

Comparative Assessment of Crude Oil Biodegradation by *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 in the Presence and Absence of Biofunctional Magnetic Nanoparticles

Rashedi H.* *PhD*, Farmani F.¹ *MSc*, Yazdian F.² *PhD*, Motevaselin M.¹ *MSc*

*Chemical Engineering School, Chemical Engineering College, University of Tehran, Tehran, Iran

¹Chemical Engineering School, Chemical Engineering College, University of Tehran, Tehran, Iran

²Life Sciences Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The effect of crude oil pollutants on water and soil pollution and ecological changes has resulted in several studies on the identification and removal of these pollutants. The biological methods have been highly regarded for controlling this type of pollution due to their optimal performance. The aim of this study was the comparative assessment of crude oil biodegradation by *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 in the presence and absence of biofunctional magnetic nanoparticles.

Materials & Methods: In this laboratory research, the amount of degradation of N-decane and Hexadecane were studied, as indices of normal paraffins in crude oil pollutions, by *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 in the optimal conditions, which Emulsan produced. Also, the effect of magnetic nanoparticles of iron oxide coated with two layers of Decanoic acid on the degradation was investigated separately. The independent t-test was performed to examine the significance of the model parameters and the two-way ANOVA was used to examine the goodness of fit. The experiment was done with a fractional factorial design. For statistical analysis of the results, Minitab V.16 software was used.

Findings: The biodegradation of N-decane and Hexadecane were obtained 85% and 86%, respectively, after 60 days. The presence of nanoparticles also led to an improvement in the biodegradation process and an increase of 91% and 89%, respectively.

Conclusion: *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG- succeeds in eliminating paraffinic compounds from crude oil with medium chain length. The effect of presence of nanoparticle in the biodegradation of N-decane is greater than that of Hexadecane.

Keywords

Bioremediation [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68001673>];

Alkane [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000473>];

Hexadecane [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67007932>];

Acinetobacter Calcoaceticus [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68016954>]

*Corresponding Author

Tel: -

Fax: +98 (21) 88497324

Post Address: Chemical Engineering School, Chemical Engineering College, University of Tehran, Tehran, Iran

hrashedi@ut.ac.ir

Received: December 21, 2015

Accepted: July 24, 2017

ePublished: June 21, 2018



Comparative Assessment of Crude Oil Biodegradation by *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 in the Presence and Absence of Biofunctional Magnetic Nanoparticles

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Rashedi H.* PhD,
Farmani F.¹ MSc,
Yazdian F.² PhD,
Motevaselin M.¹ MSc

How to cite this article

Rashedi H, Farmani F, Yazdian F, Motevaselin M. Comparative Assessment of Crude Oil Biodegradation by *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 in the Presence and Absence of Biofunctional Magnetic Nanoparticles. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(2):309-315.

*Chemical Engineering School, Chemical Engineering College, University of Tehran, Tehran, Iran

¹Chemical Engineering School, Chemical Engineering College, University of Tehran, Tehran, Iran

²Life Sciences Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Chemical Engineering School, Chemical Engineering College, University of Tehran, Tehran, Iran

Phone: -

Fax: +98 (21) 88497324
hrashedi@ut.ac.ir

Article History

Received: December 21, 2015

Accepted: July 24, 2017

ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims The effect of crude oil pollutants on water and soil pollution and ecological changes has resulted in several studies on the identification and removal of these pollutants. The biological methods have been highly regarded for controlling this type of pollution due to their optimal performance. The aim of this study was the comparative assessment of crude oil biodegradation by *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 in the presence and absence of biofunctional magnetic nanoparticles.

Materials & Methods In this laboratory research, the amount of degradation of N-decane and Hexadecane were studied, as indices of normal paraffins in crude oil pollutions, by *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 in the optimal conditions, which Emulsan produced. Also, the effect of magnetic nanoparticles of iron oxide coated with two layers of Decanoic acid on the degradation was investigated separately. The independent t-test was performed to examine the significance of the model parameters and the two-way ANOVA was used to examine the goodness of fit. The experiment was done with a fractional factorial design. For statistical analysis of the results, Minitab V.16 software was used.

Findings The biodegradation of N-decane and Hexadecane were obtained 85% and 86%, respectively, after 60 days. The presence of nanoparticles also led to an improvement in the biodegradation process and an increase of 91% and 89%, respectively.

Conclusion *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 succeeds in eliminating paraffinic compounds from crude oil with medium chain length. The effect of presence of nanoparticle in the biodegradation of N-decane is greater than that of Hexadecane.

Keywords Bioremediation; Alkane; Hexadecane; *Acinetobacter Calcoaceticus*

CITATION LINKS

[1] A review of petroleum pollutant migration in the permafrost environment [2] Bioremediation: Developments, current practices and perspectives [3] An investigation for potential development on biosurfactants [4] Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area [5] Bioremediation engineering: Design and application [6] Formation of two methylenedioxy bridges by a Sesamum CYP81Q protein yielding a furofuran lignan, (+)-sesamin [7] Comparative study of crude oil degradation efficiency of microbes isolated from crude oil contaminated site [8] Optimize the production of emulsants By *A. calcoaceticus* RAG-1 bacteria [9] Industrial and biological applications of bioemulsifiers: A mini review [10] High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications [11] Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications [12] Indigenous production of biosurfactant and degradation of crude oil by *Bacillus* sp [13] Mechanical properties of hexadecane-water interfaces with adsorbed hydrophobic bacteria [14] Analysis of bacterial surface properties using atomic force microscopy [15] Microbial production of surfactants and their commercial potential [16] Biosurfactants and oil bioremediation [17] Bilayer surfactant stabilized magnetic fluids: synthesis and interactions at interfaces [18] Bioremediation of soils polluted with phenanthrene and anthracene using ground treatment method and chicken manure as a cosubstrate [19] Production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* isolate and its applicability to in situ microbial enhanced oil recovery under anoxic conditions [20] Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on carbon sources [21] Biosurfactant production with glucose as a carbon source [22] Rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 using vegetable oil refinery wastes [23] Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food bio-preservative [24] Purification of rhamnolipid using colloidal magnetic nanoparticles

ارزیابی مقایسه‌ای تجزیه زیستی نفت خام با استفاده از میکروارگانیسم *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* در شرایط حضور و عدم حضور نانوذرات مغناطیسی زیست‌عملگرا شده

حمید راشدی* PhD

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

فرشاد فرمانی MSc

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

فاطمه یزدانی PhD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مهدی متوسلین MSc

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: تاثیر آلاینده‌های نفتی بر آلودگی آب و خاک و تغییر اکولوژی محیط به انجام مطالعات متعددی در رابطه با شناسایی و حذف این مواد منجر شده است. روش‌های زیستی به علت عملکرد مطلوب در کنترل این نوع آلودگی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف پژوهش حاضر ارزیابی مقایسه‌ای تجزیه زیستی نفت خام با استفاده از میکروارگانیسم *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* RAG-1 در شرایط حضور و عدم حضور نانوذرات مغناطیسی زیست‌عملگرا شده بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق آزمایشگاهی، میزان تخریب‌پذیری نرمال‌دکان و هگزادکان به‌عنوان شاخص‌هایی از نرمال‌پارافین‌های موجود در آلاینده‌های نفت خام، توسط میکروارگانیسم *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* در شرایط بهینه تولید امولسان توسط این میکروارگانیسم مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین تاثیر حضور نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن پوشش‌دار شده با دو لایه دکانوتیک‌اسید، بر تخریب‌پذیری به‌طور جداگانه بررسی شد. آزمون T مستقل به‌منظور بررسی معنی‌دار بودن پارامترهای مدل و آنالیز واریانس دوطرفه به‌منظور بررسی برازندگی مدل صورت گرفت. همچنین طراحی آزمایشات با روش فاکتوریل جزیی صورت گرفت و به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج از نرم‌افزار Minitab V.16 استفاده شد.

یافته‌ها: میزان تجزیه زیستی پس از ۶۰ روز، برابر با ۸۵٪ و ۸۶٪ به‌ترتیب برای ترکیبات نرمال‌دکان و هگزادکان به دست آمد. همچنین حضور نانوذرات منجر به بهبود فرآیند تجزیه زیستی و افزایش مقادیر فوق به ترتیب به ۹۱٪ و ۸۹٪ شد. **نتیجه‌گیری:** میکروارگانیسم *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* در حذف ترکیبات پارافینی با طول زنجیر متوسط از نفت خام موفق است. تاثیر حضور نانوذره در زیست‌تخریب‌پذیری نرمال‌دکان بیشتر از این اثر در تخریب هگزادکان است.

کلیدواژه‌ها: زیست‌پالایی، نرمال‌آلکان، هگزادکان، *اسینتوباکتر کالکواستیکوس*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۲

*نویسنده مسئول: hrashedi@ut.ac.ir

مقدمه

آلاینده‌های نفتی یکی از انواع آلودگی‌های محیط زیست به شمار می‌آیند که ورود آنها به آب یا خاک به‌سرعت بر خواص فیزیکی و شیمیایی محیط اثر می‌گذارد و به‌تبع آن باعث تغییرات اکولوژی منطقه می‌شود. بنابراین حذف آلاینده‌های نفتی امری بسیار ضروری و حایز اهمیت است. تاکنون روش‌های فیزیکی و شیمیایی بسیاری برای کنترل این نوع آلودگی به کار گرفته شده است [1]. از روش‌های فیزیکی می‌توان به دفن‌کردن، پوشش‌دادن، شست‌وشو و جاری‌کردن خاک آلوده و از روش‌های شیمیایی به سوزاندن و جذب سطحی با کربن اشاره کرد. این روش‌ها هر یک مشکلات خاص خود را دارند که استفاده از آن‌ها را به‌تنهایی، بسیار پرهزینه و دارای عوارض و در برخی موارد غیرکارآمد می‌کند [2].

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس

روش‌های زیستی می‌توانند کاستی تکنیک‌های شیمیایی و فیزیکی را جبران نمایند. با بالارفتن اطلاعات در این زمینه امکان ایمن‌تر عمل‌کردن و استفاده از سویه‌های میکروبی موثرتر ایجاد شده است [3]. این سویه‌ها عمل تخریب زیستی را بدون ایجاد خطر در سلامتی انسان و محیط زیست انجام می‌دهند، همچنین فرآیندهای زیستی از نظر شرایط عملیاتی انعطاف‌پذیر بوده و دارای واحدهایی با تولید آلودگی صوتی کمتر و راندمان اقتصادی بالاتر هستند [4].

میکروارگانیسم‌ها با ترشح آنزیم‌های مختلف هیدروکربن‌های نفتی را شکسته و از آن به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. تشکیل جمعیت‌های میکروبی مخلوط با ظرفیت‌های آنزیمی زیاد می‌تواند سرعت و بازدهی تجزیه زیستی مواد نفتی را بیشتر نماید. باکتری‌های مصرف‌کننده مواد نفتی در خاک شامل باسیلوس، میکروکوکوس، سودوموناس، ویبریو و آکالیجنس هستند. معمولاً سویه‌های باسیلوس به‌دلیل قابلیت تشکیل اندوسپورهای مقاوم در خاک‌های آلوده نفتی وجود دارند. سویه‌های باسیلوس و بعد از آن ویبریو بهترین جنس‌ها در تخریب زیستی هیدروکربن‌ها به حساب می‌آیند. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند آلودگی‌های وسیع نفتی را پاک‌سازی نمایند [5].

گونه‌های *اسینتوباکتر* و *رودوکوکوس* می‌توانند نرمال‌آلکان‌های 7°C تا 20°C را تخریب زیستی نمایند. *سودوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida*) به‌تنهایی با مصرف مواد نفتی رشد می‌نماید، حال آن که وقتی با *اسینتوباکتر* همراه می‌شود قادر به تخریب زیستی انواع مختلف ترکیبات آروماتیک می‌شود. بنابراین متابولیت‌هایی که *اسینتوباکتر* می‌سازد، رشد *سودوموناس پوتیدا* را افزایش می‌دهند [6].

برای تعیین اثر میکروارگانیسم در محیط‌های تهیه‌شده بر تجزیه نفت خام می‌بایست یک یا چند هیدروکربن به‌عنوان شاخص در نظر گرفته و با بررسی مقدار این هیدروکربن در نمونه‌های مختلف مقدار اثرپذیری میکروارگانیسم تعیین شود. هیدروکربن‌های سبک به‌علت فراریت و نقطه جوش پایین ممکن است به دلایلی از محیط خارج شوند؛ هیدروکربن‌های سنگین نیز نسبت به هیدروکربن‌های با وزن مولکولی متوسط قابلیت رقابت کمتری در تجزیه زیستی دارند. به همین دلایل هیدروکربن‌های با وزن مولکولی متوسط (نرمال‌دکان و هگزادکان) برای بررسی اثر میکروارگانیسم در نظر گرفته می‌شوند [7]. میکروارگانیسم انتخاب‌شده در این تحقیق *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* (*Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1) بوده است.

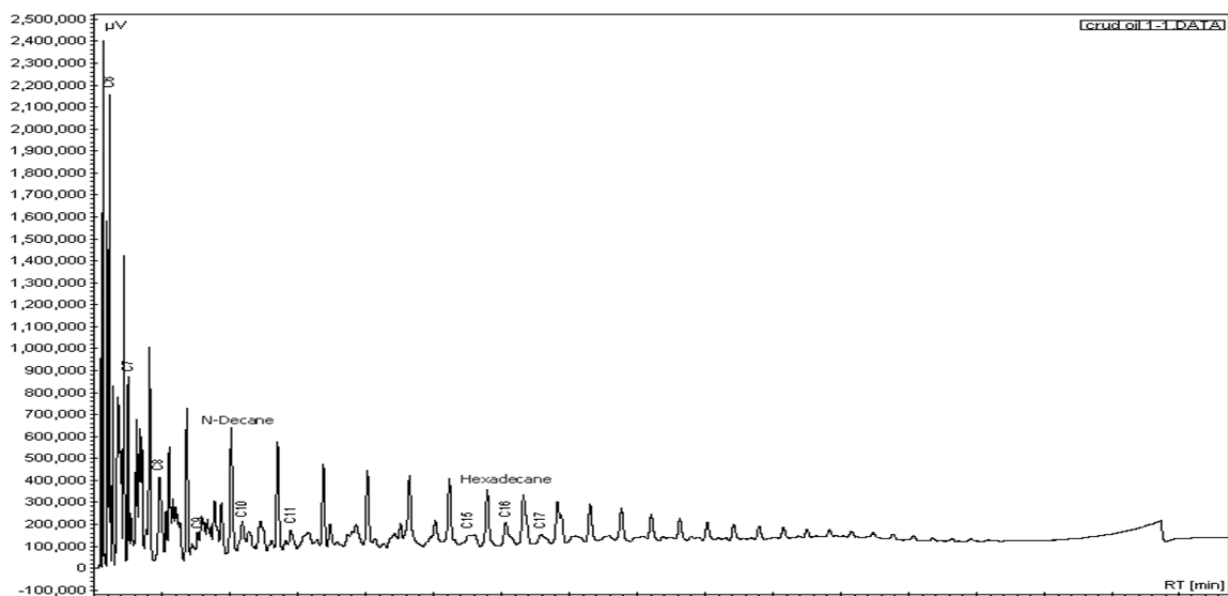
دلیل استفاده از این سویه قابلیت سازگاری در محیط‌هایی با منبع کربن هیدروکربنی و همچنین قابلیت تولید امولسان به‌عنوان بیوسورفکتانت است [8-10]. بیوسورفکتانت با کاهش ویسکوزیته و افزایش فعالیت سطحی دسترسی میکروارگانیسم به مواد نفتی را افزایش می‌دهد [11, 12]. امولسان یک ترکیب هتروپولی‌ساکارید آنیونی است که توسط باکتری *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* تولید می‌شود و عامل امولسیون‌کننده موثر برای هیدروکربن‌ها در آب است، در حالی که به‌طور محسوس کشش بین سطحی را کاهش نمی‌دهد [13-15]. این بیوآمولسیفایر در فاز لگاریتمی رشد به‌صورت خارج سلولی تولید شده و پس از رسیدن به فاز ساکن رشد در محیط آزاد می‌شود، به همین دلیل غلظت نسبتاً ثابتی در محیط دارد [16]. هدف پژوهش حاضر ارزیابی مقایسه‌ای تجزیه زیستی نفت خام با استفاده از میکروارگانیسم *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* در شرایط حضور و عدم حضور نانوذرات مغناطیسی زیست‌عملگرا شده بود.

مواد و روش‌ها

نفت خام مورد استفاده در مطالعه آزمایشگاهی حاضر، از نمونه نفت سبک استخراج شده از چاه ۷۰ رگ سفید بود که نمونه طیف کروماتوگرافی گازی آن نشان داده شده است (نمودار ۱). مقادیر غلظت‌های نرمال‌دکان و هگزادکان با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی model 5890 (HP؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد. با انجام این آزمایش روی نمونه نفت خام، توزیع هیدروکربن‌های نرمال و ایزومرهای آنها و محدوده هیدروکربنی در کروماتوگرام تعیین شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده که در ادامه ذکر شده‌اند از نمایندگی شرکت مرک آلمان خریداری شدند. ده نمونه در این مطالعه موجود بود.

سنتز نانوذرات مغناطیسی: مقدار ۶۰ میلی‌لیتر محلول $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ تهیه و یک میلی‌لیتر HCl با غلظت ۰/۵ مولار به آن اضافه شد.

محلول به یک بشر دارای همزن با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه و حاوی گاز بی‌اثر نیتروژن منتقل شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر Na_2SO_3 ۰/۵ مولار به محلول اضافه شد. در این حالت رنگ محلول از زرد کم‌رنگ به قرمز تغییر یافت که نشان‌دهنده تشکیل کمپلکس است. به محض تغییر رنگ دوباره محلول از قرمز به زرد کم‌رنگ محلول به ظرف اصلی واکنش حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول آمونیاک ۲ مولار اضافه شد و به مدت نیم ساعت تحت هم‌زدن در محیط خنثی ناشی از حضور گاز نیتروژن قرار گرفت. در این حالت رسوبی کاملاً سیاه‌رنگ که ناشی از تشکیل ذرات Fe_3O_4 است، تشکیل شد. رسوبات تشکیل شده تحت اثر میدان مغناطیسی سریعاً ته‌نشین شدند. برای خارج کردن مواد شرکت‌نکرده در واکنش، رسوب ۵ مرتبه با محلولی به حجم مساوی از اتانول مطلق و آب دیونیزه شست‌وشو داده و ۲۴ ساعت در فریز درایر خشک شد.



نمودار ۱) طیف کروماتوگرافی گازی از نمونه نفت خام مورد استفاده در این طرح: محور افقی زمان طی شده پس از تزریق نمونه تا رسیدن پیک یک ماده به دکتور (زمان خروج پیک RT) و محور عمودی ارتفاع پیک برحسب میکروولت را نشان می‌دهد. پیک‌های مربوط به نرمال‌دکان و هگزادکان روی تصویر مشخص شده‌اند

زیست‌عملگرکردن ذرات تولید شده: سنتز نانوذرات مغناطیسی زیست‌عملگر شده مطابق با روش شن و همکاران به شرح ذیل صورت گرفت [17]:

۱) سنتز نانوذره مغناطیسی تک‌لایه: ابتدا ۴۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده در داخل یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. آب دیونیزه شده توسط گاز آرگون هوازدایی شد. سپس ۰/۸۶ گرم $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ و ۲/۳۵ گرم $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ به بشر اضافه شد. مخلوط تحت هم‌زدن مکانیکی یکنواخت قرار گرفت و تا 80°C گرم شد، ۱۰۰ میلی‌گرم دکانوئیک‌اسید در ۵ میلی‌لیتر استون، حل و به محلول اضافه شد. سپس ۵ میلی‌لیتر NH_4OH با غلظت ۲۸٪ وزنی به محلول اضافه شد. در مدت ۵ دقیقه، ۵ مرتبه دکانوئیک‌اسید و هر بار به مقدار ۰/۲ گرم به محلول اضافه شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 80°C و هم‌زدن یکنواخت نگهداری شد تا کریستال‌ها رشد یابند و به آهستگی تا دمای محیط سرد شد. با استفاده از استون و متانول رسوب‌دهی انجام شد. رسوب حاصل جدا و با ۵ بار تکرار مرحله شست‌وشو، دکانوئیک‌اسید اضافی جدا شد.

۲) نشان دادن لایه دوم بر نانوذره مغناطیسی تک‌لایه: ابتدا یک گرم از

رسوب تازه تشکیل شده در مرحله اول با ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده ترکیب و دوغاب حاصله تحت شرایط هم‌زدن، تا دمای 60°C حرارت داده شد. در دمای 60°C و هم‌زدن یکنواخت، محلول ۱۰٪ نمک آمونیوم دکانوئیک‌اسید با $\text{pH}=10$ قطره‌قطره به دوغاب اضافه شد تا دوغاب به سوسپانسیون پایدار تبدیل شود. محصول نهایی در این مرحله نانوذره مغناطیسی اکسید آهن پوشش‌دار شده با دو لایه دکانوئیک‌اسید است. این ماده در آب محلول و پایدار است.

۳) آماده‌سازی فسفولیپید: مقدار ۵ گرم لستین دانه سویا در ظروف مخصوص سانتریفوژ ریخته و به آن استون اضافه شد. سپس ظرف در دستگاه سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه و در دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. فاز مایع که محتوی چربی‌هایی غیر از فسفولیپید است جدا و این عمل ۵ مرتبه تکرار شد. در نهایت به‌منظور آماده‌سازی فسفولیپیدها برای سنتز مگنتو لیپوزوم از دستگاه سونیکاسیون استفاده شد تا فسفولیپید به خوبی در محلول مورد نظر پراکنده و محلولی یکنواخت حاصل شود.

سویه مورد استفاده: سویه مورد استفاده در این آزمایش *اسیتوباکتر کالکواستیکوس* از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و

باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با شماره PTCC 1318 تهیه شد.

محیط کشت برای انجام آزمایشات تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفت و میزان جذب نوری سوسپانسیون به‌عنوان ملاک سنجش جمعیت سلولی تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱) ترکیب محیط کشت [8]

فرمول شیمیایی	نام ترکیب	غلظت (گرم بر لیتر)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	فسفات هیدروژن دی‌آمونیم	۱/۰
MnSO_4	سولفات منیزیم	۰/۰۵
NH_4NO_3	نیتрат آمونیم	۱/۰
NaCl	کلرید سدیم	۰/۰۰۲
FeSO_4	سولفات آهن	۰/۰۰۲
MgSO_4	سولفات منگنز	۰/۰۰۲

روش انجام آزمایشات: برای انجام آزمایشات ۱۰ ارلن ۲۵۰ سی‌سی شماره‌گذاری و آماده شد. pH محیط کشت روی ۷ تنظیم شد، سپس در اتوکلاو تحت دمای 121°C و فشار ۲/۱ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. نفت خام به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط در ظرف درباز قرار داده شد تا ترکیبات فرار آن خارج شود و سپس در اتوکلاو استریل شد. نفت خام و محیط کشت استریل‌شده در زیر هود زیستی تحت شرایط استریل در ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی ریخته و به‌دنبال آن با استفاده از سرنگ‌های استریل مایه تلقیح با میزان جذب نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر در ارلن‌ها ریخته شد. در هر مرتبه قبل از برداشتن حجم‌های مورد نظر از مایه تلقیح برای یکنواخت‌بودن آن، ارلن حاوی مایه تلقیح تکان داده شد [18].

برای واردکردن نانوذرات زیست‌عملگرشده به محیط، ابتدا ۰/۲۵ گرم از نانوذرات تولیدشده برای لایه نشانی و زیست‌عملگرکردن جدا شد، پس از انجام زیست‌عملگرکردن و یکنواخت‌سازی به‌وسیله دستگاه سونیکاسیون حجم سوسپانسیون یکنواخت به ۴۵۰ سی‌سی رسانده شده و محیط نمک‌های معدنی در همین سوسپانسیون ایجاد شد. این سوسپانسیون به‌عنوان محیط نمک‌های معدنی همراه با

نانوذرات زیست‌عملگرشده مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام تلقیح درب ارلن‌ها با پنبه استریل پوشانده شده و داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه در دمای 30°C قرار گرفت [19].

آزمون میانگین براساس آماره T مستقل به‌منظور بررسی معنی‌داربودن پارامترهای مدل انجام شد و آنالیز واریانس دوطرفه به‌منظور بررسی برازندگی مدل صورت گرفت. همچنین طراحی آزمایشات با روش فاکتوریل جزئی صورت گرفت. به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج از نرم‌افزار Minitab V.16 استفاده شد.

یافته‌ها

زیست‌پالایی نفت خام با استفاده از میکروارگانیسم بدون حضور نانوذره زیست‌عملگرشده: روند کاهش غلظت نرمال‌دکان و هگزادکان بدون حضور نانوذره در زمان‌های مختلف نشان داده شد (جدول ۲).

جدول ۲) غلظت نرمال‌دکان و هگزادکان (گرم بر کیلوگرم) در نفت خام بدون حضور نانوذره

زمان آزمایش	غلظت نرمال‌دکان	غلظت هگزادکان
روز صفر	$3/40 \pm 0.02$	$2/96 \pm 0.01$
روز ۱۵	$2/35 \pm 0.12$	$2/27 \pm 0.08$
روز ۳۰	$1/40 \pm 0.22$	$1/55 \pm 0.07$
روز ۴۵	$0/85 \pm 0.005$	$0/79 \pm 0.001$
روز ۶۰	$0/50 \pm 0.003$	$0/41 \pm 0.004$

نتایج مدل رگرسیون خطی ساده برای تغییرات غلظت نرمال‌دکان و هگزادکان برحسب زمان نشان داده شد (جدول ۳). منفی‌بودن ضریب زاویه در مدل رگرسیون خطی نشان‌دهنده کاهش غلظت این دو ترکیب با گذشت زمان و زیست‌پالایی نفت خام با استفاده از میکروارگانیسم است. با ریسک ۵٪ متغیر زمان و ثابت مدل تأثیر معنی‌داری بر پاسخ داشت. هر دو مدل ارایه‌شده برازندگی داشتند. با گذشت زمان آزمایش، سرعت تجزیه زیستی کاهش یافت که این مطلب ناشی از کم‌شدن غلظت سوبسترا در محلول است.

جدول ۳) مدل رگرسیون خطی ساده برای تغییرات غلظت نرمال‌دکان و هگزادکان بر حسب زمان و در عدم حضور نانو ذره

پیشگو	ضریب	ضریب SE	T	P	S	درصد واریانس خطا	درصد واریانس خطا (بهینه‌شده)
غلظت نرمال دکان							
ثابت	۳/۱۶۰۰	۰/۲۱۷۳	۱۴/۵۵	۰/۰۰۱	۰/۲۸۰۴۷۶	۹۵/۸	۹۴/۳
زمان	-۰/۰۴۸۶۶۷	۰/۰۰۵۹۱۳	-۸/۲۳	۰/۰۰۴			
غلظت هگزا دکان							
ثابت	۲/۹۱۲۰۰	۰/۰۹۳۲۵	۳۱/۲۳	۰	۰/۱۲۰۳۸۸	۹۹/۰	۹۸/۷
زمان	-۰/۰۴۳۸۶۷	۰/۰۰۲۵۳۸	-۱۷/۲۸	۰			

نرمال دکان = 0.0487 * زمان - 3.16 ؛ هگزا دکان = 0.0439 * زمان - 2.91

زمان بود ($p < 0.05$).

جدول ۴) غلظت نرمال‌دکان و هگزادکان (گرم بر کیلوگرم) در نفت خام در حضور نانوذره

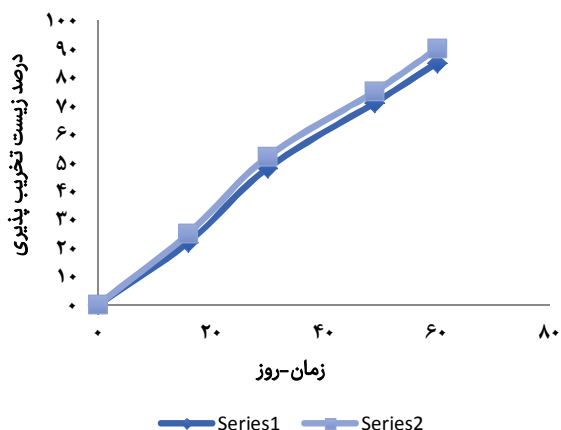
زمان آزمایش	غلظت نرمال‌دکان	غلظت هگزادکان
روز صفر	$3/40 \pm 0.005$	$2/96 \pm 0.01$
روز ۱۵	$2/20 \pm 0.02$	$2/20 \pm 0.06$
روز ۳۰	$1/25 \pm 0.12$	$1/46 \pm 0.08$
روز ۴۵	$0/70 \pm 0.006$	$0/70 \pm 0.001$
روز ۶۰	$0/31 \pm 0.002$	$0/33 \pm 0.004$

جدول ۵) مدل رگرسیون خطی ساده برای تغییرات غلظت نرمال‌دکان و هگزادکان بر حسب زمان و با حضور نانو ذره

پیشگو	ضریب	ضریب SE	T	P	S	درصد واریانس خطا	درصد واریانس خطا (بهینه شده)
غلظت نرمال دکان							
ثابت	۳/۱۰۸۰	۰/۲۴۲۷	۱۲/۸۱	۰/۰۰۱	۰/۳۱۳۲۸۴	۹۵/۲	۹۳/۷
زمان	-۰/۰۵۱۲۰۰	۰/۰۰۶۶۰۵	-۷/۷۵	۰/۰۰۴			
غلظت هگزا دکان							
ثابت	۲/۸۸۲۰	۰/۱۰۷۶	۲۶/۸۰	۰	۰/۱۳۸۸۵۲	۹۸/۸	۹۸/۳
زمان	-۰/۰۴۵۰۶۷	۰/۰۰۲۹۲۷	-۱۵/۴۰	۰/۰۰۱			

نرمال دکان ۲ = ۰/۰۵۱۲ * زمان - ۳/۱۱؛ هگزا دکان ۲ = ۰/۰۴۵۱ * زمان - ۲/۸۸

نانوذرات برابر با ۲/۷% بود. سطح اطمینان ۹۹/۹۳% و زمان از متغیرهای مهم در حذف آلاینده بود.



نمودار ۳) درصد زیست تخریب پذیری هگزادکان با و بدون استفاده از نانو ذره

جدول ۷) آنالیز واریانس دوطرفه برای درصد حذف هگزادکان بر حسب زمان و در شرایط حضور یا عدم حضور نانو ذرات

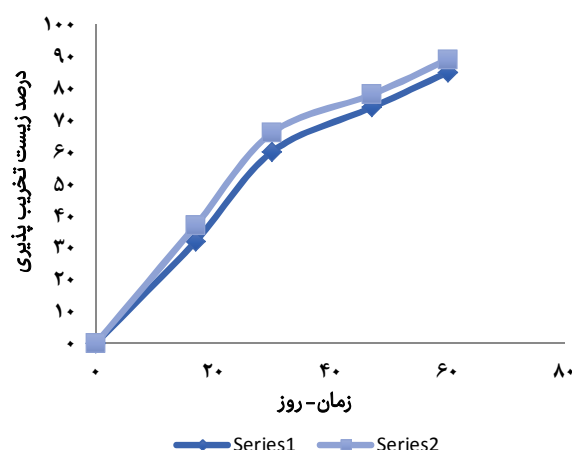
منبع	DF	SS	MS	F	P
NDEC	۱	۱۲/۴	۱۲/۴۳	۱۵/۲۳	۰/۰۱۸
زمان	۴	۱۰۲۶۹/۷	۲۵۶۷/۴۳	۳۱۴۶/۵۹	۰/۰۰۰
خطا	۴	۳/۳	۰/۸۲	-	-
مجموع	۹	۱۰۲۸۵/۴	-	-	-

S = ۰/۹۰۳۳؛ درصد واریانس خطا = ۹۹/۹۷؛ درصد واریانس خطا (بهینه شده) = ۹۹/۹۳

بحث

میکروارگانیسم *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* در حذف ترکیبات پارافینی با طول زنجیر متوسط از نفت خام موفق عمل کرده و با استفاده از این میکروارگانیسم مقدار تجزیه زیستی ترکیبات نرمال دکان و هگزادکان به ترتیب به میزان ۸۵% و ۸۶% حاصل شد. نتیجه حاصله بیانگر قابلیت تولید بیوسورفکتانت توسط این میکروارگانیسم در محیط حاوی ترکیبات نفتی است. محققان مختلف قابلیت تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم‌های متعدد در محیط کشت‌های مختلف را مورد بررسی قرار داده‌اند. تولید بیوسورفکتانت رامنولپید (Rhamnolipid) در مطالعات راشدی و همکاران توسط میکروارگانیسم *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) گزارش شده [20, 21] و باقری لطف‌آباد تولید این ترکیبات را توسط *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 از ضایعات فرآوری روغن گیاهی منتشر کرده است [22]. در تحقیق صورت گرفته توسط اسدالهی تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) جدا شده از لجن نفتی گزارش شده و شرایط بهینه تولید ارزیابی شده است [23].

بررسی و مقایسه میزان زیست تخریب پذیری هیدروکربن‌ها: برای بررسی اثر حضور نانو ذره بر زیست تخریب پذیری ترکیبات نرمال پارافین مقادیر این پارامتر بر حسب زمان آزمایش رسم شد. اثر افزایش نانو ذره بر زیست تخریب پذیری نرمال دکان: درصد زیست تخریب پذیری نرمال دکان بر حسب زمان انجام آزمایش با و بدون استفاده از نانو ذره نشان داده شد (نمودار ۲). دو عامل متغیر در این آنالیز یکی حضور یا عدم حضور نانو ذرات و دیگری زمان آزمایش بود و پاسخ نیز درصد زیست تخریب پذیری نرمال دکان بود. با سطح اطمینان ۹۵%، تغییر در هر دو عامل، تاثیر معنی داری روی درصد زیست تخریب پذیری داشت. حضور یا عدم حضور نانو ذرات زیست عملگر شده بر میزان تخریب پذیری نرمال دکان تاثیر گذار بود. درصد افزایش زیست تخریب پذیری نرمال دکان با حضور نانو ذرات برابر با ۵/۶% بود (جدول ۶).



نمودار ۲) درصد زیست تخریب پذیری نرمال دکان با و بدون استفاده از نانو ذره

جدول ۶) آنالیز واریانس دوطرفه برای درصد حذف نرمال دکان بر حسب زمان و در شرایط حضور یا عدم حضور نانو ذرات

منبع	DF	SS	MS	F	P
NDEC	۱	۳۱/۱	۳۱/۱۴	۱۳/۵۸	۰/۰۲۱
زمان	۴	۱۰۲۰۶/۴	۲۵۵۱/۶۰	۱۱۱۳/۰۸	۰/۰۰۰
خطا	۴	۹/۲	۲/۲۹	-	-
مجموع	۹	۱۰۲۴۶/۷	-	-	-

S = ۰/۱۳۸۸۵۲؛ درصد واریانس خطا = ۹۹/۹۱؛ درصد واریانس خطا (بهینه شده) = ۹۹/۸۰ =

اثر افزایش نانو ذره بر زیست تخریب پذیری هگزادکان: درصد زیست تخریب پذیری هگزادکان بر حسب زمان انجام آزمایش با و بدون استفاده از نانو ذره نشان داده شد (نمودار ۳). نتایج آنالیز واریانس دو طرفه نیز نشان داده شد (جدول ۷). حضور یا عدم حضور نانو ذره بر میزان تخریب پذیری هگزادکان تاثیر معنی داری داشت. درصد افزایش زیست تخریب پذیری هگزادکان با حضور

Environ Microbiol. 2001;67(7):3127-33.

5- Cookson J. Bioremediation engineering: Design and application. New York: McGraw-Hill Education; 1995.

6- Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Becarelli S, Siracusa G, Lorenzi R, Di Gregorio S. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: Bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L. Environ Sci Pollut Res Int. 2016;23(8):7930-41.

7- Singh P, Parmar D, Pandya A. Comparative study of crude oil degradation efficiency of microbes isolated from crude oil contaminated site. Bull Env Pharmacol Life Sci. 2015;4(2):91-4.

8- Eskandari S. Optimize the production of emulsants By *A. calcoaceticus* RAG-1 bacteria [Dissertation]. Tehran: Amirkabir University of Technology; 2007. [Persian]

9- Mujumdar S, Bhandari T, Atre C. Industrial and biological applications of bioemulsifiers: A mini review. J Biomed Pharm Res. 2015;4(4):26-35.

10- Mnif I, Ghribi D. High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. World J Microbiol Biotechnol. 2015;31(5):691-706.

11- Zou C, Wang M, Xing Y, Lan G, Ge T, Yan X, et al. Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. Biochem Eng J. 2014;90:49-58.

12- Rashedi H, Mazaheri Assadi M, Tabatabaee Bafrouee A. Indigenous production of biosurfactant and degradation of crude oil by *Bacillus* sp.. Adv Environ Technol. 2015;1(1):11-6.

13- Kang Z. Mechanical properties of hexadecane-water interfaces with adsorbed hydrophobic bacteria [Dissertation]. Edmonton: University of Alberta; 2009.

14- Dorobantu LS. Analysis of bacterial surface properties using atomic force microscopy [Dissertation]. Edmonton: University of Alberta; 2009.

15- Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61(1):47-64.

16- Ron EZ, Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation. Curr Opin Biotechnol. 2002;13(3):249-52.

17- Shen L, Laibinis PE, Hatton TA. Bilayer surfactant stabilized magnetic fluids: Synthesis and interactions at interfaces. Langmuir. 1999;15(2):447-53.

18- Amin MM, Salehi P, Teimouri F, Kalteh T. Bioremediation of soils polluted with phenanthrene and anthracene using ground treatment method and chicken manure as a cosubstrate. J Environ Health Sustain Dev. 2017; 2(3):348-56.

19- Zhao F, Zhang J, Shi R, Han S, Ma F, Zhang Y. Production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* isolate and its applicability to in situ microbial enhanced oil recovery under anoxic conditions. RSC Adv. 2015; 45:36044-50.

20- Rashedi H, Mazaheri Assadi M, Jamshidi E, Bonakdarpour B. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on carbon sources. Int J Environ Sci Technol. 2006;3(3):297-303.

21- Rashedi H, Jamshidi E, Mazaheri Assadi M, Bonakdarpour B. Biosurfactant production with glucose as a carbon source. Chem Biochem Eng Q. 2006;20(1):99-106.

22- Bagheri Lotfabad T, Partovi M, Bahmaei M.

استفاده از نانوذره زیستعملگرا شده منجر به بهبود میزان تجزیه زیستی ترکیبات نرمال دکان و هگزادکان به ترتیب به میزان ۹۱% و ۸۹% شد. علت این افزایش، تاثیر نانوذره بر افزایش تولید بیوسورفکتانت در محیط آزمایش است که این مطلب با نتایج ارایه شده توسط سایر محققان تطبیق دارد. در مطالعه عربیان و همکاران استفاده از نانوذرات مغناطیسی با هدف خالص سازی و استخراج بیوسورفکتانت صورت گرفته است [24].

برای عملکرد نانوذرات مغناطیسی زیستعملگرا شده می توان دو مکانیزم پیشنهاد کرد:

این نانوذرات با ایجاد پیوندهای سطحی یا کووالانت با ترکیبات نفت خام که به عنوان سوبسترای میکروارگانیسم هستند آنها را از محیط آلی جدا کرده و وارد فاز آبی کنند.

مولکولهای بزرگ امولسان قادر به ایجاد پیوند با مولکولهای آلکان نفت خام هستند. به این ترتیب نوعی کمپلکس در مرز محیط آلی و آبی شکل می گیرد که می تواند باعث انتقال سوبسترا به صورت امولسیون به محیط آبی شود. نانوذرات ممکن است با تاثیر بر این کمپلکسهای حجیم، بر توزیع این ذرات امولسیون در محیط آبی تاثیر بگذارند.

از محدودیت های پژوهش، می توان به زمان طولانی حذف آلودگی های نفتی اشاره کرد. همچنین بررسی مکانیسم برهم کنش نانوذره و میکروارگانیسم نیز از محدودیت های فعالیت است.

نتیجه گیری

میکروارگانیسم *اسیتوباکتر کالکوستیکوس* در حذف ترکیبات پارافینی با طول زنجیر متوسط از نفت خام موفق است. تاثیر حضور نانوذره در زیست تخریب پذیری نرمال دکان بیشتر از این اثر در تخریب هگزادکان است؛ این مطلب احتمالاً ناشی از سنگین تریودن هگزادکان و کاهش قابلیت امولسان است.

تشکر و قدردانی: از دانشگاه تهران در تامین امکانات پژوهش تقدیر و تشکر می شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تضاد منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: حمید راشدی (نویسنده اول)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰%)؛ فرشاد فرمانی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روشن شناس (۲۵%)؛ فاطمه یزدیان (نویسنده سوم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۰%)؛ مهدی متوسلین (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۵%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Hanbing Q, Jie L, Dong L. A review of petroleum pollutant migration in the permafrost environment. Phys Numer Simul Geotech Eng. 2015;18(18):95-9.
- 2- Shukla KP, Singh NK, Sharma S. Bioremediation: Developments, current practices and perspectives. Genet Eng Biotechnol J. 2010;2010:GEBJ-3.
- 3- Salihu A, Abdulkadir I, Almustapha MN. An investigation for potential development on biosurfactants. Biotechnol Mol Biol Rev. 2009;3(5):111-7.
- 4- Margesin R, Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Appl

evaluation to use as bioemulsifier for food bio - preservative. Adv Appl Sci Res. 2012; 3(3):1827-31.
24- Arabian Hossein Abadi H, Rashedi H, Amoabediny G, Mazaheri Asadi M. Purification of rhamnolipid using colloidal magnetic nanoparticles. Afr J Biotechnol. 2009;8(13):3097-106.

Rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 using vegetable oil refinery wastes. New Cell Mol Biotechnol J. 2013;3(9):91-9. [Persian]
23- CR Suresh Chander, T Lohitnath, DJ Mukesh Kumar, PT Kalaichelvan. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its