

# حذف زیستی نفتالین و هگزادکان توسط جدایه بومی *Bacillus thuringiensis*

فیروزه غلامی<sup>۱</sup>، علیرضا حبیبی<sup>۲\*</sup>، سمیرا پاکدل<sup>۱</sup>، علی بهشتی آل آقا<sup>۱</sup> و روح الله شریفی<sup>۳</sup>

۱- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲- گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

## چکیده

آلودگی به موادنفی اغلب در واحدهای بهره‌برداری، پالایش و فرآوری امری گریزناپذیر است. انتشار این ترکیبات به محیط زیست اغلب موجب اثرات نامطلوب بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده می‌شود و بنابراین باید با استفاده از روش‌های کارآمد برای حذف آنها اقدام نمود. تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها روشی کم‌هزینه، مؤثر و سازگار با محیط زیست در حذف آلودگی‌های نفتی از محیط‌های آلوده است که موفقیت آن بستگی بسیاری به وجود میکروارگانیسم‌های توانمند به حذف ترکیبات هیدروکربنی حلقوی و خطی دارد. از این‌رو، جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده سازگار با شرایط محیط و توانمند به تحمل بار بالای آلاینده‌ها، حائز اهمیت است. در این پژوهش، چهار سویه باکتریایی (*Bacillus thuringiensis*، *Staphylococcus gallinarum*، *Arthrobacter citreus* و *Paenarthrobacter nitroguajacolicus*) که پیش‌تر از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در منطقه نفت‌شهر جداسازی شده بودند، برای حذف زیستی نفتالین و هگزادکان بکار گرفته شدند. نتایج نشان داد که اگر چه تمامی این چهار سویه امکان حذف نفتالین و هگزادکان را به عنوان تنها منبع تأمین کننده کربن دارند؛ اما سویه *B. thuringiensis* بهترین عملکرد را در حذف هر دو ترکیب نشان داد به طوری که طی مدت ۷ روز توانست ۹۰/۳۱٪ از نفتالین (غلظت اولیه  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) و ۷۸/۸۹٪ از هگزادکان (غلظت اولیه  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) را به ترتیب با سرعت ویژه  $99/25 \text{ mg gcell}^{-1} \text{ day}^{-1}$  و  $231/43 \text{ mg gcell}^{-1} \text{ day}^{-1}$  حذف نماید. براساس این نتایج، می‌توان گفت که این باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت، پتانسیل بالایی در تیمار زیستی محیط‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی خطی و حلقوی دارد.

**کلمات کلیدی:** تجزیه زیستی، اکسایش هوازی، هیدروکربن‌های خطی و حلقوی، باکتری‌های بومی، آنزیم کاتکول مونواکسیژناز.

## مقدمه

شده است. آلودگی خاک با نفت خام و مشتقات آن از جمله خطرناک‌ترین انواع آلودگی‌های زیست‌محیطی محسوب می‌گردد. هیدروکربن‌های موجود در نفت خام در دو گروه اصلی ترکیبات خطی (هیدروکربن‌های آلیفاتیک) و ترکیبات حلقوی (هیدروکربن‌های آروماتیک) قرار می‌گیرند.

رشد روزافزون فعالیت‌های صنعتی از یک سو و عدم رعایت الزامات زیست‌محیطی از سوی دیگر سبب بروز مشکلات جدی در زمینه آلودگی محیط زیست

قارچ‌هایی مثل آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، فوزاریوم و پسیلومایسز و مخمرهایی مثل کاندیدا، رودترولا و پیکیا به‌عنوان عوامل پالایش زیستی مشتقات نفتی گزارش شده‌اند [۴ و ۸].

با وجود آنکه، پژوهش‌های مختلفی در زمینه تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌های نفتی صورت گرفته است؛ اما از آنجایی که در تجزیه هیدروکربن‌های حلقوی و خطی به مسیره‌های متابولیکی متفاوتی نیازمند است، یافتن میکروارگانیسمی که توانایی تجزیه هر دو نوع هیدروکربن را دارا باشند، از اهمیت بالایی برخوردار است [۹]. در پژوهش حاضر، از نفتالین و هگزادکان به‌عنوان مولکول‌های مدل در یافتن پتانسیل تجزیه زیستی ترکیبات هیدروکربنی حلقوی و خطی، توسط چهار سویه باکتری بومی جداسازی شده از خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی در منطقه نفت‌شهر استان کرمانشاه استفاده شد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد شیمیایی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل ترکیب خطی نرمال هگزادکان با فرمول مولکولی  $C_{16}H_{34}$  و ترکیب حلقوی نفتالین با فرمول مولکولی  $C_{10}H_8$ ، همچنین حلال نرمال هگزان و کلیه اجزای محیط کشت، از درجه خلوص بالا و از شرکت مرک تهیه شد.

#### محیط کشت و میکروارگانیسم‌ها

در این پژوهش از چهار گونه باکتریایی *Arthrobacter citreus* (MT786388)، *Staphylococcus* (MT786386)، *Bacillus thuringiensis* (MT786387) *gallinarum* و *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* (MT786389) که پیش از این توسط تیم تحقیقاتی حاضر از خاک‌های مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی منطقه نفت‌شهر استان کرمانشاه (موقعیت جغرافیایی

هیدروکربن‌های خطی اشباع بخش اصلی نفت خام را تشکیل می‌دهند که شامل ترکیبات فرار، ترکیبات با وزن مولکولی پایین ( $C_8-C_{16}$ )، متوسط ( $C_{17}-C_{28}$ ) و بالا ( $C_{28}<$ ) است [۱ و ۲]. دسته دیگر، هیدروکربن‌های حلقوی با حلقه‌های به‌هم‌پیوسته بنزنی هستند که به‌صورت خطی، زاویه‌دار یا خوشه‌ای به هم متصل شده‌اند و آرایش ساختاری متفاوتی دارند و ترکیباتی چربی‌دوست، با فشار بخار و حلالیت پایین در آب و نقاط جوش و ذوب بالا هستند و به علت خاصیت آب‌گریزی بالا، مقاومت و پایداری بالایی در خاک دارند و نسبت به هیدروکربن‌های خطی سخت‌تر تجزیه می‌شوند [۳]. در مجموع هیدروکربن‌های نفتی یکی از پایداری‌ترین آلودگی‌های زیست محیطی هستند که اثرات مخرب طولانی مدت روی گیاهان، حیوانات و انسان‌ها بر جای می‌گذارند [۴ و ۵].

امروزه ملاحظات اقتصادی و زیست محیطی، موجب توجه به تجزیه زیستی آلاینده‌ها توسط گیاهان و میکروارگانیسم‌های خاک شده است. در فرآیند تجزیه زیستی، میکروارگانیسم از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و موجب تغییر ساختار آن‌ها از حالت پرخطر به کم‌خطر یا بی‌خطر می‌گردند. در مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، میکروارگانیسم‌های موجود در محیط اغلب با شرایط سازگار شده و در اثر تغییرات ژنتیکی، توانایی تجزیه و حتی تغذیه از هیدروکربن‌های نفتی به‌ویژه ترکیبات خطی و حلقوی را پیدا کرده‌اند [۶ و ۷]. میکروارگانیسم‌های متنوعی از گروه باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها باعث پالایش آلودگی‌های نفتی می‌شوند که براساس گزارش‌های متعدد، باکتری‌ها عمده‌ترین گروه میکروبی مؤثر در پالایش زیستی آلودگی‌های نفتی هستند [۸]. امروزه باکتری‌های زیادی که توانایی استفاده از انواع هیدروکربن‌های خطی و حلقوی را دارند، جداسازی و شناسایی شده‌اند. باکتری‌هایی مثل آکروموباکتر، اکتینوباکتر، فلاوباکتریوم، سودوموناس، باسیلوس و متیلوباکتریوم و

شد. فلاسک‌ها در دمای °C ۳۰ بر روی شیکرانکوباتور با دور همزن rpm ۱۸۰ به مدت یک هفته نگهداری شدند [۱۰]. در طی این مدت، هر ۲۴ h یکبار نمونه‌گیری جهت اندازه‌گیری غلظت توده زیستی، pH و مقدار باقی‌مانده ترکیبات هیدروکربنی استفاده شده، انجام گرفت.

### روش‌های سنجش

جهت سنجش غلظت توده‌زیستی از یک منحنی کالیبراسیون برای تبدیل میزان کدورت در ۶۰۰ nm (OD600) به غلظت توده‌زیستی برحسب  $g L^{-1}$  استفاده شد [۱۱]. برای این کار، ابتدا محلول‌هایی با کدورت مشخص از هر کشت باکتری تهیه شد و سپس این محلول‌ها در rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شدند تا توده‌زیستی جدا گردد. پس از سانتریفیوژ، توده‌های زیستی ته‌نشین شده به مدت ۲۴ h در یک آون با دمای °C ۸۵ خشک شدند. غلظت توده‌زیستی با تقسیم وزن خشک توده‌زیستی بر حجم اولیه کشت، تعیین شد.

سرعت ویژه رشد باکتری ( $\mu$ ) با استفاده از رابطه ۱ و براساس داده‌های به دست آمده در فاز رشد لگاریتمی هر باکتری تعیین شد [۱۱]:

$$\mu(\text{day}^{-1}) = \ln\left(\frac{X_t}{X_0}\right) / t \quad (1)$$

در رابطه بالا،  $X_0$  و  $X_t$  به ترتیب غلظت توده‌زیستی در ابتدای و انتهای فاز لگاریتمی رشد و  $t$  مدت زمان فاز رشد لگاریتمی است.

اندازه‌گیری نرمال هگزادکان و نفتالین باقی‌مانده با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی (GC) انجام شد. برای این منظور، ابتدا نفتالین و هگزادکان باقی‌مانده در هر کشت به روش زیر استخراج شد [۱۲]: ۹ mL از محلول عاری از سلول در سه مرحله با ۹ mL حلال هگزان کاملاً مخلوط شد. سپس فاز آلی جداسازی شد و عملیات آب‌گیری از این فاز آلی با استفاده از ۱ g ۰/۱ نمک سدیم سولفات به انجام رسید. به منظور جداسازی سدیم سولفات،

۳۳/۹۹۹۰° شمالی، ۴۵/۴۹۳۴° شرقی) جداسازی و شناسایی شدند، استفاده شد. به منظور غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی حلقوی و خطی از محیط کشت بوشنل هاس برات (BHB) استفاده شد. اجزاء این محیط در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ اجزاء سازنده محیط BHB

ماده	مقدار ( $g L^{-1}$ )
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۰/۲
CaCl <sub>2</sub>	۰/۰۲
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	۱
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	۱
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	۱
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	۰/۰۵

### بررسی تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌ها توسط باکتری‌ها

به منظور سنجش توانایی باکتری‌ها در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی حلقوی و خطی به ترتیب از نفتالین و هگزادکان با غلظت  $200 \text{ mg L}^{-1}$  و  $2 \text{ mg L}^{-1}$  به عنوان نماینده این ترکیبات استفاده گردید. آزمایشات برای هر هیدروکربن به صورت مجزا اما در شرایط آزمایشی یکسان، در ارلن‌مایر ۲۵۰ mL انجام شد. مقدار کافی از هیدروکربن‌های نفتی به‌طور جداگانه ابتدا در ۲ mL استون حل شدند و سپس توسط فیلتر سرسرنگی استریل با اندازه روزنه متوسط  $0.2 \mu\text{m}$  استریل شدند. سایر اجزای محیط کشت در یک دستگاه اتوکلاو با دمای °C ۱۲۱ به مدت ۲۰ min استریل گردید. به‌منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی، هرکدام از جدایه‌ها درون محیط کشت نوترینت برات (NB) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ h درون انکوباتور در دمای °C ۳۰ نگهداری شدند. یک میلی لیتر از سوسپانسیون با جمعیت  $1 \times 10^9 \text{ CFU mL}^{-1}$  به همراه ۱۰۰ mL از محیط (BHB)  $\text{pH} = 7$  به هر ارلن‌مایر ۲۵۰ mL اضافه شد. آزمایش‌ها برای هر باکتری، سه بار تکرار شد و مقدار متوسط  $\pm$  مقدار خطا گزارش گردید. از نمونه فاقد باکتری‌ها، به‌عنوان آزمایش شاهد استفاده

همچنین، به منظور تعیین محل شکست حلقه در ترکیب نفتالین، فعالیت آنزیم‌های کاتکول ۱ و ۲ دی‌اکسیژناز و کاتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز به روش اسپکتروفوتومتری و به ترتیب در طول موج‌های ۲۶۰ nm و ۳۷۵ nm اندازه‌گیری شد. سپس، سپس-موکونیک اسید و ۲-هیدروکسی موکونیک سمی<sup>۱</sup> آلدئید<sup>۲</sup> به عنوان محصولات بازشدن حلقه کاتکول در دمای ۳۰ °C و پس از مدت ۵ min، آنالیز شدند [۱۵]. در این آزمایش‌ها، از محلول کاتکول در بافر فسفات (۵۰ mM و pH=۷) با غلظت ۱۰ mM به عنوان سوپسترا استفاده شد. مقدار فعالیت این دو آنزیم، به صورت مقدار میکرومول محصول تولید شده در هر دقیقه (IU) به ازای هر میلی‌گرم از پروتئین آنزیم گزارش شد. غلظت پروتئین آنزیم به روش بردفورد و با استفاده از محلول سرم آلبومین گاوی در بازه غلظت ۰-۱ mg L<sup>-1</sup> در طول موج ۵۹۵ nm به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد [۱۶].

برای جداسازی بیوسورفکتانت تولیدشده، pH محیط عاری از سلول، به کمک محلول اسیدکلریدریک ۶ N به ۲ رسانده شد و سپس با افزودن ۲ برابر حجمی از متانول، عملیات ترسیب بیوسورفکتانت در دمای ۰°C به مدت ۴ h انجام شد. رسوبات با سانتریفیوژ به مدت ۱۰ min و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm جداسازی شد [۱۷]. پس از دو بار شست‌وشو با متانول؛ عملیات خشک کردن به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C در یک آون خلاء صورت گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه‌زیستی نفتالین برای چهار باکتری جداسازی شده *Staphylococcus gallinarum*، *Paenarthrobacter nitroguajacolicus*، *Arthrobacter citreus* و *Bacillus thuringiensis* در شکل ۱ آورده شده است.

مخلوط بار دیگر به مدت ۱۰ min در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مورد آنالیز قرار گرفت. ۱۰ μL از فاز آلی آب‌گیری شده، به دستگاه GC مجهز به ستون (TRACSIL) و آشکارساز یونیزه کننده هلیم (HID) تزریق شد. دمای آون دستگاه برای مدت ۲ min در دمای ۱۵۰ °C تنظیم شد. سپس دما با شیب ۱۰ °C min<sup>-1</sup> به دمای ۲۴۵ °C افزایش یافت و نهایتاً ۲۰ min در این دما نگهداشته شد. دمای تزریق کننده و آشکارساز به ترتیب ۲۴۰ °C و ۲۸۰ °C بود. دبی هلیم به عنوان فاز متحرک در دبی ۱ mL min<sup>-1</sup> استفاده شد. استانداردسازی دستگاه GC با استفاده از محلول استاندارد نرمال هگزادکان و نفتالین به ترتیب در بازه غلظتی ۱۰۰۰-۲۰۰ mg L<sup>-1</sup> و ۲۰۰-۲۰ mg L<sup>-1</sup> انجام شد. پس از تعیین میزان هیدروکربن باقی‌مانده، بازده حذف (Y) و نیز سرعت ویژه حذف آنها (R) به صورت جداگانه و به ترتیب طبق روابط ۲ و ۳ محاسبه گردید [۱۳].

$$Y (\%) = 100 \times \frac{S_0 - S_f}{S_0} \quad (2)$$

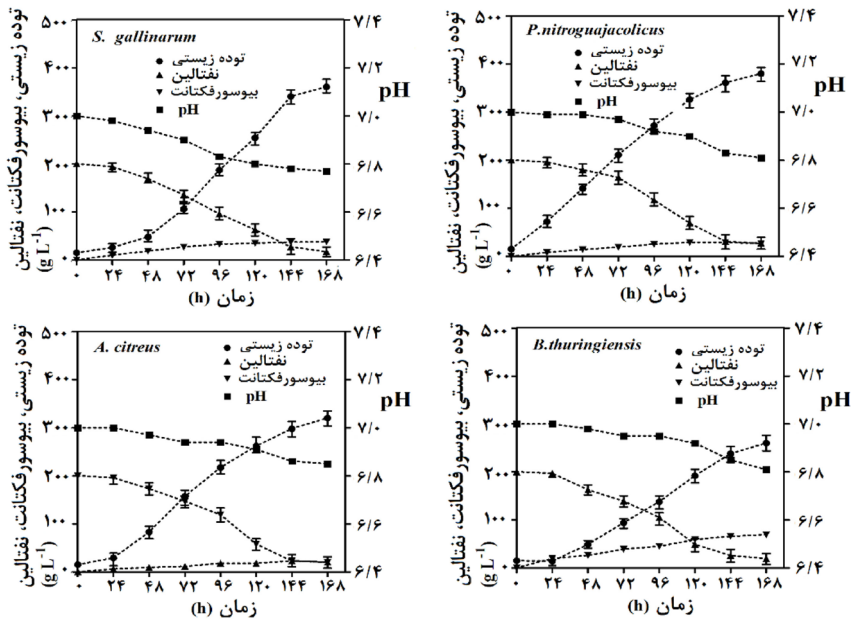
$$R (\text{mg g}^{-1} \text{ day}^{-1}) = \frac{1}{X_f} \frac{S_0 - S_f}{t} \quad (3)$$

در روابط (۲) و (۳)،  $S_0$  و  $S_f$  به ترتیب غلظت اولیه و غلظت پس از تیمار تجزیه‌زیستی است.

فعالیت آنزیم FAD مونواکسیژناز در اکسایش ترکیب خطی نرمال هگزادکان به روش اسپکتروفوتومتری با اندازه‌گیری NADH به عنوان سوپسترا همراه در دمای ۳۰ °C تعیین شد. برای این منظور، یک محلول بافر فسفات (۵۰ mM و pH=۷) شامل ۱۰ mM نرمال هگزادکان به عنوان سوپسترا، ۴ mM از NADH و ۴۴ μM از FAD تهیه شد. ۱ mL از این محلول بافر به ۵۰ μL از عصاره آنزیم استخراج شده افزوده شد و در دمای ۳۰ °C پس از مدت ۳۰ min، جذب آن در طول موج ۳۴۰ nm اندازه‌گیری شد [۱۴]. مقدار فعالیت آنزیم FAD مونواکسیژناز به صورت مقدار میکرومول NADH مصرف شده در هر دقیقه (IU) به ازای هر میلی‌گرم از پروتئین آنزیم گزارش شد.

1. Cis,Cis-muconic acid

2. 2-Hydroxyumuconic semialdehyde



شکل ۱ تغییرات زمانی غلظت توده زیستی، نفتالین، بیوسورفکتانت تولید شده و مقدار pH در طول تجزیه زیستی نفتالین

ترکیبات نفتی، انحلال و در نتیجه، دسترسی زیستی سلول‌ها به این مواد در محیط‌های آبی با محدودیت روبرو است و از این رو سلول‌های تجزیه کننده با تولید مواد امولسیون‌ساز سعی در افزایش انحلال و در دسترس قرار دادن نفتالین به عنوان منبع کربن داشتند. بیشترین میزان حذف نفتالین پس از هفت روز از تجزیه زیستی *S. gallinarum* به میزان ۹۱/۴۲٪ برای گونه مشاهده شد. میزان حذف برای سایر گونه‌ها، به ترتیب به میزان ۹۰/۳۱٪ برای *B. thuringiensis*، ۸۹/۹۱٪ برای *A. citreus* و ۸۶/۵۴٪ برای *P. nitroguajacolicus* مشاهده شد. این کاهش غلظت نفتالین از محیط را می‌توان به سازگاری و تحمل بالای این باکتری‌ها که از خاک آلوده به مواد نفتی جداسازی شده‌اند، نسبت داد. زیرا مطالعات انجام شده توسط محققان دیگر نیز نشان می‌دهد که باکتری‌های بومی موجود در محیط‌های آلوده، توانایی بالایی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی نسبت به باکتری‌های غیربومی دارند [۱۹ و ۲۰].

تفاوت رفتاری در نمودارهای رشد و حذف نفتالین در نمودارهای شکل ۱ برای سویه‌های مختلف حاکی

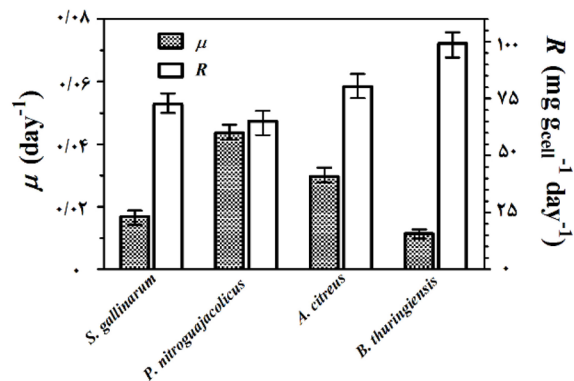
همان‌طور که از این نتایج مشخص است، این جدایه‌ها توانایی خوبی در حذف نفتالین به عنوان منبع کربن داشتند و توانسته‌اند بر روی این هیدروکربن حلقوی رشد نمایند. بیشترین میزان تولید توده زیستی به میزان  $380 \pm 13 \text{ mg L}^{-1}$  برای *P. nitroguajacolicus* و کمترین میزان به مقدار  $260 \pm 16 \text{ mg L}^{-1}$  برای *B. thuringiensis* مشاهده شد. رشد گونه *P. nitroguajacolicus* بدون مشاهده فاز تأخیر از همان آغاز تجزیه زیستی قابل رؤیت است، در حالی که برای سایر گونه‌ها یک فاز تأخیر قبل از رشد لگاریتمی مشاهده شد. در تمامی جدایه‌ها روند کاهش pH از مقدار اولیه ۷/۰ به حدود ۶/۸ در طی فرآیند تجزیه زیستی نفتالین مشاهده شد که احتمالاً به دلیل تولید متابولیت‌های اسیدی مانند اسیدبنزواتیک و فتالات در طول تجزیه زیستی نفتالین است [۱۸]. همچنین، افزایش تولید مواد بیوسورفکتانت همزمان با حذف نفتالین از محیط و رشد سلول‌ها در شکل ۱ قابل مشاهده است. بیشترین میزان تولید بیوسورفکتانت، مربوط به گونه *B. thuringiensis* به میزان  $69/3 \text{ mg L}^{-1}$  بود و سایر گونه‌ها میزان بیوسورفکتانت تولیدی کمتر از  $30 \text{ mg L}^{-1}$  داشتند. به دلیل ماهیت آب‌گریز

در حالی که در گونه *B. thuringiensis* توده زیستی کمتری تولید می‌گردد و در نتیجه سرعت تجزیه زیستی به ازای واحد جرم سلول، افزایش محسوسی را نشان می‌دهد.

نفتالین ساده‌ترین نوع از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای است که به عنوان یک مولکول مدل در بررسی توانایی حذف زیستی ترکیبات حلقوی بکار گرفته می‌شوند [۲۱]. علت استفاده از نفتالین نسبت به سایر هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک، حلالیت بهتر آن در محیط‌های آبی است که موجب می‌شود با محدودیت کمتر انتقال جرم نسبت به سایر ترکیبات چند حلقه‌ای، بتوان امکان وجود آنزیم‌های تجزیه کننده هیدروکربن آروماتیک در گونه‌های میکروبی را بررسی نمود [۲۱]. هر چه تعداد حلقه‌های آروماتیک افزایش یابد تجزیه زیستی آن ترکیب سخت‌تر بوده و زمان تجزیه زیستی طولانی‌تر می‌گردد. به عنوان مثال، سرعت رشد باکتری‌ها بر روی فنول به عنوان یک ترکیب تک حلقه‌ای به مراتب بالاتر است. سرعت رشد ویژه گونه‌ای از *Rhodococcus* در غلظت  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ، به میزان  $0.16 \text{ h}^{-1}$  گزارش شده است [۲۲]. این در حالی است که برای گونه رالستونیا ایورتروفا سرعت ویژه رشد بر روی نفتالین در غلظت  $40 \text{ mg L}^{-1}$  در حتی در حضور توئین ۸۰ به عنوان سورفکتانت در حدود  $0.05 \text{ h}^{-1}$  گزارش شده است [۲۳].

در تحقیق حاضر، به منظور تعیین مسیر بیوشیمیایی شکست ترکیبات آروماتیک، فعالیت آنزیم‌های کاتکول ۱ و ۲ دی‌اکسیژناز (مسیر بیوشیمیایی شکست اورتو) و کاتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز (مسیر بیوشیمیایی شکست متا) با استفاده از سوبسترا کاتکول (به عنوان ماده حدواسط تجزیه حلقه فنولی) مورد بررسی قرار گرفت [۲۴]. اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم‌ها در ۹۶ h پس از شروع تجزیه

از آن است که سرعت رشد و تجزیه زیستی نفتالین در این گونه‌ها یکسان نیست. برای تحلیل بهتر، پارامترهای سینتیکی همچون سرعت ویژه رشد سویه‌ها ( $\mu$ ) و سرعت ویژه حذف زیستی ( $R$ ) در فاز لگاریتمی محاسبه شد که نتایج آن در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲ مقایسه سرعت ویژه رشد ( $\mu$ ) و تجزیه زیستی نفتالین ( $R$ ) در جدایه‌ها.

براساس این نتایج، بیشترین میزان سرعت ویژه رشد با مقدار  $0.044 \pm 0.002 \text{ day}^{-1}$  مربوط به *P. nitroguajacolicus* و کمترین مقدار به میزان  $0.011 \pm 0.001 \text{ day}^{-1}$  برای *B. thuringiensis* بود. به این ترتیب، می‌توان گفت که سلول‌های *B. thuringiensis* و *S. gallinarum* در مقایسه با دو گونه دیگر سلول‌های کند رشدی هستند و سهم بیشتری از ATP آزاد شده از اکسایش نفتالین را در مسیرهای بیوشیمیایی تامین انرژی<sup>۱</sup> صرف می‌کنند تا برای ساخت اجزای ساختمان سلولی و رشد به کار بگیرند. در تأیید این مطلب، داده‌های سرعت ویژه حذف نفتالین روند متفاوتی را در بین گونه‌ها داشت و بیشترین مقدار به میزان  $99/25 \pm 5/1 \text{ mg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$  برای باکتری کند رشد *B. thuringiensis* مشاهده شد. در این بین، باکتری *P. nitroguajacolicus* با بیشترین سرعت رشد، کمترین سرعت تجزیه زیستی نفتالین را داشت. علت این امر احتمالاً تفاوت ساختاری و نیز سیستم آنزیمی آنهاست که در سلول‌های *P. nitroguajacolicus* انرژی حاصل اکسایش بیشتر به سمت افزایش توده زیستی سوق داده می‌شود،

1. Dissimilation

2. Assimilation



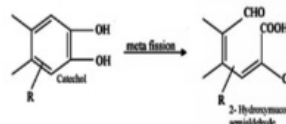
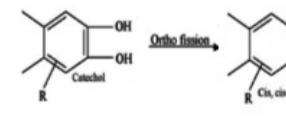
نفتالین دیده شد وجود داشت که احتمالاً به دلیل واکنش‌های بیوشیمیایی، ترکیب خطی نرمال هگزادکان است که ابتدا به اسیدهای چرب تبدیل شده و در ادامه طی فرآیندی موسوم به  $\beta$ -oxidation pathway و در فعالیت آنزیم‌های مونواکسیژناز به Acyl CoA تبدیل می‌شود [۸]. در این میان، امکان تولید ترکیبات آمفی‌پاتیکی مختلف که می‌توانند نقش امولسیون‌ساز را برای افزایش دسترسی زیستی نرمال هگزادکان داشته باشند، فراهم است. اندازه‌گیری میزان تولید مواد فعال‌ساز سطحی در تحقیق حاضر نشان داد که بیشترین میزان تولید مواد بیوسورفکتانت مربوط به گونه *B. thuringiensis* به میزان  $234 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$  بود. براساس مطالعات پیشین، گونه‌های باسیلوس دارای توانایی بالایی در تولید بیوسورفکتانت از نوع سورفکتین هستند و می‌توانند ترکیبات هیدروکربنی خطی با وزن مولکولی متوسط را به ترکیبات آمفی‌پاتیکی تبدیل نمایند [۸].

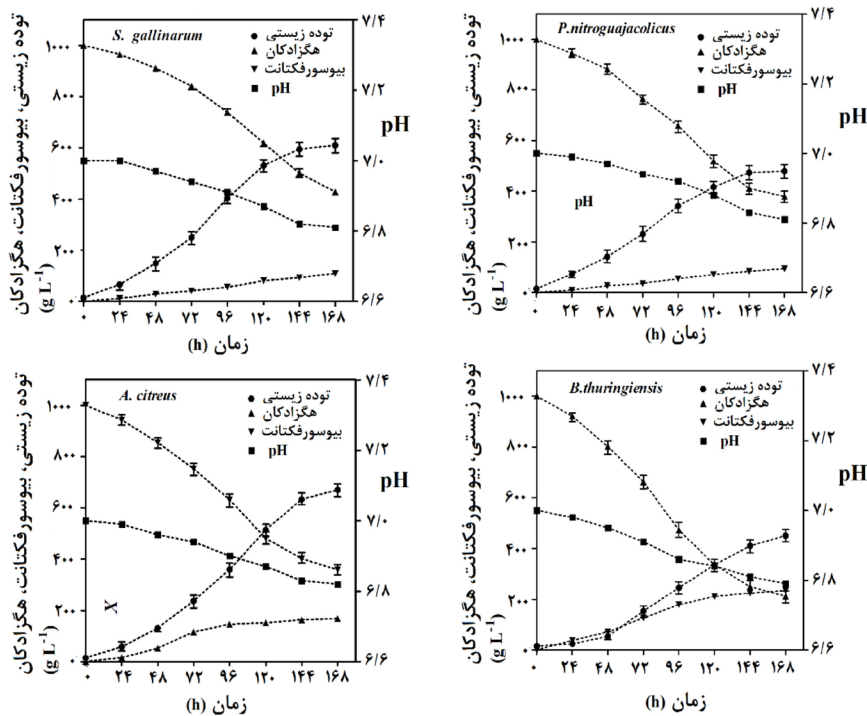
مقایسه سرعت رشد ویژه و تجزیه زیستی نرمال هگزادکان در بین سویه‌ها در شکل ۴ آورده شده است. با مقایسه این نتایج متوجه می‌شویم که سلول‌های *S. gallinarum* به هنگام تجزیه زیستی نرمال هگزادکان از سرعت ویژه بالایی ( $0.060 \pm 0.002 \text{ day}^{-1}$ ) برخوردار بوده‌اند، اما کماکان *B. thuringiensis* سرعت رشد آهسته‌ای ( $0.019 \pm 0.003 \text{ day}^{-1}$ ) را داشته است.

زیستی نفتالین (که در تمام سویه‌ها در وسط زمان رشد لگاریتمی قرار داشت) با استفاده از نمونه‌گیری از کشت و جداسازی سلول‌ها توسط سانتریفیوژ انجام گرفت و نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. ملاحظه می‌شود که گونه *S. gallinarum* از مسیر بیوشیمیایی ortho، کاتکول را به سیس-سیس-موکونیک اسید اکسایش می‌دهد در حالی که سه گونه دیگر از مسیر بیوشیمیایی Meta، اکسایش کاتکول به ۲-هیدروکسی موکونیک سمی آلدئید را به انجام می‌رسانند.

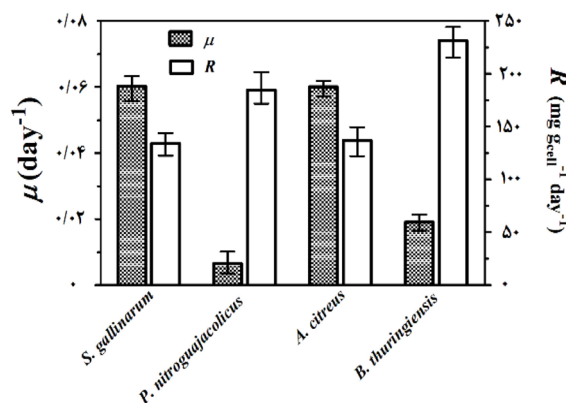
روند زمانی تغییرات میزان توده زیستی، غلظت نرمال هگزادکان، تولید بیوسورفکتانت و pH برای چهار گونه در شکل ۳ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که هر چهار سویه توانایی حذف ترکیب هیدروکربن خطی نرمال هگزادکان را از محیط داشته‌اند و توانسته‌اند از آن به عنوان منبع کربن استفاده کنند و رشد نمایند. بیشترین میزان توده زیستی به مقدار  $670 \pm 23 \text{ mg L}^{-1}$  برای *A. citreus* و کمترین مقدار  $450 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$  برای *B. thuringiensis* مشاهده شد. تفاوت در میزان حذف نرمال هگزادکان بین جدایه‌ها در مقایسه با تجزیه نفتالین محسوس‌تر بود، به طوری که باکتری *B. thuringiensis* بهترین میزان حذف در حدود ۷۸/۸۹٪ داشت و ضعیف‌ترین عملکرد مربوط به باکتری *S. gallinarum* با مقدار حذف ۵۷/۲۵٪ بود. در طی تجزیه زیستی هگزادکان نیز روند کاهش pH مشابه آنچه در تجزیه زیستی

جدول ۲ فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده در شکست ترکیب فنولی کاتکول به عنوان سوبسترا

فعالیت آنزیم‌های کاتکول ۱ و ۲ دی‌اکسیژناز ( $\text{IU mg}_{\text{protein}}^{-1}$ )	فعالیت آنزیم‌های کاتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز ( $\text{IU mg}_{\text{protein}}^{-1}$ )	نام باکتری
		
رؤیت نشد	$0.672 \pm 0.04$	<i>S. gallinarum</i>
$0.581 \pm 0.03$	رؤیت نشد	<i>P. nitroguajacolicus</i>
$0.715 \pm 0.05$	رؤیت نشد	<i>A. citreus</i>
$0.835 \pm 0.08$	رؤیت نشد	<i>B. thuringiensis</i>



شکل ۳ تغییرات زمانی غلظت توده زیستی، نرمال هگزادکان، بیوسورفکتانت تولید شده و مقدار pH در طول تجزیه زیستی نرمال هگزادکان



شکل ۴ مقایسه سرعت ویژه رشد ( $\mu$ ) و تجزیه زیستی نرمال هگزادکان (R) در جدایه‌ها

می‌دهد. با توجه به این نتایج، سرعت تجزیه نرمال هگزادکان از  $134/2 \pm 9/9 \text{ mg g cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$  در سلول *S. gallinarum* تا  $231/4 \pm 14/3 \text{ mg g cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$  در سلول *B. thuringiensis* تغییر می‌کند. بنابراین، می‌توان چنین جمع‌بندی نمود که گونه *B. thuringiensis* به عنوان یک گونه باکتری کند رشد، بیشترین تأثیر را در حذف نرمال هگزادکان داشته است. پس از *B. thuringiensis*، گونه *P. nitroguajacolicus* با سرعت ویژه حذف  $184/8 \pm 14/6 \text{ mg g cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$  بهترین عملکرد را در حذف هگزادکان داشت.

با افزایش طول زنجیر در هیدروکربن‌های خطی و افزایش خاصیت آبگریزی، دسترسی سلول‌های باکتریایی به این مواد به عنوان منبع کربن کاهش می‌یابد. پیش از این، در تجزیه نرمال دکان ( $n-C_{10}$ ) توسط *Pseudomonas chloritidis* AW-1 سرعت رشد به میزان  $0/4 \pm 0/02 \text{ day}^{-1}$  گزارش شده بود [۲۵].

شکل ۴ همچنین سرعت ویژه تجزیه زیستی نرمال هگزادکان را برای جدایه‌ها به عنوان یک پارامتر مؤثر در موفقیت آمیز بودن فرآیند تجزیه زیستی نشان



آروماتیک در مقایسه با ترکیبات خطی به دلیل پیچیدگی مسیر بیوشیمیایی شکست این ترکیبات، با سرعت کمتری صورت می‌گیرد [۹]. در تحقیق حاضر، براساس مطالعات گذشته غلظت نفتالین در مقدار  $200 \text{ mg L}^{-1}$  و هگزادکان در غلظت  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  مورد بررسی قرار گرفتند تا بازدارندگی این ترکیبات بر تجزیه زیستی اثرگذار نباشد. یقیناً استفاده از غلظت‌های بالاتر این ترکیبات، موجب اثر بازدارندگی بر فعالیت سیستم‌های آنزیمی درگیر در فرآیند تجزیه‌زیستی آنها خواهد شد [۲۶]. این نتایج نشان می‌دهد که اگر چه این چهار باکتری جداسازی شده توانایی حذف ترکیبات حلقوی و خطی را داشته‌اند اما میزان توانایی آنها در حذف ترکیبات از دسته‌های مختلف، متفاوت است. به عبارت دیگر، اگر چه این باکتری‌ها دارای سیستم آنزیمی لازم برای حذف ترکیبات خطی و آروماتیک بودند، اما میزان ابراز آنها در شرایط مشابه یکسان نیست. نتایج بررسی تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌ها نشان داد که گونه *B. thuringiensis* دارای توانایی تولید بیوسورفکتانت می‌باشد و در نتیجه تولید بیوسورفکتانت توسط این گونه، امکان دسترسی زیستی به ترکیب خطی هگزادکان افزایش یافته است. در جدول ۳، مقایسه از عملکرد جدایه *B. thuringiensis* با کارهای پیشین آورده شده است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مونواکسیژناز در ۹۶ h از شروع تجزیه زیستی هگزادکان، روند سرعت ویژه در سویه‌های مورد بررسی را تأیید کرد به طوری که میزان فعالیت ابراز شده برای این آنزیم، به ترتیب  $2/4 \pm 0/3 \text{ IU mg}_{\text{protein}}^{-1}$  برای *B. thuringiensis*،  $1/8 \pm 0/2 \text{ IU mg}_{\text{protein}}^{-1}$  برای گونه *P. nitroguia*، و نهایتاً  $1/4 \pm 0/4 \text{ IU mg}_{\text{protein}}^{-1}$  برای گونه *A. citreus* بود. این نتایج نشان داد که هر چهار سویه دارای آنزیم مونواکسیژناز برای اکسایش ترکیبات هیدروکربنی آلیفاتیک بودند. مقایسه نتایج شکل‌های ۲ و ۴ نشان می‌دهد که سرعت رشد بر روی ترکیب نفتالین به مراتب کمتر از مقادیر به دست آمده برای حذف زیستی هگزادکان است. علت این امر شکست سخت ساختار نفتالین به عنوان یک ماده آروماتیک چندحلقه‌ای در مقایسه با ترکیب خطی هگزادکان است. هر چه مسیر بیوشیمیایی شکست یک ترکیب پیچیده‌تر باشد، سهم کمتری از انرژی آزاد شده واکنش اکسایش سوپسترا، می‌تواند برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم مورد استفاده قرار بگیرد و به عبارت دیگر، سهم انرژی مصرفی برای تولید آنزیم‌ها و مواد حدواسط متابولیسمی افزایش می‌یابد. نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد که سرعت تجزیه زیستی ترکیبات

جدول ۳ مقایسه عملکرد جدایه *B. thuringiensis* با تحقیقات پیشین در تجزیه زیستی ترکیبات نفتالین و هگزادکان

منبع	$\mu (\text{day}^{-1})$	$Y (\%)$	شرایط آزمایش	ترکیب هیدروکربنی	میکروارگانیسم
[۲۳]	۱/۲۷۲	۱۰۰	افزودن توئین ۸۰ $50 \text{ mg L}^{-1}$ ، pH=۷ برای مدت ۵۲ h	نفتالین $50 \text{ mg L}^{-1}$	<i>Ralstonia eutropha</i>
[۲۷]	۰/۰۹۵	۹۶/۱	دمای $32^\circ\text{C}$ و pH=۷، سرعت همزدن ۱۵۰ rpm برای مدت ۷ day	نفتالین $10 \text{ mg L}^{-1}$	<i>Bacillus cereus</i>
[۲۸]	۶/۸۴	۱۰۰	افزودن گلوکز $500 \text{ mg L}^{-1}$ ، دمای $30^\circ\text{C}$ ، pH=۷ و سرعت همزدن ۲۰۰ rpm برای ۴۸ h	نفتالین $20 \text{ mg L}^{-1}$	<i>Micrococcus sp</i>
[۲۹]	۰/۲۸۸	۶۹	دمای $30^\circ\text{C}$ در ۷۲ h	هگزادکان $1000 \text{ mg L}^{-1}$	<i>Rhodococcus opacus</i>
[۳۰]	۰/۱۴۵	۷۳/۲۷	دمای $37^\circ\text{C}$ ، pH=۷ و سرعت همزدن ۱۶۰ rpm برای ۱۶ day	هگزادکان $3000 \text{ mg L}^{-1}$	<i>Enterobacter sp</i>
کار حاضر	۰/۰۱۱	۹۰/۳۱	دمای $30^\circ\text{C}$ ، pH=۷ و سرعت همزدن ۱۸۰ rpm برای ۷ day	نفتالین $200 \text{ mg L}^{-1}$	<i>Bacillus thuringiensis</i>
کار حاضر	۰/۰۱۹	۷۸/۸۹	دمای $30^\circ\text{C}$ ، pH=۷ و سرعت همزدن ۱۸۰ rpm برای ۷ day	هگزادکان $1000 \text{ mg L}^{-1}$	<i>Bacillus thuringiensis</i>

کربن، سرعت ویژه رشد بالایی در این تحقیقات گزارش شده است [۲۳ و ۲۸]. مشاهده می‌شود که جدایه *B. thuringiensis* ضمن توانایی بالا در حذف ترکیب نفتالین، توانسته است در حذف هگزادکان نیز به عنوان یک ترکیب خطی همانند گونه‌های *Rhodococcus opacus* [۲۹] و *Enterobacter* [۳۰] مؤثر واقع شود.

### نتیجه‌گیری

اگر چه هر چهار سویه جداسازی شده از توانایی بالایی در تجزیه‌زیستی نفتالین و هگزادکان برخوردار بودند، اما بهترین عملکرد مربوط به باکتری *B. thuringiensis* بود که به عنوان یک میکروارگانیسم تولیدکننده سورفکتانت توانست ترکیبات هیدروکربنی حلقوی و خطی را حذف نماید. ویژگی این سویه، بخصوص سرعت حذف بالا با وجود سرعت رشد پایین، مزایای فنی را برای فرآیند تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها در محیط‌های طبیعی آلوده فراهم می‌آورد چرا که با وجود کارآمدی، به دلیل زیست توده کم تولید شده در محیط، تأثیر کمتری بر اکوسیستم طبیعی اعمال خواهد نمود. سویه‌های باسیلوس هم‌چنین تولیدکننده اندوسپور هستند و قادرند محیط‌های نامساعد همچون محیط‌های گرم با تنش رطوبت بالا و غلظت بالای نمک را تحمل کنند.

در تحقیقات پیشین یک گونه هندی (*Bacillus cereus* MH681588.1) موفق شده بود نفتالین با غلظت اولیه  $10 \text{ mg L}^{-1}$  را پس از ۷ روز به میزان  $1/96\%$  در شرایط محیطی مشابه کار حاضر حذف نماید [۲۷]. لازم به ذکر است سرعت ویژه رشد این گونه  $0/095 \text{ day}^{-1}$  گزارش شده بود که به مراتب بسیار بیشتر از گونه کند رشد *B. thuringiensis* در تحقیق حاضر بود [۲۷]. حذف غلظت‌های بالاتر نفتالین به عنوان مثال،  $20 \text{ L}^{-1}$  و  $50 \text{ mg L}^{-1}$  به ترتیب با استفاده از گونه‌های *Rhodococcus* [۲۸] و *Ralstonia eutropha* [۲۳] گزارش گردیده است. البته موفقیت این میکروارگانیسم‌ها در غلظت‌های بالای نفتالین در حضور منبع کربن اضافی (گلوکز) و استفاده از امولسیفایر تویین ۸۰ به ثبت رسیده است در حالی که در تحقیق حاضر، هیدروکربن‌های نفتالین و هگزادکان (به‌طور جداگانه) به عنوان تنها منبع کربن و بدون افزودن امولسیفایر به محیط انجام شد. استفاده از منبع کربن اضافی می‌تواند انرژی بیشتری را برای رشد سلول‌ها فراهم آورد زیرا همان‌طور که پیش از این اشاره شد، پیچیده بودن شکست نفتالین، انرژی ATP زیادی تولید نمی‌کند تا تکثیر بالای سلول تجزیه‌کننده را فراهم آورد. از این‌رو، ملاحظه می‌شود که با وجود توانایی سلول‌های تجزیه‌کننده نفتالین به مصرف گلوکز و تویین به عنوان منبع تأمین‌کننده اصلی

### مراجع

- [1]. Farhadian M, Vachelard C, Duchez D, Larroche C (2008) In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review, *Bioresource Technology*, 99, 13: 5296-5308.
- [2]. Costa A S, Romão L, Araújo B, Lucas S, Macie S, Wisniewski J A, Alexandre M d R (2012) Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass, *Bioresource Technology*, 105: 31-39.
- [3]. Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 61, 3: 233-240.
- [4]. Das N, Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, *Biotechnology Research International*, Article ID 941810.
- [5]. Gojic-Cvijovic G D, Milic J S, Solecic T M, Beskoski V P, Ilic M V, Djokic L S, Vrvic M. M (2012) Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study, *Biodegradation*, 23, 1: 1-14.
- [6]. Ron E Z, Rosenberg E (2014) Enhanced bioremediation of oil spills in the sea, *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 191-194.
- [7]. Varjani S J (2017) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresource Technology*, 223: 277-286.

- [8]. Habibi A, Babaie F (2018) Fast biodegradation of diesel hydrocarbons at high concentration by the sophorolipid-producing yeast *Candida catenulata* KP324968, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28, 5: 240-254.
- [9]. Mrassi A G, Bensalah F, Gury J, Duran R (2015) Isolation bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 20: 15332-15346.
- [10]. Abarian M, Hassanshahian M, Badoei-Dalfard A (2018) Isolation, screening, and characterization of naphthalene-degrading bacteria from Zarand Mine, Iran, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 38, 5: 410-419.
- [11]. Habibi A, Vahabzadeh F (2013) Degradation of formaldehyde at high concentrations by phenol-adapted *Ralstonia eutropha* closely related to pink-pigmented facultative methylotrophs, *Journal of Environmental Science and Health, Part A.*, 48, 3: 279-292.
- [12]. Hassanshahian M, Boroujeni N A (2016) Enrichment and identification of naphthalene-degrading bacteria from the Persian Gulf, *Marine Pollution Bulletin*, 107, 1: 59-65.
- [13]. Rahman K S M, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat I M (2002) Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium, *Bioresource Technology*, 85, 3: 257-261.
- [14]. Elumalai P, Parthipan P, Karthikeyan O P, Rajasekar A (2017) Enzyme-mediated biodegradation of long-chain n-alkanes (C32 and C40) by thermophilic bacteria, *3 Biotechnology*, 7, Article 116.
- [15]. Marchlewicz A, Guzik U, Smulek W, Wojcieszynska D (2017) Exploring the degradation of Ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b): The new pathway and factors affecting degradation, *Molecules*, 22: 1676.
- [16]. Wojcieszynska D, Guzik U, Gren I, Perkosz M, Hupert-Kocurek K (2011) Induction of aromatic ring-cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 805-811.
- [17]. Ibrahim M L, Ijah U J J, Manga S B, Bilbis L S, Umar S (2013) Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 81: 28-34.
- [18]. Lin C, Gan L, Chen Z L (2010) Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN), *Journal of Hazardous Materials*, 182, 1-3: 771-777.
- [19]. Nair D, Fernández-Acero F J, García-Luque E, Riba I, Del Valls T A (2008) Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria from sediments of Cadiz area (SW Spain), *Environmental Toxicology*, 23, 5: 576-582.
- [20]. Daane L L, Harjono L L, Zylstra I, G J, Häggblom M M (2001) Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 6: 2683-2691.
- [21]. Rabani M S, Sharma R, Singh R, Gupta M K (2020) Characterization and identification of naphthalene degrading bacteria isolated from petroleum contaminated Sites and their possible use in bioremediation, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1-12.
- [22]. Wen Y, Li C, Song X, Yang Y (2020) Biodegradation of phenol by *Rhodococcus* sp. strain SKC: Characterization and kinetics study, *Molecules*, 25: 3665.
- [23]. Jalilnejad E, Vahabzadeh F (2013) Models for the biodegradation kinetics of naphthalene by *Ralstonia eutropha*, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 33, 5: 451-466.
- [24]. Ghosal D, Ghosh S, Dutta T K, Ahn Y (2016) Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Frontiers in Microbiology*, 7: 1369.
- [25]. Olivera N L, Esteves J, Commendatore M G (1997) Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediments in Patagonia, Argentina, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 40, 1: 75-79.
- [26]. Partovinia A, Naeimpoor F, Hejazi P (2010) Carbon content reduction in a model reluctant clayey soil: Slurry phase n-hexadecane bioremediation, *Journal of Hazardous Materials*, 181, 1-3: 133-139.
- [27]. Sonwani R K, Giri B S, Singh R S, Rai B N (2019) Studies on optimization of naphthalene biodegradation using surface response methodology: kinetic study and performance evaluation of a pilot scale integrated aerobic treatment plant, *Process Safety and Environmental Protection*, 132: 240-248.
- [28]. Jegan J, Vijayaraghavan K, Senthilkumar R, Velan M (2010) Naphthalene degradation kinetics of *Micrococcus* sp., isolated from activated sludge, *CLEAN-Soil, Air, Water*, 38, 9: 837-842.
- [29]. Zampolli J, Collina E, Lasagni M Di Gennaro P (2014) Biodegradation of variable-chain-length n-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism, *AMB Express*, 4, 1: 1-9.
- [30]. Zhang C, Xu L H, Zhou H, Tan Z, Xie Q, Xu Y (2018) Biodegradation of n-hexadecane by enteric bacterial isolated from an oil-field wastewater treatment plant, *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 7: 4942-4951.



# Biodegradation of Naphthalene and Hexadecane by Indigenous Isolated *Bacillus Thuringiensis*

Firoozeh Gholami<sup>1</sup>, Alireza Habibi<sup>2,\*</sup>, Samira Pakdel<sup>1</sup>, Ali Beheshti Ale Agha<sup>1</sup> and Rouhallah Sharifi<sup>3</sup>

1 Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran

2 Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.

3 Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran

a.habibi@razi.ac.ir

DOI:10.22078/PR.2022.4569.3064

Received: August/21/2021

Accepted: February/05/2022

## Introduction

The hydrocarbons in petroleum include two main groups: linear compounds (aliphatic hydrocarbons) and cyclic compounds (aromatic hydrocarbons). Linear saturated hydrocarbons are the major components of petroleum that including volatile compounds, low molecular weight compounds ( $C_8$ - $C_{16}$ ), medium ( $C_{17}$ - $C_{28}$ ), and high ( $>C_{28}$ ) [1,2]. Another group is cyclic hydrocarbons with fused benzene rings in linear, angular, or cluster arrangements. They are hydrophobic compounds with low vapor pressure, low water solubility, and high boiling and melting points. Due to high hydrophobicity, they can persist in the soil, and they are recalcitrant to degradation than other hydrocarbons [3]. Generally, petroleum hydrocarbons are the most persistent environmental pollutant that has long-term destructive effects on plants, animals, and humans [4,5].

Nowadays, economic and environmental considerations have led to the bioremediation by plants and soil microorganisms. In the biodegradation process, microorganisms use petroleum hydrocarbons as a source of carbon and energy and change their structure to the less dangerous or safe component. In the oil-contaminated area, microorganisms have been adapted to conditions, and they are capable of degradation and use of petroleum hydrocarbons [6,7]. Nowadays, many bacteria, which can utilize kinds of linear and cyclic hydrocarbons, have been isolated and identified [4,8]. Because degradation of aromatic

and aliphatic hydrocarbons needs different metabolic pathways, it is important to find microorganisms that have the potential to degrade both types of hydrocarbons [9]. In the present study, bioremediation of naphthalene and hexadecane as modal molecules in order to find biodegradation potential of cyclic and linear compounds in petroleum was evaluated by four indigenous isolated bacteria from oil-contaminated soil in the Naft-Shahr area of Kermanshah province.

## Materials and Methods

In this study, four bacterial strains including *Arthrobacter citreus* (MT786388), *Staphylococcus gallinarum* (MT786386), *Bacillus thuringiensis* (MT786387), *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* (MT786389), which previously isolated and identified, were used [10]. In order to the enrichment of bacteria, Bushnell-Haas Broth (BHB) was used (Table 1). In order to assay the capacity of bacteria in biodegradation of cyclic and linear petroleum hydrocarbons, naphthalene and hexadecane with a concentration of  $200 \text{ mg L}^{-1}$  and  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  were respectively used. For preparation inoculation, each of the isolates was cultured on nutrient broth and incubated at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  for 48 hours. One ml of suspension with a population of  $1 \times 10^9$  CFU was added to 250 mL autoclaved Erlenmeyer flasks containing 100 mL of BHB medium. The experiments were performed in triplicate for each bacteria and a control test (without inoculums of bacteria) was also prepared. The flasks were incubated at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  with a

shaking speed of 180 rpm for a week [11]. After each experiment, the suspended cell was centrifuged at  $6000\times g$  for 10 min. The supernatants were collected for quantitative analysis, and cell sediment was dried. Afterwards, biomass concentration was determined by dividing biomass dry weight by initial centrifuged culture volume. Specific growth rate ( $\mu$ ) was valued. Residual hexadecane and naphthalene were calculated by gas chromatography analysis [12] and afterward, the percent of removal ( $Y$ ) and specific degradation rate ( $R$ ) were determined [13].

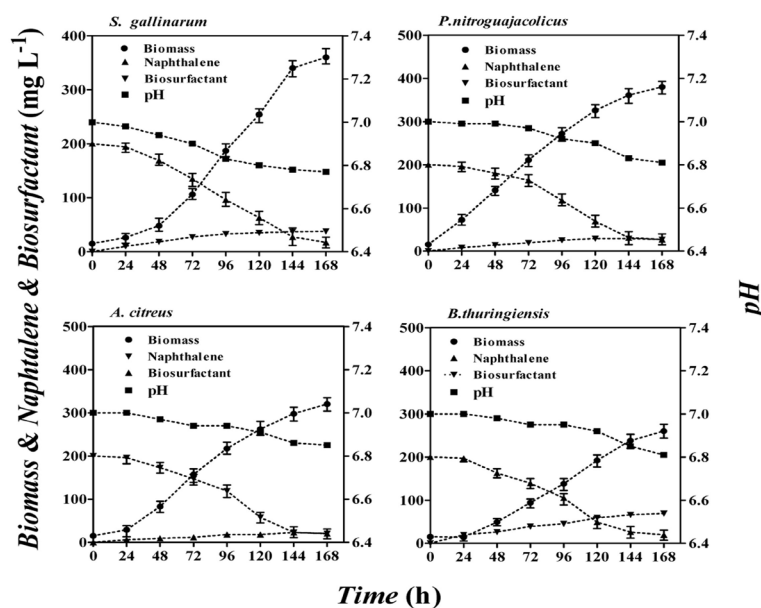
**Table 1** Composition of Bushnell-Haas Broth (BHB).

Component	Content (g L <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub>	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.0
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.05

## Results and Discussion

Figure 1 shows the results obtained during biodegradation of naphthalene by four isolated bacteria (*Arthrobacter citreus*, *Staphylococcus gallinarum*, *Bacillus thuringiensis*, and *Paenarthrobacter nitroguajacolicus*). This data shows that all strains are capable of using naphthalene as a carbon source and they grow on the aromatic hydrocarbon. It is mainly due to the high compatibility and tolerance of these bacteria isolated from an oil-contaminated soil [14,15]. The highest biomass concentration about  $380\pm 18$  mg L<sup>-1</sup> was observed by *P. nitroguajacolicus*. The growth of this strain did not show a noticeable lag phase in Figure 1, while the other bacteria showed a lag at the

beginning on their growth. As seen in Figure 1, *A. citreus* and *P. nitroguajacolicus* strains had respectively maximum growth rate about  $0.044$  day<sup>-1</sup> and  $0.029$  day<sup>-1</sup> during logarithmic growth on naphthalene. The *S. gallinarum* and *B. thuringiensis* were slow-growing cells on the substrate. Figure 1 also shows *S. gallinarum* strain can degrade naphthalene at a greater than other strains and removed 91.42% of naphthalene during 7 days. The specific biodegradation rate of naphthalene varies from  $65$  mg gcell<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for *P. nitroguajacolicus* to  $99.25$  mg gcell<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for *B. thuringiensis* during logarithmic growth. Enzymatic activities, and consequently material transport processes, affect the pH of culture [16, 17]. The pH changes as a result of biodegradation of naphthalene had been shown in Figure 1. Results show that pH value had declined from an initial pH=7 to 6.8 in all cultures. Increased acidity is most likely associated with the production of acidic metabolites, such as benzoic acid and phthalate during the biodegradation of naphthalene [18, 19]. Similar to the present study, an Indian strain of *Bacillus cereus* (MH681588.1) had been succeeded to degrade 96.1% of naphthalene with an initial concentration of  $10$  mg L<sup>-1</sup> after 7 days [20]. It is noticeable that the specific growth rate of this strain had been reported  $0.095$  day<sup>-1</sup> which was much more than a slow-growing strain of *B. thuringiensis* in this study [20]. The removal of higher concentrations of naphthalene, for instance,  $20$  mg L<sup>-1</sup> and  $50$  mg L<sup>-1</sup> has been reported by *Rhodococcus sp.* [21] and *Ralstonia eutropha* [22]. However, using of supplementary carbon source (glucose) and surfactant tween 80 has caused the success of these microorganisms at high concentrations of naphthalene [21, 22]. To conclude, *B. thuringiensis* strain as a slow-growing bacteria had the most effect on naphthalene degradation.



**Fig. 1** Temporal changes of biomass, naphthalene, and biosurfactant and pH during biodegradation of naphthalene.



Temporal variations of biomass, hexadecane, and biosurfactant and pH during biodegradation of hexadecane are presented at Figure 2. The highest and lowest biomass concentrations were  $670 \pm 23 \text{ mg L}^{-1}$  and  $450 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$  for *A. citreus* and *B. thuringiensis*, respectively. The results at Figure 2, notices *S. gallinarum* strain had a high growth rate ( $0.060 \text{ day}^{-1}$ ) but *B. thuringiensis* had a slow growth rate. The removal yield was varied from 57.25% by *S. gallinarum* to 78.89% by *B. thuringiensis*. The measurement of surface active agent showed the highest biosurfactant was produced by *B. thuringiensis* at  $234 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$ . The production of amphiphathic substances could facilitate the accessibility to hexadecane as a hydrophobic substrate [8]. The highest rate of hexadecane degradation was observed by *B. thuringiensis* about  $231.43 \text{ mg gcell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ . After *B. thuringiensis*, *P. nitroguajacolicus* strain with a specific

biodegradation rate about  $184.82 \text{ mg gcell}^{-1} \text{ day}^{-1}$  had the best efficiency in biodegradation of hexadecane. As seen, *B. thuringiensis* isolate was capable of removing naphthalene and also could be useful for degradation of hexadecane as a linear compound like *Rhodococcus opacus* [23] and *Enterobacter* strains [24]. A comparison of results at Figures 1 and 2 indicating the growth rate on naphthalene is less than hexadecane. This is due to a severe breaking pathway of naphthalene as a polycyclic aromatic substance versus to hexadecane. The results of previous studies showed that the biodegradation rate of aromatic compounds is slower than linear hydrocarbons because of their complexity of biochemical pathways [9]. In the present study, based on previous studies, the concentrations of  $200 \text{ mg L}^{-1}$  and  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  of naphthalene and hexadecane were respectively investigated, so that their inhibitory does not affect the biodegradation.

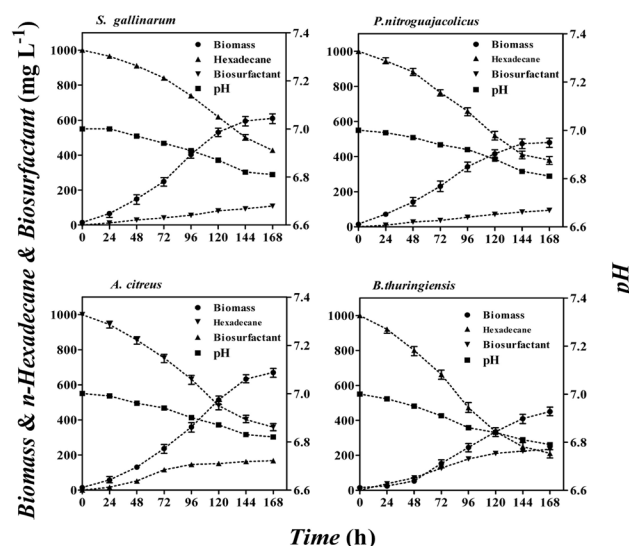


Fig. 2 Temporal changes of biomass, hexadecane, and biosurfactant and pH during biodegradation of hexadecane.

## Conclusions

All isolated strains were able to biodegradation naphthalene and hexadecane, but the best performance was related to *B. thuringiensis*, a surfactine-producing microorganism, that could degrade cyclic and linear hydrocarbons. The characters of the isolate, especially high biodegradation rate at low growth gains technical advantages for biodegradation process of hydrocarbons from contaminated environments. Because, it is efficient and produces less biomass in the environment thus implies lower ecological impacts. Bacillus strains are also endospore-former and could tolerate adverse environments such as tropical regions with high humidity stress and high salt concentration.

## References

1. Farhadian M, Vachelard C, Duchez D, Larroche C (2008) In situ bioremediation of monoaromatic

pollutants in groundwater: a review, *Bioresource Technology*, 99, 13: 5296-5308.

- Coŝta A S Romão L, Araújo B, Lucas S, Macie S, Wisniewski J A, Alexandre MdR (2012) Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass, *Bioresource Technology*, 105: 31-39.
- Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 61, 3: 233-240.
- Das N, Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, *Biotechnology Research International*, Article ID 941810.
- Gojic-Cvijovic G D, Milic J S, Solevic T M,



- Beskoski V P, Ilic M V, Djokic L S, Vrvic M M (2012) Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study, *Biodegradation*, 23, 1: 1-14.
6. Ron E Z, Rosenberg E (2014) Enhanced bioremediation of oil spills in the sea, *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 191-194.
  7. Varjani S J (2017) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresource Technology*, 223: 277-286.
  8. Habibi A, Bahaie F (2018) Fast biodegradation of diesel hydrocarbons at high concentration by the sophorolipid-producing yeast *Candida catenulata* KP324968, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28, 5: 240-254.
  9. Mrassi A G, Bensalah F, Gury J, Duran R (2015) Isolation bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 20: 15332-15346.
  10. Abarian M, Hassanshahian M, Badoei-Dalfard A (2018) Isolation, screening, and characterization of naphthalene-degrading bacteria from Zarand Mine, Iran, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 38, 5: 410-419.
  11. Habibi A, Vahabzadeh F (2013) Degradation of formaldehyde at high concentrations by phenol-adapted *Ralstonia eutropha* closely related to pink-pigmented facultative methylotrophs, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48, 3: 279-292.
  12. Hassanshahian M, Boroujeni N A (2016) Enrichment and identification of naphthalene-degrading bacteria from the Persian Gulf, *Marine Pollution Bulletin*, 107, 1: 59-65.
  13. Rahman K S M, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat I M (2002) Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 85, 3: 257-26.
  14. Elumalai P, Parthipan P, Karthikeyan O P, Rajasekar A (2017) Enzyme-mediated biodegradation of long-chain n-alkanes (C<sub>32</sub> and C<sub>40</sub>) by thermophilic bacteria", *3 Biotechnology*, 7: Article 116.
  15. Marchlewicz A, Guzik U, Smulek W, Wojcieszynska D (2017) Exploring the degradation of Ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1: The new pathway and factors affecting degradation, *Molecules*, 22: 1676.
  16. Wojcieszynska D, Guzik U, Gren I, Perkosz M, Hupert-Kocurek K (2011) Induction of aromatic ring-cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 805-811.
  17. Ibrahim M L, Ijah U J J, Manga S B, Bilbis L S, Umar S (2013) Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 81: 28-34.
  18. Lin C, Gan L, Chen Z L (2010) Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN), *Journal of Hazardous Materials*, 182, 1-3: 771-777.
  19. Nair D, Fernández-Acero F J, García-Luque E, Riba I, Del Valls T A (2008) Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria from sediments of Cadiz area (SW Spain), *Environmental Toxicology*, 23, 5: 576-582.
  20. Daane L L, Harjono I, Zylstra G J, Häggblom M M (2001) Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 6: 2683-2691.
  21. Rabani M S, Sharma R, Singh R, Gupta M K (2020) Characterization and Identification of naphthalene degrading bacteria isolated from petroleum contaminated Sites and their possible use in bioremediation, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 42, 3: 978-989.
  22. Wen Y, Li C, Song X, Yang Y (2020) Biodegradation of phenol by *Rhodococcus* sp. strain SKC: Characterization and kinetics study, *Molecules*, 25: 3665.
  23. Jalilnejad E, Vahabzadeh F (2013) Models for the biodegradation kinetics of naphthalene by *Ralstonia eutropha*, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 33, 5: 451-466.
  24. Ghosal D, Ghosh S, Dutta T K, Ahn Y (2016) Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Frontiers in Microbiology*, 7: 1369.