[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نوزدهم، شماره ۳، صفحه ۳۷۱ – ۳۶۱ (مرداد و شهریور ۱۳۹۵)
Iran South Med J 2016;19(3): 361-371

اصلاح زیستی سواحل آلوده به PAHs با استفاده از بیوسورفکتانت تولیدی از باکتری‌های جداسازی شده از خلیج‌فارس

سهند جرفی [۱و۲*]، نعمت‌اله جعفرزاده حقیقی‌فرد [۱و۲]، مهدی احمدی [۱و۲]، افشین تکدستان [۱و۲]، محمد حسن بازافکن [۱]، سیده مریم موسوی [۱]، سمانه میرعالی [۱]

[۱] گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۲] مرکز تحقیقات فناوری‌های زیست محیطی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۶- پذیرش مقاله: ۹۴/۳/۱۸)

Archive of SID

چکیده

زمینه: PAHs محصول احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی بوده و به دلیل ماهیت نشر، آلاینده خاک و سواحل به شمار می‌روند. این ترکیبات در زمره آلاینده‌های دارای اولویت، سرطان‌زا و جهش‌زای قطعی به شمار می‌روند. دشواری اصلی پاکسازی مناطق آلوده به **PAHs**، ماهیت به شدت آبگریز این آلاینده‌ها و جذب شدید آنها به بافت خاک می‌باشد. هدف اصلی این پژوهش تعیین بازده حذف فنانترن از خاک و سواحل آلوده با استفاده بیوسورفکتانت تولید شده از گونه باکتریایی جداسازی شده از خلیج فارس بود.

مواد و روش‌ها: با غربالگری اولیه، یک گونه باسیلوس **sp** با قابلیت تولید سورفکتین در آزمایشگاه جداسازی و خالص‌سازی گردید. یک کنسرسیوم باکتریایی مخلوط متشکل از سه گونه باکتریایی با قابلیت متابولیسم فنانترن از سواحل آلوده خارک جداسازی و به عنوان بذر میکروبی استفاده شد. نمونه‌های خاک‌های دارای آلودکی مصنوعی با غلظت اولیه میلی‌گرم بر کیلوگرم ۱۰۰ و دارای آلودگی طبیعی طی ۹ هفته متوالی مورد اصلاح زیستی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بازده حذف فنانترن در نمونه‌های حاوی بیوسورفکتانت و دارای آلودگی مصنوعی و طبیعی به ترتیب ۸۲ درصد و ۳۹ درصد بود. بازده حذف در نمونه‌های دارای آلودگی مصنوعی و فاقد بیوسورفکتانت ۱۱ درصد بود.

نتیجه‌گیری: فرایند اصلاح زیستی با استفاده از بیوسورفکتانت‌های میکروبی گزینه‌ای کارامد، دوست‌دار محیط زیست و عملیاتی برای اصلاح سواحل و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به شمار می رود.

واژگان کلیدی: آلودگی سواحل، **PAHs**، بیوسورفکتانت، اصلاح زیستی

* اهواز، شهر دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده بهداشت گروه مهندسی بهداشت محیط
Email: Sahand369@yahoo.com

www.SID.ir

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)[1] در زمره ترکیبات شیمیایی آلی طبیعی متشکل از دو یا تعداد بیشتری حلقه بنزنی با آرایشی خطی یا شاخه‌دار هستند. احتراق ناقص هیدروکربن‌ها و سوخت‌های فسیلی منبع اصلی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای می‌باشند. آلودگی خاک و رسوبات به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در اطراف میادین نفتی، پالایشگاه‌ها، اسکله‌های نفتی و خطوط انتقال نفت و گاز گزارش شده است (۱).

آبگریزی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای منجر به تشدید پایداری این ترکیبات در محیط می‌شود. لذا هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به سادگی جذب فاز جامد خاک شده و پیوندهای محکمی با مواد آلی خاک تشکیل می‌دهند (۲). به دلیل مخاطرات سرطان‌زایی و جهش‌زایی برای انسان و جانوران و پایداری محیطی، آژانس حفاظت محیط زیست امریکا این ترکیبات در زمره آلاینده‌های دارای اولویت قرار داده است (۳). انواع روش‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و تلفیق آنها شامل تخریب حرارتی، شستشوی شیمیایی خاک، تخریب فتوکاتالتیکی، ازن زنی کاتالیزوری، فرایندهای فنتون متداول و اصلاح شده برای اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند. روش‌های اصلاح زیستی به دلیل دوستدار محیط زیست بودن، پویایی دینامیکی فرایند، جنبه‌های اقتصادی و اجرایی و محصولات جانبی و بقایای کمتر در محل آلوده مورد توجه محققان بوده‌اند (۴ و ۵). مشکل فرایندهای زیستی زمان بر بودن و ضرورت جداسازی و خالص سازی باکتری‌های دارای توانمندی تجزیه هیدروکربن نفتی به‌عنوان منبع کربن و انرژی است. باکتری‌ها ضرورتاً منابع کربن و انرژی را به صورت محلول وارد چرخه متابولیکی خود می‌نمایند. بنابراین، آبگریزی شدید هیدروکربن‌هایی نظیر فنانترن، آنتراسن، پایرن، فلورن، فلورانتن و غیره. امکان جذب مستقیم PAHs به وسیلهٔ باکتری‌ها از طریق تماس فیزیکی را محدود نموده و در نتیجه اصلاح زیستی خاک‌های آلوده غیرممکن خواهد بود (۷-۵). موفقیت فرایند اصلاح زیستی مستلزم افزایش انحلال‌پذیری آلاینده در محیط خاک یا رسوب است. یکی از راهکارهای دستیابی به این هدف کاربرد سورفکتانت‌ها برای افزایش جداسازی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از ذرات خاک است (۸ و ۹). سورفکتانت‌ها به دو گروه شیمیایی و زیستی (بیوسورفکتانت) طبقه‌بندی می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات دارای فعالیت سطحی هستند که به وسیله گونه‌های باکتریایی متنوعی تولید می‌شوند. این ترکیبات دوگانه دوست دارای سرهای آبدوست و آبگریز بوده که قادرند با تجمع در فاز مشترک ساختارهای نامحلول در یکدیگر با کاهش کشش سطحی و بین فازی، موجبات افزایش انحلال‌پذیری آلاینده‌ها را فراهم آورند (۱۲-۱۰).

بیوسورفکتانت‌ها به دلیل مزایایی نظیر سمیت محیطی کمتر، زیست تجزیه‌پذیری، انتخاب‌پذیری، فعالیت در دامنه وسیع دمایی، شوری و pH محیطی و قابلیت تولید زیستی، در کاربردهای محیطی به ویژه برای اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای مطلوب‌تر از سورفکتانت‌های شیمیایی به شمار می‌روند (۱۵-۱۳). کاربرد موفقیت‌آمیز بیوسورفکتانت‌ها در اصلاح خاک‌های آلوده به PAHs و نیز تجزیه لکه‌های نفتی با بازده‌های حذف بالای ۸۰ درصد در مطالعات گزارش شده است (۱۰). در

[1] Poly Cyclic Aromatic Hydrocarbons

www.SID.ir
Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

پژوهش فعلی قابلیت باکتری‌های باسیلوس جداسازی شده از آب‌های ساحلی خلیج‌فارس در تولید سورفکتین به منظور حذف فنانترن از خاک‌های دارای آلودگی مصنوعی به فنانترن به عنوان هدف اصلی تحقیق تعیین شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فنانترن

جداسازی و غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه کننده فنانترن بر اساس روش جرفی و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد (۱۶). به طور خلاصه ۱۰ گرم خاک از مناطق دارای آلودگی نفتی در جنوب ایران به آزمایشگاه منتقل و بخشی از آن به یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی بافر فسفاته اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه به وسیله یک همزن مغناطیسی به شدت همزده شد. در ادامه خاک به مدت ۱۰ دقیقه ته‌نشین شد و سوپرناتانت آن جداسازی و به عنوان منبع باکتری‌های تجزیه کننده فنانترن به کار رفت. در ادامه ۵ میلی‌لیتر از این فاز محلول رویین به یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۵ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی استریل منتقل گردید.

ترکیب محیط کشت معدنی مورد استفاده در پژوهش عبارت بود (گرم بر لیتر) از K_2HPO_4 ۶/۳، KH_2PO_4 ۱/۸، عصار مخمر ۱، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۱، $CaCl_2.H_2O$ ۰/۱، $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۱، $MnSO_4.H_2O$ ۰/۱ و ۱ میلی‌لیتر محلول عناصر جزئی. ترکیب محلول عناصر جزئی عبارت بود از (گرم بر لیتر): H_3BO_3 ۰/۰۳، $ZnSO_4.7H_2O$ ۰/۰۱، $CoCL_2.6H_2O$ ۰/۰۲، $NaMoO_4$ ۰/۰۰۶، $CuSO_4.2H_2O$ ۰/۰۰۱ (۱۷). pH همه محیط‌های کشت با استفاده از محلول‌های اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم بر روی ۷ تنظیم و استریل می‌شدند. فنانترن با خلوص ۹۶ درصد از مرک خریداری شده و به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط‌های کشت اضافه می‌شد. فنانترن با فرمول شیمیایی $C_{14}H_{10}$ و انحلال‌پذیری بسیار اندک در آب به عنوان آلاینده مدل انتخاب و ابتدا در n- هگزان حل و پس از تشکیل یک امولسیون قابل دسترس برای باکتری‌ها به محلول‌های کشت افزوده می‌شد. ارلن‌های حاوی محیط کشت در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد بر روی یک شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. رشد با پایش جذب در OD600 پایش می‌شد. پس از ۷ روز، ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت‌های غنی‌سازی به ارلن مایرهای تازه و استریل حاوی محیط کشت معدنی دارای فنانترن اضافه می‌شد. این عمل به مدت ده هفته تکرار گردید. برای جداسازی گونه‌های خالص تجزیه کننده فنانترن، ۱ میلی‌لیتر از فاز محلول رویین کشت در انتهای هفته دهم، تا رقت 10^{-4} ترقیق و بروی محیط کشت جامد اختصاصی (فنانترن + آگار + محیط کشت معدنی) کشت داده شدند. فنانترن با انحلال در n- هگزان و عبور از صافی سرسرنگی PTFE به محیط کشت افزوده می‌شد. تبخیر حلال پس از چند دقیقه منبع کربن را در اختیار قرار می‌داد (۱۸ و ۱۹). این محیط‌های کشت به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کشت جامد بر روی محیط‌های کشت جامد شامل آگار تهیه شده در محلول مواد معدنی و فنانترن به عنوان یگانه منبع

www.SID.ir
Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

کربن و انرژی کشت داده شدند. در هر سری کشت، کلونی‌های دارای فنوتیپ یکسان جداسازی و مجدداً هر کلونی مجزا به صورت منفرد بر روی محیط کشت جامد اختصاصی کشت داده می‌شدند. این عمل ۵ مرتبه تکرار و در نهایت سه گونه خالص با بیشترین نرخ رشد به عنوان سوبه‌های منتخب تجزیه کننده فنانترن در تشکیل کنسرسیوم نهایی انتخاب شدند. سه گونه خالص با کدهای F1، F2 و F4 برای مرحله اصلاح زیستی انتخاب شدند.این کلونی‌های منتخب به عنوان گونه‌های تجزیه کننده فنانترن در اسلنت نوترینت آگار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تولید و خالص‌سازی بیوسورفکتانت

بیوسورفکتانت سورفکتین مورد استفاده در پژوهش فعلی از یک گونه باکتریایی باسیلوس sp استخراج و در مطالعه به‌کار رفت. جداسازی و غنی‌سازی سویه باکتریایی تولید کننده بیوسورفکتنت بر اساس روش سائکی و همکاران (۲۰۰۹) و جرفی و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد (۱۶). به طور خلاصه ۱۰۰ میلی‌لیتر آب خلیج‌فارس از مناطق دارای آلودگی نفتی در جنوب ایران به آزمایشگاه منتقل شد. این محلول به عنوان منبع جداسازی باکتری مولد بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد (۲۰). به طور خلاصه ۲۰ میلی‌گرم فنانترن با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه معدنی و ۱ میلی‌لیتر محلول عناصر جزئی در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر مخلوط شده و pH آن بر روی ۷ تنظیم شد. محتویات ارلن مایر با استفاده از اتوکلاو استریل می‌شدند. پس از سه هفته متوالی کشت در محیط مایع و رفرش هفته‌ای این نمونه‌ها، کشت از محیط مایع به محیط‌های جامد اختصاصی منتقل گردید. در ادامه سویه‌های متعددی بر روی محیط کشت جامد اختصاصی خالص‌سازی شدند. این سویه‌های خالص در شرایط استریل به محیط کشت معدنی تازه منتقل و بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در این مرحله ۸ ارلن مایر دارای سویه خالص موجود بود. پس از سه بار تکرار کشت‌های ۱ هفته‌ای، آبگوشت‌های کشت با سرعت ۱۰۰۰۰ گرادیان به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده تا بقایای سلولی حذف شده و سپس از صافی میلی پور عبور داده می‌شدند. غربال تولید کننده‌های بیوسورفکتانت به روش جایگزینی قطره نفت انجام شد (۲۱). سوپرناتانت شفاف به عنوان منبع بیوسورفکتانت خام در نظر گرفته شد گونه باسیلوس منتخب بر اساس غربال اولیه و قطر جایگزینی نفت ۳/۴ سانتی‌متر که بیش از سایر کشت‌ها بود به عنوان سویه تولید کننده بیوسورفکتانت انتخاب شد. مبنای روش جایگزینی قطره نفت افزودن ۱۵ میکرولیتر سوپرناتانت محیط کشت مایع بر روی یک پلیت حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰ میکرولیتر نفت خام است. اگر سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت باشد، بر روی لایه نفتی رویین یک شکاف ایجاد خواهد شد. هرچه بیوسورفکتانت تولیدی از جنبه کمی و کیفی قوی‌تر باشد، قطر حفره ایجاد شده بزرگ‌تر است. کلونی گونه باسیلوس به محیط کشت نوترینت براث منتقل شده و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از این بذر میکروبی با OD600 برابر ۱ به محیط کشت تلقیح می‌شد. آنالیزهای بیوشیمیایی برای شناسایی گونه باسیلوس آسپزژیلوس SP استفاده شد. محتویات به خوبی مخلوط شده و به

www.SID.ir
Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

مدت ۷ روز در ۳۱ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با دور ۱۸۰ rpm انکوبه می‌شوند. برای استخراج بیوسورفکتات ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم: متانول با نسبت ۲ به ۱ حجمی / حجمی به مخلوط اضافه می‌شود و به مدت ۱۰ دقیقه همزده شد. سپس مخلوط از یک فیلتر کاغذی عبور داده می‌شود و برای حذف بقایای سلولی به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ گرادیان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌شود. pH محلول استخراج شده نهایی با HCL دو نرمال بر روی ۲ تنظیم شد تا بیوسورفکتانت تولیدی رسوب کند. سپس رسوبات با دور ۱۰۰۰۰ گرادیان به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. تبخیر حلال آلی تحت خلاء منجر به تولید بیوسورفکتانت خالص می‌شد (۱۶). همه آزمایشات با سه بار تکرار انجام شده و از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده می‌شد.

آلوده‌سازی رسوبات ساحلی به فنانترن

نمونه رسوب ساحلی از اسکله‌های نفتی جنوب کشور و از لایه‌های ۱ تا ۲۰ سانتی‌متری عمق خاک ساحلی برداشته شد. این نمونه از الک با مش ۲ عبور داده شد و به منظور استخراج ترکیبات آلی احتمالی سه مرتبه با استون شسته و در معرض هوای محیط خشک گردید. سپس اتوکلاو شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. برای آلوده‌سازی خاک به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۲۰ میلی‌لیتر از یک محلول ذخیره فنانترن با غلظت ۵۰۰n-Hexane میلی‌گرم بر لیتر با عبور از صافی PTFE به وسیله سرنگ به نمونه‌های خاک (۲۰ گرم خاک) تزریق شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در زیر هود و در شرایط استریل نگه داشته شده تا حلال n– هگزان کاملاً تبخیر گردد.

اصلاح زیستی

همه مطالعات به صورت ناپیوسته در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری انجام شد. به هر ارلن مایر ۲۰ گرم خاک از پیش آماده شده، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی، ۵ میلی‌لیتر بذر میکروبی با ۱=۶۰۰ OD (کنسرسیوم مخلوطی از ۳ گونه خالص جداسازی شده تجزیه کننده فنانترن) با دانسیته باکتریایی معادل MPN ۱۰۷× ۵/۶ بر ۱۰۰ میلی‌لیتر و بیوسورفکنانت با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ CMC (غلظت بحرانی میسلیوم) Critical micelle concentration اضافه شد.منظور از غلظت CMC، غلظتی از بیوسورفکتانت است که در آن غلظت کشش سطحی محلول به کمترین میزان خود رسیده و افزایش بیشتر غلظت بیوسورفکتانت تأثیری در کاهش بیشتر کشش سطحی محلول نخواهد داشت (۶ و ۱۰). این غلظت با تهیه غلظت‌های سریالی بیوسورفکتانت و رسم منحنی تغییرات کشش سطحی محلول در برابر غلظت تعیین می‌شود. نقطه عطف منحنی از جنبه کمترین کشش سطحی محلول، معادل غلظت CMC خواهد بود (۶). سپس نمونه‌ها در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه گرماگذاری شدند. پیش از گرماگذاری نمونه‌ها و قبل از تلقیح بذر باکتریایی، pH آن‌ها با استفاده از محلول‌های اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم بر روی ۷±۰/۲ تنظیم شد. نمونه‌های شاهد شامل نمونه‌های فاقد سورفکتانت، شاهد منفی به عنوان نمونه فاقد بیوسورفکتانت و نمونه فاقد جرم باکتریایی بودند. نمونه واقعی دارای غلظت فنانترن طبیعی بوده و هیچ‌گونه پیش پردازشی بر روی آن صورت نگرفت. شرایط اجرای پژوهش در جدول ۱ اشاره شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

جدول ۱) شرایط اجرای مطالعه

نوع بذر میکروبی	غلظت سورفکتین	غلظت فنانترن (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	نوع نمونه
مخلوط	CMC ۱	۱۰۰	مصنوعی
مخلوط	CMC ۲	۱۰۰	مصنوعی
مخلوط	CMC ۳	۱۰۰	مصنوعی
مخلوط	-	۱۰۰	نمونه شاهد منفی (فاقد سورفکتانت)
-	CMC ۱	۱۰۰	شاهد شیمیایی(فاقد بذر میکروبی)
مخلوط	CMC ۳	۸۲	نمونه واقعی حاوی آلودگی طبیعی

تعیین نوع خاک

نوع خاک با آنالیز دانه بندی و عناصر موجود در خاک از طریق آنالیز افتراق اشعه ایکس (XRD) و آنالیز فلورسنس اشعه ایکس (XRF) تعیین گردیدند. مشخصات دستگاه XRD به شرح زیر بود: دستگاه فیلیپس مدل PW2404 ساخت هلند، لوله Cu kα، λ: ۱/۵۴۰۵۶ انگستروم، Step size: 0/02o/s، ولتاژ: ۴۰ کیلو ولت، جریان ۳۰ میلی‌آمپر. دستگاه XRF با مارک فیلیپس و مدل PW2404 ساخت کشور هلند بود.

روش‌های آزمایشگاهی

استخراج فنانترن از خاک و سنجش آن به وسیله دستگاه GC بر اساس روش سازمان حفاظت محیط زیست امریکا به ترتیب زیر انجام شد (۲۲): توزین ۲ گرم خاک، خشک‌سازی نمونه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر حلال (استون و هگزان)، استخراج به کمک اولتراسونیک (۳۰ دقیقه با حمام اولتراسونیک)، عبور از فیلتر PTFE و تزریق ۲ میکرولیتر به دستگاه کروماتوگرافی گازی. غلظت فنانترن از طریق آنالیز کروماتوگرافی گازی (Chrompack CP 9001) مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله (FID) و برخوردار از ستون کاپیلاری HP5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر تعیین شد. دمای ستون، انژکتور و دتکتور به‌ترتیب بر روی ۲۳۰، ۲۴۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شدند. نمونه‌ها به مدت ۶۳ روز، هر هفته یک مرتبه مورد پایش قرار گرفتند.

یافته‌ها

نمونه خاک انتقالی حاوی ۲۷ درصد رس، ۳۹/۲ درصد سیلت و ۳۳/۸ درصد ماسه با تخلخل ۲۹ درصد و از نوع ماسه‌ای– سیلتی بود. نتایج آنالیز XRF برای شناسایی اجزاء موجود در خاک در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲) مشخصات فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک مورد استفاده در پژوهش به دست آمده از آنالیز XRF

شاخص	میزان (٪)	شاخص	میزان (٪)
ماسه	۴۳/۸	SiO_2	۵۲/۷
رس	۱۷	P_2O_5	۰/۳۲
سیلت	۳۹/۲	K_2O	۲/۴۸
تخلخل	۲۹	CaO	۹/۷۴
رطوبت	۱۱/۳	TiO_2	۰/۵۷۶
L.O.I	۹/۵	Fe_2O_3	۵/۹۸
Na_2O	۲/۰۴	Cu	۰/۰۸
MgO	۱/۰۳۸	Sr	۰/۰۲۳
Al_2O_3	۱۵/۵۲	Zr	۰/۰۰۳

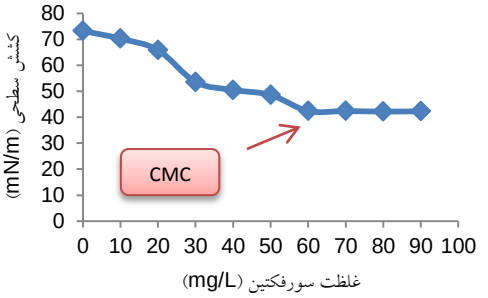
باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت

بر مبنای روش جداسازی شرح داده شده و غربالگری اولیه با آزمون جایگزینی قطره نفت، یک گونه باکتریایی با قابلیت ایجاد حفره در روآب نفتی به قطر ۴/۳ سانتی‌متر به عنوان گونه مولد بیوسورفکتانت انتخاب شد. آنالیزهای بیوشیمیایی شامل گرم مثبت، تشکیل دهنده اسپور باسیلوس SSP بود. با توجه به نوع باکتری، بیوسورفکتانت تولید از نوع سورفکتین با غلظت CMC معادل ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر بود (نمودار ۱). بیوسورفکتانت سورفکتین مورد استفاده کشش سطحی نمونه را به ۳۱/۲ میلی‌نیوتن بر مترکاهش داد.

Archive of SID

www.SID.ir

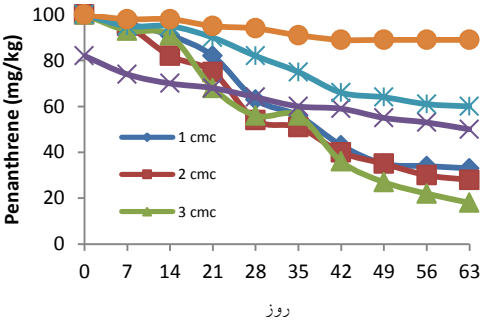
[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018



نمودار ۱) تغییرات کشش سطحی به موازات افزایش غلظت بیوسورفکتانت با هدف تعیین غلظت CMC

حذف فنانترن

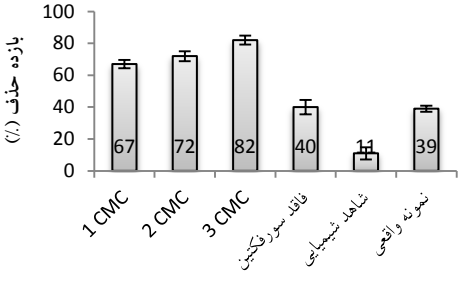
بازده حذف فنانترن در ۹ هفته متوالی پایش شد. بازده حذف فنانترن به ازای غلظت اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نمونه‌های حاوی ۱، ۲ و ۳ CMC در پایان هفته نهم به ترتیب ۶۷ درصد، ۷۲ درصد و ۸۲ درصد بود. غلظت اولیه فنانترن در نمونه خاک واقعی آلوده به هیدروکربن‌های نفتی ۸۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که پس از اعمال شرایط اصلاح زیستی مشابه نمونه‌های دارای آلودگی مصنوعی و غلظت بیوسورفکتانت CMC ۳ به ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافت (نمودار ۲). غلظت فنانترن باقی مانده در نمونه دارای بذر میکروبی و فاقد بیوسورفکتانت سورفکتین در انتهای هفته نهم ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. همچنین غلظت فنانترن باقی مانده در شاهد فاقد بذر میکروبی در انتهای هفته نهم ۸۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (نمودار ۲).



نمودار ۲) تغییرات غلظت فنانترن در شرایط راهبری مختلف: نمونه‌های سنتتیک با غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت، نمونه سنتتیک فاقد بیوسورفکتانت، نمونه واقعی و شاهد شیمیایی

مقایسه شرایط مختلف اصلاح زیستی

بازده حذف فنانترن در شرایط مختلف مورد مطالعه در نمودار ۳ نشان داده شده است. بیشترین بازده حذف مشاهده شده در نمونه حاوی سورفکتین به میزان ۳ برابر غلظت CMC با بازده حذف ۸۲ درصد و متعاقب آن نمونه‌های حاوی ۲ و ۱ CMC با بازده‌های حذف به ترتیب ۷۲ و ۶۷ درصد مشاهده شد. همچنین نمونه فاقد هرگونه بیوسورفکتانت دارای بازده حذف ۴۰ درصد بود. بازده حذف فنانترن در نمونه واقعی ۳۹ درصد و در شاهد شیمیایی ۱۱ درصد بود



نمودار ۳) مقایسه بازده حذف فنانترن در شرایط مختلف مطالعه در پایان روز ۶۳ام

بحث

بیشترین بازده حذف در نمونه‌های حاوی ۳ CMC سورفکتین به میزان ۸۲ درصد به دست آمد که بسیار بیشتر از بازده حذف در نمونه‌های فاقد هرگونه سورفکتانت بود. این برتری به اثر محلول کنندگی بیوسورفکتانت در زمان مشابه نسبت داده می‌شود. بازده حذف در نمونه‌های واقعی ۳۹ درصد بود. این بازده حذف کمتر از شرایط مشابه آزمایشگاهی است که علت آن غلظت‌های تجمعی بالاتردر حضور سایر هیدروکربن‌های آروماتیک و خطی و نیز هرگونه ماده آلی زیست تجزیه‌پذیر است که غلظت کل محتوای آلی خاک را در مقایسه با نمونه سنتتیک افزایش می‌دهد. لکن این بازده حذف با نمونه مصنوعی فاقد بیوسورفکتانت در

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

زمان مشابه برابری می‌نماید. علت این برابری وجود بیوسورفکتانت در نمونه واقعی در مقایسه با عدم وجود آن در نمونه سنتتیک است. لذا علی‌رغم غلظت تجمعی اولیه بالاتر و متنوع‌تر در نمونه واقعی، برای زمان واکنش مشابه بازده‌های تقریباً یکسانی به دست آمده است.

فرادجی و همکاران (۲۰۱۴) تجزیه نفتالن و نفت خام را به وسیله سویه‌های استرپتومایسس sp مطالعه نمودند که بازده حذف نفتالن به وسیله سویه‌های مولد بیوسورفکتانت ۸۱ الی ۸۳ درصد پس از ۱۲ انکوباسیون بود. حذف نفت خام پس از ۳۰ روز آغاز گردید (۲۳). بازده حذف مطلوب در مطالعه آنها در زمان‌های کمتر از مطالعه فعلی به دست آمد که علت آن می‌تواند اختلاف در غلظت آلایندگی و نوع هیدروکربن مورد تجزیه باشد.

آید (Ayed) و همکاران (۲۰۱۵) افزایش انحلال‌پذیری و تجزیه زیستی گازوئیل را به وسیله سویه‌های باسیلوس مطالعه نمودند. بیوسورفکتانت تولیدی از نوع سورفکتین کشش سطحی محیط محلول را به کمتر از ۳۰ میلی‌نیوتن بر متر کاهش داده و غلظت CMC آن حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. قابلیت کاهش کشش سطحی همانند بیوسورفکتانت تولیدی در مطالعه فعلی و غلظت CMC آن بیشتر بود.این بیوسورفکتانت بازده انحلال‌پذیری گازوئیل را تا ۷۱ درصد بهبود بخشید (۲۴).

ژیائو- هانگ (Xiao-Hong) و همکاران (۲۰۱۰) اثر بیوسورفکتانت و سورفکتانت‌های شیمیایی را بر تجزیه زیستی فنانترن در خاک مطالعه نمودند. افزودن بیوسورفکتانت معدنی شدن فنانترن را طی ۱۰ روز به ۹۹ درصد افزایش داد در حالی که بازده معدنی شدن در نمونه‌های فاقد سورفکتانت ۸۳ درصد بود. بازده حذف فنانترن و نیز زمان معدنی شدن در این پژوهش برتر از مطالعه فعلی است که علت آن می‌تواند غلظت اولیه فنانترن کمتر، تفاوت نوع بذر میکروبی و نوع بیوسورفکتانت باشد. لکن اثر بهبود دهنده کاربرد بیوسورفکتانت در مطالعه آنها نیز اثبات شد که این روند در پژوهش فعلی نیز مشاهده گردید (بازده حذف ۸۲ درصدی در نمونه‌های حاوی سورفکتین در مقایسه با بازده ۴۰ درصدی در نمونه‌های فاقد آن) (۲۵). یکی از دلایل احتمالی حذف ۴۰ درصدی فنانترن در نمونه‌های فاقد هرگونه بیوسورفکتانت، علاوه بر توانمندی‌های ذاتی سویه باکتریایی تلقیح شده و انحلال بسیار جزئی فنانترن نمی‌تواند به تولید ترکیبات پلیمری خارج سلولی (EPS) از این باکتری‌ها و نیز انتشار آنها در محلول واکنش پس از مرگ این باکتری‌ها باشد. این امر به افزایش دسترسی زیستی به آلاینده آبگریز کمک می‌نماید، هر چند که خصوصیات این EPSها شامل غلظت CMC، شاخص امولوسیون کنندگی و قدرت کاهش کشش سطحی در مقایسه با انواع دیگر نظیر رامنولیپیدها و سورفکتین‌ها بسیار ضعیف‌تر می‌باشد. این فرضیه در برخی مطالعات مشابه مورد تصریح قرار گرفته است (۲۶). اما از آنجا که EPSها دارای سرهای آبدوست و آبگریز هستند، قادر به عرضه خصوصیات سطحی متنوعی بوده و انحلال کنندگی هیدروکربن‌های آبگریز را ارتقاء می‌دهد. در اولین مرحله، یک سری نیروهای جاذبه نظیر واکنش متقابل آبگریزی EPS و فنانترن را به هم نزدیک می‌کند (۲۷).

واکنش متقابل بیوسوررفکتانت و هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای خود به خودی و گرمازاد بوده و پیوند آنها تحت تأثیر غالب واکنش‌های متقابل آبگریزی است. از سوی دیگر آنزیم‌های درون EPSها شامل اکسیدورداکتازها و هیدرولازها نقش مهمی در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای ایفا می‌نماید. برخی ترکیبات سمی مقاوم به وسیله اکسیدورداکتازهایی نظیر لاکاز، پلی‌فنول اوکسیداز و

www.SID.ir
Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

کاتالاز که با تجزیه هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای در ارتباطند، تجزیه می‌شوند (۲۸). این عوامل در تجزیه فنانترن در نمونه‌های فاقد هرگونه بیوسورفکتانت مؤثر بوده‌اند. نمونه شیمیایی فاقد بذر میکروبی تنها ۱۱ درصد حذف به همراه داشته که به علت اثرات جذب سطحی نوع خاک مورد استفاده است. آنالیز خاک مورد استفاده در پژوهش نشانگر وجود ۱۷ درصد رس می‌باشد که می‌تواند در بروز اثرات جذب سطحی تأثیر داشته باشد. به دلیل فقدان بذر میکروبی هیچ‌گونه حذف زیستی رخ نداده و حتی واجذب و شستشوی شیمیایی به دلیل افزودن بیوسورفکتانت اندک بوده است. با مقایسه نتایج این نمونه‌ها با نمونه‌های حاوی بذر میکروبی و فاقد بیوسورفکتانت می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اثر وجود بذر میکروبی و اصلاح زیستی بیش از حضور بیوسورفکتانت و واجذب شیمیایی است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان اظهار نمود که باکتری‌های بومی جداسازی شده از خلیج‌فارس و رسوبات آلوده آن قابلیت مناسبی برای غنی‌سازی و استفاده در حذف هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از جمله فنانترن دارند که تلفیق این باکتری‌ها با کاربرد بیوسورفکتانت سورفکتین پتانسیل بسیار مناسبی برای اصلاح زیستی خاک‌ها و رسوبات آلوده نفتی در کرانه‌های ساحلی دارد. مطالعات تکمیلی برای تعمیم نتایج این پژوهش به مقیاس واقعی و افزایش بازده حذف هیدروکربن‌ها در حضور انواع آلاینده‌ها و عوامل مداخله‌گر دیگر پیشنهاد می‌شود.

سپاس و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را به دلیل حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز ابراز می‌دارند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Boll E, Johnsen A, Christensen JH. Polar metabolites of polycyclic aromatic compounds from fungi are potential soil and groundwater contaminants. Chemosphere 2015; 119: 250-7.
2.Feng T, Lin H, Guo Q, et al. Influence of an arsenate-reducing and polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading Pseudomonas isolate on growth and arsenic accumulation in Pterisvittata L. and removal of phenanthrene. Int Biodeter Biodeg 2014; 94: 12-8.
3.Joseph-Ezra H, Nasser A, Mingelgrin U. Surface interactions of pyrene and phenanthrene on Cu-montmorillonite. Appl Clay Sci 2014; 95: 348-56.
4.Roy AS, Baruah R, Borah M, et al. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. Int Biodeter Biodeg 2014; 94: 70-89.
5.Shin D, Nam K. Potential use of a self-dying reporter bacterium to determine the bioavailability of aged phenanthrene in soil: Comparison with physicochemical measures. J Hazar Mater 2014; 265: 1-7.
6.Assadi T, Bargahi A, Nabipour I, et al. Determination of fatty acid composition of halophyte plant (Suaeda vermiculata) collected from the shorelines of Persian Gulf region (Bushehr Province). Iran South Med J 2014, 17: 638-46. (Persian)
7.Zhao HP, Wu QS, Wang L, et al. Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China. J Hazard Mater 2009; 164: 863-9.
8.Bogan BW, Trbovic V. Effect of sequestration on PAH degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin, and soil porosity. J Hazard Mater 2003; 100: 285-300.

www.SID.ir
Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

9.Ravanipour M, Rezaie Kalantary R, Farzadkia M, et al. Determine the Efficacy of Salinity on bioremediation of Polluted Soil by Phenanthrene. Iran South Med J 2011; 14: 23-30. (Persian)
10.Vaz DA, Gudina EJ, Alameda EJ, et al. Performance of a biosurfactant produced by a Bacillus subtilis strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. Colloids Surf B Biointerfaces 2012; 89: 167-74.
11.Reddy MS, Naresh B, Leela T, et al. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of Brevibacillus sp. Bioresourc Technol 2010; 101: 7980-3.
12.Pornsunthorntawee O, Wongpanit P, Chavadej S, et al. Structural and physicochemical characterization of crudebiosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa SP4 isolatedfrom petroleum-contaminated soil. Bioresour Technol 2008; 99: 1589-95.
13.Xiao-Hong P, Xin-Hua Z, Shi-Mei W, et al. Effects of a Biosurfactant and a Synthetic Surfactant on Phenanthrene Degradation by a Sphingomonas Strain. Pedosphere 2010; 20: 771-9.
14.Pan X, Liu J, Zhang D. Binding of phenanthrene to extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic activated sludge: a fluorescence study. Colloids Surf B Biointerfaces 2010; 80: 103-6.
15.Hilliou L, Freitas F, Oliveira R, et al. Solution properties of an exopolysaccharide from a Pseudomonas strain obtained using glycerol as sole carbon source. Carbohydr Polym 2009; 78: 526-32.
16.Jorfi S, Rezaee A, Mobehali GA, et al. Application of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa SP4 for bioremediation of soils contaminated to pyrene. Soil Sed Conta Int J 2013; 22: 890-911.
17.Nayak AS, Vijaykumar M, Karegoudar T. Characterization of biosurfactant produced by Pseudoxanthomonas sp. PNK-04 and its application in bioremediation. Int Biodeter Biodeg 2009; 63: 73-9.
18.Kalantary RR, Badkoubi A, Mohseni-Bandpi A, et al. Modification of PAHs Biodegradation with Humic Compounds, Soil and Sediment Contamination. Soil Sediment Contamin Int J 2013; 22: 185-98.
19.Gaskin S, Bentham R. Comparison of enrichment methods for the isolation of pyrene-degrading bacteria. Int Biodeter Biodeg 2005; 56: 80-5.
20.Lotfabad TB, Shourian M, Roostaazad R, et al. An efficient biosurfactant-producing bacterium Pseudomonas aeruginosa MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. Colloid Surface B Biointerfaces 2009; 69: 183-93.
21.Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Methods 2004; 56: 339-47.
22.United states environmental protection agency. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) 2008. (Accessed April 22, 2010, at http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/priority.htm)
23.Ferradji FZ, Mnif S, Badis A, et al. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing Streptomyces spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). Int Biodeter Biodeg 2014; 86: 300-8.
24.Ayed HB, Jemil N, Maalej H, et al. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from Bacillus amyloliquefaciens AN6. Int Biodeter Biodeg 2015; 99: 8-14.
25.Xiao-Hong P, Xin-Hua Z, Shi-Mei W, et al. Effects of a Biosurfactant and a Synthetic Surfactant on Phenanthrene Degradation by a Sphingomonas Strain. Pedosphere 2010; 20: 771-9.
26.Jia C, Li P, Li X, et al. Degradation of pyrene in soils by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from liquid cultures. Process Biochem 2011; 46: 1627-31.
27.Hilliou L, Freitas F, Oliveira R, et al. Solution properties of an exopolysaccharide from a Pseudomonas strain obtained using glycerol as sole carbon source. Carbohydr Polym 2009; 78: 526-32.
28.Gianfreda L, Rao MA. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. Enzyme Microb Technol 2004; 35: 339-54.

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.3.361]

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:44 +0430 on Sunday April 29th 2018

Iran South Med J 2016; 19(3): 361-371

Original Article

Bioremediation of polluted beaches with PAHs by using biosurfactant produced by bacterium isolated from Persian Gulf

S. Jorfi [1,2*], N. Jafarzadeh Haghighifard [1,2], M. Ahmadi [1,2], A. Takdastan [1,2], MH. Bazafkan [1], M. Mousavi [1], S.Mirali [1]

[1] Department of Environmental Health, School of Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

[2] Environmental Technologies Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz , Iran

(Received 25 Feb, 2015 Accepted 8 Jun, 2015)

Abstract

Background: PAHs was producted from incomplete combustion of fossil fuels and due to nature of publishing, it was categorized as the soil and beaches pollutant. These compounds are considered in pollutants which have priority, carcinogenic and certain mutagenic. The main difficulty of clearing contaminated areas to PAHs is the nature of highly water repellent of these pollutants and a strong attraction to the soil texture. The main objective of this current study was to determine the efficiency of phenanthrene removal from contaminated soil and beaches by using biosurfactant produced by a bacterium isolated from Persian Gulf.

Materials & Methods: with primary screening, a *Bacillus sp* strain with surfactin production capability was isolated and purified in laboratory. A mixed bacterial consortium isolated which was consists of three bacterial species with of capable of metabolism of phenanthrene from Khark contaminated beaches and was used as a microbial seed. The synthetic soil samples with initial phenanthrene concentration of 100 mg/kg and also natural contaminated samples were subjected to bioremediation during 9 weeks.

Results: The phenanthrene removal efficiency in the samples containing biosurfactants and with artificial and natural pollution were 82% and 39% respectively. The removal efficiency for samples without biosurfactant was 11%.

Conclusion: The bioremediation process is considered an efficient, eco-friendly and operational for remediation of beache and soil polluted by petroleum hydrocarbons by using bacterial biosurfactant.

Key words: beches polluted, PAHs, Biosurfactan, Bioremediation

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Jorfi S, Jafarzadeh Haghighifard N, Ahmadi M, Takdastan A, Bazafkan MH, Mousavi M, Mirali S. Bioremediation of polluted beaches with PAHs by using biosurfactant produced by bacterium isolated from Persian Gulf. Iran South Med J 2016; 19(3): 361-371.

Copyright © 2016 Jorfi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

Address for correspondence: Department of Environmental Health Engineering, School of public Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. Email:Sahand369@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir