

Application of bacterial consortium isolated from contaminated areas in the removal of oil pollutants (C_{16}) using g- C_3N_4 nanoparticles

Sahabeh Taleshpur¹, Lobat Taghavi^{1*}, Hadi Farmahini Farahani², Behnam Rasekh³, Saeed Bazgir⁴

1. Department of the Natural Resources and Environment, SR. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Analytical Chemistry Research Group, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran
3. Environment and Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran
4. Department of Petroleum and Chemical Engineering, SR. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: The harmful environmental effects caused by petroleum compounds have caused petroleum compounds to be considered as one of the priorities for the removal of pollutants in the environment.

Therefore, finding effective techniques for removing these compounds from water is one of the most important environmental issues. The purpose of this study is to investigate oil pollutant (C_{16}) removal using a graphitic carbon nitride (g- C_3N_4) nanoparticle in the presence of a bacterial consortium isolated from contaminated areas.

Materials and Methods: To investigate C_{16} removal, samples were collected from three stations in the northwestern catchment area of Iran contaminated with oil compounds. The synthesized nanoparticles were characterized with FTIR, XRD, and SEM characterization tests. The effect of nanoparticle concentration (50-100-150 mg/L) on the removal rate of oil pollutant (C_{16}) was investigated. The C_{16} removal rate was examined by evaporation analysis in the presence of 100 mg/L g- C_3N_4 .

Results: Morphology of the planar and porous g- C_3N_4 structure and the presence of g- C_3N_4 were proved. According to the results, in the evaporation analysis method, the highest percentage of C_{16} removal was observed on the last day (day 15). On the ninth day, which is the optimal time for removal, the removal of g- C_3N_4 nanoparticles and bacteria was observed at 37.32%. The decrease in the volume of C_{16} was more in the concentrations of 100 and 150 mg/L, and the largest decrease in the volume was on the 15th day, when the volume of C_{16} decreased to 1.8ml.

Conclusion: According to the results of this study, due to the ability of bacteria to C_{16} biodegradation, these bacteria can be a suitable choice for industrial use in the biodegradation process of oil pollutants.

Keywords: Graphitic carbon nitride/polyethylene, C_{16} , evaporation analysis, bacterial consortium.

*Corresponding Author's:

Department of the Natural Resources and Environment, SR. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

E-mail: lobat.taghavi@iau.ac.ir

کاربرد کنسرسیوم باکتریایی جداشده از مناطق آلوده در حذف آلاینده نفتی (C₁₆) با استفاده از نانوذرات کربن نیتريد گرافیتی

صحابه طالش پور^۱، لعبت تقوی^{۱*}، هادی فرمهینی فراهانی^۲، بهنام راسخ^۳، سعید بازگیر^۴

۱. گروه علوم محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه تحقیقاتی شیمی تجزیه، پژوهشگاه صنعت نفت (RIPI)، تهران، ایران
۳. بخش تحقیقات محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت (RIPI)، تهران، ایران
۴. گروه مهندسی پلیمر، دانشکده نفت و مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اثرهای مخرب زیست‌محیطی ناشی از ترکیبات نفتی سبب شده ترکیبات نفتی به‌عنوان یکی از اولویتهای حذف آلاینده‌ها در محیط‌زیست مطرح گردند. از این‌رو دستیابی به تکنیک‌های مؤثر در حذف این ترکیبات از آب از مهم‌ترین مسائل زیست‌محیطی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی حذف آلاینده نفتی (C₁₆) با استفاده از نانوذرات کربن-نیتريد گرافیتی در حضور کنسرسیوم باکتریایی جداشده از مناطق آلوده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای بررسی حذف آلاینده نفتی (C₁₆)، از ۳ ایستگاه تعیین‌شده از حوزه آبریز شمال‌غرب کشور آلوده به ترکیبات نفتی نمونه‌برداری شد. خصوصیات نانوذرات سنتز شده با آزمون‌های مشخصه‌یابی FTIR، XRD و SEM تعیین شد. اثر غلظت نانوذرات (۵۰-۱۰۰-۱۵۰ mg/L) در میزان حذف آلاینده نفتی (C₁₆) مورد بررسی قرار گرفت. سرعت حذف آلاینده نفتی (C₁₆) به‌روش آنالیز تبخیری در حضور ۱۰۰ ppm از نانوذرات کربن نیتريد گرافیتی بررسی گردید.

یافته‌ها: مورفولوژی، ساختار کربن نیتريد گرافیتی صفحه‌ای و متخلخل است که حضور کربن نیتريد گرافیتی را اثبات نمود. طبق نتایج، در روش آنالیز تبخیری بیشترین درصد حذف C₁₆ در آخرین روز (روز پانزدهم) مشاهده شد. در روز نهم که زمان بهینه حذف است، حذف با نانوذرات g-C₃N₄ و باکتری برابر ۳۷/۳۲ درصد مشاهده شد. کاهش حجم C₁₆ در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ کاملاً محسوس بود و بیشترین کاهش حجم در روز پانزدهم بود که حجم C₁₆ به ۲/۳ mL کاهش یافت. **نتیجه‌گیری:** طبق نتایج این مطالعه، با توجه به توانایی باکتری‌ها در تجزیه زیستی C₁₆، این باکتری‌ها می‌توانند گزینه مناسبی برای استفاده صنعتی در فرایندهای تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی باشند.

واژگان کلیدی: کربن نیتريد گرافیتی، آنالیز تبخیری، C₁₆، کنسرسیوم باکتریایی.

نویسنده مسئول: گروه علوم محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

- پست الکترونیکی:

lobat.taghavi@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۳

۱- مقدمه

آلودگی منابع آب با مشتقات نفتی از جمله مشکلات زیست‌محیطی عصر کنونی محسوب می‌گردد. مصارف روزافزون انسانی و صنایع مختلف، سبب تولید بیش از حد پساب‌ها به آلاینده‌های مختلف شده است (۱) و آلودگی آب یکی از مشکلات و چالش‌های مهم دنیاست. هیدروکربن‌های آلی، آلاینده‌های محیط‌زیستی گسترده‌ای هستند که به دلیل سرطان‌زا و جهش‌زا بودن، نگرانی‌های زیادی را به وجود می‌آورند (۳). امروزه گسترش صنایع، رشد اقتصادی و شهرنشینی، دفع نادرست فاضلاب‌های شهری و استفاده بیش از حد از کودهای شیمیایی، حیوانی و آفت‌کش‌ها از جمله دلایل اصلی آلودگی منابع آب زیرزمینی و آشامیدنی می‌باشند. همچنین این فعالیت‌های انسانی برای بشر و محیط‌زیست بسیار خطرناک هستند (۴). نفت منبع اصلی تأمین انرژی برای صنایع مختلف و زندگی روزمره است. انتشار نفت در محیط چه به طور تصادفی یا به دلیل فعالیت‌های انسانی یک علت اصلی آلودگی آب‌و‌خاک است. نفت از صدها یا هزاران هیدروکربن آلیفاتیک شاخه‌ای و معطر تشکیل شده است که بیشتر آن‌ها برای انسان، حیوانات و پوشش گیاهی سمی هستند (۵). به دلیل رشد روزافزون صنعت، فراورده‌های نفتی و مشتقات آن‌ها یکی از منابع اصلی آلودگی محیط‌زیست به‌شمار می‌روند. در طول استخراج، حمل‌ونقل، توزیع و ذخیره‌سازی نفت خام و فراورده‌های آن ممکن است این مواد آزاد شده و باعث آلودگی جو، لیتوسفر و هیدروسفر شوند (۶ و ۷). آلودگی‌های نفتی تأثیر مهمی روی گیاهان و حیوانات دریایی، جزایر مرجانی، ماهیگیری، سواحل، سلامت انسان و صنعت توریسم دارند. این ترکیبات در محیط به شدت مقاوم هستند، بنابراین بازیابی مواد نفتی، جلوگیری از نشت آن‌ها و حذف این مواد از آب‌های آلوده اهمیت بسیار بالایی دارد (۸). صدها نوع ترکیب می‌توانند در نفت حضور داشته باشند. حدود ۵۰-۹۸ درصد از ترکیبات نفتی مربوط به هیدروکربن‌ها عمدتاً آلکان‌ها (پارافین‌ها)، سیکلوآلکان‌های با ۵-۶ اتم کربن، ۴۰-۲۰ درصد ترکیبات آروماتیک (بنزن، تولوئن و زایلن)، ترکیبات دو حلقه‌ای (نفتالن)، سه حلقه‌ای (آنتراسین، فنانترن) و چند حلقه‌ای (پیرن) می‌باشد. ترکیبات هیدروکربنی ممکن است به یکی از روش‌های تصادفات، انتشار از صنایع، محصولات جانبی حاصل از تجارت یا استفاده‌های شخصی ورود مستقیم به آب وارد محیط‌زیست شوند (۹). با توجه به تأثیر سوء ترکیبات نفتی بر سلامت انسان و اثرهای مخرب زیست‌محیطی

ناشی از این ترکیبات، حذف این مواد شیمیایی به‌عنوان یکی از اولویت‌های حذف آلاینده‌ها در محیط‌زیست مطرح شده است. از این رو دستیابی به تکنیک‌های مؤثر در حذف این ترکیبات از آب یکی از مهم‌ترین مسائل زیست‌محیطی می‌باشد و روش‌های مختلفی برای حذف این آلاینده‌ها به کار برده شده است (۱۰). امروزه تجزیه زیستی آلودگی‌های نفتی با استفاده از باکتری‌های بومی درخور توجه است. تعدادی از گونه‌های میکروبی که می‌توانند طیف‌وسعی از آلاینده‌ها را تخریب کنند قبلاً گزارش شده است (۱۱). از مهم‌ترین باکتری‌های تجزیه‌کننده این مواد می‌توان به جنس‌های *Sodomonas*، *Asintobacter*، *Basillus*، *Mycobacterium*، *Mariobacter*، *Asfingomonas*، *Borx*، *Holodria* و *Wibrio* اشاره نمود. میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی ابتدا با تولید بیوسورفکتانت، نفت خام را امولسیون می‌نمایند که با این عمل نسبت سطح به حجم قطره‌های نفت بسیار افزایش می‌یابد و از این طریق دسترسی سلول‌های باکتری با ترکیبات نفت بیشتر و کارایی آن‌ها در مصرف نفت بسیار افزایش می‌یابد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که میکروارگانیسم‌های جدا شده از محیط‌های طبیعی بیشترین سازگاری را با محیط پیدا کرده‌اند، پس بهترین گزینه استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی به‌منظور استفاده در فرایند حذف زیستی لکه‌های نفتی در محیط‌های آلوده می‌باشد (۱۲). در حال حاضر، پذیرفته شده هیچ تک‌گونه‌ای از میکروارگانیسم‌ها نمی‌تواند به طور کامل بخشی از نفت را تجزیه کند. تجزیه نفت خام، نفت تصفیه شده یا مشتقات آن‌ها، نیاز به کنسرسیومی از میکروارگانیسم‌ها دارد (۱۳). پژوهشگران روش‌های متعددی مرتبط به آلودگی نفتی و اندازه‌گیری میزان حذف آلودگی را مورد بررسی قرار داده‌اند (۱۴).

تبدیل مواد به مقیاس نانو ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و فعالیت‌های کاتالیزوری آن‌ها را تغییر می‌دهد و سبب افزایش فعالیت‌های شیمیایی و نفوذپذیری این ذرات به غشای سلولی می‌شود. فناوری نانو، فناوری نوظهور برای صنعت نفت است. نانوفناوری هم به دلیل گسترش و پیشرفت‌های چشمگیر آن و هم به دلیل عدم ایجاد خطرهای زیست‌محیطی و پیشینه بسیار خوبی که در حوزه حذف آلاینده‌ها از خود نشان داده، یکی از علوم به حساب می‌آید که در حوزه فناوری سبز جای می‌گیرد. استفاده از علم نانو یک گام انقلابی برای اکتشاف بالادست و تولید نفت و گاز می‌باشد. عوامل زیادی ممکن است بر این فرایند تأثیر بگذارند مانند رفتار نانومواد، اندازه، شکل فیزیکوشیمیایی یا خاصیت محلول اطراف

اولتراسونیک قرار داده شد. محلول همگن با غلظت ۵ mg/mL به دست آمد (۲۱).

۲-۲- مشخصه‌یابی نانوذرات g-C₃N₄

پس از سنتز نانوذرات g-C₃N₄، با استفاده از روش‌های تحلیلی مختلف مشخصه‌یابی انجام شد. جهت تعیین خصوصیات ساختاری، مورفولوژی و اندازه‌گیری متوسط سایز نانوذرات از دستگاه‌های FTIR مدل (BRUKRE آلمان)، در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ و میکروسکوپ الکترونیکی روبشی (SEM) استفاده شد. جهت بررسی ساختار بلوری و خلوص فازهای نمونه، آنالیز طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) با استفاده از دستگاه پراش پرتوی ایکس مدل PW1730، تحت تابش Cu-Kα (λ = ۱/۵۴۰۵۶ Å) در محدوده ۵°-۷۰°، ۲θ، ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ mA انجام گرفت. ساختار بلوری نمونه با مطالعه اشعه بازتابیده از سطح کریستال که در بعضی نقاط دارای پیک می‌باشد بررسی گردید.

۲-۳- نمونه‌برداری از آب

در این مطالعه میدانی، از حوزه آبریز شمال غرب کشور آلوده به ترکیبات نفتی نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها طی ۲۴ ساعت در ظروف شیشه‌ای درب‌دار استریل در دمای ۴°C به آزمایشگاه منتقل شدند. به‌وسعت جغرافیایی و شرایط ویژه منطقه، ۱۴ چاه گمانه زده شد و ۳ ایستگاه با آلودگی بیشتر انتخاب گردید.

۲-۴- جداسازی کنسرسیون باکتری

جهت جداسازی باکتری‌ها از محیط R₂A برات استفاده شد، همچنین محیط سنتزی پایه نمکی (BH) نیز ساخته شد. محیط، ارلن و سرسپلر در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱ atm به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو استریل گردید. به هر ارلن ۴۵ mL محیط R₂A و ۵ mL محیط پایه ۱۰ درصد (برداشت از ایستگاه‌ها) اضافه شد. جهت رشد باکتری‌ها نمونه‌ها یک هفته در دمای ۳۰°C و دور rpm ۱۲۰ روی شیکر انکوباتور قرار داده شدند. بعد از این مدت محیط تغییر رنگ داد که نشان‌دهنده رشد باکتری است (۲۲).

۲-۵- آزمون کانت میکروبی

در تکنیک کلنی کانت، از نمونه حاوی باکتری در محیط مایع رقت سریالی تهیه شد و از هر رقت ۰/۱ میلی‌لیتر به‌صورت یک لایه نازک توسط سواپ یا سرسپلر به آرامی روی محیط جامد منتقل گردید. در حین کشت، محیط به آرامی چرخانده شد تا مایع به-صورت یکنواخت در سراسر محیط کشت جامد پخش

(pH و قدرت یونی) و خواص محیط متخلخل. به‌علاوه استفاده از مواد مبتنی بر کربن از نظر عملی و اقتصادی مقرون‌به‌صرفه هستند، زیرا مواد پیش‌ساز کربن ارزان و فراوان است (۱۵). کربن نیتريد گرافیتی یک آنالوگ گرافیت است و مانند آن دارای ساختار دو بُعدی می‌باشد (۱۶). پیشرفت‌های اخیر در مواد مبتنی بر کربن نیتريد گرافیتی توسعه استراتژی‌های ضدباکتری بسیار مؤثر را تسريع کرده است. این ماده یک فتوکاتالیست غیرسمی و زیست‌سازگار (۱۶)، فوتوکاتالیست آلی نیمه‌هادی در کامپوزیت‌های ضدباکتری استفاده شده است (۱۷). کربن نیتريد گرافیتی به فرمول مولکولی g-C₃N₄، یک فوتوکاتالیست عاری از فلز است و از زیرواحدهای tri-s- triazine ساخته شده و توسط گروه‌های عاملی سطح آمین نوع سوم^۱ در یک لایه به هم متصل می‌شوند. ویژگی‌های منحصر به فرد این ماده از جمله سهولت سنتز، پایداری در محیط‌های بسیار اسیدی، بازی و باند گپ مناسب سبب شده پژوهش‌های بسیاری روی آن صورت گیرد (۱۸). به دلیل این ویژگی‌های منحصر به فرد، در کامپوزیت‌های با خاصیت آنتی‌باکتریایی با هدف تصفیه در محیط‌زیست مورد استفاده قرار گرفته است (۱۹). در این زمینه Wang و همکاران از کربن نیتريد گرافیتی عامل-دار شده با نقره و اکسید روی برای حذف فرمالدئید استفاده کردند. نتایج آنالیزهای BET، XRD و SEM نشان داد که کربن نیتريد گرافیتی خالص و Ag/ZnO/g-C₃N₄ دارای خاصیت حذف مطلوب است (۲۰).

در پژوهش حاضر هدف بررسی حذف آلاینده نفتی (C₁₆) به روش آنالیز تبخیری با استفاده از کربن نیتريد گرافیتی در حضور کنسرسیون باکتریایی جدا شده از مناطق آلوده می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سنتز کربن نیتريد گرافیتی

به منظور سنتز کربن نیتريد گرافیتی، از اوره به‌عنوان ماده اولیه استفاده شد. ابتدا ۱۰ gr اوره در بوتله-چینی در بسته در کوره با دمای ۵۵۰°C به مدت ۴ ساعت با سرعت ۵°C/min قرار گرفت. سپس تا دمای اتاق سرد شد و کربن نیتريد گرافیتی سفیدرنگ حاصل در هاون پودر شد (کربن نیتريد گرافیتی با سنتز مستقیم به دست می‌آید). جهت تهیه محلول کربن نیتريد گرافیتی، ۲۰ mL آب مقطر به ۱۰۰ mg کربن نیتريد گرافیتی تولید شده در مرحله قبل اضافه شد، سپس به مدت نیم ساعت در حمام

¹ Planar Tertiary Amino Groups

۹-۲- تأثیر غلظت نانوذرات در میزان حذف آلاینده

نفی C₁₆

از نمونه موردنظر در روزهای ۰، ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ نمونه‌گیری انجام و اثر غلظت نانوذرات به‌دست آمد. لازم به‌ذکر است که در این آزمایش اثر غلظت نانوذرات (۱۵۰-۱۰۰-۵۰ mg/L) موردبررسی قرار گرفت و بقیه شرایط متغیرها (دما و pH) ثابت بود. به‌علاوه تأثیر عدم‌وجود باکتری و نانوذرات به‌صورت مجزا بررسی شد.

۱۰-۲- انتخاب زمان بهینه

۴۴ ml محیط بوشنل‌هاس، ۵ ml گازوئیل و ۱ ml باکتری مخلوط و ۱۰۰ mg/L نانوذرات در ارلن ریخته شد، عمل استخراج با بلانک در روزهای ۰، ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ توسط کیف دکانتور انجام گردید، محلول خروجی از صافی در میکروتیوب جمع‌آوری و در یخچال نگهداری شد.

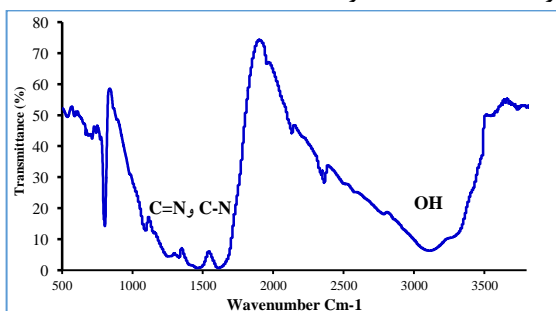
۳- نتایج

۱-۳- مشخصه‌یابی نانوذرات g-C₃N₄

نانوذرات g-C₃N₄ پس از سنتز، توسط روش‌های طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و بررسی مورفولوژی مشخصه‌یابی شدند.

۲-۳- طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR)

در آنالیز طیف‌سنجی FTIR، نمونه با اسپکتروفتومتر در محدوده طول‌موج بین ۴۰۰۰-۴۰۰ cm⁻¹ مشخصه‌یابی شد (شکل ۱). طیف FTIR کربن نیتريد گرافیتی سه منطقه جذبی در محدوده ۳۱۵۰^۱، ۱۶۵۰-۱۲۰۰ cm⁻¹ و ۸۰۵ cm⁻¹ را نشان می‌دهد. چندین قله شدید در محدوده ۱۶۱۰-۱۲۰۰ cm⁻¹ مربوط به ارتعاش‌های کششی پیوندهای C=N و C-N است. همچنین، باند جذبی در طول‌موج ۸۰۵ cm⁻¹ مربوط به ارتعاش‌های خمشی خارج صفحه حلقه‌های s-triazine است که نمایانگر ساختار کیتازین کربن نیتريد گرافیت تولید شده است (۲۸ و ۲۹).



شکل ۱- طیف FTIR کربن نیتريد گرافیتی

گرد. محیط‌کشت به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد، سپس تعداد کلنی‌ها در نمونه شمارش گردید (۲۳).

۶-۲- امکان‌سنجی حذف گازوئیل توسط باکتری

جهت بررسی عملکرد باکتری تلقیح‌شده روی گازوئیل، نمونه گازوئیل مصرفی سترون گردید. عمل سترون‌سازی توسط فیلتراسیون با کمک صافی‌های نیتروسولوزی سترون ساخت Jet-Biofil کانادا با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون صورت گرفت (۲۴). بعد از رشد میکروب‌ها با محیط بوشنل‌هاس‌براث^۱ (پایه نمکی) تست انجام شد (۲۵ و ۲۶).

۷-۲- تهیه محیط‌کشت بوشنل‌هاس حاوی گازوئیل و باکتری

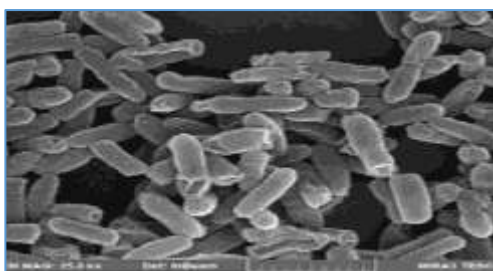
ابتدا کنسرسیون باکتریایی در ۱۰ mL محیط آبگوشت مغذی، کشت داده شد و در دمای ۲۸°C گرماگذاری گردید. پس از رسیدن به کدورتی معادل ۰/۷ نیمه مک‌فارلند ۱ mL از آن در ۴۴ mL محیط (۱۰٪) پایه معدنی حاوی ۵ mL گازوئیل اضافه گردید. از نمونه فاقد باکتری به‌عنوان شاهد استفاده شد (۱۸). سپس نمونه‌ها به‌مدت یک هفته در گرم‌خانه ۲۸°C مجهز به شیکر گرماگذاری شدند (۲۷).

۸-۲- بررسی راندمان حذف گازوئیل با روش آنالیز

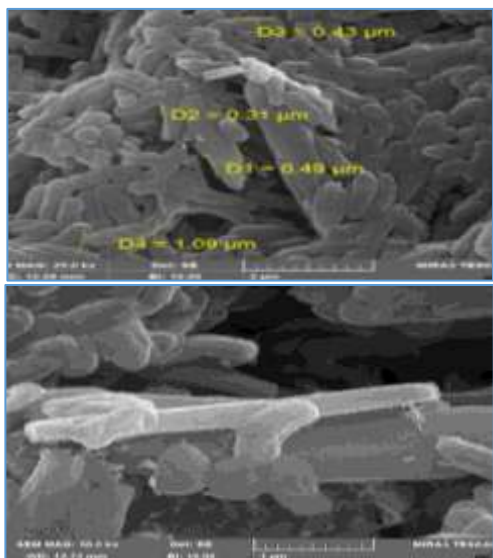
تبخیری (وزنی)

در این روش ۴۴ mL محیط بوشنل‌هاس، ۵ mL گازوئیل و ۱ mL باکتری اضافه و در دمای ۳۰°C و دور ۱۲۰ rpm روی شیکر انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت یک هفته تماس باکتری با گازوئیل، محیط‌کشت در فالكون ریخته شد. جهت استخراج بهتر ۱۰ CC نرمال-هگزان اضافه و ۵ دقیقه افقی با دست تکان داده شد. پس از ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، فاز رویی در شیشه ساعتی که قبلاً وزن‌شده ریخته شد و پس از یک ساعت زیرهود بیولوژیکی شیشه ساعت مجدد وزن شد. وزن محیط‌کشت با بلانک مقایسه شد. مراحل بیان‌شده برای ۴۴ mL محیط بوشنل‌هاس، ۵ mL گازوئیل، ۱ mL باکتری و ۱۰۰ mg/L نانوذرات g-C₃N₄ انجام گرفت و در روزهای ۰، ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ نمونه برداشت شد و به‌روش آنالیز تبخیری میزان حذف بررسی گردید (۲۸).

¹ Bushnell-Haas Broth



(ب)

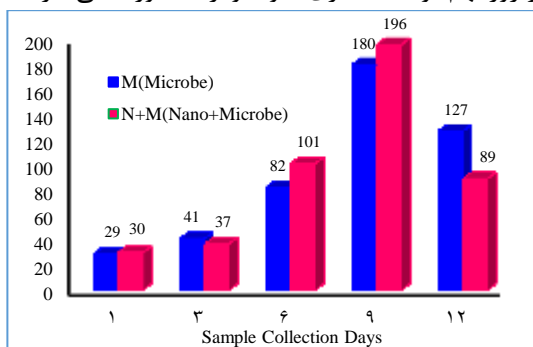


(ج)

شکل ۳- تصاویر SEM الف) $g-C_3N_4$ ، ب) باکتری، ج) $g-C_3N_4$ و باکتری

۳-۵- آزمون کانت میکروبی

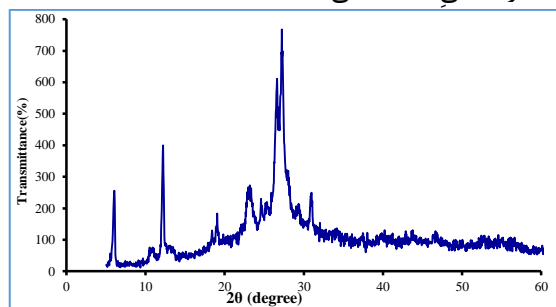
آزمون کانت میکروبی، روشی کلاسیک جهت تعیین غلظت میکروبها (باکتریها) در نمونه، با رقیق کردن نمونه و رشد باکتریها در پلیت و شمارش کلنیها است. شکل ۴ تغییرهای کانت میکروبی در روزهای تماس آلاینده و نانوذرات $g-C_3N_4$ را نشان می‌دهد. مطابق شکل ۴ الف، در روز نهم، تعداد باکتریها به بیشترین مقدار خود می‌رسد. بر اساس شکل ۴-ب بیشترین میزان حذف در روز نهم توسط باکتریها و نانوذرات صورت می‌گیرد.



(الف)

۳-۳- الگوی پراش پرتوی ایکس (XRD)

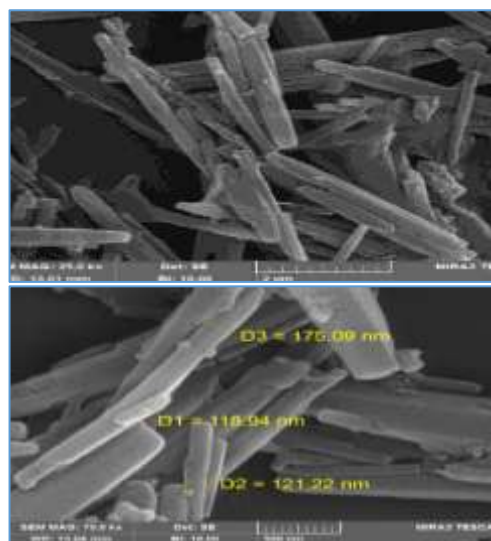
الگوی XRD کربن نیتريد گرافیتی در شکل ۲ نشان داده شده است. برای کربن نیتريد گرافیتی سنتز شده، پیک در محدوده $2\theta = 13/2^\circ$ مربوط به صفحه (۱۰۰) و نشان‌دهنده توده درون‌صفحه‌ای ساختار آروماتیک و قله دیگر در ناحیه $2\theta = 27^\circ$ نشان‌دهنده توده بین‌لایه‌ای حلقه‌های آروماتیک مزدوج مربوط به وجه کریستالی (۰۰۲) می‌باشد (۳۰).



شکل ۲- طیف XRD کربن نیتريد گرافیتی

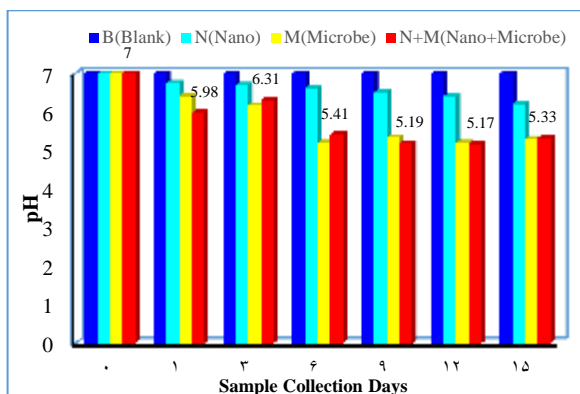
۳-۴- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

شکل ۳ تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM) الف) $g-C_3N_4$ ، ب) باکتری، ج) $g-C_3N_4$ و باکتری را با دو بزرگنمایی متفاوت نشان می‌دهد. در تصاویر ۳-الف، ابعاد نانویی صفحات کربن نیتريد گرافیتی که ضخامتی در محدوده ۱۱۸-۱۷۵ nm دارند قابل مشاهده است. مورفولوژی کربن نیتريد گرافیتی مطابق با مقاله‌های گزارش شده است (۳۱). مطابق شکل ساختار کربن نیتريد گرافیتی صفحه‌ای و متخلخل است. در شکل ۳-ج تصاویر SEM کربن نیتريد گرافیتی و باکتری نشان داده شده است.

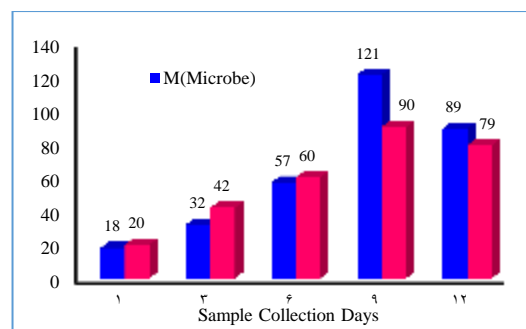


(الف)

شکل ۶ تغییرهای pH محیط در محیط بوشنل هاس را براساس روزهای تماس آلاینده و نانوذرات g-C₃N₄ نشان می‌دهد. مطابق این شکل، کمترین pH مربوط به روزهای ۹ و ۱۲ است، رنج تغییرهای pH در این محیط، ۵-۷ دیده شد.

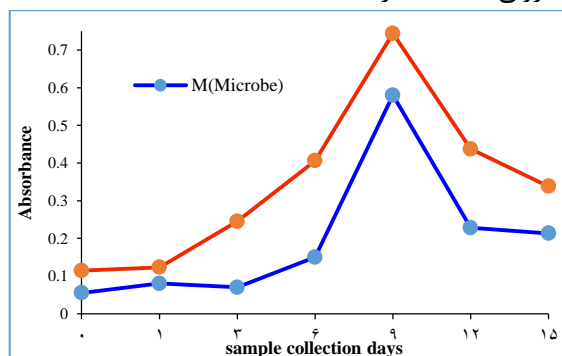


شکل ۶- تغییرهای pH براساس روزهای تماس آلاینده و نانوذرات در محیط بوشنل هاس

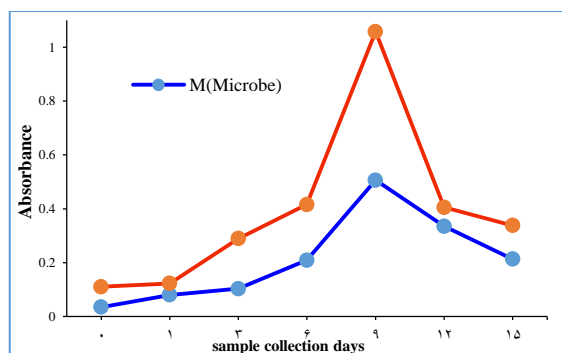


(ب)

شکل ۴- الف) سریال دایلوژن و ب) کانت میکروبی با میکروسکوپ مکمل آزمون کانت میکروبی جهت تعیین غلظت میکروب‌ها (باکتری‌ها) در نمونه، بررسی جذب نور به روش اسپکتروفوتومتری است. در این روش بیشترین میزان جذب نشان‌دهنده بیشترین تعداد باکتری است. شکل ۵ تغییرهای جذب نور به روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۶۰۰nm براساس روزهای تماس آلاینده و نانوذرات g-C₃N₄ را نشان می‌دهد. طبق شکل ۵-الف، در محیط بوشنل هاس بیشترین جذب نور مشاهده شده که نشان‌دهنده بیشترین تعداد باکتری در روز نهم نمونه‌گیری است. در محیط آبی نیز (شکل ۵-ب) بیشترین جذب در روز نهم مشاهده شد که نشان‌دهنده بیشترین تعداد باکتری در این روز است. نتایج این روش با آزمون کانت میکروبی مطابقت دارد.



(الف)



(ب)

شکل ۵- تغییرهای جذب نور به روش اسپکتروفوتومتری براساس روزهای تماس آلاینده و نانوذرات g-C₃N₄. الف) در محیط بوشنل هاس، ب) محیط آب

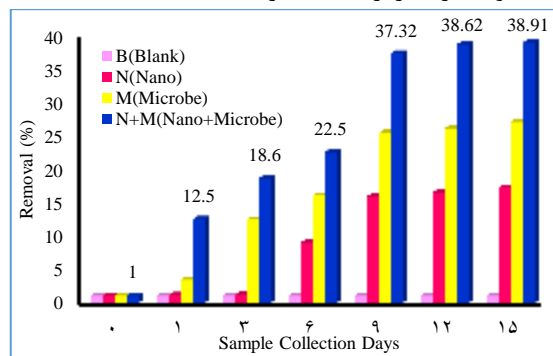
۴- بحث

محصولات مبتنی بر نفت شامل طیف گسترده-ای از ترکیبات خطرناک مانند cycloalkane n-alkane و هیدروکربن‌های معطر هستند. در طول اکتشاف، حمل‌ونقل، پردازش، ذخیره‌سازی و استفاده در مقیاس بزرگ نفت، ممکن است سایت‌های (جایگاه) آلوده در نتیجه حوادث و فعالیت‌های عملیاتی ایجاد شوند. زیستگاه‌های دریایی و خاک خشک تحت‌تأثیر کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) به‌عنوان یک آلاینده در محیط طبیعی خود قرار دارند (۳۲). هیدروکربن‌های نفتی به دلیل سمیت بالا برای سلامت انسان و محیط‌زیست یکی از هشداردهنده‌ترین آلاینده‌ها هستند. آلاینده‌های نفتی از طریق عوامل متعددی همچون دفع غیراصولی فاضلاب و ضایعات صنایع مربوطه، شکستن خطوط انتقال، نشت از مخازن ذخیره و تصادف‌های تانکرها و نفتکش‌ها وارد محیط‌زیست می‌گردند. مواد آلی سمی تأثیر بدی بر آب شیرین، موجودات آبی و انسان دارند. وجود بقایای نفت و هیدروکربن‌ها باعث ایجاد مشکلات بزرگی در فرایندهای تصفیه آب می‌شوند (۳۳ و ۳۴). بنابراین بازیابی مواد نفتی یا جلوگیری از نشت و همچنین حذف آن‌ها از آب‌های آلوده اهمیت بسیار بالایی دارد. آلوده شدن آب به ترکیبات نفتی موجب گسترش فناوری‌های جدید برای حذف آلودگی‌های نفتی گردیده است. امروزه پاک‌سازی زیستی که در آن باکتری‌ها برای تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی استفاده می‌شود، یکی از روش‌های بسیار کارآمد تصفیه آب و خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی است. روش پاک‌سازی زیستی توسط باکتری‌ها در مقایسه با سایر روش‌های حذف آلاینده‌ها، روشی دوستدار محیط‌زیست با پتانسیل آسیب‌رسانی کمتر به اکوسیستم و محیط‌زیست به‌شمار می‌رود (۳۵). روش‌های بیولوژیکی با به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های مؤثر جهت پاک‌سازی آب‌های آلوده به ترکیبات نفتی ترجیح داده می‌شوند. Singh و Mittal توانایی باکتری سودوموناس در حذف نفت را ۹۶ درصد گزارش کردند (۳۶). وابستگی شدید اقتصادهای مدرن به سوخت‌های فسیلی باعث افزایش فراوانی انتشار تصادفی هیدروکربن‌های نفتی ترکیبی از ترکیبات آلکان‌ها، هیدروکربن‌های آروماتیک و ترکیبات حاوی نیتروژن، اکسیژن و گوگرد شده است (۳۷). کلیه فعالیت‌های صنایع نفتی از جمله اکتشاف، استخراج، حمل‌ونقل، پالایش و مدیریت پسماندهای روغنی، منابع احتمالی آلودگی محیط‌زیست هستند (۳۸). به‌طور کلی مقابله با این

۳-۶- سنجش و بررسی درصد حذف C₁₆ با روش

آنالیز تبخیری

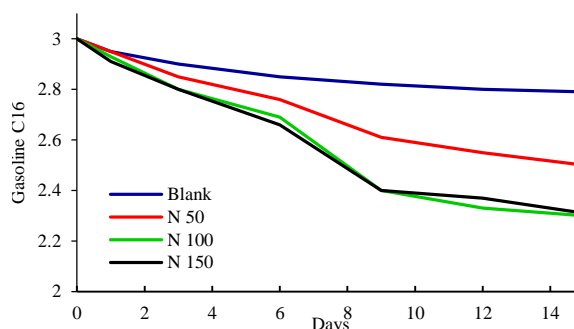
شکل ۷ میزان حذف C₁₆ در روش آنالیز تبخیری که به مدت ۱۵ روز در تماس با کنسرسیون باکتریایی بوده را نشان می‌دهد. طبق نمودار بیشترین حذف در آخرین روز (روز ۱۵) مشاهده می‌شود. در روز نهم که زمان بهینه حذف است، حذف با نانوذرات g-C₃N₄ و باکتری برابر ۳۷/۳۲ درصد مشاهده شد.



شکل ۷- میزان حذف C₁₆ در روش آنالیز تبخیری توسط نانوذرات میکروب و g-C₃N₄

۳-۷- تأثیر غلظت نانوذرات در میزان حذف C₁₆

شکل ۸ تأثیر غلظت‌های (۱۵۰-۱۰۰-۵۰ mg/L) نانوکامپوزیت را در میزان حذف C₁₆ نشان می‌دهد. کاهش حجم C₁₆ در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ mg/L کاملاً محسوس می‌باشد. در روز ۱۵ حجم C₁₆ به ۲/۳mL کاهش یافت.



شکل ۸- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات در میزان حذف C₁₆

۳-۸- زمان بهینه

نتایج نشان دادند که با گذشت زمان میزان حذف به‌صورت تدریجی سیر صعودی داشت. بهترین زمان حذف روز نهم به‌دست آمد، میزان حذف در روز نهم نسبت به روز ششم بسیار چشمگیر بود و با روز دوازدهم تفاوت چندانی نداشت.

انتشارهای تصادفی به لحاظ اقتصادی و محیط‌زیستی هزینه‌بر است (۳۹). روش‌های مختلفی برای به‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی نظیر روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی وجود دارد. در این بین، روش‌های فیزیکی و شیمیایی معمولاً در مساحت‌های کم، خاک‌های درشت‌دانه و با هزینه بالا انجام پذیرند (۴۰).

در پژوهش حاضر جهت حذف آلاینده نفتی با استفاده از کنسرسیوم باکتریایی جداشده از مناطق آلوده، نانوذرات $g-C_3N_4$ ساخته شد. در این زمینه حساسی و همکاری ساخت نقاط کوانتومی کربن نیتريد گرافیتی عامل‌شده با فنیل برونیک اسید ($g-CNQDs/PBA$) را بررسی نمودند (۴۱). خصوصیات نانوذرات سنتز شده با استفاده از آزمون‌های مشخصه‌یابی FTIR، XRD و SEM تعیین گردید. مورفولوژی ساختار کربن نیتريد گرافیتی صفحه‌ای و متخلخل است که حضور کربن نیتريد گرافیتی نیز اثبات شد. وانگ و همکاران نیز از کربن نیتريد گرافیتی عامل‌دارشده با نقره و اکسید روی برای حذف فرمالدئید استفاده کردند. بررسی‌ها با XRD، BET و SEM نشان دادند که $g-C_3N_4$ خالص اثر تبلور ضعیفی دارد اما $Ag/ZnO/g-C_3N_4$ بهتر متبلور شده و از خاصیت حذف بالاتری برخوردار است (۴۲).

به‌علاوه از روش آنالیز تبخیری جهت بررسی درصد حذف آلاینده نفتی استفاده شد. این روش با استفاده از کنسرسیوم بومی منطقه و نانوذرات $g-C_3N_4$ برای اولین بار انجام گرفته است. در این روش بیشترین درصد حذف C_{16} در آخرین روز (روز ۱۵) مشاهده شد. در روز نهم که زمان بهینه حذف است، حذف با نانوذرات $g-C_3N_4$ و باکتری برابر ۳۷/۳۲ درصد مشاهده شد. این کار برای اولین بار صورت گرفته که از کنسرسیوم بومی منطقه و نانوذرات $g-C_3N_4$ استفاده شده است، ولی به‌رحال با سایر کارهای حذف (بیولوژیکی و نانو) مقایسه شده است. به‌عنوان مثال جاوید و ابوالحسنی در مطالعه خود کارایی نانوذرة اکسید روی را در حذف نفت از پساب ساختگی بررسی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان جذب بعد از ۲۰ دقیقه و به‌مقدار ۷۴/۱ درصد و به‌صورت ثابت درآمد. بیشترین میزان جذب در pH ۷ به میزان ۸۷/۲۵ درصد و کمترین مقدار آن در pH ۹ به‌میزان ۶۶/۹ درصد حاصل شد (۴۳). در مطالعه شکرانیان و همکاران توانایی حذف زیستی نفت خام توسط باکتری جداشده از خاک آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه شیراز بررسی شد. در این پژوهش جهت سنجش میزان حذف آلاینده نفت روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. نتایج

نشان داد دو جدایه $Sludge C$ و SHA به‌ترتیب با ۶۴/۴ و ۸۴/۲ درصد، توانایی حذف آلاینده نفت در ۷ روز را داشتند (۴۴). در سال ۲۰۲۳ Sui و همکاران با هدف بررسی تجزیه آلاینده‌های نفتی توسط گونه $A. junii$ به مطالعه و پژوهش پرداختند. مطالعه آن‌ها نشان داد که $A. junii$ به‌طور مؤثری هیدروکربن‌های مختلف از جمله نفت خام، گازوئیل، روغن موتور، فلورن، فنانترن، دوکوسان و تریاکونتان را با بالاترین نرخ‌های تخریب تحت شرایط خاص منبع نیتروژن بهینه و نسبت C/N به‌دست آوردند. این باکتری کارایی بالایی در تجزیه فراکس یون‌های آلکان و آلکان‌های خاص در نفت‌های خام مختلف نشان داد (۴۵). استفاده از روش آنالیز تبخیری در حضور کنسرسیوم باکتریایی در این مطالعه نسبت به سایر روش‌ها مزایایی دارد که به چند مورد از آن اشاره می‌شود: مزایای بالقوه استفاده از کنسرسیوم باکتریایی شامل بهبود سطوح تجزیه زیستی، توزیع بار متابولیک بین گونه‌های باکتریایی و دستیابی به تعامل‌های پویا پایدار است. روش آنالیز تبخیری می‌تواند در شرایطی که دیگر روش‌ها ناکارآمد هستند بسیار مؤثر عمل کند. این امر کارایی بالا در شرایط خاص را نشان می‌دهد. این روش نیاز به استفاده از مواد شیمیایی برای تجزیه ندارد که می‌تواند خطرهای زیست‌محیطی را کاهش دهد. روش آنالیز تبخیری به‌دلیل عدم استفاده از مواد شیمیایی مضر، سازگاری بیشتری با محیط‌زیست دارد. این روش به‌طور کلی نیاز به تجهیزات پیچیده ندارد و می‌تواند ساده و به‌راحتی اجرا شود، اما زمان طولانی موردنیاز برای تجزیه زیستی، در مقایسه با روش‌های فیزیکوشیمیایی همچون دشواری دستیابی به نتایج قابل‌مقایسه در طول کاربردهای درجا که در آن عوامل بی‌شماری و غیرقابل کنترل زیستی و غیرزیستی در حال بازی هستند، از معایب حذف آلاینده‌های نفتی به‌روش آنالیز تبخیری است (۴۶). استفاده از نانوذرات به‌عنوان راهکاری نوین در حذف آلاینده‌های نفتی توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. نانوذرات کربن نیتريد گرافیتی به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود مانند سطح ویژه بالا و قابلیت جذب قوی، گزینه‌ای مناسب برای این منظور محسوب می‌شوند. استفاده از این ظرفیت علاوه‌بر به‌کارگیری هم‌زمان کنسرسیوم میکروبی ساکن در منطقه، ایده جذابی جهت استفاده به‌منظور حذف آلاینده‌های محیطی است و نوآوری این مطالعه می‌باشد.

۵- نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر حذف آلاینده‌های نفتی به‌روش آنالیز تبخیری صورت گرفته که در آن فرایند حذف با به‌کارگیری فناوری نانوبیوتکنولوژی با استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی بوده است. حذف آلاینده‌های نفتی به‌روش آنالیز تبخیری نسبت به سایر روش‌های موجود در این حوزه دارای مزایای خاصی است از جمله این روش به‌دلیل بهره‌گیری از فرایند طبیعی تبخیر با محیط‌زیست سازگارتر است و می‌تواند در کاهش هزینه‌های تصفیه و بازیابی نفت مؤثر باشد. علاوه بر این، روش آنالیز تبخیری می‌تواند به‌عنوان یک راهکار ساده و کم‌هزینه در محل‌های دورافتاده و مناطقی که دسترسی به تکنولوژی‌های پیشرفته‌تر محدود است مورداستفاده قرار گیرد. این ویژگی‌ها باعث می‌شود که روش آنالیز تبخیری به‌طور گسترده‌تری نسبت به روش‌های دیگر در مطالعه‌های زیست‌محیطی موردتوجه قرار گیرد. استفاده از کنسرسیون باکتریایی نیز شامل مزایای بالقوه از جمله بهبود سطوح تجزیه زیستی، توزیع بار متابولیک بین گونه‌های باکتریایی و دستیابی به تعامل‌های پویا پایدار است. با توجه به توانایی باکتری‌ها در تجزیه زیستی C_{16} ، این باکتری‌ها در حضور نانوذرات $g-C_3N_4$ می‌توانند در شرایط سخت گزینه مناسبی برای استفاده صنعتی در فرآیندهای تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی باشند. در این زمینه چند پیشنهاد در جهت بهبود فرایند حذف ارائه می‌گردد:

- ۱- پیشنهاد می‌گردد از نانوذرات عامل‌دارشده $g-C_3N_4$ همراه میکروارگانیسم استفاده شود، با این نانوذرات احتمال حذف آلاینده‌های نفتی بیشتر است.
- ۲- جذب سایر ترکیب‌های نفتی موجود در آب آلوده روی نانوذرات $g-C_3N_4$ همراه میکروارگانیسم موردآزمایش قرار گیرد.
- ۳- در مورد مکانیسم جذب نفت با استفاده از نانوذرات $g-C_3N_4$ همراه میکروارگانیسم پژوهش‌های بیشتری صورت گیرد.
- ۴- با استفاده از فناوری زیست‌شناسی مصنوعی، باکتری‌های دست‌کاری‌شده ژنتیکی ساخته شود تا توانایی بیشتری برای تجزیه هیدروکربن‌های نفتی بدهد.
- ۵- با توجه به اهمیت روش‌های زیستی و مزایای متعدد آن‌ها پیشنهاد می‌گردد که کارایی روش‌های زیستی جهت حذف دیگر آلاینده‌ها همچون سموم کشاورزی نیز مورد بررسی قرارگیرد، همچنین بررسی کارایی بیوسنسورها

جهت شناسایی آلاینده‌های گوناگون محیط‌های آبی درخور اهمیت ویژه می‌باشد.

۶- آب آلوده با آلاینده‌های نفتی دارای انواع مختلفی از ترکیبات آلاینده است که طی فرایند جذب سطحی ممکن است نسبتاً مستقل عمل کرده یا با یکدیگر در تداخل باشند. بنابراین انجام آزمایش‌هایی در ارتباط با تعیین تأثیر حضور سایر آلاینده‌ها ضروری است.

۶- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی پژوهشگاه صنعت نفت جهت حمایت اجرایی از این اثر تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از گروه علوم محیط زیست دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران قدردانی می‌گردد.

۸- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافی وجود ندارد.

1. Xia Z, Baird L, Zimmerman N, Yeager M. Heavy metal ion removal by thiol functionalized aluminum oxidehydroxide nano whiskers, *Appl Surf Sci*. 2017; 416: 565-73.
2. Taghavi Kalajahi S, Rasekh B, Yazdian F, Neshati J, Taghavi L. Corrosion behavior of X60 steel in the presence of sulphate-reducing bacteria (SRB) and iron reducing bacteria (IRB) in seawater, *Corrosion Eng, Sci Technol*.2021; 1-10. DOI: 10.1080/1478422X.2021.1919840.
3. Taghavi Kalajahi S, Rezazadeh Mofradnia S, Yazdian F, Rasekh B, Neshati J, Taghavi L, Pourmadadi M, Haghrosadat F. Inhibition performance of graphene oxide/silver nanostructure for the microbial corrosion: molecular dynamic simulation study, *Environmental Science and Pollution Research*. 2022; 29: 49884-49897.
4. Guo Z, Su Y, Li YX, Li G, Huang XJ. Porous single crystalline CdSe nanobelts: cation exchange synthesis and highly selective photoelectric sensing toward Cu^{2+} , *Chem Eur J*. 2018; 24(39): 9877-9883.
5. Hasija V, et al. Recent advances in noble metal free doped graphitic carbon nitride based nanohybrids for photocatalysis of organic contaminants in water: A review, *Appl Mater Today*. 2019; 15: 494-524. doi: 10.1016/j.apmt.2019.04.003.
6. M D Yuniati. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review, *IOP Conf. Ser: Earth Environ Sci*. 2018; 118 012063.
7. Bandura L, Wozzuk A, Kołodyńska D, Wojciec F. Application of Mineral Sorbents for Removal of Petroleum Substances: A. 2017; 7(37).
8. Zamiraei Z. Removal of petroleum from contaminated water by affordable adsorbents, *J Environ Res Technol*. 2020; 23-31.
9. Kharisov B. I, Dias H. R, Kharissova OV. *J Petroleum Sci Eng*. 2014; 122: 705-718.
10. IA A, ZM A, MA A.Q, IA A, FA A. Oil spill removal from water by absorption on zinc-doped cobalt ferrite magnetic nanoparticles, *Adv J Chem A*. 2019; 2(4, 266-385): 365-376.
11. Hefeiti M.A. Al, Joseph M, Thoms X G, Sathishkumar R, Bincy B, et al. Draft Genome Sequence of *Bacillus cereus* Strain UAEU-H3K6M1, a Bacterium with Potential Bioremediation Abilities, Isolated from
12. Petroleum Sludge, *Americ Soci Microbiol*. 2018; 7(3): e00856-18.
13. Moradi A, Ebrahimpour Gh, Karkhane M, Marzban A. Surveying the Antioxidant and the Antimicrobial Effects of Aqueous and Ethanolic Extract of *Rumex Alveollatus L.* on In-vitro Indicator Microorganisms, *J Adv Biomed Sci*. 2015; 4(16): 418-426.
14. Rezaei somee M, Amoozgar MA, Shavandi M, Dastgheib SMM. Isolation of halophilic microbial consortia capable of degrading diesel oil for the bioremediation of drilling wastes. *Biolog J Microorgan*. 2016; 5(19): 23-40. doi: 10.22108/bjm.2016.21005
15. Soleimani H, Mirza Khurram B, Noorhana, Khodapanah L, Sabet M, Birol M.R.D, Marek B. Impact of carbon nanotubes based nanofluid on oil recovery efficiency using core flooding, *Result Physic*. 2018; 9: 39-48.
16. Dong G, et al. A fantastic graphitic carbon nitride ($g-C_3N_4$) material: electronic structure photocatalytic and photo electronic properties, *J Photochem Photobiol C: Photochem Review*, 2014; 20: 33-50.
17. Zhang X, Wu X, Zhang J, Xu H, Yu X. Recent progress in graphitic carbon nitride-based materials for antibacterial applications: synthesis, mechanistic insights, and utilization, *Microstruct*. 2024; 4:2024017. doi: 10.20517/microstructures.2023.77
18. Dong F, et al. In situ construction of $g-C_3N_4/g-C_3N_4$ metal-free heterojunction for enhanced visible-light photocatalysis, *ACS appl material interface*. 2013; 5(21):11392-11401.
19. Ghaemi A, Javadi S, Heidari M.K, Rashedi H, Yazdian F, Omidi M, Tavakoli Z, Sheikhpour M. *Wound Med*. 2020; 100193.
20. Le Ba T, Mahian O, Wongwises S, Miklós Szilágyi I. Review on the recent progress in the preparation and stability of graphene-based nanofluids, *J Thermal Analys Calorimetr*. 2020; 142: 1145-1172.
21. Wang W, Zhang D, Ji Zh, Shao D, Sun P, Duan J. High efficiency photocatalytic degradation of indoor formaldehyde with silver-doped $ZnO/g-C_3N_4$ composite catalyst under the synergistic effect of silver plasma effect and heterojunction, *Optical Mater*. 2021; 111: 110721.
22. Rajabzadeh-Khosroshahi M, Pourmadadi M, Yazdian F, Rashedi H, Navaei-Nigjeh M, Rasekh B. Chitosan/agarose/graphitic carbon nitride nanocomposite as an efficient pH-sensitive drug delivery system for anticancer curcumin releasing, *J Drug Deliv Sci Technol*. 2022; ۷۴: ۱۰۳۴۴۳. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.jddst.۲۰۲۲.۱۰۳۴۴۳.
23. Hong JH, Kim J, Choi OK, Cho KS, Ryu HW. Characterization of a diesel degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* IU5, isolated from oil-contaminated soil in Korea, *World J Microbiol Biotechnol*. 2005; 21: 381-384.
24. Burt S, Reinders R. Antibacterial activity of consequences of salmonella and campylobacter jejuni in raw poultry, *J Food*. 2003.

- 25.Okerentugba PO, Ezerony OU. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria, *Afr J Biotech.* 2003; 2(9): 288-292.
- 26.Hasanshahian M, Emtiazi G. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation, *Int Biodeterior Biodegrad.* 2008; 62: 170-178.
- 27.Cheema S, Lavania M, Lal B. Impact of petroleum hydrocarbon contamination on the indigenous soil microbial community, *Ann Microbiol.* 2015; 65: 359-369.
- 28.Ferguson SH, Franzmann PD, Reville AT, Snape I, Rayner JL. The effects of nitrogen and water on mineralization of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils, *Cold Region Sci Technol.* 2003; 37: 197-212.
- 29.Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea, *Marine Pollut Bulletin.* 2012; 64(1): 7-12.
- 30.Jin J, et al. Simultaneous synthesis-immobilization of Ag nanoparticles functionalized 2D g-C₃N₄ nanosheets with improved photocatalytic activity, *J Alloys Compound.* 2017; 691: 763-771.
- 31.Wang K, Li Q, Liu B, Cheng B, Ho W, Yu J. *Appl Catal B Environ.* 2015; DOI: 10.1016/j.apcatb.2015.03.045.
- 32.Devi A, Das VK, Deka D. Ginger extract as a nature based robust additive and its influence on the oxidation stability of biodiesel synthesized from non-edible oil, *Fuel.* 2017; 187: 306-314.
- 33.Saeed AM, Sayed HA, El-Shatoury EHJCM. Optimizing the reduction of molybdate by two novel thermophilic bacilli isolated from Sinai, Egypt. 2020;77(5):786-94.
- 34.Liang H, Esmaeili HJET, Innovation. Application of nanomaterials for demulsification of oily wastewater: A review study. 2021;22:101498.
- 35.Macoustra GK, Koppel DJ, Jolley DF, Stauber JL, Holland AJET, Chemistry. Effect of Dissolved Organic Matter Concentration and Source on the Chronic Toxicity of Copper and Nickel Mixtures to *Chlorella* sp. 2021;40(7):1906-1916.
- 36.Azadmanesh F, Zavar Reza J, Yazdian F, Omidi M, Haghrosadat BF. Synthesis of a Novel Nanocomposite Containing Chitosan as a 3D Printed Wound Dressing Technique: Emphasis on Gene Expression, *Biotechnol Progres.* 2021; 37(2): e3132.
- 37.Mittal A, Singh P. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills, *Indian J Exp Biol.* 2009; 47: 760-765.
- 38.Sima N.A.K, Ebadi A, Reiahisamani N, Rasekh B. Bio-based remediation of petroleum-contaminated saline soils: Challenges, the current state-of-the-art and future prospects, *J environ manag.* 2019; 250: 109476.
- 39.Li X, Wang X, Wan L, Zhang Y, Li N, Li D, Zhou Q. Enhanced biodegradation of aged petroleum hydrocarbons in soils by glucose addition in microbial fuel cells, *J Chem Technol Biotechnol.* 2016; 91(1): 267-275.
- 40.Hu G, Li J, Zeng G. Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: a review, *J hazard mater.* 2013; 261: 470-490.
- 41.Khan AG. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation, *J trace Element Medic Biolog.* 2005; 18(4): 355-364.
- 42.Hosami A, Zohri S, Latifi Navid S, Eskandari H. Fabrication and investigation of carbon nitride quantum dots functionalized with phenylboronic acid, *The 5th Inter Conferenc Biolog Earth Sci,* 2023.
- 43.Wang W, Zhang D, Ji Zh, Shao D, Sun P, Duan J. High efficiency photocatalytic degradation of indoor formaldehyde with silver-doped ZnO/g-C₃N₄ composite catalyst under the synergistic effect of silver plasma effect and heterojunction. *Optical Mater.* 2021; 111: 110721.
- 44.Javid N, Abolhasani M H. Evaluation of the Efficiency of Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles in the Removal of Oil from Synthetic Wastewater: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2021; 20 (4): 387-404.
- 45.Shokranian S Yousefzadi M, Amrollahi Biuki N. Investigating the bio removal ability of crude oil by bacteria isolated from oil-contaminated soil around Shiraz refinery. *Aquatic Physiolog Biotechnol.* 2024; 12(1): 109-130.
- 46.Sui X, Li Y, Wang X, Yu L, Wang J, Ji H. Genomics and degradation law of *Acinetobacter junii* in response to petroleum pollution. *Proces Biochem.* 2023; 126: 41-50. doi: 10.1128/mra.01076-23.
- 47.Ravindra Arya P, Haq S. A. Chapter 4 - effects of xenobiotics and their biodegradation in marine life, in *Smart bioremediation technologies.* Ed. Bhatt P. Academic Press (UK). 2019; 63-81. doi: 10.1016/B978-0-12-818307-6.00004-4.