تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت جداسازی شده از سواحل بندرعباس

محسن شهریاری مقدم*[۱]
طاهره عبدلی[۲]
غلامحسین ابراهیمی‌پور[۳]

۱. استادیار گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
mohsen.shahriari@uoz.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۲۰۵۷۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۲
این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

خلیج‌فارس از متنوع‌ترین بوم‌سازگان دنیا بوده و به دلیل موقعیت خاص جغرافیایی و راهبردی به‌طور مداوم در معرض آلاینده‌های نفتی می‌باشد، درنتیجه توسعه روش‌های کارآمد برای تصفیه آلودگی‌ها ضروری است. هدف از مطالعه حاضر، تعیین توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط سویه TA1 (*Alcanivorax dieselolei*)، توانایی تجزیه زیستی ترکیبات مختلف تشکیل‌دهنده نفت خام و همچنین کنتیک تجزیه زیستی نفت خام توسط این سویه است. توانایی سویه TA1 در تولید بیوسورفاکتانت در محیط کشت پایه نمکی حاوی منابع مختلف کربن سنجیده شد. قابلیت سویه TA1 در تجزیه ترکیبات مختلف نفت خام توسط روش وزن سنجی انجام گرفت. کنتیک تجزیه زیستی نفت خام توسط این سویه در محیط کشت دارای غلظت‌های مختلف نفت خام مطالعه شد. بررسی مدل‌های مختلف کنتیک تجزیه زیستی با تطبیق آن‌ها با داده‌های به‌دست‌آمده انجام گرفت. نتایج نشان داد سویه TA1 تنها در محیط حاوی نفت خام قادر به تولید بیوسورفکتانت می‌باشد. این سویه به ترتیب ۹۵/۴۶ درصد، ۸۹/۵۲ درصد، ۲۹/۹۵ درصد و ۲۷/۲۰ درصد از ترکیبات آلیفاتیک، آروماتیک، رزینی و آسفالتن‌های موجود در نفت خام را تجزیه کرد. سویه TA1 در غلظت‌های مختلف نفت خام قادر به رشد بود و با افزایش غلظت اولیه نفت خام فاز تأخیری و زمان تجزیه زیستی افزایش یافت. نتایج نشان داد مدل ایبا بهترین مدل برای توصیف تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه TA1 است. در نتیجه‌گیری کلی، با توجه به تولید بیوسورفکتانت توسط سویه TA1، قابلیت این سویه در تجزیه زیستی ترکیبات مختلف نفت خام و همچنین توانایی این سویه در مصرف ترکیبات هیدروکربنی در غلظت بالای سوبسترا، می‌توان از این سویه به‌صورت کارآمدی در زیست پالایی مناطق آلوده به ترکیبات نفتی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: نفت خام، کنتیک، *Alcanivorax dieselolei*، تجزیه زیستی.

مقدمه

آلودگی‌های نفتی امروزه در بیشتر مناطق دنیا به‌ویژه در کشورهای درحال‌توسعه گزارش‌شده‌اند و آسیب‌های جدی و گسترده‌ای بر سلامت انسان، اکوسیستم‌های آبی و منابع طبیعی گذاشته‌اند (Marzan *et al.*, 2017). مناطق ساحلی ازجمله مناطقی هستند که در آن‌ها تأثیر ریزش‌های نفتی مشهود بوده و با توجه به آنکه این مناطق ازنظر اکولوژیک و همچنین استفاده عموم مردم اهمیت ویژه‌ای دارند (Nikolopoulou *et al.*, 2007)، استفاده از روش‌های کارآمد برای پاک‌سازی آن‌ها در صورت وقوع حوادث احتمالی پراهمیت است. اگرچه روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی برای تصفیه آلاینده‌های نفتی وجود دارد، بااین‌وجود استفاده از روش‌های زیستی کارآمدتر و آسیب‌های کمتری به محیط وارد می‌کنند (Borah and Yadav, 2017). در دهه گذشته زیست پالایی آلاینده‌های نفتی بسیار موردتوجه قرارگرفته و بسیاری از استراتژی‌های زیست پالایی توسعه‌یافته و بهینه‌شده‌اند. زیست پالایی فرایندی پیچیده است و موفقیت در

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

آن وابسته به وجود میکروارگانیسم‌های مناسب در شرایط محیطی مناسب است (Reis *et al.*, 2014). سویه‌هایی که در زیست پالایی استفاده می‌شوند باید بتوانند از ترکیبات مختلف آلاینده استفاده کرده و نرخ سوخت‌وساز بالایی داشته باشند. این سویه‌ها همچنین باید قادر باشند در شرایط محیطی که به آن معرفی می‌شوند، به‌خوبی فعالیت کنند (Gentili *et al.*, 2006). مطالعات نشان داده است استفاده از سویه‌های بومی برای زیست پالایی با توجه به سازگاری آن‌ها با شرایط محیطی کارایی بهتری دارد (نادعلیان و همکاران، ۱۳۹۵). بیوسورفکتانت ها ترکیبات فعالی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. این مواد در زیست پالایی به دلیل نقش آن‌ها در انحلال آلاینده‌های آب‌گریز و همچنین برخی ویژگی‌های آن‌ها از قبیل سمیت کم و قابلیت تجزیه‌پذیری بالا موردتوجه هستند و گزارش‌های زیادی درزمینهٔ نقش بیوسورفکتانت‌های تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها در افزایش میزان کارایی زیست پالایی مناطق آلوده وجود دارد (Thavasi *et al.*, 2011). هیدروکربن‌های بیوژنک و پتروژنیک منبع غنی از انرژی و کربن برای ارگانیسم‌هایی هستند که قادر به تجزیه آن‌ها می‌باشند. گونه‌های مختلفی که در حدود ۹۰ جنس از باکتری‌ها را شامل می‌شوند، توانایی تجزیه هیدروکربن‌ها رادارند (Prince and Walters, 2016) که از آن‌ها می‌توان به جنس‌های Alcanivorax (Santisi *et al.*, 2015)، Pseudomonas (Ebadi *et al.*, 2017) و Bacillus(SakthiPriya *et al.*, 2015) اشاره‌نمود. نفت خام مخلوطی از ترکیبات مختلف بوده و به‌طورکلی بر اساس قطبیت نفت خام عموماً به چهار بخش اشباع، حلقوی، رزینی و آسفالتن تقسیم می‌شود. با توجه به سمیت، جهش‌زایی و سرطان‌زایی ترکیبات موجود در نفت خام، در زیست پالایی استفاده از سویه‌هایی که قادر هستند از ترکیبات مختلف تشکیل‌دهنده نفت خام استفاده کنند منجر به افزایش کارایی تصفیه زیستی می‌شود. به‌منظور ارزیابی میزان تجزیه زیستی ترکیبات آلی پایدار و همچنین طراحی امکانات لازم برای زیست پالایی، مطالعه کنتیک تجزیه زیستی پراهمیت است (Bai *et al.*, 2007). درنتیجه نیاز به مطالعاتی است که اثرات ماده آلاینده را بر میزان تجزیه زیستی توسط سویه موردنظر را بررسی نماید. در سال‌های گذشته مطالعات زیادی در زمینه تجزیه کنتیک تجزیه زیستی آلاینده‌های مختلف انجام‌شده است که از آن‌ها می‌توان به مطالعات انجام‌گرفته در زمینه کنتیک تجزیه زیستی بنزن، تولوئن و فنول توسط باکتری *Pseudomonas putida* F1 (Abuhamed *et al.*, 2004)، کنتیک تجزیه زیستی پی- کرسول توسط Gliomastix *indicus* (Singh *et al.*, 2008)، کنتیک تجزیه زیستی فنول توسط باکتری *Pseudomonas fluorescene* (Agarry *et al.*, 2009)، کنتیک تجزیه زیستی مالاتیون (Tazdait *et al.*, 2013)، کنتیک تجزیه زیستی رنگ‌های آزو توسط دو گونه از جنس Pseudomonas (حیدری کشل و همکاران، ۱۳۹۲) و کنتیک تجزیه زیستی بنزن (Kureel *et al.*, 2017) اشاره‌می‌شود

. بااین‌وجود مطالعات کمی در زمینه کنتیک تجزیه زیستی نفت خام انجام‌شده است که از آن‌ها می‌توان به مطالعات انجام‌شده توسط Gibb و همکاران در سال ۲۰۰۱ و Sadeghi Haddad Zavareh و همکاران (۲۰۱۶) اشاره کرد. خلیج‌فارس از متنوع‌ترین بوم‌سازگان‌های دنیا بوده و به دلیل موقعیت راهبردی و ویژه‌ای که دارد محل عبور بیش از ۶۰ درصد نفت خام دنیا می‌باشد (حسن شاهیان و همکاران، ۱۳۸۹)، درنتیجه به‌طور مداوم در معرض آلاینده‌های نفتی بوده و نیاز به توسعه روش‌های کارآمد برای تصفیه مواد آلاینده ضروری است. با توجه به وجود مطالعات محدود در زمینه توانایی سویه‌های خالص‌شده از خلیج‌فارس در تجزیه زیستی ترکیبات مختلف موجود در نفت خام و همچنین کنتیک تجزیه زیستی نفت خام، این مطالعه باهدف مطالعه توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط سویه TA1 (*Alcanivorax dieselolei*) جداسازی شده از سواحل بندرعباس، توانایی تجزیه ترکیبات مختلف تشکیل‌دهنده نفت خام و همچنین بررسی کنتیک تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه TA1 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

سویه TA1 (*Alcanivorax dieselolei* با شماره دستیابی KF452284.1) جداسازی شده از سواحل بندرعباس از آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه شهید بهشتی تهران تهیه گردید. سویه تهیه‌شده در ارلن های شیاردار حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث بر روی انکوباتور شیکردار با ۱۴۰ دور در دقیقه و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد. پس از رشد (۲۴ ساعت) باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار Hermle Z323K رسوب داده شدند و از آن‌ها برای تلقیح محیط‌های کشت استفاده شد.

به‌منظور بررسی توانایی سویه TA1 در تولید بیوسورفکتانت، سویه TA1 به محیط کشت پایه نمکی حاوی منابع مختلف کربن (ملاس، گلیسرول و نفت خام) به‌عنوان منبع کربن و انرژی تلقیح و به مدت یک هفته در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۴۰ دور در دقیقه انکوباسیون صورت گرفت. محیط پایه معدنی حاوی ۰/۵ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۱ گرم کلرید آمونیم، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن، ۳ گرم کلرید سدیم و همچنین ۱ میلی‌لیتر محلول عناصر میکرو در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دریا بود. محلول عناصر میکرو شامل ۷۰ میلی‌گرم کلرید روی، ۱۰۰ میلی‌گرم کلرید منگنز، ۲۰۰ میلی‌گرم کلرید کبالت، ۱۰۰ میلی‌گرم کلرید نیکل، ۲۰ میلی‌گرم کلرید مس II، ۵۰ میلی‌گرم مولیبدات سدیم، ۲۶ میلی‌گرم سلنیت سدیم، ۱۰ میلی‌گرم وانادات سدیم، ۳۰ میلی‌گرم ولفرامات سدیم، ۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۲۵ درصد و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود (Schlegel, 1992). پس از سپری شدن زمان انکوباسیون به‌منظور انجام تست پراکنش لایه نفتی، در داخل یک پتری دیش ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و سپس و ۲۰ میکرو لیتر نفت خام به سطح آب اضافه شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر سوپرناتانت باکتری از محیط کشت پایه نمکی به سطح لایه نفتی افزوده و سپس ناحیه شفاف ایجادشده در لایه نفتی اندازه‌گیری شد. به‌منظور تعیین فعالیت امولسیون سازی نفت خام توسط سویه TA1 به یک لوله‌آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر نفت خام و ۲ میلی‌لیتر از سوپرناتانت محیط کشت اضافه و به مدت ۲ دقیقه تکان داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و سپس ظرفیت امولسیون سازی محاسبه گردید. از محیط کشت بدون باکتری نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام گرفتند (Rismani *et al.*, 2006).

برای بررسی توانایی سویه TA1 در تجزیه زیستی ترکیبات مختلف نفت خام (آلیفاتیک، آروماتیک، رزینی و آسفالتن)، سویه TA1 در محیط کشت نوترینت براث کشت داده‌شده و به ارلن های شیاردار ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه معدنی حاوی ۱ درصد نفت خام تلقیح شد. پس از پایان زمان انکوباسیون میزان نفت باقی‌مانده از محیط‌های کشت استخراج و وزن سنجی اجزای مختلف نفت خام انجام گرفت (Sadeghi Hadddad Zavareh *et al.*, 2016).

به‌منظور استخراج نفت خام باقیمانده از محیط‌های کشت، ابتدا pH محیط کشت با استفاده از HCl یک نرمال به کمتر از ۲ رسانیده شد و سپس با ۲۵ میلی‌لیتر هگزان نرمال شست‌وشو داده شد. سپس محیط کشت در قیف جداکننده تکان داده شد. پس از جداسازی سوپرناتانت، فاز پایینی دوباره با ۲۵ میلی‌لیتر هگزان نرمال استخراج گردید. درنهایت دو استخراج انجام‌شده باهم مخلوط و حلال پرانده شد (Shahriari Moghadam *et al.*, 2014). در پایان توسط وزن سنجی میزان نفت باقی‌مانده اندازه‌گیری شد. برای نمونه شاهد بدون باکتری نیز به همین روش استخراج نفت انجام شد.

برای وزن سنجی اجزای مختلف نفت خام، محیط‌های کشت ابتدا سانتریفوژ شده (۲۰ دقیقه در g× ۷۰۰۰) و سپس توسط کلروفرم (میلی‌لیتر ۲۰ × ۳) بخش آلی موجود در سوپرناتانت استخراج گردید و توسط سولفات سدیم آب آن گرفته شد. سپس کلروفرم توسط دستگاه روتاری پرانده و سپس بخش تغلیظ شده توسطان- هگزان به دو بخش تفکیک شد. بخش محلول دران- هگزان شامل هیدروکربن‌های اشباع‌شده، هیدروکربن‌های آروماتیک و ترکیبات رزینی و بخش غیرمحلول در آن‌که شامل آسفالتنها بوده است. بخش غیر محلول پس از گذراندن از فیلتر و تبخیر هگزان، وزن شد و جزء آسفالتن موجود در نفت خام محسوب شد. بخش محلول دران – هگزان با پراندن تغلیظ و پس از توزین در ۲۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم حل و سپس ۷ گرم سیلیکاژل به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد تا نفت جذب سیلیکاژل گردد. با استفاده از این سیلیکاژل، یک ستون کروماتوگرافی به قطر ۵/۰ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر ساخته شد. ستون حاصل به ترتیب با سیکلوهگزان، بنزن و متانول سه مرتبه و هر بار با حجم ۲۰ میلی‌لیتر شسته شد. بخش‌های استخراج‌شده

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

به‌وسیله حلال‌های سیکلوهگزان، بنزن و متانول به ترتیب به‌عنوان هیدروکربن‌های آلیفاتیک، هیدروکربن‌های آروماتیک و بخش رزینی در نظر گرفته شدند، هر یک از این اجزاء پس از پراندن حلال وزن شدند (Thouand *et al.*, 1999).

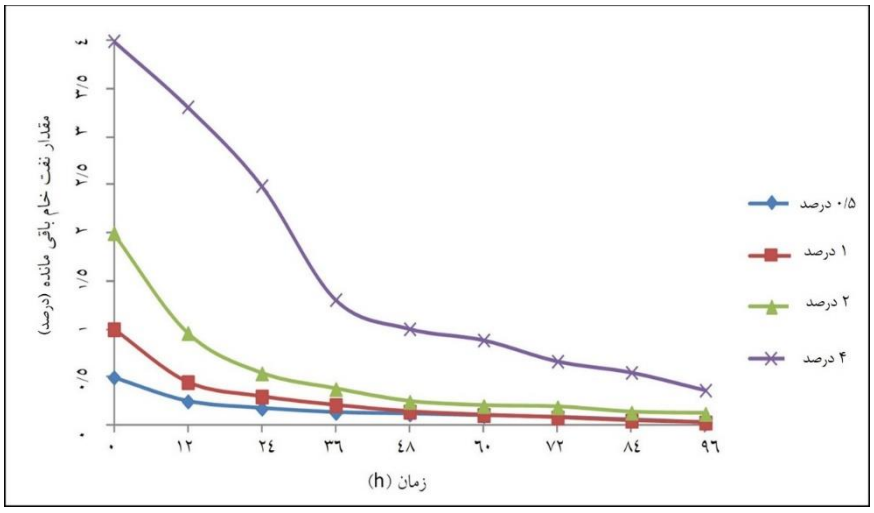
به‌منظور بررسی کنتیک تجزیه زیستی نفت خام، سویه TA1 در ارلن های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی، به همراه مقدارهای مختلف نفت خام (۰/۵ درصد، ۱ درصد، ۲ درصد و ۴ درصد) به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی تلقیح و انکوباسیون مدت ۴ روز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۴۰ دور در دقیقه صورت گرفت. همچنین تیمارهای شاهد با شرایط مشابه تیمارهای مختلف بدون تلقیح باکتری برای ارزیابی میزان تجزیه غیر زیستی نفت خام نیز انکوبه شدند. تعیین مقدار نفت باقی‌مانده به روش وزن سنجی و شمارش تعداد باکتری‌ها با روش تهیه رقت سریال و کشت بر روی پلیت‌های نوترینت آگار در ساعات (۰، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴ و ۹۶) صورت گرفت. کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار انجام گرفتند. پس از محاسبه میزان رشد ویژه، داده‌های به‌دست‌آمده با مدل‌های مختلف با استفاده از نسخه ۷ نرم‌افزار MATLAB تطبیق داده شدند.

نتایج

نتایج بررسی توانایی سویه TA1 در تولید بیوسورفکتانت در محیط کشت پایه نمکی حاوی منابع مختلف کربن (ملاس، گلیسرول و نفت خام) نشان داد، سویه TA1 در هر سه محیط ملاس، گلیسرول و نفت خام قادر به رشد بوده است، اما توانایی پراکنده کردن لایه نفتی و تست فعالیت امولسیون سازی تنها در باکتری رشد کرده در محیط حاوی نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی مشاهده شد. با افزودن فاز آبی محیط کشت حاوی باکتری TA1 رشد کرده در محیط پایه معدنی (حاوی نفت خام) به گسترده نفتی، لایه نفتی شکافته و یک ناحیه شفاف در سطح لایه نفتی تشکیل شد که نشانگر تولید بیوسورفکتانت توسط سویه TA1 بود. ظرفیت امولسیون‌سازی سویه TA1 معادل با ۵۰ درصد اندازه‌گیری شد.

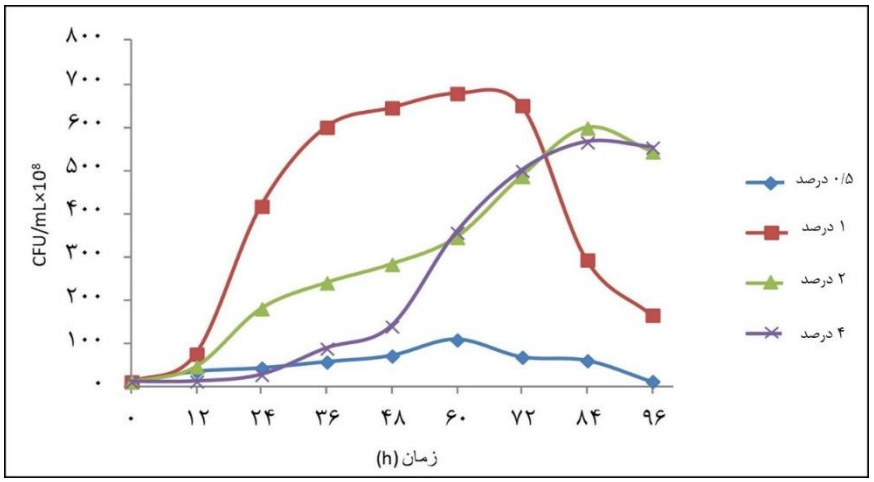
نتایج وزن سنجی ترکیبات مختلف نفت خام استفاده‌شده در تحقیق حاضر نشان داد، نفت خام استفاده‌شده شامل ۷۳/۲۸ درصد ترکیبات آلیفاتیک، ۲۲/۰۵ درصد ترکیبات آروماتیک، ۲/۱۷ درصد ترکیبات رزینی و ۲/۵۰ درصد ترکیبات آسفالتن بود است. پس از انکوباسیون سویه TA1 در محیط پایه معدنی حاوی ۱ درصد نفت خام، در پایان زمان انکوباسیون میزان نفت باقی‌مانده از محیط‌های کشت استخراج و وزن سنجی اجزای مختلف نفت خام نشان داد این سویه قادر به تجزیه ترکیبات مختلف نفت خام (آلیفاتیک، آروماتیک، رزینی و آسفالتن) بوده است. پس از دوره انکوباسیون به ترتیب ۹۵/۴۶ درصد، ۸۹/۵۲ درصد، ۲۹/۹۵ درصد و ۲۷/۲۰ درصد از ترکیبات آلیفاتیک، آروماتیک، رزینی و آسفالتن‌ها تجزیه شدند. نتایج آزمایش‌های میزان تجزیه زیستی نفت خام و میزان رشد سویه TA1 در غلظت‌های مختلف سوبسترا در شکل ۱ نشان داده‌شده است.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ۱: میزان نفت باقی‌مانده در تیمارهای دارای مقادیر مختلف نفت خام.

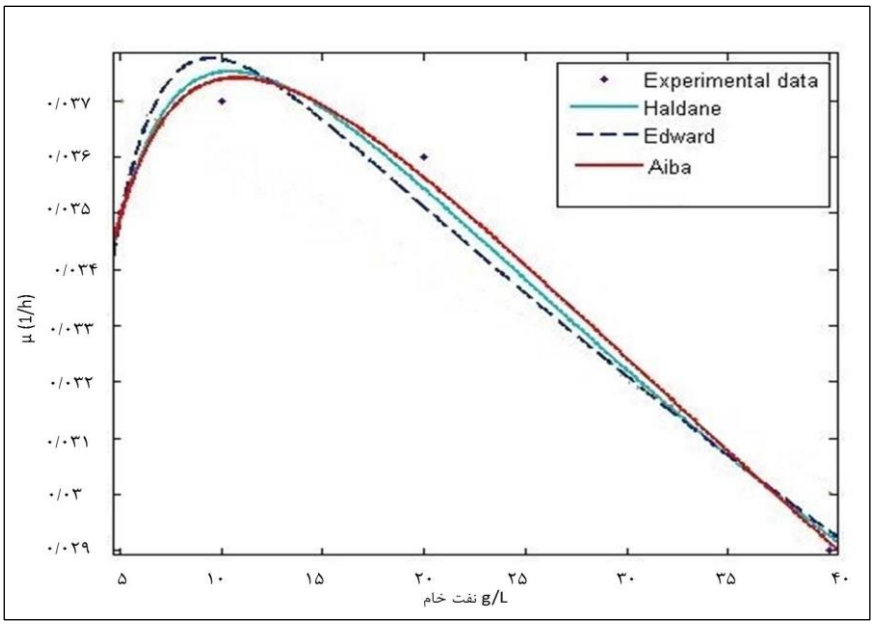
در پایان دوره آزمایش در تمامی تیمارها بالغبر ۹۰ درصد نفت خام تجزیه‌شده بود. کمترین میزان تجزیه نفت خام در تیمار حاوی ۴ درصد نفت خام اندازه‌گیری شد (۹۱ درصد). نتایج آزمون one-way ANOVA نشان داد، در ۱۲ ساعت اولیه شروع آزمایش ارتباط معنی‌داری بین تمامی تیمارها وجود داشته است ($p < ۰/۰۵$)، درحالی‌که با ادامه آزمایش در زمان‌های ۲۴، ۳۶، ۴۸ ساعت پس از شروع آزمایش بین تیمارهای حاوی ۰/۵ و ۱ درصد نفت خام و همچنین بین تیمارهای حاوی ۱ و ۲ درصد نفت خام ارتباط معنی‌داری در میزان نفت باقی‌مانده در محیط کشت دیده نشد ($p > ۰/۰۵$). با افزایش زمان (۸۴ ساعت پس از شروع آزمایش) به‌طورکلی به‌جز تیمار حاوی ۴ درصد نفت خام ارتباط معنی‌داری بین تیمارهای مختلف دیده نشد ($p > ۰/۰۵$)، همچنین نتایج آزمون one-way ANOVA نشان داد به‌طورکلی در تیمارهای دارای غلظت‌های مختلف نفت خام، گذشت زمان تأثیر معنی‌داری بر میزان تجزیه نفت خام داشته است. منحنی رشد تغییرات تعداد باکتری‌ها در زمان‌های مختلف در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲: منحنی رشد سلولی سویه TA1 در غلظت‌های مختلف نفت خام.

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت اولیه نفت خام فاز تأخیری و زمان تجزیه زیستی افزایش‌یافته است. در این پژوهش مدل‌های Haldane، Edvards و Aiba به‌خوبی با داده‌های تجربی منطبق شدند (شکل ۳).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ۳: مقایسه مدل‌های کنتیکی مختلف (ادوارد، هالدن و ایبا) استفاده‌شده در مطالعه حاضر.

با توجه به مقدار R^2 =۰/۹۹ مدل ایبا به عنوان بهترین مدل پیشنهادی در نظر گرفته شد. جدول ۱ مقدارهای به‌دست‌آمده از پارامترهای کنتیکی مدل‌های مختلف را نشان می‌دهد.

جدول ۱: پارامترهای کنتیکی مختلف اندازه‌گیری شده بر اساس مدل‌های مختلف.

مدل	Ki (mg/l)	μmax (1/h)	R^2
Haldane	۰/۱۷۸	۰/۰۵۱	۰/۹۸
Edward	۰/۴۱۱	۰/۰۴۲	۰/۹۶
Aiba	۰/۰۱۱	۰/۰۴۸	۰/۹۹

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از سویه TA1 (*Alcanivorax dieselolei*) جداسازی شده از سواحل بندرعباس استفاده گردید. از میان باکتری‌های مختلف تجزیه‌کننده ترکیبات هیدروکربنی در محیط دریایی سویه‌های متعلق به جنس Alcanivorax به‌عنوان گونه‌های کلیدی شناخته‌شده‌اند و در مناطق آلوده‌شده به ترکیبات نفتی شناسایی‌شده‌اند (Barbato *et al.*, 2016, Terrisse *et al.*, 2017). گونه‌های متعلق به این جنس به دلیل تولید بیوسورفکتانت‌های خارج سلولی توان امولوسیونه کردن قطرات نفت را دارا هستند، درنتیجه توان بالایی در مصرف ترکیبات هیدروکربنی را داشته و به‌صورت ترجیحی ترکیبات هیدروکربنی را مصرف می‌کنند، همچنین مطالعات نشان داده است این جنس هم در محیط آزمایشی و هم در طبیعت توانایی خود را حفظ کرده و همچنین از هیدرولازها و اکسیژنازهای آن‌ها می‌توان به‌عنوان بیوکاتالیست استفاده نمود (Golyshin *et al.*, 2003). سویه‌های مختلفی از این جنس شناسایی‌شده است که از آن‌ها می‌توان به *Alcanivorax balearicus* (Rivas *et al.*, 2007)، *Alcanivorax hongdengensis* (Wu *et al.*, 2009)، *Alcanivorax pacificus* (Lai *et al.*, 2011)، *Alcanivorax gelatiniphagus* (Kwon *et al.*, 2015) و *Alcanivorax nanhaiticus* (Lai *et al.*, 2016) اشاره‌می‌گردد. اولین بار گونه *A. dieselolei* توسط Liu و Shao (۲۰۰۵) از آب‌های دریایی

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

آلوده به ترکیبات نفتی جداسازی گردید. سویه TA1 استفاده‌شده در تحقیق حاضر نیز به‌صورت مؤثری قادر به تجزیه ترکیبات هیدروکربنی بود. نتایج مطالعات انجام‌شده توسط Kostka و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داده است جنس Alcanivorax نقش مؤثری در تجزیه ترکیبات هیدروکربنی ایفا می‌کند.

اگرچه سویه‌های مختلفی از باکتری‌ها قادر به تجزیه ترکیبات نفتی هستند، بااین‌وجود فعالیت آن‌ها به دلیل حلالیت کم ترکیبات هیدروکربنی در محیط آبی محدود می‌شود، درنتیجه استفاده از باکتری‌هایی باقابلیت تولید بیوسورفکتانت ازجمله روش‌هایی است که منجر به افزایش سرعت زیست پالایی مناطق آلوده به ترکیبات هیدروکربنی می‌شود (Patowary *et al.*, 2017). بیوسورفکتانت‌ها گروهی از مولکول‌های فعال سطحی با ساختار بسیار متنوعی هستند که اکثراً توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات کشش سطحی و بین سطحی را کاهش و نقش مؤثری در افزایش کارایی پاک‌سازی زیست پالایی ایفا می‌کنند.

سویه TA1 در هر سه محیط ملاس، گلیسرول و نفت خام رشد کرد؛ اما فعالیت پراکنده کردن لایه نفتی و تست فعالیت امولسیون سازی تنها در باکتری رشد کرده در محیط دارای نفت خام مشاهده گردید. مطالعات گذشته نشان داده است بیوسورفکتانت‌های تولیدشده توسط *Alcanivorax borkumensis* یکی از کارآمدترین بیوسورفکتانت های تولیدشده توسط باکتری‌ها است، درنتیجه می‌تواند توانایی لازم را برای تسهیل تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها توسط باکتری و یا دیگر سویه‌ها داشته باشد (Golyshin *et al.*, 2003). به‌عنوان‌مثال مطالعات نشان داده است تجزیه زیستی Arochlor 1248 PCBs توسط باکتری‌ها به همراه بیوسورفکتانت تولیدشده توسط *Alcanivorax borkumensis* تسهیل می‌شود (Golyshin *et al.*, 1999). بیوسورفکتانت‌ها نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی مزایای بسیاری مانند سازگاری با محیط‌زیست، سمیت کم، فعالیت بالا در شرایط سخت و تجزیه‌پذیری زیاد را دارا هستند و همچنین قادر هستند در غلظت‌های کم عملکرد مناسب را انجام دهند (Thavasi *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2017). سویه TA1 قابلیت رشد و تجزیه نفت در شوری ۳/۵ درصد را نشان داد. تخمین زده‌شده که حدود ۵ درصد از فاضلاب‌های صنعتی درجه شوری بالایی دارند و میکروارگانیسم‌های هالوفیل کاندیداهای مناسبی برای پاک‌سازی زیستی این محیط‌ها به‌حساب می‌آیند. درنتیجه سویه استفاده‌شده در این پژوهش نیز می‌تواند کاندیدای مناسبی برای به‌کارگیری در تصفیه آلاینده‌های هیدروکربنی آب‌ها، رسوبات و خاک‌های با شوری بالا باشد.

نتایج تست وزن سنجی ترکیبات مختلف تشکیل‌دهنده نفت خام نشان داد بیشترین بخش تجزیه‌شده توسط سویه TA1 مربوط به ترکیبات آلیفاتیک و کمترین آن مربوط به ترکیبات رزینی و آسفالتنی بود. نتایج مطالعات دیگر محققین نیز نشان داده است بخش اعظم ترکیبات آلیفاتیک نفت خام به‌آسانی توسط باکتری‌ها تجزیه می‌شود درحالی‌که ترکیبات چند حلقه‌ای به دلیل پیچیدگی‌های ساختاری به‌سختی تجزیه می‌شوند (Pasumarthi *et al.*, 2013). نتایج مطالعه حاضر نیز نتایج این محققین را تائید می‌کند. نکته قابل‌توجه آن است سویه استفاده‌شده در مطالعه حاضر قادر است علاوه بر اجزای آلیفاتیک و آروماتیک از اجزای دیگر نفت خام (رزینی و آسفالتن) نیز استفاده نماید که نشان‌دهنده قابلیت بالای این سویه برای استفاده در زیست پالایی دارد. در زیست پالایی استفاده از سویه‌هایی که دارای قابلیت استفاده از بخش‌های مختلف نفت خام هستند اهمیت ویژه‌ای دارد (Zhang *et al.*, 2011)؛ زیرا در مناطق آلوده پس از مصرف بخش‌های تجزیه‌پذیرتر نفت خام اجزای دیرتجزیه در محیط باقی‌مانده و استفاده از این سویه‌ها منجر به کارایی بالا در تصفیه زیستی می‌شود. کنتیک تجزیه زیستی به‌منظور پیش‌بینی غلظت سوبسترای باقیمانده در زمان خاص، طی فرایند پاک‌سازی زیستی به کار گرفته می‌شود. اساس فرضیه کنتیک تجزیه زیستی بر مصرف سوبسترا از طریق انجام واکنش‌هایی که تنها به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها با داشتن آنزیم‌های مربوطه صورت می‌گیرد، می‌باشد؛ بنابراین به‌طورکلی سرعت تجزیه سوبسترا به غلظت سوبسترا و ارگانیسم‌های تجزیه‌کننده سوبسترا بستگی دارد (Okpokwasili and Nweke, 2006). در شرایط مختلف از مدل‌های مختلفی برای بیان کنتیک تجزیه زیستی استفاده می‌شود. به‌منظور توصیف رفتار درست سیستم و فهم ویژگی‌های دینامیکی تجزیه زیستی سوبسترا، تخمین دقیق پارامترهای کنتیکی مهم است (Wei *et al.*, 2010). سویه TA1 در غلظت‌های مختلف نفت خام قادر به رشد بود. کنتیک تجزیه نفت خام توسط سویه TA1 در شرایط هوازی در کشت بسته انجام شد. با افزایش نفت خام تا مقدار ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر، روند افزایش سرعت داشت، اما بعدازاین مقدار با

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

افزایش یافتن فاز عادت و نمایان شدن اثر مهاری سوبسترا، روند کاهش سرعت رشد را نشان داد. مطالعه انجام‌شده توسط Darvishi و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داده است که درصد تجزیه نفت خام توسط کنسرسیوم باکتری با افزایش غلظت نفت خام کاهش می‌یابد که نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر نیز تأییدکننده نتایج این محققین است. پس از بررسی مدل‌های مختلف برای توصیف دینامیک تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه TA1 مدل Aiba به‌عنوان بهترین مدل‌ها برای تجزیه زیستی نفت خام انتخاب شد. در نتیجه‌گیری کلی با توجه به تولید بیوسورفکتانت توسط سویه TA1، قابلیت این سویه در تجزیه زیستی ترکیبات مختلف نفت خام و همچنین توانایی این سویه در مصرف ترکیبات هیدروکربنی در غلظت بالای سوبسترا، می‌توان از این سویه به‌صورت کارآمدی در زیست پالایی مناطق آلوده به ترکیبات نفتی استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با شناسایی و تعیین شرایط بهینه رشد باکتری نفت خوار تولیدکننده بیوسورفاکتانت جداشده از ساحل بندرعباس در مقطع کارشناسی ارشد است که با حمایت دانشگاه شهید بهشتی انجام‌شده است.

منابع

حسن شاهیان، م.، حسن شاهیان، ع. و امتیازی، گ.، ۱۳۸۹. بهینه‌سازی تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری‌های *Acinetobacter calcoacticus* BS و Pseudomonas aeroginosa AS جداسازی شده از خلیج‌فارس. پژوهش نفت، سال ۲۰، شماره ۶۳، صفحات ۸۲-۷۲.

حیدری کشل، س.، رضایی طاویرانی، م.، چکشیان خراسانی، ع.ر.، پاکزاد، ا. و نور مرادی، ح.ا.، ۱۳۹۲. مطالعه سینتیکی و مقایسه‌ای بر روی تجزیه میکروبی رنگ‌های آزو توسط باکتری‌های سودوموناس آئروژنوزا و سودوموناس پوتیدا. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره ۲۱، صفحات ۱۷۹-۱۷۰.

نادعلیان، ب.، ابراهیمی پور، غ.، شهریاری مقدم، م. و نادعلیان، ب.، ۱۳۹۵. بررسی حذف زیستی آلاینده‌های نفتی توسط باکتری جداشده از رسوبات منطقه اروندکنار. سلامت و بهداشت، سال ۷، شماره ۳، صفحات ۲۶۴-۲۷۵.

Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, T. and Mehmetoğlu, Ü., 2004. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. Process Biochemistry, 39:983-988.

Agarry, S. E., Audu, T. O. K. and Solomon, B. O., 2009. Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by *Pseudomonas fluorescence* from steady state and wash-out data. International Journal of Environmental Science and Technology, 6:443-450.

Bai, J., Wen, J. P., Li, H.M. and Jiang, Y., 2007. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. Process Biochemistry, 42:510-517.

Barbato, M., Scoma, A., Mapelli, F., De Smet, R., Banat, I. M., Daffonchio, D. and Borin, S., 2016. Hydrocarbonoclastic Alcanivorax isolates exhibit different physiological and expression responses to n-dodecane. Frontiers in microbiology, 7: 1-14.

Borah, D. and Yadav, R. N. S., 2017. Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. Egyptian Journal of Petroleum, 26: 181-188.

Darvishi, P., Mowla, D., Ayatollahi, S. and Niazi, A., 2011. Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an efficient strain, ERCPPI-1. Desalination and Water Treatment, 28:46-54.

Ebadi, A., Sima, N. A. K., Olamaee, M., Hashemi, M. and Nasrabadi, R. G., 2017. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. Journal of advanced research, 8: 627-633.

Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M. and Rodriguéz, M. S., 2006. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. International Biodeterioration and Biodegradation, 57:222-228.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Gibb, A., Chu, A., Wong, R.C.K. and Goodman, R. H., 2001. Bioremediation kinetics of crude oil at 57C. Journal of Environmental Engineering, 127:818-824.

Golyshin, P. N., Dos Santos, V. A. M., Kaiser, O., Ferrer, M., Sabirova, Y. S., Lünsdorf, H., Chernikova, T. N., Golyshina, O. V., Yakimov, M. M., Pühler, A. and Timmis, K.N., 2003. Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. Journal of Biotechnology, 106:215-220.

Golyshin, P. N., Fredrickson, H. L., Giuliano, L., Rothmel, R., Timmis, K. N. and Yakimov, M. M., 1999. Effect of novel biosurfactants on biodegradation of polychlorinated biphenyls by pure and mixed bacterial cultures. New Microbiologica, 22:257- 267.

Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T. C. and Huettel, M., 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deep water Horizon oil spill. Applied and Environmental Microbiology, 77:7962-7974.

Kureel, M. K., Geed, S. R., Giri, B. S., Rai, B. N. and Singh, R. S., 2017. Biodegradation and kinetic study of benzene in bioreactor packed with PUF and alginate beads and immobilized with Bacillus sp. M3. Bioresource Technology, 242: 92-100.

Kwon, K. K., Oh, J. H., Yang, S. H., Seo, H. S. and Lee, J. H., 2015. *Alcanivorax gelatiniphagus* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flat sediments enriched with crude oil. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 65: 2204-2208.

Lai, Q., Wang, L., Liu, Y., Fu, Y., Zhong, H., Wang, B., Chen, L., Wang, J., Sun, F. and Shao, Z., 2011. *Alcanivorax pacificus* sp. nov., isolated from a deep-sea pyrene-degrading consortium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61:1370-1374.

Lai, Q., Zhou, Z., Li, G., Li, G. and Shao, Z., 2016. *Alcanivorax nanhaiticus* sp. nov., isolated from deep sea sediment. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66: 3651-3655.

Liu, C. and Shao, Z., 2005. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55:1181-1186.

Marzan, L. W., Sultana, T., Hasan, M. M., Mina, S. A., Islam, M. R., Rakibuzzaman, A. G. M. and Khan, M. I. H., 2017. Characterization of furnace oil bioremediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites of the Sundarbans, Bangladesh. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017: 103-113.

Nikolopoulou, M., Pasadakis, N. and Kalogerakis, N., 2007. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. Desalination, 211:286-295.

Okpokwasili, G. C. and Nweke, C. O., 2006. Microbial growth and substrate utilization kinetics. African Journal of Biotechnology, 5:305-317.

Pasumarthi, R., Chandrasekaran, S. and Mutnuri, S., 2013. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. Marine Pollution Bulletin, 76:276-282.

Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C. and Deka, S., 2017. Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. Frontiers in microbiology, 8: 1-14.

Prince, R. C. and Walters, C. C., 2016. Biodegradation of oil hydrocarbons and its implications for source identification. In Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics (Second Edition), pp. 869-916.

Reis, I., Almeida, C. M. R., Magalhães, C. M., Cochofel, J., Guedes, P., Basto, M. C. P., Bordalo, A. A. and Mucha, A. P., 2014. Bioremediation potential of microorganisms from a sandy beach affected by a major oil spill. Environmental Science and Pollution Research, 21:3634-3645.

Rismani, E., Fooladi, J. and Ebrahimi Por, G. H., 2006. Biosurfactant production in batch culture by a *Bacillus licheniformis* isolated from the Persian Gulf. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9:2498-2502.

Rivas, R., García-Fraile, P., Peix, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. and Velazquez, E., 2007. *Alcanivorax balearicus* sp. nov., isolated from Lake Martel. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57:1331-1335.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Sadeghi Hadddad Zavareh, M., Ebrahimipour, G., Shahriari Moghadam, M, Fakhari, J. and Abdoli, T., 2016. Bioremediation of crude oil using bacterium from the coastal sediments of Kish Island, Iran. Iranian Journal of Public Health, 45:670-679.

SakthiPriya, N. S., Doble, M. and Sangwai, J. S., 2015. Bioremediation of costal and marine pollution due to crude oil using a Microorganism *Bacillus Subtilis*. Procedia Engineering, 116:213-220.

Santisi, S., Cappello, S., Catalfamo, M., Mancini, G., Hassanshahian, M., Genovese, L., Giuliano, L. and Yakimov, M.M., 2015. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. Brazilian Journal of Microbiology, 46:377-387.

Schlegel H. G., 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Auflage, Georg Thieme Verlag.

Shahriari Moghadam, M., Ebrahimipour, G., Abtahi, B., Khazaei, N. and Karbasi, N., 2014. Statistical optimization of crude oil biodegradation by Marinobacter sp. isolated from Qeshm Island, Iran. Iranian Journal of Biotechnology, 12:35-41.

Singh, R. K., Kumar, S., Kumar, S. and Kumar, A., 2008. Biodegradation kinetic studies for the removal of p-cresol from wastewater using *Gliomastix indicus* MTCC 3869. Biochemical Engineering Journal, 40:293-303.

Souza, E. C., Azevedo, P. O. D. S. D., Domínguez, J. M., Converti, A. and Oliveira, R. P. D. S., 2017. Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. CyTA-Journal of Food, 15: 525-530.

Tazdait, D, Abdi, N., Grib, H., Lounici, H., Pauss, A. and Mameri, N., 2013. Comparison of different models of substrate inhibition in aerobic batch biodegradation of malathion. Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 37:221-230.

Terrisse, F., Cravo-Laureau, C., Noel, C., Cagnon, C., Dumbrell, A. J., McGenity, T. J. and Duran, R., 2017. Variation of oxygenation conditions on a hydrocarbonoclastic microbial community reveals Alcanivorax and Cycloclasticus ecotypes. Frontiers in Microbiology, 8:1-15.

Thavasi, R., Jayalakshmi, S. and Banat, I. M., 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource Technology, 102:772-778.

Thouand, G., Bauda, P., Oudot, J., Kirsch, G., Sutton, C. and Vidalie, J. F., 1999. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. Canadian Journal of Microbiology, 45:106-115.

Wei, Y. H., Chen, W. C. and Chen, B. Y., 2010. Exploring kinetics of phenol biodegradation by Cupriavidus taiwanesis 187.Molecular Sciences, 11:5065-5076.

Wu, Y., Lai, Q., Zhou, Z., Qiao, N., Liu, C. and Shao, Z., 2009. *Alcanivorax hongdengensis* sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59:1474-1479.

Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F. and Xu, P., 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. Bioresource Technology, 102:4111-4116.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]