Study on the isolation and characterization of new bacterial strains producing active substances at the biosurfactant level from municipal waste in Avuj city

Nazanin Zahra Iftikhar[1], **Behzad Hemmati[1*]**

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received Date:2025.05.26 Accepted Date:2025.09.01

Abstract

Biosurfactants are surface-active substances produced by microorganisms that reduce surface and interfacial tension. In recent years, increasing environmental awareness has attracted much attention towards the use of biosurfactants compared to their chemical counterparts, which is due to the unique properties of these compounds. Isolation of new strains with high biosurfactant production capacity has always been important for researchers. This study aimed to isolate and characterize a new and indigenous thermophilic isolate with high biosurfactant production capacity from municipal waste and to investigate its physicochemical properties. Among more than 120 colonies isolated from different sources, one isolate with a biosurfactant production rate of more than 12 g/L was selected and identified by biochemical and molecular morphological methods based on the S 16 rRNA gene. Initial identification of the biosurfactant was performed by FT-IR. Investigation of the antimicrobial properties of the purified biosurfactant showed that among the pathogenic bacteria studied in this study, Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumoniae strains were more sensitive to it and it could also maintain its surface activity in a wide range of pH (3-9), high salt concentrations (up to 18%), and boiling temperatures of autoclaves, freezers, and refrigerators. The critical micellization concentration of the biosurfactant was 39 mg/L, at which point the surface tension was 40.5 mN/m.

Keywords: biosurfactant, municipal waste, new bacterial strain, and isolation, antimicrobial.

* hematibehzad71@gmail.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: In this research, the isolation and determination of the characteristics of bacteria with high ability to produce biosurfactant from fresh and rotten urban and agricultural wastes has been done. The physical and chemical characteristics of the purified product and the determination of its exact chemical structure have also been examined. Most of the biological surfactants are from oil wells or from oil-contaminated lands; they have been isolated from the effluents of factories and sewage, and the isolation of bacteria from urban and agricultural waste has not been done so far.

Materials and Methods: In this research, various sources were used to sample and isolate isolates with the ability to produce biosurfactant. The leachate of fresh and one-month-old waste was used, the fertilizer obtained from heated waste and the fresh and one-month-old waste were used. For the initial screening of bacteria capable of producing biosurfactant, a selective culture medium was used in which sunflower oil was used as the only carbon source. In the research conducted by Abbasi et al., soybean oil was used as the only carbon source. Was done, oil displacement test was used for rapid screening of producing bacteria. Isolates whose crude oil displacement test was positive. The produced biosurfactant was extracted by acid precipitation method and used to measure the amount of production. Out of more than 120 colonies isolated from different sources, 10 isolates had positive results in the oil displacement test. Biosurfactant extraction was performed on these ten isolates, and finally one isolate with a production rate of more than 12 grams per liter was selected. It was used for further investigations. This amount of production is significant compared to other bacteria that produce biosurfactant.

Discussion and conclusion: The identification of the selected isolate was done by biochemical and molecular morphological methods. Morphological results and preliminary biochemical tests showed that the isolated bacteria is gram positive, rod-shaped and aerobic. The results showed that the selected isolate belongs to the genus Aneurinibacillus and the aerothermophilus species. The 16S rRNA gene sequencing method was used to confirm the biochemical identification of the selected isolate. The results after comparing with the available NCBI sequences showed that the isolate belongs to the Aneurinibacillus genus and has more than 100 similarities with A aerothermophilus 420-9 species. Finally, the said isolate was named Aneurinibacillus aerothermophilus AS. The kinetics of biosurfactant production showed that the production of biosurfactant started after 24 hours of the greenhouse period at the rate of 2 grams per liter, and the amount of production increased gradually and reached 8 grams per liter on the sixth day, which is its maximum amount. arrived The results also showed that the production of biosurfactant is dependent on growth, however, the maximum amount of production is obtained in the stationary phase of growth, which indicates that the biosurfactant produced is a secondary metabolite, while the production of biosurfactant for Pseudomonas aeruginosa bacteria MA01 showed that after 24 hours of the greenhouse period, it started at the rate of 0.5 grams per liter and gradually the amount of production increased continuously and on the fourth day It reached five grams per liter, which can be related to the maximum cell growth on the fourth day. Then, with the gradual decrease in growth on the fifth day of the greenhouse period, a significant increase in the amount of biosurfactant production was observed, about eight grams per liter) after 10 days of the greenhouse period, the production reached its maximum value, i.e. 12 grams per liter, in a relatively stable manner. And this amount of production continues until the end of the greenhouse period, i.e. the 20th day. By comparing them, the result is that the length of the production period for the maximum production of biological surfactant in the AS01 strain is less, which is more economical, on the other hand, the maximum production in the MA01 strain is higher. In most of the biological surfactants extracted from bacteria, the ability to tolerate temperature, pH and ionic strength has been examined, because it is one of the most important characteristics of biological surfactants and one of the reasons for their superiority over industrial surfactants, for example, the biological surfactant obtained from Bacillus Lakiniformis JF tolerates temperature up to 50 degrees Celsius, pH in the range of 4.5-9, sodium ion concentration up to 50% and calcium up to 25%, and the resulting lipopeptide from Bacillus subtilis in the temperature range of up to 18 degrees and in the autoclave temperature of 121 degrees for 20 minutes and the pH range between 5-11 and 20% concentration of sodium chloride, the results of investigating the stability of the pure biosurfactant obtained from the isolated strain In this research, it was shown that this material can have its surface activity in a wide range of pH (3-9), high salt concentrations (up to 18%), as well as boiling temperatures of autoclaves, freezers and refrigerators. while in the research conducted by Abbasi et al., the tolerance threshold was in the range of pH (4-10) and salt concentrations (up to 15%). These results promise the ability to use it in harsh industrial conditions such as high temperature sterilization of products in the food industry. Conclusion: In general, the biosurfactant obtained from the aerothermophilus AS01 isolate was less effective in emulsifying vegetable oils compared to hydrocarbons. The resulting biosurfactant could only emulsify coconut and corn oils by more than 50%. While it had good emulsifying activity against xylene, hexadecagon and toluene, so that the emulsifying index for these materials was between 55.8 and 100%, which can be used for bioremediation applications. These results are at the same level as the research conducted by Abbasi et al. The

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

CMC value of biosurfactant was very low and 39 times mg/liter. At this point, a surface tension of 40.5 millinewtons/m was obtained, which shows that this material has a high surfactant property, in the sense that a smaller amount of the material is needed to reduce the surface tension in certain applications, and compared to the research the results are at a good level.

.

.

.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

بررسی جداسازی و تعیین خصوصیات سویه های جدید باکتریایی تولید کننده ماده فعال در سطح بیوسورفکتانت از پسماندهای شهری شهرستان آوج

نازنین زهرا افتخار[۱]، **بهزاد همتی**[۱*]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۴/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش:۱۴۰۴/۰۶/۱۰

چکیده

سورفکتانت‌های زیستی مواد فعال در سطحی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید شده و کشش سطحی و بین سطحی را کاهش می‌دهند. در سال‌های اخیر، افزایش آگاهی‌های زیست محیطی توجه زیادی را به سمت استفاده از سورفکتانت‌های زیستی در مقایسه با همتایان شیمیایی آنها جلب کرده است که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد این ترکیبات می‌باشد، جداسازی گونه های جدید با توانمندی بالای تولید سورفکتانت زیستی همیشه برای پژوهشگران حائز اهمیت بوده است. این پژوهش به جداسازی و تعیین ویژگی-های جدایه‌ی گرما دوست جدید و بومی با توانمندی بالای تولید سورفکتانت زیستی از پسماندهای شهری و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن پرداخته است. از میان بیش از ۱۲۰ کلنی جدا شده از منابع مختلف یک جدایه که دارای میزان تولید سورفکتانت زیستی بیش از ۱۲ گرم بر لیتر بود انتخاب گردید و با روش‌های ریخت شناسی بیوشیمیایی و مولکولی بر اساس ژن rRNA ۱۶ S شناسایی گردید، شناسایی اولیه سورفکتانت زیستی توسط FT-IR انجام شد. بررسی ویژگی‌های پادمیکروبی سورفکتانت زیستی خالص شده نشان داد که از میان باکتری های بیماری‌زای مطالعه شده در این تحقیق سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه حساسیت بیشتری نسبت به آن دارند و همچنین می‌تواند در محدوده وسیعی ازpH (۳-۹) ، غلظت‌های بالای نمک (تا ۱۸٪) و نیز دماهای جوش اتوکلاو، فریزر و یخچال فعالیت سطحی خود را حفظ کند.غلظت بحرانی میسل شدن سورفکتانت زیستی برابر با ۳۹ میلی گرم در لیتر بود که در این نقطه کشش سطحی برابر با ۴۰/۵ میلی نیوتن بر متر به دست آمد.

کلید واژه ها : بیوسورفکتانت،پسماند شهری،سویه جدید باکتریایی،جداسازی، پادمیکروبی

* hematibehzad71@gmail.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مقدمه

سورفکتانت‌های زیستی ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم ها هستند که دارای دو بخش هیدروفوب وهیدروفیل هستند و می‌توانند کشش سطحی و بین سطحی بین مایعات را کاهش دهند و با تشکیل میکرواموسیون هیدروکربن‌های نامحلول را در خود حل کنند. در ابتدا سورفکتانت‌های زیستی با انحلال هیدروکربن‌ها در سال ۱۹۹۰ مورد توجه قرار گرفتند و هر ساله کاربردهای آنها مخصوصا در زمینه نفتی غذایی و دارویی بیشتر توسعه یافت. سورفکتانت‌های زیستی می‌توانند جایگزین مناسبی برای سورفکتانت‌های شیمیایی باشند(۱). مهمترین ویژگی سورفکتانت‌های زیستی زهرآگینی پایین و تجزیه پذیری بالای آنها نسبت به سورفکتانت‌های سنتزی می‌باشد. با توجه به اهمیت ماده سورفکتانت زیستی که به آن اشاره شد و کمبود تولید آن در کشور و نیز بر هزینه بودن تولید آن از باکتری‌های موجود تحقیق و بررسی و تلاش برای یافتن سویه جدید و بومی و گرما دوست با قابلیت تولید بیشتر سورفکتانت زیستی بکار گرفته شد.

پسماند یا همان زباله به مواد جامد، مایع و گازی گفته می‌شود که به صورت مستقیم و غیرمستقیم نتیجه فعالیت‌های انسان می‌باشد و موادی زائد به حساب می‌آیند.

انواع پسماند:

پسماندهای عادی:به کلیه پسماندهایی مثل زباله‌های خانگی و نخاله‌های ساختمانی که روزانه از فعالیت انسان در شهر، روستا و یا خارج از آنها تولید می‌شود، پسماند عادی می‌گویند(۲).پسماندهای بیمارستانی:به تمامی پسماندهای عفونی و زیان آوری که در بیمارستان‌ها، مراکز بهداشتی درمانی، آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و سایر مراکز مشابه تولید می‌شوند، گفته می‌شود. البته توجه داشته باشید که پسماندهای خطرناکی که از این مکان‌ها خارج می‌شوند، در دسته‌بندی دیگری جای می‌گیرند(۲).پسماندهای کشاورزی:پسماندهای ناشی از فعالیت‌های تولیدی در بخش کشاورزی در این دسته از پسماندها قرار دارند، مانند فضولات و لاشه حیوانات (دام، طیور و آبزیان)، محصولات کشاورزی فاسد یا غیرقابل مصرف(۲).

هدف از انجام این پژوهش جداسازی و تعیین هویت جدایه های باکتریایی جدید تولید کننده سورفکتانت زیستی از پسماندهای شهری شهرستان آوج و تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سورفکتانت زیستی تولید شده به همراه برخی آثار پاد میکروبی آن است(۲).

با توجه به پیشینه پژوهش‌های صورت گرفته اهمیت و کاربردهای متنوع سورفکتانت های زیستی در صنایع گوناگون مشخص می شود .

سورفکتانت های زیستی ویژگی‌های خاصی دارند از جمله زهر آگینی کم و فعالیت در محدوده گسترده ای از دما pH و قدرت یونی که جهت استفاده در صنایع مختلف بسیار با اهمیت است. همچنین زیست تخریب پذیری سورفکتانت های زیستی، اهمیت این مواد را در آلایش محیط زیست و مدیریت آن نشان می‌دهد. فعالیت پادمیکروبی و پاد چسبندگی این ترکیب‌ها در کنترل میکروب های بیماریزا و فاسد کننده و همچنین توانایی تشکیل امولسیون از دیگر ویژگی های سورفکتانت های زیستی است که در مواد غذایی و دارویی و استخراج نفت می‌تواند مورد توجه باشد. افزایش نگرانی‌های زیست محیطی در مورد استفاده از سورفکتانت های مواد فعال در سطح شیمیایی توجه زیادی را به سمت سوی از مواد فعال در سطح مشتق شده از میکروارگانیسم ها عمدتاً به دلیل زهر آگینی پایین زیست تخریب پذیری و کارایی در محدوده متفاوت دما، pH و قدرت یونی جلب کرده است. سورفکتانت‌های زیستی دارای کاربردهای گسترده در زمینه های مختلفی از جمله استخراج و فرآوری نفت صنایع پتروشیمی زیست پالایی و مدیریت محیط زیست، صنایع مواد غذایی و آشامیدنی مواد دارویی آرایشی و بهداشتی و همچنین صنایع معدن رنگسازی متالورژی و سرامیک میباشند. سورفکتانت‌ها چه از منشا میکروبی و چه

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

شیمیایی مولکول های آمفی پایکی هستند که در سطح مشترک تجمع پیدا کرده و با کاهش نیروی کشش سطحی و بین سطحی تشکیل توده هایی به شکل میسل را می دهند به دلیل این ویژگی رفتار بین سطحی را تغییر داده و بدین تریب بر رفتار مولکول‌ها در سطح مشترک و در محلول تاثیر می-گذارند.

سورفکتانت های زیستی گروه‌های دارای ساختار مختلف و مولکول‌های فعال در سطحی هستند که به وسیله میکروارگانیسم ها ساخته می‌شوند: متولیپید از سودوموناس آئروژینوزا : سورفکتین از باسیلوس سوبیلیس امولسان از اسپنتوباکتر کالکواسیکوس ، سوفورولیپید از کاندیدا بومبیکولا ، برخی از سورفکتانت های مشتق شده از میکروارگانیسم ها هستند. اصولاً بیشترین کاربرد سورفکتانت های زیستی به صورت مواد حل کننده هیدروکربنی و ازدیاد برداشت نفت از مخازن است ولی در پنج دهه اخیر به عنوان جایگزین مواد شیمیایی فعال در سطح مانند کربوکسیلات‌ها سولفونات‌ها و استرهای اسیدی سولفات به ویژه در مواد غذایی دارویی و صنایع نفت کاربرد پیدا کرده است.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری‌های تولید کننده سورفکتانت زیستی

برای جداسازی باکتری‌های با احتمال تولید سورفکتانت زیستی از بخش‌های مختلف مرکز جمع آوری پسماند شهری نمونه برداری انجام شد و در شرایط سترون به آزمایشگاه پژوهشی سپید منتقل گردید.

جداسازی باکتری‌های تولید کننده سورفکتانت زیستی به این صورت انجام شد که مقداری از نمونه‌های پسماند و کود که به صورت نسبی خشک تلقی می‌شدند در فالکن ۵۰ میلی لیتری قرار داده شد و سرم فیزیولوژی روی آن ریخته شد بدین ترتیب که سعی شد نمونه به طور کامل همگون شود(۳). از نمونه های آورده شده از مرکز پسماند رقت‌های مختلف تهیه و از آنها روی محیط جامد آگار مغذی کشت داده شد و پلیت‌ها در دو دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس تک تک کلنی‌های تشکیل شده از روی پلیت جدا سازی شده و در پلیت‌های جداگانه کشت چهار مرحله‌ای داده شدند و تک کلنی حاصل شد. این کلنی ها برای بررسی توانایی تولید سورفکتانت زیستی مورد استفاده قرار گرفتند(۳). ترکیب محیط استفاده شده برای تولید سورفکتانت زیستی در جدول زیر بصورت دقیق ذکر شده است(جدول۱).

پیش از تلقیح باکتری‌ها به درون محیط تولید تک تک کلنی‌ها در محیطی با ترکیب زیر کشت داده شد پیش کشت محیط تولید و به مدت یک شب در دو دمای ۳۷ و ۵۰ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری گردیدند(۴).

روز بعد به میزان ۲ حجمی از محیط پیش کشت به درون ظرف‌های ۵۰۰ میلی لیتری دارای ۱۰۰ میلی لیتر از محیط تولید تلقیح شد و در دو دمای ۳۷ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۷ روز گرمخانه گذاری شد (۴)(شکل۱).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

جدول۱- ترکیب محیط کشت‌های مورد استفاده برای غربالگری باکتری‌های تولید کننده سورفکتانت زیستی.

نام ترکیب	محیط کشت تولید	محیط پیش کشت
نیترات سدیم	۳	۳
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۰/۲۵	/۲۵
سولفات منیزیم هفت مولکول آب	۰/۲۵	۰/۲۵
عصاره مخمر	۱	۱
روغن آفتابگردان	۴۰	۰
گلوکز	۰	۴۰



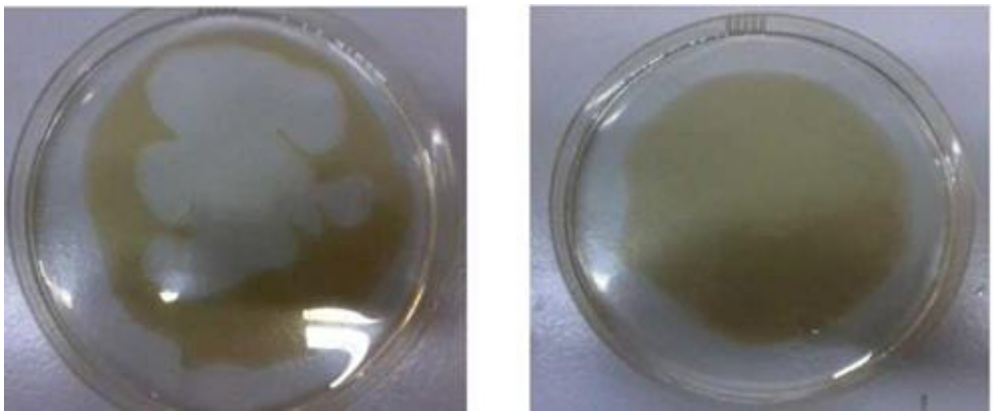
شکل۱. تصویری شامل محیط کشت تولید سورفکتانت زیستی.

آزمایش های مورد استفاده برای سنجش توانایی تولید سورفکتانت زیستی

آزمایش جابجایی نفت خام (oil spreading)

از این آزمایش برای بررسی ابتدایی و سریع توانایی باکتری ها در تولید سورفکتانت زیستی از روش موریکاوا و همکاران (۵) با یک سری تغییرات استفاده شد. به این ترتیب که ۵۳ میلی لیتر آب مقطر درون یک پلیت شیشه ای با قطر ۲۰ سانتی متر ریخته شد تا کل سطح پلیت را بپوشاند، سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به آرامی با استفاده از سمپلر در وسط لایه آب ریخته شد و چند لحظه زمان داده شد تا نفت بطور یکنواخت در سطح آب پخش شود، سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت عاری از یاخته در وسط پلیت ریخته شد. در صورتی که در محیط کشت سورفکتانت موجود باشد لایه نفتی را به سمت دیواره ها به عقب می‌راند و ناحیه ای شفاف ایجاد می‌شود. قطر ناحیه شفاف اندازه گیری شده و به عنوان شاخصی از فعالیت سطحی و تولید سورفکتانت زیستی از میکروارگانیسم مربوطه در نظر گرفته شد(۵).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



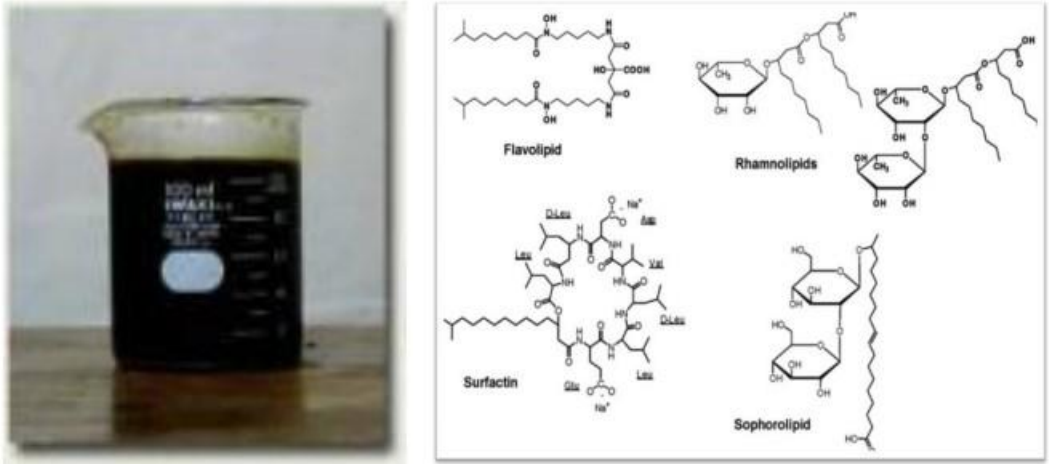
شکل۲. آزمایش جابجایی نفت خام (oil spreading) (الف) قبل از تست (ب) بعد از تست.

استخراج سورفکتانت زیستی با حلال به روش ته نشینی اسیدی

پس از پایان گرمخانه گذاری برای جداسازی یاخته‌های باکتریایی محیط کشت مایع در ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوز شد. مایع رویی بدون یاخته جدا و تا ۲ با اسید هیدروکلریک ۶ نرمال اسیدی گردید و به منظور ته نشینی بهتر سورفکتانت زیستی به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد. ته نشست حاصل از سانتریفیوژ(۱۸۰۰۰xg به مدت ۳۰ دقیقه و ۴ درجه سانتی گراد) با دقت از مایع رویی جدا گردید(۶). رسوب تشکیل شده حاوی سورفکتانت زیستی است. عمل استخراج چندین بار با استفاده از اتیل استات در دمای اتاق انجام شد. سرانجام حلال در خلا با استفاده از تبخیرکننده چرخان و خشک کن انجمادی به طور کامل حذف شد و سورفکتانت زیستی خام به صورت یک ماده عسل مانند با رنگ قهوه ای به دست آمد (۷) این ماده توزین گردید و میزان تولید بر حسب گرم در لیتر آن محاسبه شد.

با توجه به این که روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن در محیط تولید مورد استفاده قرار گرفت فعالیت احتمالی لیپاز باکتری‌های جدا شده می‌تواند منجر به تجزیه تری آسیل گلیسرول‌های روغن آفتابگردان و تبدیل آن‌ها به اسیدهای چرب آزاد مونو و دی اسیل گلیسرول‌ها شود. از آنجایی که این ترکیب‌ها نیز دارای ویژگی سورفکتانی هستند می‌توانند منجر به مثبت شدن آزمایش جابجایی نفت شوند. بنابراین در مورد نمونه هایی که آزمایش جا به جایی نفت در آن ها مثبت بود. استخراج سورفکتانت زیستی به روش ته نشست اسیدی انجام پذیرفت تا از تولید کننده بودن کلنی مورد نظر اطمینان حاصل شود.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



شکل۳. (الف) ساختار مولکولی سورفکتانت زیستی وب) تصویر سورفکتانت زیستی استخراج شده با روش اسیدی.

تعیین غلظت بحرانی میسل شدن (CMC)

اندازه گیری CMC سورفکتانت زیستی خام در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد از راه اندازه گیری کشش سطحی به روش ویلهلمی پلیت با استفاده از دستگاه تنسیومتر کروس مدل K۱۰۰۲ انجام شد. این دستگاه مجهز به کنترل کننده دما شرکت جولابو - آلمان و قطره چکان خودکار (مدل ۷۶۵ متروهم سوئیس) بود(۸).

از محلول مادر سورفکتانت زیستی رفت‌های مختلف (۵۰ تا ۵۰۰ میلی گرم در لیتر) تهیه شد و در هر رفت کشش سطحی اندازه گیری گردید. نخست دستگاه با استفاده از آب دو بار تقطیر (۹) میلی نیوتن در متر کالیبره گردید. پیش از هر آزمایش پروب مورد استفاده چندین بار با آب دوبار تقطیر و استون شستشو داده شد و سرانجام روی شعله سوزانده شد تا همه باقیمانده سورفکتانت آزمایش پیشین حذف گردد.

کشش سطحی به دست آمده در غلظت‌های مختلف بر حسب میلی نیوتن در متر ثبت گردید و CMC بر اساس نقطه شکست در نمودار کشش سطحی در برابر لگاریتم غلظت سورفکتانت زیستی به دست آمد (۱۰).

بررسی سینتیک رشد و تولید سورفکتانت زیستی از جدایه برگزیده

سینتیک رشد باکتری و تولید سورفکتانت زیستی از آن در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری بررسی گردید و از روغن آفتابگردان به میزان ۱۰ گرم در لیتر به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. از سوسپانسیون یاخته ای به دست آمده از پیش کشت شبانه به میزان دو درصد حجمی - حجمی) با دانسیته نوری یک برای تلقیح استفاده شد و ارلن‌ها در ۴۵ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری گردیدند، در طول دوره گرمخانه گذاری هر ۲۴ ساعت یک بار مقداری نمونه در شرایط سترون از ارلن‌ها برداشته شد و پارمترهای سنتیکی زیر ارزیابی گردید.

رشد یاخته از راه اندازه گیری دانسیته نوری در ۱۰۰ نانومتر و نیز اندازه گیری وزن خشک یاخته

نحوه اندازه گیری وزن خشک یاخته : ابتدا یاخته های باکتریایی با سانتریفیوژ محیط کشت درxg ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند. سپس دوبار با سرم فیزیولوژیک شستشو داده شدند و سرانجام در گرمخانه ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و توزین شد و وزن خشک آنها بر حسب گرم در لیتر بیان گردید(۱۰).

فعالیت سطحی : با اندازه گیری قطر ناحیه شفاف در آزمایش جابجایی نفت و شاخص امولسیون کنندگی در برابر هگزادگان تعیین شد. تولید سورفکتانت زیستی : استخراج با حلال به روش ته نشینی اسیدی انجام گرفت(۱۰).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

تعیین هویت جدایه برگزیده به روشهای ریخت شناسی بیوشیمیایی و مولکولی

شناسایی جدایه منتخب با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد و برخی از ویژگی های آن نیز با روش های ریخت شناسی و رنگ آمیزی گرم تعیین گردید.

شناسایی ریخت شناسی

آزمایش رنگ آمیزی گرم پیش از آغاز رنگ آمیزی نخست باید یک گستره میکروبی از محیط کشت خالص باکتری بر روی لام تهیه کرد. در ادامه مراحل رنگ آمیزی گرم به قرار زیر هستند:

نخست رنگ کریستال ویوله را به مدت ۳۰ ثانیه روی گستره باکتریایی روی لام ریخته می شود، در نتیجه همه باکتری‌ها به رنگ بنفش در خواهند آمد. پس از شستشوی گستره با آب رنگ کریستال ویوله با افزودن لوگول به مدت ۳۰ تا ۴۵ ثانیه تثبیت می‌شود لوگل با کریستال ویوله ترکیب شده و ایجاد کمپلکس‌هایی می کند که باعث تثبیت رنگ کریستال ویوله در داخل دیواره یاخته ای باکتری می‌شود، پس از این مرحله، همه باکتری ها کماکان به رنگ بنفش مشاهده می-شوند(۱۱).

مرحله رنگ زدایی

در این مرحله پس از شستشو لام با آب، لام به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه در معرض مواد رنگ زدا مانند اتانول یا استون قرار می-گیرد، سپس با آب شستشو داده می‌شود. در باکتری‌های گرم منفی که دارای لایه های پپتیدوگلیکان محدود و غشای خارجی غنی از چربی هستند این حلال باعث حذف این لایه ها و غشاء میگردد، در نتیجه باکتری رنگ مراحل قبل را از دست می‌دهد ولی در باکتری‌های گرم مثبت به علت ضخامت زیاد لایه پپتید وگلیکانی و عدم وجود لیپید فراوان در غشا رنگ مرحله قبل از غشاء خارج نمی‌شود. در نتیجه پس از این مرحله باکتری‌های گرم منفی بی رنگ ولی باکتری‌های گرم مثبت کماکان بنفش باقی خواهند ماند. در انتها سطح گستره با سافرانین یا فوشین قرمز رنگ به مدت ۳۰ تا ۴۵ ثانیه پوشانده می‌شود. در مرحله آخر با آب مقطر شستشو داده و پس از خشک شدن با میکروسکوپ مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این مرحله باکتری‌های بی رنگ باکتری‌های گرم منفی به رنگ قرمز در می‌آیند و باکتری‌های بنفش باکتریهای گرم مثبت بدون تغییر رنگ باقی می-مانند(۱۱).

تعیین هویت مولکولی

ویژگی های ژن RNA ۱۶ که آن را به ابزاری مناسب برای مطالعه‌های فیلوژنی و ارتباط های موجود در میان گونه‌های مختلف باکتری‌ها تبدیل کرده است. در این پژوهش نیز برای شناسایی مولکولی جدایه برگزیده تولید کننده سورفکتانت زیستی از روش توالی یابی ژن ۱۶SrRNA استفاده گردید. سپس ناحیه ژنی مربوطه به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز با استفاده از دو سری پرایمر یونیورسال تکثیر یافت(جدول۲).

جدول۲-پرایمرهای مربوط به تکثیر ژن۱۶SrRNA.

پرایمر	توالی
Forward	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3′
Reverse	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT- 3′

انجام واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از دستگاه سایکلر گرمایی Touchgene gradient شرکت TECHNE استافوردشایر انگلیس انجام شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل مواد زیر بود(جدول۳):

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

جدول۳-مواد مورد نیاز جهت انجام PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر.

ماده	حجم مورد نیاز (میکرولیتر)
بافر PCR (۱۰ X)	۲/۵
$dNTP_s$ (10mM)	۰/۵
$MgCl_2$	۱
پرایمر Forward	۰/۳
پرایمر Reverse	۰/۳
DNA الگو	۰/۰۰۱
DNA Taq پلیمراز	۰/۲
آب مقطر دیونیزه	۱۷/۲
حجم نهایی	۲۵

تمامی مواد مورد نیاز جهت PCR باید در دمای ۲۰- نگهداری شوند.

مراحل انجام یک واکنش PCR، شامل موارد زیر می‌باشد:

۱. ابتدا درون ویال ۲۰۰ میکرولیتری ۱۷/۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه ریخته شد.

۲.بافر PCR (۱۰ X)، $dNTP_s$ ۱۰ میلی‌مولار و $MgCl_2$ ۲۰ میلی‌مولار به ترتیب به ویال اضافه و محتویات ویال به وسیله پی‌پتاژ کردن، با یکدیگر مخلوط شدند.

۳. در این مرحله پرایمرهای مورد نظر از استوک ۲۰ پیکومولار به ویال اضافه شده و سپس DNA الگو (استخراج شده از باکتری) اضافه گردید.

۴. در پایان، آنزیم DNA Taq پلیمراز به محتویات ویال اضافه شده و حجم کل مخلوط با استفاده از آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

برنامه به کار رفته جهت انجام PCR به شرح زیر می‌باشد:

۱. اعمال دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، به منظور از بین رفتن پیچ و تاب‌های درون مولکول DNA.

۲.اعمال دمای ۹۴ درجه سلسیوس‌به مدت ۴۵ ثانیه برای باز شدن دو رشته DNA.

۳. اتصال پرایمرها به دو رشته DNA در دمای ۵۱ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه.

۴. اتصال نوکلئوتیدها به پرایمرها و طویل شدن رشته DNA تولید شده در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و مدت زمان ۹۰ ثانیه. ۳۰ بار تکرار مرحله ۲ تا ۴.

۵ . اعمال دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه جهت تکمیل رشته‌های ناقص(۱۲).

پس از کامل شدن واکنش‌ها محصول PCR با الکتروفورز ژل آگاروز (۰/۸) آنالیز شد و نوار مربوطه به صورت یک نوار تک باند مشاهده شد. توالی یابی با استفاده از پرایمرهای ذکر شده و با دستگاه توالی یاب خودکار ABI Prism ۳۷۷

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

(کالیفرنیا ایالات متحده آمریکا) انجام شد. تشابه توالی ژن ۱۶S rRNA با دیگر توالی های موجود در بانک اطلاعات ژن که در وب سایت مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) قرار دارد به کمک نرم افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت(۱۲).سپس توالی های ۱۶S rRNA باکتری مورد نظر به شکل FASTA تبدیل گردید و با استفاده از نرم افزار MEGA (ورژن (۴) با روش ClustalW) درختچه فیلوژنی آن رسم شد(۱۲).

خالص سازی شناسایی و تعیین ساختار سورفکتانت زیستی تولید شده از جدایه برگزیده

پس از استخراج سورفکتانت زیستی به روش اسیدی آزمایش‌های زیر برای شناسایی اولیه ترکیب مورد نظر انجام شد.

بررسی ویژگی یاد میکروبی سورفکتانت زیستی حاصل جدایه AS01

ارزیابی فعالیت پاد باکتریایی سورفکتانت زیستی حاصل از جدایه AS01 با دو روش دیسک دیفیوژن کمینه غلظت مهار کنندگی (MIC) و کمینه غلظت کشنده (MBC) انجام شد(۱۳).

روش دیسک دیفیوژن

برای انجام روش دیسک دیفیوژن به این ترتیب عمل شد که ابتدا ۴ یا ۵ کلنی از باکتری های زیر:

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC)

در یک آبگوشت مناسب مانند مولر هینتون براث (MHB) کشت داده شد و در ۳۷درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد تا به کدورت ۰/۵ مک فارلند (معادل ۱۰ یاخته در هر میلی لیتر است) برسد. سپس به وسیله سوآب از این محیطها برداشته و روی پلیت موثر هینتون آگار (MHA) کشت داده شد. در ادامه ۳ بار ۶۰ درجه چرخانده شد تا اطمینان حاصل شود که رشد در همه جای پلیت یکنواخت است، ۳ تا ۵ دقیقه زمان داده شد تا رطوبت اضافی روی سطح پلیت خشک شود. سپس سورفکتانت زیستی مورد نظر با بیشترین غلظتی که در آب حل می‌شود، یعنی غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر در آب تهیه شد، دیسک‌های ۶ میلی متری که هر یک بطور مجزا به ۱۰۰ میکرولیتر از این غلظت آغشته شده بود در وسط پلیت‌ها قرار گرفت و با لوپ روی آن زده شد تا خوب به سطح آگار بچسبد پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸-۱۹ ساعت گرمخانه گذاری شد. در روش جایگزین از روش چاهک زدن بر سطح محیط مولر هینتون آگار استفاده شد که قطر چاهک ها در این روش ۶ میلی متر و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر سورفکتانت زیستی، داخل چاهک ریخته شد. ذکر این نکته لازم است که اصولا روش چاهک زدن و روش دیسک گذاری تفاوتی در نتیجه ندارند(۱۴). پس از گرمخانه گذاری قطر هاله پیرامون دیسک که در آن رشد باکتری مهار شده بود، اندازه گیری شد.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



شکل۴. قطر هاله پیرامون دیسک.

بررسی کمینه غلظت مهار کننده (MIC)

در این روش کمینه غلظت سورفکتانت زیستی که جلوی رشد باکتری را می گیرد تعیین گردید. برای انجام این آزمایش از روش استاندارد با میکروپلیتهای ۹۶ خانه ای استفاده شد(۱۵).

روش استاندارد رفیق سازی دو مرحله ای (۱۵) به این صورت بود که محلول اولیه با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از سورفکتانت زیستی در مولر هینتون براث حاوی کلرید کلسیم (۵۰) میلی گرم در لیتر و کلرید منیزیم ۲۵۰ میلی گرم در لیتر تهیه شد. سپس طی دو مرحله رقیق سازی محدوده غلظتی ۵۱۲-۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از سورفکتانت زیستی در مولر هینتون براث تهیه گردید.

در این بخش ۸ جدایه برای بررسی اثر یاد باکتریایی سورفکتانت زیستی مورد استفاده قرار گرفتند. یک کلنی مشخص از هر جدایه ،باکتریایی از روی محیط آگار برداشته و در محیط مولر هیئتون براث تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد تا زمانی که دانسیته یاخته ای به ۱×۱۰ یاخته در میلی لیتر(معادل دانسیته نوری ۰/۷ در ۱۵۰ نانومتر است) رسید. سپس به صورت پشت سر هم ابتدا به نسبت ۱ به ۱۰۰ و بعد با نسبت ۱ به ۱۰ در محلول نمکی یک نرمال رفیق شد. در هر چاهک از یک میکروپلیت ۹۶ خانه ای ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت های سورفکتانت زیستی ۵۱۲-۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر ریخته شد، سپس به هر چاهک ۵ میکرولیتر از رقت نهایی سوسپانسیون باکتریایی که در بالا تشریح شد، افزوده شد. یک چاهک به عنوان کنترل مثبت سوسپانسیون باکتریایی بدون سورفکتانت زیستی و یک چاهک به عنوان کنترل منفی (محیط کشت به تنهایی) در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد همین مراحل برای هر ۱۲ جدایه باکتریایی، انجام شد(۱۶).

بررسی کمینه غلظت کشنده (MBC)

در این روش کمینه غلظت سورفکتانت زیستی که باعث از بین بردن باکتری ها می‌شود تعیین گردید. برای به دست آوردن MBC بعد از مشخص شدن نتایج MIC در لوله از غلظت MIC و نیز غلظت‌های بالاتر از آن به اندازه یک لوپ از باکتری برداشته و در محیط مولر هیئتون آگار کشت خطی داده شد. چنانچه همه باکتری‌های تلقیح شده در لوله ها در حضور سورفکتانت زیستی کشته شده باشند روی محیط مولر هینتون آگار رشد نمی‌کند، ولی چنانچه این غلظت از سورفکتانت زیستی تنها از رشد باکتری جلوگیری کرده باشد

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

رشد مشاهده می شود. آنچه مشخص است این است که غلظت MBC غلطی بالاتر از MIC است. این مراحل برای همه باکتری هایی که MIC آنها در لوله اندازه گیری شده بود انجام شد(۱۷).

نتایج

جداسازی و تعیین ویژگیهای جدایه هایی با توانایی بالا در تولید سورفکتانت زیستی

برای جداسازی باکتری‌های با احتمال تولید سورفکتانت زیستی از منابع گوناگون در مرکز جمع آوری پسماند آوج مانند شیرابه های یک روزه و یک ماهه، کود حرارت دیده و پسماند خشک یک روزه و یک ماهه نمونه گیری به عمل آمد.

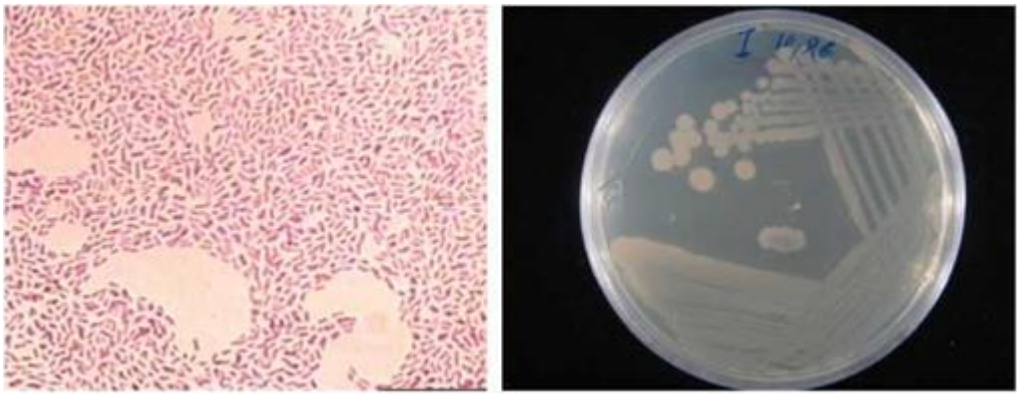
برای غربالگری اولیه باکتری‌های توانمند در تولید سورفکتانت زیستی از یک محیط کشت انتخابی استفاده شد که در آن روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن به کار رفته بود. از آزمایش جا به جایی نفت نیز با هدف غربالگری سریع باکتری‌های تولید کننده استفاده گردید. از آنجایی که از روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد و تولید احتمالی لیپاز از میکروارگانیسم های جدا شده می‌توانست منجر به شکسته شدن تری آسیل گلیسرول‌ها به اسیدهای چرب آزاد، مونو و دی آسیل گلیسرول‌ها شود و این ترکیب ها نیز دارای فعالیت در سطح هستند و می‌توانند کشش سطحی را کاهش داده و منجر به مثبت شدن آزمایش جا به جایی نفت گردند. از این رو برای جدایه هایی که آزمایش جا به جایی نفت آنها مثبت بود استخراج سورفکتانت زیستی با حلال به روش ته نشینی اسیدی انجام شد تا از تولید کننده بودن آنها اطمینان حاصل شود.

از بیش از ۱۲۰ کلنی جدا شده از منابع مختلف ۱۰ جدایه دارای نتیجه مثبت در آزمایش جابجایی نفت بودند. عمل استخراج سورفکتانت زیستی در مورد این ده جدایه انجام شد و در نهایت یک جدایه که دارای میزان تولید بیش از ۱۲ گرم در لیتر بود انتخاب شد که برای بررسی های بیشتر مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی جدایه برگزیده

شناسایی جدایه انتخاب شده به روش‌های ریخت شناسی و مولکولی انجام شد.

نتایج ریخت شناسی و آزمایش‌های اولیه بیوشیمیایی نشان داد که باکتری جدا شده، گرم مثبت میله ای شکل و هوازی است(شکل۵).

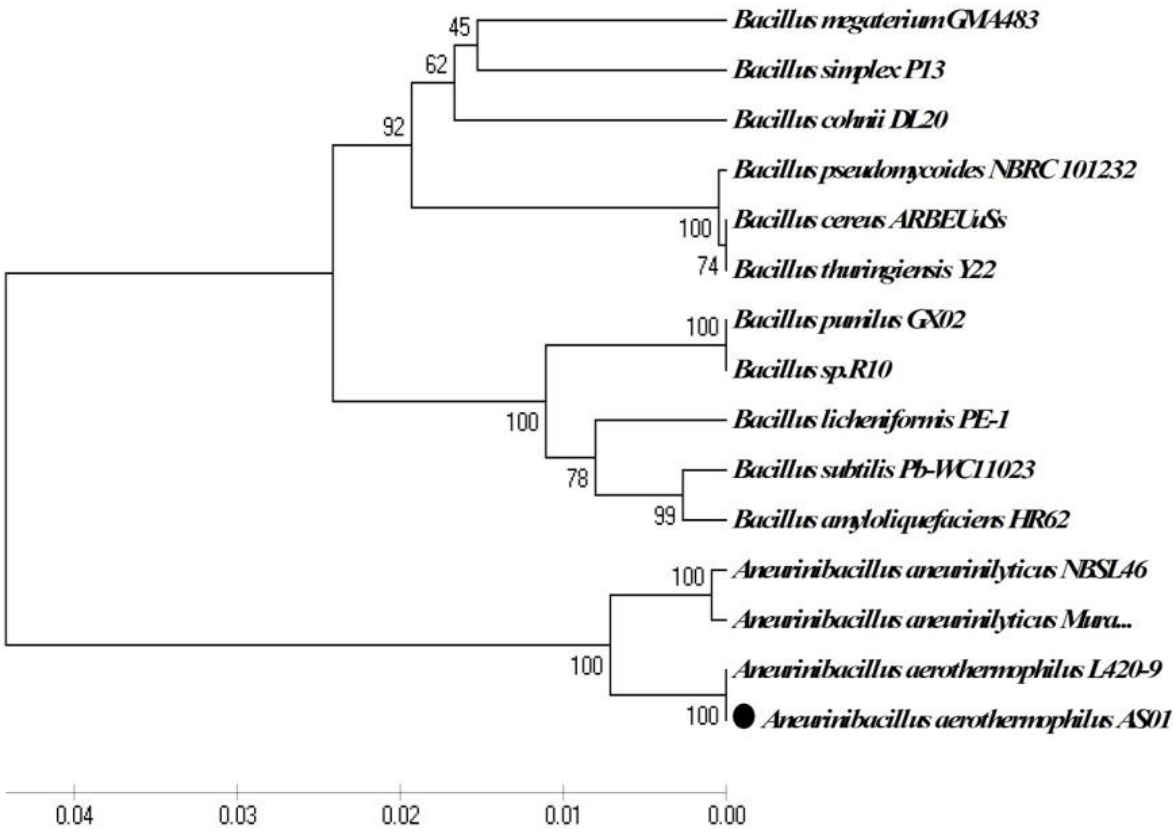


شکل۵. (الف) پلیت (ب) تصویر رنگ آمیزی گرم باکتری A. aerothermophilus AS توسط میکروسکوپ نوری.

در ضمن جدایه مورد نظر کلنی های کاملا صاف محدب (برآمده) و مرطوب تشکیل می دهد که پس از یک تا دو روز گرمخانه گذاری دارای شکلی کمی گرد با قطر یک تا دو میلی متر بود. همچنین کلنی های آن به راحتی از سطح پلیت-های آگار مغذی قابل برداشتن و جدا شدن بود. نتایج حاصل پس از مقایسه با توالی های موجود در بانک ژن متعلق به

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مرکز ملی داده های زیست فناوری (NCBI) نشان داد که جدایه به جنس Aneurinibacillus تعلق دارد و بیش از ۹۹ با گونه Aneurinibacillus aerothermophilus 420-9 همسانی دارد. سرانجام جدایه مذکور به Aneurinibacillus نامگذاری شد. توالی نسبتا کامل ژن 16S rRNA سویه AS01 در بانک ژن در وب سایت NCBI موجود است. شکل(۶) درختچه فیلوژنی سویه AS01 و تعلق آن را به جنس Ancurinibacillus و نزدیکی آن را به گونه aerothermophilus نشان می‌دهد.

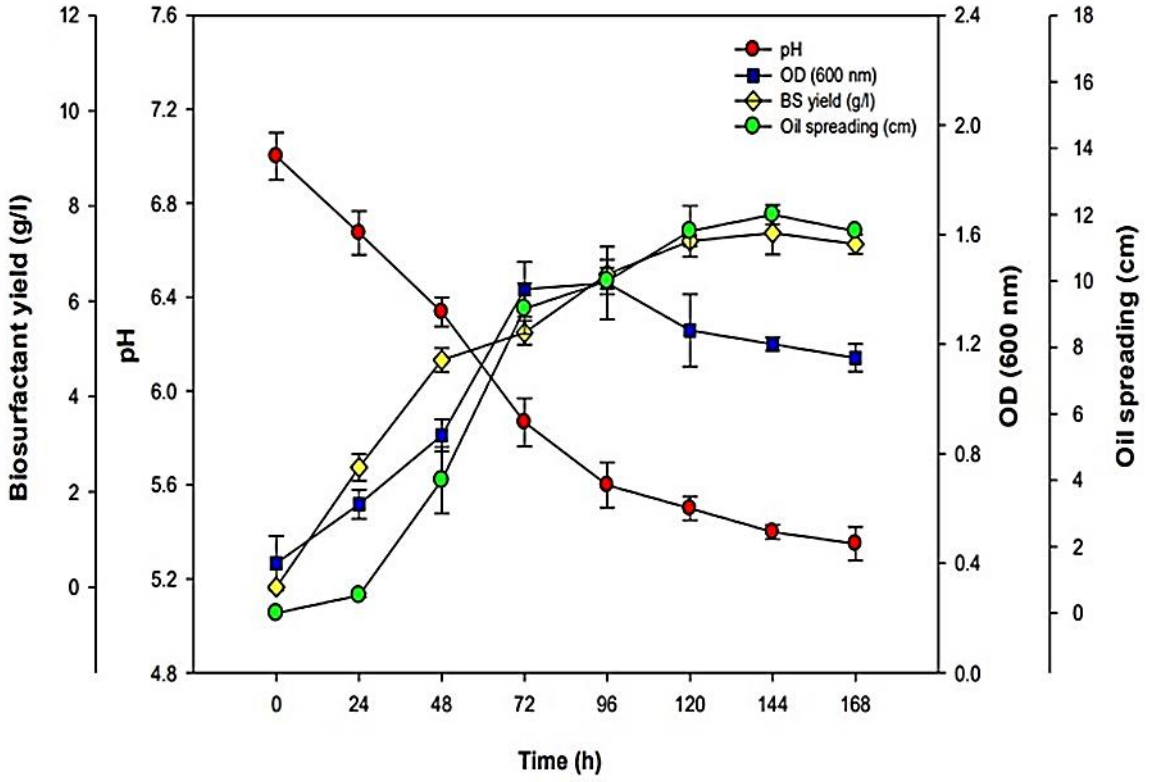


شکل۶. در خنچه فیلوژنی بر اساس توالی زن 16S rRNA نشان دهنده موقعیت جدایه AS01 .

سینتیک تولید سورفکتانت زیستی

سینتیک تولید سورفکتانت زیستی از جدایه Aneurinibacillus aerothermophilus AS01 یا استفاده از محیط کشت تولید با ۱۰ گرم در لیتر روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن و گرمخانه گذاری آن در ۵۰ درجه سانتی گراد با ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ روز انجام شد. در طول دوره گرمخانه گذاری پارامترهای دانسیته نوری (۱۰۰) نانومتر) قطر ناحیه شفاف (سانتی متر) به عنوان شاخصی از تولید سورفکتانت زیستی غلظت سورفکتانت زیستی گرم در لیتر) و pH محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت، نتایج نشان داد که رشد باکتری (دانسیته نوری در ۱۰۰ نانومتر در روز سوم از دوره گرمخانه گذاری به بیشینه مقدار خود رسیده و به تدریج طی روزهای باقی‌مانده کاسته می شود(شکل۷).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

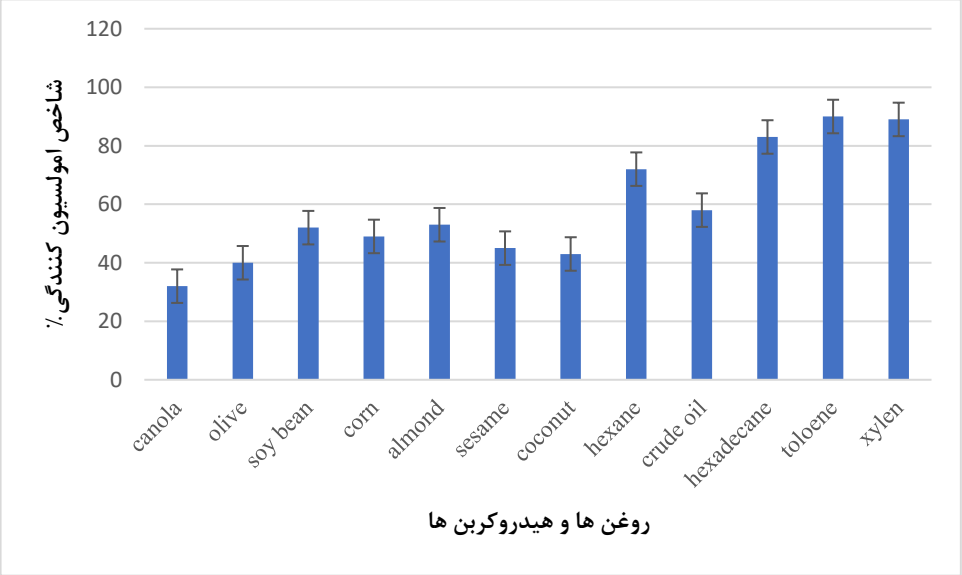


شکل۷.نمودار سینتیک تولید سورفکتانت زیستی از جدایه AS01 با استفاده از روغن آفتابگردان (۴۰ گرم در لیتر) به عنوان تنها منبع کربن.

شاخص امولسیون کنندگی

شاخص امولسیون کنندگی (۱۱) محلول یک گرم در لیتر سورفکتانت زیستی در برابر روغن های گیاهی و هیدروکربنهای مختلف بررسی شد شکل(۸). به طور کلی سورفکتانت زیستی حاصل از جدایه AS01 در امولسیون کردن روغن‌های گیاهی در مقایسه با هیدروکربن ها توان کمتری داشت سورفکتانت زیستی حاصل تنها توانست روغن‌های نارگیل و ذرت را بیش از ۵۰ امولسیون کند در حالی که فعالیت امولسیون کنندگی مناسبی در برابر هگزان ، هگزادگان زایلن و تولوئن داشت به گونه ای که شاخص امولسیون کنندگی در مورد این مواد بین ۵۵/۸ تا ۱۰۰ بود. نتایج به دست آمده می‌تواند نوید بخش استفاده از این ماده در آسان سازی دسترسی میکروب های موجود در محیط زیست به آلاینده ها شده و به روش‌های زیست پالایی کمک نماید (۱۲). منبع کربن مورد استفاده می‌تواند ویژگی امولسیون کنندگی آن را تحت تاثیر قرار دهد.

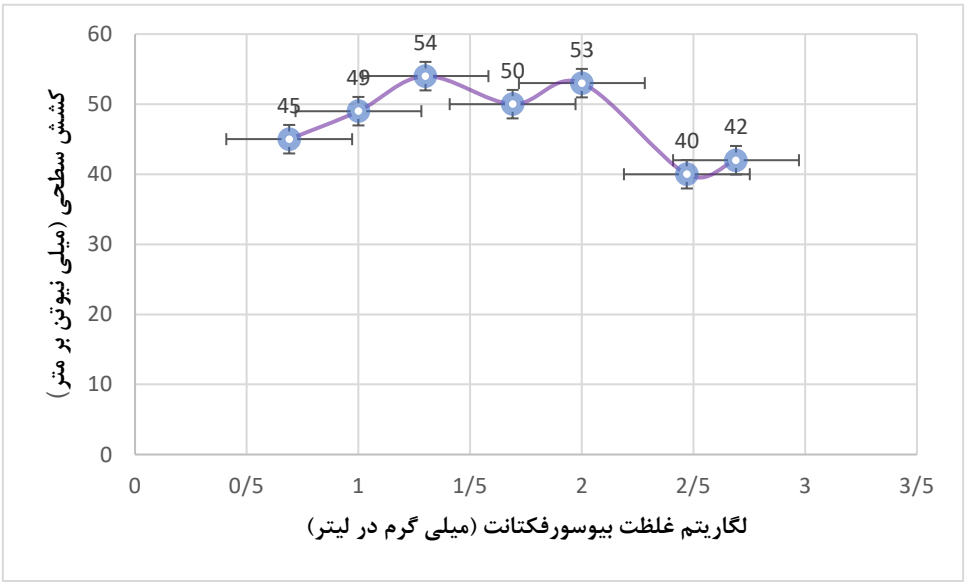
[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



شکل۸.شاخص امولسیون کنندگی (۱) سورفکتانت زیستی حاصل از جدایه AS01 در برابر انواع روغن ها و هیدروکربن ها .

اندازه گیری غلظت بحرانی میسل شدن (CMC)

با افزایش غلظت سورفکتانت در آب کشش سطحی کم کم کاهش می‌یابد در غلظت مشخصی که غلظت بحرانی میسل شدن نامیده می‌شود، این کاهش متوقف می‌شود و در بالای نقطه CMC کشش سطحی تقریبا ثابت باقی می ماند(۱۷)(شکل۹).



شکل۹. مقدار CMC محلول آبی سورفکتانت زیستی تولید شده از سویه AS01.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

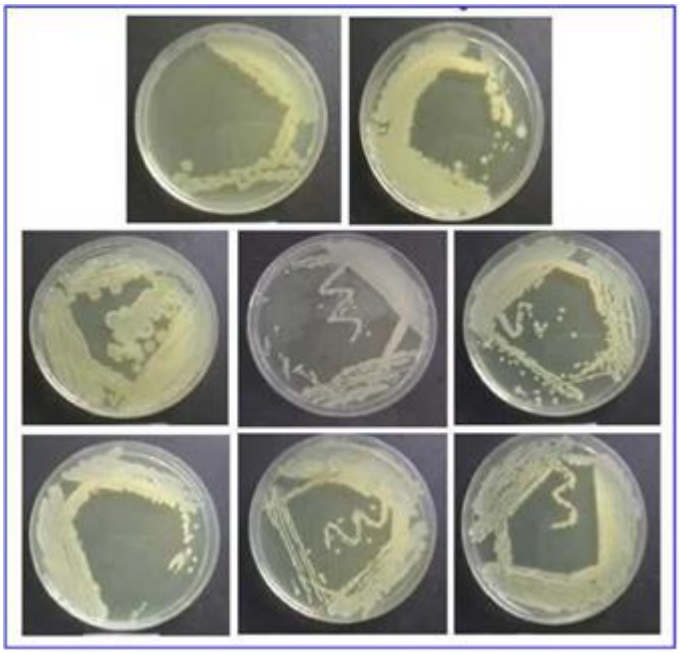
بررسی ویژگی‌های پاد میکروبی سورفکتانت زیستی حاصل از جدایه AS01

روش نفوذ از دیسک

نتایج حاصل از روش نفوذ از دیسک (جدول۲) نشان داد که از میان باکتری ها جدایه های باسیلوس سرئوس وسالمونلا تیفی موریوم به سورفکتانت زیستی حاصل از رشد باکتری روی روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن حساسیت نشان دادند در محدوده غلطی بررسی شده باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه حساسیتی به سورفکتانت زیستی نشان ندادند.

تعیین کمینه غلظت مهارکننده و کشنده

نتایج بررسی کمینه غلظت مهار کننده و کشنده سورفکتانت زیستی حاصل از جدایه AS01 روی شماری از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از روش استاندارد در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه در جدول (۴) آمده است. نتایج این تست با نتایج حاصل از روش نفوذ از دیسک مطابقت دارد. علاوه بر اینکه با توجه به کمینه غلظت کشنده سورفکتانت زیستی بر روی سودوموناس آثروجینوزا در این تست نشان دهنده حساسیت کم این باکتری به سورفکتانت زیستی مورد نظر است. ولی بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس با توجه به مقدار کمینه غلظت کشنده اثر مهار کنندگی خوبی نشان می دهد(شکل۱۰).



شکل۱۰.باکتری‌های بیماری زای بکار برده شده در تعیین کمیته غلظت مهار کننده و کشنده.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

جدول۴- نتایج حاصل از روش نفوذ از دیسک و کمینه غلظت کشنده سورفکتانت زیستی حاصل از سویهAS01 با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر روی چند سویه از باکتری‌های بیماری زا.

باکتری	کد ثبت	قطر منطقه شفاف پیرامون دیسک (میلی متر)	کمینه غلظت مهار کنندگی
استافیلوکوکوس اورئوس		۳۲۱	۵۱۲
باسیلوس سوبیلیس		۲۰	۶۴
باسیلوس سرئوس	PTCC (۱۱۵)	۱۷۲	۶۴
اشرشیا کلی		۲۰۱	۱۲۸
سالمونلا تبقی موریوم	جدایه وحشی	۱۸	۱۲۸
کلبسیلا پنومونیه		۳۱۲	۵۱۲
سودوموناس آئروژینوزا		۲۴۷	۵۱۲

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش به جداسازی و تعیین ویژگی‌های باکتری‌هایی با توانمندی بالای تولید سورفکتانت زیستی از پسماندهای شهری و کشاورزی تازه و گندیده پرداخته شده است. ویژگی های فیزیکی و شیمیایی فرآورده خالص شده و تعیین ساختار دقیق شیمیایی آن نیز مورد بررسی قرار گرفته است. طبق مقالات ارائه شده باکتری‌های تولید کننده سورفکتانت زیستی از منابع مختلفی استخراج و جداسازی شده و مورد بررسی و تعیین ساختار قرار گرفته اند، اکثر سورفکتانت های زیستی از چاه‌های نفت و یا از زمین‌های آلوده به نفت؛ از پساب کارخانه ها و فاضلاب‌ها جداسازی شده اند و جداسازی باکتری از پسماند شهری و کشاورزی تا به حال صورت نگرفته است در این پژوهش از منابع گوناگونی برای نمونه گیری و جداسازی جدایه‌هایی با توانمندی تولید سورفکتانت زیستی استفاده شد. از شیرابه پسماندهای تازه و یک ماهه از کود حاصل از پسماند حرارت دیده و از پسماند تازه و یک ماهه استفاده شد. برای غربالگری اولیه باکتری-های توانمند در تولید سورفکتانت زیستی از یک محیط کشت انتخابی استفاده شد که در آن روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن به کار رفته بود در پژوهش صورت گرفته توسط عباسی و همکاران از روغن سویا به عنوان تنها منبع کربن بکار گرفته شده بود(۸)، برای غربالگری سریع باکتری‌های تولید کننده از آزمایش جابه جایی نفت استفاده گردید. جدایه هایی که آزمایش جابجایی نفت خام آن ها مثبت بود. سورفکتانت زیستی تولید شده به روش ته نشینی با اسید استخراج شد و برای سنجش مقدار تولید استفاده شد. از بیش از ۱۲۰ کلنی جدا شده از منابع مختلف ۱۰ جدایه دارای نتیجه مثبت در آزمایش جابجایی نفت بودند. عمل استخراج سورفکتانت زیستی در مورد این ده جدایه انجام شد و در نهایت یک جدایه که دارای میزان تولید بیش از ۱۲ گرم در لیتر بود انتخاب شد و برای بررسی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفت، این مقدار تولید در مقایسه با دیگر باکتری های تولید کننده سورفکتانت زیستی قابل ملاحظه است(۱۸).

شناسایی جدایه انتخاب شده به روش‌های ریخت شناسی بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد. نتایج ریخت شناسی و آزمایش‌های اولیه بیوشیمیایی نشان داد که باکتری جدا شده، گرم مثبت، میله ای شکل و هوازی است. نتایج نشان داد که جدایه انتخابی به جنس Aneurinibacillus و گونه aerothermophilusتعلق دارد برای تایید آزمایش‌های

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مربوط به شناسایی بیوشیمیایی جدایه منتخب از روش توالی یابی ژنی16S rRNA استفاده شد(۱۹). نتایج حاصل پس از مقایسه با توالی های موجود NCBI نشان داد که جدایه به جنس Aneurinibacillus تعلق دارد و بیش از ۱۰۰ با گونه aerothermophilus420-9 Aهمسانی دارد. سرانجام جدایه مذکور به نامAneurinibacillus aerothermophilus AS نامگذاری شد. سینتیک تولید سورفکتانت زیستی نشان داد که تولید سورفکتانت زیستی پس از گذشت ۲۴ ساعت از دوره گرمخانه گذاری به میزان ۲ گرم در لیتر آغاز شد و به تدریج به صورت پیوسته مقدار تولید افزایش یافته و در روز ششم به ۸ گرم در لیتر یعنی مقدار بیشینه خود رسید. نتایج همچنین نشان داد که تولید سورفکتانت زیستی وابسته به رشد است ولی با این حال بیشینه مقدار تولید در مرحله سکون رشد به دست می آید که نمایانگر این است که سورفکتانت زیستی تولید شده متابولیت ثانویه است، در حالی که تولید سورفکتانت زیستی برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا MA01نشان داد که پس از گذشت ۲۴ ساعت از دوره گرمخانه گذاری به میزان ۰/۵ گرم در لیتر آغاز شد و به تدریج به صورت پیوسته مقدار تولید افزایش یافته و در روز چهارم به پنج گرم در لیتر رسید که می تواند در ارتباط با بیشینه رشد یاخته در روز چهارم باشد. سپس با کاهش تدریجی رشد در روز پنجم دوره گرمخانه گذاری افزایش معنی داری در میزان تولید بیوسورفکتانت مشاهده شد حدود هشت گرم در لیتر) تولید پس از گذشت ۱۰ روز از دوره گرمخانه گذاری به صورت نسبتاً پایداری به بیشینه مقدار خود یعنی ۱۲ گرم در لیتر رسید و این مقدار تولید تا پایان دوره گرمخانه گذاری یعنی روز بیستم ادامه دارد(۲۰). با مقایسه آنها این نتیجه حاصل می‌شود که طول دوره تولید برای بیشینه تولید سورفکتانت زیستی در سویه AS01 کمتر میباشد که مقرون به صرفه تر است از طرفی بیشینه تولید در سویه MA01 بیشتر است.

در اکثر سورفکتانت های زیستی استخراج شده از باکتری‌ها قابلیت تحمل به دما pH و قدرت یونی مورد بررسی قرار گرفته است چرا که از مهمترین ویژگی‌های سورفکتانت های زیستی و یکی از علل برتری آنان نسبت به سورفکتانت های صنعتی است مثلا سورفکتانت زیستی حاصل از باسیلوس لکینی فورمیس JF دما را تا محدوده ۵۰ درجه سانتی گراد pH را در محدوده ۹-۴/۵ و غلظت یون سدیم را تا ۵۰ و کلسیم را تا ۲۵ درصد تحمل می کند و نیز لیپوپپتید حاصل از باسیلوس سوبتیلیس در محدوده دمای تا ۱۸ سانتی گراد و در اتوکلاو دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۲۰ دقیقه و محدوده pH بین ۱۱-۵ و غلظت ۲۰ درصد کلرید سدیم را تحمل می-کند(۲۰ ، نتایج بررسی پایداری سورفکتانت زیستی خالص حاصل از سویه جدا شده در این تحقیق نشان داد که این ماده می‌تواند در محدوده وسیعی ازpH (۳-۹) ، غلظت‌های بالای نمک (تا ٪۱۸) و نیز دماهای جوش اتوکلاو فریزر و یخچال فعالیت سطحی خود را حفظ کند در حالی که در پژوهش انجام شده توسط عباسی و همکاران آستانه تحمل در محدوده pH (۴-۱۰) و به غلظت های نمک (تا٪۱۵) بوده است. این نتایج نوید بخش توانایی استفاده از آن در شرایط سخت صنعتی مانند دمای بالای سترون کردن فرآورده ها در صنایع غذایی است(۳).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی سورفکتانت زیستی حاصل از جدایه aerothermophilus AS01در امولسیون کردن روغن‌های گیاهی در مقایسه با هیدروکربن‌ها توان کمتری داشت سورفکتانت زیستی حاصل تنها توانست روغن‌های نارگیل و ذرت را بیش از ۵۰٪ امولسیون کند. در حالی که فعالیت امولسیون کنندگی مناسبی در برابر زایلن هگزادگان و تولوئن داشت به گونه ای که شاخص امولسیون کنندگی در مورد این مواد بین ۵۵/۸ تا ۱۰۰٪ بود که می‌توان از آن برای کاربردهای زیست پالایی استفاده کرد.

مقدار CMC سورفکتانت زیستی بسیار پایین و ۳۹ برابر میلی گرم در لیتر بود. در این نقطه کشش سطحی ۴۰/۵ میلی نیوتن بر متر به دست آمد که نشان می‌دهد این ماده از ویژگی

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

سورفکتانتی بالایی برخوردار است بدین مفهوم که برای کاهش کشش سطحی در کاربردهای خاص مقدار کمتری از ماده مورد نیاز است.بیشینه بازده تولید سورفکتانت زیستی بیش از ۱۲ گرم در لیتر زمانی به دست آمد که جدایه AS01 در روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن رشد داده شود. نتایج حاصل از روش نفوذ از دیسک نشان می دهد که از میان باکتری ها، جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس وکلبسیلا پنومونیه به سورفکتانت زیستی حاصل از رشد باکتری روی روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن حساسیت نشان داده اند. در محدوده غلظتی بررسی شده باکتری‌های باسیلوس سرئوس وسالمونلا تیفی موریوم حساسیتی به سورفکتانت زیستی نشان ندادند(۲۲). نتایج بررسی کمینه غلظت مهار کننده و کشنده سورفکتانت زیستی حاصل از جدایه AS01 با نتایج حاصل از روش نفوذ از دیسک مطابقت دارد. بجز اینکه با توجه به کمینه غلظت کشنده سورفکتانت زیستی بر روی سودوموناس آئرو جینوزا یعنی در غلظت ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر در این تست نشان دهنده حساسیت کم این باکتری به سورفکتانت زیستی مورد نظر بوده است ولی بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس با توجه به مقدار کمینه غلظت کشنده ، غلظت ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر اثر مهار کنندگی خوبی نشان می‌دهد(۲۳). این نشان دهنده این است که هم بر باکتری های گرم مثبت و هم گرم منفی اثر باز دارندگی دارد. در صورتی که آثار پادباکتریایی رامنولیپید تولید شده از سودوموناس آئروژینوزاMR01 نشان داده اند که این سورفکتانت زیستی بر باکتری های گرم مثبت اثر بیشتری دارد و می‌تواند در غلظت ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر اثر بازدارندگی علیه باکتری های استرپتوکوکوس نومونیا استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتلیس داشته باشد در حالی بر باکتری های گرم منفی اثر بازدارندگی ندارد(۲۵،۲۴).

با توجه به مزایای ذکر شده برای سورفکتانت های زیستی در مقایسه با همتایان شیمیایی آنها و توانایی بالای جدایه AS01 در تولید سورفکتانت زیستی می‌توان با تجاری سازی فرآیند تولید زمینه را برای استفاده از سورفکتانت های زیستی در صنایع گوناگون فراهم نمود. از طرف دیگر از آنجایی که این مقدار بالای تولید با استفاده از روغن آفتابگردان به عنوان تنها منبع کربن به دست آمده است امیدواری بیشتری ایجاد می-شود که بتوان فرآیند تولید را به صورتی در آورد که از نظر قیمت نیز با همتایان شیمیایی خود قابل رقابت باشد.

.

.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

منابع

10. Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., Garcia, F., Manresa, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa AT01 from soybean oil refinery wastes. Langmuir.2001. Volume 09, Issue 2, Pages 0139-0190.

12. Salehizadeh, H., Mohammadizad, S. Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by Alcaligenes faecalis. Iranian Journal of Biotechnology.2009. Volume 9, Issue 1, 203-221.

13. Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 21, Issue 2, Pages 172-218.

14. Soudmand-Asli, A., Ayatollahi, S.S., H., Mohabatkar, Zareie, M., Shariatpanahi, S.F. The in situ microbial enhanced oil recovery in fractured porous media. Journal of Petroleum Science and Engineering .2007.Volume 28, Issue 0-2, Pages 030-092.

15. Partovinia, A., Naeimpoor, F., Hejazi, P. Carbon content reduction in a model reluctant clayey soil: Slurry phase n-hexadecane bioremediation. Journal of Hazardous Materials .2010.Volume 080, Issue 0-1, Pages 011-017.

16. Falatko, D.M., Novak, J.T. Effects of Biologically Produced Surfactants on the Mobility and Biodegradation of Petroleum-Hydrocarbons. Water Environment Research .1992.Volume 31, Issue 2, Pages 031-037.

17. Butt, H.-J., Graf, K., Kappl, M. Surfactants, Micelles, Emulsions, and Foams, in Physics and Chemistry of Interfaces.2004. Pages 213-297.

18. Amani, H., Mehrnia, M.R., Sarrafzadeh, M.H., Haghighi, M., Soudi, M.R. Scale up and Application of Biosurfactant from Bacillus subtilis in Enhanced Oil Recovery. Applied Biochemistry and Biotechnology.2010. Volume 032, Issue 2, Pages 201-221.

19. Makkar, R.S., Cameotra, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of Bacillus subtilis. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology .1998.Volume 21, Issue 0, Pages 18-22.

20. Thimon, L., F., Peypoux, Michel, G. Interactions of surfactin, a biosurfactant from bacillus subtilis, with inorganic cations. Biotechnology Letters.1992. Volume 01, Issue 8, Pages 901-908.

21. Lukondeh, T., Ashbolt, N.J., Rogers, P.L. Evaluation of Kluyveromyces marxianus FII

Banat I, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, 1 Martinotti M, Fracchia L. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiolol and Biotechnol*. 2020; 2): 427-44.87 (

2. Kim, B.S., Lee, J.Y., Hwang, B.K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against Phytophthora capsici and Colletotrichum orbiculare. Pest Management Science. 2000. Volume 23, Issue 02, Pages 0127-0112.

Mireles JP, Toguchi A, Harshey RM. *Salmonella* 3. *enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol*.2023;183 20): 5848-54.(

4. Bodour AA, Gerrero-Barajas C, Maier M. Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *Appl and Env Microbiol*. 2020; 6): 14-20.10 (

5. Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica ET Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids.2010 .Volume 0188, Issue 1, Pages 200-208.

6. Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnology Advances .2007.Volume 22, Issue 0, Pages 77-020.

7. Wei, Y.H., Chou, C.L, J.S. Rhamnolipid production by indigenous Pseudomonas aeruginosa J1 originating from petrochemical wastewater. Biochemical Engineering Journal.2005. Volume 29, Issue 2, Pages 013-021.

8. Abbasi, H., Hamedi, M.M., Bagheri Lotfabad, T., Shahbani Zahiri, H., Sharafi, H., Masoomi, F., Moosavi-Movahedi, A.A., Ortiz, A, Amanlou, M., Akbari Noghabi, k. Biosurfactant-producing bacterium, Pseudomonas aeruginosa MA10 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactantm. Journal of Bioscience and Bioengineering.2012.Volume 001, Issue 2, Pages 200–207.

9. Kumar, M., Leon, V., Materano, A.D.S., Ilzins, O.A., Luis, L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant Pseudomonas sp. World Journal of Microbiology & Biotechnology.2008. Volume 21, Issue 9, Pages 0119-0129.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

201911 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology .2015.Volume 11, Issue 02, Pages 902-921.

22. Cameotra, S.S., Makkar, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Applied Microbiology and Biotechnology .2016.Volume 21, Issue 2, Pages 221-227.

23. Kim, B.S., Lee, J.Y., Hwang, B.K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against Phytophthora capsici and Colletotrichum orbiculare. Pest Management Science.2011. Volume 23, Issue 02, Pages 0127-0112.

24. de Souza, J.T., de Boer, M., de Waard, P., van Beek, T.A., Raaijmakers, J.M. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by Pseudomonas fluorescens. Applied and Environmental Microbiology.2011. Volume 37, Issue 02, Pages 9030-9092.

25. Jenneman, G.E., McInerney, M.J., Knapp, R.M. Effect of nitrate on biogenic sulfide production. Applied and Environmental Microbiology .1986.Volume 001, Issue 2, Pages 0212-0200.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]