The Study of Crude Oil Degradation by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Methanoic Acid and Biosurfactant Production by *Pseudomonas* sp.

Somayeh Kazemzadeh
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, s.kazem.k1@gmail.com
Nafiseh-Sadat Naghavi *
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, nafiseh_naghavy@yahoo.com
Zarrindokht Emami-Karvani
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, zarrindokht20@gmail.com
Masoud Fouladgar
Department of Basic Sciences, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, fouladgar@gmail.com

Abstract

Introduction: Due to the advantages of biosurfactants such as low environmental toxicity, biological degradation, and effectiveness in wide ranges of pH and temperature, the industrial production of them has been significantly increased. Bioremediation is the strategy of reducing or eliminating petroleum compounds using microorganisms that are capable of decomposing petroleum hydrocarbons by producing biosurfactants. The purpose of this study was to investigate the biosurfactant production and bioremediation of crude oil by the isolated bacterium from Isfahan Oil Recovery plant activated sludge.

Materials and methods: Quantitative and qualitative methods of screening such as hemolysis in blood agar medium, oil distribution, oil degradation, oil emulsification and surface tension reduction measurements were used for the detection of biosurfactant production. The bacterium was identified by biochemical tests and 16S rRNA sequencing. Residual petroleum hydrocarbons were analyzed using gas chromatography (GC-MS) analysis.

Results: The results from analysis of the composition by thin layer chromatography and Fiore infrared analysis showed that the produced biosurfactant had rhamnolipid content. The isolated bacterium was identified *Pseudomonas* Sp. The *Pseudomonas* sp. that was isolated from activated sludge of the oil refinery plant in Isfahan was able to produce rhamnolipid biosurfactant and decreased the surface tension of crude oil down to 27 mN/m. Gas chromatography analysis showed the removal of 80.45% of petroleum hydrocarbons within 20 days by the isolate. Methanoic acid accounts for 23% of the remarkable produced compounds.

Discussion and conclusion: The results of this study showed that the BA_3 isolate was capable of producing the most biosurfactant and also the decomposition of crude oil hydrocarbons. Therefore, it has the ability to be used in bioremediation, crude oil decomposition and elimination of the environmental pollutions from oil industries. Also, the produced methanoic acid can be used as an antibacterial substance in animal feed.

Key words: Rhamnolipid Biosurfactant, *Pseudomonas*, Crude Oil Bioremediation, Methanoic Acid.

* Corresponding author
Received: December 9, 2019 / **Accepted:** January 19, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)
سال هشتم، شماره ۳۱، پاییز ۱۳۹۸ ، صفحه ۸۱-۹۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹
Doi:10.22108/BJM.2020.120421.1252

مطالعهٔ تجزیهٔ نفت خام با کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی و تولید متانوئیک‌اسید و بیوسورفکتانت توسط جدایهٔ *سودوموناس*

سمیه کاظم‌زاده: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، s.kazem.k1@gmail.com
نفیسه سادات نقوی*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، nafiseh_naghavy@yahoo.com
زرین‌دخت امامی کرونی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، zarrindokht20@gmail.com
مسعود فولادگر: استادیار گروه علوم پایه، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، fouladgar@gmail.com

چکیده

مقدمه: بیوسورفکتانت‌ها مزایایی نظیر سمیت کم، تخریب‌پذیری زیستی و مؤثربودن در محدودهٔ وسیعی از اسیدیته و دما را از خود نشان می‌دهند و ازاین‌رو، استفاده از آنها افزایش چشمگیری یافته است. زیست‌پالایی، راهبرد کاهش یا حذف ترکیبات نفتی با استفاده از ریزموجوداتی است که توانایی تجزیهٔ هیدروکربن‌های نفتی را از طریق تولید بیوسورفکتانت‌ها دارند. هدف پژوهش حاضر، بررسی تولید بیوسورفکتانت و زیست‌پالایی نفت خام به کمک باکتری جداسازی‌شده از لجن فعال پالایشگاه نفت اصفهان است.

مواد و روش‌ها: تشخیص تولید بیوسورفکتانت از طریق روش‌های کمّی و کیفی غربال‌گری مانند همولیز در محیط کشت آگار خون‌دار، روش‌های پراکنش نفت و فروپاشی روغن، سنجش فعالیت امولسیون‌کنندگی و کشش سطحی انجام شد. باکتری با آزمون‌های بیوشیمیایی و تعین توالی ژن *16S rRNA* شناسایی شد. باقیماندهٔ هیدروکربن‌های نفتی با تجزیه‌وتحلیل به روش کروماتوگرافی گازی (GC-MS) بررسی شدند.

نتایج: نتایج بررسی ماهیت بیوسورفکتانت با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی لایهٔ نازک و طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز نشان دادند بیوسورفکتانت مدنظر از نوع رامنولیپیدی است. جدایهٔ باکتریایی مدنظر، *سودوموناس* شناسایی شد. در پژوهش حاضر، باکتری *سودوموناس* جداسازی‌شده از لجن فعال پالایشگاه نفت اصفهان توانست بیوسورفکتانت رامنولیپیدی را تولید کند و کشش سطحی را تا ۲۷ میلی‌نیوتن‌برمتر کاهش دهد. تجزیه‌وتحلیل کروماتوگرافی گازی، حذف ۸۰/۴۵ درصد از هیدروکربن‌های نفتی به‌واسطهٔ این جدایه را طی ۲۰ روز نشان داد. متانوئیک‌اسید به مقدار ۲۳ درصد از ترکیبات درخور توجه تولیدی بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند جدایهٔ BA_3 توانایی تولید بیشترین بیوسورفکتانت و همچنین تجزیهٔ نفت خام را دارد و پس‌از تأیید غیربیماری‌زابودن، این سویه می‌تواند در زیست‌پالایی، تجزیهٔ نفت‌خام و رفع آلودگی‌های محیط‌زیست در اثر صنعت نفت استفاده شود. متانوئیک‌اسید تولیدشده به‌شکل مادهٔ ضدمیکروبی در غذای دام کاربرد دارد.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت رامنولیپیدی، *سودوموناس*، زیست‌پالایی نفت خام، متانوئیک‌اسید

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

امروزه، آلودگی‌های زیست‌محیطی با پساب‌های صنعتی و لجن فعال مقادیر زیادی از آلاینده‌های صنعتی را در محیط‌زیست آزاد می‌کنند (۱)؛ بخشی از این آلاینده‌ها در اثر فعالیت ریزموجوداتی که در آب و خاک وجود دارند یا در اثر عوامل فیزیکی حذف می‌شوند، اما بخش عمدهٔ آنها در محیط‌زیست تجمع می‌یابند که برای سلامتی انسان مضر است (۲). آلاینده‌ها در خاک نفوذ می‌کنند و چنانچه پاک‌سازی نشوند، سبب آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شوند (۳). روش‌های پاک‌سازی فیزیکی و شیمیایی ازنظر اقتصادی آسان نیستند، ولی استفاده از ریزموجودات بومی هر منطقه در پالایش زیستی نفت خام از طریق تولید بیوسورفکتانت‌ها، روشی مقرون‌به‌صرفه ازنظر اقتصادی است (۲). بیوسورفکتانت‌ها، مولکول‌های دوگانه آب‌دوست و آب‌گریزی‌اند که امکان تشکیل میسل در حدفاصل دو فاز با قطبیت متفاوت را دارند. ویژگی سمیت کم و تجزیه‌پذیری زیاد بیوسورفکتانت‌ها سبب می‌شود اعمال کاهش کشش سطحی و بین‌سطحی مایعات و درنتیجه، تشکیل میکروامولسیون را بدون آسیب‌رساندن به محیط‌زیست انجام دهند. باکتری‌ها نفت امولسیون‌شده را تجزیه و به مواد ساده‌تر تبدیل می‌کنند. پالایش زیستی نفت خام از طریق بیوسورفکتانتی که باکتری‌ها تولید می‌کند، روشی مقرون‌به‌صرفه در صنعت است (۴).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: به‌منظور جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت و تجزیه‌کنندهٔ نفت خام، نمونه‌برداری از سطح ۵ تا ۲۰ سانتی‌متری حوضچهٔ لجن فعال پالایشگاه نفت اصفهان (طول جغرافیایی ۳۲ درجه و ۷۸ دقیقه و عرض جغرافیایی ۵۱ درجه و ۵۰ دقیقه) انجام شد و نمونه‌ها در ظرف‌های دردار استریل و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. اسیدیتهٔ نمونه‌ها با دستگاه Eco20COND، HACH، آمریکا در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد برابر ۸/۰۶ و هدایت الکتریکی آنها برابر ۱۵۲۲ میکروموس‌برسانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

غنی‌سازی، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها: محیط‌کشت حداقل پایهٔ نمکی (MSM[1]) شامل ۲ گرم $MgSO_4 \quad 7H_2O$، ۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۰۰۱ گرم $FeSO_4 7H_2O$، ۰/۰۱ گرم $CaCl_2 \quad 2H_2O$، ۱/۵ گرم KH_2PO_4، ۱/۵ گرم $Na_2HPO_4 \ 12H_2O$ حاوی ۱ درصد نفت خام پالایشگاه نفت اصفهان با چگالی ۸۶۰۷ گرم بر سانتی‌مترمکعب (تنها منبع کربن و انرژی) در اسیدیتهٔ برابر ۷ در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌منظور غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت و تجزیه‌کنندهٔ نفت خام به کار برده شد. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر لجن فعال پالایشگاه نفت اصفهان به محیط‌کشت MSM حاوی ۱ درصد نفت خام اضافه شد و به‌منظور غنی‌سازی به‌مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (۱۲۰ دوردردقیقه) گرمخانه‌گذاری شد. غنی‌سازی پنج مرتبه و به فواصل زمانی یک هفته و سپس، خالص‌سازی روی محیط‌کشت MSM آگار انجام شد (۴).

غربال‌گری جدایه‌های مولد بیوسورفکتانت: آزمون‌های همولیز خون، پراکنش نفت، فروپاشی روغن، فعالیت امولسیون‌کنندگی (آمیزندگی) و اندازه‌گیری کشش سطحی به‌منظور غربال‌گری جدایه‌ها به‌ترتیب زیر برای تمام جدایه‌ها اجرا شدند: به‌منظور تولید بیوسورفکتانت، جدایه‌های غربال‌شده طبق استاندارد نیم مک‌فارلند به محیط‌کشت MSM حاوی ۱ درصد

نفت‌خام (اسیدیتهٔ ۷) تلقیح و به‌مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (۱۲۰ دوردردقیقه) گرمخانه‌گذاری شدند. محیط‌کشت به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۸۵۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی برای تولید بیوسورفکتانت جدا شد (۵ و ۶). به‌منظور انجام آزمون همولیز خون و بررسی فعالیت همولیتیکی جدایه‌ها، کلنی هر جدایه به‌طور مجزا در محیط‌کشت آگار خون‌دار (۵ درصد حجم/حجم خون دفیبرینهٔ گوسفندی) کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. (۷). به‌منظور انجام آزمون پراکنش نفت، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون پلیت ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به مرکز پلیت افزوده شد و ۱۰ میکرولیتر محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ روی لایهٔ نفتی در سطح پلیت اضافه شد و میزان پراکنش سطح نفت در پلیت بررسی شد؛ محیط‌کشت MSM استریل حاوی نفت خام برای شاهد منفی در نظر گرفته شد (۶). به‌منظور انجام آزمون فروپاشی روغن، ۱۰ میکرولیتر محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل حاوی ۱۰۰ میکرولیتر پارافین اضافه شد و توئین ۸۰ برای شاهد مثبت و محیط‌کشت MSM استریل حاوی نفت خام برای شاهد منفی در نظر گرفته شد. چنانچه قطرهٔ کروی در سطح پارافین تشکیل می‌شد، امتیاز منفی به چاهک داده می‌شد و اگر قطرهٔ اضافه‌شده به ته چاهک منتقل یا از حالت کروی خارج می‌شد، امتیاز مثبت برای نمونهٔ مدنظر در نظر گرفته می‌شد (۷). به‌منظور انجام آزمون فعالیت امولسیون‌کنندگی، ابتدا زیست‌تودهٔ باکتریایی به کمک سانتریفیوژ با سرعت ۸۵۰۰ دوردردقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه از محیط‌کشت MSM حاوی ۱ درصد نفت خام حذف شد و سپس، ۲ میلی‌لیتر محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ همراه با ۲ میلی‌لیتر نفت خام در لوله‌های جداگانه ریخته شد. هر لوله ۲ دقیقه به‌شدت ورتکس شد و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت به‌طور ساکن در دمای محیط قرار داده شد؛ ارتفاع ناحیهٔ امولسیون‌شده در هر لوله اندازه‌گیری و نسبت ارتفاع ناحیهٔ امولسیون‌شده به ارتفاع کل مایع درون لولهٔ آزمایش، شاخص امولسیون‌کنندگی برای هر جدایه در نظر گرفته شد. محیط‌کشت MSM استریل برای شاهد منفی در نظر گرفته شد (۷).

$$E_{24}=\frac{\text{حجم لایهٔ امولسیون}}{\text{حجم کل مایع}}\times 100$$

به‌منظور اندازه‌گیری کشش سطحی به روش ورقهٔ فلزی، ۵۰ میلی‌لیتر مایع رویی به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ روی دستگاه تنسیومتر (KRUSS Model: K20 Easu Dyne) گذاشته شد؛ پس‌از برخورد ورقهٔ فلزی دستگاه به سطح مایع در پلیت دستگاه، میانگین کشش سطحی طی ۱۰ ثانیه سنجش متوالی با دستگاه گزارش شد؛ توئین ۸۰ برای شاهد مثبت و محیط‌کشت MSM حاوی ۱ درصد نفت خام بدون ریزموجود برای شاهد منفی در نظر گرفته شد. میانگین کشش سطحی نمایش‌داده‌شده روی صفحهٔ دستگاه با نمونه‌های شاهد مثبت و منفی مقایسه شد و نمونه‌های نزدیک به شاهد مثبت انتخاب شدند (۸).

ترسیم منحنی رشد جدایه: جدایهٔ مدنظر در محیط‌کشت MSM حاوی ۱ درصد نفت (تنها منبع کربن و انرژی) کشت و در دمای محیط (۱۲۰ دوردردقیقه) هوادهی شد. دانسیتهٔ نوری محیط در زمان صفر و در فواصل زمانی دوساعته تا ۹۶ ساعت و سپس در فواصل زمانی شش‌ساعته طی ۲۵ روز رشد نمایی جدایه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد (۹).

استخراج بیوسورفکتانت: جدایهٔ انتخابی بر اساس استاندارد نیم مک‌فارلند به محیط کشت MSM حاوی ۱ درصد نفت تلقیح و به‌طور جداگانه به‌مدت ۵، ۷، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (۱۲۰ دوردردقیقه) گرمخانه‌گذاری شد. آزمون پراکنش نفت طی روزهای رشد یادشده، معیاری ساده و مهم برای بررسی بیشترین بیوسورفکتانت تولیدشده از جدایهٔ منتخب در نظر گرفته و انجام شد؛ سپس به‌منظور استخراج بیوسورفکتانت، جدایهٔ منتخب به‌مدت ۷ روز در محیط‌کشت MSM حاوی ۱ درصد نفت و در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (۱۲۰ دوردردقیقه) گرمخانه‌گذاری شد؛ پس‌ازآن، سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۸۵۰۰ دوردردقیقه و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد حذف شدند و مایع رویی جمع‌آوری شد. میزان اسیدیتهٔ مایع با کلریدریک‌اسید ۱ مولار برابر با ۲ تنظیم و به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد؛ سپس به حجم برابر، حلال‌های کلروفرم و متانول (به نسبت ۱:۲) اضافه شدند و طی سه مرتبه شستشو با حلال‌های یادشده، فاز آبی دور ریخته و فاز آلی جدا شد. حلال‌ها در آون و دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد تبخیر شدند و فراوردهٔ نهایی به رنگ قهوه‌ای تیره و قوام چرب با عنوان بیوسورفکتانت خام و فعال به دست آمد. بیوسورفکتانت خشک به‌دست‌آمده وزن شد (۸).

کروماتوگرافی لایهٔ نازک[2] (TLC): این روش برای تعیین ماهیت بیوسورفکتانت تولیدشده استفاده شد. مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم بیوسورفکتانت استخراج‌شده از جدایهٔ انتخابی در ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم حل و سپس، ۱۰ میکرولیتر آن روی کاغذهای سیلیکاژل استاندارد (silica gel 60F254 plates) بارگذاری شد. سیستم حلال‌های به‌کاررفته شامل (کلروفرم/متانول/آب) به نسبت (۲/۱۵/۶۵v/v) بود. معرف نین‌هیدرین (۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر استون بدون آب) برای پیدایش بخش لیپیدی و معرف آنترون (۱ گرم در ۵ میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید و ۹۵ میلی‌لیتر اتانول) برای پیدایش بخش قندی به‌طور جداگانه روی کروماتوگرام به کار برده شدند (۹).

طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز[3] (FT-IR): شناسایی ماهیت بیوسورفکتانت جدایهٔ منتخب با دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز انجام شد. بیوسورفکتانت استخراج‌شده همراه با پودر پتاسیم‌بروماید خشک و خالص در دستگاه Bruker FT-IR spectrometer with KBr disks, Dresden, Germany با امواج تنظیم‌شده در $۴۰۰۰cm^{-1}$–۴۵۰ قرار داده شد (۱۰).

سنجش میزان حذف نفت به روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی: هیدروکربن‌های نفتی باقیمانده پس‌از بررسی حذف نفت خام طی ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز رشد جدایهٔ منتخب در ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MSM حاوی ۱ درصد نفت خام (۱۲۰ دوردردقیقه) نگهداری‌شده در دمای محیط سنجیده شدند؛ سپس بهترین زمان برای حذف نفت خام طی ۲۰ روز رشد جدایهٔ منتخب در نظر گرفته شد. هیدروکربن‌های نفتی باقیمانده در محیط‌کشت با هگزان نرمال استخراج شدند و میزان جذب نوری آنها پس‌از سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۸۵۰۰ دوردردقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر دوشعاعی مرئی- فرابنفش (TCC 240A(UV2600) در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین و غلظت کل محتوای هیدروکربنی جدایه‌ها با نمونهٔ شاهد مقایسه شد (۴).

سنجش حذف نفت به روش کروماتوگرافی گازی اسپکترومتر جرمی[4] (GC-MS): به‌منظور تأیید میزان حذف نفت به کمک جدایهٔ برتر در مرحلهٔ پیش، هیدروکربن‌های باقیمانده در محیط‌کشت با نمونهٔ شاهد در دستگاه Agilent Technologies 5975 inert MSD with triple-Axis Detector Biosystem-USA

سنجیده و مقایسه شدند. هپتامتیل‌نونان (مرک- آلمان) به مقدار ۷۹ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر برای استاندارد درونی در دستگاه کروماتوگرافی گازی با ویژگی‌های ستون DP-5MS به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر با گاز حامل هلیوم و سرعت ۱ میلی‌متردردقیقه به کار گرفته شد. برنامهٔ دمایی دستگاه به شرح زیر اجرا شد: دمای آغاز ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد؛ سپس دما با سرعت ۱۰ درجه در هر دقیقه تا ۲۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد افزایش یافت و ۲ میکرولیتر از نمونه در دمای ۲۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به دستگاه تزریق شد (۴ و ۱۱).

شناسایی اولیه و مولکولی جدایه: به‌منظور شناسایی اولیهٔ جدایهٔ مدنظر، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی بررسی و آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شدند. به‌منظور شناسایی مولکولی جدایهٔ مدنظر، DNA به روش جوشاندن استخراج شد (۱۱) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی ۱۴۹۲R و ۲۷F با استفاده از آنزیم DNA پلیمراز Ta (سیناژن، ایران) انجام شد (۱۲).

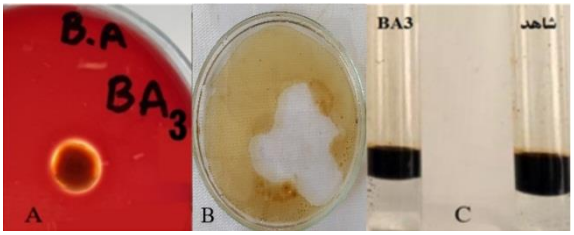
نتایج

خالص‌سازی و غربالگری باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت: تعداد ۷ جدایهٔ باکتریایی متفاوت خالص‌سازی شدند. نتایج غربال‌گری سویه‌های مولد بیوسورفکتانت برای آزمون‌های همولیز خون، پراکنش نفت، فروپاشی روغن، فعالیت امولسیون‌کنندگی (آمیزندگی) و اندازه‌گیری کشش سطحی در جدول ۱ مشاهده می‌شوند. باتوجه‌به نتایج، جدایهٔ BA_3 بهترین سویهٔ مولد بیوسورفکتانت شناسایی شد. ۴۸ ساعت پس از کشت در آزمون همولیز خون، همولیز نوع بتا در اطراف کلنی جدایهٔ BA_3 مشاهده شد (شکل ۱، A) و قطر هالهٔ همولیز پس‌از دو روز گرماگذاری به ۰/۵ سانتی‌متر رسید. در آزمون پراکنش نفت، افزودن محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سبب ایجاد ناحیهٔ شفاف در سطح لایهٔ نفتی در پلیت شد (شکل ۱، B) و قطر ناحیهٔ شفافی که جدایهٔ BA_3 ایجاد کرد، برابر با ۵/۵ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. در آزمون فروپاشی روغن، شاهد منفی در سطح پارافین قرار گرفت و شاهد مثبت به ته چاهک سقوط کرد؛ مشابه این حالت برای برخی از جدایه‌های باکتریایی مشاهده شد. در آزمون فعالیت امولسیون‌کنندگی، ناحیهٔ امولسیون‌شده به‌واسطهٔ جدایهٔ BA_3 (شکل ۱، C) به مقدار ۴۰/۵ درصد و پایدارتر از سایر جدایه‌ها مشاهده شد. در آزمون اندازه‌گیری کشش سطحی بر اساس نتایج دستگاه تنسیومتر، بیشترین کاهش کشش سطحی برای جدایهٔ BA_3 به مقدار ۲۷ میلی‌نیوتن‌برمتر گزارش شد.

جدول ۱- نتایج غربال‌گری ثانویه به‌منظور بررسی تولید بیوسورفکتانت توسط ۷ جدایهٔ باکتریایی

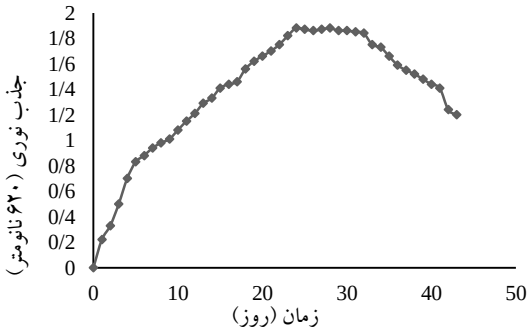
آزمون / جدایه	BA_1	BA_2	BA_3	BA_4	BA_5	BA_6	BA_7	شاهد
قطر همولیز خون (سانتی‌متر)	γ	γ	B (۰/۵سانتی‌متر)	A (۰/۵سانتی‌متر)	γ	γ	γ	γ
پراکنش نفت (سانتی‌متر)	۰	۰/۸	۵/۵	۱/۴	۱/۱	۲/۸	۰/۵	-
فروپاشی روغن	+	-	+	+	-	+	-	-
امولسیون‌کنندگی نفت خام (درصد)	۱۰	۲	۴۰/۵	۱۲	-	۲۶	۲۱	-
کشش سطحی(میلی‌نیوتن‌برمتر)	۳۸/۴	۳۷	۲۷	۳۷/۸	۲۹	۳۰/۸	۳۹	۴۴

-. نتیجهٔ منفی، +. نتیجهٔ مثبت



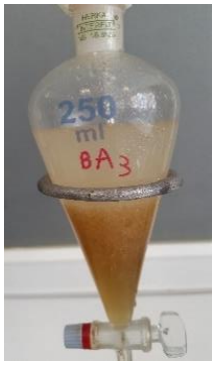
شکل ۱- برخی ویژگی‌های بیوسورفکتانت جدایهٔ BA_3؛ A. همولیز بتا، B. پراکنش نفت، C. فعالیت امولسیون‌کنندگی

ترسیم منحنی رشد جدایهٔ برتر مولد بیوسورفکتانت (BA_3): پس‌از ۲۵ روز، جدایهٔ BA_3 از فاز نمایی رشد خارج و وارد فاز سکون شد (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی رشد جدایهٔ BA_3

استخراج بیوسورفکتانت از جدایهٔ برتر مولد بیوسورفکتانت (BA_3): بیوسورفکتانت استخراج‌شده در شکل ۳ مشاهده می‌شود و وزن خشک آن برای جدایهٔ BA_3 برابر با ۱۲ گرم‌درلیتر اندازه‌گیری شد.

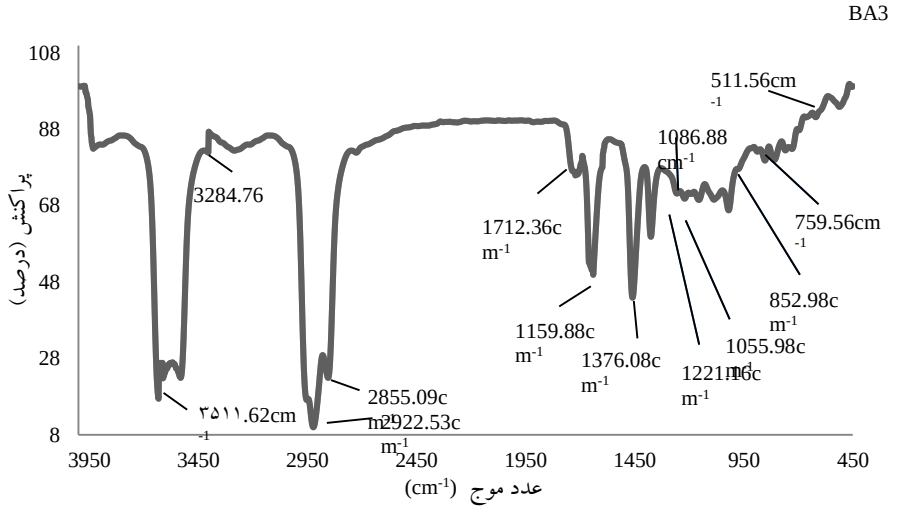


شکل ۳- بیوسورفکتانت استخراج‌شده از جدایهٔ BA_3

نتایج کروماتوگرافی لایهٔ نازک (TLC): نتایج بررسی ماهیت بیوسورفکتانت تولیدشده به‌واسطهٔ جدایهٔ BA_3 در این آزمون نشان‌دهندهٔ لکهٔ قهوه‌ای‌رنگ در اثر اسپری با معرف نین‌هیدرین و لکهٔ زردرنگ در اثر اسپری با معرف آنترون بود. نتایج نشان دادند بیوسورفکتانت استخراج‌شده حاوی ترکیبات لیپیدی و کربوهیدراتی است (شکل ۴).

شکل ۴- بیوسورفکتانت جدایهٔ BA_3 بارگذاری‌شده روی کاغذ کروماتوگرافی لایهٔ نازک

نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز (FT-IR): تفسیر ارتعاش‌های کششی و خمشی در محدودهٔ cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۵۰ بیوسورفکتانت جدایهٔ BA_3 (شکل ۵) به این ترتیب بود که باند پهن و کششی در $۳۵۱۱cm^{-1}$ به گروه عاملی O-H و ارتعاش‌های گروه هیدروکسیل آزاد مربوط بود. مقدارهای جذب در طول موج‌های cm^{-1} ۲۹۹۲ و $۲۹۲۲cm^{-1}$ به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ ارتعاش‌های کششی (-CH) مربوط به گروه‌های عاملی CH_2 و CH_3 زنجیرهٔ آلیفاتیک بودند. جذب‌های موجود در طول موج‌های $۱۶۵۶cm^{-1}$ و $۱۱۵۵cm^{-1}$ به‌ترتیب وجود گروه‌های (-C=O) و (-C-O-C-) را اثبات کردند؛ همین‌طور جذب در ناحیهٔ $۱۷۱۲cm^{-1}$ نشان‌دهندهٔ باند غیراشباع (-C=C-) مربوط به گروه کربونیل بود.



شکل ۵- نتایج آزمون FT-IR بیوسورفکتانت جدایهٔ BA_3

سنجش میزان حذف نفت به روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی: مقایسهٔ غلظت کل محتوای هیدروکربنی جدایه‌ها نشان می‌دهد جدایهٔ BA_3 توانایی بیشترین درصد حذف نفت خام را بین جدایه‌ها دارد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسهٔ بازده زیست‌پالایی نفت خام به‌واسطهٔ جدایه‌ها

نمونه‌ها	حذف نفت خام (درصد) پس‌از ۲۰ روز رشد جدایه‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر
BA_1	۴۵/۳۰ درصد
BA_2	۵۰/۴۸ درصد
BA_3	۸۰/۴۵ درصد
BA_4	۴۸/۲۰ درصد
BA_5	۷۴/۳۰ درصد
BA_6	۷۰/۲۱ درصد
BA_7	۴۱/۷۹ درصد

سنجش میزان حذف نفت به روش کروماتوگرافی گازی (GC-MS): نتایج سنجش هیدروکربن‌های باقیمانده در محیط‌کشت MSM با دستگاه GC-MS برای جدایهٔ BA_3 در مقایسه با شاهد در جدول ۳ و شکل ۶ مشاهده می‌شوند. همان‌طور که در طیف جرمی جدایهٔ BA_3 مشاهده می‌شود (شکل ۶)، ارتفاع و سطح زیر اکثر پیک‌ها نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافته است که نشان‌دهندهٔ حذف ترکیبات هیدروکربنی نفت خام به‌واسطهٔ جدایهٔ مدنظر است. ترکیباتی که در جدول ۳ با حرف R نمایش داده شده‌اند، نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافته‌اند؛ ترکیباتی که با حرف P مشخص شده‌اند، تولیدی‌اند؛ ترکیباتی که با حرف U نمایش داده شده‌اند، در محیط‌کشت کاهش نیافته‌اند یا حذف نشده‌اند و باقی مانده‌اند؛ ترکیباتی که با حرف L مشخص شده‌اند، کاهش کمتری را نسبت به نمونهٔ شاهد نشان داده‌اند. نتایج تجزیه‌وتحلیل با دستگاه طیف‌سنجی جرمی نشان می‌دهند یکی از ترکیبات ارزشمند تولیدشده به‌واسطهٔ جدایهٔ BA_3 جداسازی‌شده از لجن فعال پالایشگاه نفت اصفهان، متانوئیک‌اسید به مقدار ۲۳ درصد است.

شناسایی جدایهٔ BA_3: نتایج شناسایی اولیهٔ جدایهٔ BA_3 در جدول ۴ نشان داده شده‌اند.

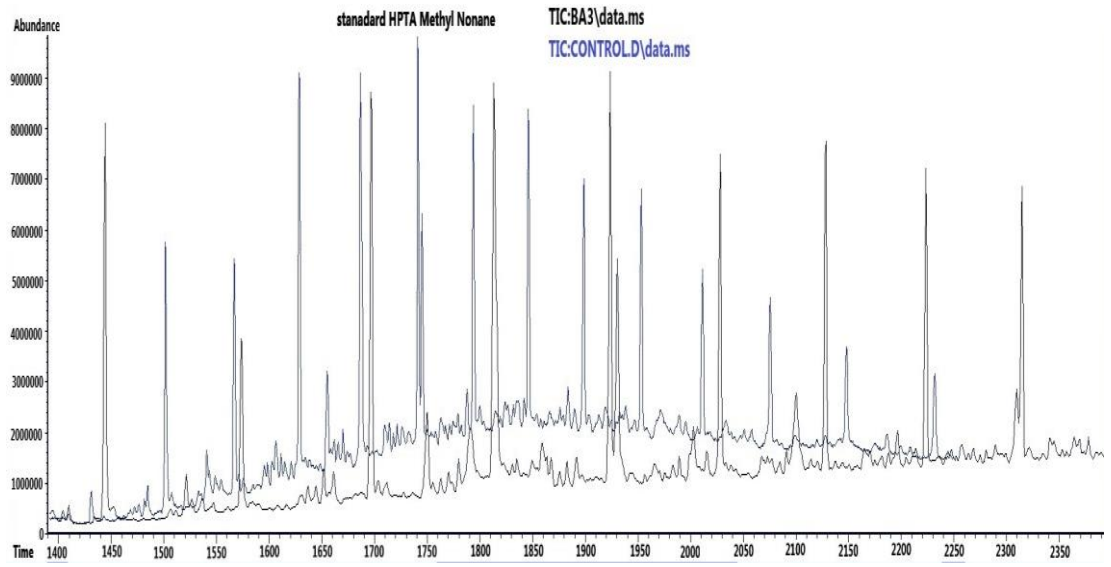
نسبت جذب DNA استخراج‌شده در طول موج

۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برابر با عدد ۱/۸۶ بود که نشان‌دهندهٔ درصد خلوص زیاد DNA است. تکثیر DNA استخراج‌شده از جدایهٔ BA_3 با استفاده از آغازگرهای عمومی ۱۴۹۲R و ۲۷F سبب تشکیل محصول PCR با اندازه باند برابر با ۱۵۰۰ جفت باز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد شد (شکل ۷).

جدول ۳- بازده زیست‌پالایی نفت خام به‌واسطهٔ جدایه BA_3 در مقایسه با شاهد

Peak number	Change of Compounds		Retention Time	Relative Abundance (control) (%)	Biodegradation Efficiency(BA_3 Strain) (%)	Chemical Formula	Molecular Weight(g/mol)
1	Butane, 2-iodo-2-methyl	R	14/094	4	90	C_5H_{11}	197/9905
2	Tridecane	R	14/312	8	98	$C_{13}H_{28}$	184/37
3	Nonahexacontanoic acid	R	14/561	3	93	$C_{69}H_{138}O_2$	999/861
4	Decane	R	14/722	3	98	$C_{20}H_{42}$	282/547
5	Tetradecane	R	15/013	9	97/5	$C_{17}H_{36}O$	256/4671
6	Oxalic acid	P	15/112	0	10	$C_{13}H_{24}O_4$	244/321
7	Hydroxy ethyl quinolin	R	15/485	11	71	$C_{20}H_{42}$	282/5475
8	Pentadecane	R	15/732	53	60	$C_{15}H_{30}$	210/405
9	Dodecane, 1-fluoro	P	15/845	0	20	$C_{12}H_{25}F$	188/33
10	Sulfurous acid, butyl tridecyl	P	16/512	0	28	$C_{17}H_{36}O_3S$	320/532
11	Naphthalene, 1,6,7-trimethyl	R	16/211	15.5	83	$C_{16}H_{34}$	226/448
12	Dodecane, 2-methyl-8-propyl-	R	16/549	32	96	$C_{17}H_{36}$	240/48
13	Pentadecane, 2,6,10-trimethyl	P	17/502	0	24	$C_{18}H_{38}$	254/502
14	Pentacosane	R	17/913	38	77	$C_{25}H_{52}$	352/69
15	Heptadecane	L	18/131	95	12	$C_{20}H_{42}$	282/5475
16	Heneicosane	R	18/987	70	89	$C_{24}H_{50}$	338/65
17	Methanoic acid	P	20/027	0	23	HCOOH	40/025
18	Tricosane	R	20/113	53	60	$C_{26}H_{54}$	366/718
19	Heneicosane	U	22/233	70	0	$C_{24}H_{50}$	338/65

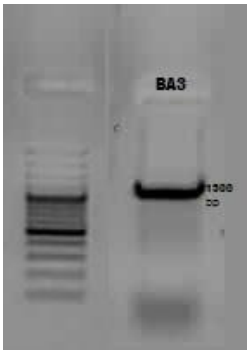
L= Less reduced, U= Un-removed, P= Product, R= Reduced



شکل ۶- مقایسهٔ تجزیه‌وتحلیل هیدروکربن‌های باقیمانده در محیط کشت MSM با دستگاه GC-MS برای جدایه BA_3 در مقایسه با شاهد

جدول ۴- نتایج شناسایی اولیهٔ جدایهٔ BA_3

ریخت‌شناسی، رنگ‌آمیزی گرم	باسیل، گرم منفی
اکسیداز	+
کاتالاز	+
رشد در ائوزین‌متیلن‌بلو	+
رشد در مک‌کانکی‌آگار	کلنی درشت، لاکتوز منفی
رنگ‌آمیزی کپسول	+
TSI	K/K، گاز منفی، H_2S منفی
IMViC	اندول منفی،MR منفی، VPمنفی، سیترات مثبت
اوره‌آز	+
احیای نیترات	+
لیپاز، لستیناز	+، +



شکل ۷- الکتروفورز محصول PCR جدایهٔ BA_3 با آغازگرهای عمومی ۱۴۹۲R و۲۷F و مشاهدهٔ باند ۱۵۰۰ جفت بازی

توالی به‌دست‌آمده از تکثیر ژن در برنامهٔ BLAST با توالی‌های موجود انطباق داده شد و ارزیابی مولکولی باکتری جداسازی‌شده، جنس *سودوموناس*[5] را تأیید کرد. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان دادند *سودوموناس* توانایی تولید بیشترین بیوسورفکتانت و تجزیهٔ هیدروکربن‌های نفت خام را دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

جنس *سودوموناس* یکی از مهم‌ترین جنس‌های خانوادهٔ سودوموناداسه[6] محسوب می‌شود. باکتری‌های موجود در این جنس همگی میله‌ای‌شکل، مستقیم یا کمی منحنی، گرم منفی غیراسیدفست و بدون اسپورند. این باکتری‌ها با یک یا تعدادی فلاژل قطبی حرکت می‌کنند و در خاک، آب، پساب‌های صنعتی و مواد آلی درحال فساد یافت می‌شوند (۱۱). در پژوهش‌های مختلف، این باکتری یکی از تولیدکنندگان بیوسورفکتانت محسوب شده است. بیوسورفکتانت‌ها میسل تشکیل می‌دهند و میسل‌ها به‌علت داشتن قابلیت زیاد در افزایش حلالیت مواد کم‌محلول در آب، اهمیت ویژه‌ای دارند (۱۳-۱۵). بیوسورفکتانت‌ها بر اساس ساختار شیمیایی و منشأ میکروبی به پنج گروه اصلی تقسیم می‌شوند که بیوسورفکتانت‌های سبک عبارتند از: گلیکولیپید، رامنولیپید، لیپوپپتید و فسفولیپیدها و بیوسورفکتانت‌های سنگین دو دستهٔ پلیمری و ذره‌ای دارند. گلیکولیپیدها عمده‌ترین بیوسورفکتانت‌هایی‌اند که تولید شده‌اند (۱۶). به‌طورکلی بیوسورفکتانت‌ها توانایی کاهش کشش سطحی و کشش بین‌سطحی یا قدرت امولسیون‌کنندگی، پتانسیل کاربرد در زمینه‌های مختلف ازجمله صنایع شیمیایی، نفت، پتروشیمی، شوینده‌ها، محصولات آرایشی، رنگ‌سازی، فرایند حذف فلزات سنگین، حذف هیدروکربن‌های نفتی و سایر حوزه‌های زیست‌فناوری را دارند (۱۴ و ۱۵). در مطالعه‌هایی که با هدف جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت از منابع محیطی انجام شده‌اند، فعالیت همولیتیک معیاری برای جداسازی اولیهٔ سویه‌های مولد بیوسورفکتانت در نظر گرفته و بررسی شده است (۱۶ و ۱۷)؛ به‌طوری‌که در مطالعهٔ مشابهی که خواجوی[7] و همکاران در سال ۲۰۱۶ برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت انجام دادند، بررسی فعالیت همولیتیک برای جداسازی

اولیهٔ ریزموجودات استفاده شد (۸). ازآنجاکه کاهش کشش سطحی محیط رشد مهم‌ترین و اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت محسوب می‌شود، پس‌از غربال‌گری اولیه در پژوهش حاضر، تعدادی از جدایه‌های باکتریایی انتخاب شدند و این آزمایش برای بررسی و تأیید توان این جدایه‌ها در تولید بیوسورفکتانت و سپس تجزیهٔ هیدروکرین‌های موجود در نفت خام استفاده شد. پارتیپان[8] و همکاران (۲۰۱۷) مطالعه‌های مشابهی را در این زمینه برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت انجام داده‌اند (۱). پژوهشگران دیگر نیز وجود بیوسورفکتانت رامنولیپیدی را در باکتری *سودوموناس* گزارش کرده‌اند؛ برای نمونه، رحمان[9] و همکاران طی پژوهشی که در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، تولید بیوسورفکتانت رامنولیپیدی به‌واسطهٔ *سودوموناس* را گزارش کردند (۱۱)؛ همچنین در مطالعه‌ای که تن‌زاده[10] و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند، جدایه‌های بومی *باسیلوس سرئوس*[11]، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس*[12] و *سودوموناس آئروژینوزا*[13] بیوسورفکتانت را تولید کردند و نشان داده شد تولید این نوع ترکیبات فعال سطحی ارتباط مستقیمی با جذب و تجزیهٔ مواد هیدروکربنی نفت خام موجود در مناطق آلوده دارد و درنتیجه سبب پالایش زیستی نفت خام از این مناطق می‌شود. جدایهٔ بومی J_{12} در مطالعهٔ یادشده، *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شد و تجزیه‌وتحلیل با دستگاه کروماتوگرافی گازی برای سنجش حذف هیدروکربن‌های نفت خام، مقدار حذف ۴۲ درصد طی ۷ روز رشد را برای این جدایهٔ بومی نشان داد (۱۸). در پژوهش حاضر مشخص شد تولید بیوسورفکتانت رامنولیپیدی به مقدار ۱۲ گرم‌درلیتر به‌واسطهٔ جدایهٔ بومی BA_3 ارتباط مستقیمی با تجزیهٔ مواد هیدروکربنی نفت خام به مقدار ۸۰/۴۵ درصد طی ۲۰ روز رشد در محیط‌کشت حداقل پایهٔ نمکی دارد و باعث پالایش زیستی مقدار درخور توجهی نفت خام می‌شود. در پژوهش دیگری که حاجی محمدی[14] و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام دادند، مقدار بیوسورفکتانت رامنولیپیدی تولیدشده از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC28793 برابر ۲ گرم‌درلیتر گزارش شد و نتایج این پژوهش نشان دادند بیوسورفکتانت رامنولیپیدی سبب سبک‌سازی نفت خام سنگین به میزان درخور توجهی می‌شود (۱۹)؛ به‌این‌ترتیب، مقایسهٔ گزارش‌های یادشده با نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد باکتری *سودوموناس* مولد مقدار درخور توجهی بیوسورفکتانت رامنولیپیدی در حضور نفت خام (تنها منبع کربن و انرژی) است. باتوجه‌به نتایج پژوهش حاضر و مقایسهٔ آن با نتایج سایر پژوهشگران، باکتری *سودوموناس* سویه BA_3 جداسازی‌شده از لجن فعال پالایشگاه نفت اصفهان مولد بیوسورفکتانت رامنولیپیدی مفید و ارزشمند است (۷ و ۱۰)؛ از سوی دیگر، تولید تجاری این نوع بیوسورفکتانت با استفاده از کمترین نمک‌های معدنی و منابع ارزان‌قیمت دیگر امکان‌پذیر و ازنظر اقتصادی بسیار مقرون‌به‌صرفه‌تر از سورفکتانت‌های گران‌قیمت شیمیایی است (۱۶)؛ همچنین این بیوسورفکتانت به‌علت منشأ زیستی، زیست‌تخریب‌پذیر است و رهاشدن آن در محیط، آلودگی زیست‌محیطی ایجاد نمی‌کند. تجزیه‌وتحلیل با دستگاه کروماتوگرافی گازی برای سنجش ترکیبات نفت خام باقیمانده در محیط‌کشت حداقل پایهٔ نمکی طی ۲۰ روز رشد *سودوموناس* سویهٔ BA_3، مقدار ۸۰/۴۵ درصد حذف ترکیبات نفتی را نشان می‌دهد؛

ازایـــن‌رو، ارتبـــاط مســـتقیمی بـــین پـــالایش زیســـتی آلودگی‌هـــای نفـــت خـــام و تولیـــد بیوســـورفکتانت رامنولیپیدی به کمک این ریزموجودات بومی در منـاطق آلوده به نفت وجود دارد و تولید تجاری بیوسـورفکتانت رامنولیپیدی و اسـتفاده از آن در صـنایع مختلـف بـه‌ویژه در صنعت نفت به‌منظور پالایش زیستی پیشنهاد می‌شـود. متانوئیک‌اسید تولیدشده در اثـر تجزیـهٔ زیسـتی نفـت بـه کمک *سودوموناس* سویهٔ BA_3، سـاده‌ترین عضـو گـروه کربوکسیلیک‌اسیدهاسـت کـه در نـیش حشـراتی ماننـد مورچه و زنبور یافت می‌شود؛ این ترکیب بیشـتر به‌شـکل مادهٔ نگهدارنده و ضدمیکروبی در غـذای دام‌هـا اسـتفاده می‌شـود. پاشـیدن مقـداری از ایـن اسـید روی علـف تازه‌خشک‌شـده از پوسـیدگی آن جلـوگیری و تـا حـد زیادی مواد مغـذی آن را حفـظ می‌کنـد. متانوئیک‌اسـید بـرای جلـوگیری از فسـاد غـذای زمسـتانی دام‌هـا در دامداری‌های بزرگ استفاده می‌شود (۲۰).

سپاسگزاری

نویسندگان مقالهٔ حاضر از معاونت محترم پژوهشی و کارکنـان آزمایشـگاه میکروبیولـوژی دانشـگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان برای دراختیارگذاشتن امکانات دستگاهی سپاسگزاری می‌کنند.

References

(1) Parthipan P., Preetham E., Machuca LL., Rahman PK., Murugan K., Rajasekar A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8(193): 1-14.

(2) Liu W., Luo Y., Teng Y., Li Z., Ma LQ. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environmental Geochemistry and Health* 2010; 32: 23-29.

(3) Umar ZD., Aziz NA., Zulkifli SZ., Mustafa M. Rapid biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using effective *Cronobacter sakazakii* MM045 (KT933253). *Methods X* 2017; 20(4): 104-117.

(4) Hassanshahian M., Emtiazi G., Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 2012; 64(1): 7-12.

(5) Pi Y., Chen B., Bao M., Fan F., Cai Q., Ze L., et al. Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. *Bioresource Technology* 2017; 232: 263-269.

(6) Karlapudi AP., Venkateswarulu T., Tammineedi J., Kanumuri L., Ravuru BK., Ramu Dirisala V., et al. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum* 2018; 4(3): 241-249.

(7) Larik I., Qazi M., Phulpoto A., Haleem A., Ahmed S., Kanhar N. *Stenotrophomonas maltophilia* strain 5DMD: An efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2019; 16(1): 259-268.

(8) Kajavi SS., Moezi A., Enayati ZN. Investigation of biosurfactant production by *Bacillus pomilis* 1529 and *Bacillus subtilis* WPI. *Biological Journal of Microoganisms* 2016; 5(17): 97-110.

(9) Anandaraj B., Thivakaran P. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *Journal Bioscience and Technology* 2010; 1(3): 120-126.

(10) Joy S., Rahman PK., Sharma S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal* 2017; 317: 232-241.

(11) Rahman PK., Pasirayi G., Auger V., Ali Z. Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2010; 55(1): 45-52.

(12) Wang Z., Fingas M., Blenkinsopp S., Sergy G., Landriault M., Sigouin L., et al. Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. *Journal of Chromatography A* 1998; 809(1-2): 89-107.

(13) Adeniji A., Okoh O., Okoh A. Analytical methods for the determination of the distribution of total petroleum hydrocarbons in the water and sediment of aquatic systems: A review. *Journal of Chemistry* 2017; 1-13.

(14) Banat IM., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti MG., Fracchia L., et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 87(2): 427-444.

(15) Sekhon Randhawa KK., Rahman PK. Rhamnolipid biosurfactantspast, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology* 2014; 5: 454-458.

(16) Ahmad Z., Arshad M., Asghar Hn., Sheikh MA., Crowley DE. Isolation, screening and functional characterization of biosurfactant producing bacteria isolated from crude oil contaminated site. *International Journal of Agriculture and Biology* 2016; 18(3): 542-548.

(17) Joshi SJ., Al-Wahaibi YM., Al-Bahry SN., Elshafie AE., Al-Bemani AS., Al-Bahri A., et al. Production, characterization, and application of *Bacillus licheniformis* W16 biosurfactant in enhancing oil recovery. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 1853-1860.

(18) Tanzadeh J., Faezi Ghasemi M., Anvari M., Issazadeh KH. Biosurfactant production and biological removal of bulk oil using native strains isolated from the southern shore lines of Caspian Sea. *Journal of Biological Microorganisms* 2018; 7(27): 113-128.

(19) Hoseini M., Amani H., Hajimohamadi R. Upgrading of heavy crude oil using rhamnolipid biosurfactant produced from *Pseudomonas Aeroginosa* ATCC28793. *Petroleum Research* 2017; 27(94): 112-122.

(20) Hajati H. Application of organic acids in poultry nutrition. *International Journal of Avian* and *Wildlife Biology* 2018; 3(4): 324-329.

[1]- Minimally salt medium
[2]- Fourier-transform infrared spectroscopy
[3]- Thin layer chromatography
[4]- Gas chromatography– mass spectrometry
[5]- Pseudomonas
[6]- Pseudomonadaceae
[7]- Kajavi
[8]- Parthipan
[9]- Rahman
[10]- Tanzadeh
[11]- *Bacillus cereus*
[12]- *Staphylococcus haemolyticus*
[13]- *Pseudomonas aeruginosa*
[14]- Hajimohammadi