Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):223-229

The effect of Nanoparticles on the Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa for Use in the Oil Industry

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Alamdar N.[1] *MSc,*
Rasekh B.*[2] *PhD,*
Yazdian F.[3] *PhD*

How to cite this article
Alamdar N, Rasekh B, Yazdian F. The effect of Nanoparticles on the Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa for Use in the Oil Industry. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):223-229.

[1]Biotechnology Department, Advanced Science & Technology Faculty, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Microbiology & Biotechnology Research Department, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran
[3]Science Engineering Department, New Sciences & Technology Faculty, Tehran University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Microbiology & Biotechnology Research Department, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 48255141
Fax: -
b.rasekh@gmail.com

Article History
Received: October 18, 2016
Accepted: May 27, 2017
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Biosurfactants are surface tension reducing compounds produced by a wide range of microorganisms. These compounds are caused to facilitate the absorption insoluble substrate by microbial cells. The aim of this study was to investigate the effects of nanoparticles of Fe/SDS on the biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa in culture is molasses.
For this purpose were used different concentrations of nanoparticles 1, 500 and 1000 mg/L. As a result the concentration of 1mg /L of Fe/SDS nanoparticles has the best effect on the growth of bacteria and biosurfactant production. This concentration increased 23.21% cell growth and 20.73% biosurfactant production compared with control samples. By increasing the concentration of nanoparticles reduced growth rate and biosurfactant production was observed. This indicates that the nanoparticles having negative effects of higher concentrations. The results showed that low concentrations of nanoparticles Fe/SDS has positive effects on bacterial biosurfactant production and therefore a good alternative to chemical surfactants for use in the petroleum industry.

Keywords Biosurfactant; Pseudomonas aeruginosa; Nanoparticles; Fe/SDS

CITATION LINKS

[1] Optimization of the production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa strains [2] Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications-Present Status and Future Potentials [3] Production and characterization of rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa san-ai [4] Biosurfactant-isolation, production, purification & significance [5] Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous Pseudomonas aeruginosa strains [6] Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications [7] Production of Microbial rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa MM1011 for ex situ enhanced oil recovery [8] Biosurtactant production by Psedomonas aeroginosa in kefir and fish meal [9] Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application [10] Effects of Au/Fe and Fe nanoparticles on Serratia bacterial growth and production of biosurfactant [11] Effects of Fe nanoparticles on bacterial growth and biosurfactant production [12] Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine Nocardiopsis sp [13] Biosurfactant: Production and Application [14] Production of Rhamnolipid boisurfactant from a marine Pseudomonas aeruginosa [15] Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil [16] Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by pseudomonas aeruginosa ATCC 55925 [17] Microbial production of surfactants and their commercial potential [18] Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs [19] Enhancement of Pseudomonas Aeruginosa Growth and Rhamnolipid Production Using Iron-Silica Nanoparticles in Low-Cost Medium [20] Rhamnolipid biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa MR01 using vegetable oil refinery wastes [21] Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus Acinetobacter spp and antibacterial effects of biosurfactant produced on some of the negative and gram-positive bacteria in vitro [22] Isolation and comparison of Rhamnolipids production in Pseudomonas aeruginosa P.B:2 and Pseudomonas fluorescens P.V:10 [23] Isolation And Characterization Of Pseudomonas aeruginosa From Waste Soybean Oil As Biosurfactants Which Enhances Biodegradation Of Industrial Waste With Special Reference To Kosmi Dam, Betul District, (M.P.)[24] Antimicrobial sensibility of Streptococcus mutans serotypes to silver nanoparticles ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی اثر نانوذره Fe/SDS بر میزان تولید بیوسورفاکتانت حاصل از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* برای کاربرد در صنایع نفتی

ندا علمدار MSc
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
بهنام راسخ* PhD
گروه پژوهش میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران
فاطمه یزدیان PhD
گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، ایران

چکیده
بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات کاهش‌دهنده کشش سطحی بوده که توسط طیف گسترده‌ای از میکروارگانیزم‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات سبب تسهیل در جذب سوبستراهای غیرقابل حل توسط سلول‌های میکروبی می‌شوند. ارزشمندترین جنبه کاربردی بیوسورفاکتانت‌ها به‌ویژه رامنولیپید حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* مربوط به صنعت نفت بوده که به‌منظور تسهیل استخراج و انتقال نفت خام و پاکسازی نفت‌کش‌ها می‌تواند استفاده شود. هدف پژوهش تجربی حاضر بررسی اثر نانوذره Fe/SDS بر میزان تولید رامنولیپید حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت ملاس بود. برای این منظور از غلظت‌های مختلف یک، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر نانوذره Fe/SDS استفاده شده است. در بین سایر غلظت‌های استفاده‌شده، غلظت یک‌میلی‌گرم بر لیتر از نانوذره Fe/SDS دارای بهترین میزان اثر بر میزان رشد باکتری و در نتیجه میزان تولید بیوسورفاکتانت بوده است. به‌طوری که سبب افزایش ۲۳/۲۱% رشد سلول‌ها شده که در نتیجه این تعداد از سلول‌ها سبب افزایش تولید بیوسورفاکتانت به میزان ۲۰/۷۳% در مقایسه با نمونه کنترل شد. لازم به ذکر است افزایش غلظت این نانوذره از یک‌میلی‌گرم بر لیتر به ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش تدریجی میزان رشد سلول‌ها و تولید بیوسورفاکتانت شد که این امر ممکن است نشان‌دهنده دارابودن اثرات منفی این نانوذره در غلظت‌های بالاتر است و همچنین بهترین میزان امولسیون‌کنندگی بیوسورفاکتانت مربوط به نمونه کنترل در روز سوم (۷۲ساعت) است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد با استفاده از غلظت‌های کم نانوذره Fe/SDS می‌توان میزان تولید رامنولیپید حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* را افزایش داد.

کلیدواژه‌ها: بیوسورفاکتانت، *سودوموناس آئروژینوزا*، نانوذره، Fe/SDS

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۶
*نویسنده مسئول: b.rasekh@gmail.com

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها برای اولین‌بار در اواخر سال ۱۹۶۰ به‌عنوان عوامل حل‌کننده هیدروکربن‌ها مورد توجه قرار گرفتند. در طول دو دهه گذشته بیوسورفکتانت‌ها تحت بررسی‌های مستمر بودند تا به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای سورفاکتانت‌های شیمیایی باشند[1, 2].

بیوسورفکتانت‌ها از متابولیت‌های ثانویه خارج سلولی یا متصل به غشای سلولی هستند که توسط گونه‌های مختلف میکروارگانیزم‌ها اعم از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها در آغاز فاز سکون تولید می‌شوند که بسته به گونه تولیدکننده آن دارای خواص شیمیایی و اندازه مولکولی متفاوتی هستند[3, 4].

برخی از ویژگی‌های مهم و شاخص بیوسورفکتانت‌ها که سبب برتری آنها در مقایسه با سورفاکتانت‌های شیمیایی می‌شود شامل سمیت پایین، زیست‌تخریب‌پذیری بالا، عملکرد انتخابی، فعالیت اختصاصی، امکان تولید از مواد خام ارزان‌قیمت، خواص ضدمیکروبی، تولید آسان‌تر و تنوع بیشتر بیوسورفاکتانت‌ها و همچنین مقاومت در شرایط افراطی مانند درجه حرارت‌های بالا و غلظت‌های زیاد نمک و تغییرات pH هستند[2, 5-8].

در عصر حاضر علم نانوتکنولوژی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و یکی از مهم‌ترین علوم بین‌رشته‌ای محسوب می‌شود. توسعه و کاربرد نانوتکنولوژی این پتانسیل را دارد که تا حد زیادی سبب بهبود کیفیت زندگی شود. اگرچه پتانسیل بسیار زیادی در فناوری نانو وجود دارد اما ایجاد سمیت سلولی توسط نانوذرات همیشه به‌عنوان یک نگرانی عمده محسوب می‌شود[9].

نانوذره Fe به‌دلیل سازگاری بالا و خاصیت مغناطیسی که دارد، در دارورسانی هدفمند بسیاری از سرطان‌ها استفاده می‌شود. در اکثر مقالات اثرات نانوذره Fe و مشتقات آن، روی فرآیندهای مختلف باکتریایی مانند میزان رشد باکتری، مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج قابل قبولی مشاهده شده است. فرآیند پوشش‌دارکردن نانوذره Fe اغلب به‌دلیل کاهش میزان اکسیدکنندگی نانوذره Fe صورت گرفته است[9-12].

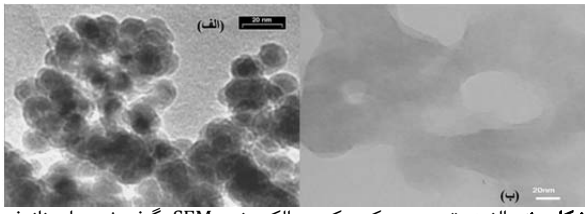
از این رو نانوذره آهن‌دار انتخاب‌شده در این تحقیق توسط سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) پوشش‌دار شده است. انتخاب SDS به‌عنوان پوششی برای نانوذره آهن به‌دلیل استفاده از این دترجنت در صنایع مرتبط با حذف آلودگی‌های نفتی از محیط زیست به‌ویژه خاک صورت گرفته است. کاربردهای فرآوان بیوسورفاکتانت‌ها در صنایع مختلف، آنها را به‌عنوان یکی از بیشترین ترکیبات مورد تقاضا در صنعت معرفی می‌کند. به‌صورت اجمالی در سال ۲۰۱۳ در گزارشی عنوان شده است که مصرف بیوسورفاکتانت‌ها در صنعت نفت ۳۳%، صنعت آرایشی بهداشتی و شوینده‌ها ۱۵%، صنعت پزشکی به‌عنوان ضدمیکروب ۱۲% و صنعت محیط زیست به‌منظور حذف آلودگی‌های زیست‌محیطی ۱۱% است[13].

رامنولیپیدها از مهم‌ترین بیوسورفاکتانت‌های گلیکولیپیدی هستند که توسط *سودوموناس آئروژینوزا* تولید می‌شوند. مهم‌ترین کاربرد آنها در صنعت نفت به‌منظور افزایش بازیافت نفت به روش میکروبی MEOR [1, 3] یا حذف آلاینده‌های نفتی از محیط زیست[14-16] و همچنین پاکسازی نفت‌کش‌ها و حمل‌ونقل آسان‌تر نفت خام است[8, 17].

هدف از این تحقیق بررسی میزان رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و تولید بیوسورفکتانت حاصل از آن در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذرات است که امیدواریم نتایج حاصل بتواند به‌عنوان یک راهنمای مفید برای کاربردهای مختلف در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد: نانوذره Fe/SDS استفاده‌شده در تحقیق تجربی حاضر، از شرکت مهندسی زیست‌تجهیز پارس خریداری شده است. خصوصیات این نانوذره توسط تصویر میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. شکل حاصل نشان‌دهنده نانوذرات کروی با قطر ۲۰نانومتر بود (شکل ۱- الف و ب).



شکل ۱) الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM گرفته‌شده از نانوذره Fe/SDS؛ ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM گرفته‌شده از سوسپانسیون نانوذره Fe/SDS در محیط کشت باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

بافر استفاده‌شده در این تحقیق، بافر نمکی PBS (کلریدسدیم ۸/۰۱گرم بر لیتر، کلریدپتاسیم ۰/۲گرم بر لیتر، دی‌سدیم‌هیدروژن‌فسفات ۲آبه ۱/۷۸گرم بر لیتر، پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات ۰/۲۷گرم بر لیتر، میزان pH برابر با ۷/۴) بوده که یک بافر پرکاربرد زیستی محسوب می‌شود. از این بافر به‌منظور ایجاد یک امولسیون پایدار برای نانوذره استفاده شده است[9-11].

میکروارگانیزم استفاده‌شده در تحقیق حاضر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PBCC5 است که از بانک ذخایر زیستی پژوهشکده صنعت نفت تهیه شده است. این باکتری اولین‌بار از خاک‌های آلوده به نفت جنوب ایران جداسازی شده و توانایی تولید بیوسورفاکتانت آن سنجیده شده است. این باکتری دارای DNA خطی با ۱۴۱۰جفت‌باز در بانک ژنی ثبت شده است. خصوصیات این باکتری توسط روش‌های تشخیصی رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی توسط چشم غیرمسلح، پس از ۴۸ساعت نگهداری در انکوباتور درون محیط کشت نوترینت‌آگار، مورد بررسی قرار گرفت[18].

تهیه منحنی رشد باکتری در محیط کشت ملاس: ملاس استفاده‌شده در این تحقیق از کارخانه قند و شکر مرودشت شیراز خریداری شد. تمامی محیط کشت‌ها حاوی ملاس ۱۵% (وزنی-حجمی) بوده‌اند. ابتدا pH محیط توسط اسیدهیدروکلریدریک یک‌مولار به ۷ رسید و توسط دستگاه اتوکلاو سترون‌سازی انجام شد[19].

پس از تهیه کشت شبانه، تلقیح میکروبی به محیط کشت ملاس صورت گرفت و هر دو ساعت در شرایط کاملاً سترون از محیط کشت نمونه‌گیری شد و توسط دستگاه اسپکتوفتومتر رشد باکتری براساس میزان تراکم سلولی در طول موج ۶۰۰نانومتر اندازه‌گیری شد[9]. در پژوهش‌های متعددی نانوذرات از طریق کاهش فاز کمون و افزایش فاز لگاریتمی و سکون سبب افزایش رشد میکروارگانیزم‌ها می‌شوند که بدین‌منظور در ابتدا به محیط کشت باکتری اضافه می‌شوند. در این تحقیق به‌منظور یافتن این نکته که اگر نانوذرات پس از گذر باکتری از فاز کمون به محیط کشت اضافه شوند آیا باز هم روی رشد سلول‌ها و تولید بیوسورفاکتانت اثرگذار هستند یا خیر، تلقیح نانوذرات در انتهای فاز کمون و ابتدای فاز لگاریتمی به محیط کشت باکتری صورت گرفت[9, 10, 12].

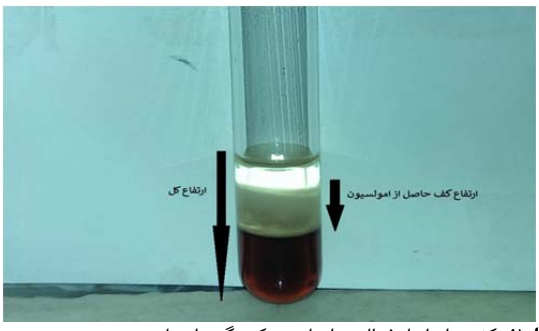
تست وزن توده خشک سلولی: برای اندازه‌گیری وزن خشک توده سلولی ابتدا از محیط کشت نمونه‌برداری شد و با دور ۱۰۰۰۰rpm در دقیقه به‌مدت ۲۰دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس رسوبات سلولی به کمک یک تا ۲سی‌سی آب مقطر سترون سه‌بار شست‌وشو داده شدند و به روی فویل آلمینیومی تمیز، کاملاً خشک و وزن‌شده ریخته شدند و درون آون با دمای ۸۰°C به‌مدت ۱۲ساعت کاملاً خشک کرده و سپس توسط ترازوی دیجیتال وزن شدند[3, 14]. اختلاف وزن موجود بین فویل خالی و فویل پر میزان بیومس در مقدار مشخصی از محیط کشت است، وزن حاضر به‌صورت گرم بر لیتر تبدیل گزارش شد.

تست وزن خشک رامنولیپید: برای اندازه‌گیری وزن خشک بیوسورفاکتانت ابتدا نمونه‌گیری از محیط کشت صورت گرفت. سپس با انجام سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰rpm و به‌مدت ۲۰دقیقه سلول‌ها از محیط کشت جدا شده و پس از آن سوپ رویی را برداشته و درون فالکون‌هایی تمیز، خشک و وزن‌شده ریخته و توسط اسیدهیدروکلریدریک یک‌مولار تا pH ۲ اسیدی شده و به‌مدت یک شب درون یخچال در دمای ۴°C نگهداری شد. در صبح روز بعد نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰rpm در هر دقیقه و به‌مدت۲۰دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع شفاف رویی دور ریخته شد. سپس روی رسوبات حاصل که همان رامنولیپید هستند به نسبت ۱:۲ کلروفرم و متانول ریخته شد و در دمای محیط به زیر هود نگهداری شد تا کاملاً خشک شود و وزن رامنولیپید حاصل توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد[1, 3, 14, 20, 21].

تست شاخص امولسیون کنندگی: این تست به‌منظور بررسی میزان پایداری و امولسیون‌کنندگی سوپ حاصل از باکتری پس از گذشت ۲۴ساعت است. پس از نمونه‌گیری از محیط کشت و حذف سلول‌ها، به نسبت ۱:۱ سوپ رویی و گازوئیل درون لوله آزمایش ریخته و نمونه به‌مدت ۲دقیقه با سرعت بالا همزده شد. سپس امولسیون ایجادشده به‌مدت ۲۴ساعت به‌صورت ساکن و بدون حرکت قرار گرفت و در نهایت پس از گذشت ۲۴ساعت میزان پایداری امولسیون تشکیل‌شده توسط فرمول زیر محاسبه شد[20-23] (شکل ۲).

$$E24 = \frac{\text{ارتفاع بخش امولسیون شده}}{\text{ارتفاع کل}} \times 100$$

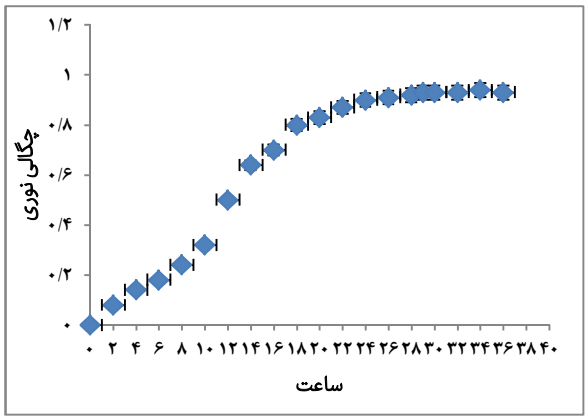
تست کشش سطحی: میزان کشش سطحی سوپ رویی توسط دستگاه کشش سطحی KRUESS KLOT K9 سنجیده شده است.



شکل ۲) کف حاصل از فعالیت امولسیون‌کنندگی رامنولیپید

یافته‌ها

همان‌طور که پیش از این گفته شد ابتدا منحنی رشد باکتری در محیط کشت ملاس مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ۱ منحنی رشد به‌دست‌آمده از باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* PBCC5 است. براساس این نمودار باکتری تقریباً در دهمین ساعت از رشد خود مرحله کمون را پشت سر گذاشت، وارد مرحله لگاریتمی شده و مرحله سکون باکتری بین ساعت‌های ۱۸ تا ۲۰ آغاز شد.



نمودار ۱) منحنی رشد باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* PBCC5 در محیط کشت ملاس

www.SID.ir

Archive of SID

در این مطالعه براساس دو روش مختلف قابلیت تولید رامنولیپید توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره مورد بررسی قرار گرفت. در تست امولسیون‌کنندگی و کشش سطحی تمامی رامنولیپیدهای تولیدشده در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذرات قابلیت امولسیون‌کنندگی و کاهش کشش سطحی خود را حفظ نموده‌اند که این امر نشان‌دهنده عدم تاثیر نانوذرات در غلظت‌های مختلف بر این دو ویژگی است.

با بررسی تست امولسیون‌کنندگی بیوسورفاکتانت تولیدشده در مجاورت نانوذره مشخص شد که در ۲۴ساعت اول در هیچ یک از نمونه‌های موجود تولید رامنولیپید صورت نگرفته است، با اندازه‌گیری تست E_{24} در روز دوم، سوم و چهارم (۴۸، ۷۲ و ۹۶ساعت) تمامی نمونه‌ها (نمونه‌های دارای غلظت‌های مختلف نانوذره و نمونه کنترل) دارای کف حاصل از امولسیون رامنولیپید بود که نشان‌دهنده آغاز تولید رامنولیپید از ۴۸ساعت پس از رشد باکتری بود.

در نتایج تست E_{24} روزهای دوم، سوم و چهارم مشاهده شد که با افزایش غلظت این نانوذره از یک‌میلی‌گرم تا ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر میزان کف حاصل از امولسیون تشکیل‌شده، کاهش یافته است که این امر نشان‌دهنده افزایش اثر منفی نانوذره روی باکتری در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر نانوذره است. به‌طور کلی غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر نانوذره سبب کاهش شدید تولید بیوسورفاکتانت در ۴۸ساعت اول شده است. اما غلظت یک‌میلی‌گرم بر لیتر نه‌تنها سبب به تاخیرافتادن تولید بیوسورفاکتانت نشد بلکه باعث شد تا باکتری با سرعت بیشتری رشد کرده و تولید بیوسورفاکتانت را هرچه سریع‌تر آغاز کند (نمودار ۲). در پژوهش‌های قبل از تست E_{24} اغلب به‌منظور تعیین میزان توانایی بیوسورفاکتانت در امولسیون‌کنندگی استفاده شده است و به‌منظور تعیین مقدار بیوسورفاکتانت تولیدی، تست تعیین وزن خشک بیوسورفاکتانت مورد آزمایش قرار گرفته است[20-22].

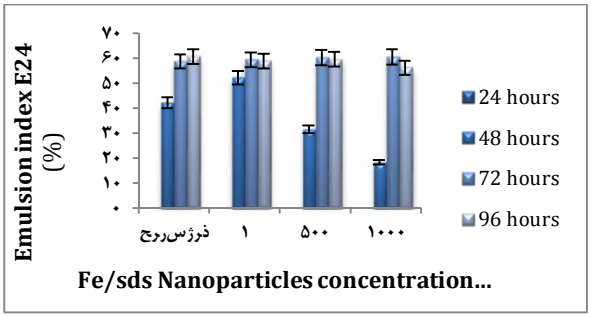
با مقایسه نتایج حاصل از تست کشش سطحی در روز چهارم (۹۶ساعت)، تغییری در میزان کشش سطحی رامنولیپید تولیدشده در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذره در مقایسه با نمونه کنترل، مشاهده نشد. این امر نشان‌دهنده بی‌تاثیربودن نانوذره Fe/SDS در غلظت‌های مختلف بر میزان کشش سطحی حاصل از رامنولیپید تولیدشده است. به عبارتی دیگر تمامی رامنولیپیدهای تولیدشده در مجاورت غلظت‌های مختلف این نانوذره همانند نمونه کنترل (فاقد نانوذره) سبب کاهش کشش سطحی آب از ۷۲میلی‌نیوتن بر متر به ۳۰ تا ۳۵میلی‌نیوتن بر متر شده‌اند (نمودار ۳).

براساس نمودار ۴ سلول‌هایی که در مجاورت غلظت یک‌میلی‌گرم بر لیتر از نانوذره بودند طی سیکل رشد (۴ روز) بیومس بیشتری نسبت به نمونه کنترل داشتند و همچنین میزان امولسیون‌کنندگی بیوسورفاکتانت این نمونه در تمامی روزها بیشتر از نمونه کنترل مشاهده شد. که این امر نشان‌دهنده وجود اثرات مثبت این نانوذره در غلظت‌های کم بر میزان رشد باکتری بوده است. در صورتی که نمونه‌های در مجاورت غلظت‌های بالاتر نانوذره نسبت به نمونه کنترل رشد کمتری داشته‌اند اما میزان امولسیون‌کنندگی بیوسورفاکتانت‌های تولیدشده در این نمونه‌ها تفاوت چندانی با نمونه کنترل نداشته است که این امر نشان‌دهنده این است که غلظت بیوسورفاکتانت‌های تولیدشده اثر چندانی بر میزان امولسیون‌کنندگی ندارند بلکه ماهیت و ساختار بیوسورفاکتانت‌های تولیدشده اثر بیشتری بر توانایی امولسیون‌کنندگی آنها دارد. برای اطمینان از این امر وزن خشک بیوسورفاکتانت‌ها در روز چهارم مورد محاسبه قرار گرفت که براساس آن مقدار بیوسورفاکتانت تولیدشده در مجاورت یک‌میلی‌گرم بر لیتر از نانوذره بیشترین میزان را نشان داد (نمودار ۵).

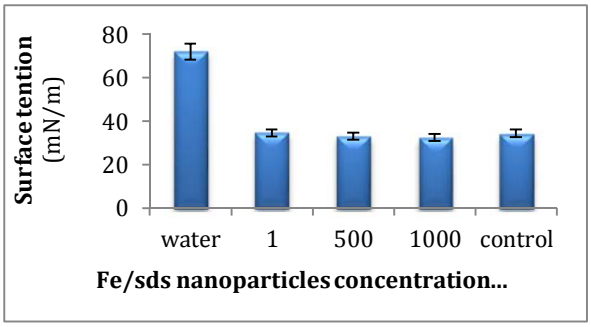
به‌طور کلی نتایج حاصل از وزن خشک رامنولیپید تولیدشده در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذره Fe/SDS کاملاً با نتایج حاصل از وزن خشک توده سلولی در روز چهارم هم‌خوانی داشته است. نتایج حاصل از این تست نشان‌دهنده افزایش ۲۰/۷۳% تولید رامنولیپید در مجاورت غلظت یک‌میلی‌گرم بر لیتر نانوذره Fe/SDS و کاهش ۸/۵۴% و ۴۱/۴۷% تولید رامنولیپید به‌ترتیب در مجاورت غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر این نانوذره در مقایسه با نمونه کنترل شده است.

نتایج نشان‌دهنده دارابودن اثرات مثبت این نانوذره در غلظت یک‌میلی‌گرم بر لیتر روی تولید بیوسورفاکتانت باکتری و دارابودن اثرات منفی در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰میلی‌گرم بر لیتر بر تولید رامنولیپید حاصل از باکتری بوده است. به عبارتی همان‌طور که غلظت یک‌میلی‌گرم بر لیتر نانوذره Fe/SDS سبب بیشترین میزان بیومس سلولی می‌شد، موجب تولید بیشترین میزان رامنولیپید نیز شده بود، یعنی رشد بیشتر سلول‌ها سبب افزایش تولید رامنولیپید شده است و با افزایش غلظت نانوذره به ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر همان‌طور که رشد سلول‌ها کاهش یافته، تولید بیوسورفاکتانت نیز کاهش یافته است (نمودار ۵).

برای حصول اطمینان از قرارگرفتن نانوذره بر سطح باکتری تصویربرداری به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام شده است. شکل به‌دست‌آمده نشان‌دهنده قرارگرفتن نانوذرات روی سطح و غشای باکتری است و احتمالاً نانوذره در غلظت‌های مختلف از طریق افزایش سطح باکتری سبب افزایش تبادلات موادغذایی باکتری با محیط کشت شده و در نتیجه میزان رشد و تولید بیوسورفاکتانت افزایش یافته است. در حالی که در غلظت‌های بالاتر اثرات سمی و منفی بر میزان رشد سلول‌ها و تولید بیوسورفاکتانت داشته است (شکل ۳).



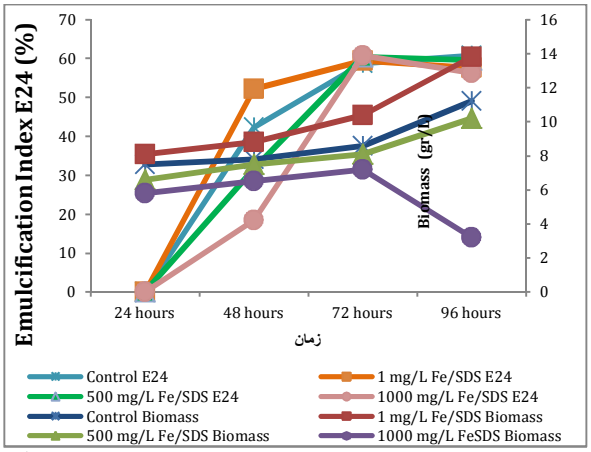
نمودار ۲) نتایج تست E_{24} رامنولیپید تولیدشده در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذره Fe/SDS



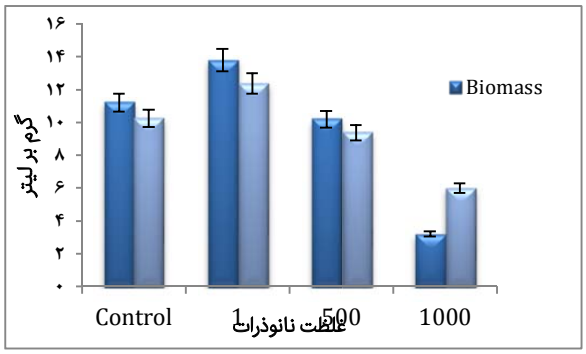
نمودار ۳) نتایج کشش سطحی رامنولیپید تولیدشده در مجاورت نانوذره Fe/SDS پس از ۹۶ساعت گرمخانه‌گذاری باکتری

www.SID.ir

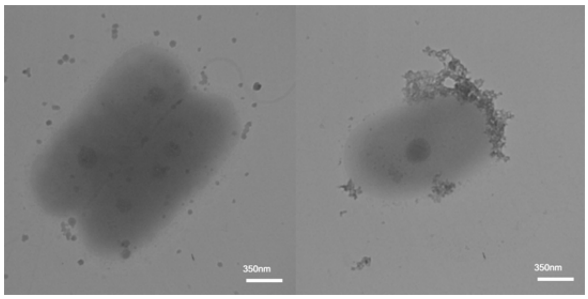
Archive of SID



نمودار ۴) سینتیک رشد باکتری به همراه میزان امولسیون‌کنندگی بیوسورفاکتانت تولیدشده در واحد زمان



نمودار ۵) نتایج سینتیک توده خشک سلولی و وزن خشک بیوسورفاکتانت در روز چهارم (۹۶ساعت) براساس گرم بر لیتر



شکل ۳) تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM باکتری به همراه نانوذره Fe/SDS

بحث

هدف از این تحقیق بررسی شرایط بهینه تولید رامنولیپید و همچنین مطالعه ویژگی‌های رامنولیپید تولیدی جهت به‌کارگیری در صنایع نفتی به‌منظور ایجاد امولسیون‌های پایدار بود. ابتدا رشد باکتری در محیط کشت ملاس صورت گرفت. سپس نانوذرات Fe/SDS با غلظت‌های متفاوت به محیط کشت باکتری اضافه شد و با تست‌های مربوطه میزان تولید رامنولیپید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان‌دهنده افزایش تولید رامنولیپید در حضور یک‌میلی‌گرم بر لیتر از نانوذره Fe/SDS بود. این امر نشان داد که این نانوذره در غلظت‌های کم، نه‌تنها اثرات منفی بر باکتری‌ها نداشته بلکه سبب افزایش رشد باکتری‌ها و در نتیجه افزایش تولید رامنولیپید نیز شده‌اند. در صورتی که نانوذره در غلظت‌های بالاتر دارای اثرات منفی روی رشد باکتری و در نتیجه تولید رامنولیپید حاصل از باکتری داشته است. به‌طوری که با افزایش غلظت نانوذره Fe/SDS از یک‌میلی‌گرم بر لیتر به ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر شاهد کاهش تدریجی رشد باکتری‌ها و در نتیجه کاهش تدریجی میزان تولید رامنولیپید بوده‌ایم.

امروزه تحقیقات متعددی در زمینه مطالعه اثرات نانوذرات فلزی روی رشد باکتری‌ها و تولید بیوسورفاکتانت‌ها در زمینه‌های مختلف صنعتی صورت گرفته است. اثر نانوذرات مختلفی مانند آهن، AU، Fe/Au و آهن (III) اکسید روی رشد باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج این مطالعات بسته به نوع باکتری، نوع نانوذره و غلظت نانوذره متفاوت بوده است. مطالعات مختلفی نشان داده است که نانوذرات در غلظت‌های مشخصی سبب افزایش رشد برخی از باکتری‌ها شده و اثرات سمی روی آنها ندارند[9-12, 24]. ممکن است الکترون‌های تولیدشده توسط نانوذرات سبب افزایش عملکرد آنزیمی پروتئین‌های غشای باکتری شده یا عملکرد زنجیره انتقال الکترون غشای باکتری‌ها را افزایش دهند که این امر به نوبه خود موجب تسهیل سوخت‌وساز سلول شده و در نتیجه رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت افزایش یابد. با این حال در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته نفوذ و اثرگذاری مستقیم و آشکار نانوذرات روی باکتری‌ها مشاهده نشده است[11, 12].

به‌طور مثال در سال ۲۰۱۱ *کترجی* و همکاران اثر دو نانوذره Fe_3O_4 و Au روی رشد باکتری *E. Coli* را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که نانوذرات اکسیدآهن یک اثر مهاری وابسته به غلظت نانوذره، روی رشد باکتری داشته است[9].

و همچنین در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۳ *جیا لیو* و همکاران به بررسی اثر دو نانوذره آهن و نانوذره آهن پوشش‌دارشده توسط طلا، در غلظت‌های مختلف یک‌میلی‌گرم، تا ۱۰۰۰میلی‌گرم روی رشد و تولید بیوسورفاکتانت حاصل از باکتری سراشیا پرداختند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باکتری در مجاورت غلظت یک‌میلی‌گرم از نانوذره Fe دارای افزایش رشد بوده اما به محض افزایش غلظت نانوذره باکتری شدیداً دچار کاهش رشد می‌شود، در صورتی که نانوذره Fe/Au نه‌تنها اثر مهاری روی رشد باکتری در غلظت‌های ذکرشده نداشته بلکه با افزایش غلظت نانوذره رشد باکتری نیز افزایش یافته است[10].

و در سال ۲۰۱۴ *کیران* و همکاران به بررسی اثر نانوذره Fe بر میزان تولید بیوسورفاکتانت باکتری *Nocardiopsis sp.* MSA13A پرداختند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده این امر بود که نانوذره آهن نه‌نتها سبب کاهش رشد باکتری و تولید بیوسوررفاکتانت نشده، بلکه سبب افزایش ۸۰% میزان تولید بیوسورفاکتانت این باکتری شده است[12].

نتایج موجود با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر کاملاً مطابقت داشته و نانوذرات در غلظت‌هایی کم نه‌تنها فاقد اثرات منفی و مهاری روی باکتری بوده بلکه سبب افزایش تعداد باکتری و تولید رامنولیپید نیز شده است. در این تحقیق مشخص شده که نانوذره Fe/SDS در کمترین میزان غلظت خود سبب بیشترین میزان افزایش تولید رامنولیپید شده است (۲۰/۷۳%).

در این تحقیق به‌منظور بررسی میزان کارآیی رامنولیپید تولیدی تست سنجش کشش سطحی و E_{24} صورت گرفت که نشان‌دهنده عملکرد مناسب رامنولیپید تولیدشده در مجاورت نانوذرات در مقایسه با رامنولیپید تولیدشده در نمونه کنترل (فاقد نانوذره) بوده است. به‌عبارتی نانوذرات اثری بر میزان امولسیون کنندگی رامنولیپید نداشته و فقط سبب افزایش تولید رامنولیپید باکتریایی شده است.

در عصر حاضر اثرات مثبت نانوذرات بر رشد میکروارگانیزم‌ها و تولیدات بیولوژیک حاصل از آنها که مورد استفاده‌ای مثبت بشر

www.SID.ir

Archive of SID

قرار می‌گیرد ثابت شده و حایض اهمیت است. متاسفانه مطالعات در این زمینه ناچیز بوده و مقالات مربوط به اثرات سایر نانوذرات بر میکروارگانیزم‌ها نیز محدود هستند. امیدواریم که مطالعه اخیر نقطه‌عطفی برای آغاز تحقیقات جدید در این زمینه و هر چه بهترشدن زندگی بشر باشد.

با توجه به بی‌ضرربودن امولسیفایر طبیعی تولیدشده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در مقایسه با امولسیفایرهای مصنوعی که بعضی اثرات جانبی نامطلوبی دارند، می‌توان میزان آسیبهای وارده به محیط زیست را تا حد مطلوبی کاهش داد. با انجام تحقیقات بیشتر به‌منظور یافتن نانوذره مناسب‌تر و همچنین سوبسترای ارزان‌تر به‌منظور افزایش تولید رامنولیپید، می‌توان هزینه تولید این ترکیبات طبیعی را کاهش داده و صنایع نفتی را به سمت استفاده از امولسیفایرهای طبیعی و جایگزین‌نمودن آنها به جای امولسیفایرهای مصنوعی سوق داد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که رامنولیپید تولیدشده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت ملاس و در حضور نانوذرات، دارای توانایی قابل قبولی در میزان کاهش کشش سطحی بوده و می‌توان از آن به‌عنوان یک امولسیفایر طبیعی در صنایع نفتی استفاده کرد. با توجه به نتایج حاصل باکتری‌های مجاورشده با یک‌میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات Fe/SDS سبب افزایش رشد باکتری‌ها به میزان ۲۳/۲۱% و افزایش تولید رامنولیپید به میزان ۲۰/۷۳% در مقایسه با نمونه کنترل شده‌اند. همچنین با افزایش غلظت نانوذرات کاهش رشد و تولید مشاهده شد که احتمال می‌رود این امر به‌دلیل دارابودن اثرات منفی این نانوذرات در غلظت‌های بالاتر روی باکتری است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از گروه بیوتکنولوژی پژوهشگاه صنعت نفت و دانشگاه تهران و همچنین حمایت شرکت ملی پالایش و پخش فرآورده‌های نفتی ایران، که در به ثمررساندن این پژوهش نهایت همکاری را به عمل آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی کنند.

تاییدیه‌اخلاقی: این مقاله تاکنون در نشریه دیگری به چاپ نرسیده، برای بررسی و چاپ برای نشریه دیگری فرستاده نشده و تا زمان تعیین تکلیف نهایی از سوی نشریه زیست‌فناوری برای نشریه دیگری ارسال نخواهد شد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ندا علمدارا (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰%)؛ بهنام راسخ (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰%)؛ فاطمه یزدیان (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۰%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Amini F, Samadi N, Harande M, Naghdi M, Sharifan A. Optimization of the production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa strains. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2009;4(1):33-8.

2- Fracchia L, Cavallo M, Martinotti M, Banat IM. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications-Present Status and Future Potentials. In: Ghista DN. Biomedical Science, Engineering and Technology. Norderstedt: Books on Demand; 2012. pp. 325-70

3- Rikalovic MG, Cvijovic GG, Vrvic MM, Karadzic I. Production and characterization of rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa san-ai. J Serbian Chem Soc. 2012;77(1):27-42.

4- Singh V. Biosurfactant-isolation, production, purification & significance. Int J Sci Res Publ. 2012;2(7).

5- Bagheri Lotfaabad T, Shahceraghi F, Shooraj F. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous Pseudomonas aeruginosa strains. Jundishapur J Microbiol. 2013;6(1):29-35.

6- Pereira J, Gudina E, Costa R, Vitorino R, Teixeira J, Coutinho J, Rodrigues L. Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. Fuel. 2013;111:259-68.

7- Amani H, Muller MM, Syldatk Ch, Hausmann R. Production of Microbial rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa MM1011 for ex situ enhanced oil recovery. Appl Biochem Biotechnol. 2013;170(5):1080-93.

8- Kaskatep B, Yildiz S, Gumustas M, Ozkan SA. Biosurtactant production by Psedomonas aeroginosa in kefir and fish meal. Braz J Microbiol. 2015;46(3):855-9.

9- Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. J Nanobiotechnology. 2011;9:34.

10- Lia J, Vipulanandan C. Effects of Au/Fe and Fe nanoparticles on Serratia bacterial growth and production of biosurfactant. Mater Sci Eng. 2013;33(7):3909-15.

11- Liu J, Vipulanandan C, Cooper TF, Vipulanandan G. Effects of Fe nanoparticles on bacterial growth and biosurfactant production. J Nanopart Res. 2013;15:1405.

12- Kiran GS, Nishanth LA, Priyadharshini S, Anitha K, Selvin J. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine Nocardiopsis sp. MSA13A. BMC Biotechnol. 2014;10:14-48.

13- Fakruddin Md. Biosurfactant: Production and Application. J Pet Environ Biotechnol. 2012;3(4):124.

14- Gomathy C, Senthilkumar R. Production of Rhamnolipid boisurfactant from a marine Pseudomonas aeruginosa. Int J Res Environ Sci Technol. 2013;3(3):86-91.

15- Rosa C, Freire D, Ferraz H. Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil. J Environ Chem Eng. 2015;3(1):89-94.

16- Rocha CA, Pedregosa AM, Laborda F. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by pseudomonas aeruginosa ATCC 55925. AMB Express 2011;1(1):9.

17- Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61(1):47-64.

18- Tabatabaee A, Mazaheri M, Noohi A, Sajadian VA. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. Iranian J Environ Health Sci Eng. 2005;2(1):6-12.

19- Sahebnazar Z, Mowla D, Karimi GH. Enhancement of Pseudomonas Aeruginosa Growth and Rhamnolipid Production Using Iron-Silica Nanoparticles in Low-Cost Medium. J Nanostructures. 2018;8(1):1:10.

20- Bagheri Lofabad T, Partovi M, Bahmaei M. Rhamnolipid biosurfactant production by Pseudomonas

www.SID.ir

Archive of SID

Pseudomonas aeruginosa P.B:2 and Pseudomonas fluorescens P.V:10. Open Access Sci Rep. 2012;1(12).
23- Bhawsar NA, Singh M. Isolation And Characterization Of Pseudomonas aeruginosa From Waste Soybean Oil As Biosurfactants Which Enhances Biodegradation Of Industrial Waste With Special Reference To Kosmi Dam, Betul District, (M.P.). Int J Adv Res. 2014;2(6):778-83.
24- Cristobal E, Castanon M, Martinez-Martinez RE, Rodriguez L, Marin P, Macias R, Ruiz F. Antimicrobial sensibility of Streptococcus mutans serotypes to silver nanoparticles. Mater Sci Eng C. 2012;32(4):896-901.
aeruginosa MR01 using vegetable oil refinery wastes. New Cell Mol Biotechnol J. CMBJ. 2013;3(9):91-9. [Persian]
21- Mostafapour M, Ahmady- Abchin S, Saffari M. Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus Acinetobacter spp and antibacterial effects of biosurfactant produced on some of the negative and gram-positive bacteria in vitro. New Cell Mol Biotechnol J. 2014;4(14):79-91. [Persian]
22- EL-Amine Bendaha M, Mebrek S, Mostefa N, Abdelkrim T, Ahmed Belaouni H, Bouziane A. Isolation and comparison of Rhamnolipids production in

www.SID.ir