



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

## تجزیه زیستی نفت خام با استفاده از سلول‌های میکروبی تثبیت شده در دانه‌های آلژینات تولید شده با روش الکترواسپری

الهام خانپور-علیکلاهی<sup>۱،۲</sup>، علی پرتوی‌نیا<sup>۳</sup>، احمد طالبی<sup>۱</sup>، حسین کرمانیان<sup>۲</sup>

۱- گروه محیط‌زیست، دانشکده محیط‌زیست، کرج، ایران

۲- گروه مهندسی پالایش‌زیستی، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، پردیس زیراب، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

### اطلاعات مقاله: چکیده

زمینه و هدف: ترکیبات نفتی یکی از عوامل اصلی آلودگی محیط‌های آبی محسوب می‌شود. در سال‌های اخیر روش‌های بیولوژیکی به‌عنوان روشی دوستدار محیط‌زیست و مقرون به‌صرفه در کنار روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای پاک‌سازی محیط‌های آلوده مورد استفاده قرار گرفته است. اخیراً روش تثبیت سلولی درون حامل‌های هیدروژلی به‌دلیل مزایای نظیر سهولت کنترل میکروارگانیسم‌ها، تماس غیرمستقیم آلاینده و سلول، افزایش مقاومت سلول‌ها در برابر تنش‌ها و استفاده مجدد و متوالی مورد توجه قرار گرفته است. اهداف اصلی این تحقیق، معرفی روش الکترواسپری به‌منظور کاهش سایز دانه‌های آلژینات کلسیم جهت استفاده در سامانه تثبیت سلولی و مقایسه میزان تجزیه زیستی نفت‌خام سنگین توسط سویه *Bacillus licheniformis* در دو حالت سلول آزاد و تثبیت شده هستند.

روش بررسی: سویه تجزیه‌کننده نفت‌خام، از منطقه آلوده نفتی جزیره خارک جداسازی شده و توانایی این سویه در حالت‌های آزاد و تثبیت شده، در شرایط محیطی متفاوت (pH برابر با ۵، ۷) و غلظت نفت‌خام (۱۵۰۰، ۳۵۰۰ ppm) بررسی شد. روش الکترواسپری برای تولید دانه‌های آلژینات و روش وزن‌سنجی و کروماتوگرافی گازی جهت اندازه‌گیری میزان حذف نفت‌خام استفاده شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان حذف نفت‌خام (۶۱ درصد) مربوط به سلول‌های تثبیت شده در محیط خنثی و غلظت نفت ۳۵۰۰ ppm بود. تجزیه‌زیستی نفت‌خام پس از ۱۴ روز، توسط سلول‌های تثبیت شده با اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) نسبت به سلول‌های آزاد بیشتر بوده و تثبیت سلولی مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط محیطی را افزایش داده است. نتیجه‌گیری: با استفاده از روش الکترواسپری با کاهش سایز دانه‌ها، می‌توان بر مشکلات انتقال جرمی سامانه تثبیت سلولی فائق آمد و این سامانه می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای سامانه سلول‌های آزاد در تصفیه پساب استفاده شود.

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۲۶  
تاریخ ویرایش: ۹۸/۰۸/۱۴  
تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۲۱  
تاریخ انتشار: ۹۸/۱۲/۲۸

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، تصفیه پساب، نفت‌خام، تثبیت سلولی، سلول آزاد

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:  
a\_partovi@sbu.ac.ir

## مقدمه

نفت خام به عنوان یکی از مهمترین منابع تامین انرژی و ماده اولیه بسیاری از محصولات شیمیایی، در کشورهای صنعتی و همچنین کشورهای در حال توسعه از اهمیت بالایی برخوردار است (۱). از آنجا که سالانه میلیون ها تن نفت خام کشف و از طریق مسیرهای آبی جابجا می شود، اکوسیستم های آبی همواره در معرض آلودگی نفتی قرار دارند (۲). نفت و فراورده های نفتی به صورت لایه های نفتی روی سطح آب می توانند مانع تبادل اکسیژن بین آب و اتمسفر شوند و زندگی آبزیان را به خطر اندازند، هیدروکربن های نفتی به صورت محلول یا امولسیون و بخش های سنگین تر که ته نشین می شوند آلودگی آب به حساب می آیند (۳). از مهمترین دلایل آلودگی نفتی می توان به اکتشاف، استخراج، تولید، نشت تصادفی، حمل و نقل و تصادفات دریایی اشاره کرد (۴-۶). آلودگی نفتی به علت سمیت و مقاومت در برابر تجزیه و همچنین سرطان زایی و جهش زایی بسیاری از اجزای آن به یک نگرانی جدی در سراسر جهان تبدیل شده است (۷، ۸). برای حذف آلودگی نفت از محیط زیست راه های مختلفی از قبیل روش های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی وجود دارد. به دلیل گران بودن، موفقیت کم و اثرات جانبی روش های فیزیکی و شیمیایی، در سال های اخیر روش های بیولوژیکی توسط محققان مورد توجه قرار گرفته است (۹-۱۳). زیست پالایی با استفاده از میکروارگانیسم هایی که از مواد آلی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کرده و آلاینده را به اجزای بی ضرری چون زیست توده، آب و دی اکسید کربن تبدیل می کنند، به روشی مقرون به صرفه، دوستدار محیط زیست و امیدوارکننده تبدیل شده است (۳، ۱۴، ۱۵). تاکنون عمده تحقیقات انجام شده در خصوص زیست پالایی با استفاده از سامانه سلول های آزاد بوده است. یکی از معایب این روش عدم توزیع یکنواخت میکروارگانیسم ها در محیط آلوده خصوصاً در فاز خاک است و همچنین عمر مفید و فعالیت آنها نیز قابل تضمین نیست (۱۶). لذا در سال های

اخیر برای مرتفع کردن این مشکل و افزایش کارایی روش زیست سالم سازی، تکنیک تثبیت سلول به عنوان روشی برای انتقال میکروارگانیسم ها به مکان آلوده، در کانون توجه محققین مختلف قرار گرفته است. به طور کلی فرایند تثبیت عبارت است از قرار گرفتن بیوکاتالیست هایی نظیر سلول زنده درون یا روی مواد حامل و نگهدارنده که امکان استفاده مجدد از سلول میکروبی را فراهم می آورد. استفاده از سلول تثبیت شده در مقایسه با سلول آزاد دارای مزایای مختلفی نظیر سهولت کنترل گونه های میکروبی، قابلیت استفاده مجدد در سامانه واکنشی و بیوراکتورها، عدم تماس مستقیم مواد آلاینده با سلول، افزایش مقاومت سلول ها طی انواع تنش و کاهش هزینه ها است (۲۱-۱۷). سلول های میکروبی را می توان روی حامل هایی نظیر شن و گرانول های کربن فعال تثبیت نمود. اما به علت شرایط غیر استریل این حامل ها بسیاری از میکروارگانیسم ها نظیر *Pseudomonas* توانایی تخریب آلاینده را از دست می دهند و همچنین بسیاری از سلول های میکروبی حین فرایند شست و شو از بین می روند. در حالی که تثبیت سلول درون هیدروژل های پلیمری طبیعی و یا سنتزی می تواند بر این مشکل غلبه نماید (۲۲). در این میان پلیمرهای طبیعی به علت در دسترس بودن، ارزان بودن و قابلیت زیست تخریب پذیری بالا و دوستدار محیط زیست از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۲۳، ۲۴). آلژینات یکی از پرکاربردترین پلیمرهای طبیعی در روش تله اندازی سلول است که از جلبک قهوه ای استخراج می شود، ساختار آن از اتصال زنجیره  $\alpha$  و  $\beta$ -D-mannuronate (M) و (G)  $\alpha$ -L-guluronate تشکیل می شود که براساس منبع تولیدشان، دارای ترکیب و سایزهای مختلفی هستند (۲۵، ۲۶). دانه های آلژینات به صورت ماتریس های ژلی تشکیل می شوند که به طور کلی شامل دو مرحله اختلاط سلول با یک مایع ویسکوز پلیمری به عنوان ماتریس و فرایند تشکیل ژل است. برای فرایند تشکیل ژل دو روش کلی وجود دارد که شامل تشکیل به صورت قطره و یا تشکیل به صورت

اول مقایسه راندمان حذف نفت خام در دو سامانه سلول تثبیت و آزاد است و همچنین با توجه به معضلات تولید دانه‌های آلژینات در سایزهای کوچک، برای اولین بار روش الکترواسپری برای کاهش سایز دانه‌های آلژینات و افزایش انتقال جرم جهت افزایش راندمان تجزیه زیستی نفت خام از پساب آلوده سنتزی، مورد استفاده قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

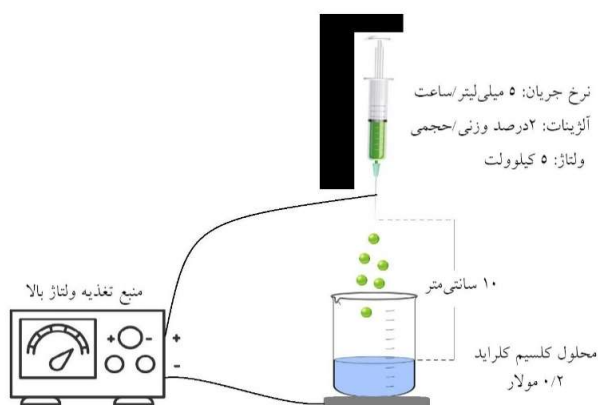
### - میکروارگانسیم و آماده‌سازی مایه تلقیح

به‌منظور جداسازی سویه میکروبی توانمند در تجزیه‌زیستی ترکیبات نفتی، ۱ g از نمونه خاک آلوده نفتی به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ mL محیط کشت مایع نمک‌های معدنی استریل و ۱ درصد نفت خام انتقال داده شد. ارلن‌ها در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰rpm به مدت ۲۰ روز گرمخانه‌گذاری شدند. در بازه‌های زمانی مختلف، ۱۰۰  $\mu\text{L}$  از محیط‌های غنی‌سازی شده برداشته و سویه‌های میکروبی زنده قابل کشت در آن جداسازی و خالص‌سازی شدند. سویه‌های میکروبی موجود به روش کشت سریال رقت بر روی پلیت‌های محیط پایه معدنی حاوی نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، جداسازی شدند. بعد از رشد میکروارگانسیم‌ها بر روی پلیت‌ها، از پلیت‌هایی که حاوی حدود ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی مجزا بودند، کلنی‌های مختلف جداسازی و با کشت متوالی بر روی محیط کشت ((Trypticase Soy Agar (TSA) خالص شدند. شناسایی باکتری براساس توالی ژن ۱۶SrRNA انجام شد و با آنالیز BLAST توالی حاصل در پایگاه بین‌المللی genbank، سویه باکتری جداسازی شده بیشترین شباهت را به گونه *Bacillus licheniformis* با درصد تشابه حدود ۹۹/۸۶ درصد نشان داد.

برای آماده‌سازی مایه‌تلقیح، ابتدا از باکتری روی پلیت نوترینت آگار کشت خطی گرفته و ۲۴ h در انکوباتور با دمای  $30^{\circ}\text{C}$  نگهداشته شد. پس از رشد باکتری، محلول سرم فیزیولوژی (۸/۵ g/L) حاوی سلول میکروبی با

صفحه است. در حالت تشکیل ژل به‌صورت قطره، مخلوط ماتریس و سلول‌ها توسط سرنگ و یا پمپ پری‌استالتیک به‌صورت قطره در آمده و به درون محلول تشکیل ژل ریخته می‌شود. در این حالت پس از تشکیل ژل و سخت شدن آن، ماتریس‌های تثبیت شده سلولی به‌صورت کروی تشکیل می‌شوند (۲۷). ماتریس آلژینات به‌صورت دانه‌های کروی از محدودیت انتقال جرمی کمتری برخوردار است و فرایند تشکیل آن آسان‌تر است اما نکته حائز اهمیت این است که در پژوهش‌های قبلی عمدتاً دانه‌های ژل با سایز ۳ تا ۵ mm تشکیل شده‌اند و در این تحقیقات اشاره شده که حذف محدودیت انتقال جرمی مستلزم کاهش سایز ذرات است. محققین از روش‌های مختلفی نظیر امولسیون کردن با استفاده از هموژنایزر و تکنیک اولتراسونیک برای کاهش سایز دانه‌ها استفاده کرده‌اند (۳، ۲۸) که این روش‌ها معمولاً مستلزم هزینه بالا بوده و امکان صنعتی شدن آنها کمتر است. اخیراً برای تولید دانه‌های با سایز کوچک‌تر در مصارف پزشکی و دارویی، ساخت نانوذرات معدنی، فیلم‌های نازک و ... از روش الکترواسپری استفاده شده است (۲۹-۳۱). در این روش به‌وسیله منبع تغذیه، محلول پلیمری در معرض میدان الکترواستاتیکی قوی قرار می‌گیرد و به‌واسطه کشش سطحی ایجاد شده، قطره کوچکی از سیال تشکیل می‌شود. در سال‌های اخیر غشاهای الکتروزیستی در کاربردهای پزشکی، زیست‌پالایی، تصفیه آب، سیستم‌های تبدیل انرژی و مواد آرایشی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. با استفاده از این روش می‌توان شبکه‌های فیبری با ویژگی‌های منحصر به فردی چون تخلخل بالا تولید کرد (۲۲، ۳۲، ۳۳). نانوذرات الکتروزیستی شده گزینه‌های مناسبی به‌عنوان حامل میکروارگانسیم‌ها هستند که با تولید نانوالیافی با قطر کمتر از ۱۰۰ nm ناحیه وسیعی را برای تثبیت سلول فراهم می‌کنند (۳۴). با توجه به مطالعات انجام شده، تکنیک الکترواسپری برای تثبیت سلول در بحث تجزیه زیستی تاکنون مورد استفاده قرار نگرفته است. بنابراین هدف تحقیق حاضر، در گام

۳۰ در دمای °C ۶۰ روی همزن قرار داده شد. به منظور تثبیت سلولی، ابتدا مایه تلقیح با سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد و پس از جداسازی فاز آبی، سلول‌ها به پلیمر آلژینات استریل شده اضافه شد و به مدت ۱۰ min با سرعت بسیار آهسته بر روی همزن قرار داده شد تا جهت فرایند الکترواسپری، سلول‌ها به‌طور یکنواخت در محلول پراکنده شوند. سپس هر ۱ mL از محلول به سرنگ ۱ mL با سوزن استیل (۱۹G) منتقل شد. یک میدان الکتریکی با ولتاژ ۵ kV برقرار شد و محلول با سرعت ثابت ۵ mL/h توسط پمپ سرنگی به‌صورت قطره به ظرف حاوی محلول کلسیم کلراید M ۰/۲ (محلول اتصال‌دهنده عرضی) منتقل شد (شکل ۱). با استفاده از این روش، بین زنجیره‌های آلژینات با کاتیون  $Ca^{2+}$  اتصال عرضی ایجاد شده و تشکیل آلژینات کلسیم می‌دهند. دانه‌های تشکیل شده برای استحکام بیشتر به مدت ۲ h در محلول اتصال‌دهنده عرضی باقی‌ماندند و سپس جهت جلوگیری از باقی‌ماندن سلول‌های تثبیت نشده بر سطح دانه‌های آلژینات، توسط آب مقطر شسته شدند. لازم به ذکر است که در این بررسی جهت فرایند الکترواسپری ولتاژ ۵ kV انتخاب شد.



شکل ۱- فرایند تثبیت سلول درون ماتریس آلژینات با روش الکترواسپری

دانسیتته نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ nm تهیه شد. برای سامانه سلول آزاد، مایه تلقیح به میزان ۱۰ درصد حجمی محیط کشت، معادل  $10^{11} \times 1/3$  CFU/mL برای هر ارلن در نظر گرفته شد. برای سامانه تثبیت سلولی نیز میزان مایه تلقیح معادل  $10^{11} \times 1/3$  CFU/mL سلول میکروبی به‌صورت تثبیت شده استفاده شد.

### - محیط کشت مورد استفاده در آزمایش‌های تجزیه زیستی نفت خام

محیط کشت نمک‌های معدنی (Mineral Salt Medium (MSM)) شامل  $Na_2HPO_4$  ۲/۹۱ g،  $KH_2PO_4$  ۴ g،  $NH_4Cl$  ۲ g،  $MgSO_4$  ۰/۲ g،  $C_6H_5Na_3O_7$  ۱ g،  $FeCl_3$  ۰/۰۴ g،  $MoO_3$  ۰/۰۲۵ g،  $CaCl_2$  ۰/۰۱ g،  $ZnSO_4$  ۰/۰۱۳ g،  $CoN_2O_6$  در ۱ L آب مقطر آماده و در اتوکلاو با دمای °C ۱۲۰ به مدت ۱۵ min استریل شد. پس از اتوکلاو، pH محیط کشت توسط دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد که تقریباً برابر با ۷ بود و در آزمایش‌ها، pH محیط اسیدی و بازی با استفاده از HCl و NaOH ۱ N روی ۵ و ۹ تنظیم شد. در تحقیق حاضر برای ارزیابی توانایی سویه *B. licheniformis* در زیست‌پالایی نفت خام سنگین در محیط آلوده واقعی، شوری محیط کشت، ۳۵ g/L (مشابه شوری آب دریا) در نظر گرفته شد. برای این تحقیق، کلیه مواد شیمیایی موجود در محیط کشت نمک‌های معدنی، همچنین حلال‌های دی‌کلرومتان و n-هگزان با درصد خلوص بالا استفاده شدند. نفت خام سنگین ایران (API=۲۹ و وزن مخصوص ۰/۸۸۱۴ g/L) که در آزمایش‌های تجزیه زیستی استفاده شده از میادین نفتی جنوب ایران انتخاب شده است.

### - آماده‌سازی پلیمر و تثبیت سلول میکروبی درون ماتریس آلژینات

برای آماده‌سازی ماتریس آلژینات، محلول (w/v) ۲ درصد تهیه شد. نمک آلژینات سدیم به آرامی به آب مقطر اضافه شد تا از کلوخه شدن و انباشتگی جلوگیری شود. برای اینکه پودر به‌طور کامل حل شود محلول به مدت ۱۰ min

## - آزمایش‌های اولیه

به منظور بررسی پایداری دانه‌های آلژینات، دانه‌ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  در محلول  $\text{NaCl}$ ،  $1\text{ N}$  به مدت یک ماه در شیکر انکوباتور قرار داده شد و در پایان روز سی‌ام مشاهده شد که دانه‌ها کاملاً پایدار بوده‌اند (۳۵). همچنین برای بررسی اثر  $\text{pH}$  محیط کشت بر پایداری دانه‌های آلژینات تشکیل شده، محیط کشت‌های مختلف اسیدی، خنثی و بازی ( $\text{pH}$  برابر با ۵، ۷، ۹) بررسی شدند. در پایان آزمایش‌ها مشخص شد که دانه‌های آلژینات در محیط‌های خنثی و اسیدی همچنان پایدارند اما در محیط بازی، پس از مدت زمان کوتاهی کاملاً تخریب شدند. به همین دلیل، در این پژوهش به علت ناپایداری دانه‌های آلژینات کلسیم در  $\text{pH}$  برابر با ۹ شرایط محیط بازی از مراحل آزمایش حذف و شرایط خنثی و اسیدی برای آزمایش‌های تجزیه زیستی بررسی شدند.

## - بررسی تجزیه زیستی نفت‌خام با استفاده از سلول آزاد و تثبیت شده

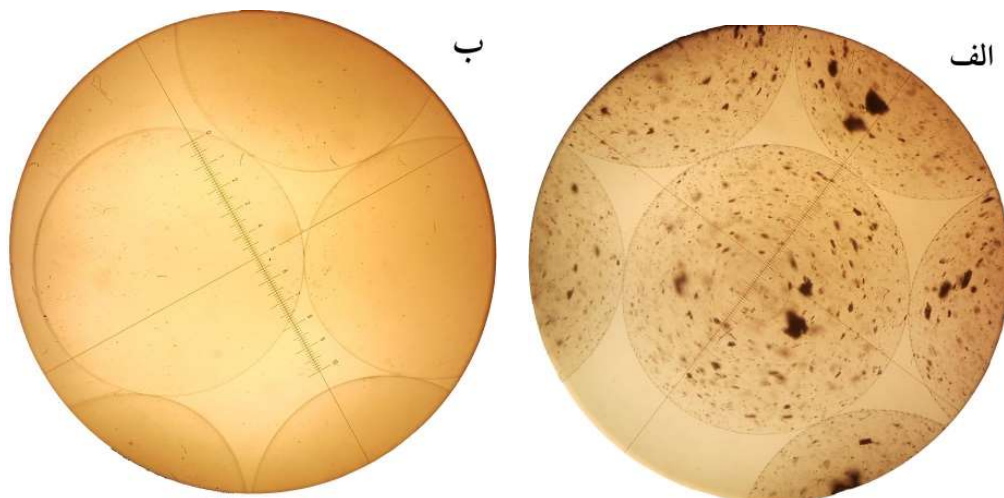
در این بررسی، آزمایش‌های تجزیه زیستی در ارلن مایرهای  $100\text{ mL}$  با حجم کاری  $25\text{ mL}$  با روش کشت لرزان با دور  $150\text{ rpm}$  و دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت  $14$  روز با دو بار تکرار در شیکر انکوباتور و در شرایط هوای انجام شدند. در آزمایش‌های اولیه جهت بررسی پایداری دانه‌های آلژینات در شرایط محیطی متفاوت، طیف وسیعی از  $\text{pH}$ های اسیدی، خنثی و بازی (۵، ۶، ۷، ۸، ۹) مورد آزمایش قرار گرفت. مشاهده شد که در  $\text{pH}$ های معادل ۹ و ۸ پس از مدت زمان کوتاهی دانه‌های آلژینات کاملاً تخریب شدند. در نتیجه برای این بررسی،  $\text{pH}$ های ۷ و ۵ مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی اثر غلظت آلاینده بر گونه باکتری، در آزمایش‌های غربالگری غلظت‌های اولیه نفت‌خام معادل  $4500$ ،  $3500$ ،  $1500$ ،  $500\text{ ppm}$  برای سلول آزاد مطالعه شد. نتایج آزمایش نشان داد که در غلظت‌های پایین نفت‌خام به علت دسترسی پذیری زیستی (Bioavailability) کم و محدودیت انتقال جرم و در

غلظت‌های بالا به دلیل اثر سمیت نفت بر میکروارگانیسم‌ها، راندمان حذف کاهش می‌یابد. در نتیجه آزمایش‌های انتخاب شده در محدوده میانی غلظت‌ها انجام شد. با توجه به بررسی‌های اولیه، دو فاکتور غلظت نفت‌خام و  $\text{pH}$  به عنوان متغیرهای تاثیرگذار بر زیست‌پالایی نفت‌خام در نظر گرفته شدند و برای این بررسی روش یک فاکتور در یک زمان ( $\text{One factor at a time (OFAT)}$ ) مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). همچنین میزان گلوکز و  $\text{NaCl}$  به ترتیب  $2/5$  و  $35\text{ g/L}$  انتخاب شدند. لازم به ذکر است که این میزان بسیار اندک گلوکز ( $0/25\%$  درصد) به عنوان سوبسترای کمکی، صرفاً جهت افزایش سرعت تجزیه زیستی نفت‌خام در مقیاس آزمایشگاهی استفاده شده است. همان‌طور که در بخش "میکروارگانیسم و آماده‌سازی مایه تلقیح" توضیح داده شد جهت بررسی مقایسه‌ای، سامانه سلول‌های میکروبی آزاد و تثبیت شده در دانه‌های آلژینات کلسیم، شمار باکتری‌های مورد استفاده در هر دو سامانه، یکسان معادل  $10^{11} \times 1/3\text{ CFU/mL}$  در نظر گرفته شد و در آزمایش‌های تثبیت، برای هر ارلن  $1\text{ mL}$  محلول آلژینات حاوی سلول میکروبی پس از فرایند الکترواسپری مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق، تمامی مراحل آزمایش در شرایط استریل انجام شد.

لازم به ذکر است که آزمایش شاهد حاوی دانه‌های آلژینات بدون سلول میکروبی با غلظت‌های مختلف نفت‌خام به منظور بررسی میزان جذب (adsorption) نفت توسط دانه‌های حامل انجام شد و نتایج نشان داد که به‌طور متوسط  $3\%$  درصد نفت‌خام توسط دانه‌های آلژینات جذب می‌شود. در نمونه آزمایش شاهد دیگر، ارلن‌های حاوی محیط کشت نمک‌های معدنی به همراه نفت‌خام جهت ارزیابی حذف غیریولوژیکی (فیزیکی-شیمیایی) نفت نظیر تبخیر (evaporation) مورد مطالعه قرار گرفت که به‌طور متوسط، حذف ناچیز  $5\%$  درصد نفت‌خام ناشی از اثرات فیزیکی و شیمیایی مشاهده شد.

جدول ۱- مقادیر فاکتورهای مورد بررسی در آزمایش‌های تجزیه زیستی نفت خام سنگین

شرایط آزمایش	شماره آزمایش	pH اولیه محیط کشت	غلظت اولیه نفت خام (ppm)
سلول تثبیت شده	۱	۵	۱۵۰۰
	۲	۷	۱۵۰۰
	۳	۵	۳۵۰۰
	۴	۷	۳۵۰۰
سلول آزاد	۵	۵	۱۵۰۰
	۶	۷	۱۵۰۰
	۷	۵	۳۵۰۰
	۸	۷	۳۵۰۰
ماتریس بدون سلول میکروبی	شاهد	۷	۱۵۰۰، ۳۵۰۰
محیط کشت و نفت خام بدون سلول	شاهد	۷	۱۵۰۰، ۳۵۰۰



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی دانه‌های آلزینات (الف) به همراه سلول میکروبی و (ب) بدون سلول میکروبی

به منظور مشاهده یکنواختی توزیع سلول میکروبی درون دانه‌های آلزینات، مشاهده میکروسکوپی از دانه‌ها انجام شد. نتایج آنالیز میکروسکوپی در شکل ۲ نشان داده شده است.

### - سایز دانه‌ها

ولتاژهای بالاتر در تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود. البته بررسی اثر ولتاژ بر سلول‌های میکروبی به‌عنوان بررسی پیشگام در ابتدا باید انجام پذیرد.

بر اساس مقیاس اندازه‌گیری شده توسط میکروسکوپ، سایز دانه‌های تولید شده  $2500 \mu\text{m}$  است. نتایج تولید دانه‌های آلژینات بدون ولتاژ در این شرایط نشان داد که سایز دانه‌ها  $3000 \mu\text{m}$  بوده و با روش الکترواسپری در ولتاژ نسبتاً پایین  $5, 17 \text{ kV}$  درصد کاهش داشته است. سایز دانه‌های مورد استفاده در تحقیقات قبلی بیشتر در محدود  $5-3 \text{ mm}$  بوده که این اطلاعات در جدول ۲ آورده شده است. بر طبق آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق با افزایش ولتاژ، مشاهده شد که تشکیل دانه‌های با سایز بسیار کوچک‌تر حتی تا حدود  $200-100 \mu\text{m}$  نیز امکان‌پذیر است. از طرفی در تحقیقات قبلی برای حذف رنگ و آلاینده‌هایی نظیر کروم ۶ ظرفیتی از روش الکترورسی استفاده و نشان داده شده است که میکروارگانیسیم‌ها می‌توانند حین فرایند الکترورسی فعالیت خود را حفظ نمایند (۲۲، ۳۲). بنابراین به‌منظور کاهش بیشتر سایز دانه‌های آلژینات، استفاده از

### - آنالیز مقدار نفت خام

پس از پایان زمان آزمایش، مقدار نفت خام باقیمانده با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی (GC-FID) و روش وزن سنجی به‌عنوان مجموع هیدروکربن‌های نفتی (TPH) اندازه‌گیری شد. در روش وزن‌سنجی تمامی نمونه‌ها با روش استخراج مایع-مایع توسط  $15 \text{ mL}$  حلال دی‌کلرومتان و n-هگزان (با نسبت حجمی ۱:۱) دو بار استخراج شدند. پس از تبخیر حلال در دمای اتاق ( $28^\circ\text{C}$ ) هیدروکربن‌های استخراج شده توسط ترازوی الکترونیکی توزین و میزان درصد حذف نفت خام با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد:

$$(1) \quad (\%) \text{ حذف نفت خام} = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100$$

جدول ۲- محدوده اندازه دانه‌های پلیمری آلژینات در تحقیقات قبلی

مرجع	محیط آلوده	قطر	آلاینده	ماتریس حامل
(۳۶)	آب	۳ mm	پنتا کلرو فنول	آلژینات-PUF
(۳۷، ۳۸)	خاک	۳-۲ mm	فنانترن	آلژینات
(۳۹)	آب	۵، ۳، ۲ mm	کینولین	آلژینات
(۲۴، ۲۵)	آب	۲/۷-۵/۵ mm	فنول	آلژینات
(۲۵)	آب	۲ mm	نفتالین	آلژینات
(۲۶)	آب	۴-۳ mm	رنگ آزو	آلژینات
(۲۰)	آب	۳ mm	تری بوتیل تین	آلژینات
(۲۱)	آب	۲ mm	نفت خام	آلژینات
(۳)	آب	$1200-300 \mu\text{m}$	نفت خام	آلژینات
(۴۰)	آب	۳ mm	۲- نیتروتولون	آلژینات
(۱۰)	آب	۵ mm	نفتالین	آلژینات، PVA-clays
(۴۱)	آب	۴-۳ mm	رنگ نساجی	آلژینات

که در آن:  $C_1$  و  $C_2$  به ترتیب مقادیر نفت خام اندازه‌گیری شده در لحظه صفر و زمان  $t$  را نشان می‌دهند. آنالیز کروماتوگرافی گازی (GC) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل (Agilent, 6890N, USA) مجهز به آشکارساز FID و ستون مویین HP-5MS به طول ۳۰ m و قطر ۰/۲۵ mm انجام شد. درجه حرارت اولیه  $40^{\circ}\text{C}$  تنظیم و این دما به مدت ۳ min حفظ شد، سپس با نسبت  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  دما به  $310^{\circ}\text{C}$  رسید و در نهایت به مدت ۱۰ min در این دما ثابت ماند. از نیتروژن با سرعت جریان  $2/6\text{ mL}/\text{min}$  به عنوان گاز حامل استفاده شد. درجه حرارت آشکارساز و محل تزریق نمونه نیز به ترتیب  $250^{\circ}\text{C}$  و  $320^{\circ}\text{C}$  در نظر گرفته شد.

#### - آنالیز آماری

در این پژوهش داده‌های جمع‌آوری شده، توسط نرم‌افزار 8 Graphpad prism و آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند و معنی‌داری اثرات متغیرها و تاثیر تثبیت سلولی بررسی شد.

#### یافته‌ها

نتایج مربوط به تجزیه زیستی نفت خام سنگین پس از ۱۴ روز در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تحت شرایط یکسان سلول‌های تثبیت شده نسبت به سلول‌های آزاد در تجزیه زیستی نفت خام مؤثرتر بودند. بیشترین میزان حذف و تجزیه زیستی در نمونه سلول‌های تثبیت شده  $61/10$  درصد مشاهده شد که این مقدار برای pH برابر با ۷ و غلظت نفت خام  $3500\text{ ppm}$  مشاهده شد. در حالی که در سلول‌های آزاد، بالاترین راندمان  $57/78$  درصد مشاهده شده است. به‌طور کلی در محیط‌های خنثی در مقایسه با محیط اسیدی میزان تجزیه زیستی و درصد حذف بالاتر بوده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش pH از ۵ به ۷ در تمامی غلظت‌ها و در هر دو حالت سلول تثبیت و آزاد، تجزیه زیستی افزایش پیدا کرده است، در حالی که در غلظت‌های بالاتر نفت خام و به‌ویژه در حالت تثبیت افزایش pH تاثیر بیشتری داشته است. در محیط‌های بازی دانه‌های آلژینات در مدت زمان کوتاهی تجزیه شدند که این امر احتمالاً به دلیل تاثیر منفی OH بر دانه‌های آلژینات است.

جدول ۳- میزان حذف زیستی نفت خام با استفاده از سامانه سلول میکروبی آزاد و تثبیت شده

شرایط آزمایش	شماره آزمایش	درصد حذف (تکرار ۱)	درصد حذف (تکرار ۲)	میانگین درصد حذف
سلول تثبیت شده	۱	۵۳/۸۲	۴۹/۱۶	۵۱/۴۹
	۲	۵۷/۹۹	۵۵/۷۱	۵۶/۸۵
	۳	۵۳/۱۹	۵۴/۸۵	۵۴/۰۲
	۴	۵۸/۲۹	۶۳/۹۰	۶۱/۱۰
سلول آزاد	۵	۴۶/۵۲	۴۸/۴۰	۴۷/۴۶
	۶	۴۸/۵۱	۵۲/۰۸	۵۰/۳۰
	۷	۵۳/۴۴	۵۰/۹۱	۵۲/۱۸
	۸	۶۰/۲۰	۵۵/۳۶	۵۷/۷۸

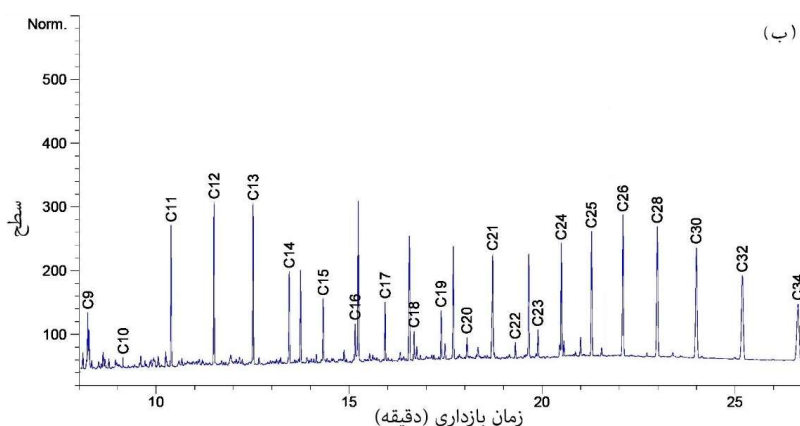
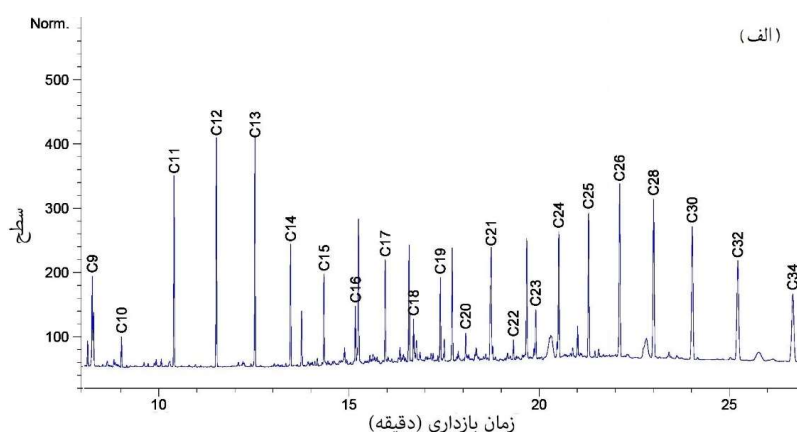


تجزیه و تحلیل نتایج GC توسط سلول‌های تثبیت شده قبل و بعد از تجزیه زیستی نفت خام پس از ۱۴ روز در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج GC نشان داد سویه *B. licheniformis* توانایی تجزیه آلکان‌های نفتی کوتاه زنجیره و بلند زنجیره را دارد.

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است مطابق آنالیز ANOVA، به‌طور کلی سامانه سلول‌های تثبیت‌شده در pH و غلظت‌های مختلف آلاینده عملکرد بهتری داشته است و در میزان حذف زیستی نفت خام، اختلاف معنی‌داری بین دو حالت سلول میکروبی تثبیت شده و آزاد وجود دارد ( $p < 0.05$ ).

جدول ۴- آنالیز واریانس دوطرفه مربوط به نتایج تجزیه نفت خام

متغیر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار p	اثرگذاری
تداخل	۱۱/۶۳	۳	۳/۸۷۵	$F(3, 8) = 0.5781$	$p = 0.6455$	-
فاکتور ردیف	۲۰۴	۳	۶۷/۹۹	$F(3, 8) = 10.14$	$p = 0.0042$	بله
فاکتور ستون	۶۱/۹۸	۱	۶۱/۹۸	$F(1, 8) = 9.246$	$p = 0.0160$	بله
باقیمانده	۵۳/۶۲	۸	۶/۷۰۳	-	-	-



شکل ۳- آنالیز کروماتوگرافی گازی (GC) و مقایسه میزان حذف ترکیبات الف) قبل و ب) بعد از تجزیه زیستی نفت خام توسط سلول‌های میکروبی تثبیت شده

## بحث

پژوهش‌های بسیاری در زمینه تجزیه زیستی نفت خام صورت گرفته است اما در اکثر آنها از میکروارگانیسم‌ها به صورت آزاد استفاده شده است. از آنجا که هیدروکربن‌های نفتی در برابر میکروارگانیسم‌ها به عنوان یک عامل بازدارنده عمل می‌کنند یکی از روش‌های افزایش مقاومت و حفظ فعالیت سلول‌ها، تثبیت آنها درون و یا بر روی مواد حامل است (۴۲).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که در تجزیه زیستی نفت خام، عملکرد سلول‌های تثبیت شده بالاتر از سلول‌های میکروبی آزاد بود. نتایج به دست آمده نشان دادند که با افزایش pH تجزیه زیستی نفت خام توسط میکروارگانیسم‌های آزاد افزایش می‌یابد و در محیط‌های خنثی نسبت به محیط اسیدی میزان حذف بالاتر بود. Li و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تجزیه زیستی نیتروبنزن توسط سویه *B. licheniformis* به نتایج مشابهی دست یافتند. با کاهش pH از فعالیت میکروارگانیسم‌ها کاسته شد و میزان حذف نفت کاهش یافت (۴۳). اما سلول‌های میکروبی تثبیت شده در شرایط محیطی اسیدی نیز توانستند فعالیت خود را حفظ کرده و نسبت به سلول‌های آزاد عملکرد بهتری از خود نشان دهند. به طور مشابه، در پژوهشی که Liu و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی تجزیه زیستی فنل انجام دادند مشاهده کردند که سلول‌های تثبیت شده نسبت به سلول آزاد میزان تخریب بالاتری داشته و در دامنه pH گسترده تری فعالیت می‌کردند. براساس تحقیقات آنها با کاهش pH به کمتر از ۷ فعالیت سلول‌ها کاهش یافت و زمانی که pH به ۶ رسید فعالیت سلول‌های آزاد کاملاً متوقف شد اما سلول‌های تثبیت شده همچنان به فعالیت خود ادامه دادند که این امر نشان داد که توانایی تحمل سلول‌های تثبیت شده در شرایط اسیدی بسیار بهتر از سلول‌های آزاد است (۴۴). Lin و همکاران در سال ۲۰۱۴ برای تجزیه زیستی نفت خام از الیاف پنبه به عنوان جاذب و برای تثبیت سلول‌های میکروبی استفاده کردند.

تحقیقات آنها نشان داد زمانی که غلظت نمک به ۷۰ g/L رسید باکتری‌های تثبیت شده عملکرد بهتری داشتند و در مقایسه با سلول‌های آزاد کارایی آنها به میزان ۳۰ درصد افزایش یافت (۱۰).

در تحقیقات قبلی نشان داده شده است که به طور کلی با استفاده از سامانه سلول‌های آزاد با افزایش مقدار آلاینده، میزان حذف کاهش می‌یابد، اما سامانه سلول‌های تثبیت شده می‌تواند در این خصوص موفق عمل کند. Zinjard و همکاران در سال ۲۰۰۰ در تجزیه زیستی نفت خام توسط سلول‌های میکروبی تثبیت شده درون دانه‌های آلژینات نشان دادند که در غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۵ w/v سلول‌های آزاد و تثبیت شده رفتاری مشابه داشتند اما با افزایش غلظت آلاینده سلول‌های تثبیت شده کارآمدتر بودند (۴۵). به طور مشابه Liu و همکاران تاثیر غلظت آلاینده فنل در تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌های آزاد و تثبیت شده را بررسی کردند. مشاهدات آنها نشان داد که در غلظت اولیه ۸۰۰ mg/L سلول‌های آزاد و تثبیت شده بیش از ۹۵ درصد فنل را طی ۳۵ h تجزیه کردند و در غلظت‌های فنل بالاتر از ۵۰۰ mg/L، سلول‌های تثبیت شده کارایی بهتری را در حذف آلاینده نشان دادند (۴۴).

Barreto و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی، اسپور باکتریایی را درون دانه‌های کایتوزان تثبیت کردند. نتایج آنها نشان داد علاوه بر اینکه تثبیت بر مشکلات ناشی از پایداری اسپور باکتری *Bacillus subtilis* غلبه می‌کند، امکان استفاده مجدد از سلول‌های تثبیت شده نیز وجود دارد (۴۶). در تحقیق مشابهی Luan و همکاران در سال ۲۰۰۶ در تجزیه زیستی تری بوتیل تین (TBT) از تثبیت جلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*) در دانه‌های آلژینات کلسیم استفاده کردند. تحقیقات آنها نشان داد که جلبک‌های تثبیت شده قادرند در سطوح مختلف آلودگی برای حداقل شش دوره متوالی، TBT را به میزان ۹۰ درصد از بین

دارند. دلیل این امر را می‌توان به عوامل مختلفی نظیر نقش پوشش محافظ مواد حامل در برابر ترکیبات سمی، تاثیر هم‌افزایی (سینرژیسم) میکروارگانیسم‌ها کنار یکدیگر، کاهش اثر بازدارندگی عوامل بازدارنده و انتقال جرم کنترل شده مرتبط دانست. براساس نتایج به‌دست آمده سویه *B. licheniformis* در محیط‌های اسیدی نسبت به محیط‌های خنثی از توانایی کمتری برای تجزیه زیستی نفت‌خام برخوردار است. اما در حالت تثبیت راندمان حذف زیستی به مقدار قابل توجهی افزایش یافته است که می‌توان نتیجه گرفت تثبیت سلول سبب افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط محیطی سخت می‌شود (۴۹، ۵۰).

در طبیعت تخریب هیدروکربن‌های بلندزنجیره توسط میکروارگانیسم‌ها به‌سختی صورت می‌گیرد (۵۱). در این تحقیق براساس نتایج کروماتوگرافی گازی، می‌توان گفت که سویه *B. licheniformis* تثبیت‌شده، در تجزیه آلکان‌های بلندزنجیره نیز عملکرد خوبی داشته است. Sadeghazad و همکاران (۲۰۰۳) تخریب آلکان‌های بلند زنجیره را توسط سه سویه *B. licheniformis*، *B. subtilis* و *Pseudomonas* بررسی کردند. مطابق با نتایج آنها *B. licheniformis* در تخریب ایزو و سیکلوآلکان‌های بلندزنجیره موفق بوده است که این نتیجه، مشاهدات این مطالعه را تایید می‌کند (۵۲).

### نتیجه‌گیری

نتایج کلی نشان می‌دهد که تثبیت سلول‌های میکروبی درون دانه‌های آلژینات کلسیم، رویکردی نوآورانه برای تجزیه‌زیستی نفت‌خام از محیط آلوده است که علاوه بر محافظت از میکروارگانیسم‌ها برای مدت طولانی‌تر، سبب افزایش مقاومت آنها در برابر شرایط محیطی سخت و افزایش بهبود کارایی آنها در تخریب آلاینده می‌شود. همچنین با استفاده از روش الکترواسپری می‌توان سایز دانه‌های آلژینات را کاهش داد و بر مشکلات انتقال جرمی

ببرند. آنها نتیجه گرفتند که آلژینات به‌دلیل پایداری بالا و تاثیر فیزیولوژیکی کم بر روی میکروارگانیسم‌ها، پلیمر مناسبی برای تثبیت سلول‌های میکروبی است (۲۰). Sarioğlu و همکاران در سال ۲۰۱۷ برای زیست‌پالایی رنگ آبی متیلن از روش الکترورسی برای تثبیت سویه *Pseudomonas aeruginosa* استفاده کردند. در این روش سلول‌های باکتری بر روی شبکه نانوالیاف Polyethylene oxide و Polyvinyl alcohol (PVA) (PEO) الکترورسی شده تثبیت شدند. نتایج آنها نشان داد تجزیه زیستی آبی متیلن براساس حضور باکتری بوده و حذف مشابهی توسط سلول‌های آزاد مشاهده کردند. آنها همچنین دریافتند که شبکه‌های نانوالیاف الکترورسی بستر مناسبی برای حفظ سلول‌های زنده است به گونه‌ای که باکتری‌های تثبیت شده می‌توانند برای مدت طولانی در دمای ۴ °C نگهداری شوند (۴۷). Sarioğlu و همکاران در تحقیق دیگری (۲۰۱۶) با استفاده از سویه *Morganella morganii* تثبیت شده بر سطح شبکه پلی‌سولفون و پلی‌استایرن الکترورسی شده حذف زیستی کروم ۶ ظرفیتی را بررسی کردند. براساس نتایج آنها سلول‌های تثبیت‌شده توانستند ۹۳/۶۰ و ۹۳/۷۹ درصد برای ۱۰ mg/L، ۹۹/۴۷ و ۹۰/۷۸ درصد برای ۱۵ mg/L و ۷۰/۴۱ و ۶۸/۲۷ درصد برای ۲۵ mg/L غلظت اولیه کروم را به مدت ۷۲ h تجزیه کنند و حداقل برای پنج دوره متوالی استفاده شوند بدون اینکه توانایی حذف زیستی کاهش یابد (۳۲). به‌طور مشابه Eroğlu و همکاران در تجزیه نیترات توسط میکروارگانیسم تثبیت شده بر نانوالیاف کایتوزان الکترورسی شده موفق به حذف ۸۷ درصد نیترات از پساب آلوده شدند. آنها دریافتند که رشد میکروارگانیسم‌ها روی مواد نانوکامپوزیت سبب حفظ یکپارچگی سلول‌ها حتی پس از شش ماه تماس با محلول آبی می‌شود (۴۸). بنابراین در اکثر تحقیقات قبلی نیز مشابه تحقیق حاضر، نشان داده شده است که میکروارگانیسم‌های تثبیت‌شده نسبت به سلول‌های آزاد توانایی تجزیه‌زیستی بالاتری

"زیست‌سالم سازی آب های آلوده به نفت خام با استفاده از سامانه سلول میکروبی تثبیت شده" در مقطع کارشناسی ارشد رشته مهندسی شیمی گرایش HSE مصوب سال ۱۳۹۸ در دانشکده محیط‌زیست کرج است که با حمایت دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی تهران اجرا شده است. نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از آقای دکتر علی ابوالحسنی سورکی به خاطر جداسازی، شناسایی و در اختیار قرار دادن سویه باکتریایی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی نمایند.

## References

1. Liang Y, Zhang X, Dai D, Li G. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009;63(1):80-87.
2. Bovio E, Gnani G, Prigione V, Spina F, Denaro R, Yakimov M, et al. The culturable mycobiota of a mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. *Science of the Total Environment*. 2017;576:310-18.
3. Ausheva KA, Goncharuk DA, Babusenko ES, Nekhaev SA, Sulygova ZS, Markvichev NS. Development of a bacterial preparation based on immobilized cells. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2008;42(5):767-73.
4. Gentili AR, Cubitto MA, Ferrero M, Rodríguez MS. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2006;57(4):222-28.
5. Kok Kee W, Hazaimah H, Mutalib SA, Abdullah PS, Surif S. Self-immobilised bacterial consortium culture as ready-to-use seed for crude oil bioremediation under various saline conditions and seawater. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2014;12(7):2253-62.
6. Talaie Khozani AR, Jafarzadeh Haghghi fard N, Talaie Khozani MR, Beheshti M. The determination of

سامانه تثبیت سلولی فائق آمد و این سامانه می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای سامانه سلول‌های آزاد در تصفیه پساب مورد استفاده قرار گیرد.

## ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان

- bio-kinetic coefficients of crude oil biodegradation using *Pseudomonas Aeruginosa* bacteria. *Iranian Journal of Health and Environment* 2010;3(2):111-22 (in Persian).
7. Darvishi P, Mowla D, Ayatollahi S, Niazi A. Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an efficient strain, ERCPP1-1. *Desalination and Water Treatment*. 2011;28(1-3):46-54.
  8. Safari M, Ahmady-Asbchin S, Soltani N. The potential of *Cyanobacterium schizothrix vaginata* ISC108 in biodegradation of crude oil. *Iranian Journal of Health and Environment* 2014;7(3):363-74 (in Persian).
  9. Bao MT, Wang LN, Sun PY, Cao LX, Zou J, Li YM. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 2012;64(6):1177-85.
  10. Lin M, Liu Y, Chen W, Wang H, Hu X. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014;88:8-12.
  11. Partovinia A, Naeimpoor F. Phenanthrene biodegradation by immobilized microbial consortium in polyvinyl alcohol cryogel beads. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013;85:337-44.
  12. Chackoshian Khorasani A-R, Mashreghi M, Yaghmaei S. Investigating biodegradation of heavy fuel oil by kinetic models and new third parametric equa-

- tion. Iranian Journal of Health and Environment 2013;6(3):307-18 (in Persian).
13. Partovinia A, Shamsollahi Z. Application of immobilized microbial cells in biological treatment of contaminated effluent with aromatic compounds: A review article. Iranian Journal of Health and Environment. 2019;12(2):273-88.
  14. Kuyukina MS, Ivshina IB, Kamenskikh TN, Bulicheva MV, Stukova GI. Survival of cryogel-immobilized Rhodococcus strains in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency. International Biodeterioration & Biodegradation. 2013;84:118-25.
  15. Lobakova E, Vasilieva S, Kashcheeva P, Ivanova E, Dolnikova G, Chekanov K, et al. New bio-hybrid materials for bioremoval of crude oil spills from marine waters. International Biodeterioration & Biodegradation. 2016;108:99-107.
  16. Franzetti A, Caredda P, Ruggeri C, La Colla P, Tamburini E, Papacchini M, et al. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. Chemosphere. 2009;75(6):801-807.
  17. Abdeen Z, El-Sheshtawy HK, Moustafa Y. Enhancement of crude oil biodegradation by immobilizing of different bacterial strains on porous PVA hydrogels or combining of them with their produced biosurfactants. Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology. 2014;5(5):1.
  18. Kostov G, Mihail A, Mihaylov I, Poncelet D. Mechanical properties of Ca-Alginate beads for ethanol fermentation with immobilized yeast. Revue de Génie Industriel 2010;5:30-40.
  19. Partovinia A, Rasekh B. Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 2018;48(1):1-38.
  20. Luan TG, Jin J, Chan SMN, Wong YS, Tam NFY. Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. Process Biochemistry. 2006;41(7):1560-65.
  21. Rahman RN, Ghaza FM, Salleh AB, Basri M. Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. Journal of Microbiology. 2006;44(3):354-59.
  22. Klein S, Kuhn J, Avrahami R, Tarre S, Beliaevski M, Green M, et al. Encapsulation of bacterial cells in electrospun microtubes. Biomacromolecules. 2009;10(7):1751-56.
  23. Leenen EJTM, Dos Santos VAP, Grolle KCF, Tramper J, Wijffels R. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. Water Research. 1996;30(12):2985-96.
  24. Bandhyopadhyay K, Das D, Bhattacharyya P, Maiti BR. Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilized on calcium alginate. Biochemical Engineering Journal. 2001;8(3):179-86.
  25. Abou Seoud M, Maachi R. Biodegradation of naphthalene by free and alginate entrapped *Pseudomonas* sp. Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences. 2003;58(9-10):726-31.
  26. Steffan S, Bardi L, Marzona M. Azo dye biodegradation by microbial cultures immobilized in alginate beads. Environment International. 2005;31(2):201-205.
  27. Martinsen A, SkjBk-Braek G, Smidsrsd O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. Biotechnology and Bioengineering. 1989;33(1):79-89.
  28. Wang B, Wang Q, Liancai Z, Fengwei Y. Degrade naphthalene using cells immobilized combining with low-intensity ultrasonic technique. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2007;57(1):17-21.
  29. Partovinia A, Vatankhah E. Experimental investigation into size and sphericity of alginate microbeads produced by electrospraying technique: Operational condition optimization. Carbohydrate Polymers. 2019;209:389-99.
  30. Barron C, He J-Q. Alginate-based microcapsules generated with the coaxial electrospray method for clinical application. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2017;28(13):1245-55.
  31. Xie J, Wang CH. Electrospray in the dripping mode for cell microencapsulation. Journal of Colloid and Interface Science. 2007;312(2):247-55.

32. Sarioglu OF, Celebioglu A, Tekinay T, Uyar T. Bacteria-immobilized electrospun fibrous polymeric webs for hexavalent chromium remediation in water. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2016;13(8):2057-66.
33. Estevinho BN, Lopes AR, Sousa V, Rocha F, Nunes OC. Microencapsulation of *Gulosibacter molinivorax* ON4(T) cells by a spray-drying process using different biopolymers. *Journal of Hazardous Materials*. 2017;338:85-92.
34. San Keskin NO, Celebioglu A, Sarioglu O, Ozkan A, Uyar T, Tekinay T. Removal of a reactive dye and hexavalent chromium by a reusable bacteria attached electrospun nanofibrous web. *RSC Advances*. 2015;5:86867-74.
35. Siripattanakul S, Wirojanagud W, McEvoy J, Khan E. Effect of cell-to-matrix ratio in polyvinyl alcohol immobilized pure and mixed cultures on atrazine degradation. *Water, Air and Soil Pollution: Focus* 2007 (4):257-66.
36. Hu ZC, Korus RA, Levinson WE, Crawford RL. Adsorption and biodegradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium*. *Environmental science & technology*. 1994;28(3):491-96.
37. Weir S, Dupuis S, Providenti M, Lee H, Trevors J. Nutrient-enhanced survival of and phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free-*Pseudomonas* sp. UG14Lr cells in creosote-contaminated soil slurries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995;43(5):946-51.
38. Weir SC, Providenti MA, Lee H, Trevors JT. Effect of alginate encapsulation and selected disinfectants on survival of and phenanthrene mineralization by *Pseudomonas* sp UG14Lr in creosote-contaminated soil. *Journal of Industrial Microbiology*. 1996;16:62-67.
39. Jianlong W, Liping H, Hanchang S, Yi Q. Biodegradation of quinoline by gel immobilized *Burkholderia* sp. *Chemosphere*. 2001;44(5):1041-46.
40. Mulla SI, Talwar MP, Bagewadi ZK, Hoskeri RS, Ninnekar HZ. Enhanced degradation of 2-nitrotoluene by immobilized cells of *Micrococcus* sp. strain SMN-1. *Chemosphere*. 2013;90(6):1920-24.
41. Daâssi D, Rodríguez-Couto S, Nasri M, Mechichi T. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriopsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014;90:71-78.
42. Siripattanakul S, Khan E. Fundamentals and applications of entrapped cell bioaugmentation for contaminant removal. In: Shah V, editor. *Emerging environmental technologies*. Netherlands: Springer; 2010.
43. Li T, Deng X, Wang J, Chen Y, He L, Sun Y, et al. Biodegradation of nitrobenzene in a lysogeny broth medium by a novel halophilic bacterium *Bacillus licheniformis*. *Marine Pollution Bulletin*. 2014;89(1-2):384-89.
44. Liu YJ, Zhang AN, Wang XC. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;44(2):187-92.
45. Zinjarde SS, Pant A. Crude oil degradation by free and immobilized cells of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2000;35(5):755-63.
46. Barreto RV, Hissa DC, Paes FA, Grangeiro TB, Nascimento RF, Rebelo LM, et al. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. *Bioresource Technology*. 2010;101(7):2121-25.
47. Sarioglu OF, Keskin NOS, Celebioglu A, Tekinay T, Uyar T. Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;152:245-51.
48. Eroglu E, Agarwal V, Bradshaw M, Chen X, Smith S, Raston C, et al. Nitrate removal from liquid effluents using algae-immobilized chitosan nanofiber mats. *Green Chemistry*. 2012;14:2682-85.
49. Ehrhardt HM, Rehm HJ. Phenol degradation by microorganisms adsorbed on activated carbon. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1985;21:32-36.
50. Kapoor A, Kumar R, Kumar A, Sharma A, Prasad S. Application of immobilized mixed bacterial culture for the degradation of phenol present in oil refinery effluent. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 1998;33(6):1009-21.

51. Kubota K, Koma D, Matsumiya Y, Chung SY, Kubo M. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation*. 2008;19(5):749-57.
52. Sadeghazad A, Ghaemi N. Microbial prevention of wax precipitation in crude oil by biodegradation mechanism. *SPE Asia Pacific Oil and Gas Conference and Exhibition*; 2003; Jakarta, Indonesia.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



## Biodegradation of crude oil by immobilized microbial cells in alginate beads produced by electrospraying technique

E Khanpour-Alikelayeh<sup>1,2</sup>, A Partovinia<sup>2,\*</sup>, A Talebi<sup>1</sup>, H Kermanian<sup>2</sup>

1- Department of Environment, College of Environment, Karaj, Iran

2- Biorefinery Engineering Department, Faculty of New Technologies Engineering, Zirab Campus, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

### ARTICLE INFORMATION:

**Received:** 17 August 2019

**Revised:** 5 November 2019

**Accepted:** 12 November 2019

**Published:** 18 March 2020

**Keywords:** Biodegradation, Wastewater treatments, Crude oil, Cell immobilization, Free cell

### \*Corresponding Author:

[a\\_partovi@sbu.ac.ir](mailto:a_partovi@sbu.ac.ir)

### ABSTRACT

**Background and Objective:** Petroleum compounds are major contributors to aquatic environmental pollution. In recent years, biological treatments as environmental-friendly and cost-effective techniques have been used alongside the various physico-chemical methods. Microbial cell immobilization in hydrogel carriers has been the focus of researchers due to various advantages such as ease of microbial species control, non-direct exposure of pollutants to the cells, increasing cell resistance during different types of stresses and reusability. The main goals of this study were introduction to electrospraying technique in order to size reduction of alginate beads and comparison of heavy crude oil biodegradation using an isolated strain of *Bacillus licheniformis* in free and immobilized cells.

**Materials and Methods:** The oil-degrading strain was isolated from oil-polluted site on Kharg Island. Microbial cells were examined in both free and immobilized systems under different conditions (pH=5,7) and initial crude oil concentration (1500,3500 ppm). Electrospraying technique was used for alginate beads production. Residual crude oil content was analyzed by gas chromatograph and gravimetrically method.

**Results:** The maximum oil removal (61%) was obtained for the immobilized cells at a concentration of 3500 ppm in neutral medium. Overall, according to the results, after the 14<sup>th</sup> day, the biodegradation through the immobilized cells was significantly ( $p<0.05$ ) higher than the free cells. Moreover, the cell immobilization caused the microorganisms to be more resistant to the harsh environments.

**Conclusion:** This study showed that the immobilized microbial cell system has a great potential for oil wastewater treatment. The electrospraying technique can be used to overcome to the mass transfer limitations.