
LAJU DEGRADASI SENYAWA HIDROKARBON YANG MENCEMARI TANAH OLEH *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) DENGAN STIMULASI FERTILIZER

(diterima 23 Februari 2022, diperbaiki 2 Maret 2022, disetujui 31 Maret 2022)

Ade Sumiardi

Program Studi Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik, Universitas Banten Jaya

Jl.Ciwaru II No.73 Kota Serang 42117

email korespondensi: adesumiardi@unbaja.ac.id

Abstract. *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) is one of soil bacterium that produce biosurfactant as a secondary metabolite. It was isolated and identified for its capacity to utilize the fraction of hydrocarbons. The purpose of this research is to analyze degradation activity of *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) on hydrocarbon contaminated soil. *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) was used as a model to degrade hydrocarbon and it was detected by GC-MS. Adding of fertilizer as a nutrient into soil is believed to enhanced in situ biodegradation by stimulating the growth of bacterium to degrade hydrocarbon contaminated soil. Analysis of Gas Chromatography – Mass Spectroscopy showed that degradation of hydrocarbon by *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) has been succeeded respectively. It means that *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) was be able to degrade hydrocarbon contaminated soil.

Keywords: Biodegradation; fertilizer; *Salipiger bermudensis* (DQ 178660); hydrocarbon.

Abstrak. *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) merupakan *halofilic bacterium*, bersifat negatif terhadap pengecatan gram, uji fosfatase dan *spore forming* serta bersifat positif terhadap uji katalase dan uji motilitas. Penelitian bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) dalam proses degradasi senyawa hidrokarbon pada tanah tercemar hidrokarbon yang distimulasi *fertilizer*. Penelitian diawali dengan preparasi sampel tanah tercemar hidrokarbon, pembuatan prekultur dan kultur *Salipiger bermudensis* (DQ 178660), ekstraksi senyawa hidrokarbon serta analisis senyawa hidrokarbon hasil degradasi menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS). Hasil penelitian analisis degradasi senyawa hidrokarbon menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS) menunjukkan bahwa hidrokarbon yang mencemari tanah di kawasan PT. Krakatau Steel Cilegon Banten terdegradasi menjadi fraksi-fraksi penyusun yang lebih sederhana. *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) memiliki kemampuan merombak senyawa hidrokarbon pada tanah tercemar minyak bumi.

Kata Kunci: Biodegradasi; fertilizer; *Salipiger bermudensis* (DQ 178660); hidrokarbon.

© hak cipta dilindungi undang-undang

PENDAHULUAN

Biodegradasi adalah proses penguraian suatu polutan organik beracun menjadi senyawa yang lebih sederhana dan tidak beracun menggunakan jasa mikroorganisme. Variabel penting yang mempengaruhi keberhasilan biodegradasi pada lokasi tercemar dapat ditentukan berdasarkan jumlah pencemar, ketersediaan mikroorganisme untuk menguraikan senyawa pencemar, stimulasi nutrisi yang memadai dan parameter lingkungan lainnya yang berperan (Goswami *et al.*, 2018). Keberhasilan proses biodegradasi lahan tercemar hidrokarbon minyak bumi juga dipengaruhi oleh banyak faktor, termasuk unsur hara, pH, suhu, kelembaban, oksigen, sifat tanah dan keberadaan kontaminan (Al-Sulaimani *et al.*, 2011).

Laju degradasi mikroorganisme terhadap minyak bumi sangat tergantung pada beberapa faktor yaitu faktor fisik dan lingkungan, faktor konsentrasi dan perbandingan berbagai struktur hidrokarbon yang ada serta kemampuan mikroorganisme pendegradasi (Nugroho, 2006). Menurut Gordon (1994), ada tiga faktor yang mempengaruhi biodegradasi yaitu mikroorganisme, nutrien dan faktor lingkungan.

Sejalan dengan pendapat Gordon (1994), Baker & Herson (1994) menyebutkan bahwa proses biodegradasi senyawa hidrokarbon dipengaruhi oleh faktor pembatas ekologi yaitu 1). faktor kimia kaitannya dengan ketersediaan suatu nutrient, tidak adanya senyawa penunjang pertumbuhan dan tidak ada induktor enzim yang diperlukan; 2) faktor lingkungan berkaitan dengan kondisi fisik yang ekstrim (pH, suhu, redoks potensial) dan ketidaktersediaan donor elektron; 3). faktor mikroorganisme kaitannya dengan ketidakberadaan populasi mikroorganisme pendegradasi polutan hidrokarbon dan kepadatan populasi mikroorganisme pendegradasi polutan hidrokarbon yang rendah.

Ada tiga prinsip umum dalam praktik biodegradasi, pertama proses biostimulasi melalui optimasi penambahan nutrisi seperti penambahan unsur hara dan penyediaan oksigen (aerasi). Kedua proses bioaugmentasi melalui penambahan bakteri eksogen. Ketiga gabungan biostimulasi dan bioaugmentasi melalui penambahan jumlah dan jenis populasi mikroorganisme, ketersediaan nutrisi, dan aklimatisasi kondisi lingkungan yang mengarah pada peningkatan pertumbuhan mikroorganisme dan degradasi kontaminan yang efisien (Agarry & Owabor, 2011). Studi menunjukkan bahwa biostimulasi, bioaugmentasi, atau kombinasi keduanya adalah efektif dalam mengurangi

konsentrasi polutan di tanah, terutama hidrokarbon (Adeyemo *et al.*, 2015; Safdari *et al.*, 2018).

Biodegradasi melalui pendekatan biostimulasi merupakan teknik remediasi yang sangat efisien, hemat biaya dan ramah lingkungan. Biostimulasi mengacu pada penambahan nutrisi yang membatasi laju seperti fosfor, nitrogen, oksigen, donor elektron ke lokasi sangat tercemar untuk merangsang mikroorganisme yang ada dalam menguraikan senyawa kontaminan berbahaya dan beracun (Adams *et al.*, 2015).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa biodegradasi melalui pendekatan biostimulasi memberikan pengaruh yang lebih tinggi pada efisiensi biodegradasi senyawa hidrokarbon dibanding proses bioaugmentasi. Penambahan nitrogen dan fosfor, bersamaan dengan inokulasi mikroorganisme dan aerasi dapat menciptakan kondisi yang optimal untuk pertumbuhan mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak bumi (TPH = *Total Petroleum Hydrocarbon*) (Yaman, 2020). Hasil penelitian lain menyebutkan bahwa dibandingkan dengan atenuasi alami, biostimulasi mampu menghilangkan lebih banyak polutan (Simpanen *et al.*, 2016).

Studi lain juga menyebutkan bahwa penambahan padatan hayati (bahan organik kaya nutrisi) yang diperoleh dari pengolahan limbah domestik dan pupuk anorganik, kaya nitrogen dan fosfor mampu meningkatkan laju degradasi hidrokarbon minyak bumi hingga 96%, penerapan bahan organik kaya hara tertentu juga dapat meningkatkan proses biodegradasi (Sarkar *et al.*, 2016). Oleh karena itu, Penelitian ini menjadi penting untuk mengetahui kemampuan bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) dalam proses degradasi senyawa hidrokarbon pada tanah tercemar hidrokarbon yang distimulasi *fertilizer*.

METODE

Penelitian diawali dengan proses peremajaan bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) yang sebelumnya dalam keadaan dorman. Selanjutnya berturut-turut dilakukan proses skrining dan karakterisasi serta identifikasi senyawa hasil degradasi oleh bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) yang distimulasi *fertilizer*.

Treatment Tanah Tercemar Oleh *Salipiger bermudensis* (DQ 178660)

Sampel tanah yang sudah dibersihkan dari kotoran, dilakukan penimbangan masing-masing sebanyak 2 kg kemudian dimasukkan pada 8 polibag. Bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) masing-masing sebanyak 200 mL dituangkan kedalam setiap

polibag yang berisi tanah tercemar senyawa hidrokarbon kemudian dilakukan homogenisasi. Masing-masing polibag yang sudah berisi tanah tercemar dan bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) ditambahkan *fertilizer* merk Dekastar dengan rasio NPK 18:11:10 sebanyak 20 g untuk setiap polibag kecuali polibag kontrol. Dilakukan sampling sebanyak 200 g untuk analisis suhu dan pH setiap 5 hari kemudian disimpan di ruang pendingin bersuhu 0°C untuk kepentingan analisis degradasi senyawa hidrokarbon oleh bakteri dan konsorsium bakteri.

Ekstraksi Senyawa Hidrokarbon Hasil Degradasi

Sampel tanah tercemar senyawa hidrokarbon ditimbang sebanyak 3 g, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi bertutup *teflon*, ditambahkan dichloromethane (CH_2Cl_2) 6 mL selanjutnya divortex selama 15 menit sampai homogen dan gasnya dibuang keudara. Dilakukan penggojokan selama 15 menit untuk memisahkan senyawa hidrokarbon dari campuran tanah dan gasnya dibuang keudara. Didiamkan selama 10 menit kemudian dilakukan penyaringan dengan kertas saring *Whatman* nomor 1. Penyaringan dilakukan sebanyak dua kali untuk mendapatkan senyawa hidrokarbon. Kemudian ditambahkan sodium anhidrat sebanyak 2 g dan dikocok. Larutan dipindahkan ke botol vial untuk kepentingan analisis degradasi senyawa hidrokarbon.

Analisis Senyawa Hidrokarbon dengan GC-MS

Setiap sampel yang digunakan sebanyak 2 μL , kemudian diinjeksikan dalam GC-MS dengan kondisi sebagai berikut:

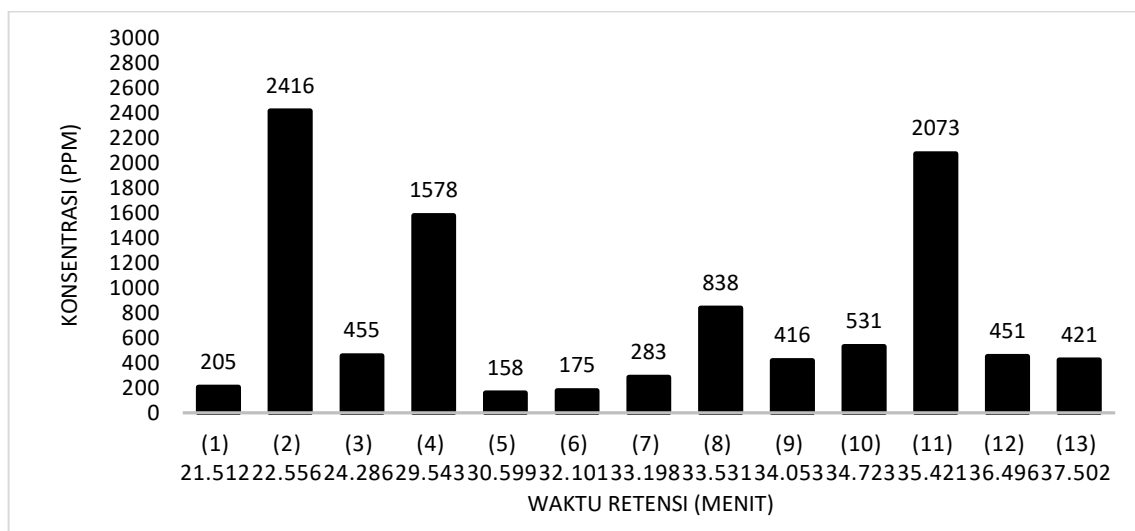
Karakteristik GC-MS (Shimadzu tipe QP2010S, suhu injektor 280 °C, injektor *mode split*, waktu pengambilan sampel 1 menit, suhu kolom 40 – 270°C dengan pengaturan suhu awal 40°C ditahan selama 5 menit, dan waktu 10 menit untuk mencapai suhu 270°C (23°C/menit) ditahan selama 60 menit, sehingga total waktu program 88 menit, suhu detektor 280°C, suhu interval 250°C, gas pembawa He, tekanan utama 500-900, *flow control mode pressure*, tekanan 10,9 Kpa, total *flow* 58,8 mL/m, jenis kolom kapiler, aliran kolom 0,55 mL/m, percepatan linier 26,0 cm/dt, aliran pembersihan 3.0 mL/m, *split ratio* 99,8, jenis kolom Rtx-5MS, panjang kolom 30.00 m, ketebalan 0.25 μm , diameter 0,25 mm, dan jenis pengion EI (*Electron Impact*) 70 eV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian studi laju degradasi senyawa hidrokarbon pada tanah tercemar dengan perlakuan *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) adalah sebagai berikut:

Awal Perlakuan

Hasil analisis GC-MS senyawa hidrokarbon pada tanah tercemar sebelum perlakuan dengan *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Konsentrasi (ppm) *peak* hasil analisis GC-MS senyawa hidrokarbon sebelum perlakuan dengan *Salipiger bermudensis* (DQ 178660).

- (1) 2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione
- (2) Dibenzothiophene
- (3) Trihexadecyl borate
- (4) 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester
- (5) 1,2-Benzenediol
- (6) 2-Amino-1-(*o*-methoxyphenyl) propane
- (7) Phenethylamine
- (8) 4-Dicyanomethylene-2-(4dimethylaminostyryl) -6-phenyl-4H-pyran
- (9) Cyclotrisiloxane, hexamethyl-
- (10) Acetyc acid, 3-(6-aminopurine-9-yl)prophyl ester
- (11) Benzenemethanol, 3-hyroxy-alpha
- (12) Acenaphthene dione, methylamine, N-oxide
- (13) Trans 1,2-bis (trichlorosily) ethylene

Gambar 1 menunjukkan ada 13 senyawa hidrokarbon ditemukan pada pengamatan awal perlakuan. Berdasarkan volume konsentrasi dan luas area, senyawa *Dibenzothiophene* adalah hidrokarbon terdeteksi paling besar volume konsentrasi dan luas area (konsentrasi 2416,00 ppm; luas area 24.16%). Senyawa *1,2-Benzediole* adalah

hidrokarbon terdeteksi paling kecil volume konsentrasi dan luas areanya (konsentrasi 158,00 ppm; luas area 1.58%).

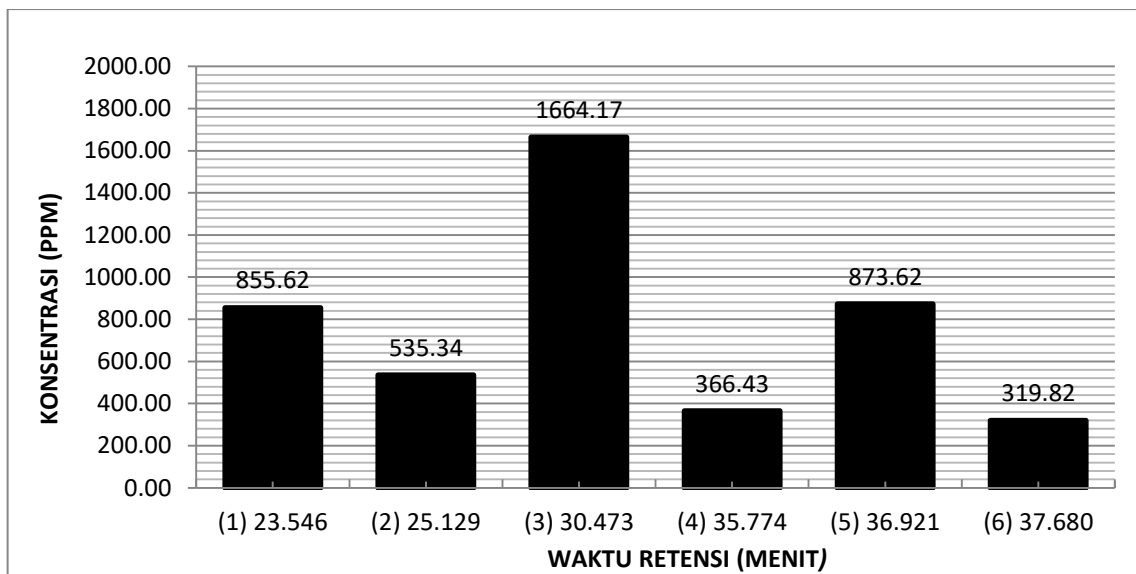
Senyawa *Dibenzothiophene* dan senyawa *1,2-Benzediol* adalah senyawa hidrokarbon aromatik dan poliaromatik dengan struktur siklik bervariasi mengandung nitrogen organik dan oksigen yang satu sama lain saling berikatan. Arun *et al.*, (2011), mengatakan bahwa senyawa hidrokarbon yang terkandung dalam minyak bumi merupakan entitas heterogen, terdiri dari rantai hidrokarbon panjang yang bervariasi dengan kandungan ratusan senyawa hidrokarbon yang berbeda seperti parafin, naphthenes, aromatik serta senyawa sulfur organik, senyawa nitrogen organik dan oksigen yang mengandung hidrokarbon (fenol).

Gambar 1 memperlihatkan bahwa senyawa terdeteksi GC-MS seluruhnya adalah senyawa *Poly Aromatic Hydrocarbons* (PAHs). PAHs adalah kelompok besar senyawa hidrokarbon yang memiliki kemiripan karakteristik. Ivey (2006) melaporkan bahwa senyawa PAHs meliputi senyawa berat molekul tinggi dengan tingkat solubilitas air yang rendah, memiliki 2 sampai 5 cincin aromatik yang mengikat dan relatif lebih sulit terdegradasi secara biologi.

Degradasi PAHs dengan struktur benzene lebih dari 3 umumnya sulit untuk dimineralisasi oleh mikroorganisme karena rendahnya daya solubilitas dan tingginya daya afinitas menjadi senyawa organik cair. Tingkat solubilitas air yang rendah dan daya afinitas elektron yang tinggi pada PAHs umumnya menjadi faktor pembatas keberadaan mikroorganisme didalam tanah karena mikroorganisme tidak dapat menggunakan sumber karbon pada PAHs untuk pertumbuhannya sehingga proses metabolisme terganggu, akibatnya mikroorganisme akan mengalami kematian.

Bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660)

Hasil analisis GC-MS senyawa hidrokarbon dengan perlakuan *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) hari ke-15 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Konsentrasi (ppm) *peak* hasil analisis GC-MS senyawa hidrokarbon dengan perlakuan *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) hari ke-15.

- (1) *Phenol, pentafluoro-*
- (2) *1H-Purin-6-amine, N-methyl-*
- (3) *Phthalic acid, 5-methoxy-3-methylepent-3-yl octyl ester*
- (4) *1,1-Dithopphenyl-2-ethyl-cyclobutane*
- (5) *Dehydroxy-isocalamendiol*
- (6) *Trans 1,2-Bis (Trichlorosily) ethylene*

Gambar 2 menunjukkan ada 6 senyawa hidrokarbon ditemukan pada pengamatan hari ke-15. Berdasarkan volume konsentrasi dan luas area, senyawa *Phthalic acid, 5-methoxy-3-3-methylpent-2- octylester* adalah hidrokarbon terdeteksi paling besar volume konsentrasi dan luas area (konsentrasi 1664,17 ppm; luas area 3,06%). Senyawa *Trans 1,2-Bis (Trichlorosily) ethylene* adalah hidrokarbon terdeteksi paling kecil volume konsentrasi dan luas area (konsentrasi 319,82 ppm; luas area 6,93%).

Biodegradasi senyawa hidrokarbon dengan perlakuan *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) terjadi pada substrat tertentu saja, substrat *Trans 1,2-Bis (Trichlorosily) ethylene* masih ditemukan pada pengamatan hari ke-15. Adam dan Jackson (2006), melaporkan bahwa strain mikroorganisme memiliki kemampuan degradasi hanya berkisar pada substrat terbatas dan sedikit membantu dalam mengkonsumsi senyawa hidrokarbon yang ditemukan dalam minyak bumi karena senyawa hidrokarbon berbeda dalam volatilitas, kelarutan dan kerentanan terhadap degradasi. Enzim yang dihasilkan satu mikroorganisme untuk degradasi senyawa hidrokarbon sangat terbatas.

Hasil analisis GC-MS pada hari ke-15 ditemukan enam senyawa hidrokarbon. Hasil analisis GC-MS pada hari ke-30 sudah tidak ditemukan senyawa hidrokarbon. Hilangnya *peak* (puncak) pada kromatogram menunjukkan adanya aktivitas *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) dalam menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon untuk proses pertumbuhan. Kemampuan *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) dalam merombak senyawa hidrokarbon ditunjukkan oleh penyusutan konsentrasi senyawa hidrokarbon melalui pengamatan hilangnya *peak* (puncak) pada kromatogram.

Penambahan fertilizer pada tanah mampu mengoptimalkan proses degradasi hidrokarbon oleh *Salipiger bermudensis* (DQ 178660). Ketersediaan fertilizer sebagai stimulan mempermudah akselerasi degradasi karena dapat meningkatkan kinerja *Salipiger bermudensis* (DQ 178660). Hal ini dapat diamati berdasarkan hilangnya *peak* (puncak). Proses biodegradasi senyawa hidrokarbon oleh *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) diduga kurang dari 14 hari masa inkubasi. Adebusoje *et al.*, (2006) melaporkan bahwa degradasi senyawa hidrokarbon oleh mikroorganisme dapat terjadi pada waktu kurang dari 14 hari terutama untuk hidrokarbon alifatis.

Biodegradasi hidrokarbon paling cepat dan lengkap umumnya terjadi dalam kondisi aerobik. Peran *fertilizer* dapat meningkatkan ketersediaan unsur nitrogen tanah sebagai prekursor pembentukan protein bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660). *Fertilizer* juga meningkatkan ketersediaan fosfor dan kalium yang merupakan prekursor pembentukan organel sel bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) sehingga kemampuan degradasi hidrokarbon menjadi lebih tinggi.

Tahap awal degradasi senyawa hidrokarbon secara aerobik terjadi melalui proses oksidasi dan aktivasi penggabungan oksigen yang merupakan reaksi enzimatik dikatalisis oleh oksigenase dan peroksidase. Jalur degradasi perifer merubah senyawa hidrokarbon secara bertahap memasuki proses metabolisme intermediet pada siklus asam trikarboksilat. Selanjutnya terjadi proses biosintesis melalui pemanfaatan ion NH_4^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} dan Fe^{3+} menghasilkan biomassa sel untuk pertumbuhan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Laju degradasi senyawa hidrokarbon pada tanah tercemar yang distimulasi *fertilizer* menunjukkan bahwa bakteri *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) memiliki kemampuan dalam merombak senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan.
2. Hasil analisis GC-MS senyawa hidrokarbon pada tanah tercemar menunjukkan bahwa senyawa paling awal terdegradasi oleh *Salipiger bermudensis* (DQ 178660) adalah senyawa dengan struktur rantai lurus (alkana), selanjutnya senyawa dengan struktur rantai bercabang dan terakhir senyawa dengan struktur rantai siklik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Dwi Susilaningsih, M. Pharm. Selaku Kepala Laboratorium Biorekayasa Lingkungan Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia atas segala fasilitas dan logistik yang disediakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams G.O., P.T. Fufeyin, & S.E. Okoro. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: a Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*. 3 (1) : 28–39.
- Adams, G.O., P. Tawari-Fufeyin, & E. Igelenyah. (2014). Bioremediation of Spent Oil Contaminated Soils Using Poultry Litter. *Research Journal in Engineering and Applied Sciences*. 3 (2) 124-130.
- Adams, P., & P.P. Jackson. (2006). Bioremediation of Oil Spills, Theory and Practice. In the *Proceedings of Int. Seminar on Petroleum Industry and the Nigerian Environ.*, 30-42.
- Adebusoye, S.A., M.O. Ilori, O.O. Amund, O.D. Teniola, & S.O. Olatope. (2006). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons in a Polluted Tropical Stream. *J. American Sci.*, 2 : 3.
- Adeyemo A.J., J.W. Mello, & S.O. Agele. (2015). Bioremediation of Three Brazilian Soils Contaminated with Used Lubricating). *Int. J. Plant Soil Sci*. 4 (4) : 366–76.
- Agarry S.E, & C.N. Owabor. (2011). Anaerobic Bioremediation of Marine Sediment Artificially Contaminated with Anthracene and Naphthalene. *Environ. Technol*. 32 : 1375-1381.

- Al-Sulaimani, S., Y. Joshi, S. Al-Wahaibi, N. Al-Bahry, A. Elshafie, & A. Al-Bemani. (2011). Microbial Biotechnology for Enhancing Oil Recovery: Current Developments and Future Prospects. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering Journal*, 1 (2) : 147-158.
- Arun, K., M. Ashok, & S. Rajesh. (2011). Crude Oil PAH Constitution, Degradation Pathway and Associated Bioremediation Microflora: An Overview. *Int. J. Environ. Sci.*, Vol. 1 : 7.
- Baker, C., & D. Herson. (1994). Bioremediation. *McGraw-Hill*. Inc New York. USA.
- Banat, I.M., B.S. Makkar and S.S. Cameotra. (2012). Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 : 495-508.
- Das, N., & P. Chandran. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants : an Overview. *Biotechnol. Res. Int.*, Article ID 941810.
- Ivey, G.A. (2006). Surfactant Enhanced Bioremediation – *Remediation Weekly*.
- Gordon, Ray. (1994). Bioremediation and Its Application to Exxon Valdez Oil Spill in Alaska. <http://www.geocities.com/capecanaverallab/2094>.
- Goswami, M., C. Poulomi, M. Koushik, M. Garbita, B. Purnita, D. Samrat, & T. Prosun. (2018). Bioaugmentation and Biostimulation: a Potential Strategy for Environmental Remediation. 6 (5) : 223–231.
- Macaulay, B.M., & D. Rees. (2014). Bioremediation of Oil Spills : A Review of Challenges for Research Advancement. *Ann. Env. Sci.* 8 : 9–37
- Nugroho, A. (2006). Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi. *Graha Ilmu*, Yogyakarta.
- Safdari, M.S., H.R. Kariminia, M. Rahmati, F. Fazlollahi, A. Polasko, S. Mahendra, W.V. Wilding, & T.H. Fletcher. (2018). Development of Bioreactors for Comparative Study of Natural Attenuation, Biostimulation, and Bioaugmentation of Petroleum-Hydrocarbon Contaminated Soil. *J. Hazard Mater.* 15 (8) : 270-342.
- Sarkar, J., S.K. Kazy, A. Gupta, A. Dutta, B. Mohapatra , A. Roy, P. Bera, A. Mitra, & P. Sar. (2016). Biostimulation of Indigenous Microbial Community for Bioremediation of Petroleum Refinery Sludge. *J. Front. Microbiol.* 7 : 1407.
- Simpanen S., M. Dahl, M. Gerlach, A. Mikkonen, V. Malk, J. Mikola, & M. Romantschu. (2016). Biostimulation Proved to Be The Most Efficient Method in The Comparison of in Situ Soil Remediation Treatments After a Simulated Oil Spill Accident. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 : 25024.
- Yaman, C. (2020). Performance and Kinetics of Bioaugmentation, Biostimulation, and Natural Attenuation Processes for Bioremediation of Crude Oil-Contaminated Soils. *J. Processes.* 8 : 883.