

بهبود تجزیه زیستی آلاینده هیدروکربنی بنزوپیرن با استفاده از دسته‌باکتریایی تولید کننده

سورفاکتانت زیستی

سحر سلیمانی^۱ - امیرلکزیان^{۲*} - امیر فتوت^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۲۷

چکیده

طی سال‌های اخیر استفاده از ریزجانداران خاکری جهت کاهش اثرات مخرب آلاینده‌های زیست‌محیطی همانند نفت و مشتقات آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تجزیه‌پذیری و در نتیجه ماندگاری ترکیبات هیدروکربنی در طبیعت، تحت تأثیر عواملی مختلفی است که مهمترین آن‌ها شامل شرایط محیطی، فعالیت تجزیه‌کنندگی ریزجانداران، نوع آلاینده و میزان دسترسی زیستی آلاینده برای ریزجانداران می‌باشد. عوامل فعال سطحی یا سورفاکتانت‌ها موجب افزایش تحرک و تجزیه زیستی ترکیبات هیدروفوب شده و بنابراین دارای اثر مثبت بر فرآیند زیست‌پالایی است. از سوی دیگر، علی‌رغم آن که تجزیه زیستی هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک فرآیندی بالقوه و طبیعی است، اما ترکیبات چند جزئی و هیدروکربن‌هایی با وزن مولکولی بالا، جهت تجزیه به بیش از یک گونه میکروبی کارآمد نیاز دارند. در بررسی حاضر با استفاده از روش‌های جداسازی و غربالگری، جدایه‌های توانمند تجزیه‌کننده آلاینده بنزوپیرن (به عنوان منبع کربنی) و تولید کننده سورفاکتانت زیستی، انتخاب و توانایی جدایه‌های منفرد و دسته‌باکتریایی^۴ حاصل از آن‌ها بر میزان تجزیه آلاینده در دو محیط محلول و خاک با هم مقایسه شد. نتایج نشان داد که از میان جدایه‌های حاصل از مرحله جداسازی، دو جدایه AP₃ و BM₁ به ترتیب با ۴۳ و ۴۰ درصد کاهش میزان کشتش سطحی محیط کشت نسبت به شاهد (فاقد تلقیح جدایه) دارای توانایی تولید سورفاکتانت زیستی بودند. بهینه‌سازی شرایط تولید سورفاکتانت زیستی حاکی از آن بود که جدایه‌های یاد شده در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷ و در حضور قند گلوکز به عنوان منبع کربنی سهل‌الوصول بیشترین میزان تولید سورفاکتانت زیستی را نشان داده و در مقایسه با شاهد (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۶ و قند گلوکز با کشتش سطحی ۵۶/۴۲ میلی‌نیوتن بر متر) کشتش سطحی کمتری (۳۰/۸۱ و ۳۱/۵۲ میلی‌نیوتن بر متر به ترتیب در جدایه‌های AP₃ و BM₁) را ایجاد نمودند. تجزیه آلاینده بنزوپیرن در محیط محلول توسط دو جدایه و دسته‌باکتریایی حاصل از آن نشان داد که بیشترین میزان تجزیه در تیمار تلقیح شده با دسته‌باکتریایی و در حضور سورفاکتانت زیستی استخراج شده از جدایه AP₃ رخ داد. این تیمار سبب تجزیه ۸۷/۳ درصد از آلاینده طی دو هفته شد. در حالی که جدایه BM₁ با ۲۷/۶ درصد تجزیه آلاینده، کمترین اثر را بر تجزیه بنزوپیرن در محیط محلول داشت. مقایسه تجزیه بنزوپیرن در خاک نیز مشخص کرد که تأثیر دسته‌باکتریایی بیشتر از جدایه AP₃ به تنهایی می‌باشد. بطوری که در انتهای ۴۵ روز، غلظت آلاینده در تیمار حاوی دسته‌جات و سورفاکتانت زیستی صفر و در تیمار تلقیح شده با جدایه AP₃ از ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسید. نتایج نشان داد که بعد از ۴۵ روز، جدایه AP₃ آلاینده را به میزان ۶۸ درصد و دسته‌باکتریایی آلاینده را بطور کامل تجزیه نمودند.

واژه‌های کلیدی: بنزوپیرن، تجزیه زیستی، سورفاکتانت زیستی، هیدروکربن

مقدمه

زیست، طی سال‌های اخیر افزایش یافته است. بنزوپیرن، یک هیدروکربن آروماتیک پنج حلقه‌ای با وزن مولکولی بالاست که علاوه بر حضور در انواع زباله‌های شهری، صنعتی و پتروشیمی، در نتیجه احتراق ناقص ترکیبات آلی، استعمال دخانیات، تصادفات کشتی‌های حمل سوخت، نشت نفت از مخازن ذخیره‌سازی، انتشار انواع مواد روان‌کننده و ضایعات روغنی تولید شده در صنایع جانبی (همانند پلاستیک‌سازی، تولید حلال‌ها و لوازم آرایشی) نیز تولید می‌شود (۱۸، ۲۱ و ۲۲). حضور در تمامی اجزای محیط زیست بخصوص (خاک، آب و هوا)، مقاومت در برابر تجزیه، توانایی بالقوه جهت تجمع زیستی به همراه خصوصیت سرطان‌زایی این ترکیب، سبب شده است

نگرانی‌های مربوط به آلودگی‌های خاک و آب توسط نفت و محصولات جانبی آن، به عنوان یکی از آلاینده‌های اصلی محیط

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری بیولوژی و استادان گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*- نویسنده مسئول: (Email: alakzian@yahoo.com)

DOI: 10.22067/jsw.v0i0.79076

4- Consortium

که محققان به دنبال راهی جهت حذف و پاکسازی آن از محیط باشند.

توانایی ریزجانداران خاک خصوصاً انواع هتروتروف در تجزیه ترکیبات سمی و آلاینده‌ها، سبب ایجاد راهکار جدیدی در فرآیند پاکسازی آلودگی‌های زیست محیطی شده است که به نام زیست پالایی شناخته شده و سبب تبدیل ترکیبات خطرناک به اشکال کم-خطر و یا بی‌خطر می‌شود (۴۲). بررسی‌های مختلف، توانایی گونه‌های باکتریایی همانند *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* (۱۰، ۲۱ و ۲۲)، *Bordetella*، *Sphingomonas* sp.، *Rhodococcus* sp. (۱۳)، *Acidovorax* sp. (۳)، *Alcaligenes*، *Microbacterium* sp.، *Novosphingobium* sp.، *Achromobacter* sp. (۴۳)، *Mycobacterium* sp.، *P. Alcaligenes denitrificans* (۱۶)، *Novosphingobium putida* و *Burkholderia cepacia*، *Flavobacterium* sp.، *fluorescens* (۱۹) را در استفاده از آلاینده‌های هیدروکربنی به عنوان منبع کربن و تجزیه آن‌ها به اثبات رسانده‌اند.

علی‌رغم آنکه تجزیه زیستی هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک نشان دهنده فرآیندهای بالقوه و طبیعی است که سبب تبدیل این ترکیبات به اجزای ساده‌تر و غیر سمی در محیط می‌شود، اما ترکیبات چند جزئی و هیدروکربن‌هایی با وزن مولکولی بالا، جهت تجزیه به بیش از یک گونه میکروبی کارآمد نیاز دارند. در واقع به نظر می‌رسد مخلوطی از جدایه‌ها دارای سازگاری و انعطاف متابولیکی بهتری نسبت به جدایه‌های منفرد می‌باشند. براساس یافته‌های اخیر، دسته‌جات باکتریایی در تجزیه ترکیبات پیچیده هیدروکربنی کارآمدتر از جدایه‌های منفرد می‌باشند (۱، ۲، ۱۴، ۲۹، ۳۰، ۳۵ و ۳۷). به عبارت دیگر، با استفاده از دسته‌باکتریایی، یک گونه با تولید متابولیت سبب حذف و یا تغییر شکل ترکیبات سمی شده و امکان عمل مؤثرتر را برای سایر گونه‌ها فراهم می‌کند. دوت و همکاران (۱۲) با استفاده از چهار جدایه متعلق به گونه‌های *Pseudomonas*، *Bacillus* و همچنین دسته-باکتریایی حاصل از آن‌ها، میزان تجزیه لجن نفتی (شامل ۲۰ درصد ترکیبات آلیفاتیک، ۴۳ درصد اجزای آروماتیک، ۱۳ درصد ترکیبات حاوی نیتروژن و گوگرد و ۲۳ درصد مشتقات آسفالتن) را بررسی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که دسته‌باکتریایی حاصل از جدایه‌ها ۸۹ درصد از محتوای آروماتیک لجن نفتی را تجزیه نمودند. درحالی‌که میزان عملکرد جدایه‌های منفرد در بهترین حالت ۷۰ درصد بود. نتایج این بررسی ثابت کرد که جدایه‌های منفرد توانایی تجزیه تمامی اجزای آروماتیک موجود در لجن نفتی را ندارند. باوجود اینکه جدایه‌های خاص بطور متفاوتی بر روی ترکیبات هیدروکربنی پلی‌آروماتیک (۳ تا ۵ حلقه‌ای) عمل می‌کنند، لکن، دسته‌باکتریایی در این زمینه بسیار موفقتر عمل می‌نمایند. ساتیشکومار و همکاران (۳۷) عنوان نمودند که کاربرد دسته‌باکتریایی حاصل از جدایه‌های

استفاده از جدایه‌های منفرد اثر بیشتری بر تجزیه دارد. باکوسا و همکاران (۱ و ۲) نیز تأثیرگذاری بیشتر دسته‌باکتریایی را بر تجزیه کروژن و نفت خام را گزارش نمودند.

یکی از عوامل محدودکننده تجزیه زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای دسترسی زیستی این ترکیبات می‌باشد. در واقع انحلال کم این آلاینده‌ها منجر به استفاده از باکتری‌های مولد سورفاکتانت زیستی به منظور افزایش انحلال و در نتیجه تجزیه زیستی آن‌ها شده است. ویژگی‌های خاص این مولکول‌های دوگانه دوست متأثر از دو انتهای آبدوست و آبگریز موجود در ساختار مولکولی این ترکیبات است (۹). این ویژگی سبب شده که این ترکیبات با کاهش کشش سطحی و بین سطحی مایعات و تشکیل میکروامولسیون موجب افزایش حلالیت و دسترسی زیستی آلاینده و در نتیجه بهبود تجزیه زیستی آن شوند (۱۱). *Pseudomonas* sp. (۳۸، ۸، ۳۱)، *Pseudomonas aeruginosa* (۳۳، ۱۵ و ۲۳)، *Bacillus subtilis* (۳۴، ۲۴، ۲۵ و ۲۸)، *stentrophomonas* sp. (۲۰)، *Paenibacillus dendritiformis* (۵)، *Bacillus circulans* (۱۱) و *Brevibacillus* sp. (۳۹) از جمله باکتری‌هایی می‌باشند که با تولید سورفاکتانت زیستی سبب افزایش تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی شده‌اند. استفاده از دسته‌باکتریایی که دارای یک جز تولید کننده سورفاکتانت زیستی و جز یا اجزای تجزیه کننده ترکیبات هیدروکربنی می‌باشند، روش مناسب و مقرون به صرفه‌ای در فرآیندهای زیست‌پالایی است (۴ و ۴۵). در واقع، جدایه‌های تولید کننده سورفاکتانت زیستی با دو مکانیسم بهبود دسترسی زیستی و تحرک آلاینده‌ها (از طریق کاهش کشش سطحی و بین سطحی) و افزایش هیدروفوبیسیته سطحی سلول باکتری، سبب افزایش انحلال آلاینده نامحلول شده و آن‌را در دسترس جدایه‌های تجزیه کننده قرار می‌دهد. این فرآیند در نهایت موجب افزایش میزان تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی می‌شود (۱۲ و ۳۲).

ایران به عنوان یکی از قطب‌های اصلی تولید کننده نفت و مشتقات آن، همواره در معرض خطرات ناشی از آلودگی‌های منابع آب و خاک قرار دارد. علی‌رغم وجود گزارشات مختلف در زمینه تأثیر بیوسورفاکتانت و دسته‌جات باکتریایی بر تجزیه هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای همانند نفتالن، آنتراسن، کروژن و فنانترن، مطالعات مربوط به تجزیه زیستی بنزوپیرن توسط استفاده همزمان از بیوسورفاکتانت و دسته‌باکتریایی بسیار اندک است. از سوی دیگر تاکنون تأثیر جدایه‌های بومی کشور و توانایی انواع مولد سورفاکتانت بر تجزیه این ترکیب بررسی نشده است. در مطالعه حاضر، توانایی دسته‌باکتریایی بومی شامل جدایه تجزیه کننده بنزوپیرن و جدایه مولد سورفاکتانت زیستی بر تجزیه زیستی هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای بنزوپیرن در دو محیط محلول و خاک بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده بنزوپیرن: به منظور جداسازی باکتری‌های توانمند تجزیه‌کننده بنزوپیرن، چهار نمونه خاک آلوده به گازوبیل، بنزین و نفت سفید از اطراف مخازن نگهداری فرآورده‌های نفتی واقع در شهرهای ساری و بهشهر جمع‌آوری، هواخشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. نمونه‌ها جهت انجام آزمایشات بعدی به مرکز تحقیقات تیرتاش وابسته به شرکت دخانیات ایران انتقال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک (مندرج در جدول ۱)، جهت اطمینان از سازگاری ریزجانداران بومی خاک با آلاینده نفتی، ۵ گرم از هر نمونه خاک با ۴۵ میلی‌لیتر از محیط کشت نمک معدنی بوشنل-هاث^۱ (۷) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوپیرن مخلوط و به مدت سه ماه بر روی شیکر و در تاریکی نگهداری شد، در انتهای هر ماه ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک به محیط بوشنل-هاث تازه منتقل شد تا جمعیت ریزجانداران ناخواسته را کم کند (۳۲). پس از اتمام دوره غنی‌سازی، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک بر روی پلیت‌های حاوی بوشنل-هاث-آگار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از بنزوپیرن کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از طی زمان گرماگذاری، کلتی‌های ظاهر شده بر روی سطح پلیت‌ها در محیط لوریا-برتانی-آگار^۲ خالص‌سازی شدند (۲۱). بررسی شکل مرفولوژیکی جدایه‌ها (مندرج در جدول ۲) در نهایت منجر به جداسازی شش جدایه باکتریایی شد که قادر به استفاده از بنزوپیرن به عنوان منبع کربنی بودند. جدایه‌های حاصل با اسامی AM_1 ، AP_3 ، BM_1 ، BM_4 ، BP_1 و BP_2 نام‌گذاری شد.

غربالگری جدایه‌های مولد سورفاکتانت زیستی: جهت غربالگری باکتری‌های تولیدکننده سورفاکتانت زیستی از میان جدایه‌های حاصل، محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ محیط کشت رابرت^۳ (۳۶) حاوی جدایه‌ها و آلاینده به پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی ارسال و میزان میزان کشش سطحی نمونه‌ها به وسیله تینسیومتر دونوی (شرکت کروزر، آلمان^۴) در دمای اتاق اندازه گرفته شد (۳۵ و ۳۸).

بهینه‌سازی شرایط تولید سورفاکتانت زیستی: به منظور افزایش میزان تولید سورفاکتانت زیستی توسط جدایه‌های انتخابی، مقدار pH

(۶، ۷ و ۸)، دما (۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد) و نوع منبع کربنی اضافه شده در محیط کشت بوشنل-هاث (گلوکز، ساکارز و نشاسته) به کمک روش آماری تاگوچی بهینه‌سازی شد. به این منظور پس از طراحی آرایش تیمارها با روش آماری تاگوچی و به وسیله نرم‌افزار مینی تب، نمونه‌ها تهیه و پس از گرماگذاری میزان کشش سطحی آن‌ها در پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی اندازه گرفته شد (۲۶).

تجزیه بنزوپیرن در محیط محلول: توانایی تجزیه بنزوپیرن توسط جدایه‌های انتخابی، در محیط محلول مورد مقایسه قرار گرفت. به این منظور، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل ۱۲ تیمار و سه تکرار طراحی شد. فاکتورهای آزمایش شامل جدایه‌های مولد سورفاکتانت زیستی (جدایه‌های AP_3 ، BM_1 و دسته باکتریایی حاصل از دو جدایه Co و شاهد) و فاکتور دوم نوع سورفاکتانت زیستی (سورفاکتانت‌های زیستی استخراج شده از جدایه AP_3 و BM_1 و عدم حضور سورفاکتانت زیستی) بود. در نمودارها جدایه‌های AP_3 ، BM_1 و دسته باکتریایی حاصل به ترتیب B_1 ، B_2 و Co و سورفاکتانت‌های زیستی حاصل از جدایه AP_3 و BM_1 و نیز S_1 و S_2 نامگذاری شدند. S_0 نیز نشان‌دهنده عدم تلقیح سورفاکتانت زیستی است. جهت تهیه مایه تلقیح با جمعیت $10^6 \times 300$ سلول بر میلی‌لیتر، کشت ۱۸ ساعته جدایه‌ها در محیط لوریا-برتانی، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس با استفاده از استانداردهای مک‌فارلند و سرم نمکی ۰/۹ درصد جمعیت یکسان از جدایه‌ها تهیه و به محیط کشت بوشنل-هاث حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از آلاینده بنزوپیرن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت چهارده روز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر گرماگذاری و در انتهای زمان گرماگذاری میزان بنزوپیرن باقیمانده در نمونه‌ها عصاره‌گیری، استخراج و با GC-FID اندازه گرفته شد.

استخراج سورفاکتانت زیستی: به منظور استخراج سورفاکتانت زیستی بر اساس روش منیف^۵ و همکاران (۲۶)، از کشت ۹۶ ساعته جدایه‌ها در محیط کشت بوشنل-هاث تحت شرایط بهینه استفاده شد. محیط حاوی جدایه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با ۴۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس pH آن با استفاده از اسیدکلریدریک ۶ نرمال به ۲ کاهش داده شد. نمونه‌ها به مدت یک شب در یخچال نگهداری و پس از آن حجم برابری از نمونه و مخلوط ۲ به ۱ کلروفورم/متانول ترکیب و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت. فاز آلی با قیف جداکننده، از فاز آبی جدا شده و در آن دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، خشک شد. سورفاکتانت زیستی ناخالص در آزمایشات تجزیه مورد استفاده قرار گرفت.

- 1- Bushnell and Haas
- 2- Luria Bertani Agar
- 3- Robert
- 4- Kruss Company, Germany

آون (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) کاملاً خشک شد. سپس ۲۰ میلی لیتر از حلال دیکلرومتان به نمونه‌ها افزوده شده و به مدت ۱۶ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. پس از طی زمان یاد شده، فاز آلی جدا شده و در هوای آزاد خشک و مجدداً با حلال به حجم رسانده شده و توسط GC-FID مورد سنجش قرار گرفت (۴۱). تمامی آزمایشات یاد شده در مرکز تحقیقات توتون تیرتاش انجام شد.

آنالیز GC-FID: نمونه‌ها جهت آنالیز دستگاهی GC به آزمایشگاه بیوپالایش زیست محیطی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد ارسال شد. دستگاه جی سی مورد استفاده دارای ستون FID با طول ۲۵ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ و ضخامت فیلم ۰/۱۷ میلی‌متر و هیدروژن به عنوان گاز حامل با فشار ۵/۱۷ نیوتن بر سانتی‌متر مربع و جریان ۱/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. برنامه دمایی سیستم شامل، ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا ۳۰۰ درجه که به مدت ۱۰ دقیقه ثابت نگه داشته شد. دمای تزریق کننده ۲۹۰ و آشکارساز ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و میزان تزریق نیز ۲ میکرولیتر طی مدت یک دقیقه در حالت اسپیلیتلس یا بدون شکاف بود (۱۳).

آنالیز آماری داده‌ها: داده‌های حاصل از آزمایشات با نرم‌افزار جامپ^۲ و آزمون توکی در سطح احتمال ۱٪ بررسی شدند.

نتایج و بحث

غنی‌سازی و کشت نمونه‌های خاک آلوده‌ی جمع‌آوری شده در محیط کشت نمک معدنی بوشنل‌هاث منجر به جداسازی شش جدایه با خصوصیات ظاهری مورفولوژیکی (جدول ۲) متفاوت شد که با اسامی اختصاری AM_1 ، AP_3 ، BM_1 ، BM_4 ، BP_1 و BP_2 نام‌گذاری شدند. جدایه‌های یاد شده از آنجایی که بومی خاک‌های آلوده بودند، علاوه بر مقاومت نسبت به غلظت‌های زیاد و سمیت آلاینده‌های هیدروکربنی، قادر به استفاده از این ترکیبات به عنوان منبع کربنی نیز می‌باشند.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان کشتش سطحی جدایه‌های مذکور به منظور انتخاب جدایه‌های تولیدکننده سورفاکتانت زیستی (جدول ۳) نشان داد که جدایه‌های BM_1 و AP_3 کمترین میزان کشتش سطحی را دارا بودند. بودور و میلرمایر (۶) معتقدند که جدایه‌هایی که میزان کشتش سطحی آب خالص را به کمتر از ۴۰ میلی-نیوتن بر متر کاهش می‌دهند، توانایی تولید سورفاکتانت را دارا می‌باشند. بر اساس داده‌های جدول ۲ میزان کشتش سطحی در جدایه‌های AP_3 و BM_1 به ترتیب ۴۶/۷۹ و ۴۹/۲۲ میلی‌نیوتن بر متر بود. در حالی که میزان کشتش نمونه شاهد (محیط کشت بوشنل-

عصاره‌گیری بنزوپیروین در محیط محلول: جهت استخراج بنزوپیروین باقیمانده در انتهای دوره گرماگذاری، ابتدا به وسیله اسیدسولفوریک ۳ مولار pH نمونه‌ها به ۲ کاهش داده شد. سپس حجم برابر (۱۰ میلی لیتر) از اتیل استات به نمونه‌ها افزوده و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر مخلوط شد. سپس عصاره‌ها به کمک نمک Na_2SO_4 بی‌آب، کاملاً آبدایی شده و پس از انتقال به ظروف مخصوص عصاره‌گیری به مدت ۱۲ ساعت در معرض هوای آزاد خشک و سپس با کمک ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات به حجم رسیده و جهت تعیین غلظت باقیمانده آلاینده به وسیله GC-FID آنالیز شدند (۱۳).

تجزیه بنزوپیروین در خاک: میزان تجزیه آلاینده در خاک توسط جدایه و سورفاکتانت زیستی برتر حاصل از آزمایشات تجزیه در محیط بوشنل-هاث، به وسیله آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل (۱۲ تیمار و سه تکرار) مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور اول شامل جدایه برتر، دسته‌بakterیایی برتر، تلقیح همزمان دسته‌بakterیایی و سورفاکتانت زیستی برتر و شاهد بوده فاکتور دوم شامل سه زمان (۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز) مورد مطالعه قرار گرفت. در واقع، باتوجه به نتایج حاصل از مرحله تجزیه آلاینده در محیط محلول، جدایه AP_3 ، سورفاکتانت زیستی استخراج شده از آن و دسته‌بakterیایی انتخاب و توانایی آن‌ها در تجزیه بنزوپیروین در محیط خاک طی سه زمان بررسی شد. به این منظور، ده نمونه خاک غیرآلوده از ۱۰ سانتی‌متری سطح مزرعه برنج واقع در شهرستان بهشهر جمع‌آوری و پس از آماده‌سازی و انجام آزمایشات فیزیکوشیمیایی به مدت یک شب در آون و دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا تمامی رطوبت آن تبخیر شود (۲۶). سپس ۵۰ گرم از خاک توزین و با مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک از آلاینده بنزوپیروین آلوده شد. به این منظور آلاینده در ۲ میلی‌لیتر استون حل و به نمونه‌ها اضافه شد. پس از تبخیر حلال (حدود دو ساعت بعد)، نمونه‌ها با یک میلی‌لیتر از مایه تلقیح حاوی جمعیت $10^6 \times 300$ سلول بر میلی‌لیتر از جدایه تلقیح شد. در این مرحله جهت ممانعت از ورود عناصر غذایی موجود در محیط کشت، پس از رشد جدایه در محیط کشت لوریا برتانی، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده، سلول‌های رسوب یافته دو بار توسط سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد شستشو داده شد و سپس جمعیت یکسان از جدایه با استفاده از استانداردهای مک‌فارلند تهیه و به نمونه‌ها تلقیح شد (۵). رطوبت نمونه‌های خاک به میزان ۶۰ درصد ظرفیت نگهداری رطوبت^۱ تنظیم و طی دوران گرماگذاری به کمک اندازه‌گیری وزنی مقدار رطوبت ثابت نگه داشته شد (۵). به منظور بررسی میزان تجزیه بنزوپیروین، طی زمان‌های پانزده، سی و چهل و پنجاه روز پس از گرماگذاری، ۵ گرم از نمونه‌های خاک برداشت و به مدت یک شب در

همراه نتایج آن، که ۹ آزمایش با دو تکرار بود، می‌باشد. براساس نتایج حاصل از آرایش تیمارها به روش تاگوچی، همان‌طور که در جدول تجزیه واریانس مربوطه (جدول ۵) مشخص است، بیشترین درصد اثرگذاری به فاکتور منبع کربنی مربوط می‌باشد. در واقع این فاکتور در مورد جدایه AP₃ با ۴۲/۶٪ و جدایه BM₁ با ۸۸/۲۸٪ بیشترین سهم اثرگذاری را داراست. پس از منبع کربنی، pH موجب ایجاد تغییر در داده‌های حاصل از آزمایش شده و در نهایت کمترین سهم نیز به فاکتور دما مربوط می‌باشد.

هاث) ۷۷/۳۵ میلی‌نیوتون بر متر به دست آمد. بنابراین نمونه‌های مورد بررسی به ترتیب موجب کاهش ۴۳ و ۴۰ درصدی کشش سطحی نسبت به شاهد شدند. به این ترتیب دو جدایه مذکور توانایی تولید سورفاکتانت را داشته و جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب شدند.

بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه‌ها جهت تولید حداکثر مقدار سورفاکتانت زیستی، به وسیله آزمایش کسری از فاکتوریل (روش تاگوچی) انجام شد. جدول ۴ حاوی تمامی تیمارهای آزمایشی طراحی شده توسط نرم‌افزار مینی‌تب به روش فاکتوریل کسری (تاگوچی) به

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های خاک مورد بررسی

Table 1- Some physical and chemical properties of examined soil samples

نمونه خاک Soil sample	شن Sand	سیلت Silt	رس Clay	pH	نیترژن کل Total nitrogen	کربن آلی Organic carbon	قابلیت هدایت الکتریکی Electrical conductivity	فسفر قابل دسترس Available phosphorus
		%			%		dS.m ⁻¹	Mg.kg ⁻¹
1	5.5	35.5	59	6.6	0.12	1.86	3.2	77.5
2	5.8	41.3	52.9	6.5	0.1	1.43	3	79.9
3	5.3	41.9	52.8	6.7	0.17	1.9	3.3	81.1
4	4.5	39.8	55.7	6.6	0.15	1.87	3.1	79.7

جدول ۲- خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌های تجزیه کننده بنزوپیرن

Table 2- Morphological properties of Benzo(a)pyrene degrading isolates

جدایه Isolate	رنگ کلنی Colony color	شکل کلنی Colony Shape	اسپور Spore	کپسول Capsule	تحرک Mobility	گرم Gram
AM ₁	زرد کم‌رنگ Light yellow	میله‌ای Bacillus	+	+	+	+
BM ₄	شیری Milky	باسیل کوکوسی Coccobacillus	+	-	+	+
BP ₁	صورتی کم‌رنگ Light Pink	باسیل رشته‌ای Streptobacilli	-	-	-	-
BP ₂	شیری Milky	خوشه‌ای Staphylococci	+	+	-	+
AP ₃	سفید شیری Milky White	میله‌ای Bacillus	+	-	+	+
BM ₁	سفید لعابی Overglazed White	میله‌ای Bacillus	-	-	+	-

جدول ۳- میزان کشش سطحی در بین جدایه‌های باکتریایی انتخاب شده

Table 3- The surface tension in selected bacterial isolates

جدایه Isolate	کشش سطحی (mN/m) Surface tension
AP ₃	46.79
BM ₁	49.22
AM ₁	51.53
BM ₄	52.01
BP ₁	57.9
شاهد (محیط کشت فاقد باکتری) Blank (culture Medium without bacteria)	77.35

جدول ۴- تیمارهای آزمایشی در آزمایش کسری از فاکتوریل (روش تاگوچی)

Table 4- Treatments in fractional factorial experiment (Taguchi)

pH	دما	منبع کربن	کشش سطحی (mN/m) جدایه AP ₃	کشش سطحی (mN/m) جدایه BM ₁
	Temperature	Carbon source	Surface tension of AP ₃ Isolate	Surface tension of BM ₁ Isolate
6	25	گلوکز Glucose	56.42	40.41
	30	نشاسته Starch	58.36	56.02
	35	ساکارز Sucrose	63.72	49.76
7	25	نشاسته Starch	58.04	54.25
	30	ساکارز Sucrose	49.18	47.74
	35	گلوکز Glucose	30.81	31.52
8	25	ساکارز Sucrose	46.29	47.23
	30	گلوکز Glucose	40.62	40.43
	35	نشاسته Starch	58.28	58.18

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر pH، منبع کربنی و دما بر بهینه سازی شرایط رشد جدایه‌ها به روش تاگوچی

Table 5- Analysis of variance resulting from biosurfactant production optimization treatments by Taguchi

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	مجموع مربعات	واریانس	واریانس	F _{AP3}	F _{BM1}	PS _{AP3}	PS _{BM1}	%P _{AP3}	%P _{BM1}
Source of variation	DF	SS _{AP3}	SS _{BM1}	V _{AP3}	V _{AP3}						
اسیدیته pH	2	635.18	104.31	317.59	52.16	9.67	6.04	607.9	87.04	34.66	5.81
دما Temperature	2	266.13	11.19	133.065	5.59	5.94	0.65	238.85	6.08	14.5	0.62
کربن Carbon	2	780.92	1585.51	390.46	792.76	11.89	91.86	753.64	1568.28	42.6	88.28
خطا Error	11	150.06	94.9	13.64	8.63					8.2	5.28
کل Total	17	1832.32	1795.92								

می‌شود و شرایط آزمایشی که دارای بیشترین مقدار S/N باشد، به عنوان شرایط بهینه انتخاب می‌شود. علاوه بر آن به کمک نمودارهای حاصله (شکل ۱) می‌توان فهمید کدام فاکتور دارای اهمیت بیشتری است. در واقع نموداری که دارای بیشترین میزان اختلاف بین سطوح باشد، دارای اثر بیشتری است و نمودارهایی که میزان اختلاف سطوح در آن کم باشد، از اهمیت کمتری در نتیجه آزمایش برخوردار است. به این ترتیب و بر اساس شکل ۱، فاکتور منبع کربنی دارای بیشترین اثر و فاکتور دما نیز دارای کمترین اثر در نتیجه آزمایش (تغییرات میزان کشش سطحی) می‌باشد. این نتیجه‌گیری از طریق جدول تجزیه

جهت بررسی نتایج، میزان کشش سطحی حاصل از دو جدایه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۶ و در حضور منبع کربنی گلوکز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و سایر نتایج با آن مقایسه گردید. بر اساس نتایج حاصل، میزان کشش سطحی جدایه AP₃ و BM₁ در شرایط یاد شده به ترتیب ۵۶/۴۲ و ۴۰/۴۱ میلی‌نیوتن بر متر بود. حداقل میزان کشش سطحی در شرایط دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷ و در حضور قند گلوکز رویت شد که شامل مقادیر ۳۰/۸۱ و ۳۱/۵۲ میلی‌نیوتن بر متر و به ترتیب مربوط به جدایه‌های AP₃ و BM₁ بود. در روش آماری تاگوچی، تغییر نتایج با عامل S/N بیان

جمعیت آن‌ها شده و در نهایت سبب افزایش میزان تولید سورفاکتانت می‌شود (۱۷ و ۳۴). تغییرات pH بر خصوصیات ساختاری بیوسورفاکتانت‌ها و توانایی آن‌ها در افزایش انحلال آلاینده‌ها، اثرگذار است. از سوی دیگر، pH مناسب جهت تولید حداکثر میزان سورفاکتانت زیستی به جنس و گونه باکتری بستگی دارد (۱۵، ۳۱ و ۴۶).

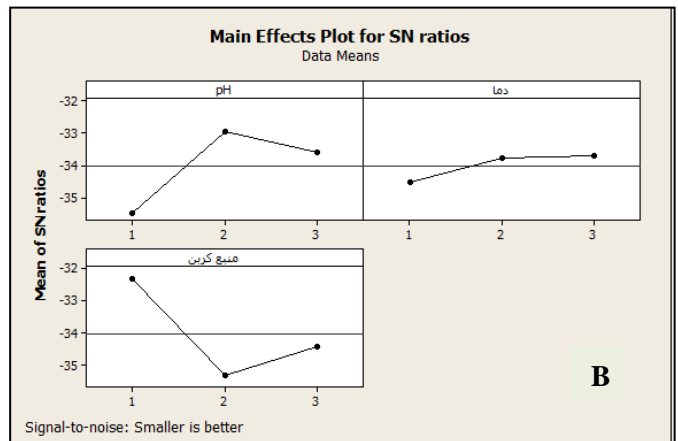
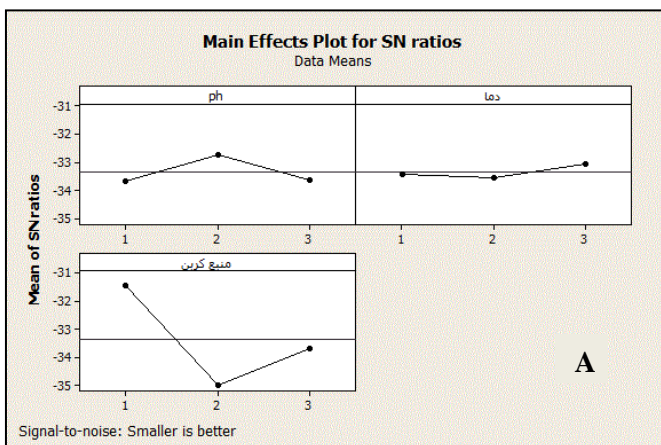
غلظت باقیمانده آلاینده بنزوپیرن و درصد تجزیه آن با استفاده از جدایه‌های AP₃ و BM₁ و تلقیح همزمان دو جدایه تحت عنوان دسته‌بakterیایی و همچنین کاربرد و عدم کاربرد دو سورفاکتانت زیستی استخراج شده از جدایه‌ها به ترتیب در شکل ۲ و تجزیه واریانس داده‌ها در جدول ۶ آورده شده است. در واقع، از آنجایی‌که تجزیه و دسترسی زیستی آلاینده بنزوپیرن، تحت تأثیر انحلال‌پذیری کم آن می‌باشد، تجزیه این ترکیب در حضور و عدم حضور سورفاکتانت زیستی و تلقیح جدایه‌ها و دسته‌بakterیایی حاصل از آن بررسی شد.

براساس داده‌های حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۶)، اثر سه فاکتور جدایه، سورفاکتانت زیستی و برهمکنش باکتری و سورفاکتانت زیستی بر تجزیه آلاینده بنزوپیرن در محیط محلول، در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشند. به عبارت دیگر، کاربرد تیمارهای یاد شده در مقایسه با شاهد سبب کاهش غلظت آلاینده و تجزیه آن شده است. شکل ۲ نشان می‌دهد که در میان تیمارهای اعمال شده، کاربرد دسته‌بakterیایی (تلقیح همزمان دو جدایه) به همراه سورفاکتانت استخراج شده از جدایه AP₃ مؤثرترین تیمار بوده و سبب تجزیه ۸۷/۳ درصد از آلاینده شده و غلظت آلاینده را به ۱۸ میلی‌گرم بر لیتر کاهش داد. در حالی‌که تلقیح جدایه BM₁ با ۲۷/۶ درصد، کمترین اثر را بر تجزیه بنزوپیرن داشته و غلظت آلاینده را از ۱۵۰ به ۱۰۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر رساند.

واریانس مربوط به تیمارهای آرایشی با روش تاگوچی نیز قابل استنباط است. بنابراین طبق نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۵) و شکل‌های ۱ و ۲، شرایط بهینه مورد نظر در pH برابر با ۷، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و منبع کربنی گلوکز حاصل شد.

نتایج حاصل از بررسی‌های مختلف حاکی از آن است که مهمترین عامل تعیین‌کننده شرایط بهینه رشد و تولید سورفاکتانت زیستی جنس و گونه باکتریایی می‌باشد. به عنوان مثال، مطالعه حمزه و همکاران (۱۵) نشان داد شرایط بهینه تولید حداکثر سورفاکتانت توسط جدایه *Pseudomonas aeruginosa* UKMP14T، شامل ۹ pH، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و منبع کربنی گلیسرول می‌باشد. در حالی‌که سویه *Pseudomonas aeruginosa* s6 مورد مطالعه توسط بین و همکاران (۴۶) در ۹ pH و حضور منبع کربنی گلوکز بیشترین میزان سورفاکتانت زیستی را تولید نمود. بنابراین شرایط بهینه رشد باکتری و تولید سورفاکتانت زیستی میان سویه‌های مختلف از یک جنس و گونه متفاوت بوده و حتی محل جداسازی سویه در شرایط بهینه مورد نیاز آن اثرگذار می‌باشد.

علاوه بر جنس و گونه، عوامل محیطی همانند اسیدیته، دما، منبع کربن و نیتروژن و محل جداسازی جدایه‌ها نیز بر رشد و تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری‌ها اثرگذارند. وو و همکاران (۴۴) نوع و غلظت منبع کربنی را به عنوان عامل مهم تأثیرگذار بر میزان تولید بیوسورفاکتانت مطرح نمودند. در واقع باکتری‌های تولیدکننده سورفاکتانت اغلب نیاز به مقدار زیادی اکسیژن دارند. از آنجایی‌که مشتقات نفتی، محتوای اکسیژن محلول کمی دارند، از منابع کربنی محلول در آب جهت تأمین اکسیژن محلول استفاده می‌شود (۱۷). وجود منبع کربنی نامحلول در آب تولید سورفاکتانت زیستی توسط ریزجانداران را تحریک می‌کند. اما از سوی دیگر منبع کربنی سهل الوصول محلول در آب موجب تحریک رشد ریزجانداران و افزایش



شکل ۱- اثر اصلی فاکتورها بر میزان کشش سطحی در روش تاگوچی: (A) جدایه BM₁ و (B) جدایه AP₃

Figure 1- The main effect of factors on surface tension in the Taguchi method: (A) BM₁ Isolate and (B) AP₃ isolate
جدول ۶- تجزیه واریانس اثر باکتری و سورفاکتانت زیستی بر تجزیه بنزوپیرن در محیط محلول

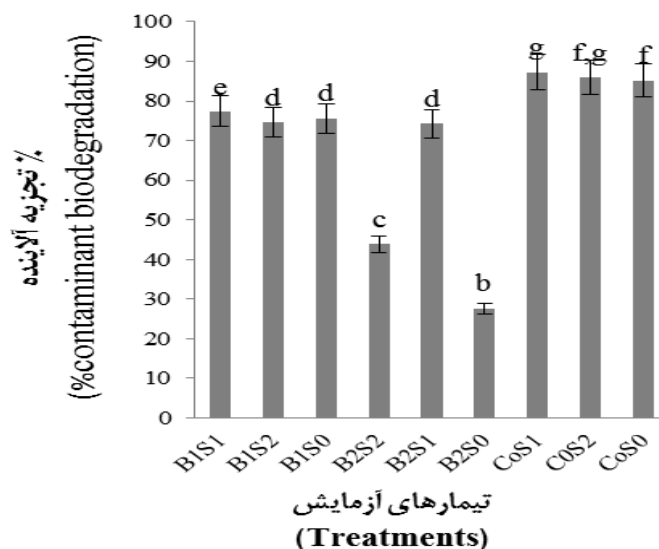
Table 6- Analysis of variance from isolates and biosurfactants on benzo(a)pyrene biodegradation in liquid medium

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی DF	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	نسبت F F value	Probe> F
باکتری Isolate	3	431303.6	143767.9	287535.7	0.001
سورفاکتانت زیستی Biosurfactant	2	165.7	82.8	165.7	0.001
باکتری*سورفاکتانت زیستی Isolate * Biosurfactant	6	271.4	45.2	90.5	0.001
خطا Error	24	12	0.5		
کل Total	35	431752.7			

تلقیح شده با سورفاکتانت زیستی استخراج شده از جدایه BM₁، غلظت بنزوپیرن در حضور جدایه‌های AP₃ و BM₁ به ترتیب ۳۷/۱۲ و ۸۳/۲ میلی گرم بر لیتر بود. به نظر می‌رسد، علاوه بر عملکرد بهتر جدایه AP₃، سورفاکتانت زیستی حاصل از آن نیز مؤثرتر بوده و سبب بهبود فرایند تجزیه شده است.

مقایسه میان تیمارها نشان داد که کاربرد سورفاکتانت زیستی سبب افزایش میزان تجزیه آلاینده شد. بطوری که حداقل میزان تجزیه بنزوپیرن در تیماری که تنها حاوی جدایه BM₁ و فاقد سورفاکتانت زیستی بود، دیده شد. لکن، تأثیر سورفاکتانت استخراج شده از جدایه AP₃ بیش از سورفاکتانت زیستی حاصل از جدایه دیگر بوده و حداکثر میزان تجزیه بنزوپیرن در حضور این ترکیب رخ داد (۸۷/۳ درصد).

بررسی درصد تجزیه آلاینده تحت تیمارهای باکتریایی مختلف نشان می‌دهد که استفاده از دسته‌باکتریایی در مقایسه با تلقیح جدایه اثر بیشتری بر میزان تجزیه دارد. بطوری که مقایسه نتایج حاصل از تیمارهای فاقد سورفاکتانت زیستی نشان داد که دسته‌باکتریایی مورد بررسی سبب تجزیه آلاینده به میزان ۸۵/۱۸ درصد شده است، در حالی که جدایه‌های AP₃ و BM₁ به ترتیب ۷۵/۶ و ۲۷/۶ درصد آلاینده را تجزیه نمودند. در واقع نتایج نشان داد که غلظت آلاینده در تیمار حاوی دسته‌باکتریایی ۲۱/۲۲ و در تیمارهای حاوی جدایه AP₃ و BM₁ به ترتیب ۸۳/۲ و ۱۰۷/۵ میلی گرم بر لیتر بود. در میان دو جدایه نیز، عملکرد جدایه AP₃ بهتر از BM₁ بوده و تیمارهای حاوی آن نتایج بهتری را نشان دادند. در تیمار حاوی سورفاکتانت استخراج شده از AP₃، غلظت آلاینده در حضور جدایه BM₁، ۳۷/۷ و در حضور جدایه مولد AP₃، ۳۳ میلی گرم بر لیتر بود. در حالی که در تیمارهای



شکل ۲- درصد تجزیه بنزوپیرن در محیط محلول پس از طی دوره گرماگذاری
Figure 2- Percentage of Benzo(a)pyrene biodegradation in liquid medium after incubation

جدول ۷- تجزیه واریانس اثر تیمار، زمان و برهم‌کنش تیمار و زمان بر تجزیه بنزوپیرن در خاک

Table 7- Analysis of variance from isolates and biosurfactants on benzo(a)pyrene biodegradation in soil

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	نسبت F	Probe> F
Source of variation	DF	SS	MS	F value	
تیمار	3	61080.2	20360.8	24432.8	0.001
Treatment					
زمان	2	28681.1	14340.9	17209.8	0.001
Time					
زمان* تیمار	6	10988.9	1831.2	2197.2	0.001
Treatment*Time					
خطا	24	20	0.86		
Error					
کل	35	100771.7			
Total					

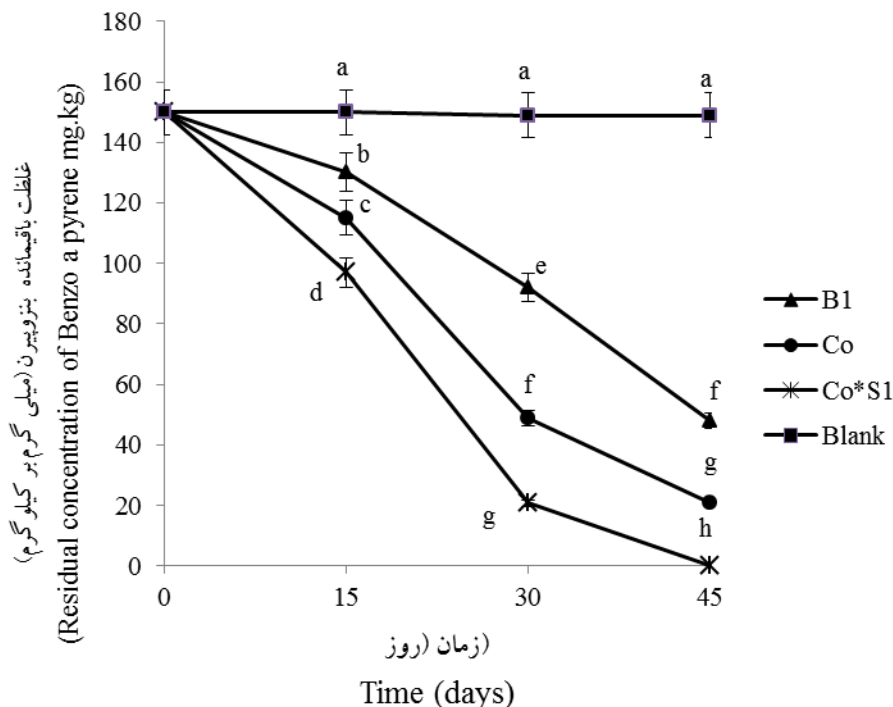
دوره گرماگذاری، ۶۸ درصد از آلاینده بنزوپیرن را تجزیه کرد. سرعت تجزیه آلاینده در تیمارهای حاوی دسته‌باکتریایی در مقایسه با جدایه منفرد بیشتر بود. بطوری‌که در نمونه‌هایی که با دسته‌باکتریایی باکتریایی مورد بررسی تلقیح شده بودند، مقدار آلاینده در سه زمان مورد نظر، ۱۱۵، ۴۸/۸ و ۲۱ میلی‌گرم بر گرم و میزان تجزیه به ترتیب ۲۳/۳، ۶۷/۴۶ و ۸۶ درصد بود. در تیمارهای تلقیح شده با دسته‌باکتریایی و بیوسورفاکتانت، درصد تجزیه طی زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز به ترتیب ۳۵/۳، ۸۶/۱ و ۱۰۰ درصد بود. در واقع مقدار آلاینده طی زمان مورد بررسی ابتدا به ۹۷ و سپس ۲۰/۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسیده و در آخرین زمان مورد سنجش نمونه‌ها فاقد غلظت قابل تشخیصی از آلاینده بوده و مقدار آن صفر در نظر گرفته شد.

تجزیه مؤثر آلاینده‌های هیدروکربنی در خاک‌های آلوده به چهار عامل بستگی دارد: شرایط محیطی، فعالیت تجزیه‌کنندگی ریزجاندار، نوع آلاینده و میزان دسترسی زیستی آلاینده برای ریزجاندار. جذب هیدروکربن‌های درشت مولکول در سطح ذرات خاک سبب کاهش دسترسی زیستی این آلاینده شده و عامل محدود کننده تجزیه زیستی آن‌ها توسط ریزجانداران خاک می‌شود. عوامل فعال سطحی موجب افزایش تحرک و تجزیه زیستی ترکیبات هیدروفوب شده و بنابراین دارای اثر مثبت بر فرآیند زیست‌پالایی می‌باشند (۴۵). در واقع استفاده از سورفاکتانت‌ها با تأثیر بر میزان انحلال و تشکیل امولسیون موجب افزایش تحرک این ترکیبات می‌شوند. سورفاکتانت‌ها در ابتدا با کاهش کشش سطحی بین آب و خاک و سپس با به دام انداختن آلاینده در ساختار میسلی که تشکیل می‌دهند، تحرک و انحلال ترکیبات

به دلیل پیچیدگی محیط خاک نسبت به محیط محلول، فرآیند تجزیه آلاینده توسط جدایه‌های باکتریایی در دو محیط یاد شده بسیار متفاوت می‌باشد. در واقع، جذب هیدروکربن‌ها در سطح ذرات خاک و کاهش دسترسی آن‌ها، عامل اصلی استفاده از جدایه‌های تولید کننده سورفاکتانت جهت تجزیه آلاینده‌ها می‌باشد. به همین دلیل، توانایی جدایه، دسته‌باکتریایی و سورفاکتانت زیستی برتر حاصل از مرحله تجزیه آلاینده در محیط محلول در خاک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی تجزیه آلاینده بنزوپیرن در خاک تحت تلقیح جدایه AP₃، دسته‌باکتریایی فاقد سورفاکتانت زیستی و دسته‌باکتریایی به همراه سورفاکتانت زیستی استخراج شده از جدایه AP₃ طی دوره ۴۵ روزه در جدول ۷ و شکل ۳ آورده شده است. اثر تیمارها (شامل جدایه، دسته‌باکتریایی و سورفاکتانت زیستی)، زمان و برهم‌کنش آن‌ها بر تجزیه بنزوپیرن در خاک معنی‌دار شد ($p < 0.01$). بطوری‌که در میان سه تیمار مورد آزمایش، تیمار حاوی دسته‌باکتریایی و بیوسورفاکتانت بیشترین اثر (۱۰۰ درصد) و تیمار حاوی جدایه کمترین اثر (۶۸ درصد) را بر تجزیه آلاینده داشتند. در حالی‌که در نمونه شاهد غلظت آلاینده پس از ۴۵ روز تقریباً ثابت باقی مانده است (۰/۶ درصد تجزیه).

در تیمار حاوی جدایه AP₃، در طول چهل و پنج روز گرماگذاری میزان آلاینده از ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک به ۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسید. جدایه یاد شده (AP₃) طی پانزده روز ابتدایی پس از تلقیح، ۱۳/۲ درصد از آلاینده را تجزیه و مقدار آن را به ۱۳۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش داد. این روند طی پانزده روز دوم و سوم ادامه داشته و با ۳۸/۶ و ۶۸ درصد تجزیه به ترتیب غلظت آلاینده به ۹۲ و ۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسید. به این ترتیب جدایه AP₃ در انتهای

هیدروفوب در خاک را افزایش می‌دهند. در واقع سورفاکتانت‌های زیستی، به عنوان جایگزین نامیزه کننده‌های (امولسیفایر) صنعتی، جهت افزایش تحرک، انحلال و در نتیجه تجزیه زیستی ترکیبات آبریز قابل استفاده می‌باشند (۲۵).



شکل ۳- غلظت باقیمانده بنزوپیرن در خاک طی دوره گرماگذاری
Figure 3- Residual concentration of Benzo(a)pyrene in soil during incubation

فقدان تولید سورفاکتانت زیستی بوده، اما در تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی بسیار مفید و کارآمد ظاهر شود. از سوی دیگر، جدایه‌های تولید کننده سورفاکتانت با دو مکانیسم بهبود دسترسی زیستی و تحرک آلاینده‌ها (از طریق کاهش کشش سطحی و بین سطحی) و افزایش هیدروفوبیسیته سطحی سلول باکتری، سبب افزایش میزان تجزیه می‌شوند (۳۱). اغلب پژوهشگران تأثیر دسته‌بakterیایی را در تجزیه آلاینده‌های مختلف بیشتر از کاربرد جدایه‌های منفرد دانسته و بر استفاده از دسته‌جات باکتریایی در تجزیه و زیست‌پالایی آلاینده‌های هیدروکربنی، تأکید داشته‌اند (۳۰، ۵، ۱۱، ۳۳، ۱۴ و ۴۵).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تأثیر استفاده همزمان از دسته‌بakterیایی و سورفاکتانت زیستی بر میزان تجزیه بنزوپیرن بررسی شد. بنزوپیرن به عنوان یک آلاینده سخت تجزیه شونده در مطالعات کمتر مورد توجه قرار گرفته است. نتایج حاصل از بررسی حاضر حاکی از تأثیر بیشتر استفاده از دسته‌بakterیایی و سورفاکتانت زیستی در فرآیند تجزیه

تحقیقات مختلف طی سال‌های اخیر ثابت نمود که استفاده از سورفاکتانت‌ها با مکانیسم‌های متفاوت همچون تأثیر بر میزان نامیزگی، انحلال میسل و تسهیل انتقال توده‌ای سبب افزایش میزان فراهمی و دسترسی آلاینده‌های آبریز برای ریزجانداران می‌شود (۲۷).

ریزجانداران منفرد توانایی متابولیز محدودی خاصی از هیدروکربن‌ها را دارند. به همین دلیل افزایش سرعت و میزان تجزیه زیستی ترکیبات یادشده، نیازمند حضور اجتماع گونه‌های متفاوت با ظرفیت آنزیمی وسیع، می‌باشد. حضور گونه‌ها و جنس‌های باکتریایی متفاوت در خاک و آب آلوده به آلاینده‌های نفتی، تأیید کننده نقش منحصربفرد هر یک در فرآیند تغییر شکل این ترکیبات است (۴۰). تهیه یک دسته‌بakterیایی مناسب مستلزم انتخاب اجزای سازگار می‌باشد. در واقع به منظور حصول حداکثر تجزیه، اجزای ترکیب باید فاقد هر گونه ارتباط آنتاگونیستی بوده تا متابولیت‌های مورد نیاز تجزیه فراهم شود. در چنین مواقعی لازم نیست تمامی اجزای دسته‌بakterیایی تولید کننده سورفاکتانت باشند. به عبارت دیگر، ممکن است جدایه‌ای

شکل ترکیبات سمی شده و امکان عمل مؤثرتر را برای سایر گونه‌ها فراهم می‌کند. عوامل فعال سطحی نیز موجب افزایش تحرک و تجزیه زیستی ترکیبات هیدروفوب شده و بنابراین دارای اثر مثبت بر فرآیند زیست‌پالایی می‌باشند. در واقع استفاده از سورفاکتانت‌های زیستی با تأثیر بر میزان انحلال و تشکیل امولسیون موجب افزایش تحرک این ترکیبات می‌شوند. به این ترتیب استفاده از دسته‌باکتریایی و جدایه‌های تولید کننده سورفاکتانت زیستی، سبب تقلیل عوامل محدود کننده در تجزیه آلاینده‌های نفتی شده و عملکرد تجزیه را بهبود می‌بخشد.

آلاینده بنزوپیرن بود. بطوری که حداکثر میزان تجزیه بنزوپیرن در محیط محلول در تیمار تلقیح شده با دسته‌باکتریایی و سورفاکتانت زیستی استخراج شده از جدایه AP₃ دیده شد. در این تیمار غلظت آلاینده طی ۱۴ روز از ۱۵۰ به ۱۸ میلی‌گرم بر لیتر رسید. این مسئله در محیط خاک نیز تکرار شد. بطوری که در انتهای زمان بررسی (۴۵ روز) غلظت بنزوپیرن در تیمار یاد شده به صفر رسیده بود. در واقع به نظر می‌رسد مخلوطی از جدایه‌ها دارای سازگاری و انعطاف متابولیکی بهتری نسبت به جدایه‌های منفرد می‌باشند. به عبارت دیگر، با استفاده از دسته‌باکتریایی، یک گونه با تولید متابولیت سبب حذف و یا تغییر

منابع

- 1- Bacosa H., Suto K., and Inoue C. 2010. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64: 702–710.
- 2- Bacosa H.P., Suto K., and Inoue C. 2012. Bacterial community dynamics during the preferential degradation of aromatic hydrocarbons by a microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 74: 109-115.
- 3- Bai N., Wang Sh., Abuduaini R., Zhang M., Zhu X., and Zhao Y. 2017. Rhamnolipid-aided biodegradation of carbendazim by *Rhodococcus* sp.D-1: Characteristics, products, and phytotoxicity. *Science of the Total Environment* 590-591: 343-351.
- 4- Barin R., Talebi M., and Beheshti M. 2014. Fast bioremediation of petroleum-Contaminated soil by consortium of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11(6): 1701-1710.
- 5- Bezza F.A., and Chirwa E.M.N. 2016. Pyrene biodegradation enhancement potential of Lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain. *Journal of Hazardous Materials* 318: 218-227.
- 6- Bodour A., and Miller-Maier R.M. 1998. Application of a modified drop collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganism. *Journal of Microbiological Methods* 32: 273-280.
- 7- Bushnell and Haas. 1941. *Journal of Bacteriology* 41: 653.
- 8- Chebbi A., Hentati D., Zaghden H., Baccar N., Rezgui F., Chalbi M., Sayadi S., and Chamkha M. 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 122: 128-140.
- 9- Chen S.Y., Wei Y.H., and Chod J.S. 2007. Repeated pH-salt fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 67-74.
- 10- Das K., and Mukherjee A.K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* 98: 1339-1345.
- 11- Das P., Mukherjee S., and Sen R. 2008. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere* 72: 1229–1234.
- 12- Dhote M., Kumar A., and Juwarkar A. 2018. Petroleum contaminated oil sludge degradation by defined consortium: Influence of biosurfactant production. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 88(2): 517- 523.
- 13- Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., and Mohn W.W. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 275-284.
- 14- Ghazali F.M., Abdul Rahman R.N.Z., Salleh A., and Mahiran B. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 61-67.
- 15- Hamzah A., Sabturan N., and Radiman. 2013. Screening and optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria. *Sains Malaysiana* 42(5): 615-623.
- 16- Hilyard E.J., Jones-meehan J.M., Spargo B.J., and Hill R.T. 2008. Enrichment, isolation and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth river sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 74(4): 1176-1182.
- 17- Hu X., Wang C., and Wang P. 2015. Optimization and characterization of biosurfactant production from marine *Vibrio* sp. Strain 3B-2. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-110.
- 18- Kamyabi A., Nouri H., and Moghimi H. 2011. Synergistic effect of *Sarocladium* sp. and *Cryptococcus* sp. co-

- Culture on crude oil biodegradation and biosurfactant production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182(1): 324-334.
- 19- Kanaly R.A., and Harayama SH. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 182(8): 2050-2067.
 - 20- Larik L.A., Qazi M.A., Phulpoto A.H., Haleem A., Ahmed S., and Kanhar N.A. 2017. *Stenotrophomonas maltophilia* strain 5DMD: an efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil. *International Journal of Environmental Science and Technology* 1-10.
 - 21- Li L., Li Q., Li F., Shi Q., Yu B., Liu F., and Xu P. 2006. Degradation of carbazole and its derivatives by a *Pseudomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 941-948.
 - 22- Lily M.K., Bahuguna A., Dangwal K., and Garg V. 2009. Degradation of Benzo (a) Pyrene by novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447). *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 884-89.
 - 23- Lotfabad T.B., Sourian M., Roostazad R., Najafabadi A.R., Adelzadeh M.R., and Noghabi K.A. 2009. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 69: 183-193.
 - 24- Mnif I., Rihab S., and Dhouha Gh. 2017. Application of bacterial biosurfactant for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Safety and Environmental Protection* 109: 72-81.
 - 25- Mnif I., Sahnoun R., and Ellouze-Chaabouni S. 2013. Evaluation of *B. subtilis* SPB1 biosurfactants potency for diesel-contaminated soil washing: optimization of oil desorption using Taguchi design. *Environmental Science and Pollution Research International* 2: 851-861.
 - 26- Mnif I., Sahnoun R., Ellouze-Chaabouni S., and Ghribi D. 2013a. Evaluation of *B. subtilis* SPB1 biosurfactants' potency for diesel-contaminated soil washing: optimization of oil desorption using Taguchi design. *Environmental Science and Pollution Research* 21(2): 851-861.
 - 27- Mohanty S., and Mukherji S. 2013. Surfactant aided biodegradation of NAPLs by *Burkholderia multivorans*: comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR-515. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102: 644-652.
 - 28- Montagnolli R.N., Lopes P.R.M., and Bidoia E.D. 2015 Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental Monitoring and Assessment* 187: 4116-4133.
 - 29- Mukherjee A.K., and Bordoloi N.K. 2012. Biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated bacterial consortium. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 3380-3388.
 - 30- Owsianiak M., Chrzanowski L., Szulc A., Staniewski J., Olszanowski A., Olejnik-Schimdt A.K., and Heipieper H. 2009. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and addition of biosurfactants. *Bioresource Technology* 100: 1497-1500.
 - 31- Parvaresh B.V., Soniyamby A.R., Mariappan C., Kavithakumari P., Palaniswamy M., and Lalitha S. 2011. Biosurfactant production by *Pseudomonas* Sp from soil using whey as carbon source. *New York Science Journal* 4(4): 100-103.
 - 32- Patowary K., Patowary R., Kalita M.C., and Deka S. 2016. Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation Consortium for potential remediation of hydrocarbons from contaminated sites. *Frontiers in Microbiology* 7: 1092.
 - 33- Patowary R., Patowary K., Kalita M.G.H., and Deka S. 2018. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 129: 50-60.
 - 34- Pereira J.F.B., Gudina E.J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J.A., Coutinho J.A.P., et al. 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111: 259-68.
 - 35- Pugazhendi A., Qari H., Al-Badry Basahi J.M., Godon J.J. and Dhavamani J. 2017. Role of a halothermophilic bacterial consortium for the biodegradation of PAHs and the treatment of petroleum wastewater at extreme conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 121: 44-54.
 - 36- Robert M., Mercade M.E., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A., and Guinea J. 1989. Effect of the carbon source on Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters* 11: 871-874.
 - 37- Sathishkumar M., Binupriya A. R., Baik S.H., and Yun S.E. 2008. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *Clean* 36: 92-96.
 - 38- Singh G.B., Gupta S., and Gupta N. 2013. Carbazole degradation and biosurfactant production by newly isolated *Pseudomonas* sp. strain GBS.5. *International Biodeterioration and Biodegradation* 84: 35-43.
 - 39- Srikanth Reddy M., Naresh B., Leela T., Prashanthi M., Madhusudhan N.CH., Dhanasri G., and Devi P. 2010. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. *Bioresource Technology* 101: 7980-7983.
 - 40- Tzintzun-Camacho O., Loera O., Ramirez-saad H.C., and Gutierrez-Rjas M. 2012. Comparison of mechanisms of

- hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 70: 1-7.
- 41- Urum K., and Pekdemir T. 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57: 1139-1150.
- 42- Viisimaa M., Karpenko O., Novikov V., Trapido M., and Goi A. 2013. Influence of biosurfactant on combined chemical-biological treatment of PCB-contaminated soil. *Chemical Engineering Journal* 220: 352-359.
- 43- Wongwongsee W., Chareanpat P., and Pinyakong O. 2013. Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand. *Marine Pollution Bulletin* 74: 95-104.
- 44- Wu J.Y., Yeh K.L., Lu W.B., Lin C.L., and Chang J.S. 2008. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology* 99:1157-1164.
- 45- Xu R., Zhang Z., Wang L., Yin N., and Zhan X. 2018. Surfactant-enhanced biodegradation of crude oil by mixed bacterial consortium in contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research* 15: 14437-14446.
- 46- Yin H., Qjang J., Jia Y., Ye J., Peng H., Qin H., Zhang N., and He B. 2009. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry* 44: 302-308.



Benz (a)pyrene Biodegradation Improvement Using the Biosurfactant Producing Bacterial Consortium

S. Soleymani¹- A. Lakzian^{2*}- A. Fottovat³

Received: 25-02-2019

Accepted: 17-07-2019

Introduction: Environmental contamination by crude oil and its various processing products is becoming a common phenomenon which severely damages soil and groundwater resources. Among the constituents of oil waste, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are of environmental concern because of their toxic, mutagenic and/or carcinogenic effects. Bioremediation involves the use of living microorganisms, bacteria or fungi, for detoxification of soil and water organic pollutants by biodegradation, biotransformation, and/or mineralization. Collaboration between different microbes under co-culture conditions such as co-metabolism or antagonism makes the system to perform better than a single microorganism. Total petroleum degradation is a result of a microbial consortium action, which is composed of different species with specific biochemical roles. On the other hand, the majority of components of petroleum products has low solubility in water and tends to bind to soil particles reducing their availability to microorganisms for degradation. This has been well described as a major limitation to the bioremediation of hydrocarbon contamination. The surfactants can be employed to enhance hydrocarbon biodegradation by mobilization, solubilization, or emulsification. Some microorganisms synthesize a wide range of surface-active compounds, generally called biosurfactants, which increases the bioavailability of these compounds. The application of these microbial surfactants in the remediation of hydrocarbons aims to increase their bioavailability or mobilize and remove the contaminants by pseudo-solubilization and emulsification in a treatment process. This work aimed to investigate the impact of the biosurfactant producing consortium on the benzo(a)pyrene biodegradation.

Materials and Methods: Four gasoline contaminated soils were enriched in Bushnell-Hass mineral medium with Benzo(a)pyrene (200 mg/l) for three months at 30°C. After this time, to obtain Benzo(a)pyrene-degrading isolates, 0.1 ml of soil suspensions were plated on BH agar plates containing pollutant. Three colonies with different morphological distinct properties were purified on LB agar plates. The screening of the most potent surfactant strain was assayed quantitatively using measurement of surface tension by the Du Nouy ring method. For increasing the production of biosurfactant, medium conditions including pH (6, 7, 8), temperature (25, 30, 35) and carbon source (glucose, sucrose and ribose) were optimized with fractional factorial based on Taguchi. The capability of the isolates and consortium in hydrocarbon biodegradation was investigated in liquid medium of Bushnell-Hass with 150 ppm of Benzo(a)pyrene, during 14 days. Treatments included inoculation of isolates AP₃ and BM₁ and their consortium in presence and absence of extracted isolates biosurfactants and control (no isolate and biosurfactant). Based on the results of Benzo(a)pyrene degradation in the liquid medium, AP₃ isolate, consortium and biosurfactant extracted from AP₃ were selected for soil experiment. Four sets of biodegradation experiments were carried out with soil contaminated by 150 ppm of benzo(a)pyrene for 45 days, as follows: set 1: soil + AP₃ isolate; set 2: soil + consortium; set 3: soil + consortium + AP₃ biosurfactant and set 4: blank (soil). The residual concentrations of contaminant were extracted on days 15, 30 and 45 by dichloromethane solvent and analyzed using GC-FID.

Results and Discussion: The results revealed that strains AP₃ and BM₁ showed a significant potential to produce surface-active agents in the presence of Benzo(a)pyrene as substrate, reducing the surface tension to 43 and 46 mN/m, respectively. Taguchi experimental design method was applied in order to optimize the biosurfactant production by isolates. Results of experiments indicated that the optimum biosurfactant production conditions were found to be temperature of 35° C and pH of 7, and glucose as water soluble carbon source. The produced biosurfactant reduced surface tension to 31/52 mN/m and 30/81 mN/m for BM₁ and AP₃, respectively. Biodegradation experiments of Benzo(a)pyrene in liquid cultures showed that the overall biodegradation

1, 2 and 3- PhD. Student of Biology and Professors Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

(* - Corresponding Author Email: alakzian@yahoo.com)

efficiency of the individual isolates after 14 days was lower than consortium. Bacterial consortium enhanced degradation of contaminant to 87.3% (with addition of biosurfactant) compared to 27.6% of removal in presence of BM₁ isolate. However, there was no statistically significant change in the degradation rates of contaminant in consortium with addition of AP₃ and BM₁ surfactant and surfactant free (87.3, 85.6 and 86.8%, respectively). The degradation of Benzo(a)pyrene was significantly enhanced in presence of AP₃ biosurfactant at individual BM₁ treatments (28.3 and 44.5 to 74.8%). Maximum degradation of Benzo(a)pyrene in contaminated soil was found (100%) in set 3: soil + consortium + AP₃ biosurfactant. Based on GC-MS analyses, it degraded around 100% of penzo(a)pyrene, used as the sole carbon and energy source, at an initial concentration of 150 mg L⁻¹, after 45 days of incubation, while alone consortium and isolate were able to remove 86% and 68% of hydrocarbon, respectively. Overall, these results provide evidence that consortium and AP3 biosurfactant could be potential candidates for further bioremediation.

Conclusion: The results revealed that the hydrocarbon removal efficiency of the consortium was higher than single species, and the final removal efficiency for the consortium could be reached in a considerably shorter time. The results suggest that biosurfactant-assisted bioremediation may be a promising practical bioremediation strategy for aged PAH-contaminated soils. It is evident from the results that the consortium alone and its producer species are both capable of promoting biodegradation to a large extent.

Keywords: Benz(a)pyrene Biodegradation, Biodegradation, Biosurfactant, Consortium, Hydrocarbon