محور مقاله: آلودگی زیست‌بوم، سلامت انسان و زیست‌پالایی

ارزیابی قابلیت امولسیون‌کنندگی و رشد باکتری‌های جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت در محیط کشت معدنی حاوی گازوئیل

ریحانه کلامی[۱]، احمدعلی پوربابایی[۲*]، حسینعلی علیخانی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه تهران

[۲] دانشیار گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[۳] استاد گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه تهران

چکیده

در دهه‌های اخیر، با پیشرفت فن‌آوری‌های پایدار جستجو برای ترکیبات طبیعی و زیست تخریب‌پذیر جهت پالایش محل‌های آلوده به هیدروکربن، رو به افزایش بوده‌است. در این مطالعه قابلیت امولسیون کنندگی، تولید بیوسورفاکتانت‌ها و رشد در حضور گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن در محیط با پایه معدنی توسط ۳۹ سویه باکتریایی جدا شده از خاک های آلوده به نفت مناطق نفت خیز جنوب استان خوزستان مورد بررسی قرار گرفت. ۹۰ ٪ از جدایه‌ها توانایی رشد در حضور گازوئیل به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی را داشتند و ۲۱ جدایه رشد بسیار خوبی با گازوئیل نشان دادند. براساس آزمون جابجایی روغن، ۳۴ جدایه توانایی تولید بیوسورفاکتانت را نشان دادند و قطر هاله ایجاد شده از ۲ میلی متر تا ۵۵ میلی متر متغیر بود. همچنین با اندازه‌گیری شاخص امولسیون کنندگی پس از ۲۴ ساعت، در ۷۲ ٪ از جدایه‌ها توانایی امولسیون کنندگی گازوئیل مشاهده شد. نتایج این پژوهش حاکی از پتانسیل بالای مناطق نفت خیز جنوب ایران در جداسازی باکتری‌های توانمند در راستای اهداف زیست پالایی مناطق آلوده به ترکیبات نفتی می باشد.

کلمات کلیدی: آزمون جابجایی روغن، مناطق نفت خیز جنوب ، 16S-rRNA ، زیست پالایی.

مقدمه

با افزایش آگاهی نسبت به خطراتی که مناطق آلوده به نفت روی سلامتی موجودات زنده و محیط زیست دارند، سلامت خاک به یک نگرانی اصلی برای محققین و مردم تبدیل شده‌است. سالانه حدود ۷/۱ تا ۸/۸ میلیون تن نفت در محیط زیست آزاد می‌شود که ۹۰٪ آن مستقیما مربوط به حوادث ناشی از دخالت و فعالیت‌های انسان در محیط زیست است (Baboshin و همکاران ۲۰۱۲). زیست پالایی یکی از روش‌های مربوط به پالایش خاکهای آلوده نفتی است و فواید بسیاری نسبت به روشهای فیزیکی و شیمیایی دارد. این روش کم هزینه و دوستدار محیط زیست می‌باشد. بیوسورفاکتانت‌ها (سورفاکتانت‌های تولید شده بوسیله میکروارگانیسم‌ها یا گیاهان)، نقش مهمی در زیست پالایی و پاکسازی محیط‌های خاکی و آبی و همچنین مزیت هایی از قبیل سمیت پایین، قابلیت تجزیه زیستی بالا، سازگاری با محیط و قیمت پایین نسبت به سورفاکتانت های شیمیایی دارند (Lin و همکاران ۲۰۱۰). به‌دلیل محدود بودن زیست فراهمی ترکیبات نفتی، افزودن بیوسورفاکتانت‌ها می‌تواند با کاهش کشش سطحی، حلالیت و در نتیجه زیست فراهمی هیدروکربن‌ها را بهبود بخشد. کاربرد بیوسورفاکتانت‌ها یک جایگزین سازگار با محیط‌زیست است، زیرا آن‌ها غیر سمی و زیست تخریب پذیر هستند (Shahaliyan و همکاران ۲۰۱۵). تنوع میکروارگانیسم‌های قادر به تجزیه آلاینده‌های نفتی، و بیوسورفاکتانت‌های تولید شده از آن‌ها بسیار گسترده‌اند و تا کنون به میزان کمی شناخته شده‌اند. بسته به زیستگاه مورد مطالعه، تخمین زده می‌شود که کم‌تر از ۰/۱ درصد و حداکثر ۱۰ درصد از گونه‌های میکروبی موجود کشف و نامگذاری شده‌اند. با این حال، تعداد گونه‌های شناخته شده با پیشرفت در تحقیقات، هر سال افزایش می‌یابد (Van Hamme و همکاران ۲۰۰۳). از سوی دیگر، ظرفیت امولسیون کنندگی ترکیبات نفتی نیز نقش ارزشمندی در زیست پالایی محیط‌های آلوده ایفا می‌کند. از جمله مزایای افزایش ظرفیت امولسیون کنندگی ترکیبات نفتی این است که تجزیه را تسهیل می‌کند، زیست فراهمی هیدروکربن‌های نفتی را افزایش داده و در نتیجه تجزیه زیستی را افزایش می‌دهد (Mnif و همکاران ۲۰۱۱). با توجه به آلودگی طولانی مدت خاکهای مناطق نفت خیز جنوب به ترکیبات نفتی، این مکان می‌تواند یک زیستگاه مناسب برای باکتری‌های توانمند در تولید بیوسورفکتانت و امولسیون‌سازی ترکیبات نفتی باشد. هدف اصلی این مطالعه شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی، تعیین توانایی آن‌ها برای تولید بیوسورفکتانت و هم چنین امولسیون کنندگی گازوئیل بوده است.

* ایمیل نویسنده مسئول: Pourbabaei@ut.ac.ir

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در تعدادی از خاک‌های مناطق نفت خیز جنوب واقع در اطراف شهر اهواز انجام شد. ده مکان با مساحت ۱۰۰ متر مربع انتخاب و برای هر مکان پنج نمونه خاک با فواصل مشخص از عمق ۲۰ سانتی متری برداشته شد. پس از نمونه برداری، همه نمونه‌ها در فلاسک حاوی یخ خشک قرار داده شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. مشخصات و مختصات جغرافیایی مکان‌های نمونه برداری در **Error! Reference source not found.** ارائه شده‌است.

جدول ۱. مشخصات محل‌های نمونه برداری

شماره نمونه خاک	نام محل	مختصات جغرافیایی
نمونه شماره یک	پارک شهروند	N:۳۱° ۲۲′ ۲۷″ E: ۴۸° ۴۲′ ۰۱″
نمونه شماره ۲	منطقه شهروند	N:۳۱° ۲۲′ ۲۲″ E: ۴۸° ۴۱′ ۵۹″
نمونه شماره ۳	پارک جنگلی شهرینه	N: ۳۱° ۲۱′ ۵۳″ E:۴۸° ۴۲′ ۲۸″
نمونه شماره ٤	حوضچه حفاری پارک شهروند	N: ۳۱° ۲۲′ ۰۶″ E:۴۸° ۴۲′ ۳۹″
نمونه شماره ٥	دغاغله	N: ۳۱° ۲۳′ ۴۵″ E:۴۸° ۳۹′ ۱۷″
نمونه شماره ٦	مجاور تاسیسات دغاغله	N: ۳۱° ۲۳′ ۵۲″ E:۴۸° ۳۹′ ۰۵″
نمونه شماره ۷	توران سوفت	N: ۳۱° ۲۴′ ۵۷″ E:۴۸° ۳۸′ ۰۳″
نمونه شماره ۸	منطقه فول آباد	N: ۳۱° ۲۵′ ۱۶″ E: ۴۸° ۳۷′ ۰۰″
نمونه شماره ۹	فول آباد	N: ۳۱° ۲۵′ ۱۶″ E:۴۸° ۳۷′ ۰۰″
نمونه شماره ۱۰	محل تاسیسات لایه حفاری فول آباد	N: ۳۱° ۲۵′ ۱۶″ E:۴۸° ۳۷′ ۰۰″

به منظور جداسازی باکتری‌های خاک، ابتدا یک محیط معدنی ساخته شد (Giebler و همکاران ۲۰۱۳).
سپس ۰/۲ ٪ هگزادکان استریل به عنوان مدل آلکان‌های راست زنجیر مایع به آن اضافه گردید. از طرف دیگر برای تهیه سوسپانسیون سلولی از خاک، از هر خاک یک گرم با ۱۰ میلی لیتر محلول ۱۰ میلی مولار بافر پتاسیم فسفات با pH = ۷ به مدت یکساعت روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفت. سپس ۱۵ دقیقه به آن زمان داده شد (Kloos و همکاران ۲۰۰۶). در ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتر برای هر نمونه خاک ۳۰ میلی لیتر از محیط کشت ذکر شده به همراه هگزادکان اضافه شد و سپس ۲۰ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده به آن تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت یک ماه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰ rpm هوادهی شدند. بعد از سپری شدن مدت زمان دو هفته، ۰/۲ ٪ هگزادکان دیگر به ارلن‌ها اضافه شد. پس از گذشت یک ماه از غنی سازی از نمونه‌ها سری رقت تهیه شد. روی محیط کشت نوترینت آگار و بوشنل هاس آگار، ۰/۲ ٪ هگزادکان استریل پخش سطحی شد و از سری‌های رقت روی پلیت‌ها کشت شد. پس از رشد کلنی‌ها اقدام به خالص سازی کلنی‌ها گردید.
برای شناسایی جدایه‌ها، ابتدا خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی جدایه‌ها و آزمایش‌های بیوشیمیایی روی کلنی‌های خالص انجام شد (برگی و هولت ۱۹۹۴). سپس باکتری‌ها طبقه بندی شدند و از هر گروه یک جدایه جهت شناسایی و توالی یابی انتخاب گردید. سپس استخراج DNA از جدایه‌ها به روش ارگانیک (فنول – کلروفرم) انجام شد (Comey و همکاران ۱۹۹۴). پس از آن محصول واکنش PCR مربوط به ژن 16S-rRNA با

پرایمرهای عمومی 27F و 1492R روی ژل آگاروز ۱٪ بارگذاری شد (Lane و همکاران ۱۹۹۴). پس از تخلیص باند مورد نظر (۱۵۰۰ bp)، جهت تعیین توالی به شرکت میکروسینس سوییس ارسال گردید.

برای آنالیز تولید بیوسورفاکتانت ، از روش جابجایی روغن طبق روش یوسف و همکاران استفاده گردید (Youssefو همکاران ۲۰۰۴). توانایی باکتری‌ها در امولسیون سازی گازوئیل طبق روش (Batista و همکاران ۲۰۰۶) انجام گردید. باکتری‌های در محیط کشت بوشنل هاس به‌علاوه ۱٪ گازوئیل برای مدت ۷ روز در ۳۲ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰ rpm انکوبه شدند. پس از گذشت این دوره، ۲ میلی لیتر از روماند میکروبی به علاوه دو میلی لیتر گازوئیل در لوله آزمایش ریخته شد. لوله‌های آزمایش برای مدت ۲ دقیقه کاملاً هوادهی شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، با اندازه‌گیری ارتفاع لایه امولسیون شده و تقسیم آن بر ارتفاع کل محلول و ضرب عدد حاصل در ۱۰۰، شاخص امولسیون کنندگی ((E24 (%) بدست آمد. سنجش رشد باکتری‌ها در محیط حاوی گازوئیل همانطور که توسط (وانگ و همکاران ۲۰۱۰) توصیف شد مورد آزمایش قرار گرفت

نتایج و بحث

در میان باکتری‌های مورد مطالعه، ۳۵ درصد میله ای شکل وگرم مثبت با اندوسپور ، ۴۹ درصد میله‌ای گرم منفی و ۱۶ درصد گرم مثبت بدون اندوسپور بودند. توالی‌های جدایه‌ها در پایگاه داده EzBioCloud براساس توالی ژن 16S-rRNA شناسایی شدند (Kim و همکاران ۲۰۱۲) و در پایگاه داده NCBI ثبت گردیدند. (جدول).

جدول۲: نام و شماره دسترسی جدایه‌ها

نام جدایه	نام نزدیک‌ترین سویه	درصد یکسانی	شماره دسترسی
SH24	*Ochrobactrum lupini*	٪ ۹۹/۵۴	MK453290
SH42	*Bacillus altitudinis*	٪ ۹۹/۱۵	MK453293
D63	*Ochrobactrum cytisi*	٪۹۸	MK453294
T71	*Ochrobactrum anthropi*	٪ ۹۸	MK453292
T74	*Microbacterium oxydans*	٪ ۹۹/۹۲	MK453291
SH34	*Bacillus subtilis subsp. inaquosorum*	٪ ۹۹/۸۴	MK493409
F84	*Bacillus paralicheniformis*	٪ ۹۸/۲۸	MK493411

آزمون جابجایی روغن

. روش جابجایی روغن برای تشخیص تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری های جدا شده، در بسیاری از مطالعات به عنوان دقیق‌ترین روش نسبت به سایر روش‌ها معرفی شده‌است (Youssefو همکاران، ۲۰۰۴؛ Płaza و همکاران ۲۰۱۳؛ Thavasi و همکاران، ۲۰۱۳). وجود بیوسورفاکتانت با ایجاد ناحیه شفاف روی سطح نفت مشخص شد و قطر هاله به وجود آمده اندازه‌گیری گردید. براساس نتایج بدست آمده در (جدول) اکثر جدایه‌ها به جز پنج مورد توانایی تولید بیوسورفاکتانت داشتند. قطر هاله ایجاد شده از ۲ میلی متر تا ۵۵ میلی متر متغیر بودند. قطر هاله ایجاد شده در جدایه‌های SH21، SH31، SH34، SH42 و SH84 ۲۰ میلی متر و بیشتر بوده که حاکی از پتانسیل بالای این جدایه‌ها در تولید بیوسورفاکتانت می‌باشد. جدایه SH42، که براساس آنالیز 16S-rRNA ، ۹۹ ٪ شباهت با *Bacillus altitudinis* نشان داد، بیشترین قطر هاله را ایجاد نمود. تا کنون نتایج خوبی از تولید بیوسورفاکتانت توسط تعدادی از گونه‌های باسیلوس بدست آمده است. برای مثال سورفاکتین که از شناخته شده‌ترین بیوسورفاکتانت‌ها است، از باسیلوس سوبتیلیس تولید می‌گردد. سورفاکتین کشش سطحی آب را از ۷۲ تا ۲۷ mN/m، با غلظت بحرانی ۲۴ mM درآب، کاهش می‌دهد (Al-Bahry و همکاران ۲۰۱۳). همچنین بیوسورفاکتانت lichenysin که توسط *Bacillus licheniformis* تولید می‌گردد، که پایداری زیادی در دماهای مختلف، pH و غلظت‌های نمک نشان داده است (Yakimov و همکاران ۱۹۹۵). مطالعات دیگر نشان داد که برخی از سویه‌های *Bacillus megatherium* نیز بیوسورفاکتانت تولید می‌کنند که به عنوان گلیکولیپیدها طبقه‌بندی می‌شوند (Thavasi و همکاران۲۰۱۳). اخیراً شرایط بهینه برای تولید بیوسورفاکتانت توسط *Bacillus brevis* نیز بررسی شده‌بااست (Mouafi و همکاران ۲۰۱۶). با این حال پژوهشی که به طور ویژه به تولید بیوسورفاکتانت و شرایط بهینه آن توسط *Bacillus altitudinis* پرداخته باشد تا کنون صورت نگرفته است.

شاخص امولسیون کنندگی(E_{24})

با بررسی شاخص امولسیون کنندگی پس از ۲۴ ساعت، در ۷۲ ٪ از جدایه‌ها توانایی امولسیون کنندگی گازوئیل مشاهده شد. شاخص امولسیون کنندگی از ۳/۳۳ تا ۳۴ ٪ متغیر بود. توانایی امولسیون کنندگی در ۱۱ جدایه مشاهده نشد در حالیکه سه جدایه SH24، F93 و SH11 نتیجه تولید بیوسورفاکتانت مثبت نشان داده بودند. بین قطر هاله ایجاد شده و شاخص امولسیون کنندگی همبستگی وجود نداشت. دما ، pH ، منبع هیدروکربن و مدت زمان انکوباسیون از جمله فاکتورهایی هستند که بر امولسیون کنندگی تاثیر گذارند (Mouafi و همکاران ۲۰۱۶). لذا مطالعات بیشتر برای بررسی شرایط بهینه امولسیون کنندگی توسط جدایه‌های این پژوهش نیاز است.

توانایی رشد با گازوئیل

جدایه‌ها توانایی متفاوتی در رشد با گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن نشان دادند. ۵۴ درصد جدایه‌ها توانایی بسیار خوبی در رشد با گازوئیل نشان دادند. بیشترین OD اندازه‌گیری شده در این بخش مربوط به سویه‌های *Ochrobactrum lupini* و *Bacillus subtilis* بودند. مطالعات پیشین نتایج خوبی در مورد توانایی رشد این باکتری‌ها با گازوئیل و همچنین تجزیه گازوئیل و نفت خام نشان داده است (Zhang و همکاران ۲۰۱۰ ; Abou-shanab ۲۰۱۵).

جدول ۳. بررسی تولید بیوسورفاکتانت (اندازه قطر هاله) ، شاخص امولسیفیکیشن و رشد جدایه‌ها با گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن

نام جدایه	آزمون جابجایی روغن	قطر هاله (mm)	شاخص امولسیون کنندگی(E24) (٪)	توانایی رشد با گازوئیل
SH11	+	۱۰	-	++
SH12	+	۱۲	۱۳/۳۳	+
SH13	+	۱۳	۱۳/۳۳	+
SH14	+	۱۵	۱۰	+++
SH21	+	۳۲	۱۳/۳۳	++++
SH22	+	۱۷	۶/۶۶	++++
SH23	+	۱۲	۱۶/۶۶	++++
SH24	+	۵	-	++++
SH31	+	۲۰	۳/۳۳	++++
SH32	+	۵	۳/۳۳	+++
SH33	+	۱۷	-	+
SH34	+	۲۰	-	+
SH35	+	۱۰	۳/۳۳	+
SH36	+	۹	-	+
SH41	-	-	-	−
SH42	+	۵۵	۳/۳۳	+++
SH43	+	۷	۳۳/۳۳	++++
SH44	-	-	-	−
D51	-	-	-	−
D61	+	۱۰	۶/۶۶	++++
D62	+	۶	۳۳/۳۳	++++
D63	+	۲	۳۳/۳۳	++++
T71	+	۲	۱۳/۳۳	++++
T72	+	۷	۲۰	++++
T73	-	-	-	+++

T74	+	۶	۲۳/۳	++++
F81	+	۲	۲۶/۶۶	++++
F82	+	۴	۲۳/۳۳	++++
F83	+	۴	۱۳/۳۳	++++
F84	+	۳۵	۶/۶۶	++++
F85	+	۸	۱۳/۳۳	++++
F91	+	۱۵	۳/۳۳	++
F92	+	۷	۳/۳۳	+++
F93	+	۱۴	-	+
F101	+	۹	۱۳/۳۳	++++
F102	+	۲	۲۰	++++
F103	+	۸	۳/۳۳	++++
F104	+	۸	۲۶/۶۶	++++
F105	-	-	-	–

در این جدول (++++)، (+++)، (++)، (+) و (–) نشان دهنده توانایی رشد جدایه‌ها از قوی به ضعیف با گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و براساس اندازه‌گیری OD در ۶۰۰ نانومتر می‌باشد: رشد (++++) بیانگر (۱ <OD600)، رشد (+++) بیانگر (۰/۶ <OD600)، رشد (++) بیانگر (۰/۶ > OD600 > ۰/۲) ، رشد (+) بیانگر (OD600<۰/۲) بعد از ۷ روز انکوباسیون در ۳۲ درجه سانتی گراد و (–) بیانگر عدم رشد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

براساس مطالعه انجام شده فراوانی غالب باکتری‌های هوازی تجزیه کننده آلکان در خاک‌های آلوده به نفت مربوط به خانواده‌های *Brucellaceae*، *Bacillaceae* و *Microbacteriaceae* بوده که به ترتیب ۴۹، ۳۵ و ۱۶ ٪ را تشکیل دادند. باکتری‌های گرم منفی در خاک‌های مورد مطالعه فراوانی بالاتری داشتند، اگرچه باکتری‌های گرم مثبت دارای اندوسپور نتایج بهتری درتولید بیوسورفاکتانت نشان دادند. چندین جدایه پتانسیل بالایی برای اهداف زیست پالایی به‌دلیل توانایی هم زمان در تولید بیوسورفاکتانت و رشد با گازوئیل نشان دادند. در این تحقیق ۳۴ جدایه توانایی تولید بیوسورفاکتانت و امولسیفیکیشن را داشتند. *Bacillus altitudinis* SH42 پتانسیل بالایی در تولید بیوسورفاکتانت براساس آزمون جابجایی روغن نشان داد. شاخص امولسیون کنندگی در *Ochrobactrum cytisi* D63 پس از ۲۴ ساعت ، ۳۳٪ اندازه‌گیری شد. همچنین SH24 *Ochrobactrum lupini* و سویه‌های D63 و *Bacillus subtilis* F104 رشد بسیار خوبی با گازوئیل به عنوان تنها منبع کربن نشان دادند. نتایج نشان دهنده وجود و کارایی باکتری‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت و امولسیون کننده در خاکهای مناطق نفت خیز جنوب بوده و با بررسی شرایط بهینه و افزایش کمیت و کیفیت تولید بیوسورفاکتانت از این جدایه می‌توان از آنها به هدف زیست پالایی محیط‌های آلوده به نفت بهره بیشتری برد.

منابع

Baboshin, M. A., and Golovleva, L. A. 2012. “Aerobic Bacterial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Its Kinetic Aspects.” Microbiology, 81(6): 639–50.

Lin, T., Pan P., and Cheng, S. 2010. “Ex Situ Bioremediation of Oil-Contaminated Soil.” Journal of Hazardous Materials, 176(1–3): 27–34.

Shahaliyan, F., Safahieh, A., and Abyar H. 2015. “Evaluation of Emulsification Index in Marine Bacteria Pseudomonas Sp. and Bacillus Sp.” Arabian Journal for Science and Engineering, 40(7): 1849–54.

Van Hamme, J. D., Singh, A., and Ward, O.P. 2003. “Recent Advances in Petroleum Microbiology.” Microbiology and molecular biology reviews, 67(4): 503–49.

Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., and Sayadi, S. 2011. “Simultaneous Hydrocarbon Biodegradation and Biosurfactant Production by Oilfield-Selected Bacteria.” Journal of Applied Microbiology, 111(3): 525–36.

Giebler, J., Wick, L.Y., Chatzinotas, A., and Harms, H. 2013. “Alkane-Degrading Bacteria at the Soil-Litter Interface: Comparing Isolates with T-RFLP-Based Community Profiles.” FEMS Microbiology Ecology, 86(1): 45–58.

Kloos, K., Munch, J.C., and Schloter, M. 2006. “A New Method for the Detection of Alkane-Monooxygenase Homologous Genes (AlkB) in Soils Based on PCR-Hybridization.” Journal of Microbiological Methods, 66(3): 486–96.

Comey, C. T., Koons, B. W., Presley, K. W., Smerick, J. B., Sobieralski, C. A., Stanley, D. M., and Baechtel, E S., 1994. "DNA Extraction Strategies for Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis," Journal of Forensic Sciences, 39(5): 1254--1269.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., McInerney, M. J. 2004. "Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms." Journal of Microbiological Methods, 56(3): 339–47.

Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R., and Tótola M.R. 2006. "Isolation and Characterization of Biosurfactant/Bioemulsifier-Producing Bacteria from Petroleum Contaminated Sites." Bioresource Technology, 97(6): 868–75.

Płaza, G. A., Zjawiony, I., and Banat, I. M. 2006. "Use of Different Methods for Detection of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated and Bioremediated Soils." Journal of Petroleum Science and Engineering, 50(1): 71–77.

Thavasi, R., Sharma, S., and Jayalakshmi, S. 2013. "Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria." Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, 04(02):1-6.

Al-Bahrya, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Elshafiea, A.E., Al-Bemani, S.A., Joshi, S.J., Al-Makhmari, H.S., Al-Sulaimani, H.S. 2013. "Biosurfactant Production by Bacillus Subtilis B20 Using Date Molasses and Its Possible Application in Enhanced Oil Recovery." International Biodeterioration & Biodegradation, 81: 141–46.

Yakimov, M., Timmis, K.N, Wray, V., and Fredrickson, H.L. 1995. "Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface Bacillus Licheniformis BAS50." Applied and environmental microbiology, 61(5): 1706–13.

Mouafi, F. E., Abo-Elsoud, M.M., and Moharam, M. E. 2016. "Optimization of Biosurfactant Production by Bacillus Brevis Using Response Surface Methodology." Biotechnology reports, 9: 31–37.

Zhang, Z., Gai, L., Hou, Z.,Yang, C., Ma, C.,Wang, Z.,Sun, B., He, X.,Tang, H., Xu, P. 2010. "Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils." Bioresource Technology, 101(21) : 8452–8456.

Abou-shanab, R. 2015. "Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of Ochrobactrum lupini Isolated from BTEX Enrichment Soil." International Journal of Environment, 04(03): 204–209.

Topic for submission: Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation

Investigating of emulsification index and the growth capability of isolated bacteria from oil-contaminated soils in mineral medium containing diesel oil

Kalami[1], R., Pourbabaei[* 2], A.A., Alikhani, H.A.[3]

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran
[2] Associate Prof., Soil Science Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran
[3] Full Prof., Soil Science Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran

Abstract

In recent decades, with the advancement of sustainable technologies, searching for natural and biodegradable compounds has been increasing to remediate the hydrocarbon contaminated sites. Biosurfactants are secondary microbial metabolites that are extremely important for bioremediation due to the numerous advantages over chemical biosurfactants. In this study, emulsification activity, biosurfactant production, and capability of growth with diesel oil as the sole source of carbon were investigated for 39 bacterial isolates from oil-contaminated soils of South oilfields of Khuzestan province. 90% of isolates were capable of growth with diesel oil as the sole source of carbon, and 21 of them exhibited significant growth with diesel oil. Due to the oil spreading test, 34 isolates showed biosurfactant production ability, and the diameter of the clear zone varied from 2 to 55 mm. Moreover, by measuring the emulsification index after 24h, 72% of isolates emulsified diesel oil. The results of this study show the great potential of South oilfields of Iran in the isolation of efficient bacteria, for bioremediation of petroleum compounds polluted regions.

Keywords: Oil spreading technique, South oilfields of Iran, 16S-rRNA, bioremediation.

[*] Corresponding author, Email: Pourbabaei@ut.ac.ir