مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، اردیبهشت ۱۳۹۷، ۱۵۶-۱۴۳

امکان سنجی تولید بیوسورفکتانت رامنولیپیدی از فاضلاب روغنی با استفاده از *سودوموناس آئروژنزا* جداسازی شده از فاضلاب بیمارستانی

بتول محب‌راد[۱]، عباس رضایی[۲]، سمیه دهقانی[۳]، معصومه زمانیان[۴]، مهدی حامد رحمت[۵]

دریافت مقاله:۹۵/۹/۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح:۹۵/۱۱/۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده:۹۶/۱۲/۹ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۲/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر، تولید و استفاده از ترکیبات با ارزش نظیر بیوسورفکتانت‌ها از فاضلاب با توجه به مزایای زیست محیطی و اقتصادی آن مورد توجه قرار گرفته است. امروزه بیوسورفکتانت‌های تولیدی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از منابع کربن مختلف، در صنایع غذایی، دارویی، پتروشیمی، استخراج نفت، تصفیه فاضلاب مورد استفاده می‌گیرند. این مطالعه، با هدف ارزیابی استفاده از فاضلاب‌های روغنی به عنوان سوبسترای ارزان‌قیمت با استفاده از سویه های سودوموناس آئروژنزا جدا شده از فاضلاب بیمارستانی جهت تولید بیوسورفکتانت‌های رامنولیپیدی انجام شده است.

مواد و روش‌ها: این تحقیق یک مطالعه تجربی و در مقیاس آزمایشگاهی است که در رآکتور ناپیوسته حاوی باکتری بومی جدا شده از پساب فاضلاب های بیمارستانی در محیط معدنی حاوی روغن‌های مختلف انجام شده است که روغن کشت در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف، با آزمایش‌های همولیز، گسترش نفت، انهدام قطره، فعالیت امولسیون کنندگی و اکسیژن مورد نیاز شیمیایی، سنجش گردید. در این تحقیق تحلیل‌های آماری بر مبنای ارزیابی‌های گروه‌های شاهد – تست مطابق با آزمون‌های student T-test انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که باکتری سودوموناس آئروژنزا جدا شده، توانایی مطلوبی را در تولید بیوسورفکتانت دارد. کاهش کشش سطحی، امولسیون‌کنندگی بیش از ۷۰ درصد و کاهش COD (Chemical oxygen demand) به میزان ۸۵ درصد، حاصل استفاده از بیوسورفکتانت جدا شده بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این تحقیق، به نظر می رسد فاضلاب‌های روغنی حاوی مقادیر بالای مواد آلی، گزینه مناسبی جهت تولید بیوسورفکتانت‌های رامنولیپیدی باشند. بیوسورفکتانت‌های تولیدی، بدلیل خاصیت امولسیون‌کنندگی مطلوب، می‌توانند به منظور حذف آلاینده‌های دیر تجزیه‌پذیر و فرآیندهای اصلاح زیستی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت رامنولیپیدی، پساب روغن، سودوموناس آئروژنزا، امولسیون کنندگی

۱- دانشجوی دکتری گروه بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استاد، گروه بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
تلفن: ۸۲۸۸۳۵۷۵-۰۲۱، دورنگار: ۸۲۸۸۳۵۷۵-۰۲۱، پست الکترونیکی: rezaee@modares.ac.ir
۳- دانشجوی دکتری گروه بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد تکنولوژی میکروبی ، دانشکده علوم ، دانشگاه فردوسی مشهد ، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

مقدمه

امروزه تولید محصولاتی نظیر بیوسورفکتانت‌ها از پسماندهای جامد و مایع، یکی از اهداف زیست محیطی است که علاوه بر مزایای اقتصادی، کاهش آلایندگی ناشی از سورفکتانت‌های مصنوعی را نیز به دنبال دارد [۱]. این مواد، در سطوح سلول‌های میکروبی معمولا به شکل خارج سلولی ترشح می‌گردند. باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولیدکنندگان مهم این ترکیبات بوده که مورد علاقه بسیاری از بیو تکنولوژیست‌ها می‌باشند [۳].

بیوسورفکتانت‌ها دارای گروه‌های هیدروفیلی و هیدروفوبی می باشند که مانند ترکیبات فعال سطحی عمل می کنند و بین فازهای مایع با قطب‌های متفاوت و پیوندهای هیدروژنی قرار می‌گیرند و بر این اساس کشش سطحی و بین سطحی را در این نواحی کاهش می‌دهند. کاربردشان در پنج دهه گذشته به طور وسیعی به جای سورفکتانت‌های شیمیایی(کربوکسیلات‌ها، سولفونات‌ها، استرهای اسیدی سولفات) بالاخص در صنایع غذایی، دارویی و نفتی توسعه یافته است. از کاربردهای مطرح دیگر بیوسورفکتانت‌ها، استفاده در تجزیه ترکیبات و آلاینده‌های نفتی است [۷-۴].

استفاده از بیوسورفکتانت‌ها به‌جای سورفکتانت‌ها در صنایع مختلف مانند نفت و پتروشیمی بدلیل گران بودن فرآیند تولید، توجیه اقتصادی ندارد. یکی از استراتژی‌های رفع این مشکل استفاده از پسماندها و ضایعات صنایع است که به‌عنوان یک سوبسترای تجدیدپذیر و ارزان قیمت مطرح اند. از جمله این مواد می‌توان به پسماندهای صنایع روغن‌کشی، صنایع لبنی و تولید قند، پسماند لیگنو سلولوزی و غیره را نام برد [۸].

با توجه به تولید بالای روغن در دنیا در حدود ۲/۵ تا ۳ میلیون تن در سال و همچنین توجه به این نکته که روغن‌های خام یا تصفیه نشده حاوی اسیدهای چرب شامل مونو، دی و تری‌گلیسریدها، فسفانیدها، پیگمان‌ها، توکوفرول‌ها، فلزات کمیاب، آفت کش‌ها و صمغ و سایر آلاینده‌ها می‌باشد، لذا دفع آن به محیط زیست نگران کننده است. وجود مواد مغذی در این پسماندها باعث شده که امروزه به عنوان یک سوبسترای مناسب برای تولید ترکیبات ثانویه مورد توجه قرار گیرند [۹-۱۰].

توانایی میکرو ارگانیسم‌ها در تولید بیوسورفکتانت‌ها سبب شده است که میکروارگانیسم‌های متنوعی در تولید بیوسورفکتانت‌ها مورد توجه قرار گیرند. سودوموناس (باکتری گرم منفی، میله‌ای غیر تخمیری، اکسیداز و کاتالاز مثبت) یکی از این میکروارگانیسم‌هاست که با توجه به توانایی زیاد در استفاده از منابع مختلف کربن در حذف آلاینده‌های زیستی و حضور در بیشتر مکان‌ها مورد توجه خاصی قرار گرفته است. امروزه از این باکتری‌ها در مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود و نقش بسیار مهمی در فعالیت‌های متابولیکی محیط زیست مانند چرخه عناصر و تجزیه آلاینده‌های ناشی از فعالیت‌های زیستی و غیر زیستی بازی می‌کند. چرخه تنفسی این باکتری شامل سیتوکروم‌های مختلف و انواع گوناگون اکسیدازهای انتقالی متصل به اکسیژن است که توانایی زیادی به آن داده است. ویژگی دیگر این باکتری این است که قادر به زندگی در هردو شرایط هوازی و بی‌هوازی است [۱۱].

امروزه تحقیقات زیادی در خصوص تولید بیوسورفکتانت‌ها به منظورهای متفاوت انجام می‌شود [۷-۴]. Jain و همکاران تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری قلیایی دوست کلبسیلا .SP گونه RJ-03 را با استفاده از

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

منابع مختلف کربن غیرمتعارف پودر و تفاله نیشکر و پوست و پودر سیب مورد بررسی قرار دادند. بیوسورفکتانت تولید شده توسط توسط نیشکر بیشترین ویسکوزیته و حداکثر کاهش کشش سطحی را داشت [۱۲]. همچنین Amani و همکاران، توانایی پسودوموناس آرئوژنوزا را برای تولید بیوسورفاکتات رامنولیپید مورد بررسی قرار دادند. منبع کربن، ساکاروز و منبع نیترات، سولفات آمونیم بود. در این تحقیق ۲/۸ گرم در لیتر رامنولیپید تولید شد [۱۳].

Franc و همکاران در سال ۲۰۱۵ توسط سویه جدیدی ازباسیلوس سوبتیلیس AC56 جداشده از جنگل‌های حرا با استفاده ازضایعات کشاورزی وصنعتی (گلیسرول، روغن آفتابگردان، آب پنیر وآب سیب، بادام زمینی) به عنوان منبع جایگزین برای تولید بیوسورفکتانت استفاده کردند در این تحقیق گلیسرول بهترین منبع کربن با بازده ۱۲۹۰ میلی‌گرم در لیتر سورفاکتانت خام بود [۱۴].

با توجه به مطالب ذکر شده، در این تحقیق سعی برجداسازی باکتری موجود در پساب فاضلاب‌های بیمارستانی با توجه به تحمل شرایط سخت توسط آن‌ها است که بتواند در حین تولید بیوسورفکتانت، روغن‌های نامحلول را نیز حذف نماید. به این منظور باکتری‌های موجود در پساب یکی از بیمارستان‌ها که به عنوان یک باکتری وحشی که در شرایط سخت به زندگی خود ادامه می‌دهند، جداسازی و تولید بیوسورفاکتانت و حذف روغن توسط آن مورد بررسی قرار گرفت. پس از جداسازی باکتری‌های بومی وحشی بدون خودهی از فاضلاب، توانایی آن‌ها در تولید بیوسورفکتانت مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین پس جداسازی بیوسورفاکتانت از فاضلاب روغنی میزان کاهش بار آلی خروجی بر حسب COD مورد مطالعه قرار گرفت. لذا این مطالعه با هدف امکان سنجی تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های جدا شده از فاضلاب با بهره‌گیری از فاضلاب‌های حاوی روغن‌های متفاوت گیاهی خوراکی و زیتون و صنعتی (مانند روغن خودرو و بنزین) به عنوان سوبسترا، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه تجربی در مقیاس آزمایشگاهی است که در راکتور ناپیوسته حاوی باکتری سودوموناس آئروژنزا جدا شده از پساب فاضلاب بیمارستانی و در گروه بهداشت محیط دانشگاه تربیت مدرس در سال ..... انجام شده است. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق عمدتاً از شرکت مرک آلمان با دارای درجه خلوص آزمایشگاهی خریداری شده است.

دستگاه‌های pH متر (Sension 378, HACH)، اسپکتروفتومتر (Ray Leigh UV-9200)، همزن مغناطیسی (ALFA HS-8600)، فور(Memert آلمان)، ترازوی آنالیتیکی (Sartrious, Germany)، دستگاه تنسیومتر (مدل700 KSV Sigma، فنلاند) و سانتریوفوژ (UNIVERSAL 320) از جمله دستگاه‌های مورد استفاده در این تحقیق بودند.

ابتدا، باکتری‌های موجود در پساب فاضلاب بیمارستانی، در محیط‌های آگار خون‌دار کشت داده شدند و سپس بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar)[ ] و لوریا براث Luria Broth (LB)[ ] حاوی ۵ درصد عصاره مخمر، ۱۰ درصد پپتون و ۵ درصد سدیم کلراید در pH حدود ۷ و در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. باکتری‌های رشد کرده در محیط‌های کشت توسط تست‌های بیوشیمیایی ارزیابی و باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس شناسایی شدند.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

جهت نگهداری باکتری‌ها، از محیط کشت پایه حاوی گلیسرول استفاده شد و باکتری‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت تهیه تولید بیوسورفکتانت از محیط کشت از فرمول زیر استفاده شد [۵-۱]:

۲/۵ g/L از NaNO3، ۱ g/L از KCl، ۱ g/L از NaCl، ۰/۱ g/L از $CaCl_2$، ۰/۲ g/L از $MgSO_4,7H_2O$، ۴ g/L از KH_2PO_4، ۴ g/L از K_2HPO_4 و ۱ g/L yeast extract و ۱ میلی‌لیتر عناصر جزئی شامل:

۰/۱۱۶ g/L $FeSO_4,7H_2O$، ۰/۲۳ g/L از H_3BO_3، ۰/۴۱ g/L از $CoCl_2.6H_2O$، ۰/۰۰۸ g/L از $CuSO_4,5H_2O$، ۰/۰۰۸ g/L از $MnSO_4,H_2O$، ۰/۰۲۲ g/L از $[NH_4]_6Mo_7O_{24}$ و ۰/۱۷۴ g/L از $ZnSO_4$ آماده شد.

پس از تنظیم pH بیوسورفکتانت استریل بر روی ۷، ۱۰۰ میلی‌لیتر از آن داخل ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتر ریخته شد و به آن درصدهای مختلف (حجمی/حجمی) از روغن‌های خودرو ، روغن زیتون، روغن خوراکی آفتابگردان و بنزین، به عنوان منبع کربن و ۲/۵ درصد باکتری آماده شده بوسیله بافر سالین با غلظت نیم مک فارلند افزوده شد و روی شیکر ارلن در دمای آزمایشگاه به مدت ۱ تا ۶ روز برای تشکیل بیوسورفاکتانت قرار گرفت. هر روز نمونه‌برداری انجام و در این مدت عواملی مانند pH و کدورت پس از انتخاب بهترین منبع کربن غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد آن (حجمی/حجمی) مورد مطالعه قرار گرفت.

جداسازی سلول‌های باکتریایی توسط سانتریفوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس جهت حذف هیدروکربن، رسوب ابتدا دو بار با استفاده از استون شسته و سپس توسط آب مقطر برای حذف محیط کشت اضافی شستشو شد. سلول‌های جداسازی شده در پلیت ریخته شد و به آن ۳ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید و وزن خشک آن بر حسب گرم در لیتر بدست آمد. منحنی کالیبراسیون کدورت ایجاد شده توسط باکتری در مدت ۶ روز در هر ۲۴ ساعت در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ترسیم گردید[۱۵].

پس از آماده‌سازی محیط کشت، به ارلن مایرهای حاوی محیط و منبع کربن، ۲/۵ درصد نیم مک فارلند باکتری سودوموناس که قبلاً بر روی محیط نوترینت آگار غنی‌سازی شده بود افزوده و بر روی شیکر ارلن با دور ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۶ روز در دمای آزمایشگاه بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و هر ۲۴ ساعت برای بررسی تولید بیوسورفکتانت نمونه‌برداری شد.

به‌منظور بررسی تولید بیوسورفکتانت، مایع رویی کشت باکتری توسط دستگاه سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از جداسازی باکتری‌ها و به کمک چند تست ویژه، توانایی تولید بیوسورفکتانت مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر سری از آزمایشات برای هر کدام از منبع کربن‌ها یک نمونه بدون باکتری و یک نمونه بدون منبع کربن به منظور کنترل گذاشته شد. به طور معمول گونه‌هایی از سودوموناس که توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارند، از توانایی ایجاد همولیز نیز بهره‌مند می‌باشند. لذا در این پژوهش کلنی خالص باکتری بر روی آگار خون‌دار کشت داده شد و فعالیت همولیز آن مورد بررسی قرارگرفت. برای این منظور، مقداری روغن روی سطح لام پخش و پس از یک ساعت ۱۰ میکرولیتر از روماند باکتری به آن اضافه گردید و پس

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

از یک دقیقه شکل قطره با عدسی ۱۰ میکروسکوب نوری بررسی شد.

غلظت بحرانی (Critical Micelle Concentration) غلظتی است که در آن میسل‌ها شروع به تجمع می‌کنند و در آن سورفاکتانت کم‌ترین کشش سطحی را نشان می‌دهد [۱۶]. در بالای غلظت بحرانی میسل (CMC)، مونومرهای سورفاکتانت به منظور تشکیل میسل تجمع می‌یابند. بسیاری از ویژگی‌های سیستم در مقادیر بالاتر از(CMC) بدون تغییر باقی می‌ماند، زیرا سورفکتانت مازاد به جای آن‌که فعالیت مائی سورفکتانت را افزایش دهد، میسل تولید می‌کند. کشش سطحی محیط کشت عاری از سلول باکتریایی با استفاده از دستگاه تنسیومتر سنجیده شد و میانگین سه بار تکرار برای بالا بردن دقت آزمایش گزارش شد. قبل از هر بار کار با دستگاه لازم است حلقه پلاتینی با آب مقطر شستشو داده شود تا در نتایج خللی ایجاد نشود. کشش سطحی با غوطه‌ور کردن حلقه در محیط کشت عاری از سلول و ثبت نیروی لازم برای خارج کردن حلقه از حد فاصل محیط آبی و هوا در مانیتور دستگاه انجام شد [۱۶].

۴ میلی‌لیتر از محلول بیوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری را با غلظت‌های مختلف به ۴ میلی لیتر از روغن-های مختلف خوراکی، روغن خودرو، بنزین و نفت خام افزوده و به مدت ۳ دقیقه به شدت چرخانده (Vortex) شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت فاکتور امولسیون‌کنندگی (Emulsification index) از تقسیم ارتفاع ناحیه سوسپانسیون شده بر مجموع ارتفاع دو سیال محاسبه گردید (معادله ۱).

معادله (۱)

$$E24=\frac{H_{24}}{H} \times 100$$

H_{24} ارتفاع امولسیون شده پس از ۲۴ ساعت و H ارتفاع کل مایع می‌باشد .

برای تایید تولید بیوسورفکتانت از آزمایش گسترش روغن(ODA (Oil displacement area استفاده شد، آزمایش به این صورت بود که ابتدا ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون پلیت ریخته و ۵۰ میکرولیتر نفت و یا انواع روغن به آن افزوده شد. بعد از ۱ تا ۲ دقیقه لایه یکنواختی بر سطح آب تشکیل می‌شود. ۱۰ میکرولیتر از بیوسورفکتانت تولید شده را به آن افزوده و قطر لایه شفاف سطح لایه رویی پلیت در مقایسه با حجم یکسانی از آب مقطر بررسی می شود. این آزمایش بیان‌گر کارا بودن بیوسورفکتانت تولیدی می‌باشد (معادله ۲) :

معادله (۲)

$$ODA = 3.14 \times r^2$$

از طریق این آزمایش می‌توان به میزان پایداری امولسیون ایجاد شده توسط بیوسورفکتانت پی برد [۱۷]. پس از تلقیح باکتری به محیط کشت حاوی نمک‌های معدنی، زمانی جهت رشد باکتری‌ها در نظر گرفته می‌شود. بدین منظور ارلن‌های حاوی باکتری در دما و دور مناسب گرم‌خانه‌گذاری می‌شوند. سپس پایداری و ارتفاع کف تولید شده بررسی می‌شود. جهت استخراج بیوسورفکتانت تولیدی، پس از جداسازی باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، روماند باکتری در ارلن مایر ریخته شد و بوسیله اسید کلریدریک ۶ مولار، pH درون ارلن به زیر ۲ رسانده شد تا بیوسورفکتانت تولیدی رسوب نماید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و سپس حجم برابر دی کلرومتان به آن اضافه و جداسازی فاز آلی آن در قیف دکانتور انجام شد. پس از تبخیر حلال،

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

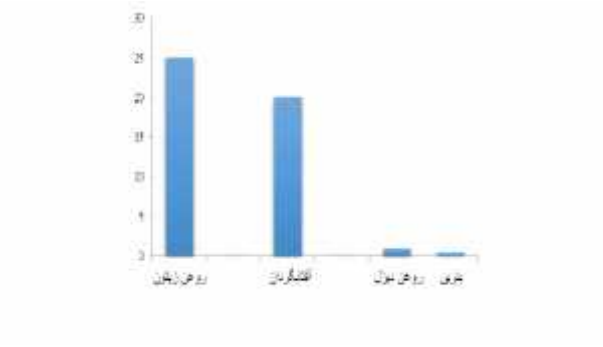
[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

ماده عسل مانند که همان رامنولیپید می‌باشد، جهت استفاده بعدی در دمای یخچال نگهداری شد. عمل استخراج به صورت سه بار تکرار انجام گرفت [۱۸].

جهت اندازه‌گیری رامنولیپید، منحنی استاندار قند رامنوز در غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۰۹ گرم در لیتر رسم گردید. به منظور سنجش قند، ۳ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته را با حجم مساوی از حلال دی کلرومتان مخلوط و فاز رویی آلی استخراج گردید [۱۹]. این عمل به‌صورت سه بار تکرار انجام شد. حلال را تبخیر و رسوب به‌دست آمده را در ۳ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۰/۱ مولار حل نموده تا به حجم اولیه برسد. به ۲ میلی‌لیتر از محلول آماده شده، ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه نموده تا تشکیل بخار نمایان شود. سپس محلول را به مدت ۱۰ دقیقه به حالت سکون قرار داده و پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها و استانداردها را که به آن اسید و فنل افزوده شده بود، در جذب نوری ۴۸۰ نانومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی کالیبراسیون، غلظت قند که مناسب با رامنولیپید است، به‌دست آمد. تحلیل‌های آماری این تحقیق به کمک نرم افزار Spss و بر مبنای ارزیابی‌های گروه های شاهد – تست مطابق با آزمون‌های student T-test انجام شد. در این روش به طور معمول با فاصله اطمینان ۹۵ درصد، گروه‌های شاهد و تست مورد مقایسه قرار گرفته اند و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SEM) بیان شده اند.

نتایج

مطابق نتایج اخذ شده، هر دو باکتری سودوموناس و باسیلوس جدا سازی شده، توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارا می باشند و هر دو همولیز مثبت بودند. به منظور تعیین ارتباط تولید سورفکتانت و نوع منبع کربن از انواع روغن‌های خوراکی آفتابگردان، زیتون، روغن سوخته خودرو و روغن استفاده شد و با درصدهای متفاوت به محیط کشت تهیه شده افزوده شد. بر اساس ارتفاع کف ایجاد شده طبق نتایج، بیش‌ترین کف مربوط به روغن زیتون۵۴ درصد، سپس روغن خوراکی ۴۳ درصد و روغن خودرو ۲ درصد و بنزین۱ درصد بود (نمودار ۱).



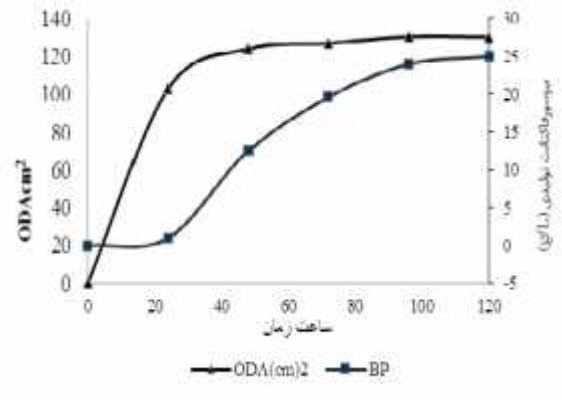
نمودار ۱- میزان بیوسورفکتانت تولیدی متعاقب استفاده از روغن‌های مختلف به عنوان منبع کربن

در آزمون تشکیل کف در لوله‌های آزمایش، از نمونه‌های سانتریفیوژ شده با حجم برابر، ریخته و به شدت توسط دستگاه ورتکس هم زده شد. ارتفاع و زمان پایداری کف بررسی گردید.

نتایج نشان داد که کف مربوط به باکتری سودوموناس ارتفاع و پایداری بیشتری در مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد داشت [۱۲]. به منظور تأیید تولید بیوسورفکتانت از آزمایش گسترش روغن ODA استفاده شد. طبق نتایج بدست آمده، قدرت گسترش قطره نفت توسط بیوسورفکتانت تولیدی، با استفاده از معادله، ارزیابی شد. همان‌طور که نتایج نمودار ۱ نشان می‌دهد، پس از ۷۲ ساعت ODA حدود ۱۲۷ سانتی‌متر مربع ایجاد گردید .

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]



نمودار ۲- رابطه بین تست ODA و میزان بیوسورفکتانت تولیدی توسط سودوموناس با استفاده از روغن زیتون ۱ درصد به عنوان منبع کربن

در بررسی توان باکتری برای تولید بیوسورفکتانت، باکتری رشد نموده درفاضلاب حاوی روغن در محیط بلاد آگار کشت داده شد. هر دو باکتری سودوموناس و باسیلوس، بتا همولیز تشکیل دادند. اما قطر دایره ایجاد شده توسط سودوموناس، بیش‌تر بود. در ادامه تحقیق از باکتری سودوموناس به منظور تشکیل بیوسورفکتانت رامنولیپید استفاده گردید.

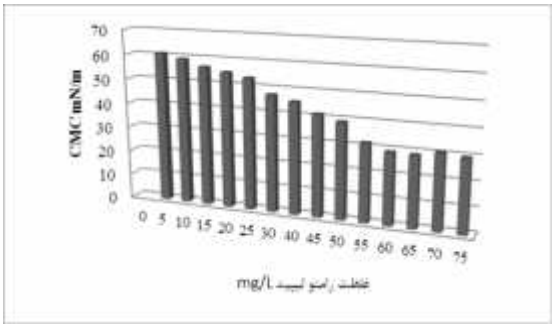
بر مبنای اطلاعات ارائه شده در جدول (۱)، مشخص است بیوسورفکتانت تولید شده از منبع مختلف دارای قدرت امولسیون‌کنندگی متفاوتی می‌باشد. رامنولیپید تولیدی توسط روغن زیتون با حضور ترکیبات مختلف حدود ۷۰ درصد و روغن خوراکی با روغن زیتون ۶۰ درصد، گازوئیل با حضور گازوئیل ۷۰ درصد بدست آمد.

جدول ۱- ارزیابی توانایی امولسیون کنندگی رامنولیپید بدست آمده از منابع مختلف کربن

نتایج	(E۲۴) اندیکس امولسیون کنندگی ٪	هیدروکربن مایع	انواع منبع کربنی
کنترل	۶۲	گازوئیل	۱SDS%
	۶۵	روغن زیتون	
	۶۱	نفت سفید	
	۶۸	روغن آفتابگردان	
خیلی خوب	۷۰	گازوئیل	روغن زیتون
	۶۵	روغن زیتون	
	۵۴	نفت سفید	
	۵۰	روغن آفتابگردان	
خوب	۵۳	گازوئیل	روغن آفتابگردان
	۵۶	روغن زیتون	
	۲۰	نفت سفید	
	۶۸	روغن آفتابگردان	
متوسط	۷۵	گازوئیل	گازوئیل
	۴۰	روغن زیتون	
	۲۲	روغن آفتابگردان	
	۰	نفت سفید	
بد	۰	گازوئیل	نفت سفید
	۰	روغن زیتون	
	۰	روغن آفتابگردان	
	۰	نفت سفید	

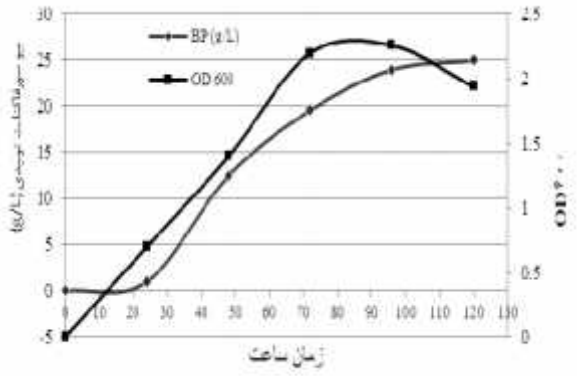
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

در این بررسی، غلظت‌های مختلف رامنولیپید تهیه و غلظت بحرانی کاهش کشش سطحی آن توسط دستگاه تنسیومتر مورد بررسی قرار گرفت. غلظت برای تشکیل میسل حدود ۶۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که توانست کشش سطحی را تا حدود ۲۸/۹ mN/m^2 کاهش دهد (نمودار ۳).



نمودار ۳ - نمودار غلظت بحرانی CMC با استفاده از غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت تولیدی

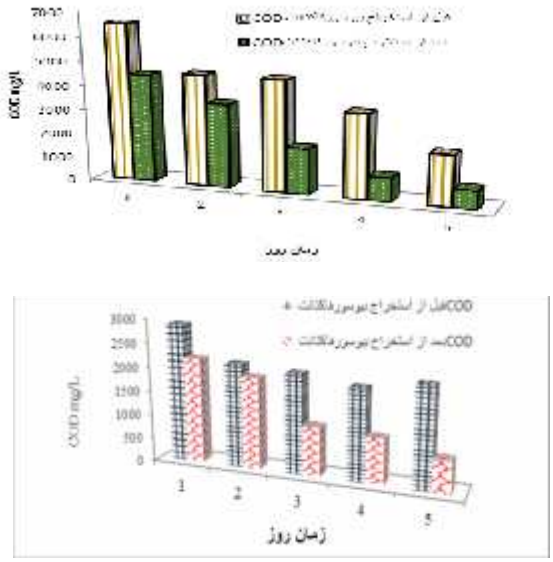
رابطه بین رشد سلولی و تشکیل رامنولیپید در نمودار ۴ بیان شده است. سودوموناس آئروژنزا جدا شده از فاضلاب بیمارستانی در محیط کشت توانست توسط منبع کربن روغن زیتون، حدود ۲۵ گرم در لیتر و برای روغن آفتابگردان ۲۰ گرم در لیتر بیوسورفکتانت تولید کند. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد بیش‌ترین تولید بیوسورفکتانت در فاز ثابت رشد به عنوان متابولیت‌های ثانویه اتفاق می‌افتد.



نمودار ۴- منحنی رابطه کدورت ایجاد شده با استفاده از روغن زیتون ۱٪ به عنوان منبع کربن

نتایج حاصل از حذف COD متعاقب استفاده از غلظت‌های ۰/۵ (a) و ۰/۲۵ (b) روغن زیتون در نمودار ۵ ارائه شده است.

a)



نمودار ۵- درصد حذف COD قبل و بعد از استخراج بیوسورفکتانت تولیدی غلظت ۰/۵ ٪ (a) و ۰/۲۵ ٪(b) روغن زیتون

بحث

با توجه به کاربردهای زیاد بیوسورفکتانت‌ها در صنایع، تولید این محصول بیولوژیکی در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. روش‌های مختلفی برای تولید و جداسازی این محصول از طریق بهینه‌سازی شرایط کشت و مهندسی ژنتیک و استراتژی مهندسی متابولیک انجام شده‌است.

همان طور که بیان شد، بیوسورفکتانت‌ها مولکول‌های بیوشیمیایی آمفی فیلیک هستند. این مواد ترکیبات فعال سطحی هستند که بین فازهای مایع با قطب‌های متفاوت و پیوندهای هیدروژنی قرار می‌گیرند این مواد در سطوح سلول‌های میکروبی تولید می‌شوند، یا به شکل خارج سلولی ترشح می‌گردند و شامل گروه‌های هیدروفیلی و

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

هیدروفوبی هستند که توانایی تجمع بین فازهای مایع را فراهم نموده و کشش سطحی و بین سطحی را در این نواحی کاهش می‌دهند. یکی از مهم‌ترین کاربرد های سورفکتانت‌ها، استفاده آنها در Bioremediation آلاینده‌های مختلف خصوصاً نفتی بوده است [۲۰-۱۷]. باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها، تولید کنندگان مهم این ترکیبات بوده و مورد علاقه بسیاری از بیوتکنولوژیست‌ها می‌باشد [۲۱].

استفاده از نوع بومی باکتری‌ها می‌تواند منجر به افزایش قابل ملاحظه این محصول شود. سودوموناس ها توانایی زیادی در استفاده از منابع مختلف کربن در حذف آلایندهای زیستی دارند و در همه جا موجود هستند. امروزه از این باکتری‌ها در مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود. همچنین این باکتری نقش بسیار مهمی در فعالیت‌های متابولیکی محیط زیست مانند چرخه عناصر و تجزیه آلایندهای ناشی از فعالیت‌های زیستی و غیر زیستی بازی می‌کند. توانایی سودوموناس در زمینه عملیات و فعالیت‌های بیوتکنولوژی بویژه در زمینه تجزیه زیست محیطی آلاینده‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. چرخه تنفسی این باکتری شامل سیتوکروم‌های مختلف و انواع گوناگون اکسیدازهای انتقالی متصل به اکسیژن است که باعث توانایی آن در استفاده از منابع مختلف کربن و شرایط سخت شده است [۲۱].

هم‌چنین با استفاده از منابع مختلف کربنی می‌توان میزان متفاوتی از این محصول را تولید نمود. یکی از روغن‌هایی که بالاترین تولید بیوسورفکتانت خصوصاً رامنولیپید را دارا می‌باشد، فاضلاب صنایع روغن زیتون است که علت عمده آن زیاد بودن چربی آب‌گریز آن می‌باشد. استفاده از فاضلاب‌های صنعتی ناشی از صنایع تصفیه روغن به لحاظ اقتصادی می‌تواند به‌عنوان یک منبع ارزان قیمت جهت تولید این محصول در نظر گرفته شود. بهینه‌سازی و تولید بیشتر محصول و استفاده از منابع مختلف نیترات و نسبت کربن به ازت می‌تواند تولید بیش-تر بیوسورفکتانت را حاصل سازد [۶].

در این تحقیق از سودوموناس آئروژنزا جهت تولید بیوسورفکتانت با حضور منابع مختلف کربن (روغن آفتابگردان، روغن زیتون، نفت سفید، گازوئیل) استفاده شد. در تحقیق Gorfi و همکاران نیز شرایط بهینه تولید بیوسورفکتانت به وسیله سودوموناس آئروژینوزا شامل منبع کربن روغن زیتون، منبع نیتروژن نیترات آمونیوم، نسبت کربن به ازت ۵، شوری ۰/۵ درصد و pH برابر ۷ تعیین گردید. بازده حذف پایرن در غلظت اولیه ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم در زمان ۶۳ روز و کاربرد بیوسورفکتانت به ترتیب ۹۱ و ۸۴ درصد تعیین شد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، سودوموناس توانایی زیادی برای تولید بیوسورفکتانت جهت حذف COD دارد که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد [۲۲].

همچنین در مطالعه‌ای Chaprão و همکاران، از بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط مخمر و باکتری‌های باسیلوس رشد کرده در سوبسترای ارزان قیمت در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود و با سورفکتانت مصنوعی توئین ۸۰ و تریتون X-۱۰۰ مقایسه کردند. نتایج نشان داد که بیوسورفکتانت‌های تولید شده از توانایی بالایی برای حذف روغن موتور از شن و ماسه آلوده در شرایط اختلاط و زمان تماس ۱۰-۵ دقیقه (۹۰ درصد تا ۷۰ درصد) برخوردارند. همچنین با افزودن بیوسورفکتانت تهیه شده از مخمر توانستند تخریب (۵۰ درصد) را انجام دهد. افزایش ۱۰ تا ۲۰ درصد بیوسورفکتانت زمان را به ۴۵ روز

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

کاهش داد که این نشان دهنده کار آمدی این ترکیبات در حذف بیولوژیکی و فیزیکی هیدرو کربن‌ها در سیستم‌های خاک می‌باشد. در راستای مطالعات ذکر شده در مطالعه ما نیز رامنولیپید تولیدی توسط روغن زیتون، دارای قدرت امولسیون‌کنندگی با حضور ترکیبات مختلف حدود ۷۰ درصد روغن موتور و ۶۰ درصد گازوئیل بود که نشان دهنده توانایی بالای این بیوسورفکتانت در محلول‌سازی این آلاینده بود که با نتایج بدست آمده از تحقیق ما همخوانی دارد [۴].

در مطالعه ای Abbasi و همکاران توانستند با استفاده از انواع مختلف میوهای فاسد و محصولات مرتبط با صنایع غذایی و فرآوری مواد غذایی به عنوان منبع کربن با استفاده از باکتری سودوموناس آئروژنوزا، بیوسورفکتانت تولید نمایند. بالاترین تولید بیوسورفکتانت در منبع روغن سویا بود. باکتری جدا شده قادر بود ۱۲ گرم بر لیتر بیوسورفکتانت تولید نماید. در مطالعه ما نیز، سودوموناس استفاده شده توانست به کمک منبع کربن روغن زیتون، حدود ۲۵ گرم در لیتر و به کمک روغن آفتابگردان، ۲۰ گرم در لیتر بیوسورفکتانت تولید نماید که میزان بالاتری برای تولید بیوسورفکتانت نسبت به مطالعه ذکر شده در بالا دارد [۶].

Maria Nathália و همکاران در مطالعه‌ای با استفاده از گونه‌های مختلف باکتری سودوموناس و روغن سویا و پاپ کورن توانستند در مدت ۱۴۴ ساعت ۳/۲ گرم در لیتر بیوسورفکتانت تولید کنند و از آن برای حذف چربی و روغن ماشین استفاده نمایند. به نظر می رسد، سودوموناس استفاده شده در مطالعه ما، توانایی بالاتری برای تولید بیوسورفکتانت نسبت به تحقیق فوق دارد [۲۳].

در مطالعه Al-Bahrya و همکاران، با کتری‌های هوازی از منابع مختلف جداسازی شد و بیوسورفکتانت‌ها و پلیمرهای تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری باسیلوس سوبتلیس W19 می‌تواند کشش سطحی را تا ۲۷ mN/m^2 کاهش دهد که با نتایج تحقیق ما مطابقت داشت. در نتایج این تحقیق غلظت برای تشکیل میسل حدود ۶۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که توانست کشش سطحی را تا حدود mN/m^2 ۲۸/۹ کاهش دهد [۲۴].

نتیجه‌گیری

نتایج ما نشان داد که بیشترین تولید محصول در فاز ثابت رشد باکتری بوده و این نشان‌دهنده ترشحات خارج سلولی باکتری‌ها به منظور استفاده بهتر از منابع کربن و محلول‌سازی آن‌ها با ترشح بیوسورفکتانت می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که استخراج بیوسورفکتانت باعث کاهش COD خروجی از تصفیه خانه نسبت به قبل از آن می‌شود. با توجه به CMC پایین و امولسیون‌کنندگی بالا و قدرت گسترش قطره روغن، تولید قابل توجه بیوسورفکتانت حاصل، می‌توان نتیجه گرفت که باکتری جدا شده از فاضلاب می‌تواند در مطالعات بعدی مرتبط با تصفیه فاضلاب‌های روغنی و تولید هم‌زمان بیوسورفکتانت، برداشت میکروبی و جداسازی نفت، تصفیه آلودگی‌های نفتی مورد توجه قرار گیرد. استفاده از پسماندهای صنایع با توجه به میزان مواد آلی بالا، قیمت پایین نسبت به سایر منابع کربن مانند گلوکز و ساکاروز می‌تواند با کاهش هزینه تولید این محصول، علاوه بر تصفیه فاضلاب‌های صنایع به تجاری‌سازی این محصول کمک نماید. در کشور ما نیز با توجه به شرایط کنونی با

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

تولید این محصول می‌توان علاوه بر رفع وابستگی به درآمد ارزی دست یافت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های پژوهشی و مالی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین از مسئولین محترم آزمایشگاه تشخیص طبی ایثارگران مشهد (عبدالمطلب) که در اجرای این تحقیق کمک‌های شایان توجهی داشتند تشکر و قدردانی نمایند.

References

[1] Priya A, Usharani B. Comparative Study for Biosurfactant Production by Using Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa. *Res Int* 2009; 2 (4): 284-7.

[2] Jain RM, Mody K, Joshi N, Mishra A, JhaDiscipline B, Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant productionand its application in bioremediation, *Int J Biol Macromol* 2013; 62: 52–8.

[3] Pérez-Armendáriz B, Mauricio-Gutiérrez A, Jiménez T, Tapia-Hernández A, Santiesteban-López A. Emulsification of Hydrocarbons Using BiosurfactantProducing Strains Isolated from Contaminated Soil inPuebla, Mexico. *Biodeg Eng Technol* 2013; 25-44.

[4] Chaprão MJ, Ferreira INS, Correa PF, Rufino RD, Luna JM, Silva EJ and et al. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sandElectronic. *J Biotechnol* 2015; 18: 471–79.

[5] Mabrouk MEM, Youssif EM, Sabry SA. Biosurfactant production by a newly isolated soft coral-associated marine Bacillus sp.E34: Statistical optimization and characterization. *Life Sci J* 2014; 11(10):17-21.

[6] Abbasi H, Hamedi MM, Bagheri Lotfabad T, Shahbani Zahiri H, Sharafi H, Masoomi F, et al. Biosurfactant-producing bacterium, Pseudomonas aeruginosa MA01 isolated fromspoiled apples: Physicochemical and structural characteristics ofisolated biosurfactant. *J Biosci Bioeng* 2012; 113 (2) 211–9.

[7] Myers D. Surfactant Science and Technology. Third Edition. Drew Myers Hoboken, New Jersey. *John Wiley and Sons, Inc* 2006; 6-10.

[8] Thavasi R, Subramanyam N, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, Banat IM. Biosurfactant Production by Pseudomonas aeruginosa from

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

Renewable Resources. *Indian J Microbiol* 2011; 51: 30-6.

[9] Rahman KS, Rahman TJ, McClean S, Marchant R, Banat IM. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of Pseudomonas aeruginosa Using Low-Cost Raw Materials. *Biotechnol Prog* 2002; 18: 1277-81

[10] Mukherjee S, Das P, Sen R. Towards Commercial Production of Microbial Surfactants (Review). *Trens Biotechnol* 2006; 24: 509-11.

[11] Nelson K.E, Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas Putida KT2440. Environ. *Microbiol* 2002; 4(12): 799–808.

[12] M. Jain, Mody K, Joshi N, Avinash Mishra, Bhavanath J. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant productionand its application in bioremediation. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013; 62: 52–8.

[13] Amani H, Optimization of Biosurfactant Production in order to clear crude and floating oil from water. *Journal of Science (Kharazmi University)* 2014; 14: 185-98.

[14] França I W L, Lima AP, Lemos J M. Production of a biosurfactant by Bacillus subtilis ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today* 2015; 225: 10-5

[15] Xiangsheng Z, Dejun Xu, Chunyan Z, Tserennyam L, Kerstin. S. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading Pseudomonas aeruginosa strains. *Chem Eng J* 2012; 209: 138-46.

[16] Youssef NH, Duncan K E, Nagle D P, Savage KN, Knapp RM, Mclnerney M J, "Comparison of methods to detect biosurfactant production be diverse microoraganism". *J Microbiol Methods* 2004; 56: 339-47.

[17] Saharan1 B, Sahu R, Sharma1 D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. *Gen Eng Biotechnol J* 2011; 29: 24-36.

[18] Darlane W, Wa T, Anne L, Vânia E. Kinetic study of biosurfactant production by Bacillus subtilis LAMI005 grown inclarified cashew apple juice. Colloids Surf B: *Biointerf* 2013; 101: 34-43.

[19] Rashedi H, Jamshidi, E. Assadi M, Bonakdarpour B. Isolation and production of biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian southern wells oil. *Int J Environ Sci Tech* 2005; 2(2): 121-27.

[20] Ochsner UA, Reiser J, Fietcher A, Witholt B, Production of Pseudomonas aeruginosa.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

rhamnolipid biosurfactants in heterologous host. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3503-06.

[21] Zhang G, Wu YT, Qian XP. Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids. *J Zhejiang University Sci* 2005; 6: 725-30.

[22] Jorfi S, Rezaee A, Mohebali G, Jafarzaed N, Application of biosurfactants produced by Pseudomonas aeruginosa SP4 for bioremediation of soils contaminated by pyrene, Soil Sediment Contam 2013; 22: 890-911.

[23] Nathália P. Rocha S, Raquel D. Rufin o, Juliana L, Valdemir A, Leonie A. Screeningof Pseudomonas species for biosurfactan tproduction using low-cos tsubstrates, Biocatalysi sand Agricultura Biotechnology. 2014; 3: 132-9.

[24] Al-Bahrya SN, Elshafiea AE, Al-Wahaibib YM, Al-Bemanib AS, Joshia SJ, Al-Lawatia A., Isolation and characterization of biosurfactant/biopolymer producing spore forming bacteria from oil contaminated sites and oil field of Oman. *Procedia* 2013; 5: 242-6.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]

Feasibility of Rhamnolipid Biosurfactant Production from Oily Wastewaters by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Hospital Wastewater

B. Mohebrad[1], A. Rezaee[2], S. Dehghani[3], M. Zamanian[4], M. Hamedrahmat[5]

Received:22/11/2016 Sent for Revision:22/01/2017 Received Revised Manuscript:28/02/2018 Accepted: 18/03/2018

Background and Objectives: Production and use of valuable compounds such as biosurfactants from wastewater, with regard to its environmental and economic benefits, is of particular interest recently. Nowadays, biosurfactants produced by microorganisms are used in various food sources, pharmaceuticals, petrochemicals, oil extraction, and wastewater treatment plants. This study was conducted to evaluate the use of oily wastewater as a cheap substrate using *Pseudomonous aeruginosa* strains isolated from hospital wastewater to produce rhamnolipid biosurfactants.

Materials and Methods: The present study was an experimental study that was conducted in a laboratory scale in a batch reactor containing local bacteria isolated from hospital sewages wastewater in a mineral medium containing various oils so that the culture oil was evaluated at different times and concentrations, using hemolysis, oil spill, droplet removal, emulsifying activity, and chemical oxygen demand experiments. In this study, the statistical analyses were performed based on the assessments of the control-test groups according to student's t-test.

Results: The obtained results showed that *Pseudomonas aeruginosa* bacteria had a good ability to produce biosurfactant. Reduced surface tension, more than 70% emulsification, and 85% COD (Chemical Oxygen Demand) reduction were the results of using isolated biosurfactant.

Conclusion: Based on the findings of this study, it seems that oily sewages containing high amounts of organic matters are the suitable option for producing rhamnolipid biosurfactants. Produced biosurfactants, due to the desired emulsification properties, can be used in elimination of decomposable pollutants and biodegradation processes.

Key words: Rhamnolipid Biosurfactant, Oily Wastewater, *Pseudomonas aeroginosa,* Emulsification

Funding: This research was funded by Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethicals Committee of Tarbiat Modares University, Tehran, Iran approved the study. The Ethical Code: 52د/8182

How to cite this article: Mohebrad B, Rezaee A, Dehghani S, Zamanian M, Hamedrahmat M. Feasibility of Rhamnolipid Biosurfactant Production from Oily Wastewaters by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Hospital Wastewater. *Univ Med Sci* 2018; 17(2): 143-56. [Farsi]

1- PhD Student, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0001-9967-4803

2- Professor, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0001-5042-2963

(Corresponding Author) Tel: (021)82883575, Fax: (021)82883575, E-mail: rezaee@modares.ac.ir

3- PhD Student, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0003-1652-3909

4- MSc Student, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0001-5074-5770

5- MSc Student of Microbial Technology, Faculty of Sience, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, ORCID: 0000-0002-5930-2586

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.1.2]