

## Bakteria Tempatan untuk Perolehan Semula Minyak Mentah dari Sisa Petroleum (Local Bacteria for Crude Oil Recovery from Petroleum Waste)

Nurul Atiqah Mohd Zainey<sup>a</sup>, Ahmad Razi Othman<sup>a\*</sup>, Nur Nadhirah Ramli<sup>a\*</sup>, Siti Rozaimah Sheikh Abdullah<sup>a</sup>, Hassimi Abu Hasan<sup>a,b</sup>  
 & Nur 'Izzati Ismail<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemical and Process Engineering, Faculty of Engineering and Built Environment, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>b</sup>Research Centre for Sustainable Process Technology (CESPRO), Faculty of Engineering and Built Environment, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

\*Corresponding author: [nurnadhirahramli@ukm.edu.my](mailto:nurnadhirahramli@ukm.edu.my)

Received 30 September 2025, Received in revised form 7 February 2026  
 Accepted 7 March 2026, Available online 30 May 2026

### ABSTRACT

*Petroleum is an important raw element utilised in a variety of sectors, including transportation, dyeing, cleaning, and polymers. However, its extraction, refining, and storage generate leftovers that harm the environment and present enormous waste management difficulties to the oil industry. Therefore, in order to obtain residues of crude oil in reservoirs, biological methods through microbial enhanced oil recovery (MEOR) using bacteria are essential. Biosurfactants made from ecologically benign microorganisms are employed as agents in MEOR because of their hydrophobic and hydrophilic characteristics, which make them appropriate for surfaces in a variety of situations, including water and oil. Thus, this study was carried out to cultivate and determine the morphology of Bacillus sp. and evaluate the effectiveness of the bacteria in the recovery of crude oil. Bacillus sp. bacteria are cultivated in nutrient broth for one day at 30 °C and subsequently using scanning electron microscope (SEM) analysis for morphological characteristics purposes. The GC-FID chromatographic analysis is used to verify the number of hydrocarbons recovered from petroleum sludge. Through SEM analysis, Bacillus sp. exposed to petroleum had a shrinkage in the cell shape. The results of GC-FID analysis revealed a potential of 91.85% long-chain hydrocarbon acquisition after the 10 days of treatment. After the 10-days, analytical data revealed that the short chain of hydrocarbons had increased in comparison to before the treatment. Overall, this work demonstrates that Bacillus sp. has the ability to extract crude oil from petroleum waste, which may subsequently be used in MEOR technology on a wider scale.*

*Keywords: Biological treatment; bacteria; bacillus; Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR); petroleum waste*

### ABSTRAK

*Petroleum adalah bahan mentah utama yang sering digunakan dalam pelbagai industri kerana kegunaannya dalam pengangkutan, pewarnaan, pembersihan dan polimer. Namun, sisa yang dihasilkan daripada proses penghasilan, penapisan dan penyimpanan petroleum telah mencemarkan alam sekitar dan mengakibatkan industri petroleum sering menghadapi masalah dalam pengurusan sisa. Oleh itu, untuk memperoleh sisa minyak mentah dalam takungan, kaedah biologi melalui perolehan minyak tertingkat mikrob (MEOR) yang menggunakan bakteria adalah penting. Biosurfaktan yang dihasilkan daripada mikroorganisma yang mesra alam sekitar digunakan sebagai agen dalam MEOR kerana sifat hidrofobik dan hidrofiliknya yang sesuai untuk permukaan dalam pelbagai keadaan, seperti minyak dan air. Oleh itu kajian ini dijalankan bagi mengkultur dan menentukan morfologi bakteria tempatan, Bacillus sp. dan menilai keberkesanan bakteria dalam perolehan semula minyak mentah. Bakteria Bacillus sp. dikultur dalam kaldu nutrien selama satu hari pada suhu 30°C dan seterusnya menggunakan analisis mikroskop pengimbas elektron (SEM) bagi tujuan morfologi. Analisis kromatografi gas-pengesan pengionan nyala (GC-FID) digunakan untuk mengesahkan jumlah hidrokarbon di dalam enap cemar petroleum. Melalui analisis SEM, Bacillus sp. yang terdedah kepada enap*

cemar petroleum mengalami pengecutan pada bentuk sel tersebut. Hasil analisis GC-FID mendapati potensi sebanyak 91.85% perolehan hidrokarbon rantaian panjang selepas hari ke-10 rawatan. Selepas hari ke-10, data analisis mendapati rantaian hidrokarbon pendek adalah lebih banyak jika dibandingkan sebelum rawatan dijalankan. Secara keseluruhan, kajian ini dapat membuktikan bahawa *Bacillus sp.* mempunyai potensi dalam perolehan semula minyak mentah dari enap cemar petroleum seterusnya dapat diaplikasikan dalam teknologi MEOR pada skala yang lebih besar.

*Kata kunci:* Rawatan biologi; bakteria; bacillus; Perolehan Minyak Tertingkat Mikrob (MEOR); sisa petroleum

## PENDAHULUAN

Penghasilan haba melalui bahan bakar seperti kayu, minyak ikan paus, atau bahan bakar fosil seperti arang batu dan pelbagai jenis minyak mentah seperti petrol dan tanah telah digunakan secara meluas di pasaran. Malah, sumber fosil masih menjadi sumber utama untuk 86% bekalan tenaga dunia dalam beberapa dekad akan datang (Raouf et al. 2024). Walau bagaimanapun, sejak Revolusi Perindustrian, bahan bakar fosil telah menjadi sumber tenaga baharu yang penting (Geetha et al. 2018). Hal ini kerana, berbanding dengan sumber tenaga lain seperti gas asli dan arang batu, tenaga fosil seperti petroleum mendapat permintaan yang tinggi dan menjadi pemangkin kepada kemajuan dalam teknologi, sosial, ekonomi, dan pembangunan (Karthick et al. 2019; Ritchie & Rosado 2022). Oleh itu, pengekstrakan minyak mentah sering dilakukan bagi memenuhi keperluan pengguna di pasaran. Kaedah pengekstrakan minyak dibahagikan kepada tiga peringkat, iaitu peringkat primer, sekunder, dan tertier atau dikenali sebagai perolehan minyak tertingkat (*Enhanced Oil Recovery*) (Gbadamosi et al. 2019). Perolehan minyak tertingkat merupakan rawatan yang penting untuk dilaksanakan bagi memulihkan sisa minyak mentah dalam takungan. Ini disebabkan oleh, kadar perolehan minyak pada peringkat primer dan sekunder sangat rendah dan selebihnya akan kekal di lapisan takungan minyak sebagai sisa minyak (Tang et al. 2023; Wu et al. 2022). Secara khusus, pada peringkat pengekstrakan primer, pengeluaran minyak adalah terhad kerana hanya minyak yang berada dalam takungan dapat diekstrak, manakala minyak yang terperangkap di celahan batuan tidak dapat dikeluarkan (Melikoglu 2026). Oleh itu, untuk mencapai pengekstrakan yang menyeluruh, kaedah pengekstrakan minyak peringkat tertier perlu dijalankan selepas fasa perolehan minyak pertama dan kedua.

Perolehan minyak tertingkat atau peringkat tertier boleh ditambah baik dengan pengenalan teknologi mikroorganisma iaitu kaedah perolehan minyak tertingkat mikrob (*Microbial Enhanced Oil Recovery*). Secara umumnya, penggunaan bakteria dalam proses perolehan minyak tertingkat merupakan kaedah '*in-situ*', di mana bakteria dimasukkan ke dalam takungan untuk membiak secara aktif dan seterusnya membantu meningkatkan perolehan minyak secara semula jadi (Sharma, Lavania & Lal 2023). Berikutnya tahap keberkesanan yang tinggi, kos

yang rendah, dan kesan alam sekitar yang minimum, kaedah biologi menggunakan mikroorganisma diiktiraf sebagai kaedah yang sesuai oleh kalangan penyelidik. Mikroorganisma seperti bakteria (Othman, Zhao & Xuc 2025) genus *Pseudomonas*, *Bacillus*, dan *Acinetobacter* yang menghasilkan biosurfaktan sering digunakan dalam teknologi MEOR kerana keberkesananannya dalam mempertingkatkan perolehan minyak mentah dari sisa petroleum dengan mengurangkan ketegangan permukaan antara air dan minyak mentah yang berbeza keadaan (Purwasena et al. 2024; Samanta 2021). Secara khususnya, dengan menukar hidrokarbon (Falih, Mohd Razali & Abdul Maulud 2025) rantai panjang kepada hidrokarbon rantai pendek, biosurfaktan mempunyai keupayaan untuk mengurangkan ketegangan permukaan dan ketegangan antara dua muka, mengubah kebolehbasaan dan membentuk emulsi sama ada antara minyak dan air atau air dan minyak untuk mengangkut minyak ke takungan pengeluaran (Aghaei et al. 2023). Biosurfaktan akan menghasilkan biofilem secara luar sel dan akan mempertingkatkan interaksi antara batuan takungan dan formasi antara air dan minyak (Lourdes et al. 2022). Khususnya, biosurfaktan tergolong dalam dua kategori utama: berat molekul tinggi dan berat molekul rendah. Biosurfaktan berat molekul tinggi biasanya lebih kompleks dan terdiri daripada protein, lipoprotein, lipopolisakarida dan heteropolisakarida. Dalam proses perolehan minyak, biosurfaktan seperti glikolipid dan lipopeptida sering digunakan kerana keupayaannya untuk mengurangkan ketegangan permukaan dan ketegangan antara muka antara minyak dan air (Andrade et al. 2024). Apabila ketegangan ini berkurang, minyak yang terperangkap dalam liang-liang batuan takungan menjadi lebih mudah bergerak dan seterusnya lebih senang dikeluarkan. Secara tidak langsung, penggunaan biosurfaktan membantu meningkatkan keberkesanan proses perolehan minyak tertingkat (EOR) kerana ia memudahkan pergerakan minyak keluar dari takungan. Selain itu, biosurfaktan juga dianggap lebih mesra alam berbanding bahan kimia sintetik, menjadikannya pilihan yang semakin mendapat perhatian dalam industri petroleum. Jenis biosurfaktan ini terutamanya bertanggungjawab untuk mewujudkan emulsi yang stabil antara minyak-dalam-air dan air-dalam-minyak (Sharma, Lavania & Lal 2023). Sebaliknya, biosurfaktan berat molekul rendah terdiri daripada eksopolisakarida dan

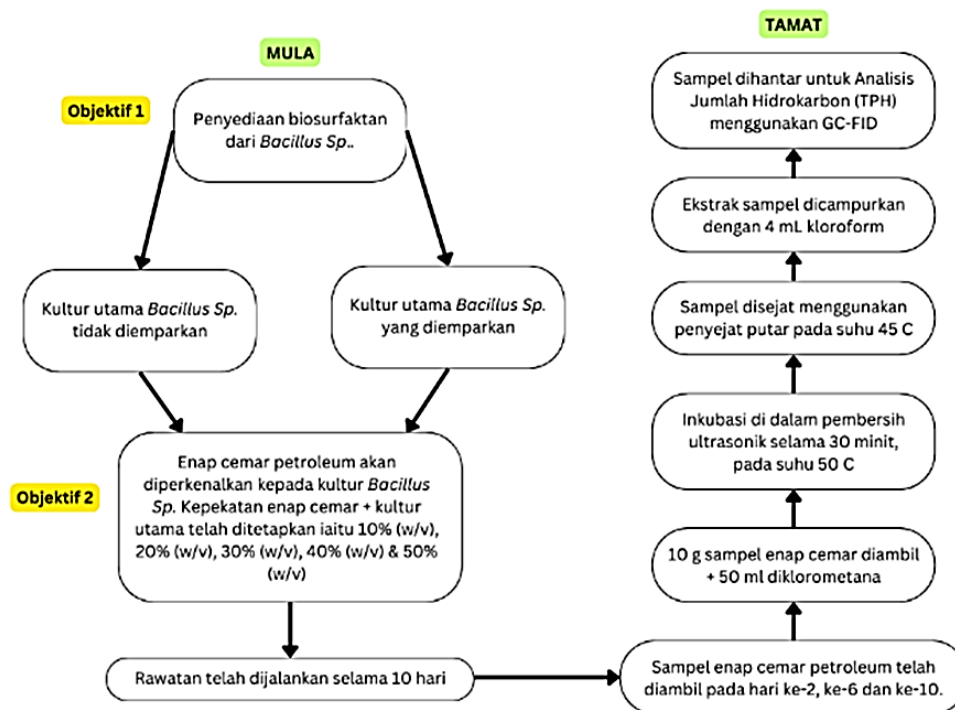
berpotensi untuk mengurangkan ketegangan permukaan antara dua cecair yang tidak saling larut (Sharma, Lavania & Lal 2023).

Walaupun teknologi MEOR menunjukkan potensi yang besar dalam meningkatkan perolehan semula minyak, pelaksanaannya di Malaysia masih terhad dan kebanyakannya tertumpu kepada penggunaan bakteria pada skala makmal. Aplikasi teknologi ini pada peringkat lapangan atau skala industri masih belum dilaksanakan secara meluas, sekali gus mengekang pemahaman yang menyeluruh terhadap keberkesanan sebenar MEOR dalam konteks takungan minyak tempatan. S Sehubungan itu, kajian ini dijalankan bagi mengkultur serta mencirikan morfologi bakteria *Bacillus* sp., di samping menilai keberkesanannya dalam meningkatkan perolehan semula

minyak mentah. Dapatan kajian ini diharapkan dapat menyediakan data asas yang penting berkaitan bakteria tempatan, yang boleh dimanfaatkan oleh penyelidik pada masa hadapan untuk tujuan pengoptimuman dan eksploitasi teknologi MEOR di Malaysia pada tahap yang lebih maju. Secara tidak langsung, kajian ini berpotensi menyumbang kepada pembangunan strategi pengekstrakan minyak yang lebih berkesan dan mampan.

## METODOLOGI

Carta alir keseluruhan kajian bagi objektif pertama (pengkulturan bakteria) dan kedua (perolehan semula minyak mentah) ditunjukkan dalam Rajah 1.



RAJAH 1. Carta alir kajian

### PENYEDIAAN AGAR DAN KALDU NUTRIEN

Sebanyak 13 g agar nutrien (R&M, Malaysia) ditimbang dengan teliti dan dicampurkan ke dalam 1 L air suling sebelum dipanaskan secara beransur-ansur sehingga serbuk agar larut sepenuhnya dan menghasilkan larutan yang homogen. Proses pemanasan ini penting bagi memastikan semua komponen medium terlarut dengan sempurna tanpa pembentukan mendakan. Seterusnya, larutan tersebut disterilkan menggunakan autoklaf (TOMY SX-700, Jepun) pada suhu 121 °C selama satu jam bagi memastikan tiada

pencemaran mikroorganisma lain yang boleh menjejaskan pertumbuhan kultur bakteria (Sachan et al., 2024). Selepas proses pensterilan selesai, agar nutrien dibiarkan menyejuk pada suhu bilik sebelum digunakan untuk tujuan pengkulturan *Bacillus* sp., bagi mengelakkan suhu yang terlalu tinggi menjejaskan viabiliti sel bakteria.

Bagi penyediaan kaldu nutrien pula, sebanyak 0.13 g serbuk kaldu nutrien ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL air suling untuk menyediakan medium cecair yang sesuai bagi pertumbuhan bakteria. Larutan kaldu nutrien ini juga melalui proses pensterilan menggunakan autoklaf pada suhu dan tempoh yang sama bagi memastikan keadaan

aseptik sentiasa dikekalkan sebelum digunakan dalam penghasilan kultur bakteria.

#### PENGKULTURAN BAKTERIA, *Bacillus* sp.

Bakteria *Bacillus* sp. telah diinokulasi ke dalam medium agar nutrien menggunakan teknik plat coretan bagi mendapatkan koloni bakteria yang terasing dan seragam. Teknik ini dilakukan secara berhati-hati di bawah keadaan aseptik untuk memastikan hanya bakteria sasaran yang tumbuh tanpa sebarang pencemaran daripada mikroorganisma lain. Melalui kaedah ini, koloni individu dapat diperolehi dengan lebih jelas, sekali gus memudahkan pemilihan koloni yang sesuai untuk langkah seterusnya.

Selepas proses inokulasi, plat agar nutrien tersebut dieramkan di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 30 °C bagi membolehkan pertumbuhan optimum *Bacillus* sp. (Freire et al., 2024). Sepanjang tempoh pengeraman ini, bakteria akan membiak dan membentuk koloni yang dapat dilihat secara fizikal pada permukaan agar. Seterusnya, satu koloni tunggal yang jelas dan sihat dipilih untuk dikultur semula ke dalam kaldu nutrien sebagai langkah pra-kultur bakteria. Proses pra-kultur ini dijalankan selama 24 jam pada suhu 30 °C bagi memastikan bakteria berada dalam keadaan aktif dan mencapai fasa pertumbuhan yang sesuai sebelum digunakan dalam eksperimen seterusnya. Kaldu nutrien yang mengandungi bakteria tersebut dieramkan di dalam inkubator dengan kelajuan goncangan 150 rpm selama 24 jam pada suhu yang sama untuk memastikan pengudaraan dan pencampuran yang mencukupi, seterusnya menyokong pertumbuhan bakteria yang lebih sekata dan optimum (Freire et al., 2024; Wu et al., 2024).

#### ANALISIS MIKROSKOP PENGIMBAS ELEKTRON (SEM)

Kultur *Bacillus* sp. telah dijalankan selama 24 jam pada suhu 30 °C di dalam kaldu nutrien di bawah dua keadaan berbeza, iaitu dengan pendedahan kepada enap cemar petroleum sebagai kumpulan rawatan dan tanpa pendedahan sebagai kumpulan kawalan. Reka bentuk ini bertujuan untuk membandingkan kesan kehadiran enap cemar petroleum terhadap pertumbuhan serta perubahan morfologi bakteria. Sepanjang tempoh pengeraman, keadaan kultur dikekalkan secara optimum bagi memastikan pertumbuhan bakteria berlaku secara aktif dan konsisten. Selepas tempoh pengeraman, sampel bakteria yang telah dirawat dan kawalan dikumpulkan untuk analisis seterusnya. Penyediaan sampel dilakukan mengikut

prosedur standard sebelum dihantar ke Unit Mikroskop Elektron, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Seterusnya, sampel tersebut dihantar ke Makmal i-Crim di Kompleks Penyelidikan UKM bagi tujuan analisis morfologi menggunakan mikroskop elektron pengimbas (SEM) (Supra 55VP Zeiss, Jerman).

#### PENGHASILAN BAKTERIA BAGI KULTUR UTAMA DAN SUPERNATAN

Sebanyak 25 mL inokulasi bakteria daripada pra kultur dipindahkan ke dalam 250 mL kelalang kon yang mengandungi kaldu nutrien dan dieramkan dalam inkubator selama 10 hari, pada suhu 30 °C dengan kelajuan 150 rpm. Setelah itu kultur utama diteruskan dengan rawatan enap cemar petroleum, manakala bagi supernatan, kultur bakteria diempar dengan menggunakan mesin pengempar (Beckman, Allegra X-30R Centrifuge, USA) pada 10 000 rpm selama 15 minit pada 4 °C untuk mendapatkan pelet sel (Sharuddin et al. 2021b). Setelah itu, hasil mendapan yang diperolehi dibekukan sehingga kering atau menghasilkan serbuk pada suhu 80 °C dengan menggunakan penyejuk beku kering (Lab Conco, USA).

#### RAWATAN PEROLEHAN SEMULA MINYAK MENTAH DARI SISA PETROLEUM

Enap cemar petroleum dicampurkan dengan larutan kultur *Bacillus* sp. (diemparkan dan tidak diemparkan) pada kepekatan yang berbeza. Sebanyak 5 sampel bagi kedua-dua keadaan (diemparkan dan tidak diemparkan) disediakan dengan kepekatan yang berbeza seperti berikut: 10% (w/v), 20% (w/v), 30% (w/v), 40% (w/v) dan 50% (w/v)

1. 10% w/v: 15g enap cemar petroleum/150 ml larutan kultur *Bacillus* sp.
2. 20% w/v: 30g enap cemar petroleum/150 ml larutan kultur *Bacillus* sp.
3. 30% w/v: 45g enap cemar petroleum/150 ml larutan kultur *Bacillus* sp.
4. 40% w/v: 60g enap cemar petroleum/150 ml larutan kultur *Bacillus* sp.
5. 50% w/v: 75g enap cemar petroleum/150 ml larutan kultur *Bacillus* sp.

Pensampelan enap cemar petroleum telah dijalankan secara sistematik pada hari ke-2, ke-6, dan ke-10 bagi memantau perubahan komposisi dan kadar degradasi hidrokarbon sepanjang tempoh eksperimen. Sampel yang

diambil merangkumi kedua-dua bentuk, iaitu enap cemar petroleum dalam keadaan pepejal dan cecair, bagi memastikan analisis yang lebih menyeluruh dan mewakili keseluruhan sisa petroleum yang terdapat di dalam sistem. Setiap sampel yang diperolehi kemudiannya melalui proses pengekstrakan bagi memisahkan sebatian hidrokarbon daripada matriks sampel, supaya hanya komponen yang relevan sahaja yang dianalisis. Setelah diekstrak, sampel digunakan untuk analisis kandungan jumlah hidrokarbon total (Total Petroleum Hydrocarbon, TPH) serta dianalisis menggunakan kaedah GC-FID. Proses ini membolehkan penentuan komposisi dan kepekatan hidrokarbon dalam sampel secara tepat, serta membantu menilai kesan interaksi antara *Bacillus* sp. dan enap cemar petroleum dari segi degradasi dan penguraian bahan cemar tersebut sepanjang tempoh kajian. Hasil analisis ini penting untuk memahami keberkesanan bakteria dalam menguraikan hidrokarbon dan memantau perubahan kimia yang berlaku dalam persekitaran yang tercemar.

#### PENGEKSTRAKAN ENAP CEMAR PETROLEUM BAGI ANALISIS GC-FID

Enap cemar petroleum terlebih dahulu menjalani proses pengekstrakan sebelum dianalisis menggunakan kaedah GC-FID. Proses ini penting bagi memastikan sebatian hidrokarbon yang terkandung di dalam sampel dapat diasingkan dengan lebih berkesan untuk tujuan analisis. Sebanyak 10 g sisa petroleum ditimbang dengan tepat dan dimasukkan ke dalam bekas yang sesuai sebelum dicampurkan dengan 50 mL diklorometana sebagai pelarut organik. Campuran ini kemudiannya digoncang dan dieramkan di dalam alat ultrasonik pada suhu 50 °C selama 30 minit bagi membantu meningkatkan kecekapan proses pengekstrakan melalui tindakan gelombang ultrasonik yang memecahkan matriks sampel. Selepas proses tersebut, campuran sampel ditapis menggunakan bulu kaca untuk mengasingkan bendasing pepejal daripada larutan ekstrak. Larutan yang diperolehi kemudiannya menjalani proses penyejatan menggunakan penyejat berputar pada suhu 45 °C untuk menyingkirkan lebihan pelarut dan memekatkan ekstrak. Setelah proses penyejatan selesai, ekstrak yang terhasil dicampurkan dengan 4 mL kloroform bagi memastikan sebatian hidrokarbon berada dalam medium yang sesuai untuk analisis seterusnya. Akhir sekali, ekstrak sisa petroleum ditapis sekali lagi menggunakan penapis picagari. Sampel yang telah ditapis dimasukkan ke dalam vial bersaiz 2 mL sebelum dihantar untuk analisis GC-FID bagi menentukan komposisi dan kandungan hidrokarbon dalam enap cemar petroleum tersebut.

#### ANALISIS PEROLEHAN SEMULA MINYAK MENTAH DARI SISA PETROLEUM

Perolehan jumlah hidrokarbon (TPH) dianggarkan mengikut persamaan berikut (Azzahra et al. 2023; Behera et al. 2021):

$$\text{Perolehan TPH, \%} = \frac{\text{TPH awal} - \text{TPH akhir}}{\text{TPH awal}} \times 100$$

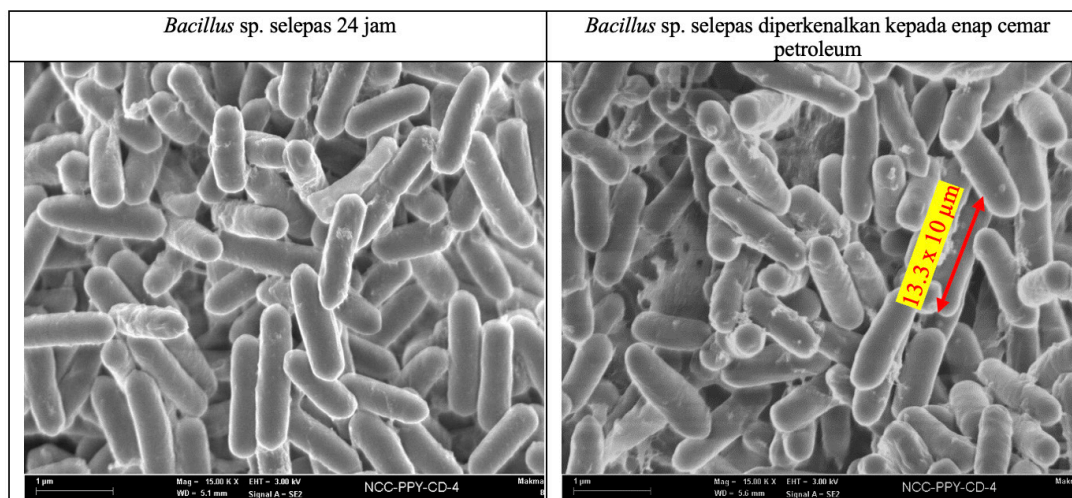
#### KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

##### MORFOLOGI *Bacillus* sp. MELALUI ANALISIS SEM

Hasil analisis SEM menunjukkan morfologi *Bacillus* sp. selepas 24 jam inkubasi berbentuk rod panjang dan susunan antara bakteria dalam keadaan palisad adalah menegak. Permukaan *Bacillus* sp. pula tampak licin berbanding dengan *Bacillus* sp. yang terdedah kepada enap cemar petroleum. Hal ini dapat dilihat pada pembesaran 15000X (Rajah 2), yang mana sel bakteria mengalami pengecutan dan saiz bakteria pula adalah lebih kecil berbanding dengan kawalan. Keputusan yang serupa juga diperolehi oleh bakteria *Bacillus licheniformis* AS5 yang mana terdapat perubahan pada sel bakteria (Gao et al. 2020). Hal ini menunjukkan bahawa, enap cemar petroleum mempengaruhi saiz bakteria kerana apabila bakteria terdedah dengan sesuatu keadaan yang ekstrim atau mengalami tekanan, bakteria akan bertindak balas untuk melindungi sel melalui mekanismenya yang tersendiri (Elahi et al. 2022; Xu et al. 2014). Selain itu, pemerhatian juga menunjukkan berlakunya pembentukan bio film pada *Bacillus* sp. yang terdedah kepada enap cemar petroleum. Fenomena ini berkemungkinan merupakan satu mekanisme tindak balas dan penyesuaian bakteria terhadap persekitaran yang mencabar. Secara semula jadi, pembentukan biofilem merupakan strategi pertahanan yang biasa diamalkan oleh bakteria apabila berhadapan dengan pelbagai bentuk tekanan persekitaran. Keadaan seperti kehadiran bahan toksik, turun naik nilai pH, kekurangan nutrien, serta tekanan akibat penyahhidratan boleh merangsang bakteria untuk membentuk komuniti sel yang dilindungi oleh matriks ekstraselular (Muhammad et al. 2020; Haque et al. 2021). Melalui pembentukan biofilem ini, sel-sel bakteria dapat melekat antara satu sama lain dan pada permukaan tertentu, sekali gus meningkatkan daya tahan terhadap keadaan yang tidak menggalakkan. Struktur

biofilm yang kompleks ini bukan sahaja membantu melindungi sel daripada kesan toksik enap cemar petroleum, malah membolehkan bakteria menyesuaikan

diri dan terus hidup dalam persekitaran yang tercemar. Namun, analisis lanjutan seperti mikroskopi sefokus perlu dijalankan bagi mengesahkan kehadiran biofilm.



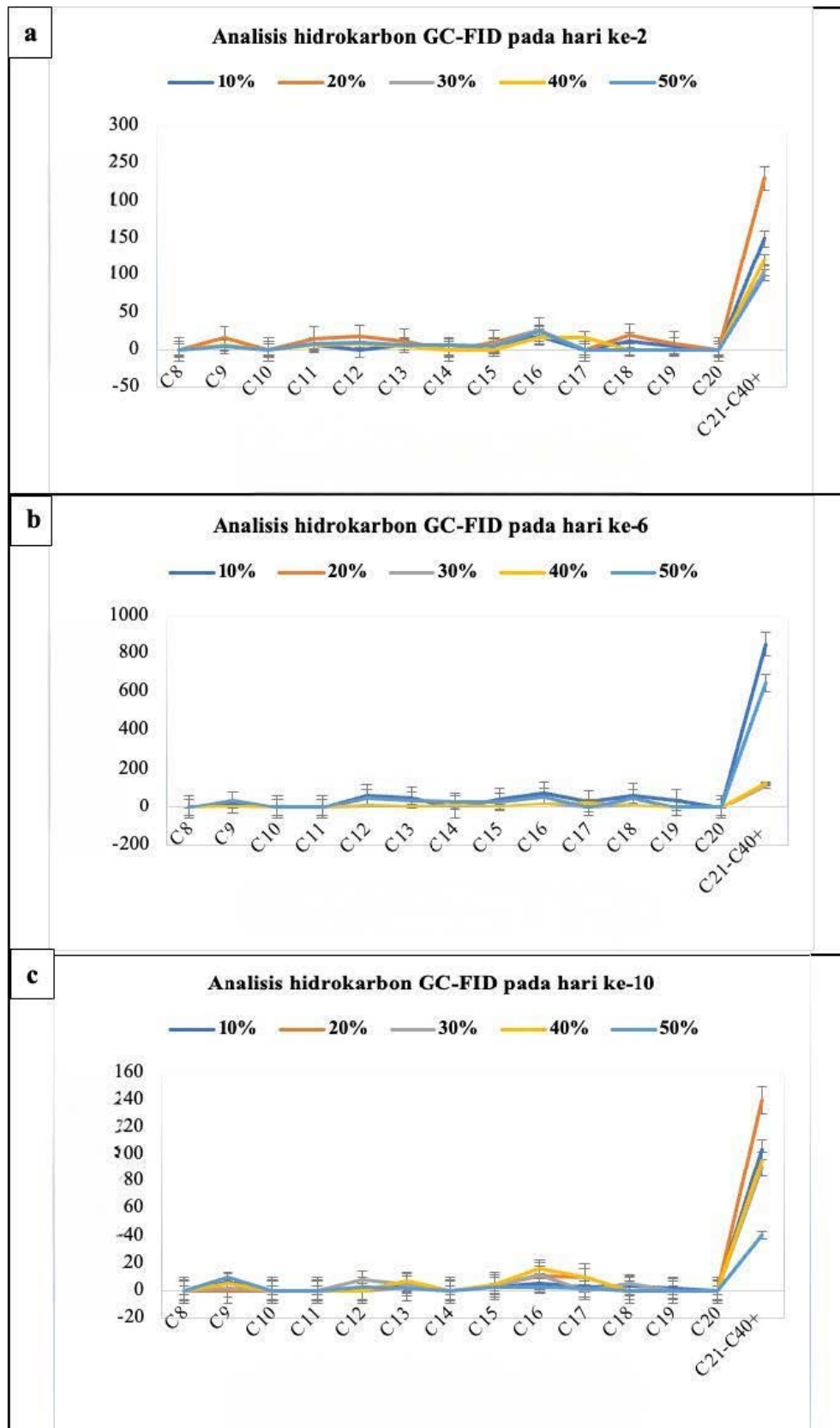
RAJAH 2. Morfologi *Bacillus* sp. sebelum dan selepas pendedahan terhadap enap cemar petroleum melalui analisis SEM pada pembesaran 15000X. Skala bar: 1 µm.

#### PEROLEHAN MINYAK MENTAH DARI SISA PETROLEUM

Bagi penilaian perolehan minyak *Bacillus* sp. melalui analisis GC-FID, pensampelan jumlah hidrokarbon dilakukan pada hari ke-2, 6 dan 10 (Rajah 3 a-c) untuk meneliti hubungan antara kecekapan perolehan semula minyak dengan kadar pengurangan petroleum dalam kajian ini. Hasil GC-FID menunjukkan bahawa rantai hidrokarbon pada hari ke-2, 6 dan 10 terdiri daripada  $C_8-C_{40+}$ . Pada hari ke-2, 6 dan 10, *Bacillus* sp. memperoleh kepekatan minyak yang paling tinggi pada hidrokarbon  $C_{20}$ . Ia mencapai kepekatan minyak sebanyak 229.59 ppm, 846.03 ppm, dan 139.63 ppm. Hal ini menunjukkan bahawa, perolehan minyak yang paling banyak diperolehi pada hari ke-6 berbanding dengan hari ke-2 dan ke-10. Faktor ini menunjukkan, pada hari ke-6, *Bacillus* sp. berada pada fasa eksponen yang mana bakteria membiak secara aktif dan telah beradaptasi dengan keadaan yang mengandungi enap cemar petroleum seterusnya meningkatkan aktiviti metabolisme nya dalam perolehan minyak (Azzahra et al. 2023; Stanbury, Whitaker & Hall 2017). Pada hari ke-2 pula, bakteria baru melalui fasa pegun manakala pada hari ke-10 bakteria memasuki fasa mati dan menyebabkan berlaku pengurangan pada perolehan minyak oleh bakteria. Apabila *Bacillus* sp. terdedah kepada 10% enap cemar

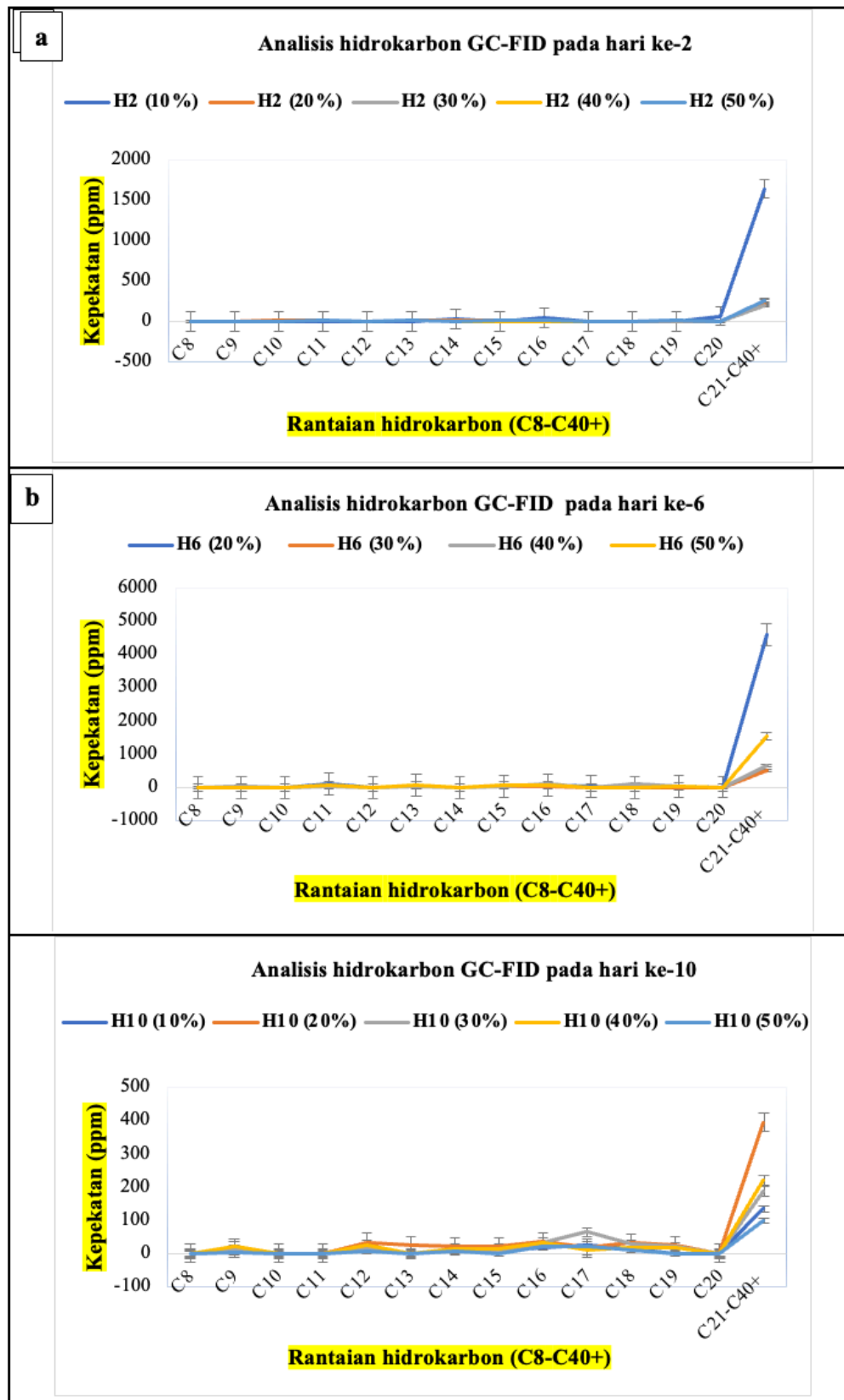
petroleum (Rajah 3b), kajian menunjukkan peningkatan yang ketara dalam perolehan minyak, dengan nilai mencapai 846.03 ppm. Peningkatan ini adalah jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan perolehan minyak pada kepekatan enap cemar petroleum yang lebih tinggi, iaitu 40% dengan hanya 125.68 ppm dan 50% sebanyak 644.52 ppm. Keputusan ini menunjukkan bahawa *Bacillus* sp. menunjukkan prestasi optimum dalam memperoleh minyak apabila berinteraksi dengan enap cemar petroleum pada kepekatan yang lebih rendah. Fenomena ini boleh dijelaskan bahawa kepekatan rendah enap cemar petroleum menyediakan persekitaran yang lebih sesuai untuk aktiviti metabolik bakteria tanpa menimbulkan tekanan toksik yang berlebihan. Dalam keadaan ini, *Bacillus* sp. dapat berfungsi dengan lebih efektif, memanfaatkan nutrien dan sebatian organik yang terdapat dalam enap cemar petroleum untuk meningkatkan penghasilan minyak. Sebaliknya, pada kepekatan yang lebih tinggi, aktiviti bakteria mungkin terjejas akibat kesan toksik hidrokarbon berlebihan, mengurangkan keupayaan mereka untuk memperoleh minyak secara maksimum. Oleh itu, keputusan ini menekankan bahawa kepekatan enap cemar petroleum memainkan peranan penting dalam menentukan keberkesanan *Bacillus* sp. dalam proses bioremediasi dan perolehan minyak, dengan prestasi terbaik dicapai pada tahap pendedahan yang sederhana hingga rendah.

a. Kultur *Bacillus* sp. yang Diemparkan



RAJAH 3. Graf GC-FID bagi jumlah hidrokarbon pada hari ke-2 (a), 6(b) dan 10(c).

b. Kultur *Bacillus* sp. yang tidak Diemparkan



RAJAH 4. Graf GC-FID bagi jumlah hidrokarbon pada hari ke-2 (a), 6(b) dan 10(c).

JADUAL 1. Dapatan kajian mengenai kultur *Bacillus* sp. yang diemparkan dan tidak diemparkan

| Hari | Kultur <i>Bacillus</i> sp. yang Diemparkan |           |           |          |           | Kultur <i>Bacillus</i> sp. yang tidak Diemparkan |           |          |           |          |
|------|--|-----------|-----------|----------|-----------|--|-----------|----------|-----------|----------|
|      | Kepekatan enap cemar petroleum (ppm)       |           |           |          |           |  |           |          |           |          |
|      | 10%  | 20%       | 30%       | 40%      | 50%       | 10%  | 20%       | 30%      | 40%       | 50%      |
| 2    | 19595                                      | 52.7645   | 3628.119  | 417.5291 | 3722.2962 | 52.7645  | 3628.119  | 417.5291 | 3722.2962 | 163.9804 |
| 6    | 1533.1582                                  | 1018.7378 | 45320     | 185.5408 | 7438.5803 | 1018.7378  | 185.5408  | -        | 181.4217  | 375.9549 |
| 10   | 2710.4296                                  | 192.9955  | 8676.5417 | 34.7071  | 3665.2638 | 192.9955   | 8676.5417 | 34.7071  | 3665.2638 | 11.2215  |

Kultur *Bacillus* sp. yang tidak diemparkan (Rajah 4 a-c) menunjukkan kepekatan rantai hidrokarbon pendek pada akhir eksperimen lebih banyak pada hari ke-10 berbanding hari ke-2, manakala kepekatan rantai hidrokarbon panjang pada akhir eksperimen pula menunjukkan pola menurun. Jumlah hidrokarbon meningkat pada hari ke-2 dan ke-6 manakala ia menurun pada hari ke-10. Hal ini menunjukkan bahawa, *Bacillus* sp. dalam kajian ini berpotensi dalam penyingkiran toksik hidrokarbon berserta dengan perolehan semula minyak mentah. Ini disebabkan oleh, biopolimer, biojisim atau biosurfaktan mikroorganisma mempunyai tegangan permukaan yang tinggi dan boleh mengurangkan tegangan antara muka untuk memudahkan proses pemulihan semula minyak dalam mekanisme MEOR (Aghaei et al. 2023; Sharma et al. 2022). Kajian ini juga menggunakan bakteria Gram-positif, seperti dalam kajian sebelumnya yang menggunakan *Geobacillus toebii*, bakteria penghasil biosurfaktan yang sesuai untuk rawatan MEOR (Fulazzaky 2015). Rantai hidrokarbon bagi ketiga-tiga hari juga terdiri daripada  $C_8$ - $C_{40+}$ . Perolehan minyak (hari ke-6) paling tinggi diperolehi pada hidrokarbon  $C_{20}$ , iaitu sebanyak 4575.86 ppm dengan 20% kepekatan enap cemar petroleum. Perolehan minyak hari ke-2 dan ke-10 pula masing-masing sebanyak 1640.42 ppm (10% enap cemar petroleum) dan 393.80 ppm (20% enap cemar petroleum). Jumlah hidrokarbon menurun pada  $C_{21-40+}$ , menunjukkan degradasi minyak *Bacillus* sp. Hasil yang sama juga diperolehi oleh pencilan *Bacillus* sp. dari Libya yang mana perolehan minyak meningkat pada  $C_{18}$ - $C_{20}$ , namun berkurang pada rantai hidrokarbon  $C_{20-22}$  (Althalb, Elmusrati & Banat 2021). Perolehan hidrokarbon rantai panjang yang ketara bagi sampel 10% w/v adalah 91.85%. Kajian terdahulu juga menunjukkan bahawa bakteria jenis Gram-positif yang sama seperti dalam kajian ini, *Geobacillus toebii* R-32639, boleh memperoleh 14.27% minyak mentah dengan menggunakan kaedah teras pambanjiran (Fulazzaky, Astuti & Fulazzaky 2015).

Bagi menilai sama ada keberkesanan biosurfaktan dalam rawatan MEOR terhadap keseluruhan sel bakteria atau hanya pelet bakteria sahaja, adalah penting untuk membandingkan kultur yang diemparkan dengan

yang tidak diemparkan. Dalam kajian ini, perolehan minyak daripada kultur *Bacillus* sp. yang tidak diemparkan menunjukkan perbezaan yang ketara berbanding dengan kultur yang diemparkan. Kultur yang diemparkan mencatat perolehan minyak yang lebih rendah, iaitu 846.03 ppm, berbanding dengan kultur yang tidak diemparkan yang mencapai 4575.86 ppm pada hari ke-6 rawatan enap cemar petroleum. Keputusan ini menunjukkan bahawa semasa proses pengemparan, medium antara fasa pepejal dan cecair terpisah (Allahghadry et al., 2022), yang seterusnya menyebabkan bakteria menjadi kurang aktif. Sebaliknya, dalam kultur yang tidak diemparkan, keseluruhan sel masih kekal aktif dan nutrien yang diperlukan tersedia dengan mencukupi, membolehkan bakteria menjalankan aktiviti metabolik secara optimum untuk memperoleh semula minyak mentah. Hasil analisis ANOVA bagi perbandingan kultur diemparkan dan tidak diemparkan juga menunjukkan bahawa pada hari ke-2, ke-6, dan ke-10, perbezaan perolehan minyak adalah signifikan bagi setiap variasi kepekatan awal TPH. Bagi mendapatkan pemahaman yang lebih mendalam mengenai mekanisme yang terlibat, penyelidikan lanjutan perlu dijalankan untuk mengesahkan penghasilan biosurfaktan melalui ujian asas seperti pengurangan ketegangan permukaan, indeks pengemulsian (E24), serakan minyak, dan ujian penurunan. Selain itu, analisis molekular seperti transkriptomik juga digalakkan untuk mengenal pasti laluan metabolik dan gen yang diaktifkan semasa proses perolehan semula minyak, sekaligus memberikan gambaran yang lebih jelas mengenai mekanisme *Bacillus* sp. menyesuaikan diri dan berfungsi dalam persekitaran yang tercemar.

## KESIMPULAN

Secara ringkasnya, bakteria tempatan *Bacillus* sp. dalam kajian ini mempunyai potensi untuk dieksploitasi dalam rawatan MEOR. Faktor ini menunjukkan, hasil rawatan enap cemar petroleum bagi kultur yang tidak diemparkan menunjukkan keputusan yang positif yang mana sebanyak 91.85% minyak dapat diperolehi semula pada hari ke-6 rawatan. Rawatan MEOR ini dapat ditambah baik dengan

kajian lanjutan mengenai bakteria ini melalui analisis pengoptimuman menggunakan kaedah permukaan gerak balas (RSM) untuk mengetahui keadaan optimum yang sesuai bagi bakteria ini bertindak secara berkesan dalam perolehan semula minyak mentah. Dapatan kajian ini menunjukkan bahawa kelebihan yang terdapat pada bakteria Gram-positif, *Bacillus* sp. mampu untuk diaplikasikan dalam rawatan biologi terutamanya perolehan semula minyak mentah pada tahap atau skala yang lebih besar, seterusnya meningkatkan kecekapan nya dalam rawatan MEOR di Malaysia.

### PENGHARGAAN

Kajian ini telah mendapat sumbangan dana penyelidikan daripada DIP2.0 (DIP-2023-006) Universiti Kebangsaan Malaysia.

### PENGISYTIRAN KEPENTINGAN BERSAING

Tiada.

### RUJUKAN

- Ahmed, T. 2010. Principles of Waterflooding. Reservoir Engineering Handbook, hlm. 909–1095. Elsevier.
- Aghaei, S., Saghandali, F., Baghban Salehi, M., Mokhtarani, B., Taghikhani, V. & Saviz, S. 2023. A micromodel investigation on the flooding of glycolipid biosurfactants for enhanced oil recovery. *Geoenergy Science and Engineering* 230(June): 212219.
- Alawode, A. J. & Falode, O. A. 2021. Enhanced Oil Recovery Practices: Global Trend, Nigeria's Present Status, Prospects and Challenges. *Current Journal of Applied Science and Technology* 79–92.
- Allahghadry, T., Bojesen, A.M., Whitehead, B.J. & Antenucci, F. 2022. Clarification of large-volume bacterial cultures using a centrifuge-free protocol. *Journal of Applied Microbiology* 133(2): 870–882.
- Almansoori, A. F., Hasan, H. A., Abdullah, S. R. S., Idris, M., Anuar, N. & Al-Adiwish, W. M. 2019. Biosurfactant produced by the hydrocarbon-degrading bacteria: Characterization, activity and applications in removing TPH from contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation* 14: 100347.
- Althab, H., Elmusrati, I. & Banat, I. 2021. A Novel Approach to Enhance Crude Oil Recovery Ratio Using Selected Bacterial Species. *Applied Sciences* 11(21): 10492.
- Andrade, A., Mehl, A., Mach, E., Couto, P. & Mansur, C.R.E. 2024. Application of biosurfactants in enhanced oil recovery ex-situ: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* 55(4): 3117–3139.
- Azzahra, F., Rinanti, A., Hadisoebroto, R., Minarti, A., Aphirta, S., Rahmiyati, L., Mahendra, S. M. P., et al. 2023. Removal of Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) crude oil by consortium bacteria *Acetobacter tropicalis* and *Lactobacillus casei*. *E3S Web of Conferences* 420: 09009.
- Behera, I. D., Nayak, M., Biswas, S., Meikap, B. C. & Sen, R. 2021. Enhanced biodegradation of total petroleum hydrocarbons by implementing a novel two-step bioaugmentation strategy using indigenous bacterial consortium. *Journal of Environmental Management* 292: 112746.
- Camargo, F. P., Menezes, A. J. de, Tonello, P. S., Dos Santos, A. C. A. & Duarte, I. C. S. 2018. Characterization of biosurfactant from yeast using residual soybean oil under acidic conditions and their use in metal removal processes. *FEMS Microbiology Letters* 365(10).
- Divandari, H., Amiri-Ramsheh, B. & Zabihi, R. 2023. Steam flooding (steam drive). *Thermal Methods*, hlm. 47–70. Elsevier.
- Elahi, A., Rehman, A., Zajif Hussain, S., Zulfiqar, S. & Shakoori, A.R. 2022. Isolation and characterization of a highly effective bacterium *Bacillus cereus* b-525k for hexavalent chromium detoxification. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29(4): 2878–2885.
- Falih, K.T., Mohd Razali, S.F. & Abdul Maulud, K.N. 2025. Improved GIS techniques and a novel physico-chemical risk index for surface water quality assessment: A case study of the Al-Garraf Oil Field. *Jurnal Kejuruteraan* 37(1): 241–258.
- El-hoshoudy, A. N. & Desouky, S. 2018. CO<sub>2</sub> miscible flooding for enhanced oil recovery. *Carbon Capture, Utilization and Sequestration*. InTech.
- Freire, V., Condón, S. & Gayán, E. 2024. Impact of sporulation temperature on germination of *Bacillus subtilis* spores under optimal and adverse environmental conditions. *Food Research International* 182: 114064.
- Fulazzaky, M., Astuti, D.I. & Fulazzaky, M.A. 2015. Laboratory simulation of microbial enhanced oil recovery using *Geobacillus toebii* R-32639 isolated from the Handil reservoir. *RSC Advances* 5(5): 3908–3916.
- Ganat, T. 2019. Pumping system of heavy oil production. *Dlm. Processing of Heavy Crude Oils*, disunting oleh Gounder. Rijeka: IntechOpen.

- Gao, G., Ji, K., Zhang, Y., Liu, X., Dai, X., Zhi, B., Cao, Y., Liu, D., Wu, M., Li, G. & Ma, T. 2020. Microbial enhanced oil recovery through deep profile control using a conditional bacterial cellulose-producing strain derived from *Enterobacter* sp. FY-07. *Microbial Cell Factories* 19(1): 1–11.
- Gbadamosi, A. O., Junin, R., Manan, M. A., Agi, A. & Yusuff, A. S. 2019, September 1. An overview of chemical enhanced oil recovery: Recent advances and prospects. *International Nano Letters*. Springer Science and Business Media, LLC.
- Gordon, I. A., Priscilla, G. M. & Joseph, P. R. 2023, November 9. Petroleum. *Encyclopedia Britannica*. Encyclopedia Britannica.
- Haque, M.M., Mosharaf, M.K., Haque, M.A., Tanvir, M.Z.H. & Alam, M.K. 2021. Biofilm formation, production of matrix compounds and biosorption of copper, nickel and lead by different bacterial strains. *Frontiers in Microbiology* 12(June): 1–19.
- Karthick, A., Roy, B. & Chattopadhyay, P. 2019. A review on the application of chemical surfactant and surfactant foam for remediation of petroleum oil contaminated soil. *Journal of Environmental Management* 243: 187–205.
- Kögler, F., Mahler, E., Dopffel, N., Schulze-Makuch, D., Borovina, A., Visser, F., Herold, A., et al. 2021. The Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) potential of Halanaerobiales under dynamic conditions in different porous media. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 196: 107578.
- Kudapa, V. K. & Suriya Krishna, K. A. 2023. Heavy oil recovery using gas injection methods and its challenges and opportunities. *Materials Today: Proceedings*.
- Lourdes, R. S., Cheng, S. Y., Chew, K. W., Ma, Z. & Show, P. L. 2022. Prospects of microbial enhanced oil recovery: Mechanisms and environmental sustainability. *Sustainable Energy Technologies and Assessments* 53: 102527.
- Ma, Q. & Tang, Y. 2023. Molecular designs of enhanced oil recovery chemicals. Dlm. *Recovery Improvement*, 281–319. Elsevier.
- Mehetre, G. T., Dastager, S. G. & Dharne, M. S. 2019. Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. *Science of The Total Environment* 679: 52–60.
- Melikoglu, M. 2026. Biosurfactants for enhanced oil recovery and bioremediation in the modern petroleum industry: A global review. *JCIS Open* 21: 100168.
- Moldes, A. B., Rodríguez-López, L., Rincón-Fontán, M., López-Prieto, A., Vecino, X. & Cruz, J. M. 2021a. Synthetic and bio-derived surfactants versus microbial biosurfactants in the cosmetic industry: An overview. *International Journal of Molecular Sciences* 22(5): 2371.
- Moldes, A. B., Rodríguez-López, L., Rincón-Fontán, M., López-Prieto, A., Vecino, X. & Cruz, J. M. 2021b. Synthetic and bio-derived surfactants versus microbial biosurfactants in the cosmetic industry: An overview. *International Journal of Molecular Sciences* 22(5): 2371.
- Muhammad, M.H., Idris, A.L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X. & Huang, T. 2020. Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology* 11: 1–20.
- Najafi-Marghmaleki, A., Kord, S., Hashemi, A. & Motamedi, H. 2018. Experimental investigation of efficiency of MEOR process in a carbonate oil reservoir using *Alcaligenes faecalis*: Impact of interfacial tension reduction and wettability alteration mechanisms. *Fuel* 232: 27–35.
- Nikolova, C. & Gutierrez, T. 2020. Use of Microorganisms in the Recovery of Oil From Recalcitrant Oil Reservoirs: Current State of Knowledge, Technological Advances and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology* 10:1.
- Nikolova, C. & Gutierrez, T. 2021. Biosurfactants and Their Applications in the Oil and Gas Industry: Current State of Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9:2.
- Niu, J., Liu, Q., Lv, J. & Peng, B. 2020. Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 192: 107350.
- Nwaiche, J. 2015. Challenges of CO<sub>2</sub> Injection in Middle East Carbonate Reservoirs- An enhanced oil recovery technique in heterogeneous reservoirs.
- Othman, A. R., Ismail, N. S., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Kurniawan, S. B., Sharuddin, S. S. N. & Ismail, N. 'Izzati. 2022. Potential of indigenous biosurfactant-producing fungi from real crude oil sludge in total petroleum hydrocarbon degradation and its future research prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10(3): 107621.
- Othman, A. R., Zhao, Y. & Xuc, W. 2025. Optimizing ammonia nitrogen removal from hospital effluent using a bacteria-algae consortium. *Jurnal Kejuruteraan* 37(2): 647–656.
- Prashant Dahal. 2024, May 20. Streak Plate Method: Principle, types, methods, uses. <https://microbenotes.com/streak-plate-method-principle-methods-significance-limitations/> [4 June 2024].
- Purwasena, I.A., Amaniyah, M., Astuti, D.I., Firmansyah, Y. & Sugai, Y. 2024. Production, characterization, and application of *Pseudoxanthomonas taiwanensis* biosurfactant: A green chemical for microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Scientific Reports* 14(1): 10270.
- Raouf, S., Ismail, Y., Gamaleldin, N., Aboelkhair, H. & Attia, A. 2024. Screening of sustainable biosurfactant produced by indigenous bacteria isolated from Egyptian oil fields for microbial enhanced oil

- recovery. *Geoenergy Science and Engineering* 239: 212974.
- Rehman, R., Ali, M. I., Ali, N., Badshah, M., Iqbal, M., Jamal, A. & Huang, Z. 2021. Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma* sp. *Journal of Hazardous Materials* 418: 126276.
- Reuvers, B. 2020. Emulsifying ionic apolar polymer in water: understanding the process. *Journal of Coatings Technology and Research* 17(5): 1131–1143.
- Ritchie, H. & Rosado, P. 2022. Fossil fuels. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/fossil-fuels>
- Sachan, R. S. K., Devgon, I., Sharma, V., Perveen, K., Bukhari, N. A., Alsulami, J. A., Jadon, V. S., et al. 2024. Investigating chemical pre-treatment methods: Valorization of wheat straw to enhance polyhydroxyalkanoate (PHA) production with novel isolate *Bacillus paranthracis* RSKS-3. *Heliyon* 10(11): e31572.
- Samanta, A. 2021. *Biosurfactants and Its Application in Oil Recovery*, hlm. 181–205.
- Santos, D. K. F., Resende, A. H. M., de Almeida, D. G., Soares da Silva, R. de C. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Banat, I. M., et al. 2017. *Candida lipolytica* UCP0988 biosurfactant: Potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Sarubbo, L. A., Silva, M. da G. C., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S., et al. 2022. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal* 181: 108377.
- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaidullah, M., Sessitsch, A. & Hafeez, F. Y. 2018. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLOS ONE* 13(6): e0198107.
- Schlumberger Limited. 2023. Sweep Efficiency. *Schlumberger Limited glossary*.
- Sedighi, M., Aminian, M., Mohammadi, M. & Koohi, A. D. 2023. Overview of thermal concepts in enhanced oil recovery. *Thermal Methods*, hlm. 1–45. Elsevier.
- Shaban, S. M., Kang, J. & Kim, D.-H. 2020. Surfactants: Recent advances and their applications. *Composites Communications* 22: 100537.
- Sharma, J., Sundar, D. & Srivastava, P. 2021. Biosurfactants: Potential Agents for Controlling Cellular Communication, Motility, and Antagonism. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8.
- Sharma, N., Lavania, M., Singh, N. & Lal, B. 2022. Microbial enhanced oil recovery: An overview and case studies. *Enhanced Oil Recovery - Selected Topics*, 1–11. IntechOpen.
- Sharma, N., Lavania, M. & Lal, B. 2023. Biosurfactant: An emerging tool for the petroleum industries. *Frontiers in Microbiology* 14: 1254557.
- Sharuddin, S. S. N., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Othman, A. R. & Ismail, N. 'Izzati. 2021a. Potential bifunctional rhizobacteria from crude oil sludge for hydrocarbon degradation and biosurfactant production. *Process Safety and Environmental Protection* 155: 108–121.
- Sharuddin, S. S. N., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Othman, A. R. & Ismail, N. 'Izzati. 2021b. Potential bifunctional rhizobacteria from crude oil sludge for hydrocarbon degradation and biosurfactant production. *Process Safety and Environmental Protection* 155: 108–121.
- She, H., Kong, D., Li, Y., Hu, Z. & Guo, H. 2019a. Recent advance of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in China. *Geofluids* 2019: 1–16.
- She, H., Kong, D., Li, Y., Hu, Z. & Guo, H. 2019b. Recent advance of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in China. *Geofluids* 2019: 1–16.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. & Hall, S.J. 2017. Microbial growth kinetics. *Principles of Fermentation Technology*, 21–74. Elsevier.
- Synák, F., Čulík, K., Rievaj, V. & Gaňa, J. 2019. Liquefied petroleum gas as an alternative fuel. *Transportation Research Procedia* 40: 527–534.
- Tang, X.-C., Li, Y.-Q., Liu, Z.-Y. & Zhang, N. 2023. Nanoparticle-reinforced foam system for enhanced oil recovery (EOR): Mechanistic review and perspective. *Petroleum Science* 20(4): 2282–2304.
- Udosoh, N. E. & Nwaoha, T. C. 2020. Demonstration of MEOR as an alternative enhanced oil recovery technique in Nigeria offshore oilfield. *Journal of Mechanical and Energy Engineering* 4(3): 277–284.
- Wu, H., Huang, L., Li, J., Yang, D. & Shang, C. 2024. Optimization of the conditions for the growth and ethanol production of strain *Bacillus* sp. EtOH. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 18(2): 333–338.
- Wu, B., Xiu, J., Yu, L., Huang, L., Yi, L. & Ma, Y. 2022. Research advances of microbial enhanced oil recovery. *Heliyon* 8(11): e11424.
- Xu, F., Ma, T., Shi, L. & Zhang, J. 2014. Bioreduction of Cr(VI) by *Bacillus* sp. QH-1 isolated from soil under chromium-containing slag heap in high altitude area. *Annals of Microbiology* 64(3): 1073–1080.