Publisher: Soil Science Society of Iran

Soil Biology Journal

/https://sbj.areeo.ac.ir

Review article

The role of effective oil-degrading bacteria in the remediation of oil-contaminated soils: a case study on the bacillus genus

Komeil Zeynali[1], Shayan Shariati [2] and Ahmad Ali Pourbabaee[3]

[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**

Article Info

Received:
June 24, 2024

Accepted:
September 29, 2024

Keywords:
Bacillus, bioremediation, biosurfactant, lipase, petroleum hydrocarbon, soil pollution

Corresponding author's email:
shayan_shariati@ut.ac.ir
Pourbabaei@ut.ac.ir

DOI:
10.22092/SBJ.2024.366140.266

Extended Abstract

Background and Objectives: Crude oil comprises aliphatic, aromatic, and heterocyclic compounds, all of which are toxic to living organisms. Consequently, oil pollution is a significant environmental concern. Due to its widespread use, accidental spills, transportation, and refining processes, crude oil contamination is relatively common worldwide. Methods for remediating oil-contaminated soils include biological, chemical, and physical approaches. While chemical and physical methods present several disadvantages, bioremediation is a promising and effective strategy for treating oil-contaminated soils. Bioremediation harnesses the natural abilities of microorganisms and their enzymatic systems to degrade, break down, and convert hydrocarbons into less toxic substances. This method is considered the least harmful and most cost-effective way to clean the environment. Various microbial genera are known for their capacity to degrade hydrocarbons. Among these, the genus *Bacillus* stands out as a Gram-positive, rod-shaped bacterium capable of producing spores in aerobic environments. Belonging to the class Bacilli and the family Bacillaceae, *Bacillus* species can form endospores under stressful environmental conditions, allowing them to remain dormant for extended periods. This unique characteristic makes *Bacillus* particularly advantageous for bioremediation in oil-contaminated environments.This review article focuses on the recognition and potential of biodegradation of petroleum compounds by oil-degrading bacteria, particularly the genus *Bacillus*. It is hoped that this review will enhance our understanding of oil pollution's impact on biological communities and the microbial remediation of oil-contaminated soils.

Materials and Methods: All the articles used in this review were sourced from online databases such as Google, Google Scholar, SID, CAS, Science Direct, and Wiley Online Library, as well as from publishers including Elsevier, Frontiers, Springer, Environmental Health Perspectives (EHP), Taylor and Francis Online, MDPI, ACS Publications, Nature, and Civilica. This review is based on research from 169 international journals and scientific publications indexed in the Journal Citation Reports (JCR). The article briefly covers the following sections:1- The Effect of Crude Oil on Soil Microorganisms, 2- Oil Pollution in Iran 3- The Importance of Bioremediation of Petroleum Compounds 4- Mechanisms of Remediation of Oil-Contaminated Soils5- Aerobic and Anaerobic Degradation Pathways of n-Alkanes 6- Research Conducted in the Field of Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons

in Iran 7- Characteristics of *Bacillus* in Oil Degradation 8- Bioremediation of Oil-Contaminated Soils in Iran with a Focus on the Use of *Bacillus*

Results: Various bacterial genera, including *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Actinomycetes*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Vibrio*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, and *Serratia*, are known to degrade hydrocarbons. These bacteria break down hydrocarbons and purify the soil through their enzyme systems and the secretion of compounds such as biosurfactants via different pathways. There are two main mechanisms for the breakdown of hydrocarbons: aerobic and anaerobic pathways. In aerobic mechanisms, oxygen acts as the electron acceptor, while in anaerobic conditions, sulfate and nitrate serve as electron acceptors to complete the process. *Bacillus* species are typically mesophilic, thriving at temperatures between 30°C and 45°C, although some thermophilic species can grow at higher temperatures, up to 65°C. Spore formation in *Bacillus* involves asymmetric cell division, producing an endospore and a mother cell, enabling the bacterium to survive harsh conditions and providing a distinct advantage for hydrocarbon biodegradation. *Bacillus* species can utilize hydrocarbons as carbon and energy sources, making them commonly found in oil-polluted soils. Several Bacillus species, including *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. badius*, *B. licheniformis*, *B. cibi*, *B. megaterium*, and *B. stearothermophilus*, have demonstrated the ability to degrade petroleum hydrocarbons. These bacteria can tolerate a wide range of environmental conditions, such as varying pH, temperature, and salt concentrations, which few organisms can endure. They exhibit high resistance to environmental stressors like nutrient scarcity, dryness, radiation, hydrogen peroxide, and chemical disinfectants. The production of endospores provides a distinct advantage for hydrocarbon biodegradation. Additionally, *Bacillus* species produce a variety of biosurfactants, particularly lipopeptides, which enhance the solubility and bioavailability of hydrocarbons, thereby increasing bioremediation efficiency. Since biosurfactants are biodegradable and exhibit low environmental toxicity, producing these powerful, stable compounds using low-cost carbon sources could significantly advance the bioremediation of oil-contaminated soils. *Bacillus* also produces key degradative enzymes, such as lipase, hydroxylase, dioxygenase, monooxygenase P450, and protease, which play crucial roles in breaking down petroleum compounds. Research has shown that species like *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, and *B. megaterium* can degrade alkanes, BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene), and PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) by secreting these enzymes. Hydrocarbon groups in oil can bind with soil phosphorus, leading to phosphorus depletion. Since phosphorus limitation is a key constraint in the bioremediation of oil-contaminated soils, phosphorus-solubilizing *Bacillus* species such as *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, and *B. megaterium* can alleviate this problem by secreting organic acids like gluconic, lactic, acetic, succinic, and propionic acids. Research conducted in Iran and other international scientific communities indicates that *Bacillus* is capable of degrading various oil compounds by up to 99% within 10 to 30 days in liquid media. Additionally, in soil, *Bacillus* can degrade petroleum hydrocarbons by 20% to 80% over a period of 15 to 180 days.

Conclusion: In conclusion, various bacterial genera, particularly *Bacillus* species, play a crucial role in the degradation of hydrocarbons through both aerobic and anaerobic pathways. Known for their resilience against environmental stressors and ability to form endospores, *Bacillus* species are highly effective in bioremediation, especially in oil-contaminated soils. These bacteria produce essential enzymes and biosurfactants, including lipopeptide biosurfactants like surfactin, which significantly enhance the breakdown of petroleum hydrocarbons. Furthermore, phosphorus-solubilizing Bacillus species help mitigate nutrient limitations in contaminated environments, further enhancing their potential in environmental clean-up efforts. Their impressive efficiency, with degradation rates of up to 80% in soil, underscores their importance in global sustainable bioremediation initiatives

Cite this article: Zeynali ,K., Shariati, Sh., Pourbabaee ,A.A., 2024.the role of effective oil-degrading bacteria in the remediation of oil-contaminated Soils: a case study on the *bacillus* genus. S*oil Biology Journal*, 12 (1),105-139.

CC BY NC

DOI: 10.22092/SBJ.2024.366140.266
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصل‌نامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir

مقاله مروری

نقش باکتری‌های نفت‌خوار مؤثر در اصلاح خاک‌های آلوده نفتی (مطالعه موردی: جنس *باسیلوس*)

کمیل زینالی[۱]، شایان شریعتی[۲]* و احمدعلی پوربابائی[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، pourbabaei@ut.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۴/۴ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۸

چکیده

هیدروکربن‌های نفتی برای همه اشکال حیات سمی هستند. بنابراین آلودگی زیست‌محیطی ناشی از نفت بسیار نگران‌کننده است. نتایج پژوهش‌های مختلف در زمینه پالایش اکوسیستم‌های آلوده، نشان داده است که مکانیسم اصلی حذف این ترکیبات سمی از مکان‌های آلوده از طریق تجزیه زیستی توسط باکتری‌های مؤثر در زیست‌پالایی اتفاق می‌افتد. جنس‌های مختلف باکتریایی مانند *Pseudomonas*، *Acinetobacter*، *Bacillus*، *Rhodococcus*، *Flavobacterium*، *Enterobacter* و *Nocardia* به‌عنوان تجزیه‌کنندگان ترکیبات نفتی شناخته شده اند. این باکتری‌ها با عملکرد سیستم آنزیمی خود و ترشح ترکیبات مختلف مثل سورفکتانت‌های زیستی، از طریق مسیرها و مکانیسم‌های مختلف، هیدروکربن‌ها را تخریب کرده و خاک را پاکسازی می‌کنند. جنس *باسیلوس* یکی از باکتری‌های مؤثر نفت‌خوار می‌باشد که می‌تواند در شرایط محیطی استرس‌زا زنده مانده و از هیدروکربن های نفتی به عنوان منابع کربن و انرژی برای رشد استفاده کند. گونه‌های *باسیلوس* دارای مجموعه‌ای از توانایی‌های فیزیولوژیکی هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها مانند ماسه‌های بیابانی، چشمه‌های آب گرم و خاک‌های قطب شمال زندگی کنند. همچنین *باسیلوس‌ها* توانایی ترشح سورفکتانت‌های زیستی مختلف مثل سورفکتین، ایتورین و فنگیسین را تا میزان ۵/۵ گرم بر لیتر دارند که در محدوده‌های گسترده pH، دما و شوری پایدار هستند. این جنس قادر به ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده قدرتمندی مثل لیپاز، دی‌اکسیژناز و هیدروکسیلاز است. پژوهش‌های صورت گرفته در ایران و جوامع علمی بین‌المللی نشان می‌دهد این باکتری توانایی تجزیه ترکیبات مختلف نفتی را تا میزان ۹۹٪ در مدت ۱۰ تا ۳۰ روز در محیط مایع دارد. همچنین در خاک، این باکتری توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را به میزان ۲۰ تا ۸۰٪ در مدت ۱۵ تا ۱۸۰ روز دارا می‌باشد. بنابراین می‌توان در رویکردهای زیست‌پالایی مکان‌های آلوده به نفت خام از *باسیلوس*‌های غیر بیماریزا به عنوان یک باکتری قدرتمند در تجزیه ترکیبات نفتی، برای دستیابی به محیط زیستی پایدار استفاده کرد.

کلیدواژه: آلودگی خاک، *باسیلوس*، سورفکتانت زیستی، زیست‌پالایی، لیپاز، هیدروکربن نفتی

مقدمه

امروزه نفت خام و مشتقات آن نقش مهمی در زندگی روزمره و صنایع مختلف ایفا می‌کند. نفت خام متشکل از ترکیبات آلیفاتیک، آروماتیک و هتروسایکلیک است (شکل ۱) و این هیدروکربن‌های نفتی برای همه اشکال حیات سمی هستند. بنابراین آلودگی زیست‌محیطی ناشی از نفت بسیار نگران‌کننده است. آلودگی نفت خام به دلیل استفاده گسترده، نشت تصادفی، حمل و نقل و پالایش، در دنیا نسبتاً رایج است (پاول و گاوریلسکو، ۲۰۰۸). بیشتر اجزای هیدروکربنی برای انسان و حیات وحش کشنده هستند؛ زیرا به راحتی می‌توانند وارد زنجیره غذایی شوند. روش‌های اصلاح خاک‌های آلوده به نفت عبارتند از: روش‌های زیستی، شیمیایی، فیزیکوشیمیایی، حرارتی، الکتریکی، الکترومغناطیسی و اولتراسونیک (ردی، ۲۰۱۳؛ رودریگو و همکاران، ۲۰۱۴؛ چانگ و همکاران، ۲۰۱۶؛ ساکسا، ۲۰۱۷). روش‌های شیمیایی و فیزیکی معایب زیادی دارند؛ گران هستند، نیاز به انرژی بالایی دارند و ممکن است به محیط زیست آسیب برسانند (جدول ۱). روش اصلاح زیستی یکی از روش‌های موفق و امیدوارکننده برای تصفیه خاک‌های آلوده به نفت و مشتقات آن است. روش های زیستی عبارتند از: تلقیح میکروبی[۱]، تحریک زیستی[۲]، ورمی‌رمدیشن[۳]، گیاه‌پالایی، استفاده از بیورآکتور، خودپالایی[۴]، کمپوستینگ[۵]، لند فارمینگ[۶] و بیوپایل[۷] (میکائیل-ایگولیما و همکاران، ۲۰۲۲). در زیست‌پالایی از میکروارگانیسم‌ها و سیستم‌های آنزیمی آن‌ها به‌طور طبیعی برای تخریب، تجزیه و تبدیل هیدروکربن‌ها به مواد با سمیت کمتر مثل آب و دی‌اکسید کربن استفاده می‌شود (طاهر و سعید، ۲۰۲۲). این روش کم ضررترین و کم هزینه‌ترین راه برای پاکسازی محیط زیست است (منصور و همکاران، ۲۰۱۵). جنس‌های مختلف باکتریایی مانند *Alcaligenes*، *Acinetobacter*، *Achromobacter*، *Actinomycetes*، *Actinomycetes*، *Arthrobacter*، *Enterobacter*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Mycobacterium*، *Staphylococcus*، *Micrococcus*، *Sphingomonas*، *Vibrio*، *Rhodococcus*، *Lactobacillus* و *Serratia* به‌عنوان تجزیه‌کننده‌های هیدروکربن‌های نفتی شناخته شده اند (خالد و الشریف، ۲۰۲۲؛ پاندولفو و همکاران، ۲۰۲۳).

جنس *Bacillus* یک باکتری گرم مثبت و میله‌ای شکل است که در محیط‌های هوازی، اسپور تولید می‌کند. این جنس متعلق به کلاس *باسیلی* و خانواده *باسیلاسه* می‌باشد. *باسیلوس‌ها* می‌توانند در شرایط محیطی استرس‌زا، اندوسپورهایی تولید کنند که می‌توانند برای مدت طولانی غیرفعال بمانند. این ویژگی، برتری خاص این باکتری نسبت به سایر جنس‌ها در پاکسازی زیستی مکان‌های آلوده به ترکیبات نفتی می‌باشد (کایدا و همکاران، ۲۰۱۸). برخی از گونه‌های *Bacillus* که توانایی‌اشان در تجزیه ترکیبات نفتی به اثبات رسیده است عبارتند از: *Bacillus polymyxa*، *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus badius*، *Bacillus lichenformis*، *Bacillus cibi*، *Bacillus megaterium* و *Bacillus stearothermophilus* (علی، ۲۰۱۹؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲؛ گارسیا-آلکانتارا و همکاران، ۲۰۱۶؛ سرکیرا و همکاران، ۲۰۱۱؛ سرخوه و همکاران، ۱۹۹۳). *باسیلوس‌ها* می‌توانند از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منابع کربن و انرژی برای رشد در محیط‌های نفتی استفاده کنند و معمولا

[۱] Bioaugmentation
[۲] Biostimulation
[۳] Vermiremediation
[۴] Bioattenuation
[۵] Composting
[۶] Land farming
[۷] Biopile

در مکان‌های آلوده به نفت یافت می‌شوند (کیم و کراولی، ۲۰۰۷؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۹؛ کیامرسی و همکاران، ۲۰۱۹؛ سعید و همکاران، ۲۰۲۲). همچنین توانایی این باکتری‌ها در تجزیه زیستی آلاینده‌های آلی به اثبات رسیده است (نصرالهی و همکاران، ۲۰۲۰؛ فریدی و همکاران، ۲۰۲۴؛ ترابی و همکاران، ۲۰۱۷).

سویه‌های متعلق به گونه *B. subtilis* به تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی، از جمله سورفکتانت‌های زیستی با خواص ضد میکروبی، مانند ایتورین‌ها[۸] و فنگیسین‌ها[۹] مشهور می‌باشند (هاروود و همکاران، ۲۰۱۸؛ کاسپار و همکاران، ۲۰۱۹). سورفکتانت-های زیستی به دلیل زیست تخریب‌پذیری بالاتر و سمیت کمتر نسبت به سورفکتانت‌های مرسوم (شیمیایی)، تأثیر سوء کمتری بر محیط زیست دارند و می‌توانند با افزایش زیست‌فراهمی ترکیبات آلی آبگریز مثل هیدروکربن‌های نفتی، باعث بهبود کارایی تجزیه زیستی شوند (گودینا و همکاران، ۲۰۱۵؛ داروش و همکاران، ۲۰۲۱). همچنین دانشمندان به این نتیجه رسیده‌اند که بیوفیلم‌های تولید شده توسط باکتری‌ها به ویژه *Bacillus*، نقش مهمی را در پاکسازی محیط زیست از آلاینده‌ها دارند. ثابت شده است که می‌توان آلاینده‌های سمی فاضلاب‌ها و محیط اطراف را با استفاده از رآکتورهای زیستی حاوی بیوفیلم‌های *B. subtilis* یا ترکیبی از بیوفیلم‌های چند سویه‌ای، تجزیه کرد (محسن و همکاران، ۲۰۲۱). از این رو، باکتری‌های گرم مثبت، به ویژه گونه‌های *Bacillus* در راهبردهای زیست پالایی خاک‌های آلوده نفتی و کاربردهای بیوتکنولوژیکی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

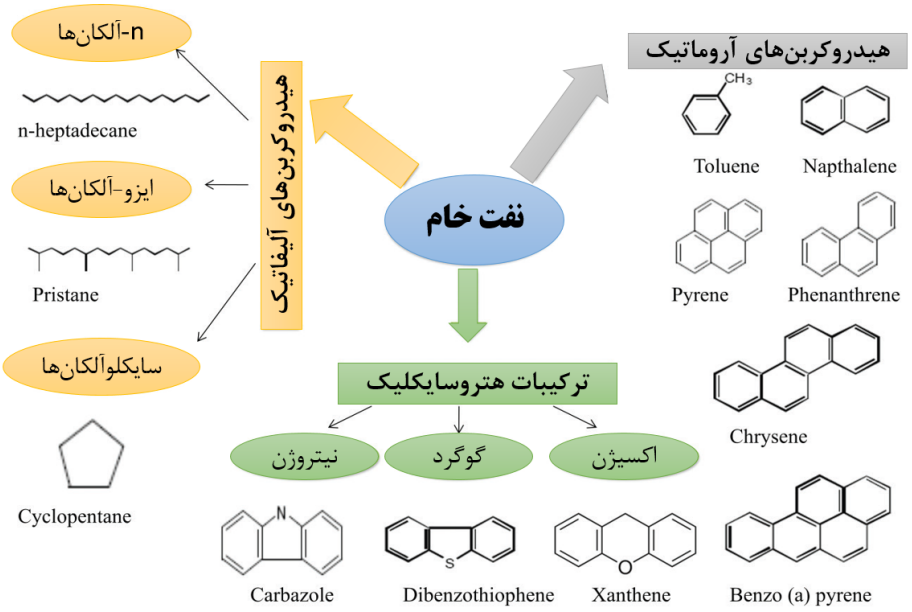
مطالعات زیادی در زمینه تجزیه ترکیبات شیمیایی مضر به وسیله باکتری *Bacillus* انجام شده است. همچنین تحقیقات در زمینه زیست‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی به وسیله *Bacillus* در ایران و دنیا در حال افزایش است (شکل ۲). تحقیق حاضر بر شناخت و پتانسیل تجزیه زیستی ترکیبات نفتی توسط باکتری‌های نفت‌خوار به خصوص جنس *Bacillus* تمرکز کرده است. امید است مطالعه حاضر، درک ما را از تأثیر آلودگی نفتی بر جوامع زیستی و اصلاح میکروبی خاک‌های آلوده به نفت، افزایش دهد.

جدول ۱- روش‌های پاکسازی خاک‌های آلوده به نفت همراه با مزایا و معایب

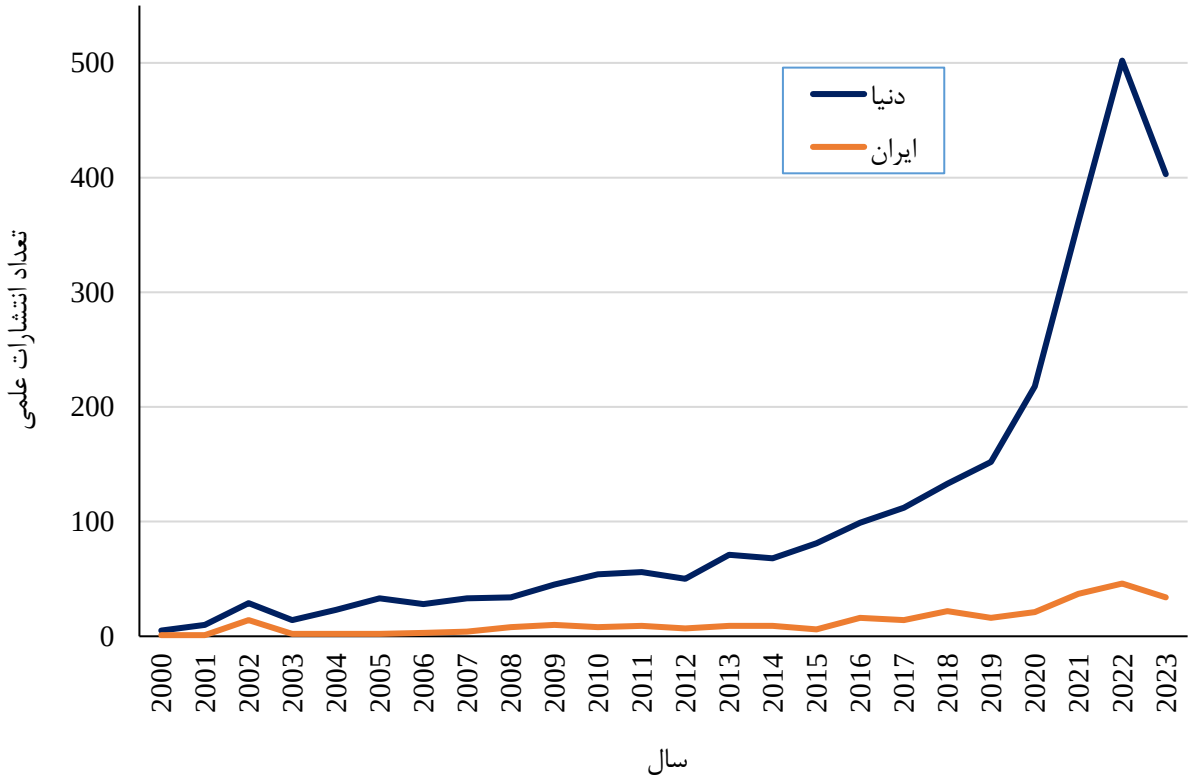
روش‌های پاکسازی	مزایا	معایب	مثال	منبع
فیزیکی	فرآیند ساده، سرعت مناسب، امکان کنترل کامل بر فرآیند اصلاح	گران بودن، نیاز به تجهیزات و امکانات پیچیده، آسیب به محیط زیست، خطر ایجاد آلودگی ثانویه، محدودیت کارایی	شست و شوی خاک، رسوب شویی، سفت سازی، تثبیت، دفع حرارتی، سوزاندن، استخراج بخار	دادرسنیا و همکاران، (۲۰۱۳) راجا و همکاران، (۲۰۲۲)
شیمیایی	کارایی بالا، سرعت مناسب	نیاز به دفع محلول‌های آلوده، هزینه بالا، خطر آلودگی ثانویه برای محیط	اکسیداسیون-احیاء، امواج فرابنفش، اکسیداسیون کاتالیزوری، کربن فعال، سیستم‌های الکتروشیمیایی	آمبایه و همکاران، (۲۰۲۲)
زیستی	کم‌هزینه بودن، سازگار با محیط زیست، عدم ایجاد آلودگی ثانویه، قابلیت اجرا در اکثر خاک‌های آلوده، بهبود کیفیت خاک و اکوسیستم	زمان‌بر بودن، کارایی پایین در آلودگی‌های بالا	تحریک زیستی، تلقیح میکروبی، خودپالایی، گیاه پالایی، استفاده از بیوراکتور، بیوپایل، کمپوستینگ	شارما و همکاران، (۲۰۲۰) سالز دا سیلوا و همکاران، (۲۰۲۰)

[۸] Iturin

[۹] Fengycin



شکل ۱- انواع هیدروکربن‌های نفتی موجود در نفت خام (محجوبی و همکاران، ۲۰۱۸)



شکل ۲-روند انتشارات علمی مرتبط با زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی توسط *Bacillus* از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۳ در دنیا و ایران با جست‌وجوی کلیدواژه‌های *Bacillus*، Petroleum hydrocarbon، Soil و Bioremediation در پایگاه داده Science Direct.

تأثیر نفت خام بر میکروارگانیسم‌های خاک

آلودگی نفتی خاک‌ها یک نگرانی زیست‌محیطی گسترده در دنیا است. نشت نفت و ترکیبات نفتی در خاک، به دلیل اینکه سلامت انسان و اکوسیستم را، به‌ویژه در مناطق سردسیر تهدید می‌کند، یکی از گسترده‌ترین و آسیب‌رسان‌ترین مشکلات آلودگی در محیط‌زیست به شمار می‌رود (احمد و فخرالدین، ۲۰۱۸). به دلیل ساختار پیچیده هیدروکربن‌ها، فرکشن‌های چربی‌دوست آن‌ها تمایل به

برقراری پیوند با ذرات خاک و ماده آلی دارند (لوگشواران و همکاران، ۲۰۱۸). هیدروکربن‌ها می‌توانند انتقال آب و اکسیژن از طریق فضاهای متخلخل در خاک را مختل کنند و بر نفوذپذیری، رطوبت، pH، قابلیت دسترسی مواد غذایی (نیترات، فسفات و سدیم) و شرایط رداکس تأثیر بگذارند (دواتا و همکاران، ۲۰۱۹).

هیدروکربن‌ها همچنین، می‌توانند گونه‌های میکروبی را حذف یا محدود کنند و عملکرد اکوسیستم مربوطه آن‌ها را تغییر دهند. این ترکیبات ممکن است تنوع میکروارگانیسم‌ها را کاهش داده و باعث ایجاد تغییرات سریع در جمعیت میکروبی شوند (پاندولفو و همکاران، ۲۰۲۳). مطالعات نشان می‌دهد که آلودگی نفتی منجر به افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت شده و باعث اختلال در جامعه میکروبی کلی خاک می‌گردد (شاه و سونی، ۲۰۲۴). حذف یا تغییر گونه‌های میکروبی با نقش‌های کلیدی در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی و تولیدات اولیه نیز می‌تواند بر سطوح بالاتر تغذیه‌ای زنجیره غذایی، به دلیل خاصیت تجمع زیستی تأثیر بگذارد (پاندولفو و همکاران، ۲۰۲۳). علاوه براین، باکتری‌های موجود در خاک مثل باکتری‌های دخیل در فرایند نیتریفیکاسیون، مستعد قرار گرفتن در معرض هیدروکربن‌ها هستند که از طریق اتصال رقابتی با هیدروکربن‌های کم‌وزن، آنزیم آمونیوم مونواکسیژناز مهار شده (لوگشواران و همکاران، ۲۰۱۸) و پیامدهایی برای حاصلخیزی خاک دارد. لی و همکاران، (۲۰۲۰) نشان دادند که وزن کرم خاکی و تولید پیله پس از قرار گرفتن در معرض خاک آلوده به نفت به طور قابل توجهی کاهش یافت. علاوه بر این، خاک آلوده به غلظت های بالای نفت می تواند باعث آسیب به DNA در وزیکول های منی کرم خاکی شود. فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز و پراکسیداز به طور قابل‌توجهی زمانی که کرم‌های خاکی در معرض خاک آلوده به نفت قرار گرفتند، مهار شد، که نشان می‌دهد استرس اکسیداتیو توسط آلاینده‌های نفتی ایجاد می‌شود. گائو و همکاران، (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های بالای نفت (بیش از ۲۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) به‌طور معنی‌داری باعث کاهش تنوع میکروبی خاک، پیچیدگی شبکه میکروبیوم خاک، الگوی همزیستی گونه‌ها و ژن‌های تثبیت کننده نیتروژن و کربن پروکاریوت‌ها شد. در غلظت‌های متوسط نفت (۴۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) ژن‌های تغییردهنده کربن و نیتروژن و تنوع میکروبی تغییری از خود نشان ندادند؛ اما الگوی همزیستی گونه‌ها ارتقاع یافت. این دانشمندان همچنین، بیان کردند غلظت متوسط نفت در خاک، باعث افزایش فراوانی راسته پروتئوباکتری‌ها به میزان ۳/۹۱ تا ۵۷/۰۱ درصد و غلظت متوسط نفت، باعث افزایش فراوانی راسته اکتینوباکتری‌ها به میزان ۰/۲۶ تا ۱/۶۹ درصد شد. هو و همکاران، (۲۰۲۳) نشان دادند که آلودگی هیدروکربن‌های نفتی می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم، واکنش تنشی قوی در کرم‌های خاکی ایجاد کند، که به نوبه خود، به طور قابل‌توجهی بر تبدیل کربن در محل‌های آلودگی نفتی تأثیر می‌گذارد.

آلودگی نفتی در ایران

گزارشات متعددی در خصوص وجود آلاینده‌های نفتی در خاک، رسوبات و منابع آبی ایران وجود دارد (فیضی و همکاران، ۲۰۲۰؛ مقدّم و همکاران، ۲۰۲۱؛ رجاوالیسون و همکاران، ۲۰۲۲). وجود آلودگی نفتی در نقاط مختلف ایران شامل رسوبات خور ماهشهر، خلیج فارس (واعظی و همکاران، ۱۳۹۳)، خاک مزارع سبزیجات شهرستان شوش (خلیلی مقدم و همکاران، ۱۳۹۸)، خاک جایگاه‌های سوخت شهری شهر همدان (پرویزی موسد و همکاران، ۲۰۱۵)، خاک بخش‌های صنعتی کلان‌شهر اهواز (اشجر و همکاران، ۲۰۲۲) و مناطق دیگر کشور به اثبات رسیده است. از دیگر مناطقی که امروزه به شدت تحت تأثیر آلودگی نفتی قرار دارد، خاک تأسیسات گوره گچساران می‌باشد که دارای حدود ۵ هزار تن خاک آلوده به ترکیبات نفتی است (مدیریت HSE شرکت نفت مناطق نفت‌خیز

جنوب). همچنین منطقه پازنان در گچساران نیز یکی از مناطق آلوده است.

آلودگی ناشی از استخراج نفت و گاز، همراه با کاهش سطح آب به دلیل تغییر اقلیم، بسیاری از گونه‌های گیاهی و جانوری را در دریای خزر تهدید می‌کند و آینده دریا را در معرض خطر قرار داده است. طبق گفته نهاد محیط زیست سازمان ملل، دریای خزر از بار آلودگی ناشی از استخراج و تصفیه نفت، میادین نفتی دریایی، پسماندهای رادیواکتیو نیروگاه‌های هسته‌ای و حجم عظیمی از فاضلاب‌های تصفیه نشده و زباله‌های صنعتی که عمدتاً توسط رودخانه ولگا وارد می‌شود، رنج می‌برد (اسماعیل‌اف و علیوا، ۲۰۱۹). با استناد به مطالعه نادری و همکاران (۱۴۰۰)، روسیه و آذربایجان به ترتیب با ورود سالانه ۸۵۸۰۰ تن و ۲۴۰۰۰ تن آلاینده‌های نفتی، در صدر مهم‌ترین تهدیدکنندگان زیست‌محیطی دریای خزر قرار گرفته‌اند. بنابراین لزوم اصلاح زیستی مکان‌های آلوده به ترکیبات نفتی در ایران بیش از پیش احساس می‌شود. کاظمی و همکاران (۲۰۲۴) خاک‌های آلوده به کل هیدروکربن های نفتی (آروماتیک و آلیفاتیک) را در میدان نفتی شهر اهواز شناسایی کردند. نتایج نشان داد که Benzo.b.fluoranthene با میانگین ۵۶۶۷/۷ میکروگرم بر کیلوگرم خاک بیشترین غلظت را در نمونه‌های خاک میدان نفتی اهواز داشت. بالاترین میانگین در نمونه‌های منطقه مرکز روغن پمپ با ۷۳۲۹/۴۸ میکروگرم بر کیلوگرم، در حالی که کمترین آن در نمونه‌های شاهد با ۱۹۱۹/۴ میکروگرم بر کیلوگرم یافت شد. بالاترین سطح اجزای آلیفاتیک نیز در مرکز روغن پمپ با مجموع ۳۶۴۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم یافت شد. نتایج حاصل از تقسیم منبع ترکیبات نفتی در نمونه های خاک نشان داد که فعالیت های نفتی ۵۱٫۵ درصد از PAH های اندازه گیری شده در خاک را تشکیل می دهد. ۳۸/۳ درصد از سایر ترکیبات اندازه گیری شده منشاء انسانی داشتند و تنها ۱۰/۱ درصد از این ترکیبات منشاء زیستی داشتند.

اهمیت زیست‌پالایی ترکیبات نفتی

به طور گسترده‌ای پذیرفته شده است که آلودگی هیدروکربن‌های نفتی در خاک، رسوبات، آب‌های سطحی و آب‌های زیرزمینی تهدید بزرگی برای سلامت انسان است. بنابراین حذف این ترکیبات از محیط‌های مختلف به خصوص خاک، از اهمیت بالایی برخوردار است. برای انجام این کار، در انتخاب رویکرد اصلاحی مناسب برای هر محیط آلوده، باید متغیرهایی مثل ماهیت و ترکیب آلاینده‌ها، غلظت آلودگی، شرایط آب و هوایی محل، شرایط فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی محیط آلوده همراه با وضعیت جامعه میکروبی موجود، در نظر گرفته شود (اوسای و همکاران، ۲۰۲۰). علاوه بر این، مکانیسم‌ها، الزامات نظارتی، هزینه‌ها و محدودیت‌های زمانی نیز در انتخاب روش اصلاح مناسب مهم هستند.

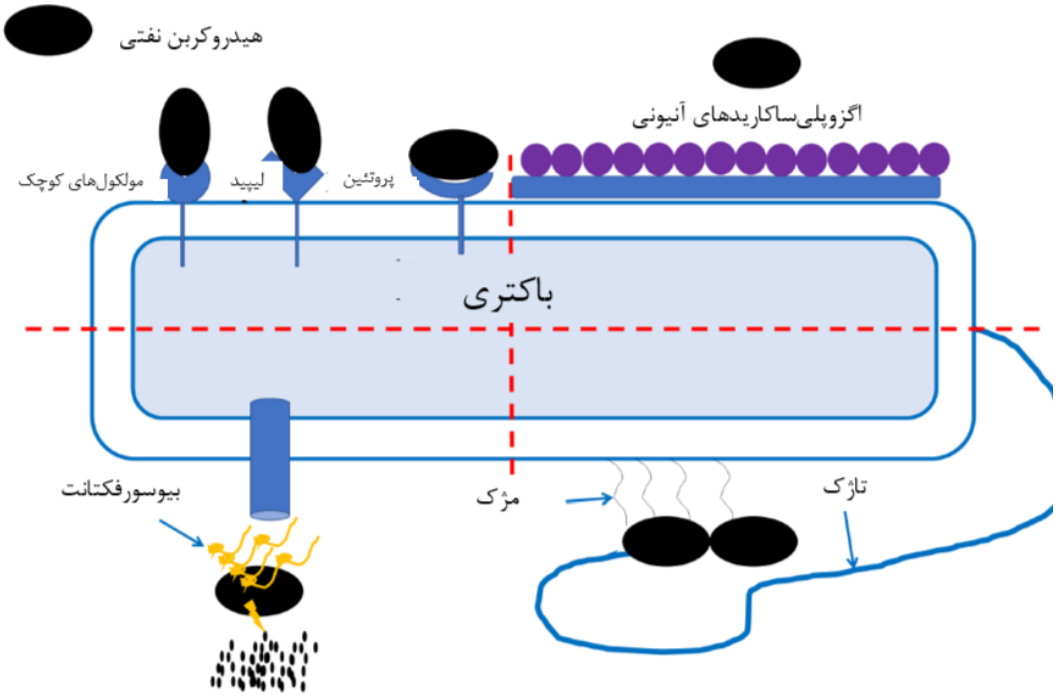
تکنیک‌های مختلف زیست‌پالایی عبارتند از: تحریک زیستی، تلقیح میکروبی، خودپالایی گیاه پالایی، استفاده از بیوراکتور، بیوپایل و کمپوستینگ. تجزیه زیستی نفت خام به معنای تبدیل اجزای پیچیده و مضر آن مانند هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای و آلکان‌های با زنجیره بلند به فرکشن‌های ساده‌تر با استفاده از باکتری‌ها، قارچ‌ها یا جلبک‌های توانمند در تجزیه است. بنابراین، میکروب‌ها به خصوص باکتری‌ها می‌توانند در اصلاح خاک‌های آلوده به نفت بسیار مؤثر باشند (جبار و همکاران، ۲۰۱۹). تا به امروز، بیش از ۷۹ جنس باکتری تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی شناخته شده‌اند (تریپاتی و همکاران، ۲۰۲۴). مهم‌ترین گونه‌های باکتریایی که از خاک‌های آلوده به نفت جداسازی شده‌اند و توانایی تجزیه زیستی نفت آن‌ها به اثبات رسیده است عبارتند از: *Acinetobacter*، *Flavobacterium*، *Bacillus*، *Aeromonas*، *Micrococcus*، *Staphylococcus*، *Vibrio*، *Xanthomonas*، *Pseudomonas*، *Rhodococcus*، *Dietzia* و *Enterobacter* (عبدالامیر علی، ۲۰۱۹).

مکانیسم‌های اصلاح خاک‌های آلوده به نفت

میکروارگانیسم‌های مختلفی توانایی اصلاح خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی را دارند. این موجودات با متابولیزه کردن آلاینده‌های آلی به دی‌اکسید کربن، آب و زیست‌توده غیرسمی، از این مواد به‌عنوان تنها منبع انرژی استفاده می‌کنند (جی و همکاران، ۲۰۱۳؛ مکونن و همکاران، ۲۰۲۴). میکروارگانیسم‌ها می‌توانند ترکیبات هیدروکربنی را با استفاده از پذیرنده‌های الکترون مانند اکسیژن، نیترات، منگنز، آهن و سولفات فعال کرده و در فرآیند تبدیل زیستی[۱۰]، اکسید کنند. فعال‌سازی هیدروکربن‌های نفتی که به‌صورت هوازی تجزیه می‌شوند، توسط آنزیم‌های مختلف انجام می‌شود. افزودن اکسیژن مولکولی به بستر توسط آنزیم‌های اکسیژناز کاتابولیزه می‌شود، در حالی که افزودن دو گروه هیدروکسیل به هیدروکربن‌های نفتی توسط دی‌اکسیژنازها یا مونواکسیژنازها انجام می‌شود (ونتزل و همکاران، ۲۰۰۷). دو مکانیسم اصلی برای تجزیه هیدروکربن‌ها وجود دارد: مسیرهای هوازی و بی‌هوازی. در مکانیسم‌های هوازی، از اکسیژن به‌عنوان پذیرنده الکترون استفاده می‌شود، در حالی که در شرایط بی‌هوازی، سولفات و نیتریت الکترون‌ها را دریافت کرده و فرآیند را تکمیل می‌کنند (مباچو و همکاران، ۲۰۲۰). شایان ذکر است که تجزیه بی‌هوازی سرعت کمتری نسبت به تجزیه هوازی دارد.

همچنین خواص سطحی باکتری برای تجزیه زیستی مؤثر بسترهای هیدروکربنی آبگریز، ضروری است و مکانیسم‌های چسبندگی آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۵). ران و روزنبرگ (۲۰۱۴) دریافتند که چسبیدن آلاینده‌های آبگریز به سلول‌های باکتریایی عمدتاً به مژک‌های آبگریز، فیبریل‌ها، پروتئین‌های غشای بیرونی و لیپیدها و همچنین مولکول‌های کوچک خاصی مانند گرامیسیدین S[۱۱] و پرودیژیوزین[۱۲] که در سطوح سلولی وجود دارند، بستگی دارد. در شکل (۳) جزئیات تماس فیزیکی باکتری‌ها با هیدروکربن‌های نفتی قابل مشاهده می‌باشد. در ادامه، به بررسی مکانیسم‌های اصلاح خاک آلوده به نفت توسط باکتری‌ها پرداخته شده است.

[۱۰] Biotransformation
[۱۱] Gramicidin S
[۱۲] Prodigiosin



- ✓ مژک یا تاژک باکتری به هیدروکربن متصل می‌شود
- ✓ بیوسورفکتانت ترشح شده از باکتری هیدروکربن را امولسیفای می‌کند
- ✓ پروتئین‌ها، لیپیدها و سایر مولکول‌های ریز سطح باکتری، ذرات نفتی را به باکتری می‌چسبانند
- ✓ بعضی از اگزوپلی‌ساکاریدهای آنیونی سطح باکتری، از چسبیدن ذرات نفتی به باکتری جلوگیری می‌کنند

شکل ۳- تماس فیزیکی بین باکتری و هیدروکربن‌های نفتی (ژو و همکاران، ۲۰۱۸)

مسیر تجزیه هوازی n-آلکان‌ها

مسیرهای متابولیک باکتری‌های هوازی که در تبدیل هیدروکربن‌های نفتی دخیل هستند، عمدتاً درون‌سلولی‌اند. تجزیه آلکان‌ها با کمک اکسیژنازها آغاز می‌شود، که اکسیژن را از طریق چهار مسیر مختلف به n-آلکان‌ها متصل می‌کنند. مسیر اکسیداسیون ترمینال[۱۳] شامل اکسیداسیون گروه متیل انتهایی n-آلکان است (پررا و همکاران، ۲۰۲۲). محصولات این اکسیداسیون الکل‌های اولیه هستند که توسط آنزیم‌های الکل و آلدهید دهیدروژناز بیشتر اکسید شده و به اسیدهای چرب تبدیل می‌شوند و سپس تحت فرآیند β-اکسیداسیون[۱۴] قرار می‌گیرند (فوردور و همکاران، ۲۰۱۸). این مسیر اکسیداسیون در باکتری‌های مختلفی از جمله *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 مشاهده شده است (جی و همکاران، ۲۰۱۳).

مسیر دوم اکسیداسیون نیز به اکسیداسیون ترمینال معروف است که در آن انتهای n-آلکان بدون شکستن زنجیره کربنی به اسید چرب مربوطه اکسید می‌شود. محصول این مسیر اکسیداسیون اسید چرب ω-هیدروکسی است که به اسید دی‌کربوکسیلیک تبدیل شده و سپس تحت اکسیداسیون بتا قرار می‌گیرد (وینکلر و گری، ۲۰۱۵).

[۱۳] Terminal oxidation pathway

[۱۴] β-oxidation

مسیر سوم اکسیداسیون، اکسیداسیون ساب‌ترمینال[۱۵] است که در آن، آلکان‌ها در موقعیت ساب‌ترمینال اکسید می‌شوند و الکل‌های اولیه و ثانویه یا متیل استون با همان طول زنجیره به‌عنوان بستر تشکیل می‌شوند (یین و همکاران، ۲۰۲۲). اکسیداسیون ساب‌ترمینال n–آلکان‌ها که پروپان را به الکل‌های ثانویه تجزیه می‌کند، در سویه *Gordonia* sp. 5 مشاهده شده است. الکل ثانویه بیشتر به کتون تبدیل شده و سپس توسط آنزیم Baeyer–Villiger مونواکسیژناز اکسید شده تا یک استر تشکیل دهد. درنهایت، این استر توسط استرازها هیدروکسیله شده و به الکل‌ها و اسیدهای چرب تبدیل می‌شود (جی و همکاران، ۲۰۱۳).

مسیر چهارم اکسیداسیون، مسیر اکسیداسیون-n آلکان‌های زنجیره بلند است که منحصراً در سویه *Acinetobacter* sp. HO1-N دیده شده است در این مسیر، n–آلکان‌ها اکسید می‌شوند تا به n–آلکیل هیدروپراکسید، پراکسی‌اسید، آلکیل آلدهید و اسیدهای چرب تبدیل شود. اولین گام مسیر فینرتی[۱۶]، تشکیل دی‌اکسیژناز است که مسئول اولین مرحله در اکسیداسیون n–آلکان‌ها توسط *Acinetobacter* sp. می‌باشد (مکونن و همکاران، ۲۰۲۴).

مسیر تجزیه بی‌هوازی n–آلکان‌ها

تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که هیدروکربن‌های نفتی، از جمله آلکان‌ها، در غیاب اکسیژن و با استفاده از نیترات، آهن دو ظرفیتی یا سولفات به‌عنوان پذیرنده‌های الکترون، یا تحت شرایط متانوژنیک[۱۷] تجزیه‌پذیر هستند (جی و همکاران، ۲۰۱۳). تجزیه زیستی بی‌هوازی هیدروکربن‌های نفتی در مناطق سرد که سطح اکسیژن محدود است، اهمیت دارد و توجه بیشتری را به خود جلب کرده است؛ زیرا این فرایند به‌عنوان مکانیزم غالب در محیط‌های آلوده و مخازن نفتی شناخته می‌شود (یاپ و همکاران، ۲۰۲۱). چندین سویه باکتریایی بی‌هوازی، از جمله باکتری‌های کاهنده سولفات (موسات، ۲۰۱۵) و باکتری‌های دنیتریفیکاسیون‌کننده (هین و همکاران، ۲۰۲۱)، قادر به تجزیه n–آلکان‌ها با شش کربن یا بیشتر به ترکیبات با سمیت کمتر هستند.

در حال حاضر، دو مکانیزم شناخته شده برای تجزیه بی‌هوازی n–آلکان‌ها وجود دارد: مسیر افزودن فومارات[۱۸] و مسیر کربوکسیلاسیون. مسیر افزودن فومارات در باکتری‌های کاهنده سولفات، باکتری‌های دنیتریفیکاسیون‌کننده و یک کنسرسیوم کاهنده نیترات شناسایی شده است (چالاقان و همکاران، ۲۰۰۶). باکتری‌های کاهنده سولفات *Desulfatibacillum aliphaticivorans* CV2803 و *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01، n–آلکان‌ها را به‌صورت بی‌هوازی از طریق افزودن فومارات به موقعیت C2 آلکان توسط آنزیم آلکیل سوکسینات سنتاز، اکسید می‌کنند و سوکسینات را تشکیل می‌دهند. AK-01 می‌تواند در حضور n–آلکان‌های با طول زنجیره C13–C18، ۱–هگزادسن و ۱–پنتادسن رشد کند. آلکیل سوکسینات از طریق بازآرایی اسکلت کربنی و اکسیداسیون بتا بیشتر تجزیه می‌شود. پس از بازآرایی کربن و دکربوکسیلاسیون، یک اسید چرب متیله شده که دو کربن بیشتر ازn–آلکان اصلی دارد، تشکیل می‌شود (چالاقان و همکاران، ۲۰۰۶). سپس، اسیدهای چرب حاصله به مسیر β–اکسیداسیون وارد می‌شوند.

[۱۵] Subterminal oxidation pathway
[۱۶] Finnerty
[۱۷] Methanogenic
[۱۸] Fumarate

پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه زیست‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی در ایران

نظر به این که ایران کشوری نفت‌خیز است و از صنایع نفتی بزرگ و زیادی برخوردار می‌باشد، درنتیجه آلودگی خاک‌ها به وسیله نفت در مناطق مختلف این کشور پدیده رایجی است.

سیدعلیخانی و همکاران (۱۳۹۰)، در مطالعه‌ای تأثیر پنج تیمار متشکل از جنس‌های مختلف باکتری‌های *Bacillus* و *Pseudomonas*همراه با کشت گیاه جو را بر اصلاح زیستی یک خاک آلوده نفتی مورد بررسی قرار دادند. بعد از ۱۰۵ روز گرماگذاری، نتایج نشان داد تیمار *Bacillus* ۲ همراه با کشت جو بهترین عملکرد را با ۷۲/۵ درصد کاهش هیدروکربن‌های نفتی داشت و این میزان بدون کشت جو، ۵۹/۸ درصد گزارش شد.

یاراحمدی و همکاران (۱۳۹۱) طی پژوهشی چهار سویه باکتریایی *Pseudomonas aeruginosa*، *Acinetobacter johnsonii*، *Chryseobacterium* و *Pseudomonas stutzeri* تجزیه‌کننده نفت را از خاک استان بوشهر جداسازی کردند. کارایی این باکتری‌ها در تجزیه زیستی فنانترن و در غلظت‌های مختلف فسفر آزمایش شد. در نهایت، نتایج نشان داد بهترین سطح فسفر در تجزیه فنانترن غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد و باکتری *P.aeruginosa* هم بهترین عملکرد را در تجزیه فنانترن داشت.

شهریاری و همکاران (۱۳۹۱)، تجزیه زیستی فنانترن به‌عنوان یک ترکیب PAH را در شرایط شور توسط سویه باکتریایی شورپسند *Halobacillus dabanensis* Q-SH1 مطالعه کردند. این سویه از نمونه خاک شور و سدیمی آلوده به پسماندهای نفت خام از منطقه سراجه قم توسط دانشمندان جداسازی گردید. نتایج نشان داد سویه Q-SH1 طی ۱۰ روز موفق به تجزیه ۸۳ درصد فنانترن در محیط کشت با شوری ۱۰ درصد حاوی ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر فنانترن شد. همچنین، نتایج این تحقیق نشان داد سویه مذکور، توانایی تجزیه فنانترن را در محدوده شوری ۰/۵ تا ۲۷ درصد دارد.

در مطالعه‌ای دیگر، بشارتی (۱۳۹۲)، باکتری‌های نفت‌خوار را از ۱۵ نمونه خاک آلوده جداسازی کرد. این پژوهشگر، به این نتیجه رسید که آلودگی باعث کاهش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه می‌گردد و افزایش آلودگی، رابطه مستقیمی با این کاهش دارد. همچنین تلقیح باکتری به خاک، با حذف مواد نفتی باعث بهبود وزن ریشه و اندام هوایی گردید.

در مطالعه ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۲)، نوزده سویه باکتریایی با جنس و گونه‌های *Sphingobacterium* sp. ،*Vibrio* sp. ،*Ralstonia* sp. ،*Stenotrophomonas maltophilia*، *Acinetobacter*، *Achromobacter xylosoxidans*، *Pantoea* sp.، *Paracoccus* sp.، *Pseudomonas aeruginosa*، *Zymomonas* sp.، *Pseudomonas stutzeri*، *Entrobacter cloacae*، *Serattia odorifera*، *Pseudomonas alcaligenes* و *Chryseobacterium* sp. از نمونه خاک‌های آلوده منطقه بوشهر جداسازی و غربالگری شدند. در ادامه، کارایی این سویه‌ها در محیط مایع معدنی همراه با گازوئیل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کدورت سنجی اسپکتروفوتومتر نشان داد باکتری *Chryseobacterium* sp. توانایی رشد بیشتری نسبت به سایر سویه‌ها در حضور گازوئیل داشت.

قویدل و همکاران (۱۳۹۵)، طی سه مرحله آزمایشگاهی جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های بومی نفت‌خوار در محیط کشت اختصاصی عصاره خاک-آگار، مطالعه کارایی جدایه‌ها در محیط کشت پایه معدنی مایع همراه با ۷٪ حجمی نفت‌گاز به‌عنوان منبع هیدروکربنی و مقایسه میزان تنفس سویه‌ها در محیط حاوی ۳٪ وزنی نفت‌گاز موفق به جداسازی دو سویه باکتریایی برتر BJ.1 و BM.1 شدند.

قریشی و همکاران (۲۰۱۷)، باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی را از چهار نمونه خاک (دو نمونه آلوده و یک نمونه غیرآلوده) و یک نمونه نفت سفید جداسازی کردند. آن‌ها از میان جدایه‌ها، هفت سویه را برای

آزمایشات بعدی انتخاب کردند. سپس توانایی این جدایه‌ها در تجزیه نفت سفید در محیط معدنی نمکی مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی نشان داد سویه‌های C2 (*Citrobacter sedlakii*) و C4 (*Entrobacter hormeachei*) طی ۷ روز گرماگذاری، به‌ترتیب قادر به تجزیه ۶۹ و ۴۸ درصد از ۵ درصد نفت سفید محیط کشت بودند.

بیات و همکاران (۱۳۹۷)، در پژوهش خود، باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام را از نمونه آب آلوده و شکم‌پایان خلیج فارس جداسازی کردند. دانشمندان در مجموع، شش کلنی متفاوت را طی فرایند غنی‌سازی جدا کردند که دو سویه از نظر حذف نفت و فعالیت امولسیون‌کنندگی عملکرد بهتری داشتند. فعالیت امولسیون‌کنندگی و میزان تجزیه نفت برای سویه *Vibrio alginolyticus* به ترتیب ۵۸/۴ و ۶۷/۵۸ درصد و برای سویه *Halomonas* sp. به ترتیب ۱۱/۶ و ۵۱/۴۴ درصد بود.

کشاورز و همکاران (۱۳۹۸) در آزمایشی گلخانه-ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اثر تیمارهای زیستی (*Pseudomonas fluorescens*، *Micrococcus yunnanensis*، *Claroideoglomus etunicatum* و *Funneliformis mosseae*) بر پاسخ‌های گیاه وتیور در آلودگی نفت خام (۰، ۲ و ۴ درصد وزنی) مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد افزایش سطح آلودگی نفتی وزن خشک اندام هوایی و ریشه و همچنین درصد کلنیزاسیون ریشه را کاهش داد اما تنفس میکروبی و غلظت کل هیدروکربن‌ها در خاک پس از برداشت را افزایش داد. تلقیح باکتری *Micrococcus yunnanensis* و باکتری *Funneliformis mosseae* موسه وزن خشک اندام هوایی را افزایش داد، همه تیمارهای بیولوژیکی بجز باکتری *Pseudomonas fluorescens* افزایش وزن خشک ریشه را موجب گردیدند. مایه زنی قارچ *Claroideoglomus etunicatum* باعث افزایش معنی‌دار غلظت و جذب آهن، و قارچ *Funneliformis mosseae* باعث افزایش معنی‌دار میانگین غلظت روی و جذب روی و آهن شد. همچنین مایه زنی قارچ باعث افزایش درصد کلنیزاسیون ریشه شدند. از بین ریزجانداران مطالعه شده باکتری *Micrococcus yunnanensis* و قارچ *Funneliformis mosseae* تنفس میکروبی را افزایش دادند که به نوبه خود مقدارکل هیدروکربن‌های باقی مانده در خاک پس از برداشت را کاهش داد.

در پژوهش دیگری سلیمانی و همکاران (۱۳۹۹) توانایی یک کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آسنفتن جداشده از خاک آلوده به مواد نفتی را در ترشح سورفکتانت زیستی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آزمایشات نشان داد دو جدایه AP3 و BM1 علاوه بر توانایی تجزیه آسنفتن، مولد سورفکتانت زیستی بوده و به‌ترتیب ۷۲/۲ و ۵۴ درصد و اجتماع آن‌ها (کنسرسیوم) نیز ۱۰۰ درصد آلاینده را در محیط مایع تجزیه کردند. همچنین میزان تجزیه آسنفتن در خاک توسط جدایه AP3 و کنسرسیوم، به‌ترتیب ۶۴/۷ و ۷۵/۷ درصد بود.

آزادی و شجاعی (۲۰۲۰)، در پژوهشی به غربالگری و طبقه‌بندی گونه‌های اکتینومیست *Nocardia* از اکوسیستم‌های مختلف ایران که توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را داشتند، پرداختند. جدایه‌ها از میان نود نمونه محیطی، غربالگری و شناسایی شدند. این دانشمندان، نوزده جدایه *Nocardia* که متعلق به ده گونه بودند را طی روش‌هایی مثل رشد در حضور آلاینده، کروماتوگرافی و کدورت سنجی، به‌عنوان میکروارگانیسم‌های توانا در امر زیست‌پالایی انتخاب کردند. گونه‌های غالب *Nocardia* عبارت بودند از: *N. farcinica* (چهار جدایه)، *N. cyriacigeorgica* و *N. cashijiensis* (سه جدایه)، *N. asteroides* و *N. kroppenstedtii* (دو جدایه).

در مطالعه دیگری، صابری و حسن‌شاهیان (۱۴۰۰) بیست و چهار سویه تجزیه‌کننده نفت را به روش‌غنی سازی با استفاده از محیط بوشنل هاس حاوی ۰/۵ درصد نفت خام جداسازی کردند. سپس جدایه‌ها

براساس توان ترشح سورفکتانت زیستی، رشد در محیط نفتی و تجزیه زیستی غربالگری شدند. نتایج توالی‌یابی ژن 16S rRNA نشان داد، دو جدایه برتر با *Rhodococcus jostii* strain D3 و *Arthrobacter citreus* strain E3 تشابه دارند. سویه D3، ۴۱ درصد تجزیه در غلظت ۴/۵ درصد نفت و سویه E3 ۷۳/۵ درصد تجزیه در غلظت ۱/۵ درصد نفت ثبت کردند.

در مطالعه‌ای دیگر، ساریخانی و همکاران (۱۴۰۱)، موفق به جداسازی شصت جدایه باکتریایی از خاک آلوده پتروشیمی و پالایشگاه تبریز شدند. سپس از میان این شصت جدایه، کارایی بیست جدایه به روش‌های کیفی و کمی در تجزیه نفت مورد بررسی قرار گرفت. درنهایت ده جدایه که متعلق به جنس و گونه‌های *Stenotrophomonas* sp.، *Achromobacter* sp.، *Psedochrobactrum* sp.، *Pseudomonas* sp.، *Alcaligenes* sp.، *Shewanella* sp.، *Arthrobacter* sp. و *Acinetobacter baumanni* بودند، به‌عنوان برترین باکتری‌ها در زیست‌پالایی نفت خام انتخاب شدند.مرادی و همکاران (۱۴۰۲) اثرات آلودگی نفتی طولانی مدت (آلودگی کم، متوسط و شدید) بر تنفس میکروبی و فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز خاک را مورد بررسی قرار دادند. میانگین درصد نفت اندازه‌گیری شده به روش سوکسله، به ترتیب ۰۳/۴، ۹/۹۵ و ۲۲/۵۰ درصد به ترتیب برای سطوح آلودگی کم، متوسط و شدید بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نفت در نمونه‌های خاک، تنفس پایه و برانگیخته افزایش یافتند و بیشترین تنفس پایه و برانگیخته به ترتیب با مقادیر ۰/۰۵۳ و ۰/۲۴۳ ($mgCO_2.g^{-1}.h^{-1}$) درخاک‌های با آلودگی شدید به دست آمد. شمارش همه باکتری‌ها و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت به ترتیب در محیط کشت‌های NA و CFMM نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین جمعیت میکروبی و غلظت نفت وجود دارد.

زینالی و همکاران (۱۴۰۳)، در پژوهشی به بررسی توانایی سه سویه مولد سورفکتانت زیستی *Dietzia aerolata* PS14B1، *Kocuria salina* PS12B2 و *Mesobacillus harenae* PS9D12 در زیست‌پالایی نفت خام پرداختند. نتایج تلقیح سویه‌ها به محیط معدنی MSM[۱۹] حاوی ۱ درصد نفت خام بعد از ۷ روز گرماگذاری نشان داد، سویه‌های PS14B1، PS12B2 و PS9D12 به‌ترتیب قادر به کاهش TPH محیط به میزان ۲۵/۶۳، ۲۴/۱۱ و ۲۲/۸۳ درصد شدند که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد در سطح ۵ درصد داشت. همچنین این دانشمندان بیان کردند که کنسرسیوم باکتری‌های فوق می‌تواند هدایت هیدرولیکی خاک را به میزان قابل توجهی افزایش دهد.

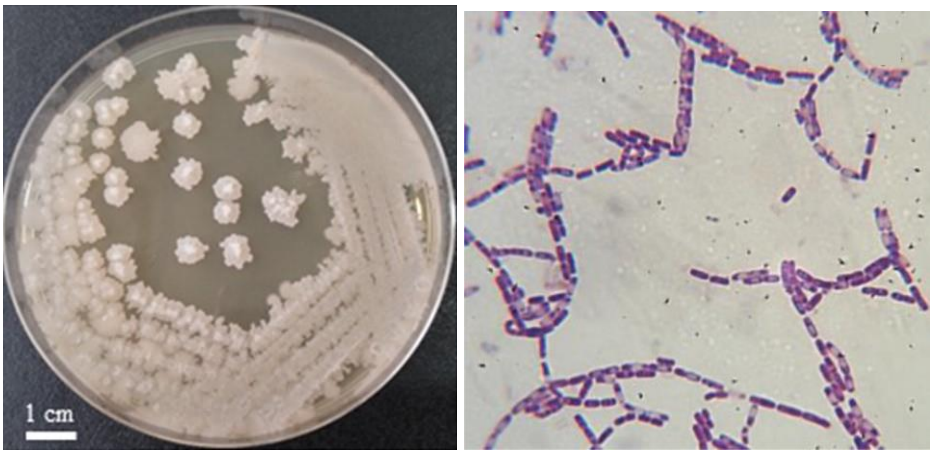
باسیلوس و تنوع زیستی

باتوجه به توانایی *باسیلوس‌ها* در ترشح طیف وسیعی از آنزیم‌ها و سورفکتانت‌های زیستی و توانایی زندگی آن‌ها در اغلب محیط‌ها با شرایط مختلف که برتری خاصی در زمینه تجزیه ترکیبات نفتی به این باکتری می‌دهد، در این مقاله مروری سعی شده است به صورت اختصاصی به بررسی و شناخت توانایی‌های این باکتری در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده نفتی پرداخته شود. جنس *Bacillus*یک باکتری گرم مثبت و میله‌ای شکل است که در محیط‌های هوازی اسپور تولید می‌کند. این جنس متعلق به کلاس *باسیل‌ها* و خانواده *باسیلاسه‌ها* می‌باشد. این باکتری‌ها می‌تواند هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری، متحرک و قادر به تولید سیتوکروم C اکسیداز و کاتالاز باشد (تورنبول و همکاران، ۱۹۹۶). با توجه به تحقیق کومار و

[۱۹] Mineral salts medium

لئون، (۲۰۰۷)، گونه‌های *Bacillus* می‌توانند در محیط حداقل نمکی رشد کنند. این باکتری‌ها معمولاً مزوفیل هستند و دمای مطلوب رشدشان ۳۰ تا ۴۵ درجه سلسیوس است. البته درصد کمی از *باسیلوس*‌ها هم گرمادوست بوده و در دماهای بالا (تا ۶۵ درجه سلسیوس) توانایی رشد دارند. *Bacillus anthracis* که عامل بیماری سیاه‌زخم است، تنها پاتوژن اجباری *باسیلوس* در مهره‌داران است. *Bacillus larvae*، *Bacillus lentimorbus*، *Bacillus popilliae*، *Bacillus sphaericus* و *Bacillus thuringiensis* پاتوژن‌های گروه خاصی از حشرات هستند (تورنبول و همکاران، ۱۹۹۶).

اسپورزایی در *باسیلوس‌ها*، شامل یک تقسیم سلولی نامتقارن و به دنبال آن مشتق شدن به دو نوع سلول اندوسپور و سلول مادر است. پوشش اندوسپور یک پوسته چند لایه است که از ده‌ها پروتئین تشکیل شده و از ژنوم باکتری در شرایط تنش محافظت می‌کند (مک‌کنی و همکاران، ۲۰۱۳). این ویژگی قابلیت خوبی به *باسیلوس‌ها* برای بقاء در شرایط سخت می‌دهد. در شکل (۴) وضعیت گرم و کلنی‌های باکتری *Bacillus subtilis* به عنوان گونه شاخص تجزیه‌کننده نفت از جنس *Bacillus*، قابل مشاهده است.



شکل ۴- تصویر سمت راست وضعیتِ گرم و سمت چپ کلنی‌های باکتری *Bacillus subtilis* روی محیط کشت LB agar (لنینی و همکاران، ۲۰۲۳؛ سهیل و همکاران، ۲۰۲۰)

توانایی *باسیلوس‌ها* در ترشح ترکیبات مختلف

اعضای جنس *Bacillus* اغلب به عنوان کارخانه های میکروبی برای تولید مجموعه وسیعی از مولکول‌های فعال زیستی درنظر گرفته می‌شوند که مصارف بیوتکنولوژیکی گسترده‌ای دارند. برخی از آن‌ها به طور بالقوه مهارکننده رشد قارچ‌ها هستند. گونه‌های *Bacillus* سیستم ترشح خوبی دارند و انواع آنزیم‌های خارج سلولی مورد استفاده در صنایع مواد شوینده، نساجی، غذا و نوشیدنی‌ها را تولید می‌کنند. از جمله آنزیم‌های مهم می توان به آمیلاز[۲۰]، پولولاناز[۲۱]، بتا-گلوکاناز[۲۲]، بتا-گالاکتوزیداز[۲۳]، سلولاز و زایلاناز[۲۴]، کیتیناز[۲۵]، استراز[۲۶] و و لیپاز[۲۷] اشاره کرد (سانسیننا و همکران، ۲۰۱۹).

[۲۰] Amylase
[۲۱] Pullulanase
[۲۲] β-Glucanase
[۲۳] β-Galactosidase
[۲۴] Xylanase
[۲۵] Chitinase
[۲۶] Esterase
[۲۷] Lypase

باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR[۲۸]) با مکانیسم‌های مختلف باعث افزایش رشد گیاهان می‌شوند (نصرت‌آباد و همکاران، ۲۰۱۷؛ فلاح و همکاران، ۱۳۹۳). چندین گونه *Bacillus* به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه شناخته شده‌اند؛ زیرا این باکتری‌ها با پاتوژن‌ها مقابله کرده یا به طریق دیگری باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (نکیسا و همکاران، ۱۳۹۴؛ فلاح نصرت‌آباد و شریعتی، ۱۳۹۴). ترشح آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی و چندین ترکیب دیگر سمی برای پاتوژن‌های گیاهی از چندین سویه *Bacillus* گزارش شده است (یو و همکاران، ۲۰۰۲). بعضی از ترکیبات ضد قارچی تولید شده توسط *باسیلوس‌ها* عبارتند از: مایکوباسیلین[۲۹]، ایتورین، باسیلومایسین[۳۰]، سورفکتین[۳۱]، مایکوسوبتیلین[۳۲]، فانگیستاتین[۳۳] و ساب‌اسپورین[۳۴]. باکتری‌های *B. subtilis* GB03 و *B. amyloliquefaciens* IN937A مولد هورمون‌هایی مثل استوئین و ۳،۲-بوتاندیول[۳۵] هستند که با تنظیم هموستازی اکسین، نقش مهمی در افزایش رشد گیاه دارند. همچنین سویه‌های این جنس قابلیت ترشح هورمون‌های گیاهی مثل ایندول استیک اسید (IAA)، سیتوکینین و جیبرلین را دارند (سیواساکتی و همکاران، ۲۰۱۴). *باسیلوس‌ها* اگزوپلی ساکاریدها و سیدروفورهایی ترشح می‌کنند که حرکت یون‌های سمی را مهار کرده، باعث تأمین آهن مورد نیاز گیاه می‌شوند، به حفظ تعادل یونی کمک می‌کنند و حرکت آب را در بافت‌های گیاهی تقویت می‌کنند (هاشم و همکاران، ۲۰۱۹).

درحال حاضر اثبات شده که *Bacillus* (*B. subtilis, B. cereus, B. thuringiensis, B. pumilus, B. megaterium*) یکی از غالب‌ترین میکروارگانیسم‌های ریزوسفری است که با مکانیسم‌های مختلف باعث افزایش دسترسی عناصر غذایی و رشد گیاه می‌شود (مینا و همکاران، ۲۰۱۶). یکی از این مکانیسم‌های اصلی که مسئول آزادسازی فرم‌های مختلف فسفر به گیاهان در خاک است، تولید اسیدهای آلی (حل شدن ترکیبات فسفات معدنی نامحلول مانند تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، هیدروکسی‌آپاتیت و سنگ فسفات) (اتینو و همکاران، ۲۰۱۶؛ چنگ و همکاران، ۲۰۱۷) و افزایش فعالیت اسید فسفاتازها می‌باشد (معدنی سازی فسفر آلی) (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹). این اسیدهای آلی ترشح شده توسط *باسیلوس‌ها* عبارتند از: گلوکونیک اسید، لاکتیک اسید، استیک اسید، سوکسینیک اسید[۳۶] و پروپیونیک اسید[۳۷].

جنس *Bacillus* به عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های حل کننده فسفات (PSB[۳۸]) شناخته می‌شود (بهرا و همکاران، ۲۰۱۴؛ عبدالله و همکاران، ۲۰۱۸). گزارش شده است که سویه‌های *B. thuringiensis* و *B. subtilis* جدا شده از ریزوسفر گیاه گندم، فعالیت‌های محرک رشد گیاه بالایی، به‌خصوص قابلیت انحلال فسفر قوی از خود نشان داده‌اند (چریف-سیلینی و همکاران، ۲۰۱۶؛ جوزانی و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه‌ای دیگر اثبات شد که سویه *B. megaterium* با افزودن استخوان ماهی، موفق به آزاد سازی ۴۸۳ میلی‌گرم در لیتر فسفر شد (سعید و همکاران، ۲۰۱۸). نکته مهم درمورد فسفر این است که گروه‌های عاملی نفت می‌توانند با فسفر معدنی خاک ترکیب شده و باعث فسفرزدایی[۳۹] شوند که منجر به

[۲۸] Plant growth promoting rhizobacteria
[۲۹] Mycobacillin
[۳۰] Bacillomycin
[۳۱] Surfactin
[۳۲] Mycosubtilin
[۳۳] Fungistatin
[۳۴] Subsporin
[۳۵] 2,3-Butanediol
[۳۶] Succinic acid
[۳۷] Propionic acid
[۳۸] Phosphate solubilizing bacteria
[۳۹] Dephosphorization

کاهش فسفر در دسترس خاک می‌گردد (گینر و همکاران، ۲۰۱۹). بنابراین باتوجه به اینکه کمبود فسفر در دسترس یکی از عوامل محدودکننده در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده نفتی می‌باشد (ورجانی و اوپاسانی، ۲۰۱۷)، استفاده از سویه‌های حل‌کننده فسفر *Bacillus* می‌تواند این مشکل را مرتفع کند (امامی و همکاران، ظا۲۰۲۰).

باسیلوس‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی

باسیلوس‌ها می‌توانند از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی برای رشد و فعالیت در محیط‌های آلوده نفتی استفاده کنند. از این رو، باکتری‌های گرم مثبت به ویژه گونه‌های *Bacillus* در استراتژی‌های زیست‌پالایی و کاربردهای بیوتکنولوژیکی مورد توجه قرار گرفته‌اند. گونه‌های *باسیلوس* گزارش شده در مقالات مختلف که توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را دارند عبارتند از: *Bacillus subtilis*، *Bacillus badius*، *Bacillus lichenformis*، *Bacillus cibi*، *Bacillus megaterium* و *Bacillus stearothermophilus* (علی، ۲۰۱۹؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲؛ گارسیا-آلکانتارا و همکاران، ۲۰۱۶؛ سرکوئرا و همکاران، ۲۰۱۱؛ سورخوه و همکاران، ۱۹۹۳).

تیرومورگان و همکاران، (۲۰۲۳) موفق به تجزیه ۹۰٪ و ۷۶٪ نفت خام به ترتیب با استفاده از دو سویه *Bacillus rugosus* و *Bacillus subtilis* بعد از ۱۵ روز انکوباسیون در محیط MSM[۴۰] حاوی نفت شدند. کریمی و همکاران، (۲۰۲۳) گزارش کردند با استفاده از یک کنسرسیوم میکروبی متشکل از سه سویه باکتریایی که یکی از آن‌ها *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* SH34 بود، موفق به تجزیه نفت خام به میزان ۷۱٪ در حضور فلزات سنگین شده‌اند. در مطالعه جالبی توانایی دو سویه *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus sp.* در تجزیه زیستی BTEX[۴۱] در شرایط کاهشی نیترات و شوری به اثبات رسید (شکیبا و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین ونگ و همکاران، (۲۰۱۹) گزارش کردند که با استفاده از یک سویه *Bacillus subtilis* موفق به تجزیه ۶۵٪ نفت خام طی ۵ روز انکوباسیون در شرایط بهینه (دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۷ و ۱٪ نمک NaCl) شدند. پوربابائی و همکاران، (۲۰۱۹) موفق به جداسازی کشت غنی شده شامل سه سویه *Acidovorax delafieldii* (Q-SH3)، *Bacillus hwajinpoensis* (Q-SH12) و *Bacillus rhizosphaerae* (Q-SH14) از خاک آلوده به نفت خام شدند. نتایج آنالیز HPLC نشان داد کشت غنی شده قادر به تجزیه فنانترن به میزان ۸۷/۶۶٪ در غلظت ۴۰ $mg\ L^{-1}$ طی ۱۰ روز انکوباسیون بود. در جدول (۲) سویه‌های مختلف *باسیلوس* که قادر به تجزیه ترکیبات نفتی هستند، گزارش شده است.

جدول ۲- سویه‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی از جنس *باسیلوس*

سویه	توضیحات	منبع

[۴۰] Mineral salt medium

[۴۱] Benzene, toluene, ethylbenzene, xylene

Bacillus cereus	سویه تجزیه‌کننده نفت خام؛ جداسازی شده از منطقه پالایش نفت نیجریه	چونوکو و همکاران، (۲۰۱۷)
Bacillus cereus CPOU13	قادر به تجزیه ترکیبات PAH	پورنچندر رائو و همکاران، (۲۰۱۵)
Bacillus cereus JMG-01	سویه تجزیه‌کننده آنتراسن با ۹۸٪ تجزیه طی ۲۱ روز گرماگذاری	داس و همکاران، (۲۰۱۷)
Bacillus lichenformis	سویه گرمادوست تجزیه‌کننده نفت خام سنگین	گارسیا–آلکانتارا و همکاران، (۲۰۱۶)
Bacillus sp. Ege B.6.2i	سویه تجزیه‌کننده کریسن و نفتالن و ترشح‌کننده سورفکتانت زیستی	کولسال و همکاران، (۲۰۱۷)
Bacillus subtilis A1	سویه ترشح‌کننده سورفکتانت زیستی و تجزیه‌کننده آلکان‌ها	پارتیبان و همکاران، (۲۰۱۷)
Bacillus subtilis *Bacillus atrophaeus*	سویه‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک در محیط مایع	کیامرثی و همکاران، (۲۰۱۷)
Bacillus marsiflavi	سویه تجزیه‌کننده ترکیبات PAH و محرک رشد گیاه	سعید و همکاران، (۲۰۲۲)
Bacillus rugosus *Bacillus subtilis*	سویه‌های تجزیه‌کننده نفت خام و مولد سورفکتانت زیستی	تیروموروگان و همکاران، (۲۰۲۳)
Bacillus spp.	کاهش میزان هیدروکربن‌های نفتی خاک به میزان ۷۲/۵٪ در طول ۱۰۵ روز انکوباسیون همراه با کشت گیاه جو	سیدعلیخانی و همکاران، (۱۳۹۰)
Bacillus megaterium ZS2.12 *Bacillus subtilis ZS5.210*	توانایی بهتر رشد و تجزیه سویه‌ها در محیط حاوی نفت سفید از نفت خام	خلیلی مقدم و همکاران، (۱۳۹۸)
Bacillus Cereus	سویه تجزیه‌کننده گازوئیل که جداسازی شده از منطقه پالایش نفت تهران	کبریا و همکاران، (۲۰۰۹)
Bacillus hwajinpoensis Q-SH12 *Bacillus rhizosphaerae* Q-SH14	سویه‌های تجزیه‌کننده فنانترن جدا شده از خاک آلوده به نفت خام	پوربابائی و همکاران، (۲۰۱۹)
Bacillus thuringiensis *Bacillus sp.*	سویه‌های تجزیه‌کننده BTEX	شکیبا و همکاران، (۲۰۱۹)
Bacillus subtilis subsp. *inaquosorum* SH34	سویه تجزیه‌کننده نفت خام	کریمی و همکاران، (۲۰۲۳)

ویژگی‌های متمایز کننده *باسیلوس* در تجزیه ترکیبات نفتی

چندین ویژگی از جنس *Bacillus* وجود دارد که در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها به آنها برتری می‌دهد. گونه‌های *Bacillus* دارای مجموعه‌ای از توانایی‌های فیزیولوژیکی هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها زندگی کنند؛ از جمله بسیاری از زیستگاه‌های سخت‌زیست مانند ماسه‌های بیابانی، چشمه‌های آب گرم و خاک‌های قطب شمال. گونه‌های جنس *Bacillus* می‌توانند گرمادوست، سرمادوست، اسیددوست، قلیایی‌دوست، متحمل نمک یا نمک‌دوست باشند و قادر به رشد در مقادیر مختلف pH، دما و غلظت نمک هستند که هر موجودی نمی‌تواند زنده بماند (کایدا و همکاران، ۲۰۱۸). این باکتری در برابر شرایط استرس‌زای محیطی مانند کمبود یا عدم دسترسی به مواد غذایی، خشکی، تابش، H_2O_2 و ضدعفونی کننده‌های شیمیایی بسیار مقاوم است (نیکولسون و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین تولید اندوسپور هم یک ویژگی به خصوص در این باکتری‌ها به حساب می‌آید. اندوسپورها سلول‌های استراحتی هستند که در شرایط استرس‌زا توسط باکتری تولید می‌شوند و می‌توانند به مدت طولانی غیر فعال بمانند. هر گونه *Bacillus* توانایی تولید یک اسپور متفاوت را دارد که در برابر گرما، سرما،

تشعشعات و مواد ضدعفونی کننده مقاومند (مادیگان و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین این جنس توانایی ترشح سورفکتانت‌های زیستی متنوع و آنزیم‌های قدرتمند تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی را دارد و خصوصیات محرک رشد گیاه مثل انحلال فسفات نامحلول هم در این باکتری‌ها دیده شده است.

توانایی ترشح سورفکتانت زیستی *باسیلوس‌ها*

سورفکتانت‌های زیستی به عنوان ترکیبات فعال سطحی با وزن مولکولی کم شناخته می‌شوند که معمولاً توسط باکتری‌ها (تولیدکنندگان اصلی سورفکتانت زیستی)، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شوند. این ترکیبات نمایانگر طیف گسترده‌ای از ساختارهای شیمیایی، از جمله گلیکولیپیدها، لیپوپپتیدها، فسفولیپیدها، اسیدهای چرب یا لیپیدهای خنثی هستند (گودینا و همکاران، ۲۰۱۳؛ گیز و همکاران، ۲۰۱۴). گونه‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Rhodococcus* و *Candida* به‌عنوان گسترده‌ترین تولیدکنندگان انواع سورفکتانت‌های زیستی تحت شرایط رشد مختلف به‌عنوان بسترهای غیرقابل اختلاط با آب شناخته می‌شوند (دروش و همکاران، ۲۰۲۱).

سورفکتانت‌های زیستی می‌توانند از طریق مکانیسم‌های انحلال، امولسیون‌سازی[۴۲] و متحرک کردن، برای بهبود فرآیندهای زیست‌پالایی مورد استفاده قرار بگیرند. از آنجایی که حلالیت پایین، یکی از فاکتورهای محدودکننده تجزیه نفت است، سورفکتانت میکروبی باعث افزایش حلالیت ترکیبات آلی آبگریز مانند نفت شده و به دنبال آن کارایی فرایند تجزیه زیستی را افزایش می‌دهد (دروش و همکاران، ۲۰۲۱). گونه‌های *Bacillus* طیف گسترده‌ای از سورفکتانت‌های زیستی لیپوپپتیدی را تولید می‌کنند که مولکول‌های حلقوی متشکل از یک اسید چرب با طول متغیر (نیمه آبگریز) متصل به یک زنجیره پپتیدی کوتاه (نیمه آبدوست) از هفت یا ده آمینو اسید هستند. در میان آن‌ها، سورفکتین[۴۳]، یک لیپو هپتاپپتید[۴۴] تولید شده توسط سویه‌های *Bacillus subtilis* است که یکی از موثرترین سورفکتانت‌های زیستی شناخته شده تا کنون می‌باشد. سورفکتین می‌تواند کشش سطحی و کشش بین سطحی مخلوط آب و آب/n–هگزادکان را به ترتیب از ۷۲ تا ۲۷ میلی‌نیوتن بر متر و ۴۳ تا ۱ میلی‌نیوتن بر متر کاهش دهد (سانتوس و همکاران، ۲۰۱۶).

باسیلوس، با توجه به تولید صنعتی سورفکتانت-های زیستی مورد توجه قرار گرفته است. *Bacillus licheniformis* و *Bacillus subtilis* متابولیت‌های فعال سطحی تولید می‌کنند. ال–وهیبی و همکاران، (۲۰۱۴) گزارش کردند که سورفکتانت زیستی استخراج شده از سویه *Bacillus subtilis* B30، از نوع مخلوطی از لیپوپپتیدها می‌باشد که شبیه به سورفکتین است. همچنین این دانشمندان بیان کردند که سویه فوق توانایی ترشح سورفکتانت زیستی خالص به وزن ۰/۳ تا ۰/۵ گرم بر لیتر را دارد و سورفکتانت زیستی تولید شده در محدوده‌های گسترده pH، شوری و دما پایدار است. کلوندی و همکاران، (۲۰۲۲a) موفق به طراحی محیط کشتی برای بهینه‌سازی تولید سورفکتانت زیستی لیپوپپتیدی توسط سویه *Bacillus sp.* SHA302 شدند. در مطالعه‌ای دیگر، کلامی و پوربابائی، (۲۰۲۱) موفق به جداسازی سه سویه ترشح‌کننده سورفکتانت زیستی *Bacillus altitudinis* SH42، *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* SH34 و *Bacillus paralicheniformis* F84 از خاک آلوده میدان نفتی اهواز شدند.

[۴۲] Emulsification
[۴۳] Surfactin
[۴۴] Lypo heptapeptide

شایمردنووا و همکاران، (۲۰۲۴) توانایی شش سویه باکتری با جنس و گونه *Bacillus subtilis*، *Bacillus safensis*، *Bacillus paralicheniformis* و *Bacillus licheniformis* را در ترشح سورفکتانت زیستی به اثبات رساندند. محققان بیان کردند سویه‌های فوق، قادر به کاهش کشش سطحی مایع به کمتر از ۴۰ میلی‌نیوتن بر متر شدند. توانایی کاهش کشش سطحی به دلیل جذب سورفکتانت-های زیستی در فازهای مختلف است که منجر به تعامل و اختلاط بیشتر فازهای غیرمشابه می‌شود. این اختلاط باعث افزایش زیست‌فراهمی هیدروکربن‌های نفتی شده و پاکسازی زیستی را از نظر سرعت و قوت بهبود می‌بخشد (اوزویگوی و همکاران، ۲۰۱۵).

کاربرد دیگر سورفکتانت‌های زیستی در افزایش بازیابی نفت می‌باشد. این ترکیبات می‌توانند خواص فیزیکوشیمیایی نفت باقیمانده در مخزن و مخازن را بهبود بخشند، عمر تولید چاه‌های نفت را افزایش و هزینه‌ها را کاهش دهند (ژیائو و همکاران، ۲۰۱۳). وو و همکاران، (۲۰۲۲) موفق به جداسازی یک سویه باکتریایی ترشح کننده سورفکتانت زیستی شدند. آن‌ها بیان کردند سورفکتانت تولید شده از این جدایه (*Bacillus subtilis*) از نوع لیپوپپتیدی (سورفکتین) بوده و این سویه می‌تواند ۱۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر از این سورفکتانت را با منبع کربنی ساکارز در طول ۷۲ ساعت تولید کند. همچنین نویسندگان به این نتیجه رسیدند که سورفکتانت زیستی تولید شده، خاصیت امولسیون‌سازی بسیار خوبی با نفت خام، نفت سفید، اکتان و هگزادکان دارد که کمک زیادی به فرایند پاکسازی زیستی مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی می‌کند. بنابراین، از آنجایی که سورفکتانت‌های زیستی زیست‌تخریب‌پذیر بوده و سمیت کمی برای محیط دارند، می‌توان با تولید سورفکتانت‌های زیستی قدرتمند و پایدار *باسیلوس* با استفاده از منابع کربنی ارزان‌قیمت، گامی مؤثر در پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی برداشت.

ترشح آنزیم‌های دخیل در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها توسط *باسیلوس*

آنزیم‌های زیست‌تخریب‌پذیر، نقش عمده‌ای در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها دارند (یانگ و ژانگ، ۲۰۱۰). یک مکانیسم مهم برای حذف آلکان‌ها، اکسیژن‌رسانی به گروه متیل انتهایی است. میکروب‌های تجزیه‌کننده آلکان، دارای ژن‌های متعددی برای تولید آلکان هیدروکسیلازها[۴۵] هستند که برای تجزیه طیف گسترده ای از آلکان‌ها بسیار مناسب می‌باشند (ون بیلن و همکاران، ۲۰۰۲). همچنین PAHها به عنوان ترکیبات با وزن مولکولی بالا، به وسیله لاکاز[۴۶] سمیت‌زدایی می‌شوند (بهانداری و همکاران، ۲۰۲۱). برای مؤثر واقع شدن فرایند زیست‌پالایی، میکروارگانیسم‌ها باید به وسیله آنزیم‌ها به آلاینده‌ها حمله کرده و آن‌ها را به مولکول‌های بی‌خطر تبدیل کنند. تجزیه زیستی شامل تصفیه آلاینده‌های نفتی با استفاده از میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده این ترکیبات است که دارای انواع زیادی از آنزیم‌ها مانند لیپاز، آلکان مونواکسیژناز[۴۷]، پروتئاز[۴۸]، هیدرولاز[۴۹]، استراز، الکل دهیدروژناز[۵۰] و سیتوکروم P450s هستند (بهانداری و همکاران، ۲۰۲۱؛ آرناسیولا و همکاران، ۲۰۲۲a). آنزیم‌های تولید شده توسط میکروب‌ها به ویژه توسط گونه‌های *باسیلوس*، منابع اصلی آنزیم‌های لیپولیتیک هستند. جنس *Bacillus* آنزیم‌های پروتئولیتیک خنثی و قلیایی را با خواص قابل‌توجهی مانند پایداری بالا در طیف وسیعی از

[۴۵] Alkane hydroxylase
[۴۶] Lacase
[۴۷] Alkane monooxygenase
[۴۸] Protease
[۴۹] Hydrolase
[۵۰] Alcohol dehydrogenase

pHها و دماها و بازده بالا تولید می‌کند که وزن مولکولی آن‌ها بین ۲۷ تا ۷۱ کیلو دالتون است (اورتیز و سانسینا، ۲۰۲۲). ثابت شده است که این آنزیم‌ها هزینه تولید نسبتاً پایینی دارند، پایدار هستند و مستلزم فناوری ساده‌ای در تجزیه آلاینده‌ها در زمان کوتاه می‌باشند (آرناسیولا و همکاران، ۲۰۲۲b؛ مائوتی و همکاران، ۲۰۱۶).

پارتیپان و همکاران، (۲۰۱۷) موفق به جداسازی سویه *Bacillus subtilis* A1 شدند که توانایی ترشح سورفکتانت زیستی و تجزیه ترکیبات نفتی را داشت. این دانشمندان بیان کردند سویه A1 در زمان تجزیه هیدروکربن‌ها، قادر به تولید آنزیم‌های آلکان هیدروکسیلاز و الکل دهیدروژناز بود. همچنین این سویه ۸۷٪ نفت خام را در ۷ روز تجزیه کرد.

آنزیم لیپاز یکی از قدرتمندترین آنزیم‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها می‌باشد که جنس *Bacillus* به خوبی قادر به تولید آن است. لیپاز، لیپیدها را که شامل چربی و روغن است، به گلیسرول و اسیدهای چرب تجزیه می‌کند (روتمن و همکاران، ۲۰۰۲). ترشح آنزیم لیپاز توسط یک سویه *Bacillus subtilis* با استفاده از روش محیط نوترینت آگار غنی شده با توئین ۸۰، به اثبات رسید (ابوبکر و همکاران، ۲۰۲۴). دانشمندان به این نتیجه رسیدند که بیشترین فعالیت لیپاز ترشح شده از این باکتری در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و pH ۸ می‌باشد. همچنین آن‌ها بیان کردند که این آنزیم ۸/۱۱٪ نفت خام را طی ۲۸ روز در محیط حداقل نمکی (MSM) تجزیه کرده است. *باسیلوس‌ها* قادر به ترشح آنزیم‌های دیگری مثل دهیدروژناز و کتکول ۳،۲–دی‌اکسیژناز[۵۱] هستند که نقش مهمی در تجزیه ترکیبات نفتی دارند. یان و همکاران، (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای، موفق به جداسازی هفت سویه *Bacillus* از خاک حاوی آلودگی قدیمی نفتی شدند. در این مطالعه فعالیت سه آنزیم لیپاز، دهیدروژناز و کتکول ۳،۲–دی‌اکسیژناز که در تجزیه نفت دخیل هستند مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد سویه‌های X3، X4 و X1 به ترتیب بیشترین فعالیت آنزیمی لیپاز، کتکول ۳،۲–دی‌اکسیژناز و دهیدروژناز را دارند.

مونواکسیژناز P450 استخراج شده از *B. megaterium* BM3 می‌تواند بسترهای متنوعی مانند ترکیبات حلقه‌ای و اسیدهای چرب را تجزیه کند (روکاتانو، ۲۰۱۵). باکتری مقاوم در برابر حرارت *B. licheniformis* M2-7، دارای ژن‌های *pobA* و *fabHB* بود که به ترتیب ۴–هیدروکسی بنزوات ۳–مونواکسیژناز[۵۲] و کتوآسیل–ACP سنتاز III[۵۳] را کد می‌کردند و تجزیه بیولوژیکی بنزو(a)پیرن را تسهیل می‌کرد (روجاس–آپاریسیو و همکاران، ۲۰۱۸).

دی‌اکسیژنازها طیف وسیعی از ویژگی‌های سوبسترا دارند و واکنش‌های مختلفی را کاتالیز می‌کنند (گیبسون و پارالز ۲۰۰۰). این آنزیم با افزودن دو مولکول اکسیژن به حلقه آروماتیک، باعث تخریب آن می‌شود. بر اساس یافته‌های اخیر، سویه‌های *Bacillus* پتانسیل قابل توجهی برای تولید طیف وسیعی از دی‌اکسیژنازها دارند. در مطالعه‌ای سویه *Bacillus* جدا شده از مخازن نفتی، فعالیت های کاتکول ۲،۱–دی‌اکسیژناز[۵۴] و کاتکول ۳،۲–دی اکسیژناز را نشان داد. این دو آنزیم، دی‌اکسیژنازهای غیرهِم[۵۵] هستند و در برش حلقه‌ای از آروماتیک‌ها دخیل هستند (دا کونها و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین کاتکول ۲،۱–دی‌اکسیژناز تولید شده توسط *B. pumilus* MVSV3، واسطه تخریب بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن (BTEX) است (سورندرا و همکاران، ۲۰۱۷).

[۵۱] Catechol 2,3-dioxygenase
[۵۲] 4-Hydroxybenzoate 3-Monooxygenase
[۵۳] Ketoacyl-ACP synthase III
[۵۴] Catechol 1,2-Dioxygenase
[۵۵] Nonheme

هیدروکسیلازها، شکستن بسیاری از پیوندهای شیمیایی مانند پیوندهای پپتیدی، استرها، پیوندهای کربن–هالید و غیره را تسهیل می کنند (کاریگار و رائو، ۲۰۱۱) و یکی از آنزیم‌های حیاتی در تجزیه نفت و سوخت‌ها می‌باشند (ون بیلن و فانهاف، ۲۰۰۷). گروه هیدروکسیلاز شامل انواع مختلفی از آنزیم‌ها مثل کربوکسی‌استراز[۵۶]، لیپاز، فسفوتری استراز[۵۷]، سلولاز و هالوآلکان دهالوژناز[۵۸] هستند (شارما و همکاران، ۲۰۱۸). *Bacillus* دارای طیف وسیعی از فعالیت هیدروکسیلاز است. به عنوان مثال، *Bacillus* spp. PS1 و PS11 دارای فعالیت فنل هیدروکسیلاز[۵۹] هستند و گزارش شده است که در تجزیه نفتالین، بنزن، تولوئن و فنل کارآمد است (دوکیچ و همکاران ۲۰۱۱). پارتیپان و همکاران، (۲۰۱۷) گزارش کردند *B. subtilis* A1 با حدود ۹۷ درصد راندمان تخریب به سمت هیدروکربن‌های با وزن مولکولی بالا، تخریب کامل هیدروکربن‌های با وزن مولکولی کم و بالا را تسهیل می‌کند، که این امر توسط فعالیت آلکان هیدروکسیلاز همراه با سورفکتانت‌های زیستی و الکل دهیدروژناز تسهیل می‌شود.

تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در خاک توسط *باسیلوس*

Bacillus یکی از جنس‌های مهم تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی در خاک به شمار می‌آید (گیونتا و همکاران، ۲۰۱۹؛ گوپتا و همکاران، ۲۰۱۹). برای افزودن این باکتری به خاک، ابتدا باید کشت تازه در محیط مایع تا رسیدن به جمعیت مناسب انجام شده (مایه تلقیح) و سپس به خاک تلقیح شود (النگا–ویلسون و همکاران، ۲۰۲۱).
تأثیر مثبت استفاده از سویه‌های *Bacillus* در پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs) به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ای ماندری و همکاران، (۲۰۲۱) کارایی دو نمونه از اجتماع سویه‌های *Bacillus* را در زیست‌پالایی یک خاک آلوده به ترکیبات PAH مورد بررسی قرار دادند. بعد از ۱۱ هفته انکوباسیون، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که کنسرسیوم ۲ (متشکل از سویه‌های *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis*) عملکرد بهتری نسبت به کنسرسیوم ۱ (متشکل از سویه‌های *Bacillus velezensis* و *Bacillus subtilis*) داشت و موفق به تجزیه کامل (۱۰۰٪) نفتالن، فنانترن و پیرن در خاک آلوده شد.

در مطالعه دیگری، توانایی یک کنسرسیوم میکروبی متشکل از چهار سویه *Bacillus* M28، M29، ST70 و ST55 مولد سورفکتانت زیستی در کاهش TPH یک خاک آلوده به ۱۹۵ گرم بر کیلوگرم TPH (۱۹٪/۵) مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد کنسرسیوم *Bacillus* بعد از ۱۵ روز انکوباسیون، موفق به کاهش میزان TPH خاک از ۱۹۵ به ۱۱۲ گرم بر کیلوگرم (تجزیه ۴۲٪/۵۶) شده است (النگا–ویلسون و همکاران، ۲۰۲۱).

در پژوهش یان و همکاران، (۲۰۱۳)، دانشمندان موفق به جداسازی هفت سویه *Bacillus* از خاک حاوی آلودگی قدیمی نفتی شدند. آن‌ها توانایی این سویه‌ها را در تجزیه نفت خام در محیط مایع و خاک در مدت ۲۸ روز انکوباسیون بررسی کردند. نتایج نشان داد سویه X6 با تجزیه ۵۴/۴٪ و ۵۱٪ نفت خام به ترتیب در محیط‌های مایع و خاک، بهترین عملکرد را داشت.

ستار و همکاران، (۲۰۲۲) اثر یک کنسرسیوم میکروبی متشکل از سویه‌های *Bacillus pumilus* (KY010576)، *Exiguobacteriaum aurantiacum* (KY010578)، *Lysinibacillus fusiformis* (KY010586) و *Pseudomonas putida*

[۵۶] Carboxylesterases
[۵۷] Phosphotriesterases
[۵۸] Haloalkane dehalogenases
[۵۹] Phenol hydroxylase

(KX580766) را در کاهش TPH یک خاک آلوده مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که استفاده از کنسرسیوم فوق به تنهایی و بدون افزودن ماده دیگری می‌تواند ۷۰٪ TPH خاک را در مدت ۲۰ روز انکوباسیون تجزیه کند. همچنین آن‌ها بیان کردند که همبستگی مثبتی بین تجزیه TPH و افزایش ۱۰۰ برابری جمعیت تجزیه‌کننده خاک وجود دارد.

مطالعه‌ای در زمینه بررسی کارایی تثبیت یک سویه *Bacillus* (*Bacillus* C5) بر روی حامل‌های سدیم آلژینات و اکسید گرافن در پاکسازی زیستی یک خاک آلوده به ۰/۸٪ نفت خام توسط لیو و همکاران، (۲۰۲۳) انجام شد. نتایج نشان داد ترکیب فوق به طور معنی‌داری باعث کاهش نفت خام در خاک شد و بعد از ۳۰ روز ۶۴/۹۲٪ نفت خاک تجزیه شد که ۲/۱ مرتبه بیشتر از کارایی تجزیه *Bacillus* C5 به تنهایی بود.

اصلاح زیستی خاک‌های آلوده به نفت در ایران با رویکرد بهره‌گیری از *باسیلوس*

در ایران، مطالعات زیادی در زمینه جداسازی و زیست‌پالایی نفت به وسیله *Bacillus* و جنس‌های مختلف میکروبی انجام شده است (جدول ۳). کلوندی و همکاران، (۲۰۲۲b) تأثیر سورفکتانت زیستی لیپوپپتیدی استخراج شده از جدایه SHA302 را در تخلیه TPH یک نمونه خاک آلوده منطقه جنوب ایران مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که این جدایه موفق به تخلیه ۴۲/۴٪ TPH خاک آلوده شده است. همچنین نتایج توالی یابی ژن 16S rRNA نشان داد سویه SHA302 قرابت ۹۳/۹۸ درصدی با باکتری *Bacillus pumilus* سویه ATCC 7061 دارد. شوندی و همکاران، (۱۳۹۷) دینامیک گونه‌های *Bacillus* را طی تجزیه گازوئیل در خاک مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که با افزودن گازوئیل به خاک به عنوان منبع کربن، تنوع و جمعیت گونه‌های *Bacillus* افزایش می‌یابد و این باکتری نقشی اساسی در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی دارد. همچنین این دانشمندان بیان کردند که در میکروکاسم[۶۰]های غنی شده با ۲٪ و ۴٪ گازوئیل، به ترتیب ۵۰٪ و ۴۴/۴۴٪ این ماده طی مدت ۶ ماه تجزیه شد.

مطالعه‌ای در زمینه توانایی کاهش آسنفتن[۶۱] (هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای) توسط سویه *Bacillus velezensis* CR-502(T) به تنهایی و در حضور *Pseudomonas putida* ATCC 12633 در خاک انجام شد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۸). محققان به این نتیجه رسیدند که سویه *Bacillus velezensis* CR-502(T) و کنسرسیوم حاصل از دو سویه، به ترتیب ۶۴/۷٪ و ۷۵/۷٪ آسنفتن را در خاک تجزیه کردند. همچنین این دانشمندان بیان کردند که در تجزیه آسنفتن، سورفکتانت زیستی حاصل از سویه *Bacillus*، مؤثرتر از سورفکتانت زیستی حاصل از سویه *سودوموناس* عمل کرد.

در مطالعه‌ای دیگر رسولی و همکاران، (۱۳۹۷)، به شناسایی باکتری‌های بومی جدا شده از خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی منطقه پتروشیمی ماهشهر و پتانسیل این باکتری‌ها در حذف TPH از خاک پرداختند. آن‌ها با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و توالی یابی به این نتیجه رسیدند که دو گونه باکتری *Bacillus nakamurai* و *Peseudomons aeruginosa* در شش ایستگاه متفاوت، با درصد شباهت بیش از ۹۵٪ غالب هستند. همچنین این دانشمندان بیان کردند که سویه *Bacillus nakamurai* قادر به تجزیه ۳۳/۰۵٪ TPH خاک بود.

[۶۰] Microcosm

[۶۱] Acenaphthene

هاشمی و همکاران (۲۰۲۴) تجزیه زیستی فنانترن (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در خاک سدیمی شور بسیار آهکی را با استفاده از کنسرسیوم باکتریایی هالوفیل مصنوعی (*Halobacillus* sp. strain Q-SH1, *Acidovorax* sp. strain Q-SH3, *Bacillus* sp. (strain Q-SH12, and *Bacillus* sp. strain Q-SH14 مورد بررسی قرار دادند. تنفس، فعالیت دهیدروژناز و جمعیت میکروبی در این کنسرسیوم بالاترین فعالیت را نشان داد. علاوه بر این، نتایج کروماتوگرافی گازی (GC) نشان داد که این کنسرسیوم هالوفیل مصنوعی قادر به حذف سریع بیش از ۹۰ درصد فنانترن (۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) از خاک شدیداً متاثر از شوری همراه با محتوای آهک بالا در عرض ۱۵ روز بود.

جدول ۳- مطالعات انجام شده در ایران در زمینه زیست‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی به وسیله *باسیلوس*

سویه	محل جداسازی	ماتریکس زیست‌پالایی	آلاینده و مقدار آن	میزان تجزیه (٪)	منبع
کنسرسیوم باکتری‌های *Bacillus megaterium*، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas putida*	-	خاک	۳۸٪ نفت خام	۳۴	دوستکی و همکاران، (۱۳۹۲)
کنسرسیوم A (*Acinetobacter radioresistence*، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa*)	خاک آلوده	خاک کشاورزی (بیوراکتور S-SBR)	۱٪ n- هگزادکان ۱٪ n-دودکان	۱۷/۶۱ n- هگزادکان ۲۸/۵۵ n- دودکان	نوذری و همکاران، (۲۰۱۸)
کنسرسیوم B (*Bacillus sp.*، *Ochrobactrum oryzae*، *Sphingomonas yanoikuyae*)	کمپوست			۱۳/۲۲ n- هگزادکان ۱۹/۲۴ n- دودکان	
اجتماع جدایه‌های تجزیه‌کننده TPH	خاک الوده و گل حفاری	خاک (بیوراکتور)	۳٪ TPH	۹۰/۵۰	علوی و همکاران، (۲۰۱۴)
Bacillus cereus	خاک آلوده به BTEX	خاک	۲٪ سوخت دیزل	۵۸/۵	وراوی‌پور و سلطانی، (۲۰۱۳)
Pseudomonas putida و *Bacillus pumilus*	خاک آلوده به نفت	خاک	۳٪/۵ نفت خام	۷۷/۳	شیرزادیان‌گیلان و همکاران، (۲۰۲۳)

تلقیح *باسیلوس* به خاک

تلقیح *Bacillus* به خاک برای اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، یکی از روش‌های کارآمد و پایدار برای بهبود کیفیت خاک و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی است. این روش شامل استفاده از میکروارگانیسم‌های مؤثر در تجزیه و تخریب هیدروکربن‌ها به منظور پاکسازی خاک‌های آلوده می‌باشد. در ادامه، مراحل و نحوه تلقیح *Bacillus* به خاک، برای اصلاح آلودگی‌های نفتی توضیح داده شده است. مراحل تلقیح *Bacillus* به خاک به ترتیب عبارتند از: ۱- انتخاب و تهیه سویه‌های مناسب باکتری *Bacillus* ۲- کشت انبوه میکروبی ۳- آماده‌سازی خاک ۴- تلقیح میکروبی ۵- تهویه و آبیاری خاک ۶- مانیتورینگ و ارزیابی (داس و موخرج، ۲۰۰۷؛ لیو و همکاران، ۲۰۱۶؛ کایدا و همکاران، ۲۰۱۸؛ ماسیکا و همکاران، ۲۰۲۰).

در ابتدا باید سویه‌های مناسب *Bacillus* مانند *subtilis* و *B. licheniformis* که از محیط‌های طبیعی آلوده یا کلکسیون‌های میکروبی معتبر جدا و خالص‌سازی شده‌اند و توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را دارند، انتخاب شوند. می‌توان از این سویه‌ها بصورت تکی یا کنسرسیومی (ترکیبی از دو یا چند سویه) استفاده کرد. در مرحله بعد

سویه‌های منتخب باید در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شده و به تعداد کافی تکثیر شوند. برای زیست‌پالایی در ابعاد بزرگتر، می‌توان از فرمانتور برای کشت انبوه استفاده کرد. این کار معمولاً در محیط‌های کشت مایع مانند لوریا برتانی (LB[۶۲]) یا نوترینت براث (NB[۶۳]) انجام می‌گیرید. بعد از رسیدن به جمعیت مناسب، سلول‌های میکروبی با استفاده از سانتریفوژ جدا و به صورت سوسپانسیون در آب یا محلول‌های مناسب نگهداری می‌شوند. مرحله سوم آماده سازی، خاک است که در این مرحله خاک آلوده به نفت، به خوبی مخلوط شده و در صورت لزوم به کُپه‌های کوچکتر تقسیم می‌شود تا تلقیح میکروبی به طور یکنواخت صورت گیرد. سپس سوسپانسیون *Bacillus* به صورت اسپری یا تزریق مستقیم، به خاک آلوده اضافه می‌شود. میزان تلقیح میکروبی به مقدار آلودگی و حجم خاک بستگی دارد و معمولاً به ازای هر گرم خاک، تعداد مشخصی از سلول‌های میکروبی تلقیح می‌شوند. بعد از تلقیح، برای افزایش فعالیت میکروبی و تجزیه مؤثر هیدروکربن‌ها، خاک به طور منظم تهویه و آبیاری می‌شود. تهویه به تأمین اکسیژن لازم برای فعالیت میکروبی کمک می‌کند و آبیاری مناسب نیز از خشک شدن خاک و کاهش فعالیت میکروبی جلوگیری می‌کند. درنهایت خاک تلقیح شده باید به طور منظم مورد پایش قرار بگیرد تا میزان تجزیه هیدروکربن‌ها و کاهش آلودگی سنجیده شود. این کار با استفاده از تکنیک‌های کروماتوگرافی گازی[۶۴] یا طیف‌سنجی جرمی انجام می‌شود. همچنین تغییرات در جمعیت میکروبی و ویژگی‌های خاک نیز باید ارزیابی شوند.

نتیجه گیری و چشم اندازهای آینده

Bacillus یک باکتری گرم مثبت، اسپورزا، میله ای شکل و هوازی است که می‌تواند در شرایط سخت و استرس‌زای محیطی مثل گرمای بیش از حد، سرمای بیش از حد، تشعشعات، خشکی و عدم دسترسی به مواد غذایی زنده بماند. این ویژگی‌ها باعث شده است که این باکتری در هر مکانی یافت شود. بعضی از گونه‌های *Bacillus* می‌توانند از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کرده و این ترکیبات را تجزیه کنند. گونه‌های مختلف این باکتری مانند *Bacillus polymyxa*، *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus badius* و *Bacillus lichenformis* به عنوان گونه‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی گزارش شده‌اند. این باکتری قادر به ترشح آنزیم‌های قدرتمندی مانند لیپاز، دهیدروژناز، هیدروکسیلاز و مونواکسیژناز در تجزیه نفت است. همچنین بعضی از سویه‌های *Bacillus* مولد سورفکتانت-های زیستی مختلفی هستند که باعث افزایش کارایی فرایند اصلاح زیستی مکان‌های آلوده به نفت می‌شود و برخی از این سویه‌ها قابلیت افزایش رشد گیاه از طریق مقابله با عوامل بیماری‌زا، انحلال فسفات نامحلول و... را دارند.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده مکانیسم‌های دخیل در تجزیه انواع اجزاء هیدروکربن‌ها و گونه‌های مختلف *Bacillus* به صورت جزء به جزء مورد بررسی قرار گیرد. نهایتاً می‌توان از این باکتری توانمند در پروژه‌های زیست‌پالایی محل‌های آلوده مثل خاک، آب و رسوبات برای دستیابی به محیط زیستی پایدار و عاری از آلودگی استفاده کرد.

[۶۲] Luria-Bertani broth
[۶۳] Nutrient broth
[۶۴] Gass-chromatography

فهرست منابع

[۱] ابراهیمی، م.، فلاح، ع.، ساریخانی, م. ۱۳۹۲. جداسازی و شناسایی برخی از باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های آلوده به مواد نفتی و بررسی توان رشد آن‌ها در حضور گازوئیل. دانش آب و خاک، ۲۳(۱): ۱۰۹-۱۲۱.

[۲] بشارتی، ح. ۱۳۹۲. پالایش میکروبی خاک‌های آلوده به مواد نفتی و بررسی نقش رایزوسفر در کارایی ریز جانداران. پژوهش¬های خاک، ۲۸(۳): ۵۷۳-۵۸۴.

[۳] بیات، ز.، حسن ش. م.، عسکری، م. ۱۳۹۷. جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام از شکم پا Haustrum scobina جمع آوری شده از خلیج فارس (ناحیه ساحلی بندرعباس)، زیست شناسی میکروبی، ۱۷(۵): ۷۲-۶۱.

[۴] خلیلی مقدم، ب.، سرخه، ز.، اسداغی، ا.، معتمدی، ح. ۱۳۹۸. تجزیه زیستی نفت سفید توسط باکتری‌های بومی جداسازی شده از خاک مزارع سبزیجات آلوده به ترکیبات نفت سفید استان خوزستان، تحقیقات آب و خاک ایران، ۵۰(۷): ۱۷۴۷-۱۷۵۷.

[۵] دوستکی، م.، ابراهیمی، س.، موحدی ن.س.، علمائی، م. ۱۳۹۲. بهینه‌سازی شرایط تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی به‌وسیله میکرواورگانیسم‌های بومی و غیربومی. مجله پژوهش‌های حفاظت آب و خاک، ۲۰(۴): ۱۶۵-۱۸۱.

[۶] رسولی، ث.، کاشفی ا.، مرتضی، م. ر.، امتیازجو، م.، زعیم دار، م. ۱۳۹۹. شناسایی باکتری‌های بومی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در منطقه ویژه اقتصادی پتروشیمی ماهشهر. علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۲۲(۳ (پیاپی ۹۴)): ۲۸۶-۲۷۷.

[۷] زینالی، ک.، شریعتی، ش.، پوربابائی، ا.، شرفا، م. ۱۴۰۳. کاربرد کنسرسیوم باکتریایی مولد بیوسورفکتانت و تجزیه کننده نفت در افزایش ضریب آبگذری خاک آلوده به TPH. تحقیقات آب و خاک ایران (چاپ آنلاین).

[۸] ساریخانی، م.، افشارنیا، م.، زارعی، م. ۱۴۰۱. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از خاک‌های آلوده نفتی پالایشگاه و پتروشیمی تبریز و شناسایی باکتری‌های کارآمد. دانش آب و خاک، ۳۲(۴): ۹۱-۱۰۴.

[۹] سلیمانی، س.، لکزیان، ا.، فتوت، ا.، رمضانپور، م. ۱۳۹۹. بررسی تولید بیوسورفاکتانت توسط کنسرسیوم باکتریایی جدا شده از خاک آلوده به مواد نفتی. زیست شناسی خاک، ۸(۱): ۵۵-۷۱.

[۱۰] سیدعلیخانی، س.، شرفا، م.، اصغرزاده، ا. ۱۳۹۰. کارآیی باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس در زیست پالایی یک خاک آلوده به هیدروکربن ها. دانش آب و خاک (دانش کشاورزی)، ۲۱(۳): ۱۰۱-۹۱.

[۱۱] شهریاری، م.، ثواقبی فیروزآبادی، غ.، پوربابایی، ا. ۱۳۹۱. توانایی تجزیه زیستی فنانترن توسط سویه باکتریایی شور دوست جداسازی شده از خاک شور و سدیمی آلوده به پسماند نفت خام منطقه سراجه قم. تحقیقات آب و خاک ایران (علوم کشاورزی ایران): ۴۳(۴)، ۳۲۵-۳۳۳.

[۱۲] شوندی، م.، زمانیان، ن.، حدادی، ا. ۱۳۹۷. مطالعه دینامیک گونه‌های باسیلوس طی حذف آلودگی‌های نفتی با روش PCR-DGGE. زیست شناسی میکروارگانیسم ها، ۷(۲۶): ۶۳-۵۱.

[۱۳] صابری، ط.، حسن شاهیان، م. ۱۴۰۰. جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام از مکان‌های آلوده به مواد نفتی در مسجدسلیمان. زیست شناسی میکروبی، ۱۰(۳۸): ۱-۱۵.

[۱۴] فلاح نصرت آباد، ع.، شریعتی، ش. ۱۳۹۴. بررسی تاثیر باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس در عملکرد گندم و جذب عناصر غذایی و مقایسه آن با کود شیمیایی و آلی. آب و خاک، ۲۸(۵): ۹۸۶-۹۷۶.

[۱۵] فلاح، ع.، مومنی، س.، شریعتی، ش. ۱۳۹۳. تاثیر کود زیستی و نیتروژن بر عملکرد و اجزاء عملکرد گندم در شرایط گلخانه‌ای. مهندسی زراعی، ۳۷(۲): ۸۶-۷۳.

[۱۶] قویدل، ا.، ناجی راد، س.، و علیخانی، ح. ۱۳۹۵. جداسازی و مطالعه باکتری‌های بومی خاک‌های آلوده جنوب پالایشگاه تهران جهت زیست پالایی آلودگی‌های نفتی. دانش آب و خاک، ۲۶(۳): ۱۷۵-۱۸۵.

[۱۷] کشاورز، س.، قاسمی فسائی، ر.، رونقی، ع.، زارعی، م. ۱۳۹۸. اثر برخی ریز جانداران در کاهش آلودگی یک خاک آهکی آلوده به نفت خام. زیست شناسی خاک، ۷ (۱): ۳۹-۲۹.

[۱۸] مرادی، ش.، ساریخانی، م.، بهشتی آل آقا، ع.، ریحانی‌تبار، ع.، علوی‌کیا، س.س.، شریفی، ر. ۱۴۰۲. اثرات

آلودگی نفتی طولانی مدت بر تنفس میکروبی و فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز خاک. زیست شناسی خاک، ۱۱ (۲):۲۳۰-۲۱۳.

[۱۹] نادری، ا.، محمدی، پ.، چوبکار، ن.، حسینی، س.ا. ۱۴۰۰. ارزیابی آلودگی نفتی و اولویت بندی راهبرد حفاظت محیط زیست دریای خزر بر اساس مدلSWOT . علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۲۳(۶ (پیاپی ۱۰۹)): ۱۷۳-۱۶۱.

[۲۰] نکیسا، ن.، بشارتی، ح.، دورودیان، ح. ۱۳۹۴. اثر باکتری باسیلوس سوبتلیس و مقادیر کودشیمیایی سوپرفسفات تریپل بر عملکرد و اجزای عملکرد دو رقم برنج (علی کاظمی و هاشمی). پژوهش های خاک، ۲۹(۳): ۲۵۹-۲۶۸.

[۲۱] یاراحمدی، ز.، بشارتی، ح.، فلاح‌نصرت‌آباد، ع.، ساریخانی، م. ۱۳۹۱. تأثیر غلظت فسفر بر باکتری های تجزیه کننده مواد نفتی جداسازی شده از خاک های استان بوشهر در حضور فنانترن. مجله مدیریت خاک و تولید پایدار، ۲(۲): ۱۶۵-۱۷۲.

[۲۲] Abdallah, D.B., Frikha-Gargouri, O. and Tounsi, S., 2018. Rizhospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain 32a. Biological Control, 124, 61-67.

[۲۳] Abdul-Ameer Ali, W., 2019. Biodegradation and phytotoxicity of crude oil hydrocarbons in an agricultural soil. Chilean journal of agricultural research, 79(2), 266-277.

[۲۴] Abubakar, A., Abioye, O.P., Aransiola, S.A., Maddela, N.R. and Prasad, R., 2024. Crude oil biodegradation potential of lipase produced by Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa isolated from hydrocarbon contaminated soil. Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 6, 26-32.

[۲۵] Adipah, S. (2019). Introduction of petroleum hydrocarbons contaminants and its human effects. Journal of Environmental Science and Public Health, 3(1), 1-9.

[۲۶] Ahmed, A.T., Othman, M.A., Sarwade, V.D. and Kachru, G.R., 2012. Degradation of anthracene by alkaliphilic bacteria Bacillus badius. 1(2), 2-9.

[۲۷] Ahmed, F. and Fakhruddin, A.N.M., 2018. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources, 11(3), 1-7.

[۲۸] Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A. and Shibulal, B., 2014. Biosurfactant production by Bacillus subtilis B30 and its application in enhancing oil recovery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 114, 324-333.

[۲۹] Ambaye, T.G., Chebbi, A., Formicola, F., Prasad, S., Gomez, F.H., Franzetti, A. and Vaccari, M., 2022. Remediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons and its reuse for agriculture: Recent progress, challenges, and perspectives. Chemosphere, 293, p.133572.

[۳۰] Aransiola, S.A., Afolabi, F., Joseph, F. and Maddela, N.R., 2022a. Soil Enzymes: Distribution, Interactions, and Influencing Factors. In Agricultural Biocatalysis (303-333). Jenny Stanford Publishing.

[۳۱] Aransiola, S.A., Joseph, F., Oyedele, O.J. and Maddela, N.R., 2022b. Ecological Interplays in Microbial Enzymology: An Introduction. In Ecological Interplays in Microbial Enzymology (3-18). Singapore: Springer Nature Singapore.

[۳۲] Ashjar, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Soltani, N., Hooda, P.S. and Mahmoudi, M.R., 2022. TPH and PAHs in an oil-rich metropolis in SW Iran: Implication for source apportionment and human health. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 28(1), 58-78.

[۳۳] Azadi, D. and Shojaei, H., 2020. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenol and sodium sulfate by Nocardia species isolated and characterized from Iranian ecosystems. Scientific reports, 10(1), 21860.

[۳۴] Azubuike, C.C., Chikere, C.B. and Okpokwasili, G.C., 2016. Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32, 1-18.

[۳۵] Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K. and Thatoi, H.N., 2014. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(2), 97-110.

[۳۶] Bhandari, S., Poudel, D.K., Marahatha, R., Dawadi, S., Khadayat, K., Phuyal, S., Shrestha, S., Gaire, S., Basnet, K., Khadka, U. and Parajuli, N., 2021. Microbial enzymes used in bioremediation. Journal of Chemistry, 1, 8849512.

[۳۷] Callaghan, A. V., Gieg, L. M., Kropp, K. G., Suflita, J. M., & Young, L. Y., 2006. Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. Applied and Environmental Microbiology, 72(6), 4274-4282.

[۳۸] Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M.H., Camargo, F.A., Maria do Carmo, R.P. and Bento, F.M., 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. Bioresource technology, 102(23), 11003-11010.

[۳۹] Chang, K.S., Lo, W.H., Lin, W.M., Wen, J.X., Yang, S.C., Huang, C.J. and Hsieh, H.Y., 2016. Microwave-assisted thermal remediation of diesel contaminated soil. Engineering Journal, 20(4), 93-100.

[۴۰] Cheng, J., Zhuang, W., Li, N.N., Tang, C.L. and Ying, H.J., 2017. Efficient biosynthesis of d-ribose using a novel co-feeding strategy in Bacillus subtilis without acid formation. Letters in Applied Microbiology, 64(1), 73-78.

[۴۱] Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I. and Boudabous, A., 2016. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of Bacillus isolated from the wheat rhizosphere. Annals of Microbiology, 66, 1087-1097.

[۴۲] Chonoko, UG., Abdullahi, IO., Ado, SA., Whong, CMZ., 2017. Hydrocarbon degradation by autochthonous species of Bacillus cereus and Pseudomonas aeruginosa Isolated from Kaduna Refinery Effluents. Cont J Biol, 10(2), 10–26.

[۴۳] Da Cunha, C.D., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Seldin, L. and Von Der Weid, I., 2006. Oil biodegradation by Bacillus strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. Applied microbiology and biotechnology, 73, 949-959.

[۴۴] Dadrasnia, A., Shahsavari, N. and Emenike, C.U., 2013. Remediation of contaminated sites. Hydrocarbon, p.65.

[۴۵] Darwesh, O.M., Mahmoud, M.S., Barakat, K.M., Abuellil, A. and Ahmad, M.S., 2021. Improving the bioremediation technology of contaminated wastewater using biosurfactants produced by novel bacillus isolates. Heliyon, 7(12).

[۴۶] Das, K. and Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource technology, 98(7), 1339-1345.

[۴۷] Das, M., Bhattacharya, A., Banu, S. and Kotoky, J., 2017. Enhanced biodegradation of anthracene by Bacillus cereus strain JMG-01 isolated from hydrocarbon contaminated soils. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 26(5), 510-525.

[۴۸] Das, S., Raj, R., Mangwani, N., Dash, H.R. and Chakraborty, J., 2014. Heavy metals and hydrocarbons: adverse effects and mechanism of toxicity. Microbial biodegradation and bioremediation, 23-54.

[۴۹] Đokić, L., Narančić, T., Nikodinović-Runić, J., Bajkić, S. and Vasiljević, B., 2011. Four Bacillus sp. soil isolates capable of degrading phenol, toluene, biphenyl, naphthalene and other aromatic compounds exhibit different aromatic catabolic potentials. Archives of Biological Sciences, 63(4), 1057-1067.

[۵۰] Elenga-Wilson, P.S., Kayath, C.A., Mokemiabeka, N.S., Nzaou, S.A.E., Nguimbi, E. and Ahombo, G., 2021. Profiling of indigenous biosurfactant-producing bacillus isolates in the bioremediation of soil contaminated by petroleum products and olive oil. International Journal of Microbiology, 1, 9565930.

[۵۱] Emami, S., Alikhani, H.A., Pourbabaee, A.A., Etesami, H., Motasharezadeh, B. and Sarmadian, F.,

2020. Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. Rhizosphere, 14, 100196.

[۵۲] Faridy, N., Torabi, E., Pourbabaee, A. A., Osdaghi, E., & Talebi, K. (202

[۵۳] Efficacy of novel bacterial consortia (۴). in degrading fipronil and thiobencarb in paddy soil: a survey for community structure and metabolic pathways. Frontiers in Microbiology, 15, 1366951.

[۵۴] Feyzi, H., Chorom, M. and Bagheri, G., 2020. Urease activity and microbial biomass of carbon in hydrocarbon contaminated soils. A case study of cheshmeh-khosh oil field, Iran. Ecotoxicology and environmental safety, 199, 110664.

[۵۵] Fitriatin, B.N., Yuniarti, A., Turmuktini, T. and Ruswandi, F.K., 2014. The effect of phosphate solubilizing microbe producing growth regulators on soil phosphate, growth and yield of maize and fertilizer efficiency on Ultisol. Eurasian Journal of Soil Science, 3(2), 101-107.

[۵۶] Fordwour, O. B., Luka, G., Hoorfar, M., & Wolthers, K. R. (2018). Kinetic characterization of acetone monooxygenase from Gordonia sp. strain TY-5. AMB Express, 8, 1-13.

[۵۷] Gainer, A., Bresee, K., Hogan, N. and 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.

[۵۸] Gao, H., Wu, M., Liu, H., Xu, Y., & Liu, Z. (2022). Effect of petroleum hydrocarbon pollution levels on the soil microecosystem and ecological function. Environmental Pollution, 293, 118511.

[۵۹] García-Alcántara, J.A., Maqueda-Gálvez, A.P., Téllez-Jurado, A., Hernández-Martínez, R. and Lizardi-Jiménez, M.A., 2016. Maya crude-oil degradation by a Bacillus licheniformis consortium isolated from a Mexican thermal source using a bubble column bioreactor. Water, Air, & Soil Pollution, 227, 1-6.

[۶۰] Geys, R., Soetaert, W. and Van Bogaert, I., 2014. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. Current opinion in biotechnology, 30, 66-72.

[۶۱] Ghoreishi, G., Alemzadeh, A., Mojarrad, M., & Djavaheri, M. (2017). Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. Sustainable Environment Research, 27(4), 195-202.

[۶۲] Giunta, M., Lo Bosco, D., Leonardi, G. and Scopelliti, F., 2019. Estimation of gas and dust emissions in construction sites of a motorway project. Sustainability, 11(24), 7218.

[۶۳] Gudiña, E.J., Fernandes, E.C., Rodrigues, A.I., Teixeira, J.A. and Rodrigues, L.R., 2015. Biosurfactant production by Bacillus subtilis using corn steep liquor as culture medium. Frontiers in microbiology, 6, 126037.

[۶۴] Gudiña, E.J., Rangarajan, V., Sen, R. and Rodrigues, L.R., 2013. Potential therapeutic applications of biosurfactants. Trends in pharmacological sciences, 34(12), 667-675.

[۶۵] Gupta, G., Kumar, V. and Pal, A.K., 2019. Microbial degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons with emphasis on pyrene. Polycyclic Aromatic Compounds, 39(2), 124-138.

[۶۶] Harwood, C.R., Mouillon, J.M., Pohl, S. and Arnau, J., 2018. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the Bacillus subtilis group. FEMS microbiology reviews, 42(6), 721-738.

[۶۷] Hashem, A., Tabassum, B. and Abd_Allah, E.F., 2019. Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi journal of biological sciences, 26(6), 1291-1297.

[۶۸] Hashemi, N., Pourbabaee, A. A., Shariati, S. and Yadzanfar, N., 2024. Rapid phenanthrene biodegradation in highly calcareous saline sodic soil using an

artificial halophile bacterial consortium. International Journal of Environmental Science and Technology, 1-12.

[۶۹] Heyen, S., Scholz-Böttcher, B.M., Rabus, R. and Wilkes, H., 2021. Release of carboxylic acids into the exometabolome during anaerobic growth of a denitrifying bacterium with single substrates or crude oil. Organic Geochemistry, 154, 104179.

[۷۰] Hou, Z., Mo, F. and Zhou, Q., 2023. Elucidating response mechanisms at the metabolic scale of Eisenia fetida in typical oil pollution sites: A native driver in influencing carbon flow. Environmental Pollution, 337, 122545.

[۷۱] Ismailov, N.M. and Alieva, S.R., 2019. Potential role of groundwater in pollution of coastal water of the Caspian sea by organic pollutants. Arid ecosystems, 9, 202-208.

[۷۲] Jabbar, N.M., Mohammed, A.K., Jabber, S.M. and Kadhim, E.H., 2019, July. The use of Mixed Bacterial Culture to improve the Biodegradation of Diesel Pollution. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 579, No. 1, 012011). IOP Publishing.

[۷۳] Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., & Bartlam, M. (2013). Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. Frontiers in microbiology, 4, 58.

[۷۴] Jouzani, G.S., Valijanian, E. and Sharafi, R., 2017. Bacillus thuringiensis: a successful insecticide with new environmental features and tidings. Applied microbiology and biotechnology, 101, 2691-2711.

[۷۵] Kaida, N., Habib, S., Yasid, N.A. and Shukor, M.Y., 2018. Biodegradation of Petroleum hydrocarbons by Bacillus spp.: a review. Bioremediation Science and Technology Research, 6(2), 14-21.

[۷۶] Kalami, R. and Pourbabaee, A.A., 2021. Investigating the potential of bioremediation in aged oil-polluted hypersaline soils in the south oilfields of Iran. Environmental Monitoring and Assessment, 193, 1-20.

[۷۷] Kalvandi, S., Garousin, H., Pourbabaee, A.A. and Alikhani, H.A., 2022a. Formulation of a culture medium to optimize the production of lipopeptide biosurfactant by a new isolate of Bacillus sp.: a soil heavy metal mitigation approach. Frontiers in Microbiology, 13, 785985.

[۷۸] Kalvandi, S., Garousin, H., Pourbabaee, A.A. and Farahbakhsh, M., 2022b. The release of petroleum hydrocarbons from a saline-sodic soil by the new biosurfactant-producing strain of Bacillus sp. Scientific Reports, 12(1), 19770.

[۷۹] Karigar, C.S. and Rao, S.S., 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. Enzyme research, 2011(1), 805187.

[۸۰] Karimi, S., Shariati, S., Pourbabaei, A.A., Alikhani, H.A. and Kalami, R., 2023. Determining sensitivity to heavy metals in surfactant-producing bacteria and their efficiency in removing Total petroleum hydrocarbons. Iranian Journal of Soil and Water Research, 54(10), 1565-1579.

[۸۱] Kaspar, F., Neubauer, P. and Gimpel, M., 2019. Bioactive secondary metabolites from Bacillus subtilis: a comprehensive review. Journal of natural products, 82(7), 2038-2053.

[۸۲] Kazemi, A., Parvaresh, H., Ghanatghestani, M. D. and Ghasemi, S., 2024. A study on source identification of contaminated soil with total petroleum hydrocarbons (aromatic and aliphatic) in the Ahvaz oil field. Environmental Monitoring and Assessment, 196 (9), 1-16.

[۸۳] Kebria, D.Y., Khodadadi, A., Ganjidoust, H., Badkoubi, A. and Amoozegar, M.A., 2009. Isolation and characterization of a novel native Bacillus strain capable of degrading diesel fuel. International Journal of Environmental Science & Technology, 6, 435-442.

[۸۴] Kiamarsi, Z., Soleimani, M., Nezami, A. and Kafi, M., 2019. Biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons using novel indigenous bacteria isolated from contaminated soils. International journal of environmental science and technology, 16(11), 6805-6816.

[۸۵] Kim, J.S. and Crowley, D.E., 2007. Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar Pits. Applied and

environmental microbiology, 73(14), 4579-4591.

[۸۶] Khalid, S. A., & Elsherif, W. M., 2022. Types of microorganisms for biodegradation. In Handbook of biodegradable materials. Cham: Springer International Publishing.1-27.

[۸۷] Kolsal, F., Akbal, Z., Liaqat, F., Gök, O., Sponza, D.T. and Eltem, R., 2017. Hydrocarbon degradation abilities of psychrotolerant Bacillus strains. AIMS microbiology, 3(3), 467.

[۸۸] Kumar, M., León, V., De Sisto Materano, A. and Ilzins, O.A., 2007. A halotolerant and thermotolerant Bacillus sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(2), 211-220.

[۸۹] Leñini, C., Rodriguez Ayala, F., Goñi, A. J., Rateni, L., Nakamura, A., & Grau, R. R. (2023). Probiotic properties of Bacillus subtilis DG101 isolated from the traditional Japanese fermented food nattō. Frontiers in Microbiology, 14, 1253480.

[۹۰] Li, Y., Wang, X. and Sun, Z. 2020. Ecotoxicological effects of petroleum-contaminated soil on the earthworm Eisenia fetida. Journal of hazardous materials, 393, 122384.

[۹۱] Liu, B., Liu, J., Ju, M., Li, X. and Yu, Q., 2016. Purification and characterization of biosurfactant produced by Bacillus licheniformis Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. Marine pollution bulletin, 107(1), 46-51.

[۹۲] Liu, Q., Chen, H., Su, Y., Sun, S., Zhao, C., Zhang, X., Gu, Y. and Li, L., 2023. Enhanced crude oil degradation by remodeling of crude oil-contaminated soil microbial community structure using sodium alginate/graphene oxide/Bacillus C5 immobilized pellets. Environmental Research, 223, 115465.

[۹۳] Madigan, M.T., Clark, D.P., Stahl, D. and Martinko, J.M., 2010. Brock biology of microorganisms 13th edition. Benjamin Cummings.

[۹۴] Mandree, P., Masika, W., Naicker, J., Moonsamy, G., Ramchuran, S. and Lalloo, R., 2021. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from industry contaminated soil using indigenous bacillus spp. Processes, 9(9), 1606.

[۹۵] Mansur, A.A., Adetutu, E.M., Makadia, T., Morrison, P.D. and Ball, A.S., 2015. Assessment of the hydrocarbon degrading abilities of three bioaugmentation agents for the bioremediation of crude oil tank bottom sludge contaminated Libyan soil. Int J Environ Bioremed Biodegrad, 3(1), 1-9.

[۹۶] Masika, W.S., Moonsamy, G., Mandree, P., Ramchuran, S., Lalloo, R. and Kudanga, T., 2020. Biodegradation of petroleum hydrocarbon waste using consortia of Bacillus sp. Bioremediation Journal, 25(1), 72-79.

[۹۷] Mauti, G.O., Onguso, J., Kowanga, D.K. and Mauti, E.M., 2016. Biodegradation activity of Aspergillus niger lipase isolates from a tropical country garage. Journal of Scientific and Innovative Research, 5(1), 15-18.

[۹۸] Mbachu, A. E., Chukwura, E. I., & Mbachu, N. A., 2020. Role of microorganisms in the degradation of organic pollutants: a review. Energy Environ Eng, 7(1), 1-11.

[۹۹] McKenney, P.T., Driks, A. and Eichenberger, P., 2013. The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat. Nature Reviews Microbiology, 11(1), 33-44.

[۱۰۰] Meena, V.S., Maurya, B.R., Meena, S.K., Meena, R.K., Kumar, A., Verma, J.P. and Singh, N.P., 2016. Can Bacillus species enhance nutrient availability in agricultural soils?. Bacilli and agrobiotechnology, 367-395.

[۱۰۱] Mekonnen, B. A., Aragaw, T. A., and Genet, M. B., 2024. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements. Frontiers in Environmental Science, 12, 1354422.

[۱۰۲] Michael-Igolima, U., Abbey, S.J. and Ifelebuegu, A.O., 2022. A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils. Environmental Advances, 9, 100319.

[۱۰۳] Moghaddam, A.H., Hashemi, S.H. and Ghadiri, A., 2021. Aliphatic hydrocarbons in urban runoff sediments: A case study from the megacity of Tehran, Iran. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 19(1), 205.

[۱۰۴] Mohsin, M.Z., Omer, R., Huang, J., Mohsin, A., Guo, M., Qian, J. and Zhuang, Y., 2021. Advances in engineered Bacillus subtilis biofilms and spores, and their applications in bioremediation, biocatalysis, and biomaterials. Synthetic and systems biotechnology, 6(3), 180-191.

[۱۰۵] Musat, F., 2015. The anaerobic degradation of gaseous, nonmethane alkanes—From in situ processes to microorganisms. Computational and structural biotechnology journal, 13, 222-228.

[۱۰۶] Nardini, E., Kisand, V. and Lettieri, T., 2010. Microbial biodiversity and molecular approach. JCR Scientific and Technical Reports. Luxembourg: Office for Official Publications of European Communities.

[۱۰۷] Nasrollahi, M., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., and Talebi, K., 2020. Diazinon degradation by bacterial endophytes in rice plant (Oryzia sativa L.): a possible reason for reducing the efficiency of diazinon in the control of the rice stem–borer. Chemosphere, 246, 125759.

[۱۰۸] Nicholson, S.E., Yin, X. and Ba, M.B., 2000. On the feasibility of using a lake water balance model to infer rainfall: an example from Lake Victoria. Hydrological Sciences Journal, 45(1), 75-95.

[۱۰۹] Nosratabad, A.R.F., Etesami, H. and Shariati, S., 2017. Integrated use of organic fertilizer and bacterial inoculant improves phosphorus use efficiency in wheat (Triticum aestivum L.) fertilized with triple superphosphate. Rhizosphere, 3, 109-111.

[۱۱۰] Nozari, M., Samaei, M.R., Dehghani, M. and Ebrahimi, A.A., 2018. Bioremediation of alkane hydrocarbons using bacterial consortium from soil. Health Scope, 7(3), 1-8.

[۱۱۱] Ortiz, A. and Sansinenea, E., 2022. The Industrially important enzymes from bacillus species. In Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting (89-99). Cham: Springer International Publishing.

[۱۱۲] Ossai, I.C., Ahmed, A., Hassan, A. and Hamid, F.S., 2020. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. Environmental Technology & Innovation, 17, 100526.

[۱۱۳] Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J. and Dowling, D.N., 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. Frontiers in microbiology, 6, 745.

[۱۱۴] Pandolfo, E., Barra Caracciolo, A., & Rolando, L. (2023). Recent advances in bacterial degradation of hydrocarbons. Water, 15(2), 375.

[۱۱۵] Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K., Murugan, K., & Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium Bacillus subtilis A1. Frontiers in microbiology, 8, 193.

[۱۱۶] Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L.L., Rahman, P.K., Murugan, K. and Rajasekar, A., 2017. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium Bacillus subtilis A1. Frontiers in microbiology, 8, 237675.

[۱۱۷] Parvizimosaed, H., sobhan, A.S., Merrikhpour, H., Farmany, A., Cheraghi, M. and Ashorlo, S., 2015. The effect of urban fuel stations on soil contamination with petroleum hydrocarbons. Iranian Journal of Toxicology, 9 (30), 1378-1384.

[۱۱۸] Pavel, L.V. and Gavrilescu, M., 2008. Overview of ex situ decontamination techniques for soil cleanup. Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ), 7(6).

[۱۱۹] Perelo, L.W., 2010. In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. Journal of hazardous materials, 177(1-3), 81-89.

[۱۲۰] Perera, M., Wijesundera, S., Wijayarathna, C. D., Seneviratne, G., & Jayasena, S. (2022). Identification of long-chain alkane-degrading (LadA) monooxygenases in Aspergillus flavus via

in silico analysis. Frontiers in Microbiology, 13, 898456.

[۱۲۱] Poornachander Rao, M., Rajithasri, A.B., Sagar, K. and Satyaprasad, K., 2015. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading PGPR from a oil products contaminated site in Hyderabad, Telangana State, India. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 6, B305-B317.

[۱۲۲] Pourbabaee, A.A., Shahriari, M.H. and Garousin, H., 2019. Biodegradation of phenanthrene as a model hydrocarbon: Power display of a super-hydrophobic halotolerant enriched culture derived from a saline-sodic soil. Biotechnology reports, 24, e00388.

[۱۲۳] Raja, P., Karthikeyan, P., Marigoudar, S.R., Sharma, K.V. and Murthy, M.V.R., 2022. Spatial distribution of total petroleum hydrocarbons in surface sediments of Palk Bay, Tamil Nadu, India. Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 4, 20-28.

[۱۲۴] Rajaoalison, H., Knez, D. and Zamani, M.A.M., 2022. A multidisciplinary approach to evaluate the environmental impacts of hydrocarbon production in Khuzestan Province, Iran. Energies, 15(22), 8656.

[۱۲۵] Reddy, K.R., 2013. Electrokinetic remediation of soils at complex contaminated sites: Technology status, challenges, and opportunities. Coupled Phenomena in Environmental Geotechnics–Manassero et al (Eds).–2013.–CRC Press, Taylor & Francis Group, 131-147.

[۱۲۶] Roccatano, D., 2015. Structure, dynamics, and function of the monooxygenase P450 BM-3: insights from computer simulations studies. Journal of Physics: Condensed Matter, 27(27), 273102.

[۱۲۷] Rodrigo, M.A., Oturan, N. and Oturan, M.A., 2014. Electrochemically assisted remediation of pesticides in soils and water: a review. Chemical reviews, 114(17), 8720-8745.

[۱۲۸] Rodríguez, H. and Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology advances, 17(4-5), 319-339.

[۱۲۹] Rojas-Aparicio, A., Hernández-Eligio, J.A., Toribio-Jiménez, J., Rodríguez-Barrera, M.Á., Castellanos-Escamilla, M. and Romero-Ramírez, Y., 2018. Genetic expression of pobA and fabHB in Bacillus licheniformis M2-7 in the presence of benzo [a] pyrene. Genet Mol Res, 17(2).

[۱۳۰] Rothman, S., Liebow, C. and Isenman, L., 2002. Conservation of digestive enzymes. Physiological Reviews, 82(1), 1-18.

[۱۳۱] Saeed, M., Ilyas, N., Bibi, F., Jayachandran, K., Dattamudi, S. and Elgorban, A.M., 2022. Biodegradation of PAHs by Bacillus marsiflavi, genome analysis and its plant growth promoting potential. Environmental Pollution, 292, 118343.

[۱۳۲] Saeid, A., Prochownik, E. and Dobrowolska-Iwanek, J., 2018. Phosphorus solubilization by Bacillus species. Molecules, 23(11), 2897.

[۱۳۳] Saksa, P., 2017. Electrically assisted soil remediation. INSURE Geosto Report.

[۱۳۴] Sales da Silva, I.G., Gomes de Almeida, F.C., Padilha da Rocha e Silva, N.M., Casazza, A.A., Converti, A. and Asfora Sarubbo, L., 2020. Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. Energies, 13(18), 4664.

[۱۳۵] Sansinenea, E., 2019. Bacillus spp.: As plant growth-promoting bacteria. Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications, 225-237.

[۱۳۶] Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A. and Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. International journal of molecular sciences, 17(3), 401.

[۱۳۷] Sattar, S., Siddiqui, S., Shahzad, A., Bano, A., Naeem, M., Hussain, R., Khan, N., Jan, B.L. and Yasmin, H., 2022. Comparative analysis of microbial consortiums and nanoparticles for rehabilitating petroleum waste contaminated soils. Molecules, 27(6), 1945.

[۱۳۸] Shah, G., & Soni, V. (2024). Comprehensive Insights into the Impact of Oil Pollution on the Environment. Regional Studies in Marine Science, 103516.

[۱۳۹] Shaimerdenova, U., Kaiyrmanova, G., Lewandowska, W., Bartoszewicz, M., Swiecicka, I. and Yernazarova, A., 2024. Biosurfactant and biopolymer producing microorganisms from West Kazakhstan oilfield. Scientific Reports, 14(1), 2294.

[۱۴۰] Shakiba, M., Sohrabi, T., Mirzaei, F. and Pourbabaee, A.A., 2019. Assessment of the BTEX biodegradation by Bacillus thuringiensis and Bacillus sp. under nitrate reducing condition. Iranian Journal of Soil and Water Research, 50(3), 713-724.

[۱۴۱] Sharma, B., Dangi, A.K. and Shukla, P., 2018. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. Journal of environmental management, 210, 10-22.

[۱۴۲] Sharma, I., 2020. Bioremediation techniques for polluted environment: concept, advantages, limitations, and prospects. In Trace metals in the environment-new approaches and recent advances. IntechOpen.

[۱۴۳] ShirzadianGilan, R., Parvizi, Y., Pazira, E. and Rejali, F., 2023. Remediation capacity of drought-tolerant plants and bacteria in petroleum hydrocarbon-contaminated soil in Iran. South African Journal of Botany, 153, 1-10.

[۱۴۴] Sivasakthi, S., Usharani, G. and Saranraj, P., 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis: A review. Afr. J. Agric. Res, 9(16), 1265-1277.

[۱۴۵] Sohail, R., Jamil, N., Ali, I., & Munir, S. (2020). Animal fat and glycerol bioconversion to polyhydroxyalkanoate by produced water bacteria. e-Polymers, 20(1), 92-102.

[۱۴۶] Sorkhoh, N.A., Ibrahim, A.S., Ghannoum, M.A. and Radwan, S.S., 1993. High-temperature hydrocarbon degradation by Bacillus stearothermophilus from oil-polluted Kuwaiti desert. Applied Microbiology and Biotechnology, 39, 123-126.

[۱۴۷] Surendra, S.V., Mahalingam, B.L. and Velan, M., 2017. Degradation of monoaromatics by Bacillus pumilus MVSV3. Brazilian Archives of Biology and Technology, 60, e16160319.

[۱۴۸] Taher, A.M. and Saeed, I.O., 2022, October. Bioremediation of contaminated soil with crude oil using two different bacteria. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2398, No. 1). AIP Publishing.

[۱۴۹] Thirumurugan, D., Kokila, D., Balaji, T., Rajamohan, R., AlSalhi, M.S., Devanesan, S., Rajasekar, A. and Parthipan, P., 2023. Impact of biosurfactant produced by Bacillus spp. on biodegradation efficiency of crude oil and anthracene. Chemosphere, 344, 140340.

[۱۵۰] Tripathi, V., Gaur, V.K., Kaur, I., Srivastava, P.K. and Manickam, N., 2024. Unlocking bioremediation potential for site restoration: A comprehensive approach for crude oil degradation in agricultural soil and phytotoxicity assessment. Journal of Environmental Management, 355, 120508.

[۱۵۱] Truskewycz, A., Gundry, T.D., Khudur, L.S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Ball, A.S. and Shahsavari, E., 2019. Petroleum hydrocarbon contamination in terrestrial ecosystems—fate and microbial responses. Molecules, 24(18), 3400.

[۱۵۲] Turnbull, P.C., Kramer, J.M. and Melling, J., 1996. Bacillus. Medical microbiology, 4, 233.

[۱۵۳] Uzoigwe, C., Burgess, J.G., Ennis, C.J. and Rahman, P.K., 2015. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. Frontiers in microbiology, 6, 245.

[۱۵۴] Van Beilen, J.B. and Funhoff, E.G., 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. Applied microbiology and biotechnology, 74, 13-21.

[۱۵۵] Van Beilen, J.B., Smits, T.H., Whyte, L.G., Schorcht, S., Röthlisberger, M., Plaggemeier, T., Engesser, K.H. and Witholt, B., 2002. Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. Environmental Microbiology, 4(11), 676-682.

Varavipour, M. and Mashal Soltani, J., [۱۵۶] 2013. Bioremediation of petroleum contaminated soil with poly nuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in southern region of Iran. Res Crops, 14, 1258-1263.

Varjani, S.J. and Upasani, V.N., 2017. [۱۵۷] A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. International Biodeterioration & Biodegradation, 120, 71-83.

Wang, D., Lin, J., Lin, J., Wang, W. and [۱۵۸] Li, S., 2019. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by Bacillus subtilis BL-27, a strain with weak hydrophobicity. Molecules, 24(17), 3021.

Wang, W., Zhao, J. and Zhang, Z., [۱۵۹] 2022. Bacillus metabolites: compounds, identification and anti-Candida albicans mechanisms. Microbiology Research, 13(4), 972-984.

Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. [۱۶۰] K., Zotchev, S. B., and Throne-Holst, M., 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. Applied microbiology and biotechnology, 76, 1209-1221.

Winkler, J. R., and Gray, H. B., 2015. [۱۶۱] Electron flow through biological molecules: does hole hopping protect proteins from oxidative damage?. Quarterly reviews of biophysics, 48(4), 411-420.

Wu, B., Xiu, J., Yu, L., Huang, L., Yi, [۱۶۲] L. and Ma, Y., 2022. Biosurfactant production by Bacillus subtilis SL and its potential for enhanced oil recovery in low permeability reservoirs. Scientific Reports, 12(1), 7785.

Xiao, M., Zhang, Z.Z., Wang, J.X., [۱۶۳] Zhang, G.Q., Luo, Y.J., Song, Z.Z. and Zhang, J.Y., 2013. Bacterial community diversity in a low-permeability oil reservoir and its potential for enhancing oil recovery. Bioresource technology, 147, 110-116.

Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., [۱۶۴] Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H. and Yu, H., 2018. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. Frontiers in microbiology, 9, 2885.

Yan, S., Wang, Q., Qu, L. and Li, C., [۱۶۵] 2013. Characterization of oil-degrading bacteria from oil-contaminated soil and activity of their enzymes. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 27(4), 3932-3938.

Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S. [۱۶۶] and Huang, Y., 2015. Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas. Applied microbiology and biotechnology, 99, 1935-1946.

Yap, H. S., Zakaria, N. N., [۱۶۷] Zulkharnain, A., Sabri, S., Gomez-Fuentes, C., and Ahmad, S. A., 2021. Bibliometric analysis of hydrocarbon bioremediation in cold regions and a review on enhanced soil bioremediation. Biology, 10(5), 354.

Yin, C. F., Xu, Y., Li, T., and Zhou, N. [۱۶۸] Y., 2022. Wide distribution of the sad gene cluster for sub-terminal oxidation in alkane utilizers. Environmental Microbiology, 24(12), 6307-6319.

Yong, Y.C. and Zhong, J.J., 2010. [۱۶۹] Recent advances in biodegradation in China: new microorganisms and pathways, biodegradation engineering, and bioenergy from pollutant biodegradation. Process Biochemistry, 45(12), 1937-1943.

Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. [۱۷۰] and Bertagnolli, B.L., 2002. Production of iturin A by Bacillus amyloliquefaciens suppressing Rhizoctonia solani. Soil Biology and Biochemistry, 34(7), 955-963.