

## **Biosurfactant Production and Biological Removal of Bulk Oil using Native Strains Isolated from the Southern Shore Lines of Caspian Sea**

**Jina Tanzadeh**

Ph.D Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran,  
jina\_tanzadeh@yahoo.com

**Mohammad Faezi Ghasemi** \*

Associate professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic azad University, Lahijan, Iran,  
faezi\_m@yahoo.com

**Masoumeh Anvari**

Associate professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran,  
anvariir@yahoo.com

**Khosro Issazadeh**

Assistant professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran,  
issa\_kaam@yahoo.com

### **Abstract**

**Introduction:** Nowadays, biodegradation of oil pollution using native bacteria isolates is considered in different research programs. The purpose of this study was to investigate biosurfactant production and degradation of oil spills on Caspian Sea coastlines using native bacterial isolates.

**Materials and methods:** Sediment and oil spills samples were isolated from seven stations in the coasts of Bandar Anzali and Kiah Shahr. Biosurfactant production was evaluated using quantitative and qualitative methods such as hemolysis on blood agar, oil spreading method, droplet disintegration, emulsification activity and surface tensile test. Also, total hydrocarbon of oil was estimated. Biodegradation of compounds in sediments and petroleum analyzed using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) method. Identification of strains was performed using different morphological, biochemical and sequencing of 16S rRNA genes.

**Results:** Amongst 115 isolates, 57 isolates showed biosurfactant activity based on qualitative methods, and 15 strains with highest biological removal efficiency were selected for further studies. The spectrophotometry results showed the J3 isolate could remove 94.6% of oil within 7 days, was the most potent isolate in removal of hydrocarbons. Gas chromatography analysis indicated that 90% of aliphatic compounds were removed by J3 strain in 21 days. The isolates J3, J5, and J12, which showed highest biosurfactant activity, were identified as strains of *Bacillus cereus* sensu lato, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively.

**Discussion and conclusion:** The results of this study showed that the isolated strains showed suitable decreasing hydrophobicity and removal of oil hydrocarbons. So, it can be concluded that isolated J3, J5 and J12 are potent microorganisms in cleaning of contaminated waters by oil and other hydrocarbons.

**Key words:** Contamination, Biosurfactant Production, Biodegradation, Bulk Oil

---

\* Corresponding author

**Received:** February 5, 2018 / **Accepted:** June 27, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۱۲۸-۱۱۳  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶

## تولید بیوسورفکتانت و حذف زیستی لکه‌های نفتی با استفاده از جدایه‌های بومی باکتری‌های سواحل جنوبی دریای خزر

**جینا تن‌زاده:** دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، jina\_tanzadeh@yahoo.com  
**محمد فائزی قاسمی\*:** دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، faezi\_m@yahoo.com  
**معصومه انوری:** دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، ایران، anvariir@yahoo.com  
**خسرو عیسی‌زاده:** استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، issa\_kaam@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** امروزه تجزیه زیستی آلودگی‌های نفتی با استفاده از باکتری‌های بومی درخور توجه است. هدف پژوهش حاضر، جداسازی باکتری‌های بومی تولیدکننده بیوسورفکتانت با قابلیت حذف زیستی لکه‌های نفتی موجود در سواحل دریای خزر است.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌برداری از رسوبات و لکه‌های نفتی هفت ایستگاه داخل سواحل بندر انزلی و کیاشهر انجام شد. تولید بیوسورفکتانت با استفاده از روش‌های کمی و کیفی شامل همولیز در محیط آگار خون‌دار، روش گسترش نفت، آزمایش انهدام قطره، فعالیت امولسیون‌کنندگی (آمیزندگی) و آزمون کشش سطحی انجام شد. میزان تجزیه زیستی ترکیبات در رسوبات و لکه‌های نفتی به روش کروماتوگرافی گازی (GC-MS) و شناسایی باکتری‌ها با آزمون‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام شد.

**نتایج:** از میان ۱۱۵ جدایه حاصل، ۵۷ جدایه بر اساس آزمون‌های کیفی تولیدکننده ترکیبات فعال سطحی بودند. ۱۵ جدایه از ۵۷ جدایه برای مراحل بعدی و آزمون‌های تکمیلی انتخاب شدند؛ نتایج اسپکتروفتومتری این جدایه‌ها نشان دادند جدایه J3 با میزان حذف نفت ۹۴/۶ درصد طی ۷ روز توانمندترین جدایه در حذف هیدروکربن‌های نفتی است. تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی حذف ۹۰ درصد ترکیبات آلیفاتیک طی ۲۱ روز را توسط این جدایه نشان دادند. سه جدایه برتر تولیدکننده ترکیبات بیوسورفکتانت شامل J3، J5 و J12 بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی به ترتیب در گروه‌های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس همولیتیکوس و سودوموناس آنروژینوزا شناسایی شدند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشان دادند سویه‌های جداسازی شده سطح آبگریزی، توانایی تولید ترکیبات فعال‌کننده سطحی و ویژگی تجزیه ترکیبات هیدروکربنی را در حد مناسبی دارند. جدایه‌های J3 و J5 و J12 بیشترین درصد حذف نفتی را نشان دادند و نمونه J3 پس از ۲۱ روز با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC-MS) میزان TPH را به میزان ۹۴/۶ درصد در نفت خام کاهش داد.

**واژه‌های کلیدی:** آلودگی، تولید بیوسورفکتانت، تجزیه زیستی، لکه نفتی

\* نویسنده مسئول مکاتبات

## مقدمه

لکه‌های نفتی از مهم‌ترین مشکلات تهدیدکننده محیط‌زیست‌های آبی به شمار می‌روند و وقوع هر لکه نفتی با آسیب به محیط‌زیست دریایی همراه است. لکه‌های نفتی اغلب روی دریاها و در تأسیسات خطوط ساحلی ظاهر می‌شوند و بیشتر با مسیر رفت و آمد کشتی‌ها مرتبط هستند. قرارگیری در معرض لکه نفتی با توجه به زمان و مکان و سمیت و غلظت لکه نفتی ممکن است به مرگ موجودات مختلف منجر و آثار مضرری از جمله کاهش تولیدمثل، رشد غیرمناسب، مشکل در سازوکار تغذیه و کاهش قدرت دفاعی در برابر بیماری‌ها را موجب شود (۱). هیدروکربن‌های نفتی با منشأ فعالیت‌های انسانی بر اثر نشت و ورود نفت خام و ترکیبات فراوری‌شده آن و یا ورود باقیمانده‌های ناشی از احتراق ناقص نفت وارد محیط می‌شوند. تاکنون بیش از ۱۷۵ هیدروکربن در ترکیب نفت شناسایی شده است که ۱۰۸ نمونه آن ترکیبات آلیفاتیک اشباع‌شده و بقیه ترکیبات آروماتیک هستند. هیدروکربن‌های آلیفاتیک ترکیبات شاخه‌ای و ساده نفت محسوب می‌شوند که بر اساس تعداد اتم‌های کربن دسته‌بندی می‌شوند. ترکیبات آروماتیک از مهم‌ترین آلاینده‌های موجود در نفت خام هستند و آثار مخرب آنها بر سلامت انسان و محیط‌زیست چشمگیر است؛ به طوری که ورود آنها به زنجیره غذایی انسان ممکن است موجب بروز انواع بیماری‌ها، سرطان و مشکلات ژنتیکی در انسان شود. بندر انزلی در بخش غربی ساحل جنوبی دریای خزر جزو قدیمی‌ترین بندرهای ایران است و بیش از ۱۲۰ سال از عمر آن می‌گذرد. این بندر درباری بین تالاب انزلی و دریای خزر قرار دارد و دارای دو بازوی موج‌شکن سنگی است که حوضچه بندر را تشکیل می‌دهند. امروزه،

روش تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی با استفاده از باکتری‌های بومی به دلایل اقتصادی و زیست‌محیطی درخور توجه است. بیوسورفکتانت‌ها با ساختمان دوگانه دوست آب‌دوست و آب‌گریز از مواد فعال سطحی هستند که به علت توانایی‌هایی مانند کم کردن کشش سطحی و بین سطحی یا قدرت امولسیون‌کنندگی دارای پتانسیل استفاده در حوزه‌های مختلفی مانند صنایع شیمیایی، نفت، پتروشیمی، پلاستیک‌ها و مواد کامپوزیتی، دترجت‌ها و پاک‌کننده‌ها، صنعت نساجی، محصولات آرایشی، صنایع رنگ، کاغذ، معدن، فلزات، تهیه حشره‌کش‌ها و کنترل آفت‌ها، غذا و بسته‌بندی غذایی، مواد دارویی، پژوهش‌های پزشکی و بیوشیمیایی و سایر حوزه‌های فناوری پیشرفته هستند (۲). برای تولید بیوسورفکتانت توسط میکروب‌ها از بسترهایی مانند نفت خام (۳) روغن زیتون (۴)، پوست میوه پرتقال (۵) و گلوکز (۶) استفاده می‌شود. هدف پژوهش حاضر بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت و قابلیت حذف نفتی توسط باکتری‌های بومی جداسازی‌شده از مناطق آلوده به لکه‌های نفتی در سواحل جنوبی دریای خزر است.

## مواد و روش‌ها

**نمونه برداری:** در پژوهش حاضر، نمونه‌گیری از هفت منطقه رسوب و لکه‌های نفتی موجود در سواحل بندر انزلی (طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۲۸ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۲۸ دقیقه) انجام شد؛ این مناطق شامل ۳ نمونه از رسوب و لکه‌های نفتی در سه ایستگاه داخل بندر انزلی از سه فاصله طولی ۵، ۵۰ و ۱۰۰ متری ساحل (از هر کدام ۳ نمونه با فاصله ۵۰ متر از یکدیگر در عرض ساحل)، ۲ نمونه از لکه‌های نفتی موجود در منطقه سنگ‌چین، ۲ نمونه از خاک سواحل

کیاشهر (طول جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۰ دقیقه شمالی و عرض جغرافیایی ۴۹ درجه و ۵۶ دقیقه شرقی) و ۱ ایستگاه (ایستگاه شاهد) در خارج از بندر انزلی بودند و نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل شدند. در فرایند نمونه‌برداری حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم نمونه از رسوبات سطحی مرطوب با عمق حداکثر ۵ سانتی‌متر برداشته شد. برای نمونه‌برداری از رسوبات سطحی بستر به منظور اندازه‌گیری هیدروکربن‌های موجود از روش شماره ۲۰ استاندارد UNEP/IOC/IAEA استفاده شد. اسیدیتته نمونه‌ها با دستگاه (Horiba U-54) اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها به‌طور میانگین در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد، اسیدیتته برابر ۸/۲ و میزان قابلیت هدایت الکتریکی ۴۸/۵ دسی‌زیمنس بر متر (ds/m) داشتند.

**محیط کشت:** نفت خام مورد آزمایش از پالایشگاه نفت تهران با چگالی ۰/۸۴۴۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب تهیه شد. نمونه‌ها در محیط کشت MSM (Mineral Salt medium) حاوی ۱ درصد نفت خام (تنها منبع کربن و انرژی) کشت شدند؛ به این منظور، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد و سپس ۱ میلی‌متر نفت خام استریل شده به آن اضافه شد. ترکیبات محیط پایه نمکی (MSM) استفاده شده در پژوهش حاضر عبارتند از: ۲/۵ گرم برلیتر  $K_2HPO_4$ ، ۰/۳ گرم برلیتر  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۴ گرم برلیتر  $(NH_4)Cl$ ، ۰/۰۵ گرم برلیتر  $NaCl$  و ۰/۰۱ گرم برلیتر  $CaCl_2$ . سپس به ترکیب یادشده میزان ۲ میلی‌لیتر عناصر کمیاب به شرح زیر اضافه شد: ۰/۷۵ گرم برلیتر  $ZnSO_4 \cdot H_2O$ ، ۰/۲ گرم برلیتر  $MgSO_4 \cdot H_2O$ ، ۰/۰۷۵ گرم برلیتر  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۰/۰۵ گرم برلیتر  $Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$ ، ۰/۰۸ گرم برلیتر

۰/۰۲۷،  $H_3BO_3$ ، ۲CoCl. 6H<sub>2</sub>O گرم برلیتر ۰/۱۵، پس از افزودن ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های جداسازی شده به ارلن‌های محیط کشت MSM حاوی غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد) نفت خام، ارلن‌ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه (rpm) قرار گرفتند؛ پس از آن، ۵ میلی‌لیتر از مایع میکروبی به پلیت‌های حاوی محیط کشت MSM جامد اضافه شد و پلیت‌ها درون انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۷). برای خالص‌سازی باکتری‌ها، کلنی‌هایی که از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی متفاوت بودند به‌طور متوالی به روش کشت خطی روی محیط کشت نوترینت آگار کشت شدند. کشت نمونه‌ها روی محیط جامد نوترینت آگار تا رسیدن به کلنی خالص تکرار شد (۸).

#### غزبال‌گری باکتری‌های جداسازی شده بر اساس تولید

**بیوسورفکتانت:** به منظور بررسی تولید بیوسورفکتانت توسط جدایه‌ها، ارلن‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و با مشاهده کدورت حاصل از رشد باکتری‌ها درون لوله‌ها، مایع رویی از باکتری‌ها جداسازی و برای بررسی تولید بیوسورفکتانت استفاده شد (۹).

#### آزمون‌های تشخیص تولید بیوسورفکتانت

**آزمون همولیز خون در محیط کشت آگار خون‌دار (BA):** کشت باکتری‌های جداسازی شده روی محیط آگار خون‌دار دارای ۵ درصد (V/V) خون گوسفند انجام و نمونه به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. جدایه‌های حاوی همولیز بتا (ایجادکننده هاله شفاف) برای آزمون‌های بعدی انتخاب شدند (۱۰)؛ هاله شفاف اطراف کلنی فعالیت

غیراستریل برای شاهد منفی و از Tween20 برای شاهد مثبت استفاده شد (۱۴).

**بررسی فعالیت امولسیون‌کنندگی:** برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیون‌کنندگی از روش کوپر و گولدبرگ<sup>۱</sup> (۱۹۸۷) استفاده شد (۱۵)؛ برای این منظور، ۵ میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط پایه نمکی (MSM) همراه با ۶ میلی‌لیتر هیدروکربن مدنظر (نفت خام) در لوله آزمایش مدرج ریخته شد. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ دقیقه در ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط سکون قرار داده شدند (۱۶). پس از این مدت، فعالیت امولسیفیکاسیون (EC) با استفاده از آزمون E24 (Emulsification index) محاسبه شد. از محیط کشت استریل برای شاهد منفی و از سدیم دودسیل سولفات برای شاهد مثبت استفاده شد (۱۶).

$100 \times \text{حجم لایه امولسیون} / \text{حجم کل ستون مایع E24} =$

**بررسی فعالیت شکل‌گیری کف:** میزان پایداری امولسیون ایجاد شده توسط بیوسورفکتانت تولیدی سویه‌های برتر با اندازه‌گیری فعالیت شکل‌گیری کف مشخص شد (۱۲). همه جدایه‌هایی که طی مراحل اولیه غربال‌گری نتایج مثبت نشان داده بودند به‌طور جداگانه به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت برات تلقیح شدند و به مدت ۹۶ ساعت درون انکوباتور شیکر (۲۰۰ دور در دقیقه) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند؛ سپس فعالیت تشکیل کف بر اساس میزان پایداری کف و ارتفاع کف تولید شده بررسی شد. از محیط کشت استریل برای شاهد منفی و از سدیم دودسیل سولفات برای شاهد مثبت استفاده شد (۹).

همولیتیک سویه‌ها را نشان داد و قطر هاله تولید شده شاخصی برای تأیید توان تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد (۱۱). از محلول رقیق شده آب و صابون برای شاهد مثبت و از آب مقطر و محیط MSM بدون تلقیح باکتری برای نمونه شاهد منفی استفاده شد (۱۱).

#### آزمون پراکنش نفت (OSM) Oil Spread Method:

برای انجام این آزمایش، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل پلیت ریخته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آب افزوده شد؛ پس از پخش شدن نفت، ۱۰ میکرولیتر رومانند میکروبی حاصل از سانتریفیوژ لایه نفتی در مرحله پیش به آن افزوده شد. چنانچه رومانند میکروبی حاوی بیوسورفکتانت باشد توانایی کنارزدن لایه نفتی و ایجاد ناحیه شفاف روی سطح آب را دارد. در این آزمون از Tween20 (مرک-آلمان) برای شاهد مثبت و از محیط کشت MSM بدون باکتری برای شاهد منفی استفاده شد؛ همچنین، اگر قطر لایه شفاف که عصاره حاصل از سانتریفیوژ ایجاد می‌کند کمتر از ۱۰ میلی‌متر بود با علامت + و اگر بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر بود به ترتیب با ++ و +++ نمایش داده شد (۱۲ و ۱۳).

#### آزمایش‌های تکمیلی برای غربال‌گری

##### باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت

**اندازه‌گیری کشش سطحی:** به این منظور، ۵ میلی‌لیتر رومانند حاصل از سانتریفیوژ به لوله‌های آزمایشی اضافه شد که در حمام آب گرم با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند. کشش سطحی رومانند تمام نمونه‌های آزمایش شده در شرایط دمایی یکسان بر حسب میلی‌نیوتن بر متر با دستگاه تنسیومتر به روش حلقه دونوی (Du Nouy Ring Method) اندازه‌گیری شد. در هر بار اندازه‌گیری کشش سطحی از آب مقطر

همراه با ۱ درصد نفت خام (تنها منبع کربن) تلقیح و به مدت ۱۵ روز در شیکرانکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. محتوای هیدروکربنی باقیمانده در ارلن‌ها ۵، ۱۰ و ۱۵ روز پس از تلقیح با حلال تولوئن استخراج و میزان جذب نوری آن پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر دوشعاعی مرئی - فراننش مدل Lambda25 در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین شد. منحنی استاندارد با استفاده از نفت خام رسم و غلظت کل محتوای هیدروکربنی نمونه‌های تیمار شده با منحنی استاندارد و نیز نمونه شاهد (محیط کشت ۱ درصد نفت و بدون باکتری) مقایسه شد (۷).

#### سنجش میزان حذف نفت با استفاده از

**کروماتوگرافی گازی (GC-MS):** برای تأیید میزان حذف نفت و انتخاب برترین جدایه، ۱۵ جدایه برگزیده از مرحله پیش که دارای بیشترین فعالیت حذف نفت بودند به روش طیف‌سنجی با دستگاه کروماتوگرافی گازی (Shimadzu GC-Q2010, Japan) سنجیده شدند (۱۷). جدایه‌ها در محیط کشت همراه با ۱ درصد نفت خام کشت داده شدند و پس از گذشت ۱۵ روز، محتوای هیدروکربنی باقیمانده در محیط کشت با استفاده از حلال تتراکلرید کربن استخراج و با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-MS) مجهز به ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر با گاز حامل هلیوم سنجیده شد. شرایط دمایی تجزیه و تحلیل به شرح زیر بود: ابتدا ۳ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (دمای شروع) ماند، سپس دما با سرعت ۱۵ درجه سانتی‌گراد بردقیقه تا دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و مدت ۶ دقیقه روی این دما ماند و سپس تزریق انجام شد (۱۷).

**جداسازی بیوسورفکتانت:** برای این منظور، محلول شفاف رویی حاصل از سانتریفیوژ به کمک کلریدریک اسید ۶ نرمال تا رسیدن به اسیدیته ۲ اسیدی شد و پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز، رسوب حاصله به کمک سانتریفیوژ در ۸۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری شد. پس از آن به حجمی برابر با محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، کلروفرم و متانول با نسبت (۱:۲) به رسوب اضافه شد و در ادامه، فاز آلی مجزا و حلال آن در آن و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد (۱۶).

#### سنجش میزان حذف نفت: در این روش، نفت خام

موجود در نمونه‌های آزمایش پیش و پس از تجزیه زیستی با استفاده از حلال غیرقطبی تولوئن و دی‌کلرومتان استخراج (۷) و نمودار استاندارد نفت خام برای تعیین مقادیر هیدروکربن نمونه‌ها رسم شد. در این نمودار، بین جذب نوری و غلظت هیدروکربن در حلال غیرقطبی رابطه وجود دارد و به ازای هر غلظت از آلاینده، لوله‌های بدون باکتری (شاهد) تهیه می‌شوند (۱۷). برای تعیین توانمندی جدایه‌های حاصل در حذف نفت خام، ابتدا هر یک از جدایه‌ها با استفاده از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی از طریق اسپکتروفتومتری ارزیابی شد.

#### سنجش میزان حذف نفت و رشد جدایه‌ها با روش

**سنجش کل محتوای هیدروکربنی:** برای تعیین توانمندی جدایه‌ها در حذف نفت خام از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی<sup>۲</sup> به روش رحمان و همکاران<sup>۳</sup> (۲۰۰۳) استفاده شد (۷، ۱۸، ۱۹)؛ برای این منظور، هر یک از جدایه‌ها به طور جداگانه به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM

شناسایی جدایه‌ها: شناسایی جدایه‌های دارای توانایی زیاد در تولید بیوسورفکتانت بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی، بیوشیمیایی و تجزیه و تحلیل *16S rRNA* انجام شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی شامل اندازه کلنی، شکل کلنی، شرایط کشت، اندازه سلول، کاتالاز، اکسیداز، تولید اسید از قندها، هیدرولیز کازئین، نشاسته، ژلاتین، اسکولین، سترات، همولیز، رشد در درجه حرارت‌های مختلف، رشد در درصد‌های مختلف نمک، حرکت، تشکیل اندول، آرژنین دهیدرولاز، لیزین دکربوکسیلاز، لپاز، اوره آز و سایر آزمون‌های بیوشیمیایی لازم بررسی شدند. به منظور تعیین توالی ژن *16S rRNA* از کشت باکتری‌های هدف برای شناسایی کلنی تک استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از کلنی تک باکتری با استفاده از کیت DNeasy Blood & Tissue Handbook شرکت Qiagen کره جنوبی انجام شد. واکنش زنجیره پلیمرز تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از آغازگرهای 27f: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 1505r: 5'-GATACGGCTACCTTGTTACGA-3' کمک ترموسایکلر مدل *FTC51S5D* Techne (Staffordshire, UK) انجام شد.

توانایی زیاد در تولید بیوسورفکتانت بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی، بیوشیمیایی و تجزیه و تحلیل *16S rRNA* انجام شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی شامل اندازه کلنی، شکل کلنی، شرایط کشت، اندازه سلول، کاتالاز، اکسیداز، تولید اسید از قندها، هیدرولیز کازئین، نشاسته، ژلاتین، اسکولین، سترات، همولیز، رشد در درجه حرارت‌های مختلف، رشد در درصد‌های مختلف نمک، حرکت، تشکیل اندول، آرژنین دهیدرولاز، لیزین دکربوکسیلاز، لپاز، اوره آز و سایر آزمون‌های بیوشیمیایی لازم بررسی شدند. به منظور تعیین توالی ژن *16S rRNA* از کشت باکتری‌های هدف برای شناسایی کلنی تک استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از کلنی تک باکتری با استفاده از کیت DNeasy Blood & Tissue Handbook شرکت Qiagen کره جنوبی انجام شد. واکنش زنجیره پلیمرز تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از آغازگرهای 27f: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 1505r: 5'-GATACGGCTACCTTGTTACGA-3' کمک ترموسایکلر مدل *FTC51S5D* Techne (Staffordshire, UK) انجام شد.

27f: 5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'  
16r339: 5'- ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG -3'  
16f358: 5'- CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'  
704f: 5'- GTAGCGGTGAAATGCGTAGA- 3'  
1505r: 5'- GATACGGCTACCTTGTTACGA -3'

### نتایج

در مطالعه حاضر پس از نمونه برداری از هفت ایستگاه داخل سواحل بندر انزلی و کیشهر و یک ایستگاه (ایستگاه شاهد) خارج از سواحل در مناطق آلوده به نفت، تعداد ۱۱۵ باکتری جداسازی شدند که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و میکروسکوپی، ۳۸ باسیل گرم مثبت، ۳۲ کوکسی گرم مثبت، ۲۵ باسیل گرم منفی و ۲۰ کوکسی گرم منفی بودند. از میان جدایه‌ها، ۲۵ جدایه بهترین فعالیت همولیتیکی را در آزمون همولیز نشان دادند و ۳۲ جدایه دارای توانایی پراکنش روغن (OSM) بودند. طی آزمون‌های غربال‌گری اولیه، ۱۵ جدایه برای آزمون‌های تکمیلی انتخاب شدند (جدول ۱).

محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ حاوی بیوسورفکتانت باشد لایه نفتی را کنار می‌زند و ناحیه شفاف در سطح آب ایجاد می‌کند. موریکاو و همکاران<sup>۴</sup> (۲۰۰۰) (۱۲) این روش را برای مقایسه فعالیت شکل‌های حلقوی و خطی سورفکتین و آرتروفکتین استفاده و بیان کردند قطر ناحیه شفاف ایجاد شده با غلظت بیوسورفکتانت موجود در محیط رابطه مستقیم دارد.

برنامه PCR در شرایط زیر انجام شد: واسرشته شدن ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، واسرشته شدن طی ۳۵ چرخه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، جفت شدن آغازگرها در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه. خالص‌سازی محصول PCR به کمک کیت GF-1 PCR Clean-up

جدول ۱- آزمون‌های تکمیلی تولید بیوسورفکتانت توسط جدایه‌ها

کاهش سطحی (میلی نیوتن بر متر)	درصد امولسیفیکاسیون نفت خام E24%	فعالیت شکل‌گیری کف	OSM	فعالیت همولیتیک روی آگار خون‌دار	نمونه‌ها
۵۱/۰۳	۶۸/۱۲ درصد	+	+	+	J1
۴۱/۴	۶۱/۱۴ درصد	-	+	+	J2
۳۷/۸۵	۸۰/۷ درصد	++	++	++	J3
۳۷/۸۵	۷۹/۹۸ درصد	++	++	+++	J4
۳۸/۴۸	۷۹/۹۷ درصد	++	++	++	J5
۵۰/۰۶	۷۱/۲۸ درصد	+	+	+	J6
۵۱/۱۲	۶۵/۰۸ درصد	+	+	+	J7
۵۱/۱۶	۵۹/۵۲ درصد	+	+	+	J8
۵۳/۱۶	۶۶/۷۶ درصد	+	+	+	J9
۵۲/۳۴	۶۵/۰۸ درصد	+	+	+	J10
۵۰/۳۹	۶۴/۵۳ درصد	+	+	+	J11
۴۹/۶۲	۷۲/۱۲ درصد	++	++	++	J12
۵۰/۱۲	۵۵/۱۶ درصد	-	+	-	J13
۵۳/۰۵	۵۹/۵۱ درصد	-	+	+	J14
۵۲/۳۱	۴۲/۱۳ درصد	+	+	-	J15
۷۱/۰۲	-	-	-	-	آب مقطر
	۵۷ درصد	-	-	-	SDS1%
۶۳	-	-	-	-	محیط کشت استریل



شکل ۱ الف- ارلن تیمار شده با جدایه J3 در محیط کشت MSM همراه با ۱ درصد نفت خام در مقایسه با نمونه شاهد MSM بدون باکتری

به منظور افزایش دادن احتمال جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت (MSM حاوی ۱ درصد نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی) کشت داده شدند (شکل ۱). روش همولیز روی محیط آگار خون‌دار یک روش غربال‌گری اولیه در تولید بیوسورفکتانت است و مشاهده همولیز در محیط کشت آگار نشان‌دهنده کاهش کاهش سطحی گلبول‌های قرمز خون و لیز شدن آنها در اثر رشد باکتری‌های یادشده و در واقع، توانایی تولید بیوسورفکتانت آنها است.



حلقهٔ دونوی<sup>۵</sup> انجام می‌شود (۲۰) و بر اساس رابطهٔ  $W=2\pi r\gamma$  که  $w$  وزن قطره،  $r$  شعاع لولهٔ موئین و  $\gamma$  کشش سطحی مایع است اندازهٔ قطره با شعاع مجرا رابطهٔ مستقیم دارد. با توجه به اینکه کاهش کشش سطحی به کمتر از ۴۰ میلی‌نیوتن بر متر شاخص تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته می‌شود، آزمایش تولید بیوسورفکتانت نشان می‌دهد این جدایه‌ها کاهش کشش سطحی را به خوبی نشان می‌دهند (جدول ۱). بر اساس نتایج، جدایهٔ J3 قادر به بیشترین کاهش کشش سطحی (از ۶۳ به ۳۷/۸۵ میلی‌نیوتن بر متر) در مقایسه با نمونهٔ شاهد است.



شکل ۱-ب- ارلن تیمار شده با جدایهٔ J3 در محیط کشت MSM همراه با ۱ درصد نفت خام در مقایسه با نمونهٔ شاهد MSM بدون باکتری



شکل ۲- بررسی فعالیت امولسیون‌کنندگی در نمونهٔ J3

توانایی هریک از جدایه‌ها در حذف نفت طی مدت ۲۱ روز در محیط کشت پایهٔ نمکی حاوی ۱ درصد نفت بررسی شد و جدایه‌های J3، J5 و J12 بیشترین درصد حذف نفت را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). غلظت اجزای ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک موجود با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-MS) تعیین و جدایهٔ J3 پس از ۲۱ روز، میزان TPH در نفت خام را به میزان ۹۹/۸ درصد کاهش داد.

در پراکنش نفتی که روشی سریع و بسیار حساس برای تشخیص ترکیبات فعال سطحی است چنانچه شاخص امولسیون‌کنندگی معیاری از توانایی بیوسورفکتانت در امولسیون کردن ترکیبات نفتی و نشان‌دهندهٔ میزان پایداری امولسیون حاصل از آب و ترکیبات نفتی است. نتایج فعالیت امولسیون‌کنندگی کشت سویه‌های غربال‌شده از مرحلهٔ پیش با هیدروکربن نفتی نشان دادند از میان ۱۵ سویهٔ حاصل از غربال‌گری اولیه، ۵ سویه دارای توانایی امولسیون‌کنندگی ۷۰ درصد یا بیشتر هستند که برای مطالعه‌های بیشتر انتخاب شدند. نتایج فعالیت امولسیون‌کنندگی جدایهٔ J3 در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج تولید بیوسورفکتانت در مقایسه با نمونهٔ شاهد نشان دادند جدایهٔ J3 مولد ترکیبات فعال سطحی است و کشش سطحی محیط را به میزان درخور توجهی کاهش می‌دهد (جدول ۱).

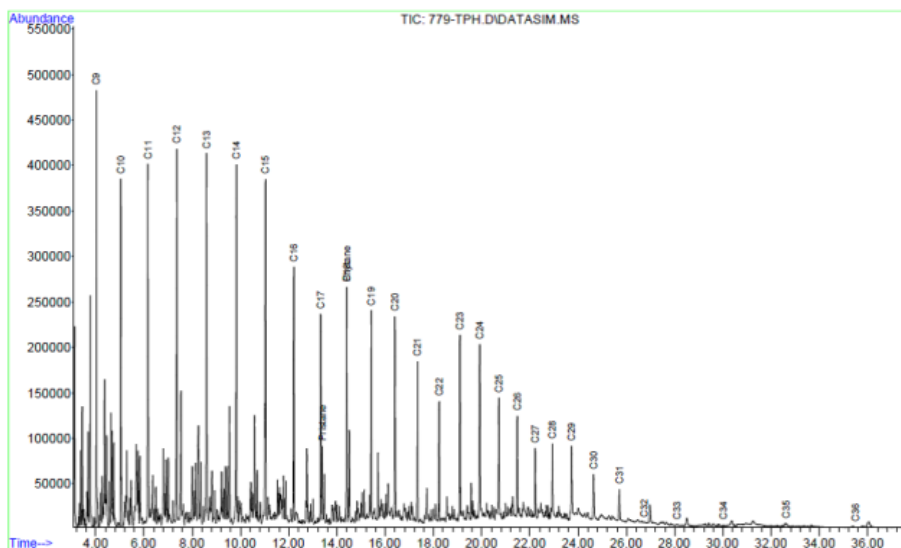
اندازه‌گیری کشش سطحی (شاخصی برای بررسی حضور بیوسورفکتانت) با دستگاه تنسیومتری به روش

نتایج نشان می‌دهند هرچه ارتفاع و سطح زیر پیک بیشتر باشد میزان آلودگی نیز بیشتر است. در این نمودارها ستون افقی نشان‌دهنده زمان و ستون عمودی نشان‌دهنده غلظت فرآورده است.

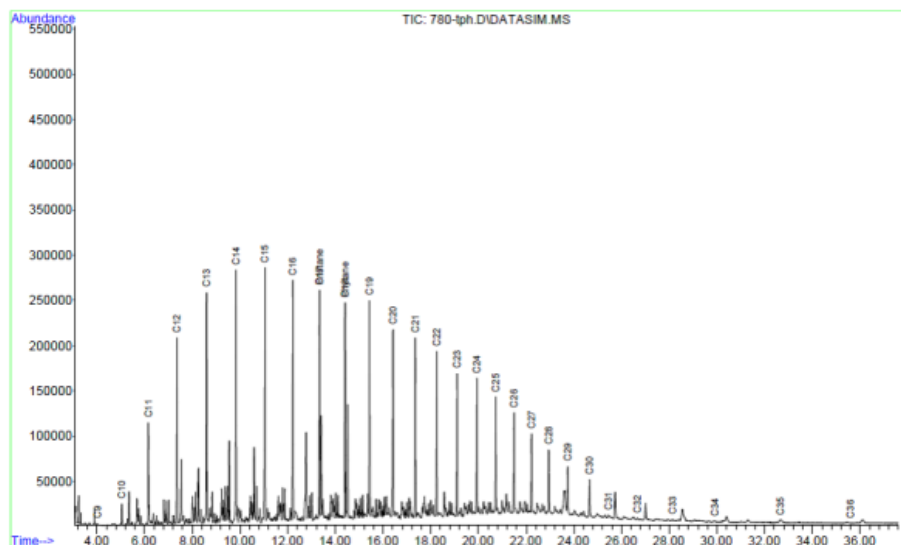
در شکل‌های ۳ و ۴، زیرطیف‌های جرمی نفت خام در نمونه شاهد و نمونه حاوی باکتری J3 با استفاده از کروماتوگرافی گازی طیف‌سنج جرمی توسط دستگاه GC-MS نشان داده شده است.

جدول ۲- بررسی بازده تجزیه‌کنندگی نفت خام توسط جدایه‌ها

نمونه‌ها	حذف نفتی (درصد) پس از ۷ روز در طول موج ۴۲۰ نانومتر
J3	۹۴/۶ درصد
J5	۴۲/۵ درصد
J12	۴۲ درصد
J11	۳۲/۹ درصد



شکل ۳- تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی نمونه نفت خام پیش از تیمار با جدایه J3



شکل ۴- تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی نمونه J3 در محیط کشت حاوی ۱ درصد نفت خام پس از ۲۱ روز گرماگذاری

در ۳۰ درجه سانتی‌گراد دارای کلنی‌هایی به اندازه ۲ میلی‌متر، سفیدرنگ، تخم‌مرغی با اطراف صاف، نرم و تیره بود. در مطالعه میکروسکوپی، باسیل‌های گرم مثبت کوتاه یا دارای زنجیره‌های بلند مشاهده شدند و اندازه سلول‌ها بزرگ‌تر از ۱ میکرومتر بود. سایر ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی در جدول ۳ دیده می‌شوند. جدایه J5 روی محیط کشت آگار خون‌دار در ۳۰ درجه سانتی‌گراد دارای کلنی‌هایی به اندازه ۱ تا ۱/۵ میلی‌متر، سفید، کروی با اطراف صاف، محدب، نرم، درخشان و تیره بود. در مطالعه میکروسکوپی، کوکسی‌های گرم مثبت به شکل دسته‌های نامنظم دیده شدند. سایر ویژگی‌ها در جدول ۳ مشاهده می‌شوند. جدایه J12 روی محیط نوترینت آگار دارای کلنی‌های ۲ تا ۳ میلی‌متری با رنگدانه سبز و صورتی بود و کلنی‌ها به شکل کروی، مسطح با اطراف برآمده و لبه‌های نامنظم و نرم درخشان دیده شدند. سایر ویژگی‌ها در جدول ۳ آمده است.

همان‌طور که در طیف جرمی نمونه J3 مشاهده می‌شود ارتفاع و سطح زیر پیک کاهش یافته است که نشان‌دهنده حذف آلودگی توسط باکتری مدنظر است. بر اساس نتایج کروماتوگرافی گازی بیشترین میزان حذف به ترکیبات C9، C10 و C30 تا C35 مربوط است.

باتوجه به نتایج، بهترین شرایط برای به‌دست آوردن بیشترین کاهش TPH در اسیدیته برابر ۷، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۱ درصد نفت خام و زمان ۲۱ روز حاصل می‌شود. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل TPH، نمونه حاوی نفت خام و نمونه J3 بیشترین قدرت تولید بیوسورفکتانت را نشان می‌دهد. برای جدایه J3 که حاوی بیشترین قدرت تولید بیوسورفکتانت و درصد حذف نفتی ۹۴/۶ درصد است، کاهش TPH برابر ۹۹/۸ درصد است.

بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی انجام شده، جدایه J3 روی محیط کشت نوترینت آگار

جدول ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌های J3، J5 و J12

ویژگی‌ها	J3	J5	J12	ویژگی‌ها	J3	J5	J12
اندازه سلول $>1.0\mu\text{m}$	+	+	+	آزمون حرکت	+	+	+
ریخت‌شناسی سلول	باسیل	کوکسی	باسیل	لیپاز	+		+
واکنش گرم	+	+	-	همولیز	بتا	آلفا	بتا
تشکیل اسپور	+	-	-	دآمیناسیون فنیل آلانین	+		-
کاتالاز	+	+	+	ایندول	-	-	-
اکسیداز	+	+	+	رشد در NaCl (۲ تا ۷ درصد)	+	+	+
وژس-پروسکوئر (VP)	+	+	-	اوره‌آز	-	-	-
گلوکز	+			ساکارز		+	
آرابینوز	-			مالتوز	+	+	+
گزیلوز	-			Dnase		-	-
مانیتول	-	+	+	متیل رد		+	-
سیترات	+		+	ONPG		+	
اکسیداز		+	+	PYR		+	
OF			غیر تخمیری	کوآگولاز	-	-	-
KIA (Kligler Iron Agar)			ALK/ALK	سولفید هیدروژن	-	-	-
LIA (Lysine Iron Agar)			ALK/ALK	رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد	+	-	+
احیای نیترات به ازت	+	+	+	پیگمان	-	-	+(سبز فلورسنت)

MTCC مرکز کلکسیون و نگهداری ریزموجودات در کشور هند است. توالی *16S rRNA* جدایه J5 در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی MH368118 ثبت شد.

یک توالی ۱۴۵۶ بازی از *16S rRNA* برای جدایه J12 به دست آمد؛ میزان شباهت توالی حاصل با ژن مشابه از سودوموناس آئروجینوزا JCM 5962<sup>TV</sup> که توالی کل ژنوم آن با کد BAMA01000316 در پایگاه NCBI ثبت شده است ۱۰۰ درصد است. JCM مرکز کلکسیون و نگهداری ریزموجودات در کشور ژاپن است. توالی *16S rRNA* جدایه J12 در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی MH368439 ثبت شد.

پس از انجام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و الکتروفورز محصول وجود قطعه ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی تأیید شد. یک توالی ۱۴۴۶ بازی از ژن *16S rRNA* برای جدایه J3 حاصل شد؛ میزان شباهت توالی حاصل با ژن مشابه از سویه‌های یادشده که همگی به گروه باسیلوس تعلق داشتند در جدول ۴ آمده است. توالی *16S rRNA* جدایه J3 در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی MH368126 ثبت شد.

یک توالی ۱۴۸۵ بازی از ژن *16S rRNA* برای جدایه J5 به دست آمد؛ میزان شباهت توالی حاصل با ژن مشابه از سویه استافیلوکوکوس همولتیکوس MTCC 3383<sup>T</sup> که توالی کل ژنوم آن با کد LILF01000056 در پایگاه NCBI ثبت شده است ۹۹/۸۶ درصد است.

جدول ۴- شباهت توالی *16S rRNA* جدایه J3 با سویه‌های گروه باسیلوس سرئوس

Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity (%)	Diff/Total nt	Completeness
<i>Bacillus albus</i>	N35-10-2(T)	KJ812440	100.00	0/1435	100.00
<i>Bacillus tropicus</i>	N24(T)	KJ812435	100.00	0/1435	100.00
<i>Bacillus nitratireducens</i>	4049(T)	KJ812430	100.00	0/1435	100.00
<i>Bacillus luti</i>	TD41(T)	KJ812415	100.00	0/1435	100.00

آلوده به لکه‌های نفتی در منطقه ساحلی بندر انزلی در استان گیلان است. بر اساس اصل تطابق، باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت در مکان‌هایی یافت می‌شوند که در تماس با آلودگی مواد نفتی و هیدروکربنی هستند. در پژوهش حاضر از اصل یادشده به منظور دستیابی به این باکتری‌ها استفاده شد. سه روش همولیز روی محیط آگار خون‌دار، روش انهدام قطره و روش گسترش نفت برای غربال‌گری باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت استفاده شدند (۲۳ و ۲۴). نتایج حاصل از تولید بیوسورفکتانت توسط نمونه‌های جداسازی شده در پژوهش حاضر نشان دادند از میان ۱۱۵ جدایه به دست آمده، ۵۷ جدایه بر اساس آزمون‌های کیفی تولیدکننده ترکیبات فعال سطحی

## بحث و نتیجه‌گیری

آلودگی محیط زیست با نفت و مشتقات آن به‌ویژه در کشورهای تولیدکننده نفت به نگرانی جهانی تبدیل شده است (۳ و ۲۱)؛ ازاین‌رو، توسعه روش‌های پاکسازی زیستی با قابلیت کاربرد در محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی دارای اهمیت بسزایی است. در میان روش‌های موجود برای کاهش آثار منفی ترکیبات نفتی در جایگاه‌های آلوده، اصلاح زیستی به کمک ریزموجودات یکی از پرکاربردترین روش‌هاست. میزان تجزیه زیستی با روش‌های اصلاح زیستی افزایش می‌یابد (۳ و ۲۲). هدف پژوهش حاضر، بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت و قابلیت حذف نفتی توسط باکتری‌های بومی جداسازی شده از مناطق

مصطفی پور و احمدی<sup>۱۷</sup> جدایه‌ای از گروه *باسیلیوس* سرئوس را از نمونه‌های نفت، آب و خاک‌های آلودهٔ مختلف جداسازی و شناسایی کردند که قابلیت زیادی در کاهش کشش سطحی و تولید بیوسورفکتانت داشت (۲۷).

در پژوهش حاضر، جدایهٔ J5 به جنس *استافیلوکوکوس* متعلق بود و بر اساس ترادف یابی *16S rRNA* استافیلوکوکوس همولیتیکوس شناسایی شد. یوبانی و همکاران<sup>۱۸</sup> در سال ۲۰۱۶ انواع مختلفی از باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی را از کمپوست‌ها جداسازی کردند و گونهٔ *استافیلوکوکوس* / *پیدرمیدیس* جزو جدایه‌های شناسایی شده بود (۲۸). موکرد و همکاران<sup>۱۹</sup> در پژوهش خود در سال ۲۰۰۸ تجزیهٔ زیستی نفت خام در آب را با اضافه کردن منابع نیتروژنی افزایش دادند؛ یکی از چهار جدایه‌ای که در افزایش تجزیه نقش داشتند گونه‌ای از *استافیلوکوکوس* شناسایی شد (۲۹).

جدایهٔ J12 متعلق به جنس *سودوموناس* و گونهٔ *آئروژینوزا* شناسایی شد. اخوان و همکاران در سال ۲۰۰۸ از آزمون‌های همولیتیک و کاهش کشش سطحی برای سنجش تولید بیوسورفکتانت توسط *باسیلوس*‌ها استفاده کردند (۳۰).

جیالاکشمی و تووسیو<sup>۲۰</sup> در سال ۲۰۰۳ نمونه‌ای از باکتری‌های تولیدکنندهٔ بیوسورفکتانت مانند *باسیلیوس* مگاتریوم<sup>۲۱</sup>، کورینه‌باکتریوم کوتشری<sup>۲۲</sup> و *سودوموناس* *آئروژینوزا*<sup>۲۳</sup> را از نمونه‌های آب بندر توتیکوری در سواحل جنوب شرق هند جداسازی کردند (۳۱). آبولوس و همکاران<sup>۲۴</sup> در سال ۲۰۰۱ تولید بیوسورفکتانت رامنولیبیدی توسط *سودوموناس* *آئروژینوزا* AT10 جداسازی شده از پسماند تصفیهٔ روغن سویا را معادل ۹/۵ گرم در لیتر گزارش کردند (۳۲). در

هستند. ۱۵ جدایه از ۵۷ جدایه با بیشترین فعالیت کاهش‌دهندگی سطحی برای مراحل بعدی و آزمون‌های تکمیلی انتخاب شدند. در آزمون‌های تکمیلی، جدایه‌های J3، J5، J11 و J12 بیشترین فعالیت تجزیه‌کنندگی را نشان دادند و در بین چهار جدایهٔ یادشده، J3 بیشترین توانایی تجزیه‌کنندگی را به خود اختصاص داد؛ این جدایه بر اساس نتایج بیوشیمیایی و تجزیه و تحلیل *16S rRNA* به گروه *باسیلیوس* سرئوس تعلق دارد. میزان شباهت جدایهٔ J3 به چهار گونهٔ *باسیلیوس* *آلبوس*<sup>۸</sup>، *باسیلیوس* *تروپیکوس*<sup>۹</sup>، *باسیلیوس* *نیترا تیردوسنس*<sup>۱۰</sup> و *باسیلیوس* *لوتی*<sup>۱۱</sup> ۱۰۰ درصد است. لیو و همکاران<sup>۱۲</sup> در سال ۲۰۱۷ چهار جدایهٔ یادشده و پنج جدایهٔ دیگر از جنس *باسیلیوس* سرئوس را از نمونه‌های مختلف شامل رسوبات و آب دریا جداسازی کردند (جدول ۴). جدایهٔ J3 در پژوهش حاضر از آب‌های آلوده به ترکیبات نفتی نیز جداسازی شد که با پژوهش لیو و همکاران مطابقت دارد. برای تشخیص نهایی می‌بایست تجزیه و تحلیل (MLST<sup>۱۳</sup>) انجام شود که بر اساس ترادف یابی قطعه‌های داخلی ژن‌های خانه‌دار<sup>۱۴</sup> انجام می‌شود (۲۵).

گونانامی و همکاران<sup>۱۵</sup> در سال ۲۰۱۰ در زمینهٔ پاکسازی زیستی آلودگی‌های نفت خام با استفاده از ریزموجودات نشان دادند تولید بیوسورفکتانت ارتباط مستقیمی با جذب مواد اولیهٔ هیدروکربنی موجود در محیط دارد و سبب پاکسازی زیستی زمین‌های آلوده می‌شود. آنها ۶ سویهٔ مختلف از جنس *باسیلیوس* جداسازی کردند (۱۹). جوزف و همکاران<sup>۱۶</sup> در سال ۲۰۰۹ موفق به جداسازی سویه‌های مختلف جنس *باسیلیوس* دارای نقش در تجزیهٔ ترکیبات نفتی از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی شدند (۲۶).

سایر موجودات زنده دارند، نتایج پژوهش حاضر در استفاده از باکتری‌های بومی برای تجزیه لکه‌های نفتی شاخصی برای رفع آلودگی‌های نفتی مناطق آلوده است. ترکیبات فعال در سطح شامل بیوسورفکتانت‌ها از جمله شاخص‌های ریزموجودات تجزیه‌کننده آلاینده‌های نفتی هستند که حضور باکتری‌های جداسازی‌شده با توانایی تولید بیوسورفکتانت در رسوبات آلوده موجود در منطقه ساحلی نشان‌دهنده توانایی احتمالی سازش‌پذیری آنها با محیط‌های آلوده به هیدروکربن است (۳۴-۳۶).

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند نمونه‌های J3، J5 و J12 دارای توانایی بیشترین درصد حذف نفتی هستند. تجزیه و تحلیل نمونه J3 پس از ۲۱ روز با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC-MS) نشان داد این باکتری TPH را به میزان ۹۴/۶ درصد در نفت خام کاهش می‌دهد. جدایه‌های پژوهش حاضر دارای پتانسیل زیاد در تولید بیوسورفکتانت هستند و می‌توانند در تجزیه لکه‌های نفتی به‌عنوان شاخصی برای رفع آلودگی‌های نفتی در مناطق آلوده به نفت استفاده شوند.

### سپاسگزاری

از خانم دکتر فرزانه عزیز محسنی و همکاران مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران برای شناسایی نژادهایی جداسازی‌شده سپاسگزاری می‌شود.

### References

- (1) Najafi AR., Rahimpour MR., Jahanmiri AH., Roostaazad R., Arabian D., Ghobadi Z. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *Chemical Engineering Journal* 2010; 163(3): 188-194.

سال‌های اخیر، تولید بیوسورفکتانت انگیزه زیادی برای افزایش استخراج نفت و از بین بردن آلودگی‌های نفتی ایجاد کرده است (چسبندگی باکتری‌ها به هیدروکربن‌ها حلالیت آنها را افزایش می‌دهد و تجزیه آن را تحریک می‌کند). پروتی و همکاران<sup>۲۵</sup> در سال ۱۹۹۷ نشان دادند سوبیه‌های گرم منفی می‌توانند به هیدروکربن‌های متعددی متصل شوند و بیش از ۸۰ درصد گونه‌های *Sordomonas*، *Basilus* و *Asnitobacter*ها به هیدروکربن‌های متعددی می‌چسبند (۳۳). آلکان‌ها بخشی از ترکیبات آلیفاتیک موجود در هیدروکربن‌های نفتی و حاوی تعداد زیادی از نشانگرهای زیستی مرتبط با منشأ و ماهیت هیدروکربن‌های نفتی هستند. فراوانی نسبی آلکان‌ها با تعداد کربن‌های مختلف یا غالب بودن حضور یک آلکان مشخص در رسوبات بیان‌کننده حضور نوع ویژه‌ای از هیدروکربن‌های نفتی در نمونه‌های رسوبی است. در این زمینه، حضور شاخص آلکان نرمال ۱۸ کربنه (n-C18) در نمونه‌های رسوبی نشان‌دهنده منشأ نفتی هیدروکربن‌های مشاهده‌شده است. در پژوهش حاضر، در منطقه ورودی بندر انزلی، در مجاورت تالاب که خارج از محدوده لایروبی است بیشترین میزان غلظت TPH مشاهده شد. بر اساس نتایج کروماتوگرافی گازی مشخص شد بیشترین میزان حذف به ترکیبات n-C9، n-C10 و C30 تا n-C35 مربوط است. مشاهده‌های فیزیولوژیکی و بررسی‌های گاز کروماتوگرافی تأیید می‌کنند که باکتری‌های بومی جداسازی‌شده از هیدروکربن‌های نفتی برای منبع کربن استفاده و آنها را به ترکیبات ساده‌تر تجزیه می‌کنند؛ از آنجا که نفت فرآورده‌ای سمی برای سیستم‌های زیستی و یکی از آلوده‌کننده‌های اصلی اکوسیستم‌های زیستی محسوب می‌شود و آلودگی‌های نفتی آثار مضر روی انسان و

- (2) Zhang G-l., Wu Y-t., Qian X-p., Meng Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Sciences- B*. 2005; 6: 725-730.
- (3) Ibrahim ML., Ijah UJJ., Manga SB., Bilbis LS., Umar S. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2013; 81: 28-34.
- (4) Khopade A., Biao R., Liu X., Mahadik K., Zhang L., Kokare C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiosis sp.* B4. *Desalination* 2012; 285: 198-204.
- (5) George S., Jayachandran K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2008; 158(3): 694-705.
- (6) Joshi SJ., Geetha SJ., Yadav S., Desai AJ. Optimization of bench-scale production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* R2. *Apchee Procedia* 2013; 5: 232-236.
- (7) Rahman KS., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 2002; 85(3): 257-261.
- (8) Sakthipriyaa N., Mukesh Dobleb., Jitendra S. Sangwai. Bioremediation of Coastal and Marine Pollution due to crude oil using a microorganism *Bacillus subtilis*. *Procidia Engineering* 2015; 116: 213-220.
- (9) Zhang X., Li M., Xiang T. Genetic modification of MEOR bacterium *Bacillus licheniformis* H strain by low energy ion beam irradiation. *Open Biotechnology Journal* 2010; 4: 14-17.
- (10) Shankar S., Kansrajh C., Dinesh MG., Satyan RS., Kiruthika S., Tharanipriya A. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils. *International Journal of Environmental Science and Technology (IJEST)* 2014; 11(2): 367-376.
- (11) Varjani SJ., Rana DP., Bateja S., Sharma MC., Upasani VN. Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. *Engineering and Technology* 2014; 3(2): 9205-9213.
- (12) Morikawa M., Hirata Y., Imanaka TA. Study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids* 2000; 1488(3): 211-218.
- (13) Nasr S., Soudi MR., Mehrnia MR. Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus spp.* isolated from petroleum contaminated soil. *Iranian Journal of Microbiology (IJM)* 2009; 1(2): 54-61.
- (14) Dastgheib SM., Amoozegar MA., Khajeh K., Ventosa A. A halotolerant *Alcanivorax sp.* strain with potential application in saline soil remediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 90(1): 305.
- (15) Pereira JF., Gudiña EJ., Costa R., Vitorino R., Teixeira JA., Coutinho JA., et al. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 2013; 111: 259-268.
- (16) Islam Janpen H., Kitten A., Dassara Y. Screening of biosurfactants producing bacteria and optimization of production process. *Journal of Basic Microbiology* 2000; 1-3.
- (17) Youssef NH., Duncan KE., Nagle DP., Savage KN., Knapp RM., McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 2004; 56(3): 339-347.
- (18) Behnood M., Nasernejad B., Nikazar M. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2014; 1879-1885.

- (19) Gnanamani A., Kavitha V., Radhakrishnan N., Mandal AB. Bioremediation of crude oil contamination using microbial surface-active agents: isolation, production and characterization. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 2010; 1(2): 1-8.
- (20) Bodour AA., Miller Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantization and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 1998; 32: 273-280.
- (21) Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment International* 2011; (8): 1362-1375.
- (22) Christofi N., Ivshina IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology* 2002; 93(6): 915-929.
- (23) Rahman KSM., Rahman TG., Lakshmanaperumalsamy P., Marchant R., Banat IM. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta Biotechnologica* 2003; 23(4): 335-345.
- (24) Batista SB., Mounteer AH. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology* 2006; 97: 868-875.
- (25) Liu Y., Du J., Lai Q., Zeng R., Ye D., Xu J., et al. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2017; 67: 2499-2508.
- (26) Joseph P., Joseph A. Microbial enhanced separation of oil from petroleum refinery sludge. *Journal of hazardous materials* 2009; 161(1): 522-525.
- (27) Mostafapour R., Ahmady-Asbchin S. Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus *Bacillus cereus* and antibacterial effects of biosurfactant Production *in vitro*. *Arak Medical University Journal (AMUJ)* 2014; 16(81): 59-74.
- (28) Ubani O., Atagana H. Identification and characterisation of oil sludge degrading bacteria isolated from compost. *Archives of Environmental Protection* 2016; 42(2): 67-77.
- (29) Mukred A., Hamid A., Hamzah A., Wan Mohtar Wan Yusoff. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. *Online Journal of Biological Sciences* 2008; 8(4): 73-79.
- (30) Akhavan Sepahi A., Dejban Golpasha I., Emami M. Isolation and characterization of crude oil degrading *Bacillus* ssp. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2008; 5(3): 149-154 (in Persian).
- (31) Mishra S., Sarma PM., Lal B. Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 235(2): 323-331.
- (32) Abalos A., Pinazo A., Infante MR., Casals M., García F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soyabean oil refinery wastes. *Langmuir* 2001; 17: 1367-1371.
- (33) Pruthi V., Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Techniques* 1997; 11(9): 671-674.
- (34) Banat IM., Makkar RS., Cameotra SS. Potential commercial application of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000; 53: 495-508.
- (35) Saravanan V., Vijayakumar S. Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. *Journal of Academia and Industrial Research* 2012; 1(5): 264-268.
- (36) Gautam KK., Tyagi VK. Microbial surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science* 2006; 55(4): 155-166.



- 
- 1- Cooper and Gotenberg
  - 2- Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)
  - 3- Rahman et al.
  - 4- Murikava et al.
  - 5- Du Nouy Ring Method
  - 6- *Staphylococcus haemolyticus*
  - 7- *Pseudomonas aeruginosa*
  - 8- *Bacillus albus*
  - 9- *Bacillus tropicus*
  - 10- *Bacillus nitratireducens*
  - 11- *Bacillus luti*
  - 12- Liu et al.
  - 13- Multilocussequence typing
  - 14- House keeping
  - 15- Gnanamani et al.
  - 16- Joseph et al.
  - 17- Mostafapour and Ahmady-Asbchin
  - 18- Ubani et al.
  - 19- Mukred et al.
  - 20- Jayalakshmi and Thavasi
  - 21- *B. megaterium*
  - 22- *C. kutscheri*
  - 23- *Pseudomonas aeruginosa*
  - 24- Abalos et al.
  - 25- Pruthi et al.