

افزایش تجزیه زیستی هیدروکربن‌های سنگین توسط آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 در حضور رامنولپید

حسن قربان‌نژاد^۱، حمید مقیمی^{۱*} و سیدمحمد مهدی دستغیب^۲

۱- بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

۲- گروه پژوهش میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت ایران، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۲

چکیده

هدف این پژوهش بررسی توانمندی جدایه‌های کپکی در حذف آلاینده‌های نفتی و همچنین، بررسی تأثیر ترکیبات فعال سطحی به منظور افزایش کارایی حذف این ترکیبات بود. در این تحقیق، از مناطق دارای آلودگی‌های قدیمی نفتی ۴۰ جدایه کپکی دارای توانایی حذف ترکیبات نفتی خالص‌سازی شد. شناسایی جدایه منتخب به‌وسیله تعیین توالی ژن ITS نشان داد جدایه F13 دارای شباهت ۱۰۰٪ با آسپرژیلوس سودودفلکتوس است. نتایج حاصل از تجزیه زیستی نفت خام نشان داد که این جدایه قادر به حذف ۵۲/۹۷٪ نفت خام در مدت ۲۱ روز است. میزان تجزیه زیستی در هنگام استفاده از پیرن (به‌عنوان یک آروماتیک چند حلقه سنگین) با غلظت ۵۰۰ ppm مقدار ۴۹/۰۶٪ و در مورد تتراکوزان (به‌عنوان یک آلیفاتیک سنگین) با غلظت ۱٪ مقدار ۵۵/۷۳٪ به‌دست آمد که نشان از سخت تجزیه‌پذیر بودن پیرن نسبت به تتراکوزان دارد. در ادامه، برای بررسی تأثیر سورفکتانت‌ها در تجزیه این ترکیبات از بیوسورفکتانت رامنولپید (۰/۰۱٪) و سورفکتانت شیمیایی تویین ۸۰ (۰/۲٪) استفاده شد که رامنولپید با عملکردی بهتر توانست میزان کارایی تجزیه نفت خام، تتراکوزان و پیرن را به ترتیب ۱۶، ۲۵ و ۳۰٪ افزایش دهد. این نتایج نشان داد که رامنولپید نسبت به سورفکتانت شیمیایی تویین ۸۰، در غلظت کمتر، اثر بهتری در بهبود فرآیند تجزیه زیستی دارد. همچنین، اثر سورفکتانت بر روی حذف زیستی آروماتیک‌ها نسبت به ترکیبات آلیفاتیک‌ها کمتر است. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند به استفاده از جدایه‌های قارچی به منظور پاک‌سازی زیستی آلودگی‌های نفتی قدیمی و سخت تجزیه کمک کند.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس سودودفلکتوس، تجزیه زیستی، پیرن، رامنولپید، تتراکوزان

مقدمه

به‌ویژه نفت خام و مشتقات آن را به‌دنبال داشته است. در جهان، بیش از ۲ بلیون تن نفت در هر سال تولید می‌شود که بخشی از این نفت تولیدی در اثر سوانح یا نواقص فرآیند در آب اقیانوس‌ها و محیط خشکی تخلیه می‌گردد. به‌دلیل آثار مخرب

توسعه صنعت در جهت رفع نیازهای جمعیت در حال افزایش، استفاده روزافزون سوخت‌های فسیلی

*مسئول مکاتبات
آدرس الکترونیکی: hmoghimi@ut.ac.ir
شناسه دیجیتال: (DOI: 10.22078/pr.2020.3931.2788)

بوده اما قارچ‌ها هم با مکانیسمی مخصوص به خود دارای توانایی فراوانی در تجزیه و مصرف این ترکیبات هستند، به خصوص هیدروکربن‌هایی که وزن مولکولی بالا، دسترسی زیستی پایین و سمیت بیشتری دارند. توانایی رشد در شرایط محیطی خاص مانند خشکی و سرما و همچنین، تولید آنزیم‌های برون سلولی جزو مهم‌ترین ویژگی‌هایی هستند که باعث شده است بسیاری از محققین در سال‌های اخیر بر روی این دسته از میکروارگانیسم‌ها تمرکز کنند [۷]. علاوه بر این، تولید ریشه‌های^۲ رونده توسط کپک‌ها که امکان نفوذ میکروارگانیسم‌ها را به مناطق عمقی فراهم می‌آورد و باعث افزایش میزان دسترسی می‌گردد را می‌توان از عوامل مهم توجه به پاک‌سازی زیستی قارچی^۳ دانست [۱ و ۷].

به‌طور معمول ترکیبات سنگین تر نفت خام به نسبت سایر ترکیبات دارای ماندگاری بیشتری در محیط زیست هستند. حلالیت پایین این ترکیبات که باعث کاهش دسترسی زیستی آن‌ها می‌گردد، نقش بسیار مهمی در این زمینه دارد [۸]. سورفکتانت‌های مختلف شیمیایی و زیستی از طریق امولسیون نمودن هیدروکربن‌های نفت خام، باعث افزایش انحلال‌پذیری این ترکیبات در محیط‌های آبی و در نتیجه، افزایش دسترسی زیستی ارگانیسم‌های زنده به این ترکیبات و بهبود شرایط تجزیه و مصرف آن‌ها می‌شوند [۹]. سورفکتانت‌های زیستی دارای مزایای بی شماری در مقایسه با سورفکتانت‌های شیمیایی هستند. از مهم‌ترین این برتری‌ها می‌توان به تجزیه‌پذیری زیستی، سازگاری با محیط زیست، سمیت کم، انتخابییت بالا و فعالیت مناسب در شرایط سخت مانند دمای بالا، pH اسیدی و قلیایی و شوری اشاره نمود.

رهایش هیدروکربن‌ها در محیط، آلودگی‌های زیست‌محیطی وابسته به صنایع نفتی در طول دهه‌های اخیر به‌شدت مورد توجه قرار گرفته است [۱]. ترکیبات مختلف موجود در نفت خام علاوه بر آلودگی‌های مربوط به آب و خاک‌های سطحی، ممکن است با نفوذ به بخش‌های عمقی خاک باعث آلودگی آب‌های زیرزمینی گردند [۲]. نفت خام ترکیبی پیچیده متشکل از انواع ترکیبات هیدروکربنی و برخی اجزای غیرهیدروکربنی است که دارای اثرات مخرب و سمی روی محیط زیست و موجودات زنده هستند. ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای^۱ (PAHs) از جمله ترکیبات هیدروکربنی خطرناک نفت خام است که با افزایش وزن مولکولی، انحلال‌پذیری و دسترسی آن‌ها در محیط‌های آبی کاهش یافته و به‌همین دلیل، دیرتر و سخت‌تر تجزیه می‌شوند [۳ و ۴]. ترکیبات آلیفاتیک هم در کنار هیدروکربن‌های آروماتیک بخش عظیمی از نفت خام را شامل می‌شوند. این ترکیبات در مقایسه با PAHها دارای سمیت کمتری بوده ولی با این وجود ترکیبات آلیفاتیک که طول زنجیره کربنی بلندتری دارند (بیش از ۱۵ کربن) به‌دلیل پایین بودن انحلال‌پذیری و دسترسی زیستی، مدت زمان زیادی در محل آلودگی باقی‌مانده و باعث بروز مشکلاتی برای محیط زیست و سلامت موجودات زنده می‌شوند. به‌همین دلایل، یافتن یک راه‌حل مناسب برای پاک‌سازی این ترکیبات حائز اهمیت است [۵]. روش‌های بسیار متنوعی برای پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی وجود دارد که از میان آن‌ها می‌توان به روش‌های زیستی، شستشوی خاک به‌وسیله سورفکتانت، سوزاندن و ... اشاره کرد. لازم به ذکر است که با توجه به مسائل زیست محیطی و فراوانی آلودگی‌های نفتی، روش‌های مورد استفاده باید کم هزینه و در زمینه اجرا تا حد امکان ساده باشند [۶]. اکثر محققانی که به بررسی پاک‌سازی زیستی آلودگی‌های نفتی پرداخته‌اند، تمرکزشان بر روی باکتری‌های مختلف

1. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)
2. Hyphae
3. Mycoremediation

محسن زاده و همکارانش [۱۴] و عبدالکریم چراغی راد و همکارانش [۱۵] در تحقیقات خود گونه‌های قارچی متفاوتی را از مناطق ریزوسفری گیاهان رشد یافته در مناطق آلوده به نفت جداسازی کردند.

در این تحقیق سعی بر آن بوده است که با استفاده از خاک مناطق دارای آلودگی‌های قدیمی که تجمع هیدروکربن‌های سنگین در آن بالاتر از سایر مناطق آلوده است بتوان جدایه‌های کپکی مناسبی را برای تجزیه ترکیبات سنگین و سخت تجزیه پذیر موجود در نفت خام شناسایی کرد. در ادامه نیز تلاش شده است که با استفاده از ترکیبات فعال سطحی شیمیایی و زیستی میزان تجزیه زیستی ترکیبات نفتی را افزایش داده و علاوه بر مقایسه عملکرد این ترکیبات با هم، تأثیر مواد فعال در سطح را در تجزیه انواع مختلف ترکیبات و مشتقات نفتی با هم مقایسه نمود.

مواد و روش‌ها

محل نمونه برداری

برای دستیابی به سویه‌های کپکی توانمند در زمینه تجزیه هیدروکربن‌های سنگین نفتی، برای نمونه برداری از خاک آلوده به لجن‌های نفتی که به مدت زیاد در معرض این ترکیبات قرار گرفته بودند، استفاده شد. در خاک مناطقی که به مدت طولانی در معرض آلاینده‌های نفتی قرار گرفته‌اند، هیدروکربن‌های دارای وزن پایین که به طور معمول راحت‌تر تجزیه می‌شوند، به مرور زمان توسط میکروارگانیسم‌های مختلف موجود در محل آلودگی تجزیه شده و هیدروکربن‌های سنگین‌تر باقی مانده‌اند. تجمع هیدروکربن‌های سنگین باعث می‌شود که بخش زیادی از میکروارگانیسم‌هایی که به صورت طبیعی در منطقه حضور داشتند دیگر قادر به فعالیت نبوده و میکروارگانیسم‌های مقاوم‌تر و تجزیه‌کننده فراوانی بیشتری پیدا کرده و اکولوژی میکروبی محیط تغییر یابد [۱۶].

سورفکتانت‌های زیستی دارای گروه‌های چربی دوست مربوط به پروتئین و (یا) پپتید و اجزای آب‌گریز زنجیره‌های کربنی با ۱۰ الی ۱۸ کربن هستند و از طرف دیگر دارای گروه‌های آبدوستی هستند که توسط استرها، هیدروکسیل، فسفات، کربوکسیل و کربوهیدرات مشخص می‌شوند. این ترکیبات معمولاً در فاز سکون رشد میکروبی که چگالی سلولی بالا است، تولید می‌شوند [۹].

تحقیقات مختلفی در سطح ملی و جهانی در زمینه تجزیه ترکیبات نفت خام توسط میکروارگانیسم‌های مختلف انجام شده است. Zobel و همکارانش برای اولین بار متوجه شد که بسیاری از میکروارگانیسم‌ها توانایی استفاده از هیدروکربن‌ها را به عنوان منبع کربن و انرژی دارا هستند. توانایی میکروارگانیسم‌های موجود در خاک برای پاک‌سازی هیدروکربن‌های نفتی بسیار متنوع بوده و طبق تحقیقات انجام شده قارچ‌های موجود در خاک ۶ تا ۸۲٪ از ترکیبات آلاینده را تجزیه می‌کنند [۱۰ و ۱۱]. Challian و همکارانش گونه‌های قارچی و مخمری مختلفی را از خاک‌های آلوده جداسازی کردند و اعلام نمودند که فعالیت قارچ‌های کپکی در خاک بیش از مخمرها و باکتری‌ها است. Singh دسته‌ای از قارچ‌های خاکی به نام‌های آسپرژیلوس، سفالوسپوریوم و پنی‌سیلیوم را جداسازی کرد که دارای توانای تجزیه بالای ترکیبات نفتی بودند. در میان قارچ‌ها دو جنس تریکودرما و مورتیلا فراوان‌ترین جنس‌های موجود در میان خاک‌های آلوده به نفت هستند و در کنار آن‌ها دو جنس آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم هم به فراوانی از محیط‌های خاکی و هم محیط‌های آبی جدا شده‌اند [۱۲]. در پژوهشی که توسط Balaji و همکارانش انجام شد قارچ‌های مختلفی که دارای توانایی تولید آنزیم‌های برون سلولی جهت تجزیه PAH‌های نفتی را داشتند، جداسازی شدند. در این تحقیق ۲۱ گونه قارچی توانمند در زمینه تجزیه PAH‌ها مربوط ۹ خانواده قارچی مختلف از خلیج مکزیک جداسازی شدند [۱۳]. همچنین، فریبا

مربوط به چاه نفت گچساران بوده و دارای ۴۴/۶٪ آلیفاتیک، ۳۲/۱٪ آروماتیک، ۲۲/۹٪ رزین و ۱/۴٪ آسفالتن است.

غربال‌گری جدایه‌های کپکی تجزیه‌کننده نفت خام

به منظور غربال‌گری اولیه جدایه‌های کپکی که توانایی استفاده از نفت خام سنگین به‌عنوان تنها منبع کربن در محیط مایع پایه نمکی را دارند، بررسی میزان رشد در محیط پایه نمکی حاوی نفت خام به‌روش سنجش کیفی انجام شد. جدایه‌های کپکی خالص شده به ارلن‌های ۵۰ mL حاوی ۱۰ mL محیط باشنل هاس همراه با ۱٪ گلوکز و ۰/۱٪ درصد نفت خام به‌عنوان پیش‌کشت اضافه و در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرمادهی شدند. پس از رسیدن جذب نوری نمونه‌ها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ nm، ۱ mL از محیط پیش‌کشت به‌مدت ۵ min در دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و سه بار به‌وسیله سرم فیزیولوژیک شستشو داده شد و در نهایت، با افزودن سرم فیزیولوژیک استریل به حجم ۱ mL اولیه رسانیده شد. سوسپانسیون سلولی نهایی به‌عنوان مایه تلقیح به ارلن‌های ۵۰ mL حاوی ۹ mL محیط پایه نمکی و ۱٪ نفت خام اضافه و در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرمادهی شد. پس از گذشت ۱۰ روز، OD₆₀₀ نمونه‌ها خوانده شد و بهترین جدایه‌ها براساس میزان رشد انتخاب شدند [۱۸].

بررسی حذف نفت خام توسط جدایه‌های کپکی

به منظور انتخاب بهترین جدایه کپکی خالص‌سازی شده، میزان تجزیه تمام هیدروکربن‌های نفت خام (TPH)^۲ توسط این جدایه‌ها بررسی شد. به منظور تهیه مایه تلقیح جدایه‌های کپکی به ارلن‌های ۵۰ mL حاوی ۱۰ mL از محیط پایه نمکی باشنل هاس دارای ۱٪ گلوکز و ۰/۱٪ نفت به‌عنوان پیش‌کشت اضافه و در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرمادهی شدند.

به‌همین دلیل برای جداسازی میکروارگانیزم‌های توانمند در زمینه تجزیه هیدروکربن‌های سنگین، از خاک‌های آلوده به لجن‌های نفتی منطقه پازنان استفاده شد. ۵ نمونه مختلف از این منطقه تهیه شد. برای این منظور از عمق ۵ تا ۱۰ cm خاک میزان ۱۰۰ g خاک با بیلچه ضدفونی شده داخل ظروف استریل ریخته و نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شد. تا زمان جداسازی، نمونه‌ها در دمای ۴ °C نگهداری شدند [۱۷]. ویژگی خاک‌های مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ شرایط محیط‌های نمونه‌برداری

شماره خاک	pH	هدایت الکتریکی (μs/cm)	شوری (ppt)
۱	۶/۸	۶۷۳	۰/۳۶
۲	۶/۷	۳۸۲	۰/۲۰
۳	۷/۱	۱۸۶	۰/۱۶
۴	۶/۷	۶۲۶	۰/۳۴

محیط کشت و شرایط رشد

به منظور جداسازی سوبه‌های کپکی، ۱ g از خاک منطقه نمونه‌برداری شده به ۱۰ mL سرم فیزیولوژیک اضافه و به‌مدت ۱ h در شیکر با دور rpm ۱۲۰ مخلوط شد. سپس، برای غنی‌سازی جدایه‌های توانمند، ۱ mL از مخلوط به‌دست آمده از مرحله قبل به ۱۰۰ mL محیط پایه نمکی باشنل هاس^۱ شامل (g/L): K₂H- (۱)، KH₂PO₄ (۱)، CaCl₂ (۰/۰۲)، MgSO₄ (۰/۲) و NH₄NO₃ (۱) و FeCl₂ (۰/۰۵) همراه با ۱ g نفت خام سنگین به‌عنوان تنها منبع کربن افزوده شد و در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرمادهی شد. پس از رسیدن میزان جذب نوری نمونه‌ها به ۰/۴ در طول موج ۶۰۰ nm، ۱۰۰ μL از نمونه بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها افزوده شدند و پس از ۵ روز گرمادهی در دمای ۲۸ °C، جدایه‌های کپکی رشد یافته بر روی محیط PDA خالص‌سازی شدند [۵]. لازم به ذکر است نمونه نفت خام استفاده شده در این پژوهش

1. Bushnell Haas

2. Total Petroleum Hydrocarbons

مرحله اول با استفاده از روش کشت روی لام^۱ و رنگ لاکتوفنول کاتن بلو، ویژگی‌های مورفولوژیک و میکروسکوپی این جدایه بررسی شد و پس از آن برای شناسایی مولکولی، قطعه ITS ژن DNA ریبوزومی توسط واکنش PCR و به‌وسیله دو پرایمر ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') تکثیر و توالی این قطعه به‌روش توالی‌یابی مشخص شد [۲۱]. واکنش PCR به‌صورت ۳۰ چرخه با دمای اتصال پرایمر ۵۴ °C انجام پذیرفت. نتیجه توالی‌یابی قطعه ژنی ITS با بانک اطلاعاتی CBS مطابقت داده شد و جنس و گونه جدایه مورد نظر شناسایی شد. توالی حاصل در پایگاه بانک ژنی NCBI ثبت گردید.

بررسی حذف پیرن و تتراکوزان توسط جدایه قارچی منتخب

بیشتر نفت خام از ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک تشکیل شده است. ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای سنگین و ترکیبات آلیفاتیک بلند زنجیر به نسبت سایر ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک کمتر و سخت‌تر تجزیه می‌شوند. در این تحقیق، از تتراکوزان به‌عنوان مدلی از آلیفاتیک‌های بلند زنجیر و پیرن به‌عنوان مدلی از آروماتیک‌های چند حلقه‌ای سنگین استفاده شد. به منظور افزودن تتراکوزان و پیرن به ارلن‌های حاوی محیط کشت، محلولی غلیظ از پیرن و تتراکوزان به‌ترتیب در استون و هگزان تهیه و فیلتر گردید و میزان مناسب از این محلول‌ها برای ایجاد غلظت مورد نظر به ارلن‌ها اضافه شد و به‌مدت ۲۴ h به‌صورت تلقیح نشده در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرمادهی شدند تا تمام حلال تبخیر گردید [۲۲]. برای تهیه پیش‌کشت، جدایه منتخب به ارلن‌های ۵۰ mL حاوی ۱۰ mL محیط کشت باشنل هاس حاوی ۱٪ گلوکز و ۱۰۰ ppm پیرن یا ۱۰۰۰ ppm تتراکوزان اضافه و مشابه بخش قبل در دمای ۲۸ °C و دور rpm ۱۲۰ شیکر گرمادهی گردید.

پس از رسیدن جذب نوری نمونه‌ها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ nm، ۱ mL از محیط پیش کشت به‌مدت ۵ min در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و سه بار به‌وسیله سرم فیزیولوژیک شستشو داده شد و در نهایت، به‌وسیله سرم فیزیولوژیک به حجم ۱ mL اولیه رسانیده شد. مایه تلقیح به حجم ۱ mL به ارلن‌های ۵۰ mL دارای ۹ mL محیط پایه نمکی باشنل هاس و ۱٪ نفت خام اضافه و در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرمادهی شدند. پس از گذشت ۲۱ روز از گرمادهی، ۱۰ mL تولوئن (به‌عنوان حلال نفت خام) به تمام ارلن‌ها اضافه و به‌مدت ۳۰ min برروی شیکر با دور ۱۲۰ rpm قرار داده شد. تمام محتوای نفت خام موجود در هر ارلن توسط تولوئن استخراج شد و میزان نفت خام جدا شده از هر ارلن به‌روش وزن‌سنجی محاسبه گردید [۱۹].

به منظور انجام آنالیز وزن‌سنجی، تولوئن حاوی نفت خام درون ظروف شیشه‌ای خالی که وزن آن‌ها تعیین شده بود، ریخته شد. پس از گذشت حدود ۶ h تمام حلال موجود در ظروف شیشه‌ای تبخیر شده و هیدروکربن‌های نفتی موجود در حلال‌ها در ته ظرف باقی‌مانده بود. تفاوت وزن ظروف قبل و بعد از اضافه شدن حلال‌ها اندازه‌گیری شد و این اختلاف بیانگر وزن نفت موجود در هر نمونه بود. در نهایت به منظور دست‌یابی به‌میزان تجزیه نفت خام توسط جدایه‌ها، میزان نفت خام باقی‌مانده در هر ارلن با ارلن شاهد (فاقد تلقیح)، مقایسه شد [۲۰]. علت استفاده از نمونه شاهد به جای در نظر گرفتن مقدار اضافه شده اولیه برای سنجش میزان حذف نفت خام، کنار گذاشتن مقادیری از ترکیبات فرار نفت است که در طول مدت گرمادهی از محیط خارج شده‌اند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مرحله، جدایه‌ای که می‌توانست بیشترین میزان نفت خام را در مدت ۲۱ روز تجزیه کند به‌عنوان جدایه برتر برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شد.

شناسایی جدایه منتخب

به منظور شناسایی جدایه کپکی منتخب، در

نمودار استاندارد با مقادیر ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۰/۱ برای تتراکوزان تهیه شد [۲۴].

ح- بررسی میزان تولید سورفکتانت توسط سوپه منتخب با استفاده از روش گسترش روغن به منظور ارزیابی تولید سورفکتانت توسط سوپه منتخب، یک کشت مناسب از سوپه به صورت مشابه با قسمت‌های پیشین انجام شد و به مدت ۲۱ روز در یک شیکر (در دمای 28°C و دور شیکر ۱۲۰ rpm) گرمادهی شد. پس از ۲۱ روز، توانایی این سوپه برای تولید بیوسورفکتانت با استفاده از روش گسترش روغن مورد بررسی قرار گرفت [۲۵]. نفت خام (۲۰ mL) به یک ظرف بزرگ (با قطر ۲۰ cm) حاوی ۵۰ mL آب مقطر افزوده شد. محتویات ارلن حاوی سوپه منتخب در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و $10\ \mu\text{m}$ از مایع رویی به سطح نفت خام اضافه شد. در صورت وجود سورفکتانت هاله‌ای روشن در وسط نفت خام ایجاد می‌گردد [۲۵]. قطر هاله روشن در سطح نفت خام در کشت‌های سه گانه اندازه‌گیری شد و با ۱۰ mL آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی مقایسه گردید.

بررسی اثر استفاده از سورفکتانت‌های شیمیایی و زیستی در افزایش بازده حذف زیستی

یکی از مشکلات اصلی در زمینه تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، حلالیت و دسترسی زیستی پایین این ترکیبات است. به‌همین دلیل استفاده از ترکیبات فعال سطحی که باعث افزایش انحلال‌پذیری ترکیبات آبگریز می‌شوند به‌عنوان یک راه حل برای رفع این نقیصه در نظر گرفته می‌شود. به‌همین دلیل از سورفکتانت برای بهبود کارایی این سوپه در تجزیه نفت خام استفاده شد. به‌همین دلیل در این تحقیق به مقایسه اثر سورفکتانت شیمیایی تویین ۸۰ و سورفکتانت زیستی رامنولپید پرداخته شد.

پس از رسیدن جذب نوری نمونه‌ها به $0/6$ در طول موج $600\ \text{nm}$ ، ۱ mL از محیط پیش کشت در دور ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۵ min سانتریفیوژ گردید و سه بار به‌وسیله سرم فیزیولوژیک شستشو و با سرم فیزیولوژی به حجم ۱ mL اولیه برگردانده شد. محلول نهایی به‌عنوان مایه تلقیح به ارلن‌های ۵۰ mL حاوی ۹ mL محیط باشنل هاس دارای ۵۰۰ ppm پیرن یا ۰/۱٪ تتراکوزان (تنها منابع کربن) اضافه و در دمای 28°C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرمادهی شدند. پس از گذشت ۲۱ روز از زمان گرمادهی محتوای پیرن و تتراکوزان موجود در ارلن‌ها توسط ۱۰ mL تولوئن جداسازی شد. میزان پیرن و تتراکوزان توسط کروماتوگرافی گازی (GC) سنجیده شد و برای به‌دست آوردن درصد حذف میزان پیرن و تتراکوزان هر ارلن با نمونه شاهد (فاقد تلقیح) مربوط به خودش که تمام شرایط مشابه را طی کرده بود، مقایسه گردید [۲۲ و ۲۳].

شرایط انجام کروماتوگرافی گازی (GC) برای سنجش میزان تتراکوزان و پیرن

پس از استخراج پیرن و تتراکوزان باقی‌مانده مربوط به هر ارلن توسط تولوئن، محلول آلی نهایی به ویال‌های شیشه‌ای تمیز انتقال یافت و به منظور جلوگیری از تبخیر در محل سرد و خنک نگهداری شد. تزریق نمونه‌ها به‌دستگاه کروماتوگرافی گازی Shimidzu مجهز به ستون موئین اینوواکس به طول ۳۰ m و قطر خارجی ۰/۲۵ mm و قطر داخلی $0/25\ \mu\text{m}$ انجام شد. دمای اولیه آون 100°C بود و پس از ۱ min با سرعت 20°C در دقیقه به دمای 320°C رسید و به مدت ۱۰/۵ min در این دما ثابت ماند. از گاز هلیوم با خروجی ثابت ۱ mL/min به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. حجم تزریق $1\ \mu\text{m}$ و دمای تزریق 250°C بود. نوع آشکارساز دستگاه، یونیزاسیون شعله‌ای^۱ (FID) بود. تزریق نمونه‌های استاندارد تتراکوزان برای رسم منحنی کالیبراسیون نیز در شرایط مشابه انجام پذیرفت.

هیدروکربن‌های سنگین از مناطق دارای آلودگی‌های بسیار قدیمی صورت گرفته است [۲۸]. به‌طور مثال در سال Potin و همکارانش با استفاده از خاک دارای آلودگی قدیمی اطراف یک ایستگاه استخراج گاز که دارای تجمع بسیار بالایی از PAH‌های سنگین بود، توانست ۲۱ نوع قارچ مختلف را جداسازی کند که از میان دو قارچ فوزاریوم و کونیوتریوم دارای توانایی مناسبی در جهت تجزیه زیستی مخلوطی از PAH‌های مختلف بودند [۲۹].

حذف نفت خام توسط جدایه‌های قارچی

به منظور دستیابی به جدایه کپکی برتر برای انجام بررسی‌های تکمیلی، میزان تجزیه نفت خام توسط این ۸ جدایه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به میزان تجزیه نفت خام توسط این ۸ جدایه در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲ میزان حذف نفت خام توسط جدایه‌های کپکی مختلف پس از ۲۱ روز

نام جدایه	میزان حذف نفت خام (%)
F11	۴۵/۳۱
F12	۴۶/۹۴
F13	۵۲/۹۷
F14	۴۷/۳۰
F15	۴۹/۰۷
F16	۳۹/۷۲
F17	۴۳/۵۴
F18	۴۵/۶۸

همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است، جدایه F13 با ۵۲/۹۷٪، به نسبت سایر جدایه‌ها توان بیشتری در تجزیه نفت خام داشت و به همین دلیل برای ادامه آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. همچنین جدایه‌های F15 و F14 به ترتیب با ۴۹/۰۷٪ و ۴۷/۳۰٪ بعد از F13 بیشترین میزان حذف را داشتند و F16 با ۳۹/۷۲٪، کمترین میزان حذف را از خود نشان داد.

در این مرحله تمام کشت‌های مربوط به تجزیه زیستی نفت خام، پیرن و تتراکوزان (۰/۲٪ (وزنی/حجمی) تویین ۸۰ و ۰/۰۱٪ (وزنی/حجمی) رامنولیپید (رامنولیپید ۹۰٪ از شرکت سیگما آلدریج^۱) به صورت مجزا اضافه شد. غلظت استفاده شده از رامنولیپید و تویین ۸۰ با توجه به مقدار بهینه‌ای که توسط Chen و همکاران و Lai و همکاران اعلام شده بود، انتخاب گردید [۲۶ و ۲۷]. شرایط این کشت‌ها مانند نحوه تهیه پیش کشت مناسب، شرایط گرمادهی (دما و دور شیکر) و مدت زمان تجزیه کاملاً مشابه با کشت‌های پیشین بود.

بحث و نتایج

ارزیابی رشد جدایه‌های کپکی در محیط نمکی حاوی نفت خام

پس از انجام خالص‌سازی، در مجموع ۴۳ جدایه کپکی مختلف از منطقه پازنان جداسازی شد. در مرحله اول توانایی این جدایه‌ها در مصرف نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی ارزیابی شد. از میان ۴۰ جدایه مختلف، ۲۴ جدایه به‌طور کلی نتوانستند در محیط پایه نمکی که نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن در آن وجود داشت، رشد کنند و ۱۱ جدایه دیگر نیز به مقدار بسیار کمی قادر به رشد بودند و مقدار کمی از نفت را مصرف کردند (کمتر از ۱۰٪). این دو دسته از جدایه‌ها کنار گذاشته شدند. در انتها، ۸ جدایه کپکی که می‌توانستند در محیط پایه نمکی حاوی نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن به‌خوبی رشد کنند، برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شدند. سال هستند. لازم به ذکر است که در مناطق دارای آلودگی قدیمی هیدروکربن‌های سنگین موجود در نفت خام با گذشت سال‌ها متمادی تجمع یافته‌اند و به همین دلیل سویه‌های میکروبی موجود در این مناطق برای تجزیه زیستی این دسته از هیدروکربن‌ها سازگار شده‌اند. به همین دلیل تحقیقات بسیاری مبنی بر جداسازی سویه‌های توانمند در تجزیه زیستی

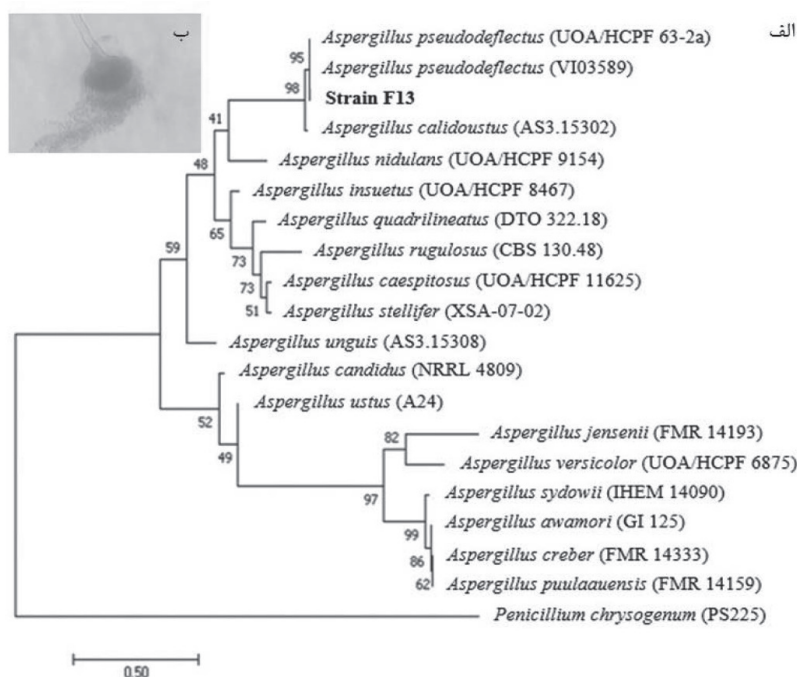
1. Sigma-Aldrich

گروه، دسته‌ای از میکروارگانیسم‌ها وجود دارند که از مواد واسطه حاصل از تجزیه ناقص نفت توسط میکروارگانیسم‌های پیشین استفاده کرده و آن‌ها را به مواد ساده‌تری تجزیه می‌کنند. در میان این مجموعه‌های تجزیه‌کننده، گروه دیگری از میکروارگانیسم‌ها وجود دارند که با تولید بیوسورفاکتانت و انواع مواد فعال سطحی دسترسی بین ترکیبات نفتی و تجزیه‌کننده‌ها را افزایش می‌دهند [۳۲].

شناسایی جدایه منتخب

به منظور شناسایی سویه F13، در مرحله اول تصاویر میکروسکوپی مربوط به کشت روی اسلاید شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). با توجه به تصویر میکروسکوپی حاصل از کشت روی اسلاید شیشه‌ای، ساختار کلوملا^۱ و کندیوسپورهای^۲ جنس آسپرژیلوس به‌وضوح مشاهده شد (شکل ۱ ب).

در پژوهشی که توسط Atangana و همکارانش بر روی تجزیه PAHها توسط قارچ‌ها انجام شد، از میان ۲۳ جدایه اولیه خالص‌سازی شده ۸ جدایه غیرتجزیه‌کننده در کشت غنی‌سازی تهیه شده روی هیدروکربن حاصل شده است [۳۰]. علت این امر که حتی در چنین مناطقی با آلودگی قدیمی هم جدایه‌های غیرتجزیه‌کننده توانایی رشد دارند، این است که در محیط دارای آلودگی نفتی انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم در تجزیه ترکیبات آلاینده نفتی نقش دارند و از آنجا که هر نوع خاص میکروارگانیسم تنها توانایی حذف تعداد محدودی از ترکیبات نفتی را دارد، وجود یک مجموعه از میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده اثر بیشتری دارد [۳۱]. به‌طور مثال میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نفت با حمله مستقیم به ترکیبات نفتی و مصرف آن‌ها به‌عنوان منبع مغذی به فعالیت می‌پردازند. در کنار این



شکل ۱ الف- درخت فیلوژنی حاصل برای سویه آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 با استفاده از پرایمرهای ITS، با الگوریتم Neighbor joining نرم‌افزار ۷ Mega، ب) تصویر میکروسکوپی مربوط به جدایه منتخب با بزرگ‌نمایی X ۱۰۰۰ و استفاده از رنگ لاکتوفنول بلو

1. Columella
2. Conidiospore

پیرن با ۴۷/۰۶٪ در مقایسه با تتراکوزان و نفت خام در شرایط مشابه، که به ترتیب برابر ۵۸/۷۳٪ و ۵۲/۹۷٪ است، مقدار کمتری است.

جدول ۳ میزان تجزیه آلاینده‌های مختلف در طول ۲۱ روز توسط آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13

میزان حذف (%)	نوع منبع کربن (آلاینده) موجود در محیط
۵۲/۹۷	نفت خام
۴۷/۰۶	پیرن
۵۸/۷۳	تتراکوزان

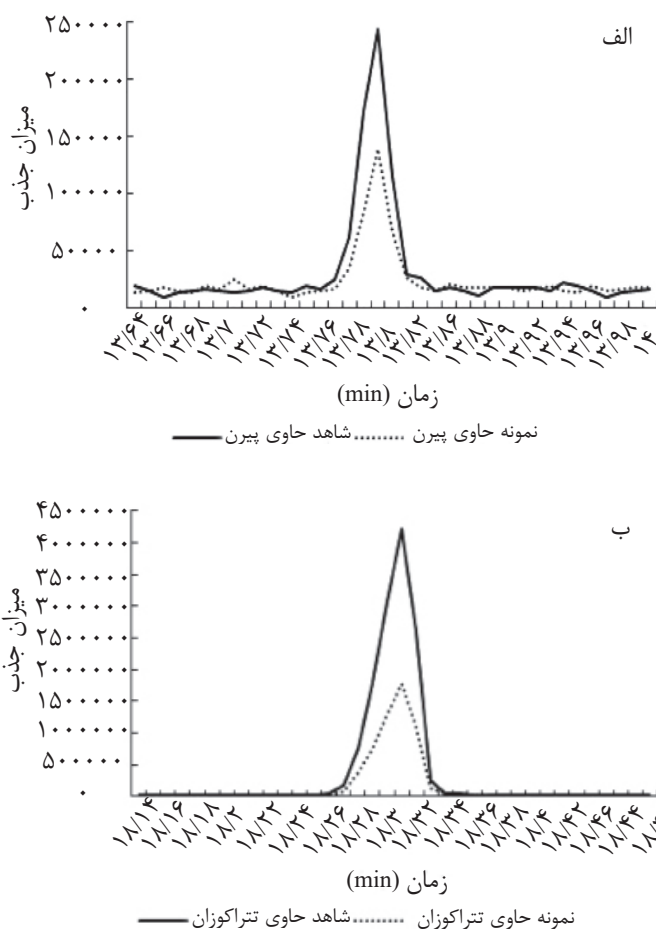
مقدار تتراکوزان و نفت خام استفاده شده در این تست ۲۰ برابر از پیرن بیشتر بوده است. با این وجود، مقدار بیشتری از تتراکوزان در مدت ۲۱ روز تجزیه شده است که ممکن است بیان کننده‌ی سمیت بالاتر، سخت تجزیه‌پذیر بودن یا دسترسی زیستی کمتر پیرن در مقایسه با تتراکوزان باشد. علاوه بر این، آزمایش‌های دیگری در همین آزمایشگاه انجام شده است که نشان می‌دهد درصد تجزیه زیستی پیرن در غلظت‌های بیشتر از ۵۰۰ ppm به شدت افت می‌کند. براساس پژوهش‌های قبلی، می‌توان گفت که در شرایط یکسان اختلاف زیادی بین تجزیه زیستی آروماتیک‌های چند حلقه‌ای و آلیفاتیک‌ها وجود دارد [۳۳]، ولی به سبب آنکه سویه آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 از منطقه‌ای با آلودگی‌های نفتی سنگین جدا شده برای رشد و فعالیت در حضور این گونه ترکیبات سازگاری خوبی پیدا کرده است. پاک‌سازی محل‌های آلودگی از ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای مانند پیرن در مقایسه با آلیفاتیک‌هایی نظیر تتراکوزان به مراتب حساس‌تر و سخت‌تر است. طبق اعلام El-Alawi و همکاران در مقاله‌ای که منتشر شد، پیرن و بنزو پیرن به عنوان PAH‌های دارای حلالیت بسیار پایین و در نتیجه بسیار سخت تجزیه‌پذیر معرفی شدند [۳۴].

در ادامه برای شناسایی نهایی این سویه، توالی قطعه ITS آن با بانک اطلاعاتی CBS مطابقت داده شد که نشان‌دهنده شباهت ۱۰۰٪ جدایه F13 با گونه آسپرژیلوس سودودفلکتوس^۱ بود. در نهایت، درخت فیلوژنی مربوط به جدایه‌ی F13 با استفاده از الگوریتم Neighbor joining و نرم‌افزار Mega 7 رسم شد (شکل ۱ الف). توالی جزئی 5.8S rRNA این سویه با شماره دسترسی KY565473 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد. لازم به ذکر است که تا به حال گزارشی مبنی بر تجزیه ترکیبات نفتی توسط این گونه گزارش نشده است.

بررسی توانایی حذف پیرن و تتراکوزان توسط آسپرژیلوس سودودفلکتوس

برای بررسی توان سویه آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 در تجزیه ترکیبات سنگین نفتی، از پیرن و تتراکوزان به عنوان دو هیدروکربن مدل به ترتیب برای PAH‌ها و آلیفاتیک‌های بلند زنجیر (سنگین) استفاده شد. پیرن یک هیدروکربن آروماتیک سمی با خواص جهش‌زایی و سرطان‌زایی بوده که در محیط‌های آبی نامحلول است و دسترسی زیستی به شدت پایینی دارد و به همین علت، مدت زمان زیادی در منطقه آلوده باقی مانده و برای سلامت محیط و جانداران ساکن در آن بسیار مضر است [۳]. تتراکوزان هیدروکربنی خطی بوده که سمیت پایین‌تری به نسبت ترکیبات آروماتیک چند حلقه مانند پیرن دارد، اما به دلیل داشتن زنجیره کربنی بلند (۲۴ عدد اتم کربن) انحلال‌پذیری و دسترسی زیستی بسیار پایینی در محیط‌های آبی دارد که باعث حضور طولانی مدت این ترکیب در محیط شده که ممکن است باعث تغییر دراکولوژی میکروبی محیط آلودگی گردد [۱]. میزان حذف پیرن و تتراکوزان توسط آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 در جدول ۳ آورده است. با میزان تجزیه نفت خام مقایسه شده است و همچنین نتایج خروجی حاصل از GC پیرن و تتراکوزان در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۳، میزان تجزیه

1. *Aspergillus Pseudodeflectus*



شکل ۲ نمودار خروجی GC مربوط به حذف پیرن و تتراکوزان توسط سویه آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 (الف) میزان پیرن موجود در نمونه شاهد و نمونه تلقیح شده، (ب) میزان تتراکوزان موجود در نمونه شاهد و نمونه تلقیح شده

آلیفاتیک‌های با طول زنجیر ۲۰ کربن به بالا تنها به ۵۰٪ می‌رسد [۴]. این مطالب نشان‌دهنده توان بالای آسپرژیلوس سودودفلکتوس در تجزیه مشتقات سنگین نفت خام مانند پیرن (PAH سنگین) و تتراکوزان (آلیفاتیک بلند زنجیر) است.

میزان تولید سورفکتانت توسط آسپرژیلوس سودودفلکتوس

F13

بررسی هاله روشن ایجاد شده روی سطح نفت خام توسط آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 (۲/۳ cm) و مقایسه آن با میزان هاله روشن ایجاد شده روی سطح نفت خام توسط آب مقطر (۱/۱ cm) نشان داد که سویه توانایی مناسبی در تولید سورفکتانت ندارد.

Diana و همکاران میزان تجزیه پیرن و فنانترن را در غلظت ۵۰ ppm و مدت ۷ روز توسط ۵ سویه مختلف قارچی و باکتریایی مقایسه کرده و اعلام نمودند که سویه کپکی فوزاریوم^۱ FPYF3 بیشترین توانایی را در تجزیه ترکیبات آروماتیک چند حلقه دارد و تجزیه پیرن به نسبت فنانترن بسیار کمتر است [۵]. علاوه بر این، Dede و همکاران در تحقیقی به بررسی تجزیه ترکیبات آلیفاتیک توسط یک سویه کپکی پرداختند و بیان کردند که ترکیبات آلیفاتیک در مقایسه با سایر ترکیبات نفت خام راحت‌تر و سریع‌تر تجزیه می‌شوند و آن‌هایی که دارای کمتر از ۱۰ کربن هستند به صورت ۱۰۰٪ در ۵ روز اول فرآیند تجزیه می‌شوند. این میزان برای کل آلیفاتیک‌های نفت خام بعد از گذشت ۳۰ روز از آغاز تجزیه حدود ۹۰٪ است ولی در مورد

1. Fusarium

در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۴ تأثیر مثبت ترکیبات فعال سطحی در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی مشخص است. رامنولیپید به‌عنوان یک سورفکتانت زیستی نسبت به توپین ۸۰ در مقادیر بسیار کمتر (۱:۲۰) تأثیر مثبت‌تری داشته است. رامنولیپید دارای پایه زیستی بوده و به‌همین دلیل زیست تخریب‌پذیر است و تا کنون هیچ‌گونه آلودگی ثانویه و سمیت خاصی در مورد آن گزارش نشده است و در مقابل آن توپین ۸۰ به‌عنوان یک سورفکتانت شیمیایی دارای ساختاری لیپیدی بوده و توسط توسط سوپه استفاده شده تجزیه نمی‌شود. استفاده از توپین ۸۰ باعث شد که میزان تجزیه نفت خام، پیرن و تتراکوزان از مقادیر اولیه ۵۲/۹۷، ۴۷/۰۶ و ۵۸/۷۳٪ به‌ترتیب به مقادیر ۶۴/۸۹، ۵۷/۳۹ و ۷۰/۷۸٪ افزایش یابد. در واقع با استفاده از توپین ۸۰ کارآیی فرآیند تجزیه زیستی این سه ماده توسط اسپرژیلوس سودودفلکتوس در حدود ۲۰ تا ۳۰٪ افزایش می‌یابد. در مقابل، رامنولیپید میزان تجزیه زیستی نفت خام، پیرن و تتراکوزان را حدود ۲۵ تا ۳۵٪ افزایش داده و مقدار اندازه‌گیری شده به‌ترتیب برای نفت خام، پیرن و تتراکوزان ۶۸/۸۶، ۶۰/۳۱ و ۷۵/۲۴٪ است. این نتایج نشان‌دهنده تأثیر بالای رامنولیپید در افزایش تجزیه زیستی، آن هم در مقادیر ۲۰ برابر کمتر از توپین ۸۰ است.

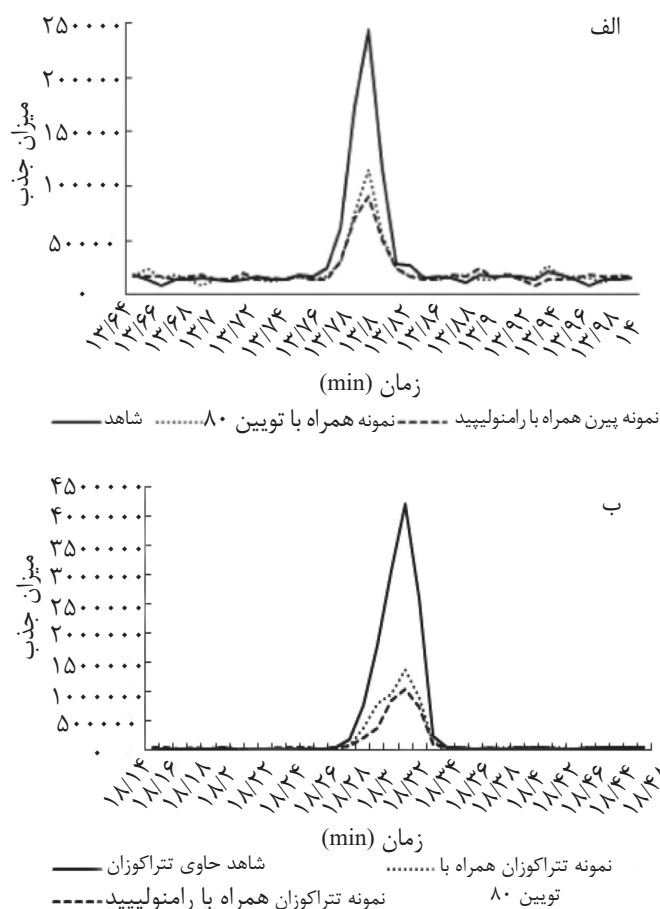
به‌همین دلیل می‌توان نتیجه گرفت که سوپه مورد بررسی در تجزیه ترکیباتی که دارای حلالیت کمتری هستند دارای مشکل است. پس می‌توان با استفاده از یک ترکیب سورفکتانت و افزایش انحلال‌پذیری این ترکیبات، کارآیی سوپه را در حذف نفت خام بهبود بخشید.

مقایسه اثر توپین ۸۰ و رامنولیپید در افزایش تجزیه زیستی

ترکیبات فعال سطحی با کاهش انرژی آزاد انحلال ترکیبات آب‌گریز، موجب افزایش انحلال‌پذیری این ترکیبات در محیط‌های آبی می‌شوند. افزایش انحلال‌پذیری، دسترسی زیستی ترکیبات دارای انحلال پایین را برای میکروارگانیسم‌ها افزایش داده و باعث بهتر شدن فرآیند تجزیه می‌گردد [۲۶]. در این پژوهش اثر سورفکتانت شیمیایی توپین ۸۰ و سورفکتانت زیستی رامنولیپید با توجه به تحقیقات سایر محققان [۲۶ و ۲۷] در تجزیه زیستی نفت خام، پیرن و تتراکوزان مورد مقایسه قرار گرفته است. مقدار تجزیه نفت خام، پیرن و تتراکوزان توسط جدایه منتخب در حضور توپین ۸۰ (به‌میزان ۰/۲٪ وزنی/حجمی) و رامنولیپید (به‌میزان ۰/۰۱٪ وزنی/حجمی) در جدول ۴ آورده شده است. همچنین، نمودار خروجی GC مربوط به تست‌های این بخش

جدول ۴ میزان حذف زیستی نفت خام، پیرن و تتراکوزان توسط اسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 در حضور و عدم حضور سورفکتانت

نوع سورفکتانت	نوع منبع کربن (آلاینده) موجود در محیط	میزان حذف (%)
بدون سورفکتانت	نفت خام	۵۲/۹۷
	پیرن	۴۷/۰۶
	تتراکوزان	۵۸/۷۳
توپین ۸۰	نفت خام	۶۴/۸۹
	پیرن	۵۷/۳۹
	تتراکوزان	۷۰/۷۸
رامنولیپید	نفت خام	۶۸/۸۶
	پیرن	۶۰/۳۱
	تتراکوزان	۷۵/۲۴



شکل ۳ شکل ۲ نمودار خروجی GC مربوط به حذف پیرن و تتراکوزان توسط سویه آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 در حضور توپین ۸۰ و رامنولیپید (الف) میزان پیرن موجود در نمونه شاهد و نمونه‌های تلقیح شده همراه با توپین ۸۰ و رامنولیپید، (ب) میزان تتراکوزان موجود در نمونه شاهد و نمونه‌های تلقیح شده همراه با توپین ۸۰ و رامنولیپید

اثر بیشتر ترکیبات فعال سطحی در تجزیه ترکیبات آلیفاتیک به نسبت آروماتیک‌ها است. تأثیر مواد فعال سطحی را در تجزیه ترکیبات مختلف با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان به صورت $\text{PAHs} < \text{Crude Oils} < \text{n-alkanes}$ نشان داد. Chen و همکارانش همچنین در مقاله خود، اعلام کرده بودند که تأثیر استفاده از رامنولیپید بر روی هیدروکربن‌های موجود در نفت خام به صورت $\text{PAHs} > \text{biomarkers} > \text{n-alkanes}$ است [۳۴] که با نتایج به دست آمده در این پژوهش هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، جدایه قارچی آسپرژیلوس سودودفلکتوس F13 از منطقه نفتی پازنان جداسازی شد.

Lai و همکاران در تحقیق خود که انجام دادند به بررسی اثر دو سورفکتانت زیستی رامنولیپید، سورفکتین و دو سورفکتانت شیمیایی توپین ۸۰ و تریتون ایکس ۱۰۰ (مقادیر تمامی آن‌ها برابر ۰/۲٪ وزنی/حجمی) در تجزیه زیستی نفت خام از خاک پرداختند و بیان کردند هر کدام از این مواد ترکیبات میزان تجزیه را به ترتیب ۲۳، ۱۴، ۶ و ۴٪ افزایش داده که رامنولیپید بیشترین مقدار تغییر مثبت را نشان داد [۲۷]. در مطالعه دیگری، Chen و همکاران تأثیر استفاده از رامنولیپید را در محیط شبیه‌سازی شده دریایی (مقدار ۰/۰۲٪) را بررسی نمودند و اعلام داشتند که رامنولیپید میزان تجزیه نفت خام را ۵/۶۳٪ افزایش می‌دهد. نکته دیگری که می‌توان از این نتایج متوجه شد،

رامنولیپید در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های سنگین بررسی شد و نشان داده شد رامنولیپید در غلظت بسیار پایین، می‌تواند میزان تجزیه پیرن، نفت خام و تتراکوزان را به ترتیب حدود ۲۵، ۳۰ و ۳۵٪ افزایش دهد. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌تواند در زیست‌پالایی مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی کمک کنند.

این جدایه توانست ۱٪ تتراکوزان (آلیفاتیک سنگین C_{24}) و ۵۰۰ ppm پیرن (آروماتیک چهار حلقه‌های سنگین) را به ترتیب به میزان ۵۸/۸۴ و ۵۱/۴۲٪ حذف کند. عملکرد این جدایه نشان از توان بالای آن برای استفاده در پاک‌سازی زیستی مناطقی که دارای آلودگی‌های بسیار قدیمی با هیدروکربن‌های سنگین هستند، دارد. از طرف دیگر در این تحقیق اثر مناسب سورفکتانت‌ها و به‌خصوص بیوسورفکتانت

مراجع

- [1]. Husaini A., Roslan H. A., Hii K. S. and Ang C. H., "Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites," World J Microb Biot., Vol. 24, No. 12, pp. 2789-2797, 2008.
- [2]. Plohl K., Leskovsek H. and Bricelj M., "Biological degradation of motor oil in water," Acta Chim Slov., Vol. 49, No. 2, pp. 279-290, 2002.
- [3]. Varjani S. J., "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons," Bioresource technol., Vol. 223, No. 1, pp. 277-286, 2017.
- [4]. Yanto D. H. and Tachibana S., "Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007," Int. Biodeter Biodegr., Vol. 85, No. 1, pp. 438-450, 2013.
- [5]. Ortega-González D. K., Cristiani-Urbina E., Flores-Ortiz C. M., Cruz-Maya J. A., Cancino-Díaz J. C. and Jan-Roblero J., "Evaluation of the removal of pyrene and fluoranthene by *ochrobactrum anthropi*, *fusarium* sp. and their coculture," Appl. Biochem Biotech., Vol. 175, No. 2, 1123-1138, 2015.
- [6]. Rajesh D., Sunil C., Lalita R. and Sushila S., "Impact assessment of soils treated with refinery effluent," Eur. J. Soil. Biol., Vol. 45, No. 5, pp. 459-465, 2009.
- [7]. Acevedo F., Pizzul L., del Pilar Castillo M., Cuevas R. and Diez M. C., "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoophyllum discolor*," J. Hazard Mater., Vol. 185, No. 1, pp. 212-219, 2011.
- [8]. Mnif I., Mnif S., Sahnoun R., Maktouf S., Ayedi Y., Ellouze-Chaabouni S. and Ghribi D., "Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants," Environ. Sci. Pollut. Res., Vol. 22, No. 19, pp. 14852-14861, 2015
- [9]. Souza E. C., Vessoni-Penna T. C. and de Souza Oliveira R. P., "Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview," Int. Biodeter Biodegr., Vol. 89, No. 1, pp. 88-94, 2014.
- [10]. Jones J. G., Knight M. and Byrom J. A., "Effect of gross pollution by kerosine hydrocarbons on the microflora of a moorland soil," Nature. Vol. 227, No. 5263, pp 1166-1166. 1970
- [11]. Pinholt Y., Struwe S. and Kjøller A., "Microbial changes during oil decomposition in soil," Ecography. Vol. 2, No. 3, pp. 195-200. 1979
- [12]. Boonchan S., Britz M. L. and Stanley G. A., "Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic

- aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures,* Appl Environ Microbiol., Vol. 66, No. 3, pp 1007-1019. 2000
- [13]. Balaji V., Arulazhagan P. and Ebenezer P., "Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds," J. Environ Biol. Vol. 35, No. 3, pp. 521-529. 2014.
- [14]. Mohsenzadeh F., Nasser S., Mesdaghinia A., Nabizadeh R., Zafari D., Khodakaramian G. and Chehregani A., "Phytoremediation of petroleum-polluted soils: application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils," Ecotoxicol Environ. Saf. Vol. 73, No. 4, pp. 613-619. 2010
- [15]. Rad A. C., Mohsenzadeh F. and Akbari M., "Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils," Iranian J. Environ. Health Sci. Eng. Vol. 9, No. 1, pp 26-36. 2012
- [16]. Margesin R. and Schinner F., "Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area," Applied Environ. Microbiol., Vol. 67, No. 7, pp. 3127-3133, 2001.
- [17]. Birdi K., Sen T. and Ray C., "Subsurface colloidal fines, behavior, characterization, and their role in ground-water contamination," 1st ed. Handbook of surface and colloid chemistry, pp. 413-436, London, CRC Press, 2015.
- [18]. Rahman K. S., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P. and Banat I. M., "Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium," Bioresour Technol. Vol. 85, No. 3, pp. 257-261, 2002.
- [19]. Mukred A. M., Hamid A. A., Hamzah A. and Yusoff W. W., "Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water," J. Biol. Sci., Vol. 8, No. 4, pp. 73-79, 2008.
- [20]. Latha R. and Kalaivani R., "Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis," Adv Applied Sci. Res., Vol. 3, No. 5, pp. 2789-2795, 2012.
- [21]. Sambrook J. and Russell D. W., "The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual," 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory., 2006.
- [22]. Deng F., Liao C., Yang C., Guo C., Ma L. and Dang Z., "A new approach for pyrene bioremediation using bacteria immobilized in layer-by-layer assembled microcapsules: dynamics of soil bacterial community," RSC Adv., Vol. 6, No. 25, pp. 20654-20663, 2016.
- [23]. Goudarztalejerdi A., Tabatabaei M., Eskandari M. H., Mowla D. and Iraj A., "Evaluation of bioremediation potential and biopolymer production of pseudomonads isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated areas," Int. J. Environ. Sci. Technol., Vol. 12, No. 9, pp. 2801-2808, 2015.
- [24]. Pugazhendi A., Abbad Wazin H., Qari H., Basahi J. M., Godon J. J. and Dhavamani J., "Biodegradation of low and high molecular weight hydrocarbons in petroleum refinery wastewater by a thermophilic bacterial consortium," Environ Technol., Vol. 38, No. 19, pp. 2381-2391, 2016.
- [25]. Hasanizadeh P., Moghimi H. and Hamed J., "Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* on waste frying oil and possible uses in crude oil remediation," Water Sci Technol, Vol. 76, No. 7, pp 1706-1714, 2017.
- [26]. Mulligan C. N., Yong R. N. and Gibbs B. F., "Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review,"

Eng. geol., Vol. 60, No. 1, pp. 731-780, 2001.

[27]. Lai C. C., Huang Y. C., Wei Y. H. and Chang J. S., "Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil," J. Hazard Mater., Vol. 167, No. 1, pp. 607-614, 2009.

[28]. Bento F. M., Camargo F. A., Okeke B. C. and Frankenberger W. T., "Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation," Bioresour Technol, Vol. 96, No. 9, pp. 1049-1055, 2005

[29]. Potin O., Rafin C. and Veignie E., "Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil," Int. Biodeter Biodegr. Vol. 54, No. 1, pp. 45-52. 2004.

[30]. Atagana H. I., Haynes R. J. and Wallis F. M., "Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi," Water Air Soil Pollut, Vol. 172, No. 1, pp. 201-219. 2006

[31]. Fan C. Y. and Krishnamurthy S., "Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review," J. Air Waste Manag Assoc, Vol. 45, No. 6, pp. 453-460. 1995

[32]. Zhao D., Liu C., Liu L., Zhang Y., Liu Q. and Wu W. M., "Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation," Int. Biodeter Biodegr. Vol. 65, No. 8, pp. 1244-1248, 2011

[33]. Song R., Hua Z., Li H. and Chen J., "Biodegradation of petroleum hydrocarbons by two *Pseudomonas aeruginosa* strains with different uptake modes," J. Environ Sci. Heal A., Vol. 41, No. 4, pp 733-748, 2006.

[34]. El-Alawi Y. S., McConkey B. J., Dixon D. G. and Greenberg B. M., "Measurement of short-and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria," Ecotoxic Environ Safe., Vol. 51, No. 1, pp. 12-21, 2002.

[35]. Chen Q., Bao M., Fan X., Liang S. and Sun P., "Rhamnolipids enhance marine oil spill bioremediation in laboratory system," Mar. Pollut. Bullet., Vol. 71, No. 1, pp. 269-275, 2013.