



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Biological Journal of Microorganism

12th Year, Vol. 12, No. 46, Summer 2023 pp. 99-112

Received: 29.07.2022

Accepted: 19.12.2022

(Research Paper)

A Comparative Study on the Effects of Biostimulation and Bioaugmentation on the Remediation of Contaminated Sediments with Crude Oil in the Persian Gulf

Sayyid Rasool Tayyeb

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran., s.rasool.t@gmail.com

Nadia Kazempour

Department of Microbiology, School of Medicine, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran., nadia_kazemi@yahoo.com

Mehdi Hassanshahian*

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran., m_hsn2002@yahoo.com

Farokh Rokhbakhsh-Zamin

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran., rokhbakhsh@gmail.com

Sayed Mohammad Reza Khoshroo

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran., khoshroo@iauk.ac.ir

Abstract

Introduction: Crude oil pollution in the Persian Gulf is a major problem in this important marine environment. Today, the use of biological degradation methods to remove these pollutants is considered. The purpose of the present study is to compare the two methods of biological stimulation and biological enhancement for the degradation of sediments contaminated with crude oil in the Persian Gulf.

Materials and Methods: In this research, six types of microcosms were designed to understand the effectiveness of biostimulation and bioaugmentation on the microbial population of Khark Island sediments. Indicators such as the quantity of degrader, heterotrophs, and the rate of crude

*Corresponding Author



2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2023.134414.1477](https://doi.org/10.22108/BJM.2023.134414.1477)

oil degradation were investigated at different times and finally, the degradation over time was measured by the Gas Chromatography method.

Results: The results of this study showed that the combined microcosm of biostimulation and bio-augmentation (SB) with the amount of heterotrophic bacteria (equal to 3.9×10^6) and degrader (equal to 1×10^6) had the highest quantity. Population dynamics in microcosms were also studied and the lowest quantity of heterotrophic bacteria with a numerical value of 1×10^4 was related to natural sediments. The statistical results of this research proved that there is a significant relationship between the type of method chosen for biodegradation with the sampling time and the quantity of the dynamic population, and finally, with the increase of incubation time, the biodegradation of oil in all microcosms increased significantly (95%), but the best biodegradation of oil was related to the integrated microcosm of biostimulation and bio-augmentation.

Discussion and Conclusion: By using the type of biological remediation method according to the nature of the contaminated sediments, oil-contaminated sediments can be rehabilitated with the help of biological methods and contribute to the stability of marine ecosystems.

Key words: Oil Pollution, Biological Stimulation, Biological Assessment, Microcosm



<https://bjm.ui.ac.ir>

زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال دوازدهم، شماره ۴۶، تابستان ۱۴۰۲، صفحه ۹۹-۱۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۸

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای اثر تحریک زیستی و اثر تقویت زیستی برای رفع آلودگی رسوبات آلوده‌شده به نفت خام در خلیج فارس

سید رسول طیب: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران، s.rasool.t@gmail.com
نادیا کاظمی‌پور: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران، nadia_kazemi@yahoo.com
مهدی حسن شاهیان*: استاد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، m_hsn2002@yahoo.com
فرخ رخ‌بخش زمین: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران، rokhbakhsh@gmail.com
محمدرضا خوش‌رو: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران، khoshroo@iauk.ac.ir

چکیده

مقدمه: آلودگی نفتی در خلیج فارس یکی از معضلات اساسی این محیط مهم دریایی است. امروزه استفاده از روش‌های تجزیه زیستی برای حذف این آلودگی‌های نفتی در محیط‌های دریایی شایان توجه قرار گرفته است. هدف از این تحقیق مقایسه دو روش اثر تحریک زیستی و تقویت زیستی برای رفع آلودگی رسوبات آلوده‌شده به نفت خام در خلیج فارس است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق برای درک کارایی اثرات تحریک زیستی و تقویت زیستی روی جمعیت میکروبی رسوبات جزیره خارک شش نوع میکروکازم طراحی شد. شاخص‌هایی همچون کمیت تجزیه‌کننده‌ها، هتروتروف‌ها

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2023.134414.1477](https://doi.org/10.22108/BJM.2023.134414.1477)

و میزان تجزیه نفت خام در زمان‌های گوناگون بررسی شدند و در نهایت با روش گاز کروماتوگرافی تجزیه پذیری در طول زمان سنجش شد.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند میکروکازم ترکیبی تحریک زیستی و تقویت زیست (SB) با داشتن کمیت باکتری‌های هتروتروف برابر با $3/9 \times 10^6$ و تجزیه‌کننده برابر با 1×10^6 دارای بیشترین کمیت و دینامیک جمعیتی در میکروکازم‌های مطالعه شده است و کمترین کمیت باکتری‌های هتروتروف با ارزش عددی 1×10^4 مربوط به رسوبات طبیعی است. نتایج آماری حاصل از این تحقیق ثابت کردند رابطه معنی‌داری بین نوع روشی که برای تجزیه زیستی انتخاب شده است، با زمان نمونه‌برداری و کمیت جمعیت دینامیکی وجود دارد و در نهایت با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تجزیه زیستی نفت در همه میکروکازم‌ها افزایش چشمگیری داشت (۹۵ درصد)؛ اما بهترین تجزیه زیستی نفت مربوط به میکروکازم تلفیقی تحریک زیستی و تقویت زیستی بود.

بحث و نتیجه‌گیری: با به کارگیری نوع روش احیای زیستی برحسب ماهیت رسوبات آلوده می‌توان به کمک روش‌های زیستی رسوبات آلوده به نفت را احیا و به ثبات اکوسیستم‌های دریایی کمک کرد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، تحریک زیستی، تقویت زیستی، میکروکازم

مقدمه

باشد. آلاینده‌های موجود در رسوب می‌توانند وارد زنجیره غذایی شوند و سلامت حیوان و انسان را با خطر جدی مواجه کنند. همچنین این دسته از آلاینده‌های آلی پایداری زیادی در رسوب دارند و انباشته شدن تدریجی آنها در طول زمان موجب اختلال در کارکرد طبیعی رسوب مانند کاهش عملکرد محصولات کشاورزی و تغییر در ویژگی رسوبات آلوده می‌شود که امروزه به دلیل هزینه کم و آثار جانبی ناچیز بر محیط زیست بسیار درخور توجه قرار گرفته‌اند؛ بنابراین، آلودگی محیط زیست و سواحل، توسط نفت خام و مشتقات نفتی و پتروشیمی، مشکل جدی در سراسر جهان است (۲).

کاربردی‌ترین روش برای از بین بردن آلاینده‌ها زیست‌پالایی است. زیست‌پالایی یا پاک‌سازی زیست، یک تکنیک مدیریت زباله است و به فرایندهایی در راستای پاک‌سازی و پالایش زیست‌بوم و برگرداندن آن

جامعه پیشرفته امروز همچنان به استفاده از هیدروکربن‌های نفت خام برای تولید انرژی مورد نیاز تکیه دارد. ترکیبات نفتی از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های آلی محیط زیست به‌ویژه خاک هستند که به سبب سمی بودن و خصوصیات سرطان‌زایی برای موجودات زنده به‌ویژه انسان و ورود آنها به طبیعت به یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های آلودگی محیط زیست تبدیل شده‌اند. آلودگی نفتی دارای اثرات اکولوژیکی بر رسوبات است؛ به‌طوری‌که ترکیب و تنوع جامعه میکروبی را بر هم زده است و اثراتی نیز بر فعالیت ریزجانداران و آنزیم‌های رسوبات دارد. آلودگی مزمن محیط با نفت موجب به‌هم‌ریختگی اکولوژیکی شده است (۱).

به‌طور کلی تجمع آلاینده‌ها در رسوبات می‌تواند اثرات مخربی بر محیط زیست و سلامت انسان داشته

به شرایط نخستین گفته می‌شود که در آن قارچ‌ها یا باکتری‌ها و آنزیم آنها به کار گرفته می‌شود؛ مانند پالایش هیدروکربن‌ها و آلودگی‌های نفتی با کمک میکروارگانیسم‌ها. به‌طور کلی زیست پالایی می‌تواند به دو بخش درجا^۱ و برون‌جا^۲ تقسیم‌بندی شود. زیست پالایی درجا، شامل عملیات روی مواد آلوده در همان محل است (۳)؛ درحالی‌که عملیات برون‌جا شامل عملیات حذف مواد آلوده در جایی دیگر است. استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده بومی یا درون‌زا با خاصیت تخریب آلاینده‌ها یا بهبود شرایط مختلف فیزیکی - شیمیایی رسوبات برای تحریک رشد میکروارگانیسم‌های کارآمد است و روش درجا نامیده می‌شود (۴).

آلودگی‌های نفتی به روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی و زیستی پاکسازی می‌شوند. روش‌های فیزیکی مانند سوزاندن در کوره و روش‌های شیمیایی مانند درمان اکسیداتیو حرارتی، تثبیت‌کننده آهکی و استخراج با حلال هستند. روش‌های شیمیایی و فیزیکی نامبرده‌شده به تجهیزات و ماشین‌آلات صنعتی گران‌قیمت و انرژی زیادی نیاز دارند؛ ازاین‌رو درمان‌های بیولوژیک روش‌های امیدوارکننده و بی‌ضرر با طیف گسترده برای حذف هیدروکربن‌های نفتی به‌دلیل مقرون‌به‌صرفه بودن و کارایی بیشتر در اولویت‌اند. پاکسازی زیستی استفاده از موجودات زنده و اجزای آنها برای حذف آلاینده است. میزان تجزیه هیدروکربن‌ها با باکتری‌ها به‌دلیل فراوانی زیاد، سرعت رشد بالا و همچنین توانایی استفاده از طیف وسیعی از هیدروکربن‌ها به مراتب بیشتر است. دو روش عمده برای تسهیل پاکسازی زیستی وجود دارد؛ تحریک زیستی و تقویت زیستی (۵).

تحریک زیستی^۳ اضافه‌کردن مواد مغذی نظیر ترکیبات نیتروژن‌دار و فسفردار و مواد آلی برای تحریک فعالیت میکروبی و تجزیه‌کننده‌های بومی نفت خام و افزایش سرعت تجزیه زیستی است. تحریک زیستی را نوعی پاکسازی طبیعی تعریف کردند که با بهینه‌سازی شرایطی مانند هوادهی، افزودن مواد مغذی، کنترل pH و دما موجب تخریب آلاینده‌های نفتی در رسوبات شوند (۶). از مزیت‌های تحریک زیستی می‌توان به پاکسازی آلاینده‌های نفتی توسط میکروارگانیسم‌های بومی سازگار با محیط اشاره کرد که به خوبی توزیع شده‌اند. چالش اصلی تحریک زیستی در انتقال و توزیع یکنواخت مواد مغذی به میکروارگانیسم‌های زیرسطحی و در عمق رسوبات است. مسئله دیگر، افزودن مواد مغذی منجر به رشد میکروارگانیسم‌های هتروتروف می‌شود که تجزیه‌کننده نفت نیستند و سبب رقابت با میکروارگانیسم‌های بومی و تجزیه‌کننده می‌شود (۷).

تقویت زیستی^۴ به‌منظور شناسایی میکروب‌های مفید و افزایش آنها در رسوبات انجام می‌شود. در این فرایند تغییر ژنتیکی مدنظر نیست و فقط افزایش تعداد باکتری انجام می‌شود. جمعیت‌های میکروبی بومی به تنهایی قادر به تجزیه طیف گسترده‌ای از مخلوط‌های پیچیده مانند نفت خام نیستند یا اینکه در نتیجه تغییرات شرایط محیطی در وضعیت تنش قرار دارند. مطالعه میکروب‌ها در سیستم‌های زیست پالایی، امکان انتخاب میکروارگانیسم‌هایی با پتانسیل تجزیه و تولید ترکیبات با کاربردهای بیوتکنولوژیکی در صنعت نفت و پتروشیمی را ممکن می‌کند (۸). به‌کارگیری تیمارهای تقویت زیستی مناسب با استفاده از سویه‌ها یا جمعیت‌های میکروبی مفید سازگار با محیط می‌تواند در حذف

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: برای انجام این تحقیق رسوبات جزیره خارک انتخاب شدند و برای نمونه‌برداری ۵ سانتی‌متر از سطح رسوبات کنار زده شد و میزان ۵۰۰ گرم رسوب از مناطق جغرافیایی مختلف برداشت شد و نمونه‌ها روی یخ و در شرایط استریل به آزمایشگاه برای طراحی میکروکازم منتقل شدند. موقعیت جغرافیایی محل نمونه‌برداری به شرح $52^{\circ}69'N$ و $27^{\circ}49'E$ است.

طراحی میکروکازم‌ها: میکروکازم به محیط کوچک آزمایشگاهی گفته می‌شود که شرایط مورد آزمایش در آن طراحی می‌شود. شش میکروکازم برای هر نوع رسوبات، در ظروف شیشه‌ای با ابعاد 30×20 عرض $10 \times$ عمق سانتی‌متر برای مطالعه تغییرات در جوامع میکروبی طراحی شدند. هر میکروکازم حاوی ۶۰۰ گرم رسوب سواحل خلیج فارس بود و مشخصات آنها در جدول ۱ آورده شده است (۱۴).

میکروکازم‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ روز در تاریکی انکوبه و در فواصل زمانی هر سه روز یک‌بار رسوبات هم زده شدند تا شرایط بی‌هوازی ایجاد نشود و مقدار رطوبت رسوبات به‌ازای هر ۱۰۰ گرم رسوب، با یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل حفظ شد. در زمان‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ برحسب روز، نمونه‌گیری برای اندازه‌گیری مقدار سریال رقت و بیشترین تعداد احتمالی^{۱۱} و تجزیه نفت خام از میکروکازم‌ها انجام شد (۱۵).

آلودگی‌های نفتی مؤثر باشد. استفاده از میکروارگانیسم‌های غیربومی ممکن است مناسب باشند؛ اما کارایی آنها به توانایی رقابت با میکروارگانیسم‌های بومی و تنش‌های محیطی بستگی دارد (۹).

خلیج فارس از متنوع‌ترین اکوسیستم‌های جهان است و به دلیل داشتن وضعیت استراتژیک، محل عبور بیش از ۶۰ درصد نفت خام مورد نیاز جهان است (۱۰). هیدروکربن‌های نفتی آلاینده‌های اصلی محیط‌های دریایی هستند. ترکیبات آروماتیک نفت مهم‌ترین آلاینده‌های موجود در نفت خام هستند و آثار مخرب آنها در سلامت انسان و محیط زیست چشمگیر است. آلاینده‌ها در رسوبات نفوذ می‌کنند؛ چنانچه پاکسازی نشوند سبب آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شوند (۱۱).

در سال‌های اخیر، یک گروه جدید از باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن دریایی، باکتری‌های اجباری هیدروکربنوکلاستیک^۵ شناخته شده است که نقش مهمی در حذف بیولوژیکی هیدروکربن‌های نفتی از آب‌های دریایی آلوده دارند. از جنس‌های باکتریایی دریایی بومی آلکانیوراکس^۶، مارینیوباکتر^۷، تالاسولیتوس^۸، سیکلوکلاستیکوس^۹ و اولسپیرا^{۱۰} را می‌توان نام برد. مطالعه تجزیه بیولوژیکی نفت خام توسط میکروارگانیسم‌های بومی از اهمیت اکولوژیکی فوق‌العاده‌ای برخوردار است (۱۲ و ۱۳).

هدف از این پژوهش مقایسه‌ای اثر تحریک زیستی و تقویت زیستی برای رفع آلودگی رسوبات آلوده‌شده به نفت خام در خلیج فارس است.

جدول ۱- مشخصات میکروکازم‌های طراحی شده

ردیف	نام میکروکازم	اسم اختصاری	ویژگی
۱	میکروکازم اول	S	رسوب طبیعی ساحل جزیره خارک
۲	میکروکازم دوم	SP	رسوب + نفت (۲/۵ میلی‌لیتر)
۳	میکروکازم سوم (تحریک زیستی)	BM	رسوب + نفت + ماده معدنی به نسبت C ₁₀₀ :N ₁₀ :P ₁ به مقدار کلرید آمونیوم و نترات سدیم ۰/۲۵ گرم برای منبع نیتروژن، فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم ۰/۲۵ گرم برای منبع فسفر
۴	میکروکازم چهارم (تقویت زیستی)	AM	رسوب + نفت + یک باکتری <i>شوانلا آلگا</i> ^{۱۲} به مقدار ۳×۱۰ ^۸ واحد تشکیل کلونی در گرم ^{۱۳}
۵	میکروکازم پنجم (تقویت زیستی)	MM	رسوب + نفت + دو باکتری <i>شوانلا آلگا</i> و <i>باسیلوس پومیلوس</i> ^{۱۴} (۲)
۶	میکروکازم ششم (تلفیق تحریک زیستی و تقویت زیستی)	SB	رسوب + نفت + ماده معدنی + یک باکتری <i>شوانلا آلگا</i>

محیط کشت‌های استفاده‌شده: محیط کشت ONR

^{۱۵}: برای تهیه این محیط کشت محلول شماره یک با ترکیبات کلرید سدیم ۴۰ گرم، سولفات سدیم ۳/۸ گرم، کربنات هیدروژن سدیم ۳۱ میلی‌گرم، کلرید پتاسیم ۰/۷۲ گرم، برمید سدیم ۸۳ میلی‌گرم، فلورید سدیم ۲/۶ میلی‌گرم، فسفات هیدروژن سدیم ۸۹ میلی‌گرم، اسید بوریک ۲۷ میلی‌گرم و کلرید آمونیوم ۰/۲۷ گرم جداگانه تهیه شدند و با محلول شماره دو با ترکیبات کلرید کلسیم ۱/۴۶ گرم، کلرید منیزیم ۱۱/۱۸ گرم، کلرید استرانسیوم ۲۴ میلی‌گرم، کلرید آهن ۲ میلی‌گرم و تریس بازی ۱/۳ گرم تنظیم شده با pH متر مدل AZ 85502 در pH ۷، پس از استریل کردن در اتوکلاو ایرانیان طب زعیم مدل Strilizer 25lit vertical و سرد شدن با هم مخلوط شدند (۱۶).

محیط مارین برات^{۱۶}: ترکیبات این محیط مشابه محیط ONR است؛ با این تفاوت که منبع کربن در این محیط پیتون ۰/۵ گرم در لیتر و عصاره مخمر ۱ گرم در لیتر است (۱۷).

تعیین کمیت تعداد کل باکتری‌های تجزیه‌کننده

نفت خام و هتروتروف در نمونه‌ها با روش بیشترین تعداد احتمالی (MPN): روش MPN برای شمارش باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در میکروپلیت‌های استریل ۲۴ خانه با استفاده از مقدار نمونه با رقت‌ها و محیط کشت ONR انجام شد (۱۸). ابتدا ۱۷۰۰ میکرولیتر محیط ONR در هر چاهک از میکروپلیت‌ها ریخته و سپس سری رقت نمونه‌ها (رقت ده برابر ۱۰^{-۴} و ۱۰^{-۳} - ۱۰^{-۲}) در محیط ONR تهیه شد. چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه تلقیح شدند. به دنبال تلقیح نمونه، ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام سبک استریل ایرانی در مرکز هر چاهک اضافه شد. MPN برای شمارش باکتری‌های هتروتروف در محیط کشت مارین برات بدون نفت انجام شد. هر رقت دارای ۳ تکرار بود و MPN به صورت سه تایی انجام شد. میکروپلیت‌ها برای شمارش هتروتروف‌ها به مدت ۷ روز و میکروپلیت‌ها برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس از گذشت دوره گرمخانه‌گذاری ایجاد کدورت در

در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و سپس کدورت نفت استخراج‌شده در مقابل شاهد دی‌کلرومتان در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین و از رابطه زیر برای محاسبه درصد حذف نفت خام استفاده شد (۲۱).

$$100 \times \frac{\text{میزان جذب نمونه - میزان جذب شاهد}}{\text{میزان جذب شاهد}} = \text{درصد حذف}$$

نفت خام

روش گاز کروماتوگرافی (GC - FID^{۲۰}): میزان

تجزیه نفت خام توسط گاز کروماتوگرافی تخمین زده شد. در این روش سوبه‌ها در محیط کشت ONR حاوی ۱ درصد نفت خام به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از دوره انکوباسیون به محیط کشت ۵۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان افزوده و به قیف جداکننده برای جداسازی فاز آلی از فاز آبی منتقل شد. سپس فاز آلی که حاوی نفت حل‌شده در دی‌کلرومتان بود، درون ارلن ریخته شد و ۳ گرم سدیم سولفات برای جذب آب باقی‌مانده به ارلن اضافه و به مدت ۱ شب در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شد. سپس محتویات ارلن از کاغذ صافی عبور داده شد و در دمای محیط برای تبخیر دی‌کلرومتان قرار گرفت. پس از تبخیر دی‌کلرومتان، مجدداً ۳ میکرولیتر دی‌کلرومتان به ۱ میکرولیتر نفت باقی‌مانده اضافه و با دستگاه GC، Agilent Technology مدل ۷۸۹۰A آنالیز شد.

ستون: Hewlett Packard Rona Fused با ۰/۲۵

میلی‌متر قطر داخلی، ۳۰ میلی‌متر طول و ۰/۳۲ میلی‌متر عرض Silica Capillary، دکتور: MS، گاز حامل: هلیوم. برنامه دمایی دستگاه به شرح زیر اجرا شد: دمای اولیه: ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، دمای انتقال: ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، دمای تزریق: ۳۳۰ درجه

مقایسه با شاهد به‌عنوان شاخص مثبت برای آزمایش MPN انجام شد (۱۹). شمارش MPN باکتری‌ها با استفاده از نرم‌افزار محاسبه MPN^{۱۷} نسخه ۴/۲ انجام شد.

تعیین کمیت تعداد کل باکتری‌های تجزیه‌کننده

نفت خام و هتروتروف با روش سریال رقت^{۱۸} (CFU): برای شمارش تعداد کل باکتری‌های تجزیه‌کننده موجود در رسوب، ۳ گرم از نمونه رسوب مدنظر در ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین^{۱۹} ۱ گرم بر لیتر از نسبت مساوی فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم و فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم حل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تکان داده شد و سپس سری رقت نمونه‌ها (۱۰^{-۲} - ۱۰^{-۳} و ۱۰^{-۴}) در لوله‌های آزمایش تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها روی محیط کشت ONR آگار حاوی (v/v) ۱ درصد نفت به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی کشت چمنی داده شد. برای شمارش تعداد کل باکتری‌های هتروتروف رسوب، سری رقت نمونه‌ها (۱۰^{-۳} - ۱۰^{-۴} و ۱۰^{-۵}) در لوله‌های آزمایش تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها روی محیط کشت مارین آگار کشت چمنی داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز برای هتروتروف‌ها و ۷ روز برای تجزیه‌کننده‌ها شمارش کلنی‌ها برآورد و نتایج کمی‌سازی باکتری‌ها به صورت CFU · g⁻¹ (تعداد باکتری در هر گرم رسوب = میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده × عکس ضریب رقت × عکس حجم انتقالی) بیان شد (۲۰).

سنجش میزان نفت باقی‌مانده در رسوبات: ابتدا ۵

گرم نمونه رسوب هر میکروکازم در ۵۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل و با فویل آلومینیوم به مدت ۱۵ دقیقه

به میکروکازم ششم (SB) است که در واقع ترکیب دو روش تقویت زیستی و تحریک زیستی است و رتبه بعد مربوط به میکروکازم سوم (BM) است که همان تحریک زیستی است. کمترین کمیت باکتری‌ها از لحاظ دینامیک جمعیتی مربوط به میکروکازم اول (S) است که در واقع رسوب طبیعی سواحل خلیج فارس است (جدول ۳ و شکل ۱).

رابطه بین دینامیک جمعیت میکروبی و زمان

نمونه برداری با روش احیای زیستی: نتایج حاصل از شمارش با روش آماری تجزیه و تحلیل شدند. همان‌طور که در جدول تجزیه واریانس دو طرفه، جدول ۳ و شکل ۱ آمده است، بین نوع روشی که برای تجزیه زیستی (تحریک زیستی و تقویت زیستی و ترکیب آنها) انتخاب شده است با زمان نمونه برداری و کمیت و دینامیک جمعیتی رابطه معنی داری وجود دارد (در سطح $P < 0.01$ درصد)؛ به طوری که هم در زمان‌های مختلف نمونه برداری و هم بین میکروکازم به کاررفته رابطه معنی دار است که به صورت علامت‌های اختصار در شکل ۱ و به صورت ستاره‌دار در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.

سانتی گراد، دمای نگهداری ستون: ۲۴۰ درجه سانتی گراد برای ۵۰ دقیقه، دمای نهایی: ۳۲۰ درجه سانتی گراد و جریان عبوری ۰/۷ میلی لیتر بر دقیقه بود. پیک‌های حاصل از GC با استاندارد درونی مقایسه شدند و نوع ترکیب براساس اطلاعات کتابخانه wily به دست آمد (۲۰ و ۲۲).

نتایج

خصوصیات فیزیکوشیمیایی رسوبات مطالعه شده:

نتایج به دست آمده از آنالیز فیزیکوشیمیایی رسوبات مطالعه شده در جدول ۲ آمده‌اند. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود بافت رسوبات بیشتر شنی است.

دینامیک جمعیتی در میکروکازم‌های مطالعه شده:

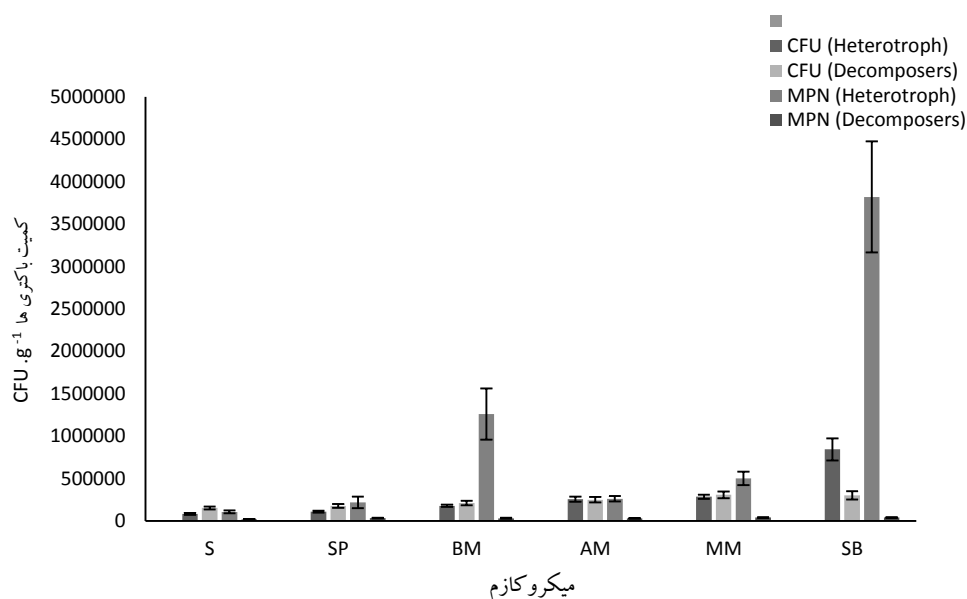
نتایج حاصل از شمارش و تعیین کمیت باکتری‌های هتروتروف و تجزیه کننده نفت خام در همه میکروکازم‌های مطالعه شده به دو روش CFU و MPN در جدول ۳ و شکل ۱ آمده‌اند. همچنین تحلیل آماری نیز در شکل و جدول مذکور لحاظ شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین دینامیک و کمیت جمعیتی در میکروکازم‌های بررسی شده مربوط

جدول ۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی رسوبات مطالعه شده

رس (درصد)	لای (درصد)	شن (درصد)	پتاسیم قابل جذب (میلی گرم بر کیلوگرم)	فسفر قابل جذب (میلی گرم بر کیلوگرم)	کربن آلی	آهک (درصد)	اسیدیته کل اشباع pH	هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر)
۶	۴	۸۸	۱۲۰	۴	۰	۴۷	۷/۹	۲۵/۳

جدول ۳- تجزیه واریانس دو طرفه صفات بررسی شده در روز و میکروکازم

منابع تغییرات	درجه آزادی	MPN هتروتروف‌ها	CFU هتروتروف‌ها	MPN تجزیه کننده‌ها	CFU تجزیه کننده‌ها	تجزیه نفت	P
روز	۶	۱۱×۱۰ ^{۱۲} **	۳۵×۱۰ ^{۱۰} **	۹×۱۰ ^۸ **	۳۵×۱۰ ^{۱۰} **	۸×۱۰ ^۳ **	۰/۰۱
میکروکازم	۵	۴۲×۱۰ ^{۱۲} **	۱۶×۱۰ ^{۱۱} **	۱۲×۱۰ ^۸ **	۸×۱۰ ^{۱۰} **	۹×۱۰ ^۳ **	۰/۰۵
روز×میکروکازم	۳۰	۵۱×۱۰ ^{۱۱} **	۲۰×۱۰ ^{۱۰} **	۱۳×۱۰ ^۸ **	۱۸×۱۰ ^۹ **	۴×۱۰ ^۲ **	۰/۰۲
خطا	۸۴	۳۶×۱۰ ^۸ **	۸×۱۰ ^۸ **	۱۰×۱۰ ^۵ **	۷×۱۰ ^۷ **	۲۰**	۰/۰۱



شکل ۱- نتایج حاصل از شمارش کل هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها در میکروکازم‌های بررسی شده به روش CFU و MPN

تجزیه نفت خام مربوط به میکروکازم SB است که در آن ماده معدنی و باکتری علاوه بر باکتری‌های رسوب قرار دارد. در مرتبه بعد، تجزیه نفت خام میکروکازم‌های AM و BM و در آخر، میکروکازم‌های MM، SP و S تجزیه کمتری را نشان دادند. میکروکازم BM تحریک زیستی و میکروکازم‌های AM و MM تقویت زیستی را نشان می‌دهند و میکروکازم SB شامل تلفیق تحریک زیستی و تقویت زیستی است.

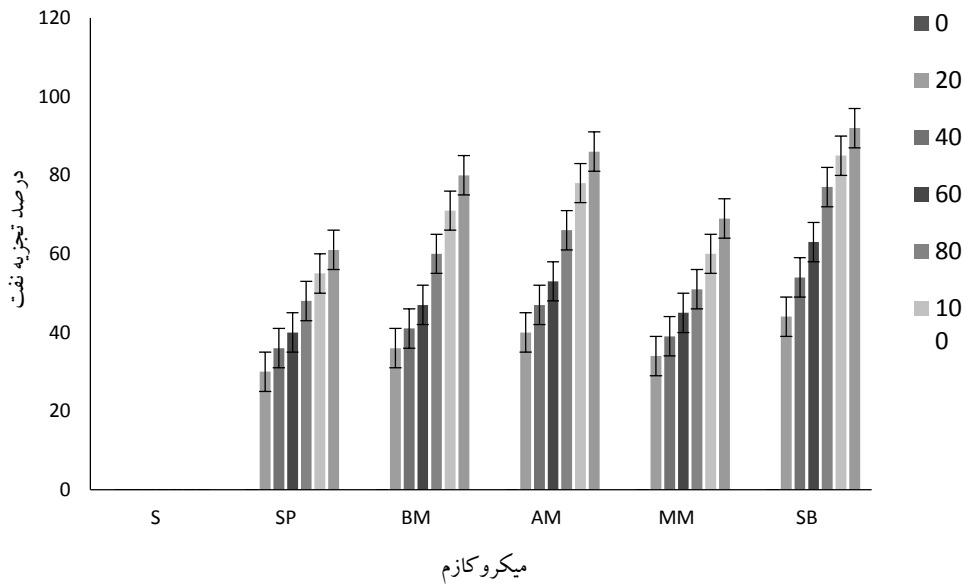
نتایج گاز کروماتوگرافی: در هر میکروکازم مطالعه شده طی زمان‌های ۰، ۲۰، ۶۰ و ۱۲۰ پیک‌های گاز کروماتوگرافی نیز به دست آمدند. نتایج حاصل در

تجزیه زیستی نفت خام در میکروکازم‌های

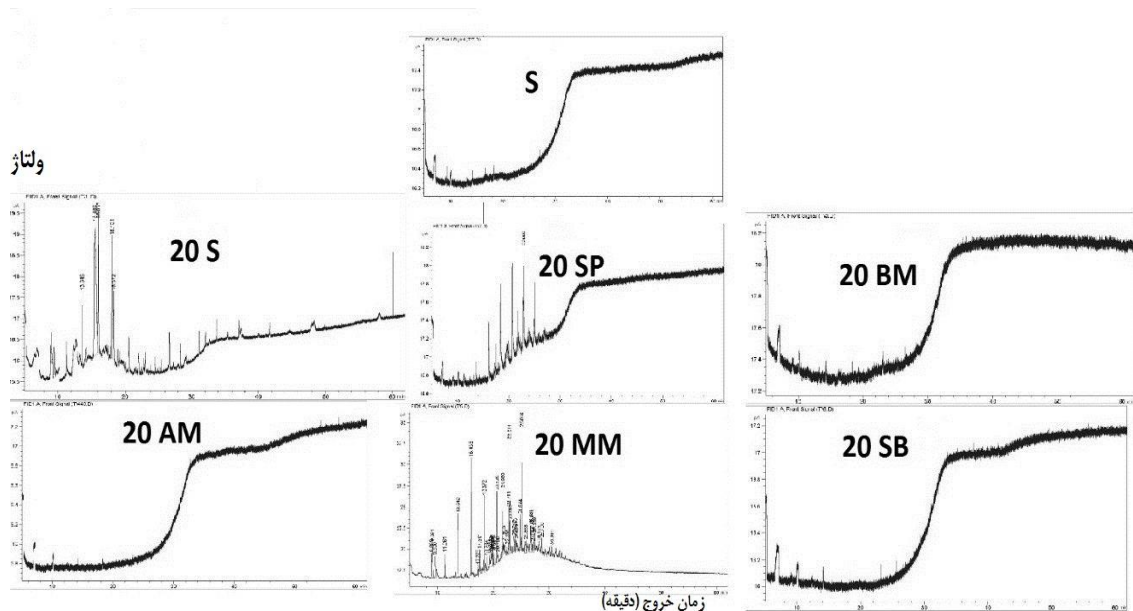
مطالعه شده در زمان گرمخانه‌گذاری: میزان نفت باقی مانده در هریک از میکروکازم‌ها و روش‌های احیای زیستی به کاررفته با دو روش اسپکتروفتومتری و گاز کروماتوگرافی تعیین شد. نتایج حاصل از میزان تجزیه نفت خام در زمان گرمخانه‌گذاری در شکل ۲ آمده‌اند. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری میزان ۹۰ درصد نفت خام در رسوبات تجزیه شده است. میزان تجزیه نهایی در هر میکروکازم به لحاظ آماری تجزیه و تحلیل شد و نتایج حاصل در شکل ۲ آورده شدند. با توجه به این شکل، بیشترین

داشته‌اند؛ به طوری که تجزیه نفت خام با گذشت زمان از ۱۰ درصد به ۹۰ درصد رسیده است که تأیید کننده نتایج کار است.

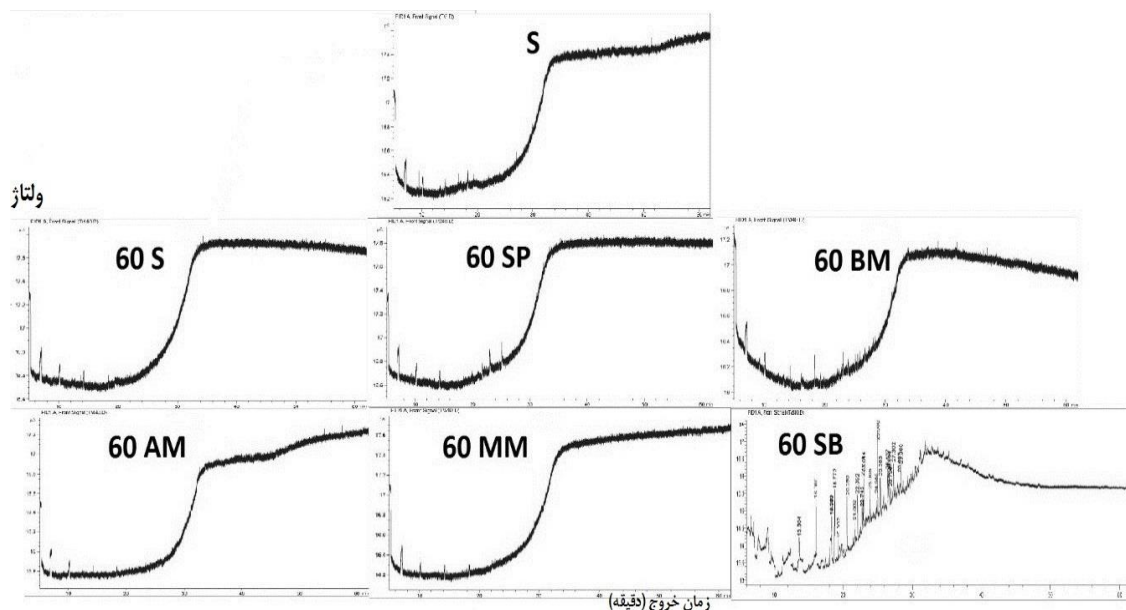
شکل های ۳، ۴ و ۵ آمده‌اند. با توجه به این شکل‌ها می‌توان نتیجه گرفت میزان ترکیبات نفتی از شروع زمان گرمخانه گذاری به انتهای زمان گرمخانه گذاری کاهش



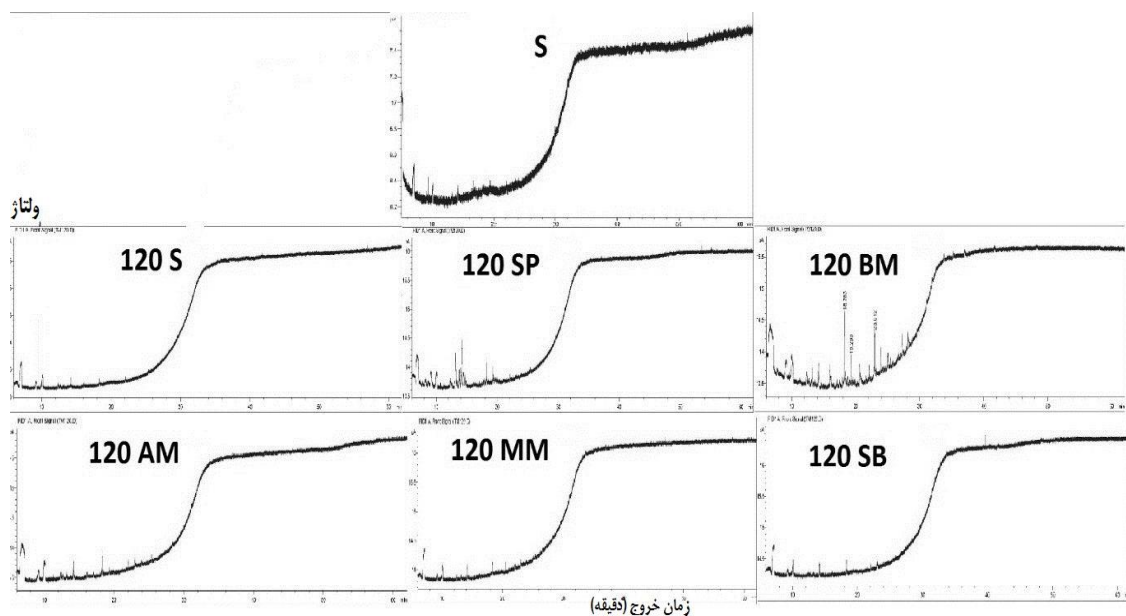
شکل ۲- مقایسه میزان تجزیه نفت در میکروکازم‌های بررسی شده



شکل ۳- مقایسه تجزیه زیستی در میکروکازم‌ها در زمان‌های شروع آزمایش (زمان صفر) تا روز ۲۰



شکل ۴- مقایسه تجزیه زیستی در میکروکازم‌ها در زمان‌های شروع آزمایش (زمان صفر) تا روز ۶۰



شکل ۵- مقایسه تجزیه زیستی در میکروکازم‌ها در زمان‌های شروع آزمایش (زمان صفر) تا روز ۱۲۰

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات متعددی روی تجزیه زیستی نفت خام صورت گرفته است و محققان با استفاده از روش‌های احیای زیستی سعی در حذف نفت از اکوسیستم‌های دریایی آلوده داشته‌اند و در این میان روش تحریک

زیستی و تقویت زیستی در سال‌های اخیر شایان توجه قرار گرفته است (۲۳). در تحقیق حاضر برای درک اثر روش‌های مختلف احیای زیستی بر جمعیت میکروبی دریایی رسوبات خلیج فارس از روش‌های تحریک زیستی - تقویت زیستی و تلفیق این دو روش

باشد. از آنجایی که غلظت باکتری افزوده‌شده نسبت به جمعیت درونی بیشتر بود، احتمال می‌رود این باکتری به‌عنوان فلور غالب تجزیه‌کننده در جمعیت تثبیت شده باشد. تحلیل آماری، تفسیرها و استدلال‌های ذکرشده را تأیید می‌کند؛ زیرا ارتباط معنی‌داری بین میزان تجزیه نفت خام و تجزیه میکروکازم دیده شد.

حمیدی و همکاران با مطالعه تخریب کل هیدروکربن‌های نفتی^{۲۱} با استفاده از تقویت زیستی به افزایش درصد تجزیه زیستی برای نمونه‌ها در طول زمان پی بردند که بالاترین میزان تخریب هیدروکربن‌ها ۷۵/۱ درصد با استفاده از مخلوط تلقیح سوبه‌های میکروبی به روش تقویت زیستی است و در پژوهش حاضر تقویت زیستی در میکروکازم MM منجر به تجزیه بالای نفت خام و تلفیق تقویت زیستی و تحریک زیستی در میکروکازم SB منجر به تجزیه بالای ۹۵ درصدی نفت خام شد (۲۴).

گروسین^{۲۲} و همکاران به ناکارآمدی روش تحریک زیستی در زیست پالایی اشاره کردند و با طراحی میکروکازم (SM) تحریک زیستی و میکروکازم NA به‌صورت شاهد آزمایشی طراحی کردند. برای تحریک زیستی (SM) با اضافه کردن مواد معدنی به این نتیجه رسیدند که فرایند زیست پالایی، استراتژی تحریک زیستی به تنهایی ناکافی بود و توصیه نمی‌شود؛ با این حال، تفاوت معنی‌داری در کاهش نفت خام بین تیمارهای SM و NA در پایان آزمایش مشاهده نشد. با توجه به تفاوت چشمگیر در کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی بین تیمارهای تلقیح‌شده با باکتری و تیمار با تحریک زیستی به تنهایی، نتیجه‌گیری می‌شود استفاده از میکروارگانسیم‌های مناسب برای کاهش آلودگی در

استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش تأیید می‌کنند تلفیق دو روش تحریک و تقویت زیستی روش مؤثرتری برای احیای زیستی رسوبات دریایی آلوده به نفت خام است؛ به‌طوری‌که در میکروکازم SB با تلفیق دو روش مقدار CFU و MPN باکتری‌های تجزیه‌کننده و هتروتروف $3/9 \times 10^6$ بوده و افزایش ۱۰۰ درصد نسبت به شاهد به سایر میکروکازم‌ها بوده است و تأیید می‌کند بالابودن مقدار باکتری‌های تجزیه‌کننده در تجزیه نفت خام نقش بسزایی دارد. در میکروکازم SB اضافه کردن باکتری *شوانلا آلگا* (علاوه بر باکتری‌های موجود در رسوبات) در کنار تحریک زیستی به‌صورت همزمان به کار رفت. نتیجه به‌دست آمده بدین صورت بود که بهترین درصد تجزیه نفت در این میکروکازم دیده شد. این نتیجه تأیید می‌کند باکتری اضافه‌شده به اکوسیستم یک اثر همزیستی و همیاری مناسبی با جامعه میکروبی دریایی درونی رسوبات دارد؛ به‌طوری‌که افزودن این باکتری همراه با حمایت مواد معدنی اثر افزایش‌دهنده‌ای روی حذف نفت خام گذاشته است؛ زیرا هنگام وارد شدن استرس آلودگی نفتی به اکوسیستم دریایی، منابع نیتروژن و فسفر اولین مسئله‌ای هستند که در محیط دریایی کاهش می‌یابند که یک محیط استرس‌زا و تنش‌زا است. در روش تلفیقی با تأمین منبع نیتروژن و فسفر و رعایت نسبت $C_{100}:N_{10}:P_1$ ، این عامل تنش‌زا از جمعیت میکروبی درونی کاهش یافت و مواد معدنی به مقدار کافی وارد جمعیت میکروبی شد؛ همچنین این امر باعث می‌شود هم جمعیت میکروبی درونی دریایی تقویت شود و هم باکتری *شوانلا* که یک باکتری بومی دریایی تجزیه‌کننده نفت خام است (۱۵) یک اثر سینرژی (هم‌افزایی) با جمعیت درونی میکروبی داشته

References

- (1) Hasanshahian M., Emtiazi G., Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 2012; 64 (1): 7–12.
- (2) Ansari N., Rokhbakhsh-Zamin F., Hassanshahian M., Askari Hesni M. Biodegradation of crude oil using symbiont crude-oil degrading bacteria isolated from corals collected at the Persian Gulf. *Journal Chemical Technology and Biotechnology* 2021; 96: 1882–1892.
- (3) Sharma S., M. Pandey L. Hydrophobic Surface Induced Biosorption and Microbial Ex Situ Remediation of Oil-Contaminated Sites. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2021; 60 (26): 9378-9388.
- (4) Pourbabae A A., Shahriari M H., Garousin H. Biodegradation of phenanthrene as a model hydrocarbon: Power display of a super-hydrophobic halotolerant enriched culture derived from a saline-sodic soil. *Biotechnology Reports* 2019; 24: 1-12.
- (5) Rezaei Somee M., Amoozegar M A., Shavandi M., Dastgheib S M M. Isolation of halophilic microbial consortia capable of degrading diesel oil for the bioremediation of drilling wastes. *Biological Journal of Microorganism* 2016; 5 (19): 23-40.
- (6) Talaat A., Hegazy M., Ibrahim S., Hazem T., El-Hamid A., Khalid M., El-Moselhy. Microcosm application for Improving Biodegradation potentials of diesel Oil contaminated marine sediments. *International Journal of Advanced Research* 2014; 2 (9): 623-631.
- (7) Adams GO., Fufeyin PT., Okoro SE., Ehinomen I. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*. 2015; 3 (1): 28-39.
- (8) Chen F., Li X., Zhu Q., Ma J., Hou H., Zhang S. Bioremediation Of petroleum-contaminated soil enhanced by aged refuse. *Chemosphere* 2019; 98–105.

چنین رسوبات‌هایی ضروری است. در پژوهش حاضر اضافه کردن مواد معدنی به میکروکازم دارای باکتری‌های تجزیه‌کننده مفید و تلفیق تقویت زیستی و تحریک زیستی منجر به تجزیه بالای نفت خام تا ۹۵ درصد شد (۲۵).

وو مانلی^{۲۳} و همکاران میکروکازم‌هایی طراحی کردند که در آنها دو میکروکازم BA افزایش زیستی با افزودن فلور تجزیه‌کننده هیدروکربن و میکروکازم BS تحریک زیستی با افزودن نترات آمونیوم و فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم با نسبت C₁₀₀:N₁₀:P₁ به رسوبات بود و اعلام داشتند راندمان تخریب کل هیدروکربن‌های نفتی در رسوبات تیمار شده با BS و BA به ترتیب ۲۸/۳ درصد و ۱۳/۹ درصد بود. تحریک زیستی برای تخریب هیدروکربن‌های نفتی مؤثرتر از تقویت زیستی بود. در پژوهش حاضر تلفیق تقویت زیستی و تحریک زیستی در میکروکازم SB منجر به تجزیه بالای ۹۵ درصدی نفت خام شد (۲۶).

بنیاهیا و همکاران میکروکازم‌هایی طراحی کردند که در آنها باکتری‌های بومی تحریک شده (BS)، سیستم تقویت زیستی (BA) و به‌عنوان کنترل (BC) (فقط نفت خام) به رسوبات اضافه شده بود. از نظر کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی پس از یک دوره ۱۵۵ روز، مشاهده کردند بهترین نتایج با تقویت زیستی (BA) با کاهش کمی بیش از ۷۷ درصد به دست آمد؛ در حالی که سیستم BS کمی بیش از ۲۳ درصد کاهش داد و BC فقط کمی بیش از ۴ درصد کل هیدروکربن‌های نفتی را کاهش داد. در پژوهش حاضر تلفیق تقویت زیستی و تحریک زیستی در میکروکازم SB منجر به تجزیه بالای ۹۵ درصدی نفت خام شد (۲۷).

- (9) Garg N., Lata P., Jit S., Sangwan N., Singh A K., Dwivedi V. Laboratory and field scale bioremediation of hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils by means of bioaugmentation and biostimulation. *Biodegradation* 2016; 27: 179–193.
- (10) Abed R., Al-Sabahi J., Al-Maqrashi F., Al-Habsi A., Al-Hinai M. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2014; 89: 58-66.
- (11) Primeia S., Inoue C., Chien M. Potential of Biosurfactants' Production on Degrading Heavy Oil by Bacterial Consortia Obtained from Tsunami-Induced Oil-Spilled Beach Areas in Miyagi, Japan. *Journal of Marine Science and Engineering* 2020; 8: 577.
- (12) Obi L., Atagana H., Adeleke R., Maila M., Bamuza-Pemu E. Potential microbial drivers of biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil sludge using a composting technique. *Journal Chemical Technology Biotechnology* 2020; 95: 1569-1579.
- (13) Gutierrez T. Occurrence and roles of the obligate hydrocarbonoclastic bacteria in the ocean when there is no obvious hydrocarbon contamination. In: McGenity, editor. *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. Springer, Cham; 2018: 337–352.
- (14) Louvado A., Coelho F J R C., Oliveira V., Gomes H. Microcosm evaluation of the impact of oil contamination and chemical dispersant addition on bacterial communities and sediment remediation of an estuarine port environment. *Journal of Applied Microbiology* 2019; 127 (1).
- (15) Ansari N., Rokhbakhsh-Zamin F., Hassanshahian M., Askari Hesni M. The Occurrence of Crude Oil-Degrading Bacteria in Some Sponges Collected at the Persian Gulf: Ecological Importance and Biotechnological Application. *Polycyclic Aromatic Compounds* 2021; 1-14. <https://doi.org/10.1080/10406638.2021.2014529>.
- (16) Adeleye AO., Nkereuwem ME., Omokhudu GI., Amoo AO., Shiaka GP., Yerima M B. Effect of Microorganisms in the Bioremediation of Spent Engine Oil and Petroleum Related Environmental Pollution. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 2018; 22 (2): 157-167.
- (17) Hasanshahian M., Emtiazi G. Isolation, and molecular detection of *Alcanivorax dieselolei* in the Persian Gulf and the study of biodegradation ability for remediation of oil pollution. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (17): 31-40.
- (18) Ahmad M., Yang Q., Zhang Y., Ling J., Sajjad W., Qi S., Zhou W., Zhang Y., Lin X., Zhang Y., Dong J. The distinct response of phenanthrene enriched bacterial consortia to different PAHs and their degradation potential: a mangrove sediment microcosm study. *Journal of Hazardous Materials* 2019; 1-10.
- (19) Fuchsluger C., Preims M., Fritz I. Automated measurement and quantification of heterotrophic bacteria in water samples based on the MPN method. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2011; 38: 241-247.
- (20) Bayat Z., Hasanshahian M., Askari Hesni M. Study the symbiotic crude oil degrading bacteria in the mussel *Macra stultorum* collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin* 2016; 105: 120-124.
- (21) Rahman K S., Thahira-Rahman M., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 2004; 85: 257–261.
- (22) Wang W., Wang L., Shao Z. Diversity and Abundance of Oil-Degrading Bacteria and Alkane Hydroxylase (alkB) Genes in the Subtropical Seawater of Xiamen Island. *Microbial Ecology* 2010; 60: 429- 439.

- (23) Liu X., Ge W., Zhang X., Chai C., Wu J., Xiang D. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soil by *Paracoccus* sp. Lxc combined with humic acid and spent mushroom substrate. *Journal of Hazardous Materials* 2019; 379: 120820.
- (24) Hamidi Y., Ataeia S A., Sarrafi A. Biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge: A comparative study of Biostimulation, Bioaugmentation and combination of methods. *Journal Chemical Technology Biotechnology* 2021; 96: 1302-1307.
- (25) Garousin H., Pourbabae A A., Alikhani H A., Yazdanfar N. A Combinational Strategy Mitigated Old-Aged Petroleum Contaminants: Ineffectiveness of Biostimulation as a Bioremediation Technique. *Frontiers in Microbiology* 2021; 12 (64): 1-12.
- (26) Wu M., Wu J., Zhang X., Ye X. Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. *Chemosphere* 2019; 237: 124456.
- (27) Benyahia F., Embaby A S. Bioremediation of Crude Oil Contaminated Desert Soil: Effect of Biostimulation, Bioaugmentation and Bioavailability in Biopile Treatment Systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2016; 13: 219.

- 14- *Bacillus pumillus*
 15- Oil Nutration Remediation
 16- Marin Broth
 17- MPN calculator
 18- Colony forming unit
 19- Phosphate Buffer Saline
 20- Gas Chromatography- Flame Ionization Detector
 21- Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)
 22- Garousin
 23- Manli Wu

- 1- in situ
 2- ex situ
 3- Bio stimulation
 4- Bio augmentation
 5- Obligate Hydro Carbonoclasticus Bacteria (OHCB)
 6- *Alcanivorax*
 7- *Marinobacter*
 8- *Thalassolituus*
 9- *Cycloclasticus*
 10- *Oleispira*
 11- Most Probable Number (MPN)
 12- *Shewanella alga*
 13- CfU/g