ORIGINAL ARTICLE

Bioremediation of n-Hexadecane Contaminated Soils Using Pseudomonas aeruginosa Bacteria Isolated from Coastal Areas

Taherh Tayybi[1],
Sahand Jorfi[2],
Shokuh Ghaffari[3],
Raheleh Kujlu[4]

[1] BSc Student in Environmental Health Engineering, Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, Environmental Technologies Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3] PhD in Virology, Health Research Institute, Infectious and tropicl Desease Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[4] MSc Student in Environmental Health Engineering, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received February 21, 2016 ; Accepted June 11, 2016)

Abstract

Background and purpose: Soil pollution to hydrocarbons in oil field zones in southern Iran and areas close to oil and gas transportation pipe lines is a major environmental problem. The current study aimed at determining the efficiency of bioremediation of n-Hexadecane contaminated soil as a model contaminant.

Materials and methods: Aged hydrocarbon contaminated soils were used as the origin of bacteria isolation. Isolation of n-Hexadecane degrading bacteria was carried out through enrichment in mineral salt medium and incubation in 31 ºC in shaker incubator at 150 rpm by repetitive cultures during 6 consecutive refreshing. Finally, two pure strains were isolated and identified by PCR. Bioremediation of initial n-Hexadecane concentrations of 500, 1000 and 5000 mg/kg was investigated in eight weeks.

Results: Two *Pseudomonas aeruginosa* strains capable of n-Hexadecane biodegradation were isolated. The removal efficiencies at the end of day 56 for n-Hexadecane initial concentrations of 500, 1000 and 5000 mg/kg were 93.6%, 87.5%, and 69.62%, respectively.

Conclusion: Isolated *Pseudomonas aeruginosa* bacteria demonstrated high n-Hexadecane biodegradation potential in soil and also biosurfactant production, therefore, they could be used for bioremediation of hydrocarbon contaminated soils.

Keywords: bioremediation, soil pollution, n-Hexadecane, *Pseudomonas aeruginosa*

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(140): 127-136 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۰ شهریور سال ۱۳۹۵ (۱۳۶-۱۲۷)

اصلاح زیستی خاک های آلوده به n-هگزادکان با استفاده از باکتری‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از نواحی آلوده ساحلی

طاهره طیبی[۱]
سهندجرفی[۲]
شکوه غفاری[۳]
راحله کوجلو[۴]

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی خاک‌های مناطق نفت خیز جنوب کشور و مجاور خطوط انتقال نفت و گاز به انواع هیدروکربن‌های نفتی به یک معضل عمده زیست محیطی تبدیل شده است. هدف از پژوهش فعلی، تعیین بازده حذف زیستی n- هگزادکان از خاک به عنوان آلاینده مدل با استفاده از فرایند اصلاح زیستی بود.

مواد و روش‌ها: خاک‌های دارای آلودگی قدیمی به هیدروکربن‌ها نفتی به عنوان منبع جداسازی باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده n- هگزادکان با غنی‌سازی در محیط کشت نمکی و گرماگذاری در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد بر روی یک شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm با انجام کشت‌های مکرر یک هفته‌ای طی ۶ هفته انجام شد. در نهایت دو سویه خالص جداسازی و به وسیله PCR شناسایی شدند. بازده حذف زیستی غلظت‌های اولیه n- هگزادکان ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ mg/kg طی ۸ هفته مطالعه شد.

یافته‌ها: دو سویه باکتری پسودوموناس آئروژینوزا با قابلیت تجزیه n- هگزادکان جداسازی شدند. بازده حذف حذف n-هگزادکان در انتهای روز ۵۶ به ازای غلظت‌های اولیه ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ mg/kg به ترتیب ۹۳/۶ درصد، ۸۷/۵ درصد و ۶۹/۶۲ درصد بود.

استنتاج: باکتری‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده نشان‌دهنده قابلیت بالای تجزیه زیستی n-هگزادکان در خاک و نیز پتانسیل تولید بیوسورفکتات بوده و می‌توان آن‌ها را برای اصلاح زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به کار برد.

واژه های کلیدی: اصلاح زیستی، آلودگی خاک، n- هگزادکان، *پسودوموناس آئروژینوزا*

مقدمه

نشت انواع هیدروکربن‌های نفتی منجر به آلودگی محیط و به ویژه خاک‌های مجاورت میادین نفتی و خطوط انتقال نفت و گاز در کشور شده است(۱). در این میان، حجم بالای هیدروکربن‌های آلیفاتیک و به ویژه هیدروکربن‌های آلیفاتیک دارای زنجیره متوسط (n-alkane) به عنوان رایج‌ترین و فراوان‌ترین آلاینده‌های

مولف مسئول: سهند جرفی- اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، مرکز تحقیقات فناوری های زیست محیطی E-mail: sahand369@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی بهداشت محیط، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات فناوری های زیست محیطی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. دکتری ویروس شناسی، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱۲/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱۲/۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۳/۲۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

خاک شناسایی شده‌اند(۲). از آن‌جا که n-alkanes ملکول‌های غیرقطبی فاقد گروه‌های عاملی هستند، از جنبه شیمیایی بسیار خنثی بوده و برای فعال‌سازی نیازمند انرژی خارجی هستند. میکروارگانیزم‌ها با بهره‌گیری از آنزیم‌ها و مسیرهای تجزیه متابولیکی می‌توانند n-alkanes را به عنوان منبع انرژی و کربن مصرف نمایند(۳). لکن تجزیه طبیعی آن‌ها به دلیل حلالیت پایین در آب و تمایل اندک به غشای دیواره سلولی بسیار کند است. از این رو چگونگی تهییج میکروارگانیزم‌ها به بهبود قابلیت‌های تجزیه n-آلکان‌ها بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است(۴). n-هگزادکان به عنوان یک هیدروکربن آلیفاتیک دارای زنجیره متوسط ($C_{16}H_{34}$) یک ترکیب نماینده هیدروکربن‌های آلیفاتیک موجود در نفت و یک جزء عمده موجود در گازوئیل است. این ترکیب به دلیل حلالیت اندک در آب (۰/۹ میکروگرم بر لیتر در آب مقطر) و قابلیت تجزیه پذیری از طریق مسیرهای متابولیکی، به عنوان آلاینده مدل این پژوهش انتخاب شده است. روش‌های اصلاح فیزیکی، شیمیایی و زیستی مختلفی برای آلودگی زدایی از خاک آلوده پیشنهاد و اجرایی شده‌اند. روش‌های زیستی به دلیل قابلیت سازگاری بهتر، ارزان بودن، پویایی دینامیکی و بازده قابل قبول در بازه های زمانی میان مدت و بلندمدت به عنوان گزینه ارجح بسیاری از متخصصان برای حذف آلاینده‌های خطرناک مدنظر قرار می‌گیرند(۵). روش‌های اصلاح زیستی در قالب تحریک زیستی یا افزایش زیستی به صورت فناوری‌های در محل نظیر تهویه زیستی، زیست افشانی هوا، اصلاح گیاهی و لندفارمینگ یا فناوری‌های خارج از محل شامل کمپوست، توده های زیستی یا زیست راکتورهای دوغابی مورد مطالعه قرار گرفته و اجرایی شده‌اند(۷،۶). با این وجود اصلاح زیستی در محل با مشکلاتی نظیر زمان طولانی مورد نیاز به دلیل فقدان میکروارگانیزم‌های توانمند و شکست سویه باکتریایی تلقیح شده در رقابت میکروارگانیزم‌های بومی به هنگام کاربردهای عملی مواجه است. لذا جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی با قابلیت تجزیه آلاینده‌های نفتی و ماندگاری در خاک آلوده به یک چالش تحقیقاتی تبدیل شده است. با وجود انجام تحقیقات اصلاح زیستی متعدد، تاکنون مطالعات اندکی مبنی بر کاربرد گونه‌های باکتریایی جداسازی شده از نواحی ساحلی جنوب استان نفت خیز خوزستان و کاربرد آن در تجزیه n-هگزادکان به عنوان آلاینده مدل در خاک‌های ریزدانه مناطق جنوبی شامل بندر امام خمینی انجام شده است. در میان انواع خاک‌های مورد مطالعه برای اصلاح زیستی آلاینده‌های هیدروکربنی، تمرکز بر خاک‌های با درصد بالای ذرات ریزدانه رسی محدود بوده است. ذرات رس اغلب دارای بار سطحی منفی بوده و جاذب های مناسبی برای آب و یون‌ها به شمار می‌روند. به دلیل سطح ویژه بالا، برخی آلاینده‌های محیطی را به شدت جذب کرده و نسبت به فرآیندهای اصلاح محیطی مقاومت نشان می‌دهند. از این رو، حذف مؤثر آلاینده هیدروکربنی از خاک‌هایی که دارای درصد قابل توجهی رس هستند (در حدود ۵۰-۲۰ درصد) به‌عنوان یک اولویت تحقیقاتی مطرح است. در میان انواع میکروارگانیزم‌های دارای قابلیت تجزیه n-هگزادکان، گونه‌های پسودوموناس به عنوان یکی از کارآمدترین باکتری‌ها با قابلیت مصرف این ترکیب به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی شناخته شده‌اند(۹،۸). اصلاح زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به روش‌های زیستی به وسیله محققان دیگر بررسی شده است. تکدستان و کردانی (۲۰۱۵) حذف کل هیدروکربن‌های نفتی از خاک را به وسیله گیاه ویتور در منطقه اهواز مطالعه کردند(۱۰).

حسینی پناه و تکدستان (۲۰۱۶) اصلاح کننده‌های حفاری آلوده به هیدروکربن‌های نفتی را با استفاده از کرم خاکی مطالعه نمودند(۱۱). رضایی کلانتری و همکاران (۲۰۱۳) بهبود اصلاح زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای را با استفاده از مواد هیومیکی مطالعه نمودند(۱۲). در پژوهش فعلی، نمونه‌برداری از سواحل، رسوبات و خاک دارای سابقه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

آلودگی به هیدروکربن‌های نفتی در بندر امام خمینی با هدف جداسازی سویه‌های سودوموناس تجزیه کننده n- هگزادکان و تعیین اثر عوامل مؤثر بر تجزیه n- هگزادکان به‌عنوان هدف اصلی این پژوهش تعریف گردید.

مواد و روش ها

مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده در پژوهش به شرح زیر است که از شرکت‌های مرک، فلوکا و دکتر مجللی خریداری شده و همگی دارای درجه آزمایشگاهی بوده‌اند: استون، متانول، نوترینت براث، نوترینت آگار، آگار، n-هگزان، n- هگزادکان، عصاره مخمر، NaCl، K_2HPO_4، $CuSO_4.2H_2O$، KH_2PO_4، NH_4NO_3، Na_2MoO_4، $MgSO_4.7H_2O$، $CaCl_2.H_2O$، $FeSO_4.7H_2O$، $CoCl_2.6H_2O$، $MnSO_4.H_2O$، H_3BO_3، $ZnSO_4.7H_2O$.

محیط کشت

محیط کشت نمکی (MSM) مورد استفاده شامل (g/L) 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 بود. ترکیب محلول عناصر جزئی متشکل از (g/L): 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 بود(۱۳). pH همه محلول‌ها با استفاده از محلول‌های اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم بر روی ۷ تنظیم (اندازه‌گیری به وسیله pH متر دیجیتال مارک Hack) و کلیه محیط‌های کشت استریل شدند. n-هگزادکان با خلوص ۹۸ درصد از مرک خریداری شده و به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی به میزان ۵ درصد حجمی/ حجمی به محیط‌های کشت اضافه شد.

جداسازی باکتری های تجزیه کننده n-هگزادکان

جداسازی و غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده پایرن بر اساس روش جرفی و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد(۱۴). به‌طور خلاصه ۱۰ گرم خاک آلوده از مناطق نفتی آلوده جنوب ایران به آزمایشگاه منتقل و بخشی از آن به یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی بافر فسفاته اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه به وسیله یک همزن مغناطیسی به شدت هم زده شد. سپس ته نشین شده و فاز محلول رویین آن به عنوان منبع جداسازی باکتری در نظر گرفته شد. در ادامه ۵ میلی‌لیتر از این فاز محلول رویین به یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۵ میلی لیتر محیط کشت معدنی نمکی استریل منتقل گردید. ارلن‌های حاوی محیط کشت در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد بر روی یک شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۵۰ به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. رشد با پایش جذب در OD_{600} پایش شد. پس از ۷ روز، ۵ میلی‌لیتر از محیط‌های محلول غنی‌سازی به ارلن مایرهای تازه و استریل حاوی محیط کشت معدنی به علاوه n- هگزادکان اضافه شد.

این عمل به مدت شش هفته تداوم یافت. برای جداسازی گونه‌های خالص تجزیه‌کننده n-هگزادکان، ۱ میلی‌لیتر از فاز محلول رویین کشت در انتهای هفته ششم، تا 10^{-4} ترقیق و بر روی محیط کشت جامد اختصاصی (n-هگزادکان + آگار + محیط کشت معدنی) کشت داده شد. این محیط‌های کشت به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلونی نشان دهنده رشد قابل توجه بر روی محیط کشت اختصاصی به عنوان گونه‌های تجزیه‌کننده n-هگزادکان انتخاب و در اسلنت نوترینت آگار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. دو گونه خالص با کدهای S_1 و S_2 برای مرحله اصلاح زیستی انتخاب شدند.

شناسایی باکتری‌ها

شناسایی اولیه گونه‌های S1 و S2 براساس روش‌های فنوتایپی شامل نتایج مثبت آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، همولیز بتا در محیط بلاد آگار، تولید پیگمان سبز-آبی در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

محیط نوترینت آگار، بوی خاص کلونی‌ها و مشاهده میکروسکوپیک باسیل های گرم منفی فاقد اسپور انجام شد(۱۵). به منظور شناسایی قطعی سویه‌ها، DNA باکتری به روش boiling استخراج گردید. در ابتدا یک کلونی از باکتری در ۲۰ میکرولیتر آب دیونیزه به شکل سوسپانسون در آورده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر قرار گرفت. سپس با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی که حاوی DNA باکتری بود، برای PCR استفاده شد. PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی RD1 و FD1 به منظور تکثیر ژن 16srna به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز صورت گرفت. پس از تکثیر، محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید(۱۶).

آماده سازی خاک

نمونه خاک از نواحی مجاور پتروشیمی بندر امام خمینی در جنوب استان خوزستان و از لایه‌های ۱ تا ۲۰ سانتی‌متری عمق خاک 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 ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ mg/kg n-هگزادکان در n هگزان انحلال داده شده و پس از 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(۱۷).

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 = $OD_{۶۰۰}$ (کنسرسیوم مخلوطی از ۲ گونه خالص جداسازی شده تجزیه کننده n-هگزادکان) اضافه گردید. سپس نمونه‌ها در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. پیش از گرماگذاری نمونه‌ها، pH آن‌ها با استفاده از محلول‌های اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم بر روی ۷±۰/۲ تنظیم شد. نمونه‌های شاهد شامل نمونه‌های فاقد جرم باکتریایی بودند. نمونه‌ها به مدت ۵۶ روز، هر هفته یک مرتبه مورد پایش قرار گرفتند. با توجه به تناوب پایش هفته‌ای یک بار، سه سطح غلظتی و یک نمونه کنترل (در مجموع چهار نمونه) و کل دوره پایش ۵۶ روز، این مطالعه در مجموع شامل ۳۲ نمونه برای سنجش n-هگزادکان و نیز ۳۲ نمونه برای پایش تغییرات دانسیته باکتریایی بود. با لحاظ کردن سه تکرار به ازای هر نمونه، مجموع کل نمونه‌های سنجش n-هگزادکان، ۹۶ عدد بود.

روش های آزمایشگاهی

تغییرات دانسیته باکتریایی به روش محتمل‌ترین تعداد (MPN) پایش گردید(۱۸،۱۴). استخراج n-هگزادکان از خاک و سنجش آن به وسیله دستگاه GC-FID بر اساس روش ۳۵۰۰C آژانس حفاظت محیط زیست امریکا به ترتیب زیر انجام شد. روش شامل توزین ۳ گرم خاک اصلاح شده به روش زیستی و سه مرتبه استخراج به مدت ۳۰ دقیقه با شیکینگ با دور ۱۸۰ rpm و در ادامه اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه و استفاده از مخلوط حلال تری‌کلرواتان و متانول (۲:۱ حجمی/ حجمی) بود. آنالیز n-هگزادکان از طریق آنالیز کروماتوگرافی گازی (Chrompack CP 9001) مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله (FID) و برخوردار از ستون کاپیلاری HP5 (۳۰ متر× ۰/۳۲ ×۰/۲۵ میکرومتر) تعیین شد. دمای ستون با نرخ ۱۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه از ۶۰ به ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و به مدت ۵ دقیقه در این دما نگه داشته شد. دمای انژکتور و دتکتور به ترتیب بر روی ۲۴۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

تنظیم شدند(۲۰،۱۹). نوع خاک با آنالیز دانه‌بندی و عناصر موجود در خاک از طریق آنالیز فلورسنس اشعه ایکس (XRF) تعیین گردیدند. دستگاه XRF با مارک فیلیپس و مدل PW2404 ساخت کشور هلند بود.

یافته ها

نوع خاک

نمونه خاک انتقالی حاوی ۴۱/۹ درصد رس، ۴۰/۷ درصد سیلت و ۱۷/۴ درصد ماسه با تخلخل ۲۴/۷ درصد و از نوع رسی- سیلتی بود. نتایج آنالیز XRF برای شناسایی اجزاء موجود در خاک در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

جدول شماره ۱: مشخصات فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک مورد استفاده در پژوهشبه دست آمده از آنالیز XRE

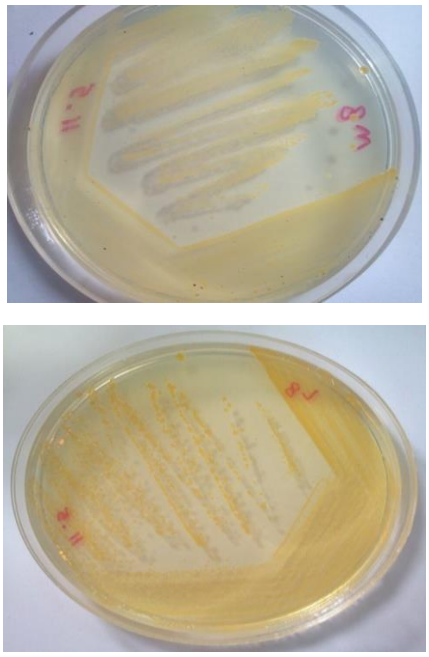
شاخص	میزان (درصد)	شاخص	میزان (درصد)
ماسه	۴۱/۹	SiO_2	۵۹/۱۵
رس	۴۰/۷	P_2O_5	۰/۱۸
سیلت	۱۷/۴	K_2O	۳/۳۵
تخلخل	۲۱/۳	CaO	۸/۵۲
رطوبت	۱۱/۰۹	TiO_2	۰/۳۱
L.O.I	۹/۲۶۲	Fe_2O_3	۲/۶۸۵
Na_2O	۱/۷۳	Cu	۰/۰۸۲
MgO	۱/۱۵	Sr	۰/۰۲۳
Al_2O_3	۱۳/۵۵	Zr	۰/۰۰۸

نوع باکتری ها

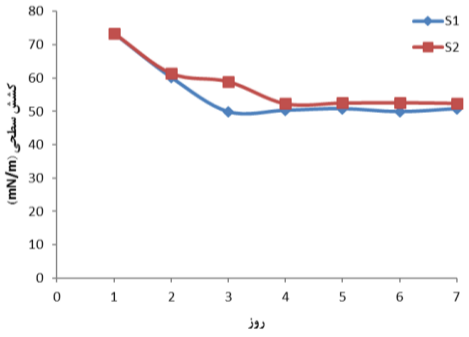
آنالیز نتایج تعیین توالی با استفاده از پایگاه اطلاعات NCBI و blastn نشان داد که سویه‌های S1 و S2 قطعاً به جنس پسودوموناس گونه آئروژینوزا تعلق دارند و قرابت ژنتیکی آن‌ها با سایر سویه‌های *پسودوموناس آئروزینوزا* به ترتیب ۹۸ و ۹۹ درصد می‌باشد. تصاویر کشت های خالص در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.

قابلیت تولید بیوسورفکتانت

پتانسیل تولید بیوسورفکتانت کشت‌های خالص سویه‌های S1 و S2 *پسودوموناس آئروژینوزا* با اندازه‌گیری تغییرات کشش سطحی به عنوان شاخص از حضور بیوسورفکتانت درکشت‌های خالص هر سویه پایش گردید (نمودار شماره ۱). کم‌ترین مقادیر کشش سطحی مخلوط کشت مایع سویه S1 در روز ۳ به ۴۹/۹ mN/m و سویه S2 در روز چهارم به ۵۲/۳ mN/m کاهش یافت.



تصویر شماره ۱: کشت‌های خالص باکتری‌های پسودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده دارای قابلیت تجزیه n-هگزادکان، الف) سویه S1 و ب) سویه S2



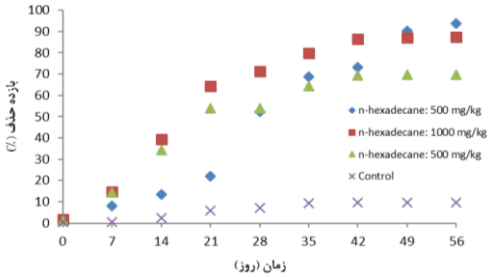
نمودار شماره ۱: تغییرات کشش سطحی کشت های خالص سویه‌های S1 و S2 گونه های *پسودوموناس آئروژینوزا*

بازده حذف n-هگزادکان

بازده حذف حذف n-هگزادکان در انتهای روز ۵۶ به ازای غلظت های اولیه ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ mg/kg به ترتیب ۹۳/۶ درصد، ۸۷/۵ درصد و ۶۹/۶۲ درصد بود (نمودار شماره ۲). به عبارت دیگر میزان n-هگزادکان تجزیه شده به ازای غلظت اولیه ۱۰۰ mg/kg معادل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

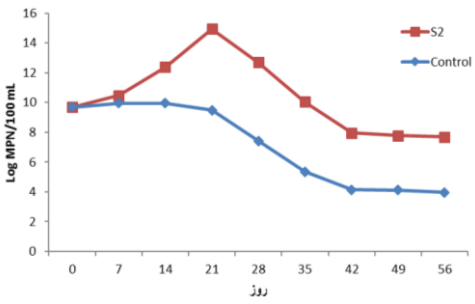
۹۳/۶ mg/kg، به ازای غلظت اولیه ۱۰۰۰ mg/kg معادل ۸۷۵ mg/kg و به ازای غلظت اولیه ۵۰۰۰ mg/kg معادل ۳۴۸۱ mg/kg بود. بازده حذف در نمونه شاهد فاقد بذر باکتریایی تنها ۹/۸ درصد بود.



نمودار شماره ۲: تغییرات بازده حذف زیستی n-هگزادکان به وسیله کشت مخلوط باکتری‌های سویه های S1 و S2 *پسودوموناس آئروژینوزا*

تغییرات دانسیته باکتریایی

تغییرات دانسیته باکتریایی کشت مخلوط باکتریایی مورد استفاده در تجزیه زیستی n-هگزادکان در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است. بیش‌ترین دانسیته باکتریایی در روز ۲۱ با دانسیته باکتریایی معادل ۱۴/۹ log MPN/100 mL و کم‌ترین مقدار معادل ۷/۶۹ log MPN/100 mL در روز ۵۶ از ابتدای آغاز فرایند تجزیه زیستی مشاهده گردید. هم‌چنین تغییرات دانسیته باکتریایی در نمونه‌های شاهد فاقد آلودگی آلی، حاکی از روند کاهش دانسیته باکتریایی در دوره زمانی مورد مطالعه و کاهش دانسیته باکتریایی از ۹/۶۹ log MPN/100 mL در روز صفر به ۳/۹۵ log MPN/100 mL در روز ۵۶ بود.



نمودار شماره ۳: تغییرات دانسیته باکتریایی کشت مخلوط حاوی گونه های *پسودوموناس* در دوره اصلاح زیستی

بحث

کشت مخلوط باکتریایی مشتمل بر دو سویه پسودوموناس آئروژینوزا با کدهای S1 و S2 برای تجزیه زیستی n-هگزادکان مورد استفاده قرار گرفت. در پژوهش فعلی بازده حذف n-هگزادکان به ازای غلظت های اولیه ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ mg/kg به ترتیب ۹۳/۶ درصد، ۸۷/۵ درصد و ۶۹/۶۲ درصد پس از ۵۶ روز واکنش زیستی بود که بسیار بیش تر از مقدار ۹/۸ درصد به دست آمده در نمونه های شاهد بود. بازده حذف به موازات افزایش غلظت اولیه n-هگزادکان کاهش یافت، لکن میزان کلی بار حذف شده در غلظت‌های بالاتر بسیار بیش تر است. تجمع بار سمی متابولیت‌های واسطه تولیدی، کمیت بالای بار اولیه آلی، کمبود دانسیته باکتریایی اولیه به ازای غلظت‌های بالاتر n-هگزادکان و فقدان زمان کافی برای متابولیسم و تکثیر بار باکتریایی مورد نیاز و نیاز به زمان واکنش بالاتر از علل کاهش بازده حذف در زمان واکنش مساوی به ازای غلظت های اولیه n- هگزادکان متفاوت بود. در مطالعه ای به وسیله پرتوی نیا و همکاران (۲۰۱۰)، بازده حذف n-هگزادکان با غلظت اولیه ۱۰۰۰۰ mg/kg در یک بیوراکتور دوغابی با استفاده از باکتری های غنی سازی شده بر اساس TOC پس از ۹ روز ۵۴ درصد بود که با غلظت‌های اولیه ۵۰۰۰ mg/kg در مطالعه فعلی قابل مقایسه است(۲۱). n-هگزادکان یک آلاینده فاز غیر آبی به شمار رفته و با توجه به ضرورت محلول بودن آلاینده برای تجزیه باکتریایی، یکی از دلایل احتمالی حذف و تجزیه n-هگزادکان در نمونه‌های خاک آلوده، علاوه بر انحلال بسیار جزئی n-هگزادکان، 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 EPS ها شامل غلظت بحرانی میسلیوم، شاخص امولوسیون کنندگی و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

قدرت کاهش کشش سطحی درمقایسه با بیوسورفکتانت‌های خالصی نظیر سورفکتین و رامنولیپید بسیار ضعیف‌تر می‌باشد. این فرضیه با اندازه‌گیری کشش سطحی محلول کشت تایید شد(۲۲).کشش سطحی محلول کشت برای سویه S1 در روز ۳ به ۴۹/۹ mN/m و برای سویه S2 در روز چهارم به ۵۲/۳ mN/m کاهش یافت که قابلیت ترشح EPS و بیوسورفکتانت را به وسیله سویه‌های S1 و S2 تایید می‌نماید. EPS ها دارای سرهای آبدوست و آبگریز بوده و قادر به عرضه خصوصیات سطحی متنوعی بوده و انحلال هیدروکرین‌های آبگریز را ارتقاء می‌دهد. در اولین مرحله، یک سری نیروهای جاذبه نظیر واکنش متقابل آبگریزی EPS و n-هگزادکان را به هم نزدیک می‌کند(۲۳). واکنش متقابل EPS و هیدروکربن‌های آبگریز، خود به خودی و گرمازاد بوده و پیوند آن‌ها تحت تاثیر غالب واکنش‌های متقابل آبگریزی است. از سوی دیگر آنزیم‌های درون EPS ها شامل اکسیدورداکتازها و هیدرولازها نقش مهمی در تجزیه n-هگزادکان دارند. برخی ترکیبات سمی مقاوم به وسیله اکسیدورداکتازهایی نظیر لاکاز، پلی فنول اوکسیداز و کاتالاز که با تجزیه هیدروکربن‌ها در ارتباطند، تجزیه می‌شوند(۲۴). این عوامل در تجزیه n-هگزادکان آبگریز مؤثر بوده‌اند. نمونه‌های شاهد فاقد کنسرسیوم میکروبی در زمان واکنش یکسان نشان‌دهنده رخداد چیزی در حدود ۹/۸ درصد برای غلظت اولیه ۵۰۰ mg/kg بود. این کاهش به اثرات مربوط به جذب سطحی آلاینده توسط ذرات خاک نسبت داده می‌شود. نمونه خاک مورد بررسی با حدود ۴۰ درصد رس می‌تواند نقش یک جاذب را ایفا کرده و آلاینده مورد بررسی را به روش جذب سطحی حذف نماید. جذب هیدروکربن های آبگریز در مطالعات دیگر مورد تأیید بوده است(۱۴). این امر با افزایش آبگریزی آلاینده تشدید می‌شود. افزایش دانسیته باکتری‌های کشت مخلوط به ۱۴/۹ log MPN/100 mL و روند نزولی دانسیته باکتریایی از ۹/۶۹ log MPN/100 mL در روز صفر به ۳/۹۵ log MPN/100 mL در روز ۵۶ در نمونه‌های شاهد، حاکی از غلبه مکانیزم تجزیه زیستی بر جذب سطحی بود. با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش فعلی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده قابلیت بسیار مناسبی در تجزیه زیستی n-هگزادکان و سایر هیدروکربن‌های مشاور دارند.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مورد حمایت کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور به شماره ۹۳S۹۵ می‌باشد.

References

1. Freydoni R, Farhadi Z, Bakhtiari A, Saravi H. Integrated Use of n-Alkanes and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Source Identification Petroleum Hydrocarbons at 5, 15 and 30 m Depths in Noshahr and Amir Abad Ports, Caspian Sea. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(101): 56-65 (Persian).
2. Agamuthu P, Tan YS, Fauziah SH. Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. Procedia Environ Sci 201; 18: 694-702.
3. Ying W, Jiang F, Qianxin L, Xianguo L, Xiaoyu W, Guoping W. Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momogewet land of China. Chin Geogr Sci 2013; 23(6):708-715.
4. Silva N, Rufino RD, Luna, JM, Santos VA, Sarubbo LA. Screening of Pseudomonas species for biosurfactant production using low-cost substrates. Biocatal Agric Biotechnol 2014; 3(2): 132-139.
5. Maddela NR, Masabanda M, Leiva-Mora M. Novel diesel-oil degrading bacteria and fungi

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

from Ecuadorian Amazon rainforest. Water Sci Technol 2015; 71(10): 1554-1561.

6. Kang Y, Park YJ, Jung J, Park W. Inhibitory effect of aged petroleum hydrocarbons on the survival of inoculated microorganism in a crude-oil- contaminated site. J Microbiol Biotechnol 2009; 19(12): 1672-1678.
7. Sun J, Xu L, Tang Y, Chen F, Wu X. Simultaneous degradation of phenol and n-hexadecane by Acinetobacter strains. Bioresource Tech .2012; 123: 664-668.
8. Chung TP, Tseng HY, Juang RS. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized Pseudomonas putida systems. Process Biochem 2003; 38(10): 1497-1507.
9. Yuan Y, Guo S, Li F, Li T. Effect of an electric field on n hexadecane microbial degradation in contaminated soil. Int Biodeterior Biodegradation 2013; 77: 78-84.
10. Kardani M, Takdastan A. Removal of Total Petroleum Hydrocarbons Using Vetiveria Zizanioides and Microbial Population Changes in Soil Contaminated with Oil in Ahvaz. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(131): 87-97 (Persian).
11. Hosseini Panah E, Takdastan A. Feasibility of Total Petroleum Hydrocarbon Removal from Drill Cutting with Digested Sludge Using Earth Worm. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 25(133): 319-324 (Persian).
12. Rezaei Kalanatry R, Badkoubi A, Mohseni-Bandpei A, Esrafili A, Jorfi S, Dehghanifard E, Baneshi M. Modification of PAHs Biodegradation with Humic Compounds. Soil Sediment Contam 2013; 22(2): 185-198.
13. Nayak A, Vijaykumar M. andKaregoudar T. Characterization of biosurfactant produced by Pseudoxanthomonas sp. PNK-04 and its application in bioremediation. Int Biodeterior Biodegradation 2009; 63(1): 73-79.
14. Jorfi S, Rezaee A, Mohebali G, Jaafarzadeh N. Application of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosaSP4 for bioremediation of soils contaminated to pyrene. Soil Sediment Contam 2013; 22(8): 890-911.
15. Hosokawa R, Sakaguchi N, Okuyama H. Establishment and characterization of turbine oil-degrading bacterial consortia. Int Biodeterior Biodegradation 2010; 64(8): 519-524.
16. Cenis JL. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Res 1992; 20(9): 2380.
17. Jorfi S, Rezaee A, Jaafarzadeh N, Mohebali G. Pyrene removal from contaminated soils by modified Fenton oxidation using iron nano oxides. J Environ Health Sci Eng 2013; 11(1): 17-24.
18. Eaton AD, Franson MA. Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, twenty first ed. Washington DC: American Public Health Assoiation; 2005.
19. Vigueras G, Shirai K, Hernández-Guerrero M, Morales M, Revah S. Growth of the fungus Paecilomyceslilacinus with n-hexadecane in submerged and solid-state cultures and recovery of hydrophobin proteins. Process Biochem 2014; 49(10): 1606-1611.
20. USEPA, 2007. Method 3550C, Ultrasonic Extraction. Available from: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3550c.pdf
21. Partovinia A, Naeimpoor F, Hejazi P. Carbon content reduction in a model reluctant clayey soil: Slurry phase n-hexadecane bioremediation. J Hazard Mater 2010; 181(1-3): 133-139.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

22. Jia C, Li P, Li X, Tai P, Liu W, Gong Z. Degradation of pyrene in soils by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from liquid cultures. Process Biochem 2011; 46(8): 1627-163.
23. Hilliou L, Freitas F, Oliveira R, Reis MAM, Lespineux D, Grandfils C, et al. Solution properties of an exopolysaccharide from a Pseudomonas strain obtained using glycerol as sole carbon source. Carbohydr Polym 2009; 78(3): 526-532.
24. Gianfreda L, Rao M. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. Enzyme Microb Technol 2004; 35(4): 339-354.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]