



Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology<https://sbj.areeo.ac.ir/>

Research article

The efficiency of oil-degrading and phosphate-solubilizing bacteria in phosphorus availability of an oil-contaminated calcareous soil

Komeil Zeynali¹ , Shayan Shariati² , Ahmad Ali Pourbabaei^{3*} and Mehdi Shorafa³

1-M.Sc graduate in Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran, E-mail: komeilzeynali7899@ut.ac.ir

2-Assistant Professor, Department of Environmental Engineering, Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: shayan_shariati@ut.ac.ir

3-Professor, Department of Soil Science and Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: Pourbabaei@ut.ac.ir, m_shorafa@ut.ac.ir

Article Info

Received:

September 14, 2024

Accepted:

December 29, 2024

Keywords:

Bioremediation
Biosurfactant
crude oil
drillingmud
phosphate
solubilization

Corresponding author's email:

shayan_shariati@ut.ac.ir
Pourbabaei@ut.ac.ir

DOI:

10.22092/SBJ.2024.36
6874.268

Extended Abstract

Background and Objectives: The leakage of petroleum compounds into ecosystems poses a severe risk to both environmental health and human safety. Various physical and chemical methods are utilized to remediate oil-contaminated soils; however, many of these methods are underutilized due to high costs and adverse environmental impacts. Physical methods are relatively cost-effective. However, they often fail to completely eliminate contaminants and may cause phase transitions in pollutants. Chemical methods, including precipitation, chemical oxidation, and the use of Fenton's reagent, are expensive and have adverse environmental consequences. Bioremediation, by contrast, is widely employed approach for the treating petroleum-contaminated soils due to its economic and environmental advantages. This method relies on microorganisms to enzymatically degrade petroleum compounds into water and carbon dioxide. One major challenge in bioremediation is the limited availability of essential nutrients, particularly phosphorus, in contaminated soils. Research indicates that oil contamination markedly reduces the bioavailable phosphorus in soil, creating a critical limitation factor for plant growth and the success of bioremediation efforts. To address this phosphorus deficiency, phosphate-solubilizing bacteria (PSBs) capable of converting inorganic phosphate into a bioavailable form, can effectively mitigate phosphorus deficiency in soil. This study aimed to isolate microorganisms with dual capabilities of degrading crude oil and solubilizing phosphate from drilling mud and to assess their impact on soil phosphorus levels post-inoculation.

Materials and Methods: Bacterial strains were isolated using enrichment techniques from drilling mud with high total petroleum hydrocarbon (TPH) contamination to enhance bioremediation and soil phosphorus availability. Their ability to utilize crude oil as the sole carbon and energy source was evaluated through three assays: growth on mineral salt medium (MSM) agar, growth in MSM, and crude oil degradation in MSM using a gravimetric method. Then, phosphate solubilization capability was determined using the spot-on-plate method in Sperber-agar,

employing tricalcium phosphate $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ as the insoluble phosphate source. Next, biosurfactant production was assessed using oil spreading, surface tension, and emulsification index (E24) assays, with crude oil as the carbon source. The isolates were phenotypically identified. Subsequently a soil microcosm experiment was designed using a completely randomized design with two treatments and six replicates in glass containers containing 300 grams of contaminated soil finally. The three most effective isolates were combined in equal proportions and inoculated into contaminated soil. The available phosphorus content in the soil was measured using the sodium bicarbonate extraction method at the start (day 0) and after 30 days of incubation at 27°C. Data analysis, including variance analysis and graphical representation, was conducted using Minitab and Excel software, respectively.

Results: Seven distinct bacterial isolates were obtained from contaminated drilling mud following the enrichment stage. Crude oil degradation assays in MSM showed that isolates NW1, NW5, and NW7 achieved degradation rates of 20.6%, 19.66%, and 15.53%, respectively. Additionally, isolates NW2, NW7, and NW4 demonstrated growth rates (OD_{600}) of 0.35, 0.35, and 0.31, respectively, over seven days. Phosphate solubilization tests indicated that isolates NW7 and NW5 achieved the highest solubilization indices of 3.76 and 2.83 on Sperber-agar, respectively ($p < 0.05$). Based on these results, isolates NW1, NW2, and NW7 were selected for further experiments. In biosurfactant production tests, isolate NW2 exhibited the largest oil spread zone (1.26 cm) and the highest emulsification index (46.7%), significantly outperforming other isolates. The cumulative results indicated that NW2 was the most effective biosurfactant producer. Phenotypic identification classified NW1, NW2, and NW7 as belonging to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Rhodococcus*, respectively. In the soil microcosm experiment, the bacterial consortium significantly increased soil-available phosphorus from 3.4 mg/kg to 8.46 mg/kg compared to the control ($p < 0.05$).

Conclusion: Oil compound spills have detrimental effects on ecosystems and human health, and conventional remediation methods are costly and environmentally unsustainable. In contrast, bioremediation provides a sustainable and economical solution by employing microorganisms to degrade petroleum hydrocarbons. However, nutrient deficiencies, especially phosphorus, in contaminated soils restrict its efficiency. This study aims to isolate and evaluate oil-degrading and phosphate-solubilizing microorganisms from contaminated drilling mud, with the aim of increasing bioremediation efficiency and soil phosphorus levels. Among the seven isolated bacteria, NW1, NW2, and NW7 showed promising hydrocarbon degradation and phosphate solubilization capabilities and were identified as *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Rhodococcus*, respectively. Inoculating these strains significantly increased soil-available phosphorus, underscoring their potential to improve both bioremediation efficiency and soil fertility. Future studies should explore the phosphorus solubilization capabilities of these isolates in soils with varying salinity, pH, and total phosphorus levels. Additionally, the impact of bacterial immobilization on different carriers for phosphorus solubilization in soil represents an interesting topic that has not yet been explored.

Cite this article: Zeynali, K., Shariati, Sh., Pourbabaee, A.A., Shorafa, M., 2025. The efficiency of oil-degrading and phosphate-solubilizing bacteria in phosphorus availability of an oil-contaminated calcareous soil. *Journal of Soil Biology*, 12 (2), 191-212



DOI: 10.22092/SBJ.2024.366874.268

Publisher: Soil Science Society of Iran



مقاله پژوهشی

ارزیابی کارایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت و دارای توان حل‌کنندگی فسفات در فراهمی فسفر یک خاک آهکی آلوده نفتی

کمیل زینالی^۱، شایان شریعتی^۲، احمدعلی پوربابائی^۳ و مهدی شرفا^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران، تهران، ایران،

komeilzeynali7899@ut.ac.ir

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

۳- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران، تهران، ایران، m_shorafa@ut.ac.ir، pourbabaei@ut.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۶/۲۴ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۹

چکیده

در این پژوهش، با هدف بهبود زیست‌پالایی خاک آلوده و افزایش فسفر در دسترس خاک، سوبه‌های باکتریایی به روش غنی‌سازی از گل حفاری چاه نفتی با آلودگی بالای هیدروکربن‌های نفتی کل (TPH) (Total Petroleum Hydrocarbon) جدا شدند و توانایی آن‌ها در استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس توانایی انحلال فسفر و تولید سورفکتانت زیستی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت آزمایشی در محیط خاک به منظور بررسی انحلال فسفر طراحی گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار B (خاک آلوده به همراه تلقیح اجتماع سه جدایه باکتریایی) و C (شاهد، خاک آلوده بدون تلقیح باکتری) و شش تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای Minitab و Excel انجام شد. نتایج نشان داد، از میان هفت باکتری جدا شده از گل حفاری، جدایه‌های NW1، NW5 و NW7 به ترتیب با ۲۰/۶، ۱۹/۶۶ و ۱۵/۵۳ درصد تجزیه نفت در محیط MSM، بهترین عملکرد را در تخریب هیدروکربن‌ها داشتند. همچنین جدایه‌های NW7 و NW5 به ترتیب با شاخص انحلال ۳/۷۶ و ۲/۸۳ بیشترین میزان انحلال فسفات را نسبت به سایر جدایه‌ها ثبت کردند ($p < 0.05$). در آزمون‌های مختلف تولید سورفکتانت زیستی، جدایه NW2 کارایی بالایی از خود نشان داد. در مرحله بعد، شناسایی فنوتیپی جدایه‌های NW1، NW2 و NW7 انجام شد که نشان داد این باکتری‌ها به ترتیب متعلق به جنس‌های *Rhodococcus*، *Bacillus* و *Pseudomonas* هستند. همچنین، در آزمایش خاک، این باکتری‌ها توانستند میزان فسفر قابل جذب خاک را به‌طور چشمگیری از ۳/۴ میلی گرم بر کیلوگرم به ۸/۴۶ میلی گرم بر کیلوگرم افزایش دهند ($p < 0.05$). در نتیجه، یافته‌های این پژوهش بر پتانسیل زیست‌پالایی و افزایش حاصلخیزی خاک مبتنی بر میکروب‌های توانمند به عنوان یک راه حل مؤثر و پایدار برای پاکسازی مکان‌های آلوده به ترکیبات نفتی و انحلال فسفات نامحلول خاک، تأکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: انحلال فسفات، سورفکتانت زیستی، زیست‌پالایی، گل حفاری، نفت خام

مقدمه

ذخیره‌سازی و حمل‌ونقل، پالایش، استفاده از نفت و محصولات آن و تخلیه زباله‌های نفتی، باعث نشت نفت به اکوسیستم و به خطر افتادن سلامت موجودات زنده و انسان می‌شود (Ramirez et al., 2017; Cerqueda-García et al., 2020; Žvirgždas et al., 2023). بزرگترین نشت نفت تاریخ در دریا، مربوط به نشت DWH^۱ است که در تاریخ ۲۰ آوریل ۲۰۱۰ در خلیج مکزیک رخ داد. در این حادثه حدود ۴/۹ میلیون بشکه (۲۱۰ میلیون گالن ایالات متحده) نفت خام شیرین لوئیزیانا جنوبی به محیط آبی نشت کرد (Quigg et al., 2021).

روش‌های فیزیکی و شیمیایی متعددی برای مقابله با آلودگی‌های نفتی در خاک وجود دارد که بسیاری از آن‌ها به سبب هزینه بالا و اثرات جانبی مضر زیست محیطی، کمتر استفاده می‌شوند (Wang et al., 2021). روش‌های فیزیکی کم‌هزینه می‌باشند، اما در اکثر مواقع حذف کامل آلاینده را انجام نمی‌دهند و تغییر فاز آلودگی از شاخصه‌های بارز این فرایندها می‌باشد. از روش‌های شیمیایی نیز می‌توان استفاده از فرایند ترسیب و اکسیداسیون شیمیایی^۲، کمپوستینگ^۳، استفاده از معرف فتون^۴، تصفیه با گاز ازن^۵ و روش اکسیداسیون آندی^۶ را نام برد که نیازمند هزینه بالا بوده و جزء روش‌های دوست‌دار محیط زیست محسوب نمی‌شوند (Sayed et al., 2021). ریزجانداران به‌عنوان یکی از اجزای اصلی چرخه‌های بیوژئوشیمیایی، جزء کلیدی بقای گیاهان، جانوران و دیگر موجودات زمینی و محرک اصلی تخریب منابع کربنی از جمله ترکیبات نفتی هستند (Chunyan et al., 2023). یکی از بهترین گزینه‌ها برای پالایش خاک‌های آلوده، زیست‌پالایی^۷ است که به‌سرعت در حال گسترش می‌باشد. عمده مزیت این‌گونه

روش‌ها، تنوع حذف آلاینده‌های مختلف و هزینه سرمایه‌گذاری پایین و بهره‌برداری بالا می‌باشد (Mahjoubi et al., 2018; Xu et al., 2018). تجزیه زیستی نفت خام، عبارت است از تبدیل ترکیبات پیچیده و مضر آن، مانند هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای^۸ (PAHs) و آلکان‌های با زنجیره بلند توسط ریزجانداران به ترکیبات ساده‌تر (Kim et al., 2013; Nikitha et al., 2017; Zeynali et al., 2024a). به عبارت دیگر، هیدروکربن‌های ساده و پیچیده، از طریق جذب و سپس متابولیسم سلولی، به طور کامل تخریب شده و به ترکیبات بی‌ضرری مانند دی‌اکسیدکربن و آب تبدیل می‌شوند (Wang et al., 2021). ریزجانداران با سیستم آنزیمی خود باعث پاکسازی محل‌های آلوده به ترکیبات نفتی شده و سلامت محیط زیست را تضمین می‌کنند (Sozina & Danilov, 2023). فسفر، یک عنصر غذایی پرمصرف ضروری برای تمام اشکال حیات روی زمین است و ثابت شده است که کمبود آن یک عامل محدودکننده حیاتی برای رشد گیاه و زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت است (Schryer & Siciliano, 2024; Ou et al., 2024). کمبود فسفر، یک پدیده رایج در اکوسیستم‌های خاکی می‌باشد. همچنین، در خاک‌های آلوده نفتی، گروه‌های عاملی نفت می‌توانند با نیتروژن و فسفر معدنی ترکیب شده و باعث فسفرزدایی^۹ و مهار نیتریفیکاسیون شوند که منجر به کاهش فسفر دردسترس و همچنین پتانسیم خاک می‌گردد (Gainer et al., 2019). Okafor (2023) در مطالعه‌ای به این نتیجه رسید که آلودگی خاک به نفت خام، به‌طور معنی‌داری باعث کاهش مقدار هدایت الکتریکی، نیتروژن و فسفر می‌گردد. Wang و همکاران (2021) هم به نتایج مشابهی دست یافتند و بیان کردند آلودگی نفتی باعث کاهش فسفر محلول از ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در تیمار

^۱ Anodic oxidation^۲ Bioremediation^۸ Polycyclic aromatic hydrocarbons^۹ Dephosphorization^۱ Deepwater Horizon^۲ Chemical oxidation^۳ Composting^۴ Fenton indicator^۵ Treatment using ozone gas

فسفر، رویکردی نویدبخش برای بهبود زیست‌پالایی و حاصلخیزی خاک‌های آلوده است. باتوجه به اینکه تاکنون مطالعه جامعی درباره اثر تلقیح PSB بر تغییرات فسفر خاک‌های آلوده به نفت انجام نشده است، این پژوهش با هدف جداسازی میکروارگانیسم‌های با توانایی تجزیه نفت خام و انحلال فسفات از گل حفاری و بررسی تأثیر آن‌ها بر افزایش فسفر قابل جذب خاک طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و تعیین خصوصیات گل حفاری

گل حفاری از محل چاه نفت شماره ۴۸۳ در شمال میدان نفتی مارون، واقع در ۵۲ کیلومتری جنوب شرقی اهواز تهیه شد و تحت شرایط سترون سریعاً به آزمایشگاه منتقل و برای انجام آزمایشات در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. گل حفاری بعد از هوا خشک شدن، از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و آزمایشات مربوط به خصوصیات خاک روی آن انجام گرفت. بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962) و اسیدیته خاک در سوسپانسیون خاک:آب با نسبت ۱:۵ به وسیله دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد (Rayment & Higginson, 1992). رطوبت، قابلیت هدایت الکتریکی، درصد ماده آلی و کربن آلی کل خاک به ترتیب به روش‌های وزن‌سنجی (Black, 1965)، دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی (EC متر) (Black, 1965) و والکلی-بلک^{۱۱} (Nelson & Sommers, 1983) اندازه‌گیری شدند. همچنین جمعیت میکروبی قابل کشت خاک به روش بیشترین تعداد احتمالی (MPN^{۱۲}) در محیط کشت مایع (Alexander, 1983) تعیین شد.

استخراج و اندازه‌گیری میزان TPH

محتویات TPH گل حفاری به روش استخراج با سوکسله، استخراج شد (Sattar et al., 2022). بدین

شاهد، به ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم در تیمار آلوده، شده است. رفع کمبود این عنصر ضروری با کودهای شیمیایی، منجر به تأثیرات نامطلوب بر سلامت اکولوژیکی محیط زیست می‌شود. همچنین مواد اولیه سازنده این کودها تجدیدنپذیر بوده و به مدت طولانی در خاک باقی می‌مانند (Pahalvi et al., 2021). از این رو، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات^{۱۰} (PSB)، یک راه مقرون‌به‌صرفه، مؤثر و دوست‌دار محیط زیست برای حل مشکل کمبود فسفر در خاک می‌باشد (Shariati et al., 2013; Owen et al., 2015). این باکتری‌ها، ظرفیت‌های متابولیکی گسترده‌ای در افزایش دسترسی زیستی اشکال مختلف فسفر در خاک دارند. توانایی باکتری‌های جنس *Bacillus* در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی و انحلال فسفر معدنی خاک به اثبات رسیده است (Zeynali et al., 2024a). علاوه بر آن، ثابت شده است که رفع کمبود فسفر خاک، باعث افزایش فعالیت میکروبی، فراوانی ژن *AlkB* و در نتیجه تجزیه بیشتر هیدروکربن‌های نفتی می‌شود (Hoang et al., 2022). بنابراین، تلقیح خاک‌های آلوده نفتی با باکتری‌های حل‌کننده فسفر نتیجه خوبی در زیست‌پالایی این خاک‌ها خواهد داشت (Girigiri et al., 2019). باتوجه به تأثیرات مخرب آلودگی‌های نفتی بر سلامت اکوسیستم‌ها و محدودیت‌های روش‌های فیزیکی و شیمیایی در رفع این آلودگی‌ها، زیست‌پالایی به‌عنوان روشی پایدار و دوست‌دار محیط زیست، اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. یکی از عوامل محدودکننده زیست‌پالایی در خاک‌های آلوده به نفت، کمبود فسفر، به‌عنوان یک عنصر حیاتی برای رشد و فعالیت ریزجانداران، محسوب می‌شود. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که آلودگی‌های نفتی باعث کاهش دسترسی به فسفر خاک و مهار نیتریفیکاسیون می‌شوند و استفاده از کودهای شیمیایی برای جبران این کمبود، اثرات زیست‌محیطی نامطلوبی به همراه دارد. از این رو، استفاده از PSB، با توانایی تجزیه ترکیبات نفتی و افزایش دسترسی زیستی

¹¹ Walkley-Black

¹² Most probable number

¹⁰ Phosphate-solubilizing bacteria

جدایه‌های برتر، آزمون‌های مختلفی شامل توانایی رشد جدایه‌ها در محیط جامد (آگار) و مایع نفتی، توانایی تجزیه نفت خام در محیط مایع نفتی و توانایی ترشح سورفکتانت زیستی روی این باکتری‌ها انجام شد.

توان رشد جدایه‌ها در محیط MSM-آگار

جهت انجام این آزمایش ابتدا کشت‌های تازه (۱۸ ساعته) در محیط نوترینت آگار تهیه گردید. سپس پلیت‌های حاوی محیط کشت MSM-آگار (طبق ترکیبات ذکرشده در قسمت قبل با افزودن ۱۵٪ حجمی/حجمی آگار) تهیه و اتوکلاو شد. ۱ قطره نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، به هر پلیت افزوده شد. در مرحله بعد، یک کلنی از هر جدایه برداشته شد و بر روی محیط MSM-آگار، کشت خطی داده شد. پلیت‌ها به مدت ۷ روز و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند (Asemoloye et al., 2019). آزمایش در سه تکرار به همراه شاهد (کشت خطی با لوپ استریل بدون تلقیح) انجام شد. بعد از ۷ روز، وضعیت رشد جدایه‌ها بررسی شد و براساس تعداد کلنی‌های رشد یافته در محیط، امتیاز بندی انجام گرفت.

توان رشد جدایه‌ها در محیط MSM

میزان رشد جدایه‌ها در محیط نفتی معدنی به روش کدورت‌سنجی بررسی شد. جدایه‌ها در محیط نوترینت براث تا رسیدن به کدورت ۰/۵ ($OD_{600}=0.5$) کشت داده شدند. ۴۰ میلی‌لیتر محیط MSM استریل در ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری به همراه ۰/۵ درصد نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی تهیه گردید. باکتری‌ها به میزان ۵ درصد حجمی/حجمی به محیط MSM تلقیح شدند. نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶۰ RPM به مدت ۶ روز گرماگذاری شدند. چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به منظور تعیین رشد جدایه‌ها هر دو روز یک بار با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV 2100 unico اندازه‌گیری شد. آزمایش در سه تکرار به

منظور، ابتدا ۱۰ گرم خاک هواخشک شده داخل صافی انگشتی ریخته شد و بعد از قرار دادن صافی داخل سیفون، ۱۲۰ میلی‌لیتر مخلوطی از حلال‌های دی‌کلرومتان و n-هگزان با نسبت ۱:۱ به بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت، بالن حاوی حلال و TPH از دستگاه سوکسله جدا شده و برای پراندن حلال به دستگاه روتاری در دمای حمام آب ۱۸ درجه سلسیوس و دور ۷۰ RPM منتقل شد. محتوای TPH داخل بالن با استفاده از چند قطره از مخلوط دو حلال شست‌وشو داده شد و عصاره حاصله به یک بشر منتقل شد. درنهایت، میزان TPH به روش وزن‌سنجی تعیین گردید (Lee et al., 2012).

غنی‌سازی ریزجانداران مؤثر تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی

جهت غنی‌سازی، ۵ گرم از نمونه گل حفاری به ۹۵ میلی‌لیتر محیط استریل شده MSM^{13} (شامل K_2HPO_4 ، $g/L (NH)_2SO_4$ ۴/۵، $g/L KH_2PO_4$ ۵/۸، $g/L MnSO_4$ ۰/۰۱، $g/L CaCl_2$ ۰/۱، $g/L MgSO_4$ ۰/۰۱۷۸، $g/L FeSO_4$ ۰/۰۰۱، $g/L ZnSO_4$ ۰/۰۱) (Shariati et al., 2021) که حاوی ۰/۵ درصد نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود، اضافه گردید. pH اولیه محیط روی ۷ تنظیم شد و در شیکر دوار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۶۰ RPM گرماگذاری شد. پس از ۷ روز ۵ میلی‌لیتر از کشت‌های رشد یافته، به محیط MSM تازه که این بار حاوی ۱ درصد نفت خام بود، منتقل شد. پس از یک هفته این کار مجدداً با میزان نفت ۲٪ تکرار شد. مجموعاً بعد از سه هفته دوره غنی‌سازی و دستیابی به ریزجاندارانی مؤثر در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، سویه-های قابل کشت با توانایی تجزیه TPH، بر روی محیط MSM-آگار حاوی ۰/۰۱ درصد نفت خام جداسازی شدند (Behera et al., 2020). جدایه‌های رشد یافته در محیط MSM-آگار، براساس شکل کلنی، بر روی محیط نوترینت آگار خالص‌سازی و بازکشت شدند تا برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار بگیرند. درنهایت، به منظور انتخاب

همراه شاهد (تلقیح باکتری و سپس اتوکلاو) انجام گردید (Partovinia et al., 2021).

توان تجزیه نفت خام جدایه‌ها در محیط MSM

جهت بررسی توان باکتری‌ها در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، ابتدا جدایه‌ها در محیط نوترینت براث تا رسیدن به $OD_{600}=0.5$ کشت داده شدند. سپس جدایه‌ها به میزان ۵ درصد به ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM تلقیح شدند. مقدار ۱ درصد نفت خام (۰/۴ گرم) به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی به محیط کشت اضافه گردید (وزنی/حجمی). آزمایش در سه تکرار به همراه تیمار بدون تلقیح به‌عنوان شاهد انجام شد. ارلن‌ها به یک شیکر انکوباتور منتقل شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۶۰ RPM به مدت ۷ روز شیک شدند. پس از ۷ روز، محتویات هیدروکربنی محیط به روش استخراج مایع-مایع استخراج شد. بدین صورت که ۴۰ سی‌سی حلال دی‌کلرومتان به ارلن‌ها افزوده شد و با استفاده از قیف جداکننده، فاز آلی (هیدروکربنی) از فاز آبی جدا گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در هوای آزاد رها شدند تا حلال تبخیر شود. درنهایت با روش وزن‌سنجی میزان تجزیه نفت در محیط مشخص شد (Tripathi et al., 2023).

توان انحلال فسفات نامحلول معدنی

برای بررسی توان جدایه‌ها در حل کردن فسفات نامحلول معدنی، از محیط کشت جامد اسپربر استفاده شد (شامل ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۳۲ گرم در لیتر $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۱۴ گرم در لیتر $CaCl_2$ ، ۲/۵ گرم در لیتر $Ca_3(PO_4)_2$ ، ۱۵ گرم در لیتر آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و pH ۷/۲) (Sperber, 1958). ابتدا جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط نوترینت براث کشت داده شدند. برای تشخیص نیمه کمی

توان انحلال فسفات، ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری به روش قطره‌گذاری بر روی پلیت‌های حاوی محیط اسپربر کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. ظهور هاله شفاف پیرامون کلنی باکتری به منزله انحلال فسفات در نظر گرفته شد. قطر کلونی^{۱۴} (CD) و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات^{۱۵} (HD) به دقت با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شدند. برای ارزیابی شاخص انحلال^{۱۶} (SI) نسبت متوسط قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) بعد از ۷ روز محاسبه شد. این آزمون در سه تکرار انجام شد.

ارزیابی توانایی تولید سورفکتانت زیستی جدایه‌ها آماده‌سازی محلول رویی

در این مرحله، جدایه‌های برتر آزمون‌های تجزیه نفت برای بررسی تولید سورفکتانت زیستی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای آماده‌سازی محلول رویی جهت انجام این آزمایش‌ها، ابتدا محیط MSM با ترکیبات ذکر شده آماده و اتوکلاو شد. سپس باکتری‌ها به میزان ۵ درصد (حجمی/حجمی) با چگالی نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر ($OD_{600}=0.5$) به ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط MSM و ۰/۵ درصد نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی تلقیح شدند. ارلن‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه در شیکرانکوباتور شیک شدند. در پایان، محتویات ارلن‌ها به فالکن‌های شیشه‌ای منتقل و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای رسوب باکتری‌ها سانتریفیوژ شدند. فاز رویی برای انجام آزمایش‌های سورفکتانت جدا شد و باکتری‌های رسوب کرده بعد از اتوکلاو حذف شدند (Chen et al., 2020).

^{۱۶} Solubilization Index

^{۱۴} Colony Diameter

^{۱۵} Halo diameter

گسترش نفت^{۱۷}

توانایی گسترش نفت با رجوع به روش Joe و همکاران (2019) تعیین گردید. برای این کار، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به پلیت‌های ۸ سانتی‌متری افزوده شد و روی سطح آب، ۳۰ میکرولیتر نفت خام ریخته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت هر جدایه از فاصله ۲ سانتی‌متری به مرکز پلیت‌ها اضافه شد. پس از ۳۰ ثانیه، قطر هاله تشکیل شده در اثر پخش شدن نفت با دقت توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد. این آزمایش در سه تکرار به همراه شاهد منفی (آب مقطر) انجام شد.

کشش سطحی^{۱۸}

برای تعیین کشش سطحی، ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی هر جدایه (محیط کشت) به یک ظرف شیشه‌ای در حمام آب با دمای ۲۸ درجه سلسیوس افزوده شد. سپس لوله‌های موئین به‌صورت عمودی وارد مایع شده و ارتفاع بالا آمده مایع توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد (Viramontes-Ramos et al., 2010). در نهایت میزان کشش سطحی طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\sigma = \frac{r h \rho g}{2} \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در آن r شعاع لوله موئین بر حسب میلی‌متر (۰/۲۴۶)، ρ چگالی مایع بر حسب kg L^{-1} ، g شتاب جاذبه بر حسب m s^{-2} (۹/۸)، h ارتفاع ستون مایع در لوله بر حسب میلی‌متر و σ کشش سطحی مایع بر حسب میلی‌نیوتن بر متر (mN m^{-1}) می‌باشد.

شاخص امولسیون‌کنندگی (E24)

طراحی آزمایش در محیط خاک^{۱۹}

جهت اندازه‌گیری شاخص امولسیون‌کنندگی باکتری‌ها، ابتدا ۳ میلی‌لیتر از مایع رویی هر جدایه به همراه ۳ میلی‌لیتر حلال n-هگزان در لوله‌های شیشه‌ای ریخته شد و به مدت ۲ دقیقه با سرعت بالا ورتکس شدند. بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای اتاق، ارتفاع لایه امولسیون‌شده و ارتفاع کل ستون به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری شد (Huang et al., 2020). آزمایش در سه تکرار انجام گردید. بعد از ۲۴ ساعت E24% از طریق رابطه زیر محاسبه شد:

رابطه (۲)

$$\text{E24\%} = \left(\frac{\text{ارتفاع کل ستون} / \text{ارتفاع لایه امولسیون شده}}{100} \right) \times 100$$

شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها

جدایه‌ها از نظر ریخت‌شناسی کلنی مثل شکل، رنگ، شفافیت، برجستگی و حاشیه کلنی و ویژگی‌های سلولی مثل تحرک، اسپورزایی، شکل سلولی، آرایش قرارگیری در کنار هم و وضعیت گرم طبقه‌بندی شدند (Garritty, 2007). برای انجام رنگ‌آمیزی گرم، ابتدا کشت تازه (۱۸ ساعته) از جدایه‌ها در محیط نوترینت آگار تهیه گردید. سپس یک کلنی از هر باکتری به ترتیب با رنگ‌های کریستال ویوله، لوگول و سافرانین رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها پس از خشک شدن، برای بررسی وضعیت گرم، مورفولوژی سلولی و آرایش قرارگیری در کنار هم، به زیر میکروسکوپ متقل شدند (Quigg, 2021). در نهایت با رجوع به کتاب باکتری‌شناسی سیستماتیک برگ (Garritty, 2007) و تطبیق داده‌ها با خصوصیات اندازه‌گیری شده، جدایه‌های برتر در سطح جنس شناسایی شدند.

^{۱۹} Soil microcosm

^{۱۷} Oil spreading

^{۱۸} Surface tension

تجزیه واریانس داده‌ها از طریق ANOVA یک طرفه و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۷ انجام گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ رسم شد.

نتایج و بحث

خصوصیات گل حفاری مورد مطالعه

گل حفاری از نظر خصوصیات شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). pH گل مورد نظر بسیار بالا و قلیایی بود (۱۰/۱) و قابلیت هدایت الکتریکی بالای آن ($25/6 \text{ ds m}^{-1}$)، این خاک را در گروه خاک‌های بسیار شور قرار داد. همچنین جمعیت میکروبی نسبتاً پایین آن ($1/1 \times 10^4$) می‌تواند به دلیل بالا بودن مقادیر pH، شوری و آلودگی نفتی باشد که شرایط محیطی را برای رشد ریزجانداران نامساعد می‌کند. بخشی از کربن آلی بالای گل حفاری (۴/۵۱ درصد) مربوط به مواد نفتی می‌باشد و از ماده آلی خاک مجزا است. میزان TPH گل حفاری ۷٪ بود که حاکی از آلودگی بالای آن می‌باشد. Tang et al., (2012) بیان کردند که مقادیر بالای هیدروکربن‌های نفتی در خاک، می‌تواند محیط را برای رشد ریزجانداران سمی کند. در شکل (۱) تصویر گل حفاری قابل مشاهده می‌باشد.

برای بررسی توانایی باکتری‌های منتخب در فراهمی فسفر و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، دو تیمار شامل تیمار C (شاهد، خاک آلوده بدون تلقیح باکتری) و تیمار B (خاک آلوده به همراه تلقیح اجتماع سه جدایه باکتریایی NW1، NW2 و NW7) طراحی شد. هر تیمار دارای ۶ تکرار بود و آزمایش در ظروف شیشه‌ای حاوی ۳۰۰ گرم خاک انجام گرفت. خاک مورد استفاده آهکی (۱۵/۳ درصد)، دارای فسفر قابل جذب پایین و به‌شدت آلوده به نفت (با رنگ تیره و بوی شدید نفت) بود. برای تهیه مایه تلقیح، هر جدایه باکتریایی به‌صورت جداگانه کشت داده شد تا به کدورت ۱ ($OD_{600}=1$) برسد و سپس جدایه‌ها به نسبت برابر با یکدیگر مخلوط شدند. مخلوط باکتریایی به میزان ۱۰ درصد (حجمی به وزنی) به خاک تیمار B اضافه شد. همچنین، بر اساس نسبت کربن:نیتروژن:فسفر ۱۰۰:۱۰:۱ (طبق دستورالعمل Varjani & Upasani, 2019)، نیتروژن به هر دو تیمار افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ماه در دمای ثابت ۲۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. در نهایت، فسفر قابل جذب خاک با استفاده از روش عصاره‌گیری بی‌کربنات سدیم (Olsen, 1954) در روزهای ۰ و ۳۰ اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جدول ۱- خصوصیات گل حفاری

پارامتر	pH	EC (ds m^{-1})	کربن آلی (%)	ماده آلی (%)	بافت	جمعیت میکروبی (MPN g^{-1})	رطوبت (%)	TPH (%)
مقدار	۱۰/۱	۲۵/۶	۴/۵۱	۷/۷۷	لوم رسی	$1/1 \times 10^4$	۳/۵	۷

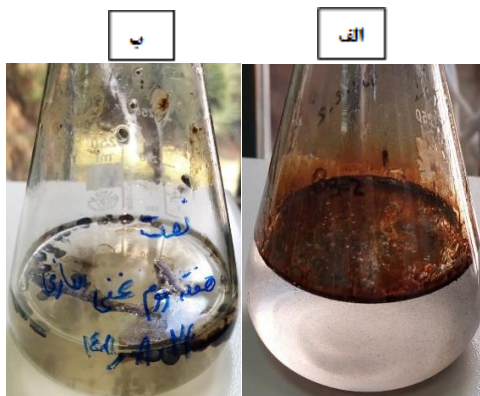


شکل ۱- گل حفاری چاه شماره ۴۸۳

غنی‌سازی و جداسازی ریزجانداران تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی

و جدایه‌های NW3 و NW5 به ترتیب کلنی‌های بیضی و نامنظم داشتند. همچنین جدایه‌های NW1، NW2، NW3، NW4، NW5، NW6 و NW7 به ترتیب دارای کلنی‌های با رنگ سبز، کرمی، سفید، بی‌رنگ، شیری، سبزآبی و سفید بودند. در شکل (۲) ارلن‌های شیک شده طی دوره غنی‌سازی قابل مشاهده می‌باشد.

پس از دوره غنی‌سازی، هفت جدایه متفاوت از نظر شکل ظاهری، از کنسرسیون میکروبی غنی شده از گل حفاری آلوده به ترکیبات نفتی، جداسازی شدند. جدایه‌های NW1، NW2، NW4، NW6 و NW7 شکل کلنی مدور



شکل ۲- ارلن‌های شیک شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۶۰ دور در دقیقه در پایان هفته دوم غنی‌سازی. الف: شاهد، ب: گل حفاری

توان رشد جدایه‌ها در محیط جامد نفتی

داشتند (شکل ۳) که این مسئله بیانگر توانایی خوب این باکتری‌ها در استفاده از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی است (جدول ۲). جدایه‌های NW1 و NW3 هم در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

نتایج این آزمون نشان داد، جدایه‌های NW2، NW5 و NW6 رشد بهتری نسبت به چهار جدایه دیگر

جدول ۲- امتیازدهی به وضعیت رشد جدایه‌ها بعد از ۷ روز انکوباسیون در محیط MSM-agar

جدایه	NW1	NW2	NW3	NW4	NW5	NW6	NW7
وضعیت رشد	++	++++	++	+	++++	+++	+



شکل ۳- وضعیت رشد جدایه NW5 بعد از ۷ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و محیط MSM-agar حاوی نفت

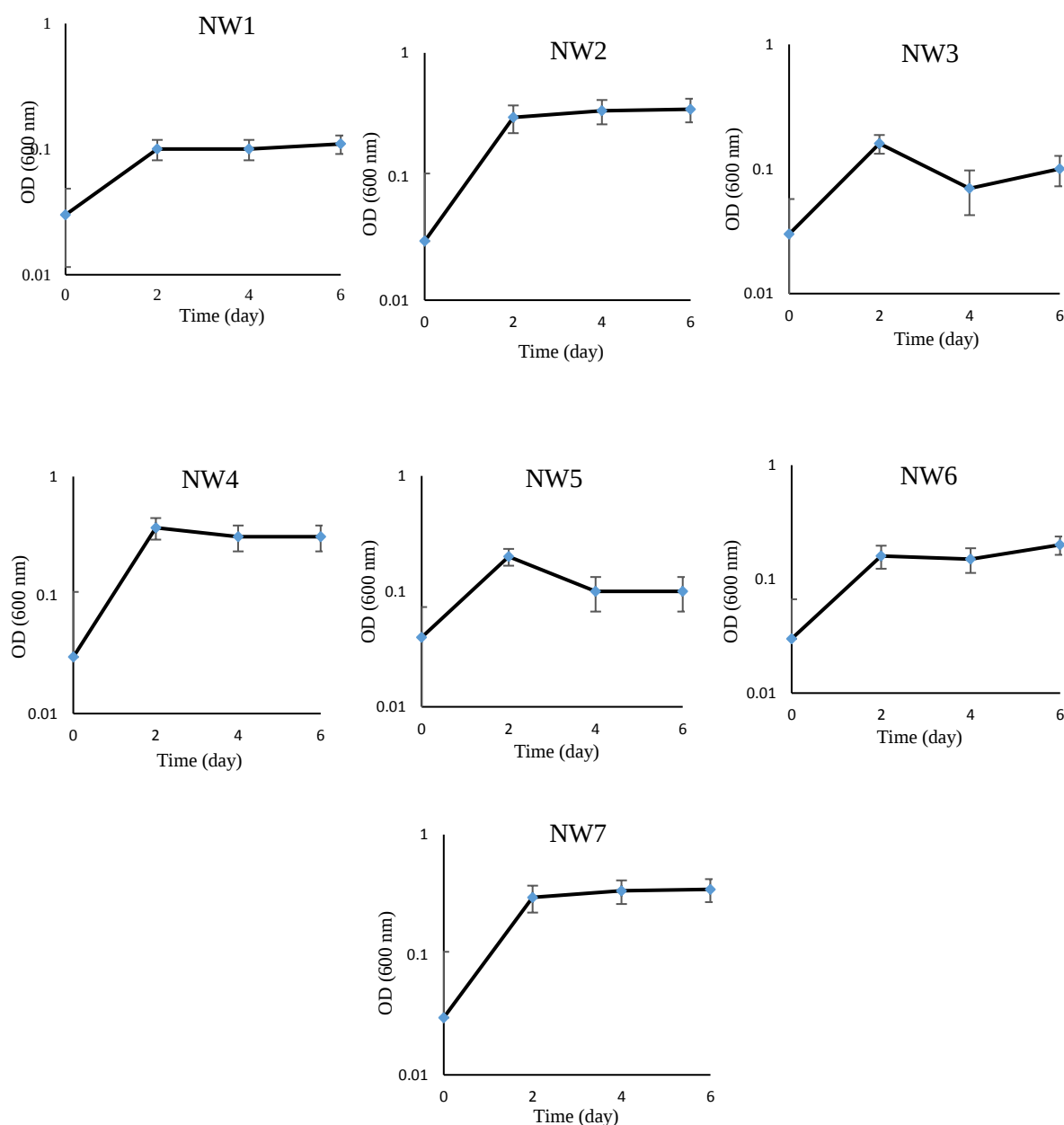
توان تجزیه نفت خام توسط جدایه‌ها در محیط مایع (کمی)

اکثر جدایه‌ها قادر به تجزیه بیش از ۱۰ درصد نفت خام بودند. جدایه NW1 با ۲۰/۶ درصد تجزیه، عملکرد بهتری نسبت به سایر جدایه‌ها داشت. بعد از جدایه NW1، جدایه‌های NW5، NW7 و NW4 به ترتیب با ۱۹/۶۶، ۱۵/۵۳ و ۱۵/۴ درصد بهترین عملکرد را در تجزیه نفت داشتند. برخی از جدایه‌ها مثل NW5 و NW2 نفت را در محیط به خوبی حل کردند که این مسئله نشان می‌دهد این جدایه‌ها قادر به ترشح ترکیباتی مثل سورفکتانت زیستی هستند که قادر است کشش سطحی نفت را کاهش داده و حلالیت آن را در محیط بالا ببرد (Li et al., 2022). میزان تجزیه نفت خام جدایه‌ها و تصویر ارلن‌های شیک شده بعد از ۷ روز انکوباسیون به ترتیب در جدول (۳) و شکل (۵) آمده است. نتایج حاصله با مطالعه Zeynali و همکاران (2024b) همسو می‌باشد. Hossain و همکاران (2022) میزان تجزیه گازوئیل و روغن موتور سوخته توسط سویه *Pseudomonas sp.* را در هفت روز به ترتیب ۱۴/۱۹ و ۱۲ درصد گزارش کردند. همچنین Phulpoto و همکاران (2022) گزارش کردند که بیشترین تجزیه هیدروکربن‌های نفتی توسط سویه *Pseudomonas sp. S1WP* انجام شد و مقدار آن طی ۱۲ روز ۴۲/۲ درصد بود. همچنین مقایسه‌ای بین نتایج تجزیه ترکیبات نفتی در محیط مایع بین این مطالعه و مطالعات معتبر، در جدول (۴) آمده است.

نتایج به دست آمده با پژوهش Mukred و همکاران (2008) همسو می‌باشد. این دانشمندان توانایی رشد شانزده جدایه باکتریایی را در محیط MSM-آگار حاوی ۱ درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی به اثبات رساندند. برخی از جدایه‌ها رشد خوبی بعد از ۳ روز گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس داشتند. همچنین Mohammed و همکاران (2023) بیان کردند که باکتری‌های *Bacillus cereus*، *Achromobacter sp.* و *Pseudomonas sp.* توانایی رشد و تشکیل کلنی در محیط MSM-آگار حاوی نفت را دارند.

توان رشد جدایه‌ها در محیط مایع نفتی

نتایج حاصل شده از این آزمون نشان داد اکثر جدایه‌ها توانایی رشد در محیط نفتی و استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را دارند. OD تمام نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر بجز تیمار شاهد، در طی دوره انکوباسیون در مقایسه با روز صفر افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان OD₆₀₀ در پایان دوره انکوباسیون، متعلق به جدایه NW2 با مقدار ۰/۳۵ و بعد از آن جدایه‌های NW7، NW4 و NW6 به ترتیب با ۰/۳۱، ۰/۲ و ۰/۳۱ بود. این مسئله نشان دهنده این است که این جدایه‌ها توانایی متابولیسمی بالایی در استفاده از نفت به عنوان منبع غذایی دارند (Olajide & Adeloye, 2023). نمودارهای مربوط به رشد جدایه‌ها در شکل (۴) قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۴- وضعیت رشد جدایه‌ها در طول ۶ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در محیط MSM

توان تجزیه نفت خام توسط جدایه‌ها در محیط مایع (کمی)

نفت داشتند. برخی از جدایه‌ها مثل NW5 و NW2 نفت را در محیط به خوبی حل کردند که این مسئله نشان می‌دهد این جدایه‌ها قادر به ترشح ترکیباتی مثل سورفکتانت زیستی هستند که قادر است کشش سطحی نفت را کاهش داده و حلالیت آن را در محیط بالا ببرد (Li et al., 2022). میزان تجزیه نفت خام جدایه‌ها و تصویر ارلن‌های شیک شده بعد از ۷ روز انکوباسیون به ترتیب در جدول (۳) و

اکثر جدایه‌ها قادر به تجزیه بیش از ۱۰ درصد نفت خام بودند. جدایه NW1 با ۲۰/۶ درصد تجزیه، عملکرد بهتری نسبت به سایر جدایه‌ها داشت. بعد از جدایه NW1، جدایه‌های NW5، NW7 و NW4 به ترتیب با ۱۹/۶۶، ۱۵/۵۳ و ۱۵/۴ درصد بهترین عملکرد را در تجزیه

تجزیه هیدروکربن‌های نفتی توسط سویه *Pseudomonas* sp. S1WP انجام شد و مقدار آن طی ۱۲ روز ۴۲/۲ درصد بود. همچنین مقایسه‌ای بین نتایج تجزیه ترکیبات نفتی در محیط مایع بین این مطالعه و مطالعات معتبر، در جدول (۴) آمده است.

شکل (۵) آمده است. نتایج حاصله با مطالعه Zeynali و همکاران (2024b) همسو می‌باشد. Hossain و همکاران (2022) میزان تجزیه گازوئیل و روغن موتور سوخته توسط سویه *Pseudomonas* sp. را در هفت روز به ترتیب ۱۴/۱۹ و ۱۲ درصد گزارش کردند. همچنین Phulpoto و همکاران (2022) گزارش کردند که بیشترین

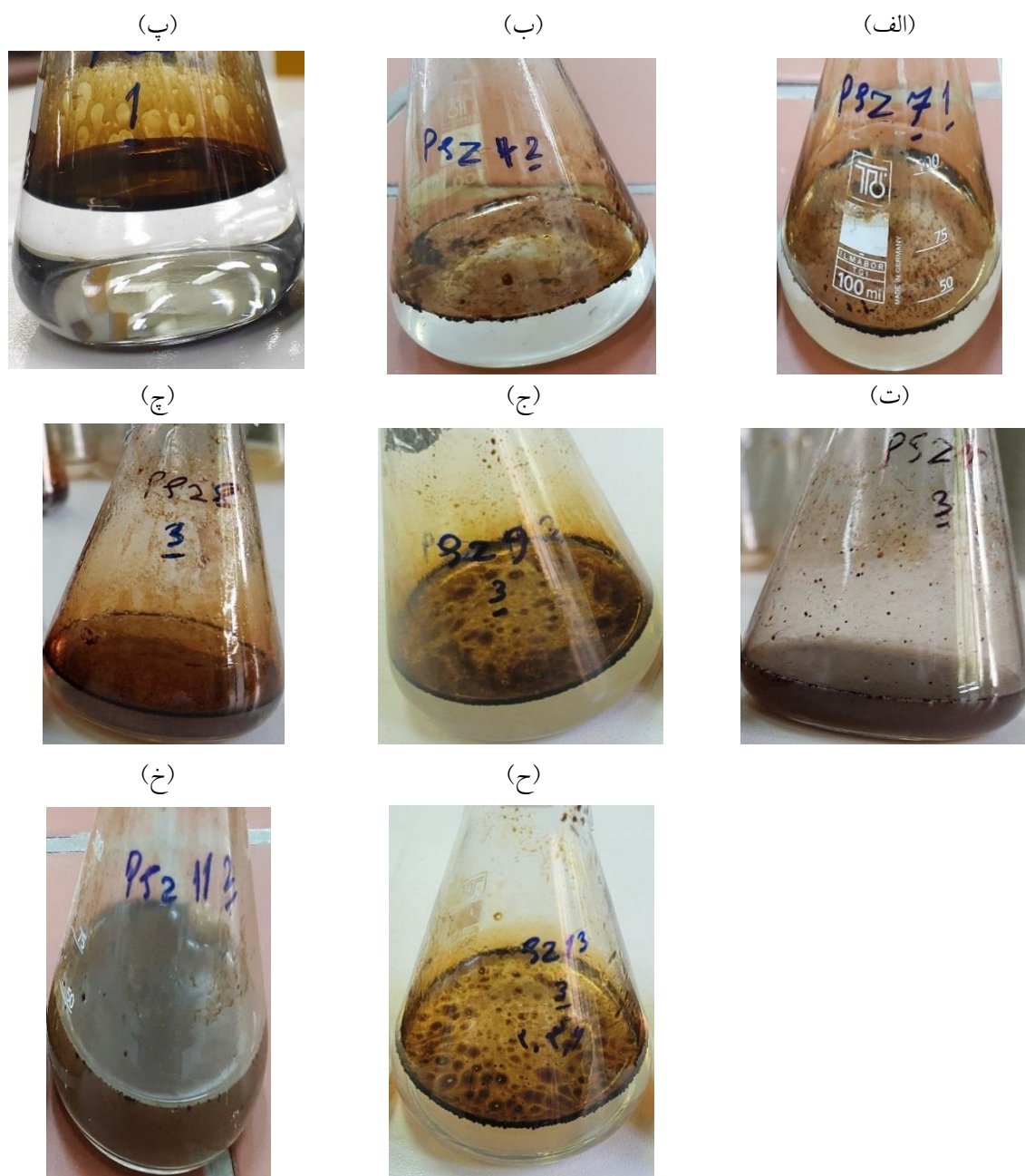
جدول ۳- تجزیه نفت خام توسط جدایه‌ها بعد از ۷ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در محیط MSM.

جدایه	NW1	NW2	NW3	NW4	NW5	NW6	NW7
میزان تجزیه نفت خام (%)	۲۰/۶۰ ^a	۱۴/۳۳ ^a	۱۴/۶۶ ^a	۱۵/۴۰ ^a	۱۹/۶۶ ^a	۲/۷۰ ^b	۱۵/۳۳ ^a

حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان ندادند.

جدول ۴- برخی از مطالعات انجام شده در زمینه تجزیه زیستی ترکیبات نفتی در محیط مایع

منبع	مقدار تجزیه	دوره انکوباسیون	ترکیب نفتی	سویه
Hossain et al., (2022)	٪۱۴/۱۹	۷ روز	گازوئیل	<i>Pseudomonas</i> sp.
Mukred et al., (2008)	٪۴۲/۲	۱۲ روز	TPH	<i>Pseudomonas</i> sp.
Wang et al., (2019)	٪۶۵	۵ روز	نفت خام	<i>Bacillus subtilis</i> BL-27
Xia et al., (2017)	٪۶۸	۱۵ روز	نفت خام	<i>Serratia proteamaculans</i> S1BD1
	٪۵۴/۹			<i>Rhodococcus erythropolis</i> OSDS1
Gyasi et al., (2024)	٪۲۷/۵۹	۱۵ روز	نفت خام	<i>Acinetobacter junii</i>
	٪۲۱/۱۴			<i>Alcanivorax xenomutans</i>
	۲۰٪/۶			NW1
مطالعه حاضر	٪۱۹/۶۶	۷ روز	نفت خام	NW5
	٪۱۵/۵۳			NW7

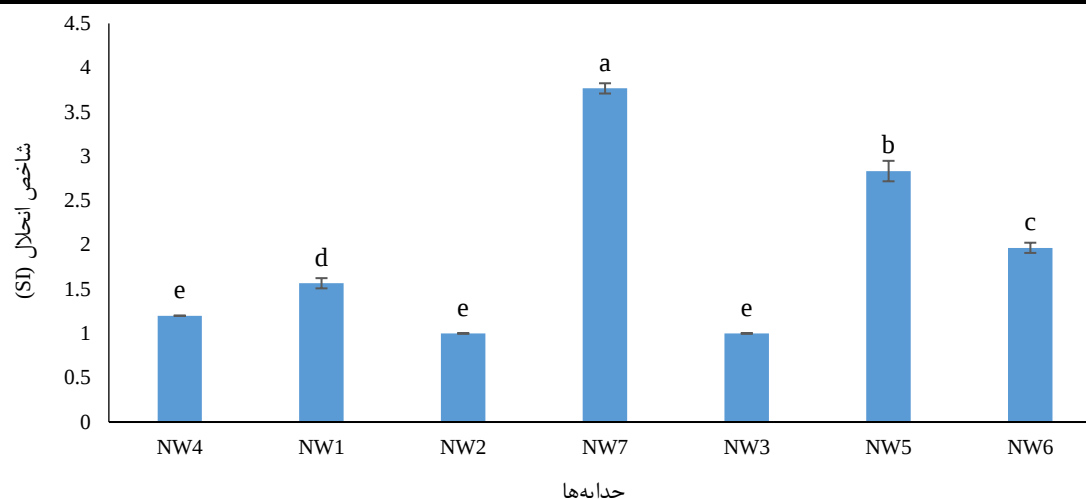


شکل ۵- ارلن‌های حاوی نفت تلقیح شده با جدایه‌ها بعد از ۷ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس. الف: شاهد، ب: NW1، پ: NW2، ت: NW3، ج: NW4، چ: NW5، ح: NW6 و خ: NW7

توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

نتایج آزمون انحلال فسفات نشان داد جدایه‌های NW7، NW5 و NW6 به ترتیب با شاخص انحلال ۳/۷۶، ۲/۸۳ و ۱/۹۶ به‌طور معنی‌داری توانایی بیشتری در انحلال فسفر نسبت به سایر جدایه‌ها دارند (شکل ۶). بنابراین

می‌توان گفت این باکتری‌ها مولد آنزیم‌هایی مثل فسفاتازها و اسیدهای آلی هستند که نقش مهمی در انحلال فسفر دارند (Aliyat et al., 2020). همچنین جدایه‌های NW2 و NW3 قادر به ایجاد هاله در اطراف کلنی و انحلال فسفات نبودند.



شکل ۶- انحلال فسفات جدایه‌ها در محیط اسپربر-آگار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بعد از ۷ روز گرماگذاری. حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان ندادند.

ترشح سورفکتانت زیستی انتخاب شدند. در آزمون گسترش نفت، بزرگترین هاله ایجاد شده در نفت خام متعلق به جدایه NW2 با ۱/۲۶ سانتی‌متر بود که اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها ($p < 0.05$) و شاهد (۰/۲۶ سانتی‌متر) داشت. در آزمون کشش سطحی، جدایه NW2 بیشترین کاهش در کشش سطحی محیط را در مقایسه با سایر جدایه‌ها ایجاد کرد و مقدار آن را به ۴۸,۷۳ میلی‌نیوتن بر متر رساند. این مقدار حتی بهتر از کشش سطحی آب مقطر که به‌عنوان شاهد استفاده شد (۷۱,۳۶ میلی‌نیوتن بر متر)، ارزیابی شد. همچنین در آزمون E24 بیشترین میزان امولسیون‌کنندگی n-هگزان را جدایه NW2 با ۴۶/۷ درصد به ثبت رساند که اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با سایر جدایه‌ها داشت (جدول ۵). تمام نتایج حاصله با تحقیق Lee و همکاران (2018) همسو می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس مربوط به تست‌های تجزیه نفت، انحلال فسفات، ترشح سورفکتانت زیستی و فسفر قابل جذب خاک در جدول (۶) آورده شده است.

فسفر یکی از عناصر مهم برای رشد و توسعه گیاهان می‌باشد. همچنین این عنصر نقش بسیار مهمی را در عملکرد فیزیولوژیکی باکتری‌ها ایفا می‌کند (Aliyat et al., 2020) و کمبود آن باعث کاهش کارایی تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی می‌شود. در همین راستا، Mirsaedi (2023) در پژوهشی به این نتیجه رسید که افزودن فسفر باعث افزایش معنی‌داری در پاکسازی آب آلوده به نفت شد. بنابراین، باتوجه به این که مقدار قابل دسترس این عنصر در اکثر خاک‌های آهکی ایران پایین می‌باشد، انحلال و فراهمی زیستی آن برای ریزجانداران خاک جهت زیست‌پالایی بهتر و افزایش رشد گیاه، اهمیت زیادی دارد.

توانایی ترشح سورفکتانت زیستی جدایه‌ها

باتوجه به نتایج آزمون‌های توانایی رشد در حضور نفت و تجزیه آن، سه جدایه NW1، NW2 و NW7 از میان هفت سویه جداسازی شده، برای آزمون‌های

جدول ۵- نتایج آزمون‌های ترشح سورفکتانت زیستی

جدایه	گسترش نفت (cm)	کشش سطحی (mN/m)	امولسیون‌کنندگی (%) (E24)
NW1	1 ± 0.1^b	49.5 ± 2.17^c	7.5 ± 0.5^c
NW2	1.26 ± 0.04^a	48.73 ± 5.3^c	46.7 ± 2.04^b
NW7	1.1 ± 0.1^b	56.43 ± 1.6^b	15.66 ± 2.71^a
آب مقطر	0.26 ± 0.06^c	71.36 ± 0.55^a	-

مقادیر بصورت $\pm$ انحراف استاندارد ذکر شده اند و حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان ندادند.

سورفکتانت‌های زیستی سبب افزایش فراهمی آلاینده‌های آبریز و در دسترس قرار گرفتن این آلاینده‌ها برای ریزجانداران می‌شوند. استفاده از این ترکیبات در فرآیند تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها، با هدف افزایش دسترسی

زیستی یا انحلال آلاینده‌ها (از طریق افزایش نامیزگی^{۲۰}) صورت می‌گیرد و باعث افزایش راندمان زیست‌پالایی می‌شود (Chebbi et al., 2017).

جدول ۶- تجزیه واریانس ANOVA آزمایش‌ها

آزمایش	تجزیه واریانس	
	منبع تغییرات	درجه آزادی
تجزیه نفت خام	تیمار	۶
	خطا	۱۴
	کل	۲۰
انحلال فسفات	تیمار	۶
	خطا	۱۴
	کل	۲۰
گسترش نفت	تیمار	۳
	خطا	۸
	کل	۱۱
کشش سطحی	تیمار	۳
	خطا	۸
	کل	۱۱
امولسیون‌کنندگی (E24)	تیمار	۲
	خطا	۶
	کل	۸
فسفر قابل جذب خاک	تیمار	۱
	زمان	۱
	تیمار×زمان	۱
	خطا	۸
	کل	۱۱

شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها

طبقه‌بندی هفت جدایه NW1، NW2، NW3، NW4، NW5، NW6 و NW7 از نظر خصوصیات مورفولوژی و وضعیت گرم بطور کامل در جدول (۷) آمده است. با رجوع به کتاب باکتری‌شناسی سیستماتیک برگ

(Garrity, 2007) و تطبیق داده‌ها با خصوصیات اندازه‌گیری شده، مشخص شد جدایه‌های NW1، NW2 و NW7 احتمالاً به ترتیب متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Rhodococcus* هستند.

۲۰ Emulsification

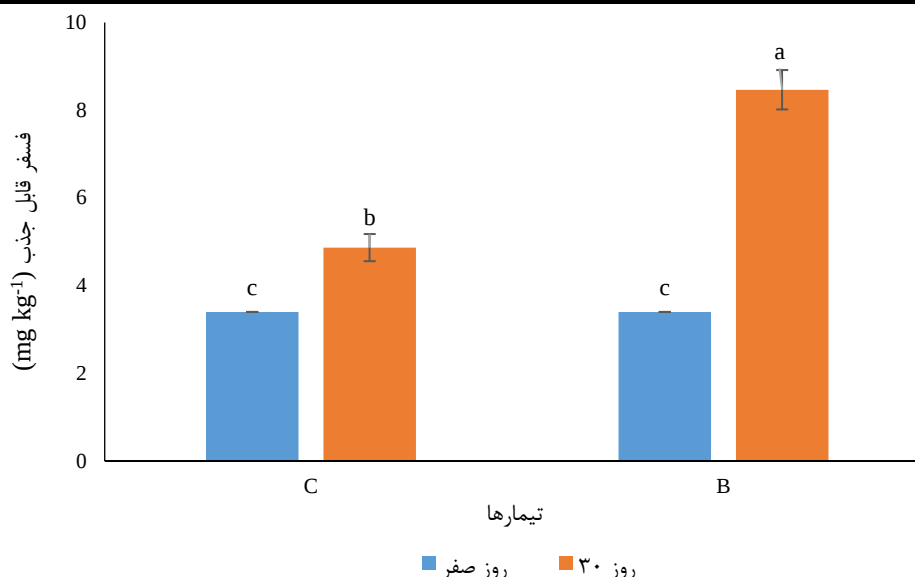
جدول ۷- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

جدایه	شکل کلنی	برجستگی کلنی	شفافیت کلنی	حاشیه کلنی	رنگ کلنی	تحرک	اسپورزایی	شکل سلولی	آرایش	وضعیت گرم
NW1	مدور	تخت	مات	صاف	سبز	-	-	باسیلی	باسیل	-
NW2	مدور	برآمده	مات	موج‌دار	کرمی	+	+	باسیلی	دیپلویاسیل	+
NW3	بیضی	تخت	شفاف	صاف	سفید	+	+	باسیلی	باسیل	+
NW4	مدور	تخت	شفاف	صاف	بی‌رنگ	+	+	باسیلی	باسیل	+
NW5	نامنظم	برآمده	شفاف	صاف	شیری	-	-	باسیلی	باسیل	+
NW6	مدور	تخت	شفاف	موج‌دار	سبزآبی	+	-	باسیلی	باسیل	-
NW7	مدور	محدب	مات	لوب‌مانند	سفید	-	-	باسیلی	کوکوباسیل	+

تغییرات فسفر قابل جذب خاک

نتایج آنالیز فسفر قابل جذب خاک نشان داد تلقیح باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌تواند باعث حل شدن فسفر نامحلول خاک شود. افزایش فسفر قابل جذب خاک در تیمار B در طول زمان معنی‌دار بود. مقدار فسفر محلول طی ۳۰ روز در این تیمار، از ۳/۴ به ۸/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش یافت که نشان دهنده موفقیت جدایه‌ها در انحلال فسفات خاک می‌باشد (شکل ۷). همچنین، در تیمار تلقیح نشده (C)، افزایش معنی‌داری در فسفر قابل دسترس خاک در دوره ۳۰ روزه مشاهده شد (افزایش از ۳/۴ به ۴/۸۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم). دلیل این امر می‌تواند این باشد که ریزجانداران بومی خاک مورد مطالعه هم توانایی انحلال فسفات را دارند و با افزودن نیتروژن، تکثیر و فعالیت این ریزجانداران افزایش یافته است.

مطالعات نشان داده است که باکتری‌های گرم مثبت مانند سویه‌های متعلق به جنس *باسیلوس* قادر به ترشح آنزیم‌هایی مانند لیپاز و پروتئاز هستند که می‌توانند هیدروکربن‌های پیچیده را به هیدروکربن‌های ساده تر تخریب کنند (Kumar et al., 2023). همچنین *باسیلوس*‌ها قادر به تشکیل اندوسپورهایی هستند که توانایی زندگی در محیط‌های استرس‌زا مثل سمیت بالا در اثر آلودگی نفتی را به آن‌ها می‌دهد (Madigan et al., 2010). توانایی باکتری‌های گرم منفی مانند *سودوموناس*‌ها نیز در تجزیه هیدروکربن‌های مختلف به اثبات رسیده است (Muthukumar et al., 2023). همچنین در مطالعه ای اثبات شد که ترکیب سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی، در زیست‌پالایی هیدروکربن‌ها نتایج بهتری را در مقایسه با استفاده تکی از آن‌ها در پی دارد (Bilen Ozyurek & Seyis Bilkay, 2020).



شکل ۷- تغییرات فسفر قابل جذب خاک طی ۳۰ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

نتیجه‌گیری

در این مطالعه هفت جدایه تجزیه‌کننده نفت از یک نمونه گل حفاری جداسازی شدند. با انجام آزمون‌های مربوط به توانایی رشد و توانایی تجزیه TPH در محیط‌های نفتی مایع و جامد، سه جدایه برتر برای انجام آزمون‌های ترشح سورفکتانت زیستی انتخاب شدند. جدایه‌های NW1، NW5 و NW7 توانایی بهتری در تجزیه نفت خام نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند. در آزمون انحلال فسفات معدنی، جدایه‌های NW5 و NW7 بیشترین میزان انحلال فسفات را داشتند. همچنین جدایه NW2 در کل، توانایی بهتری

نسبت به سایر جدایه‌ها در ترشح سورفکتانت زیستی از خود نشان داد. با انجام آزمون‌های شناسایی فنوتیپی و سلولی، مشخص شد جدایه‌های NW1 و NW2 و NW7 به ترتیب متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Rhodococcus* هستند. تلقیح مخلوط سه جدایه NW1، NW2 و NW7 به خاک آلوده نفتی، نتیجه بسیار خوبی در افزایش فسفر قابل جذب خاک داشت. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، توانایی انحلال فسفر این جدایه‌ها در خاک‌هایی با مقادیر شوری، pH و فسفر کل متفاوت مورد آزمایش قرار گیرد. همچنین، تأثیر تثبیت باکتری‌ها بر روی حامل‌های مختلف در انحلال فسفر خاک هم موضوع جالبی می‌باشد که به آن پرداخته نشده است.

References

- Alexander, M. (1983). Most probable number method for microbial populations. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 815-820.
- Aliyat, F. Z., Maldani, M., El Guilli, M., Nassiri, L., & Ibijbjen, J. (2020). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from phosphate solid sludge of the moroccan phosphate mines. *The Open Agriculture Journal*, 14(1).
- Asemoloye, M. D., Jonathan, S. G., & Ahmad, R. (2019). Degradation of 2, 2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate (dichlorvos) through the rhizosphere interaction between *Panicum maximum* Jacq and some selected fungi. *Chemosphere*, 221, 403-411.
- Behera, I. D., Basak, G., Kumar, R. R., Sen, R., & Meikap, B. C. (2020). Treatment of petroleum refinery sludge by petroleum degrading bacterium *Stenotrophomonas pavanii* IRB19 as an efficient novel technology. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 56(2), 226-239.
- Bilen Ozyurek, S., & Seyis Bilkay, I. (2020). Comparison of petroleum biodegradation efficiencies of three different bacterial consortia determined in petroleum-contaminated waste mud pit. *SN Applied Sciences*, 2, 1-12.
- 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.
- Cerqueda-García, D., García-Maldonado, J. Q., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2020). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110775.
- Chebbi, A., Hentati, D., Zaghden, H., Baccar, N., Rezgui, F., Chalbi, M., ... & Chamkha, M. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 122, 128-140.
- 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.
- Chunyan, X., Qaria, M. A., Qi, X., & Daochen, Z. (2023). The role of microorganisms in petroleum degradation: Current development and prospects. *Science of the Total Environment*, 865, 161112.
- Gainer, A., Bresee, K., Hogan, N., & Siciliano, S. D. (2019). Advancing soil ecological risk assessments for petroleum hydrocarbon contaminated soils in Canada: Persistence, organic carbon normalization and relevance of species assemblages. *Science of the total environment*, 668, 400-410.
- Garrity, G. (2007). *Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 2: the Proteobacteria, part B: the Gammaproteobacteria* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Girigiri, B., Ariole, C. N., & Stanley, H. O. (2019). Bioremediation of crude oil polluted soil using biofertilizer from nitrogen-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *American Journal of Nanosciences*, 5(4): 27-38.
- Gyasi, S. F., Sarfo, M. K., Kobo-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).
- Hoang, S. A., Lamb, D., Sarkar, B., Seshadri, B., Yu, R. M. K., Tran, T. K. A., ... & Bolan, N. S. (2022). Phosphorus application enhances alkane hydroxylase gene abundance in the rhizosphere of wild plants grown in petroleum-hydrocarbon-contaminated

- soil. Environmental Research, 204, 111924.
17. 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.
18. Huang, Y., Zhou, H., Zheng, G., Li, Y., Xie, Q., You, S., & Zhang, C. (2020). Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Serratia marcescens* ZCF25 from oil sludge and application to bioremediation. Environmental Science and Pollution Research, 27, 27762-27772.
19. Joe, M. M., Gomathi, R., Benson, A., Shalini, D., Rengasamy, P., Henry, A. J., ... & Sa, T. (2019). Simultaneous application of biosurfactant and bioaugmentation with rhamnolipid-producing *Shewanella* for enhanced bioremediation of oil-polluted soil. Applied Sciences, 9(18), 3773.
20. 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.
21. Koohkan, H., Mortazavi, M. S., Golchin, A., Saraji, F., & Akbarzadeh-Chomachaei, G. (2023). Comparison of native bacterial and fungal bioaugmentation in the removal of petroleum from soil in the presence of sorghum. Water, Air, & Soil Pollution, 234(5), 309.
22. Kumar, A. G., Manisha, D., Rajan, N. N., Sujitha, K., Peter, D. M., Kirubakaran, R., & Dharani, G. (2023). Biodegradation of phenanthrene by piezotolerant *Bacillus subtilis* EB1 and genomic insights for bioremediation. Marine Pollution Bulletin, 194, 115151.
23. Lee, Y., Jeong, S. E., Hur, M., Ko, S., & Jeon, C. O. (2018). Construction and evaluation of a Korean native microbial consortium for the bioremediation of diesel fuel-contaminated soil in Korea. Frontiers in microbiology, 9, 2594.
24. Li, H. P., Han, Q. Q., Liu, Q. M., Gan, Y. N., Rensing, C., Rivera, W. L., ... & Zhang, J. L. (2023). Roles of phosphate-solubilizing bacteria in mediating soil legacy phosphorus availability. Microbiological Research, 272, 127375.
25. Li, X., Du, Y., Wu, G., Li, Z., Li, H., & Sui, H. (2012). Solvent extraction for heavy crude oil removal from contaminated soils. Chemosphere, 88(2), 245-249.
26. 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.
27. Madigan, M.T., Clark, D.P., Stahl, D. and Martinko, J.M., 2010. Brock biology of microorganisms 13th edition. Benjamin Cummings.
28. Mahjoubi, M., Cappello, S., Souissi, Y., Jaouani, A., & Cherif, A. (2018). Microbial bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated marine environments. Recent insights in petroleum science and engineering, 325, 325-350.
29. Mirsaeidi, A. (2023). The effects of nitrogen and phosphorus nutrients on the bioremediation of oil-contaminated waters by *Gracilariopsis persica* in the coastal areas of Bandar Abbas. Marine Pollution Bulletin, 188, 114660.
30. Mohammed, S. A., Omar, T. J., & Hasan, A. H. (2023). Degradation of crude oil and pure hydrocarbon fractions by some wild bacterial and fungal species. arXiv preprint arXiv:2301.08715.
31. Mukred, A. M., Abd Hamid, A., Hamzah, A., & Yusoff, W. M. W. (2008). Growth Enhancement of Effective Microorganisms for Bioremediation of. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(13), 1708-1712.
32. Muthukumar, B., Surya, S., Sivakumar, K., AlSalhi, M. S., Rao, T. N., Devanesan, S., ... & Rajasekar, A. (2023). Influence of bioaugmentation in crude oil contaminated soil by *Pseudomonas* species on the removal of

- total petroleum hydrocarbon. *Chemosphere*, 310, 136826.
33. 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.
34. 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. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 1627-1639.
35. Okafor, U. C. (2023). Evaluation of the Impact of Crude Oil Contamination on Soil's Physicochemical Characteristics, Micro-flora and Crop Yield. *Tropical Aquatic and soil pollution*, 3(1), 24-35.
36. Olajide, P. O., & Adeloye, A. O. (2023). Hydrocarbon biodegradation by *Proteus* and *Serratia* strains isolated from oil-polluted water in Bonny Community, Niger Delta, Nigeria. *Results in Chemistry*, 5, 100735.
37. Olsen, S. R. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate (No. 939). US Department of Agriculture.
38. Ou, Y., Wu, M., Yu, Y., Liu, Z., Zhang, T., & Zhang, X. (2024). Low dose phosphorus supplementation is conducive to remediation of heavily petroleum-contaminated soil—From the perspective of hydrocarbon removal and ecotoxicity risk control. *Science of The Total Environment*, 929, 172478.
39. Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41-54.
40. Pahalvi, H. N., Rafiya, L., Rashid, S., Nisar, B., & Kamili, A. N. (2021). Chemical fertilizers and their impact on soil health. *Microbiota and Biofertilizers*, Vol 2: Ecofriendly tools for reclamation of degraded soil environs, 1-20.
41. Partovinia, A., Soorki, A. A., & Koosha, M. (2021). Synergistic adsorption and biodegradation of heavy crude oil by a novel hybrid matrix containing immobilized *Bacillus licheniformis*: Aqueous phase and soil bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222, 112505.
42. 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.
43. Quigg, A., Parsons, M., Bargu, S., Ozhan, K., Daly, K. L., Chakraborty, S., ... & Buskey, E. J. (2021). Marine phytoplankton responses to oil and dispersant exposures: Knowledge gained since the Deepwater Horizon oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 164, 112074.
44. Ramirez, M. I., Arevalo, A. P., Sotomayor, S., & Bailon-Moscoso, N. (2017). Contamination by oil crude extraction—Refinement and their effects on human health. *Environmental Pollution*, 231, 415-425.
45. Rayment, G. E., & Higginson, F. R. (1992). *Australian Laboratory Handbook of Soil and Water Chemical Methods*. Inkata Press Pty Ltd.
46. Sattar, S., Siddiqui, S., Shahzad, A., Bano, A., Naeem, M., Hussain, R., ... & Yasmin, H. (2022). Comparative Analysis of Microbial Consortia and Nanoparticles for Rehabilitating Petroleum Waste Contaminated Soils. *Molecules*, 27(6), 1945.
47. Sayed, K., Baloo, L., & Sharma, N. K. (2021). Bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) by bioaugmentation and biostimulation in water with floating oil spill containment booms as bioreactor basin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 2226.
48. Schryer, A. D., & Siciliano, S. D. (2024). Do phosphorus amendments enhance biodegradation activity in stalled petroleum hydrocarbon-

- contaminated soil? Journal of environmental quality, 10.1002/jeq2.20594.
49. Shariati, S., Alikhani, H. A., Pourbabaee, A., & Mohammadi, L. (2013). The potential of application of different organic and inorganic carriers in insoluble phosphate solubilizing bacteria (*Pseudomonas fluorescens*) inoculants production process. International Journal of Agriculture: Research and Review, 3(1), 176. (In persian).
50. 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.
51. Sozina, I. D., & Danilov, A. S. (2023). Microbiological remediation of oil-contaminated soils. Journal of Mining Institute. 26,0 297-312.
52. Sperber, J. I. (1958). Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research, 9(6), 782-787.
53. Tang, J., Lu, X., Sun, Q., & Zhu, W. (2012). Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. Agriculture, Ecosystems & Environment, 149, 109-117.
54. 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.
55. Varjani, S., & Upasani, V. N. (2019). Evaluation of rhamnolipid production by a halotolerant novel strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource technology, 288, 121577.
56. 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.
57. 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.
58. Wang, S., Wang, D., Yu, Z., Dong, X., Liu, S., Cui, H., & Sun, B. (2021). Advances in research on petroleum biodegradability in soil. Environmental Science: Processes & Impacts, 23(1), 9-27.
59. 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.
60. Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., ... & Yu, H. (2018). Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. Frontiers in microbiology, 9, 2885.
61. Zeynali, K., Shariati, S., & Pourbabaee, A. A. (2024a). The role of effective oil-eating bacteria in the remediation of oil-contaminated soils (Case study: *Bacillus* genus). Journal of Sol Biology, 12(1), 105-139. (In persian).
62. Zeynali, K., Shariati, S., Pourbabaee, A. A., & Shorafa, M. (2024b). 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, 1585-1599. (In persian)
63. Žvirgždas, J., Paškevičius, A., Petrovas, S., Galginienė, I., & Iljasevičius, K. (2023). Isolation, selection, and use of oil-degrading microorganisms for biological treatment of contaminated soil. Polish Journal of Environmental Studies, 32(3), 1-10.