Archive of SID

پایداری بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویه بومی *Bacillus subtilis* در برابر تغییرات شرایط محیطی

محمد رضا صعودی[1*]، شقایق نصر[1]، بهاره عطاران[1]، محمدرضا مهرنیا[2] و محمد حسین صرافزاده[2]

[1] تهران، دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم پایه، آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی ایران

[2] تهران، دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۱٤ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۱۰

چکیده

بیوسورفکتانت ها ترکیبات آمفی پاتیکی هستند که توسط انواعی از میکروارگانیسم ها تولید می شوند و به علت ویژگیهای منحصربه فرد شان، کاربرد وسیعی در صنایع مختلف دارند. بنابراین حفظ و پایداری ویژگیهای عملکردی آنها در برابر شرایط مختلف محیطی اهمیت بسیار دارد. در این مطالعه سویهٔ بومی *Bacillus subtilis* با هدف تولید بیوسورفکتانت و به کارگیری آن در صنعت نفت، با استفاده از روشهای غربال سازی میکروبی از خاک یک ناحیهٔ آلوده به ترکیبات هیدروکربنی جداسازی شد. از آنجا که این ترکیبات به هنگام کاربرد در صنایع نفتی در معرض دماهای نسبتاً بالا و شرایط سخت محیطی چون شوری و تغییرات pH قرار می گیرند بنابراین تأثیر این فاکتورهای محیطی خارجی بر عملکرد آنها بررسی شد. از این رو تولید بیوسورفکتانت طی یک فرآیند تخمیر ۹ روزه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و با سرعت همزنی ۲۰۰ rpm در شیکر انکوباتور انجام شده، پس از جداسازی زی توده میکروبی، عملکرد بیوسورفکتانت خام موجود در براث تخمیر در برابر تیمار نمکی (تراکم ۱-۱۰ درصد نمک NaCl)، تغییرات pH (۱-۱۳) و نیز پایداری آن در برابر تیمار حرارتی (دمای اتاق تا دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه) و از طریق سنجش میزان کاهش کشش سطحی به وسیلهٔ تنسیومتری (Tensiometry) ، بررسی شد. بر این اساس، محلول بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویه بومی *B. subtilis* در برابر تیمار حرارتی مقاوم بوده، در مقایسه با کشش سطحی شاهد، محلول بیوسورفکتانت تیمار نشده (۲۳/۳ mN/m)، تغییر قابل ملاحظه ای مشاهده نمی شود. درpH ۵ تا ۹ تغییرات کشش سطحی اندک بوده و به نظر می رسد pH اسیدی اثر شدیدتری بر عملکرد بیوسورفکتانت دارد، چنان که در pH پایین تر از ۵ کارآیی بیوسورفکتانت در عمل مختل می شود. بیوسورفکتانت موجود در صاف شدهٔ کشت در برابر تراکم نمک ۱ تا۱۰ درصد قابلیت کاهش کشش سطحی خود را نسبتاً حفظ می نماید، به طوری که بیشینه کشش سطحی که در تراکم ۱۰ درصد نمک مشاهده می شود، برابر (۲۸/٦ mN/m) می باشد که تفاوت قابل ملاحظه ای را با نمونه شاهد نشان نمی دهد.

واژه های کلیدی: *Bacillus subtilis*، بیوسورفکتانت، فاکتورهای محیطی، کشش سطحی، تنسیومتری

* نویسنده مسئول، تلفن: (۲۷۳۳)۹-۸۸۰٤٤۰۵۱ پست الکترونیکی: msoudi@alzahra.ac.ir

مقدمه

سورفکتانت های شیمیایی و زیستی هر دو مولکولهای فعال سطحی با ساختار آمفی پاتیک هستند، این مولکولها قادرند با قرار گرفتن در حد فاصل سیالات غیر امتزاج پذیر، موجب کاهش کشش سطحی و بین سطحی در حد فاصل مایعات، جامدات و گازها شده، امکان مخلوط شدن یا پراکنده شدن این ترکیبات را به عنوان امولسیون در آب یا سایر سیالات تسهیل کنند و بدین ترتیب حلالیت، قابلیت حرکت، دسترسی زیستی و به دنبال آن تجزیهٔ زیستی مواد هیدروفوبیک و مواد آلی نامحلول را افزایش دهند (۱ و ۲۲). امروزه نیاز بازار جهانی به سورفکتانت ها

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر به وسیلهٔ سورفکتانت های سنتزی که عمدتاً بر پایه ترکیبات نفتی هستند، پاسخ داده می شود. این ترکیبات عموماً برای محیط زیست سمی بوده، غیر قابل تجزیه هستند. سورفکتانت های سنتزی به وسیله ی چرخه های زیستی تجمع یافته و تولید، فرآوری و فرآورده های جانبی آنها برای محیط زیست زیان آور است. با سخت تر شدن قوانین محیط زیستی و افزایش آگاهی نسبت به ضرورت حفظ اکوسیستم، به بیوسورفکتانت ها به عنوان جانشینان احتمالی سورفکتانت های شیمیایی توجه ویژه ای می شود (۱). بیوسورفکتانت های تولید شده توسط میکروارگانیسم های مختلف ساختاری متنوع و خصوصیات سطحی گوناگون دارند. از این رو منطقی است که نقشهای طبیعی متنوعی را برای این متابولیتهای ثانویه تصور کرد که رایج ترین آنها شامل افزایش دسترسی زیستی به سوبستراهای هیدروفوبیک نامحلول در آب، اتصال به فلزات سنگین، بیماریزایی، فعالیت ضد میکروبی و تنظیم اتصال و جدایی میکروارگانیسم تولید کننده از سطوح اتصال در زیستگاههای طبیعی آنها و برهمکنشهای میکروارگانیسم- میزبان است (۱۲،۱۰ و ۱۹). بیوسورفکتانت ها در صنایع مختلف کشاورزی، معادن، صنایع نساجی و صنایع دارویی و بهداشتی- آرایشی و به خصوص صنایع نفتی و حفاری به عنوان عوامل کاهش دهندهٔ کشش سطحی، مرطوب کننده، تشکیل دهنده کف و امولسیون کننده به کار می روند (۱، ٦ و ۱۷). توجه به سورفکتانت های میکروبی در سالهای اخیر به علت تنوع و ماهیت سازگار با محیط زیست آنها افزایش یافته است (۱۷). این ترکیبات با داشتن مزایایی چون امکان قابلیت تولید در مقیاس وسیع و از منابع ارزان قیمت و تجدید پذیر، سازگاری بیشتر با محیط زیست، سمیت کمتر و قابلیت تجزیهٔ زیستی بالاتر و حفظ قابلیت های عملکردی در دامنهٔ وسیعی از شرایط متغیر محیطی بر رقبای شیمیایی خود پیشی می گیرند (٦ و۱۰). بزرگترین بخش بازار مصرف بیوسورفکتانت ها به صنعت نفت اختصاص دارد؛ این ترکیبات برای تولید نفت، حفاری، روان سازی، و نیز در کاربردهای وابسته به صنایع نفتی شامل پاکسازی زیستی آلاینده های هیدروکربنی ناشی از نشت ترکیبات هیدروکربنی در خشکی و دریا و زدودن و به حرکت در آوردن لجن نفتی در تانکرهای نفتی و خطوط لوله و نیز ازدیاد برداشت نفت (MEOR) (Microbial enhanced oil recovery) مورد استفاده قرار می گیرند (۱). هدف نهـایی ایـن بـررسی به کارگیری بیوسورفکتانت تولیدی در ازدیـاد برداشت نفت است. مکـانیزم عمل این گـروه از فرآورده ها کاهش کشش سطحی در مرز جدا کنندهٔ نفت و سنگ مخزن و به دنبال آن کاهش نیروی مویینگی (Capillary force) است که این نیرو مانع از جاری شدن نفت از منافذ سنگ مخزن می شود. افزون بر این، بیوسورفکتانت ها با کمک به امولسیون شدن و جدایی فیلم نفتی از صخره های نفتی مخزن موجب افزایش بازده پاکسازی جاروبی در فرآیند سیلابزنی با سورفکتانت ها و به دنبال آن ازدیاد برداشت نفت می شوند (۱ و ۲۳). از این رو تأثیر عوامل محیطی چون تغییرات دما و pH و نیز تراکمهای نمکی که می تواند بر کارآیی آنها در فرآیندهای ازدیاد برداشت نفت مؤثر باشد مورد توجه قرار می گیرد. جستجو برای یافتن سویه های تازهٔ مولد بیوسورفکتانت ادامه دارد (۲) و ظرفیتهای جدیدی را برای دستیابی به سویه های صنعتی در اختیار قرار می دهد. در این بررسی سویهٔ بومی از گونهٔ *B. subtilis* با قابلیت تولید بیوسورفکتانتی با ویژگیهای مطلوب جهت به کارگیری در فرآیند ازدیاد برداشت نفت ، معرفی می شود.

مواد و روشها

میکروارگانیسم وشرایط نگهداری: سویه بومی *Bacillus subtilis* تولید کننده بیوسورفکتانت از خاک یک ناحیهٔ آلوده به ترکیبات هیدروکربنی ناشی از نشت مداوم این ترکیبات در تهران جداسازی و شناسایی آن بر اساس ویژگیهای مورفولوژیک و آزمونهای بیوشیمیایی و ملکولی

www.SID.ir

Archive of SID

مرسوم انجام شد. (۸ و ۱۵). این باکتری بر روی محیط کشت شیب دار نوترینت آگار و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد رشد کرده و هر ۱۵ روز یکبار تجدید کشت شد.

محیط تولید بیوسورفکتانت: تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *B. subtilis* در فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت E- medium با pH برابر ۶/۹ انجام شد. اجزای محیط کشت بر حسب واحد گرم برلیتر به شرح زیر است: ۲/۷ دی پتاسیم مونو هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)، ۱۳/۹ پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) ، ۱۰ سوکروز ($C_{12}H_{22}O_{11}$)، ۵۰ کلرید سدیم ($NaCl$)، ۰/۵ عصاره مخمر(Yeast extract)، ۱ نیترات سدیم ($NaNO_3$). پس از اتوکلاو کردن ۱۰ میلی لیتر از هر یک از محلولهای A، B، C به یک لیتر از محلول فوق افزوده می شود. محلول A بر حسب گرم بر لیتر حاوی ۲۵ سولفات منیزیم ($MgSO_4$)، محلول B حاوی۱۰۰ سولفات آمونیوم ($(NH4)_2SO_4$) و محلول C بر حسب گرم بر لیتر حاوی ترکیبات زیر است: ۰/۵ اتیلن دی آمین تترا استیک اسید دی پتاسیم (EDTA)، ۳ سولفات منگنز ($MnSO_4.H_2O$)،۱ کلرید سدیم ($NaCl$)، ۰/۱ کلرید کلسیم ($CaCl_2.2H_2O$)، ۰/۱ سولفات روی ($ZnSO_4.7H_2O$)، ۰/۱ سولفات آهن ($FeSO_4.7H_2O$)، ۰/۰۱ سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$)، ۰/۰۱ آلومینیوم پتاسیم سولفات ($AlK(SO_4)_2$)، ۰/۰۱ سدیم مولیبدات ($Na_2MoO_4.2H_2O$)، ۰/۰۱ اسید بوریک (H_3BO_3)، ۰/۰۰۵ سلنات سدیم (Na_2SeO_4) ، ۰/۰۰۳ کلرید نیکل ($NiCl_2.6H_2O$) است. محلولهای A و B جداگانه اتوکلاو شده و محلول C به وسیلهٔ فیلتراسیون استریل می شود (۲۵). محیط کشت تلقیح شده به مدت ۷ تا ۹ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و با دور همزنی ۲۰۰rpm گرماگذاری می شود (۳).

استحصال محصول خام حاوی بیوسورفکتانت خام: کشت براث به مدت ٤٥ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت فاقد باکتری در مراحل بعدی سنجش مورد استفاده قرار گرفت (۲۰ و ۲۱).

سنجش کشش سطحی: سنجش کشش سطحی براث عاری از سلول باکتری با استفاده از تنسیومتر(Kruss Nr2215 Germany) انجام شد که برای افزایش دقت سنجشها، میانگین حداقل سه بار سنجش گزارش شد (۱۸). سنجش کشش سطحی با غوطه ور کردن حلقهٔ پلاتینیومی در براث عاری از سلول و ثبت نیروی لازم جهت بیرون کشیدن حلقه از حد فاصل هوا و سیال انجام شد و حلقهٔ پلاتینیومی در فاصلهٔ هر سنجش با آب مقطر شستشو داده شده و در معرض جریان هوا خشک گردید (٤ و ١٦).

تعیین تراکم بحرانی تشکیل میسل(Critical Micelle Concentration) یا (CMC) : تراکم بحرانی تشکیل میسل (CMC) بیوسورفکتانت تولیدی به وسیلهٔ رقیق کردن بیوسورفکتانت خام در آب مقطر و تعیین کشش سطحی به عنوان شاخص عملکرد بیوسورفکتانت انجام شد (۷ و ۱۱).

بررسی پایداری در برابر فاکتورهای محیطی: مطالعات پایداری در برابر فاکتورهای محیطی با استفاده از براث کشت عاری از سلول باکتری انجام شد (۱۰). پنجاه میلی لیتر از این براث از لحاظ پایداری در برابر تیمارهای حرارتی، pH و تیمارهای نمکی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعهٔ پایداری در برابر تیمارهای حرارتی براث فاقد سلول به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای ۲۵، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از سرد شدن کشش سطحی آن با نمونهٔ تیمار نشده مقایسه شد. در بررسی تحمل نمکی تراکم های ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد نمک NaCl به براث عاری از باکتری افزوده شد و پس از حداقل ۳۰ دقیقه مجاور سازی، کشش سطحی این محلولها با نمونهٔ شاهد مقایسه گردید. پایداری در برابر pH با رساندن pH براث فاقد سلول به pH های مختلف ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۳ با استفاده از محلولهای نرمال HCl و

www.SID.ir

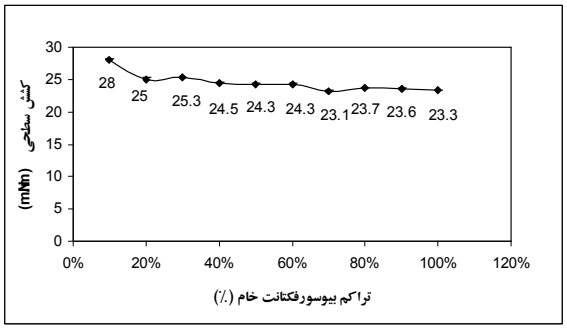
Archive of SID

NaOH و سپس تعیین کشش سطحی این محلولها در مقایسه با شاهد بررسی شد.

نتایج و بحث

بیوسورفکتانت ها متابولیتهای ثانویه ای هستند که توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند. در این پژوهش جداسازی باکتری بومی *B. subtilis* تولید کننده بیوسورفکتانت از خاک آلوده به ترکیبات نفتی صورت گرفت زیرا باکتریهایی که قادرند آلاینده های هیدروفوبیک را به صورت درجا امولسیون و محلول سازند در نواحی آلوده به ترکیبات هیدروکربنی بر رقیبان خود برتری دارند و این جایگاهها و نمونه ها اغلب غنی از باکتری واجد خصوصیات مطلوب هستند (۲). بیوسورفکتانت های تولیدی توسط میکروارگانیسم ها یا به سطح سلول اتصال داشته و یا با بخشی از سطح دیوارهٔ سلولی آمیخته اند که در این صورت کاهش کشش سطحی تنها در حضور سلولها مشاهده می شود اما نوع دیگر بیوسورفکتانت ها، توسط سلولها به محیط کشت ترشح می شود (۲ و ١٤). در این پژوهش بیوسورفکتانت های ترشحی که از نقطه نظر اقتصادی و به دلیل تسهیل فرآیند استحصال در صنعت مورد توجه قراردارند ، مورد بررسی قرار گرفت. یکی از خصوصیات اصلی جهت انتخاب و ارزیابی سویه های میکروبی مولد بیوسورفکتانت قابلیت کاهش کشش سطحی براث تولید در این باکتریها است (٤، ٥ و٢٤).

سویهٔ بومی *B. subtilis* میزان کشش سطحی محیط تولید را به ۲۳/۳mN/m می رساند که در مقایسه با کشش سطحی آب مقطر (۷۰/۱mN/m) و محیط کشت تلقیح نشده (٦٥/٨mN/m) به عنوان کنترل منفی کاهش قابل توجهی را نشان می دهد. یکی دیگر از رایج ترین شاخصهای مورد بررسی در ارزیابی فعالیت بیوسورفکتانت تراکم بحرانی تشکیل میسل (CMC) است. CMC در واقع حلالیت بیوسورفکتانت در فاز آبی و یا حداقل تراکم بیوسورفکتانت مورد نیاز برای رسیدن به پایین ترین حد کشش سطحی است (۱۲). همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود CMC بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویهٔ بومی *B. subtilis* تقریباً ۳۰ درصد است که این تراکم بیوسورفکتانت کشش سطحی را به ۲۵/۳ mN/m می رساند که شاخصی از کارآیی و اثر بخشی بیوسورفکتانت تولیدی است، زیرا در مصارف کاربردی اهمیت دارد تا بتوان بین یک سورفکتانت کارآ (efficient surfactant) و یک سورفکتانت مؤثر (effective surfactant) تفاوت قائل شد. کارآیی (Efficiency) به وسیلهٔ تراکم مورد نیاز سورفکتانت برای ایجاد کاهش کشش سطحی قابل توجه به کار می رود در حالی که تأثیر (Effectiveness) حداقل میزانی است که کشش سطحی می تواند کاهش یابد بنابراین قابلیت کاهش کشش سطحی و CMC پایین، جهت کاربرد صنعتی بیوسورفکتانت ضروری است (۱۱).



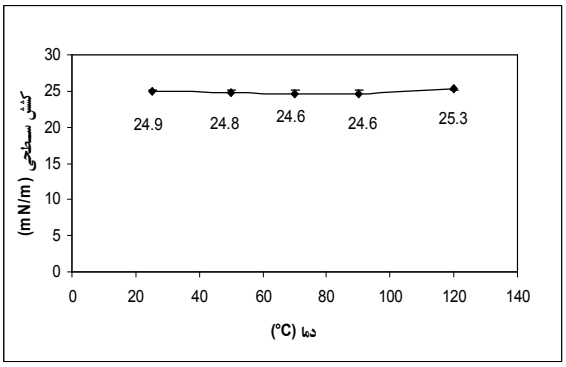
شکل ۱- تراکم بحرانی تشکیل میسل (CMC) بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویهٔ بومی *B. subtilis*

هدف نهایی از تولید بیوسورفکتانت توسط سویهٔ بومی *B. subtilis* امکان سنجی قابلیت به کارگیری آن در فرآیند سیلابزنی سورفکتانتی در مرحلهٔ سوم ازدیاد برداشت نفت است. از آنجا که این ترکیبات به هنگام کاربرد در صنایع نفتی در معرض دماهای نسبتاً بالا و شرایط سخت محیطی چون شوری و تغییرات pH قرار می گیرند بنابراین تأثیر این فاکتورهای محیطی خارجی بر عملکرد بیوسورفکتانت تولیدی مورد توجه قرار می گیرد (۹). بر این اساس بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویهٔ بومی *B. subtilis* در برابر تیمار حرارتی مقاوم بوده (شکل ۲) و در مقایسه با

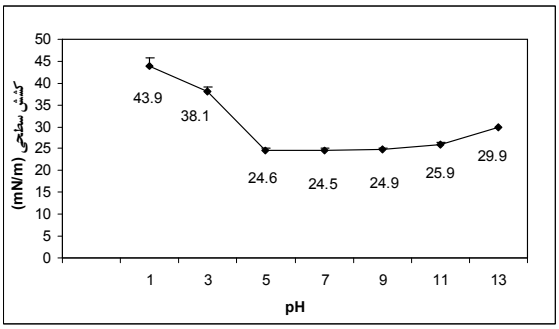
www.SID.ir

Archive of SID

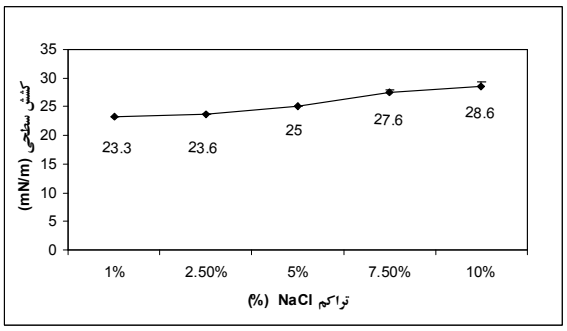
کشش سطحی شاهد تیمار نشده (۲۳/۳ mN/m) تغییر قابل ملاحظه ای مشاهده نمی شود. در pH ۵ تا ۹ تغییرات کشش سطحی اندک بوده، به نظر می رسد pH اسیدی اثر شدیدتری بر عملکرد بیوسورفکتانت دارد، چنانکه در pH پایین تر از ۵ عملکرد بیوسورفکتانت در عمل مختل می گردد (شکل ۳). علت احتمالی این پدیده آن است که در pH ایزوالکتریک، هیچ نیروی دافعه ای بین مولکولهای مجاور وجود ندارد؛ بنابراین این مولکولها تمایل دارند به یکدیگر متصل شده و تشکیل رسوب دهند که این پدیده می تواند به کاهش کارآیی مولکولهای بیوسورفکتانت منجر شود. افزون بر این، پروتونه شدن گروههای فعال در ساختار مولکول بیوسورفکتانت نیز عامل دیگری است که می تواند خصوصیات مولکول را تغییر دهد (۱۳). ویژگیهای سطحی بیوسورفکتانت ها به ترکیب یونی فاز آبی وابسته است. برای مثال تراکم بالای NaCl، گلیکولیپید های *Torulopsis apicola* را غیر فعال می سازد (۱۲). در این بررسی، بیوسورفکتانت موجود در صاف شدهٔ کشت در برابر تراکم ۱ تا۱۰ درصد نمک NaCl قابلیت کاهش کشش سطحی خود را نسبتاً حفظ می نماید، به طوری که بیشینهٔ کشش سطحی که در تراکم ۱۰ درصد نمک مشاهده می شود، برابر (۲۸/٦ mN/m) می باشد که تفاوت قابل ملاحظه ای را با نمونهٔ شاهد نشان نمی دهد (شکل٤).



شکل ۲- بررسی اثر تیمار حرارتی بر کشش سطحی بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویهٔ بومی *B. subtilis* به عنوان شاخص عملکرد آن



شکل ۳- بررسی اثر تغییرات pH بر کشش سطحی بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویهٔ بومی *B. subtilis* به عنوان شاخص عملکرد آن



شکل ٤- بررسی اثر تراکمهای مختلف نمک NaCl بر کشش سطحی بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویهٔ بومی *B. subtilis* به عنوان شاخص عملکرد آن

با توجه به افزایش روز افزون قیمت نفت و نیز روند رو به رشد کاهش مخازن نفتی، تکنولوژیهای ازدیاد برداشت نفت (MEOR) و پژوهشهای مربوط به جداسازی میکروارگانیسم های واجد قابلیت تولید متابولیتهای سودمند در این بخش از صنعت نفت مورد توجه قرار می گیرد که پژوهش پیش رو نیز با همین هدف انجام شده است.

منابع

1-Banat, I.M., Makkar, R.S., Cametora, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 53:495-508.

2- Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R., Totola, M.R., 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated

www.SID.ir

Archive of SID

sites. Journal of Bioresource Technology, 97:868-875.

3- Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M., 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated Arid Southwestern soils. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 69(6):3280-3287.

4- Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M., 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganism. Journal of Microbiological Methods. 32:273-280.

5- Christofi, N., Ivshina, I.B., 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. Journal of Applied Microbiology. 93:915-929.

6-Gautam, K.K., Tyagi, V.K., 2006. Microbial surfactants: a review. Journal of Oleo Science. 55(4):155-166.

7- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., Manreasa, A., 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. Journal of Applied Microbiology. 88:379-387.

8- Holt, J.G., Kreig, N.R.., Sneath, P.H., Stanely, J.T., 1986. Bergey's manual of determinative bacteriology, Volume2, Baltimore, USA: Williams and Wilkans publisher.

9- Jeremic, K., Markov, S., Pekic, B., Jovanovic, S., 1999. The influence of temperature and inorganic salts on the rheological properties of xanthan aqueous solutions. Journal of the Serbian Chemical Society . 64(2) 109-116.

10-Joshi, S., Bharucha, C., Desai, A.J., 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. Journal of Bioresource Technology. 99(11):4603-4608.

11- Lee, S.C., Lee, S.J., Kim, S.H., Park, I.H., Lee, Y.S., Chung, S.Y., Choi, Y.L., 2008. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. Journal of Bioresource Technology. 99:2288-2292.

12-Lin, S.C., 1996. Biosurfactants: recent advances. Journal of Chemical Technology and Biotechnology.66:109-120.

13- Maneerat S., Pheetrong K., 2007. Isolation of biosurfactant producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant, Songklankarin Journal of Science Technology. 29(3) 781-791.

14- Mukherjee, S., Das, P., Sen, R., 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. Journal of Trends in Biotechnology. 24(11):509-515.

15-Nasr, S., Soudi, M.R., Mehrnia, M.R, Sarrafzadeh, M.H, 2008. Screening and selection of biosurfactant producing bacteria from an oil-contaminated soil site, XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology 5-9 August, Istanbul, Turkey.

16- Pavitran, S., Balasubramanian, S., Kumar, P., Bisen, P.S., 2004. Emulsification and utilization of high-speed diesel by *Brevibacterium* species isolated from hydraulic oil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20:811-816.

17- Rahman, K.S.M., Rahman, T.G., Lakshmanaperumalsamy,P., Marchant,R., Banat, I.M., 2003. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. Journal of Acta Biotechnology.23(4): 335-345.

18- Rahman, K.S.M., Rahman, T.G., McClean, S., Marchant, R., Banat, I.M., 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strain of *Pseudomonas aeroginosa* using low-cost raw materials. Journal of Biotechnology progress.18:1277-1281.

19- Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2001. Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology. 3(4):229-236.

20- Tabatabaee, A., Mazaheri Assadi, M., Noohi, A.A., Sajadian, V.A., 2005. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. Iranian Journal of Health Science Engineering. 2(1):6-12.

21- Tugrul, T., Cansunar, E., 2005. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21:851-853.

22- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2006. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Journal of Biotechnology Advances. 24(6): 604-620.

23-Van Poollen, H.K., 1981. Fundamentals of enhanced oil recovery, Oklahoma, USA, Pennwell Publishing Company.

24-Volchenko, N.N., Karasev, S.G., Nimchenko, D.V., Karaseva, E.V., 2007. Cell hydrophobicity as a criterion of selection of bacterial producers of biosurfactants. Journal of Microbiology. 76(1):126-128.

www.SID.ir

Archive of SID

25- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., McInerney, M.J., 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of Microbiological Methods. 56:339-347.

Stability of biosurfactant produced by native strain of *Bacillus subtilis* in variation of environmental conditions

[1]Soudi M.R., [1]Nasr S., [1]Attaran B., [2]Mehrnia M.R., [2] and Sarrafzadeh M.H.

[1]National laboratory of industrial Microbiology, Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of IRAN

[2] Biotechnology group, Faculty of Chemical Engineering, Tehran University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Biosurfactants are amphipathic compounds produced by a wide variety of microorganisms and due to their unique properties are used by many industries. Hence, maintenance and stability of their functional properties against various environmental conditions is a grave concern. To achieve the goal of production and application of biosurfactant in petroleum industry, a native strain of *Bacillus subtilis* was isolated from hydrocarbon contaminated soil using microbial screening procedures. Biosurfactant production was carried out in shaker incubator during a nine-day period of fermentation at 30°C and 200 rpm. After separating microbial biomass, the influence of salt treatments (concentration of 1-10% NaCl), pH variations (1-13) and also heat treatments (room temperature up to 120°C for 30 minutes) on function of crude biosurfactant existing in fermentation broth were investigated using tensiometery. According to this study, biosurfactant produced by native strain of *B. subtilis* was resistant to heat treatment and comparing to untreated control (23.3 mN/m) did not show noticeable difference. There was a slight variation in surface tension in pH 5-9; however, it seemed that acidic pH had more severe impact on biosurfactant function and subsequently annihilated its function in pH below 5. Biosurfactant, which exists in culture filtrate, was relatively resistant to the salt concentration of 1-10% and maximum surface tension was at 10% salt concentration (28.6 mN/m) which indicates only a minor difference comparing to that of control.

Keywords: *B. subtilis*, biosurfactant, environmental factors, surface tension, tensiometry

www.SID.ir