Iranian Journal of Soil and Water Research ISNN: 2423-7833
Homepage: http://ijswr.ut.ac.ir

The application of biosurfactant producing bacterial consortium as a petroleum degrader in increasing the hydraulic conductivity coefficient of TPH-contaminated soil

Komeil Zeynali [1] | Shayan Shariati [2] | Ahmad Ali Pourbabaee [3]✉ | Mahdi Shorafa [4]

1. Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: komeilzeynali7899@ut.ac.ir
2. Department of Environmental Engineering, Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: shayan_shariati@ut.ac.ir
3. Corresponding Author, Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: Pourbabaei@ut.ac.ir
4. Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: m_shorafa@ut.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: May.23, 2024

Revised: July. 6, 2024

Accepted: Aug. 5, 2024

Published online: Nov. 2024

Keywords:
Biodegradation,
Biosurfactant,
Crude Oil,
Hydraulic Conductivity,
Oil Pollution.

ABSTRACT

Oil pollution is recognized as one of the significant threat to soil fertility and plant production. Pollution caused by petroleum hydrocarbons, reduces the hydraulic conductivity of soils, leading to increased erosion and runoff, and decreased plant growth. One practical approach for remediating soils contaminated with petroleum hydrocarbons is using biosurfactant-producing microorganisms that can degrade these compounds. This study examined the efficacy of a microbial consortium comprising the bacterial strains *Dietzia aerolata* PS14B1, *Kocuria salina* PS12B2, and *Mesobacillus harenae* PS9D12 in altering the permeability coefficient of soil contaminated with high pollution (TPH). In the hydrocarbon growth and degradation test in the mineral base medium after seven days of incubation, the results showed that strains PS14B1, PS12B2, and PS9D12 were successful in reducing Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by 25.63%, 24.11%, and 22.83%, respectively, which was significantly different from the control ($P<0.05$). The inoculation of the bacterial strains into the soil and subsequent 30-day incubation demonstrated a significant increase in soil hydraulic conductivity, from 1.18 cm h-1 to 9.12 cm h-1, compared to the control treatment (3.24 cm h-1). These findings suggest that the bacterial consortium holds potential for the sustainable remediation of oil-contaminated sites and the enhancement of soil permeability in polluted areas.

Cite this article: Zeynali, K., Shariati, S., Pourbabaee, A., Shorafa, M. (2024). The application of biosurfactant producing bacterial consortium as a petroleum degrader in increasing the hydraulic conductivity coefficient of TPH-contaminated soil, *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 55 (9), 1585-1599. https://doi.org/10.22059/ijswr.2024.376847.669716

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijswr.2024.376847.669716

EXTENDED ABSTRACT

Introduction:

The surge in petroleum product demand poses a significant risk of oil pollution. Crude oil, a mixture of diverse hydrocarbons, is susceptible to degradation by microorganisms. Exposure to petroleum compounds not only disrupts soil structure but also endangers human health due to their carcinogenic and mutagenic properties. Such compounds impede water flow mechanisms in contaminated soils, leading to reduced hydraulic conductivity, erosion, and surface runoff. Bioremediation emerges as a promising approach to address oil-contaminated soils, mainly through the secretion of biosurfactants by proficient microbes, enhancing the compounds' biodegradation by augmenting their bioavailability. This study aims to explore the biodegradation capability and biosurfactant secretion of hydrocarbonoclastic bacteria, along with improving hydraulic conductivity in oil-contaminated soil using potent strains.

Materials and Methods:

Twelve bacterial strains isolated from oil-contaminated soil were obtained from the microbial collection of the Soil Science and Engineering Department, Faculty of Agriculture, University of Tehran. Initial testing involved assessing the growth ability of strains in MSM-agar medium containing crude oil as the sole source of carbon and energy. The Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) reduction ability was evaluated by inoculating bacteria into a MSM medium containing 1% crude oil (at a concentration of 5% v/v) and determining the remaining TPH gravimetrically after seven days. Furthermore, biosurfactant production capacity was assessed through oil spreading, surface tension reduction, and emulsification index (%E24) tests. Based on the results, three strain: *Dietzia aerolata* PS14B1, *Kocuria salina* PS12B2, and *Mesobacillus harenae* PS9D12 were selected and applied as a microbial consortium to contaminated soil to evaluate their impact on hydraulic conductivity.

Results and Discussion:

The growth ability test indicated that strain PS12B2 exhibited the highest growth compared to others in the presence of oil. In the oil spread test, strains PS12B2, PS2C3, and PS20B1 exhibited the most expansive halos, measuring 2.43, 2, and 2 cm, respectively, which was statistically significant ($P<0.05$). It's noteworthy that researchers established a minimum halo diameter of 0.5 cm as indicative of positive biosurfactant secretion. Moving on to the surface tension test, strains PS12E1, PS20B1, and PS12B2 demonstrated remarkable efficacy in reducing the surface tension of distilled water from 72.36 mN m^{-1} to 32.37, 31.39, and 30.43 mN m^{-1}, respectively. Furthermore, in the E24 test utilizing n-hexane as a water-repellent medium, strains PS20B1, PS7D1, and PS12E1 exhibited the highest emulsifying capacity among all strains, with E24 values of 54.93%, 42.58%, and 40.5%, respectively. Notably, strains PS14B1, PS12B2, and PS9D12 demonstrated substantial TPH reduction capacities by 25.63%, 24.11%, and 22.83%, respectively, which was significantly different from the control treatment (1% reduction). Monitoring soil hydraulic conductivity showed a significant increase from 1.18 to 9.12 cm h^{-1} after 30 days with the PSZ treatment compared to the control treatment (3.24 cm h^{-1}) ($P<0.05$).

Conclusion:

Petroleum hydrocarbons have adverse effects on human health and soil physical properties such as hydraulic conductivity. Bioremediation is one of the best methods for restoring soils contaminated with oil. The results of this study showed that strains Dietzia aerolata PS14B1, Kocuria salina PS12B2, and Mesobacillus harenae PS9D12 have good growth capability in MSM agar oily medium, biosurfactant secretion, and petroleum hydrocarbon degradation. Additionally, the consortium composed of these strains increased soil hydraulic conductivity from 1.18 to 9.12 cm h^{-1} ($P<0.05$). Therefore, these strains can be used in the bioremediation of oil-contaminated areas to promote environmental cleanliness and stability.

Author Contributions

K.Z wrote the original draft and, investigation, writing—review, A.A.P; supervision, Conceptualization, funding acquisition and project administration, S.S; methodology, formal analysis, data curation, M.S.; validation, resources, editing, and visualization. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgements

Authors sincerely acknowledge University College of Agriculture (UCA), South Oilfields Company for providing funding to carry out this research work. The authors also would like to thank Dr. Moradi from Gachsaran Oil Company for providing of soil sample for the present study.

Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

مجله تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۵، شماره ۹ شاپا: ۲۴۲۳-۷۸۳۳
Homepage: http://ijswr.ut.ac.ir

کاربرد کنسرسیوم باکتریایی مولد بیوسورفکتانت و تجزیه‌کننده نفت در افزایش ضریب آبگذری خاک آلوده به TPH

کمیل زینالی[۱] | شایان شریعتی[۲] | احمدعلی پوربابائی[۳]✉ | مهدی شرفا[۴]

۱. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: komeilzeynali7899@ut.ac.ir

۲. گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: shayan_shariati@ut.ac.ir

۳. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: Pourbabaei@ut.ac.ir

۴. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: m_shorafa@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۴/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۱۵

تاریخ انتشار: آذر ۱۴۰۳

واژه‌های کلیدی:
مدل رفتاری،
خاک غیراشباع،
مدل‌سازی عددی،
پلاستیسیته.

چکیده

آلودگی نفتی به عنوان یکی از تهدیدات مهم حوزه حاصلخیزی خاک و تولیدات گیاهی شناخته شده است. آلودگی ناشی از هیدروکربنهای نفتی، با کاهش هدایت هیدرولیکی خاک‌ها، منجر به افزایش فرسایش و رواناب و کاهش رشد گیاه می‌شود. یکی از راه‌های اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، استفاده از میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت با قابلیت تجزیه هیدروکربن‌های نفتی است. در این مطالعه توانایی سویه‌های باکتریایی موثر در تجزیه نفت خام شامل: Dietzia aerolata PS14B1، Kocuria salina PS12B2 و Mesobacillus harenae PS9D12 در قالب یک کنسرسیوم میکروبی در تغییرات ضریب آبگذری یک خاک آلوده به نفت با آلودگی زیاد بررسی شدند. در آزمون توانایی رشد سویه‌ها و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در محیط پایه معدنی بعد از ۷ روز گرماگذاری، نتایج نشان داد که سویه‌های PS14B1، PS12B2 و PS9D12 به ترتیب موفق به کاهش هیدروکربن‌های نفتی کل (TPH) به میزان ۲۵/۶۳ ٪، ۲۴/۱۱ ٪ و ۲۲/۸۳ ٪ شدند که تفاوت معنی‌داری با شاهد داشتند ($P<0.05$). نتایج آزمایشات تلقیح سویه‌ها در محیط خاک و بعد از ۳۰ روز انکوباسیون نشان داد، کنسرسیوم فوق موفق به افزایش هدایت هیدرولیکی خاک از ۱/۱۸ به ۹/۱۲ سانتی‌متر بر ساعت شده است که نسبت به تیمار شاهد (۳/۲۴ سانتی‌متر بر ساعت) معنی‌دار بود. بنابراین، می‌توان از این سویه‌ها در اصلاح پایدار محل‌های آلوده به ترکیبات نفتی و تعدیل وضعیت آبگذری خاک‌های آلوده استفاده کرد.

استناد: زینالی، کمیل؛ شریعتی، شایان؛ پوربابائی، احمدعلی؛ شرفا، مهدی (۱۴۰۳). کاربرد کنسرسیوم باکتریایی مولد بیوسورفکتانت و تجزیه‌کننده نفت در افزایش ضریب آبگذری خاک آلوده به TPH، *مجله تحقیقات آب و خاک ایران*، ۵۵ (۹)، ۱۵۹۹-۱۵۸۵. https://doi.org/10.22059/ijswr.2024.376847.669716

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijswr.2024.376847.669716

مقدمه

افزایش تقاضا برای فرآورده‌های نفتی در صنایع مختلف و زندگی روزمره ممکن است منجر به افزایش بهره‌برداری نفت و آلودگی نفتی محیط‌زیست شود (Varjani and Srivastava, 2015;Varjani and Upasani, 2016). نفت خام مخلوطی از انواع هیدروکربن‌های ساده و پیچیده است و برخی میکروارگانیسم‌ها قابلیت تجزیه این ترکیبات را دارند. قرار گرفتن در معرض ترکیبات نفتی ساختمان خاک را از بین می‌برد، کیفیت آن را تحت تأثیر قرار داده و به نوبه خود مانع رشد گیاه می‌شود. علاوه بر این، آلاینده‌های موجود در نفت خام می توانند از خاک به آب‌های زیرزمینی نفوذ کرده و سلامت آب آشامیدنی و انسان را تهدید کنند (Su et al., 2021). هیدروکربن‌های نفتی بیشتر به عنوان ترکیبات سرطان‌زا شناخته می‌شوند (Nikitha et al., 2017) و می‌توانند به قسمت‌های مختلف بدن انسان آسیب برسانند. اثرات کوتاه مدت هیدروکربن‌های نفتی بر روی انسان علائمی از قبیل سوزش چشم، حالت تهوع، سوزش پوست، استفراغ، اسهال و التهاب است (Kim et al., 2013; Yan et al., 2015; Varjani and Upasani., 2017).

رطوبت خاک به عنوان یک عامل مهم در حاصلخیزی مطرح است. در صورت بروز آلودگی نفتی، رطوبت خاک به طور قابل‌توجهی تحت تأثیر قرار گرفته و مکانیسم جریان آب مختل می‌شود (Shah & Soni, 2024). این مسئله باعث ایجاد فرسایش، رواناب و کاهش رشد گیاه می‌شود. همچنین آلودگی خاک منجر به تغییر در خصوصیات خاک مثل سطوح رطوبت خاک، هدایت هیدرولیکی، حدود آتربرگ، کربن آلی خاک، نیتروژن کل و فسفر قابل‌جذب می‌شود. خواص هیدرولیکی خاک نقش اساسی در تخمین وضعیت دسترسی آبِ آبخوان‌ها دارد (Dvatha et al., 2019). Hewelke & Gozdowski (2020) بیان کردند که همبستگی منفی و معنی‌داری میان غلظت هیدروکربن‌های نفتی خاک و هدایت هیدرولیکی آن وجود دارد؛ به طوری که با افزایش میزان ترکیبات نفتی در خاک، هدایت هیدرولیکی آن کاهش می‌یابد. بنابراین نیاز مبرمی به راهکارهای مؤثر در اصلاح چنین خاک‌هایی احساس می‌شود.

زیست‌پالایی آلاینده‌های هیدروکربنی یکی از موضوعات مهم کاربرد بیوتکنولوژی در صنعت نفت است (Silva et al., 2014). مطالعات متعددی در مورد تجزیه زیستی آلاینده‌های هیدروکربنی در سال‌های اخیر انجام شده است. جنس‌های باکتریایی *باسیلوس، مزوباسیلوس، رائوسِرِلا، ویرجیباسیلوس، استرپتومایسس، آکروموباکتر، دی‌اِتزیا، کوکوریا، اَسینتوباکتر، آرتروباکتر، آزوآرکوس، بروی‌باکتریوم، سِلولوموناس، کورینه‌باکتریوم، فلاووباکتریوم، مارینوباکتر، میکروکوکوس، نوکاردیا، آکروباکتروم، سودوموناس، اِستِنوتروفومائوناس و ویبریو* به‌عنوان تجزیه‌کننده‌های هیدروکربن‌های نفتی شناخته شده‌اند (Nazina et al., 2015; Khalifa, 2017; Varjani, 2017; Dastgheib et al., 2017; Baoune et al., 2019; Zhang et al., 2022; Al-Marri et al., 2023).

ترشح بیوسورفکتانت توسط میکروب‌های توانمند می‌تواند از طریق افزایش زیست‌فراهمی ترکیبات نفتی باعث افزایش تجزیه زیستی این ترکیبات شود (Othman et al., 2022). بیوسورفکتانت‌ها عوامل فعال سطحی هستند که می‌توانند به صورت خارج سلولی توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها (Almansoory et al., 2019) از جمله باکتری‌ها (Mehetre et al., 2019; Sharuddin et al., 2021) تولید شوند. مشخص شده است که این ترکیبات با تجمع در سطح مشترک سیالات امتزاج‌ناپذیر، باعث کاهش کشش سطحی می‌شوند که منجر به افزایش حلالیت، فراهمی زیستی و تجزیه ترکیبات آلی یا نامحلول آب‌گریز مثل هیدروکربن‌های نفتی می‌گردد (Sharuddin et al., 2018; Sobri et al., 2018; Karlapudi et al., 2018).

نوآوری مطالعه حاضر، تعیین کارایی کنسرسیوم میکروبی منتخب مولد بیوسورفکتانت در تغییرات هدایت هیدرولیکی خاک آلوده نفتی بوده است. در این مطالعه، توانایی تجزیه زیستی و ترشح بیوسورفکتانت سویه‌های باکتریایی جداسازی شده از خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به‌صورت کیفی و کمی در قالب آزمایش‌های استاندارد و معتبر مورد بررسی قرار گرفت. سپس با ساخت کنسرسیومی متشکل از سه سویه برتر و تلقیح به خاک آلوده، تغییرات هدایت هیدرولیکی خاک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب سویه‌ها و آماده‌سازی

دوازده سویه مورداستفاده، از کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه شد. این سویه‌ها از خاک آلوده به نفت خام طی فرایند غنی‌سازی جدا شده‌اند و عبارتند از: PS14B1، PS12B2, PS7D1، PS2C3، PS12D12، PS3B1، PS20B1، PS9D11 PS8A1، PS12A1، PS12B1 و PS12E1. پس از ارزیابی توان رشد در محیط نفتی و تولید سورفاکتانت باکتری‌ها،

سویه‌های *Dietzia aerolata* PS14B1، *Kocuria salina* PS12B2 و *Mesobacillus harenae* PS9D12 که به ترتیب با کدهای دسترسی pp760989، pp760516 و pp751998 در GeneBank ثبت شده‌اند، برای ساخت کنسرسیوم میکروبی انتخاب شدند. برای تهیه کشت تازه، تمام باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط نوترینت آگار کشت خطی داده شدند.

ارزیابی توان رشد سویه‌ها در محیط کشت معدنی نمکی جامد (MSM-agar) حاوی نفت

این آزمون طبق روش Mishra et al., (2019) با کمی تغییر انجام شد. ابتدا مایه تلقیح سویه‌ها با کشت آن‌ها در محیط نوترینت براث تا رسیدن به کدورت OD_{600}=0.5 آماده شد. سپس محیط MSM آگار تهیه شد و بعد از اتوکلاو کردن به پلیت‌ها افزوده شد. محیط MSM آگار استفاده شده در این مطالعه متشکل از ۵/۸ g L^{-1} K_2HPO_4، ۴/۵ g L^{-1} KH_2PO_4، ۱ g L^{-1} $(NH)_2SO_4$، ۰/۱ g L^{-1} $MgSO_4$، ۰/۱ g L^{-1} $CaCl_2$، ۰/۰۱۷۸ g L^{-1} $MnSO_4$، ۰/۰۱ g L^{-1} $ZnSO_4$، ۰/۰۱ g L^{-1} $FeSO_4$ و ۰/۰۰۱ g L^{-1} ۱۵ g L^{-1} آگار بود (Shariati et al., 2021).

یک قطره نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی به پلیت‌ها اضافه شد. سوسپانسیون باکتری‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در قالب کشت اسپرید به پلیت‌های حاوی محیط MSM آگار و نفت افزوده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز در انکوباتور گرماگذاری شدند. این آزمایش در سه تکرار به همراه تیمار شاهد (پلیت حاوی محیط MSM آگار بدون تلقیح) انجام گردید. درنهایت بعد از ۷ روز به وضعیت رشد باکتری‌ها امتیازدهی شد.

ارزیابی توان کاهش TPH سویه‌ها

توانایی کاهش TPH سویه‌ها در محیط MSM حاوی نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی ارزیابی شد. ابتدا سویه‌ها در محیط نوترینت براث تا رسیدن به کدورت OD_{600}=0.5 کشت داده شدند. سپس باکتری‌ها به میزان ۵ درصد (حجمی/حجمی) به ارلن‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM و ۱ درصد نفت خام استریل شده با فیلتر، تلقیح شدند (Lee et al., 2018). یک ارلن بدون تلقیح هم به‌عنوان شاهد تهیه گردید. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور RPM ۱۶۰ به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. بعد از ۷ روز محتوای TPH ارلن‌ها (فاز آلی) با استفاده از ۴۰ میلی‌لیتر حلال دی‌کلرومتان و قیف جداکننده استخراج شد و جهت پراندن حلال، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد رها شدند. درنهایت میزان TPH باقی‌مانده در ارلن‌ها به روش وزن‌سنجی تعیین گردید (Tripathi et al., 2023).

ارزیابی توان ترشح بیوسورفکتانت سویه‌ها

توان ترشح بیوسورفکتانت سویه‌ها در قالب سه آزمون گسترش نفت، کشش سطحی و شاخص امولسیون‌کنندگی (E24%) ارزیابی شد. ابتدا باکتری‌ها در محیط نوترینت براث کشت داده شدند و با کدورت OD_{600}=0.5 به ارلن مایرهای حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط MSM و ۰/۵ درصد نفت خام استریل، تلقیح شدند. ارلن‌ها در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور RPM ۱۶۰ به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. بعد از ۷ روز نمونه‌ها در دور RPM ۱۰۰۰۰ و ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی برای انجام آزمایش‌های ترشح بیوسورفکتانت جدا گردید (Chen et al., 2020).

توانایی گسترش نفت سویه‌ها به روش Li et al., 2022 مشخص گردید. ۱۰ میکرولیتر نفت خام به سطح ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک پتری‌دیش ۸ سانتی‌متری اضافه شد. سپس با استفاده از میکروسمپلر، ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی هر سویه به مرکز نفت خام از فاصله یک سانتی‌متری اضافه شد. بعد از ۳۰ ثانیه قطر هاله ایجادشده در اثر باز شدن نفت با استفاده از یک خط‌کش به طور دقیق اندازه‌گیری شد.

جهت تعیین کشش سطحی، ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی هر سویه به یک ظرف شیشه‌ای که در یک حمام آب با دمای ۲۸ درجه سلسیوس تثبیت شده بود، افزوده شد. سپس با استفاده از لوله‌های موئین، ارتفاع بالاآمده مایع توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد (Viramontes-Ramos et al., 2010). درنهایت میزان کشش سطحی با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\sigma = \frac{rh\rho g}{2}$$ رابطه ۱)

برای تعیین شاخص امولسیون‌کنندگی (E24%)، ۳ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۳ میلی‌لیتر حلال n–هگزان در لوله‌های شیشه‌ای مخلوط و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شدند. بعد از ۲۴ ساعت ارتفاع لایه امولسیون شده و ارتفاع کل لایه مایع با استفاده از خط کش به دقت اندازه‌گیری شد (Ziwei et al., 2023). نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد محاسبه شد. E24 طبق فرمول زیر محاسبه شد:

رابطه ۲)
$$\%E24 = \frac{\text{ارتفاع لایه امولسیون شده}}{\text{ارتفاع کل ستون مایع}} \times 100$$

اندازه‌گیری خصوصیات خاک

خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک موردمطالعه شامل بافت، رطوبت، pH، درصد ماده آلی، نیتروژن کل، فسفر در دسترس، پتاسیم، هدایت الکتریکی، جمعیت میکروبی و تنفس میکروبی خاک به ترتیب به روش‌های هیدرومتری (Bouyoucos, 1962)، وزن‌سنجی (Black, 1965)، والکلی بلک (Nelson and Sommers, 1983)، کِجِلدال (Bremner, 1965)، عصاره‌گیری بی‌کربنات سدیم (Olsen and Robertson, 1954)، فلیم‌فتومتری (Michel and Kaufmann, 1973)، دستگاه ECمتر (NSW Agriculture, 2003)، بیشترین تعداد احتمالی (MPN) (Alexander, 1983) و تیتراسیون با اسید HCl (Anderson, 1983) اندازه‌گیری شد. TPH خاک هم به روش استخراج با سوکسله به کمک مخلوطی از حلال‌های دی‌کلرومتان و n–هگزان با نسبت ۱:۱ استخراج شد و سپس حلال با دستگاه روتاری در دور RPM ۷۰ و ۲۰ دقیقه پرانده شد (Sattar et al., 2022). درنهایت TPH باقی‌مانده با چند قطره حلال شست‌وشو داده شد و با دستگاه کروماتوگرافی گازی با دتکتور FID مورد آنالیز قرار گرفت. برای اندازه‌گیری فلزات سنگین موجود در خاک، از روش Ure et al., (1993) برای عصاره گیری استفاده شد و عصاره حاصله توسط دستگاه ICP-OES آنالیز شد.

تهیه کنسرسیوم میکروبی و تلقیح به خاک

با توجه به نتایج آزمون‌های قبلی، درنهایت سه سویه *Dietzia aerolata* PS14B1، *Kocuria salina* PS12B2 و *Mesobacillus harenae* PS9D12 برای ساخت کنسرسیوم میکروبی و بررسی تأثیر آن بر هدایت هیدرولیکی، جهت تلقیح به خاک آلوده انتخاب شدند. ابتدا سویه‌ها به‌صورت تکی تا رسیدن به کدورت OD_{600}=1 کشت داده شدند. سپس سویه‌ها با هم مخلوط شده و بر روی حامل پرلیت فعال، تثبیت شدند (Uyun et al., 2022). درنهایت کنسرسیوم به میزان ۱۵ درصد به ظروف شیشه‌ای حاوی ۳۰۰ گرم خاک آلوده، تلقیح شدند. آزمایش در سه تکرار به همراه تیمار شاهد (خاک با افزودن پرلیت بدون تلقیح) انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تحت انکوباسیون قرار گرفتند.

اندازه‌گیری هدایت هیدرولیکی خاک

بعد از ۳۰ روز انکوباسیون، هدایت هیدرولیکی یا ضریب آبگذری اشباع خاک‌ها به روش بار ثابت اندازه‌گیری شد. ابتدا مقداری خاک از هر نمونه داخل سیلندرهای ۵×۵ ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از مخلوط آب مقطر و کلسیم کلرید ۰/۰۱ مولار از پایین اشباع شدند. بعد از ۲۴ ساعت سطح خاک‌ها با کاغذ صافی پوشانده شد و یک فشار ثابت آبی از بالا روی سیلندرها اعمال گردید. بعد از ۵ دقیقه یک مِزور در زیر سیلندرها قرار داده شد و مقدار آب خروجی از سیلندرها در مدت ۳۰ دقیقه قرائت گردید (Avizhgan et al., 2021). آزمایش در ۵ تکرار انجام شد. درنهایت ضریب آبگذری خاک به کمک رابطه زیر محاسبه گردید:

رابطه ۳)
$$Ks = \frac{LV}{hAt}$$

L= ارتفاع ستون خاک (cm)

V= حجم آب خروجی (cm^3)

h= بار آبی از محل ورود آب به خاک تا محل خروج آن (cm)

A= سطح مقطع نمونه (cm^2)

t= مدت زمان آزمایش (hr)

آنالیز آماری داده‌ها

نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ رسم شد. تجزیه واریانس داده‌ها از طریق ANOVA یک‌طرفه و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۷ انجام گرفت.

نتایج و بحث

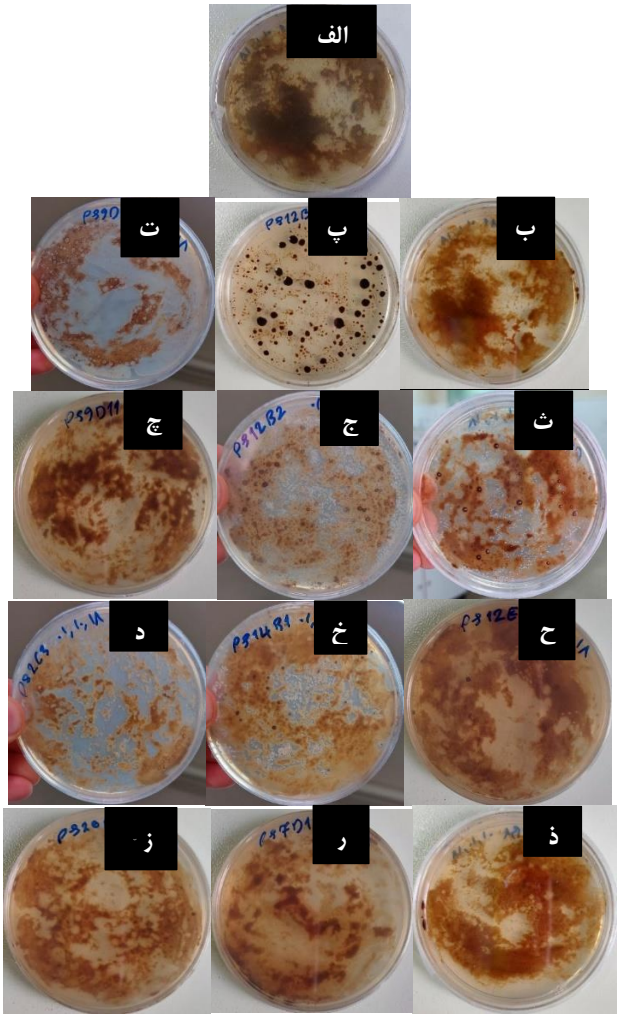
وضعیت رشد سویه‌ها در محیط MSM آگار حاوی نفت

نتایج این آزمون نشان داد سویه PS12B2 بیشترین توانایی رشد را نسبت به سایر سویه‌ها در محیط نفتی جامد (آگار) دارد (جدول ۱).

همچنین سویه‌های PS14B1، PS9D12 و PS12A1 از نظر میزان رشد در حضور نفت در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. سویه‌های PS7D1، PS3B1، PS20B1، PS8A1 و PS9D11 هیچ‌گونه رشدی در این محیط از خود نشان ندادند. نتایج حاصله با تحقیق Concepta Goveas et al., (2022) همسو است. این دانشمندان موفق به جداسازی یک‌سویه باکتریایی *Lysinibacillus* sp. SS1 شدند که توانایی رشد در محیط بوشنل آگار حاوی نفت خام را داشت. همچنین Khobragade and Kulkarni, (2019) توانایی رشد چند سویه را در حضور ترکیبات PAH در محیط MSM آگار مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که برخی از این سویه‌ها توانایی رشد خوبی در حضور PAHها دارند. تصاویر پلیت‌های تلقیح‌شده با سویه‌های موردمطالعه به همراه شاهد (بدون تلقیح) بعد از ۷ روز گرماگذاری در شکل ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- وضعیت رشد سویه‌ها در محیط MSM آگار حاوی نفت بعد از ۷ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

سویه	PS14B1	PS12B2	PS7D1	PS9D12	PS2C3	PS3B1	PS20B1	PS8A1	PS9D11	PS12A1	PS12B1	PS14B1
وضعیت رشد	++++	+++++	-	++++	+++	-	-	-	-	++++	+++	++



شکل ۱- پلیت‌های MSM آگار حاوی نفت تلقیح شده و بدون تلقیح بعد از ۷ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس. الف: شاهد، ب: PS8A1، پ: PS12B1، ت: PS9D12، ث: PS12A1، ج: PS12B2، چ: PS9D11، ح: PS12E1، خ: PS14B1، د: PS2C3، ذ: PS3B1، ر: PS7D1 و ز: PS20B1

توانایی سویه‌ها در ترشح بیوسورفکتانت

توانایی ترشح بیوسورفکتانت ۱۲ سویه باکتریایی در قالب سه آزمون گسترش نفت، کشش سطحی و امولسیون کنندگی (E24) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد در آزمون گسترش نفت بزرگترین هاله تشکیل‌شده متعلق به سویه‌های PS12B2، PS2C3، PS20B1 و PS12E1 به ترتیب با مقادیر ۲/۴۳، ۲، ۲ و ۱/۹۶ سانتی‌متر بیشتر از آب مقطر (۰/۱۶ سانتی‌متر) بود ($P<0.05$) (جدول ۲). Thavasi

et al., (2011) بیان کردند که نتیجه مثبت برای ترشح بیوسورفکتانت، قطر هاله حداقل ۰/۵ سانتی‌متری در نظر گرفته می‌شود. در آزمون کشش سطحی، سویه‌های PS12E1، PS20B1، PS12B2 و PS9D12 موفق به کاهش کشش سطحی آب مقطر به عنوان شاهد از ۷۲/۳۶ mN m^{-1} به ترتیب به ۳۷/۳۲، ۳۹/۶۱، ۴۳/۶۵ و ۴۶/۲۳ mN m^{-1} شدند که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت. آزمایش امولسیون کنندگی یک آزمون غیرمستقیم برای ارزیابی میزان ترشح بیوسورفکتانت است (Nayarisseri et al., 2018) که در این آزمایش از n-هگزان به عنوان بستر آبگریز استفاده شد. سویه‌های PS20B1، PS7D1، PS12E1 و PS14B1 به ترتیب با E24 ۵۴/۹۳ ٪، ۴۲/۵۸ ٪، ۴۰/۵ ٪ و ۳۵/۳ ٪ بیشترین میزان امولسیون کنندگی را نسبت به سایر سویه‌ها داشتند.

جدول ۲- نتایج ترشح بیوسورفکتانت سویه‌ها

کد سویه‌ها	قطر هاله (cm)	کشش سطحی (mN m^{-1})	شاخص امولسیون کنندگی (E24) (٪)
PS14B1	۱/۱۶ ± ۰/۱۲^{B}	۶۵/۲۹ ± ۳/۸۸^{ABC}	۳۵/۳ ± ۴/۰۸^{BC}
PS12B2	۲/۴۳ ± ۰/۰۹^{A}	۴۳/۶۵ ± ۳/۴۸^{DEF}	۳۱/۱۸ ± ۴/۹۸^{BCD}
PS7D1	۱/۴۳ ± ۰/۲۳^{B}	۵۲/۲ ± ۳/۹۶^{CDE}	۴۲/۵۸ ± ۴/۰۶^{AB}
PS9D12	۰/۶ ± ۰/۰۸^{CD}	۴۶/۲۳ ± ۳/۳۸^{DEF}	۱۱/۳۱ ± ۳/۰۲^{FG}
PS2C3	۲ ± ۰/۰۸^{A}	۶۳/۹۳ ± ۳/۹۲^{ABC}	۲۴/۸۷ ± ۲/۷۲^{CDE}
PS3B1	۰/۳۳ ± ۰/۰۴^{DE}	۶۷/۲۶ ± ۱/۹۶^{AB}	۱۹/۰۶ ± ۳/۶۷^{DEF}
PS20B1	۲ ± ۰/۰۸^{A}	۳۹/۶۱ ± ۳/۷۶^{EF}	۵۴/۹۳ ± ۴/۵۹^{A}
PS8A1	۱/۱ ± ۰/۱۴^{B}	۶۲/۲۲ ± ۳/۹۸^{ABC}	۱۴/۷۶ ± ۱/۹۲^{EFG}
PS9D11	۰/۴ ± ۰/۰۸^{CD}	۶۷/۶۴ ± ۶/۰۸^{AB}	۸/۲۶ ± ۲/۴۷^{G}
PS12A1	۰/۶۶ ± ۰/۰۹^{C}	۵۵/۰۹ ± ۳/۸۵^{BCD}	۸/۴۵ ± ۲/۸۷^{G}
PS12B1	۰/۵ ± ۰/۰۸^{CD}	۶۶/۴۶ ± ۲/۷۳^{AB}	۱۶/۹۷ ± ۵/۲۳^{EFG}
PS12E1	۱/۹۶ ± ۰/۰۴^{A}	۳۷/۳۲ ± ۳/۳۸^{F}	۴۰/۵ ± ۳/۱۸^{ABC}
آب مقطر (شاهد)	۰/۱۶ ± ۰/۰۴^{E}	۷۲/۳۶ ± ۱/۴۶^{A}	-

نتایج براساس میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، مقایسه‌های میانگین با آزمون توکی و حروف مشترک تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵٪ نشان ندادند.

کاهش TPH در محیط MSM حاوی نفت خام

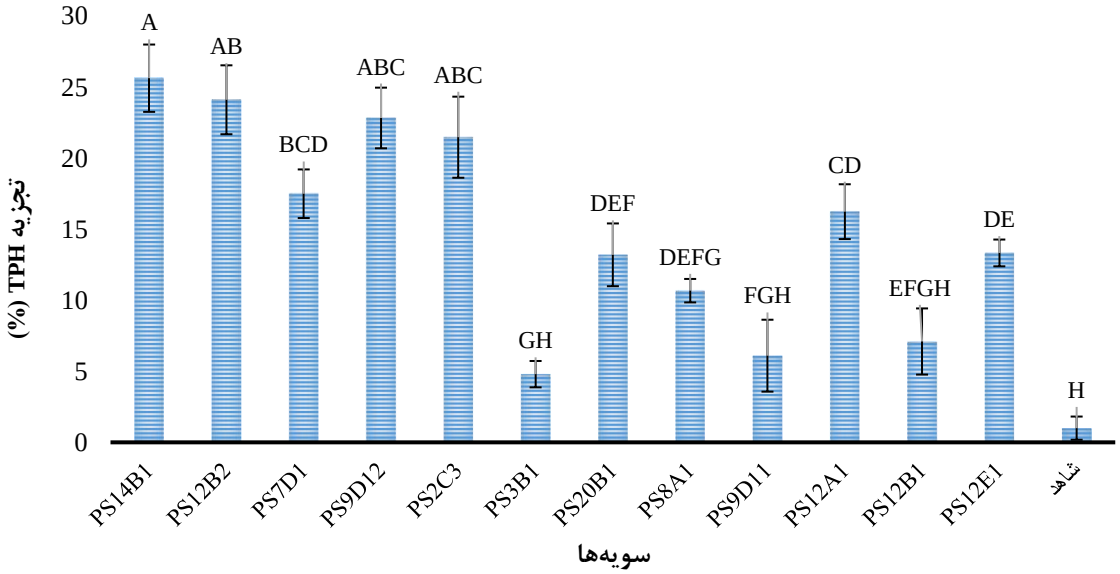
برای بررسی توان باکتری‌ها در تجزیه TPH از محیط MSM غنی‌شده با نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده شد. نتایج مثبتی در این آزمون حاصل شد؛ به این صورت که سویه‌های PS14B1، PS12B2، PS9D12 و PS2C3 به ترتیب موفق به تجزیه TPH به میزان ۲۵/۶۳ ٪، ۲۴/۱۱ ٪، ۲۲/۸۳ ٪ و ۲۱/۴۸ ٪ شدند (شکل ۲) که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد در سطح احتمال ۵٪ داشتند. Gyasi et al., (2024) گزارش کردند که دو باکتری *Acinetobacter junii* و *Alcanivorax xenomutans* به ترتیب موفق به تجزیه ۲۷/۵۹ ٪ و ۲۱/۱۴ ٪ نفت خام در محیط مایع بعد از ۱۵ روز گرماگذاری شدند. همچنین Hamidi et al., 2021 توانایی دو سویه باکتریایی *Arthrobacter citreus* و *Rhodococcus jostii* را در تجزیه TPH مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که سویه‌های *Arthrobacter citreus* و *Rhodococcus jostii* به ترتیب موفق به تجزیه ۲۷٪ و ۲۲٪ TPH در طول ۷ روز شدند. در جدول ۳ نتایج برخی از مطالعات انجام‌شده در زمینه تجزیه ترکیبات نفتی در محیط مایع گزارش شده است. تصاویر مربوط به ارلن‌های تلقیح شده با سویه‌های مختلف در شکل ۳ قابل مشاهده است. همچنین تجزیه واریانس آزمون‌های ترشح بیوسورفکتانت و کاهش TPH در جدول ۴ آورده شده است.

خصوصیات خاک مورد مطالعه

خصوصیات شیمیایی، فیزیکی و زیستی خاک آلوده اندازه‌گیری شد. بافت خاک موردنظر رس سیلتی بود و از نظر عناصر غذایی فقیر بود. همچنین pH قلیایی و هدایت الکتریکی آن ۱/۷۱ ds m^{-1} بود که این خاک را در رده خاک‌های با شوری کم قرار می‌دهد. نتایج آنالیز کروماتوگرافی نشان داد که این خاک به ۱۴/۴۳ ٪ TPH آلوده است که مقدار زیادی است و وجود مقادیر زیاد فلزات سنگین هم مؤید این قضیه است. مشخصات خاک موردمطالعه در جدول ۵ و کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC-FID در شکل ۴ قابل مشاهده است.

جدول ۳- برخی از مطالعات انجام‌شده در زمینه تجزیه ترکیبات نفتی در محیط مایع

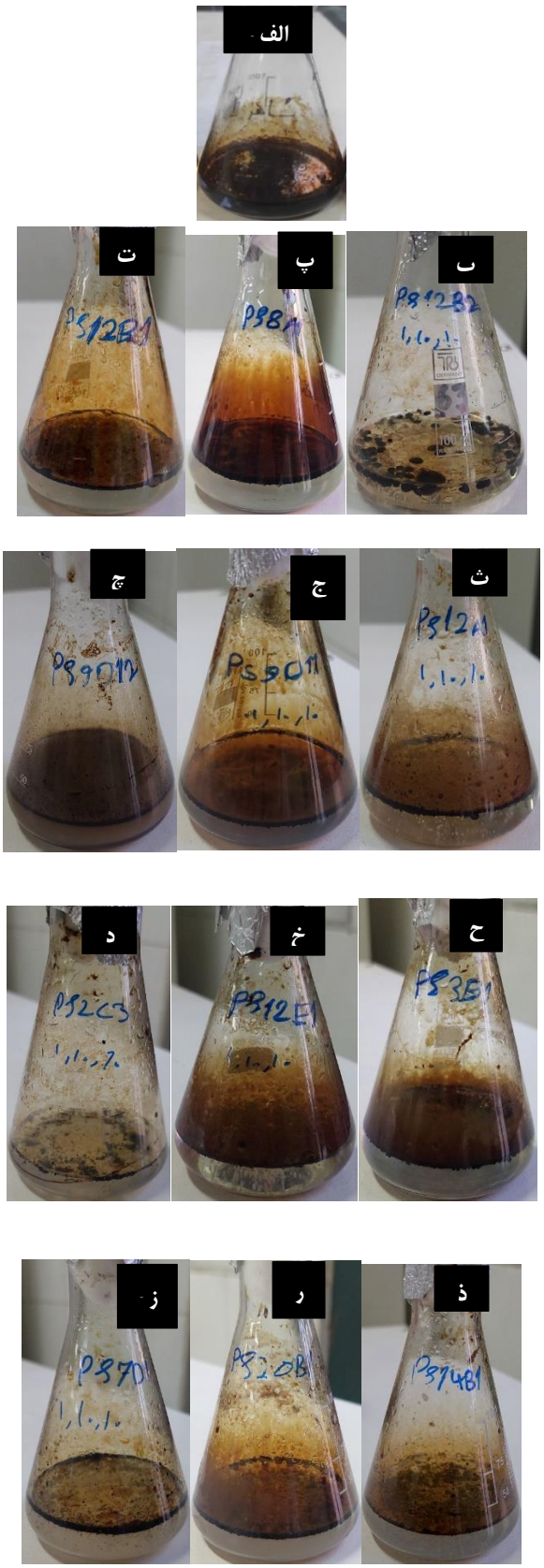
سویه	ترکیب نفتی	دوره انکوباسیون	تجزیه	منبع
Pseudomonas sp.	گازوئیل	۷ روز	٪ ۱۴/۱۹	Hossain et al., 2022
Pseudomonas sp.	TPH	۱۲ روز	٪ ۴۲/۲	Phulpoto et al., 2022
Bacillus subtilis BL-27	نفت خام	۵ روز	٪ ۶۵	Wang et al., 2019
Serratia proteamaculans S1BD1	نفت خام	۱۵ روز	٪ ۶۸	Xia et al., 2017
Rhodococcus erythropolis OSDS1			٪ ۵۴/۹	
Acinetobacter junii	نفت خام	۱۵ روز	٪ ۲۷/۵۹	Gyasi et al., 2024
Alcanivorax xenomutans			٪ ۲۱/۱۴	
Dietzia aerolata PS14B1	نفت خام	۷ روز	٪ ۲۵/۶۳	مطالعه حاضر
Kocuria salina PS12B2			٪ ۲۴/۱۱	
Mesobacillus harenae PS12B2			٪۲۲/۸۳	



شکل ۲- نتایج آزمون تجزیه TPH سویه‌ها بعد از ۷ روز گرماگذاری در RPM ۱۶۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس. حروف مشترک تفاوت معنی‌داری را در سطح ٪۵ نشان ندادند.

جدول ٤- تجزیه واریانس ANOVA آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab 17.3.1 در سطح احتمال ٪۵

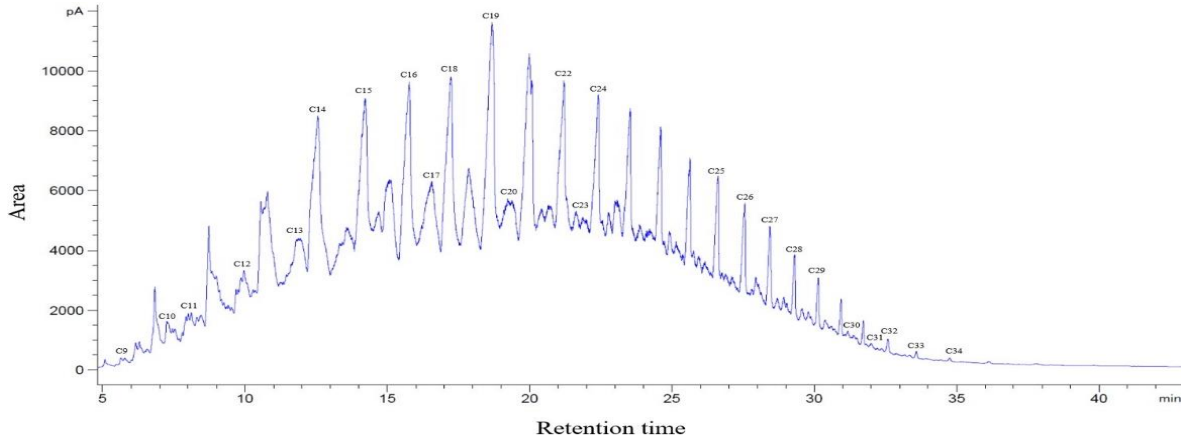
آزمایش	تجزیه واریانس		
	منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
کاهش TPH در محیط MSM	تیمار	۱۲	۱۹۱/۰۸۱*
	خطا	۲۶	۵/۸۴۵
	کل	۳۸	–
گسترش نفت خام (بیوسورفکتانت)	تیمار	۱۲	۱/۸۳۴۹۱*
	خطا	۲۶	۰/۰۱۵۹۰
	کل	۳۸	–
کشش سطحی (بیوسورفکتانت)	تیمار	۱۲	۴۲۴/۷۲*
	خطا	۲۶	۲۰/۳۸
	کل	۳۸	–
E24 (بیوسورفکتانت)	تیمار	۱۱	۶/۹۴۴۷*
	خطا	۲۴	۰/۲۴۵۱
	کل	۳۵	–



شکل ۳- ارلن‌های تلقیح شده و بدون تلقیح بعد از ۷ روز گرماگذاری در ۱٦۰ RPM و دمای ۳۰ درجه سلسیوس مربوط به تجزیه نفت در محیط مایع. الف: شاهد، ب: PS8A1، پ: PS12B2، ت: PS12B1، ث: PS12A1، ج: PS9D11، چ: PS9D12، ح: PS3B1، خ: PS12E1، د: PS2C3، ذ: PS14B1، ر: PS20B1 و ز: PS7D1

جدول ۵- خصوصیات خاک موردمطالعه

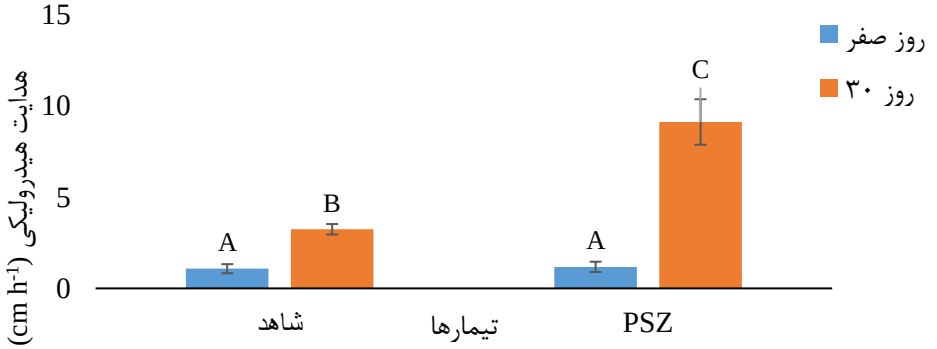
پارامتر	pH	بافت	نیتروژن کل (٪)	فسفر قابل‌جذب ($mg\ Kg^{-1}$)	پتاسیم ($mg\ Kg^{-1}$)	هدایت الکتریکی ($ds\ m^{-1}$)	جمعیت میکروبی ($MPN\ g^{-1}$)	غلظت TPH (٪)
مقدار	۸/۲	رس سیلتی	۰/۲۲	۳/۴۳	۲۱۲	۱/۷۱	$۲/۲\times۱۰^{۳}$	۱۴/۴۳
پارامتر	سرب (Pb) ($mg\ Kg^{-1}$)	کروم (Cr) ($mg\ Kg^{-1}$)	نیکل (Ni) ($mg\ Kg^{-1}$)	کبالت (Co) ($mg\ Kg^{-1}$)	مس (Cu) ($mg\ Kg^{-1}$)	روی (Zn) ($mg\ Kg^{-1}$)	کادمیوم (Cd) ($mg\ Kg^{-1}$)	تنفس میکروبی ($mg\ CO_2\ day^{-1}$) (gr^{-1}
مقدار	۱۹۴/۲۰	۱۰۱/۳۹	۱۰۰/۳۶	۹۰/۳۶	۵۲/۳۰	۳۸/۷۸	۲۵/۸۰	۰/۳۵



شکل ٤- کروماتوگرام GC-FID مربوط به آنالیز TPH خاک موردمطالعه

تغییرات هدایت هیدرولیکی خاک

هیدروکربن‌های نفتی جریان هوا را در منافذ خاک مسدود می‌کنند (Sutton et al., 2013) و خواص فیزیکی مانند هدایت هیدرولیکی خاک را کاهش می‌دهند (Devatha et al., 2019; Akinwumi et al., 2013; Nazir, 2011)؛ بنابراین تغییر خصوصیات فیزیکی خاک به دلیل آلودگی هیدروکربن‌های نفتی می‌تواند بر رشد گیاه تأثیر منفی بگذارد (Adieze et al., 2012; Athar et al., 2016). هدایت هیدرولیکی خاک‌ها در روز صفر و بعد از ۳۰ روز انکوباسیون اندازه‌گیری شد. در روز صفر، هدایت هیدرولیکی تیمار شاهد ۱/۰۸ و تیمار PSZ (کنسرسیوم *Dietzia aerolata* PS14B1، *Kocuria salina* PS12B2 و *Mesobacillus harenae* PS9D12) ۱/۱۸ سانتی‌متر بر ساعت بود که بعد از ۳۰ روز هر دو به طور معنی‌داری افزایش پیدا کردند. در پایان دوره انکوباسیون هدایت هیدرولیکی تیمار PSZ افزایش چشمگیری داشت و به مقدار ۹/۱۲ سانتی‌متر بر ساعت رسید که نسبت به تیمار شاهد (۳/۲۴ سانتی‌متر بر ساعت) معنی‌دار بود (شکل ۵). این نشان از تأثیر مثبت کنسرسیوم افزوده‌شده بر وضعیت آبگذری خاک است.



شکل ۵- تغییرات هدایت هیدرولیکی خاک‌ها تحت تیمار کنسرسیوم میکروبی PSZ به همراه شاهد (بدون تلقیح) در طول ۳۰ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

نتیجه‌گیری

هیدروکربن‌های نفتی اثرات سوئی بر سلامت انسان، گیاهان، جامعه میکروبی خاک و خصوصیات فیزیکی خاک مثل هدایت هیدرولیکی دارند. زیست‌پالایی از جهت مقرون به‌صرفه بودن و سازگاری با محیط‌زیست، یکی از بهترین روش‌ها برای اصلاح خاک‌های آلوده به نفت است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سویه‌های *Dietzia aerolata* PS14B1، *Kocuria salina* PS12B2 و *Mesobacillus harenae* PS9D12 توانایی خوبی در رشد در محیط MSM آگار حاوی نفت، ترشح بیوسورفکتانت و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دارند. همچنین کنسرسیوم متشکل از این سویه‌ها ضریب آبگذری خاک را از ۱/۱۸ به ۹/۱۲ سانتی‌متر بر ساعت افزایش داد ($P<0.05$)؛ بنابراین می‌توان از این سویه‌ها در اصلاح زیستی مکان‌های آلوده به ترکیبات نفتی در جهت میل به محیط زیستی پاک و پایدار استفاده کرد. درنهایت پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده تأثیر این باکتری‌ها بر خصوصیات دیگر فیزیکی خاک‌های آلوده مثل آبگریزی و پایداری خاکدانه‌ها و خصوصیات شیمیایی مثل انحلال عناصر غیرقابل‌دسترس مورد بررسی قرار بگیرد.

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

REFERENCES

Adieze, I. E., Orji, J. C., Nwabueze, R. N., & Onyeze, G. O. C. (2012). Hydrocarbon stress response of four tropical plants in weathered crude oil contaminated soil in microcosms. *International Journal of Environmental Studies*, 69(3), 490-500.

Akinwumi, I. I., Adeyeri, J. B., & Ejohwomu, O. A. (2013). Effects of steel slag addition on the plasticity, strength, and permeability of lateritic soil. In ICSDEC 2012: *Developing the Frontier of Sustainable Design, Engineering, and Construction* (pp. 457-464).

Alexander, M. (1983). Most probable number method for microbial populations. Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties, 9, 815-820.

Almansoory, A. F., Hasan, H. A., Abdullah, S. R. S., Idris, M., Anuar, N., & Al-Adiwish, W. M. (2019). Biosurfactant produced by the hydrocarbon-degrading bacteria: Characterization, activity and applications in removing TPH from contaminated soil. *Environmental technology & innovation*, *14*, 100347.

Al-Marri, S., Eldos, H. I., Ashfaq, M. Y., Saeed, S., Skariah, S., Varghese, L., ... & Raja, M. M. (2023). Isolation, identification, and screening of biosurfactant-producing and hydrocarbon-degrading bacteria from oil and gas industrial waste. *Biotechnology Reports*, *39*, e00804.

Athar, H. U. R., Ambreen, S., Javed, M., Hina, M., Rasul, S., Zafar, Z. U., ... & Ashraf, M. (2016). Influence of sub-lethal crude oil concentration on growth, water relations and photosynthetic capacity of maize (Zea mays L.) plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 18320-18331.

Avizhgan, A., Asadi, H., Mohammadi, M. H., & Gorji, M. (2021). Assessment of Surface Sealing Formation and Its Relationship with Soil Quality Indices. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 52(6), 1501-1514.

Baoune, H., Aparicio, J. D., Pucci, G., Ould El Hadj-Khelil, A., & Polti, M. A. (2019). Bioremediation of petroleum-contaminated soils using Streptomyces sp. Hlh1. *Journal of Soils and Sediments*, *19*, 2222-2230.

Black, C. A. (1965). Method of soil analysis part 2. Chemical and microbiological properties, 9, 1387-1388.

Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils 1. *Agronomy Journal*, 54(5), 464-465.

Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen. Methods of soil analysis: part 2 chemical and microbiological properties, 9, 1149-1178.

Chen, W., Kong, Y., Li, J., Sun, Y., Min, J., & Hu, X. (2020). Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 154, 105047.

Clark, F. E. (1965). Agar-plate method for total microbial count. In: C. A. Black, D. D. Evans, L. E. Ensminger, J. L.White, & F. E. Clark (Eds.), Methods for soil analysis. Part 2 chemical and microbiological properties (pp. 1461–1465).

Concepta Goveas, L., Alva, M., Menezes, J., Krishna, A., Salian, A., & Sajankila, S. P. (2022). Optimization of degradation of petroleum crude oil by Lysinibacillus sp. SS1 in seawater by response surface methodology. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *9*(1), 494-503.

Dastgheib, S. M. M., Tirandaz, H., Moshtaghi Nikou, M., Ramezani, M., Shavandi, M., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2017). Prauserella oleivorans sp. nov., a halophilic and thermotolerant crude-oil-degrading actinobacterium isolated from an oil-contaminated mud pit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(9), 3381-3386.

Devatha, C. P., Vishnu Vishal, A., & Purna Chandra Rao, J. (2019). Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Applied Water Science*, 9, 1-10.

Devatha, C. P., Vishnu Vishal, A., & Purna Chandra Rao, J. (2019). Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Applied Water Science*, *9*, 1-10.

Gyasi, S. F., Sarfo, M. K., Kabo-Bah, A. T., Adu, B., Appiah, A. S., & Serfor-Armah, Y. (2024). In vitro assessment of crude oil degradation by Acinetobacter junii and Alcanivorax xenomutans isolated from the coast of Ghana. *Heliyon*, *10*(3).

Hamidi, Y., Ataei, S. A., & Sarrafi, A. (2021). Biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge: a comparative study of biostimulation, bioaugmentation, and combination of methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *96*(5), 1302-1307.

Hewelke, E., & Gozdowski, D. (2020). Hydrophysical properties of sandy clay contaminated by petroleum hydrocarbon. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(9), 9697-9706.

Hossain, M. F., Akter, M. A., Sohan, M. S. R., Sultana, N., Reza, M. A., & Hoque, K. M. F. (2022). Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(1), 211-216.

Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Ramu Dirisala, V., & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, *4*(3), 241-249.

Khalifa, A. Y. (2017). Degradation of diesel-oil by a newly isolated Kocuria sediminis DDK6. *African Journal of Microbiology Research*, *11*(10), 400-407.

Khobragade, V. B., & Kulkarni, S. D. (2019). Isolation and biochemical characterization of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils from Maharashtra, India.

Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international*, 60, 71-80.

Lee, D. W., Lee, H., Kwon, B. O., Khim, J. S., Yim, U. H., Kim, B. S., & Kim, J. J. (2018). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental pollution*, *241*, 254-264.

Li, Z., Rosenzweig, R., Chen, F., Qin, J., Li, T., Han, J., ... & Ronen, Z. (2022). Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soils with Biosurfactant-Producing Degraders Isolated from the Native Desert Soils. *Microorganisms*, *10*(11), 2267.

Mehetre, G. T., Dastager, S. G., & Dharne, M. S. (2019). Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. *Science of the total environment*, *679*, 52-60.

Michel, B. E., & Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51(5), 914-916.

Mishra, A., Saxena, A., & Singh, S. P. (2019). Isolation and characterization of microbial strains from refinery effluent to screen their bioremediation potential. *J Pure Appl Microbiol*, *13*(4), 2325-2332.

Nayarisseri, A., Singh, P., & Singh, S. K. (2018). Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing Bacillus subtilis strain ANSKLAB03. *Bioinformation*, *14*(6), 304.

Nazina, T. N., Shumkova, E. S., Sokolova, D. S., Babich, T. L., Zhurina, M. V., Xue, Y. F., ... & Tourova, T. P. (2015). Identification of hydrocarbon-oxidizing Dietzia bacteria from petroleum reservoirs based on phenotypic properties and analysis of the 16S rRNA and gyr B genes. *Microbiology*, *84*, 377-388.

Nazir, A. K. (2011). Effect of motor oil contamination on geotechnical properties of over consolidated clay. Alexandria *Engineering Journal*, 50(4), 331-335.

Nelson, D. A., & Sommers, L. (1983). Total carbon, organic carbon, and organic matter. Methods of soil analysis: Part 2 chemical and microbiological properties, 9, 539-579.

Nikitha, T., Satyaprakash, M., Vani, S. S., Sadhana, B., & Padal, S. B. (2017). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: their transport, fate and biodegradation in the environment. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci, 6(4), 1627-1639.

Olsen, S. R. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate (No.

939). US Department of Agriculture.
Othman, A. R., Ismail, N. S., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Kurniawan, S. B., Sharuddin, S. S. N., & Ismail, N. I. (2022). Potential of indigenous biosurfactant-producing fungi from real crude oil sludge in total petroleum hydrocarbon degradation and its future research prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *10*(3), 107621.
Phulpoto, I. A., Yu, Z., Li, J., Ndayisenga, F., Hu, B., Qazi, M. A., & Yang, X. (2022). Evaluation of di-rhamnolipid biosurfactants production by a novel Pseudomonas sp. S1WB: Optimization, characterization and effect on petroleum-hydrocarbon degradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *242*, 113892.
Rayment, G. E., & Higginson, F. R. (1992). Australian laboratory handbook of soil and water chemical methods. *Inkata Press Pty Ltd*.
Sattar, S., Siddiqui, S., Shahzad, A., Bano, A., Naeem, M., Hussain, R., ... & Yasmin, H. (2022). Comparative Analysis of Microbial Consortiums and Nanoparticles for Rehabilitating Petroleum Waste Contaminated Soils. *Molecules*, 27(6), 1945.
Shah, G., & Soni, V. (2024). Comprehensive Insights into the Impact of Oil Pollution on the Environment. *Regional Studies in Marine Science*, 103516.
Shariati, S., Ebenau-Jehle, C., Pourbabaee, A. A., Alikhani, H. A., Rodriguez-Franco, M., Agne, M., ... & Boll, M. (2021). Degradation of dibutyl phthalate by Paenarthrobacter sp. Shss isolated from Saravan landfill, Hyrcanian Forests, Iran. *Biodegradation*, 1-12.
Sharuddin, S. S. N., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Othman, A. R., & Ismail, N. I. (2021). Potential bifunctional rhizobacteria from crude oil sludge for hydrocarbon degradation and biosurfactant production. *Process Safety and Environmental Protection*, *155*, 108-121.
Silva, R. D. C. F., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2014). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International journal of molecular sciences*, *15*(7), 12523-12542.
Sobri, I. M., Halim, M., Lai, O. M., Lajis, A. F., Yusof, M. T., Halmi, M. I. E., ... & Wasoh, H. (2018). Emulsification characteristics of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa using coconut oil as carbon source. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, *6*(1), 7-12.
Su, H., Lin, J., & Wang, Q. (2021). A clean production process on oily sludge with a novel collaborative process via integrating multiple approaches. *Journal of Cleaner Production*, *322*, 128983.
Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Abu Al-Soud, W., Langenhoff, A. A., Grotenhuis, T., ... & Smidt, H. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 619-630.
Thavasi, R., Jayalakshmi, S., & Banat, I. M. (2011). Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by Lactobacillus delbrueckii in biodegradation of crude oil. *Bioresource technology*, *102*(3), 3366-3372.
Tripathi, V., Gaur, V. K., Thakur, R. S., Patel, D. K., & Manickam, N. (2023). Assessing the half-life and degradation kinetics of aliphatic and aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from crude oil contaminated soil. *Chemosphere*, *337*, 139264.
Ure, A. M., Quevauviller, P. H., Muntau, H., & Griepink, B. (1993). Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *International journal of environmental analytical chemistry*, *51*(1-4), 135-151.
Uyun, K., Darmayati, Y., & Mustafa, I. (2022). Perlite-immobilized bacterialconsortium enhanced degradation of crude oil-contaminated marine sediment. *Journal of Sustainability Science and Management*, 17(1), 194-203.
Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology*, *223*, 277-286.
Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2016). Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of Pseudomonas aeruginosa NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresource technology*, *221*, 510-516.
Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 71-83.
Varjani, S. J., and V. K. Srivastava. "Green technology and sustainable development of environment." *Renewable Resources Journal* 3.1 (2015): 244-49.
Viramontes-Ramos, S., Portillo-Ruiz, M. C., Ballinas-Casarrubias, M. D. L., Torres-Muñoz, J. V., Rivera-

Chavira, B. E., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2010). Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*, 668-675.

Wang, D., Lin, J., Lin, J., Wang, W., & Li, S. (2019). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by Bacillus subtilis BL-27, a strain with weak hydrophobicity. *Molecules*, 24(17), 3021.

Xia, M., Liu, Y., Taylor, A. A., Fu, D., Khan, A. R., & Terry, N. (2017). Crude oil depletion by bacterial strains isolated from a petroleum hydrocarbon impacted solid waste management site in California. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *123*, 70-77.

Yan, Z., Jiang, H., Cai, H., Zhou, Y., & Krumholz, L. R. (2015). Complex interactions between the macrophyte Acorus calamus and microbial fuel cells during pyrene and benzo [a] pyrene degradation in sediments. *Scientific reports*, 5(1), 10709.

Zhang, Z., Sun, J., Gong, X., Yang, Z., Wang, C., & Wang, H. (2022). Anaerobic phenanthrene biodegradation by a new salt-tolerant/halophilic and nitrate-reducing Virgibacillus halodenitrificans strain PheN4 and metabolic processes exploration. *Journal of Hazardous Materials*, 435, 129085.

Ziwei, B., Hanning, W., Lusha, W., Zena, Z., & Yifei, W. (2023). Isolation and characterization of viscosity-reducing and biosurfactant-producing bacteria in low-permeability reservoir. *International Journal of Energy Research*, *2023*.