

Research Article

Comparative Analysis of Bacterial Isolates for Bioremediation of an Oil-Contaminated Soil

Mohammad Reza Sarikhani¹✉, Ali Lotfollahi², Sevda Hashemzadeh³

1. Corresponding Author, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

E-mail: rsarikhani@yahoo.com

2. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran. E-mail: lotfollahimarkid@gmail.com

2. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

E-mail: 80712sevdahashemzadeh@gmail.com

Received: June 23, 2025
Accepted: October 16, 2025

Revised: October 15, 2025
Published: October 26, 2025

Extended Abstract

Background and Objectives

Soil contamination with petroleum hydrocarbons is a critical environmental challenge, posing significant risks to ecosystems, agricultural productivity, and human health. The widespread release of petroleum compounds through industrial activities, accidental spills, and improper waste disposal has led to the accumulation of persistent and toxic pollutants in soil. Conventional remediation techniques, such as physical and chemical methods (e.g. thermal desorption, and chemical oxidation), often entail high costs, energy consumption, and secondary environmental damage. In contrast, microbial bioremediation has emerged as a sustainable and eco-friendly alternative, leveraging the metabolic capabilities of microorganisms to degrade hydrocarbons into less harmful byproducts. Among hydrocarbon-degrading microorganisms, bacterial isolates particularly those from the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Rhodococcus* have demonstrated remarkable efficiency in breaking down complex petroleum compounds. Their enzymatic machinery, including oxygenases and dehydrogenases, enables the catabolism of alkanes, aromatics, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). However, the effectiveness of bioremediation depends on factors such as microbial strain selection, environmental conditions (e.g., temperature, pH, and nutrient availability), and the composition of the contaminant.

Methodology

In this study, we evaluated the biodegradation potential of nine bacterial isolates (H921, H814, H712, H711, S21-1, C16-20, 14A-4, P5, and Bio4) in a soil artificially contaminated with 6.5% petroleum hydrocarbons over a 60-day period. The experiment simulated natural conditions (room temperature) with controlled moisture, aeration (daily stirring), and NPK nutrients supplementation to enhance microbial activity. Key indicators such as reduction in hydrocarbon odor, visible color changes, and residual oil content were monitored to assess degradation efficiency. Hydrocarbon quantification was performed using Soxhlet extraction with diethyl ether, ensuring accurate measurement of residual contamination.

Results and Discussion

Preliminary results highlighted strain S21-1 (*Pseudomonas* sp.) as the most effective, achieving 26% hydrocarbon degradation, followed by 14A-4 and C16-20. The superior performance of S21-1 was corroborated by its rapid colonization, biosurfactant production, and ability to thrive in hydrocarbon-rich environments. This study underscores the importance of strain-specific selection for optimizing bioremediation

strategies and provides a comparative framework for future research on microbial consortia or genetically enhanced strains. By elucidating the degradative capacities of these isolates, we contribute to the development of scalable, low-cost solutions for mitigating petroleum pollution in contaminated soils.

Conclusion

Considering the distribution and dispersion of oil pollution in oil-rich regions, especially in the Persian Gulf area, and the prevalence of high temperatures in these regions, this experiment was conducted to investigate certain microbial species tolerant to 50 °C and their potential use in the bioremediation of oil-contaminated soils. Initially, Tween 80 was used to enhance the availability of petroleum compounds for biodegradation, followed by the application of NPK fertilizers and bacterial inoculation at specific intervals, along with maintaining appropriate moisture and active aeration. Analysis of the obtained data on the initial and residual TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) levels in the control and bacterial-treated samples indicated that after 60 days, the initial TPH concentration of 6.5% decreased to 4.7%. Among the tested strains, S21-1, belonging to the genus *Pseudomonas*, exhibited the highest efficiency. GC-FID analysis was not performed on the samples to determine the proportion of aliphatic and aromatic compounds, but it appears that the distribution of these substances in the oil contamination may have been a limiting factor in the biodegradation of petroleum compounds. Alternatively, the tested bacteria may have required more time for the complete biodegradation of petroleum hydrocarbons. For oil bioremediation projects, obtaining highly efficient bacterial strains is a key factor, and the objective of this research was to achieve such a strain.

Keywords: Bioaugmentation, Environment remediation, Petroleum hydrocarbons, Soil contamination.

Author Contributions

Conceptualization and methodology, M.R.S; Performing experiments and measurements, M.R.S., A.L., and S.H.; formal analysis and data curation, M.R.S., A.L., and S.H.; writing-original draft preparation, M.R.S., writing- review and editing, M.R.S; supervision, M.R.S; project administration, M.R.S; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Data is available on reasonable request from the authors.

Acknowledgements

This paper is published as a part of a PhDs thesis supported by the Vice Chancellor for Research and Technology of the University of Tabriz, Tabriz, Iran. The authors are thankful to the University of Tabriz for financial supports.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Cite this article: Sarikhani, M.R., Lotfollahi, A., & Hashemzadeh, S. (2025). Comparative analysis of bacterial isolates for bioremediation of an oil-contaminated soil. *Journal of Soil and Plant Science*, 35(3), 79–94.

<https://doi.org/10.22034/sps.2025.67844.1014>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Copyright © 2025 The Authors.
Publisher: The University of Tabriz

OPEN ACCESS
JOURNALS



مقاله پژوهشی

مقایسه کارایی برخی جدایه‌های باکتریایی در زیست‌پالایی یک خاک آلوده به نفت

محمدرضا ساریخانی^۱ , علی لطف‌اللهی^۲ , سودا هاشم‌زاده^۳ 

۱- نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: rsarikhani@yahoo.com

۲- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: lotfollahimarkid@gmail.com

۳- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: 80712sevdahashemzadeh@gmail.com

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۷/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۰۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۸/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۴

چکیده

آلودگی خاک به ترکیبات نفتی یکی از مشکلات جدی زیست‌محیطی است که می‌تواند اثرهای مخربی بر زیست‌بوم‌ها و سلامت انسان داشته باشد. روش‌های فیزیکی و شیمیایی پاکسازی خاک اغلب پرهزینه و مخرب هستند، در حالی که زیست‌پالایی میکروبی به عنوان یک روش پایدار و مقرون‌به‌صرفه مورد توجه قرار گرفته است. برای انجام پروژه‌های زیست‌پالایی ترکیبات نفتی، دستیابی به سویه‌های کارآمد یکی از نکات کلیدی می‌باشد و هدف از اجرای این کار تحقیقی، تلاش برای دستیابی به چنین موردی بوده است. بر این اساس، در این آزمایش ۹ جدایه باکتریایی موجود در بانک میکروبی (شامل H921, H814, H712, H711, S21-1, C16-20, P5, 14A-4 و Bio4) برای حذف زیستی آلودگی نفتی یک خاک آلوده با آلودگی طبیعی (با آلودگی اولیه ۶/۵ درصد) مورد استفاده قرار گرفت. طول مدت آزمایش ۶۰ روز بود و آزمایش در دمای اتاق انجام شد. در طول آزمایش تأمین رطوبت (هر دو روز یکبار)، همزدن (روزانه)، و تلقیح میکروبی به همراه مصرف محلول غذایی (NPK) (هر سه روز یک بار) انجام شد. توجه به نشانه‌هایی همچون کاهش بوی متصاعد شده از نمونه (استشمام نمونه)، تغییر رنگ آن (مشاهده بصری) و میزان نفت باقی‌مانده (به روش سوکسله) پس از شروع آزمایش از جمله معیارهای مقایسه‌ای بین تیمارهای آزمایشی بودند. برای تعیین میزان نفت اولیه و میزان نفت باقی‌مانده در نمونه و اندازه‌گیری درصد تجزیه نفت، از روش سوکسله با بهره‌گیری از حلال دی‌اتیل اتر استفاده شد. از میان تیمارهای مورد استفاده سویه S21-1 بالاترین درصد تجزیه نفت را به خود اختصاص داد (۲۶ درصد) و در رتبه‌های بعدی 14A-4 و C16-20 قرار داشتند. تغییر رنگ تدریجی به همراه کاهش میزان نفت باقی‌مانده حاکی از برتری نسبی سویه S21-1 متعلق به جنس *Sodomonas* بود. به نظر می‌رسد باکتری‌های مورد آزمون، به زمان بیشتری برای حذف زیستی ترکیبات نفتی نیاز داشته‌اند یا سهم ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک و توزیع این مواد در آلودگی نفتی عاملی برای کاهش تجزیه زیستی ترکیبات نفتی بوده است.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، پاکسازی محیط‌زیست، تلقیح زیستی، هیدروکربن‌های نفتی

استناد به این مقاله: ساریخانی، م.ر.، لطف‌اللهی، ا. و هاشم‌زاده، س. (۱۴۰۴). مقایسه کارایی برخی جدایه‌های باکتریایی در زیست‌پالایی

یک خاک آلوده به نفت. *نشریه دانش خاک و گیاه*، ۳۵ (۳)، ۷۹-۹۴.

مقدمه

آلودگی نفتی به دلیل مصرف گسترده سوخت‌های فسیلی به معضلی جهانی تبدیل شده است. این مشکل در خاورمیانه و کشورهای نفت‌خیز خلیج فارس شدیدتر است. درگیری‌ها و جنگ‌ها نیز بر گسترش این موضوع بی‌تأثیر نبوده‌اند. هیدروکربن‌های نفتی از پایدارترین آلاینده‌های آلی هستند که با ورود به خاک و آب‌های زیرزمینی، هم محیط‌زیست و هم سلامت انسان را تهدید می‌کنند (Al-Maamary et al., 2017).

آلودگی خاک با هیدروکربن‌های نفتی یک چالش زیست‌محیطی جدی محسوب می‌شود و خطرهای قابل‌توجهی در زیست‌بوم‌ها، بهره‌وری کشاورزی و سلامت انسان ایجاد می‌کند. انتشار گسترده ترکیبات نفتی از طریق فعالیت‌های صنعتی، نشت‌های اتفاقی و دفع نامناسب پسماندها، منجر به تجمع آلاینده‌های پایدار و سمی در خاک شده است. روش‌های پاکسازی خاک آلوده به سه دسته فیزیکی، شیمیایی و زیستی تقسیم می‌شوند. زیست‌پالایی به عنوان روشی کارآمد، با استفاده از ریزجاندارانی که هیدروکربن‌ها را به عنوان منبع کربن مصرف می‌کنند، آلودگی را به مواد بی‌ضرر تبدیل می‌نماید (Ebrahimi et al., 2013; Afsharnia et al., 2022). انتخاب روش مناسب به عواملی مانند نوع آلودگی، هزینه و مقررات زیست‌محیطی بستگی دارد. روش‌های سنتی پاکسازی، مانند حفاری، حرارت‌دهی و اکسایش شیمیایی، معمولاً هزینه‌های بالا، مصرف انرژی و آسیب‌های ثانویه به محیط‌زیست را به همراه دارند. در مقابل، زیست‌پالایی میکروبی به عنوان یک جایگزین پایدار و سازگار با محیط‌زیست ظهور کرده است که از قابلیت‌های متابولیک ریزجانداران برای تجزیه هیدروکربن‌ها به محصولات کم‌خطرتر استفاده می‌کند (Moradi et al., 2024a; 2024b).

در میان ریزجانداران تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها، جدایه‌های باکتریایی به‌ویژه آن‌هایی که متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Rhodococcus* هستند، کارایی قابل‌توجهی در تجزیه ترکیبات پیچیده نفتی از خود نشان داده‌اند. ابزار آنزیمی آن‌ها، از جمله اکسیژنازها و دهیدروژنازها، امکان کاتابولیسم آلکان‌ها، ترکیبات آروماتیک و هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAH¹) را فراهم می‌کنند. با این حال، اثربخشی زیست‌پالایی به عواملی مانند انتخاب سویه میکروبی، شرایط محیطی (مانند دما، pH و در دسترس بودن مواد غذایی) و ترکیب آلاینده بستگی دارد (Baniasadi and Mousavi, 2019). تلاش برای دسترسی به سویه‌های کارآمد برای رفع آلودگی‌های نفتی همواره مورد توجه پژوهشگران مختلف بوده است (Ebrahimi et al., 2013; Ghavidel et al., 2016; Afsharnia et al., 2022). به‌ویژه تفاوت در میزان و نوع آلودگی‌ها (آلودگی‌ها بالا یا کم، آلودگی آلیفاتیک یا آروماتیک و غیره) و همچنین شرایط محیطی (نوع خاک، شوری و pH خاک، دمای محیط و غیره) که این آلودگی‌ها در آن رخ می‌دهد.

آفرت و همکارانش (Auffret et al., 2014) در مطالعه‌ای پس از جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از خاک و فاضلاب و استفاده از مخلوط ۱۳ گونه باکتریایی مؤثر در تجزیه آلاینده‌های نفتی در خاک، مشاهده کردند که با تلقیح این کنسرسیوم باکتریایی به خاک پس از ۱۱۳ روز آن‌ها توانستند از ۱۶ نوع ترکیب نفتی موجود در خاک ۱۳ نوع از آن را به‌طور کامل و ۲ نوع را به‌طور نسبی از خاک حذف کنند. تایاگی و همکارانش (Tyagi et al., 2011) نشان دادند که ۱۳ روز پس از تلقیح باکتری و کاربرد کود نیتрат آمونیوم، آلودگی خاک به گازوئیل به میزان ۹۰ درصد کاهش یافت. این نتیجه به‌وسیله مقایسه سطح زیر منحنی پیک‌های کروماتوگرافی گازی (GC) به دست آمد که نشان‌دهنده مصرف گازوئیل به‌وسیله جمعیت باکتری و افزایش فعالیت میکروبی در خاک آلوده بر اثر تلقیح باکتری به خاک و کاربرد کود بود.

¹-Polycyclic aromatic hydrocarbons

روش‌های متفاوتی برای پایش وضعیت آلودگی و بررسی سلامت خاک وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به شاخصهای زیستی (نظیر تنفس پایه و برانگیخته، جمعیت میکروبی و زیست‌توده آن) و فعالیت‌های آنزیمی اشاره کرد (Norozpour et al., 2024; Moradi et al., 2024a; 2024b). علاوه بر آن شاخصه‌های فیزیکی و شیمیایی نیز مورد توجه هستند. بعد از بکارگیری انواع تیمارهای زیست‌پالایی، نیز می‌توان از همین موارد برای بررسی موفقیت روش‌های زیست‌پالایی بهره جست. آنزیم‌ها در خاک به عنوان یکی از ابزارهای قابل‌اعتماد، آسان و حساس به کیفیت و سلامت خاک، برای تشخیص و اندازه‌گیری مقدار و غلظت آلاینده‌ها قبل از آزمایش، در طول آن و بعد از فرایند پالایش خاک می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (Moradi et al., 2024). تاوامانی و همکاران (Thavamani et al., 2012) دریافتند که در خاک آلوده به ترکیبات PAH و فلزهای سنگین، کاهش در جمعیت، تنوع میکروبی و فعالیت متابولیکی اتفاق می‌افتد و فعالیت‌های آنزیمی نیز به شدت مهار می‌شوند. توجه به غلظت آلاینده و پایش تغییرات آن با بکارگیری روش‌هایی نظیر سوکسله، GC و غیره از جمله موارد مورد توجه در روش‌های شیمیایی است. در این میان توجه به ظاهر و فیزیک خاک‌های آلوده و تغییراتی که در آن قابل‌پیگیری است، نیز می‌تواند مدنظر قرار گیرد. خلاصه‌ای از این شاخصها و صفاتی که در مطالعات زیست‌پالایی می‌توانند مورد توجه قرار گیرند، در جدول ۲ آورده شده است و تغییرات آن‌ها قبل و بعد از زیست‌پالایی قابل‌مشاهده است.

بر این اساس در مطالعه حاضر، پتانسیل تجزیه زیستی نه جدایه باکتریایی (H711, H712, H814, H921, S21-1, C16-20, A-4۱۴, P5 و Bio4) در خاک آلوده نفتی با میزان آلودگی ۶/۵ درصد هیدروکربن‌های نفتی در یک دوره ۶۰ روزه ارزیابی شد. آزمایش در شرایط طبیعی (دمای اتاق) با رطوبت کنترل‌شده، هوادهی (همزدن روزانه) و تغذیه با محلول غذایی NPK برای افزایش فعالیت میکروبی انجام شد. شاخص‌های کلیدی مانند کاهش بوی هیدروکربن، تغییرات رنگ قابل‌مشاهده و میزان باقی‌مانده نفت برای ارزیابی کارایی تجزیه، پایش شدند. اندازه‌گیری هیدروکربن‌ها با استفاده از روش سوکسله و حلال دی‌اتیل اتر انجام شد تا اندازه‌گیری دقیقی از آلودگی باقی‌مانده تضمین شود.

مواد و روش‌ها

تهیه خاک آلوده به مواد نفتی

در این آزمایش از خاک آلوده به نفت که به‌طور طبیعی آلوده شده بود، از بخش جنوب کشور (حوزه خلیج فارس) استفاده شد. در ابتدا ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بر روی نمونه‌های هواخشک و عبور یافته از الک ۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. این ویژگی‌ها مطابق با روش‌های زیر تعیین شدند: بافت خاک با استفاده از روش هیرومتر (Bouyoucos, 1951)، pH خاک در تعلیق^۲ خاک (۱:۲، خاک به آب) با استفاده از pHسنج (مدل 86502 AZ) بر اساس روش (Rich, 1958) سنجیده شد. قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره تعلیق خاک (۱:۲) با استفاده از EC متر (مدل 8301 AZ) طبق روش ریچارد (Richard, 1954) تعیین گردید. کلسیم کربنات معادل خاک به روش خنثی سازی با هیدروکلریک اسید و تیت کردن با سود (Martin & Reeve, 1955) اندازه‌گیری شد. کربن آلی خاک بر اساس روش اکسایش (Walkley & Black, 1934) سنجیده شد. فسفر قابل‌جذب گیاه در خاک به روش اولسن (Olsen & Sommer, 1982)،

²-Suspension

پتاسیم قابل جذب قابل جذب گیاه در خاک با استفاده از عصاره‌گیر آمونیوم استات یک مولار (Jones, 2001) تعیین شدند (جدول ۱).

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این پژوهش.

بافت خاک	شن (%)	سیلت (%)	رس (%)	کربن آلی (OC) (%)	CCE (%)	فسفر قابل جذب (mg/kg)	پتاسیم قابل جذب (mg/kg)	pH	EC (dS/m)
شنی	۹۵	۱/۶	۳/۴	۸/۷۵	۱	۲	۱۲	۷/۷۲	۲/۸۵

CCE: کلسیم کربنات معادل خاک

بدون انجام تیمار خاصی بر روی نمونه‌های مورد نظر، این نمونه‌ها پس از توزین به مقدار برابر در پتری‌دیش‌های شیشه‌ای استفاده شدند. این آزمایش با در نظر گرفتن سه تکرار به انجام رسید. برای هر تیمار ۲۰ گرم از خاک آلوده توزین و مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز به روش سوکسله (Anonymus, 1998) برای اندازه‌گیری هیدروکربن کل نفتی یا TPH نشان داد که مقدار اولیه نفت ۶/۵ درصد می‌باشد.

تهیه و آماده‌سازی باکتری‌ها

در این آزمایش از نه سویه باکتریایی (Bio4، P5، 14A-4، C16-2O، S21-1، H711، H712، H814، H921) موجود در بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز استفاده شد. برخی از این جدایه‌ها از خاک‌های آلوده به نفت در نفت‌شهر کرمانشاه جداسازی شده بودند (نظیر H712، H814، H921 و H711) و برخی نیز مربوط به شرایط غیرآلوده به نفت بودند که قبلاً جدا سازی و در بانک میکروبی موجود بودند. قابل ذکر است که برخی جدایه‌های مورد استفاده در این آزمایش، هنوز شناسایی کامل نشده‌اند اما برخی به جنس *سودوموناس* (S21-1 و C16-2O)، برخی به جنس *باسیلوس* (Bio4)، برخی به جنس *اگروباکتریوم* (14A-4) و برخی به جنس *پاتوتوآ* (P5) تعلق داشتند. ابتدا کشت شبانه باکتری‌ها در محیط NB تهیه شد. پس از رسیدن به جمعیت مطلوب ($OD=1$)، جمعیتی معادل با CFU/ml 10^9 درون یخچال نگهداری شده و قبل از استفاده به میزان ۱۰ برابر رقیق شده و برای تلقیح به خاک افزوده شد. رقیق‌سازی در آب مقطر یا در محلول NPK مورد استفاده انجام شد. با توجه به میزان خاک مورد استفاده، ۴ میلی‌لیتر از آن به ۲۰ گرم افزوده شد و خاک بهم زده شد. تلقیح باکتریایی در هر هفته، دو بار با فاصله حدود سه یا چهار روز انجام شد. در برخی از مطالعات تلقیح یکبار انجام گرفته و زمان بیشتری داده می‌شود تا زیست‌پالایی انجام شود اما در مواردی که زمان مهم می‌باشد و در بازه زمانی کوتاه‌تری نیاز به زیست‌پالایی باشد، مقدار اینوکولوم یا تعداد دفات تلقیح آن افزایش می‌یابد (Arjoon, 2012). سعی شد هوادهی روزانه باشد و در روزهای غیر از تلقیح باکتری در صورت نیاز به همان میزان آب برای هر تیمار افزوده و هم‌زده شد. مدت آزمایش ۶۰ روز به طول انجامید. جزئیات روش تلقیح میکروبی در بخش ۳ ارائه شده است.

بررسی امکان رشد باکتری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس

با توجه به پراکندگی مناطق آلوده نفتی در حوزه خلیج فارس و بالا بودن دما در این مناطق، آزمون قابلیت رشد باکتری‌ها در دمای بالا مورد توجه بود. بدین خاطر امکان رشد باکتری‌ها در محیط کشت جامد NA در دمای ۵۰

درجه سلسیوس ارزیابی شد (Meintanis et al., 2006). برای این منظور کشت خطی از باکتری‌ها در پلیت انجام شد و رشد باکتری‌ها در دو دمای ۲۸ و ۵۰ درجه سلسیوس درون انکوباتور مورد بررسی قرار گرفت.

اعمال تیمار زیست‌پالایی

مراحل اجرای تیمار زیست‌پالایی به شرح زیر بود (Sarikhani et al., 2025).

(الف) افزودن سورفکتانت به خاک آلوده: برای این کار، از توئین ۸۰ به میزان ۱ درصد (V/W) استفاده شد. افزودن سورفکتانت به میزان ۵ میلی‌لیتر به ۲۰ گرم خاک فقط یکبار انجام شد و پس از آمیختن خاک، بعد از گذشت یک روز، تلقیح باکتریایی انجام پذیرفت.

(ب) افزودن عناصر NPK به خاک آلوده: در این آزمایش از محلول N:P:K ۲۰:۲۰:۲۰ استفاده شد. برای تهیه ۱ لیتر از محلول فوق، ۵/۵ گرم N:P:K با ۱۲ گرم اوره (برای افزایش مقدار و سهم نیتروژن) مخلوط شد. هر لیتر شامل ۱/۱ گرم فسفر، ۱/۱ گرم پتاسیم و ۶/۶ گرم نیتروژن بود.

(ج) تلقیح باکتریایی: زادمایه باکتریایی اولیه قبل از استفاده به میزان ۱۰ برابر رقیق شده و برای تلقیح به خاک افزوده شد. رقیق‌سازی در آب مقطر یا در محلول NPK انجام گرفت. سپس ۴ میلی‌لیتر از آن به ۲۰ گرم خاک افزوده شد و خاک بهم زده شد. تلقیح باکتریایی در هر هفته، دوبار با فاصله حدود سه یا چهار روز انجام گرفت. دلیل رقیق‌سازی مشابه‌سازی شرایط آزمایشگاهی با شرایط واقعی بود، زیرا که در کارهای میدانی معمولاً زادمایه مورد استفاده با جمعیت کمتری مورد استفاده قرار می‌گیرد و بعضاً رقیق‌سازی به میزان ۱۰۰۰ برابر می‌باشد (۱ میلی لیتر در یک لیتر آب یا محلول غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد). در این آزمایش برای اینکه کارایی باکتری‌ها در تجزیه زودتر مشخص شود، غلظت کاربردی بیش از حالت معمول در کارهای میدانی بود.

(د) هوادهی و تأمین رطوبت خاک آلوده: هوادهی به صورت روزانه جهت تأمین هوا از طریق همزدن خاک انجام گرفت. و تنظیم رطوبت هر دو روز یک بار با افزودن ۵ میلی‌لیتر آب به ۲۰ گرم خاک انجام شد. شایان ذکر است که در طول آزمایش دمای انکوباسیون، دمای اتاق بوده است و تمام پتری‌دیش‌ها در دمای اتاق نگهداری شدند.

اندازه‌گیری TPH و درصد تجزیه آن

تعیین غلظت هیدروکربن‌های نفتی کل در خاک آلوده و خاک‌های تیمار شده بر اساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا انجام شد (Anonymus, 1998). در این روش، برای تعیین غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خاک خشک درون کاغذ خشک کن قرار داده شد و اطراف آن مسدود شد. سپس در عصاره‌گیر سوکسله با ۳۰۰ میلی‌لیتر از دی‌اتیل اتر به مدت ۴ ساعت استخراج شد. سپس نمونه شسته شده با حلال فوق، به مدت دو روز درون آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس گذاشته شد تا کاملاً خشک شود و از طریق فرمول ۱ مقدار هیدروکربن‌های نفتی یا درصد نفت در نمونه محاسبه شد (Anonymus, 1998).

$$TPH (\%) = (W_i - W_d) / W_d \times 100 \quad (1)$$

برای محاسبه درصد نفت موجود در نمونه کافی است وزن اولیه نمونه (W_i) از وزن نمونه شسته شده با حلال و خشک شده درون آون (W_d) کسر شود و در فرمول فوق قرار گیرد.

برای محاسبه درصد تجزیه زیستی TPH از رابطه ۲ استفاده شد (Anonymus, 1998):

$$TPH \text{ degradation } (\%) = (W_i - W_f) / W_i \times 100 \quad (1)$$

W_i مقدار نفت موجود در تیمار شاهد (مقدار نفت اولیه) و W_f مقدار نفت باقی‌مانده بعد از فرایند زیست‌پالایی (نفت موجود در تیمارها).

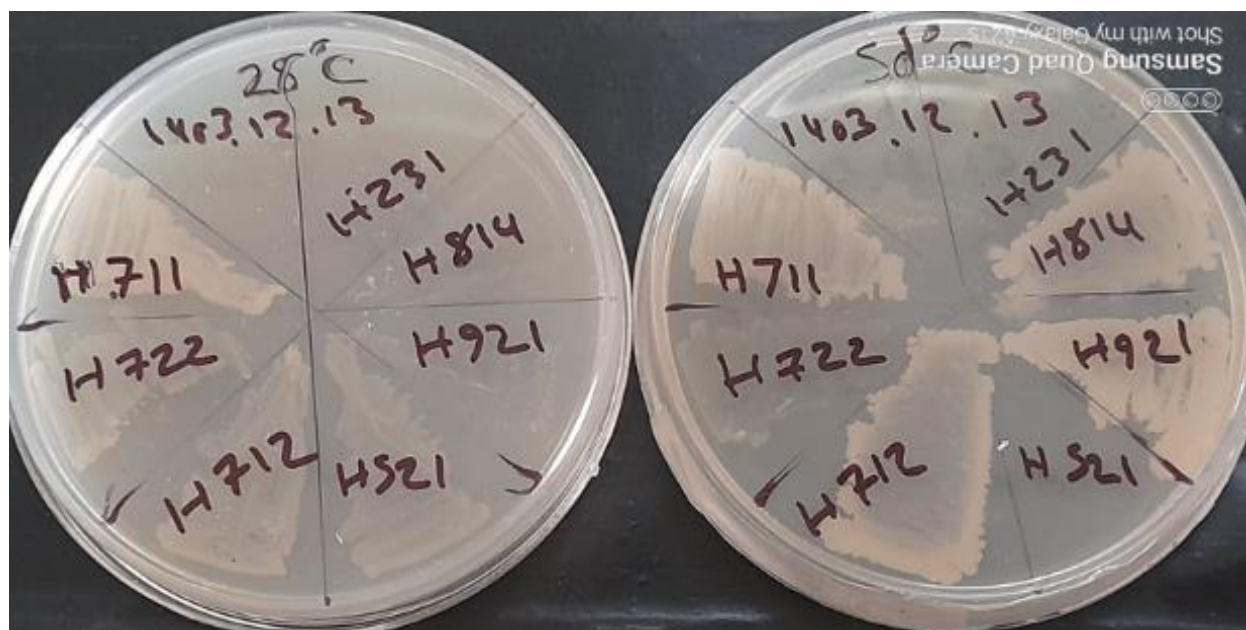
طرح آزمایشی و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با اعمال سه تکرار انجام شد و تجزیه آماری داده‌ها از طریق نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. مقایسه‌های میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شدند. تیمارهای آزمایش شامل ۹ سویه باکتریایی و یک نمونه شاهد بدون تلقیح بود. در این آزمایش تیمار شاهد، خاک آلوده بدون اعمال تلقیح میکروبی بود، که برای مقایسه کارایی زیست‌پالایی باکتری‌های مورد استفاده در آزمایش، در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

رشد باکتری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس

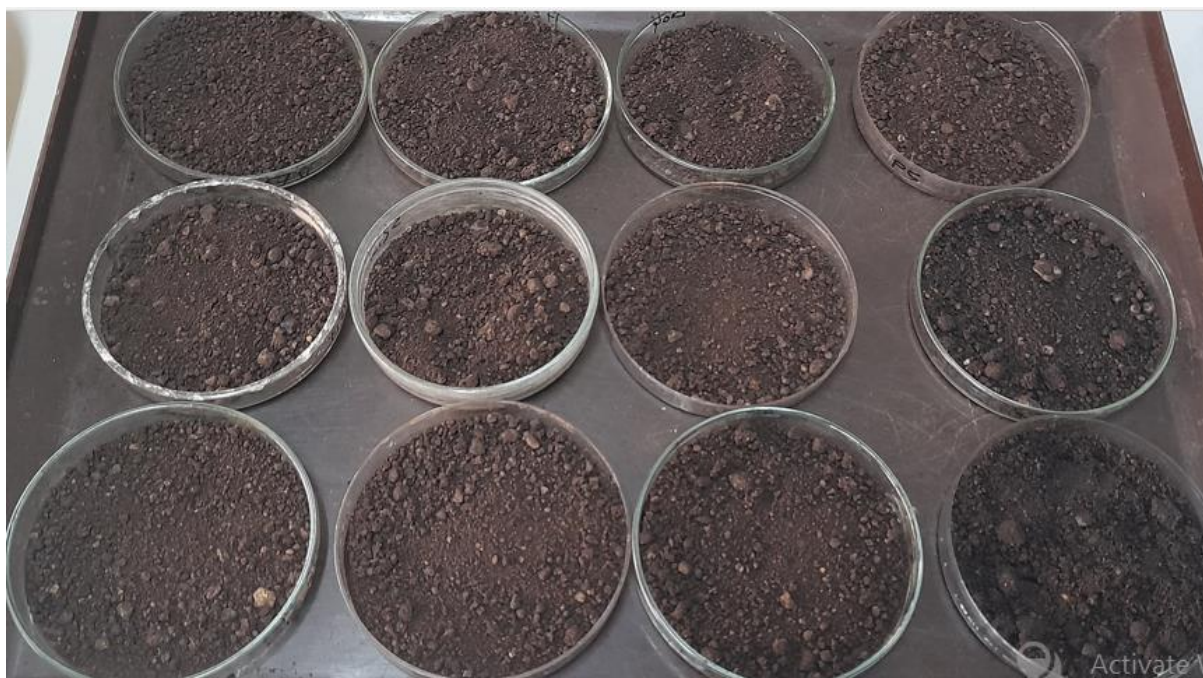
با توجه به میانگین بالای دما در بخش جنوبی کشور و کشورهای حوزه خلیج فارس و وجود دماهای بالا، طبیعی است که توجه به سویه‌های میکروبی که به‌خوبی در این شرایط امکان رشد و فعالیت داشته باشند، از نکات کلیدی است. همان گونه که از شکل ۱ برمی‌آید، عدم رشد برخی از باکتری‌ها نظیر H521 در دمای ۵۰ درجه سلسیوس دیده می‌شود. در نقطه مقابل برخی از جدایه‌ها در دمای بالاتر رشد بهتری داشتند (همانند جدایه H921 و H814). با توجه به اینکه تحمل دمای ۵۰ درجه برای انتخاب سویه‌ها برای آزمایش زیست‌پالایی مهم بود. ابتدا این آزمون دمایی برای غربالگری باکتری‌ها انجام شد و سویه‌های حساس برای بخش دوم آزمایش انتخاب نشدند. ترموفیل (گرمادوست) بودن یا ترموتولرنت (متحمل گرما) بودن باکتری از جمله ویژگی‌های مورد توجه در استفاده و استعمال این دست از باکتری‌ها در مناطق با دمای بالا است (Al-Maghrabi et al., 1999; Meintanis et al., 2006).



شکل ۱- بررسی توانایی رشد باکتری‌ها در دمای ۵۰ درجه سلسیوس. کشت خطی از باکتری‌های مورد آزمایش در دو دمای متفاوت (۵۰ درجه سلسیوس (سمت راست) و ۲۸ درجه سلسیوس (سمت چپ)).

توجه به شاخص‌های ظاهری خاک (رنگ و بوی خاک)

همان گونه که از شکل ۲ برمی‌آید، در خلال فرایند زیست‌پالایی به مرور تغییراتی در ظاهر خاک آلوده نفتی مشاهده شد. به مرور از تیرگی آن کاسته شد و رنگ روشنتری پیدا نمود و به سمت قهوه‌ای شدن یا رنگ اصلی خاک سوق پیدا کرد. به بیان دیگر، تغییر در ظاهر و رنگ خاک آشکار شد. سرعت این تغییر در تیمارهای کارآمد و موفق زیست‌پالایی بیشتر بود. علاوه بر تغییر رنگ خاک، ساختمان خاک بهتر شده، اسفنجی و پوک شده و شرایط تهویه خاک بهبود یافت. تغییر در میزان بوی متصاعد شده نیز مشهود بود و روند کاهشی داشت. همچنین، در مقایسه با روزهای نخست که در هنگام تأمین رطوبت، حالت آبریزی بارز بود، جذب آب در نمونه‌ها با گذشت زمان بهتر شد. بخشی از این تغییرات در جدول ۲ قابل مشاهده است. موارد مطرح شده در جدول ۲ بیانگر تغییرات مورد انتظار در خاک‌های آلوده به نفت با آلودگی اولیه است که در جریان زیست‌پالایی دچار تغییرات شده و در نهایت به صورت‌هایی که در جدول ارائه شده است، قابل مشاهده یا پیگیری بود. در آزمایش حاضر، نوع ساختمان خاک تعیین نشد ولی مقایسه خاک‌ها در تیمار زیست‌پالایی با خاک آلوده اولیه، تغییرات محسوسی از نظر پوک شدن و اسفنجی شدن خاک نشان داد. علاوه بر آن، قابلیت خاک برای جذب آب افزایش یافت و از حالت آبریز بودن اولیه فاصله گرفت. تغییرات رنگ خاک هم به صورت بصری و هم با استفاده از دفترچه رنگ مانسل بررسی شد و همان گونه که از شکل ۲ نیز برمی‌آید این تغییرات ملموس بودند. هر چند در این آزمایش ابزار خاصی برای اندازه‌گیری و کمی‌سازی بوی متصاعد شده از نمونه‌ها وجود نداشت، اما با استشمام نمونه‌های خاک، در تیمار آزمایشی با نمونه شاهد (نمونه با آلودگی نفتی اولیه)، این موضوع کاملاً آشکارا تأیید شد.



شکل ۲- مقایسه تیمارهای زیست‌پالایی بعد از تلقیح باکتریایی در مقایسه با نمونه شاهد. نمونه تیره (سمت راست پایین)، نمونه خاک آلوده نفتی است که تلقیح میکروبی در آن انجام نشده است و به عنوان نمونه شاهد می‌باشد.

میزان نفت خاک و درصد تجزیه نفت

آلودگی نفتی یکی از چالش‌های مهم زیست‌محیطی است که نیاز به روش‌های کارآمد برای پاکسازی دارد. زیست‌پالایی با استفاده از ریزجانداران، قارچ‌ها، یا آنزیم‌ها، هیدروکربن‌های نفتی را به ترکیبات کم‌خطرتر تجزیه می‌کند. برای ارزیابی موفقیت این فرایند، محاسبه درصد تخریب نفت ضروری است. شکل ۳ نشان‌دهنده آن است که مقدار نفت در نمونه شاهد که هیچ تیماری بر روی آن انجام نشده است، برابر با $\frac{6}{5}$ درصد بود. در میان تیمارهای باکتریایی کمترین مقدار نفت مربوط به تیمار S21-1 بود. بر این اساس، نگاهی به درصد تجزیه نفت در بین تیمارها نشان داد که بالاترین مقدار تجزیه نفت مربوط به همین تیمار بود (شکل ۴). همان‌گونه که از تصویر ۴ برمی‌آید این میزان در تیمار S21-1 حدود ۲۶ درصد به دست آمد. به نظر می‌رسد که حذف کامل ترکیبات نفتی به زمان بیشتری نیاز داشته است. در مطالعات میدانی در مناطق آلوده با آلودگی بالا تمرکز بر کاهش آلودگی TPH به میزان کمتر از ۱ درصد می‌باشد. هر چند پیشرفت زیست‌پالایی به عوامل دیگری به جز غلظت اولیه آلاینده اعم از نوع آلاینده (سهم آلیفاتیک‌ها و آروماتیک‌ها)، نوع میکروب، شرایط محیطی (دما، رطوبت، تهویه، سطح عناصر غذایی و غیره) وابسته است.

نادعلیان و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه خود اقدام به جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام از رسوبات آلوده به نفت منطقه اروندکنار نمودند و در ادامه شرایط بهینه برای تجزیه ترکیبات نفتی (به‌ویژه نفت خام) و نیز ارزیابی توان سویه انتخابی (*Pseudomonas aeruginosa* BN2) در تجزیه ترکیبات نفتی تعیین کردند. آنان به منظور دستیابی به بهترین شرایط تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه BN2، اقدام به بهینه‌سازی غلظت منبع نیتروژن و فسفر نمودند و توانایی سویه BN2 در تجزیه نفت خام را به روش وزن سنجی گزارش دادند. این سویه در غلظت

۰/۲۵ گرم در لیتر کلرید آمونیم و ۰/۰۲۴ گرم در لیتر فسفات پتاسیم بهترین عملکرد را نشان داد و بالغ بر ۸۰ درصد نفت خام را در پنج روز تجزیه کرد.

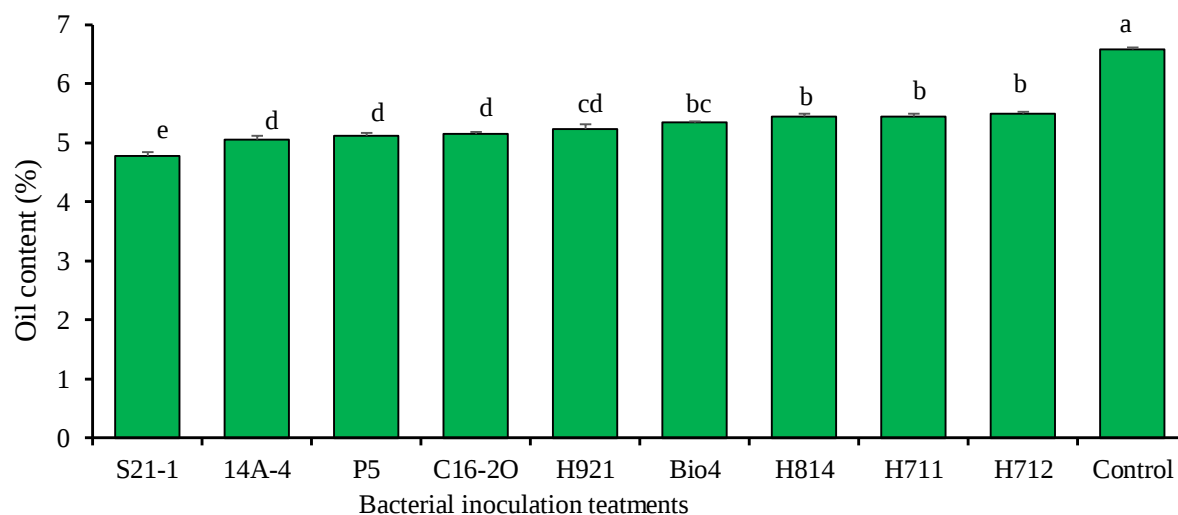
حسینی‌بلداجی و همکاران (۲۰۲۳) با نمونه‌برداری از خاک‌های مناطق آلوده در اطراف پالایشگاه تهران اقدام به جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت در محیط کشت دارای ۲ درصد نفت سفید (به عنوان تنها منبع کربن) نمودند و عنوان داشتند که سه ایزوله تجزیه‌کننده نفت (نوکارِ دیا، باسیلوس سوبتیلیس و اسیتوباکتر بومانی) قادرند ترکیبات آروماتیک نفت را کاهش داده و یا کاملاً از بین ببرند.

در پژوهش دیگری جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کننده نفت خام از خاک‌های آلوده به نفت پالایشگاه شازند اراک گزارش شد. آزمون TPH در حضور یک درصد نفت در این جدایه‌ها نشان داد که جدایه ADH-02 با ۷۵ درصد حذف نفت خام، توانمندترین جدایه در حذف هیدروکربن‌های نفتی است. تحلیل FTIR حذف ۹۱ درصد ترکیبات آلیفاتیک را در این جدایه نشان داد. نتایج حاصل از شناسایی نشان داد که ADH-02 با ۹۹ درصد شباهت متعلق به جنس *Gliomastix* است. بررسی تجزیه ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای مدل در محیط پایه نمکی با HPLC حاکی از آن بود که این سویه قادر است ۶۷ درصد آنتراسن را طی ۱۴ روز تجزیه کند (حیدری‌تبار و مقیمی، ۲۰۱۷).

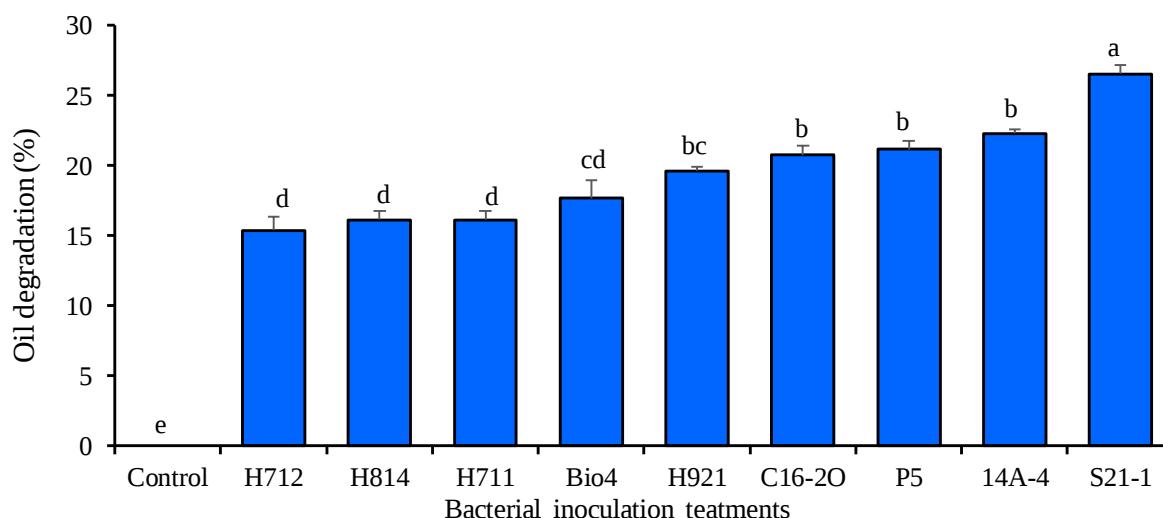
ابراهیمی‌پور و همکاران (۲۰۰۵) در تحقیق خود یک باکتری اکستریم هالوفیل نفت‌خوار تولیدکننده بیوسورفاکتانت از دریاچه نمکدان، واقع در جزیره قشم جداسازی کردند. آنها عنوان داشتند که این باکتری بر روی ملاس چغندر قند قادر به رشد بود اما در این شرایط تولید بیوسورفاکتانت جهت امولوسیونه شدن نفت خام مشاهده نشد. این در حالی بود که در حضور گلیسرین به عنوان تنها منبع انرژی و کربن، رشد و تولید بیوسورفاکتانت بسیار چشمگیر بود.

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک مورد پالایش زیستی قبل و بعد از تیمارهای زیستی (استنتاج از منابع (Speight & Arjoon, 2012; Romero-Zerón 2012).

ویژگی‌های خاک	قبل از زیست‌پالایی	بعد از زیست‌پالایی
تغییرات فیزیکی		
بافت خاک و ساختمان خاک	خاک فشرده، روغنی و چرب است. ساختمان خاک تخریب شده و فاقد دانه‌بندی مناسب به دلیل فقدان فعالیت میکروبی، کاهش نفوذپذیری خاک است.	بازگشت تخلخل و نفوذپذیری خاک به حالت عادی. بهبود تشکیل خاکدانه‌ها به دلیل فعالیت ریزجانداران و ترشح مواد پلیمری
رنگ خاک	رنگ خاک تیره یا قهوه‌ای تیره	رنگ خاک روشنتر شده، هیوی طبیعی خاک ظاهر می‌شود.
بوی خاک جذب آب	بوی شدید مواد نفتی آبگریزی غالب است.	بدون بو، بوی خاک غالب است. بهبود جذب آب
تغییرات شیمیایی		
مقدار هیدروکربن (TPH, Alkanes, PAH,...)	بالا بودن مقدار و نوع آلاینده	کاهش TPH به زیر ۱ درصد
سطح عناصر غذایی	کمبود نسبی نیتروژن و فسفر در نمونه (به دلیل مصرف توسط ریزجانداران برای تجزیه هیدروکربن‌ها)، بالا بودن C/N	افزایش نسبی به دلیل معدنی شدن مواد آلی و افزودن کودهای نیتروژنی (مثلاً اوره)، کاهش C/N
سمیت	بالا بودن سمیت و ممانعت از استقرار گیاه و فون خاک	کاهش اثرهای سمی بر گیاهان و موجودات زنده خاک (با تست جوانه‌زنی گیاه، یا تست بقای کرم خاکی کاهش سطح آلودگی قابل انجام است).
تغییرات زیستی		
فعالیت میکروبی	کاهش فعالیت میکروبی (کاهش تنوع میکروبی و تنها استقرار گونه‌های مقاوم به ترکیبات نفتی)- تنوع میکروبی کم و غالبیت با گونه‌های مقاوم به آلاینده	افزایش فعالیت و تنوع میکروبی (استقرار باکتری‌های هتروتروف عمومی)- بازگشت باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیسستهای مفید
فعالیت تنفسی	پایین بودن به دلیل سرکوب متابولیسم میکروبی	افزایش تنفس در نتیجه افزایش فعالیت متابولیسم میکروب‌ها
فعالیت آنزیمی	کاهش فعالیت آنزیم‌ها	افزایش فعالیت آنزیمی (دهیدروژناز، لیپاز و غیره)، افزایش آنزیم‌های مرتبط با تجزیه آلاینده‌ها
رشد گیاه و حضور فون خاک	عدم رشد گیاه یا حضور فون خاک (کرم خاکی و غیره)	احیاء و استقرار پوشش گیاهی و فون جانوری (نشانه احیای سلامت خاک)



شکل ۳- میزان نفت اندازه‌گیری شده (TPH) در نمونه شاهد و تیمارهای مختلف بعد از گذشت ۶۰ روز.



شکل ۴- درصد تجزیه نفت یا ترکیبات نفتی (TPH) در تیمارهای مختلف بعد از گذشت ۶۰ روز.

در مطالعه حاضر باکتری‌های مختلفی استفاده شدند که برخی از آن‌ها شناسایی شده و برخی نیز هنوز شناسایی نشده‌اند. باکتری‌هایی از گروه گرم مثبت و گرم منفی و وابسته به جنس‌های مختلف (جنس‌هایی نظیر *باسیلوس*، *سودوموناس*، *پانتوآ* و غیره) استفاده شد. آنالیز GC-FID بر روی نمونه انجام نگرفت تا سهم ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک را مشخص نمود ولی به نظر توزیع این مواد در آلودگی نفتی عاملی برای کاهش تجزیه زیستی ترکیبات نفتی بوده است. یا اینکه باکتری‌های مورد آزمون، به زمان بیشتری برای حذف زیستی ترکیبات نفتی نیاز داشته‌اند. برای انجام پروژه‌های زیست‌پالایی ترکیبات نفتی، دستیابی به سویه‌های کارآمد یکی از نکات کلیدی می‌باشد و هدف از اجرای این کار تحقیقی دستیابی به چنین موردی بوده است.

در مطالعات مختلف و در بررسی‌های پیشین توجه به شاخص‌های مرتبط با زیست‌پالایی (اعم از زیستی، شیمیایی و غیره) مورد توجه بوده است همانند تنفس خاک (Moradi et al., 2024b; Sarikhani et al., 2025)، فعالیت آنزیمی خاک

(Thavamani et al., 2012; Moradi et al., 2024a; Sarikhani et al., 2025)، شمارش جمعیت میکروبی خاک (Thavamani et al., 2024a) و بعضاً چندین شاخص به صورت هم‌زمان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. برخی موارد نتیجه‌گیری از پارمترهای اندازه‌گیری شده پژوهشگران را دچار مشکل می‌نماید و شاید توجه به خروجی نهایی کار که همان نفت باقی‌مانده یا درصد تجزیه باشد، کارآمدترین صفت برای جمع‌بندی مطالب باشد. بدین خاطر در مطالعه حاضر تاکید بر این صفت بوده است و از پرداختن به مواردی نظیر اندازه‌گیری صفات مرتبط با فعالیت زیستی خاک اجتناب شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به توزیع و پراکندگی آلودگی‌های نفتی در مناطق نفت‌خیز به‌ویژه در حوزه خلیج فارس و حاکم بودن دمای بالا در این مناطق، این آزمایش با هدف بررسی برخی گونه‌های میکروبی متحمل به دمای ۵۰ درجه سلسیوس و امکان استفاده از آن‌ها در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده نفتی انجام شد. استفاده اولیه از توپین ۸۰ برای افزایش فراهمی ترکیبات نفتی در تجزیه زیستی بود و بعد از آن از کودهای NPK و تلقیح باکتریایی در فواصل زمانی مشخص به همراه تأمین رطوبت مناسب و هوادهی فعال استفاده شد. توجه به داده‌های به دست آمده از میزان اولیه و باقی‌مانده TPH در نمونه شاهد و تیمار باکتریایی، حاکی از آن بود که بعد از گذشت ۶۰ روز مقدار اولیه ۶/۵ درصد TPH به ۴/۷ درصد کاهش یافت. در این میان، سویه S21-1 متعلق به جنس *Sordomonas* بالاترین کارایی را از خود نشان داد. نکته قابل‌توجه در این آزمایش برتری نسبی جدایه S21-1 در مقایسه با جدایه‌هایی بود که از خاک‌هایی نفتی جداسازی شده بودند (نظیر H712، H814، H921 و H711). این موضوع بر خلاف انتظار ما بود اما این یک مشاهده بسیار جالب و از نظر علمی ارزشمند است. برتری یک باکتری جداسازی شده از یک منبع غیرنفتی (S21-1) بر باکتری‌های بومی خاک‌های آلوده به نفت، پدیده‌ای غیرمنتظره اما کاملاً قابل‌توجه است. بایستی توجه داشت که همه میکروب‌های «نفت‌خوار» الزاماً در خاک‌های نفتی زندگی نمی‌کنند. به‌طور خلاصه، برتری S21-1 را شاید بتوان به انعطاف‌پذیری متابولیک بالاتر، تولید سورفکتانت، سازگاری ایده‌آل با شرایط آزمایشگاه و یا داشتن مجموعه ژنی کارآمدتر نسبت داد. آنالیز GC-MS انجام شده بر روی نمونه نشان داد که بخش اعظم ترکیبات نفتی دارای زنجیره کربنی (بیش از ۱۲ کربن، ۴۰ درصد) و (بیش از ۶ کربن، ۷۳ درصد) بالا بود و شاید همین موضوع عاملی برای کاهش تجزیه زیستی ترکیبات نفتی بوده است. یا اینکه باکتری‌های مورد آزمون به زمان بیشتری برای حذف زیستی ترکیبات نفتی نیاز داشته‌اند. برای انجام پروژه‌های زیست‌پالایی ترکیبات نفتی، دستیابی به سویه‌های کارآمد یکی از نکات کلیدی می‌باشد و هدف از اجرای این کار پژوهشی، تلاش برای دستیابی به چنین موردی بوده است.

References

- Afsharnia, M., Sarikhani, M. R., & Zarei, M. (2022). Isolation of oil degrading bacteria from oil contaminated soil around the oil refinery and petrochemical plants of Tabriz and identification of the efficient bacteria. *Water and Soil Science*, 32(4), 91-104. (In Persian with English abstract)
<https://doi.org/10.22034/ws.2021.45023.2408>
- Al-Maamary, H. M., Kazem, H. A., & Chaichan, M. T. (2017). Climate change: the game changer in the Gulf Cooperation Council Region. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 555-576.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.048>
- Al-Maghrabi, I. M., Aqil, A. B., Islam, M. R., & Chaalal, O. (1999). Use of thermophilic bacteria for bioremediation of petroleum contaminants. *Energy Sources*, 21(1-2), 17-29.
<https://doi.org/10.1080/00908319950014920>
- Anonymous. (1998). *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical Chemical Methods*. Environmental Protection Agency, USEPA, Washington DC, USA.
- Auffret, M. D., Yergeau, E., Labbé, D., Fayolle-Guichard, F., & Greer, C. W. (2015). Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2419-2430. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6159-8>
- Baniasadi, M., & Mousavi, S.M. (2018). A Comprehensive Review on the Bioremediation of Oil Spills. In: Kumar, V., Kumar, M., Prasad, R. (eds) *Microbial Action on Hydrocarbons*. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_10
- Bouyoucos, G.J. (1951). A recalibration of hydrometer method for making mechanical analysis of soils. *Agronomy Journal*, 43, 434-438. <https://doi.org/10.2134/agronj1951.00021962004300090005x>
- Ebrahimi, M., Fallah, A. R., & Sarikhani, M. R. (2013). Isolation and identification of oil-degrading bacteria from oil-polluted soils and assessment of their growth in the presence of gas oil. *Water and Soil Science*, 23(1), 109-121. https://water-soil.tabrizu.ac.ir/article_201.html?lang=en
- Ebrahimpour, Gh. & Fooladi, J. (2005). Isolation and characterisation of crude oil biodegrading extreme halophilic biosurfactant-producing bacterium and an examination of the effect of salt concentrations on crude oil biodegradation by this strain. *Environmental Sciences*, 2(4), 9-20.
https://envs.sbu.ac.ir/article_96971.html?lang=fa
- Ghavidel, A., Najirad, S., & Alikhani, H. A. (2016). Isolation and study of indigenous bacteria of the contaminated soils in southern of Tehran oil refinery plant for bioremediation of oil contaminations. *Water and Soil Science*. 26(3), 175-185. https://water-soil.tabrizu.ac.ir/article_5543.html?lang=en
- Heydaritabar, R., & Moghimi, H. (2017). Evaluation of anthracene biodegradation by *Gliomastix* sp. isolated from contaminated soil of Shazand oil refinery, Iran. <https://www.sid.ir/paper/250530/fa>
- Hosseini-Boldaji, S. A., Soltani, H., & Teimouri, M. (2023). Isolation and purification of petroleum-decomposing bacteria from contaminated soils and identification the resulted compounds of degradation of such compounds. *Applied Biology*, 36(1), 109-34. <https://doi.org/10.22051/jab.2022.40410.1486>
- Jones, J.R. (2001). *Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis*. CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Meintanis, C., Chalkou, K. I., Kormas, K. A., & Karagouni, A. D. (2006). Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island. *Biodegradation*, 17(2), 3-9.
<https://doi.org/10.1007/s10532-005-6495-6>
- Martin, A.E., & Reeve, R. (1955). A rapid manometric method for determining soil carbonate. *Soil Science*, 79, 187-197.
- Moradi, Sh., Sarikhani, M. R., Beheshti Ale-Agha, A., Hassanpur, K., & Shiri, J. (2024a). Effects of natural and prolonged crude oil pollution on soil enzyme activities. *Geoderma Regional* 36 (2024) e00742.
<https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2023.e00742>

- Moradi, Sh., Sarikhani, M. R., Beheshti Ale-Agha, A., Hassanpur, K., & Shiri, J. (2024b). Evaluation of the pattern of changes in basal and substrate-induced respiration in oil-contaminated soils (Case study: Naft-Shahr Kermanshah). *Water and Soil Science*, 34(1), 163-183. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22034/ws.2023.54206.2502>
- Nadalian, B., Ebrahimipour, G., & Shahriari Mogadam, M. (2016). Biodegradation of crude oil contamination by a bacterium strain isolated from sediment of Arvandkenar area. *Journal of Health*, 7(3), 263-275. <http://healthjournal.arums.ac.ir/article-1-989-fa.html>
- Norozpour, M., Sarikhani, M. R., & Aliasgharzad, N. (2024). Monitoring of soil enzyme activity changes in a heavy naphtha-contaminated soil under different bioremediation treatments. *Water and Soil Science*, 34(1), 217-233. <https://doi.org/10.22034/ws.2021.48736.2448>
- Olsen, S.R. & Sommer, L.E. (1982). Phosphorus. Pp. 403–430. In: Page, A.L, Miller, R.H and Keeney, D.R. (Eds). *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. SSSA, Madison, WI, USA.
- Richard, L.A. (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Staff of U. S. Salinity Laboratory, Agriculture Handbook No. 60, USDA, Washington, USA. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-195408000-00012>
- Rich, C. I. (1958). Soil chemical analysis. *Soil Science Society of America Journal*, 22(3), 272. <https://doi.org/10.2136/sssaj1958.03615995002200030025x>
- Romero-Zerón, L. (Ed.). (2012). Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites. BoD–Books on Demand.
- Sarikhani, M. R., Afsharnia, M., Zareii, M., & Lotfolahi, A. (2025). Comparison of different bioremediation methods in reducing petroleum hydrocarbons in contaminated soil (Case study: Evaporation ponds of Tabriz refinery). *Journal of Soil and Plant Science*, 35(2), 23–41. <https://doi.org/10.22034/sps.2025.66736.1004>
- Speight, J. G., & Arjoon, K. K. (2012). Bioremediation of petroleum and petroleum products. John Wiley & Sons.
- Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2012). Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 99, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.12.030>
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22, 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- Walkley, A., & Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37 (1), 29–38. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>