

بررسی تولید بیوسورفاکتانت توسط کنسرسیوم باکتریایی جدا شده از خاک آلوده به مواد نفتی

سحر سلیمانی، امیر لکزبان¹، امیر فتوت و محمودرضا رمضان‌پور

دانشجوی دکترای بیولوژی خاک دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛ soleymani.s1387@yahoo.com

استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛ alakzian@yahoo.com

استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛ afotovat@um.ac.ir

استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران؛ mrramezanpour@yahoo.com

دریافت: 98/5/9 و پذیرش: 98/9/27

چکیده

آسنفتن، یکی از اجزای طبیعی نفت خام و ترکیبی مقاوم در برابر تجزیه و سرطانزا است. زیست‌پالایی که تکنیک استفاده از ریزجانداران زنده جهت تجزیه و معدنی کردن آلاینده‌ها است، برای حذف آلودگی‌های مقاوم محیطی نظیر آسنفتن استفاده می‌شود. تجزیه کامل هیدروکربن‌ها نتیجه فعالیت ترکیبی از گونه‌های مختلف ریزجانداران بوده که به عنوان کنسرسیوم شناخته می‌شود. از سوی دیگر، حلالیت کم آلاینده‌های نفتی عامل محدود کننده زیست‌پالایی است. به همین دلیل اخیراً استفاده از کنسرسیوم‌های باکتریایی تولید کننده بیوسورفاکتانت، جهت افزایش دسترسی زیستی آلاینده‌های نفتی، در فرآیند زیست‌پالایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، با استفاده از غنی‌سازی خاک آلوده به مشتقات نفتی، باکتری‌های تجزیه کننده آسنفتن جداسازی و سپس با بررسی میزان کشتش سطحی محیط حاوی جدایه‌ها، انواع جدایه‌های باکتریایی مولد بیوسورفاکتانت غربال شدند. پس از شناسایی جدایه‌ها، تجزیه آسنفتن توسط جدایه‌های منفرد انتخابی، کنسرسیوم آن‌ها و بیوسورفاکتانت‌های استخراج شده از جدایه‌ها در دو محیط کشت و خاک بررسی شد. نتایج نشان داد که دو جدایه AP3 و BMI علاوه بر توانایی تجزیه آسنفتن، مولد بیوسورفاکتانت بوده و به ترتیب 72/2 و 54% و کنسرسیوم حاصل از آن‌ها نیز 100% از آلاینده را در محیط محلول تجزیه می‌کنند. بیوسورفاکتانت استخراج شده از جدایه AP3 در تجزیه آسنفتن مؤثرتر از بیوسورفاکتانت حاصل از جدایه BMI عمل کرد. میزان تجزیه آسنفتن در خاک توسط جدایه AP3 و کنسرسیوم به ترتیب 64/7 و 75/7% بوده و استفاده از بیوسورفاکتانت AP3 به همراه کنسرسیوم نیز موجب تجزیه کامل آسنفتن شد. شناسایی جدایه‌ها نشان داد که AP3 به میزان 100 درصد با سویه *Bacillus velezensis* CR-502(T) و جدایه BMI 99/5 درصد با سویه *Pseudomonas putida* ATCC 12633 مطابقت دارد. بنابراین، استفاده از کنسرسیوم و کاربرد بیوسورفاکتانت به همراه آن، در مقایسه با تلقیح جدایه منفرد موجب بهبود تجزیه زیستی آسنفتن شد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی‌های نفتی، باسیلوس، زیست‌پالایی، سودوموناس

¹ نویسنده مسئول، آدرس: دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه خاک

مقدمه

آسفتن ($C_{12}H_{10}$) با شکل ظاهری کریستالی به رنگ زرد، بخش طبیعی نفت خام و زغال سنگ و جزء پایدار موجود در پساب صنایع نفتی و صنعتی است (شوکن و گیسون، 1984). این ترکیب در سال 1979 توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA)¹، به عنوان یکی از 16 هیدروکربن چندحلقه‌ای آلوده کننده محیط زیست معرفی و ثبت گردید (کیث و تلیارد، 1979). حضور در تمامی اجزای محیط زیست (خاک، آب و هوا)، مقاومت در برابر تجزیه به همراه خصوصیت سرطان‌زایی این ترکیب، سبب شده است که پژوهشگران به دنبال راهی جهت حذف و پاکسازی آن از محیط باشند. زیست پالایی روشی مناسب، کم هزینه و دوستدار محیط زیست است که جهت حذف آلاینده‌های مقاوم و پایدار محیطی، استفاده می‌شود (هولتمن و کوبایاشی، 1997). این روش شامل استفاده از ریزجانداران زنده برای کاهش سمیت آلاینده‌های آب و خاک به وسیله تجزیه زیستی، تبدیل و معدنی کردن آن‌ها می‌باشد (مونتاگنولی و همکاران، 2015؛ منیف و همکاران، 2015). بررسی‌های مختلف طی سال‌های اخیر نشان داد که سویه‌های مفرد باکتریایی همچون *Pseudomonas sp.* (الیس و همکاران، 1991)، *Bacillus sp.* (پیناکونگ و همکاران، 2004)، *Sphingomonas sp.* *Beijerinckia sp.* (فوسال و همکاران، 2013)، *Burkholderia cepacia* (شی و همکاران، 2001) قادر به تجزیه آسفتن می‌باشند.

با این حال پژوهشگران معتقدند، تجزیه کامل هیدروکربن‌ها نتیجه فعالیت ترکیبی از گونه‌های مختلف (کنسرسیوم باکتریایی) با نقش‌های بیوشیمیایی خاص می‌باشد. در واقع هریک از سویه‌های باکتریایی دارای مکانیزم آنزیمی منحصربفردی بوده و طیف خاصی از ترکیبات نفتی را تجزیه می‌کنند (مونتاگنولی و همکاران، 2015). به همین دلیل افزایش سرعت و میزان تجزیه زیستی ترکیبات یاد شده، نیازمند حضور اجتماع گونه‌های متفاوت با ظرفیت آنزیمی وسیع، می‌باشد. حضور گونه‌ها و جنس‌های باکتریایی متفاوت در خاک و آب آلوده به آلاینده‌های نفتی، تأییدکننده نقش منحصر به فرد هر یک در فرآیند تغییر شکل این ترکیبات است (تزیین زون- کاماچون و همکاران، 2012). نتایج حاصل از بررسی تأثیر کنسرسیوم‌های باکتریایی بر تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی، نیز این مسئله را تأیید کرده‌اند (مائو و همکاران، 2016؛ منیف و همکاران، 2017).

اما انحلال کم ترکیبات نفتی در آب و تمایل آن‌ها به اتصال با ذرات خاک، سبب کاهش فراهمی این ترکیبات برای تجزیه کنندگان زیستی شده و به عنوان عامل محدود کننده زیست‌پالایی شناخته می‌شود. (لواندوسکا و والورژیک، 2010). پژوهش‌های مختلف طی سال‌های اخیر نشان داده‌اند که استفاده از سورفاکتانت‌ها با مکانیسم‌های متفاوتی مانند تأثیر بر میزان نامیزگی²، انحلال میسلی و تسهیل انتقال توده‌ای سبب افزایش میزان فراهمی و دسترسی آلاینده‌های آبگریز برای ریزجانداران می‌شوند. (موهانتی و موکرچی، 2013). مطالعات نشان داده است که برخی ریزجانداران همانند *Pseudomonas sp.* (سین و همکاران، 2013)، *Bacillus sp.* (داس و همکاران، 2008)، *Rhodococcus sp.* (بای و همکاران، 2017) و *Acinetobacter sp.* (اوحدی و همکاران، 2017) طیف گسترده‌ای از بیوسورفاکتانت‌ها را تولید می‌کنند که سبب افزایش فراهمی آلاینده‌های آبگریز می‌شوند. استفاده از این ترکیبات در فرآیند پالایش هیدروکربن‌ها با هدف افزایش دسترسی زیستی یا انحلال آلاینده‌ها (به وسیله افزایش شبه انحلال و نامیزگی)، صورت می‌گیرد (چپی و همکاران، 2017).

علیرغم وجود گزارشات مختلف در زمینه تأثیر بیوسورفاکتانت و کنسرسیوم باکتریایی بر تجزیه هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای همانند نفتالن، آنتراسن، کروزن و فناترن، مطالعات مربوط به تجزیه زیستی آسفتن بسیار اندک است. با توجه به اینکه ایران به عنوان یکی از قطب‌های اصلی تولید کننده نفت و مشتقات آن، همواره در معرض خطرات ناشی از آلودگی منابع خاکی و آبی با آلاینده‌های نفتی همانند آسفتن قرار دارد، مطالعه و بررسی تجزیه آسفتن توسط کنسرسیوم باکتریایی (بومی) خاک‌های آلوده به گازوییل) و تأثیر استفاده از بیوسورفاکتانت بر روند تجزیه آن حائز اهمیت می‌باشد. در پژوهش حاضر تجزیه زیستی هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای آسفتن در دو محیط کشت و خاک توسط جدایه‌های بومی تجزیه کننده هیدروکربن که دارای توانایی تولید بیوسورفاکتانت بودند، بررسی شد.

مواد و روش

جداسازی و غربالگری جدایه‌های مولد بیوسورفاکتانت
جداسازی باکتری‌های توانمند تجزیه کننده آسفتن به وسیله غنی‌سازی چهار نمونه خاک آلوده به گازوییل، بنزین و نفت سفید صورت گرفت. نمونه‌های یک و دو مندرج در جدول 1 از اطراف مخازن نگهداری

² Emulsification¹ United States Environmental Protection Agency

بر لیتر تریپتون و کلرید سدیم، 5 گرم بر لیتر عصاره مخمر و آگار می‌باشد (لی و همکاران، 2006).

غربالگری باکتری‌های تولید کننده سورفاکتانت زیستی از میان جدایه‌های حاصل

جهت غربالگری باکتری‌های تولید کننده سورفاکتانت زیستی از میان جدایه‌های حاصل، باکتری‌ها در محیط کشت رابرت⁷ (1989) تلقیح و به مدت 96 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و با سرعت 200 دور در دقیقه، گرماگذاری شدند. پس از طی زمان یاد شده، محیط کشت حاوی جدایه‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و سرعت 4000 دور در دقیقه ساتریفیوژ شده و رومانند (سوپرناتانت) حاصله به پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی ارسال و میزان کشش سطحی نمونه‌ها به وسیله تنسیومتر دونوی (شرکت کروزر، آلمان⁸) در دمای اتاق اندازه گرفته شد. در نهایت جدایه‌ای که دارای کمترین میزان کشش سطحی بود جهت بهینه‌سازی شرایط محیط کشت انتخاب شد (روفینو و همکاران، 2014).

بهینه‌سازی شرایط تولید بیوسورفاکتانت

به منظور افزایش میزان تولید بیوسورفاکتانت توسط جدایه‌های انتخابی، میزان pH (6، 7 و 8)، دما (25، 30 و 35 درجه سانتی‌گراد) و نوع منبع کربنی اضافه (گلوکز، ساکارز و نشاسته) در محیط کشت بوشنل-هاث به کمک روش آماری تاگوچی بهینه‌سازی شد. پس از تعیین آرایش تیمارها (جدول 3) با استفاده از نرم‌افزار Minitab، تیمارها طبق آرایش مربوطه تهیه، آسنتن با غلظت 200 میلی‌گرم در لیتر و جدایه به میزان یک میلی-لیتر تلقیح و سپس به مدت 96 ساعت با سرعت 200 دور در دقیقه گرماگذاری شدند. پس از طی زمان یاد شده، نمونه‌ها و شاهد به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و با سرعت 4000 دور در دقیقه ساتریفیوژ شده و میزان کشش سطحی رومانند حاصله در پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی اندازه گیری شده و نتایج حاصل به کمک نرم‌افزار Minitab بررسی شدند. (منیف و همکاران، 2014).

تجزیه آلاینده در محیط کشت

توانایی تجزیه آسنتن توسط جدایه‌های انتخابی در محیط کشت بوشنل-هاث، به وسیله آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با 9 تیمار و سه تکرار بررسی شد. فاکتورهای آزمایش شامل جدایه‌های مولد بیوسورفاکتانت (جدایه‌های AP₃، BM₁ و کنسرسیوم

فرآورده‌های نفتی واقع در شهرهای ساری (به مختصات جغرافیایی 36/57 درجه شمالی و 53/177 درجه شرقی) و نمونه‌های سه و چهار از نواحی آلوده اطراف منابع دخیره گازیویل شهرستان بهشهر (به مختصات جغرافیایی 36/72 درجه شمالی و 53/62 درجه شرقی) جمع آوری شده و جهت انجام آزمایشات بعدی به مرکز تحقیقات تیرتاش وابسته به شرکت دخانیات ایران انتقال و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی (مندرج در جدول 1) نمونه-ها، pH گل اشباع و مقدار هدایت الکتریکی عصاره آن به ترتیب با pH متر و EC سنج اندازه گرفته شد. میزان شن، سیلت و رس نمونه‌های خاک با روش هیدرومتری (بویوکاس¹، 1962)، کربن آلی با روش والکی بلک (نلسون و سامرز²، 1982)، نیتروژن کل با استفاده از روش کجالدال³ (برمنر و مولوانی، 1965) و مقدار فسفر قابل دسترس خاک به وسیله روش اولسن⁴ (1982) اندازه گرفته شد. به منظور غنی‌سازی نمونه‌های خاک و اطمینان از سازگاری ریزجانداران بومی خاک با آلاینده نفتی، 5 گرم از هر نمونه خاک با 45 میلی‌لیتر از محیط کشت نمک معدنی بوشنل-هاث⁵ (بوشنل و هاث، 1941) حاوی 200 میلی‌گرم در لیتر آسنتن مخلوط و به مدت سه ماه بر روی شیکر و در تاریکی نگهداری شد. محیط کشت یاد شده شامل 1 گرم در لیتر از نمک‌های مونوپتاسیم فسفات، دی آمونیوم هیدروژن فسفات و نترات پتاسیم، 0/2 گرم بر لیتر سولفات منیزیم، کلرید کلسیم و کلرید آهن به ترتیب به میزان 0/05 و 0/02 گرم بر لیتر بود. در انتهای هر ماه 5 میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک به 45 میلی‌لیتر محیط بوشنل-هاث تازه حاوی 200 میلی‌گرم در لیتر آلاینده منتقل و تجدید کشت شدند (باتیستا و همکاران، 2006). با کشت و گرماگذاری 0/1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک بر روی پلیت‌های بوشنل-هاث-آگار حاوی 100 میلی‌گرم بر لیتر از آلاینده و بررسی شکل مرفولوژیکی کلنی‌های ظاهر شده، در نهایت سه جدایه AM₁، BM₁، BM₄ از نمونه‌های خاک شهرستان ساری و جدایه‌های AP₃، BP₁ و BP₂ از نمونه-های شهرستان بهشهر انتخاب و در محیط لوریا-برتانی-آگار⁶ خالص‌سازی شدند. محیط یاد شده حاوی 10 گرم

1. Bouyoucos

2. Nelson and Summers

3. Kjeldal

4. Olsen

5. Bushnell and Haas

6. Luria Bertani Agar

7. Robert

8. Kruss Company, Germany

آلاینده در محیط محلول، جدایه AP_3 ، سورفاکتانت زیستی استخراج شده از آن و کنسرسیوم باکتریایی انتخاب و توانایی آن ها در تجزیه آسفنتن در محیط خاک طی سه زمان بررسی شد. به این منظور، ده نمونه خاک غیرآلوده از 10 سانتی متری سطح مزرعه (منیف و همکاران، 2014) برنج واقع در شهرستان بهشهر جمع آوری و پس از آماده سازی 50 گرم از آن توزین و با مقدار 300 میلی گرم بر کیلوگرم خاک از آلاینده آلوده شد. به این منظور آلاینده در 2 میلی لیتر استون حل و به نمونه ها اضافه شد. پس از تبخیر حلال (حدود دو ساعت بعد)، نمونه ها با یک میلی لیتر از مایه تلقیح حاوی جمعیت $10^6 \times 300$ سلول بر میلی لیتر از جدایه تلقیح شد. در این مرحله جهت ممانعت از ورود عناصر غذایی موجود در محیط کشت، پس از رشد جدایه در محیط کشت لوریبرتانی، نمونه ها سانتریفیوژ شده، سلول های رسوب یافته دو بار توسط سرم فیزیولوژیک 0/9 درصد شستشو داده شد و سپس جمعیت یکسان از جدایه با استفاده از استانداردهای مک-فارلند تهیه و به نمونه ها تلقیح شد (بزا و چپروا، 2017). رطوبت نمونه های خاک به میزان 60 درصد ظرفیت نگهداری رطوبت تنظیم و طی دوران گرمگذاری حفظ گردید (ویسیما و همکاران، 2013).

عصاره گیری آسفنتن باقیمانده از خاک

جهت بررسی میزان تجزیه آسفنتن، در روزهای 15، 30 و 45، 5 گرم از نمونه های خاک برداشت و پس از هوا خشک شدن، با 20 میلی لیتر از حلال دیکلرومتان مخلوط شده و به مدت 16 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 (پوتین و همکاران، 2004).

آنالیز GC-FID

نمونه ها 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 25 متر، قطر داخلی 0/32 و ضخامت فیلم 0/17 میلی متر و هیدروژن به عنوان گاز حامل با فشار 5/17 نیوتن بر سانتی متر مربع و جریان 1/8 میلی لیتر بر دقیقه بود. برنامه دمایی سیستم شامل، 40 درجه سانتی گراد به مدت 3 دقیقه، 30 درجه سانتی گراد بر دقیقه تا دمای 300 درجه که به مدت 10 دقیقه ثابت نگه داشته شد. دمای تزریق کننده 290 و آشکارساز 300 درجه سانتی-گراد و میزان تزریق نیز 2 میکرولیتر طی مدت یک دقیقه

حاصل از دو جدایه (Co) و نوع بیوسورفاکتانت (بیوسورفاکتانت های استخراج شده از جدایه AP_3 و BM_1 و عدم حضور بیوسورفاکتانت) بود. به این صورت که در یک سری از آزمایش تیمارها شامل تلقیح جدایه مولد AP_3 به تنهایی (عدم تلقیح بیوسورفاکتانت)، تلقیح جدایه به همراه بیوسورفاکتانت استخراج شده از خود جدایه و تلقیح جدایه مذکور به همراه بیوسورفاکتانت استخراج شده از BM_1 بود. این آرایش برای جدایه ی مولد دیگر تکرار شد.

تیمارها پس از تلقیح با آسفنتن (به میزان 300 میلی گرم بر لیتر) و جمعیت یکسان از جدایه ها (مک-فارلند، 1907) به مدت چهارده روز در دمای 35 درجه سانتی گراد بر روی شیکر گرمگذاری و پس از طی زمان میزان آلاینده باقیمانده در نمونه ها عصاره گیری، استخراج و با GC-FID اندازه گرفته شد.

عصاره گیری آسفنتن باقیمانده در محیط کشت

جهت استخراج آسفنتن باقیمانده، پس از کاهش pH نمونه ها به 2 (به وسیله اسیدسولفوریک 3 مولار)، حجم برابر از اتیل استات به آن افزوده و به مدت 24 ساعت بر روی شیکر مخلوط شد. عصاره ها به کمک نمک Na_2SO_4 بی آب، کاملاً آبزدایی شده و پس از انتقال به ظروف مخصوص عصاره گیری به مدت 12 ساعت در معرض هوای آزاد خشک و سپس با کمک 10 میلی لیتر اتیل استات به حجم رسیده و جهت تعیین غلظت باقیمانده آلاینده به وسیله GC-FID آنالیز گردیدند (اریکسون و همکاران، 2003).

استخراج بیوسورفاکتانت

جهت استخراج بیوسورفاکتانت، کشت 96 ساعته جدایه ها سانتریفیوژ و سپس pH آن با استفاده از اسیدکلریدریک 6 نرمال به 2 کاهش داده شد. نمونه ها به مدت یک شب در یخچال نگهداری و پس از آن فاز آلی با افزودن حجم برابری از مخلوط 2 به 1 کلروفورم/متانول و به وسیله قیف جداکننده، عصاره گیری شد (منیف و همکاران، 2017).

تجزیه آلاینده در خاک: میزان تجزیه آلاینده در

خاک توسط جدایه و سورفاکتانت زیستی برتر حاصل از آزمایشات تجزیه در محیط کشت بوشنل-هات، به وسیله آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل (12 تیمار و سه تکرار) مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور اول شامل جدایه برتر، کنسرسیوم برتر، تلقیح همزمان کنسرسیوم و سورفاکتانت زیستی برتر و شاهد بوده فاکتور دوم شامل سه زمان (15، 30 و 45 روز) مورد مطالعه قرار گرفت. در واقع، باتوجه به نتایج حاصل از مرحله تجزیه

43 و 40 درصدی کشتش سطحی نسبت به شاهد شدند. به این ترتیب جدایه‌های AP₃ و BM₁ براساس توانایی آنها در استفاده از آسنتن به عنوان منبع کربن و میزان تأثیر در کاهش کشتش سطحی محیط به عنوان جدایه‌های برتر تجزیه کننده آسنتن و تولید کننده بیوسورفاکتانت انتخاب و شناسایی شدند.

شناسایی جدایه‌ها

نتایج حاصل از توالی خوانی ژن 16S rRNA نشان دادند که جدایه AP₃ به میزان 100 درصد با سویه *Bacillus velezensis* CR-502(T) و جدایه BM₁ 99/5 درصد با سویه *Pseudomonas putida* ATCC 12633 مطابقت دارد. مطالعات بسیاری توانایی گونه‌های مختلف متعلق به دو جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* را بر تجزیه هیدروکربن‌های نفتی اثبات نموده‌اند (پاتواری و همکاران، 2016؛ چن و همکاران، 2010؛ اسکندری و همکاران، 2017؛ هوانگ و همکاران، 2009؛ داس و موکرچی، 2007 و 2005؛ گرمبرگ، 1996؛ بیشتر و همکاران، 2014؛ لین و همکاران، 2011). گونه‌های مختلف *Bacillus spp.* طی سال‌های اخیر بطور فزاینده‌ای در میکروبیولوژی کاربردی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این باکتری‌ها به دلیل تولید اندوسپوره‌های مقاوم، قادر به تحمل غلظت‌های بالای آلاینده‌های هیدروکربنی بوده و به همین دلیل در فرآیندهای زیست‌پالایی بسیار موثر و مورد توجه می‌باشند (اسکندری و همکاران، 2017). از سوی دیگر، قابلیت‌های خاص *Pseudomonas spp.* در تجزیه و تخریب مواد ناشناخته (زنوبیوتیک‌ها)، همچنین بقا در شرایط خاص محیطی (دما و اسیدیته نامتعارف و شرایط سمی)، تند رشد بودن، نیاز تغذیه‌ای کم و توانایی تولید ترکیبات بیوشیمیایی همانند بیوپلیمر و بیوسورفاکتانت سبب توجه روزافزون به آن، در مطالعات مختلف شده است (یابلو-کاسلو، 2012).

در حالت اسپیلیتلس یا بدون شکاف بود (اریکسون و همکاران، 2003).

شناسایی جدایه‌ها

شناسایی جدایه‌های مورد بررسی در مرکز دخیار ژنتیکی و زیستی ایران انجام شد. به این منظور در ابتدا با استفاده از روش مرمرور¹ (1961)، DNA باکتری‌ها استخراج و پس از اطمینان از صحت استخراج، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز 1 درصد بارگذاری شدند. به منظور تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای یونیورسال 27F و 1492R متعلق به شرکت کیاژن² استفاده شد. تعیین توالی DNA با استفاده از دستگاه توالی‌یابی 3730/3730xl و روش سنگر³ (1975) در شرکت ماکروژن کره⁴ انجام شده و مقایسه توالی نوکلئوتیدها با استفاده از ژن‌بانک بلاست⁵ و در پایگاه داده‌های ایزیبیوکلود⁶ صورت گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها: داده‌های حاصل از مراحل تجزیه آلاینده در محیط مایع و خاک با نرم افزار Jump و آزمون توکی در سطح 1 درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

جداسازی و غربالگری جدایه‌های مولد بیوسورفاکتانت

غنی‌سازی و کشت نمونه‌های خاک آلوده (با خصوصیات فیزیکوشیمیایی مندرج در جدول 1) در محیط کشت نمک معدنی بوشنل‌هاث منجر به جداسازی شش جدایه با خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت شد. جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ظاهری و شکل کلنی با اسامی اختصاری AM₁، AP₃، BM₁، BM₄، BP₁ و BP₂ نامگذاری شدند (جدول 2). آزمایش اندازه‌گیری میزان کشتش سطحی جهت غربالگری جدایه‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت (جدول 3) منجر به انتخاب جدایه‌های AP₃ و BM₁ گردید. بودور و میلر مایر (1998) معتقدند که جدایه‌هایی که میزان کشتش سطحی آب خالص (72 میلی‌نیوتون بر متر در دمای 25 درجه سانتی‌گراد) را به کمتر از 40 میلی‌نیوتون بر متر کاهش می‌دهند، توانایی تولید بیوسورفاکتانت را دارا می‌باشند. بر اساس داده‌های جدول 3 میزان کشتش سطحی در جدایه‌های AP₃ و BM₁ به ترتیب 49/22 و 46/79 میلی‌نیوتون بر متر بود. در حالیکه میزان کشتش سطحی نمونه شاهد (محیط کشت بوشنل-هاث) 77/35 میلی‌نیوتون بر متر به دست آمد. بنابراین نمونه‌های مورد بررسی به ترتیب موجب کاهش

1. Marmur

2. Qiagen

3. Sanger

4. Macrogen

5. GenBank Blast

6. ezbiocloud

جدول 1- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های خاک مورد بررسی

بافت خاک	فسفر قابل دسترس	قابلیت هدایت الکتریکی	کربن آلی	نیتروژن کل	pH	رس	سیلت	شن	نمونه خاک
	mg.kg ⁻¹	dS.m ⁻¹			%				
رسی	77/5	3/2	1/86	0/12	6/6	59	35/5	5/5	1
رسی	79/9	3	1/43	0/1	6/5	52/9	41/3	5/8	2
رسی	81/1	3/3	1/9	0/17	6/7	52/8	41/9	5/3	3
رسی	79/7	3/1	1/87	0/15	6/6	55/7	39/8	4/5	4

جدول 2- خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های تجزیه کننده آسنفتن

جدایه	رنگ کلنی	شکل کلنی	اسپور	کپسول	تحرك	گرم
AM ₁	زرد کمرنگ	میله‌ای	+	+	+	+
BM ₄	شیری	باسیل کوکوسی	+	-	+	+
BP ₁	صورتی کمرنگ	باسیل رشته ای	-	-	-	-
BP ₂	شیری	خوشه‌ای	+	+	-	+
AP ₃	سفید شیری	باسیل میله‌ای	+	-	+	+
BM ₁	سفید لعابی	میله‌ای	-	-	+	-

جدول 3- میزان کشش سطحی در بین جدایه‌های باکتریایی انتخاب شده

جدایه	میزان کشش سطحی (mN/m ¹)
AP ₃	46/79
BM ₁	49/22
AM ₁	51/53
BM ₄	52/01
BP ₁	57/9
BP ₂	58/22
شاهد (محیط کشت فاقد باکتری)	77/35

جدول 4- تیمارهای بهینه سازی شرایط تولید بیوسورفاکتانت و نتایج حاصل از آن به وسیله آزمایش کسری از فاکتوریل (تاگوچی)

pH	دما	منبع کربن	میزان کشش سطحی (mN/m)	
			جدایه <i>B. velezensis</i>	جدایه <i>P. putida</i>
6	25	گلوکز	49/83	52/61
	30	نشاسته	61/7	65/18
	35	ساکارز	56/12	58/46
7	25	نشاسته	49/72	55/17
	30	ساکارز	38/66	42/98
	35	گلوکز	27/11	37/15
8	25	ساکارز	48/09	50/32
	30	گلوکز	39/58	44/43
	35	نشاسته	55/63	63/87

¹ میلی نیوتن بر متر

بهینه‌سازی شرایط تولید بیوسورفاکتانت

جدول 4 حاوی تمامی 9 تیمار آزمایشی (سه فاکتور در سه سطح) طراحی شده توسط نرم‌افزار مینی‌تیب به همراه نتایج آن (میانگین دو تکرار) می‌باشد. میزان کشتش سطحی حاصل از دو جدایه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد، اسیدیته 6 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 کشتش سطحی جدایه‌های *P. putida* و *B. velezensis* در شرایط یاد شده به ترتیب 49/83 و 52/61 میلی نیوتن بر متر بود. کمترین میزان کشتش سطحی در اسیدیته 7، دمای 35 و حضور منبع کربنی گلوکز مشاهده شد. در این شرایط میزان کشتش سطحی حاصل از کشت جدایه‌های *B. velezensis* و *P. Putida* به ترتیب 27/11 و 37/15 میلی نیوتن بر متر بوده و نسبت به شاهد به ترتیب 45/5 و 29/38% کاهش داشت. جنس و گونه باکتریایی مهمترین عامل مؤثر بر میزان تولید بیوسورفاکتانت است. به عنوان مثال حمزه و همکاران (2013) نشان دادند pH=9، دمای 37 درجه سانتی‌گراد و منبع کربنی گلیسرول، شرایط بهینه جهت تولید حداکثر میزان بیوسورفاکتانت توسط جدایه

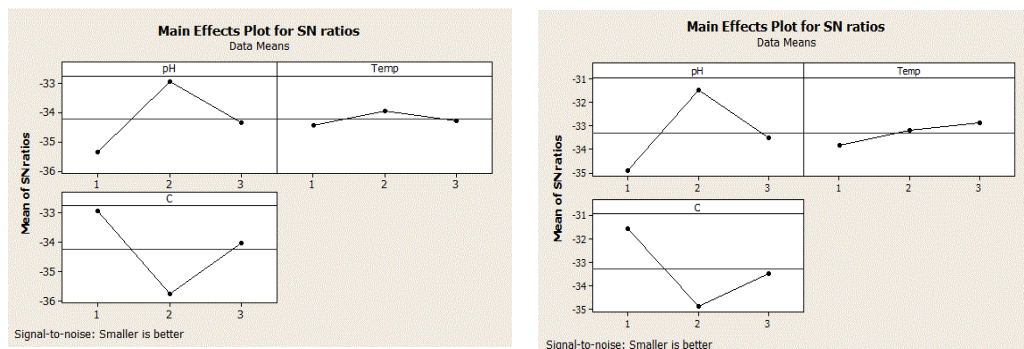
Pseudomonas aeruginosa UKMP14T می‌باشد. در حالیکه سویه *Pseudomonas aeruginosa* s6 مورد مطالعه توسط بین و همکاران (2009) در pH=9 و حضور منبع کربنی گلوکز بیشترین میزان بیوسورفاکتانت را تولید نمود. از سوی دیگر، پرورش و همکاران (2011) pH=7، دمای 35 و مقدار 3 درصد حجمی از نفت خام و لطف آباد (2009) و چن و همکاران (2007) دمای 37 درجه سانتی‌گراد را به عنوان بهترین شرایط جهت تولید حداکثر میزان بیوسورفاکتانت توسط جدایه مذکور معرفی نمودند. این موضوع در مورد گونه‌های مختلف *Rhodococcus sp.* نیز به اثبات رسیده است (پال و همکاران، 2009). در روش آماری تاگوچی نتایج و داده‌ها بر اساس میزان تاثیرگذاری فاکتورهای مورد بررسی، سنجش می‌شوند. به این ترتیب بر اساس نتایج مندرج در جدول تجزیه واریانس مربوطه (جدول 4)، بیشترین درصد اثرگذاری برای جدایه *B. velezensis* مربوط به فاکتور اسیدیته و در مورد جدایه *P. putida* منبع کربنی می‌باشد. کمترین سهم اثرگذاری نیز در مورد هر دو جدایه به فاکتور دما مربوط می‌باشد.

جدول 5- تجزیه واریانس اثر pH، منبع کربنی و دما بر بهینه‌سازی شرایط رشد *B. velezensis* (B.v) و *P. putida* (P.p) به روش تاگوچی

منبع	DF _{B.v}	DF _{P.p}	SS _{B.v}	SS _{P.p}	V _{B.v}	V _{P.p}	F _{B.v}	F _{P.p}	PS _{B.v}	PS _{P.p}	%P _{B.v}	%P _{P.p}
pH	2	2	1362/33	843/84	681/66	421/92	125/07	105/74	1351/43	413/94	49/2	38/31
دما	2	2	51/20	26/57	25/6	13/28	4/69	3/32	40/3	5/3	1/85	1/21
کربن	2	2	1295/21	1288/45	647/46	644/22	118/8	29/77	1284/31	1276/33	46/78	58/49
خطا	11	11	60/01	43/86	5/45	3/99					2/17	1/99
کل	17	17	2768/76	2202/74								

در روش آماری تاگوچی علاوه بر آنالیز داده‌ها، عامل S/N نیز جهت بیان نتیجه مطلوب استفاده می‌شود. به این معنا که هرچقدر میزان S/N در تیماری بیشتر باشد، نشان دهنده نتیجه بهتر است. عامل سیگنال به نویز (S/N)، میزان پراکندگی را حول یک مقدار مشخص بیان میکند یا به بیان دیگر اینکه جواب‌های ما در بین چند آزمایش انجام شده چگونه تغییر کرده اند. علاوه بر آن با بررسی نمودارهای S/N و میزان اختلاف سطوح، نیز می‌توان به میزان اهمیت فاکتورهای مورد بررسی پی برد. در واقع نموداری که دارای بیشترین میزان اختلاف بین سطوح باشد، دارای اثر بیشتری بوده و از اهمیت بیشتری در نتیجه آزمایش برخوردار است. به این ترتیب شکل 1

نشان می‌دهد که فاکتور منبع کربنی دارای بیشترین اثر در تغییر میزان کشتش سطحی محیط حاوی جدایه *P. putida* و اسیدیته مهمترین فاکتور تعیین کننده نتیجه در محیط تلقیح شده با جدایه *B. velezensis* بود. فاکتور دما نیز کمترین اثر را بر تغییر مقدار کشتش سطحی در محیط حاوی هر دو جدایه داشت. این نتیجه‌گیری از طریق جدول تجزیه واریانس مربوط به تیمارهای آرایشی با روش تاگوچی نیز قابل استنباط است. بنابراین طبق نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس و شکل 1، شرایط بهینه مورد نظر در pH برابر با 7، دمای 35 درجه سانتی‌گراد و منبع کربنی گلوکز حاصل می‌شود.



شکل 1- اثر اصلی فاکتورها بر میزان کشتش سطحی جهت تعیین شرایط بهینه محیط کشت با استفاده از روش تاگوچی: (A) جدایه B. *P. putida* و (B) جدایه *velezensis*

رشد ریزجانداران و افزایش جمعیت آن‌ها میزان تولید بیوسورفاکتانت را می‌افزاید. تولید بیوسورفاکتانت در حضور منبع کربنی محلول در آب همانند گلوکز، ساکارز، مالتوز، گلیسرول و اتانول در مطالعات هو و همکاران (2015)، پریرا و همکاران (2013)، فوتنس و همکاران (2010) و دسایی و بنات (1997) به اثبات رسیده است.

تغییرات pH بر خصوصیات ساختاری بیوسورفاکتانت‌ها و توانایی آن‌ها در افزایش انحلال آلاینده‌ها، تأثیر می‌گذارد. همانند منبع کربنی، pH مناسب جهت تولید حداکثر میزان بیوسورفاکتانت نیز به نوع جنس و گونه باکتری بستگی دارد (پرورش و همکاران، 2011؛ همزه و همکاران، 2013؛ خلیفه و همکاران، 2013؛ بین و همکاران، 2009). مشخص شده است که گونه‌های مختلف سودوموناس توانایی تولید بیوسورفاکتانت در اسیدیته‌های مختلف را دارند. به عنوان مثال *Pseudomonas aeruginosa* s6 در pH برابر با 9 و *Pseudomonas aeruginosa* UKMP14T در pH=7 بیشترین میزان کاهش کشتش سطحی را نشان دادند (همزه و همکاران، 2013).

تجزیه آلاینده در محیط کشت

درصد تجزیه آلاینده آسفتن در حضور جدایه‌های *Bacillus velezensis* و *Pseudomonas putida* و تلقیح همزمان دو جدایه به عنوان کنسرسیوم باکتریایی به همراه کاربرد و عدم کاربرد دو بیوسورفاکتانت استخراج شده از جدایه‌ها در شکل 2 و تجزیه واریانس داده‌ها در جدول 6 آورده شده است.

علاوه بر جنس و گونه، عوامل محیطی مختلف نیز بر رشد و تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری‌ها اثرگذارند. اسیدیته، دما، منبع کربن و نیتروژن و محل جداسازی جدایه‌ها از جمله مهمترین عوامل محیطی مؤثر بر تولید بیوسورفاکتانت می‌باشند. وو و همکاران (2008) نوع و غلظت منبع کربنی را به عنوان عامل مهم تأثیرگذار بر میزان تولید بیوسورفاکتانت مطرح نمودند. اغلب باکتری‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت در حضور منابع کربنی آبگریز عملکرد بهتری نشان داده و در بیشتر موارد نیاز به منبع کربنی اضافی نیست (سوزاورا و همکاران، 2014). با این حال، برخی مطالعات نشان دادند که رشد و میزان تولید بیوسورفاکتانت توسط گونه‌های مختلف *Bacillus sp.* در حضور هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی (همانند n-هگزان و پارافین)، محدود و یا متوقف شده و استفاده از گلوکز، ساکارز و در برخی موارد فروکتوز منجر به حصول شرایط بهینه شده است (عبدالمقصود و همکاران، 2010؛ ماکار و کامترا، 1997؛ دستغیب و همکاران، 2008؛ پریرا و همکاران، 2013). کاربرد همزمان گلوکز و هیدروکربن‌ها نیز سبب بهبود رشد گونه‌های مختلف *Bacillus sp.* و تولید بیوسورفاکتانت توسط آن‌ها شد (پریرا و همکاران، 2013). در واقع از آنجاییکه باکتری‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت مقدار زیادی اکسیژن مصرف می‌کنند، منابع کربنی محلول در آب سبب تامین اکسیژن محلول مورد نیاز باکتری‌ها می‌شود (هو و همکاران، 2015). بدیهی است وجود منبع کربنی نامحلول در آب سبب تحریک تولید بیوسورفاکتانت توسط ریزجانداران می‌شود، اما از سوی دیگر منبع کربنی محلول در آب با تحریک

جدول 6- تجزیه واریانس اثر باکتری و سورفاکتانت زیستی بر تجزیه آسفنتن در محیط محلول

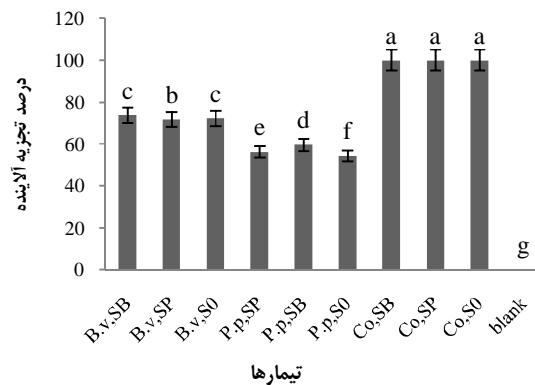
probe> F	نسبت F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
0/001	40051/7	30038/8	90116/4	3	باکتری
0/001	1493/7	1119/8	2239/7	2	سورفاکتانت
0/001	1185/5	889/2	5334/9	6	باکتری* سورفاکتانت
		0/75	18	24	خطا
			97709/1	35	کل

تجزیه شده و مقدار تجزیه آسفنتن در تیمار تلقیح شده با *B. velezensis* و بیوسورفاکتانت مذکور 77/66 % بود. کاربرد بیوسورفاکتانت استخراج شده از جدایه *P. putida*، به همراه تلقیح جدایه‌های *B. velezensis* و *P. putida* به ترتیب منجر به حذف 71/66 و 59/56 % از آلاینده شد. بنابراین، استفاده از بیوسورفاکتانت میزان آسفنتن تجزیه شده در تیمارها را بهبود بخشید. نتایج حاصل علاوه بر تأیید اثر مثبت کاربرد سورفاکتانت زیستی بر تجزیه آسفنتن، نشان می‌دهد که بیوسورفاکتانت استخراج شده از جدایه *B. velezensis* مؤثرتر از سورفاکتانت حاصل از جدایه *P. putida* بود. غلظت نهایی آلاینده در تیمارهای تلقیح شده با جدایه *B. velezensis* در حضور بیوسورفاکتانت استخراج شده از آن، 79 و با استفاده از بیوسورفاکتانت حاصل از *P. putida* 85 میلی‌گرم بر لیتر بوده و تأثیر بیشتر سورفاکتانت زیستی حاصل از جدایه *B. velezensis* را تأیید کرد. این مسئله در تیمارهای تلقیح شده با جدایه *P. putida* نیز مشاهده شد. غلظت آسفنتن استخراج شده از تیمارهای حاوی بیوسورفاکتانت استخراج شده از جدایه *B. velezensis* و جدایه مذکور 56/36 و در حضور جدایه *P. putida* 59/56 میلی‌گرم بر لیتر بود.

تجزیه آسفنتن در خاک

جذب آلاینده‌های هیدروکربنی در سطح ذرات خاک و حلالیت کم آن‌ها در آب، موجب پیچیدگی تجزیه این ترکیبات در مقایسه با محیط محلول می‌باشد. به همین دلیل، جدایه، کنسرسیوم و سورفاکتانت زیستی برتر مرحله پیشین (تجزیه آسفنتن در محیط محلول) انتخاب و جهت بررسی تجزیه آلاینده در خاک مورد استفاده قرار گرفتند.

طبق نتایج مندرج در جدول تجزیه واریانس (جدول 6)، اعمال فاکتورهای مورد نظر شامل باکتری، بیوسورفاکتانت و برهمکنش این دو بر میزان تجزیه آلاینده آسفنتن در سطح یک درصد معنی‌دار بوده و موجب کاهش غلظت آلاینده در تیمارهای مورد بررسی شد. براساس شکل 2 و نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت باقیمانده از آسفنتن به وسیله سنسجش GC-FID، جدایه *Bacillus velezensis* با کاهش غلظت آسفنتن از 300 به 83/2 میلی‌گرم بر لیتر موجب تجزیه آلاینده به میزان 72/2 % شد. درحالی‌که *Pseudomonas putida* 54 % از غلظت اولیه آسفنتن را تجزیه کرده و مقدار آن را به 137/1 میلی-گرم بر لیتر کاهش داد. بنابراین جدایه *B. velezensis* در مقایسه با *P. putida* توانایی بیشتری در استفاده از آسفنتن به عنوان منبع کربنی داشته و موجب تجزیه بیشتر آن می‌شود. از سوی دیگر، نتایج بطور واضحی نشان دهنده برتری اثر کنسرسیوم بر تجزیه آسفنتن، در مقایسه با جدایه‌های منفرد بود. بطوریکه غلظت آلاینده در تمامی تیمارهای تلقیح شده با کنسرسیوم به صفر رسید. بنابراین استفاده از کنسرسیوم صرف نظر از کاربرد بیوسورفاکتانت مؤثرتر از جدایه منفرد بوده و سبب افزایش میزان تجزیه آلاینده شد. علاوه بر نتایج یاد شده، کاربرد سورفاکتانت-های زیستی استخراج شده از جدایه‌ها به همراه تلقیح باکتریایی، درصد تجزیه آسفنتن را افزوده و غلظت آلاینده در مقایسه با تیمارهای فاقد بیوسورفاکتانت را کاهش داد. میزان تجزیه آسفنتن در تیمارهای تلقیح شده با جدایه‌های *B. velezensis* و *P. putida* (بدون استفاده از بیوسورفاکتانت) به ترتیب 72/2 و 54/3 % بود. درحالی‌که با استفاده از بیوسورفاکتانت استخراج شده از جدایه *B. velezensis* به همراه تلقیح *P. putida*، 56/36 % از آلاینده



شکل 2- درصد تجزیه آسفندن در محیط محلول پس از طی دوره گرماگذاری (B.v: *B. velezensis*, P.p: *P. putida*, Co: *B.velezensis*+ *P. putida*) (SB: بیوسورفاکتانت حاصل از باسیلوس، SP: بیوسورفاکتانت حاصل از سودوموناس، S0: عدم استفاده از بیوسورفاکتانت)

جدول 7- تجزیه واریانس اثر باکتری و سورفاکتانت زیستی بر تجزیه آسفندن در خاک

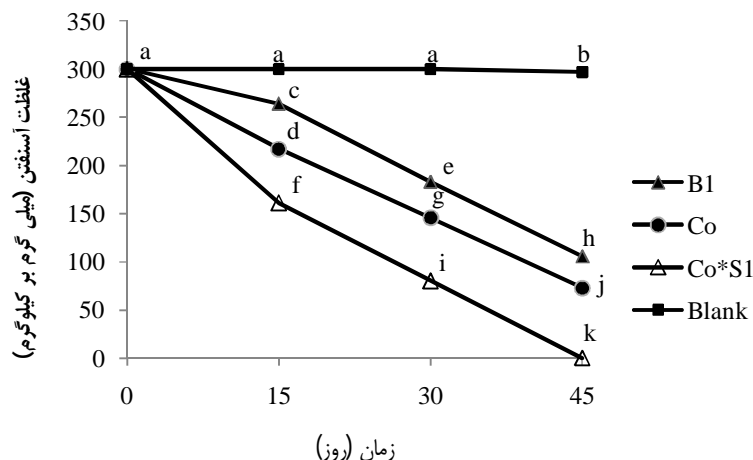
probe> F	نسبت F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
0/001	87978/8	75759/8	227277/2	3	تیمار
0/001	47244/8	40638/9	81336/1	2	زمان
0/001	5033/2	4334/2	26008/9	6	تیمار*زمان
		0/86	20/7	24	خطا
			334672/7	35	کل

به 264/1 و طی 15 روز دوم به 183 میلی گرم بر کیلوگرم (39% تجزیه) رسید. این جدایه در انتهای 45 روز 64/7% از آلاینده را تجزیه کرده و غلظت آن را به 105/8 میلی-گرم بر کیلوگرم کاهش داد.

همانند تجزیه در محیط کشت، توانایی تجزیه آسفندن در خاک توسط کنسرسیوم باکتریایی بیشتر از جدایه منفرد بوده و تلقیح تیمارها با آن منجر به تجزیه 75/7% از آلاینده طی دوره گرماگذاری شد. طی پانزده روز ابتدایی گرماگذاری، غلظت آسفندن در تیمارهای حاوی کنسرسیوم با 27/6% تجزیه به 217 میلی گرم بر کیلوگرم رسید. غلظت آلاینده در انتهای پانزده روز دوم 145/5 (51/5% تجزیه) و در روز پایانی دوره گرماگذاری 72/9 میلی گرم بر کیلوگرم بود. در تیمارهای تلقیح شده با کنسرسیوم و بیوسورفاکتانت، درصد تجزیه آلاینده طی زمان‌های 15، 30 و 45 روز به ترتیب 46/2، 73/2 و 100% بود. در واقع غلظت آلاینده طی زمان مورد بررسی ابتدا به 46/2 و سپس 73/2 میلی گرم بر کیلوگرم رسید و در روز پایانی نمونه‌ها فاقد غلظت قابل تشخیصی از آلاینده بوده و میزان آن صفر در نظر گرفته شد.

جدول 7 نشان‌دهنده تجزیه واریانس نتایج حاصل از آزمایشات تجزیه آسفندن در خاک تلقیح شده با جدایه *B. velezensis* و کنسرسیوم به همراه بیوسورفاکتانت استخراج شده از جدایه *B. velezensis* طی 45 روز گرماگذاری می‌باشد. درصد تجزیه آلاینده طی مدت یاد شده نیز در شکل 3 آورده است. با توجه به نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس، اثر تیمارها (جدایه، کنسرسیوم و کنسرسیوم به همراه سورفاکتانت زیستی)، زمان و برهمکنش آن‌ها بر تجزیه آسفندن در سطح 1% در خاک معنی‌دار شد. در میان تیمارهای مورد بررسی، تیمار تلقیح شده با کنسرسیوم و بیوسورفاکتانت با تجزیه کامل آسفندن بیشترین اثر و تیمار حاوی جدایه *B. velezensis* کمترین اثر (64/73%) را بر تجزیه آلاینده داشتند. غلظت آسفندن در تیمار شاهد طی 45 روز گرماگذاری تقریباً ثابت باقی مانده و تنها 1% از آن تجزیه شد.

در تیمارهای تلقیح شده با جدایه *B. velezensis* غلظت آلاینده آسفندن طی 15 روز ابتدایی گرماگذاری با 12% تجزیه از 300 میلی گرم بر کیلوگرم



شکل 3- غلظت باقیمانده آسفنتن در خاک طی دوره گرماگذاری (سورفاکتانت حاصل از باسیلوس B1: *B. velezensis*, Co: *B. velezensis* + *P. putida*, S1: سورفاکتانت حاصل از باسیلوس)

فسفولپیدها، اسیدهای چرب، لپیدهای خنثی و ترکیب پروتئین و پلی‌ساکارید هستند. این ترکیبات دارای خواص نامیزه‌کنندگی، انتشار، پاک‌کنندگی (دترجنتی)، افزایش رشد میکروبی و جداسازی فلزات می‌باشد. در کنار خصوصیات یاد شده، سایر ویژگی‌های منحصر بفرد و خاص سورفاکتانت‌ها همچون ساختار مولکولی خاص با دو انتهای آبدوست و آبگریز، تجزیه پذیری و سازگاری با محیط زیست، سبب استفاده از آن‌ها در صنایع زیست-پالایی و بازیافت نفت به عنوان جایگزین انواع شیمیایی و سنتزی، شده است (گومز و همکاران، 2018). اما، توانایی تجزیه آلاینده‌های نفتی توسط انواع ریزجانداران تولیدکننده بیوسورفاکتانت یکسان نیست. به عبارت دیگر، ریزجانداران منفرد توانایی تجزیه محدودی خاصی از هیدروکربن‌ها را دارند. به همین دلیل افزایش سرعت و میزان تجزیه زیستی ترکیبات یاد شده، نیازمند حضور اجتماع گونه‌های متفاوت با ظرفیت آنزیمی وسیع، می‌باشد (تیزینون کاماچو و همکاران، 2012). بر اساس نتایج منتشر شده از تحقیقات مختلف، استفاده از کنسرسیوم‌های باکتریایی در تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی آب و خاک بسیار مؤثرتر از جدایه‌های منفرد می‌باشد. (آدبوزای و همکاران، 2007؛ ساتیشکومار و همکاران، 2008؛ لیو و لیو، 2011). بطوریکه باکتری‌هایی که دارای توانایی کاتابولیکی تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی می‌باشند، با انواع تولیدکننده بیوسورفاکتانت رابطه سینرژیستی برقرار نموده و با سرعت بیشتری آلاینده را تجزیه می‌کنند. از مزایای کاربرد کنسرسیوم می‌توان به

بطور معمول، باکتری‌های بومی خاک دارای توانایی تجزیه هیدروکربن‌ها می‌باشند، اما این فرآیند محدود بوده و بسیار کند می‌باشد. به همین دلیل اغلب، اقداماتی همانند استفاده از منابع کربنی، مواد مغذی و بیوسورفاکتانت‌ها جهت افزایش سرعت تجزیه و تخریب این ترکیبات اتخاذ می‌شود (سیلوا و همکاران، 2014). ثابت شده است که حضور بیوسورفاکتانت زمان تجزیه زیستی ترکیبات هیدروکربنی را کم می‌کند (پاتواری و همکاران، 2016). در واقع، در محیط‌های ناهمگن همچون خاک، پلی‌آروماتیک‌های هیدروکربنی درون ذرات آلی موجود در منافذ کوچک جذب شده و از دسترس ریزجانداران خارج می‌شود. بطوریکه تغییر در ماهیت مواد آلی خاک سبب تأثیر بر رفتار این ترکیبات خواهد شد (چاگاس-اسپانلی و همکاران، 2012). نقش بیوسورفاکتانت در فرآیند زیست‌پالایی آغاز انتشار آلاینده‌های هیدروکربنی آبگریز در فاز آبی و به دنبال آن افزایش فراهمی زیستی این ترکیبات (به عنوان عامل کنترل‌کننده سرعت تجزیه زیستی) است (پاتواری و همکاران، 2018). در واقع این ترکیبات با دو روش مؤثر الف) افزایش فراهمی و دسترسی هیدروکربن‌های آبگریز برای ریزموجودات (به وسیله کاهش کشش سطحی و در نتیجه افزایش سطح تماس ترکیبات نامحلول) و ب) واکنش با سطح سلول‌های میکروبی و افزایش هیدروفوبیستی سطحی، سرعت تجزیه آلاینده‌های نفتی را می‌افزایند (اوحدی و همکاران، 2017). بیوسورفاکتانت‌ها، ترکیباتی مختلف از انواع گلیکولپیدها، لیپوپپتیدها،

حاصل از دو جدایه *Bacillus velezensis* و *Pseudomonas putida*، متابولیت‌های لازم جهت تجزیه کامل آسفنتن را فراهم کرده و موجب بهبود سرعت تجزیه آن می‌شوند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد استفاده از کنسرسیوم باکتریایی در فرایند زیست‌پالایی موثرتر از کاربرد جدایه‌های منفرد است. در واقع کنسرسیوم‌ها، دارای سازگاری و انعطاف متابولیکی بیشتری بوده و با تلقیح کنسرسیوم، یک گونه با سبب تغییر شکل و تجزیه ابتدایی آلاینده، امکان عمل موثرتر را برای سایر گونه‌ها فراهم می‌کند. بیوسورفاکتانت‌ها نیز موجب افزایش تحرک و تجزیه زیستی ترکیبات آبرگیز شده و سبب بهبود فرآیند زیست‌پالایی می‌شود. به این ترتیب استفاده از کنسرسیوم و جدایه‌های تولید کننده سورفاکتانت زیستی، سبب رفع عوامل محدودکننده در تجزیه آلاینده‌های نفتی شده و میزان تجزیه را افزایش می‌دهد.

قابلیت زنده ماندن در خاک‌های غیر بومی و رقابت با جمعیت میکروبی بومی خاک (به شرط فراهم بودن عناصر غذایی مورد نیاز جهت حفظ جمعیت کنسرسیوم باکتریایی) را نام برد (مائو و همکاران، 2012). در یک کنسرسیوم لازم نیست که تمامی جدایه‌ها توانایی تولید بیوسورفاکتانت را دارا باشند. در واقع فرض می‌شود که حضور باکتری تولید کننده بیوسورفاکتانت با افزایش دسترسی و فراهمی آلاینده‌های آبرگیز در کنار باکتری که توانایی تجزیه آلاینده را دارد اما بیوسورفاکتانت تولید نمی‌کند، سبب افزایش بازدهی تجزیه زیستی می‌شود (پاتواری و همکاران، 2016).

اثر سینرژیستی جدایه‌های متعلق به جنس *Bacillus sp.* و *Pseudomonas sp.* در تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی پیش از این بررسی و اثبات شده است (داس و موکرچی، 2007؛ غزالی و همکاران، 2004؛ رحمان و همکاران، 2002؛ موکرچی و بوردولی، 2012). در مطالعه حاضر نیز مشخص شده است که کاربرد بیوسورفاکتانت استخراج شده جدایه *Bacillus velezensis* به همراه کنسرسیوم حاصل از تلقیح این جدایه و *Pseudomonas putida* سرعت تجزیه آسفنتن را افزوده و موجب تجزیه کامل آن می‌شود. به عبارت دیگر، اجزای کنسرسیوم

فهرست منابع:

1. Abdel-Mawgoud, A.M. Lepine, F. and Deziel, E. 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (5): 1323-1336.
2. Adebusoye, S.A. Ilori, M.O. Amund, O.O. Teniola, O.D. and Olatope, S.O. 2007. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1149-1159.
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. Batista, S.B. Mounter, A.H. Amorim, F.R. and Totola, M.R. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource technology* 97: 868-875.
5. Bremner, J.M. and Mulvaney, C.S. 1982. *Methods of soil analysis*. American Society of Agronomy Inc. Madison, Wisconsin USA.
6. Bezza, F.A. and Chirwa E.M.N. 2017. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chemical Engineering Journal* 309: 563-576.
7. Bisht, S. Pandey, P. Kaur, G. Aggarwal, H. Sood A. Sharma S. Kumar V. and Bisht, N.S. 2014. Utilization of endophytic strain *Bacillus sp.* SBER3 for biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system. *European Journal of Soil Biology* 60: 67-76.

8. 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.
9. Bouyoucos, G.J. 1962. Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analysis of Soils. *Agronomy Journal*. 54: 464-465.
10. Bushnell L.D. and Haas H.F. 1941. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *Journal of bacteriology* 41:653-671.
11. Chagas-Spinelli, A.C.O. Kato, M.T. de Lima, E.S. and Gavazza. 2012. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of Environmental Management* 113: 510-516.
12. 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.
13. Chen, L. Li, G. and Zu-Liang, Ch. 2010. Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN). *Journal of Hazardous Materials* 182: 771–777.
14. 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.
15. Das, K. Mukherjee, A.K. 2005. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 192–199
16. Das, K. Mukherjee, A.K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* 98 (7): 1339-1345.
17. Das, P. Mukherjee, S. and Sen, R. 2008. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemospher* 72: 1229-1234.
18. Dastgheib, S.M.M. Amoozegar, M.A. Elahi, E. Asad, S. Banat, I.M. 2008. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnology Letters* 30 263-270.
19. Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 47–64.
20. Ellis, B. Harold, P. Kronberg, H. 1991. Bioremediation of a creosote contaminated site. *Environmental Technology* 12: 447-459.
21. 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.
22. Eskandari, S. Hoodaji, M. Tahmourespour, A. Abdollahi, A. Mohammadian, Baghi T. Eslamian, S. and Ali-Askari, K.O. 2017. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Bacillus Licheniformis* ATHE9 and *Bacillus Mojavensis* ATHE13 as Newly Strains Isolated from Oil-Contaminated Soil. *Journal of Geography, Environment and Earth Science International* 11(2): 1-11.
23. Fonts, G.C. Amaral, P.F.F. Nele, M. and Coelho, M.A.Z. 2010. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1-8.

24. Ghazali, F.M. Adul Rahman, R.N.Z. Salleh, A.B. and Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 61-67.
25. Ghosal, D. Dutta, A. Chakraborty, J. Basu, S. and Dutta, T.K. 2013. Characterization of the metabolic pathway involved in assimilation of acenaphthene in *Acinetobacter* sp. strain AGAT-W. *Research in Microbiology* 164: 155-163.
26. Gomes, M.B. Gonzales-Limache, E.E. Sousa, S.T.P. Dellagnezze, B.M. Sartoratto, A. Silva, L.C.F. Gieg, L.M., Valoni, E. Torre, A.P.R. Sousa, M.P. De Paula, S.O. Silva, C.C. and Oliveira, V.M. 2018. Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 126: 231-242.
27. Grimberg, S.J. Stringfellow, W.T. and Aitken, M.D. 1996. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (7): 2387–2392.
28. Hamzah, A. Sabturani, N. and Radiman. 2013. Screening and optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria. *Sains Malaysiana* 42 (5): 615-623.
29. Holtman, M. Kobayashi, D. 1997. Identification of *Rhodococcus erythropolis* isolates capable of degrading the fungicide carbendazim. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 578–582.
30. 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.
31. Hwang, G. Park, S.R. Lee, C.H. Ahn, I.S. Yoon, Y.J. and Mhin, B.J. 2009. Influence of naphthalene biodegradation on the adhesion of *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 to a naphthalene-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 171: 491–493.
32. Keith, L.H. and Telliard, W.A. 1979. Priority pollutants I-a perspective view. *Environmental Science and Technology* 13: 416-423.
33. Khalifeh, A. Roozbehani, B. and Mashinchian Moradi, A. 2013. Optimization of biosurfactant in oily polluted waters clearance recovery. *American Journal of Oil and Chemical Technologies* 1 (3): 1-3.
34. Lewandowska, A. and Walorczyk, S. 2010. Carbendazim residues in the soil and their bioavailability to plants in four successive harvests. *Polish Journal of Environmental Studies* 19: 757–761.
35. 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.
36. Ling, J. Zhang, G. Sun, H. Fan, Y. Ju, J. and Zhang, Ch. 2011. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A. *Science of the Total Environment*, 409: 1994–2000.
37. Liu, C.W. and Liu, H.S. 2011. *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors. *Process Biochemistry* 46: 202–209.
38. 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.
39. Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. 1997. Biosurfactant production by thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18 (1): 37-42.

40. Mao, J. Lou, Y. Teng, Y. and Li, Zh. 2016. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *International Biodeterioration and biodegradation* 70: 141-147.
41. Mao, J. Luo, Y. Teng, Y. and Li, Zh. 2012. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated microbial community changes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 70: 141-147.
42. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3: 208-218.
43. McFarland, J. 1907. Nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* 14: 1176-1178.
44. Mnif, I. Ellouze-chaabouni, S. Ayedi, Y. and Ghribi, Dh. 2015. Treatment of diesel- and kerosene-contaminated water by *B. subtilis* SPB1 biosurfactant-producing strain. *Water Environment Research* 86: 707-716.
45. 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.
46. Mnif, I. Sahnoun, R. Ellouze-Chaabouni, S and Ghribi, D. 2014. 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.
47. 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.
48. Montagnolli, R.N. Matos Lopes, P.R. and Bidoia, E.D. 2015. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental Monitoring and Assessment* 187(1): (4116) 1-17.
49. 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 (8): 3380-3388.
50. Nelson, D.W. and Sommers, L.E. 1982. *Methods of soil analysis*. American Society of Agronomy Inc. Madison, Wisconsin USA.
51. Ohadi, M., Dehghan-Nudeh G.H.R., Shakibaie M., Banat I.M., Pournamdari M. and Forootanfar H. 2017. Isolation, characterization and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12:1-9.
52. Olsen, S.R. and Sommers, L.E. 1982. *Methods of soil analysis*. American Society of Agronomy Inc. Madison, Wisconsin USA.
53. Pal, M.P. Vaidya, B.K. Desai, K.M. and Joshi, R.M. 2009. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: Artificial intelligence versus a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology* 36(5): 747-756.
54. 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.
55. 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.

56. Patowary, R. patowary K. Kalita, M.C. and Deka, S. 2018. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 129: 50-60.
57. Pereira, J.F.B. Gudina, E.J. Costa, R. Vitorino, R. Teixeira, J.A. and Coutinho, J.A.P. 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111: 259-68.
58. Pinyakong, O. Habe, H. Kouzuma, A. Nojiri, H. Yamane, H. and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclicaromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. *FEMS Microbiology Letters* 238: 297-305.
59. Poblete-Castro, I. Becker, J. Dohnt, K. dos Santos, V.M. and Wittmann, Ch. 2012. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (6): 2279-2290.
60. Potin, O. Rafin, C. and Veignie, E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International biodeterioration and biodegradation* 54: 45-52.
61. Rahaman, K.S.M. Thahira-Rahman, J. lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I.M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 85 (3): 257-261.
62. 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 *Psuedomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters* 11: 871-874.
63. Rufino, R.D. de Luna, J.M. de Campos Takaki, G.M. and Sarubbo, L.A. 2013. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electronic journal of biotechnology* 17:34-38.
64. Sanger, F. and Coulson, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94(3): 441-8.
65. 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.
66. Schocken, M.J. and Gibson, D.T. 1984. Bacterial oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 10-16.
67. Shi, T. Fredrickson, J.K. and Balkwill, D.L. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 283-289.
68. Silva, J.E. Rocha, A. Silva, N.M.P. Rufino, R.D. and Luna, J.M. 2014. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wasted and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 117: 36-41.
69. 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.
70. Souza Vera, E.C. Vessoni-Penna T.C. and Souza Oliveira, R.P. 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation* 89: 88-94.
71. 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.

72. 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.
73. 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: 1157-1163.
74. 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

Study of Biosurfactant Production by Bacterial Consortium Isolated from Oil Contaminated Soil

S. Soleymani, A. Lakzian¹, A. Fottovat, and M. R. Ramazanpour

Ph.D. student of Soil Science Department, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad;
E-mail: soleymani.s1387@yahoo.com

Professor of Soil Science Department, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad;
E-mail: alakzian@yahoo.com

Professor of Soil Science Department Agricultural College Ferdowsi University of Mashhad;
E-mail: afotovat @um.ac.ir

Associated professor of Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center; E-mail: mrramezanpour@yahoo.com

Received: Julu, 2019 & Accepted: December, 2019

Abstract

Acenaphthene, a natural component of crude oil, is a carcinogenic compound and persistent to degradation. Bioremediation, which involves the use of living microorganisms for degradation and mineralization of contaminants, used to remove persistent contaminants such as Acenaphthene. Complete degradation of hydrocarbons is the result of different species activity that is known as a bacterial consortium. On the other hand, the low solubility of oil pollutants is a limiting factor in bioremediation. So, recently biosurfactant-producing bacterial consortia have been considered in the bioremediation to increase the bioavailability of oil contaminants. In the present study, Acenaphthene degrading bacteria were isolated by enriching the oil-contaminated soil and then, the biosurfactant-producing bacteria were screened based on the surface tension of the medium containing the isolates. After bacterial identification, degradation of Acenaphthene by isolates, consortium, and extracted biosurfactants from isolates, were investigated in the aqueous medium and soil. The results showed that both AP₃ and BM₁ could decompose Acenaphthene and produce biosurfactants. The AP₃, BM₁, and their consortium degraded 72.2%, 54%, and 100% of pollutants in the aqueous medium, respectively. The effect of biosurfactant extracted from AP₃ on the degradation of Acenaphthene was more than the BM₁ biosurfactant. Percentage of Acenaphthene degradation in soil by AP₃ and consortium was 64.7% and 75.7% respectively, and the use of AP₃ biosurfactant with the consortium led to complete degradation. 16S rRNA gene sequences of isolates showed that AP₃ 100% was compatible with *Bacillus velezensis* CR-502 (T) and BM₁ 99.5% was compatible with *Pseudomonas putida* ATCC 12633. Therefore, the use of a consortium and biosurfactants improve the biodegradation of Acenaphthene compared to inoculation of individual isolates.

Keyword: *Bacillus sp.*, Bioremediation, Hydrocarbon contamination, *Pseudomonas sp.*

¹ Corresponding author: soil Microbiology Department Agricultural College Ferdowsi University of Mashhad