Arak Medical University Journal (AMUJ)
2014; 16(81): 59-74

Original Article

Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus Bacillus Cereus and antibacterial effects of biosurfactant Production in vitro

Mostafapour Rami M.J(M.Sc)[1*], Ahmady-Asbchin S(Ph.D)[1]

1- Perfesor, Cell and moulcular biology department, Faculty of Science, Mazandaran university, babolsar

Received:22 Oct 2013, Accepted: 22 Jan 2014

Abstract

Background: Biosurfactants are amphiphilic biological compounds produced extracellularly by a variety of microorganisms. Because their use in various industries is of a particular importance, the aim of this study was to identify a strain of bacteria of the genus Bacillus Cereus biosurfactant producers and investigate the antibacterial effects of their biosurfactants.

Material & Methods: To do the study, different samples of oil, water, and soil (contaminated with oil) were obtained. Measures of hemolytic activities, emulsification and surface tension were used and selected strains were identified by biochemical tests. The nature and antibacterial effect of biosurfactants produced by selected strains were assessed.

Results: In this study, 88 bacterial strains were isolated of which 24 strains had hemolytic activities, 14 strains had above 70% emulsification activities, and four strains were able to change the surface tension to less than 40 mN/m. According to biochemical tests, a strain called B. cereus 43 was identified. Investigation of its biosurfactant nature showed that the strain was a lipopeptide type. Also, the produced biosurfactant had antibacterial activity against six infectious bacteria. The most sensitive and the most resistant bacteria to the biosurfactant were S. Aureus PTCC1112 and Proteus Mirabilis ATCC 2601 respectively. Also, the results of MIC and MBC showed that in a dilution of 63 mg /ml MIC extract were mostly effective on S. Aureus PTCC1112 and S.Epidermidis ATCC2405, and in a dilution of 125mg/ml the MBC extract had the greatest effects on S. Aureus, S. Epidermidis, and Pseudomonas Aeruginosa PTCC1074.

Conclusion: As findings showed, Bacillus Cereus 43 is of high potential in reducing the surface tension and its extracted biosurfactant had high antibacterial effects. Therefore, this strain is of useful applications in biotechnology and the environmental sciences.

Keywords: Antibacterial activity, Biosurfactant, Bacillus Cereus, Surface tension

*Corresponding author:
Address: Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ilam University, Ilam, Iran
Email: javadmostafapur@yahoo.com

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 12 (شماره پیاپی 81)، اسفند 1392، 74-59

جداسازی و شناسایی باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت از جنس باسیلوس سرئوس و بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت تولیدی در شرایط آزمایشگاهی

محمد جواد مصطفی پور رمی[1*]، سلمان احمدی اسب چین[2]

1. کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
2. دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران، بابلسر

تاریخ دریافت: 92/7/30 تاریخ پذیرش: 92/11/2

چکیده

زمینه و هدف: بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات زیستی آمفی فیلیک به صورت خارج سلولی به وسیله انواع میکروارگانیسم‌ها هستند. به علت استفاده از آنها در صنایع مختلف از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. هدف از این مطالعه پژوهشی شناسایی یک سویه باکتری از جنس باسیلوس سرئوس تولید کننده بیوسورفکتانت و بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت تولید شده از آن بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پژوهشی نمونه‌های مختلف از نفت، آب و خاک آلوده به نفت تهیه شدند. فعالیت‌های همولیتیک، امولسیفیه کنندگی و اندازه‌گیری کشش سطحی استفاده و سویه انتخابی به وسیله تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شد. هم‌چنین ماهیت بیوسورفکتانت و اثرات ضد باکتریایی نیز برای سویه انتخابی بررسی شد.

یافته‌ها: در این مطالعه پژوهشی 88 سویه باکتریایی جداسازی شدند. از میان آنها 24 سویه دارای فعالیت همولیتیک بودند که از میان آنها 14 سویه فعالیت امولسیفیه کنندگی بالای70 درصد داشتند و در نهایت از میان آنها 4 سویه قادر به رساندن کشش سطحی به کمتر از 40 میلی‌نیوتن بر متر بودند. براساس تست‌های بیوشیمیایی، یک سویه انتخابی در این پژوهش به عنوان باسیلوس سرئوس 43، شناسایی و انتخاب شد. نتایج بررسی ماهیت بیوسورفکتانت مشخص شد که از نوع لیپوپپتید بود. هم‌چنین بیوسورفکتانت تولیدی دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه 6 باکتری عفونت‌زا بود. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری نسبت به تاثیر عصاره بیوسورفکتانت؛ استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس میرابیلیس می‌باشد. هم‌چنین نتایج MIC, MBC نشان داد که MIC عصاره در رقت 63 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس موثر بود و MBC عصاره در رقت 125 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و سودوموناس آئروزینوزا بیشترین اثر داشت.

نتیجه‌گیری: باسیلوس سرئوس 43؛ قابلیت بالایی در کاهش کشش سطحی و بیوسورفکتانت استخراج شده از آن دارای اثرات ضد باکتریایی بالایی است. بنابر این، دارای پتانسیل فراوانی برای کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست محیطی می‌باشد.

واژگان کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، بیوسورفکتانت، باسیلوس سرئوس، کشش سطحی

***نویسنده مسئول:** ایلام، دانشگاه ایلام، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email: javadmostafapur@yahoo.com

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات زیستی آمفی فیلیکی تولید شده به صورت خارج سلولی یا بخشی از غشاءهای سلول به وسیله انواع میگروارگانیسم‌ها هستند. بیوسورفکتانت‌ها از لحاظ تجاری به دلیل استفاده در صنایع مختلف از جمله صنعت نفت، پتروشیمی، غذایی، داروسازی- پزشکی، آرایشی، کشاورزی، نساجی، کاغذ سازی، چرم سازی و غیره از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند به همین جهت میکروارگانیسم‌های تولید کننده این ترکیبات به دلیل دارا بودن نسبت بالای سطح به حجم و ظرفیت متنوع بیوسنتیک، کاندیدای مناسبی جهت گسترش تولید بیوسورفکتانت می‌باشند(1، 2). در پزشکی حرکت سوارمینگ و تشکیل بیوفیلم اعمال مهم در کلونیزاسیون سطح به وسیله باکتری‌ها هستند و احتمال بروز عفونت‌ها را افزایش می‌دهد. بیوسورفاکتانت‌ها برای جلوگیری از چسبندگی ارگانیسم‌های بیماری‌زا به سطوح جامد یا به محل‌های عفونت، تولید شده‌اند. سورفاکتین باعث کاهش میزان تشکیل بیوفیلم به وسیله سالمونلا تیفی‌موریوم، سالمونلا انتریکا، اشریشیاکلی و پروتئوس‌میرابیلیس در پلی‌وینیل‌کلراید و هم‌چنین در سوندهای مجرای وینیل می‌شود. اخیراً، از بیوسورفکتانت ال-فرمنتوم به منظور مهار عفونت استافیلوکوکوس اورئوس و چسبندگی برای ایمپلنت‌های جراحی گزارش شده است(3). بیوسورفاکتانت‌ها کاربردهای بسیار گسترده‌ای در صنایع غذایی هم دارند. در حال حاضر، گروهی از این ترکیبات به‌عنوان افزودنی‌های مجاز مواد غذایی به کار می‌روند. برای مثال، لسیتین و مشتقات آن، استرهای اسیدهای چرب حاوی گلیسرول، سوربیتان(Sorbitan) یا اتیلن‌گلیکول و مشتقات اتیوکسیلات منوگلیسریدهای حاوی یک الیگوپپتید، در تمام دنیا به‌عنوان عوامل امولسیونه‌کننده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند(4، 5). بیوفیلم به عنوان گروهی از باکتری‌هایی‌ست که در یک سطح کلونیزه می‌شوند. بیوفیلم نه تنها شامل باکتری‌ها، بلکه توصیف همه مواد خارج سلولی تولید شده در سطح و هر نوع مواد به دام افتاده در داخل ماتریکس می‌باشد. مرحله اول در ایجاد بیوفیلم چسبندگی باکتریایی است که تحت تاثیر فاکتورهایی از جمله گونه‌های میکروارگانیسم، آبگریزی سطح و بارهای الکتریکی درگیر، شرایط محیطی و توانایی میکروارگانیسم‌ها برای تولید پلیمرهای خارج سلولی که در اتصال سلول ها به سطوح کمک می‌کند است(6). بیوفیلم در حال حاضر در سطوح صنایع غذایی منابع مهم آلودگی است، که ممکن است منجر به فساد مواد غذایی و انتقال بیماری شود. با توجه به این واقعیت که نگه دارنده‌ای مواد غذایی دارای سطح تحمل صفر برای پاتوژن مانند سالمونلا و هم‌چنین در بسیاری از کشورها برای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز هستند، سلول‌های چسبنده منفرد ممکن است به طور قابل توجهی به صورت بیوفیلم به خوبی گسترش یابند، در نتیجه کنترل چسبندگی میکروارگانیسم‌ها به سطوح در تماس با مواد غذایی یک مرحله اساسی در فراهم آوردن ایمنی و محصولات با کیفیت به مصرف‌کنندگان است از این رو، دخالت بیوسورفکتانت‌ها در چسبندگی میکروبی و جدا شدن از سطوح مورد بررسی قرارگرفته است(6). سورفاکتانت منتشرشده به وسیله استرپتوکوکوس ترموفیلوس برای کنترل زنگ زدگی صفحات مبدل حرارتی در پاستوریزه کردن استفاده می‌شود که کلونیزاسیون گونه‌های دیگر گرما دوست استرپتوکوک‌ها که مسئول زنگ زدگی هستند را به تاخیرمی‌اندازد(6). لذا هدف از این مطالعه پژوهشی، جداسازی و شناسایی یک سویه باکتری از جنس باسیلوس سرئوس تولید کننده بیوسورفکتانت و بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت تولید شده از آن بر روی رشد شش باکتری گرم مثبت و گرم منفی با

استفاده از روش انتشار در آگار(Disk diffusion) به کمک دیسک مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، نمونه‌ها از منابع مختلف از جمله نفت خام نفت شهر کرمانشاه(چاه 25)، آب و خاک‌های آلوده به نفت نواحی اطراف مخازن نفتی جمع آوری شدند. برای نمونه‌گیری از شیشه‌های در پوش‌دار استریل استفاده شد.

پس از انجام نمونه‌گیری و ارسال به آزمایشگاه 5 میلی‌لیتر از نمونه آب و 5 گرم از نمونه خاک آلوده به نفت در 95 میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تقویت شده(Strenghted Nutrient Broth) در داخل ارلن مایر 250 میلی‌لیتر تلقیح و در دمای 30 درجه به مدت72 ساعت شیکر(150rpm) و گرم خانه‌گذاری شدند (7، 8). محیط نوترینت براث تقویت شده استفاده شده در این تحقیق محتوای 500 میلی‌لیتر نوترینت براث و 500 میلی‌لیتر محلول نمک معدنی(Mineral Salt Solution) می‌باشد. محلول نمک معدنی استفاده شده در این مطالعه تجربی در هر لیتر آب مقطر محتوای: 2 گرم KH_2PO_4، 5 گرم K_2HPO_4، 3گرم $(NH_4)_2SO_4$، 0/1 گرم Nacl، 0/01گرم $FeSO_4.7H_2O$، 0/01 گرم $CaCl_2.2H_2O$، 2گرم $MgSO_4.7H_2O$، 0/002 گرم $MnSO_4.7H_2O$، 0/25گرم $CuSO_4.5H_2O$، 0/24گرم $ZnSO_4.7H_2O$، 0/03 درصد گلوکز و 0/03 درصد عصاره مخمر(Yeast extract)، به pH=7.2 تنظیم شد. پس از آن از این محیط از 10^{-1} تا 10^{-6} در فسفات بافر سالین رقت‌های متوالی تهیه گردید و سپس هر رقت در محیط کشت نوترینت آگار تقویت شده (Strenghted Nutrient Agar) (1,2 نوترینت براث تقویت شده همراه با 2 درصد آگار) به صورت پورپلیت(Pour Plate) کشت داده شد اما به منظور افزایش دادن تعداد باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت برای نمونه نفت ابتدا 1 میلی‌لیتر نفت خام در99 میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تقویت شده در داخل ارلن مایر 250 کشت داده شد و همین طور 1 میلی‌لیتر نفت فیلتر شده نیز به همراه 99 میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تقویت شده به عنوان شاهد قرار داده شد. هر دو ارلن در دمای 30 درجه به مدت 2 ساعت شیکر و گرم‌خانه گذاری شدند(150rpm). پس از 2 ساعت از کشت مورد نظر رقت‌های متوالی تهیه شد اما برای رقت‌سازی به جای بافر فسفات سالین از نوترینت براث تقویت شده استفاده شد و از هر رقت در محیط کشت نوترینت آگار تقویت شده به صورت پورپلیت کشت داده شد و از محیط‌های گلوکز عصاره مخمر آگار(Glucose Yeast extract Agar) جهت جداسازی سایر باکتری‌ها و از محیط مکانکی آگار، ائوزین متیل بلو آگار(EMB)، اندو آگار جهت جداسازی باکتری‌های گرم منفی از گرم مثبت استفاده شد. تمام پلیت‌ها در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند(9، 10).

اولین تست غربال‌گری برای شناسایی و جداسازی باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت تست همولیز است. تک کلنی‌های تازه از تمام کشت‌های خالصی به دست آمده بودند بر روی آگار خوندار به طور خطی کشت داده شدند و به مدت 72 ساعت در دمای30 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند(7، 11).

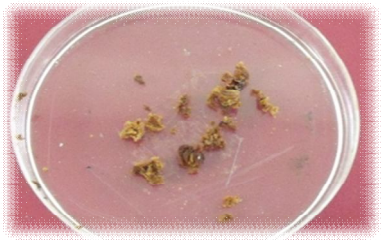
برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی هر کدام از کلنی جدا شده از غربال‌گری اولیه در لوله آزمایش محتوای 3 میلی‌لیتر محیط محلول نمک معدنی به مدت 48ساعت کشت داده شد پس از تلقیح دو کلنی در هر محیط، به میزان 10 درصد هیدروکربن(نفت خام) به لوله اضافه و پس از مخلوط کردن با دستگاه ورتکس به مدت 1 دقیقه در دمای 30 درجه به مدت 3 روز گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از گرم‌خانه‌گذاری لوله‌ها خوب با ورتکس مخلوط و در ادامه ضخامت لایه نفت امولسیفیه شده به صورت زیر محاسبه شد(9، 11).

EC=طول کل ستون مایع / طول لایه امولیسیفیه شده × 100

برای اندازه‌گیری کشش سطحی نیز از دستگاه کشش سنج کرواس کلات(Tensiometer-Kruess Klot) استفاده شد. بدین منظور یک کلنی از کشت خالص هر یک از سویه‌های جدا شده از غربال‌گری ثانویه به محیط کشت نوترینت براث تلقیح گردید، پس از آن که جذب نوری کشت مذکور در طول موج 620 نانومتر به 0/9-0/8 آنگسترم رسید، از آن به عنوان مایع تلقیح استفاده شد. 1 میلی‌لیتر از کشت مذکور به 100 میلی‌لیتر محیط محلول نمک معدنی و 1 درصد نفت فیلتر شده به عنوان منبع هیدروکربن اضافه شد. مخلوط همراه با نمونه شاهد در دمای 30 درجه در 150 دور در دقیقه به مدت 3 روز گرم‌خانه‌گذاری شد(9، 11).

خصوصیات سویه انتخابی تولید کننده بیوسورفکتانت به واسطه تست‌های مختلف تعیین شده بود. این تست‌ها شامل: خصوصیات ظاهری کلنی‌ها، رنگ آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، تست کاتالاز، اکسیداز، سیترات، تریپل شوگر آیرون آگار(Triple Sugar Iron Agar)، سولفید تحرک اندول(Sulfide Indole Motility)، متیل رد- وجس پروسکوآر(Methyl Red- Voges Proskauer) اوره آز، احیا نیترات و هم‌چنین الگوی مقاومت سویه‌های انتخابی به 16 آنتی بیوتیک جنتامایسین(10 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، کلینداماسین(2 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، متی سیلین(5 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، آمپی‌سیلین(10 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین(10 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اکسی‌تتراسایکلین(30 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سیپروفلوکساسین(5 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ونکومایسین (3 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اپی پنم(10 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اریترومایسین(15 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، باسیتراسین(0/04 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اگزاسیلین(1 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، نالیدیکسیک اسید(30 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سفی پیم(30 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، کلرامفنیکل(30 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، پنی سیلین(10 میکروگرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت.

برای استخراج بیوسورفکتانت کلونی سویه انتخابی به ارلن 1000 میلی‌لیتری محتوای 500 میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث تلقیح، سپس با اضافه کردن 10 میلی‌لیتر n-هگزان به عنوان منبع هیدروکربن، مخلوط در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 روز با شیکر 150 دور در دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد. پس از آن سلول‌های باکتری به وسیله سانتریفیوژ در 5000 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه حذف و مایع‌رویی جمع‌آوری شد. pH مایع با استفاده از اسید سولفوریک 1 مولار به 2 تنظیم شد و بعد از آن به حجم برابر کلروفرم و متانول(1:2) اضافه شد. سپس فاز آلی مجزا شده و حلال در آون و در دمای 60 درجه تبخیر گردید. فرآورده نهایی به رنگ قهوه‌ای تیره و قوام چرب به عنوان بیوسورفکتانت خام به دست آمد(شکل 1). بیوسورفکتانت خشک به دست آمده از هر سویه وزن شد و از آنها رقت‌های متوالی شامل 1000، 500، 250، 125 و 63 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در 1 میلی‌لیترحلال دی متیل سولفوکساید(DMSO) تهیه شد رقت‌های هر بیوسورفکتانت جهت بررسی‌های ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت(7).



شکل 1. عصاره بیوسورفکتانت خام به دست آمده از باسیلوس سرئوس 43 انتخابی

برای تعیین وزن خشک بیوسورفکتانت‌ها پلیت استریل را گرفته و وزن پلیت‌ها اندازه‌گیری شد، رسوب حاصل از استخراج بر روی پلیت‌ها ریخته شد سپس پلیت‌ها در آون در دمای 100 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه قرار داده شد پس از خشک کردن، پلیت‌ها وزن شد. وزن خشک بیوسورفکتانت‌ها به وسیله فرمول زیر محاسبه شد(7).

وزن پلیت خالی - وزن پلیت پس از خشک کردن = وزن خشک بیوسورفکتانت

یکی از روش‌های اطمینان از حضور بیوسورفکتانت در محیط، کروماتوگرافی لایه نازک است. پس از استخراج بیوسورفکتانت، 500 میلی‌گرم از بیوسورفکتانت خام را در 1000 میلی‌لیترآب دیونیزه شده مخلوط و سپس 10 میکرولیتر از آن بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک بارگذاری شد. سیستم حلال مورد استفاده شامل: کلروفرم/ متانول/ اسید استیک/ آب (25:15:4:1 V/V/V/V) بود. صفحه کروماتوگرافی لایه نازک آماده، در داخل تانک حاوی حلال قرار گرفت سپس صفحه کروماتوگرافی لایه نازک بعد از خشک شدن زیر UV قرار داده شد تا ببینیم واکنش انجام شده است یا نه، اگر واکنش انجام شده کروماتوگرام را با معرف‌های نین هیدرین (Ninhydrin) (0/5 گرم در 100 میلی‌لیتر استون بدون آب) برای کشف بخش‌های لیپیدی به عنوان نقاط قهوه‌ای و معرف آنترون(Anthrone) (1 گرم در 5 میلی‌لیتر اسید سولفوریک ترکیب شده با 95 میلی‌لیتر اتانول) برای کشف بخش‌های کربوهیدراتی به عنوان نقاط زرد اسپری می‌نماییم(7، 9، 12).

سویه‌های استاندارد باکتری‌های مورد آزمایش در این مطالعه تجربی ازگروه میکروب شناسی موسسه سرم سازی رازی کرج و کلکسیون میکروب‌شناسی تهران به نام‌های استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112، اشریشیاکلی PTCC 1330، سودوموناس آئروژینوزا PTCC 1074، استافیلوکوکوس اپیدرمیس ATCC 2405، پروتئوس میرابیلیس ATCC 2601 و سالمونلا تیفی موریوم ATCC 1679 تهیه شد.

از تمام سویه‌ها در سرم فیزیولوژی سدیم کلراید 0/9 درصد سوسپانسیون میکروبی تهیه شد به این صورت که برای هر سری آزمایش کشت تازه 24 ساعته تهیه شد برای این کار یک لوپ از هر میکروب در 5 سی سی سرم فیزیولوژی فوق تلقیح شد. جذب نوری سوسپانسیون میکروبی با دستگاه اسپکترفتومتری در طول موج 620 به 0/08 تا 0/1 آنگسترم تنظیم شد، سپس از این سوسپانسیون میکروبی برای تلقیح در محیط کشت مولر-هینتون آگار استفاده گردید.

برای تعیین حساسیت کیفی و کمی از سوسپانسیون تهیه شده استفاده شد در روش کیفی از انتشار در آگار به شیوه کربی بائر(Kirby Bauer) استفاده شد که طی آن از سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده به روش سفره‌ای در سطح محیط کشت مولرهینتون آگار(Muller hinton agar) کشت انجام شد و سپس برای بررسی خواصی ضد باکتریایی، دیسک‌های کاغذی بلانک(ساخت پادتن طب) با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی آگار قرار داده شد و حدود 20 میکرولیتر از غلظت‌های حاوی 1000، 500، 250، 125 و63 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محلول دی متیل سولفوکساید، روی دیسک‌ها اضافه شد. از دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین با غلظت 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس محیط‌های کشت حاوی باکتری‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله‌های تشکیل شده در اطراف صفحه‌ها، نتایج مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آنتی بیوتیک را با جداول؛ موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی(Clinical and Laboratory Standards Institute) مقایسه شده است جهت حصول اطمینان از هر یک از غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت و آنتی بیوتیک این آزمایش‌ها برای هر سویه باکتریایی سه بار تکرار شد. هم‌چنین آزمایش‌های کمی برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده بیوسورفکتانت‌ها انجام شد. به این ترتیب آزمایش حداقل غلظت مهارکننده در پلیت 96 خانه استریل و با

روش براث میکرودایلوشن انجام شد. ابتدا ازمولر هینتون براث (مرک آلمان) 100 میکرولیتر داخل چاهک‌های مربوط به رقت‌های مورد نظر میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک 100 میکرولیتر عصاره بیوسورفکتانت اضافه گردید و از خانه دوم و سوم به همین ترتیب تا خانه ششم رقیق شدند. درآخر به همه چاهک‌ها 100 میکرولیتر سوسپانسیون رقیق شده(نوترینت براث) معادل لوله نیم مک فارلند اضافه گردید بعد از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کف پلیت زیر نور در آینه مشاهده شد. خانه کنترل اسانس، محیط کشت و میکروب نیز جداگانه منظور شد. وجود کدورت را که نشان دهنده رشد یا عدم رشد باکتری است، درجدول مخصوص یادداشت شد. طبق تعریف اولین چاهک بدون کدورت(رقیق‌ترین) به عنوان حداقل غلظت مهارکننده قرار داده شده است. هم‌چنین آزمایش حداقل غلظت کشندگی با توجه به نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد. از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها کاملا متوقف شده بود با سوآپ استریل نمونه برداری و روی محیط کشت نوترینت آگارکشت داده و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از 24 ساعت کم‌ترین غلظتی از عصاره بیوسورفکتانت که باکتری در آن رشد نکرده به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شدند(13).

بنابر این بررسی خواص ضد باکتریایی در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم افزار SAS در سطح 1 درصد و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه دانکن در سطح 5 درصد استفاده شد.

یافته‌ها

در نهایت در این مطالعه تجربی، از نمونه‌ها بعد از سپری شدن مراحل غنی سازی، رقت تهیه شده و بر روی محیط کشت‌های اختصاصی کشت داده شدند. در نتیجه نمونه‌ها از نفت خام، خاک و آب آلوده به نفت تهیه شده بودند، که بر اساس مشخصات ظاهری و صفات کلنی‌ها، 88 سویه باکتریایی مختلف جداسازی گردیدند در این روش به علت خالص بودن کشت‌ها، میزان آلودگی‌های قارچی تا حد زیادی کاهش پیدا می‌کند، چون تنها سویه‌هایی که بر روی محیط کشت اختصاصی خالص‌سازی شده‌اند، مورد استفاده قرار گرفتند.

تمام سویه‌های جدا شده در مرحله قبل، برای بررسی فعالیت همولیتیک بر روی محیط کشت بلادآگار کشت داده شدند. از بین 88 سویه جداسازی شده، تنها 24 سویه دارای فعالیت همولیز بتا بودند در نتیجه سویه‌هایی که دارای همولیز بتا بودند به عنوان فعالیت همولیتیک مثبت در نظرگرفته و برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

نتایج حاصل از فعالیت امولسیفیه کنندگی کشت سویه‌های غربال شده از مرحله قبل با هیدروکربن نفت نشان داد که از میان 24 سویه حاصل از غربال‌گری اولیه، 14 سویه توانایی امولسیفیه کنندگی 70 درصد یا بیشتر را داشتند که این سویه‌ها برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند.

کشش سطحی یکی از معیارهای نشان دهنده تولید مواد فعال سطحی در محیط است کشش سطحی شاهد محیط کشت فاقد باکتری 72 میلی نیوتن بر متر بود. در این مرحله با توجه به نتایج غربال‌گری اول و دوم 14 سویه برای اندازه‌گیری کشش سطحی انتخاب شدند از بین 14 سویه تست شده تنها سویه‌های 43، 47، 83 و 88 قادر به کم کردن کشش سطحی تا کمتر از 40 میلی‌نیوتن بر متر هستند(10، 19). البته هر 4 سویه متعلق به نمونه نفت بودند.

اما در این مطالعه تجربی یکی از باکتری‌های تولیدکننده بیو سورفکتانت به نام سویه 43 که دارای کاهش کشش سطحی زیر 40 میلی نیوتن بر متر بود بر اساس تست‌های بیوشیمیایی مطابق با جدول 1 و طبقه‌بندی ارائه شده در چاپ هشتم کتاب برگی، سویه جدا شده تا حد امکان تعیین هویت شد به این ترتیب سویه

c.f. Bacillus. Cereus؛43 نام گذاری و برای استخراج بیوسورفکتانت انتخاب شد.

هم‌چنین وزن خشک بیوسورفکتانت بر اساس فرمول فوق 0/284 گرم بود:(48/98- 49/264=0/284) با قرار دادن صفحه کروماتوگرام در سیستم حلال، جا به جایی لکه‌ها زیر UV بررسی شد که نمونه تشکیل لکه بزرگ و مشخصی بر روی TLC صفحه کروماتوگرام دادند که زیر UV به صورت لکه صورتی رنگ مشاهده شدند. هم‌چنین با اسپری معرف نین هیدرین بر روی صفحه لکه لیپیدی به رنگ قهوه‌ای در سویه انتخابی مشاهده شد اما با اسپری معرف آنترون، لکه زرد در سویه باسیلوس سرئوس 43 دیده نشد که وجود بخش کربوهیدراتی را در این سویه نشان می‌دهد.

جدول 1. خصوصیات بیوشیمیایی سویه انتخابی تولیدکننده بیوسورفکتانت

خصوصیات	43	الگوی مقاومت	43
مورفولوژی سلول	باسیلی	جنتامایسین	-
واکنش گرم	+	کلیندامایسین	+
تشکیل اسپور	+	متی سیلین	+
کاتالاز	+	آمپی سیلین	+
اکسیداز	-	استرپتومایسین	-
حرکت	-	اکسی تتراسایکلین	-
اندول	-	سیپروفلو کساسین	-
H_2S	-	ونکومایسین	-
متیل رد	+	اریترومایسین	-
وجس- پروسکوآر	-	باسیتراسین	+
گلوکز	+	اگزاسیلین	+
لاکتوز	-	نالیدیکسیک اسید	-
اوره آز	-	سفی پنم	+
سیترات	-	کلرامفنیکل	-
احیای نیترات	+	پنی سیلین	+
پیگمان	-	اپی پنم	-

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط (جدول 2) نشان دادند که اثر باکتری و رقت‌های مختلف و هم‌چنین اثر متقابل بین باکتری و رقت بیوسورفکتانت مورد آزمایش در سطح یک درصد معنادار ($p<0/01$) می‌باشند.

آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که اولاً تفاوت بین میانگین‌های قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت برای شش باکتری مختلف در سطح پنج درصد معنادار است($p<0/05$) (جدول 2). هم‌چنین بررسی قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت بر روی هر باکتری و سپس مقایسه باکتری‌ها با هم نشان داد که حساس‌ترین باکتری نسبت به تاثیر عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43؛ استافیلوکوکوس اورئوس بود. و مقاوم‌ترین باکتری در برابر عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43؛ پروتئوس میرابیلیس می‌باشد(جدول 3).

آنالیز داده‌ها نشان داد که رقت1000 میلی گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس داشته است که تفاوت آن با هم معنی‌دار نبود ولی تفاوت آنها با دیگر باکتری‌ها معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی برای رقت 1000 میلی گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 به ترتیب بر سالمونلا تیفی موریوم، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی و پروتئوس میرابیلیس اثر داشت که تفاوت آنها نیز با هم معنی دار بود(جدول 4).

جدول 2. نتایج تجزیه واریانس بیوسورفکتانت به دست آمده از باسیلوس سرئوس 43

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	5	259/14**
رقت	5	544/25**
باکتری*رقت	25	15/ 71**
خطا	72	0/138
کل	107	
(ضریب تغییرات)	2/27	

** معنی دار

جدول 3. مقایسه میانگین بین باکتری‌ها متاثر از رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43

سویه باکتری	میانگین
اشریشیا کلی	13/16 E
استافیلوکوکوس اورئوس	21/05 A
استافیلوکوکوس اپیدرمیس	19/61 B
پروتئوس میرابیلیس	11 F
سالمونلا تیفی موریوم	16/55 D
سودوموناس آئروژینوزا	17 C

آنالیز داده‌ها نشان داد که رقت 500 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس داشته که تفاوت آنها با هم معنی‌دار نبود ولی با دیگر باکتری‌ها معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بر سالمونلا تیفی موریوم و سودوموناس آئروژینوزا وجود داشت که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ولی تفاوت آنها با استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس و هم‌چنین اشریشیاکلی و پروتئوس میرابیلیس معنی داری بود(جدول 4).

آنالیز داده‌ها نشان داد که رقت 250 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر استافیلوکوکوس اورئوس داشت که تفاوت آن با دیگر باکتری‌ها معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر استافیلوکوکوس اپیدرمیس، سالمونلا تیفی موریوم، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی و پروتئوس میرابیلیس داشت که تفاوت آنها به جز در دو باکتری؛ سالمونلا تیفی موریوم و سودوموناس آئروژینوزا با هم معنی‌دار بود(جدول 4).

آنالیز داده‌ها نشان داد که رقت 125 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر استافیلوکوکوس اپیدرمیس داشت که تفاوت آن با دیگر باکتری‌ها معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی را عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بر استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس‌آئروژینوزا که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند داشت ولی تفاوت آنها با سالمونلا تیفی موریوم و هم‌چنین اشرشیاکلی و پروتئوس میرابیلیس که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند معنی‌دار بود(جدول 4).

آنالیز داده‌ها نشان داد که اثر بازدارندگی رقت63 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 در مورد استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از سایر باکتری‌ها می‌باشد که تفاوت آن با باکتری‌ها دیگر معنی‌دار بود پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی بر استافیلوکوکوس اپیدرمیس، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی موریوم وجود داشت که تفاوت آنها با هم و هم‌چنین با اشرشیاکلی و پروتئوس میرابیلیس که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند معنی‌دار بود(جدول 4).

جدول 4. مقایسه میانگین و انحراف معیار قطر هاله‌های ممانعت از رشد(بر حسب میلی‌متر) شش باکتری مختلف حاصل تأثیر رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 و آنتی بوتیک

باکتری	رقت	میانگین ±انحراف معیار	باکتری	رقت	میانگین ±انحراف معیار
اشریشیاکلی	1000	18/33 ^{i}±0/57		1000	12/66 ^{no}±0/57
	500	14 ^{m}±0		500	10/33 ^{pq}±0/57
	250	13/33 ^{mn}±0/57		250	9 ^{r} ±0
	125	8 ^{s} ±0	پروتئوس میرابیلیس	125	8/33 ^{rs} ±0/57
	63	6 ^{t}±0		63	6^{t} ±0
	جنتامایسین	19/33 ^{h}±0/57		جنتامایسین	19 /33 ^{h}±0/57
استافیلوکوکوس اورئوس	1000	28/66 ^{a}±0/57		1000	22/33 ^{e}±0/57
	500	25 ^{bc}±0		500	18^{ij} **±0**
	250	23/33 ^{d}±0/57	سالمونلا تیفی موریوم	250	17 ^{k} **±0**
	125	13 ^{n}±0		125	11^{p} **±0**
	63	11 ^{p}±0		63	8 ^{s} **±0**
	جنتامایسین	25/33 ^{b}±0/57		جنتامایسین	23de **±0**
استافیلوکوکوس اپیدرمیس	1000	28 ^{a} ±0		1000	21/33 ^{f}±0/57
	500	24/33 ^{c}±0/57		500	18 ^{ij} **±0**
	250	19 ^{hi} ±0	سودوموناس آئروژینوزا	250	17^{k} **±0**
	125	16 ^{l} ±0		125	13^{n} **±0**
	63	10 ^{q}±0		63	9 ^{r} **±0**
	جنتامایسین	20/33 ^{g}±0/57		جنتامایسین	23/66 ^{cd}±0/57

حروف مشابه بیان کننده عدم وجود اختلاف معنی دار است

برای مقایسه تأثیر ضد باکتریایی بیوسورفکتانت در رقت‌های مختلف با تاثیر بازدارنده آنتی بوتیک‌ها، تجزیه تحلیل آماری داده‌ها طبق جدول 5 نشان داد که در مورد باکتری اشریشیا کلی اثر بازدارنده رقت 1000 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43، از تمام آنتی بیوتیک‌های موثر بر این باکتری کمتر ولی از آنتی بیوتیک اریترومایسین موثر بر این باکتری بیشتر است.

در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تاثیر بازدارنده رقت 1000 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 به طور معنی‌داری بیشتر از آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، کلیندامایسین، اگزاسیلین، وانکومایسین و نالیدیکسیک اسید موثر بر این باکتری بود اما نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تاثیرگذار دیگر از جمله آمپی‌سیلین، اکسی‌تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، اپی‌پنم وسفی‌پیم اثر بازدارندگی کمتری را نشان داد.

در مورد باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیس، اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین بیشتر ولی نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین اثر مشابه‌ای و نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، کلرامفنیکل، سفی‌پیم، اریترومایسین و اپی‌پنم موثر بر این باکتری کمتر موثر بودند(جدول 4، 5).

جدول 5. اثرات ضد باکتری آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی شش باکتری مختلف(میلی‌متر)

سویه باکتری / آنتی بیوتیک	اشرشیاکلی	استاف اورئوس	استاف اپیدرمیس	پروتئوس میرابیلیس	سالمونلا تیفی موریوم	سودوموناس آئروژینوزا
کلیندامایسین	12/33 R	23 S	6 R	6 R	17/66 S	6 R
متی سیلین	6 R	15/66 R	6 R	6 R	6 R	6 R
آمپی سیلین	6 R	30/33 S	6 R	6 R	9/33 R	6 R
استرپتومایسین	12/66 R	12/66 R	6 R	11 R	9/33 R	10/33 R
اکسی تتراسایکلین	25 S	32/33 S	6 R	6 R	22/66 S	20 S
سیپروفلوکساسین	35/33 S	35/33 S	28/33 S	25 S	26/33 S	35/33 S
وانکومایسین	6 R	20/33 S	6 R	6 R	6 R	6 R
اپی پنم	35 S	33/66 S	30 S	31 S	38/33 S	33/66 S
اریترومایسین	15 I	6 R	33/66 S	6 R	12/66 R	6 R
باسیتراسین	6 R	16/33 R	6 R	6 R	6 R	6 R
اگزاسیلین	6 R	22/66 S	6 R	6 R	6 R	6 R
نالیدیکسیک اسید	10/33 R	14/33 I	10/33 R	6 R	28 S	12/33 R
سفی پیم	28/33 S	31/33 S	30 S	30 S	34/33 S	29/33 S
کلرامفنیکل	13 R	13 R	31/33 S	12 R	31 S	6 R
پنی سیلین	6 R	6 R	34/33 S	25/66 S	21/33 I	10 R

R: Resistant, I: Intermediate/moderatelysusceptible, S: Susceptible

در مورد باکتری پروتئوس میرابیلیس تاثیر بازدارنده رقت 1000 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر این باکتری شامل سیپروفلوکساسین، اپی پنم، سفی‌پیم و پنی‌سیلین اثر بازدارندگی کمتر مشاهده شد و همین طور نسبت به جنتامایسین هم بیوسورفکتانت تولیدی کمتر موثر بودند.

برای باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم، اثر بازدارندگی رقت 1000 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 از کلیندامایسین، پنی‌سیلین به طور معنی‌داری بیشتر و با اکسی‌تتراسایکلین مشابه ولی اثر آن نسبت به سیپروفلوکساسین، اپی‌پنم، سفی‌پیم و کلرامفنیکل کمتر بود.

در مورد باکتری سودوموناس آئروژینوزا تاثیر بازدارنده رقت 1000 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 نسبت به اکسی‌تتراسایکلین بیشتر ولی از تمام آنتی‌بیوتیک‌های موثر و مورد آزمایش کمتر و معنی‌دار بود(جدول4، 5).

همان گونه که نتایج این پژوهش نشان داد، عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌باشد که این خصوصیت بسته به رقت بیوسورفکتانت و جنس باکتری متفاوت می‌باشد. به طوری که برحسب تجزیه تحلیل آماری داده‌ها مطابق با جداول 3 و 4 نشان داد که بیش‌ترین اثر بازدارندگی رقت‌های مختلف عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس وکم‌ترین اثر این عصاره بیوسورفکتانت بر روی باکتری پروتئوس میرابیلیس بود.

بحث

در این مطالعه تجربی؛ باکتری باسیلوس سرئوس 43 با قابلیت تولید ترکیبات بیوسورفکتانتی در دوره زمانی کوتاه و توانایی مصرف نفت خام، هگزان، به عنوان تنها منبع کربن و انرژی جداسازی و شناسایی شد. بیشتر باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت از نفت خام، آب و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی جدا شده اند.

هم‌چنین عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس43 بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس، در رقت 125 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برروی باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم و در رقت 500 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری پروتئوس میرابیلیس اثر باکتریواستاتیکی داشت ولی اثر باکتریوسیدالی عصاره بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس در رقت 125 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، برای باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم در رقت 250 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری پروتئوس میرابیلیس در رقت 1000 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. در مورد باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی به ترتیب رقت 125 و 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره این بیوسورفکتانت برروی این باکتری‌ها هم اثر باکتریواستاتیکی و هم اثر باکتریوسیدالی داشت(جدول 6).

جدول 6. تعیین میزان حداقل غلظت مهارکننده رشدMIC حداقل غلظت کشنده رشد MBC بیوسورفکتانت‌ها بر روی شش باکتری مختلف(میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

بیوسورفکتانت‌ها	سویه باکتری	MIC	MBC
	اشریشیا کلی	125	500
	استاف اورئوس	125	125
باسیلوس سرئوس	استاف اپیدرمیس	63	125
43	پروتئوس میرابیلیس	250	500
	سالمونلا تیفی موریوم	250	500
	سودوموناس آئروژینوزا	125	500

در مطالعه‌ای که در بلغارستان توسط تانکووا و همکاران انجام گرفت نیز جداسازی میکروارگانیسم‌ها از مناطق آلوده(آب‌های آلوده به پساب‌های نفتی) گزارش گردیده است(15). اوکرنتوگبا و ازرونی باکتری‌های تجزیه کننده نفت از آب‌های آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه را جداسازی نمودند(16). بولا در نیجریه از ترکیبات ماسه‌ای همراه با نفت سنگین که به صورت کلوخ درآمده بودند باکتری‌هایی جداسازی کرد که در تجزیه نفت خام بسیار موثر عمل می‌کردند. این باکتری‌ها بیشتر از جنس سودوموناس بودند. از آن جایی که

باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت در تجزیه نفت موثرتر عمل می‌کنند، لذا از بین باکتری‌های جدا شده سویه‌های مولد بیوسورفکتانت انتخاب شدند(17). با این وجود همکاران میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت بالای تولید بیوسورفکتانت را از آب و خاک‌های غیرآلوده به هیدروکربن‌های نفتی و فلزات جداسازی نموده‌اند(14). این گزارشات بیان‌گر توزیع وسیع میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت در انواع اکوسیستم‌های آبی و خاکی و حتی غیرآلوده به ترکیبات هیدروکربنی می‌باشد.

در مطالعاتی که با هدف جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت از منابع محیطی انجام شده معمولاً از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان معیاری برای جداسازی اولیه سویه‌های مولد بیوسورفکتانت استفاده شده است(11). به طوری که در مطالعاتی مشابه که طباطبایی در سال 2005 و آناندارج در سال 2010 برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت انجام دادند از فعالیت همولیتیک برای جداسازی اولیه استفاده شد(7، 10).

با توجه به بررسی‌های انجام شده، راه دیگر غربال‌گری فعالیت امولسیون‌سازی است. فعالیت امولسیفیه‌کنندگی یک امولسیفایر به تمایل آن نسبت به سوبسترای هیدروکربنی استفاده شده برای اندازه‌گیری EC بستگی دارد. نتایج آزمایش امولسیون‌سازی(E24) به دست آمده برای سویه‌های غربال شده از مرحله قبل مطابق جدول 1 بود. نتایج به دست آمده در این مطالعه تجربی، از نتایج گزارش شده در مطالعات مشابه توسط بودوئر و همکاران(4)، فرنسی و همکاران(9) و بیکا وهمکارانش(18)، بهتر و چشمگیرتر است. اما یکی دیگر از فعالیت‌های غربال‌گری کشش سطحی‌ست از آن جایی که کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهم‌ترین و اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت محسوب می‌شود به همین دلیل در این مطالعه تجربی؛ پس از غربال‌گری اول و دوم و کاهش تعداد سویه‌های باکتری انتخاب شده، از این آزمایش برای بررسی و تائید توان این سویه‌ها در تولید بیوسورفکتانت استفاده شد. مطالعات مشابهی در این زمینه توسط بنت در سال 1991 و طباطبایی در سال 2005 برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت انجام شد(10، 19). اما یکی از قابلیت‌های جالب توجه باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، توانایی آنها در ازدیاد برداشت میکروبی نفت از مخازن نفتی است. ازدیاد برداشت میکروبی نفت یک روش ثالثیه ازدیاد برداشت است که علی‌رغم برخوردار بودن از قدمت و سابقه تاریخی طولانی به تازگی مورد توجه فراوان قرار گرفته است. مکانیسم‌هایی که برای ازدیاد برداشت نفت به وسیله میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد شده‌اند بسیار پیچیده، متنوع و فراوان هستند اما بدون شک تولید بیوسورفکتانت و کم کردن کشش سطحی و کاهش قدرت موبینگی یکی از دلایل اصلی افزایش تولید نفت توسط میکروارگانیسم‌ها به شمار می‌رود(1، 20).

علاوه بر این، در آنالیز عصاره حاصل از کشت سویه باسیلوس سرئوس 43، لکه به دست آمده بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک در اثر اسپری با معرف نانیهیدرین، تولید رنگ قهوه‌ای می‌کرد که نشان می‌دهد که عصاره بیوسورفکتانت سویه حاوی ترکیب لیپیدی است. در مطالعه‌ای که توسط طباطبایی و همکاران در سال 2005، آناندارج و همکاران و روسا و همکاران در سال 2010 انجام شده، ماهیت بیوسورفکتانت که به وسیله آنها جداسازی شده بود نیز کاملاً مشابه با نتایج حاصل از سویه باسیلوس سرئوس 43، گزارش شده است(7، 10 و 20).

اما یکی دیگر از کاربردهای بیوسورفکتانت‌ها فعالیت ضدمیکروبی آنها است. هر روزه مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها بیشتر می‌شود. تحقیق در مورد کشف مواد جدید با خواص ضدمیکروبی قوی‌تر همپای افزایش مقاومت در باکتری‌ها رو به گسترش است و از این رو بیوسورفاکتانت یک جایگزین مناسب برای داروهای ترکیبی هستند و عوامل ضد میکروبی و عوامل موثر درمانی یا پروبیوتیک به عنوان ایمنی(بی‌خطر) به خصوص در زمانی که مقاومت در برابر داروها در میان ارگانیسم‌ها برای بسیاری از بیماری‌های تهدیدکننده زندگی رو به افزایش است می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. که به عنوان یک انتخاب مناسب برای این نوع تحقیقات به شمار می‌روند. بیوسورفکتانت‌ها با اثرات ضدمیکروبی بر روی طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌ها و هم‌چنین قابلیت مصارف غذایی آنها در برخی موارد وکمتر بودن اثرات جانبی آنها نسبت به آنتی بوتیک‌های رایج می‌توانند در برخی موارد جایگزین آنتی بیوتیک‌ها شوند(21).

در راستای بررسی اثرات ضدمیکروبی بیوسورفکتانت‌ها، اثرات ضدباکتریایی بیوسورفکتانت که در مصارف غذایی و آرایشی و بهداشتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد، بر روی شش باکتری مختلف عفونت زا به ویژه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که هم ایجاد کننده مسمومیت‌های غذایی و هم یکی از باکتری‌های مهم در ایجاد عفونت‌هاست همچنین بر روی سودوموناس آئروژینوزا که از مقاوم‌ترین باکتری‌ها و بیماری‌زاست مورد ارزیابی قرار گرفتند به این صورت که بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بر رشد پروتئوس میرابیلیس و اشریشیاکلی اثر مهارکنندگی و کشندگی داشت که نشان دهنده اثر آنتی‌باکتریال قوی این بیوسورفکتانت به این باکتری‌ها می‌باشد همین طور بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس 43 بر استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، سالمونلا تیفی موریوم، سودوموناس آئروژینوزا هم اثر باکتریوسیدال و هم باکتریواستاتیک داشت که اعداد نزدیک به هم MBC و MICنیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال بیوسورفکتانت‌ها بر این باکتری‌هاست. در بررسی مطالعات مشابه، تحقیقات کمی به ویژه در ایران در مورد خواص ضد میکروبی بیوسورفکتانت‌ها صورت گرفته یا در این مطالعات در مورد جزئیات خصوصیات آنتی باکتریالی از جمله به نتایج هاله‌های عدم رشد اشاره نشده است با این حال بعضی از بیوسورفکتانت‌های دکاپپتیدی حلقوی جدید از گونه‌های سودوموناس جدا شدند، که در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضدمیکروبی بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم آویوم داخل سلولی یافت شد(22). هم‌چنین سویه باسیلوس سوبتیلیس C1 در آزمایشگاه از نفت خام لجن جدا شده بود و برای تولید کمپلکس سه لیپوپتیدی یافت شد. در مطالعات منتشر نشده مربوط به این سویه فعالیت ضدمیکروبی بیوسورفاکتانت لیپوپپتید N1، در برابر ارگانیسم‌های مختلف تست شد. N1 فعال بر علیه چندین باکتری گرم مثبت از جمله استافیلوکوکوس اورئوس و مایکوباکتریوم اسمگماتیس مشاهده شد. با این حال، هیچ فعالیتی بر علیه ارگانیسم‌های گرم منفی مشاهده نشد(22). با این وجود، این نقش سورفاکتین ایزوله شده به عنوان یک عامل ضدمیکروبی مفید تایید شده است. اما در این مطالعه تجربی بر خلاف مطالعات ذکر شده بیوسورفکتانت تولید شده از باسیلوس سرئوس 43 هم بر روی باکتری‌های گرم منفی و هم بر روی باکتری‌های گرم مثبت اثرات ضد باکتریال زیادی مشاهده شد. در تحقیقاتی که توسط وتسا و همکاران انجام شد گزارش دادند که رامنولیپیدها جدا شده از سودوموناس دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه باکتری گرم منفی؛ سودوموناس آئروژینوزا و باکتری گرم مثبت؛ استافیلوکوکوس بودند(23). هم‌چنین فعالیت ضدمیکروبی بر اساس مقادیر MIC بیوسورفکتانت رامنولیپید از سودوموناس AT10 بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مخمر، و سویه‌های قارچ به دست آمده است که با نتایج تحقیقات این مطالعه تجربی مشابه می‌باشد(24). اما تفاوت در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به متابولیت‌های مختلف، می‌تواند به تفاوت‌های مورفولوژیکی بین این میکروارگانیسم‌ها مرتبط باشد. باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی پلی ساکاریدی هستند که دارای ترکیباتی با ساختار لیپوپلی ساکارید می‌باشد و یک دیواره سلولی نفوذ ناپذیر به وجود می‌آورند اما باکتری‌های گرم مثبت بیشتر حساسند چون فقط یک لایه پپتیدوگلیکان خارجی دارند که نمی‌تواند یک مانع موثر جهت نفوذ پذیری متابولیت‌ها باشد. یافته‌های این مطالعه، اهمیت موضوع را برای تحقیقات آینده جهت به دست آوردن ترکیبات ضد میکروبی در میان گونه‌های باسیلوس از مخازن نفتی غرب ایران مشخص می‌نماید. تحقیق برای کشف متابولیت‌های بیولوژیکی جدید و ترکیبات دارویی، به تعداد زیادی از ایزوله‌ها احتیاج دارد و اگر باسیلوس‌های متنوع نمونه گیری و غربال‌گری شوند این تحقیقات در آینده امید بخش خواهد بود با این حال وجود برخی تفاوت‌ها در میزان اثرات ضد میکروبی مشاهده شده در این مطالعه تجربی و تحقیقات مشابه می‌تواند به دلیل تفاوت سوبستراهای مختلف برای رشد باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت، استفاده از روش‌های مختلف برای استخراج باشد. تفاوت در اثرات ضد میکروبی نشان دهنده تفاوت‌های موجود در ترکیبات بیوسورفکتانت‌ها می‌باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این مطالعه تجربی می‌توان گفت که این باکتری دارای پتانسیل فراوانی برای کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست

محیطی است. بنابر این ما می‌توانیم در مورد استفاده از آن در آینده به عنوان اجزاء تشکیل‌دهنده چند منظوره فکرکنیم، بنابر این با وجود پتانسیل بسیار زیاد بیوسورفاکتانت‌ها در این زمینه، استفاده از آنها هنوز محدود است. شاید دلیل آن هزینه‌های تولید کمابیش بالا و هم‌چنین اطلاعات اندکی در مورد سمیت آن‌ها نسبت به سیستم‌های انسانی است با این وجود، تقاضای استفاده از آنها به شکل مکمل‌های غذایی، موادآرایشی و محصولات دارویی نشان دهنده علاقه زیاد به استفاده از این محصولات میکروبی به دست آمده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد محمد جواد مصطفی پور رمی با راهنمایی استاد گرامی جناب آقای دکتر سلمان احمدی اسپچین از دانشگاه ایلام با عنوان جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت از مخازن نفتی نفت شهر کرمانشاه می‌باشد. بدین وسیله از کارشناسان گروه میکروبیولوژی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه ایلام که در انجام این تحقیق با ما همکاری صمیمانه‌ای داشتند، تشکر می‌نماییم.

منابع

1. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010;87(2):427-44.
2. Cameotra SS, Makkar RS, Kaur J, Mehta SK. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. In: Biosurfactants; 2010. P.261-80.
3. Mireles JR, Toguchi A, Harshey RM. Salmonella enterica serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. Journal of bacteriology. 2001;183(20):5848-54.
4. Bodour AA, Guerrero-Barajas C, Jiorle BV, Malcomson ME, Paull AK, Somogyi A, et al. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by Flavobacterium sp. Strain MTN11. Applied and environmental microbiology. 2004;70(1):114-20.
5. Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technology and Biotechnology. 2001;39(4):295-304.
6. Hood S, Zottola E. Biofilms in food processing. Food control. 1995;6(1):9-18.
7. Anandaraj B, Thivakaran P. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. J Biosci Tech. 2010;1(3):120-6.
8. Haddad NI, Wang J, Mu B. Identification of a biosurfactant producing strain: Bacillus subtilis HOB2. Protein and Peptide Letters. 2009;16(1):7-13.
9. Francy D, Thomas J, Raymond R, Ward C. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. Journal of Industrial Microbiology. 1991;8(4):237-45.
10. Tabatabaee A, Assadi MM, Noohi A, Sajadian V. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering. 2005;2(1):6-12.[Persian]
11. Walter V, Syldatk C, Hausmann R. Screening concepts for the isolation of Biosurfactant producing Microorganisms. In: Biosurfactants. 2010. P.1-13.
12. Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lepine F, Muller MM, Deziel E. Rhamnolipid: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regalation and Bioengineering of production. In: Biosurfactants. 2011. P.13-55.
13. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001;48(1):43-57.
14. Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S. Predominant growth of Alcanivorax strains in oil-contaminated and

nutrient-supplemented sea water. Environmental Microbiology. 2002;4(3):141-7.
15. Vasilieva-Tonkova E, Galabova D. Hydrolytic enzymes and surfactants of bacterial isolates from lubricant-contaminated wastewater. Zeitschrift Fur Naturforschung. 2003;58(1/2):87-92.
16. Okerentugba P, Ezeronye O. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. African Journal of Biotechnology. 2004;2(9):288-92.
17. Oboh BO, Ilori MO, Akinyemi JO, Adebusoye SA. Hydrocarbon degrading potentials of bacteria isolated from a Nigerian bitumen (Tarsand) deposit. Nature and Science. 2006;4(3):51-7.
18. Bicca FC, Fleck LC, Ayub MAZ. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcus ubber and Rhodococcus erythropolis. Revista de Microbiologia. 1999;30(3):231-6.
19. Banat IM, Makkar RS, Cameotra S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology. 2000;53(5):495-508.
20. Rosa CFCd, Michelon M, Burkert JFdM, Kalil SJ, Burkert CAV. Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa LBM10 grown on glycerol. 2010; 9(53): 9012-7.
21. Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends in Biotechnology. 2004;22(3):142-6.
22. Vater J, Kablitz B, Wilde C, Franke P, Mehta N, Cameotra SS. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of Bacillus subtilis C-1 isolated from petroleum sludge. Applied and environmental microbiology. 2002;68(12):6210-9.
23. Vatsa P, Sanchez L, Clement C, Baillieul F, Dorey S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. International journal of molecular sciences. 2010;11(12):5095-108.
24. Abalos A, Pinazo A, Infante M, Casals M, Garcia F, Manresa A. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by Pseudomonas a eruginosa AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. Langmuir. 2001;17(5):1367-71.