



Evaluation of the ability of microorganisms *Rhodococcus fascians* LMG3623 and *Penicillium* sp. in the degradation of asphaltene isolated from soil

Atefeh Goudarzi¹ | Ahmad Ali Pourbabaee² | Hossein Ali Alikhani³ | Shayan Shariati⁴

1. Department of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: atefeh.goudarzi@ut.ac.ir

2. Corresponding Author, Department of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: pourbabaee@ut.ac.ir

3. Department of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: halikhan@ut.ac.ir

4. Department of Environmental Engineering, Faculty of Natural Resources, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: shayan_shariati@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received 01 September 2025

Received in revised form 25 October 2025

Accepted 05 November 2025

Published online 21 November 2025

Keywords:

Bioremediation,

Microbial biomass,

Oil degradation,

Soil pollution.

ABSTRACT

Petroleum compounds and their derivatives are among the most harmful pollutants affecting soil and water globally. A particular group of crude oil components, known as polar compounds—including resins and asphaltenes—are notably difficult to degrade due to their complex molecular structures. This study focused on identifying microorganisms capable of breaking down residual asphaltenes in petroleum-contaminated soils. The bacteria and fungi used in this research were sourced from the microbial collection of the soil science and engineering department at the University of Tehran; these strains were originally isolated from sites with long-term petroleum contamination and wastewater pollution. The ability of these strains to degrade petroleum was tested through pure culture incubation over one week in 50 mL of Bushnell-Haas medium containing 500 and 1000 mg/L of asphaltenes. Results indicated that the bacterium *Rhodococcus fascians* LMG3623 and the fungus *Penicillium* sp. removed 36% and 14.5%, and 22% and 14.5% of the asphaltenes at 500 and 1000 mg/L concentrations, respectively, after 60 days in liquid culture. Furthermore, biomass production was measured at 9.8 mg/mL for the bacterium and 6 mg/mL for the fungus at 500 mg/L asphaltene concentration. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis of asphaltenes treated with *Rhodococcus fascians* LMG3623, compared to untreated controls, showed that bacterial degradation targeted alkane, alkyne, alkene, and aromatic groups, converting them into oxygen-containing, phosphorous, aliphatic, ketone, and amine functional groups.

Cite this article: Goudarzi, A., Pourbabaee, A.A., Alikhani, H.A., & Shariati, S. (2025). Evaluation of the ability of microorganisms *Rhodococcus fascians* LMG3623 and *Penicillium* sp. in the degradation of asphaltene isolated from soil. *Journal of Natural Environment*, 78 (3), 427-438. DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2025.401188.2836>



ارزیابی توانایی میکروارگانیسم‌های *Rhodococcus fascians* و قارچ *Penicilium* LMG3623 در تجزیه آسفالتین جدا شده از خاک

عاطفه گودرزی^۱ | احمد علی پوربابایی^۲ | حسینعلی علیخانی^۳ | شایان شریعتی^۴

۱. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشکده‌های کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: atefeh.goudarzi@ut.ac.ir
۲. نویسنده مسئول گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشکده‌های کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: pourbabaiei@ut.ac.ir
۳. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشکده‌های کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: halikhan@ut.ac.ir
۴. گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشکده‌های کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: shayan_shariati@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۴ تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۸/۳۰ کلیدواژه‌ها: آلودگی خاک، بیومس میکروبی، تجزیه نفت، زیست پالایی.	ترکیبات نفتی و مشتقات آنها از خطرناکترین آلاینده‌های خاک و آب در جهان‌اند. شاخه‌ای از ترکیبات نفت خام مربوط به ترکیبات قطبی است که شامل رزین‌ها و آسفالتین‌ها می‌شود. ترکیبات قطبی نفت معمولاً به دلیل ساختار پیچیده‌ای که دارند به سختی تجزیه می‌شوند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر شناسایی میکروارگانیسم‌های مؤثر در تجزیه باقیمانده‌های آسفالتین در خاک‌های آلوده نفتی بوده است. باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران که از مناطق دارای آلودگی نفتی قدیمی و مناطق دارای آلودگی پساب جداسازی و شناسایی شده بودند، تهیه شد. توانایی سویه‌های مورد نظر در تجزیه نفت، به صورت کشت خالص به مدت یک هفته در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت بوشنل‌هاوس دارای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آسفالتین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد باکتری <i>Rhodococcus fascians</i> LMG3623 و قارچ <i>Penicillium</i> sp. توانستند به ترتیب ۳۶ و ۱۴/۵ درصد و ۲۲ و ۱۴/۵ درصد آسفالتین با غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم را بعد از ۶۰ روز در محیط مایع حذف نمایند و در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر آسفالتین، ۹/۸ (باکتری) و ۶ (قارچ) میلی گرم بر لیتر بیومس میکروبی تولید نمایند. مقایسه نتایج تجزیه و تحلیل FTIR ساختار آسفالتین تیمار شده توسط باکتری <i>Rhodococcus fascians</i> LMG3623 با نمونه شاهد در محیط مایع نشان داد، گروه‌های آلکان‌ها، آلکین‌ها، آلکن‌ها و آروماتیک‌ها مورد حمله باکتری قرار گرفته و در طی تجزیه زیستی به ترتیب به گروه‌های اکسیژن‌دار، فسفری، آلینی، کتونی و آمینی تبدیل شده‌اند.

استناد: گودرزی، عاطفه؛ پوربابایی، احمد علی؛ علیخانی، حسینعلی؛ و شریعتی، شایان (۱۴۰۴). ارزیابی توانایی میکروارگانیسم‌های *Rhodococcus fascians* و قارچ *Penicilium* LMG3623 در تجزیه آسفالتین جدا شده از خاک. محیط زیست طبیعی، ۷۸ (۳)، ۴۳۸-۴۲۷.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2025.401188.2836>



مقدمه

خاک به عنوان بخشی از بیوسفر، یکی از بسترهای اصلی تولید غذا و سلامت محیط است. افزایش فعالیت‌های انسانی در چند دهه گذشته باعث افزایش آلودگی‌های شایع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در خاک و آب شده که برای رشد موجودات زنده خطرناک است (Hou et al., 2023; Das et al., 2023; Shah and Soni, 2024). نفت خام شامل چهار گروه عمده ترکیبات آلیفاتیک، ترکیبات آروماتیک، رزین‌ها و آسفالتین است (Su et al., 2021; Zeynali et al., 2024). وجود آلودگی نفتی طولانی‌مدت در خاک منجر به پدیده‌ای به نام پیری خاک می‌شود که پالایش و تصفیه خاک را سخت‌تر می‌کند (García et al., 2018). بیشتر مطالعات انجام شده در زمینه تجزیه ترکیبات سبک و ساده همچون ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک بوده‌اند و بخش‌های سنگین نفت کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Nzila and Musa, 2021). آسفالتین سنگین‌ترین و قطبی‌ترین ماده تشکیل‌دهنده نفت خام است. ساختار مولکولی آن بسیار پیچیده است و شامل چندین ساختار حلقوی است که به‌وسیله هیدروکربن‌های آلیفاتیک پیوند خورده‌اند. آسفالتین یک مولکول پلی‌آروماتیک با هترواتم‌ها و زنجیره‌های آلیفاتیک متصل به هسته آن است. آسفالتین ترکیبی از نفت که حاوی نیتروژن، گوگرد و اکسیژن و عناصر فلزی مانند نیکل، آهن و وانادیوم است، اغلب به ترکیبات NSO^۱ معروفند، و به‌عنوان سنگین‌ترین ترکیب نفت معرفی می‌شود (Tavassoli et al., 2023). از لحاظ رژیم حلالیت آسفالتین‌ها در آلکان‌هایی مانند نرمال پنتان و نرمال هپتان c7 انحلال‌ناپذیر ولی در حلال‌های آروماتیک مانند تولوئن و بنزن و پیریدین انحلال‌پذیراند (Hosseini et al., 2015 a,b). مولکول‌های آسفالتین با توجه به ساختار پیچیده به سختی تحت فرایندهای زیستی مورد دگرگونی قرار می‌گیرند. سرعت کم انتقال جرم این مولکول‌ها بر روی بیوکاتالیست و به‌طور کلی دشواری عبور از این مولکول‌ها از غشاهای سلولی از جمله دلایل مقاومت این ترکیبات در برابر تبدیل زیستی^۲ می‌باشد. باکتری‌ها سازوکارهای متفاوتی را در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها دارند و می‌توانند آلاینده‌ها را از طریق سطوح آبریز خود منتقل کنند و یا با تولید سورفکتانت به افزایش حلالیت و دسترسی به هیدروکربن‌ها کمک کنند (Johnsen et al., 2005; Das and Chandran, 2011). اخیراً روش‌های زیستی به‌عنوان فرایندهای مقرون به‌صرفه و سازگار با محیط‌زیست برای حذف و تخریب آسفالتین پیشنهاد شده‌اند (Gaur et al., 2018; Davoodi et al., 2020; Chand et al., 2022; Wei et al., 2023; Zeynali et al., 2024). Tavassoli و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند ۵ نوع از میکروارگانیسم‌های تند رشد (جداسازی شده از خاک آلوده میدان نفتی درود جنوب ایران) در محیط حاوی آسفالتین شامل TMU2-5 *Pseudomonas* spp., *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* TMU8-2، *Bacillus lentus* TMU5-2 و *Bacillus firmus* TMU6-2 بودند که توانستند ۴۶-۴۰ درصد آسفالتین را تخریب کنند. باکتری *Bacillus lentus* TMU5-2 بیشترین توانایی را در تخریب آسفالتین داشت. Asadollahi و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند *Bacillus cereus* پس از ۶۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قادر به کاهش ۴۰ درصد آسفالتین و استفاده از آن به‌عنوان منبع کربن و انرژی است. Wei و همکاران (۲۰۲۳) باکتری *Pseudomonas stutzeri* با توانایی تجزیه آسفالتین را از شیل نفتی جداسازی کردند. این باکتری توانست ۴۹ درصد از بخش آسفالتین نفت خام (۷۵ گرم/لیتر) را در محیط کشت معدنی به‌مدت ۱۴ روز تجزیه نماید. Das و همکاران (۲۰۲۳) گونه‌های *باسیلوس* با توانایی تجزیه آسفالتین را از خاک آلوده به نفت آسام هند جداسازی کردند. *B. thuringiensis* SSL1 و *B. cereus* SSL3 توانستند ۷۶/۴ و ۶۷/۴ درصد از آسفالتین را تجزیه کنند. اگرچه پژوهش‌های قابل توجهی در خصوص تأثیر میکروارگانیسم در کاهش هیدروکربن‌های نفتی کل^۳ و هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی^۴ در محیط‌های آبی و خاکی انجام شده است ولی در خصوص تجزیه آسفالتین (به‌عنوان بخش اصلی ترکیب چند حلقه‌ای نفت خام) نسبتاً پژوهش‌های کمتری صورت پذیرفته است. بنابراین هدف مطالعه حاضر بر ارزیابی توانایی سویه‌های تجزیه‌کننده نفت خام و مولد سورفکتانت در افزایش تجزیه‌پذیری آسفالتین در محیط مایع استوار بود.

^۱Nitrogen, sulfur, oxygen^۲Biotransformation^۳Total petroleum hydrocarbons (TPH)^۴Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)

روش‌شناسی پژوهش

جداسازی آسفالتین موجود از خاک: در این پژوهش جهت حذف آسفالتین در محیط مایع از آسفالتین طبیعی موجود در خاک آلوده استفاده شد. نمونه‌برداری از منطقه آلوده به مساحت ۱۰۰ متر مربع در ۵ نقطه با فواصل مشخص از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری میدان نفتی کوپال که در استان خوزستان در فاصله ۶۰ کیلومتری از شمال شرقی اهواز است، انجام شد. نمونه‌های مورد نظر به آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران انتقال یافتند و میزان آسفالتین خاک به شرح زیر اندازه‌گیری شد (۳۱/۲۵ درصد آسفالتین). جهت تخمین میزان آسفالتین موجود در خاک دارای آلوده نفتی از روش ASTM D6560 و دستگاه سوکسله^۵ استفاده شد که شامل ۱۵ مرحله کلی است. در اولین مرحله ۱۰ گرم از نمونه خاک توزین شد. با نسبت مساوی n-هگزان و استون در دستگاه سوکسله قرار داده شد. دمای دستگاه ۲۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از نقطه جوش حلال‌ها تنظیم شد. عمل استخراج به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. پس از گذشت زمان مذکور جهت تبخیر حلال نمونه در زیر هود شیمیایی قرار داده شد. سپس نمونه باقی‌مانده با ۶۰ میلی‌لیتر n-هپتان به مدت ۶۰ دقیقه در شرایط رفلکس قرار گرفت. در مرحله بعدی نمونه به مدت ۱۵۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد و بدون همزدن به کاغذ واتمن ۴۲ انتقال داده شد. حلال داغ به کاغذ صافی اضافه شد. نمونه به مدت ۱ ساعت همراه با حلال n-هپتان تحت شرایط سوکسله قرار گرفت و با گذشت این زمان حلال تولوئن جایگزین شد. عمل استخراج تا خروج کامل نمونه آسفالتین ادامه یافت. سپس حلال توسط دستگاه روتاری خارج شد. رسوب باقیمانده تراشیده توسط روش وزنی توزین شد (ASTM, 2012; Oscar, 2023).

انتخاب باکتری‌های توانمند در تجزیه آسفالتین: باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران که از مناطق دارای آلودگی نفتی قدیمی و مناطق دارای آلودگی پساب پلیمری جداسازی و شناسایی شده بودند، تهیه شد (Shariati et al., 2021, 2023; Nikkhah et al., Kalami and Pourbabaee, 2021). باکتری‌های شناسایی شده با پتانسیل تجزیه‌کنندگی هیدروکربن‌های نفتی (تولیدکننده سورفکتانت و مولد ژن آلکان هیدروکسیلاز) جهت بررسی توانایی آنها در تجزیه آسفالتین مورد بررسی قرار گرفتند. قارچ‌های *فانروکیت کریزوسپوریوم* (P. *chrysosporium* RP 78) هدیه‌ای از دکتر کالن و قارچ پنی‌سیلیوم از بازمانده‌های گیاهی تهیه شده بود (Ehteshamzadeh, 2015). در جدول ۱ اسامی علمی سویه‌های مورد استفاده در این تحقیق ارائه شده است. باکتری‌های مورد نظر به صورت کشت خالص و مخلوط برای مدت یک هفته در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت بوشنل‌هاوس ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ۲ گرم بر لیتر، CaCl_2 ۰/۰۲ گرم بر لیتر، KH_2PO_4 ۱ گرم بر لیتر، K_2HPO_4 ۱ گرم بر لیتر، NO_3NH_4 ۱ گرم بر لیتر، FeCl_3 ۰/۰۵ گرم بر لیتر) دارای ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسفالتین جدا شده از خاک آلوده به‌عنوان منبع کربن و انرژی و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۰۰ rpm انکوبه شدند، و پس از گذشت این زمان میزان رشدشان به‌وسیله اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد.

جدول ۱- باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده

منبع	شماره دسترسی	اسامی میکروارگانیسم‌ها
(Kalami and Pourbabaee, 2021)	MK453292	<i>Ochrobactrum anthropic</i>
(Kalami and Pourbabaee, 2021)	MK453291	<i>Microbacterium oxydans</i>
(Kalami and Pourbabaee, 2021)	MK493408	<i>Ochrobactrum lupine</i>
(Kalami and Pourbabaee, 2021)	MK453290	<i>Ochrobactrum lupine</i>
(Kalami and Pourbabaee, 2021)	MK493409	<i>Bacillus subtilis subspinaquosorum</i>
(Kalami and Pourbabaee, 2021)	MK493411	<i>Bacillus paralicheniformis</i>
(Shariati et al., 2021, 2023)	MN298858	<i>Pseudomonas Putida</i>
(Nikkhah et al., 2023)	OL759126	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
(Nikkhah et al., 2023)	OL759129	<i>Rhodococcus fascians</i>
(Korouzhdehi et al., 2018)	MF540569	<i>Bacillus pumilus strain BK111</i>
(Ehteshamzade, 2015)	unpublished	<i>Penicillium sp.</i>
(Martinez et al., 2004)	AY532141	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

⁵Soxhlet

ارزیابی توانایی میکروارگانیسم‌ها در تجزیه زیستی آسفالتین: در این مرحله باکتری و قارچ منتخب، به‌منظور بررسی توانایی آنها در حذف آسفالتین و میزان کربن بیومس تولیدی مورد ارزیابی قرار گرفتند. درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر، ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت بوشنل‌هاوس، ۱۰ میلی‌گرم عصاره گوشت و دو سطح از غلظت آسفالتین (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) با سه تکرار از هر غلظت اضافه شد، سپس درون هر ارلن ۱۰ درصد حجمی از باکتری‌ها که غلظتی برابر با نیم مک‌فارلند دارند، اضافه شد. نمونه‌ها برای مدت دو ماه در شرایط انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. میزان تجزیه آسفالتین و بیومس میکروبی به‌مدت دو ماه و ماهانه به روش وزنی اندازه‌گیری شد (Poddar et al., 2019).

سنجش میزان بیومس میکروبی: جهت سنجش میزان بیومس میکروبی قارچ و باکتری ابتدا محیط کشت با دور ۴۰۰۰ در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا و با رسوب آسفالتین باقیمانده و بیومس میکروبی، به رسوب باقیمانده آب مقطر استریل اضافه، و به‌خوبی هم زده شد. سپس از کاغذ صافی واتمن ۴۲ استفاده گردید. در این حالت آسفالتین تجزیه نشده بر روی کاغذ باقی می‌ماند. مایع عبور کرده از صافی دوباره سانتریفیوژ گردید، و آب رویی تخلیه شد و اجازه داده شد تا رسوب باقیمانده به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آون خشک شود. وزن رسوب باقیمانده به‌عنوان بیومس میکروبی در نظر گرفته شد (Rittmann and McCarty, 2001).

سنجش میزان آسفالتین باقیمانده: میزان تجزیه زیستی آسفالتین با روش IP 143 اندازه‌گیری گردید. در این روش آسفالتین‌ها را به‌طور جداگانه در حلال آلی هپتان نرمال حل و سپس محلول به‌دست آمده در شرایط خلاء صاف شد. رسوب به‌مدت ۲۴ ساعت در آون و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. با اندازه‌گیری وزن آسفالتین برجای مانده درصد تجزیه زیستی محاسبه گردید (Vazquez and Mansoori, 2000).

$$\%Y = B1 - B2 / B1 * 100$$

Y: درصد تجزیه‌پذیری آسفالتین، B1: وزن آسفالتین اضافه شده به محیط کشت و B2: وزن آسفالتین باقیمانده.

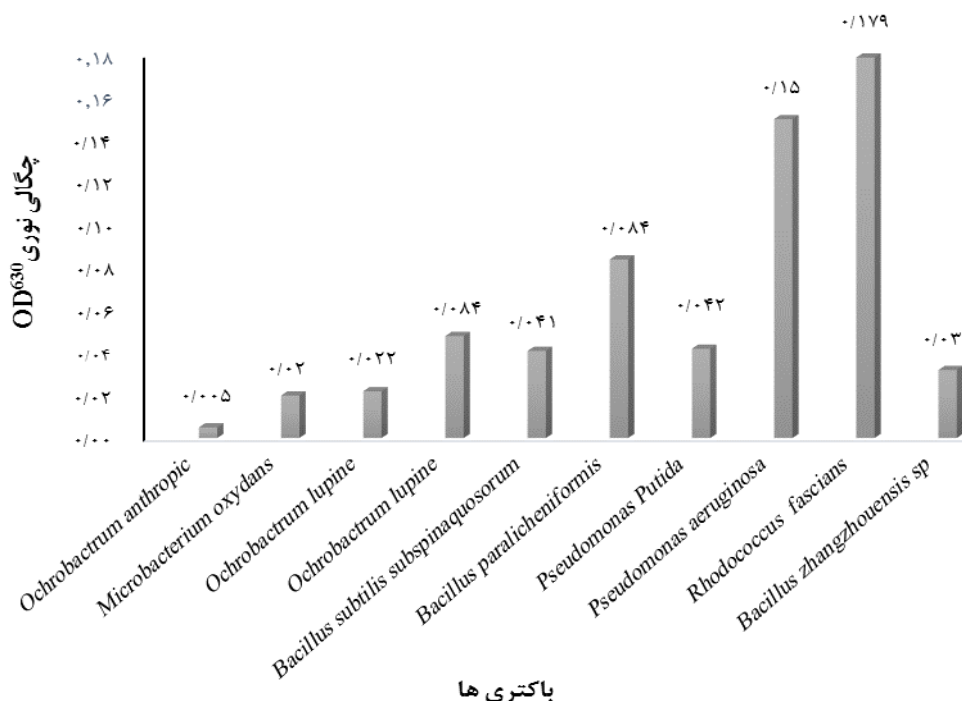
یافته‌های پژوهش و بحث

خصوصیات خاک و رسوب نفتی: نتایج آنالیز نمونه مخلوط خاک و رسوب محل تخلیه نفت نشان داد، درصد آلودگی نفتی و آسفالتین در این نمونه بالای ۶۰ درصد می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی رسوبات لوله‌های نفتی (محل تخلیه آسفالتین)

مقادیر	خصوصیات
۷/۸۱	pH عصاره اشباع
۳/۲۶	Ec عصاره اشباع (dS/m)
۰/۳۹۹	نیتروژن (%)
۲/۸۶	فسفر قابل جذب (mg/kg)
۶۳/۲۴	TPH (%)
۳۱/۲۵	آسفالتین (%)
۱/۱۶×۱۰ ^۵	جمعیت میکروبی (MPN/g)
لومی شنی	بافت خاک

انتخاب باکتری‌های توانمند در تجزیه آسفالتین: نتایج نشان داد باکتری مورد مطالعه، *Rhodococcus fascians* LMG3623، که از مناطق دارای آلودگی پساب‌های پلیمری تهیه شده بود در دوره رشدی ۷ روزه، چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به بقیه باکتری‌های مورد مطالعه که به‌صورت کشت خالص در محیط کشت بوشنل‌هاوس حاوی منبع کربنی آسفالتین و طول موج ۶۳۰ نانومتر بوده‌اند، داشته است. شکل ۱ میزان کدورت تولید شده توسط هر باکتری را در دوره ۳۰ روزه نشان می‌دهد. در بین قارچ‌ها نیز جنس *Penicillium* sp. به‌طور کیفی رشد بهتری داشت. سپس از باکتری *Rhodococcus fascians* LMG3623 و قارچ *Penicillium* sp. در مراحل بعدی استفاده شد.



شکل ۱- میزان رشد باکتری‌ها (OD₆₃₀) در حضور ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر آسفالتین

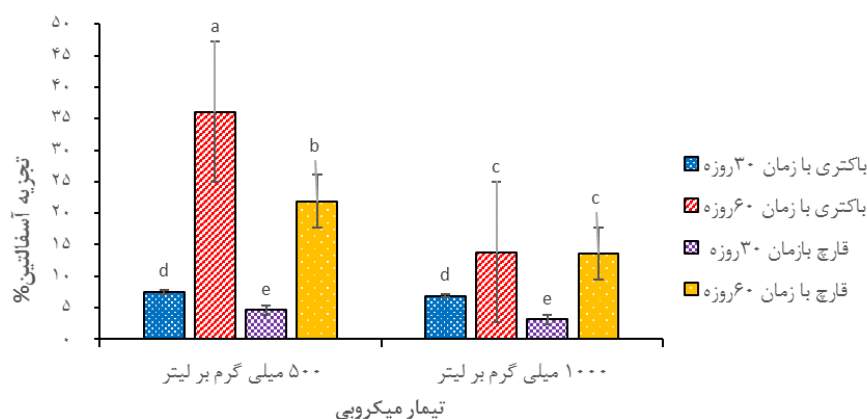
توانایی تجزیه آسفالتین توسط *Rhodococcus fascians* و *Penicillium sp.* در محیط مایع: باتوجه به جدول تجزیه واریانس، میانگین مربعات بیومس میکروبی و تجزیه شدن آسفالتین در تیمار میکروب، زمان و میکروب در زمان در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار شده است (جدول ۳). بررسی تجزیه زیستی آسفالتین در محیط مایع توسط سویه باکتری *Rhodococcus fascians* LMG3623 و قارچ *Penicillium sp.* در دوره ۶۰ روزه نشان داد، بهترین تیمار مربوط به باکتری رودوکوکوس با غلظت آسفالتین ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر و با دوره انکوباسیون ۶۰ روزه است. همچنین نتایج نشان داد بیشترین میزان تجزیه-کنندگی آسفالتین ۳۶ درصد و معادل (۱۸۰ میلی گرم از ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آسفالتین اولیه) است. این تیمار توانسته (۹/۸ میلی گرم بر میلی لیتر) بیومس میکروبی را در طی دوره دو ماهه تولید کند، که به ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ و جدول ۴ قابل مشاهده است. Gao و همکاران (۲۰۱۷) بیان داشتند تنها چند نوع از میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه زیستی این ترکیبات پیچیده تکامل یافته‌اند هرچند که این عمل را با سرعت پایینی انجام دهند. این محققین گزارش کردند دو سویه باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* توانستند ۱۰ درصد از آسفالتین خالص را در مدت ۶۰ روز تجزیه کنند. Muangchinda و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند علی‌رغم کند رشد بودن باکتری رودوکوکوس توانایی متابولیکی قدرتمندی دارد و جزء اولین کلنی‌هایی هستند که توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی خاک آلوده را دارند. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Jahromi و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، تجزیه زیستی آسفالتین در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ماه در شرایط ثابت و متحرک توسط چهار کنسرسیوم میکروبی بررسی شد، که بیشترین تخریب توسط کنسرسیوم گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas fluorescens* با ۳۲ درصد بود. در این مطالعه تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده آسفالتین در طول آزمایش با افزایش غلظت آسفالتین افزایش می‌یابد در صورتی که این تحقیق نتیجه‌ای عکس را نشان داد و با افزایش غلظت اولیه آسفالتین به دلیل سمیت بالای آن میزان تجزیه‌کنندگی آسفالتین کاهش یافت. این مغایرت در نتایج به دست آمده ممکن است به دلیل تفاوت در نوع ساختار آسفالتین مورد استفاده باشد. Irajی و Ayatollahi (۲۰۱۹) نشان دادند استفاده از سورفاکتانت موجب افزایش تجزیه آسفالتین تا ۴۹ درصد در حضور باکتری‌های *Enterobacter cloacae* و *Pseudomonas aeruginosa* طی ۱۰ روز می‌شود. اگرچه استفاده از سورفاکتانت با افزایش درجه زاویه تماس باکتری با مواد تجزیه‌شونده می‌تواند سبب افزایش درصد تجزیه‌پذیری شوند اما با اثرات مخرب محیط‌زیستی نیز همراه است. بنابراین استفاده از سویه‌های میکروبی با توانایی تولید سورفاکتانت زیستی

ترجیح داده می‌شوند. Wei و همکاران (۲۰۲۳) باکتری *Pseudomonas stutzeri* با توانایی تجزیه آسفالتین را از شیل نفتی جداسازی کردند. این باکتری توانست ۴۹ درصد از بخش آسفالتین نفت خام (۷۵ گرم/لیتر) را در محیط کشت معدنی به مدت ۱۴ روز تجزیه نماید. Das و همکاران (۲۰۲۳) گونه‌های *باسیلوس* با توانایی تجزیه آسفالتین را از خاک آلوده به نفت آسام هند جداسازی کردند. *B. thuringiensis* SSL1 و *B. cereus* SSL3 توانستند ۷۶/۴ و ۶۷/۴ درصد از آسفالتین را تجزیه کنند. درصد خلوص آسفالتین مورد آزمایش در میزان تجزیه‌پذیری اثر گذار خواهد بود (Nzila and musa, 2021). اکثر مطالعات انجام شده در مخلوطی از ترکیبات مختلف انجام می‌شود بنابراین رمز گشایی تخریب تقریباً غیر ممکن خواهد بود و تنها زمانی که نمونه آسفالتین و رزین کاملاً مشخص باشد به توسعه رویکردهای عالی برای درک بهتر مکانیسم مولکولی کمک خواهد کرد. با توجه به شرایط متفاوت حاکم بر آزمایش ارزیابی مقایسه‌ای دشوار خواهد بود ولی به نظر می‌رسد دلیل اصلی تخریب آهسته آسفالتین ماهیت آبریزی آن و محدودیت‌های انتقال جرم ناشی از آن است.

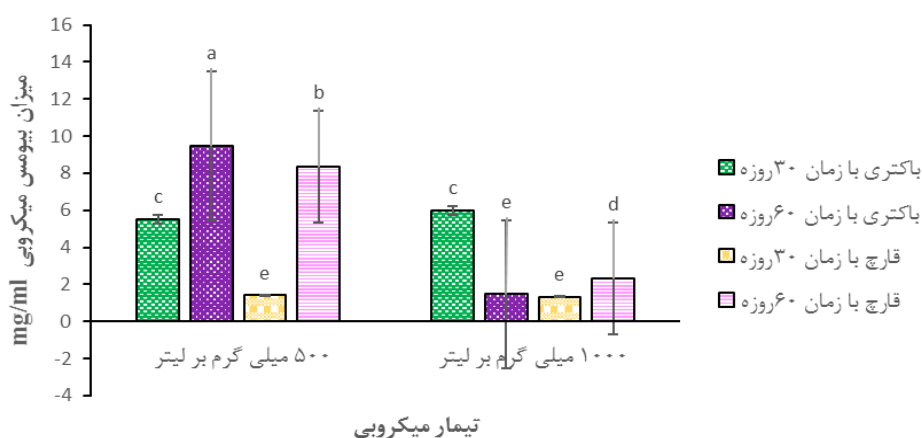
جدول ۳- تجزیه واریانس (ANOVA) دوطرفه بررسی میزان تجزیه‌کنندگی آسفالتین و بیومس میکروبی تولید شده در محیط مایع

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات میزان بیومس میکروبی	میانگین مربعات تجزیه شدن آسفالتین
میکروب	۳	۰/۰۰۰۳۳۸۴**	۲۱۰/۷۰۲۲۲۳**
زمان	۱	۰/۰۰۰۱۹۸۴**	۱۴۹۲/۳۹۳۹۵۹**
زمان×میکروب	۳	۰/۰۰۰۳۵۸۳**	۱۳۵/۸۶۳۹۸۷**
خطا	۱۶	۰/۰۰۰۰۰۱۸	۱/۴۳۷۱۴۷
کل	۲۳	–	–
ضریب تغییرات	–	۹/۴۵۴۳۷۶	۸/۹۰۷۷۰۹

**معنی‌داری در سطح ۵ درصد

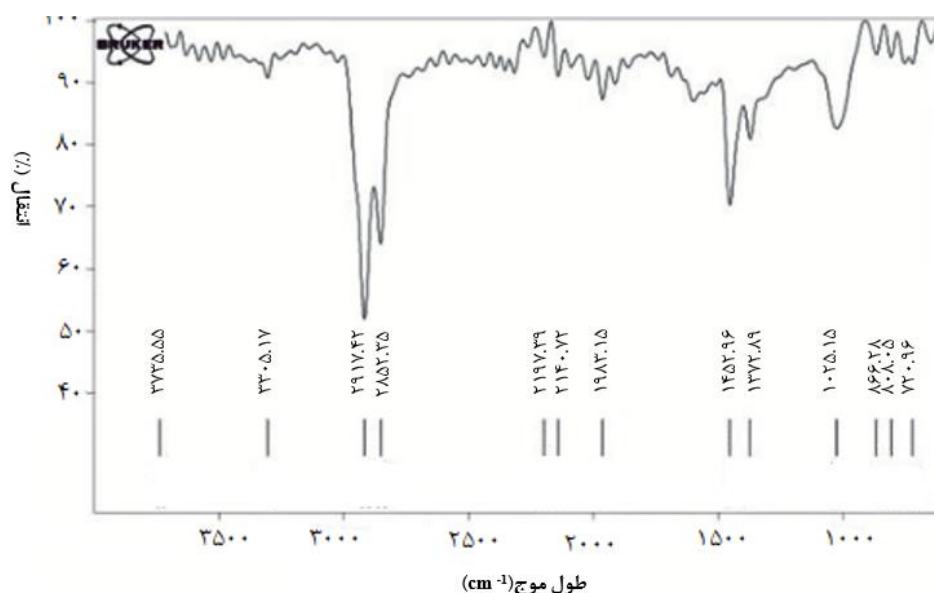


شکل ۲- تجزیه آسفالتین توسط گونه‌های میکروبی در دوره ۶۰ روزه در شرایط انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

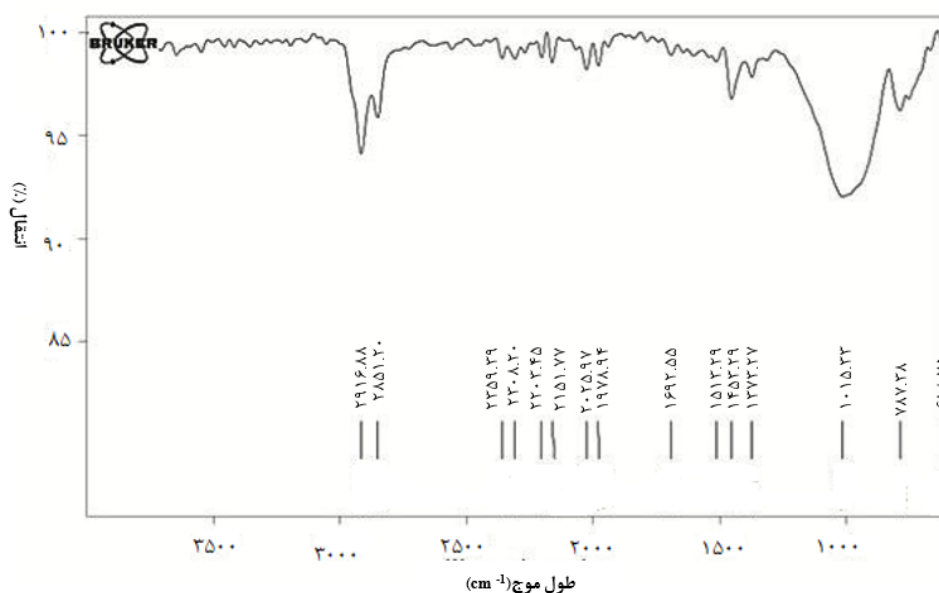


شکل ۳- میزان بیومس میکروبی گونه‌های میکروبی در دوره ۶۰ روزه در شرایط انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

تحلیل نتایج FTIR آسفالتین تیمار شده: جهت تأیید نتایج به دست آمده از سنجش وزنی زیست تخریب پذیری آسفالتین آنالیز FTIR انجام شد. در شکل های ۵ و ۶ نتایج تجزیه و تحلیل FTIR بر روی آسفالتین تجزیه نشده و تجزیه شده پس از دو ماه توسط باکتری *Rhodococcus fascians* LMG3623 در محیط مایع را نشان داده شد، قله ۲۸۵۲/۳۵ و ۲۹۱۷/۴۲ قله مربوط به کشش C-H در گروه آلکان هاست که در طی فرآیند تجزیه زیستی توسط باکتری مورد حمله قرار گرفته است و تا حدی تجزیه شده است. قله های ۲۱۹۷/۳۹ و ۲۱۴۰/۷۲ مربوط به گروه عاملی آلکین $C\equiv C$ است که پس از تجزیه زیستی تغییرات متمایزی را به وجود آورده و تبدیل به گروه فسفری شده است، که در واقع نشان دهنده این است که باکتری ها قادرند پیوندهای سخت ساختارهای ماکرومولکولی را با ترکیبات ساده تر فسفیدی جایگزین کنند. قله بعدی در محدوده ۱۹۶۳/۱۵ قرار دارد که مربوط به گروه عاملی آلکن هاست ($C=C$) که پس از تجزیه به گروه های آلینی و کتونی تبدیل شده است. قله های ۱۴۵۲/۹۶ و ۱۳۷۲/۸۹ مربوط به گروه آلکان هاست که پس از تجزیه با گروه های اکسیژن دار جایگزین شده و نشان دهنده تغییرات اکسیداتیو ساختارهای ماکرومولکولی توسط باکتری هاست. در نهایت گروه عاملی ۱۰۲۵/۵، ۸۰۸/۰۵ و ۷۲۰/۹۶ مربوط به گروه عاملی آروماتیک هاست که پس از تجزیه به صورت گروه آمینی نشان داده شده است. نتایج به دست آمده این تحقیق همسو با نتایج Shahebrahimi و همکاران (۲۰۱۸) است.



شکل ۵- گراف مربوط به آسفالتین قبل از دوره آنکوباسیون ۶۰ روزه



شکل ۶- گراف مربوط به آسفالتین بعد از دوره آنکوباسیون ۶۰ روزه

بررسی توانایی باکتری رودوکوکوس در تجزیه زیستی ترکیبات نفتی و آسفالتین: در جدول‌های ۴ و ۵ توانایی باکتری *Rhodococcus* در زمینه تجزیه زیستی ترکیبات نفتی و آسفالتین را در چند پژوهش مورد بررسی قرار داده است. بررسی پژوهش‌ها نشان داد باکتری رودوکوکوس توانایی خوبی در حذف ترکیبات مختلف نفتی دارد (Aislabie et al., 2006). اعضای جنس *Rhodococcus* به عنوان یک گروه هیدروکربنوکلاستیک عالی شناخته می‌شود (Táncsics et al., 2015). آلکان هیدروکسیلازهای مرتبط با AlkB که آنزیم‌های آهن غیر هم‌غشایی هستند نقش کلیدی در تخریب میکروبی بسیاری از هیدروکربن‌ها را دارند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی ژن AlkB نشان داد که نوع خاصی از ژن AlkB در تمام اعضای جنس *Rhodococcus* وجود دارد. با توجه به قابلیت‌هایی که برای این جنس از باکتری در حذف ترکیبات سخت ارائه شده است و اینکه اکثر مطالعات انجام شده در زمینه تجزیه پذیری TPH و سایر ترکیبات نفتی به جز آسفالتین بوده است در این مطالعه به بررسی توانایی باکتری *Rhodococcus fascians* LMG3623 در حذف سخت‌ترین و پیچیده‌ترین بخش نفت پرداخته شد.

جدول ۴- مطالعات انجام شده برای بررسی توانایی باکتری رودوکوکوس در تجزیه زیستی ترکیبات نفتی

منبع	تجزیه %	آلاینده	شرایط آزمایش	باکتری
Pacheco et al., 2010	۴۰	TPH	۳۰ روز	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Egorova et al., 2017	۱۰	HCH	۱۴ روز	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> Ch628
Parach et al., 2017	۴۹	TPH	۷ روز	<i>Rhodococcus ruber</i> KE1
Roslee et al., 2020	۳۰	TPH	۲ روز	<i>Rhodococcus</i> sp. AQ5-07

جدول ۵- مقایسه مطالعات تجزیه زیستی آسفالتین

منبع	تجزیه آسفالتین %	شرایط آزمایش	باکتری
Asadollahi et al., 2016	۴۰	۶۰ روز	<i>Bacillus cereus</i>
Gao et al., 2017	۱۰	۶۰ روز	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (FX GX)
Ayatollahei et al., 2018	۴۹	۱۰ روز در حضور سورفکتانت	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Kshirsagar et al., 2020	۳۰	۱۵ روز	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
Chand et al., 2022	۱۲	۹۰ روز	<i>Rhodococcus ruber</i> , <i>Bacillus</i> sp. and <i>Bacillus cereus</i>
Wei et al., 2023	۴۹	۱۴ روز	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
Das et al., 2023	۶۷ و ۶۷	۱۵ روز	<i>Bacillus thuringiensis</i> SSL1 and <i>Bacillus cereus</i> SSL3
این پژوهش	۳۶	۶۰ روز	<i>Rhodococcus fascians</i> LMG3623

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر با توجه به سخت تجزیه‌پذیری آسفالتین نتایج نشان داد سویه بومی باکتری *Rhodococcus fascians* LMG3623 توانایی بهتری در تجزیه آسفالتین در محیط مایع را دارد. بیشترین میزان تجزیه زیستی آسفالتین در محیط مایع مربوط به تیمار با غلظت آسفالتین ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر و زمان ۶۰ روزه است که توانسته است ۳۶ درصد از آسفالتین اولیه را تجزیه کند. همچنین معادل ۹/۸ میلی گرم بر میلی لیتر کربن بیومس میکروبی را تولید کند. نتایج بررسی تجزیه آسفالتین توسط باکتری *Rhodococcus fascians* LMG3623 با FTIR نشان داد، این سویه توانست گروه‌های مختلف موجود در آسفالتین را تجزیه و به گروه‌های ثانویه تبدیل نماید. از یافته‌های این پژوهش در زمینه افزایش تجزیه زیستی ترکیبات سخت تجزیه‌پذیر آسفالتین می‌توان دریافت ارزش بررسی در محیط‌های رسوبی کنترل شده را دارد و همچنین در پژوهش‌های بعدی پیشنهاد می‌گردد با تغییر شرایط آزمایش و هم‌افزایی سویه با سایر سویه‌های بومی در غالب کنسرسیوم‌های میکروبی، درصد بالاتر تجزیه ترکیبات آسفالتین مورد آزمون قرار گیرد.

References

- Adams, J.J., 2014. Asphaltene adsorption, a literature review. *Energy & Fuels* 28(5), 2831-2856.
- Aislabie, J., Saul, D.J., Foght, J.M., 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10(3), 171-179.
- Asadollahi, L., Salehizadeh, H., Yan, N., 2016. Investigation of biosurfactant activity and asphaltene biodegradation by *Bacillus cereus*. *Journal of Polymers and the Environment* 24(2), 119-128.
- Chand, P., Dutta, S., Mukherji, S., 2022. Slurry phase biodegradation of heavy oily sludge and evidence of asphaltene biotransformation. *Journal of Environmental Management* 324, 116315.
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International* 941810, 1-13.
- Das, S., Das, N., Choure, K., Pandey, P., 2023. Biodegradation of asphaltene by lipopeptide-biosurfactant producing hydrocarbonoclastic, crude oil degrading *Bacillus* spp. *Bioresource Technology* 382, 129198.
- Davoodi, S.M., Miri, S., Taheran, M., Brar, S.K., Galvez-Cloutier, R., Martel, R., 2020. Bioremediation of unconventional oil contaminated ecosystems under natural and assisted conditions: a review. *Environmental Science & Technology* 54(4), 2054-2067.
- Egorova, D.O., Buzmakov, S.A., Nazarova, E.A., Andreev, D.N., Demakov, V.A., Plotnikova, E.G., 2017. Bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil by the new *Rhodococcus wratislaviensis* strain Ch628. *Water, Air, & Soil Pollution* 228, 1-16.
- Ehteshamzadeh, M., 2015. Study of bioleaching of sulfide ores using saprophytic fungi. Master's thesis, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. (In Persian)
- Gao, H., Zhang, J., Lai, H., Xue, Q., 2017. Degradation of asphaltenes by two *Pseudomonas aeruginosa* strains and their effects on physicochemical properties of crude oil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 122, 12-22.
- García-Sánchez, M., Košnář, Z., Mercl, F., Aranda, E., Tlustoš, P., 2018. A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 165-174.
- Gaur, N., Narasimhulu, K., PydiSetty, Y., 2018. Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. *Journal of Cleaner Production* 198, 1602-1631.
- Hosseini-Dastgerdi, Z., Tabatabaei-Nejad, S. A. R., Sahraei, E., Nowroozi, H., 2015b. Morphology and size distribution characterization of precipitated asphaltene from live oil during pressure depletion. *Journal of Dispersion Science and Technology* 36(3), 363-368.
- Hosseini-Dastgerdi, Z., Tabatabaei-Nejad, S.A.R., Khodapanah, E., Sahraei, E., 2015a. A comprehensive study on mechanism of formation and techniques to diagnose asphaltene structure; molecular and aggregates: a review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 10(1), 1-14.
- Hou, Z., Mo, F., Zhou, Q., 2023. Elucidating response mechanisms at the metabolic scale of *Eisenia fetida* in typical oil pollution sites: A native driver in influencing carbon flow. *Environmental Pollution*, 337, 122545.
- Iraji, S., Ayatollahi, S., 2019. Experimental investigation on asphaltene biodegradability using microorganism: cell surface properties' approach. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology* 9(2), 1413-1422.
- Jahromi, H., Fazelipour, M. H., Ayatollahi, S., Niazi, A., 2014. Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. *Fuel* 117, 230-235.
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution* 133(1), 71-84.
- Kalami, R., Pourbabae, A.A., 2021. Investigating the potential of bioremediation in aged oil-polluted hypersaline soils in the south oilfields of Iran. *Environmental Monitoring and Assessment* 193(8), 517.
- Koohkan, H., Mortazavi, M.S., Golchin, A., Saraji, F., Akbarzadeh-Chomachaei, G., 2023. Comparison of Native Bacterial and Fungal Bioaugmentation in the Removal of Petroleum from Soil in the Presence of Sorghum. *Water, Air, & Soil Pollution* 234(5), 309.

- Korouzhdehi, B., Abbasi, A.R., Bahreini, M., Pourbabaee, A.A., Sharif Moghadam, M.R., 2018. Isolation and recognition of keratinolytic bacteria strains based on their biochemical and molecular properties. *Modern Genetics Journal* 12(4), 535-546. (In Persian)
- Kshirsagar, S.D., Mattam, A.J., Jose, S., Ramachandrarao, B., Velankar, H.R., 2020. Heavy hydrocarbons as selective substrates for isolation of asphaltene degraders: A substrate-based bacterial isolation strategy for petroleum hydrocarbon biodegradation. *Environmental Technology & Innovation* 19, 100832.
- Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D.S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F. Coutinho, P.M., 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature biotechnology* 22(6), 695-700.
- Muangchinda, C., Chavanich, S., Viyakarn, V., Watanabe, K., Imura, S., Vangnai, A.S., Pinyakong, O., 2015. Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station. *Environmental Science and Pollution Research* 22(6), 4725-4735
- Navas-Cáceres, O.D., Parada, M., Zafra, G., 2023. Development of a highly tolerant bacterial consortium for asphaltene biodegradation in soils. *Environmental Science and Pollution Research* 30(59), 123439-123451.
- Nikkhah, M., Pourbabaee A.A., Shariati, S., Shakiba, M., 2023. The rhizospheric soil of *Sparganium erectum* L. plant: A new source of efficient bacteria for Azo dye decolorization. *Pollution* 9(1), 107-125.
- Nzila, A., Musa, M.M., 2021. Current Knowledge and Future Challenges on Bacterial Degradation of the Highly Complex Petroleum Products Asphaltenes and Resins. *Frontiers in Environmental Science* 554.
- Oscar D., Mayra P., German Z., 2023. Development of a highly tolerant bacterial consortium for asphaltene biodegradation in soils. *Environmental Science and Pollution Research* 30, 123439-123451.
- Pacheco, G.J., Ciapina, E.M.P., Gomes, E.D.B., Pereira Junior, N., 2010. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 685-693.
- Parach, A., Rezvani, A., Assadi, M.M., Akbari-Adergani, B., 2017. Biodegradation of heavy crude oil using Persian Gulf autochthonous bacterium. *International Journal of Environmental Research* 11, 667-675.
- Poddar, K., Sarkar D., Sarkar A., 2019. Construction of potential bacterial consortia for efficient hydrocarbon degradation. *International. Biodeterioration and Biodegradation* 144, 104770.
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L. 2001. *Environmental biotechnology: principles and applications*. McGraw-Hill Education.
- Roslee, A.F.A., Zakaria, N.N., Convey, P., Zulkharnain, A., Lee, G.L.Y., Gomez-Fuentes, C., Ahmad, S.A., 2020. Statistical optimisation of growth conditions and diesel degradation by the Antarctic bacterium, *Rhodococcus* sp. strain AQ5-07. *Extremophiles* 24, 277-291.
- Shah, G., Soni, V., 2024. Comprehensive Insights into the Impact of Oil Pollution on the Environment. *Regional Studies in Marine Science* 74, 103516.
- Shahebrahimi, Y., Fazlali, A., Motamedi, H., Kord, S., 2018. Experimental and modeling study on precipitated asphaltene biodegradation process using isolated indigenous bacteria. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 17064-17075
- Shariati, S., Pourbabaee, A.A., Alikhani, H.A., 2023. Biodegradation of diethyl phthalate and phthalic acid by a new indigenous *Pseudomonas putida*. *Folia Microbiologica* 68 (3), 477-488.
- Shariati, S., Pourbabaee, A.A., Alikhani, H.A., Rezaei, K.A., 2021. Biodegradation of DEHP by a new native consortium An6 (*Gordonia* sp. and *Pseudomonas* sp.) adapted with phthalates, isolated from a natural strongly polluted wetland. *Environmental Technology & Innovation* 24, 101936.
- Standard, A.S.T.M., 2012. *Standard Test Method for Determination of Asphaltenes (Heptane Insolubles) in Crude Petroleum and Petroleum Products*.
- Su, H., Lin, J., Wang, Q., 2021. A clean production process on oily sludge with a novel collaborative process via integrating multiple approaches. *Journal of Cleaner Production* 322, 128983.

- Táncsics, A., Benedek, T., Szoboszlay, S., Veres, P.G., Farkas, M., Máthé, I., Marialigeti, K., Kukolya, J., Lanyi, S., Kriszt, B., 2015. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. *Systematic and applied microbiology* 38(1), 1-7.
- Tavakkoli, M., Chen, A., Vargas, F.M., 2016. Rethinking the modeling approach for asphaltene precipitation using the PC-SAFT Equation of State. *Fluid Phase Equilibria* 416, 120-129.
- Vazquez, D., Mansoori, G.A., 2000. Identification and measurement of petroleum precipitates. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 26(1-4), 49-55.
- Wei, F., Xu, R., Rao, Q., Zhang, S., Ma, Z., Ma, Y., 2023. Biodegradation of asphaltenes by an indigenous bioemulsifier-producing *Pseudomonas stutzeri* YWX-1 from shale oil in the Ordos Basin: Biochemical characterization and complete genome analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 251, 114551.
- Zeynali, K., Shariati, S., Pourbabaee, A.A., 2024. 'The role of effective oil-eating bacteria in the remediation of oil-contaminated soils (Case study: *Bacillus* genus). *Journal of Sol Biology* 12 (1), 105-139. (In Persian)