مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره چهارم (پیاپی ۲۱) زمستان ۱۳۹۳
صفحات ۳۲۰-۳۰۸

Original Article

بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در منابع مختلف کربن

محبوبه ورناصری قندعلی*[۱]، عبدالامیر معزی[۲]، نعیمه عنایتی ضمیر[۳]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه خاکشناسی، [۲]دانشیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه خاکشناسی، [۳]استادیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه خاکشناسی

چکیده

سابقه و هدف: بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات فعال سطحی هستند که به وسیله میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و در صنایع مختلف مانند نفت، شیمی، پتروشیمی، صنایع غذایی، پزشکی و کشاورزی کاربرد دارند. این مطالعه با هدف بهینه سازی تولید بیوسورفکتانت به وسیله باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در منابع مختلف کربن انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* از کلکسیون میکروبی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد. تولید بیوسورفکتانت توسط این باکتری در منابع مختلف کربن شامل نفت سفید، گلوکز و ملاس نی‌شکر در دو دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سیلیسیوس و دو زمان گرماگذاری ۴۸ و ۱۶۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. به منظور غربالگری تولید بیوسورفکتانت از آزمون‌های فروپاشی و پراکنش نفت، شاخص امولسیفیکاسیون، کشش سطحی و آب گریزی سطح سلول استفاده گردید.

یافته‌ها: باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* بیشترین کاهش کشش سطحی را در منبع کربن نفت سفید پس از ۱۶۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس نشان داد و توانست کشش سطحی را تا ۲۱/۲۸ میلی نیوتن بر متر کاهش دهد. همچنین بیشترین درصد امولسیفیکاسیون در منبع کربن ملاس (۴۳ درصد) بود. درصد آبگریزی سطح سلول باکتری در منبع کربن نفت سفید، ملاس و گلوکز به ترتیب ۶۵، ۵۸ و ۵۰ درصد بود. حداکثر مقدار بیوسورفکتانت تولید شده توسط *باسیلوس لاتروسپروس* در منبع کربن نفت سفید به مقدار ۸/۴ گرم بر لیتر به‌دست آمد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس، زمان گرماگذاری ۱۶۸ ساعت و منبع کربن نفت سفید شرایط بهینه برای تولید بیوسورفکتانت توسط سویه بومی *باسیلوس لاتروسپروس است.*

واژگان کلیدی: *باسیلوس لاتروسپروس*، بیوسورفکتانت، کشش سطحی، نفت سفید.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۳

Archive of SID

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها، ترکیبات آمفی پاتیکی هستند که به وسیله انواع متنوعی از باکتری ها، قارچ ها و مخمرها تولید می شوند (۱). بیوسورفکتانت ها ساختمان دوگانه آب دوست-آب گریز دارند و کاهش دهنده کشش سطحی محیطی هستند که در آن تولید شده‌اند. این گروه از مواد فعال سطحی به دلیل داشتن توانایی‌هایی مانند کاهش کشش سطحی و بین سطحی یا قدرت امولسیون کنندگی، دارای پتانسیل استفاده در حوزه‌های مختلفی شامل صنایع شیمیایی، صنعت نفت و پتروشیمی، پلاستیک‌ها و مواد کامپوزیتی، شوینده‌ها (دترجنت ها) و پاک کننده ها، محصولات آرایشی، صنعت نساجی، رنگ، کاغذ، معدن، صنعت فرآیند فلزات، تهیه حشره کش و کنترل آفات، غذا و بسته بندی غذایی، مواد دارویی، تحقیقات پزشکی و بیوشیمیایی و سایر حوزه‌های تکنولوژی پیشرفته می باشند (۲). بیش از یک دهه است که تولید *بیوسورفکتانت* به وسیله میکروارگانیسم‌ها به‌طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته

* آدرس برای مکاتبه: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه خاک شناسی.
تلفن: ۰۹۱۶۹۸۶۷۲۶۰ پست الکترونیک: Mahboobe.varnaseri@yahoo.com

www.SID.ir

است (۳). پروثی (Pruthi) و کامئوترا (Cameotra) با استفاده از روش های کروماتوگرافی، آزمون های تجمع نمک و آب گریزی سطح سلول توانایی تولید بیوسورفکتانت را در باکتری های *سودوموناس آئروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، *باسیلوس لاتروسپروس* (*Bacillus laterosporus*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *باسیلوس پومیلوس* (*Bacillus pumilus*)، *آسینتوباکتر کالکواستیکوس* (*Acinetobacter calcoaceticus*)، *سراشیا مارسسنز* (*Serratia marcescens*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) مورد بررسی قرار دادند.

نتایج آنها نشان داد که از این میان باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* قادر به تولید بیوسورفکتانت می باشد (٤). کاسزروک (Kaczorek) و همکاران در سال ۲۰۱۲، تاثیر افزودن بیوسورفکتانت رامنولیپیدی را بر روی درصد آب گریزی سطح سلول و میزان حذف روغن دیزل به وسیله تعدادی از باکتری های جداسازی شده از مناطق آلوده نفتی مورد ارزیابی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که رامنولیپید بسته به نوع باکتری، غلظت رامنولیپید، نوع منبع کربن و شرایط کشت تاثیر متفاوتی بر روی درصد آبگریزی سطح سلول و همچنین حذف روغن دارد (۵).

امروزه بیوسورفکتانت ها با استفاده از مواد زائد حاصل از فرآیندهای مختلف به‌عنوان منبع کربن تولید می‌گردند. جین (Jain) و همکاران در سال ۲۰۱۳، حداکثر تولید بیوسورفکتانت به وسیله یکی از سویه های باکتری *کلبسیلا* جدا شده از ذرت را برابر با ۱۵/٤۰ گرم بر لیتر گزارش نمودند. (٦). آبالوس (Abalos) و همکاران در سال ۲۰۰۱ حداکثر تولید بیوسورفکتانت رامنولیپیدی توسط *سودوموناس آئروجینوزا* At10 جدا شده از پسماند تصفیه روغن سویا را معادل ۹/۵ گرم بر لیتر گزارش نمودند (۷).

مصرف مواد ارزان قیمت، تجدید پذیر طبیعی، پسماندهای کشاورزی و یا پساب‌های صنعتی و شهری به‌عنوان سوبستراهای جایگزین، علاوه بر کمک به عدم تجمع این مواد در طبیعت به تولید ماده‌ای با ارزش نیز کمک می‌نماید (۸). به منظور تولید بیوسورفکتانت توسط میکروب‌ها از بسترهایی شامل نفت خام (۹)، گلوکز (۱۰)، پوست میوه پرتقال (۱۱) و روغن زیتون (۱۲) استفاده شده است. با این وجود همچنان انتخاب بستر مناسب به منظور رشد بهینه میکروارگانیسم‌ها و حداکثر تولید بیوسورفکتانت ها توجه محققان را جلب نموده است.

هدف از این پژوهش بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت و انتخاب بهترین منبع کربن برای تولید بیوسورفکتانت به وسیله ی باکتری بومی *باسیلوس لاتروسپروس* جدا شده از پساب شهری بود.

مواد و روش‌ها

الف) تولید بیوسورفکتانت در محیط کشت حاوی منابع مختلف کربن: باکتری مورد استفاده در این پژوهش *باسیلوس لاتروسپروس* می‌باشد که از کلکسیون میکروبی گروه بیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد. این باکتری قبلاً توسط عباسی (Abbasi) و همکاران از پساب شهری اهواز جداسازی و شناسایی شده بود (۱۳).

به منظور بررسی تولید بیوسورفکتانت، از کشت شبانه باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در محیط مایع مغذی، به میزان ۵ درصد حجمی به ارلن های جداگانه حاوی محیط کشت نمک معدنی (Mineral Salts Medium) (جدول ۱) با منابع مختلف کربن

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت نمک معدنی (۱۵).

ترکیبات	مقدار
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۲ گرم
آمونیوم نیترات	۰/۱ گرم
منیزیم سولفات	۰/۱ گرم
سدیم کلرید	۰/۱ گرم
سولفات آهن ۷ آبه	۰/۱ گرم
دی سدیم هیدروژن فسفات	۲/٤ گرم
کلسیم کلرید ۲ آبه	۰/۰۱۳ گرم
سولفات روی ۷ آبه	۱/٤ گرم
سولفات منگنز ۷ آبه	۱/۲ گرم
سولفات مس ۵ آبه	۰/۲۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

Archive of SID

www.SID.ir

شامل ۱/۲ درصد (وزنی/حجمی) گلوکز، ۲ درصد (وزنی/حجمی) نفت سفید، ۵ درصد (وزنی/حجمی) ملاس و ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن تلقیح شد. در مجموع ۳٦ ارلن (هر منبع کربن در سه تکرار آزمایش شد) در دو دوره زمانی در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سیلیسیوس و دور ۱۸۰ دور بر دقیقه به مدت ٤۸ و ۱٦۸ ساعت گرماگذاری شدند.

پس از اتمام گرماگذاری، به منظور جداسازی باکتری و ذرات معلق، محیط کشت با دور ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سیلیسیوس سانتریفیوژ گردید. روماند به دست آمده برای انجام آزمون های سنجش تولید بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت (۱٤).

ب) آزمون‌های تشخیص تولید بیوسورفکتانت:

۱- آزمون همولیز خون: باکتری بر روی محیط کشت بلاد آگار دارای ۵ درصد (v/v) خون گوسفند، کشت و به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری گردید. فعالیت همولیتیک با حضور منطقه شفاف اطراف کلونی‌های باکتریایی شناسایی شد (۱٦). قطر هاله تولید شده به عنوان یک شاخص برای تایید تولید بیوسورفکتانت به‌کار می‌رود. به طور کلی واکنش همولیتیک با توجه به ظاهر منطقه اطراف کلنی با آلفا، بتا و گاما در محیط آگار خون دار مشخص می شود. همولیز آلفا زمانی است که محیط اطراف کلنی به صورت یک منطقه سبز رنگ و همولیز بتا به صورت یک منطقه روشن در اطراف کلنی باکتریایی در بلاد آگار به نظر می رسد. در صورتی که هیچ تغییری در محیط اطراف کلنی نباشد، هیچ همولیزی در بلاد آگار رخ نداده است و واکنش همولیز از نوع گاما می باشد (۱۷).

۲- آزمون پراکنش نفت: برای این منظور از روش موریکاوا (Morikawa) و همکاران در سال ۲۰۰۰ همراه با تغییر جزیی استفاده شد (۱۸). ابتدا مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون پلیت‌های ۱۵ سانتی‌متری ریخته شد. سپس ۲۰ میکرو لیتر نفت خام به مرکز پلیت اضافه گردید. پس از به تعادل رسیدن نفت در سطح آب، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه روماند حاصل از سانتریفیوژ (بخش الف) بر روی لایه نفتی ایجاد شده ریخته شد. چنانچه محلول یاد شده حاوی بیوسورفاکتانت باشد، توانایی کنار زدن لایه نفتی و ایجاد ناحیه شفاف در سطح آب را دارد (۱۸). در این مطالعه از Tween 20 (مرک، آلمان) به‌عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت نمک معدنی همراه با منبع کربن به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. در این آزمون اگر قطر لایه شفاف ایجاد شده توسط عصاره حاصل از سانتریفیوژ کمتر از ۱۰ میلی متر باشد با علامت + و اگر بین ۱۰ تا ۲۰ میلی متر و بیشتر از ۲۰ میلی متر باشد به ترتیب با ++ و +++ نشان داده می شود (۱۹).

۳- آزمون فروپاشی نفت (Drop collapsing): در این آزمون ۲۰ میکرولیتر از روماند به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ (بخش الف) به درون هر چاهک پلیت الایزا (پلیت ۹٦ خانه) حاوی ۱۰۰ میکرولیتر پارافین اضافه گردید. از سورفکتانت شیمیایی (Tween 20) به‌عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت نمک معدنی همراه با منبع کربن به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. در صورت تشکیل قطره کروی در سطح پارافین امتیاز منفی به چاهک و در صورتی که قطره اضافه‌شده به ته چاهک منتقل گردد و یا از حالت کروی خارج شود امتیاز مثبت تعلق می‌گیرد (۲۰). در این آزمون از علامت + برای نمایش قطره‌هایی که قطر کمتر از ۰/٦ میلی متر و از علامت ++ برای قطره‌هایی که قطر بیشتر از ۰/٦ میلی‌متر دارند استفاده شد (۲۱).

٤- اندازه‌گیری فعالیت امولسیون کنندگی: برای این منظور از آزمون E24 (Emulsification index) استفاده گردید. ابتدا ۲ میلی‌لیتر از هر نمونه روماند به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ (بخش الف)، به طور جداگانه درون لوله‌های آزمایش ریخته شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر نفت سفید نیز به هرکدام اضافه گردید. سپس هر یک از لوله ها به مدت ۲ دقیقه ورتکس شدند و نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعت در یک محیط ساکن قرارگرفتند. در ادامه ارتفاع امولسیون باقیمانده درون هر لوله آزمایش اندازه‌گیری و نسبت ارتفاع این امولسیون به ارتفاع کل مایع درون لوله‌آزمایش، به‌عنوان شاخص امولسیفیکاسیون برای هر نمونه مربوط به هر یک از منابع کربن گزارش گردید (۲۲). از

Archive of SID

www.SID.ir

Tween20 به عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت نمک معدنی همراه با منبع کربن به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

۵- اندازه‌گیری کشش سطحی: برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از روماند به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ (بخش الف) به لوله آزمایشی که در حمام آب در دمای ۲۸ درجه سیلیسیوس قرار داشت اضافه گردید. لوله موئین (با شعاع ۰/۵ و ارتفاع ۷۵ میلیمتر) درون لوله آزمایش قرار گرفت. کشش سطحی با اندازه‌گیری ارتفاع صعود مایع در لوله مویین با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۳).

معادله (۱) $$\gamma = \frac{rh\delta g}{2}$$

در این فرمول r شعاع لوله مویین (سانتی متر)، h ارتفاع صعود مایع (سانتی متر) δ چگالی (گرم بر میلی لیتر)، g نیروی ثقل (۹۸۰ سانتی متر بر مجذور ثانیه)، γ کشش سطحی (میلی نیوتن بر متر) است.

۶- *آزمون آب‌گریزی سطح سلول:* این روش از روش‌های غیرمستقیم غربالگری تولید بیوسورفکتانت به وسیله ی ریز موجودات است. با این وجود، برای شناسایی سریع سویه‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت می‌توان از این روش استفاده نمود (۲۴ و ۲۵). نسبت آب‌گریزی سلول‌های باکتریایی *باسیلوس لاتروسپروس* بر اساس مطالعه روزنبرگ و همکاران (۱۹۸۰) و ژانگ و میلر (۱۹۹۴) با روش BATH (Bacterial adhesion to hydrocarbon) تعیین گردید. بدین منظور، از کشت باکتری در محیط کشت نمک معدنی حاوی هر یک از منابع مختلف کربن استفاده شد. سلول های باکتریایی در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ شدند. به منظور حذف هرگونه باقی‌مانده محیط کشت و مواد پلیمری خارج سلولی سه بار در محلول بافر فسفات منیزیم اوره (شامل ۱۹/۷ گرم بر لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۷/۲۶ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۱/۸ گرم بر لیتر اوره و ۰/۲ گرم بر لیتر سولفات منیزیم ۷ آبه) شسته شدند. سپس سلول‌ها در محلول بافر به حالت سوسپانسیون درآمده تا حدی که چگالی نوری اولیه و سوسپانسیون (A.) به یک برسد. چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Apel (PD-303 UV) قرائت شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر هگزادکان به ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه و به مدت ۲ دقیقه با دور بالا ورتکس گردید. پس از ۱۰ دقیقه، چگالی نوری فاز آبی اندازه‌گیری شد (A_1). میزان آب‌گریزی از معادله (۲) محاسبه گردید (۲۶ و ۲۷). این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

معادله (۲) $$\text{درصد آب گریزی} = \left[1 - \left(\frac{A0-A1}{A0}\right) \times 100\right]$$

ج) جداسازی بیوسورفکتانت : برای این منظور، محلول شفاف رویی به دست آمده از سانتریفیوژ به کمک اسید کلریدریک ۶ نرمال تا pH ۲ اسیدی گردید. سپس در طول یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سیلیسیوس نگهداری شد. رسوب حاصل، به کمک سانتریفیوژ با دور ۸۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری و پس از آن به حجم برابر با محلول حاصل از سانتریفیوژ، کلروفرم و متانول با نسبت (۲: ۱) اضافه گردید. در ادامه فاز آلی مجزا شده، حلال آن در آون و در دمای ۶۰ درجه سیلیسیوس تبخیر شد. مقدار بیوسورفکتانت تولید شده به وسیله ترازو وزن گردید (۱).

د) تجزیه و تحلیل داده ها: داده های آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به وسیله نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

یافته‌ها

الف) آزمون همولیز خون: در این روش، ۴۸ ساعت پس از کشت باکتری در پلیت های حاوی آگار خون‌دار هاله‌ای از نوع بتا در اطراف کلنی باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* مشاهده شد. قطر هاله ایجاد شده پس از دو روز گرماگذاری به ۲ سانتی‌متر رسید.

ب) اثر منابع مختلف کربن بر پراکنش نفت: در این روش، نفت اضافه‌شده در سطح آب مقطر لایه‌ای به قطر ۱۰ سانتی‌متر تشکیل داد. با افزودن محلول حاصل از سانتریفیوژ باکتری در

Archive of SID

www.SID.ir

منابع مختلف کربن به‌صورت جداگانه، ناحیه شفافی در سطح لایه نفتی ایجاد شد. این پدیده نشان‌دهنده حضور ترکیبات دوگانه دوست بیوسورفکتانت در محیط کشت باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در چهار منبع کربن است. اما با توجه به ایجاد نواحی شفاف با قطر بیشتر در برخی از نمونه‌ها مشخص شد که فعالیت بیوسورفکتانت تولیدشده در برخی منابع کربن بیشتر است (جدول ۲). به‌طوری که محلول حاصل از سانتریفیوژ باکتری در منابع کربن نفت سفید و ملاس در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس و زمان گرماگذاری ۱۶۸ ساعت، دایره‌هایی با قطر بیش ۲ سانتی متر در سطح نفت خام ایجاد نمود.

ج) اثر منابع مختلف کربن بر فروپاشی روغن: نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که شاهد منفی (آب مقطر) در لایه پارافینی موجود در چاهک پلیت سقوط نکرده و مانند یک مهره در سطح پارافین قرار گرفت. درحالی‌که شاهد مثبت (توین ۲۰ درصد) در مدت زمان ۱ دقیقه فروریخت و به ته چاهک منتقل شد. این حالت به‌طور مشابه، برای محلول‌های حاوی ترکیبات باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در هر سه منبع کربن مشاهده گردید. از سوی دیگر در نمونه‌های شاهد حاوی منابع کربن هیچ‌گونه سقوط و یا تغییر حالت در سطح پارافین مایع مشاهده نشد. به‌طوری که قطر قطره محلول حاصل از سانتریفیوژ باکتری در منبع کربن نفت سفید در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس و زمان گرماگذاری ۱۶۸ ساعت، نسبت به سایر منابع کربن و دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و زمان ۴۸ ساعت افزایش یافت (جدول ۲).

د) تاثیر تیمارهای مختلف برفعالیت امولسیون کنندگی: نتایج حاصل از تجزیه آماری و جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر هر یک از تیمارهای دما، زمان، منبع کربن و اثر متقابل آنها بر شاخص امولسیون کنندگی باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است.

حداکثر درصد امولسیون کنندگی (۴۳ درصد) به منبع کربن ملاس در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس و زمان گرماگذاری ۱۶۸ ساعت اختصاص داشت. این مقدار نسبت به درصد امولسیون‌کنندگی سایر منابع کربن اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد نشان داد.

داده‌های نمودار ۱ نشان می دهد که تیمار کاربرد باکتری در مقایسه با تیمار بدون باکتری به صورت معنی‌داری موجب افزایش شاخص امولسیونی شده است. افزایش زمان و دما گرماگذاری در حضور باکتری در تیمار های متناظر به صورت معنی‌داری موجب افزایش شاخص امولسیونی شد اما در عدم

جدول ۲: نتایج آزمون پراکنش و فروپاشی نفت توسط باکتری *باسیلوس لاتروسپروس*.

زمان و دما آزمایش	۴۸ ساعت، ۳۷ °C	۱۶۸ ساعت، ۳۷ °C	۴۸ ساعت، ۳۷ °C	۱۶۸ ساعت، ۳۷ °C
		پراکنش نفت*		
گلوکز	+	++	+	+
نفت سفید	++	+++	+	++
ملاس	++	+++	+	+
توئین ۲۰			+++	
آب مقطر			−	
		فروپاشی نفت**		
گلوکز	+	+	+	+
نفت سفید	+	++	+	+
ملاس	+	+	+	+
توئین ۲۰			++	
آب مقطر			−	

*+ نواحی با قطر کمتر از ۱ سانتی متر، ++ نواحی با قطر ۱ تا ۲ سانتی متر ، +++ نواحی با قطر بیش از ۲ سانتی متر

** + نواحی فروریخته با قطر کمتر از ۶/۰ سانتی متر، ++ نواحی فروریخته با قطر بیشتر از ۶/۰ سانتی متر

Archive of SID

www.SID.ir

حضور باکتری در تیمارهای متناظر تفاوت معنی داری در شاخص امولسیونی حاصل نگردید. شاخص امولسیون کنندگی شاهد مثبت (توئین ۲۰) ٦٨ درصد بود.

ه) تاثیر تیمارهای مختلف برکشش سطحی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر هر یک از تیمارهای منبع کربن، دما، زمان و اثر متقابل آنها بر کشش سطحی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

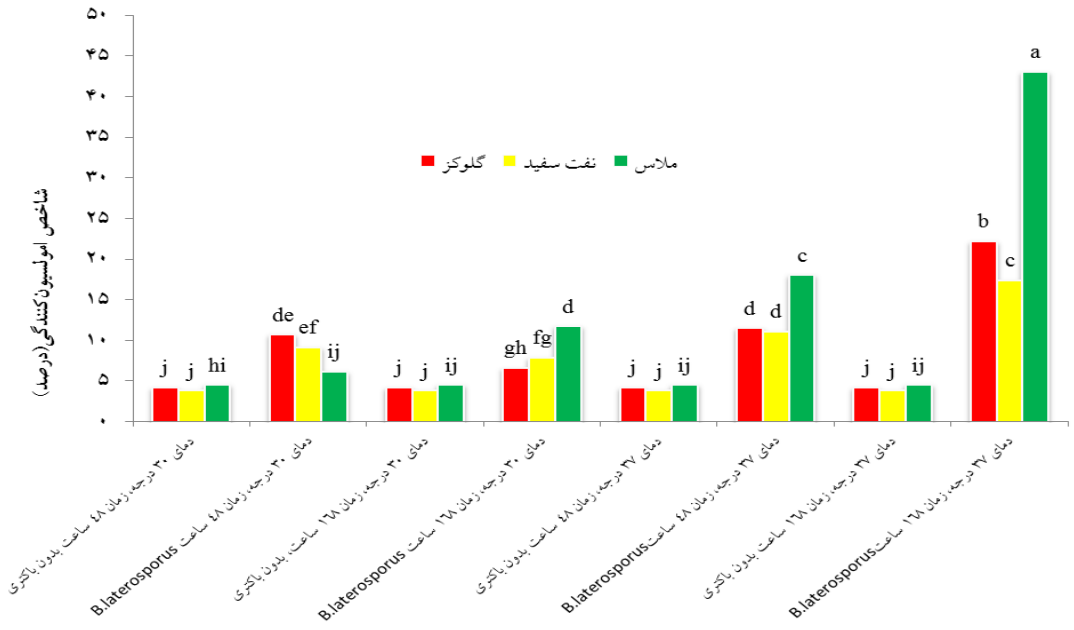
تیمار کاربرد باکتری در مقایسه با تیمار بدون باکتری به صورت معنی‌داری باعث کاهش کشش سطحی شد (نمودار ۲). افزایش زمان و دمای گرماگذاری در حضور باکتری در تیمارهای متناظر به صورت معنی داری موجب کاهش کشش سطحی محیط گردید. اما در عدم حضور باکتری در تیمارهای متناظر تفاوت معنی داری در کشش سطحی حاصل نگردید. با افزایش دمای گرماگذاری کشش سطحی محیط های حاوی منابع مختلف کربن به طور معنی داری نسبت به نمونه های بدون باکتری افزایش نشان دادند. کشش سطحی شاهد مثبت (توئین ۲۰) ۳۵/۸ میلی نیوتون بر متر بود.

در میان منابع کربن مورد استفاده بیشترین کاهش کشش سطحی و درنتیجه تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در منبع کربن نفت سفید ایجاد شد (نمودار ۲). به طوری که این باکتری توانست کشش سطحی محیط حاوی نفت سفید را از ٦٣/٦ به ۲۱/۲۸ میلی نیوتن بر متر کاهش دهد.

و) تاثیر منابع مختلف کربن بر آب گریزی سطح سلول : تجزیه واریانس و آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که اثر منبع کربن بر آب گریزی سطح سلول باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در سطح یک درصد معنی دار است.

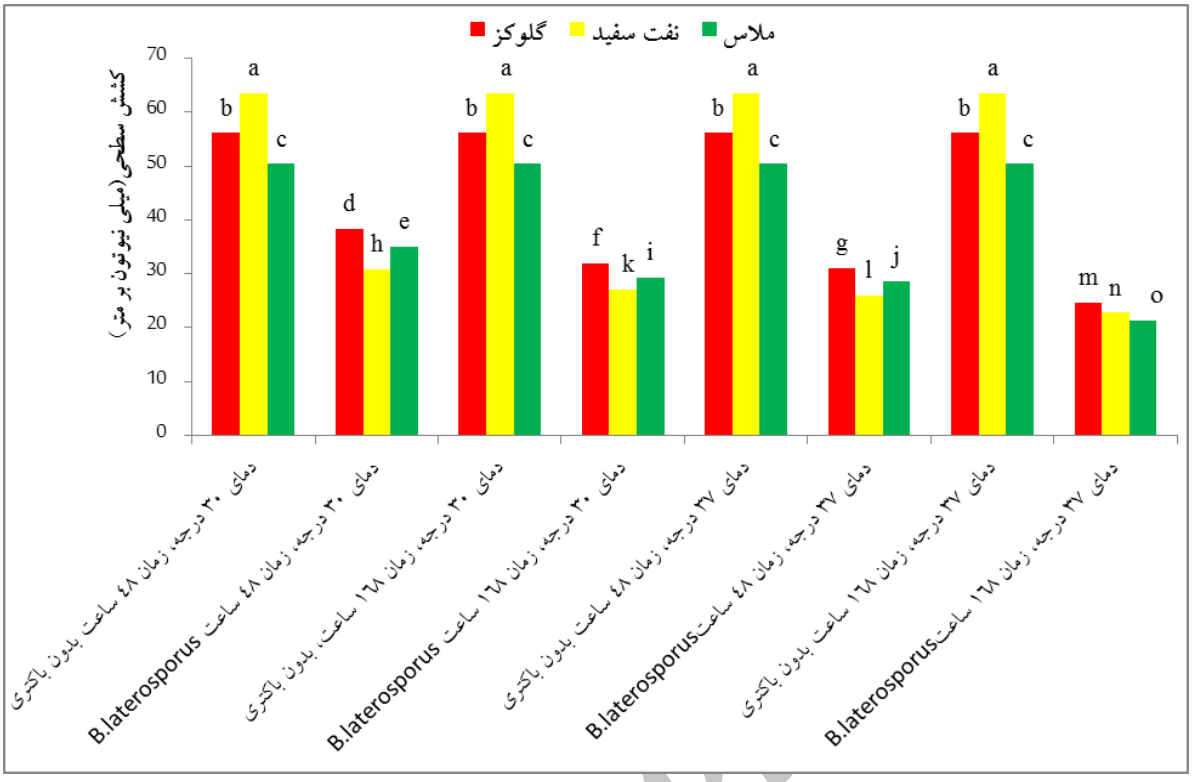
نتایج نشان داد که آب گریزی سطح سلول با توجه به منبع کربن در محیط کشت تغییر می‌کند و وابستگی بسیار زیادی به منبع کربن دارد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار بین منابع کربن گلوکز، نفت سفید و ملاس از نظر آب گریزی سطح سلول باکتری است. درصد آب گریزی سطح سلول باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در منبع کربن نفت سفید، ملاس و گلوکز به ترتیب ٦٥، ٥٨ و ٥٠ درصد بود.

ز) مقدار تولید بیوسورفکتانت: مقدار بیوسورفکتانت تولید شده به وسیله باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در منابع کربن گلوکز، نفت سفید و ملاس در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس و زمان ۱٦٨



نمودار ۱: میانگین اثر متقابل زمان، دما و منبع کربن بر شاخص امولسیون کنندگی *باسیلوس لاتروسپروس* (میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی دار نیستند).

www.SID.ir



نمودار ۲: میانگین اثر متقابل کاربرد منبع کربن، دما و زمان بر کشش سطحی باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* (میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی دار نیستند).

ساعت که دمای بهینه تولید بیوسورفکتانت بود، جداسازی و اندازه گیری شد. مقدار بیوسورفکتانت تولید شده در منبع کربن نفت سفید با ۸/٤ گرم بر لیتر نسبت به منبع گلوکز (۱/۳ گرم بر لیتر) و ملاس (۵/۸ گرم بر لیتر) بالاتر بود. همچنین بیشترین کاهش کشش سطحی نیز مربوط به منبع کربن نفت سفید بود.

بحث

در سال‌های اخیر با توجه به کاربردهای فراوان بیوسورفکتانت ها در صنایع مختلف، تولید آن ها در پژوهش‌های فراوانی مورد بررسی قرارگرفته است. محققین از روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید بیوسورفکتانت استفاده نموده‌اند. از میان این روش‌ها بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت ارزان‌تر و آسان‌تر از سایر روش‌ها می باشد (۲۸).

در این مطالعه قابلیت تولید بیوسورفکتانت به‌وسیله باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در دو دوره زمانی (٤٨ و ١٦٨ ساعت) و توانایی مصرف گلوکز، ملاس نیشکر و نفت سفید به‌عنوان منبع کربن و انرژی در دو دمای متفاوت بررسی شد.

در پژوهش حاضر فعالیت همولیتیک باکتری‌ها به‌عنوان اولین شاهد کیفی برای تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* دارای همولیز مثبت یا β بودند. لاکشمی پتی (Lakshmipathy) و همکاران نیز از این روش برای بررسی تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های جداسازی شده خود استفاده نمودند (۲۰).

اولین بار فعالیت همولیتیک بیوسورفکتانت‌ها، توسط برن هایمر (Bernheimer) و اویقاد (Avigad) در سال ۱۹۷۰ برای بیوسورفکتانت تولید شده به وسیله ی *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) گزارش شد (۲۹). اختصاصی نبودن این روش، از محدودیت‌های آن محسوب می‌شود. زیرا ممکن است هاله شفاف اطراف کلنی در نتیجه حضور آنزیم‌های همولیتیک تولید شده توسط باکتری به وجود آمده باشد. عدم همولیز

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های قرمز خون نیز می‌تواند ناشی از محدودیت انتشار سورفکتانت در محیط حاوی آگار باشد. به همین منظور در ادامه، توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط این دو باکتری با روش دقیق‌تر و کمی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج آزمون پراکنش و فروپاشی نفت در مورد باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* مثبت و نشان دهنده تولید بیوسورفکتانت بود. بیشترین میزان پراکنش و فروپاشی در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس و پس از ۱۶۸ ساعت گرماگذاری حاصل گردید.

روش پراکنش نفت و فروپاشی روغن روشی سریع و آسان برای تشخیص بیوسورفکتانت می باشد که بدون نیاز به تجهیزات و تنها با حجم کوچکی از نمونه انجام می‌شود. این روش نسبت به مقادیر کم بیوسورفکتانت نیز واکنش نشان می‌دهد. یوسف (Youssef) و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مورد روش های غربالگری سویه های مولد بیوسورفکتانت، روش گسترش نفت را بهترین آزمون برای غربالگری تعیین کردند (۳۰).

در روش فروپاشی نفت، قطره‌ای که حاوی بیوسورفکتانت می باشد در سطح نفت منهدم و پخش می‌گردد. این روش ساده بوده و برای غربالگری هم زمان تعداد زیادی سویه استفاده می شود. تاگرول (Tugrul) و کنسونار (Cansunar) در سال ۲۰۰۵ از این روش برای غربالگری بیوسورفکتانت باکتری های *سودوموناس آئروجینوزا* و *باسیلوس سوبتیلیس* استفاده کردند و از آن به عنوان روشی سریع در تشخیص تولید بیوسورفکتانت یاد کردند (۳۱).

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که بیشترین شاخص امولسیونی در دو منبع کربن ملاس و گلوکز ایجاد شده است. ولی در مجموع فعالیت امولسیون کنندگی باکتری در هر سه منبع کربن پایین (ملاس ۴۳، گلوکز ۲۲/۲۲ و نفت سفید ۱۷/۴ درصد) بود. موگاد (Mawgoud) و همکاران در سال ۲۰۰۸ از شاخص امولسیون کنندگی در منابع کربن n-هگزادکان، نفت سفید و دیزل برای یک گونه از باکتری *باسیلوس* استفاده کردند و حداکثر شاخص امولسیون کنندگی ۶۰ درصد را در منبع n-هگزادکان گزارش کردند (۳۲). پورتیلا (Portilla) و همکاران در سال ۲۰۰۸ از شاخص امولسیون کنندگی برای تولید بیوسورفکتانت توسط *لاکتوباسیلوس پنتوسس* (*Lactobacillus pentosus*) استفاده کردند. درصد امولسیون کنندگی در مطالعه آنها بین ۳۸ تا ۴۲ درصد در منبع کربن گازوئیل گزارش گردید (۳۳). برای اطمینان بیش‌تر از تولید بیوسورفکتانت و تعیین شرایط بهینه برای تولید آن کشش سطحی نمونه‌ها نیز اندازه‌گیری شد. کمیت و کیفیت تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها تحت تأثیر ماهیت منبع کربن می باشد (۳۴).

در مطالعه حاضر باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* بیشترین کاهش کشش سطحی را در محیط حاوی نفت سفید نشان داد. به طوری که کشش سطحی از ۶۳/۶ به ۲۱/۲۸ میلی نیوتن بر متر کاهش یافت. پروثی (Pruthi) و کامئوترا (Cameotra) کشش سطحی محیط معدنی حاوی منبع کربن هگزادکان را در نتیجه تولید بیوسورفکتانت توسط *باسیلوس لاتروسپروس* معادل ۳۲ دین بر سانتی متر گزارش کردند (۴). این میزان نسبت به پژوهش حاضر بیشتر بوده و نشان دهنده توانایی بیشتر باکتری پژوهش حاضر در تولید بیوسورفکتانت می باشد.

الایه (Ellaiah) و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی قابلیت تولید بیوسورفکتانت در سویه‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن دریافتند که تولید بیوسورفکتانت در باکتری از گونه *سودوموناس* در محیط کشت حاوی نفت سفید بسیار بیشتر از محیط حاوی گلوکز به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی است (۳۵). ریسمانی (Rismani) و همکاران در سال ۲۰۰۶ قدرت تولید بیوسورفکتانت را در *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) جدا سازی شده از آب‌های خلیج فارس با انجام آزمون های همولیتیک، امولسیون کنندگی و کشش سطحی مورد بررسی قرار دادند. همچنین اثر منابع مختلف کربن بر تولید بیوسورفکتانت ارزیابی گردید (۳۶). یافته های آنها نشان داد که باکتری دارای فعالیت همولیتیکی با ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی بود. این باکتری در محیط حاوی

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۵ درصد نفت خام با ۵۵ درصد امولسیون کنندگی و کاهش کشش سطحی محیط کشت از ۷۲ به ۳۵ میلی نیوتون بر متر بیشترین تولید بیوسورفکتانت را داشت. بهترین بیوسورفکتانت لیپوپپتیدی، سورفاکتین با کشش سطحی کمتر از ۲۷ میلی نیوتون بر متر بود (۳۶). فرانسی (Francy) و همکاران سویه هایی که بیشتر از ۱۰ دین بر سانتی متر مربع کاهش در کشش سطحی ایجاد می نمودند را به عنوان سویه های مناسب تولید کننده بیوسورفکتانت معرفی کردند (۳۷).

بررسی اثر دما بر تولید بیوسورفکتانت نشان داد که کشش سطحی در محیط کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس کاهش بیشتری می‌یابد. در واقع تولید بیوسورفکتانت کاملاً وابسته به دمای گرماگذاری می باشد. بررسی اثر زمان بر تولید بیوسورفکتانت نیز نشان داد که بیشترین کاهش کشش سطحی پس از ۱۶۸ ساعت دوره گرماگذاری حاصل می‌گردد. ایلوری (Ilori) و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش نمودند که بیشترین میزان تولید بیوسورفکتانت گلیکولیپیدی توسط جنس *آئرومونا*س (*Aeromonas*) در محیط کشت حاوی نفت پس از ۸ روز ایجاد می گردد (۳۸).

دی سوسا (de Sousa) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که حداکثر تولید رامنولیپید توسط سویه *سودوموناس آئروجینوزا* در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس می باشد (۳۹). همچنین ابوسعود (Abouseoud) و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که افزایش دما از ۲۵ به ۵۰ درجه سیلیسیوس کشش سطحی را به‌صورت خطی کاهش می‌دهد. اما این افزایش دما هیچ تأثیری در درصد امولسیون کنندگی ندارد (۴۰). باقری (Bagheri) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که کاهش درجه حرارت از ۳۷ به ۳۰ و ۲۵ درجه سیلیسیوس موجب افزایش کشش سطحی محیط کشت (به ترتیب ۳۳ و ۴۵ میلی نیوتون بر متر) و کاهش سریع تولید بیوسورفکتانت می گردد (۱).

بررسی آب‌گریزی سطح سلول باکتری‌ها در مطالعه حاضر نشان داد که باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* دارای سطح آب گریزی قابل توجهی در هر سه منبع کربن نفت سفید، ملاس و گلوکز است. به طوری که بیشترین میزان آب گریزی سطح سلول باکتری در منبع کربن نفت سفید (۶۵ درصد) مشاهده شد که نتایج حاصل از کشش سطحی که در این منبع پایین تر از دو منبع دیگر بود را تایید نمود. کازورک (Kaczorek) در سال ۲۰۱۲ درصد آب گریزی سطح سلول باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* جداسازی شده از مناطق آلوده نفتی، را در منبع کربن گلوکز ۱۸ و در منبع کربن روغن دیزل ۳۱ گزارش نمود (۵).

از آنجایی‌که هیدروکربن ها ترکیبات غیرقطبی هستند، بنابراین میزان انحلال آنها در آب بسیار پایین است. در نتیجه قابلیت دسترسی باکتری‌ها به آنها به سختی خواهد بود. باکتری‌ها برای استفاده بهتر از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی، باید قادر به واردکردن میزان بیشتری از فاز آلی (غیرقطبی) به فاز آبی (قطبی) باشند. به همین منظور هر چه سطح سلول باکتری آب‌گریزتر باشد یا به عبارت دیگر هیدروفوبیسیته سطح سلولی بیشتر باشد، تولید بیوسورفکتانت بیشترمی‌شود و میزان بیشتری از هیدروکربن‌ها مورد استفاده قرار می گیرد.

در پژوهش حاضر، مقدار بیوسورفکتانت تولید شده توسط *باسیلوس لاتروسپروس* در منبع کربن نفت سفید با ۸/٤ گرم بر لیتر نسبت به دو منبع دیگر کربن بالاتر بود و بیشترین کاهش کشش سطحی نیز مربوط به منبع کربن نفت سفید به دست آمد. پروتی و کامئوترا مقدار تولید بیوسورفکتانت توسط *باسیلوس لاتروسپروس* در محیط معدنی نمک حاوی ۲ درصد هگزادکان به عنوان منبع کربن را در روز هفتم کشت حدود ٦/۲ گرم بر لیتر گزارش کردند که نسبت به پژوهش حاضر کمتر بود (٤). مقدار بیوسورفکتانت تولید شده در منبع کربن نفت سفید با ۸/٤ گرم بر لیتر نسبت به منبع گلوکز (۱/۳گرم بر لیتر) و ملاس (۵/۸ گرم بر لیتر) بالاتربود که بیشترین کاهش کشش سطحی نیز مربوط به منبع کربن نفت سفید بود.

آپارنا (Aparna) و همکاران در سال ۲۰۱۲ حداکثر تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *سودوموناس اس پی* 2B را در یک درصد ملاس به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و ۹٦ ساعت گرماگذاری، ٤/۹۷ گرم بر لیتر گزارش کردند (٤۱).

Archive of SID

www.SID.ir

باتیستا (Batista) و همکاران در سال ۲۰۰۶ حداکثر تولید بیوسورفکتانت را در حضور منبع کربنی مختلف توسط باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های آبی و خاکی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان دهنده تولید بالاتر بیوسورفکتانت در حضور گلوکز به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود (۴۲).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با افزایش دما و زمان گرماگذاری به ترتیب از ۳۰ به ۳۷ درجه سیلیسیوس و ۴۸ به ۱۶۸ ساعت بر اساس نتایج آزمون ها تولید بیوسورفکتانت افزایش می یابد. همچنین بهترین منبع کربن برای تولید بیوسورفکتانت به وسیله باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* نفت سفید بود. به دلیل کاهش قابل‌توجه کشش سطحی در محیط حاوی نفت توسط *باسیلوس لاتروسپروس* می‌توان قابلیت استفاده از این باکتری را برای پالایش مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی اعم از خاک و آب بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Bagheri L, Shourian M, Rootaazad R, Rouholamini NA, Adelzadeh AR, Noghabi K. An efficient biosurfactant-producing *bacterium Pseudomonas aeruginosa MR01*, isolated from oil excavation areas in south of Iran. Coll surf B: Bioin. 2009; 69: 183-193.
2. Najafi AR, Rahimpour MR, Jahanmiri AH, Roostaazad R, Arabian D, Ghobadi Z. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. Chem Eng J. 2010; 163(3): 188-194.
3. Rufino RD, de Luna JM, de Campos Takaki GM, Sarubbo LA. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. Elect J Biotechnol. 2014; 17(1): 34-38.
4. Pruthi V, Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. Biotechnol Tech. 1997; 11(9): 671-674.
5. Kaczorek E. Effect of external addition of rhamnolipids biosurfactant on the modification of gram positive and gram negative bacteria cell surfaces during biodegradation of hydrocarbon fuel contamination. Polish J Environ Stu. 2012; 21(4): 901-909.
6. Jain RM, Mody K, Joshi N, Mishra A, Jha B. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. Int J Biol Macromol. 2013; 62: 52-58.
7. Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, García F, Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soyabean oil refinery wastes. Langmuir. 2001; 17: 1367-1371.
8. Makkar RS, Cameotra SS, Banat IM. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Exp. 2011; 1(15): 1-19.
9. Ibrahim ML, Ijah UJJ, Manga SB, Bilbis LS, Umar S. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. Int Biodet Biodeg. 2013; 81: 28-34.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Joshi SJ, Geetha SJ, Yadav S, Desai AJ. Optimization of bench-Scale production of biosurfactant by *Bacillus Licheniformis* R2. Apcbee Procedia. 2013; 5: 232-236.

11. George S, Jayachandran K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. Appl Biochem Biotechnol. 2008; 158(3): 694-705.

12. Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis sp*. B4. Desalination. 2012; 285: 198-204.

13. Abbasi S. Biological remedation of municipal and industrial wastewater using *Potamogeton brchtoldii* and resistant bacteria isolated from wastewater. M.Sc. thesis. 2013. Agriculture Faculty. Shahid Chamran University of Ahvaz.

14. Zhang X, Li M, Xiang T. Genetic modification of MEOR bacterium *Bacillus licheniformis* H strain by low energy ion beam irradiation. Open Biotechnol J. 2010; 4: 14-17.

15. Saravanan V, Vijayakumar S. Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. J Acad Indus Res. 2012; 1(5): 264-268.

16. Dhail S, Jasuja N D. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria. Afr J Environ Sci Technol. 2012; 6(6): 263-266.

17. Varjani SJ, Rana DP, Bateja S, Sharma MC, Upasani VN. Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. Engin Technol. 2014; 3(2): 9205-9213.

18. Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T. A study on the structure–function relationship of lipopeptidebiosurfactants. BBA Mol Cell Biol Lipids. 2000; 1488(3): 211-218.

19. Nasr S, Soudi MR, Mehrnia MR. Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus spp*. isolated from petroleum contaminated soil. Iran J Microbiol. 2009; 1(2): 54-61.

20. Lakshmipathy TD, Prasad AA, Kannabiran K. Production of biosurfactant and heavy metal resistance activity of *Streptomyces* Sp. VITDDK3-novel halo tolerant actinomycete isolated from saltpan soil. Adv Biol Res. 2010; 4(2): 108-115.

21. Nawawi WMFW, Jamal P, Alam MZ. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. Bioresour Technol. 2010; 101(23): 9241-9247.

22. Pereira JF, Gudiña EJ, Costa R, Vitorino R, Teixeira JA, Coutinho JA, Rodrigues LR. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. Fuel. 2013; 111: 259-268.

23. Viramontes-Ramos S, Portillo-Ruiz MC, Ballinas-Casarrubias MDL, Torres-Muñoz JV, Rivera-Chavira BE. Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. Braz J Microbiol. 2010; 41(3): 668-675.

24. Whitfield C, Roberts I. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol. 1999; 31(5): 1307-1319.

25. Nakar D, Gutnick D. Involvement of a protein tyrosine kinase in production of the polymeric bioemulsifier emulsan from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. J Bacteriol. 2003; 185(3): 1001-1009.

Archive of SID

www.SID.ir

26. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett. 1980; 9(1): 29-33.

27. Zhang Y, Miller R. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl Environ Microbiol. 1994; 60(6): 2101-2106.

28. Zheng C, Wang M, Wang Y, Huang Z. Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. Bioresour Technol. 2012; 110: 338-342.

29. Bernheimer AW, Avigad LS. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis.* J Gen Microbiol. 1970; 61(3): 361-369.

30. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microb Methods. 2004; 56(3): 339-347.

31. Tugrul T, Cansunar E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. J Microbiol Biotechnol. 2005; 21(6-7): 851-853.

32. Mawgoud ANM, Aboulwafa MM, Hassouna NA. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. Appl Biochem Biotechnol. 2008; 150(3): 289-303.

33. Portilla-Rivera O, Torrado A, Domínguez JM, Moldes AB. Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. J Agr Food Chem. 2008; 56(17): 8074-8080.

34. Raza ZA, Khan MS, Khalid ZM. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. Process Biochem 2007; 42(4): 686-692.

35. Ellaiah P, Prabhakar T, Sreekanth M, Taleb AT, Raju PB, Saisha V. Production of glycolipids containing biosurfactant by *Pseudomonas* species. Indian J Exp Biol. 2002; 40(9): 1083-1086.

36. Rismani E, Fooladi J, Ebrahimipor GH. biosurfactant production in batch culture by a *Bacillus licheniformis* isolated from the Persian Gulf. Pak J Biol Sci. 2006; 9(13): 2498-2502.

37. Francy DS, Thomas JM, Raymond RL, Ward CH. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. J Ind Microbiol Biotechnol. 1991; 8(4): 237-245.

38. Ilori MO, Amobi CJ, Odocha AC. Factor's affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* sp. isolated from a tropical environment. Chemosphere. 2005; 61(7): 985-992.

39. de Sousa J, Correia J, Almeida J, Sueli Rodrigues S, Pessoa O, Melod V, Goncalves L. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by P. aeruginosa MSIC02. Process Biochem. 2011; 46: 1831-1839

40. Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, Boudergua S, Nabi A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens.* Desalination. 2008; 223: 143-151.

41. Aparna A, Srinikethan G, Smitha H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonassp.* 2B. Coll Surf B: Bioint. 2012; 95: 23-29.

42. Batista SB, Mounteer AH, Amorim FR, Totola MR. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. Bioresour Technol. 2006; 97(6): 868-875.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 4, January 2015

Original Article

The survey of biosurfactant production by *Bacillus laterosporus* in various carbon sources

Mahboobeh Varnaseri Ghandali[1], Abdolamir Moezi[2], Naeimeh Enayatizamir[3]

[1]MS.c., Department of Soil Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Soil Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Soil Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Biosurfactants are surface active compounds that produce by microorganisms. They are used in various industries such as petroleum, chemical, petrochemical, food industry, medicine, agriculture, etc. The purpose of this study was to optimize the production of biosurfactant in different carbon sources by *Bacillus laterosporus*.

Materials & Methods: In this study, *Bacillus laterosporus* was provided from the microbial collection of Shahid Chamran University of Ahwaz. Biosurfactant production was evaluated in different carbon sources such as kerosene, glucose and sugar cane molasses at 30 and 37° C and the incubation periods of 48 and 168 hours. Screening of biosurfactant production was carried out using oil collapse and emulsification index, surface tension, and cell surface hydrophobicity.

Results: *Bacillus laterosporus* showed the lowest surface tension reduction in kerosene carbon source after 168 hours incubation at 37 ° C, and decreased surface tension to 21.28 mN/m. The highest percentage of emulsification was related to medium containing molasses carbon source (43%). *Bacillus laterosporus* cell surface hydrophobicity in kerosene, molasses and glucose was 65, 58 and 50 %, respectively. Maximum biosurfactant production by *Bacillus laterosporus* obtained in kerosene carbon source around 8.4 gr/L

Conclusion: The results showed that 37° C, 168 hours incubation and also using kerosene as carbon sources make the optimum condition for biosurfactant production by indigenous strain of *Bacillus laterosporus.*

Keywords: *Bacillus laterosporus,* Biosurfactant, Kerosene, Surface tension.

Correspondence to: Mahboobeh Varnaseri Ghandali

Tel: +989169867260

E-mail: Mahboobe.varnaseri@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 7(4): 308-320.

Archive of SID

www.SID.ir