

## ارزیابی کارایی بیوسورفکتانت رامنولپید MR۰۱ و تریتون X-۱۰۰ در حذف فناترن از خاک

معصومه گلشن<sup>۱</sup>، سیمین ناصری<sup>۲</sup>، مهدی فرزاد کیا<sup>۳</sup>، علی اسرافیلی<sup>۴</sup>، روشنگ رضایی کلانتری<sup>۵</sup>، لیلا کریمی تکانلو<sup>۶</sup>

پذیرش: ۹۲/۰۷/۲۸

دریافت: ۹۲/۰۴/۳۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** استفاده از سورفکتانت‌ها منجر به افزایش دسترسی زیستی به آلاینده‌های سخت تجزیه‌پذیر از جمله PAHs می‌شود. در این راستا استفاده از بیوسورفکتانت‌ها به دلیل سازگاری با محیط زیست مورد توجه ویژه قرار دارند، اما توانایی آنها در قبال سورفکتانت‌های شیمیایی باید مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق تأثیر سورفکتانت زیستی بر کارایی اصلاح زیستی خاک آلوده به فناترن مورد مقایسه با سورفکتانت شیمیایی قرار گرفت.

**روش بررسی:** خاک عاری از هر نوع آلودگی شیمیایی و میکروبی، به طور مصنوعی به فناترن آلوده شد، سپس محلول نمک‌های معدنی با غلظت ثابت از سورفکتانت شیمیایی تریتون X-۱۰۰ و بیوسورفکتانت رامنولپید MR۰۱ تهیه، بعد مخلوط میکروبی با قابلیت تجزیه فناترن در دو سطح غلظتی (۱ و ۲)  $(OD_{600nm})$ ، به محلول مذکور اضافه شد به طوری که نسبت ۱۰ درصد وزنی حجمی (خاک به محلول) حاصل گردد، کلیه نمونه‌ها و شاهد‌های مربوطه بر روی شیکر قرار گرفتند و هوادهی شدند. پس از ۸ هفته غلظت فناترن باقیمانده در خاک پس از استخراج توسط اولتراسونیک به HPLC تزریق و مورد سنجش قرار گرفت. جمعیت میکروبی نیز با روش MPN سنجش شد. این تحقیق براساس آزمایش فاکتوریل کامل انجام شد.

**یافته‌ها:** راندمان حذف فناترن با غلظت اولیه ۵۰ mg/kg در حضور تریتون X-۱۰۰، ۹۸/۵٪ و در حضور رامنولپید MR۰۱، ۸۸/۷٪ بدست آمد، در حالی که در غلظت ۳۰۰ mg/kg فناترن، این میزان برابر ۸۷٪ و ۷۶٪ به ترتیب برای تریتون X-۱۰۰ و رامنولپید MR۰۱ بدست آمد. در غیاب سورفکتانت در غلظت ۵۰ mg/kg، ۶۰/۷۶٪ و در غلظت ۳۰۰ mg/kg، ۵۱٪ راندمان حذف فناترن حاصل شد. راندمان حذف در  $OD_{600nm}=2$  بیشتر از  $OD_{600nm}=1$  بدست آمد. بررسی تغییرات جمعیت میکروبی با گذشت زمان نشان داد، حداکثر رشد میکروبی در هفته دوم در حضور بیوسورفکتانت رامنولپید بیشتر از تریتون X-۱۰۰ بوده است.

**نتیجه‌گیری:** در مناطق با آلودگی‌های کمتر (مناطق گسترده آلوده اطراف پالایشگاه‌ها) استفاده از رامنولپید می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب در کاهش آلودگی مورد نظر باشد. اما در مکان‌هایی با آلودگی بالا (مناطق که به طور متمرکز و یا تحت تأثیر حرارت آلوده شده‌اند) استفاده از سورفکتانت‌های شیمیایی به صورت خارج از مکان (Ex situ) نتایج مطلوب‌تری را حاصل می‌نماید.

**واژگان کلیدی:** هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، فناترن، دسترسی زیستی، رامنولپید، تریتون X-۱۰۰

۱- کارشناس ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- دکترای مهندسی شیمی، استاد دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دکترای بهداشت محیط، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۴- دکترای شیمی تجزیه، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران

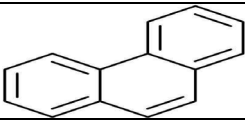
۵- (نویسنده مسئول): دکترای عمران محیط زیست، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۶- کارشناس ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران

یکی از راهکارهای پیشنهادی توسط United (US EPA) States Environmental Protection Agency استفاده از اصلاح زیستی برای تصفیه خاک‌های آلوده به این نوع ترکیبات است (۵). اصلاح زیستی یک استراتژی حذف PAHs با استفاده از میکروارگانیسم‌هایی است که توانایی متابولیز کردن PAHs به متابولیت‌هایی کم خطرتر و حتی  $CO_2$  و آب را دارند (۲). راندمان حذف در فازهایی که نرخ انتقال جرمی آنها پایین است مثل خاک‌های آلوده به PAHs کم بوده، به همین دلیل سورفکتانت‌ها می‌توانند از طریق انحلال‌پذیر کردن یا امولوسیون‌سازی به آزادسازی هیدروکربن‌های جذب شده از بافت خاک کمک کرده و غلظت‌های هیدروکربن‌ها را در فاز مایع افزایش دهند که منجر به افزایش نرخ انتقال جرمی می‌شود (۸-۵). سورفکتانت‌ها ملکول‌های دوگانه دوست (هم آب دوست و هم آب گریز) هستند که شامل دو بخش قطبی و غیر قطبی بوده که به آنها امکان می‌دهد در فاز مشترک بین فازهای مخلوط نشدنی (نظیر نفت / آب یا نفت / هوا) تجمع یابند و کشش سطحی بین فازی را کاهش دهند. فعالیت

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه (PAHs) گروهی از ترکیبات شیمیایی حاوی کربن و هیدروژن بوده که از دو یا بیشتر حلقه‌های آروماتیک تشکیل شده‌اند. مواجهه موجودات زنده با PAHs از طریق تنفس، بلع و مواجهه پوستی است. متابولیسم PAHs در بدن انسان ترکیبات اپوکسید با خاصیت موتاژنی و کارسینوژنی تولید کرده که در این مورد مواردی مثل سرطان‌های ریه، کبد، پانکراس، روده و پوست گزارش شده است (۱). PAHs، مثل فنانترن، از احتراق ناقص سوخته‌های آلی مثل زغال سنگ، نفت، گاز، چوب، زباله و از صنایع پتروشیمی و پالایشگاه‌های نفت ایجاد می‌شوند. آزادسازی این ترکیبات در محیط باعث آلودگی منابع طبیعی می‌شود (۲). با افزایش تعداد حلقه‌ها در ساختار مولکولی PAHs، حلالیت آبی آنها کاهش و ضریب آب - اکتانول ( $K_{ow}$ ) افزایش می‌یابد. ضریب تفکیک بالای این ترکیبات می‌تواند باعث جذب شدید این ترکیبات به سطح ذرات خاک شده و در محیط خاک ته نشین شوند (۳). ساختار و ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی فنانترن در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: ساختار و ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی فنانترن (۴)

$C_{14}H_{10}$	
Molecular weight	۱۷۸/۲
Mp ( $^{\circ}C^a$ )	۱۰۱
Bp ( $^{\circ}C^b$ )	۳۴۰
Aqueous solubility ( $15^{\circ}C$ , $mg L^{-1}$ )	۱/۶
Log $K_{ow}^c$	۴/۵۷
Vapor pressure ( $20^{\circ}C$ , mmHg)	$6/8 \times 10^{-4}$

Mp<sup>a</sup>: نقطه ذوب

Bp<sup>b</sup>: نقطه جوش

$K_{ow}^c$ : ضریب تفکیک آب - اکتانول

سورفکتانت‌های شیمیایی سمیت پایین، تجزیه زیستی بالاتر، سازگاری بالاتر با محیط زیست و توانایی سنتز آن‌ها از منابع تجدید پذیر است (۵، ۱۵ و ۹).

با توجه به آلودگی خاک اطراف پالایشگاه‌ها که در غلظت متوسط و برخی موارد زیاد است، در این پژوهش اثر مقایسه‌ای بیوسورفکتانت رامنولپید MR۰۱ و سورفکتانت شیمیایی متداول تریتون X-۱۰۰ در حذف فنانتن از خاک بررسی شد. اثر دانسیته تلقیح اولیه باکتریایی در حذف فنانتن در حضور سورفکتانت‌ها تعیین شد.

### مواد و روش‌ها مواد شیمیایی

فنانتن با درجه خلوص بیش از ۹۸٪، استون و متانول HPLC grade از شرکت ROMIL، نوترینت آگار و نوترینت برات از شرکت BIOMARK، اسید سولفوریک، متیلن بلو، کلرفرم، NaCl و نمک‌های محیط کشت معدنی از شرکت Merck تهیه شد. سورفکتانت شیمیایی غیر یونی تریتون X-۱۰۰ از سیگما آلدریج تهیه شد. بیوسورفکتانت رامنولپید گلیکولپید تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا MR۰۱، یک ترکیب فعال سطحی آنیونی است که از پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تهران تهیه شد (۲۰).

### آماده‌سازی خاک

خاک جمع‌آوری شده از عمق ۲۰-۵ cm بالای زمین اطراف پالایشگاه تهران (مکان‌های غیر آلوده)، در دمای اتاق خشک و از الک ۲ mm عبور داده شد. سپس برای عاری بودن از مواد آلی آن را با استون شسته و این کار طی سه مرحله تکرار انجام گرفت. نهایتاً برای حذف استون، خاک با آب مقطر مورد شستشو قرار گرفت و پس از خشک شدن در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱۵ psi در مدت زمان ۱۵ min) استریل شد. با توجه به آلودگی خاک‌های اطراف پالایشگاه‌ها که حدود ۴۰-۶۰ mg/kg فنانتن گزارش شده (۲۱)، در این تحقیق به طور مصنوعی خاک به فنانتن در دو غلظت ۵۰ mg/kg فنانتن به عنوان نمونه‌ای از خاک‌هایی که به طور متداول به ترکیبات نفتی آلوده شده‌اند و ۳۰۰ mg/kg فنانتن به عنوان نمونه‌ای از خاک‌هایی که به صورت نقطه‌ای دارای آلودگی زیاد هستند (مانند نشت ترکیبات نفتی از مخازن ذخیره و یا

سطحی باعث می‌شود سورفکتانت‌ها عوامل امولسیفایر، کف‌زا و پخش‌کننده باشند (۹). غلظتی که در آن میسل‌ها شروع به تجمع می‌کنند، غلظت بحرانی میسل Critical Micelle Concentration (CMC) نامیده می‌شود. این غلظت به نقطه‌ای مربوط است که در آن سورفکتانت کمترین کشش سطحی را نشان می‌دهند. در غلظت‌های پایین‌تر از بحرانی میسل (CMC)، به علت باند شدن میکروارگانیزم و سورفکتانت، میسل‌ها ظاهر نمی‌شوند (۱۰).

اثر گذاری سورفکتانت‌ها در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها در تحقیقات قبلی گزارش شده است (۶). در تحقیق Zhang و همکاران (۲۰۱۲) تجزیه زیستی پیرن به وسیله کلسیلا اکستوکا در حضور سورفکتانت شیمیایی توین ۸۰ ارتقاء یافت (۱۱). تجزیه زیستی فنانتن در حضور سورفکتانت‌های شیمیایی توین ۸۰ و سدیم دودسیل بنزن سولفونات با استفاده از سیتروباکتر sp. SA۰۱ افزایش یافت (۱۲) و همچنین افزایش تجزیه زیستی نفت خام در حضور بیوسورفکتانت تولید شده از روغن بادام با استفاده از لاکتوباسیلوس دلبروکی (۱۳) و در حضور بیوسورفکتانت‌های سورفاکتین و رامنولپید با استفاده از سودوموناس آئروژینوزا، گزارش شده است (۱۴).

بیوسورفکتانت‌ها متابولیت‌های میکروبی دارای فعالیت سطحی بوده و از طریق تجمع در سطح بینابینی دو فاز غیر قابل اختلاط، کشش سطحی را کاهش می‌دهند و باعث افزایش حلالیت ترکیبات آلی هیدروفوب می‌شوند (۹ و ۱۵). کاربرد این مواد در پنج دهه اخیر به علت زیست تخریب‌پذیری در مقایسه با سورفکتانت‌های شیمیایی به مقدار زیادی گسترش یافته است (۱۶). دو مکانیسم برای افزایش تجزیه زیستی ترکیبات آلی کم محلول توسط بیوسورفکتانت‌ها وجود دارد: (۱) بیوسورفکتانت‌ها، ترکیبات آب‌گریز را در داخل میسل‌های خود حل نموده و از این طریق به طور مؤثری حلالیت آبی ظاهری ترکیبات آلی و قابلیت دسترسی آن‌ها را برای جذب توسط یک سلول افزایش می‌دهند، (۲) بیوسورفکتانت مانند یک درجنت عمل می‌کند و باعث آب‌گریز شدن سطح سلول شده (در نتیجه کاهش و حذف لیپو پلی ساکراید از غشاء خارجی) و در نتیجه افزایش تماس فیزیکی بین سلول و ترکیبات کم محلول فراهم می‌شود (۱۷ و ۱۸). مزیت بیوسورفکتانت‌ها بر



سورفکتانت برابر  $0.188 \text{ mg/kg d}^{-1}$ ،  $0.179$  و  $0.154$  در غلظت  $50 \text{ mg/kg}$  بدست آمد. برای غلظت  $300 \text{ mg/kg}$  این ترتیب برابر  $0.466$ ،  $0.407$  و  $0.273$  بدست آمد. در  $1 \text{ OD} =$  نرخ حذف به ترتیب برای ترتیب  $X-100$ ، رامنولیپید و بدون حضور سورفکتانت برابر  $0.183 \text{ mg/kg d}^{-1}$ ،  $0.174$  و  $0.146$  در غلظت  $50 \text{ mg/kg}$  بود. در حالیکه در غلظت  $300 \text{ mg/kg}$  برای ترتیب  $X-100$ ، رامنولیپید و نمونه شاهد نرخ حذف به ترتیب برابر  $0.464 \text{ mg/kg d}^{-1}$ ،  $0.363$  و  $0.2/3$  حاصل شد.

آنالیز نمونه‌ها استفاده شد و داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. کلیه مراحل آزمایش در آزمایشگاه پایلوت دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت پذیرفته است.

#### یافته‌ها

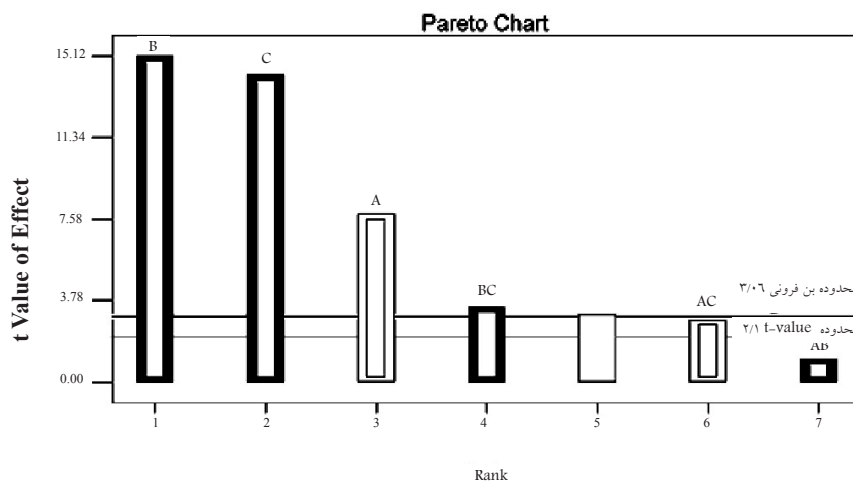
مطابق با جدول ۲ نمونه‌ها در  $2 \text{ OD} =$  راندمان حذف بیشتری نسبت به  $1 \text{ OD} =$  داشتند، به طوری که در  $2 \text{ OD} =$  نرخ حذف، به ترتیب برای ترتیب، رامنولیپید و نمونه‌های بدون حضور

جدول ۲: مشخصات نمونه‌های اصلی و شاهد و نتایج حاصله بعد از هفته هشتم

آزمایش	نوع سورفکتانت %w/v 0.12	دانسیته ی اولیه باکتریایی (OD)	غلظت اولیه ی فنانتون mg/kg	درصد حذف فنانتون در انتهای هفته هشتم در هر ارلن از خاک و مایع (%)
۱	rhamnolipid	۱	۵۰	۸۳/۱۲
۲	Triton-X100	۱	۵۰	۹۲/۶
۳	rhamnolipid	۲	۵۰	۸۸/۶۸
۴	Triton-X100	۲	۵۰	۹۸/۵
۵	rhamnolipid	۱	۳۰۰	۶۷/۸۲
۶	Triton-X100	۱	۳۰۰	۸۶/۶۹
۷	rhamnolipid	۲	۳۰۰	۷۶/۰۹
۸	Triton-X100	۲	۳۰۰	۸۷/۱۴
۹	-	۱	۵۰	۵۱/۹۶
۱۰	-	۲	۵۰	۶۰/۷۶
۱۱	-	۱	۳۰۰	۴۳/۴۱
۱۲	-	۲	۳۰۰	۵۰/۹۹
شاهد شیمیایی نمونه ۱ و ۳	rhamnolipid	-	۵۰	۷/۳۲
شاهد شیمیایی نمونه ۲ و ۴	Triton-X100	-	۵۰	۵/۴
شاهد شیمیایی نمونه ۵ و ۷	rhamnolipid	-	۳۰۰	۱۰/۲
شاهد شیمیایی نمونه ۶ و ۸	Triton-X100	-	۳۰۰	۸/۹
شاهد شیمیایی نمونه ۹ و ۱۰	-	-	۵۰	-
شاهد میکروبی نمونه ۱۱ و ۱۲	-	-	۳۰۰	-
شاهد میکروبی نمونه ۱ و ۵	rhamnolipid	۱	-	-
شاهد میکروبی نمونه ۳ و ۷	Triton-X100	۲	-	-
شاهد میکروبی نمونه ۲ و ۶	rhamnolipid	۱	-	-
شاهد میکروبی نمونه ۴ و ۸	Triton-X100	۲	-	-

جدول ۳: جدول ANOVA برای مدل فاکتوریل کامل (۲<sup>k</sup>) متغیر اسمی نوع سورفکتانت و دو متغیر عددی غلظت فناترن و دانسیته تلقیح اولیه باکتری

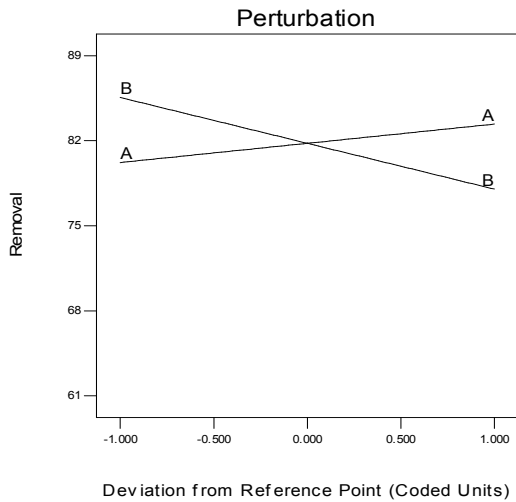
Source	SS	DF	MS	F-Value	P-Value
Model	۱۲۹۰/۰۹	۶	۲۱۵/۰۲	۸۵/۵۹	<۰/۰۰۰۱
A: OD.Conc	۱۵۲/۲۶	۱	۱۵۲/۲۶	۶۰/۶۱	<۰/۰۰۰۱
B: PHE.Conc.	۵۷۴/۵۸	۱	۵۷۴/۵۸	۲۲۸/۷۲	<۰/۰۰۰۱
C: Type.surfactant	۵۰۹/۲۲	۱	۵۰۹/۲۲	۲۰۲/۷۱	<۰/۰۰۰۱
AB	۲/۷۸	۱	۲/۷۸	۱/۱۱	۰/۳۰۷۴
AC	۲۱/۰۴	۱	۲۱/۰۴	۸/۳۷	۰/۰۱۰۱
BC	۳۰/۲۲	۱	۳۰/۲۲	۱۲/۰۳	۰/۰۰۲۹
Residual	۴۲/۷۱	۱۷	۲/۵۱		
Cor Total	۱۳۳۲/۸۰	۲۳			



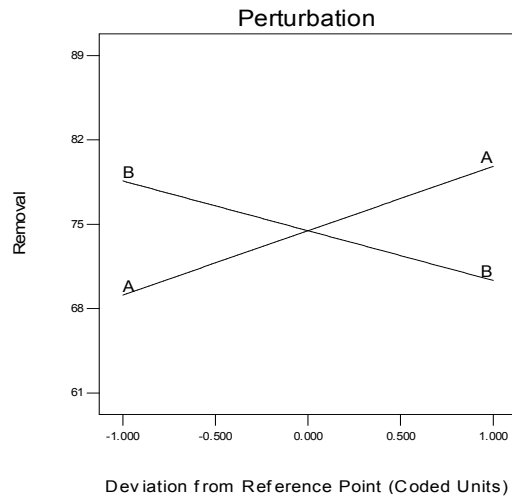
شکل ۱: نمودار pareto برای فاکتوریل کامل: (A) دانسیته تلقیح اولیه باکتریایی، (B) غلظت فناترن در خاک و (C) نوع سورفکتانت.

تلقیح اولیه باکتری (فاکتور A) با F-Value معادل با ۱۱/۸٪ بوده است. هر سه فاکتور در سطح معنی‌داری بالایی قرار دارند ( $P < ۰/۰۰۰۱$ ). شکل ۱ اثرات آماری مرتبط که از بیشترین به کمترین مرتب شده‌اند را نشان می‌دهد. در نمودار Pareto تمام اثرات که بالای خط t-value قرار دارد معنی‌دار هستند و اثراتی که بیشتر از خط محدودیت بن فرونی قرار دارند، معنی‌داری بالایی را نشان می‌دهند. بنابراین غلظت فناترن، نوع سورفکتانت و دانسیته تلقیح

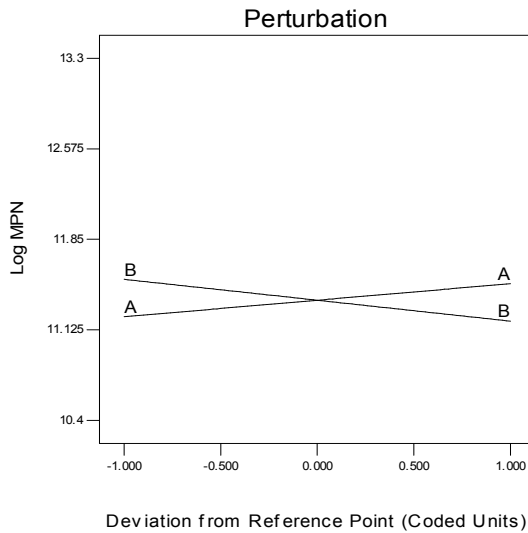
براساس نتایج حاصل از آزمون آماری آنالیز واریانس - ANOVA (جدول ۳)، مدل خطی (Linear) انتخابی برای این آزمایش با سه بار تکرار و  $P < ۰/۰۵$  قابل قبول (معنی دار) بوده بنابراین می‌توان به درستی بر یافته‌ها قضاوت نمود. نتایج این آزمون، فاکتور غلظت فناترن (فاکتور B) را با F-Value معادل با ۴۴/۵٪ مهم‌ترین متغیر نشان داد. نوع سورفکتانت (فاکتور C) با درجه اثر ۳۹٪ فاکتور مؤثر بعدی بوده و کمترین فاکتور تأثیرگذار در راندمان حذف، دانسیته



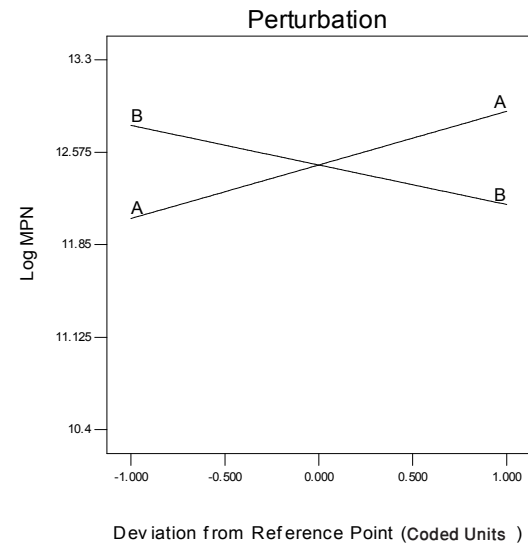
ب.



الف.



ت.



پ.

شکل ۲: نمودار اثر اصلی برای دو پاسخ، راندمان حذف فنانترن (%) در حضور (الف) تریتون-۱۰۰X، (ب) رامنولیبید، و جمعیت باکتریایی در حداکثر رشد سلولی (هفته دوم) در حضور (پ) تریتون-۱۰۰X و (ت) بیوسورفکتانت رامنولیبید؛ (A) دانسیته تلقیح اولیه، (B) غلظت فنانترن در خاک.

فاکتورهای، غلظت فنانترن و دانسیته تلقیح اولیه، در حضور سورفکتانت شیمیایی تریتون-۱۰۰X و بیوسورفکتانت رامنولیبید بر راندمان حذف (الف و ب) و حداکثر جمعیت کنسرسيوم در هفته دوم (پ و ت)، را نشان داده شده است.

اولیه به عنوان فاکتورهای مهم در تجزیه زیستی فنانترن انتخاب شدند. در بین برهمکنش‌ها، برهمکنش BC دارای اثر مهم ( $P < 0.05$ ) برابر  $0.02 < P$  و برهمکنش AC اثر مهم دیگر ( $P < 0.05$ ) برابر  $0.01$  بوده است به طوری که در شکل ۱ نشان داده شده است. نمودار اثر اصلی (شکل ۲) متغیرهای

رایج‌ترین اشکال اصلاح زیستی در مقایسه با سایر گزینه‌ها، زمان نسبتاً طولانی به دلیل کینتیک کند آنها است. در مورد PAHs، نرخ متابولیسم میکروبی در مکان با دو فاکتور محدود می‌شود: فقدان قابلیت میکروبی و پارتیشن بندی بالا به فاز جامد و حلالیت پایین این ترکیبات که منجر به دسترسی زیستی پایین برای میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده می‌شود. مطابق با نتایج حاصله (جدول ۲)، در شرایط بدون حضور سورفکتانت (نمونه‌های ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲)، راندمان حذف فناترن در مقایسه با استفاده از سورفکتانت‌ها، کمتر بوده است. عدم حضور سورفکتانت باعث می‌شود فناترن به سختی از خاک واجذب شود، به همین دلیل سرعت تجزیه زیستی در مقایسه با حضور سورفکتانت‌ها کمتر است. Thavasi و همکاران (۲۰۱۱) نیز در تحقیق خود به بهبود میزان تجزیه زیستی در حضور بیوسورفکتانت از طریق شتابی که در اثر افزایش دسترسی زیستی هیدروکربن فراهم شده بود، دست یافتند (۲۸). برای تجزیه PAHs نه تنها برهم کنش سورفکتانت و PAH مهم است، بلکه برهم‌کنش بین سورفکتانت و میکروارگانیسم، که ممکن است چسبندگی هیدروکربن به غشای سلول میکروبی را فراهم آورد، نیز عامل مهم دیگری است (۱۷). Kaczorek و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش تجزیه زیستی دیزل از فاز مایع را به دلیل اصلاح سطح سلول میکروبی در حضور سورفکتانت‌ها و بیوسورفکتانت‌ها که با افزایش چسبندگی سطح سلول برای آلاینده همراه بود، گزارش کرده‌اند (۲۴). Liu و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند پیش تصفیه با سورفکتانت‌ها باعث تغییر گروه‌های تابعی سطح سلول پنی سیلیوم سیمپلیسیسموم شده که منجر به چسبندگی یا جذب میکروارگانیسم به فل می‌شود (۲۹).

نتایج آنالیز واریانس با درصد اطمینان ۹۵٪ نشان می‌دهد تمام متغیرهای مستقل دارای اثرات معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) برابر  $0/0001 <$  است. فاکتور غلظت فناترن اثر منفی بر میزان حذف فناترن داشته است اما فاکتور دانسیته تلقیح اولیه باکتریایی اثر مثبت دارد ولی این اثر در مقایسه با اثر غلظت فناترن کوچک بوده که به نوع سورفکتانت بستگی دارد. همان طور که در نمودار اثر اصلی نشان داده شده است شیب خط فاکتور A

(دانسیته ی تلقیح اولیه) در حضور تریتون (شکل ۲ الف) کم است در حالی که در حضور رامنولپید (شکل ۲ ب) شیب تندی مشاهده می‌شود که نشان دهنده تأثیر بیشتر فاکتور A بر راندمان حذف در حضور رامنولپید است. مشابه با اثر فاکتور A، فاکتور B (غلظت فناترن) دارای شیب زیادی در حضور رامنولپید است بر خلاف تریتون که دارای شیب کمی است. ضمن آنکه سورفکتانت شیمیایی تریتون ۱۰۰-X در مقایسه با بیوسورفکتانت رامنولپید، راندمان حذف بیشتری داشته است (جدول ۲). یکی از عواملی که بر روی عملکرد سورفکتانت‌ها تأثیرگذار است، تشکیل ترکیبات فعال سطحی است و این زمانی رخ می‌دهد که غلظت CMC و یا بالاتر بدست آید (۳۰). در تحقیق حاضر از غلظت  $120 \text{ mg/L}$  که بالاتر از CMC هر کدام از سورفکتانت‌ها بوده، استفاده شده است. بر طبق نظر Kaczorek و همکاران (۲۰۰۸) دسترسی زیستی مستلزم تشکیل میسل‌های سورفکتانت و بیوسورفکتانت بوده که در غلظت‌های بالاتر از CMC ظاهر می‌شوند (۱۰).

توانایی سورفکتانت‌ها و بیوسورفکتانت‌ها در افزایش حذف آلاینده‌های هیدروفوب به دو عامل حلالیت و امولسیون‌سازی مربوط است (۶). توانایی تریتون احتمالاً به دسترسی زیستی آن به وسیله امولسیون‌سازی مربوط است که این باعث افزایش تجزیه زیستی هیدروکربن می‌شود. این پدیده توسط Mohanty و همکاران (۲۰۰۷) توضیح داده شد (۳۰). آن‌ها پیشنهاد کردند تریتون ۱۰۰-X می‌تواند به طور چشمگیری میزان و سرعت تجزیه دیزل در خاک را در غلظت ۲ برابر CMC با استفاده از دو سویه بورخولدریا سپاکیا و اکسزیگوباکتر آرانسیسیوم افزایش دهد (۳۰). Mohanty و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی مکانیسم اثر سورفکتانت‌ها و بیوسورفکتانت‌ها نشان دادند در حضور تریتون افزایش سطح به دلیل امولسیون شدن به همراه چسبندگی سلول منجر به افزایش مصرف n-آلکان از مایع شد در حالی که تأثیر رامنولپید به مکانیسم حلال سازی آن مربوط می‌شود (۶). در تحقیق Thavasi و همکاران (۲۰۱۱) نیز امولسیون‌سازی در حضور تریتون بیشتر از امولسیون‌سازی در حضور بیوسورفکتانت‌ها مشاهده شد (۲۸).



رشد باکتریایی در حضور بیوسورفکتانت بیشتر از سورفکتانت شیمیایی تریتون بوده است که می‌تواند به دلیل رقابت بین سورفکتانت با فنانترون به عنوان سوبسترای مصرفی کنسرسیون باکتریایی باشد (۶). Vipulanandan و همکاران (۲۰۰۰) نیز در تحقیق خود علت مهار در تجزیه زیستی نفتالین را به این عامل نسبت دادند (۳۱). همان طور که در شکل ۲ ت مشاهده می‌شود، شیبی که فاکتور A (غلظت OD) بر حداکثر جمعیت باکتری دارد، شیب افزایشی تندی بوده در حالی که این فاکتور در مقایسه با حضور تریتون  $X-100$  (شکل ۲ پ) دارای شیب افزایشی ملایمی است که نشان می‌دهد باکتری‌ها با رامنولپید تطابق بیشتری داشته و رشد بیشتری را نشان می‌دهند. تأثیری که فاکتور B (غلظت فنانترون) بر جمعیت باکتری در حضور رامنولپید داشته (شکل ۲ ت) دارای شیب کاهشی تندی است به طوری که افزایش غلظت فنانترون با کاهش در جمعیت باکتری همراه است. در حضور تریتون  $X-100$  این روند کاهشی دارای شیب ملایمی است. کاهش جمعیت باکتری در حضور تریتون در مقایسه با رامنولپید ممکن است به دلیل سمیتی باشد که تریتون بر روی میکروارگانیسم داشته است (۸). یکی از دلایل سمیت ممکن است، تجمع واسطه‌های سمی به علت متابولیسم ناقص ناشی از برهمکنش‌های سوبستره - سورفکتانت باشد، سمیت سلولی ناشی از برهمکنش مولکول‌های سورفکتانت با غشای سلولی یا پروتئین‌های غشای سلولی و بازدارندگی آنزیم‌های مسیر کاتابولیک یا از طریق ارتباط با آنزیم یا با سوبستره نیز می‌تواند از سایر علل سمیت باشد (۳۲).

حذف غلظت‌هایی از آلاینده که معمولاً در خاک‌های مناطق نفتی مشاهده می‌گردد، توسط بیوسورفکتانت نتایج قابل توجهی را حاصل نمود. اما در مورد خاک‌هایی که آلودگی بیشتری داشتند، غلظت باقیمانده در خاک در حد نسبتاً بالایی بوده است ( $90 \text{ mg/kg}$ ) بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که به دلیل سازگاری بیشتر بیوسورفکتانت‌ها با محیط استفاده از آن‌ها به صورت در مکان برای آلودگی متداول این مناطق با سطوح آلودگی کم، نتایج مطلوبی را به دنبال داشته باشد و شاید استفاده از بیوسورفکتانت در مکان قابل توصیه باشد که نیاز به تحقیق گسترده‌تری دارد. اما در مناطق با سطوح بالای

بالانس آبدوست-لیپوفیلیک (HLB) Hydrophilic Lipophilic Balance در غلظت‌های بیشتر از CMC بیوسورفکتانت‌ها، کاهش می‌یابد (۴). در این شرایط، سرهای آب‌گریز ملکول‌های سورفکتانت در درون ساختار میسل به هم چسبیده و سر آب‌دوست به سمت خارج در فاز آب قرار می‌گیرد. در نتیجه درون میسل یک محیط رقابتی برای مولکول‌های آب‌گریز شکل می‌گیرد و حلالیت PAH افزایش می‌یابد (۲۳). نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که استفاده از رامنولپید بر حذف مؤثر بوده اما این تأثیر در قبال اثر تریتون کمتر است (جدول ۲). بنابراین احتمالاً تأثیر حلالیت بر حذف زیستی فنانترون، کمتر از تأثیر امولسیون‌کنندگی است. در تحقیق Shin و همکاران (۲۰۰۹) نیز افزایش در حلالیت فاکتور مؤثری بر حذف زیستی نبوده است (۸). افزایش در آب‌گریزی سطح سلول و تغییر الکترونگاتیویته سطح سلول (کاهش الکترونگاتیویته) منجر به جذب هیدروکربن به سطح سلول می‌شود. Mohanty و همکاران (۲۰۱۲) علت اثرگذاری کمتر عامل حلالیت را به ایجاد مهار ناشی از کاهش قابلیت آب‌گریزی باکتری اطلاق نمود. قابلیت آب‌گریز بودن سطح باکتری، جذب آلاینده آب‌گریز را تسهیل می‌کند اما حلالیت منجر به کاهش جذب این نوع آلاینده‌ها در حالت جامد می‌شود (۶). Thavasi و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیق خود افزایش تجزیه زیستی نفت خام را با بیشترین آب‌گریزی، توسط تجزیه‌کننده‌های سریع هیدروکربن مشاهده کرد (۲۸). Zhao و همکاران (۲۰۱۱) نیز به این نتیجه رسیدند که رامنولپید بر روی سطح آب‌گریز باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس جذب می‌شود و منجر به پر کردن سایت‌های آب‌گریز آن می‌گردد (۱۷). سرهای آب‌دوست رامنولپید در این حالت با فاز آبی تماس پیدا کرده که منجر به کاهش آب‌گریزی سطح سلول باسیلوس سوبتیلیس می‌شوند (۲۳).

افزایش رشد سلول‌های تجزیه‌کننده آلاینده با افزایش درصد حذف آلاینده همراه است، Whang و همکاران (۲۰۰۸) یک ارتباط قوی بین تولید بیومس و درصد حذف دیزل را گزارش کردند (۱۴)، اما نتایج حداکثر رشد باکتریایی که در هفته دوم حاصل گردید با حذف فنانترون چنین ارتباطی را نشان نداد. علیرغم حذف کمتر توسط بیوسورفکتانت رامنولپید  $MR01$

آلودگی استفاده از سورفکتانت شیمیایی می تواند مؤثرتر باشد به همین دلیل استفاده از آن به صورت خارج از مکان و به طریق شستشوی خاک و سپس تجزیه زیستی محلول قابلیت پذیرش بیشتری دارد.

### نتیجه‌گیری

بررسی سه فاکتور نوع سورفکتانت، غلظت تلقیح اولیه میکروبی و غلظت فنانترن موجود در خاک نشان داد فاکتور غلظت فنانترن با اثر منفی، بیشترین تأثیر را در حذف فنانترن داشته است. راندمان حذف در حضور تریتون ۱۰۰-X در غلظت بالاتر از CMC بیشتر از رامنولپید بوده است. غلظت تلقیح اولیه میکروبی اثر مثبتی بر راندمان حذف داشت به طوری که در  $OD=2$  راندمان بیشتر از  $OD=1$  بدست آمد. تلفیق نتایج رشد باکتریایی و حذف آلاینده پیشنهاد می‌کند که (۱) مکانیسم امولسیون‌کنندگی عامل مؤثرتر از حلالیت بوده است، (۲) بیوسورفکتانت قابلیت مصرف به عنوان سوستر برای کنسرسیوم باکتریایی را دارد، (۳) عدم تطابق رشد باکتریایی با حذف می‌تواند مربوط به اثر مهارکنندگی بیوسورفکتانت بر روی یک یا چند گونه باکتریایی به کار رفته در کنسرسیوم باکتریایی باشد.

### تشکر و قدردانی

مراتب تشکر و قدردانی خود را از خانم دکتر طیبه باقری لطف آباد، عضو هیئت علمی پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران به خاطر همکاری در مراحل مختلف تحقیق ابراز می‌نمایم. این مقاله بخشی از پایان‌نامه با عنوان بررسی تولید بیوسورفکتانت در فاز آبی و خاکی و تأثیر آن بر حذف فنانترن در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۲ و کد ۹۱-۰۱-۲۷-۱۷۲۵۸ است که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اجرا شده است.

## منابع

1. Lu L, Zhu L. Effect of soil components on the surfactant-enhanced soil sorption of PAHs. *Journal of Soils and Sediments*. 2012;12(2):161-68.
2. Santos EC, Jacques RJ, Bento FM, Peralba MdCR, Selbach PA, Sá EL, et al. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*. 2008;99(7):2644-49.
3. Shin K-H, Kim K-W, Ahn Y. Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process. *Journal of Hazardous Materials*. 2006;137(3):1831-37.
4. Jin D, Jiang X, Jing X, Ou Z. Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. *Journal of Hazardous Materials*. 2007;144(1):215-21.
5. Lai C-C, Huang Y-C, Wei Y-H, Chang J-S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;167(1):609-14.
6. Mohanty S, Mukherji S. Surfactant aided biodegradation of NAPLs by *Burkholderia multivorans*: Comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR-515. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;102:644-52.
7. Gomez J, Alcantara MT, Pazos M, Sanroman MA. Remediation of polluted soil by a two-stage treatment system: desorption of phenanthrene in soil and electrochemical treatment to recover the extraction agent. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;173(1-3):794-98.
8. Shin KH, Ahn Y, Kim KW. Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005;24(11):2768-74.
9. Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(1):633-54.
10. Kaczorek E, Chrzanowski L, Pijanowska A, Olszanowski A. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: rhamnolipides and saponins. *Bioresource Technology*. 2008;99(10):4285-91.
11. Zhang D, Zhu L. Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1. *Environmental Pollution*. 2012;164:169-74.
12. Li F, Zhu L. Effect of surfactant-induced cell surface modifications on electron transport system and catechol 1, 2-dioxygenase activities and phenanthrene biodegradation by *Citrobacter* sp. SA01. *Bioresource Technology*. 2012;123:42-48.
13. Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresource Technology*. 2011;102(3):3366-72.
14. Whang L-M, Liu P-WG, Ma C-C, Cheng S-S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*. 2008;151(1):155-63.
15. Nguyen TT, Youssef NH, McInerney MJ, Sabatini DA. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research*. 2008;42(6):1735-43.
16. Cameotra SS, Makkar RS. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*. 2004;7(3):262-66.
17. Zhao Z, Selvam A, Wong JW-C. Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. *Bioresource Technology*. 2011;102(5):3999-4007.
18. Zhang Y, Miller RM. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994;60(6):2101-106.
19. Joshi S, Bharucha C, Desai AJ. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*. 2008;99(11):4603-608.
20. Lotfabad TB, Shourian M, Roostaazad R, Najafabadi AR, Adelzadeh MR, Noghbi KA. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;69(2):183-93.
21. Arbabi M, Nasserli S, Chimezie A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in petroleum contaminated soils. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2009;28(3).
22. Ravanipour M, Rezaei Kalantary R, Farzadkia M, Hashemi-Najafabadi S, Esrafilly A. Comparison of Nutrients and Salinity on Phenanthrene Removal from Polluted Soil. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2013;5(4):411-22 (in Persian).
23. Nayak AS, Vijaykumar M, Karegoudar T. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009;63(1):73-79.

24. Kaczorek E, Moszyńska S, Olszanowski A. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. *Biodegradation*. 2011;22(2):359-66.
25. USEPA. Environmental Protection Agency. Ultrasonic extraction. USA. Environmental Protection Agency; 1996 Dec. Report No.: Method 3550B.
26. Atlas RM, Philp Jim C. *Bioremediation*. Washington: ASM Press; 2005.
27. Juhasz AL, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo a pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2000;45(1):57-88.
28. Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*. 2011;102(2):772-78.
29. Liu Z, Zeng Z, Zeng G, Li J, Zhong H, Yuan X, et al. Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on adsorption of phenol by *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource Technology*. 2012;110:468-73.
30. Mohanty G, Mukherji S. Effect of an emulsifying surfactant on diesel degradation by cultures exhibiting inducible cell surface hydrophobicity. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007;82(11):1004-11.
31. Vipulanandan C, Ren X. Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering*. 2000;126(7):629-34.
32. Cameotra SS, Makkar RS. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure and Applied Chemistry*. 2010;82(1):97-116.

# Performance assessment of rhamnolipid MR01 biosurfactant and Triton X-100 chemical surfactant in removal of phenanthrene from soil

<sup>1</sup>Masoumeh Golshan, <sup>1,2</sup>Simin Nasseri, <sup>3</sup>Mahdi Farzadkia, <sup>3</sup>Ali Esrafil, <sup>\*2,3</sup>Roshanak Rezaei Kalantary, <sup>1</sup>Leila Karimi Takanlu

<sup>1</sup>Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Center for Water Quality Research (CWQR), Institute for Environmental Research (IER), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received; 22 July 2013

Accepted; 20 October 2013

## Abstract

**Background and Objectives:** The use of surfactants enhance the bioavailability of nonbiodegradable contaminants such as PAHs. Biosurfactants are more environmental friendly. In this study the ability of removing phenanthrene from soil by biosurfactant was assessed and compared with that of chemical surfactant.

**Materials and Methods:** A soil sample free of any organic or microbial contamination was artificially spiked with phenanthrene at two concentrations. Then, mineral salt medium at constant concentration of chemical surfactant TritonX-100 and rhamnolipid MR01 biosurfactant was added to it in order to have the proportion of 10% w:v (soil:water). A microbial consortium with a potential of phenanthrene biodegradation was inoculated to the soil slurry in two densities (OD=1 and 2) and then it was aerated on a shaker. After eight weeks, the residual concentration of phenanthrene in the soil was extracted by ultrasonic and was analyzed using HPLC. MPN test was used for measuring microbial population. This study was conducted based on the two level full factorial design of experiment.

**Results:** It was found that chemical surfactant exhibited higher PHE removal efficiency than the biosurfactant. Using 120 mg/L of TritonX-100 and rhamnolipid, the PHE removal for the soil contaminated with 50 mg PHE/kg dry soil was 98.5 and 88.7% respectively, while the removal efficiency was decreased to 87 and 76% respectively for the soil contaminated with 300 mg PHE/kg. In the absence of surfactant, the removal efficiency at concentrations of 50 and 300 mg PHE/kg dry soil was achieved 60.76 and 51% respectively. The phenanthrene removal efficiency in OD=2 was more higher than OD=1. In the presence of rhamnolipid, the maximum microbial populations was observed in the second week, while it decreased in the presence of TritonX-100.

**Conclusion:** Use of biosurfactants can be considered as a suitable option in low level pollutant sites. Chemical surfactants as ex-situ has achieved more satisfactory results in high level contaminant sites.

**Keywords:** Phenanthrene, bioavailability, rhamnolipid, TritonX-100, experimental design, bacterial population.

---

\*Corresponding Author: [rezaei.ir@iums.ac.ir](mailto:rezaei.ir@iums.ac.ir)  
Tel: +98 86704775