مروری بر روش‌های جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار

کمیل زینالی[۱]، احمدعلی پوربابائی[۲*]، شایان شریعتی[۳]

۱- دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛ pourbabaei@ut.ac.ir
۳- دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

نفت خام و فرآورده‌های آن موجب آلودگی محیط زیست و آسیب به سلامت گیاهان، جوامع میکروبی، حیوانات و انسان‌ها می‌شود. برای اصلاح مکان‌های آلوده به نفت، روش‌های مختلفی از جمله فیزیکی، شیمیایی، فیزیکوشیمیایی و زیستی توسعه داده شده است، اما روش زیستی به دلیل صرفه‌جویی اقتصادی، سازگاری با محیط زیست و کارایی بالا، بهترین گزینه محسوب می‌شود. زیست‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی بر توانایی متابولیکی و سیستم آنزیمی میکروارگانیسم‌ها استوار است. لذا جداسازی میکروب‌های مؤثر در تجزیه ترکیبات نفتی بسیار حائز اهمیت است. باکتری‌ها و قارچ‌های نفت‌خوار به‌طور طبیعی در محیط‌های آلوده وجود دارند و می‌توانند هیدروکربن‌ها را به‌عنوان منبع کربن و انرژی متابولیزه کنند. روش جداسازی این میکروارگانیسم‌ها بر اساس غنی‌سازی است؛ که در آن از محیط کشت متنوع حاوی منبع کربنی نفتی استفاده می‌شود. پس از چندین بار تازه‌سازی محیط کشت، سوسپانسیون به محیط جامد حاوی نفت منتقل شده و کلنی‌های متفاوت جداسازی و خالص‌سازی می‌شوند. سپس غربالگری جدایه‌ها با آزمون‌های مختلف کیفی و کمی تجزیه نفت و ترشح بیوسورفکتانت انجام می‌پذیرد. باتوجه به عدم وجود مطالعه‌ای کامل و مناسب برای دستیابی به میکروب‌های توانمند تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی در ایران، در این مقاله سعی شده است مجموعه ای از روش های مختلف بکار رفته در سال های اخیر مورد بحث قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آلودگی نفتی؛ جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نفت؛ غنی‌سازی؛ محیط کشت معدنی.

مقدمه

نفت رکن اصلی اقتصاد جهانی سوخت و انرژی است. استخراج، حمل و نقل و استفاده از نفت و فرآورده‌های آن باعث آلودگی محیط زیست، خاک و آب و هوا شده و سلامت موجودات زنده در اکوسیستم‌ها و انسان را به خطر می اندازد (Žvirgždas et al., 2023). تخمین زده می‌شود که بین ۰/۰۸ تا ۰/۴ درصد از تولید سالانه نفت جهان، به عنوان آلاینده وارد محیط زیست شود. میزان نفت رها شده در محیط زیست، هر سال در حال افزایش است و مشکلات زیست محیطی بیشتری را ایجاد می‌کند. بنابراین، پاکسازی این مکان‌های آلوده با روش‌های مناسب، از اهمیت بالایی برخوردار است. روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی برای رفع آلودگی نفتی وجود دارد؛ اما این روش‌ها گران بوده، باعث ایجاد آلودگی ثانویه شده و گاهاً قابل اجرا نمی‌باشند. زیست‌پالایی به عنوان یکی از بهترین روش‌ها از نظر هزینه کم، کارایی و سازگاری با محیط زیست شناخته می‌شود. در این روش از میکروارانیسم‌های توانمند برای تجزیه زیستی ترکیبات نفتی و تبدیل آن‌ها به ترکیبات با سمیت کمتر مثل آب، CO_2 و متان استفاده می‌شود (Ali et al., 2020).

مطالعات موجود، حضور تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن در محیط های غنی از نفت، مانند مکان‌های نشت نفت و مخازن نفت را به اثبات رسانده اند (Ezennubia & Vilcáez, 2023; Baltaci et al., 2024) و فراوانی و تنوع آن‌ها ارتباط نزدیکی با نوع ترکیب نفتی و عوامل محیطی اطراف دارد (Fuentes et al., 2016; Varjani and Gnansounou, 2017). همچنین، چندین مطالعه توانایی کاتابولیک این میکروارگانیسم‌های بومی مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و جلبک‌ها را برای تجزیه هیدروکربن‌های نفتی گزارش کرده‌اند (Žvirgždas et al., 2023; Ejaz et al., 2021; Saravanan et al., 2023; Kazim et al., 2024). این میکروارگانیسم‌ها، با محیط‌های آلوده آداپته شده و مجهز به سیستم‌های آنزیمی خاصی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد تا از هیدروکربن‌ها به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند.

جهت استفاده از این میکروارگانیسم‌های مؤثر، ابتدا باید آن‌ها را از مکان‌های آلوده جداسازی کرد. منابع مختلفی برای جداسازی باکتری‌ها و قارچ‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی وجود دارد، مانند: خاک، آب، رسوب، ریزوسفر، ریشه گیاهان آلوده، لجن نفتی، فاضلاب، گل حفاری، سیال حفاری و پساب صنایع نفت. اولین مرحله جداسازی میکروب‌های نفت‌خوار، غنی‌سازی است. طی فرایند غنی‌سازی، از یک محیط کشت حداقلی معدنی نمکی به منظور افزایش رشد و جمعیت میکروب‌های هدف و جلوگیری از رشد میکروب‌هایی که نیازی به آن‌ها نیست استفاده می‌شود (Madhuri et al., 2019). به منظور جداسازی میکروارگانیسمی با توانایی تجزیه ترکیب نفتی موردنظر، می‌توان از منابع کربن مختلفی مثل نفتالن، فنانترن، BTEX، لجن نفتی، آلکان‌های مختلف ویا نفت خام در محیط کشت استفاده کرد.

باتوجه به وجود منابع و صنایع نفتی گسترده در ایران و آلودگی ناشی از آن‌ها، ضرورت جداسازی باکتری‌ها و قارچ‌های توانمند در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی طبق روش‌های معتبر و شناسایی آن‌ها، بیش از پیش احساس می‌شود. همچنین، عدم وجود منبعی جامع و مشخص برای شرح مراحل و روش‌های جداسازی این میکروب‌ها، نویسندگان را بنا بر این داشت تا این مقاله مروری را نگارش کنند. امید است مطالعه حاضر، گامی مؤثر در جهت پاکسازی و بازیابی محیط‌های آلوده به نفت در ایران باشد.

هیدروکربن‌های نفتی

هیدروکربن‌های نفتی که به‌طور گسترده به‌عنوان سوخت‌های فسیلی شناخته می‌شوند، از منابع معدنی طبیعی نظیر قیر، زغال‌سنگ و نفت خام به‌دست می‌آیند (Hung et al., 2020). این ترکیبات عمدتاً از هیدروژن و کربن تشکیل شده‌اند و مقادیر کمتری از اکسیژن، گوگرد و نیتروژن را شامل می‌شوند (Dutta et al., 2017). هیدروکربن‌های نفتی به انواع مختلفی تقسیم می‌شوند، از جمله هیدروکربن‌های آلیفاتیک، هیدروکربن‌های آروماتیک (شامل آروماتیک‌های تک‌حلقه‌ای و چندحلقه‌ای)، رزین‌ها و آسفالتن‌ها (Mahjoubi et al., 2018). از نظر زیست‌تخریب‌پذیری، آلکن‌ها و آلکان‌های زنجیره کوتاه به‌راحتی تجزیه می‌شوند، در حالی که آلکان‌های شاخه‌دار و آروماتیک‌ها تجزیه‌پذیری کمتری دارند.

ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک

هیدروکربن‌های آلیفاتیک که به‌عنوان پارافین نیز شناخته می‌شوند، عمدتاً در ذخایر گاز طبیعی و نفتی که از تجزیه گیاهی و حیوانی حاصل می‌شوند، یافت می‌شوند (Pandolfo et al., 2023). این ترکیبات هیچ پیوند دوگانه‌ای ندارند و فرمول عمومی

آن‌ها CnH_{2n} است. آلیفاتیک‌ها به دو گروه آلکان‌ها (ساختار خطی) و سیکلوآلکان‌ها (ساختار حلقه‌ای) تقسیم می‌شوند و می‌توانند خطی یا شاخه‌ای باشند (Varjani, 2017). در مقابل، آروماتیک‌ها، مولکول‌های هیدروکربنی حلقه‌ای هستند که به دو دسته هیدروکربن‌های آروماتیک تک‌حلقه‌ای (مانند BTEX) و هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) تقسیم می‌شوند (Pandolfo et al., 2023). PAHها به‌عنوان آلاینده‌های خطرناک محیطی شناخته می‌شوند که از فرآیندهای بیولوژیکی و احتراق ناقص ناشی می‌شوند و به دلیل سمیت و ماندگاری آن‌ها در محیط، توجه ویژه‌ای به آن‌ها معطوف شده است (Huang and Batterman, 2014; Ghosal et al., 2016).

اثرات ترکیبات نفتی بر موجودات زنده و انسان

ترکیبات موجود در نفت خام، عمدتاً سرطان‌زا و تراتوژن[1] هستند و می‌توانند به قسمت‌های مختلف بدن انسان آسیب برسانند. گزارش شده است که این ترکیبات برای کوتاه مدت یا بلند مدت مضر هستند (Varjani et al., 2015; Varjani., 2017). اثرات کوتاه مدت هیدروکربن‌های نفتی علائمی از قبیل سوزش چشم، حالت تهوع، سوزش پوست، استفراغ، اسهال و التهاب است (Kim et al., 2013; Yan et al., 2015; Varjani and Upasani., 2017). آنتراسن[2]، بنزو(a) پیرن[3] و نفتالن به عنوان تحریک کننده مستقیم پوست شناخته می‌شوند و عوارض بلند مدتی دارند که به آرامی به قسمت‌های مختلف بدن آسیب می‌رساند. این علائم به عنوان اثرات مزمن مانند کاهش عملکرد سیستم ایمنی، آب مروارید، آسیب کلیه و کبد (به عنوان مثال یرقان)، مشکلات تنفسی، آسم و ناهنجاری‌های عملکرد ریه طبقه‌بندی می‌شوند (Varjani et al., 2018). نشت نفت همچنین، سلامت جوامع زیستی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در پژوهشی ثابت شد غلظت‌های بالای هیدروکربن‌ها در خاک (بیشتر از ۲۰۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) باعث کاهش تنوع میکروبی خاک، پیچیدگی شبکه میکروبیوم خاک، الگوهای همزیستی گونه‌ها و ژن‌های تثبیت کننده کربن و نیتروژن موجود در میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (Gao et al., 2022). وجود هیدروکربن-های نفتی در زمین‌های کشاورزی از طریق تأثیر بر فرایند جوانه‌زنی باعث کاهش رشد گیاه می‌شود؛ همچنین با اثرگذاری بر تهویه خاک یکی از عوامل کاهش حاصلخیزی خاک می‌باشد (Deborah Gnana Selvam and Thatheyus, 2018). بنابراین، تخریب این ترکیبات سمی و مضر، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

تأثیر نفت بر محیط زیست

هنگامی که TPH از طریق تصادفات، رهاسازی از صنایع، نشت‌ها یا به عنوان یک محصول جانبی از مصارف تجاری و خصوصی به محیط زیست وارد می‌شود، از طریق خاک به آب‌های زیرزمینی منتقل می‌شود. برخی از هیدروکربن‌ها ممکن است توسط برخی از موجودات به فرکشن‌های کوچک‌تری تجزیه شوند. برخی از ترکیبات فرار به اتمسفر تبخیر می‌شوند و برخی دیگر برای مدت طولانی‌تری در خاک می‌مانند و توسط سایر میکروارگانیسم‌های خاک تجزیه می‌شوند (Nardini et al., 2010). طبق تحقیقات آژانس حفاظت از محیط زیست (USEPA, 2007)، انتشار TPH در محیط زیست باعث آلوده شدن آب آشامیدنی، ایجاد خطرات آتش‌سوزی و انفجار، کاهش کیفیت هوا و آب، به خطر افتادن کشاورزی، تخریب مناطق تفریحی، تخریب زیستگاه‌ها، تهدید سلامت و ایمنی عمومی و هدر رفتن منابع تجدید ناپذیر سوخت می‌شود. چرخه بیوژئوشیمیایی PAHها در شکل ۴ قابل مشاهده است. بازیابی خاک‌های آلوده به نفت ممکن است سال‌ها به طول بیانجامد. Yang et al., (2015) گزارش دادند انفجار خط لوله نفت چینگدائو که منجر به آلودگی خاک شد، به دلیل خطای انسانی و در نتیجه برنامه‌ریزی و نگهداری ضعیف خط لوله و سهل‌انگاری پس از مشخص شدن نشت آن بوده است.

همان‌طور که ذکر شد، آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی به دلایل متعددی یک نگرانی است. اول از همه، هنگامی که این ترکیبات در خاک آزاد می‌شوند، به خصوص زمانی که وارد فضاهای محدود می‌شوند، فراریت برخی از هیدروکربن‌ها می‌تواند خطر آتش‌سوزی یا حتی انفجار به دنبال داشته باشد. همچنین آلاینده‌ها می‌توانند در انتقال مواد غذایی و آب تداخل ایجاد کنند که منجر به تخریب زمین می‌شود. بقایای نفت ممکن است به ذرات خاک متصل شوند و سال‌ها در خاک باقی بمانند. اگرچه جمعیت میکروبی تجزیه‌کننده خاک می‌تواند از آلاینده‌ها به عنوان منبع کربن استفاده کرده و سود ببرند، اما این

[1] Teratogen
[2] Anthracene
[3] Benzo (a) pyrene

ترکیبات برای اکثر موجودات زنده خاک سمی هستند. همچنین این ترکیبات با القای بو، طعم و ظاهر نامناسب، زیبایی محیط زیست را از بین می‌برند. بنابراین هیدروکربن‌های نفتی یک تهدید بالقوه برای محیط زیست به شمار می‌آیند (Adipah, 2019).

تجزیه میکروبی ترکیبات نفتی

میکروارگانیسم‌ها به عنوان بخش مهمی از اکوسیستم خاک، عمدتاً در چرخه مواد و انرژی در خاک نقش دارند. باکتری‌ها به‌عنوان بیشترین میکروارگانیسم‌های خاک، عمدتاً تغذیه هتروتروفیک دارند. آنها در خاک سطحی پخش شده و فعال‌ترین جزء میکروارگانیسم‌های خاک هستند. *اکتینومیست‌ها* به طور گسترده در خاک‌هایی مشاهده می‌شوند که دارای مواد آلی و pH بالا هستند (Wang et al., 2021). درصد کمی از میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفتی هستند (۱-۰/۱٪) (Koohkan et al., 2023) (جدول ۱). در خاک غیر آلوده، تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی در مقایسه با خاک آلوده به نفت نسبتاً کم است (Wang et al., 2021). انتخاب میکروارگانیسم‌های مناسب گامی حیاتی در پاکسازی زیستی است، زیرا گونه‌ها از نظر توانایی تخریب آلاینده‌ها بسیار متفاوت هستند (Koohkan et al., 2023). به‌عنوان مثال، به دلیل غشای خارجی نفوذناپذیر باکتری‌های گرم منفی، به‌طور کلی پذیرفته شده است که این نوع باکتری درمقایسه با باکتری‌های گرم مثبت نسبت به هیدروکربن‌های نفتی تحمل بیشتری دارد (Babalola et al., 2016). با این حال، در مطالعات دیگری، چندین باکتری گرم مثبت مقاومت بیشتری داشتند (Lăzăroaie, 2010). در مطالعه Ozyurek & Bilkay, (2020) تلقیح کنسرسیومی متشکل از ترکیب سویه‌های باکتریایی گرم مثبت و منفی نتیجه بهتری نسبت به تلقیح سویه‌های گرم مثبت و منفی به تنهایی داشت. نویسندگان همچنین، بیان کردند کنسرسیوم متشکل از باکتری‌های گرم منفی عملکرد بهتری (۷۷٪ تجزیه بنزین) نسبت به کنسرسیوم باکتری‌های گرم مثبت (تجزیه ۴۸ درصدی) داشت. برخی از میکروارگانیسم‌ها به دلیل وجود ترکیبات سمی و خطرناک قادر به رشد و فعالیت در خاک‌های آلوده به نفت نیستند (Nandy et al., 2021). بنابراین، جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که در حذف ترکیبات نفتی کارآمد هستند به منظور تسریع در اصلاح خاک‌های آلوده به نفت ضروری است (Koohkan et al., 2023).

جدول ۱- جنس‌های میکروبی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی (Tang et al., 2010; Chandra et al., 2013; Ossai et al., 2020; Imron et al., 2020; Vimali et al., 2021; Pandolfo et al., 2023)

نوع میکروارگانیسم	جنس‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن
باکتری‌ها	*Achromobacter, Acinetobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Actinomycetes, Bacillus, Brevibacterium, Brevibacillus, Citrobacter freundii, Chromobacterium, Corynebacterium, Enterobacter cloacae, Micrococcus, Mycobacterium, Micromonospora, Nocardia, Serratia marcescens, Sphingomonas, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Streptomyces parvus, Sphingomonas, Spirillum, Ochrobactrum, Pseudomonas, Rhodococcus, Vibrio*
قارچ‌ها	*Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Mortierella, Rhodotorula, Selenotila, Trichosporon, Cladosporium, Cunninghamella, Fusarium, Gliocladium, Mucor, Verticillium, Phanerochaete*
جلبک‌ها	*Anabaena, Oscillatoria, Nostoc, Coelastrella, Scenedesmus*

مراحل جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی

۱- تهیه نمونه و انتقال به آزمایشگاه

اولین مرحله جداسازی میکروب‌های تجزیه‌کننده نفت، تهیه نمونه آلوده می‌باشد. این نمونه می‌تواند خاک، آب، رسوب، فاضلاب، پساب نفتی، لجن نفتی و یا هر منبعی که احتمال وجود میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار در آن است، باشد (Tian et al., 2018; Ifediegwu et al., 2024; Samimi & Shahriari-Moghadam, 2024; Aboud et al., 2021; Xu et al., 2020; Zeynali et al., 2025). نمونه مورد نظر باید با استفاده از بیلچه، سرنگ، سمپلر، اوگر و یا هر وسیله نمونه‌برداری دیگری که استریل باشد برداشته شده و به بسته‌های استریل منتقل شود (Munezero et al., 2024). این بسته‌های استریل می‌توانند

پلاستیکی یا از جنس شیشه باشند. سپس نمونه، برای فریز شدن فعالیت‌های میکروبی و ثابت ماندن فعل و انفعالات بیوشیمیایی، سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری می‌شود (Munezero et al., 2024). در مرحله بعد، برای شروع فرایند غنی‌سازی، نمونه خاک، گل یا رسوب مورد نظر باید خشک، کوبیده و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شود (Khan et al., 2017).

۲- غنی‌سازی میکروب‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی

برای جداسازی باکتری‌ها و قارچ‌های مورد نظر، باید از محیط کشت غنی‌سازی مایع استفاده شود. محیط غنی‌سازی محیطی است که تنها امکان رشد نوع خاصی از میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کند. این کار با افزودن عناصر غذایی، بازدارنده‌ها یا شرایط محیطی خاصی انجام می‌شود که فقط اجازه رشد میکروب مورد نظر را می‌دهد (Schlegel & Zaborosch, 1993). در غنی‌سازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نفت، معمولاً از محیط‌های معدنی نمکی مثل MSM، Bushnell-Haas، M9 وCzapek's Dox Brorh (برای جداسازی قارچ‌ها)، استفاده می‌شود و منبع کربن مورد نظر به عنوان تنها منبع کربن و انرژی برای میکروب‌ها، به محیط اضافه می‌شود (Munezero et al., 2024; Samimi & Shahriari-Moghadam, 2024; Kuppusamy et al., 2016; Hamad et al., 2021). این منبع کربن می‌تواند نفت خام، نفت سفید، گازوئیل، بنزین، روغن موتور، نفتالن، فنانترن، n-آلکان‌ها و ترکیبات آروماتیک مختلف باشد. مقدار ترکیب نفتی اضافه شده به محیط کشت از ۰/۱ تا ۱۰ درصد متفاوت است؛ اما مقادیر معمول، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ درصد می‌باشند. بنابراین، در این محیط‌ها فقط باکتری‌ها یا قارچ‌هایی رشد خواهند کرد که توانایی استفاده از منبع کربنی افزوده شده و تجزیه آن را داشته باشند. محیط‌های غنی‌سازی از ترکیب عناصر غذایی ضروری و غیرضروری (کربن، نیتروژن، فسفر، پتاسیم، منیزیم، آهن، گوگرد، کلسیم، منگنز، روی، مس، مولیبدن، کلر و سدیم) برای رشد میکروارگانیسم‌ها ساخته می‌شوند. این عناصر به مقادیر معین به شکل نمک به آب مقطر اضافه شده و پس از تنظیم pH، اتوکلاو می‌شوند. یک نمونه محیط غنی‌سازی MSM برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام به همراه ترکیبات آن در جدول (۲) قابل مشاهده است.

برای انجام غنی‌سازی ۵ یا ۱۰ (گرم/میلی‌لیتر) از نمونه مورد نظر به ارلن مایر حاوی ۹۰ یا ۹۵ میلی‌لیتر محیط غنی‌سازی استریل (Cao et al., 2023) افزوده شده و ارلن‌ها در شیکرانکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۶۰ RPM (Wang et al., 2015) به مدت هفت روز گرماگذاری می‌شوند. بعد از یک هفته، ۵ یا ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون رشد یافته به ۹۰ یا ۹۵ میلی‌لیتر محیط غنی‌سازی تازه همراه با منبع کربنی، تلقیح می‌شود. این کار مجدداً بعد از یک هفته تکرار شده و مجموعاً بعد از سه مرحله غنی‌سازی، نوبت به جداسازی و خالص‌سازی میکروب‌های رشد یافته در محیط می‌رسد. شایان ذکر است که فرایند غنی‌سازی به شکل‌های مختلفی توسط متخصصین انجام می‌شود (مدت گرماگذاری، دما، دور شیکر، حجم محیط کشت و تعداد مراحل غنی‌سازی متفاوت)؛ اما روش‌های ذکر شده در این مقاله، مرسوم‌ترین و معتبرترین روش‌ها هستند.

جدول ۲- ترکیبات و مقادیر یک محیط کشت MSM برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها با منبع کربنی نفت خام (Tian et al., 2018)

ترکیب	مقدار
آب مقطر	1 L
NH_4NO_3	1 g/L
$CaCl_2$	0.02 g/L
Mg_2SO_4	0.05 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
$CaCl_2$	2 mg/L
$FeCl_3.6H_2O$	50 mg/L
$MnCl_2.4H_2O$	0.5 mg/L
$ZnSO_4.7H_2O$	10 mg/L
$CuSO_4$	0.5 mg/L
نفت خام	0.5%

۳- جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها

بعد از پایان مرحله غنی‌سازی، سوسپانسیون رشد یافته باید به محیط معدنی نمکی جامد (آگار) اتوکلاو شده همراه با منبع کربن نفتی منتقل شود تا باکتری‌ها و قارچ‌های متفاوت ظاهر شوند. با افزودن ۱۵ یا ۲۰ درصد آگار به محیط‌های معدنی مایع می‌توان محیط کشت جامد معدنی ساخت. این محیط کشت باید حاوی یک یا دو قطره یا مقدار مشخصی نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی باشد. بعد از آماده‌سازی محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رشد یافته طی مرحله غنی‌سازی، به کمک سمپلر بر روی محیط MSM-agar تلقیح شده و کشت اسپرد انجام می‌گیرد. پلیت‌ها باید به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شوند (Behera et al., 2020). در پایان دوره انکوباسیون و رشد جدایه‌ها، کلنی‌های متفاوت از نظر شکل ظاهری در محیط نوتریت آگار کشت خطی می‌شوند تا خالص شوند. خالص‌سازی باید تا جایی انجام شود که تمام کلنی‌های رشد یافته در محیط نوترینت آگار شبیه هم باشند و آلودگی و ناخالصی در آن‌ها دیده نشود (Brzeszcz et al., 2024).

۴- غربالگری و اثبات توانایی تجزیه زیستی جدایه‌ها

آزمون‌های کیفی و کمی تجزیه نفت

جهت غربالگری و اطمینان از توانایی زیست‌پالایی جدایه‌های برتر برای تلقیح به مکان‌های آلوده، باید توانایی تجزیه آن‌ها را در قالب آزمون‌های کیفی یا کمی ارزیابی کرد. یکی از آزمون‌های کیفی، بررسی توانایی رشد جدایه‌ها در محیط MSM به روش کدورت‌سنجی است. در این روش ابتدا سویه‌ها تا رسیدن به OD_{600}=0.5 در محیط نوترینت براث کشت داده می‌شوند. سپس سویه‌ها به میزان ۰/۵ تا ۵ درصد (حجمی/حجمی) به محیط MSM حاوی ۱ درصد نفت خام تلقیح می‌شوند. بعد از دوره انکوباسیون (۵ تا ۲۰ روز)، کدورت محیط کشت به منظور سنجش میزان رشد جدایه با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. روش کیفی دیگری برای بررسی توانایی رشد جدایه‌ها در حضور نفت وجود دارد و آن کشت در محیط MSM-agar است. در این روش، ابتدا جدایه‌ها در محیط نوترینت آگار کشت خطی ۱۸ ساعته می‌شوند. سپس با استفاده از لوپ استریل، یک کلنی از هر جدایه برداشته شده و در محیط MSM-آگار حاوی نفت کشت خطی داده می‌شود. پلیت‌ها باید در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در انکوباتور به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری شوند (Mishra et al., 2019). درنهایت، توانایی رشد و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی توسط باکتری، از طریق شمارش تعداد کلنی رشد یافته در محیط یا سرعت و تداوم رشد جدایه، مشخص می‌شود (Behera et al., 2021; Zeynali et al., 2024). در آزمون کمی، برای تهیه مایه‌تلقیح، ابتدا باکتری‌ها در محیط نوترینت براث تا رسیدن به OD_{600}=0.5 کشت داده می‌شوند. سپس ۵٪ (حجمی/حجمی) از مایه‌تلقیح به ارلن‌مایر حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط MSM استریل همراه با ۱٪ نفت خام تلقیح می‌شود. البته حجم تلقیح و محیط کشت می‌تواند متغیر باشد. سپس ارلن‌ها در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۶۰ RPM (Ferreira et al., 2022) به مدت هفت روز شیک می‌شوند. بعد از هفت روز، جهت تعیین میزان نفت باقی‌مانده، هیدروکربن‌های موجود در محیط به روش استخراج مایع-مایع با استفاده از قیف جدا کننده و حلال آلی، استخراج می‌شوند. در این روش معمولاً به اندازه حجم محیط MSM، حلال n-هگزان یا دی‌کلرومتان یا مخلوطی از این دو با نسبت مشخص به ارلن اضافه می‌شود. بعد از کمی هم زدن، مخلوط حاصله به قیف جداکننده منتقل می‌گردد. سپس محتویات داخل قیف به مدت ۱۰ دقیقه خوب هم زده شده و فاز آلی (هیدروکربنی) از فاز آبی جدا می‌شود. فاز آلی به یک بشر منتقل شده و جهت پراندن حلال، در زیر هود قرار داده می‌شود (Lee et al., 2018). بعد خشک شدن کامل نمونه، میزان هیدروکربن باقی‌مانده در محیط به روش وزن‌سنجی یا کروماتوگرافی گازی تعیین می‌شود (Tripathi et al., 2023; Zeynali et al., 2024). طبیعتاً درصورت کم شدن مقدار نفت محیط، می‌توان نتیجه گرفت که میکروب مورد نظر توان تجزیه این ترکیب را دارد.

ترشح بیوسورفکتانت

توانایی ترشح بیوسورفکتانت هم یکی دیگر از آزمون‌های غربالگری جدایه‌های برتر می‌باشد. ترشح بیوسورفکتانت توسط میکروب‌های توانمند می‌تواند با افزایش زیست‌فراهمی ترکیبات نفتی، تجزیه زیستی این ترکیبات را افزایش دهد (Othman et al., 2022). تحقیقات نشان داده‌اند که این ترکیبات با تجمع در سطح مشترک مایعات غیرقابل امتزاج، کشش سطحی را کاهش می‌دهند و به این ترتیب، حلالیت، فراهمی زیستی و تجزیه ترکیبات آلی یا نامحلول آبگریز مانند هیدروکربن‌های نفتی را افزایش می‌دهند (Zeynali et al., 2024).

آزمون‌های ترشح بیوسورفکتانت به‌طور کلی به سه تست اصلی گسترش نفت[1]، کشش سطحی[2]، و شاخص امولسیون‌کنندگی[3] (E24%) تقسیم می‌شوند. برای انجام این آزمون‌ها، ابتدا باید باکتری‌ها در محیط MSM حاوی ۰/۵ درصد نفت تلقیح و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۶۰ RPM انکوبه شوند تا بیوسورفکتانت تولید شود. پس از پایان دوره انکوباسیون، مایع رویی که حاوی بیوسورفکتانت است، با سانتریفیوژ در سرعت ۱۰،۰۰۰ RPM و دمای ۴ درجه سلسیوس جدا شده و برای انجام آزمون‌های مربوط به بیوسورفکتانت آماده می‌شود (Zeynali et al., 2024).

گسترش نفت

تست گسترش نفت یکی از روش‌های ساده و کارآمد برای ارزیابی توانایی میکروارگانیسم‌ها در تولید سورفکتانت‌های زیستی و تأثیر آن‌ها بر کاهش کشش سطحی بین آب و نفت است. با کاهش کشش سطحی، بیوسورفکتانت می‌تواند به بهبود تجزیه هیدروکربن‌های نفتی کمک کند. این آزمون به‌ویژه در زمینه‌های زیست‌پالایی و بیوتکنولوژی کاربرد دارد (Sharma et al., 2022). در این آزمون، یک پتری‌دیش شیشه‌ای یا پلاستیکی ۶ سانتی یا ۸ سانتی تمیز انتخاب می‌شود و مقداری آب (معمولاً آب مقطر) در آن ریخته می‌شود. مقدار معینی نفت (۱۰ میکرولیتر) به آرامی بر روی سطح آب اضافه می‌شود تا یک لایه نازک روی آب تشکیل شود. سپس، به کمک میکروسمپلر ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی هر سویه به مرکز نفت خام از فاصله نزدیک اضافه می‌شود. درنهایت، بعد از ۳۰ ثانیه، قطر هاله ایجادشده در اثر باز شدن نفت با استفاده از یک خط‌کش به طور دقیق اندازه‌گیری می‌شود (Li et al., 2022). هرچه قطر هاله ایجاد شده بزرگتر باشد، نشان از ترشح بیشتر بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم مورد نظر است. Thavasi et al., (2011) بیان کردند که نتیجه مثبت برای ترشح بیوسورفکتانت، قطر هاله حداقل ۰/۵ سانتی‌متری درنظر گرفته می‌شود.

کشش سطحی

هدف اصلی این تست اندازه‌گیری کشش سطحی آب قبل و بعد از افزودن بیوسورفکتانت است. کاهش کشش سطحی نشان‌دهنده کارایی بیوسورفکتانت در تسهیل گسترش و تجزیه هیدروکربن‌ها است. در این روش معمولاً از تانسیومتر پلاریزاسیون برای اندازه‌گیری کشش سطحی استفاده می‌شود. روش انجام آزمون به این صورت است که ابتدا مایع رویی (حاوی بیوسورفکتانت) به آرامی در تانسیومتر قرار می‌گیرد. سپس کشش سطحی مایع با استفاده از تکنیک‌هایی مانند روش حلقه دوتایی یا روش قطره اندازه‌گیری می‌شود (Jui et al., 2024).

شاخص امولسیون‌کنندگی (E_{24}%)

این تست برای اندازه‌گیری توانایی بیوسورفکتانت در ایجاد و حفظ امولسیون بین دو فاز غیرقابل امتزاج (مانند آب و یک ترکیب نفتی) استفاده می‌شود. هرچه مقدار امولسیون کنندگی بیشتر باشد به افزایش زیست‌فراهمی ترکیبات نفتی و تسهیل در تخریب زیستی آن‌ها کمک می‌کند (Kieu et al., 2024). برای انجام این آزمون ابتدا در یک لوله آزمایش، مقدار مشخصی از مایع رویی و یک مقدار معین از ماده نفتی (مانند نفت خام یا n-هگزان) ترکیب می‌شود. نسبت معمولاً ۱:۱ یا ۱:۲ بین آب و ماده نفتی است. مخلوط به مدت مشخصی (۲ تا ۵ دقیقه) با استفاده از دستگاه ورتکس به‌خوبی هم زده می‌شود تا امولسیون ایجاد شود. پس از هم زدن، مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری می‌شود. سپس، ارتفاع فاز آب و فاز روغن در لوله آزمایش اندازه‌گیری می‌شود (Zeynali et al., 2024). درنهایت، درصد امولسیون‌کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

[1] Oil spreading
[2] Surface tention
[3] Emulsification index

$$\%E_{24} = (\frac{H_{emulsion}}{H_{total}}) \times 100$$

که در آن:

$H_{emulsion}$ ارتفاع فاز امولسیون شده پس از ۲۴ ساعت و H_{total} ارتفاع کل ستون مایع است.

به طور کلی، مقدار E_{24}% بالای ۵۰٪ معمولاً به‌عنوان نشانه‌ای از توانایی میکروارگانیسم‌ها در تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته می‌شود. این مقادیر ممکن است بسته به نوع میکروارگانیسم، شرایط آزمایش و نوع بیوسورفکتانت‌های تولیدشده تغییر کند، بنابراین اعتبارسنجی نتایج در شرایط مختلف مهم است (Csutak et al., 2024).

برخی از مطالعات انجام شده در این زمینه

Behera et al., (2021) در مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک غنی‌سازی، موفق به جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی شدند. آن‌ها ۱ گرم از لجن نفتی پالایشگاه را به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط استریل MSM اضافه کردند. هیدروکربن‌های موجود در لجن نفتی به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی برای باکتری‌ها استفاده شد. pH اولیه محیط روی ۷ تنظیم شد و ارلن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۱۲۰ RPM در شیکر دوار گرماگذاری شد. بعد از ۳ دوره غنی‌سازی ۷ روزه، سوسپانسیون رشد یافته به محیط MSM-agar غنی‌شده با ۰/۵ درصد بنزین منتقل شد و بعد از رشد، دوازده جدایه با مورفولوژی متفاوت روی محیط MSM-agar ظاهر شدند.

در مطالعه دیگری Ejaz et al., (2021)، از محیط معدنی پایه نمکی به همراه ۱ درصد نفت خام برای غنی‌سازی جدایه‌های تجزیه‌کننده نفت استفاده کردند. بدین منظور ابتدا، ۱۰ گرم خاک آلوده به ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۵ میلی‌لیتر محیط معدنی اضافه شد. به منظور رشد میکروب‌ها، ارلن‌ها در شیکر به مدت ۱۰ روز شیک شدند و در پایان انکوباسیون یک رقت ۱/۱۰ از سوسپانسیون تهیه و به محیط معدنی جامد تلقیح شد. سپس پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. جدایه‌ها بر اساس رنگ، شکل و اندازه کلنی از هم متمایز شده و در محیط نوترینت آگار خالص شدند.

Ziwei et al., (2023) برای غنی کردن باکتری‌های غالب، ابتدا ۵ میلی‌لیتر نفت و ۵ میلی‌لیتر از نمونه آب آلوده را به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MSM اضافه کردند. کشت به مدت ۴ روز در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و دور شیکر ۱۶۰ RPM انجام شد. بعد از سه دوره غنی‌سازی (انتقال به محیط تازه MSM)، سوسپانسیون نهایی در محیط نوترینت آگار کشت داده شد. سپس براساس رنگ و مورفولوژی کلنی‌های ظاهر شده، جدایه‌ها به روش خطی کشت و خالص شدند. درنهایت برای غربالگری باکتری‌ها، سویه‌ها به محیط MSM حاوی نفت تلقیح شدند و کدورت محیط با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بعد از ۷ روز گرماگذاری اندازه‌گیری شد.

در پژوهشی Bhuyan et al., (2023)، دو نمونه خاک آلوده نفتی را در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل کرده و برای انجام آزمایشات در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری کردند. برای جداسازی سویه‌های باکتریایی، ۱ گرم از هر خاک به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط بوشنل هاس اضافه شد. ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۵۰ RPM شیک شدند. سپس سری رقت از سوسپانسیون تهیه گردید و رقت‌های 10^{-5} و 10^{-6} به محیط بوشنل هاس آگار تلقیح شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۰ درجه سلسیوس، کلنی باکتری‌ها ظاهر شد و برای خالص‌سازی درمحیط نوترینت آگار، کشت خطی داده شدند. در این مطالعه دانشمندان برای غربالگری جدایه‌های قدرتمند، از روش کشت در محیط معدنی جامد (آگار) استفاده کردند؛ بدین صورت که تمام جدایه‌ها در محیط بوشنل هاس آگار حاوی ۱ و ۲ درصد نفت خام کشت خطی داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند و رشد باکتری‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ بررسی شد. براساس الگوی رشد، سویه‌های توانمند در تجزیه نفت خام انتخاب شدند. همچنین در این مطالعه، توان ترشح بیوسورفکتانت جدایه‌ها با آزمون‌های گسترش نفت و شاخص امولسیون کنندگی ارزیابی شد.

در مطالعه دیگری یک گروه از دانشمندان، برای غنی‌سازی میکروب‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی، ۲ گرم از خاک با آلودگی زیاد را به ۵۰ میلی‌لیتر محیط MSM حاوی ۱ درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی اضافه کردند (Nong et al., 2023). نمونه‌ها به مدت ۷ روز در شیکرانکوباتور با دمای ۳۵ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰ RPM گرماگذاری شدند. بعد

از ۷ روز ۵٪ (حجمی/حجمی) ازمحیط کشت، به محیط تازه MSM اما این بار با ۵٪ نفت خام تلقیح شد. پروسه غنی‌سازی به مدت ۵ بار تکرار شد و در پایان این مرحله، سویه‌های توانا در پلیت‌های حاوی محیط MSM-agar جداسازی شدند.

در پژوهش دیگری، محققین سویه‌های قارچی تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی را جداسازی کردند (Al-Otibi et al., 2023). آن‌ها ابتدا ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونه خاک ۱۰ درصد (حل شده در آب مقطر) را به محیط کشت استریل PDA-agar اضافه کردند. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت سه روز گرماگذاری شدند تا کلنی‌های متفاوت قارچها ظاهر شود. هر کلنی به‌طور مجزا در محیط PDA-agar دیگری کشت به مدت سه روز کشت داده شد تا کلنی‌های خالص حاصل شود. جهت غربالگری جدایه‌ها، محیط MSM-agar با افزودن ۱٪ از انواع هیدروکربن‌ها تهیه شد. هر جدایه قارچی به یک پتری‌دیش، برای ارزیابی توان تحمل به هیدروکربن، تلقیح شد. معیار امتیازدهی به وضعیت رشد در این مطالعه، میزان رشد میسل قارچها بود. در آزمون محیط مایع، دانشمندان دو تکه کوچک (0.5×0.5 cm) از محیط جامد که قارچ در آن رشد کرده بود را به ارلن‌مایرهای حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط MSM همراه با ۱٪ منبع هیدروکربنی اضافه کردند. ارلن‌ها در ۲۵ درجه سلسیوس و ۱۴۰ RPM به مدت ۳۰ روز گرماگذاری شدند. نرخ رشد قارچها با وزن کردن هر سه روز یک بار ارلن‌ها (گرم) تعیین گردید. همچنین توانایی ترشح بیوسورفکتانت قارچها با آزمون‌های گسترش نفت و شاخص امولسیون کنندگی تعیین شد.

Zeynali et al., (2024)، در مطالعه خود، موفق به جداسازی هفت جدایه باکترایی تجزیه‌کننده نفت از یک نمونه گل حفاری شدند. جهت غنی‌سازی، ۵ گرم از گل حفاری به ۹۵ میلی‌لیتر محیط MSM استریل حاوی ۰/۵ درصد نفت خام افزوده شد. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و RPM۱۶۰ به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. مجموعا بعد از سه هفته دوره غنی‌سازی و دستیابی به کنسرسیوم میکروبی، سویه‌های مؤثر نفت‌خوار در محیط MSM-agar حاوی نفت خالص‌سازی و جداسازی شدند. به منظور غربالگری و تعیین جدایه‌های برتر، این دانشمندان ابتدا از آزمون توانایی رشد در محیط MSM-agar حاوی یک قطره نفت استفاده کردند. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. سپس آزمون‌های توان رشد در محیط MSM حاوی نفت، توانایی کاهش TPH در محیط MSM و ترشح بیوسورفکتانت انجام شد.

نتیجه‌گیری کلی

نشت هیدروکربن‌های نفتی در اثر تولید، اکتشاف و حمل و نقل نفت باعث آلودگی محیط زیست و آسیب به موجودات زنده می‌شود. میکروارگانیسم‌های موجود در مکان‌های آلوده، می‌توانند این ترکیبات سمی را تجزیه کرده و به ترکیبات با سمیت کمتر تبدیل کنند. برای استفاده از این میکروب‌ها جهت زیست‌پالایی مکان‌های آلوده، بایستی آن‌ها را جداسازی کرد. فرایند جداسازی با غنی‌سازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نفت در محیط معدنی نمکی آغاز می‌شود. سپس سوسپانسیون رشد یافته با محیط معدنی جامد (آگار) منتقل شده و کلنی‌های غیرهمشکل خالص‌سازی می‌شوند. درانتها، برای غربالگری و انتخاب بهترین جدایه، توانایی رشد و تجزیه زیستی باکتری‌ها و قارچها در محیط مایع یا جامد نفتی و توان ترشح بیوسورفکتانت آن‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

منابع

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 670-699.

Aboud, E. M., Burghal, A. A., & Laftah, A. H. (2021). Genetic identification of hydrocarbons degrading bacteria isolated from oily sludge and petroleum-contaminated soil in Basrah City, Iraq. *Biodiversitas: Journal of Biological Diversity*, *22*(4).

Adipah, S. (2019). Introduction of petroleum hydrocarbons contaminants and its human effects. *Journal of Environmental Science and Public Health*, *3*(1), 1-9.

Ali, N., Dashti, N., Khanafer, M., Al-Awadhi, H., & Radwan, S. (2020). Bioremediation of soils saturated with spilled crude oil. *Scientific reports*, *10*(1), 1116.

Al-Otibi, F., Al-Zahrani, R. M., & Marraiki, N. (2023). Biodegradation of selected hydrocarbons by fusarium species isolated from contaminated soil samples in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Fungi*, *9*(2), 216.

Babalola, T. A., Antai, S., & Tiku, D. R. (2016). Toxicity of crude oil and diesel fuel to some gram positive and gram negative bacterial. *Imper. J. Interdiscip. Res*, *2*, 273-283.

Baltaci, M. O., Omeroglu, M. A., Ozkan, H., Taskin, M., & Adiguzel, A. (2024). Enhanced biodegradation of crude oil contamination by indigenous bacterial consortium under real conditions. *Biocatalysis and Biotransformation*, *42*(1), 56-67.

Behera, I. D., Basak, G., Kumar, R. R., Sen, R., & Meikap, B. C. (2020). Treatment of petroleum refinery sludge by petroleum degrading bacterium Stenotrophomonas pavanii IRB19 as an efficient novel technology. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *56*(2), 226-239.

Behera, I. D., Nayak, M., Biswas, S., Meikap, B. C., & Sen, R. (2021). Enhanced biodegradation of total petroleum hydrocarbons by implementing a novel two-step bioaugmentation strategy using indigenous bacterial consortium. *Journal of Environmental Management*, *292*, 112746.

Bhuyan, R., Namdeo, A., Verma, J. S., & Geed, S. R. (2023). Isolation of indole biodegrading bacterial species from petroleum contaminated site of northeast India: Growth kinetics and crude oil biodegradation assessment. *Journal of Water Process Engineering*, *52*, 103544.

Bilen Ozyurek, S., & Seyis Bilkay, I. (2020). Comparison of petroleum biodegradation efficiencies of three different bacterial consortia determined in petroleum-contaminated waste mud pit. *SN Applied Sciences*, *2*, 1-12.

Brzeszcz, J., Steliga, T., Ryszka, P., Kaszycki, P., & Kapusta, P. (2024). Bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons are prevalent in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, *31*(4), 5668-5683.

Cao, D., Huo, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, Z., & Huo, M. (2023). Aerobic biodegradation of phenanthrene by a newly isolated Klebsiella sp. DS-1 from wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, *53*, 103820.

Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., & Sharma, A. (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, 63(2), 417-431.

Csutak, O. E., Nicula, N. O., Lungulescu, E. M., Marinescu, V., & Corbu, V. M. (2024). Yarrowia lipolytica CMGB32 biosurfactants produced using n-hexadecane: developing strategies for environmental remediation. *Applied Sciences*, *14*(7), 3048.

Dutta, T., Kwon, E., Bhattacharya, S. S., Jeon, B. H., Deep, A., Uchimiya, M., & Kim, K. H. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile organic compounds in biochar and biochar-amended soil: a review. *Gcb Bioenergy*, *9*(6), 990-1004.

Ejaz, M., Zhao, B., Wang, X., Bashir, S., Haider, F. U., Aslam, Z., ... & Mustafa, A. (2021). Isolation and characterization of oil-degrading Enterobacter sp. from naturally hydrocarbon-contaminated soils and their potential use against the bioremediation of crude oil. *Applied Sciences*, *11*(8), 3504.

Ezennubia, V., & Vilcáez, J. (2023). Removal of oil hydrocarbons from petroleum produced water by indigenous oil degrading microbial communities. *Journal of Water Process Engineering*, *51*, 103400.

Ferreira, T. F., Martins, F. F., Cayres, C. A., Amaral, P. F., Azevedo, D. D. A., & Coelho, M. A. Z. (2022). Biosurfactant production from the biodegradation of n-paraffins, isoprenoids and aromatic hydrocarbons from crude petroleum by Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682. *Fermentation*, *9*(1), 21.

Fuentes, S., Barra, B., Caporaso, J. G., & Seeger, M. (2016). From rare to dominant: a fine-tuned soil bacterial bloom during petroleum hydrocarbon bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(3), 888-896.

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*, 1369.

Hamad, A. A., Moubasher, H. A., Moustafa, Y. M., Mohamed, N. H., & Abd-El Rhim, E. H. (2021). Petroleum hydrocarbon bioremediation using native fungal isolates and consortia. *The Scientific World Journal*, *2021*(1), 6641533.

Huang, L., & Batterman, S. A. (2014). Multimedia model for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHs in Lake Michigan. *Environmental Science & Technology*, 48(23), 13817-13825.

Hung, C. M., Huang, C. P., Chen, C. W., Wu, C. H., Lin, Y. L., & Dong, C. D. (2020). Activation of percarbonate by water treatment sludge–derived biochar for the remediation of PAH-contaminated sediments. *Environmental Pollution*, *265*, 114914.

Ifediegwu, M. C., Uba, B. O., Awari, V. G., & Okongwu, D. J. (2024). Biodegradation of bonny light crude oil by plasmid and non-plasmid borne soil bacterial strains using biostimulation and bioaugmentation techniques. *Science World Journal*, *19*(1), 178-188.

Jui, A. H., Bhuiyan, M. N. I., Bhowmik, B., Khatun, N., Chowdhury, A., Bhuiyan, R. H., ... & Afrin, S. (2024). Exploration and characterization of a newly isolated bacterium, Enterobacter quasihormaechei strain BDIFST24001, capable of producing rhamnolipid biosurfactant for oil remediation. *Access Microbiology*, *6*(8), 000830-v4.

Kazim, M., Dauletova, A., Sandybayeva, S., Bukharbayeva, Z., & Zayadan, B. (2024). Isolation and study of cyanobacterial cultures from oil refinery wastewaters. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 100, p. 02019). EDP Sciences.

Khan, A. H. A., Tanveer, S., Alia, S., Anees, M., Sultan, A., Iqbal, M., & Yousaf, S. (2017). Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, *104*, 158-164.

Kieu, T. Q. H., Nguyen, T. Y., Nguyen, V. T., & Nguyen, T. N. Q. (2024). Biosurfactant production by a crude oil-utilizing bacterium towards petroleum hydrocarbon biodegradation applications. *Vietnam Journal of Chemistry*, *62*(S1), 33-39.

Koohkan, H., Mortazavi, M. S., Golchin, A., Saraji, F., & Akbarzadeh-Chomachaei, G. (2023). Comparison of Native Bacterial and Fungal Bioaugmentation in the Removal of Petroleum from Soil in the Presence of Sorghum. *Water, Air, & Soil Pollution*, 234(5), 309.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Lee, Y. B., & Naidu, R. (2016). Polyaromatic hydrocarbon (PAH) degradation potential of a new acid tolerant, diazotrophic P-solubilizing and heavy metal resistant bacterium Cupriavidus sp. MTS-7 isolated from long-term mixed contaminated soil. *Chemosphere*, *162*, 31-39.

Lăzăroaie, M. M. (2010). Multiple responses of gram-positive and gram-negative bacteria to mixture of hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*, 649-667.

Lee, D. W., Lee, H., Kwon, B. O., Khim, J. S., Yim, U. H., Kim, B. S., & Kim, J. J. (2018). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental pollution*, *241*, 254-264.

Li, Z., Rosenzweig, R., Chen, F., Qin, J., Li, T., Han, J., ... & Ronen, Z. (2022). Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soils with Biosurfactant-Producing Degraders Isolated from the Native Desert Soils. *Microorganisms*, *10*(11), 2267.

Madhuri, R. J., Saraswathi, M., Gowthami, K., Bhargavi, M., Divya, Y., & Deepika, V. (2019). Recent approaches in the production of novel enzymes from environmental samples by enrichment culture and metagenomic approach. *Recent developments in applied microbiology and biochemistry*, 251-262.

Mahjoubi, M., Cappello, S., Souissi, Y., Jaouani, A., & Cherif, A. (2018). Microbial bioremediation of petroleum hydrocarbon–contaminated marine environments. *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering*, 325, 325-350.

Mishra, A., Saxena, A., & Singh, S. P. (2019). Isolation and characterization of microbial strains from refinery effluent to screen their bioremediation potential. *J Pure Appl Microbiol*, *13*(4), 2325-2332.

Munezero, J., Kassaza, K., Bazira, J., & Kiwanuka, G. N. (2024). Bioremedial potential of bacteria isolated from soil in automobile garages and fuel stations in Mbarara City, Southwestern Uganda. *Bioremediation Journal*, 1-13.

Nandy, S., Andraskar, J., Lanjewar, K., & Kapley, A. (2021). Challenges in bioremediation: from lab to land. *In Bioremediation for Environmental Sustainability* (pp. 561-583). Elsevier.

Nardini, E., Kisand, V. and Lettieri, T., 2010. Microbial biodiversity and molecular approach. *JCR Scientific and Technical Reports. Luxembourg: Office for Official Publications of European Communities*.

Nong, J., Peng, P., Pan, J., Shen, T., & Xie, Q. (2023). Effect of Bioaugmentation and Biostimulation on Hydrocarbon Degradation and Bacterial Community Composition in Different Petroleum-Contaminated Soil Layers. *Water, Air, & Soil Pollution*, *234*(3), 189.

Othman, A. R., Ismail, N. S., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Kurniawan, S. B., Sharuddin, S. S. N., & Ismail, N. I. (2022). Potential of indigenous biosurfactant-producing fungi from real crude oil sludge in total petroleum hydrocarbon degradation and its future research prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *10*(3), 107621.

Pandolfo, E., Barra Caracciolo, A., & Rolando, L. (2023). Recent Advances in Bacterial Degradation of Hydrocarbons. *Water*, 15(2), 375.

Pandolfo, E., Barra Caracciolo, A., & Rolando, L. (2023). Recent advances in bacterial degradation of hydrocarbons. *Water*, *15*(2), 375.

Samimi, M., & Shahriari-Moghadam, M. (2024). Efficient biodegradation of crude oil by novel Pseudomonas aeruginosa strain isolated from petrochemical wastewater: identification and optimization. *Petroleum Science and Technology*, 1-18.

Saravanan, A., Karishma, S., Kumar, P. S., & Rangasamy, G. (2023). Biodegradation of oil-contaminated aqueous ecosystem using an immobilized fungi biomass and kinetic study. *Environmental Research*, *220*, 115252.

Schlegel, H. G., & Zaborosch, C. (1993). *General microbiology*. Cambridge university press.

Sharma, N., Lavania, M., & Lal, B. (2022). Biosurfactant: a next-generation tool for sustainable remediation of organic pollutants. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 821531.

Thavasi, R., Jayalakshmi, S., & Banat, I. M. (2011). Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by Lactobacillus delbrueckii in biodegradation of crude oil. *Bioresource technology*, *102*(3), 3366-3372.

Tian, X., Wang, X., Peng, S., Wang, Z., Zhou, R., & Tian, H. (2018). Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater. *Water Science and Technology*, *78*(12), 2626-2638.

Tripathi, V., Gaur, V. K., Thakur, R. S., Patel, D. K., & Manickam, N. (2023). Assessing the half-life and degradation kinetics of aliphatic and aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from crude oil contaminated soil. *Chemosphere*, *337*, 139264.

USEPA., 2007. Developing innovative solutions for oil spill cleanup.

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.

Varjani, S. J., & Gnansounou, E. (2017). Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. *Bioresource technology*, *245*, 1258-1265.

Vimali, E., Jayaram, M., Vignesh, N. S., Ashokkumar, B., Ganeshmoorthy, I., Sivasubramanian, V., & Varalakshmi, P. (2021). Biodegradation of used Motor Oil and Biofuel production by Microalgae Coelastrella sp. M60 and Scenedesmus sp. VJ1. *Chemical Engineering & Technology*, *44*(5), 852-857.

Wang, S., Wang, D., Yu, Z., Dong, X., Liu, S., Cui, H., & Sun, B. (2021). Advances in research on petroleum biodegradability in soil. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 23(1), 9-27.

Wang, X., Wang, X., Liu, M., Bu, Y., Zhang, J., Chen, J., & Zhao, J. (2015). Adsorption–synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials. *Marine pollution bulletin*, *92*(1-2), 195-200.

Wartell, B., Boufadel, M., & Rodriguez-Freire, L. (2021). An effort to understand and improve the anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons: A literature review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 157, 105156.

Xiang, W., Liang, Y., Hong, S., Wang, G., You, J., Xue, Y., & Ma, Y. (2022). Degradation of long-chain n-alkanes by a novel thermal-tolerant Rhodococcus strain. *Archives of Microbiology*, 204(5), 259.

Xu, M., Fu, X., Gao, Y., Duan, L., Xu, C., Sun, W., ... & Xiao, X. (2020). Characterization of a biosurfactant-producing bacteria isolated from Marine environment: Surface activity, chemical characterization and biodegradation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *8*(5), 104277.

Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S. and Huang, Y., 2015. Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*, pp.1935-1946.

Zeynali, K., Shariati, S., Pourbabaee, A. A., & Shorafa, M. (2025). The efficiency of oil-degrading and phosphate-solubilizing bacteria in phosphorus availability of a oil-contaminated calcareous soil. *Journal of Sol Biology*, *12*(2), 191-212.

Zeynali, K., Shariati, S., Pourbabaei, A. A., & SHORAFA, M. (2024). The application of biosurfactant producing bacterial consortium as a petroleum degrader in increasing the hydraulic conductivity coefficient of TPH-contaminated soil. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, *55*(9), 1585-1599.

Ziwei, B., Hanning, W., Lusha, W., Zena, Z., & Yifei, W. (2023). Isolation and Characterization of Viscosity-Reducing and Biosurfactant-Producing Bacteria in Low-Permeability Reservoir. *International Journal of Energy Research*, *2023*(1), 3223516.

Žvirgždas, J., Paškevičius, A., Petrovas, S., Galginienė, I., & Iljasevičius, K. (2023). Isolation, selection, and use of oil-degrading microorganisms for biological treatment of contaminated soil. *Polish journal of environmental studies.*, *32*(3), 1-10.

A review of isolation and screening methods for oil-eating microorganisms

Komeil Zeynali[1], Ahmad Ali Pourbabaee[2*], Shayan Shariati[3]

1-Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran. Iran; pourbabaei@ut.ac.ir
3- Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract
Crude oil and its products cause environmental pollution and harm the health of plants, microbial communities, animals, and humans. Various physical, chemical, physicochemical, and biological methods exist for remediating oil-contaminated sites; however, the biological approach is considered the best option due to its cost-effectiveness, environmental compatibility, and high efficiency. Bioremediation of petroleum hydrocarbons relies on the metabolic capabilities and enzymatic systems of microorganisms. Therefore, isolating these capable microbes for the degradation of petroleum compounds is of significant importance. Oil-degrading bacteria and fungi naturally exist in contaminated environments and are well-adapted to these habitats. Consequently, they possess metabolic capabilities to utilize hydrocarbons as a carbon and energy source. The isolation of oil-degrading microorganisms is based on the enrichment method. In this method, a saline mineral growth medium is utilized, along with the addition of a petroleum carbon source, to increase the population of degrading microbes while inhibiting the growth of other microorganisms. After refreshing the growth medium and repeating this cycle multiple times, the cultured suspension is inoculated into a solid saline mineral medium (agar) containing oil. The resulting colonies are then visually distinguished from one another and purified in nutrient broth. Finally, to screen and select the best isolate, degradation and growth tests must be performed in liquid or solid media. Given the lack of comprehensive studies serving as an adequate reference for the principled isolation of capable oil-degrading microorganisms in Iran, this article has been prepared with the hope of contributing to the field.

Keywords: Oil pollution; Isolation of oil-degrading microorganisms; Bioremediation; Enrichment; Saline mineral growth medium.