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعهٔ حاضر، امکان تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های نفتی به روش درمحل با استفاده از تشدید زیستی توسط کنسرسیوم میکروبی بومی توانست تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر افزایش سرعت تجزیهٔ زیستی این مواد از خاک در منقطهٔ خشک و گرمسیری نفت‌شهر داشته باشد. در مقایسه با تیمار تشدید زیستی میکروارگانیسم‌های بومی خاک، افزایش ۳۸٪ در حذف کل محتوای هیدروکربن‌ها مشاهده شد. این افزایش عملکرد حذف در تیمار تشدید زیستی نشان می‌دهد که گونه‌های استفاده شده در کنسرسیوم توانسته‌اند ضمن تحمل شرایط محیطی، از هیدروکربن‌های خاک به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند و آن را به‌میزان مطلوبی طی مدت ۱۲۰ روز کاهش دهند. براین اساس، پیش‌بینی می‌شود که بتوان با استفاده از این کنسرسیوم میکروبی، هیدروکربن‌های آلاینده خاک در منطقهٔ بهره‌برداری میادین نفتی را به‌شکل محسوسی حذف نمود.

قدردانی

از مسئولین و کارشناسان HSE شرکت بهره‌برداری نفت‌وگاز غرب؛ خصوصاً کارشناسان منطقهٔ نفت‌شهر که در انجام مراحل مختلف این تحقیق، با ما همکاری صمیمانه‌ای داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

References

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R., 2015. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. Applied Biochemistry and Biotechnology 176(3), 670-699.

Ahamed, F., Hasibullah, M., Ferdouse, J., Anwar, M. N., 2010. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon. Bangladesh Journal of Microbiology 27(1), 10-13.

Babaei, F., Habibi, A., 2018. Fast biodegradation of diesel hydrocarbons at high concentration by the sophorolipid-producing yeast candida catenulata KP324968. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 28(5), 240-254.

Baxi, N. N., Patel, S., Hansoti, D., 2019. An *Arthrobacter citreus* strain suitable for degrading ε-caprolactam in polyamide waste and accumulation of glutamic acid. AMB Express 9(1), 1-11.

Bento F.M., Camargo F.A., Okeke B.C., Frankenberger W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresouce Technology 96(9), 1049-1055.

Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A., 2013. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. Annals of Microbiology 63(2), 417-431.

Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnology Research International. Article ID 941810. 13 p.

Dongfeng Z., Weilin W., Yunbo Z., Qiyou L., Haibin Y., Chaocheng Z., 2011. Study on isolation, identification of a petroleum hydrocarbon degrading bacterium *Bacillus fusiformis* sp. and influence of environmental factors on degradation efficiency. Environment Protection 13(4), 74-82.

Ebadi, A., Sima, N.A.K., Olamaee, M., Hashemi, M., Nasrabadi, R.G., 2017. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. Journal of Advanced Research 8(6), 627-633.

Eskandari, S., Hoodaji, M., Tahmourespour, A., Abdollahi, A., Mohammadian-Baghi, T., Eslamian, S., Ostad-Ali-Askari, K., 2017. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Bacillus Licheniformis* ATHE9 and *Bacillus Mojavensis* ATHE13 as newly strains isolated from oil-contaminated soil. Journal of Geography, Environment and Earth Science International 11(2), 1-11.

Fan, T., Buckley, J.S., 2002. Rapid and accurate SARA analysis of medium gravity crude oils. Energy and Fuels 16(6), 1571-1575.

Feng, L., Jiang X., Huang, Y., Wen, D., Fu, T., Fu, R., 2021. Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid. Environmental Pollution, 273, 116476.

Ferreira, L., Rosales, E., Danko, A. S., Sanromán, M. A., Pazos, M. M., 2016. *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. Process Safety and Environmental Protection 101, 19-26.

Habibi, A., Babaei, F., 2017. Biological treatment of real oilfield-produced water by bioaugmentation with sophorolipid-producing *Candida catenulata*. Environmental Processes 4(4), 891-906.

Haque, S., Sirvastava, N., Bahadur Pal, D., Alkhanani, M.F., Almalki, A.H., Areeshi, M.Y., Naidu, R., Gupta, V.K., 2022. Functional microbiome strategies for the bioremediation of petroleum-hydrocarbon and heavy metal contaminated soils: a review. Science of The Total Environment 833, 155222.

Hamby D.M., 1996. Site remediation techniques supporting environmental restoration activities: a review. Science of the Total Environment 191(3), 203-224.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S., 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin 64(1), 7-12.

Hassanshahian, M., Boroujeni, N.A., 2016. Enrichment and identification of naphthalene-degrading bacteria from the Persian Gulf. Marine Pollution Bulletin 107(1), 59-65.

Joo H. S., Ndegwa P. M., Shoda M., Phae. C., 2008. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. Environmental Pollution 156, 891-896

Malina G., Zawierucha I., 2007. Potential of bioaugmentation and biostimulation for enhancing intrinsic biodegradation in oil hydrocarbon–contaminated soil. Bioremediation Journal 11(3), 141-147.

Rahbari-Sisakht, M., Pouranfard, A., Darvishi, P., Fauzi Ismail, A., 2017. Biosurfactant production for enhancing the treatment of produced water and bioremediation of oily sludge under the conditions of Gachsaran oil field. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 92(5), 1053-1064.

Rahman, K.S.M., Banat, I.M., Thahira, J., Thayumanavan, T., Lakshamanaperumalsamy, P., 2002. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. Bioresource Technology 81, 25-32.

Sun, S.. Su, Y., Chen, S., Cui, W., Zhao C., Liu Q., 2022. Bioremediation of oil-contaminated soil: exporaing the potential of endogenous hydrocarbon degrader *Enterobacter* sp. SAVR S-1. Applied Soil Ecology 173, 104387.

Varjani, S.J., Upasani, V.N., 2016. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. Bioresouce Technology 222, 195-201.

Varjani, S., Upasani, V.N., 2019. Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. Journal of Environmental Management 245, 358-366.

Wang, Y., Wu, S., Wang, H., Dong, Y., Li, X., Wang, S., Fan, H., Zhuang, X., 2022. Optimization of conditions for a surfactant-producing strain and application to petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 213, 112428.

Zhen, L., Hu, T., Lv, R., Wu, Y., Chang, F., Jia, F., Gu, J., 2021. Succession of microbial communities and synergetic effects during bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil enhanced by chemical oxidation. Journal of Hazardous Materials 410, 124869.