

مروری بر پاکسازی زیستی آب‌های آلوده به نفت خام به کمک ریزاندامگانهای بومی

حسین هاشم‌لو^۱، میترا احمدی^{۲*}، مجتبی سمنانی رهبر^۳

۱- کارشناس ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه پیام نور

۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه پیام نور

۳- دانشیار مهندسی شیمی، دانشگاه پیام نور

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۲۱

پیام‌نگار: mi_ahmadi@pnu.ac.ir

چکیده

آلودگی ناشی از نشت نفت خام مشکل عمده‌ای است که از بزرگترین تهدیدها برای محیط زیست دریایی به شمار می‌آید. پس از اقدامات اولیه برای مهار گسترش آلودگی با بهره‌گیری از روش‌های فیزیکی و شیمیایی، پاکسازی زیستی بهترین و ارزانه‌ترین اقدام برای مبارزه با این آلودگی محسوب می‌شود. دامنه کیفیت پاکسازی زیستی را می‌توان با دو روش تلقیح زیستی و تحریک زیستی گسترش داد. تلقیح زیستی ریزاندامگانها از طریق افزودن محیط کشت غنی از مخلوط ریزاندامگانها به آب دریا و تحریک زیستی، شامل افزودن مواد مغذی به محیط آلوده، صورت می‌گیرد. در این مقاله، اثربخشی این دو روش در پاکسازی زیستی محیط‌های آلوده دریایی بررسی و مقایسه می‌شود. نتایج به‌دست آمده از تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که استفاده از محیط کشت آمیخته ریزاندامگانهای بومی، بازده پاکسازی زیستی را به طور چشمگیری افزایش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: تجزیه زیستی، ریزاندامگان، نفت خام، تلقیح زیستی، تحریک زیستی، آب آلوده به نفت، زیست روآور

۱. مقدمه

هیدروکربن‌های نفتی آمیزه‌های پیچیده‌ای از چند صد ترکیب، از جمله ترکیبات اشباع و غیراشباع‌اند که با وجود سمی بودن، به طور طبیعی در معرض تبدیل و تجزیه زیستی توسط انواع ریزاندامگانهای موجود در محیط دریایی هستند. این فرایند را می‌توان با اقدامات مختلف مهندسی، پشتیبانی کرد [۱ و ۲]. هنگامی که نفت خام به‌صورت لایه‌های ضخیم و متمرکز روی سطح آب پخش می‌شود، روش‌های مکانیکی از قبیل

نفت خام و فراورده‌های آن از جمله آلاینده‌های زیست محیطی در جهان به شمار می‌آیند. این آلودگی‌ها در خلال تولید، حمل و نقل، ذخیره‌سازی، و پالایش نفت خام به وجود می‌آید و موجب آلودگی خاک و آب‌های سطحی می‌شود که با توجه به سمی بودن نفت خام، بوم‌سازگانه‌های خشکی و دریایی را نیز با خطر روبه‌رو خواهد کرد.

* تهران، دانشگاه پیام نور، گروه مهندسی شیمی

متغیرهای محیطی تاثیرگذار از جمله شوری، مواد مغذی، هوادهی، pH، و دما برای تحریک زیستی محیط دریایی در پاکسازی نفت خام است. عملکرد محلول زیست روآور به دست آمده از مخلوط باکتری‌ها در تجزیه زیستی نیز بررسی شده است.

۲. پاکسازی زیستی نفت خام

پاکسازی زیستی توسط ریزاندامگانهای بومی از ارزان‌ترین و قابل اعتمادترین روش‌هایی است که از آن طریق هزاران آلاینده از جمله نفت خام از محیط زیست حذف می‌شود. این روش راهبردی برای استفاده از کنش و واکنشهای زیستی در جهت تسریع حذف آلاینده‌های زیست محیطی و رساندن آن به بیشترین حد ممکن به شمار می‌آید [۷و۸].

ریزاندامگانهای تجزیه‌کننده نفت خام در آب‌های شیرین، دریاها و خاک‌ها پراکنده و فراوان‌اند. بیش از ۲۰۰ نوع باکتری و قارچ (مخمر و کپک‌های رشته‌ای) شناخته شده که می‌توانند هیدروکربن‌های تک کربنه تا بیش از ۴۰ کربنه را تجزیه کنند [۹]. در محیط‌های دریایی، غلبه بر آلودگی‌ها اکثراً به کمک باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن صورت می‌گیرد. ریزاندامگانهای موجود در دریا می‌توانند نفت را به صورت جزئی و یا به طور کامل تجزیه و آن‌را به ترکیبات محلول در آب و در نهایت کربن دی‌اکسید و آب تبدیل کنند [۷]. برخی از ریزاندامگانهای تجزیه‌کننده نفت خام در جدول (۱) درج شده‌اند.

پاکسازی زیستی نفت خام می‌تواند به دو صورت تاثیر مستقیم ریزاندامگانها و تاثیر زیست روآور تولید شده ریزاندامگانها انجام گیرد، اما یکی از معایبی که در استفاده از زیست روآورها در صنعت مشکل ساز می‌شود، گران بودن آن‌هاست. در فرایند تجزیه زیستی، نفت خام به عنوان منبع کربن آلی از طریق یک فرایند میکروبی مصرف، و در نتیجه باعث شکستن ترکیبات نفت خام به ترکیباتی با وزن مولکولی پایین‌تر می‌شود. کاربرد زیست روآورها دامنه تجزیه نفت خام را افزایش می‌دهد، این سهولت تجزیه زیستی به علت افزایش آب‌گریزی سطح سلولی است که باعث جذب نفت توسط زیست روآورها از طریق تماس مستقیم بین سلول‌ها و قطرات نفت و افزایش چشمگیر در پاکسازی نفت خام می‌شود [۱۲و۱۳].

قلاک سردکل (بازوی متحرک)^۱ و جمع‌کننده سطحی^۲ می‌توانند شرایط مطلوبی را برای جمع‌آوری و جلوگیری از گسترش این آلودگی‌ها به بوم‌سازگانه‌های حساس ایجاد کنند [۳]. نفت خامی را، که از طریق روش‌های مکانیکی محدود شده، می‌توان با روش‌های شیمیایی مانند جامدکننده‌ها^۴ و روآورها^۵، یا مواد پراکنده‌ساز پاکسازی کرد. اکثر جامدکننده‌ها از بسپارهای خشک با وزن مولکولی بالا، و در واقع یک ماتریس متخلخل با سطح ویژه زیاد و خاصیت نفت‌دوستی تشکیل شده‌اند. جامدکننده‌ها با نفت به صورت یک پیوند فیزیکی و اندروالس ارتباط برقرار می‌کنند. این مواد، گر انرژی نفت را تا نقطه‌ای افزایش می‌دهند که لاستیک جامد مانندی به دست می‌آید و می‌توان آن را جمع‌آوری و بازیافت کرد [۴]. روآورها یا مواد پراکنده‌ساز لکه‌های نفتی^۵، دارای یک سر با قدرت جذب‌کنندگی نفت (نفت‌دوست^۶) هستند، در حالی که بخش دیگرشان گرایش به جذب آب دارد (آب‌دوست^۷). وقتی مواد پراکنده‌ساز روی لکه نفتی پاشیده می‌شود، کشش بین سطحی نفت و آب را کاهش می‌دهد و در نتیجه به شکستن لایه نفتی به قطره‌های کوچک‌تر و تسریع در عمل پراکنده شدن منجر می‌شوند [۵].

با توجه به مزیت‌های روش‌های زیستی چون تنوع آن‌ها، ماهیت سازگار با محیط زیست، امکان تولید در مقیاس بزرگ، گزینش‌پذیری، عملکرد تحت شرایط بسیار دشوار، و برنامه‌های کاربردی بالقوه، یکی از بهترین راه‌های پاکسازی آب‌های آلوده به نفت خام، سودجستن از ریزاندامگانها در تجزیه ترکیبات سمی نفت خام است. با توجه به این‌که استفاده از باکتری‌ها در پاکسازی نفت خام نسبت به سایر روش‌ها هزینه کم و کارایی بالایی دارد، به همین دلیل وقتی جمع‌آوری مکانیکی نفتی که به سواحل و دریاها راه یافته، امکان‌پذیر نباشد، بهره‌گیری از باکتری‌ها پیشنهاد می‌شود [۶].

هدف از این تحقیق، اولاً استفاده از مخلوط باکتری‌ها به جای تک باکتری‌ها برای افزایش توان زیستی ریزاندامگانهای بومی در پاکسازی زیستی نفت خام از روی آب دریاها، و ثانیاً بررسی

1. Boom
2. Skimmer
3. Solidifier
4. Surfactant
5. Oil Spill Dispersants (OSD)
6. Oleophilic
7. Hydrophilic

جدول ۱. ریزاندامگانهای تجزیه‌کننده مواد نفتی [۱۱ و ۱۰].

کپک‌های رشته‌ای	مخمر	باکتری
آسپرژیلوس ^۳	کاندیدا ^۲	اکروموباکتر ^۱
کلادوسپوریوم ^۶	کریپتوکوکوس ^۵	اسینتوباکتر ^۴
کورولاسپوریوم ^۹	دباریومایسس ^۸	آلکانیووراکس ^۷
دندریفیلا ^{۱۲}	هامسلونا ^{۱۱}	آلکالیژنز ^{۱۰}
فوساریوم ^{۱۵}	پیشیا ^{۱۴}	باسیلوس ^{۱۳}
گلیوکلادیوم ^{۱۸}	رودوتورولا ^{۱۷}	بروی‌باکتریوم ^{۱۶}
لیورثیا ^{۲۱}	ساکارومایسس ^{۲۰}	بولخوردریا ^{۱۹}
پنی‌سیلیوم ^{۲۴}	سوفوروبولومایسس ^{۲۳}	کورینه‌باکتریوم ^{۲۲}
وری‌کوسپورا ^{۲۷}	تورولوپسیس ^{۲۶}	فلابوباکتریوم ^{۲۵}
ورتی‌سیلیوم ^{۳۰}	تریکوسپرون ^{۲۹}	مایکوباکتریوم ^{۲۸}
کونینگاملا ^{۳۳}	یاروویا ^{۳۲}	نوکاردیا ^{۳۱}
		سودوموناس ^{۳۴}
		رودوکوکوس ^{۳۵}
		اسفینجوموناس ^{۳۶}
		استرپتومایسس ^{۳۷}

1. Achromobacter
2. Candida
3. Aspergillus
4. Acinetobacter
5. Cryptococcus
6. Cladosporium
7. Alcanivorax
8. Debaryomyces
9. Corollasporium
10. Alcaligenes
11. Hamsenula
12. Dendryphiella
13. Bacillus
14. Pichia
15. Fusarium
16. Brevibacterium
17. Rhodotorula
18. Gliocladium
19. Burkholderia

20. Saccharomyces
21. Luworthisa
22. Corynebacterium
23. Sporobolomyces
24. Penicillium
25. Flavobacterium
26. Torulopsis
27. Varicospora
28. Mycobacterium
29. Trichosporon
30. Verticillium
31. Nocardia
32. Yarrowia
33. Cunninghamella
34. Pseudomonas
35. Rhodococcus
36. Sphingomonas
37. Streptomyces

۱.۲ زیست روآورها (روآورهای زیستی)

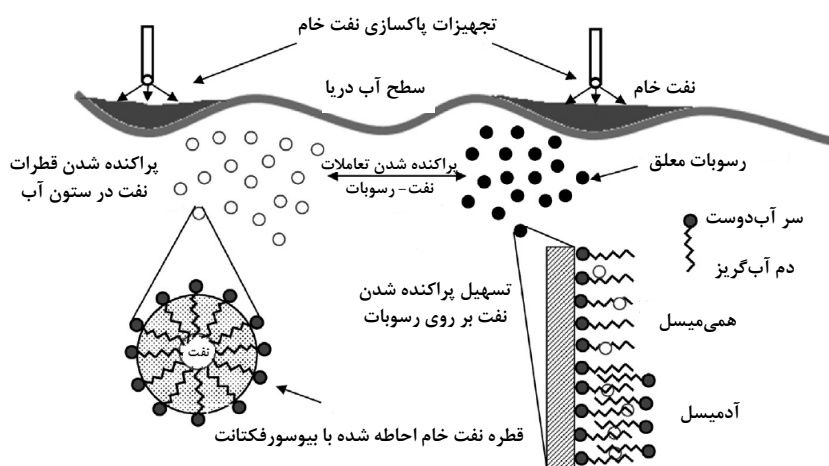
زیست روآورها مواد فعال سطحی‌اند که از طریق تاثیر سلول‌های زنده و اغلب ریزاندامگانها بروی منبع کربنی تولید می‌شوند. زیست روآورها رابط میان دو شاره غیرقابل امتزاج‌اند که در بین آنها جمع می‌شود و با تشکیل میسل، تنش سطحی نیروهای رانشی بین دو فاز غیرمشابه را کاهش می‌دهند. عمل زیست روآورها به تعامل بیشتر دو سیال غیرقابل امتزاج می‌انجامد و به این ترتیب هیدروکربن‌ها را در آب یا آب در هیدروکربن حل می‌کنند [۱۴ و ۱۵]. زیست روآورها مانند روآورهای شیمیایی دوگانه‌دوست‌اند و از دو قسمت آب‌دوست^۲ و آب‌گریز^۳ تشکیل شده‌اند؛ در سال‌های اخیر کاربرد زیست روآورها با توجه به کاهش کشش سطحی و بین سطحی بیشتر، تنوع آنها، سازگار با محیط زیست، مقاوم در دماهای بالا، مقاوم در برابر محلول‌های نمکی، امکان تولید در مقیاس بزرگ، گزینش‌پذیری و عملکرد تحت شرایط بسیار سخت در حال افزایش است [۱۶-۲۴].

۲.۲ سازوکار عملکرد زیست روآور در تجزیه زیستی نفت

خام در آب دریا

افزایش زیست روآورها بر سطح نفت خام باعث پراکندگی و شکستن

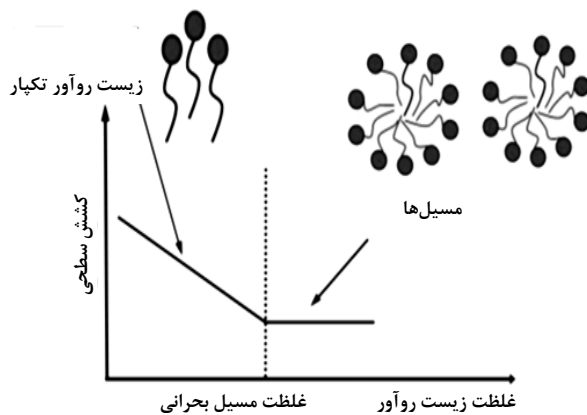
نفت خام به قطرات کوچک، و در نتیجه افزایش سطح آن با کاهش کشش سطحی بین روغن/آب، و در نهایت، افزایش سرعت پراکندگی نفت در آب می‌شود (شکل (۱))، [۲]. علاوه بر این زیست روآورها بر سطح رسوبات جذب می‌شوند که به اصطلاح همی‌میسل^۴ و آدمیسل^۵ نامیده می‌شوند و می‌توانند به نوبه خود موجب افزایش جذب ترکیبات آب‌گریز از طریق فرایند انحلال سطحی شود. جذب این زیست روآورها روی رسوبات به صورت شارژ یونی نیروی کولنی^۶ می‌شود (شکل (۲)). زیست روآور رقیق، به صورت تک لایه بر روی سطح رسوب تشکیل می‌شود. سر آب‌دوست به سمت رسوبات و دم آب‌گریز در لایه محیط آبی قرار می‌گیرد. این ساختار را معمولاً همی‌میسل می‌گویند [۲۵]. در حالت غلیظ‌تر، یک لایه دوم زیست روآور از طریق کنش و واکنش‌های دم-دم تشکیل شده است که آدمیسل نامیده می‌شوند و در کنار همی‌میسل‌ها قرار می‌گیرند [۲]. آدمیسل و همی‌میسل، مانند میسل، قادر به حل طیف گسترده‌ای از مواد می‌باشد. توانایی حل مواد در میسل انحلال نامیده می‌شوند و برای آدمیسل و همی‌میسل نیز اصطلاح مشابه انحلال سطحی به کار می‌رود [۲۵].



شکل ۱. سازوکار عملکرد زیست روآور در تجزیه زیستی نفت خام در آب دریا [۲۶].

1. Amphiphile
2. Hydrophilic
3. Hydrophobic
4. Coulombic Force
5. Admicelles
6. Hemimicelles

در بین زیست روآورها، سه نوع سورفکتین^۳، رامنولیپید^۴ و سوفورولیپید^۵ از کمترین CMC برخوردارند و برای جایگزینی روآورهای شیمیایی بهترین گزینه محسوب می‌شوند. مطابق مندرجات جدول (۲)، کمترین CMC مربوط به سورفکتین با درصد خلوص ۹۸٪ است؛ اما این مقدار با CMC سورفکتین با درصد خلوص ۷۰٪ تفاوت چندانی ندارد و می‌توان برای کاربردهای صنعتی درصد خلوص ۷۰٪ را به کار برد که با هزینه کمتر تولید می‌شود.

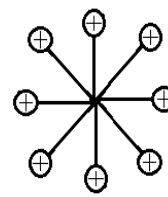


شکل ۳. اثر افزایش غلظت تکپارهای زیست روآور بر تشکیل مسیل [۲۸].

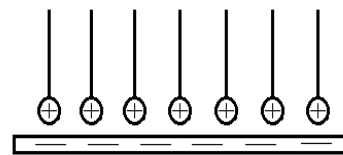
۳. روش‌های پاکسازی زیستی نفت خام

روش‌های پاکسازی زیستی پاکسازی طبیعی^۶، تحریک زیستی^۷ و تلقیح زیستی^۸ را دربر می‌گیرند. تجزیه زیستی نفت خام در دریاها را می‌توان به صورت تلقیح مخلوط باکتری‌های غنی شده به آب و یا با تحریک ریزاندامگانهای بومی (افزایش مواد مغذی و اکسیژن به آب) سرعت بخشید. برای بهینه‌سازی شرایط پاکسازی زیستی باید خصوصیات منطقه آلوده قبل از انجام عملیات پاکسازی شناسایی و اطلاعات پایه‌ای نظیر مشخصات نفت خام، جمعیت ریزاندامگانهای بومی، پتانسیل تجزیه زیستی این ریزاندامگانها و دیگر اطلاعات پایه جمع‌آوری شود [۴۲ و ۴۳].

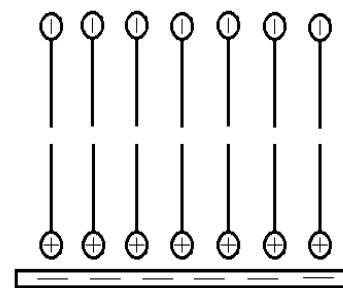
3. Surfactin
4. Rhamnolipid
5. Sophorolipid
6. Natural Attenuation
7. Biostimulation
8. Bioaugmentation



مسیل



همی‌مسیل



آدمسیل

شکل ۲. ساختار مسیل، همی‌مسیل و آدمسیل در یک حلال آبی [۲۵].

در غلظت‌های پایین، زیست روآورها به فرارگیری در سطح گرایش دارند. در غلظتی خاص و زمانی که در سطح، انبوهی از زیست روآور وجود دارد، تکپاره‌های زیست روآور به شکل مسیل می‌آیند و افزودن زیست روآور دیگر باعث کاهش کشش سطحی نمی‌شود. این غلظت خاص، غلظت بحرانی مسیل^۱ نامیده می‌شود. مسیل‌های تشکیل شده توسط زیست روآورها قادرند کشش سطحی و بین‌سطحی ترکیبات آلی آب‌گریز را کاهش دهند و حلالیت و دسترس‌پذیری زیستی^۱ آن‌ها را افزایش دهند [۲۷]. مسیل در غلظتی بالاتر از غلظت بحرانی مسیل (CMC) تشکیل می‌شود، با این حال دانه‌های آدمسیل در غلظتی پایین‌تر از CMC تشکیل می‌شوند [۲۵] (شکل ۳).

غلظت بحرانی مسیل، شاخص کارایی زیست روآور را نشان می‌دهد. هر چه میزان غلظت بحرانی مسیل کمتر باشد نشان‌دهنده خلوص و کیفیت بالای زیست روآور، و در پی آن تشکیل سریع مسیل و کاهش کشش سطحی و بین‌سطحی بیشتر است.

1. Critical Micelle Concentration (CMC)
2. Bioavailability

جدول ۲. بررسی میزان عملکرد زیست روآورها.

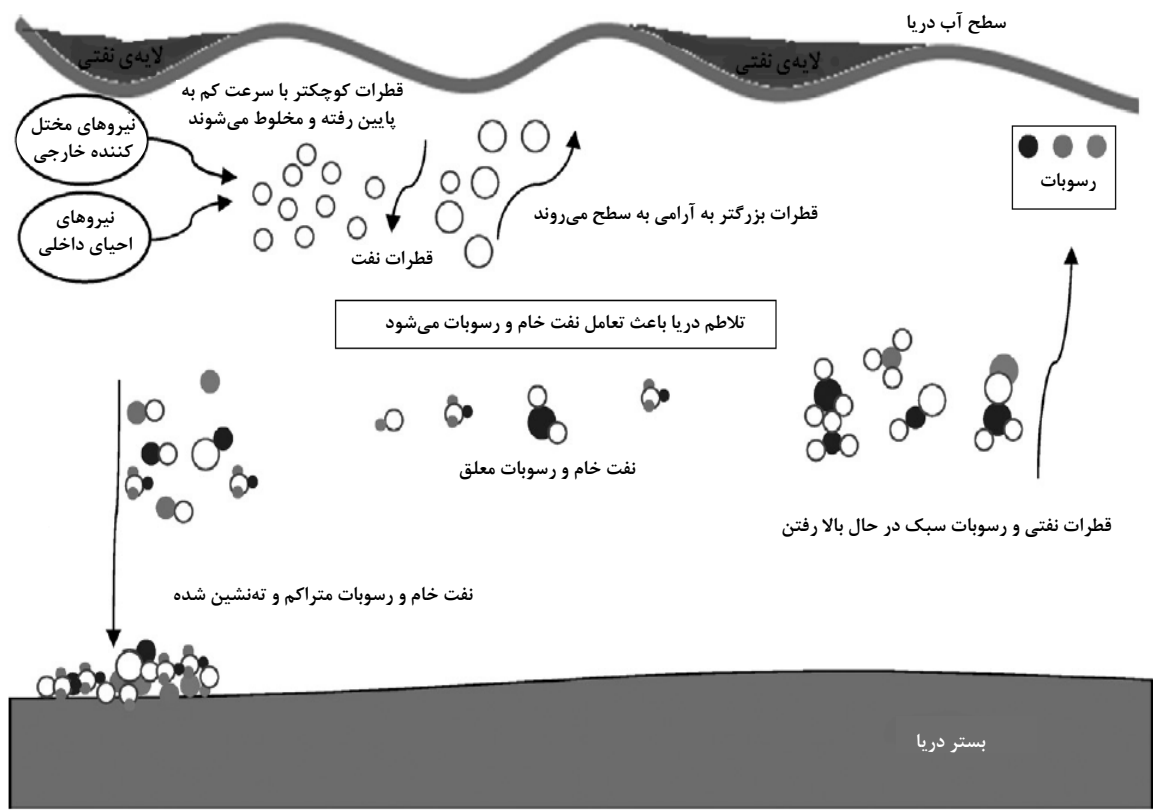
توضیحات	مراجع	(۲۵°C) CMC/ μ M	ریزاندامگان تولیدکننده	زیست روآور
سورفکتین تهیه شده از شرکت سیگما ^۱ (خلوص ۹۸٪).		۱۳	-	سورفکتین
خالص سازی شیمیایی با خلوص ۳۲/۱٪	[۲۹,۳۰]	۲۲	باسیلوس سوبتیلیس DSM3256	سورفکتین
خالص سازی توسط روش اولترافیلتراسیون با خلوص ۷۰٪		۱۷		سورفکتین
-	[۳۱]	۲۲	سودوموناس آئروژینوزا MA01	رامنولیپید
-	[۳۲]	۹/۵	کاندیدا بومبی کولا ATCC22214	سوفورولیپید
-	[۳۳]	۳۶۰	سودوزایما آنتارکتیکا ^۳	مانوسیلریتول لیپید ^۲
-	[۳۴]	۳۵	باسیلوس متیلوتروفیکوس ^۴ USTBa	زیست روآور USTBa
-	[۳۵]	۱۱۰	استرپتومایسس ^۵ B3	-
-	[۳۶]	۵۰	کاندیدا بومبی کولا ATCC22214 و سودوموناس آئروژینوزا O-2-2	مخلوط سوفورولیپید و دی رامنولیپید ^۶
-	[۳۷]	۴۳	کاندیدا بومبی کولا NRRL Y-17069	سوفورولیپید
خلوص ۶۰٪	[۳۸]	۶۷	سودوموناس آئروژینوزا PA1	رامنولیپید
خلوص ۷۸٪	[۳۸,۳۹]	۳۳	باسیلوس سوبتیلیس LB5a	سورفکتین
pH= ۴ در	[۴۰]	۱۰	سودوموناس آئروژینوزا NCIB40044	دی رامنولیپید
pH= ۷/۴ در	[۴۰]	۱۱۰		
-	[۴۱]	۴۵	باسیلوس سوبتیلیس ATCC21332	سورفکتین
-	[۴۱]	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا J4	رامنولیپید

نیروهای مختل کننده خارجی ناشی از میدان جریان، مانند لختی یا نیروی گرانشی، و دیگری نیروهای داخلی نفت مانند کشش بین سطحی است که عامل حفظ شکل قطره نفت است. مرحله دوم تعامل بین ترکیبات قطبی قطرات نفت و ذرات معلق است. پارامترهایی چون شوری (و یا قدرت یونی)، نوع نفت، غلظت و نوع رسوب و غلظت ذرات در این مرحله می تواند موثر باشد. تلاطم دریا باعث تعامل نفت خام و رسوبات می شود؛ به این ترتیب که قطرات کوچکتر با سرعت کم به سمت پایین می روند و با رسوبات مخلوط می شوند؛ قطرات بزرگتر نیز به آرامی به سطح می آیند. در مرحله بعدی، قطرات نفتی و رسوبات سبک بالا می روند و رسوبات سنگین و متراکم ته نشین می شوند [۲۶].

۱.۳ پاکسازی طبیعی

تشکیل پیوند بین نفت خام و ذرات معلق (رسوبات و ریزاندامگانها)^۷ از طریق برهم کنشهای الکتریکی بین سطوح ذرات و ترکیبات قطبی نفت، به واسطه کاتیون ها به عنوان پل های الکتریکی برقرار می شود [۱۴]. قطرات نفت معلق به همراه رسوبات (OSAs) در دو مرحله متوالی تشکیل می شوند (شکل (۴)). در ابتدا، لایه نفتی از طریق وارد آمدن دو نوع نیرو به قطرات نفت تبدیل می شود؛ اولی

1. Sigma
2. Mannosylerythritol Lipids
3. Pseudozyma Antarctica
4. Bacillus Methylotrophicus
5. Streptomyces
6. Di-Rhamnolipid
7. Oil-Suspended Particulate Material (SPM) Aggregates (OSAs)



شکل ۴. سازوکار تجزیه طبیعی نفت خام در آب دریا [۲۶].

CMC را داشتند؛ به بیان دیگر، تاثیر این باکتری‌ها بر نفت خام باعث می‌شود در مدت زمانی کوتاه به پایین‌ترین نقطه CMC برسیم تا زیست روآورهای تکپار به میسل تبدیل شوند و قطرات امولسیون نفت خام را در برگیرند و به توانایی پاکسازی برسند. ضریب فعالیت امولسیون‌سازی از رابطه (۱) به دست می‌آید:

$$EA = \frac{\text{طول لایه امولسیون‌سازی}}{\text{طول کل لایه}} \times 100 \quad (1)$$

در شکل (۵)، میزان کاهش کشش سطحی آب توسط زیست روآور تولیدشده از ریزاندامگانها بررسی شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده میزان عملکرد سودوموناس آئروژینوزا WJ-1 از بقیه باکتری‌ها پذیرفتنی‌تر ارزیابی شده است.

۲.۳. تلقیح زیستی (افزایش توان زیستی ریزاندامگانها)

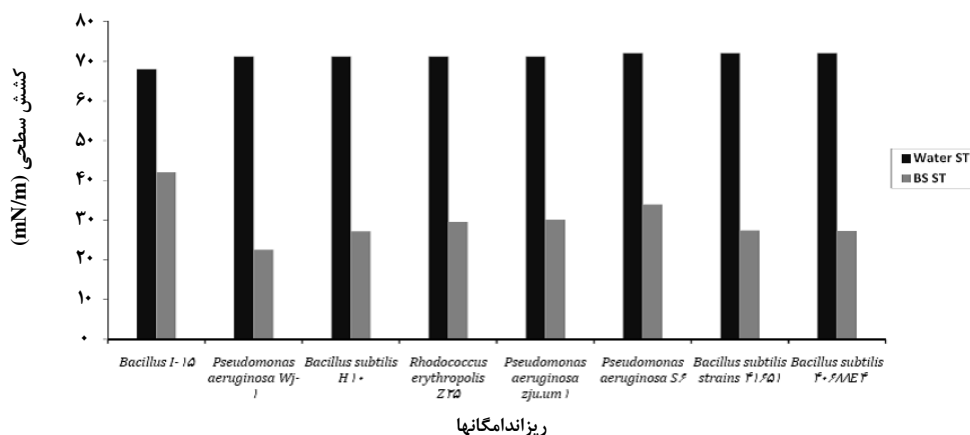
تلقیح زیستی از روش‌های درجا^۱ است؛ در این روش باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام دیگر را برای افزایش توانایی زیستی ریزاندامگانهای بومی در تجزیه نفت خام به محیط اضافه می‌کنند. افزایش توان زیستی ابزاری قدرتمند، سریع، موثر و مقرون به صرفه است و می‌توان آن را به عنوان جایگزین مستقل در تجزیه نفت به کار گرفت و به خوبی با بسیاری از سایر فناوری‌های پاکسازی سازگار است. سرعت و موفقیت تلقیح زیستی مانند هر فناوری پاکسازی دیگر، به درک روشنی از شرایط خاص منطقه بستگی دارد [۴۵].

در جدول (۳)، عملکرد ریزاندامگانهای مختلف در تجزیه نفت خام بررسی شده است. در این بررسی، باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و مخمر کاندیدا بومی‌کولا کمترین

1. In-Situ

جدول ۳. عملکرد ریزاندامگانها در تجزیه نفت خام.

مراجع	CMC/ μM (25°C)	فعالیت امولسیون سازی (%)	زیست روآور تولیدی	ریزاندامگانها
[۴۶]	۲۰۰	-	سورفکتین	باسیلوس سوبتیلیس I-15
[۴۷]	۳۰	۸۰	رامنولیپید	سودوموناس آئروژینوزا WJ-1
	۵۰	۷۵	سورفکتین	باسیلوس سوبتیلیس H10
	۷۰	۷۴	فسفاتی دی لتانولامین ^۱	رودوکوکوس اریشروپولیس Z25
[۴۸]	۲۸/۸	-	رامنولیپید	سودوموناس آئروژینوزا zju.um1
[۴۹]	۵۰	۸۲/۶۴	رامنولیپید	سودوموناس آئروژینوزا S6
[۵۰]	۱۵	-	سورفکتین	باسیلوس سوبتیلیس 41651 A1
	۱۰۰	-	اسیل چرب گلوتمات ^۲	باسیلوس سوبتیلیس 40688 E4
[۵۱]	۳۰	-	سوفورولیپید	کاندیدا بومی کولا ATCC22214
	۴۰	-	رامنولیپید	سودوموناس آئروژینوزا O-2-2
[۶۳]	-	۸۴/۱۴	رامنولیپید، سورفکتین و سوفورولیپید	سودوموناس آئروژینوزا PTCC1074، باسیلوس سوبتیلیس PTCC1023 و اسپینتوباکتر کالکواستیکوس PTCC1318



شکل ۵. تغییرات کشش سطحی در حضور ریزاندامگانها (کشش سطحی آب: Water ST، کشش سطحی زیست روآور تولیدشده در محیط: BS ST) [۴۶-۵۱].

تجزیه زیستی در محیط زیست دریایی بسیار دشوار است، به خصوص در دریاها، جایی که غلظت مواد مغذی محلول در آب با نشت نفت به سرعت کاهش می‌یابد. برای مقابله با این مشکل، تعیین اجزای تشکیل دهنده مواد مغذی برای حفظ غلظت مطلوب انجام می‌شود [۵۲]. گاهی افزایش توان زیستی با تحریک زیستی اشتباه گرفته می‌شود. در تحریک زیستی، مواد شیمیایی یا مواد مغذی به لایه زیرسطحی برای تحریک باکتری‌های بومی اضافه

۳.۳ تحریک زیستی

تحریک زیستی، شامل اصلاح محیط زیست و در نتیجه تحریک باکتری‌های بومی است. مطالعات تجربی نشان می‌دهد که تحریک ریزاندامگانها با افزودن منابع نیتروژن و فسفر، اقدامی متقابل برای رویارویی با نشت نفت در محیط زیست دریایی است. با این حال، در پیش گرفتن تحریک زیستی به عنوان یک راهبرد برای

1. Phosphati-Dylethanolamine
2. Fatty acyl-Glutamate

می‌شوند. فرایند تحریک برای افزایش جمعیت باکتریایی محیط نیاز به زمان دارد تا به میزان لازم برای تاثیر در تجزیه زیستی نفت خام برسد [۶۳].

عوامل محیطی و شرایط رشدی مانند نوع منبع کربنی، منبع نیتروژنی، میزان هوادهی و قابلیت دسترسی اکسیژن و دما با تاثیر نهادن بر رشد و فعالیت سلولی بر تحریک زیستی و تولید روآور برای کاهش کشتش سطحی تاثیر می‌گذارند [۴۱ و ۵۳]. در ادامه، برخی از عوامل محیطی موثر را بررسی خواهیم کرد.

۳.۳. ۱ عوامل محیطی موثر

برخی از ریزاندامگانها که از منابع شیمیایی انرژی کسب می‌کنند، آنها که از منابع غیرآلی چون کربن دی‌اکسید برای افزایش توده زیستی خود بهره می‌برند، خودپرورد^۱ و بقیه از کربن آلی استفاده می‌کنند که دگرپرورد^۲ نام دارند [۵۴]. براساس مشاهدات پژوهشگران دیگر، وقتی باکتری‌ها در محیط حاوی منبع کربن محلول در آب، که براحتی در دسترس است، رشد و مقدار کمی روآور تولید کنند، پس از پایان یافتن منبع کربن محلول در آب، وقتی هیدروکربن‌های نامحلول در آب به عنوان منبع کربن در اختیار سلول قرار می‌گیرند، تولید زیست روآور با افزایش ناگهانی همراه می‌شود [۵۵] (جدول (۴)).

افزودن منبع نیتروژن، فسفر و غلظت آن‌ها، و نیز نسبت کربن به نیتروژن و فسفر تاثیر فوق‌العاده زیادی بر رشد سلولی و کاهش کشتش سطحی می‌گذارند، به طوری که درصد اهمیت مواد مغذی در بعضی مواقع، هم سطح تاثیر منبع کربن است. علت این امر آن است که در ترکیب اکثر زیست روآورها، نیتروژن و فسفر موجود است. وجود این مواد مغذی در محیط کشت به منظور رشد سلولی بسیار ضروری است زیرا در صورتی که ریزاندامگانها قادر به رشد مناسب نباشند، ممکن است بسیاری از عوامل سوخت‌وسازی مناسب را تولید نکنند [۵۵، ۵۶، ۶۷]. امروزه، علاوه بر دو منبع یادشده، مطالعات زیادی بر روی سایر مواد مغذی به منظور تولید زیست روآور نظیر آهن، منیزیم، کلسیم و پتاسیم انجام شده است و تاثیر غلظت آنها در محیط کشت و در پی آن تولید محصول مشاهده شد [۵۵].

برای تامین اکسیژن مورد نیاز تولید زیست روآور، به علت هزینه کم

آن، از هوا در فرایندهای زیستی صنعتی استفاده می‌شود. با این وجود اکسیژن خالص، نیتروژن خالص یا هوای غنی شده با اکسیژن یا کربن دی‌اکسید نیز قابل استفاده‌اند [۵۴]. میزان pH، یکی از عوامل مهم در تجزیه زیستی نفت خام به شمار می‌آید. محدوده pH در برخی مراجع ۶ تا ۶/۵ و در برخی ۷ و بیش از آن گزارش شده است [۵۷]. دما نیز عامل بسیار مهمی است که در میزان تولید زیست روآور مؤثر است. ولی معمولاً زیست روآورها در برابر دما مقاومت بروز می‌دهند. به این ترتیب که قابلیت تشکیل امولسیون، کشتش سطحی و کشتش بین سطحی آنها پس از ۱۵ دقیقه اتوکلاو در دمای ۱۲۰ °C نیز تغییر نمی‌کند [۵۸] (جدول (۴)).

تحقیقات زیادی در زمینه دستیابی به موثرترین شرایط محیط دریایی در تجزیه زیستی نفت خام صورت گرفته است (جدول (۴)). این تحقیقات شرایط بهینه محیطی در هنگام نشت نفت خام با توجه به نوع ریزاندامگانهای بومی، مدت زمان لازم برای پاکسازی، میزان پاکسازی و موارد دیگری را بررسی می‌کنند.

۴. نتیجه‌گیری کلی

با توجه به این که عوامل بسیاری در پاکسازی نفت خام موثرند، در این مبحث توسعه، بهینه‌سازی، تغییر یا بهبود عملیات فرایندی ضروری است. با توجه به مطالعات انجام شده، جامعه میکروبی دریایی طی سه مرحله آلودگی‌ها را از بین می‌برند: پاکسازی طبیعی، تلقیح زیستی (افزایش توان زیستی) و تحریک زیستی (افزودن مواد مغذی). سویه‌های بومی مناطق آلوده برای افزایش توان زیستی محیط دریایی به کار می‌رود، چون این سویه‌ها با شرایط محیطی و ریزاندامگانهای دیگر منطقه آلوده سازگاری بیشتری دارند. برای افزایش بازده پاکسازی معمولاً به استفاده بیش از یک تک سویه نیاز است. تک ریزاندامگانها تنها لایه‌های محدودی از هیدروکربن‌ها را حذف می‌کنند اما کشت مخلوط، عملکرد به مراتب بهتری در پاکسازی زیستی دارد. استفاده از این روش این امکان را فراهم می‌آورد که با استخراج ریزاندامگانهای بومی، هم بازده را بالا برد و هم هزینه‌های عملیات پاکسازی را به میزان قابل توجهی پایین آورد. در مرحله بعد، با مصرف منبع کربنی نفت خام توسط ریزاندامگانها، غلظت مواد مغذی معدنی موردنیاز پاکسازی در محیط دریایی آلوده به شدت کاهش پیدا می‌کند که برای حل این مشکل، مواد مغذی

1. Autotroph
2. Heterotroph

زیست روآورها، این ترکیبات در صنعت نفت و پتروشیمی با حداقل خلوص مصرف می‌شوند، به طوری که کل محیط کشت برای رفع آلودگی‌های نفتی قابل استفاده است. از سوی دیگر، این امر، کاهش هزینه‌های تخلیص را نیز به دنبال خواهد داشت.

لازم برای تحریک زیستی به محیط آلوده تزریق می‌شود تا پاکسازی نفت خام به سرعت قابل قبولی برسد. از تاثیر باکتری‌ها بر روی محیط کشت اصلی که حاوی منبع کربن است، زیست روآور تولید می‌شود. در حال حاضر، با توجه به هزینه تخلیص

جدول ۴. شرایط محیطی موثر در تجزیه زیستی نفت خام.

مراجع	زمان تجزیه (روز)	تجزیه نفت خام (%)	میزان کاهش کشش سطحی (mN/m)	فعالیت تشکیل امولسیون (%)	دما (°C)	دور همزن (rpm)	منبع کربن (%)	pH	ریزاندامگان	
[۵۹]	۷	۸۲	۳۹/۴	۵۸	۳۰	۱۶۵	۱ (v/v)	۵	مخمر یاروویا لیپولیتیکا ^۱ PG-20	
	۷	۶۸	۳۹/۱	۵۰	۳۰	۱۶۵	۱ (v/v)	۵	مخمر یاروویا لیپولیتیکا ^۱ PG-32	
[۶۰]	۳۰	۶۰/۶	از ۷۲/۵۴ به ۴۸/۴۶	۷۵	۳۵	۲۰۰	۱ (v/v)	۷	سودوموناس BP10	
	۳۰	۴۹/۵	از ۷۲/۵۴ به ۶۵/۲۴	۳۵	۳۰	۲۰۰	۱ (v/v)	۶	رودوکوکوس NJ2	
[۵]	۷	۳۶	از ۶۳/۱ به ۴۱/۳	-	۳۰	۱۸۰	۰/۲۵ گرم	۷	سودوموناس آئروژینوزا Z1	
			از ۶۱/۷ به ۴۷/۶						سودوموناس آئروژینوزا Z41	
			از ۶۳/۱ به ۴۱/۴						سودوموناس آئروژینوزا Z49	
			از ۶۱/۷ به ۴۶/۲							
[۶۱]	۷	۶۷	از ۷۲ به ۵۳/۶	OD ₆₁₀ =1/۷۵	۳۴	۳۵۰	۲ (w/v)	۷/۵	لاکتوباسیلوس دلبروکی ^۲	
			از ۷۲ به ۵۳/۶	۶۴					اسینتوباکتر کالکواستیکوس (BS)	
[۶۲]	۱۰	۶۸	از ۷۲ به ۵۳/۶	۲۰	۳۰	۱۸۰	۱ (v/v)	۷	سودوموناس آئروژینوزا 4-NBAII AFP-4 (AS)	
			۶۵	۴۳/۴					۴۵/۵	اسینتوباکتر کالکواستیکوس (PG-3)
			۵۱	۵۸/۸					۳	گوردونیا آمیکالایس ^۴ CS-12 (CS-12)
			۴۸	۴۳					۱۲	رودوکوکوس وارنسیس لاونسیس ^۵ FPA1 (PG-39)
			۴۱	۴۸					۴۲	سودوموناس استاتزری ^۶ JMC01 (CS-2)
			۶۸	۳۸/۷					۳۰	هالوموناس هالودورانس ^۷ DSM 5160 (PG-11)
			۶۱	۳۵/۳					۱۰	هالوموناس اورگانوورانس ^۸ G-16.1 (PG-31)
			۷۱	۳۵/۳					۵۱	آلکانیووراکس دیزلولی ^۹ PM07 (PG-12) (12)
			۵۲	۳۸/۵					۲۳	مارینوباکتر هیدروکربنوکاستیکوس ^{۱۰} (PG-24) P210(9)
			۳۳	۴۳					۵	ماکروباکتریوم آگوی ماریس ^{۱۱} DT27 (PG-26)
[۶۳]	۶	۷۲/۲۵	کشش بین سطحی به صورت مخلوط باکتری‌ها از ۳۷ تا ۸ کاهش یافت	به صورت مخلوط باکتری‌ها (۷۵/۴۶)	۳۷	۱۵۰	۱ (v/v)	۶/۸	سودوموناس آئروژینوزا PTCC1074	
	۵	۶۸/۳۱							باسیلوس سوبتیلیس PTCC1023	
	۶	۶۹/۷۷							اسینتوباکتر کالکواستیکوس PTCC1318	

1. Yarrowia Lipolytica
2. Yarrowia Lipolytica
3. Lactobacillus Delbrueckii
4. Gordonia Amicalis
5. Rhodococcus Wratislaviensis
6. Pseudomonas Stutzeri
7. Halomonas Halodurans
8. Halomonas Organivorans
9. Alcanivorax Dieselolei
10. Marinobacter Hydrocarbonoclasticus
11. Microbacterium Aquimaris

- [1] Hua, Z., Chen, Y., Du G., Chen, J., "Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 25–29, (2004).
- [2] Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T., Scherr, K. E., "Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains", *Chemical Engineering Journal*, 209: 138-146, (2012).
- [3] مصطفی زارع دوست، مریم رسولی، امین موسی پور، "جمع آوری آلودگیهای نفتی از روی سطح آب دریا به وسیله انواع اسکیمر، مطالعه موردی کاربرد اسکیمر تفکیک نفت و آب بر پایه چگالی *Density Base Oil Skimmer*"، اولین همایش ملی توسعه سواحل مکران و اقتدار دریایی جمهوری اسلامی ایران، کدمقاله: ۳۰، ۱۳۹۱.
- [4] Dahl, W., Lessard, R. R., Cardello, E. A., Fritz, D. E., Norman, F. S., Twyman, J. D., Clayton E. W., Knight B. L., Crane R. D., Johnson S. J., Martin B. R. "Solidifiers for oil spill response", *Proceedings of the Society of Petroleum Engineers Conference on Health Safety and Environment. The Society of Petroleum Engineers*, No. 35860, 803-810, (1996).
- [5] Ubalua, A. O., "Bioremediation strategies for oil polluted marine ecosystems", *Australian Journal of Agricultural Engineering*, 2: 160-168, (2011).
- [6] Dowty R. A., Shaffer, G. P., Hester, M. W., Childers, G. W., Campo, F. M., Greene, M. C., "Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation", *Marine Environmental Research*, 52: 195-211, (2001).
- [7] Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L. S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M., Yakimov, M. M., Giuliano, L., "Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study", *Journal of Applied Microbiology*, 102: 184–194, (2007).
- [8] Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., Yakimov, M. M., "Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on oil spill bioremediation in mesocosms", *Microbiological Research*, 162: 185–190, (2006).
- [9] حسین هاشم‌لو، "بررسی عملکرد آزمایشگاهی مخلوط باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و اسینتوباکتر کالکواستیکوس در تجزیه زیستی نفت خام"، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده فنی و مهندسی تهران شمال، دانشگاه پیام نور تهران، آذر ۱۳۹۲.
- [10] Prince, R. C., "Petroleum Microbiology", *American Society for Microbiology Press Washington DC*, (2005).
- [11] Hassanshahian, M., Cappello, S., "Biodegradation-Engineering and Technology", Chapter 5: Crude Oil Biodegradation in the Marine Environments. Publisher: InTech: 101-136, (2013).
- [12] Zhang, G. L., Wu, Y. T., Qian, X. P., Meng, Q., "Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids", *Journal of Zhejiang University science B*, 6: 725-730, (2005).
- [13] Rahman, K. S. M., Thahira, J. R., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I. M., "Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients", *Bioresource Technology*, 90: 159–168, (2003).
- [14] Bordoloi, N. K., Konwar, B. K., "Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 170: 495-505, (2009).
- [15] Soberón-Chávez, G., Maier, R. M., "Biosurfactants: a General Overview", In *Biosurfactants*. Edition Springer-Verlag: Berlin, Germany: 1–11, (2011).
- [16] Banat, I. M., Makkar, R. S., Cameotra, S. S., "Potential commercial applications of microbial surfactants", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 495–508, (2000).
- [17] Lang, S., "Biological amphiphiles (microbial biosurfactants)", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7: 12–20, (2002).
- [18] Desai, J. D., Banat, I. M., "Microbial production of surfactants and their commercial potential", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 47–64, (1997).
- [19] Desai, J. D., Banat, I. M., "Microbial production of surfactants and their commercial potential", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 47–64, (1997).
- [20] Kosaric, N., "Biosurfactants in industry", *Pure and Applied Chemistry*, 64: 1731–1737, (1992).
- [21] Kosaric, N., "Biosurfactants and their application for soil bioremediation", *Food Technology and Biotechnology*, 39: 295–304, (2001).
- [22] Rahman, K. S. M., Rahman, T. J. Kourkoutas, Y. Petsas, I., Marchant, R., Banat, I. M., "Enhanced bioremediation of n-alkane petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients", *Bioresource Technology*, 90: 159–168, (2003).
- [23] Das, K., Mukherjee, A. K., "Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants", *Process Biochemistry*, 42: 1191–1199, (2007).
- [24] Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., "Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin", *Chemosphere*, 72: 1229–1234, (2008).

- [25] Gangula, S., Suen, S. Y., Conte, E. D., "Analytical applications of admicelle and hemimicelle solid phase extraction of organic analytes", *Microchemical Journal*, 95: 2–4, (2010).
- [26] Gong, Y., Zhao, X., Cai, Z., O'Reilly, S. E., Hao, X., Dongye Zhao, D., "A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills", *Marine Pollution Bulletin*, 79: 16–33, (2014).
- [27] Whang, L. M., Liu, P. W. G., Ma, C. C., Cheng, S. S., "Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil", *Journal of Hazardous Materials*, 151: 155–163, (2008).
- [28] Ghalambor, A., "Evaluation and characterization of sorbents in removal of oil spills", Louisiana oils spill coordinators of the governor, Louisiana Applied Oil Spill Research and Development Program, Baton Rouge, Louisiana, OSRADP, Technical report series: 95-006, (1995).
- [29] Heerklotz, H., Seelig, J., "Detergent-Like Action of the Antibiotic Peptide Surfactin on Lipid Membranes", *Biophysical Journal*, 81: 1547–1554, (2001).
- [30] Sen, R., Swaminathan, T., "Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin", *Process Biochemistry*, 40: 2953–2958, (2005).
- [31] Khoshdast, H., Abbasi, H., Sam, A., Akbari Noghabi, K., "Frothability and surface behavior of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MA01", *Biochemical Engineering Journal*, 60: 127–134, (2012).
- [32] Joshi-Navare, K., Khanvilkar, P., Prabhune, A., "Jatropha Oil Derived Sophorolipids: Production and Characterization as Laundry Detergent Additive", *Biochemistry Research International*, 11, Article ID 169797, (2013).
- [33] Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, H., "Structural characterization and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipid, produced from glucose by *Pseudozyma Antarctica*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76: 801–810, (2007).
- [34] Chandankere, R., Yao, J., Cai, M., Masakorala, K., Jain, A. K., Choi, M. F. M., "Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa", *Fuel*, 122: 140–148, (2014).
- [35] Khopade, A., Ren, B., Liu, X. Y., Mahadik, K., Zhang, L., Kokare, C., "Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3", *Journal of Colloid and Interface Science*, 367: 311–318, (2012).
- [36] Song, D., Lia, Y., Liang, S., Wang, J., "Micelle behaviors of sophorolipid/rhamnolipid binary mixed biosurfactant systems", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436: 201–206, (2013).
- [37] Daverey, A., Pakshirajan, K., "Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79: 246–253, (2010).
- [38] Araujo, L. V., Abreu, F., Lins, U., Santa Anna, L. M. M., Nitschke M., Freire D.M.G., "Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion", *Food Research International*, 44: 481–488, (2011).
- [39] Nitschke, M., Pastore, G. M., "Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater", *Bioresource Technology*, 97: 336–341, (2006).
- [40] Sánchez, M., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Marqués, A., Teruel, J. A., Manresa, Á., Ortiz, A., "Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media", *Journal of Colloid and Interface Science*, 307: 246–253, (2007).
- [41] Whang, L. M., Liu, P. W. G., Ma, C. C., Cheng, S. S., "Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil", *Journal of Hazardous Materials*, 151: 155–163, (2008).
- [42] Nikolopoulou, M., Eickenbusch, P., Pasadakis, N., Venieri, D., Kalogerakis, N., "Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills", *New Biotechnology*, 30: 734–742, (2013).
- [43] Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Kalogerakis, N., "Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills", *Marine Pollution Bulletin*, 72: 165–173, (2013).
- [44] Bandara, U. C., Yapa, P. D., Xie, H., "Fate and transport of oil in sediment laden marine waters", *Journal of Hydro-environment Research*, 5: 145–156, (2011).
- [45] Cornelius, J. R., Falgale, J. D., "Bioaugmentation: An effective method for reducing contaminant concentrations", *Florida Specifier*, which is a privately-owned environmental newspaper, (2008).
- [46] Ismail, W., Al-Rowaihi, I. S., Al-Humam, A. A., Hamza, R. Y., El Nayal, A. M., Bououdina, M., "Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84: 168–178, (2013).
- [47] Xia, W. J., Dong, H. P., Yu, L., Yu, D. F., "Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 392: 124–130, (2011).
- [48] Qin, L., Zhang, G., Meng, Q., Zhang, H., Xu, L., Lv, B., "Enhanced submerged membrane bioreactor combined with biosurfactant rhamnolipids: Performance for frying oil degradation and membrane fouling reduction", *Bioresource Technology*, 126: 314–320, (2012).
- [49] Yin, H., Qiang, J., Jia, Y., Ye, J., Peng, H., Qin, H., Zhang, N., He, B., "Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from

- oil-containing wastewater", *Process Biochemistry*, 44: 302–308, (2009).
- [50] Marti, M. E., Colonna, W. J., Patra, P., Zhang, H., Green, C., Reznik, G., Pynn, M., Jarrell, K., Nyman, J. A., Somasundaran, P., Glatz, C. E., Lamsal, B. P., "Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation", *Enzyme and Microbial Technology*, 55: 31–39, (2014).
- [51] Song, D., Liang, Sh., Zhang, Q., Wang, J., Yan, L., "Development of High Efficient and Low Toxic Oil Spill Dispersants Based on Sorbitol Derivants Nonionic Surfactants and Glycolipid Biosurfactants", *Journal of Environmental Protection*, 4: 16-22, (2013).
- [52] Lee, K., Merlin, F. X., "Bioremediation of Oil on Shoreline environments: development of techniques and guidelines", *Pure and Applied Chemistry*, 71: 161-171, (1999).
- [53] Sifour, M., Al-Jilawi, M. H., Aziz, G. M., "Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 1331–1335, (2007).
- [54] Gladwin, M., Trattler, B., "Clinical Microbiology made ridiculously simple", 3rd Edition, MiamiFL, Med Master Inc, (1997).
- [55] Rosenberg, E., *CRC Crit. Rev. Biotechnology*, 3: 109-132, (1986).
- [56] Guevara, E., Gonzalez, J., Nuñez, G., "Highly Viscous Oil Transportation Methods in the Venezuela Industry, Proc", 15th World Pet. Congress: 495-502, (1998).
- [57] Mulligan, C. N., "Environmental applications for biosurfactants", *Environmental Pollution*, 133: 183–198, (2005).
- [58] Eisenstadt, E., Carlton, B. C., Brown, B. J., Gene mutation. In *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R., Eds): 297–316. American Society for Microbiology, Washington, DC, (1994).
- [59] Hassanshahian, M., Tebyanian, H., Cappello, S., "Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf", *Marine Pollution Bulletin*, 64: 1386–1391, (2012).
- [60] Kumari, B., Singh, S. N., Singh, D. P., "Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. *Process Biochemistry*, 47: 2463–2471, (2012).
- [61] Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Banat, I. M., "Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil", *Bioresource Technology*, 102: 3366–3372, (2011).
- [62] Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S., "Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea", *Marine Pollution Bulletin*, 64: 7–12, (2012).
- [63] Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A. "Microbial Communities in Oil-contaminated Seawater", *Current Opinion in Biotechnology*. 15, 205-214, (2004).