



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Biological Journal of Microorganism

12rd Year, Vol. 12, No. 46, Summer 2023 pp. 81-97

Received: 27.07.2022

Accepted: 31.08.2022

(Research Paper)

Investigating the Amount of Cadmium (Cd) Removal from Contaminated Soil Using the Biosurfactant Produced by the Tolerant Bacteria to Cd

Ateieh Ataei

Department of Soil Science, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran., ataeiateieh@yahoo.com

Jila Baharlouei*

Department of Soil Science, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

(*Corresponding author, jbahar5411@yahoo.com)

Mitra Ataabadi

Department of Soil Science, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Abstract

Introduction: Using efficient and environment-friendly techniques for the remediation of potentially toxic and harmful metals in contaminated soils plays a vital role in public health. The present study was conducted to assess the efficiency of the biosurfactant produced by the tolerant bacteria to cadmium (Cd) for the removal of Cd from contaminated soil as a completely randomized design with three replications.

Materials and Methods: Three native strains of bacteria including *Bacillus pumilus*, *Alcanivorax dieselolei*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* were studied in terms of resistance to different levels of Cd contamination. In order to evaluate the production capacity of biosurfactants in the superior strain, 4 tests of emulsification measurement, oil spreading, drop collapsing, and hemolytic activity were used. Then, to investigate the amount of Cd removal from the contaminated soil, three treatments including the superior strain, the biosurfactant

*Corresponding Author

2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.134458.1480](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.134458.1480)

produced by it, and the control soil (i.e., without *the strain* and biosurfactant) were added to the contaminated soil.

Results: By applying *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* as the superior strain and the biosurfactant produced by it to the Cd contaminated soil, it was observed that the biosurfactant treatment significantly had more ability on Cd removal from the soil compared to other treatments. Also, there was no significant difference between the *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* and the control treatment.

Discussion and Conclusion: In general, it is concluded that after local calibration and also repeating and performing the experiment in natural conditions, the biosurfactant produced by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* can be more reliably used as a conditioner for the soils contaminated with Cd.

Key words: Soil Contamination, Biosurfactant, Cadmium, *Marinobacter hydrocarbonoclasticu*



<https://bjm.ui.ac.ir>

زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال دوازدهم، شماره ۴۶، تابستان ۱۴۰۲، صفحه ۸۱-۹۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۹

مقاله پژوهشی

مطالعه میزان حذف کادمیم از خاک آلوده در نتیجه کاربرد بایوسورفکتانت به دست آمده از باکتری مقاوم به آلودگی کادمیم

عطیه عطایی: دانشجوی رشته خاک‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران، ataeiateieh@yahoo.com
ژیلا بهارلویی*: استادیار گروه خاک‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران، jbahar5411@yahoo.com
میترا عطاآبادی: استادیار گروه خاک‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران، mitra_ataabadi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: استفاده از روش‌های کارآمد و دوستدار محیط زیست برای اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات بالقوه سمی و خطرناک نقش حیاتی در تأمین سلامت عمومی دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی قابلیت بایوسورفکتانت به دست آمده از باکتری مقاوم به کادمیم در حذف کادمیم از خاک آلوده به صورت طرح آماری کاملاً تصادفی و در سه تکرار اجرا شد.

مواد و روش‌ها: سه جدایه باکتری بومی شامل *باسیلوس پومیلوس*، *آلکانیوراکس دیزلوی* و *مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس* از نظر میزان مقاومت به سطوح مختلف آلودگی به غلظت‌های مختلف کادمیم مطالعه شدند. به منظور ارزیابی ظرفیت تولید بایوسورفکتانت توسط جدایه برتر باکتری، چهار آزمون شامل گسترش لکه نفت، انهدام قطره نفتی، فعالیت امولسیون‌کنندگی و فعالیت همولیتیک بررسی شدند. سپس به منظور مطالعه میزان حذف کادمیم از

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/© The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.134458.1480](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.134458.1480)

خاک آلوده، سه تیمار شامل جدایه باکتری برتر، بایوسورفکانتان تولیدی توسط آن و شاهد به خاک آلوده اضافه شدند.

نتایج: با کاربرد باکتری *مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس* به عنوان جدایه باکتری برتر و بایوسورفکانتان تولیدی توسط آن در خاک آلوده به کادمیم مشاهده شد تیمار بایوسورفکانتان به طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها قابلیت بیشتری در حذف کادمیم از خاک آلوده دارد. همچنین، تفاوت معنی‌داری میان تیمار باکتری *مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس* با تیمار شاهد مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتیجه‌گیری می‌شود بایوسورفکانتان تولیدشده توسط *مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس* پس از کالیبراسیون محلی و همچنین تکرار و اجرای آزمایش در شرایط طبیعی، با اطمینان بیشتری می‌تواند به عنوان اصلاح‌کننده خاک‌های آلوده به کادمیم استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، بایوسورفکانتان، کادمیم، *مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس*

مقدمه

خاک به‌عنوان مهم‌ترین بستر طبیعی تولید غذا برای انسان و حیوانات، یکی از اجزای مهم اکوسیستم است که بقا و سلامتی انسان‌ها به‌طور مستقیم به آن وابسته است (۱). در سال‌های اخیر آلودگی خاک و محیط زیست توسط فلزات سنگین نگرانی چشمگیری را از نظر تهدید سلامت عمومی ایجاد کرده است (۲، ۳). فلزات سنگین علاوه بر منشأ طبیعی، در نتیجه فعالیت‌های مختلف انسانی نظیر کشاورزی، استخراج معدن، ذوب فلزات و غیره به خاک و محیط زیست وارد می‌شوند (۴-۶).

با توجه به اینکه فلزات سنگین برخلاف بسیاری از آلاینده‌های آلی به‌طور زیستی تجزیه‌پذیر نیستند و در محیط پایدارند و به دلیل داشتن اثر مستقیم و غیرمستقیم بر تهدید سلامت عمومی، یکی از نگرانی‌های اصلی جوامع بشری محسوب می‌شوند (۷-۹). در سال‌های اخیر توجه پژوهشگران به سمت بهبود روش‌های مدیریتی

به‌ویژه در مصرف نهاده‌های شیمیایی با هدف ارتقای سلامت و کیفیت خاک و گیاه معطوف شده است (۱۰)؛ اما همچنان، آلودگی خاک به فلزات سنگین یکی از چالش‌های اصلی محسوب می‌شود؛ بنابراین، دستیابی به روش مناسب برای حذف این آلاینده‌های معدنی امری ضروری است. برای اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات سنگین روش‌های مختلفی نظیر استفاده از گیاه‌پالایی^۱ (۱۱)، باکتری‌های محرک رشد گیاه (۱۲-۱۴) و اصلاح‌کننده‌های آلی و شیمیایی مختلف (۱، ۲، ۱۵، ۱۶) مطالعه شده‌اند. با وجود این، بیشتر این روش‌ها از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نبوده‌اند و در برخی موارد با محیط زیست سازگار نیستند (۶). علاوه بر این، فلزات سنگین در محیط زیست معمولاً با قدرت بالا با ذرات کلوئیدی و ترکیبات آلی پیوند برقرار می‌کنند (۱۷) که این مسئله مهمی در حذف این آلاینده‌ها با استفاده از روش‌های مرسوم پالایش درجاً^۲ به‌شمار می‌رود؛ بنابراین، تلاش برای یافتن سایر روش‌های کارآمد،

مواد و روش‌ها

مشخصات منطقه نمونه برداری شده: این مطالعه از تیر ماه ۱۳۹۸ تا مرداد ماه ۱۳۹۹ در آزمایشگاه‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (واحد خوراسگان) به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. نمونه برداری از لایه‌های سطحی (۰ تا ۲۵ سانتی متر) خاک‌های منطقه شاهین شهر انجام شد. خاک مطالعه شده از لایه سطحی (۰ تا ۲۵ سانتی متر) در منطقه شاهین شهر نمونه برداری شد (جدول ۱). تیمار مطالعه شده شامل عامل اصلاح کننده خاک در سه سطح سویه باکتریایی، بایوسورفکتانت و شاهد بود. نمونه‌های خاک در معرض هوا خشک شدند و طبق اصول استاندارد در تعیین خصوصیات خاک از الک ۲ میلی متر عبور داده شدند. سپس برخی خصوصیات فیزیکی شامل بافت خاک به روش هیدرومتر (۲۵) و خصوصیات شیمیایی خاک شامل pH با استفاده از دستگاه pH متر (۲۶)، قابلیت هدایت الکتریکی با استفاده از دستگاه EC متر (۲۷)، کربن آلی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی - فرابنفش (۲۸)، نیتروژن کل با استفاده از دستگاه کجلدال (۲۹)، کلسیم، منیزیم و کادمیم با استفاده از دستگاه جذب اتمی (۳۰) اندازه گیری شدند (جدول ۱).

سه جدایه باکتریایی بومی شامل *باسیلوس پومیلوس*^{۱۲}، *آلکانیوراکس دیزلوی*^{۱۳} و *مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس*^{۱۴} در این مطالعه استفاده شدند که از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران (<https://ibrc.ir/>) تهیه شده بودند. مقاومت جدایه‌ها به سطوح مختلف کادمیم از نظر تشکیل کلونی روی پلیت سنجیده شد.

ارزان و سازگار با محیط زیست شایان توجه محققان واقع شده است.

در این راستا، استفاده از بایوسورفکتانت تولیدی توسط ریزجانداران به عنوان یکی از جدیدترین فناوری‌های سازگار با محیط زیست در حذف فلزات سنگین محسوب می‌شود (۱۸). از شاخص‌ترین باکتری‌های تولیدکننده بایوسورفکتانت می‌توان به *سودوموناس آئروژینوزا*^۳، *کورینه باکتریوم*^۴، *نوکاردیا*^۵، *رودوکوکوس*^۶، *باسیلوس سابتیلیس*^۷، *باسیلوس لیجینی فرمیس*^۸ و *آرتروباکتر*^۹ و از قارچ‌ها به *تورولوپسیس*^{۱۰} و *کاندیدا*^{۱۱} اشاره کرد (۱۹، ۲۰).

استفاده از بایوسورفکتانت‌ها در حذف آلودگی فلزات سنگین مزایای بسیاری دارد که می‌توان به سمیت کم، تجزیه پذیری زیستی، سازگاری با محیط زیست، مقاومت در برابر فاکتورهای فیزیکی و تولید از مواد ارزان قیمت اشاره کرد (۲۱). مطالعات نشان داده‌اند بایوسورفکتانت‌ها می‌توانند با کاهش کشش سطحی بین فلز و خاک و تشکیل میسل تحرک فلزات سنگین را افزایش دهند (۲۲) و قادر به تشکیل کمپلکس با فلزات سنگین مانند سرب، نیکل، کادمیم و درنهایت، پاکسازی آنها از خاک هستند (۲۳، ۲۴).

اگرچه به خوبی نشان داده شده است سلول‌های باکتریایی می‌توانند کمپلکس‌های پایدار با فلزات موجود در محلول خاک تشکیل دهند، اطلاعات کمی درباره استفاده از بایوسورفکتانت‌ها به منظور تشکیل کمپلکس با فلزات سنگین و حذف آنها از خاک‌های آلوده وجود دارد. با در نظر گرفتن این دیدگاه، مطالعه حاضر برای ارزیابی کارایی باکتری‌های تولیدکننده بایوسورفکتانت برای حذف کادمیم از خاک آلوده انجام شده است.

سپس محیط‌های غذایی کشت به وسیله دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل 4-16kh شرکت Sigma) با سرعت ۱۰۰۰۰ گرادیان به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند تا بقایای سلولی حذف شوند (۳۱). در نهایت، میزان تولید بایوسورفکتانت با استفاده از آزمون‌های گسترش لکه نفتی (۳۵)، فعالیت امولسیون‌کنندگی (۳۵)، انهدام قطره (۳۶)، تعیین فعالیت همولیتیک خون (۳۷، ۳۸) و آزمون کشش سطحی (۳۹) سنجش و ارزیابی شد.

جداسازی و میزان تولید بایوسورفکتانت در

غلظت‌های مختلف کادمیم: به منظور استخراج بایوسورفکتانت بعد از ۷ روز انکوباسیون، سوسپانسیون میکروبی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ و سوپرناتانت محیط کشت جدا شد که حاوی بایوسورفکتانت است (۱۹). در مرحله بعد pH محلول با اسید فسفریک به ۳ رسانده شد. اتیل استات به نسبت برابر به محلول، اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز آلی جدا و در تبخیرکننده با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، اتیل استات محلول نیز تبخیر شد (شکل ۱-الف). در نهایت، مایع زرد رنگ حاوی بایوسورفکتانت در ظرف باقی ماند (۳۴). سپس توسط دستگاه فریز درایر مایع زرد رنگ به جامانده خشک شد (شکل ۱-ب). برای بررسی نوع گروه‌های عاملی مؤثر در حذف فلزات سنگین، از دستگاه FTIR (TENSOR 27) استفاده شد (۶۱).

تعیین مقاومت باکتری‌ها به عنصر کادمیم با

استفاده از شاخص حداقل غلظت بازدارنده: با استفاده از شاخص حداقل غلظت بازدارنده (MIC)^{۱۵}، باکتری مقاوم انتخاب شد. برای این منظور، ابتدا پلیت‌هایی حاوی محیط نوترینت آگار با غلظت‌های مختلف کادمیم از نمک نترات کادمیم شامل ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مول بر لیتر تهیه شدند. سپس کلونی ۳ گونه باکتری به صورت شعاعی بر سطح پلیت کشت داده شد و در نهایت، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرماگذاری شدند. پس از طی زمان لازم، پلیت‌ها بررسی و براساس اولین رقتی که به طور کامل مانع رشد باکتری در محیط کشت آگار شد، شاخص حداقل غلظت بازدارنده تعیین شد (۳۳).

تهیه سوسپانسیون باکتری برای تلقیح به کشت پایه

نمکی: به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری برای تلقیح به کشت پایه نمکی برای تولید بایوسورفکتانت، باکتری در محیط نیم مک فارلند نوترینت برات، کشت و غلظت باکتری در آن تنظیم شد.

کشت باکتری برای تولید بایوسورفکتانت: محلول

استریل گلوکز به عنوان منبع کربن به میزان ۲ درصد حجمی به محیط کشت پایه نمکی بعد از اتوکلاو اضافه شد. در نهایت، ۵ درصد از سوسپانسیون باکتریایی به محیط کشت پایه نمکی، اضافه و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه در انکوباتور شیکردار (مدل 1010DT شرکت HelidolphUnimix) قرار داده شد (۳۴).



شکل ۱- بایوسورفکتانت استخراج شده به صورت مایع در دستگاه تبخیر کننده در خلأ (الف)؛ خشک کردن بایوسورفکتانت در دستگاه فریز درایر (ب).

دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز، شیک و بعد از آن، با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه ساترifiوژ شدند. در نهایت، سوپرناتانت دور ریخته و خاک آلوده به مدت ۴۸ ساعت هوا خشک و از الک ۲ میلی متر عبور داده شد (۴۰). برای اطمینان از آلوده شدن خاک به غلظت فلز سنگین مدنظر، در پایان این مرحله، غلظت کادمیم در خاک با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Perkin Elmer Analyst 800 خوانده شد. پس از آلوده کردن خاک، سوسپانسیون باکتریایی به میزان ۲۰ درصد به خاک آلوده تلقیح شد. سپس ۲ درصد گلوکز به عنوان منبع کربن به خاک اضافه شد و به مدت ۳۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۴۱). نمونه شاهد نیز برای این مرحله تهیه شد که فاقد سوسپانسیون باکتریایی بود. در تیمار محلول بایوسورفکتانت، نمونه های خاک آلوده به فلز سنگین درون فالكون هایی حاوی سوپرناتانت حاوی بایوسورفکتانت، با نسبت ۱:۱۰ به مدت ۲۴ ساعت در

به منظور بررسی میزان تولید بایوسورفکتانت در غلظت های مختلف کادمیم، محیط کشت پایه نمکی در غلظت های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی مولار از نمک نترات کادمیم و در محدوده مقاومت باکتری تهیه شد. سپس محیط پیش کشت به میزان ۵ درصد به محیط کشت های آماده شده، اضافه و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار به مدت ۷ روز با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. سپس محیط های غذایی کشت با دستگاه ساترifiوژ یخچال دار با سرعت ۱۰۰۰۰ گرادیان به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد ساترifiوژ شدند تا بقایای سلولی حذف شوند (۳۱).

اعمال آلودگی کادمیم و تیمار خاک ها: خاک

استریل شده در اتوکلاو، به صورت مصنوعی و در آزمایشگاه به فلز کادمیم آلوده شد. برای این منظور محلول کادمیم با غلظت ۰/۳ میلی مولار از نمک نترات کادمیم در محدوده غلظت مقاومت باکتری با نسبت ۲ به ۱ به خاک ها اضافه شد. سپس سوسپانسیون خاک ها در

محیط آزمایشگاه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیک شدند. مراحل مذکور برای نمونه شاهد نیز انجام شد؛ اما به جای محلول حاوی بایوسورفکتانت از آب مقطر استفاده شد (۱۹).

اندازه گیری غلظت کادمیم باقی مانده در خاک

بعد از اعمال تیمارها: بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسیون خاک و سوپرناتانت حاوی بایوسورفکتانت صاف و خاک روی کاغذ صافی خشک شد (۱۹). خاک مذکور به روش اسید کلریدیک و اسید نیتریک با نسبت ۱:۳

هضم و میزان کل فلز کادمیم باقی مانده در خاک با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Perkin Elmer Analyst 800 خوانده شد. سوسپانسیون خاک‌های آلوده حاوی باکتری نیز ساترifiوژ شدند و خاک باقی مانده خشک شد (۴۱). خاک مذکور به روش اسید کلریدیک و اسید نیتریک با نسبت ۱:۳ هضم و میزان کل فلز کادمیم باقی مانده در خاک خوانده شد؛ در نهایت، برای محاسبه درصد حذف فلزات سنگین از خاک از رابطه ۱ استفاده شد (۴۲).

$$\text{غلظت نهایی فلز سنگین خاک} - \text{غلظت اولیه فلز سنگین خاک} = \frac{\text{درصد فلز سنگین حذف شده از خاک}}{\text{غلظت اولیه فلز سنگین خاک}} \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین به روش LSD در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

تعیین مقاومت باکتری‌ها به آلودگی کادمیم:

براساس جدول ۱ مشاهده می‌شود خاک مطالعه شده دارای بافت سنگین بوده است و ضمن داشتن کربن آلی قابل توجه، شوری بالایی نیز دارد؛ زیرا بخش عمده خاک‌های کشور، درصد کربن آلی کمتر از ۱ درصد دارند و خاک مناسب از نظر شوری باید EC کمتر از ۴ دسی‌زیمنس بر متر داشته باشد. همچنین، مقدار pH بالای این خاک، از جمله نکاتی است که همراه با شوری می‌تواند به عنوان عوامل اثرگذار بر تحرک و قابلیت استفاده عناصر در خاک نقش مهمی

داشته باشد. وضعیت عناصر نیتروژن، کلسیم و منیزیم خاک از نظر دامنه غلظتی مطلوب بود. همچنین، سطح غلظتی کادمیم در این خاک به حدی پایین است که مسئله‌ای از نظر آلودگی ایجاد نمی‌کند (جدول ۱).

براساس اطلاعات ارائه شده در جدول ۲ مشاهده می‌شود باکتری آلکانیوراکس دیزولولی تا غلظت ۰/۲ میلی‌مولار کادمیم و باکتری باسیلوس پومیلوس تا غلظت ۰/۳ میلی‌مولار کادمیم رشد داشتند و قادر به رشد در غلظت‌های بالاتر کادمیم نبودند؛ اما ماریوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس توانست غلظت ۰/۴ میلی‌مولار کادمیم را تحمل کند و در این غلظت قادر به رشد بود. بنابراین، باکتری ماریوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس به عنوان مقاوم‌ترین باکتری در برابر کادمیم، شناسایی و برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

جدول ۱- برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک مطالعه شده

ویژگی های خاک	مقادیر
بافت خاک	رس
شن (%)	۱۹/۶
سیلت (%)	۳۲
رس (%)	۴۸/۴
قابلیت هدایت الکتریکی (dS/ m)	۴/۳۲
pH	۸/۴۵
کربن آلی (%)	۱/۳۶
نیترژن کل	۱/۲
کلسیم (Meq/ L)	۳۶
منیزیم (Meq/ L)	۵
کادمیم کل (mg/ Kg)	<۰/۱
کادمیم قابل دسترس (mg/ Kg)	غیر قابل تشخیص توسط دستگاه

جدول ۲- رشد باکتری در غلظت های مختلف فلز کادمیم

غلظت Cd	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۳	باکتری
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	باسیلوس پومیلوس
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	آلکانیوراکس دیزلولی

+: رشد باکتری، -: عدم رشد باکتری، غلظت فلز سنگین بر حسب mmol/L

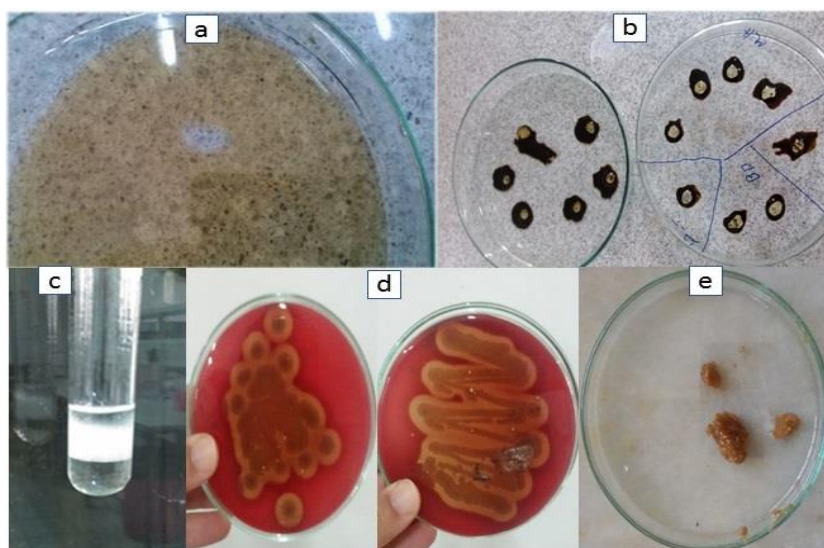
بررسی ایزوله برتر از نظر تولید بایوسورفکتانت:

به منظور بررسی توان تولید بایوسورفکتانت در باکتری مقاوم منتخب از روش های آزمون گسترش لکه نفت، انهدام قطره نفتی، فعالیت امولسیون کننده، فعالیت همولیتیک و اندازه گیری کشش سطحی استفاده شد. نتایج آزمون گسترش لکه نفت نشان دادند سوپرناتانت حاصل از باکتری مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس توانست لایه نفتی را کنار بزند و هاله ای شفاف به قطر ۱/۵ سانتی متر ایجاد کند (شکل ۲- a). با توجه به اینکه قطر هاله ایجاد شده ۱۰ تا ۲۰ میلی متر بود، می توان قدرت تولید بایوسورفکتانت این باکتری را با علامت ++ نشان داد.

بر اساس نتایج روش انهدام قطره، سوپرناتانت حاصل از باکتری مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس توانست شکل قطره نفتی را تغییر دهد؛ به گونه ای که قطره نفتی از حالت کاملاً برآمده و گرد خارج و متمایل شد. میزان این تمایل زیاد بود؛ اما به میزانی نبود که قطره کاملاً مسطح و پهن شود (شکل ۲- b)؛ بنابراین، طبق دستورالعمل، نتایج حاصل از آزمون انهدام قطره برای بایوسورفکتانت تولیدی ++ بود. برای بررسی فعالیت امولسیون کننده بایوسورفکتانت تولیدی از آزمون EI24 استفاده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، ارتفاع امولسیون ایجاد شده، ۷ میلی متر و ارتفاع کل مایع درون

درجه فعالیت همولیتیک این بایوسورفکتانت ++ می‌شود. در نهایت، مقدار بایوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس بعد از ۷ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جداسازی و اندازه‌گیری شد. ماده جداسازی شده حاصل از تخلیص بایوسورفکتانت، قهوه‌ای رنگ با قوام چرب بود (شکل ۲- e). میزان بایوسورفکتانت به دست آمده ۱۹/۸۲ گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد.

لوله آزمایش ۳۰ میلی‌متر بود (شکل ۲- c). با توجه به نتایج، فعالیت امولسیون‌کنندگی بایوسورفکتانت حاصل از باکتری مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس ۲۳/۳۳ درصد به دست آمد. نتایج حاصل از آزمون تعیین فعالیت همولیتیک نشان دادند جدایه باکتری به کاررفته در این پژوهش، همولیز مثبت یا بتا داشت و قطر هاله ایجاد شده کمتر از ۱ سانتی‌متر بود (شکل ۲- d)؛ بنابراین، مطابق دستورالعمل،



شکل ۲- بررسی توان تولید بایوسورفکتانت در باکتری مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس با استفاده از روش‌های آزمون گسترش لکه نفت (a)، انهدام قطره نفتی (b)، فعالیت امولسیون‌کنندگی (c)، و فعالیت همولیتیک (d). در شکل e بایوسورفکتانت استخراج شده نمایش داده شده است.

بیان‌کننده پیوند $O=C=O$ در ترکیب کربن‌دی‌اکسید است؛ بنابراین، نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی در این تحقیق با ساختار کلی بایوسورفکتانت هماهنگی دارند.

تأثیر غلظت کادمیم بر تولید بایوسورفکتانت:

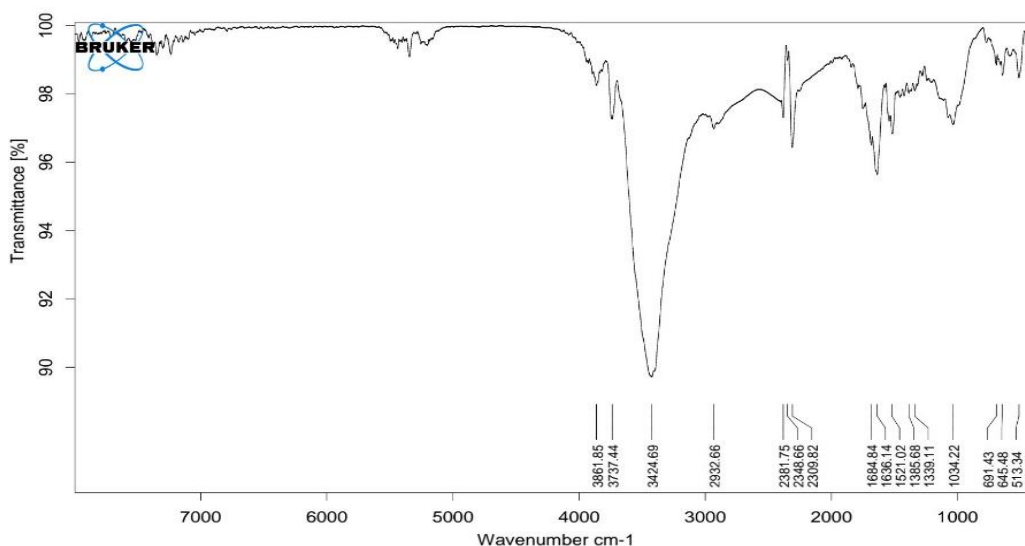
همان‌طور که اشاره شد، غلظت‌های مختلف کادمیم در محدوده مقاومت باکتری به محیط کشت پایه نمکی اضافه شدند و سپس باکتری کشت داده شد. سپس میزان تولید بایوسورفکتانت از روش‌های فعالیت

آنالیز طیف‌سنجی FTIR بایوسورفکتانت

استخراج شده: براساس نتایج آنالیز FTIR (شکل ۳)، جذب موجود در طول موج ۳۴۲۴ احتمالاً ناشی از پیوند $-OH$ گروه هیدروکسیل است. طول موج ۱۶۳۶ نشان‌دهنده پیوند $C=O$ در یک گروه آمید و پیوند $C=C$ در یک گروه آلکن، طول موج ۱۰۳۴ بیان‌کننده پیوند $C-O-O-CO$ در انیدرید، طول موج ۱۵۲۱ نشان‌دهنده پیوند $N-O$ در ترکیب نیترو و جذب در طول موج ۲۳۴۸

تست لکه نفتی قطر هاله ایجاد شده در تمامی غلظت‌های کادمیم کمتر از یک سانتی متر بود و بنابراین با علامت + نشان داده می‌شود (جدول ۳). نتایج روش انهدام قطره نفتی نشان دادند در غلظت‌های ۰/۱ میلی مولار کادمیم میزان انحنا ایجاد شده در سطح قطره نفتی بسیار اندک بود و طبق قرارداد با علامت + نشان داده شد. در سایر غلظت‌ها انحنا ایجاد شده بیشتر بود؛ اما قطره کاملاً مسطح نشده بود و بنابراین، با علامت ++ نشان داده شد (جدول ۳).

امولسیون کنندگی، لکه نفتی و انهدام قطره نفتی بررسی شد. نتایج حاصل از روش فعالیت امولسیون کنندگی نشان دادند با افزایش غلظت کادمیم از ۰/۱ میلی مولار به ۰/۲ میلی مولار و از ۰/۲ میلی مولار به ۰/۳ میلی مولار فعالیت امولسیون کنندگی به ترتیب ۲۴/۱۶ درصد افزایش و ۱۰ درصد کاهش داشت (شکل ۴). به عبارتی نتایج نشان می‌دهند افزایش غلظت کادمیم تا حدی باعث افزایش تولید بایوسورفکتانت شده است و از آن حد به بعد باعث کاهش تولید بایوسورفکتانت می‌شود. در



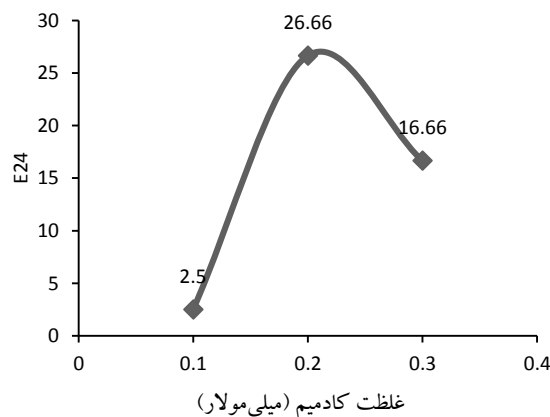
شکل ۳- طیف جذبی آنالیز FTIR بایوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس

جدول ۳- اثر سطوح غلظتی مختلف کادمیم بر تولید

بایوسورفکتانت

نوع آلودگی	میزان آلودگی	تست لکه نفتی	تست انهدام قطره
کادمیم	۰/۱ (میلی مولار)	+	+
	۰/۲ (میلی مولار)	+	++
	۰/۳ (میلی مولار)	+	++

تست لکه نفتی (۳۵)، +: قطر دایره شفاف ایجاد شده توسط عصاره حاصل از سانتریفیوژ کمتر از ۱۰ میلی متر است؛ تست انهدام قطره (۳۶)، +: قطره ایجاد شده کمی متمایل است؛ ++: قطره ایجاد شده خیلی متمایل است.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف کادمیم بر تولید بایوسورفکتانت

بحث

در پژوهش‌های ابو‌شانا و همکاران میانگین میزان مقاومت باکتری‌های بررسی‌شده (*Arthrobacter Microbacterium*, *Clavibacter xyli rhombi Rhizobium arabinogalactanolyticum* و *mongolense* و *Variovorax paradoxus*) برای فلز کادمیم ۰/۵ میلی‌مول بر لیتر گزارش شد (۴۳). زید و همکاران بیشترین غلظت قابل تحمل فلز کادمیم برای باکتری‌های *مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس*، *باسیلوس پومیوس* و *آلکانیوراکس دیزلولی* را به ترتیب ۰/۴، ۰/۳ و ۰/۲ میلی‌مولار به دست آوردند (۴۴). این پژوهشگران بیان کردند باکتری‌هایی که مقاومت بیشتری به یک فلز سنگین دارند، به دلیل توسعه مکانیسم‌هایی برای پالایش محیط اطراف خود، به آن فلز مقاومت پیدا می‌کنند.

به‌منظور ارزیابی و شناسایی سویه‌های مولد بایوسورفکتانت، روش‌های استاندارد استفاده می‌شوند. یوسف و همکاران (۳۱) روش گسترش لکه نفتی را بهترین آزمون برای غربال‌گری سویه‌های مولد بایوسورفکتانت معرفی کردند. با افزایش غلظت بایوسورفکتانت، هاله شفاف ایجادشده در سطح نفت وسیع‌تر خواهد بود. موریکاو و همکاران بیان کردند قطر ناحیه شفاف ایجادشده رابطه مستقیمی با غلظت بایوسورفکتانت موجود در محیط دارد (۴۵). در روش انهدام قطره نفتی، قطره حاوی بایوسورفکتانت، در سطح نفت منهدم شده و پخش می‌شود (۳۱). با افزایش غلظت بایوسورفکتانت تولیدی، اندازه قطره نفتی افزایش می‌یابد. پاویتران و همکاران (۴۶) نیز بیان کردند رابطه مستقیمی بین قطر نمونه و غلظت بایوسورفکتانت وجود دارد؛ به گونه‌ای که غلظت کم بایوسورفکتانت با توجه به

بررسی اثر تیمارهای اصلاح‌کننده بر حذف کادمیم

از خاک: نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای اصلاح‌کننده (باکتری *مارینوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس* و بایوسورفکتانت تولیدی توسط آن) بر حذف کادمیم از خاک آلوده نشان دادند تیمارهای اصلاح‌کننده به‌طور معنی‌داری بر درصد حذف کادمیم از خاک تأثیر دارند (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای اصلاح‌کننده بر

حذف کادمیم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد حذف
اصلاح‌کننده	۲	۶۵/۷۳**
خطا	۶	۱/۹۴
ضریب تغییرات (%)		۱/۷۶

** معنی‌دار شدن در سطح آماری ۱ درصد

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای اعمال‌شده بر حذف کادمیم نشان می‌دهند اختلاف معنی‌داری بین تیمار باکتری و تیمار شاهد وجود ندارد؛ درحالی‌که تیمار بایوسورفکتانت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها (حدود ۱۰ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد و ۱۱ درصد افزایش نسبت به تیمار باکتری) باعث حذف کادمیم از خاک آلوده شده است (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر تیمارهای اصلاح‌کننده بر حذف

کادمیم

حذف‌کننده	درصد حذف (%)
شاهد	۷۶/۶۲ b
بایوسورفکتانت	۸۴/۳۱ a
باکتری	۷۵/۸۳ b
LSD	۲/۷۸

میانگین‌های با حروف متفاوت، در سطح پنج درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌دار دارند.

آبگریز بودن نفت باعث باقی ماندن قطره و تجمع آن روی سطح می شود؛ البته این روش به غلظت های کم بایوسورفکتانت حساس نیست. طغرل و کانسونار از این روش برای غربالگری بایوسورفکتانت از باکتری های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* استفاده کردند و از آن به عنوان یک روش سریع تشخیص تولید بایوسورفکتانت یاد کردند (۴۷).

فعالیت امولسیون کنندگی مقیاسی از قدرت و توانایی بایوسورفکتانت تولیدی در امولسیون کردن هیدروکربن ها و ترکیبات نفتی است (۳۵). دستغیب و همکاران از روش شاخص امولسیون کنندگی در منابع کربن مختلف ساکارز، عصاره مخمر، گلوکز و فروکتوز برای غربالگری بایوسورفکتانت استفاده کردند (۴۸). پورتیلا-ریورا و همکاران از شاخص امولسیون کنندگی برای تولید بایوسورفکتانت *Lactobacillus pentosus* استفاده کردند و درصد امولسیون کنندگی را ۳۸ تا ۴۲ درصد برای گازیول و ۱۴ درصد برای سورفکتانت تجاری به دست آوردند (۴۹).

بررسی فعالیت همولیتیکی که به وجود بایوسورفکتانت ها نسبت داده می شود، به علت سادگی، سرعت بالا و نیاز نداشتن به امکانات پیچیده آزمایشگاهی، به عنوان معیار انتخاب اولیه باکتری های مولد بایوسورفکتانت استفاده می شود. این روش کارایی وسیعی در غربال کردن باکتری های تولید کننده بایوسورفکتانت دارد و در مطالعات مختلف، استفاده از این روش گزارش شده است (۳۸، ۵۰). فعالیت همولیتیک با حضور منطقه شفاف (هاله) اطراف کلونی های باکتریایی شناسایی می شود (۵۱). به طور کلی واکنش همولیتیک با توجه به ظاهر منطقه اطراف کلونی با آلفا، بتا و گاما در محیط آگار خون دار مشخص

می شود. همولیز آلفا زمانی است که محیط اطراف کلونی به صورت یک منطقه سبز رنگ و همولیز بتا به صورت یک منطقه روشن در اطراف کلونی باکتریایی در آگار خون دار ایجاد می شود. در صورتی که هیچ تغییری در محیط اطراف کلونی صورت نگیرد، هیچ همولیزی در آگار خون دار رخ نداده است و واکنش همولیز گاما است (۵۲). در پژوهش برنمر و آویگود (۵۳) از همولیز بتا در محیط آگار خون دار به عنوان معیار تولید بایوسورفکتانت استفاده شد. همچنین، نتایج آزمون کشش سطحی نشان دادند بایوسورفکتانت حاصل از سویه ماریوباکتر هیدروکربنوکلاستیکوس قادر به کاهش کشش سطحی از ۶۷ (شاهد) به زیر ۴۰ میلی نیوتن بر متر بود و توانست کشش سطحی را به ۳۷ میلی نیوتن بر متر برساند. کاهش کشش سطحی محیط رشد مهم ترین و اصلی ترین معیار برای اثبات تولید بایوسورفکتانت است. در پژوهش های دیگری نیز نشان داده شد اندازه گیری کشش سطحی می تواند نشان دهنده تولید بایوسورفکتانت باشد (۵۴، ۵۵). طبق روش دسایبی و بانات (۵۶) توانایی کاهش کشش سطحی پایین تر از ۴۰ میلی نیوتن بر متر نشان دهنده قابلیت گونه مدنظر به عنوان تولید کننده بایوسورفکتانت است.

باکتری های قادر به تولید بایوسورفکتانت، با توجه به شرایط محیط و منبع کربن، قابلیت های متفاوتی از نظر میزان تولید بایوسورفکتانت دارند. پنگ و همکاران (۵۷) گزارش کردند باکتری *Sudomonas marisnensis*^{۱۶} در منبع کربن هگزادکان قادر است ۳/۴ گرم بر لیتر بایوسورفکتانت تولید کند. تفاوت در مقادیر تولید بایوسورفکتانت توسط این باکتری احتمالاً به علت تفاوت در سوسترا و شرایط گرماگذاری است (۵۷). در پژوهش های ورناسری و قندعلی (۳۵) مقدار

جهانشاه و همکاران (۱۹) در مطالعات خود دریافتند تمایل بایوسورفکتانت‌ها برای جذب فلزات مختلف، متفاوت است و بیان کردند با توجه به بار یونی و غلظت بایوسورفکتانت، نوع و بار فلز، پایداری اتصال فلز به بایوسورفکتانت و نیز میزان فلز در خاک، بایوسورفکتانت‌ها با میل ترکیبی متفاوتی به فلزات متصل می‌شوند. در پژوهشی پس از شستشوی خاک آلوده با استفاده از بایوسورفکتانت به‌دست آمده از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* سویه A21، ۴۴/۲ درصد کادمیم از خاک آلوده حذف شد. در این پژوهش پارامترهایی مانند غلظت سورفکتانت، دما و pH محلول شستشو بر توانایی حذف فلزات سنگین توسط بایوسورفکتانت مؤثر بودند (۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند براساس حداقل غلظت بازدارنده (MIC) فلز کادمیم، از میان سه باکتری *مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس*، *باسیلوس پومیلیوس* و *آلکانیوراکس دیزلکولی*، باکتری *مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس* به‌دلیل برخورداری از MIC بیشتر، به‌عنوان مقاوم‌ترین باکتری انتخاب شد و قابلیت آن در تولید بایوسورفکتانت با استفاده از آزمون‌های گسترش لکه نفت، انهدام قطره نفتی، فعالیت امولسیون‌کنندگی، فعالیت همولیتیک و اندازه‌گیری کشش سطحی سنجیده و در نهایت تأیید شد. همچنین، نتایج مربوط به آنالیز طیف‌سنجی FTIR بایوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری *مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس* بر تأیید ساختار ترکیب تولیدی به‌عنوان بایوسورفکتانت صحه گذاشت. در نهایت، با بررسی قابلیت باکتری *مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس* و بایوسورفکتانت تولیدی از آن

بایوسورفکتانت جداشده از نفت سفید توسط باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا*^{۱۷} و *باسیلوس لاتروسپوروس*^{۱۸} به ترتیب ۱۰/۲ گرم بر لیتر و ۸/۴ گرم بر لیتر بود. همچنین، مقدار بایوسورفکتانت جداشده از منبع کربن گلوکز توسط دو باکتری *سودوموناس پوتیدا* و *باسیلوس لاتروسپوروس* به ترتیب ۱/۷ گرم بر لیتر و ۱/۳ گرم بر لیتر و از منبع کربن ملاس به ترتیب ۶/۵ و ۵/۸ بود.

همان‌طور که در مطالعات گذشته نشان داده شده است، هیدروفوبیک بایوسورفکتانت‌ها شامل اسیدچرب اشباع‌شده یا اشباع‌نشده، زنجیره‌های هیدروکربنی یا الکل‌های چرب است. جزء هیدروفیل بایوسورفکتانت بسیار متنوع و شامل پپتیدهای کاتیونی یا آنیونی و اسیدهای مونو، دی یا پلی‌ساکاریدی است (۵۸). زوبولیس و همکاران (۵۹) نشان دادند افزودن بایوسورفکتانت‌ها ممکن است جذب فلزات سنگین از خاک را به دو روش بهبود بخشد؛ نخست، از طریق کمپلکس شدن با شکل آزاد فلز در محلول باعث کاهش فعالیت فاز محلول فلز می‌شود. دوم، با کاهش کشش سطحی و بین سطحی فلز و خاک باعث جذب آنها به سلول باکتری می‌شود. بایوسورفکتانت‌ها در حدواسط دو فاز جامد - محلول تجمع می‌یابند و تماس مستقیم بین بایوسورفکتانت و فلز جذب‌شده را ممکن می‌کنند. در واقع مکانیسم بایوسورفکتانت برای رفع آلودگی فلزات سنگین در نتیجه جذب سورفکتانت به سطح خاک و تشکیل کمپلکس با فلز، جداشدن از خاک و در نهایت شرکت در مسیل‌های سورفکتانتی اتفاق می‌افتد (۵۹، ۶۰). داس و همکاران (۱۸) نشان دادند رامینولیپیدها می‌توانند در حضور کاتیون‌های آب و خاک، با فلزات سنگین مانند کادمیم تشکیل کمپلکس دهند و آنها را به خوبی حذف کنند.

- (5) Mousavi SM., Bahmanyar MA., Pirdashti H., Gilani SS. Trace metals distribution and uptake in soil and rice grown on a 3-year vermicompost amended soil. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9 (25): 3780-5.
- (6) Chi T., Zuo J., Liu F. Performance and mechanism for cadmium and lead adsorption from water and soil by corn straw biochar. *Journal of Frontiers of Environmental Science & Engineering* 2017; 11 (2): 1-8.
- (7) Mousavi SM., Bahmanyar MA., Pirdashti HA. Phytoextraction of nickel and chrome in paddy soil amended with municipal solid waste and sewage sludge. *Journal of Environmental Science and Engineering* 2011; 5 (5).
- (8) Mousavi SM., Bahmanyar MA., Pirdashti H. Phytoavailability of some micronutrients (Zn and Cu), heavy metals (Pb, Cd), and yield of rice affected by sewage sludge perennial application. *Journal of Communications in Soil Science Plant Analysis* 2013; 44 (22): 3246-58.
- (9) Mousavi SM., Bahmanyar MA., Pirdashti H., Moradi S. Nutritional (Fe, Mn, Ni, and Cr) and growth responses of rice plant affected by perennial application of two bio-solids. *Journal of Environmental Monitoring Assessment* 2017; 189 (7): 1-10.
- (10) Srivastava A., Wu QS., Mousavi SM., Hota D. Integrated soil fertility management in fruit crops: An overview. *International Journal of Fruit Science* 2021; 21 (1): 413-39. Gravand F., Rahnavard A., Pour GM. Investigation of vetiver grass capability in phytoremediation of contaminated soils with heavy metals (Pb, Cd, Mn, and Ni). *Soil Sediment Contamination: An International Journal* 2021; 30 (2): 163-86.
- (11) Gravand F., Rahnavard A., Pour GM. Investigation of vetiver grass capability in phytoremediation of contaminated soils with heavy metals (Pb, Cd, Mn, and Ni). *Soil Sediment Contamination: An International Journal* 2021; 30 (2): 163-86.

در حذف کادمیم از خاک آلوده نشان داده شد تیمار بایوسورفکتانت به طور معنی داری در مقایسه با سایر تیمارها باعث حذف کادمیم از خاک آلوده می شود. براساس مطالعات گذشته، باکتری های خاک واکنش های متفاوتی به شرایط مختلف خاک نشان می دهند (برای مثال، کمبود یا سمیت عناصر غذایی، شوری خاک، آلودگی خاک و غیره). شناسایی این واکنش ها و توانایی ها به ما کمک می کند از آنها برای بهبود سلامت خاک و محصول و در نتیجه سلامت عمومی استفاده کنیم. به طور کلی از یافته های این پژوهش نتیجه گیری می شود بایوسورفکتانت تولید شده توسط مارینوباکتر هیدروکربنوکلستیکوس پس از کالبراسیون محلی و همچنین تکرار و اجرای آزمایش در شرایط طبیعی، با اطمینان بیشتری می تواند برای پالایش خاک های آلوده به کادمیم استفاده شود.

References

- (1) Mousavi SM., Srivastava AK., Cheraghi M. Soil health and crop response of biochar: An updated analysis. *Journal of Archives of Agronomy and Soil Science* 2022; 1-26.
- (2) Mousavi SM. *Silicon and nano-silicon mediated heavy metal stress tolerance in plants*. Elsevier; 2022, 181-91.
- (3) Mousavi SM., Brodie G., Payghamzadeh K., Raiesi T., Srivastava AK. Lead (Pb) bioavailability in the environment, its exposure and effects. *Journal of Advances in Environmental Health Research* 2022; 10 (1): 1-4.
- (4) Mousavi SM., Bahmanyar MA., Pirdashti H. Lead and cadmium availability and uptake by rice plant in response to different biosolids and inorganic fertilizers. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2010; 5 (1): 25-31.

- (12) Mousavi SM., Motesharezadeh B., Hosseini HM., Alikhani H., Zolfaghari AA. Root-induced changes of Zn and Pb dynamics in the rhizosphere of sunflower with different plant growth promoting treatments in a heavily contaminated soil. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety* 2018; 147: 206-16.
- (13) Mousavi SM., Motesharezadeh B., Hosseini HM., Alikhani H., Zolfaghari AA. Geochemical fractions and phytoavailability of zinc in a contaminated calcareous soil affected by biotic and abiotic amendments. *Environmental Geochemistry Health* 2018; 40 (4): 1221-35.
- (14) Moshiri F., Ebrahimi H., Ardakani MR., Rejali F., Mousavi SM. Biogeochemical distribution of Pb and Zn forms in two calcareous soils affected by mycorrhizal symbiosis and Alfalfa rhizosphere. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2019; 179: 241-8.
- (15) Mousavi SM., Moshiri F., Moradi S. Mobility of heavy metals in sandy soil after application of composts produced from maize straw, sewage sludge and biochar. *Journal of Environmental Management* 2018; 222: 132-4.
- (16) Mousavi SM., Nasrabadi M. Discussion of "remediation of heavy metals contaminated silty clay loam soil by column extraction with ethylenediaminetetraacetic acid and nitrilo triacetic acid" by Dariush Naghipour, Jalil Jaafari, Seyed Davoud Ashrafi, and Amir Hossein Mahvi. *Journal of Environmental Engineering* 2018; 144 (5): 07018003.
- (17) Mousavi SM., Motesharezadeh B., Hosseini HM., Zolfaghari AA., Sedaghat A., Alikhani H. Efficiency of different models for investigation of the responses of sunflower plant to Pb contaminations under SiO₂ nanoparticles (NPs) and *Pseudomonas fluorescens* treatments. *Arabian Journal of Geosciences* 2022; 15 (14): 1-12.
- (18) Das A., Lal S., Kumar R., Verma C. Bacterial biosurfactants can be an ecofriendly and advanced technology for remediation of heavy metals and co-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2017; 14 (6):1343-54.
- (19) Jahanshah G., Nahvi I., Khodaverdee H., Barani M., Ghanavati H., Zarkesh SH. Feasibility of heavy metals removal from compost by biosurfactant. *Journal of Water and Wastewater* 2012; 23 (3): 119-24 (in Persian).
- (20) Zhang X., Xu D., Zhu C., Lundaa T., Scherr KE. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal* 2012; 209: 138-46.
- (21) De S., Malik S., Ghosh A., Saha R., Saha B. A review on natural surfactants. *RSC Advances* 2015; 5 (81): 65757-67.
- (22) Wang S., Mulligan CN. Rhamnolipid foam enhanced remediation of cadmium and nickel contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 2004; 157 (1): 315-30.
- (23) Ramani K., Jain SC., Mandal AB., Sekaran G. Microbial induced lipoprotein biosurfactant from slaughterhouse lipid waste and its application to the removal of metal ions from aqueous solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2012; 97: 254-63.
- (24) Singh AK., Cameotra SS. Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Journal of Environmental Science and Pollution Research* 2013; 20 (10): 7367-76.
- (25) Gee GW., Or D. Particle-size analysis. *Methods of soil analysis (Part 24)* 2002; 4 (598): 255-93.
- (26) Klute A. *Methods of soil analysis. Part I. Physical and mineralogical methods. Soil Science Society of America, Inc Publisher, Madison, WI.* 1986.

- (27) Bremner JM. Total nitrogen. Methods of soil analysis Am Soc Agron Mongrn 10. 1982; 2: 594-624.
- (28) Walkley A., Black IA. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 1934; 37 (1): 29-38.
- (29) Bremner JM. Nitrogen-total. Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods. 1996; 5: 1085-121.
- (30) Page AL. Methods of soil analysis, Part 2-chemical and microbiological properties. Soil Science Society of America. 1982.
- (31) Youssef NH., Duncan KE., Nagle DP., Savage KN., Knapp RM., McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of Microbiological Methods 2004; 56 (3): 339-47.
- (32) Shahami H. Investigation the possibility of production of biosurfactant by pseudomonas strain. Master Thesis, School of Chemical, Petroleum and Gas Engineering. University of Science and Technology 2007: 186 Pp (in Persian).
- (33) Tahmourespour A., Kermanshahi KR. Adaptability of Bacterial Isolates to Heavy Metals in Industrial Wastewater. Journal of Water and Wastewater 2007; 18 (1): 53-9 (in Persian).
- (34) Malek Mahmoudi S. Investigation the removal of crude oil from the soil by using Rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa PTCC1340. Master Thesis, School of Chemical Engineering. Babol Noshirvani University of Technology (BNUT) 2018:144 Pp, (in Persian).
- (35) Varnaseri Ghand Ali M. Effect of Pseudomonas Putida 1694 on production of biosurfactant, purification of oil contamination and heavy metals from the soil. Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz. 2015:153 Pp (in Persian).
- (36) Bodour AA., Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. Journal of Microbiological Methods 1998; 32 (3): 273-80.
- (37) Francy D., Thomas J., Raymond R., Ward C. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. Journal of Industrial Microbiology 1991; 8 (4): 237-45.
- (38) Rodrigues L., Moldes A., Teixeira J., Oliveira R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by Lactobacillus strains. Biochemical Engineering Journal 2006; 28 (2): 109-16.
- (39) Walter V., Syldatk C., Hausmann R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. Biosurfactants 2010; 1-13.
- (40) Juwarkar AA., Dubey KV., Nair A., Singh SK. Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant—a novel approach. Indian Journal of Microbiology 2008; 48 (1): 142-6.
- (41) Sarin C., Sarin S. Removal of cadmium and zinc from soil using immobilized cell of biosurfactant producing bacteria. Environ Asia 2010; 3 (2): 49-53.
- (42) Emenike C., Agamuthu P., Fauziah S. Sustainable remediation of heavy metal polluted soil: A biotechnical interaction with selected bacteria species. Journal of Geochemical Exploration 2017; 182: 275-8.
- (43) Abou-Shanab R., Van Berkum P., Angle J. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of Alyssum murale. Chemosphere 2007; 68 (2): 360-7.
- (44) Zeid A., Hassanein WA., Salama HM., Fahd GA. Biosorption of some heavy metal ions using bacterial species isolated from

- agriculture waste water drains in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research* 2009; 372-83.
- (45) Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2000; 1488 (3): 211-8.
- (46) Pavitran S., Balasubramanian S., Kumar P., Bisen P. Emulsification and utilization of high-speed diesel by a *Brevibacterium* species isolated from hydraulic oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2004; 20 (8): 811-6.
- (47) Tugrul T., Cansunar E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; 21 (6): 851-3.
- (48) Dastgheib S., Amoozegar M., Elahi E., Asad S., Banat I. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Journal of Biotechnology Letters* 2008; 30 (2): 263-70.
- (49) Portilla-Rivera O., Torrado A., Domínguez J., Moldes A. Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56 (17): 8074-80.
- (50) Plaza GA., Zjawiony I., Banat I. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 2006; 50 (1): 71-7.
- (51) Bicca FC., Fleck LC., Ayub MA. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia* 1999; 30: 231-6
- (52) Varjani S., Rana D., Bateja S., Sharma M., Upasani V. Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 2014; 3 (2).
- (53) Bernhemer A., Avigod L. nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *Journal Genomics Microbiology* 1970; 145: 53-6.
- (54) Barathi S., Vasudevan N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International* 2001; 26 (5-6): 413-6.
- (55) Emtiazi G., Shakarami H., Nahvi I., Mirdamadian S. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *E. coli*. *African Journal of Biotechnology* 2005; 4 (2): 172-6.
- (56) Desai JD., Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997; 61 (1): 47-64.
- (57) Peng F., Wang Y., Sun F., Liu Z., Lai Q., Shao Z. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105 (3): 698-705.
- (58) Islam Janpen H., Kitten A., Dassara Y. Screening of biosurfactants producing bacteria and optimization of production process. *Journal of Basic Microbiology* 2000; 1-3.
- (59) Zouboulis A., Matis K., Lazaridis N., Golyshin P. The use of biosurfactants in flotation: application for the removal of metal ions. *Journal of Minerals Engineering* 2003; 16 (11): 1231-6.
- (60) Banat I. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal–State of the Art. *Acta Biotechnologica* 1995; 15 (3): 251-67.

(61) Thavasi R., Subramanyam Nambaru VR., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat IM. Biosurfactant production by

Azotobacter chroococcum isolated from the marine environment. *Journal of Marine Biotechnology* 2009; 11(5), 551-6.

-
- 1- Phytoremediation
 - 2- In situ remediation
 - 3- *Pseudomonas aeruginosa*
 - 4- *Corynebacterium*
 - 5- *Nocardia*
 - 6- *Rhodococcus*
 - 7- *Bacillus subtilis*
 - 8- *Bacillus licheniformis*
 - 9- *Arthrobacter*
 - 10- *Torulopsis bombicola*
 - 11- *Candida spp*
 - 12- *Bacillus pumilus*
 - 13- *Alcanivorax dieselolei*
 - 14- *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*
 - 15- Minimum Inhibitory Concentration
 - 16- *S. marcescens*
 - 17- *pseudomonas putia 1694*
 - 18- *Bacillus laterosporus*