

# مقایسه عملکرد باکتری *Methylobacterium* sp. در حذف ترکیبات نفت خام به صورت آزاد و تثبیت شده: رویکردی بر پایه فعالیت آنزیم‌های کلیدی

میترا پارسا<sup>۱</sup> و سنبل ناظری<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه تولیدات و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲. دانشیار، گروه تولیدات و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۰

## چکیده

نشت نفت خام و ماندگاری ترکیبات هیدروکربنی در محیط زیست، تهدیدی جدی برای سلامت انسان و اکوسیستم‌ها محسوب می‌شود. این ترکیبات به دلیل سمیت، پایداری بالا و تجمع در منابع آب و خاک، موجب اختلال در زنجیره‌های غذایی و تشدید بحران‌های زیست‌محیطی می‌شوند. زیست‌پالایی با بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌ها، راهکاری مؤثر، اقتصادی و سازگار با محیط برای حذف این آلاینده‌ها است. در این پژوهش، توان تجزیه نفت خام توسط باکتری *Methylobacterium* sp. در دو وضعیت سلول آزاد و تثبیت شده در آلزینات سدیم بررسی و فعالیت آنزیم‌های آلکان مونواکسیژناز، سیتوکروم P450 و لیپاز به‌عنوان آنزیم‌های کلیدی در تجزیه ترکیبات نفتی ارزیابی شد.

نتایج نشان داد که در حضور چهار درصد نفت خام (۳۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، باکتری در حالت آزاد موفق به تجزیه حدود ۵۰ درصد از ترکیبات نفتی شد، در حالی که تثبیت آن در دانه‌های آلزیناتی موجب افزایش تجزیه به ۷۰ درصد شد. آنالیز GC-MS نشان داد آلکان‌های سبک (C4-C9) به‌طور کامل و ترکیبات سنگین (C14-C28) تا ۷۴ درصد در حالت تثبیت شده تجزیه شدند. تصاویر میکروسکوپی FE-SEM ساختار متخلخل دانه‌ها و توزیع مناسب سلول‌ها را نشان داد. بیشینه فعالیت آنزیمی آلکان مونواکسیژناز، سیتوکروم P450 و لیپاز در سلول‌های تثبیت شده در روز سوم به ترتیب برابر با ۹، ۹/۵۰ و ۱۳/۵۵ واحد بر میلی‌گرم بود. تثبیت باکتری موجب افزایش پایداری، حفاظت سلولی و ارتقای عملکرد تجزیه‌ای شد. نتایج این مطالعه نقش اثربخش تثبیت *Methylobacterium* sp. را در زیست‌پالایی نفت خام تأیید کرده و می‌تواند گامی مؤثر در توسعه سامانه‌های مقیاس‌پذیر، ایمن و دوستدار محیط‌زیست برای مدیریت آلودگی‌های نفتی به‌شمار رود.

واژه‌های کلیدی: آلکان مونواکسیژناز، باکتری *Methylobacterium* sp.، تثبیت سلولی، سیتوکروم P450 و لیپاز.

## مقدمه

بنزن و تولوئن را با راندمان قابل توجهی تجزیه نماید. این یافته‌ها حاکی از توان بالای این باکتری در تحمل شرایط آلوده، مصرف متابولیت‌های واسطه‌ای حاصل از تجزیه ناقص و ایفای نقش مؤثر در کاهش بار آلاینده‌ها در محیط است (Maki et al., 2023).

یکی از مهم‌ترین دلایلی که باکتری‌های تجزیه‌کننده قادر به تجزیه ترکیبات نفتی هستند، حضور آنزیم‌های زیست‌تجزیه‌ای اختصاصی در ساختار آن‌هاست که امکان شکستن پیوندهای شیمیایی هیدروکربن‌ها را فراهم می‌سازد (Wasoh et al., 2019; Yong and Zhong, 2010). کارایی تجزیه هیدروکربن‌ها به‌طور عمده به گونه‌های باکتریایی درگیر و ماهیت مکانیزم‌های اکسیداسیون آنزیمی آن‌ها بستگی دارد (Parthipan et al., 2017). آنزیم‌های دخیل در تجزیه زیستی آلکان‌ها بر اساس طول زنجیره کربنی ترکیبات هدف، به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند (Van Beilen and Funhoff, 2007). آلکان‌های با زنجیره کوتاه (C1-C4) بیشتر توسط آنزیم متان‌مونواکسیژناز تجزیه می‌شوند که با وارد کردن یک اتم اکسیژن به مولکول، آن را برای مراحل بعدی متابولیسم آماده می‌کند. آلکان‌های با زنجیره متوسط (C5-C16) توسط آنزیم‌های آلکان‌مونواکسیژناز بدون هم مورد اکسیداسیون قرار می‌گیرند که توسط ژن‌هایی مانند AlkB کد می‌شوند و آلکان‌ها را مستقیماً به الکل‌های اولیه تبدیل می‌کنند (Van Beilen et al., 1994). در مقابل، تجزیه آلکان‌های با زنجیره بلندتر از ۲۰ کربن به عهده آنزیم‌هایی نظیر سیتوکروم P۴۵۰، آلکان‌هیدروکسیلازهای دی‌آهن و مونواکسیژنازهای وابسته به فلاوین است که از طریق واکنش‌های اکسیداتیو پیچیده، ترکیبات نفتی سنگین را به اجزای قابل جذب و متابولیسم توسط باکتری‌ها تبدیل می‌کنند (Parthipan et al., 2017; Singh et al., 2012). علاوه بر این، آنزیم‌های لیپاز نیز نقش مؤثری در زیست‌تجزیه نفت خام دارند (Kadri et al., 2018). این آنزیم‌ها قادرند پیوندهای استری موجود در ترکیبات چرب را شکسته و اسیدهای چرب و گلیسرول آزاد کنند. اسیدهای چرب حاصل می‌توانند

در دنیای امروز، هیدروکربن‌های موجود در نفت خام همچنان یکی از منابع اصلی تأمین انرژی محسوب می‌شوند. با این حال، این ترکیبات به دلیل ویژگی‌های سمی، سرطان‌زا و پایداری بالا در برابر تجزیه زیستی، تهدیدی جدی برای سلامت انسان و اکوسیستم‌ها به‌شمار می‌آیند. از جمله پیامدهای زیست‌محیطی حضور آن‌ها می‌توان به آلودگی منابع آب و خاک، برهم خوردن تعادل در زنجیره‌های غذایی و افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای اشاره کرد که در نهایت منجر به بروز چالش‌های اقتصادی و اجتماعی گسترده می‌شوند (Ahmed and Fakhruddin, 2018; Elijah, 2022; Mohanta et al., 2024; Tahmasbizadeh et al., 2025). علاوه بر این، حضور نفت خام در محیط، به‌ویژه در موارد نشت نفت، خطرات بلندمدت زیست‌محیطی ایجاد می‌کند که نیازمند اقدامات نظارتی سخت‌گیرانه و راهکارهای پایدار است (Godec and Biglarbigi, 1991; Ngene et al., 2016; Sojini and Ejeromedoghene, 2019).

فرایند پاک‌سازی آلودگی نفتی از طریق روش‌های فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی و زیستی صورت می‌گیرد. روش‌های شیمیایی و فیزیکی به‌طور معمول نیازمند تجهیزات صنعتی پرهزینه و مصرف انرژی بالا هستند. در مقابل، تجزیه زیستی راهکاری مناسب و دوستدار محیط‌زیست برای حذف ترکیبات نفتی به‌شمار می‌آید (Omotosho, 2024; Rezaei et al., 2016). Somee et al., 2016. اثربخشی این روش تا حد زیادی وابسته به انتخاب گونه‌های میکروبی مناسب و همچنین شرایط محیطی حاکم بر فرایند پالایش است. گونه‌های مختلفی مانند *Achromobacter*، *Acinetobacter*، *Flavobacterium* و *Pseudomonas* برای زیست‌پالایی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Salam et al., 2015). یکی دیگر از میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌های متیلوتروف اختیاری مانند *Methylobacterium* هستند که می‌توانند ترکیبات تک کربنه مانند متانول و فرمالدهید را متابولیزه کرده و در شرایط محیطی متنوع به فعالیت بپردازند. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که باکتری *Methylobacterium extorquens* قادر است ترکیبات آروماتیک نفتی نظیر نفتالن، زایلن،

سیتوکروم P450 و لیپاز، بررسی شد. شایان توجه است که این پژوهش، نخستین مطالعه‌ای است که عملکرد باکتری *Methylobacterium sp.* را در حالت تثبیت‌شده، به‌طور مستقیم و اختصاصی در زمینه تجزیه ترکیبات نفتی مورد ارزیابی قرار می‌دهد.

## روش مطالعه

### بهینه کردن شرایط رشد و تعیین نرخ رشد باکتری

در این مطالعه از گونه باکتریایی *Methylobacterium sp.* که توسط گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بوعلی‌سینا شناسایی شده بود، استفاده شد. برای آماده‌سازی تلقیح، باکتری مورد نظر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت شیکر ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند. سپس سلول‌ها دو بار با محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم شست‌وشو داده شده و در همان محلول نگهداری شدند. در نهایت، چگالی نوری (OD) نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر بر مقدار یک تنظیم شد که این مقدار معادل با غلظت  $10^8$  CFU/mL بود (Sakdapetsiri et al., 2021).

برای تعیین pH بهینه برای رشد باکتری، باکتری *Methylobacterium sp.* بر روی محیط MSM حاوی چهار درصد (۳۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نفت خام ایرانی در بازه‌های پنج تا هشت (۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸) به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نرخ رشد باکتری در فواصل زمانی مختلف (صفر، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶، ۱۰۸ و ۱۲۰ ساعت) از طریق شمارش واحدهای تشکیل‌دهنده کلونی (CFU) روی محیط کشت جامد LB با روش استاندارد جت و همکاران (Jett et al., 1997) اندازه‌گیری شد. پس از تعیین pH بهینه، میانگین زمان تولید (Td) و نرخ رشد ویژه ( $\mu$ ) باکتری با استفاده از روش زویترینگ و همکاران (Zwietering et al., 1990) محاسبه شد.

به‌عنوان منبع انرژی و کربن برای رشد میکروارگانیسم‌ها عمل کرده و موجب تسریع فرآیند تجزیه ترکیبات نفتی شوند. از آن‌جا که تجزیه نفت خام یک فرآیند مداوم و چندمرحله‌ای است، ترکیبات واسطه‌ای حاصل از تخریب آلکان‌های خطی می‌توانند به‌عنوان ترکیبات حدواسط برای فعالیت لیپازها و استرازها عمل کنند. این تعامل آنزیمی میان مسیرهای متابولیکی مختلف، باعث بهبود کارایی زیست‌پالایی شده و امکان رهگیری دقیق‌تر پیشرفت تجزیه زیستی را فراهم می‌سازد (Adlan et al., 2020).

اگرچه زیست‌پالایی به‌عنوان روشی مؤثر، کم‌هزینه و سازگار با محیط‌زیست برای حذف آلاینده‌های نفتی شناخته می‌شود، اما در عمل با چالش‌هایی نظیر کاهش فعالیت میکروبی، از دست رفتن سویه‌های مؤثر و ناپایداری عملکرد مواجه است. در این میان، استفاده از فناوری تثبیت میکروبی با فراهم آوردن شرایطی پایدارتر برای رشد و فعالیت سلول‌ها، حفظ تراکم بالا، کاهش تلفات میکروارگانیسم‌ها و افزایش مقاومت آن‌ها در برابر تنش‌های محیطی، می‌تواند راهکاری مؤثر برای غلبه بر این محدودیت‌ها باشد (Laothamteep et al., 2022). این روش، کارایی افزایش زیستی را به‌طور قابل توجهی بالا می‌برد و امکان کنترل بهتر بر تعاملات میکروبی در سایت‌های آلوده را فراهم می‌آورد. مزایای مختلفی از سیستم‌های سلول تثبیت‌شده نسبت به سلول‌های آزاد ارائه شده است که می‌توان به مقاومت بیشتر در برابر شرایط محیطی سخت، نیاز کمتر به محیط رشد و فضا و سهولت جداسازی سلول از محیط کشت اشاره کرد (Eroglu et al., 2015; Moreno-García et al., 2018; Partovinia and Rasekh, 2018; Srividya and Vishnuvarthan, 2014).

در این مطالعه، کارایی حذف نفت خام توسط باکتری *Methylobacterium sp.* در دو وضعیت سلولی آزاد و تثبیت‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت تا مشخص شود آیا فرآیند تثبیت می‌تواند موجب بهبود زیست‌تجزیه ترکیبات نفتی گردد یا خیر. همچنین، میزان فعالیت آنزیم‌های کلیدی دخیل در تجزیه هیدروکربن‌ها، از جمله آلکان‌مونواکسیژناز،

## تثبیت باکتری در دانه‌های آلژینات

برای تثبیت باکتری، مایع تلقیح با غلظت حدود  $10^8$  CFU/mL تهیه شد. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت جداسازی شدند و سپس در محلول استریل (W/V) دو درصد آلژینات سدیم معلق شدند و به آرامی به مدت یک ساعت مخلوط شدند. مخلوط به داخل بورت ۲۵ میلی لیتری منتقل شد که در فاصله ۱۴ سانتی متری بالای سطح محلول ۰/۲ مولار کلرید کلسیم قرار داشت. قطرات به شکل دانه‌هایی با قطر تقریبی یک میلی متر در آمده و به مدت دو ساعت جهت تکمیل فرایند ژل شدن در محلول کلرید کلسیم نگهداری شدند. سپس دانه‌های حاوی سلول‌های باکتری با آب مقطر استریل شسته شده و در دمای اتاق تا زمان استفاده نگهداری شدند.

## میکروسکوپ الکترونی روبشی با نشر میدانی (FE-SEM)

برای بررسی ساختار سطح مقطع دانه‌های آلژینات کلسیم حاوی باکتری‌های تثبیت شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی با نشر میدانی (FE-SEM) استفاده شد. دانه‌ها به صورت تدریجی در اتانول با غلظت‌های (از ۱۰ تا ۱۰۰ درصد) دهیدراته شدند. سپس به مدت یک ساعت در جریان هوا خشک و با لایه نازکی از طلا پوشش داده شدند و با استفاده از نوار گرافیتی روی پایه میکروسکوپ پیاده‌سازی و ساختار آنها مشاهده و ثبت شد.

## آزمون‌های تجزیه زیستی نفت خام

### طراحی آزمایش

دو آزمایش برای ارزیابی توانایی گونه باکتریایی در تجزیه نفت خام انجام شد. در آزمایش اول، از سلول‌های آزاد باکتری استفاده گردید. آزمایش دوم مشابه آزمایش اول بود، با این تفاوت که به جای سلول‌های آزاد، از تعداد مشابهی از سلول‌ها به صورت تثبیت شده در دانه‌های آلژینات کلسیم استفاده شد. هر دو آزمایش در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MSM حاوی چهار درصد نفت خام انجام گرفت. نمونه‌های مورد آزمایش در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۵۰

دور در دقیقه به مدت ۱۵ روز گرماگذاری شدند. برای بررسی اثرات غیرزیستی، یک نمونه شاهد شامل دانه‌های استریل (فاقد باکتری) در محیط کشت MSM حاوی چهار درصد نفت خام تهیه شد تا میزان اتلاف نفت به دلایل فیزیکی یا جذب سطحی مورد بررسی قرار گیرد. تمامی آزمایش‌ها به صورت سه تکرار مستقل انجام شد.

### اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی کل (TPH)

در روز پانزدهم، همه نمونه‌ها با ۲۰ میلی لیتر مخلوط ان هگزان:دی‌کلرومتان (نسبت ۱:۱) برای استخراج نفت باقیمانده ترکیب شدند. سپس از روش وزنی مطابق با خانپور علی کلایه و همکاران (Khanpour-Alikelayeh et al., 2020) برای تعیین مقدار نفت باقیمانده استفاده شد.

### آنالیز GC-MS

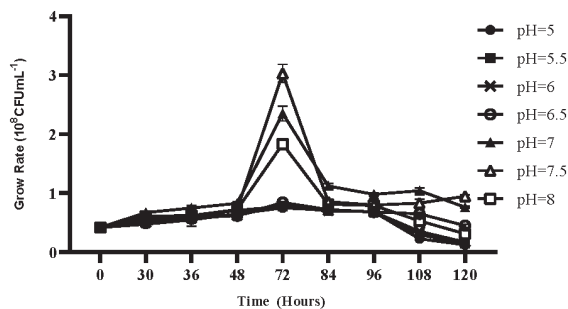
نفت خام باقیمانده پس از هفت روز انکوباسیون، با استفاده از دو مرحله استخراج با دی‌کلرومتان استخراج شد (Baltaci et al., 2024). آنالیز نمونه‌ها با دستگاه Agilent GC 6890/MS 5973 و ستون HP-5MS انجام گرفت. به منظور تزریق، حجم یک میکرولیتر از نمونه با نسبت تقسیم ۱:۱۰ وارد دستگاه شد. گاز حامل هلیوم با دبی ۱ میلی لیتر در دقیقه، دمای تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، و برنامه دمایی از ۴۰ تا ۲۸۰ درجه با نرخ افزایش ۱۰ درجه در دقیقه تنظیم شده بود. طیف جرمی در بازه جرم-بار ۳۰ تا ۴۰۰ m/z با سرعت ۶ طیف در ثانیه ثبت گردید. شناسایی ترکیبات بر اساس مقایسه با کتابخانه طیفی NIST05 انجام شد.

### سنجش فعالیت سه آنزیم‌های تخریب‌کننده ترکیبات نفتی

پیش از سنجش فعالیت آنزیم‌های آلکان مونواکسیژناز (AlkB)، سیتوکروم P۴۵۰ (CYP450) و لپاز، سلول‌های تثبیت شده در دانه‌های آلژینات با استفاده از محلول سیترات سدیم با غلظت ۲۰ گرم بر لیتر و بر اساس روش لی و همکاران (Lee et al., 1991) آزادسازی شدند.

سپس، فعالیت آنزیم AlkB با سنجش میزان اکسیداسیون NADH در طول موج ۳۴۰ نانومتر

خنثی تا قلیایی گزارش کرده‌اند، هم‌خوانی دارد (Fatajeva et al., 2014; Qu et al., 2023; Rojas-Gätjens et al., 2022; Zhang et al., 2021). کیم و همکاران (Kim et al., 2005) گزارش کردند که گونه *M. vanbaalenii* PYR-1 در محیط حاوی پیرن و فنانترن، بالاترین نرخ رشد را در بازه pH بین ۶/۵ تا ۷/۵ نشان داده است (Kim et al., 2005).



شکل ۱. نرخ رشد باکتری *Methylobacterium sp.* در سطوح مختلف pH در محیط MSM چهار درصد (۳۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نفت خام

### نرخ رشد باکتری در بازه زمانی مختلف

در شرایط کنترل (محیط حاوی یک درصد گلوکز)، رشد *Methylobacterium sp.* به‌طور پیوسته افزایش یافت و در حدود ۳۰ ساعت (بیش از یک روز) به بیشینه مقدار خود رسید؛ اما پس از آن کاهش قابل توجهی در تراکم سلولی مشاهده شد. در محیط حاوی چهار درصد نفت خام، اگرچه نرخ رشد نسبت به شرایط کنترل کمتر بود، اما بیشینه رشد در حدود ۷۲ ساعت (سه روز) به‌دست آمد. در این شرایط، نرخ رشد ویژه باکتری برابر با  $0.1028 \text{ d}^{-1}$  و زمان دو برابر شدن برابر با  $6/74$  روز برآورد شد (شکل ۲).

مطالعات متعددی نرخ رشد ویژه گونه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده را گزارش کرده‌اند. به‌عنوان مثال، سویه *Pseudomonas sp. LP5* که از خاک آلوده به هیدروکربن در لاگوس نیجریه جداسازی شده بود، در فرآیند تجزیه روغن موتور مصرف‌شده، نرخ رشدی برابر با  $0.13 \text{ d}^{-1}$  نشان داد (Obayori et al., 2014). همچنین، سلام و همکاران (Salam et al., 2015) گزارش کردند که سویه *Methylobacterium mesophilicum* نرخ رشدی معادل  $0.10 \text{ d}^{-1}$  در حضور روغن موتور مصرف‌شده داشته است

(Schellenberg and Hellerman, 1958). فعالیت CYP450 با آزمون طیف تفاوتی CO در طول موج ۴۵۰ نانومتر (Zuo et al., 2010) و فعالیت لپاز با استفاده از بستر pNPP و اندازه‌گیری جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر (Jauhari et al., 2014) سنجش شدند.

### آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند و داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) ارائه شدند. تفاوت بین تیمارها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون چندگانه توکی بررسی شد. سطح معنی‌داری در  $p < 0.01$  در نظر گرفته شد. نمودارها با نرم‌افزار GraphPad Prism 8 رسم شدند.

### بحث

#### تأثیر pH بر رشد باکتری

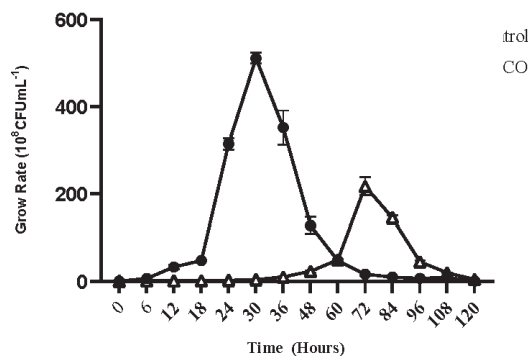
رشد باکتری *Methylobacterium sp.* در بازه pH از پنج تا هشت در محیط MSM حاوی ۳۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن بررسی شد. بیشترین رشد در pH برابر با ۷/۵ مشاهده شد و حدود ۷۲ ساعت پس از شروع کشت (۳ روز)، به بالاترین میزان رشد خود رسید و از آن پس، رشد باکتری روند کاهشی پیدا کرد. این باکتری در pHهای ۶/۵ و هفت نیز رشد خوبی داشت، اما در pHهای پنج و ۵/۵ رشد چندانی نداشت که نشان‌دهنده تمایل آن به شرایط خنثی تا کمی قلیایی است (شکل ۱).

تأثیر pH بر رشد باکتری‌ها یکی از عوامل کلیدی در متابولیسم میکروبی محسوب می‌شود، به‌ویژه در محیط‌هایی که نفت خام تنها منبع کربن است. در این مطالعه، باکتری *Methylobacterium sp.* بیشترین رشد را در pH برابر ۷/۵ داشت که بیانگر مطلوب بودن شرایط خنثی تا کمی قلیایی برای رشد و تجزیه نفت خام توسط این نوع از باکتری است. کاهش رشد در شرایط اسیدی می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت آنزیم‌ها، ناپایداری غشای سلولی یا اختلال در مسیرهای متابولیسم هیدروکربن‌ها باشد (Varjani, 2017). این نتایج با مطالعات پیشین که عملکرد بهینه باکتری‌های مصرف‌کننده هیدروکربن را در شرایط



که ترکیبات نفت خام به راحتی درون ماتریس نفوذ کرده و با سلول‌های باکتریایی تثبیت شده تماس مؤثری برقرار کنند. این ویژگی موجب افزایش دسترسی باکتری‌ها به سوبسترا و در نتیجه بهبود کارایی تجزیه زیستی نفت خام شد؛ موضوعی که نتایج تجربی این پژوهش نیز آن را تأیید می‌کند. همچنین، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که دانه‌های آلژیناتی با قطر بزرگ‌تر، به‌طور معمول در حذف آلاینده‌هایی نظیر فنول و نفت خام از کارایی پایین‌تری برخوردارند (Aksu and Bülbül, 1999; Partovinia et al., 2023). شکل ۳ نمایی از ساختارهای داخلی میکروکپسول‌های کلسیم-آلژینات و سلول‌های باکتریایی تثبیت شده درون آن‌ها را نشان می‌دهد. این تصاویر به خوبی ویژگی‌های متخلخل دانه‌های آلژیناتی را به تصویر می‌کشند که با فراهم‌سازی نسبت بالای سطح به حجم، امکان چسبندگی مؤثر و رشد مناسب سلول‌های باکتریایی را فراهم کرده‌اند. این شکل همچنین نشان می‌دهد که حفاظت فیزیکی ایجادشده توسط ماتریس آلژیناتی و تراکم بالای سلولی درون دانه‌ها، شاید موجب افزایش پایداری و تقویت فعالیت متابولیکی باکتری‌ها شده است. این مشاهدات با نتایج گزارش‌شده در مطالعات پیشین نیز مطابقت دارد (Liang et al., 2009; Partovinia et al., 2023).

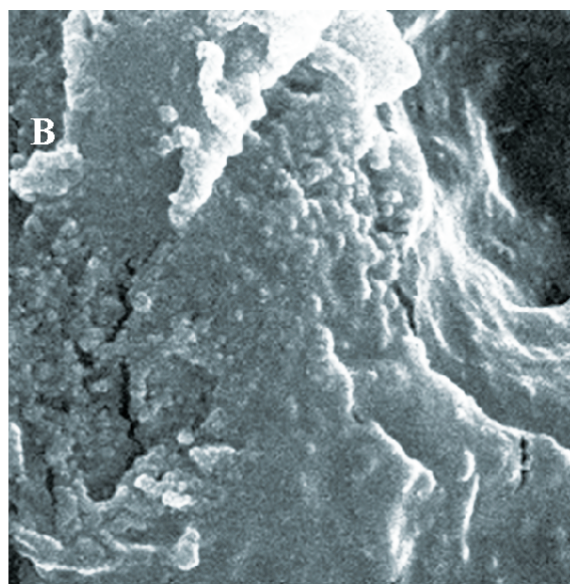
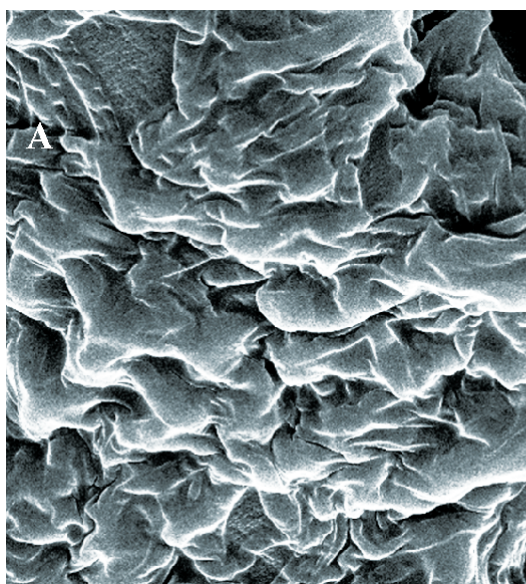
(Salam et al., 2015). این تفاوت‌ها در نرخ رشد ممکن است ناشی از ویژگی‌های ژنتیکی و متابولیکی ذاتی گونه‌ها یا میزان سازگاری آن‌ها با شرایط محیطی باشد؛ زیرا گونه‌های مختلف نسبت‌های متفاوتی از کربن مصرفی را به زیست‌توده و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌کنند (Salam et al., 2015).



شکل ۲. نرخ رشد باکتری *Methyloburum* sp. در محیط MSM حاوی چهار درصد نفت خام. "CO" نشان‌دهنده نفت خام و «Control» به محیط MSM حاوی یک درصد گلوکز اشاره دارد

### سلول‌های تثبیت‌شده با میکروسکوپ الکترونی نشر میدانی (FESEM)

در این مطالعه، از دانه‌های آلژینات سدیم با اندازه یک‌نواخت و قطری در حدود یک میلی‌متر برای تثبیت باکتری‌ها استفاده شد. اندازه کوچک این دانه‌ها موجب شد



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی با نشر میدانی (FE-SEM) از ساختار دانه‌های آلژینات کلسیم، (A) دانه کنترل بدون سلول‌های باکتریایی، (B) سلول‌های باکتریایی تثبیت‌شده پس از هفت روز تجزیه زیست

## تحلیل GC-MS

به‌عنوان نمونه، اکتان در سیستم سلول آزاد تنها ۲۲/۵ درصد تجزیه شده، در حالی که در سیستم تثبیت شده این مقدار به ۴۴/۵ درصد افزایش یافته است. این اختلاف عملکرد در آلکان‌های با وزن مولکولی بالاتر مانند دودکان، تترادکان و هگزاکان نیز قابل مشاهده است؛ به‌طوری‌که درصد تخریب در سلول‌های تثبیت‌شده به‌مراتب بیشتر از سلول‌های آزاد بوده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تثبیت سلول‌ها موجب افزایش پایداری و کارایی آن‌ها در برابر ترکیبات پیچیده‌تر و بلندزنجیره‌تر می‌شود، درحالی‌که این تفاوت در مورد آلکان‌های سبک چندان مشهود نیست. این یافته‌ها از نظر دقت و تطابق با نتایج حاصل از آنالیز وزن‌سنجی قابل توجه بوده و یکدیگر را تأیید می‌کنند. به‌طور خلاصه، سلول‌های تثبیت‌شده موفق به حذف حدود ۷۲ درصد از هیدروکربن‌های قابل شناسایی شدند.

پس از گذشت پنج روز انکوباسیون در حضور چهار درصد نفت خام و استفاده از دو سیستم آزاد و تثبیت شده، نمونه‌های تجزیه‌شده و کنترل با استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی-کروماتوگرافی گازی (GC-MS) تجزیه و تحلیل شدند. شناسایی ساختار ترکیبات بر اساس زمان نگهداری در دستگاه GC-MS و نتایج طیف جرمی آنها در جدول ۱ ارائه شده است. جدول مقایسه‌ای نشان می‌دهد که دو سیستم زیستی شامل سلول آزاد و سلول تثبیت‌شده *Mythlorubrum sp.* در تخریب n-آلکان‌ها و مشتقات آن عملکرد متفاوتی دارند. در ترکیبات سبک‌تر مانند بوتان، پنتان و ایزومرهای متیله‌شده آن‌ها (C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>)، هر دو سیستم کارایی ۱۰۰ درصدی از خود نشان داده‌اند، اما با افزایش طول زنجیره کربنی و شاخه‌دار شدن ساختار مولکولی، عملکرد سیستم سلول آزاد به‌طور چشم‌گیری کاهش یافته است.

جدول ۱. کارایی تجزیه مربوط به n-آلکان‌ها در دو سیستم سلول‌های آزاد و تثبیت شده

Retention Time (min)	Compound Name	n-alkane	Methylorubrum sp.- free cell	Methylorubrum sp.- Immobilized
۱/۷۴	Butane	C4	۱۰۰	۱۰۰
۲/۰۶	-Butane, 2-methyl	C5	۱۰۰	۱۰۰
۲/۲۲	Pentane	C5	۱۰۰	۱۰۰
۲/۸۲	-Pentane, 2-methyl	C6	۱۰۰	۱۰۰
۲/۹۹	-Pentane, 3-methyl	C6	۱۰۰	۱۰۰
۳/۱۹	Hexane	C6	۸۵/۴	۹۰/۱
۴/۲۹	-Hexane, 3-methyl	C7	۸۰/۶۷	۹۱/۵
۴/۶۸	Heptane	C7	۹۰/۲	۹۰/۴۵
۵/۸۴	-Heptane, 2-methyl	C8	۸۵/۳	۹۴/۲
۶/۴۸	Octane	C8	۲۲/۵	۴۴/۵
۷/۰۱	-Heptane, 2,6-dimethyl	C9	۸۰/۴۵	۹۰/۲
۷/۵۶	-Heptane, 2,3-dimethyl	C9	۷۹/۵	۸۰/۴۵
۷/۶۸	-Octane, 4-methyl	C9	۲۷/۶	۵۵/۲۱
۷/۸۳	-Octane, 3-methyl	C9	۲۴/۳	۴۸/۶
۸/۳۴	Nonane	C9	۲۸/۹	۴۸/۹
۸/۹۷	-Octane, 2,6-dimethyl	C10	۴۰/۳۱	۶۰/۲
۹/۴۶	-Nonane, 4-methyl	C10	۴۲/۵۱	۵۲/۳۱
۱۰/۱۳	Decane	C10	۵۰/۲	۶۵/۳
۱۰/۵۳	-Decane, 4-methyl	C11	۵۱/۳	۶۰/۲
۱۱/۱۸	-Octane, 3-ethyl	C10	۲۷/۵	۵۴/۳

ادامه جدول ۱.

Retention Time (min)	Compound Name	n-alkane	Methylorubrum sp.-	Methylorubrum sp.-
			free cell	Immobilized
۱۱/۸۳	Undecane	C11	۲۶/۴	۵۶/۷
۱۲/۹۷	-Undecane, 3-methyl	C10	۲۷/۲	۴۹/۵
۱۳/۴۲	Dodecane	C12	۴۲/۵	۶۰/۲
۱۳/۶۳	-Undecane, 2,6-dimethyl	C13	۲۲/۱	۴۴/۸
۱۴/۵۱	-Decane, 2-methyl	C14	۳۵/۳	۶۷/۲
۱۴/۹	Tridecane	C15	۶۱/۲	۶۵/۱۲
۱۶	-Dodecane, 2,6,10-trimethyl	C15	۲۴/۵	۴۸/۲
۱۶/۳۱	Tetradecane	C14	۲۵/۷	۵۰/۷
۱۷/۱۴	Undecane	C11	۲۴	۴۸/۶
۱۷/۶۲	Pentadecane	C15	۴۰/۵	۵۱/۲
۱۸/۸۷	Hexadecane	C16	۳۶/۴	۴۵/۳
۲۰/۰۵	Heptadecane	C17	۳۲/۱	۶۰/۴۵
۲۰/۱۳	Pentadecane, -2,6,10,14-tetramethyl	C15	۳۰/۱	۵۴/۷
۲۱/۱۷	Octadecane	C18	۷۰/۲	۸۰/۱
۲۱/۳	Hexadecane, 2,6,10,14- -tetramethyl	C16	۳۲/۴	۶۰/۳
۲۲/۲۴	Nonadecane	C19	۵۰/۱	۶۷/۲
۲۳/۲۵	Eicosane	C20	۵۶/۲	۶۱/۲
۲۴/۲۳	Heneicosane	C21	۴۸/۷	۶۰/۵
۲۵/۱۵	Docosane	C22	۵۱/۲	۵۹/۹
۲۶/۱۵	Heptacosane	C27	۶۰/۵	۶۲/۳
۲۷/۸	Otadecane,9-Ethyl-9-Hepthyl	C27	۵۶/۱	۶۰/۱۴
۲۸/۸		C28	۵۲/۹	۶۵/۴۱

## تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری آزاد و تثبیت شده

داد که میزان حذف نفت خام توسط سلول‌های تثبیت شده *Methylorubrum sp.* به ۷۰ درصد رسید، در حالی که این میزان در حالت سلول آزاد تنها ۵۰ درصد بود. این اختلاف ۲۰ درصدی در راندمان تجزیه، نشان‌دهنده نقش قابل توجه تثبیت در افزایش پایداری و عملکرد زیست‌تخریبی میکروارگانیسم‌ها در شرایط تیمار آلودگی‌های نفتی است (شکل ۵). برای بررسی اثرات غیرزیستی، یک آزمایش کنترل بدون تلقیح میکروبی نیز انجام شد. در این آزمایش مشاهده شد که تنها دو درصد از نفت خام کاهش یافته است که این میزان کاهش به جذب فیزیکی توسط کپسول‌های آلژیناتی نسبت داده می‌شود. این مقدار در مقایسه با کل فرآیند تجزیه زیستی بسیار ناچیز بوده و نشان می‌دهد که

نتایج مربوط به تجزیه نفت خام با استفاده از سلول‌های میکروبی در دو حالت آزاد و تثبیت شده در شکل ۵ ارائه شده‌اند. یافته‌ها نشان دادند که این گونه قادر است هیدروکربن‌های نفتی را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی مصرف کند. پس از پنج روز و در محیط حاوی چهار درصد نفت خام، گونه *Methylorubrum sp.* نرخ تجزیه‌ای برابر با ۵۰ درصد از خود نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که این باکتری به تنهایی نیز توانایی قابل توجهی در تجزیه نفت خام دارد. در مقایسه بین سلول‌های آزاد و تثبیت شده، نتایج نشان



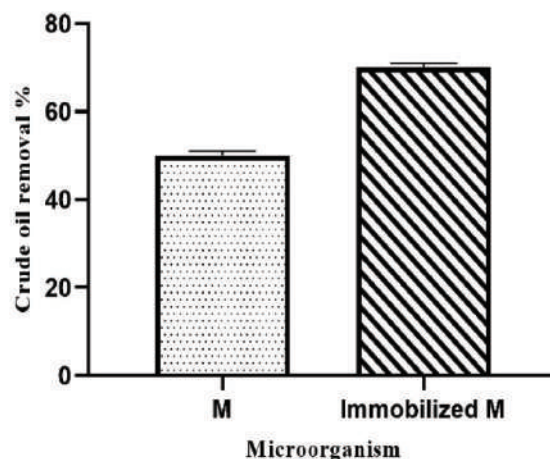
مقابل، سلول‌های تثبیت‌شده قابلیت استفاده مجدد تا ۱۰ چرخه را حفظ کردند که آن‌ها را برای کاربردهای صنعتی مناسب‌تر می‌سازد (Jeon et al., 2019). در مجموع، این شواهد علمی مزایای تثبیت میکروبی در زیست‌پالایی نشت‌های نفتی را به‌خوبی نشان می‌دهند و تأکید می‌کنند که بهینه‌سازی ترکیب میکروارگانیسم‌ها و طراحی بسترهای تثبیت می‌تواند نقش مهمی در افزایش کارایی تجزیه در شرایط آلودگی‌های مختلف ایفا کند.

### سنجش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی

فعالیت اختصاصی آنزیم‌های لیپاز، AlkB و CYP450 در طول چهار بازه زمانی (صفر، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت) اندازه‌گیری شد تا تأثیر زمان بر بیان آنزیم‌ها در میکروارگانیسم مورد مطالعه مشخص شود. نتایج حاصل از نمودار نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌ها در طی زمان به‌طور قابل توجهی تغییر کرده است. در مورد آنزیم AlkB، جهش قابل توجهی در فعالیت آنزیم در بازه زمانی ۶۰ ساعت مشاهده شد که بیش‌ترین فعالیت (حدود ۱۳/۵۳ واحد در میلی‌گرم) را نشان داد. این روند سپس در روز سه کاهش یافت که می‌تواند بیانگر پاسخ تنظیمی میکروارگانیسم به شرایط محیطی باشد. آنزیم CYP450 نیز الگوی مشابهی با AlkB نشان داد؛ یعنی از روز صفر تا روز ۶۰ ساعت فعالیت آنزیمی افزایش یافت و پس از ۶۰ ساعت به حداکثر خود (حدود ۹/۴۱ واحد در میلی‌گرم) رسید، اما پس از ۷۲ ساعت کاهش داشت (شکل A-۶). این کاهش در فعالیت آنزیمی شاید به دلیل کاهش قابل توجه آلکان‌ها و ورود سلول‌ها به فاز مرگ رخ داده است. روند فعالیت آنزیم لیپاز با گذشت زمان به‌صورت تدریجی افزایش یافت. در روز صفر، فعالیت آنزیم بسیار کم بود، اما در ساعات ۴۸ و ۶۰ افزایش یافت و در ۷۲ ساعت به حداکثر مقدار خود (حدود ۸/۴ واحد در میلی‌گرم) رسید. در مجموع، نتایج بیانگر آن است که فعالیت آنزیمی در طی زمان به‌ویژه تا روز دهم روند افزایشی دارد و پس از آن ممکن است تحت تأثیر سازوکارهای مهارتی، تنش‌های محیطی یا تخلیه منابع سلولی کاهش یابد. بیشترین فعالیت اختصاصی

بخش اعظم حذف نفت خام در نتیجه فعالیت‌های زیستی میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته است.

شواهد علمی موجود حاکی از آن است که تثبیت میکروارگانیسم‌ها در بسترهایی مانند آلژینات می‌تواند آن‌ها را از تنش‌های محیطی محافظت کرده و موجب افزایش نرخ تجزیه هیدروکربن‌ها گردد. مطالعه لی و همکاران (Li et al., 2025) نشان داد که *Acinetobacter SHC* تثبیت‌شده توانست در شرایط سخت، از جمله پنج گرم در لیتر نفت خام، pH برابر با ۱۰ و شوری سه درصد، به ترتیب ۷۴، ۴۵ و ۲۲ درصد نفت را تجزیه کند؛ عملکردی که ۵۹ درصد بیشتر از سلول‌های آزاد بود و پتانسیل بالای این روش را برای کاربردهای زیست‌پالایی در محیط‌های با تنش شدید نشان می‌دهد (Li et al., 2025).



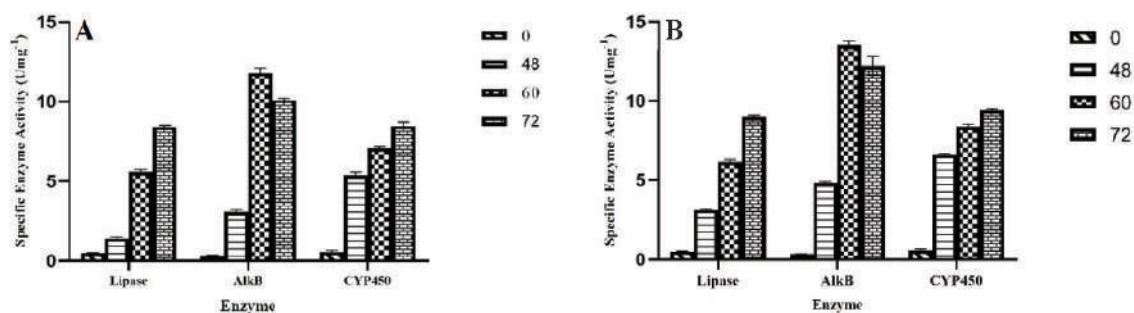
شکل ۵. راندمان حذف نفت خام توسط باکتری *Methylobacterium* sp. آزاد و تثبیت‌شده

سویه *Pseudomonas* sp. DG17 نیز که در بستری از آلژینات سدیم، آتاپولژیت و کربنات کلسیم تثبیت شده بود، در خاک آلوده به نفت خام بین ۳۳/۵۶ تا ۵۶/۸۲ درصد از کل هیدروکربن‌ها را طی ۲۰ روز حذف کرد. افزودن کربنات کلسیم موجب افزایش تخلخل بستر و بهبود نفوذ نفت به سلول‌ها شد (Wang et al., 2014). جون و همکاران (Jeon et al., 2019) بیان کردند که اگرچه سلول‌های آزاد در ابتدا نرخ تجزیه بالاتری (۱۴/۷ تا ۳۱/۶ درصد) را نشان دادند، اما کارایی آن‌ها پس از یک چرخه کاهش یافت. در

پایداری آنزیمی بالاتر در شرایط تثبیت شده است. سیتوکروم p450 نیز الگوی مشابهی را نشان داد. فعالیت آن از کمتر از یک واحد در روز صفر به حدود ۹/۵ واحد در روز سه رسید و به مقدار متناظر در سلول‌های آزاد (حدود ۸/۴ واحد در روز سه) باز هم بیشتر است. فعالیت لیپاز در سلول‌های تثبیت شده روند افزایشی به نسبت پایداری داشت و از مقدار کمتر از یک واحد در روز صفر به حدود ۹ واحد در روز سه رسید. این مقدار نسبت به حالت آزاد حدود یک واحد بیشتر است که نشان دهنده اثربخشی تثبیت بر حفظ و ارتقای فعالیت آنزیم در مدت زمان طولانی‌تر است (شکل B-۶).

در آنزیم AlkB دیده شد که نشان دهنده نقش کلیدی آن در پاسخ به شرایط مورد بررسی است.

نتایج حاصل از فعالیت اختصاصی آنزیم‌های AlkB، CYP450 و لیپاز در سلول‌های تثبیت شده طی بازه‌های زمانی صفر، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت نشان داد که تثبیت سلول‌ها تأثیر قابل توجهی بر افزایش فعالیت آنزیمی در مقایسه با سلول‌های آزاد دارد. در مورد AlkB، فعالیت آنزیم در سلول‌های تثبیت شده در ۶۰ ساعت به بیش از ۱۳ واحد رسید که در مقایسه با حدود ۱۱ واحد در سلول‌های آزاد، افزایش قابل توجهی دارد. این افزایش همچنین در روز سه همچنان بالا باقی ماند (حدود ۱۲ واحد) که نشان دهنده



شکل ۶. فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها در گونه *Methyloburbum* sp. تحت شرایط چهار درصد نفت خام در مقایسه با کنترل، در دو سیستم متفاوت (سلول آزاد و سلول تثبیت شده) و در زمان‌های مختلف گرماگذاری (صفر، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت)، (A) فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها در سیستم سلول آزاد، (B) فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها در سیستم سلول تثبیت شده. معناداری آماری با استفاده از آزمون چندمقایسه‌ای توکی انجام شد و مقدار p کمتر از ۰/۰۱ به عنوان معناداری در نظر گرفته شد

تجزیه n-هگزاکان ایفا می‌کند. پارسپیان و همکاران (Parthipan et al., 2018) نیز نشان دادند که *Bacillus subtilis* A1 بیش از ۹۷ درصد از آلکان‌های C15 تا C19 از طریق فعالیت آنزیم آلکان هیدروکسیلاز تجزیه شدند. آدلان و همکاران (Adlan et al., 2020) قادر بودند بیش از ۷۰ درصد از پارافین را در مدت کمتر از سه روز تجزیه کنند. در میان این باکتری‌ها، سویه AD24 بالاترین سطح فعالیت آنزیم آلکان مونواکسیژناز را نشان داد. همچنین، گونه‌هایی مانند N3A7 و DFY1 نیز با فعالیت بالای آنزیم‌های لیپاز و استراز، توانمندی بالایی در تجزیه ترکیبات هیدروکربنی از خود نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر، الومالای و همکاران

در دهه‌های اخیر، مسیرهای زیستی تجزیه هیدروکربن‌ها و آنزیم‌های کلیدی در این فرایندها به طور گسترده مطالعه شده‌اند (Hassanshahian et al., 2012; Kothari et al., 2013). آنزیم‌هایی مانند آلکان مونواکسیژناز غیرهمی نقش اصلی در اکسیداسیون آلکان‌های زنجیره کوتاه و متوسط ایفا می‌کنند (Van Beilen et al., 1994). در مقابل، هیدروکربن‌های بلندتر (بیش از ۲۰ کربن) توسط آنزیم‌هایی نظیر سیتوکروم P450 تجزیه می‌شوند (Nie et al., 2011; Van Beilen and Funhoff, 2005). Mishra and Singh (۲۰۱۲) گزارش کردند که در سویه‌های *Rhodococcus* و *Pseudomonas aeruginosa* PSA5 sp. NJ2، آنزیم آلکان هیدروکسیلاز نقش کلیدی در

1. Tukey

International Journal of Environmental Sciences and Natural Resources. 11(3), 1-7. <https://doi.org/10.19080/IJESNR.2018.11.555811>.

- Aksu, Z. and Bülbül, G., 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Ca-alginate-immobilized *P. putida* beads. *Enzyme and microbial technology*. 25(3-5), 344-348. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00051-4).

- Baltacı, M. O., Omeroglu, M. A., Ozkan, H., Taskin, M. and Adiguzel, A., 2024. Enhanced biodegradation of crude oil contamination by indigenous bacterial consortium under real conditions. *Biocatalysis and Biotransformation*. 42(1), 56-67. <https://doi.org/10.1080/10242422.2023.2231592>.

- Elijah, A. A., 2022. A review of the petroleum hydrocarbons contamination of soil, water and air and the available remediation techniques, taking into consideration the sustainable development goals. *Earthline Journal of Chemical Sciences*. 7(1), 97-113. <https://doi.org/10.34198/ejcs.7122.97113>.

- Eroglu, E., Smith, S. M. and Raston, C. L., 2015. Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses. *Biomass and biofuels from microalgae: Advances in engineering and biology*, 19-44. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16640-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16640-7_2).

- Fatajeva, E., Gailiūtė, I., Paliulis, D. and Grigiškis, S., 2014. The use of *Acinetobacter* sp. for oil hydrocarbon degradation in saline waters. *Biologija*. 60(3). <https://doi.org/10.6001/biologija.v60i3.2971>.

- Godec, M. L. and Biglarbigi, K., 1991. Economic effects of environmental regulations on finding and developing crude oil in the US. *Journal of Petroleum Technology*. 43(01), 72-79. <https://doi.org/10.2118/20619-PA>.

- Hassanshahian, M., Emtiazi, G. and Cappello, S., 2012. Isolation and characterization

(Elumalai et al., 2021) نشان دادند که کنسرسیوم میکروبی متشکل از *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas stutzeri* قادر است آلاینده‌های آلی آب‌گریز را با کارایی بالایی تجزیه کند. بر اساس گزارش آن‌ها، نرخ حذف برای نفت خام، دیزل، C32 و C40 به ترتیب ۹۰، ۸۴، ۷۶ و ۷۲ درصد بود. آنزیم‌های کلیدی مانند آلکان هیدروکسیلاز، الکل دهیدروژناز و لیپاز در این فرایند نقش اساسی ایفا کردند و نشان‌دهنده توان بالای این کنسرسیوم در زیست‌تخریب ترکیبات پیچیده هیدروکربنی هستند.

## نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان دادند که تثبیت باکتری *Methylobacterium* sp. در بستر آلژیناتی، روشی مؤثر برای افزایش پایداری، بازده و توان تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی است. سلول‌های تثبیت‌شده نه تنها توانستند میزان بیشتری از نفت خام را تجزیه کنند، بلکه فعالیت اختصاصی آنزیم‌های کلیدی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها شامل AlkB، CYP450 و لیپاز نیز به‌طور معناداری نسبت به حالت سلول آزاد بالاتر بود. تجزیه مؤثر آلکان‌های سنگین، به‌ویژه در بازه زمانی سه روز، بیانگر قابلیت این سیستم در حذف ترکیبات پیچیده و ماندگار نفتی است. در مجموع، این مطالعه نقش مهم تثبیت سلولی در ارتقاء عملکرد زیست‌پالایی را تأیید می‌کند و پیشنهاد می‌دهد که ترکیب سویه‌های توانمند مانند *Methylobacterium* sp. با فناوری تثبیت، رویکردی پایدار و کارآمد برای پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی در مقیاس‌های صنعتی باشد.

## منابع

- Adlan, N. A., Sabri, S., Masomian, M., Ali, M. S. M. and Rahman, R. N. Z. R. A., 2020. Microbial biodegradation of paraffin wax in Malaysian crude oil mediated by degradative enzymes. *Frontiers in Microbiology*. 11, 565608. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.565608>.

- Ahmed, F. and Fakhruddin, A., 2018. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation.

- of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*. 64(1), 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.11.006>.
- Jauhari, N., Mishra, S., Kumari, B. and Singh, S. N., 2014. Bacteria-mediated aerobic degradation of hexacosane in vitro conditions. *Bioresource technology*. 170, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.091>.
- Jeon, Y., Bissessur, A. and Singh, P., 2019. Novel immobilization techniques of *Acinetobacter* (V2) and *Paenibacillus* (D9) bacterial strains for waste oil degradation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 33(1), 911-920. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1628663>.
- Jett, B. D., Hatter, K. L., Huycke, M. M. and Gilmore, M. S., 1997. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques*. 23(4), 648-650. <https://doi.org/10.2144/97234bm22>.
- Kadri, T., Rouissi, T., Magdouli, S., Brar, S. K., Hegde, K., Khiari, Z., Dagher, R. and Lauzon, J.-M., 2018. Production and characterization of novel hydrocarbon degrading enzymes from *Alcanivorax borkumensis*. *International journal of biological macromolecules*. 112, 230-240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.177>.
- Khanpour-Alikelayeh, E., Partovinia, A., Talebi, A. and Kermanian, H., 2020. Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 205, 111103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111103>.
- Kim, Y.-H., Freeman, J. P., Moody, J. D., Engesser, K.-H. and Cerniglia, C. E., 2005. Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied microbiology and biotechnology*. 67, 275-285. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1796-y>.
- Kothari, V., Panchal, M., and Srivastava, N., 2013. Microbial degradation of hydrocarbons.
- Laothamteep, N., Naloka, K., and Pinyakong, O., 2022. Bioaugmentation with zeolite-immobilized bacterial consortium OPK results in a bacterial community shift and enhances the bioremediation of crude oil-polluted marine sandy soil microcosms. *Environmental Pollution*. 292, 118309. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118309>.
- Lee, G. M., Gray, J. J. and Palsson, B. Ø., 1991. Effect of trisodium citrate treatment on hybridoma cell viability. *Biotechnology techniques*. 5, 295-298. <https://doi.org/10.1007/BF02438666>.
- Li, J., Zhang, H., Mei, K., Sun, L., Wang, L. and Liang, C., 2025. Enhanced degradation of petroleum hydrocarbons by immobilizing *Acinetobacter*. *Biochemical Engineering Journal*. 217, 109666. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2025.109666>.
- Liang, Y., Zhang, X., Dai, D. and Li, G., 2009. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63(1), 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.07.005>.
- Maki, A. A., Al-Tae, A. M. and Atwan, Z. W., 2023. Measuring the Degradation of Aromatic Compounds Using *Methylorubrum* ex-torquens Isolated from Oil-Contaminated Soils in Southern Iraq. *Mesopotamian Journal of Marine Sciences*. 38(1), 9-20. <https://doi.org/10.58629/mjms.v38i1.323>.
- Mishra, S. and Singh, S., 2012. Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. *Bioresource technology*. 111, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.049>.
- Mohanta, S., Pradhan, B., and Behera, I. D., 2024. Impact and remediation of petroleum hydrocarbon pollutants on agricultural land: a re-



- view. *Geomicrobiology Journal*. 41(4), 345-359. <https://doi.org/10.1080/01490451.2023.2243925>.
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Mauricio, J. C. and Moreno, J., 2018. Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: actual trends and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 9, 241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00241>.
  - Ngene, S., Tota-Maharaj, K., Eke, P. and Hills, C., 2016. Environmental and economic impacts of crude oil and natural gas production in developing countries. *International Journal of Economy, Energy and Environment*. 1(3), 64-73. <https://doi.org/10.11648/j.ijeee.20160103.13>.
  - Nie, Y., Liang, J., Fang, H., Tang, Y.-Q. and Wu, X.-L., 2011. Two novel alkane hydroxylase-rubredoxin fusion genes isolated from a *Dietzia* bacterium and the functions of fused rubredoxin domains in long-chain n-alkane degradation. *Applied and environmental microbiology*. 77(20), 7279-7288. <https://doi.org/10.1128/AEM.00203-11>.
  - Obayori, O. S., Salam, L. B. and Ogunwumi, O. S., 2014. Biodegradation of fresh and used engine oils by *Pseudomonas aeruginosa* LP5. *Bioremediation and Biodegradation*. 5(213), 1-7. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000213>.
  - Omotosho, O., 2024. Degradation of Crude Oil by Microbial Populations of Lagos Lagoon Water Microcosms. *The 3rd International Electronic Conference on Processes-Green and Sustainable Process Engineering and Process Systems Engineering*. 105(1). <https://doi.org/10.3390/proceedings2024105082>.
  - Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K., Murugan, K. and Rajasekar, A., 2017. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in microbiology*. 8, 193. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00193>.
  - Partovinia, A., Khanpour-Alikelayeh, E., Talebi, A. and Kermanian, H., 2023. Improving mass transfer rates in microbial cell immobilization system for environmental applications: synergistic interaction of cells on crude oil biodegradation. *Journal of Environmental Management*. 326, 116729. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116729>.
  - Partovinia, A. and Rasekh, B., 2018. Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 48(1), 1-38. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1439652>.
  - Qu, S., Liu, L., Zhang, L., Zheng, M., Feng, J., Liu, C., Miao, Y. and Jing, G., 2023. Biodegradation of crude oil by a moderately haloalkaliphilic *Acinetobacter* strain. *Petroleum Science and Technology*. 41(1), 30-44. <https://doi.org/10.1080/10916466.2022.2041666>.
  - Rezaei Somee, M., Amoozegar, M. A., Shavandi, M. and Dastgheib, S. M. M., 2016. Isolation of halophilic microbial consortia capable of degrading diesel oil for the bioremediation of drilling wastes. *Journal of Microbial Biology*. 5(19), 23-40. <https://doi.org/10.22108/bjm.2016.21005>.
  - Rojas-Gätjens, D., Fuentes-Schweizer, P., Rojas-Jiménez, K., Pérez-Pantoja, D., Avendaño, R., Alpízar, R., Coronado-Ruíz, C. and Chavarría, M., 2022. Methylophils and hydrocarbon-degrading bacteria are key players in the microbial community of an abandoned century-old oil exploration well. *Microbial ecology*, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01748-1>
  - Sakdapetsiri, C., Kaokhum, N. and Pin-yakong, O., 2021. Biodegradation of crude oil by immobilized *Exiguobacterium* sp. AO-11 and shelf life evaluation. *Scientific Reports*. 11(1), 12990. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92122-1>.
  - Salam, L. B., Obayori, O. S. and Raji,



- S., 2015. Biodegradation of used engine oil by a methylophilic bacterium, *Methylobacterium mesophilicum* isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. *Petroleum Science and Technology*. 33(2), 186-195. <https://doi.org/10.1080/10916466.2014.961610>.
- Schellenberg, K. A. and Hellerman, L., 1958. Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide. *Journal of Biological Chemistry*. 231(1), 547-556. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77327-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77327-X).
- Singh, S., Kumari, B. and Mishra, S., 2012. Microbial degradation of alkanes. *Microbial degradation of xenobiotics*, 439-469. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23789-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23789-8_17).
- Sojini, S. O. and Ejeromedoghene, O., 2019. Environmental challenges associated with processing of heavy crude oils. *Processing of Heavy Crude Oils*. 241.
- Srividya, A. R. and Vishnuvarthan, V. J., 2014. Immobilization of therapeutically beneficial enzymes
- Tahmasbizadeh, M., Nikaeen, M., Attar, H. M., Khanahmad, H. and Khodadadi, M., 2025. Resuscitation-promoting factors: novel strategies for the bioremediation of crude oil-contaminated soils. *Environmental Research*, 121085. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121085>.
- Van Beilen, J. B. and Funhoff, E. G., 2005. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Current opinion in biotechnology*. 16(3), 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.04.005>.
- Van Beilen, J. B., and Funhoff, E. G., 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied microbiology and biotechnology*. 74, 13-21. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0>.
- Van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G. and Witholt, B., 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*. 5, 161-174. <https://doi.org/10.1007/BF00696457>.
- Varjani, S. J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology*. 223, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>.
- Wang, H. Q., Hua, F., Zhao, Y. C., Li, Y. and Wang, X., 2014. Immobilization of *Pseudomonas* sp. DG17 onto sodium alginate-attapulgite-calcium carbonate. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 28(5), 834-842. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.961123>.
- Wasoh, H., Veeraswamy, K., Gunasekaran, B. and Shukor, M. Y., 2019. Biodegradation of hydrocarbon sludge by *Pseudomonas* sp. strain UPM-KV. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*. 7(1), 10-15. <https://doi.org/10.54987/jemat.v7i1.473>.
- Yong, Y.-C. and Zhong, J.-J., 2010. Recent advances in biodegradation in China: new microorganisms and pathways, biodegradation engineering, and bioenergy from pollutant biodegradation. *Process Biochemistry*. 45(12), 1937-1943. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.04.009>.
- Zhang, X., Kong, D., Liu, X., Xie, H., Lou, X. and Zeng, C., 2021. Combined microbial degradation of crude oil under alkaline conditions by *Acinetobacter baumannii* and *Talaromyces* sp. *Chemosphere*. 273, 129666. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129666>.
- Zuo, K., Zhang, L., Yao, H. and Wang, J., 2010. Isolation and functional expression of a novel lipase gene isolated directly from oil-contaminated soil. *Acta Biochimica Polonica*. 57(3), 305-311.