فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۶، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۴۱- ۵۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۱/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۵

جداسازی و شناسایی باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت از جنس *سودوموناس آئروژینوزا* و بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت تولیدی در شرایط آزمایشگاهی

محمد جواد مصطفی پور رمی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه ایلام، ایران، javadmostafapur@yahoo.com *
سلمان احمدی اسب چین: استادیار میکروبیولوژی صنعتی، دانشگاه ایلام، ایران، sahmadyas@yahoo.fr

چکیده

مقدمه: بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات زیستی آمفی‌فیلیک به شکل خارج سلولی یا بخشی از غشاءهای سلولی تولید شده به‌وسیله انواع میکروارگانیسم‌ها هستند که به علت استفاده از آن‌ها در صنایع مختلف از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. بنابراین، هدف از این پژوهش شناسایی یک سویه باکتری از جنس *سودوموناس آئروژینوزا* تولید کننده بیوسورفکتانت بود.

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

نتایج: در این پژوهش، ۸۸ سویه باکتریایی جداسازی شدند. از میان آن‌ها ۲۴ سویه دارای فعالیت همولیتیک بودند که از میان آن‌ها ۱۴ سویه فعالیت امولسیفیه کنندگی بالای ۷۰ درصد داشتند و در نهایت، از میان آن‌ها ۴ سویه قادر به رساندن کشش سطحی به کمتر از ۴۰ میلی‌نیوتن بر متر بودند. براساس آزمایش‌های بیوشیمیایی، یک سویه انتخابی در این پژوهش، به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳، شناسایی و انتخاب شد. نتایج بررسی ماهیت بیوسورفکتانت با کروماتوگرافی لایه نازک[1] مشخص شد که از نوع گلیکولیپیدی بود. همچنین، بیوسورفکتانت تولیدی سویه انتخابی دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه ۶ باکتری عفونت‌زا بودند. حساس‌ترین باکتری نسبت به تاثیر عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ و *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین باکتری نسبت به این عصاره، *پروتئوس میرابیلیس* است. همچنین، نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی[2] و حداقل غلظت کشندگی[3] نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره دررقت ۶۳ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب بر روی باکتری *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* موثر بود. همچنین، حداقل غلظت کشندگی عصاره در رقت ۶۳ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب بر روی *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: *سودوموناس آئروژینوزا* قابلیت بالایی در کاهش کشش سطحی و بیوسورفکتانت استخراج شده از آن دارای اثرات ضدباکتریایی بالایی است. بنابراین، می‌توان گفت که این باکتری دارای پتانسیل فراوانی برای کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست محیطی است.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، بیوسورفکتانت، کشش سطحی، امولسیفیه کنندگی، گلیکولیپید، فعالیت ضد باکتریایی

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات زیستی آمفی‌فیلیکی تولید شده به شکل خارج سلولی یا بخشی از غشاءهای سلول به‌وسیله انواع میگروارگانیسم‌ها هستند. بیوسورفکتانت‌ها از لحاظ تجاری به علت استفاده در صنایع مختلف از جمله صنعت نفت، پتروشیمی، غذایی، داروسازی پزشکی، آرایشی، کشاورزی، نساجی، کاغذسازی، چرم‌سازی و غیره از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. به همین جهت میکروارگانیسم‌های تولید کننده این ترکیبات به علت دارا بودن نسبت بالای سطح به حجم و ظرفیت متنوع بیوسنتتیک، کاندیدای مناسبی برای گسترش تولید بیوسورفکتانت هستند (۱ و ۲) . در پزشکی حرکت سوارمینگ و تشکیل بیوفیلم اعمال مهم در کلونیزاسیون سطح به وسیله باکتری‌ها هستند و احتمال بروز عفونت‌ها را افزایش می‌دهد. بیوسورفاکتانت‌ها برای جلوگیری از چسبندگی ارگانیسم‌های بیماری‌زا به سطوح جامد یا به محل‌های عفونت، تولید شده‌اند. سورفاکتین باعث کاهش میزان تشکیل بیوفیلم به‌وسیله *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *سالمونلا انتریکا*، *اشریشیا کلی* و *پروتئوس میرابیلیس* در پلی‌وینیل کلراید و همچنین، در سوندهای مجرای وینیل می‌شود. به تازگی، از بیوسورفکتانت ال-فرمنتوم به منظور مهار عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* و چسبندگی برای ایمپلنت‌های جراحی گزارش شده است (۳) . بیوسورفاکتانت‌ها کاربردهای بسیار گسترده‌ای در صنایع غذایی هم دارند. در حال حاضر، گروهی از این ترکیبات به‌عنوان افزودنی‌های مجاز مواد غذایی به‌کار می‌روند. برای مثال، لسیتین و مشتقات آن، استرهای اسیدهای چرب حاوی گلیسرول، سوربیتان[۴] یا اتیلن گلیکول و مشتقات اتیوکسیلات منوگلیسریدهای حاوی یک الیگوپپتید، در تمام دنیا به عنوان عوامل امولسیونه‌کننده در مواد غذایی استفاده می‌شوند (۴ و ۵). بیوفیلم به عنوان گروهی از باکتری‌هایی است که در یک سطح کلونیزه می‌شوند. بیوفیلم نه تنها شامل باکتری‌ها، بلکه توصیف همه مواد خارج‌سلولی تولید شده در سطح و هر نوع مواد به دام افتاده در داخل ماتریکس است. مرحله اول در ایجاد بیوفیلم چسبندگی باکتریایی است که تحت‌تاثیر عامل‌هایی از جمله گونه‌های میکروارگانیسم، آب‌گریزی سطح و بارهای الکتریکی درگیر، شرایط محیطی و توانایی میکروارگانیسم‌ها برای تولید پلیمرهای خارج‌سلولی که در اتصال سلول‌ها به سطوح کمک می‌کند، است (۶). بیوفیلم در حال حاضر در سطوح صنایع‌غذایی منبع مهم آلودگی است، که ممکن است به فساد مواد غذایی و انتقال بیماری منجر شود. با توجه به این واقعیت که نگه دارنده‌های مواد غذایی دارای سطح تحمل صفر برای پاتوژن مانند *سالمونلا* و همچنین، در بسیاری از کشورها برای باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* هستند، سلول‌های چسبنده منفرد ممکن است به طور در خور توجهی به شکل بیوفیلم به خوبی گسترش یابند. در نتیجه کنترل چسبندگی میکروارگانیسم‌ها به سطوح در تماس با مواد غذایی یک مرحله اساسی در فراهم آوردن ایمنی و محصولات با کیفیت به مصرف‌کنندگان است. از این رو، دخالت بیوسورفکتانت‌ها در چسبندگی میکروبی و جداشدن از سطوح بررسی شده است (۶). سورفاکتانت منتشرشده به‌وسیله *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* برای کنترل زنگ زدگی صفحات مبدل حرارتی در پاستوریزه کردن استفاده می‌شود که کلونیزاسیون گونه‌های دیگر گرما دوست استرپتوکوک‌ها که مسئول زنگ زدگی هستند را به تاخیرمی‌اندازد (۶). در این پژوهش،

جداسازی و شناسایی سویه تولید کننده بیوسورفکتانت از جنس *سودوموناس آئروژینوزا* و بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت تولید شده از آن بر روی رشد ۶ باکتری گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، نمونه‌ها از منابع مختلف از جمله نفت خام نفت‌شهر کرمانشاه (چاه ۲۵)، آب و خاک‌های آلوده به نفت نواحی اطراف مخازن نفتی جمع آوری شدند. برای نمونه‌گیری از شیشه‌های در پوش‌دار استریل استفاده شد.

غنی‌سازی و کشت میکروبی

پس از انجام نمونه‌گیری و ارسال به آزمایشگاه ۵ میلی‌لیتر ازنمونه آب و ۵ گرم ازنمونه خاک آلوده به نفت در ۹۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تقویت شده[۵] در داخل ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتر تلقیح و در دمای ۳۰ درجه به مدت۷۲ ساعت شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه[۶]) و گرمخانه‌گذاری شدند (۷ و ۸). محیط نوترینت براث تقویت شده استفاده شده در این تحقیق، محتوای ۵۰۰ میلی‌لیتر نوترینت براث و ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول نمک معدنی[۷] است. محلول نمک معدنی استفاده شده در این تحقیق، در هر لیتر آب مقطر محتوای: ۲ گرم KH_2PO_4، ۵ گرم K_2HPO_4، ۳ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۱ گرم Nacl، ۰/۰۱گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۲گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۲ گرم $MnSO_4.7H_2O$، ۰/۲۵گرم $CuSO_4.5H_2O$، ۰/۲۴گرم $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۰۳ درصد گلوکز و ۰/۰۳ درصد عصاره مخمر[۸]، با اسیدیته ۷/۲ تنظیم شد. پس از آن از این محیط از 10^{-1} تا 10^{-6} در فسفات بافر سالین رقت‌های متوالی تهیه شد و سپس هر رقت در محیط کشت نوترینت آگار تقویت شده[۹] (۱,۲ نوترینت براث تقویت شده همراه با ۲ درصد آگار) به شکل پورپلیت[۱۰] کشت داده شد. به منظور افزایش دادن تعداد باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت برای نمونه نفت ابتدا یک میلی‌لیتر نفت خام در۹۹ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تقویت شده در داخل ارلن مایر ۲۵۰ کشت داده شد و همین‌طور یک میلی‌لیتر نفت فیلتر شده نیز به همراه ۹۹ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تقویت شده به عنوان شاهد قرار داده شد. هر دو ارلن در دمای ۳۰ درجه به مدت ۲ ساعت شیکر وگرمخانه‌گذاری شدند (۱۵۰rpm). پس از ۲ ساعت از کشت مورد نظر رقت‌های متوالی تهیه شد. برای رقت‌سازی بجای بافر فسفات سالین از نوترینت براث تقویت شده استفاده شد و از هر رقت در محیط کشت نوترینت آگار تقویت شده به شکل پورپلیت کشت داده شد و از محیط‌های گلوکز عصاره مخمر آگار[۱۱] برای جداسازی سایر باکتری‌ها و از محیط مکانکی آگار، ائوزین متیل بلو آگار[۱۲] و اندو آگار برای جداسازی باکتری‌های گرم منفی از گرم مثبت استفاده شد. تمام پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (۹ و ۱۰).

غربال‌گری

آزمایش همولیزخون

نخستین آزمایش غربال‌گری برای شناسایی و جداسازی باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت آزمایش همولیز است. تک کلونی‌هایی که تازه از تمام کشت‌های خالصی به‌دست آمده بودند بر روی آگار حاوی خون به‌طور خطی کشت داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند (۷ و ۱۱).

اندازه گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی

در این مرحله هر کدام از کلونی جدا شده از غربال‌گری اولیه در لوله آزمایش محتوای ۳ میلی‌لیتر محیط محلول نمک معدنی به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. پس از تلقیح دو کلونی در هر محیط، به میزان ۱۰ درصد هیدروکربن (نفت خام) به لوله اضافه و پس از مخلوط کردن با دستگاه ورتکس[۱۳] به مدت یک دقیقه، در دمای ۳۰ درجه به مدت ۳ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه گذاری لوله‌ها خوب با ورتکس مخلوط و در ادامه ضخامت لایه نفت امولسیفیه شده به شکل زیر محاسبه شد (۹ و ۱۱).

EC= طول لایه امولسیفیه شده / طول کل ستون مایع ×۱۰۰

تائید ترشح بیوسورفکتانت با اندازه‌گیری کشش سطحی

برای اندازه‌گیری کشش سطحی از دستگاه کشش‌سنج کرواس کلات[۱۴] استفاده شد. بدین منظور یک کلونی از کشت خالص هر یک از سویه‌های جدا شده از غربال‌گری ثانویه به محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد، پس از آن‌که جذب نوری کشت مذکور در طول موج ۶۲۰ نانومتر به ۰/۹-۰/۸ آنگستروم رسید، از آن به عنوان مایع تلقیح استفاده شد. یک میلی‌لیتر از کشت مذکور به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط محلول نمک معدنی و یک درصد نفت فیلتر شده به عنوان منبع هیدروکربن اضافه شد. مخلوط همراه با نمونه شاهد در دمای ۳۰ درجه در ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۳ روز گرمخانه‌گذاری شد (۹ و ۱۱).

ویژگی‌های سویه انتخابی *سودوموناس آئروژینوزا* تولید کننده بیوسورفکتانت

ویژگی‌های سویه انتخابی تولید کننده بیوسورفکتانت بواسطه آزمایش‌های مختلف تعیین شده بود. این آزمایش‌ها شامل: ویژگی‌های ظاهری کلونی‌ها، رنگ آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، آزمایش کاتالاز، اکسیداز، سیترات، تریپل شوگر آیرون آگار[۱۵]، سولفید تحرک اندول[۱۶]، متیل رد- وجس پروسکوآر[۱۷]، اوره‌آز، احیا نیترات و همچنین، الگوی مقاومت سویه‌های انتخابی به ۱۶ آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، متی‌سیلین (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اکسی‌تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ونکومایسین (۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اپی پنم (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اریترومایسین) ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، باسیتراسین (۰/۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، نالیدیکسیک‌اسید (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سفی‌پیم (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بررسی شد.

استخراج بیوسورفکتانت

به این شکل که کلونی سویه انتخابی به ارلن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری محتوای ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث تلقیح، سپس با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر n-هگزان به عنوان منبع هیدروکربن، مخلوط در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز با شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن سلول‌های باکتری به‌وسیله سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه حذف و مایع‌رویی جمع‌آوری شد. اسیدیته مایع با استفاده از سولفوریک اسید ۱ مولار به ۲ تنظیم شد و پس از آن به حجم برابر کلروفرم و متانول (۱:۲) اضافه شد. سپس فاز آلی مجزا شده و حلال در آون و در دمای ۶۰ درجه تبخیر شد.

فراورده نهایی به رنگ قهوه‌ای تیره و قوام چرب به عنوان بیوسورفکتانت خام به‌دست آمد (شکل ۱). بیوسورفکتانت خشک بدست آمده از هر سویه وزن شد و از آن‌ها رقت‌های متوالی شامل: ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۱ میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکساید[۱۸] تهیه شد رقت‌های هر بیوسورفکتات برای بررسی‌های ضد باکتریایی استفاده شد (۷).

شکل ۱- عصاره بیوسورفکتانت خام به‌دست آمده از *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ انتخابی

در این مرحله پلیت استریل را گرفته و وزن پلیت‌ها اندازه‌گیری شد. رسوب حاصل از استخراج بر روی پلیت‌ها ریخته شد، سپس پلیت‌ها در آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد پس از خشک کردن، پلیت‌ها وزن شد. وزن خشک بیوسورفکتانت‌ها به‌وسیله فرمول زیر محاسبه شد (۷).

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

کروماتوگرافی لایه نازک

یکی از روش‌های اطمینان از حضور بیوسورفکتانت در محیط، کروماتوگرافی لایه نازک است. پس از استخراج بیوسورفکتانت، ۵۰۰ میلی‌گرم از بیوسورفکتانت خام را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده مخلوط و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک بارگذاری شد. سیستم حلال مورد استفاده شامل: کلروفرم/ متانول/ استیک اسید/ آب (V/V/V/V ۲۵:۱۵:۴:۱) بود. صفحه کروماتوگرافی لایه نازک آماده، در داخل تانک حاوی حلال قرار گرفت سپس صفحه کروماتوگرافی لایه نازک پس از خشک شدن زیر UV قرار داده شد تا مشاهده شود واکنش انجام شده است یا نه، اگر واکنش انجام شده کروماتوگرام را با معرف‌های نین هیدرین[۱۹] (۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر استون بدون آب) برای کشف بخش‌های لیپیدی به عنوان نقاط قهوه‌ای و معرف آنترون[۲۰] (۱گرم در ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ترکیب شده با ۹۵ میلی‌لیتر اتانول) برای کشف بخش‌های کربوهیدراتی به عنوان نقاط زرد اسپری می‌نماییم (۷، ۹ و۱۲).

سویه‌های میکروبی

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

تهیه سوسپانسیون میکروبی

ازتمام سویه‌ها در سرم فیزیولوژی سدیم کلراید ۰/۹ درصد سوسپانسیون میکروبی تهیه شد، به این شکل که برای هر سری آزمایش کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه شد. برای این کار یک لوپ از هر میکروب در ۵ سی‌سی سرم فیزیولوژی فوق تلقیح شد. جذب نوری

سوسپانسیون میکروبی با دستگاه اسپکترفتومتری در طول موج ۶۲۰ به ۰/۰۸ تا ۰/۱آنگسترم تنظیم شد، سپس از این سوسپانسیون میکروبی برای تلقیح در محیط کشت مولرهینتون آگار استفاده شد.

بررسی خاصیت ضد باکتری بیوسورفکتانت

برای تعیین حساسیت کیفی و کمی از سوسپانسیون تهیه شده استفاده شد. در روش کیفی از انتشار در آگار[۲۱] به شیوه کربی بائر[۲۲] استفاده شد که طی آن از سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده به روش چمنی در سطح محیط کشت مولرهینتون‌آگار[۲۳] کشت انجام شد. سپس برای بررسی خواصی ضدباکتریایی، دیسک‌های کاغذی بلانک (ساخت پادتن طب) با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی آگار قرار داده شد و حدود ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های حاوی ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محلول دی متیل سولفوکساید، روی دیسک‌ها اضافه شد. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس محیط‌های کشت حاوی باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله‌های تشکیل شده در اطراف صفحه‌ها، نتایج بررسی و نتایج حاصل از آنتی بیوتیک با جداول، موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی[۲۴] مقایسه شده است برای حصول اطمینان از هر یک از غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت و آنتی بیوتیک این آزمایش‌ها برای هر سویه باکتریایی سه بار تکرار شد. همچنین، آزمایش‌های کمی برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده بیوسورفکتانت‌ها انجام شد. به این ترتیب آزمایش حداقل غلظت مهارکننده در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد. ابتدا ازمولر هینتون براث (مرک‌آلمان) ۱۰۰ میکرولیتر داخل چاهک‌های مربوط به رقت‌های مورد نظر میکروپلیت ریخته شد. سپس به نخستین چاهک ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بیوسورفکتانت اضافه شد و از خانه دوم وسوم به همین ترتیب تا خانه ششم رقیق شدند. در پایان به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون رقیق شده (نوترینت براث) معادل لوله نیم مک فارلند اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد،کف پلیت زیر نور در آینه مشاهده شد. خانه کنترل اسانس، محیط کشت و میکروب نیز جداگانه منظور و وجود کدورت را که نشان دهنده رشد یا عدم رشد باکتری است، درجدول مخصوص یادداشت شد. طبق تعریف اولین چاهک بدون کدورت (رقیق‌ترین)، به عنوان حداقل غلظت مهارکننده قرار داده شده است. همچنین، آزمایش حداقل غلظت کشندگی با توجه به نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد. از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها به طور کامل متوقف شده بود با سوآپ استریل نمونه برداری، روی محیط کشت نوترینت آگارکشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت کم‌ترین غلظتی از عصاره بیوسورفکتانت که باکتری در آن رشد نکرده به عنوان حداقل غلظت‌کشندگی گزارش شدند(۱۳).

تجزیه تحلیل آماری

بررسی خواص ضدباکتریایی در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم افزار SAS در سطح ۱ درصد و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

جداسازی، خالص‌سازی

در این مطالعه، از نمونه‌ها پس از سپری شدن مراحل غنی‌سازی، رقت تهیه شده و بر روی محیط کشت‌های اختصاصی کشت داده شدند. نمونه‌ها از نفت خام، خاک و آب آلوده به نفت تهیه شده بودند، که بر اساس مشخصات ظاهری و صفات کلونی‌ها، ۸۸ سویه باکتریایی مختلف جداسازی شدند. در این روش به علت خالص بودن کشت‌ها، میزان آلودگی‌های قارچی تا حد زیادی کاهش پیدا می‌کند، چون تنها سویه‌هایی که بر روی محیط کشت اختصاصی خالص‌سازی شده‌اند، استفاده شدند.

انتخاب مناسب‌ترین سویه‌ها

آزمایش همولیزخون

تمام سویه‌های جدا شده در مرحله قبل، برای بررسی فعالیت همولیتیک بر روی محیط کشت بلادآگار کشت داده شدند. از بین ۸۸ سویه جداسازی شده، تنها ۲۴ سویه دارای فعالیت همولیز بتا بودند (شکل ۲). در نتیجه سویه‌هایی که دارای همولیز بتا بودند به عنوان فعالیت همولیتیک مثبت در نظرگرفته و برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه‌کنندگی

نتایج حاصل از فعالیت امولسیفیه‌کنندگی کشت سویه‌های غربال شده از مرحله قبل با هیدروکربن نفت نشان داد که از میان ۲۴ سویه حاصل از غربال‌گری اولیه، ۱۴ سویه، ۷۰ درصد یا بیشتر توانایی امولسیفیه‌کنندگی را داشتند. این سویه‌ها برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند.

اندازه‌گیری کشش سطحی

کشش سطحی یکی از معیارهای نشان دهنده تولید مواد فعال سطحی در محیط است. جدول ۱ کشش سطحی کشت سویه‌های انتخابی همراه با یک درصد نفت را نشان می‌دهد. کشش سطحی شاهد (محیط کشت فاقد باکتری) ۷۲ میلی‌نیوتن برمتر بود. در این مرحله با توجه به نتایج غربال‌گری اول و دوم ۱۴ سویه برای اندازه‌گیری کشش سطحی انتخاب شدند. همان‌طور که در این جدول نشان داده شده از بین ۱۴ سویه آزمایش شده تنها سویه‌های ۴۳، ۴۷، ۸۳ و ۸۸ قادر به کم کردن کشش سطحی تا کمتر از ۴۰ میلی‌نیوتن برمتر هستند (۱۰ و۱۹) البته هر ۴ سویه به نمونه نفت متعلق بودند.

شکل ۲- فعالیت همولیز بتا توسط *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ انتخابی

جدول ۱- کشش سطحی حاصل از ۱۴ سویه انتخابی پس از ۷۲ ساعت (mN/m)

شماره سویه	کشش سطحی [میلی‌نیوتن برمتر]
۱	۴۳
۵	۴۲
۴۰	۴۸
۴۱	۴۷
۴۳	۳۸/۶
۴۷	۳۸
۵۳	۴۰
۵۶	۵۵
۷۷	۵۳
۷۸	۵۸
۸۰	۶۲
۸۳	۳۹
۸۷	۵۷
۸۸	۳۶

جدول ۲- ویژگی‌های بیوشیمیایی سویه انتخابی تولیدکننده بیوسورفکتانت

ویژگی‌ها	*سودوموناس*۸۳	الگوی مقاومت	*سودوموناس*۸۳
ریخت‌شناسی سلول	کوکوباسیل	جنتامایسین	-
واکنش گرم	-	کلیندامایسین	+
تشکیل اسپور	-	متی‌سیلین	+
کاتالاز	+	آمپی‌سیلین	+
اکسیداز	+	استرپتومایسین	+
حرکت	-	اکسی‌تتراسایکلین	-
اندول	-	سیپروفلوکساسین	-
H_2S	-	ونکومایسین	+
متیل رد	-	اریترومایسین	+
وجس- پروسکوآر	-	باسیتراسین	+
گلوکز	+	اگزاسیلین	+
لاکتوز	+	نالیدیکسیک اسید	+
اوره‌آز	+	سفی‌پنم	-
سیترات	+	کلرامفنیکل	+
احیای نیترات	+	پنی‌سیلین	+
پیگمان	+	اپی‌پنم	-

-: نتیجه منفی، +: نتیجه مثبت

ویژگی‌ها وشناسایی سویه‌های باکتری

در این مطالعه، یکی از باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت به نام سویه ۸۳ دارای کاهش کشش سطحی زیر ۴۰ میلی‌نیوتن برمتر بود. براساس آزمایش‌های بیوشیمیایی مطابق با جدول ۲ و طبقه‌بندی ارائه شده در چاپ هشتم کتاب برگی، سویه جدا شده تا حد امکان تعیین هویت شد. به این ترتیب سویه ۸۳؛ c.f. *Pseudomonas. aeruginosa* نام گذاری و برای استخراج بیوسورفکتانت انتخاب شد.

وزن خشک بیوسورفکتانت

وزن خشک بیوسورفکتانت مطابق با جدول ۳ اندازه‌گیری و تعیین شد.

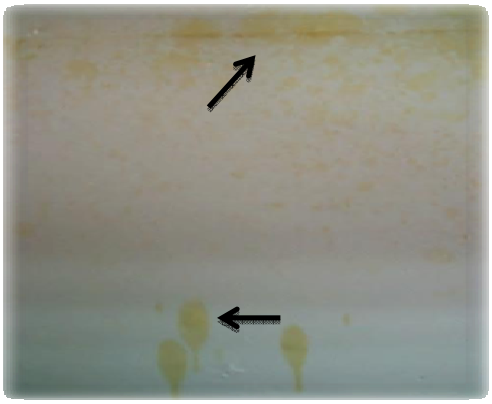
جدول ۳- وزن خشک بیوسورفکتانت سویه‌های انتخابی (برحسب گرم)

سویه	وزن پلیت	وزن پلیت پس از خشک کردن بیوسورفکتانت	وزن خشک بیوسورفکتانت
*سودوموناس آئروژینوزا*۸۳	۴۸/۹۸	۴۹/۲۵۴	۰/۲۷۴

کروماتوگرافی لایه نازک

با قرار دادن صفحه کروماتوگرام در سیستم حلال، جابجایی لکه‌ها زیر UV بررسی شد که نمونه لکه بزرگ و مشخصی بر روی صفحه کروماتوگرام تشکیل داد و زیر UV به شکل لکه صورتی رنگ مشاهده شد. همچنین، با اسپری معرف نین‌هیدرین بر روی صفحه کروماتوگرام لکه لیپیدی به رنگ قهوه‌ای در سویه انتخابی مشاهده شد. همچنین، با اسپری معرف آنترون لکه زرد در سویه *سودوموناس آئروژینوزا*۸۳ دیده شد که وجود بخش کربوهیدراتی را در این سویه نشان می‌دهد (شکل ۴).

شکل ۳- صفحه کروماتوگرام



شکل ۴- مشاهده لکه‌های عصاره *بیوسورفکتانت سودوموناس آئروژینوزا ۸۳* انتخابی

بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت

تجزیه تحلیل آماری داده‌های حاصل از بیوسورفکتانت

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط (جدول ۴) نشان دادند که اثر باکتری و رقت‌های مختلف و همچنین، اثر متقابل بین باکتری و رقت بیوسورفکتانت مورد آزمایش در سطح یک درصد معنادار هستند.

تأثیر رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت بر هر یک از باکتری‌ها

تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که تفاوت بین میانگین‌های قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تاثیر رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت برای ۶ باکتری مختلف در سطح پنج درصد معنادار است (جدول ۴). همچنین، بررسی قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت بر روی هر باکتری و سپس مقایسه باکتری‌ها با هم نشان داد که حساس‌ترین باکتری نسبت به تاثیر عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا ۸۳*؛ *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین باکتری در برابر عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا ۸۳*؛ *پروتئوس میرابیلیس* است (جدول ۵).

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس بیوسورفکتانت بدست آمده از *سودوموناس آئروژینوزا ۸۳*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۵	۲۸۷/۱۶**
رقت	۵	۵۲۱/۷۴**
باکتری*رقت	۲۵	۲۲/ ۳۵**
خطا	۷۲	۰/۲۲
کل	۱۰۷	
CV درصد (ضریب تغییرات)	۲/۸۷	

** معنی دار

جدول ۵- مقایسه میانگین بین باکتری‌ها متاثر از بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا ۸۳*

سویه باکتری	میانگین	انحراف معیار
اشریشیا کلی	۱۶/۲۷ C	±۰/۵۷
استاف اورئوس	۲۱/۸۳A	±۰/۵۷
استاف اپیدرمیس	۲۰/۰۵B	±۰/۵۷
پروتئوس میرابیلیس	۱۰/۸۸F	±۰
سالمونلا تیفی‌موریوم	۱۴/۳۸E	±۰/۵۷
سودوموناس آئروژینوزا	۱۴/۸۳D	±۰/۵۷

اثر بیوسورفکتانت در رقت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر مهار رشد ٦ باکتری مختلف با یکدیگر

مقایسه میانگین‌های قطر هاله ممانعت از رشد وتجزیه و تحلیل داده‌ها مشخص کرد که رقت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت

سودوموناس آئروژینوزا ۸۳ بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته که تفاوت آن با دیگر باکتری‌ها معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ به ترتیب بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *پروتئوس میرابیلیس* وجود داشت که تفاوت آن‌ها با هم معنی‌دار بود (جدول ۶).

اثر بیوسورفکتانت در رقت۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر مهار رشد ٦ باکتری مختلف با یکدیگر

تحلیل داده‌ها نشان داد که رقت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته که تفاوت آن‌ها با هم معنی‌دار نبود، ولی تفاوت آن‌ها با دیگر باکتری‌ها معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثربازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ به‌ترتیب بر *اشریشیاکلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *پروتئوس‌میرابیلیس* داشت که تفاوت آن‌ها نیز با هم معنی‌دار بود (جدول ۶).

اثر بیوسورفکتانت دررقت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برمهار رشد ٦ باکتری مختلف با یکدیگر

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد اثر بازدارندگی رقت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتراز سایر باکتری‌هاست که تفاوت آن با دیگر باکتری‌ها معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *اشریشیاکلی* مشاهده شد که تفاوت آن‌ها با هم و با *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* که اختلاف معناداری با هم نداشتند و همچنین بر *پروتئوس میرابیلیس* معنی‌دار بود (جدول ۶).

اثر بیوسورفکتانت در رقت۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر مهار رشد ٦ باکتری مختلف با یکدیگر

تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها نشان داد اثر بازدارندگی رقت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از سایر باکتری‌هاست که تفاوت آن‌ها با دیگر باکتری‌ها معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و اشریشیاکلی مشاهده شد که تفاوت آن‌ها با *پروتئوس میرابیلیس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند، معنی‌دار بودند (جدول ۶).

اثر بیوسورفکتانت در رقت٦٣ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر مهار رشد ٦ باکتری مختلف با یکدیگر

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد اثر بازدارندگی رقت ۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ در مورد *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* بیشتر از سایر باکتری‌هاست که تفاوت آن‌ها با باکتری‌های دیگر معنی‌دار بود. پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* وجود داشت که تفاوت آن‌ها با هم و با *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند و همچنین، *پروتئوس میرابیلیس* که کم‌ترین اثر بازدارندگی را داشت معنی‌دار بود (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد ۶ باکتری مختلف تحت تأثیر رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ وآنتی بوتیک (میلی‌متر)

باکتری	رقت	میانگین	انحراف معیار	باکتری	رقت	میانگین	انحراف معیار
اشریشیا کلی	۱۰۰۰	۲۳/۶۶ de	±۰/۵۷	*پروتئوس میرابیلیس*	۱۰۰۰	۱۲ n	±۰
	۵۰۰	۱۸/۳۳ h	±۰		۵۰۰	۹/۶۶ p	±۰/۵۷
	۲۵۰	۱۵ jk	±۰/۵۷		۲۵۰	۹/۶۶ p	±۰/۵۷
	۱۲۵	۱۰/۶۶ o	±۰/۵۷		۱۲۵	۸/۶۶ q	±۰/۵۷
	۶۳	۱۰/۶۶ o	±۰/۵۷		۶۳	۶ r	±۰
	جنتامایسین	۱۹/۳۳ g	±۰/۵۷		جنتامایسین	۱۹/۳۳ g	±۰/۵۷
استاف اورئوس	۱۰۰۰	۳۱/۳۳ a	±۰/۵۷	*سالمونلا تیفی‌موریوم*	۱۰۰۰	۱۸ hi	±۰/۵۷
	۵۰۰	۲۴ d	±۰		۵۰۰	۱۵/۶۶ j	±۰
	۲۵۰	۲۴ d	±۰		۲۵۰	۱۲/۳۳ mn	±۰
	۱۲۵	۱۴/۳۳ kl	±۰/۵۷		۱۲۵	۸/۶۶ q	±۰
	۶۳	۱۲ n	±۰		۶۳	۸/۶۶ q	±۰
	جنتامایسین	۲۵/۳۳ c	±۰/۵۷		جنتامایسین	۲۳ e	±۰/۵۷
استاف اپیدرمیس	۱۰۰۰	۲۹/۶۶ b	±۰/۵۷	*سودوموناس آئروژینوزا*	۱۰۰۰	۲۰/۳۳ f	±۰/۵۷
	۵۰۰	۲۴ d	±۰		۵۰۰	۱۴/۶۶ k	±۰/۵۷
	۲۵۰	۲۰/۳۳ f	±۰/۵۷		۲۵۰	۱۳ m	±۰
	۱۲۵	۱۳ m	±۰		۱۲۵	۸/۶۶ q	±۰/۵۷
	۶۳	۱۳ m	±۰		۶۳	۸/۶۶ q	±۰
	جنتامایسین	۲۰/۳۳ f	±۰/۵۷		جنتامایسین	۲۳/۶۶ de	±۰/۵۷

حروف مشابه بیان کننده عدم وجود اختلاف معنی دار است

مقایسه تأثیر ضد باکتریایی بیوسورفکتانت در رقت‌های مختلف با تاثیر بازدارنده آنتی‌بوتیک‌ها

تجزیه تحلیل آماری داده‌ها طبق جدول ۷ نشان داد که در مورد باکتری *اشریشیا کلی* اثر بازدارنده رقت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳، از تمام آنتی بیوتیک‌های موثر بر این باکتری کمتر ولی از آنتی بیوتیک اریترومایسین موثر بر این باکتری بیشتر است.

در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تاثیر بازدارنده رقت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳، در برابر جنتامایسین، کلیندامایسین، آمپی‌سیلین، وانکومایسین، اگزاسیلین و نالیدیکسیک اسید زیاد ولی نسبت به سفی‌پیم که یک نوع آنتی‌بیوتیک حاوی حلقه بتالاکتامی و از دسته سفالوسپورین‌هاست اثری مشابه و نسبت به سیپروفلوکساسین، اکسی‌تتراسایکلین و اپی‌پنم کمتر موثر بودند.

در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین موثر بر این باکتری بیشتر و نسبت به آنتی بیوتیک

اپی پنم و سفی‌پیم اثر مشابه ولی نسبت به اریترومایسین، کلرامفنیکل پنی‌سیلین موثر بر این باکتری کمتر بود (جدول۶ و ۷).

در مورد باکتری *پروتئوس میرابیلیس* اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین موثر بر این باکتری بیشتر و نسبت به آنتی بیوتیک اپی پنم و سفی‌پیم اثر مشابه ولی نسبت به اریترومایسین، کلرامفنیکل پنی‌سیلین موثر بر این باکتری کمتر بود.

برای باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*، اثر باز دارندگی رقت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ از تمام آنتی‌بیوتیک‌های موثر به جز کلیندامایسین که با رقت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ اثر مشابه داشت کمتر و معنی‌دار بود.

در مورد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* تاثیر بازدارنده رقت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها به جز اکسی‌تتراسایکلین که اثرات مشابه‌ای داشت کمتر بود (جدول۶ و۷).

همان‌گونه که نتایج این پژوهش نشان داد، عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ دارای خاصیت ضد باکتریایی است که این ویژگی بسته به رقت بیوسورفکتانت و جنس باکتری متفاوت است. مطابق با جداول ۵ و۶ بیش‌ترین اثر بازدارندگی رقت‌های مختلف عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و کمترین اثر برروی *سالمونلا تیفی‌موریوم* باکتری مشاهده شد.

همچنین، عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا*۸۳، برای باکتری *اشریشیاکلی* دررقت ۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیکی و در رقت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدالی داشت. همچنین، برای باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و *سودوموناس آئروژینوزا* رقت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیکی و دررقت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدالی مشاهده شد. با این حال برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* دررقت ۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، *استافیلوکوکوس اورئوس* در رقت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *پروتئوس میرابیلیس* دررقت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هم اثر باکتریواستاتیکی و هم اثر باکتریوسیدالی مشاهده شد (جدول ۸).

جدول ۷- اثرات ضد باکتری آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی ۶ باکتری مختلف (میلی‌متر)

سویه باکتری / آنتی بیوتیک	*اشریشیاکلی*	*استاف اورئوس*	*استاف اپیدرمیس*	*پروتئوس میرابیلیس*	*سالمونلا تیفی‌موریوم*	*سودوموناس آئروژینوزا*
کلیندامایسین	۱۲/۳۳ R	۲۳ S	۶ R	۶ R	۱۷/۶۶ S	۶ R
متی‌سیلین	۶ R	۱۵/۶۶ R	۶ R	۶ R	۶ R	۶ R
آمپی‌سیلین	۶ R	۳۰/۳۳ S	۶ R	۶ R	۹/۳۳ R	۶ R
استرپتومایسین	۱۲/۶۶ R	۱۲/۶۶ R	۶ R	۱۱ R	۹/۳۳ R	۱۰/۳۳ R
اکسی‌تتراسایکلین	۲۵ S	۳۲/۳۳ S	۶ R	۶ R	۲۲/۶۶ S	۲۰ S
سیپروفلوکساسین	۳۵/۳۳ S	۳۵/۳۳ S	۲۸/۳۳ S	۲۵ S	۲۶/۳۳ S	۳۵/۳۳ S

ادامه جدول ۷

سویه باکتری آنتی بیوتیک	*اشریشیاکلی*	*استاف اورئوس*	*استاف اپیدرمیس*	*پروتئوس میرابیلیس*	*سالمونلا تیفی‌موریوم*	*سودوموناس آئروژینوزا*
وا نکومایسین	۶ R	۲۰/۳۳ S	۶ R	۶ R	۶ R	۶ R
اپی‌پنم	۳۵ S	۳۳/۶۶ S	۳۰ S	۳۱ S	۳۸/۳۳ S	۳۳/۶۶ S
اریترومایسین	۱۵ I	۶ R	۳۳/۶۶ S	۶ R	۱۲/۶۶ R	۶ R
باسیتراسین	۶ R	۱۶/۳۳ R	۶ R	۶ R	۶ R	۶ R
اگزاسیلین	۶ R	۲۲/۶۶ S	۶ R	۶ R	۶ R	۶ R
نالیدیکسیک اسید	۱۰/۳۳ R	۱۴/۳۳ I	۱۰/۳۳ R	۶ R	۲۸ S	۱۲/۳۳ R
سفی‌پیم	۲۸/۳۳ S	۳۱/۳۳ S	۳۰ S	۳۰ S	۳۴/۳۳ S	۲۹/۳۳ S
کلرامفنیکل	۱۳ R	۱۳ R	۳۱/۳۳ S	۱۲ R	۳۱ S	۶ R
پنی‌سیلین	۶ R	۶ R	۳۴/۳۳ S	۲۵/۶۶ S	۲۱/۳۳ I	۱۰ R

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

جدول ۸- تعیین میزان حداقل غلظت مهارکننده رشد حداقل غلظت کشنده رشد بیوسورفکتانت بر روی ۶ باکتری مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

بیوسورفکتانت	سویه باکتری	غلظت مهارکننده رشد	غلظت کشنده رشد
*سودوموناس آئروژینوزا*۸۳	*اشریشیا کلی*	۶۳	۲۵۰
	استاف اورئوس	۱۲۵	۱۲۵
	استاف اپیدرمیس	۶۳	۶۳
	پروتئوس میرابیلیس	۱۰۰۰	۱۰۰۰
	سالمونلا تیفی‌موریوم	۲۵۰	۵۰۰
	سودوموناس آئروژینوزا	۲۵۰	۵۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

تعداد زیادی از باکتری و قارچ‌ها قادر به تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی هستند. این ارگانیسم‌ها به طور گسترده‌ای در مخازن نفتی و اکوسیستم‌های آبی و خاکی پراکنده می‌باشند (۱۴). بررسی‌ها نشان داده است اگر چه امکان وجود باکتری با توان تجزیه‌کنندگی بالا در آب‌ها و خاک‌های بدون سابقه آلودگی قبلی با ترکیبات نفتی وجود دارد، ولی در اکثر پژوهش‌های مشابه، به آب، خاک‌ها و مناطق‌آلوده به نفت توجه می‌شود. چون که امکان یافتن میکروارگانیسمی با توان تجزیه‌کنندگی بالا در این مناطق بیشتر از مناطق غیرآلوده به ترکیبات نفتی است. در مطالعه ای که در بلغارستان توسط کانکووا و گالابووا [۲۵] در سال ۲۰۰۲ انجام شد نیز جداسازی میکروارگانیسم‌ها از مناطق آلوده (آب‌های آلوده به پساب‌های نفتی) گزارش شده است (۱۵). اوکرنتوگبا و ازرونی[۲۶] باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت ازآب‌های آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه را جداسازی نمودند. (۱۶). بولا[۲۷] در سال ۲۰۰۶ در نیجریه از ترکیبات ماسه‌ای همراه با نفت سنگین که به شکل کلوخ درآمده بودند باکتری‌هایی جداسازی کرد که در تجزیه نفت خام بسیار موثر عمل می‌کردند. این باکتری‌ها بیشتر از جنس سودوموناس بودند. از آن‌جایی که باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت در تجزیه نفت

موثرتر عمل می‌کنند، از بین باکتری‌های جدا شده سویه‌های مولد بیوسورفکتانت انتخاب شدند (۱۷).

در مطالعاتی که با هدف جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت از منابع محیطی انجام شده به طور معمول از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان معیاری برای جداسازی اولیه سویه‌های مولد بیوسورفکتانت استفاده شده است (۱۱). به طوری که در مطالعاتی مشابه که طباطبایی در سال ۲۰۰۵ و آناندارج[۲۸] در سال ۲۰۱۰ برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت انجام دادند از فعالیت همولیتیک برای جداسازی اولیه استفاده شد (۷ و ۱۰).

با توجه به بررسی‌های انجام شده، راه دیگر غربال‌گری فعالیت امولسیون‌سازی است. فعالیت امولسیفیه‌کنندگی یک امولسیفایر به تمایل آن نسبت به سوبسترای هیدروکربنی استفاده شده برای اندازه‌گیری EC بستگی دارد. نتایج آزمایش امولسیون‌سازی (E24) به دست آمده برای سویه‌های غربال شده از مرحله قبل مطابق جدول ۱ بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق، از نتایج گزارش شده در مطالعات مشابه توسط بودوئر[۲۹] و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۴)، فرنسی[۳۰] و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۹) و بیکا[۳۱] وهمکارانش در سال ۱۹۹۹ (۱۸)، بهتر و چشمگیرتر است. اما یکی دیگر از فعالیت‌های غربال‌گری کشش سطحی‌ست. از آنجایی که کاهش کشش‌سطحی محیط رشد، مهم‌ترین و اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت محسوب می‌شود به همین دلیل در این تحقیق، پس از غربال‌گری اول و دوم و کاهش تعداد سویه‌های باکتری انتخاب شده، از این آزمایش برای بررسی و تائید توان این سویه‌ها در تولید بیوسورفکتانت استفاده شد. مطالعات مشابهی در این زمینه توسط بنت[۳۲] در سال ۱۹۹۱ و طباطبایی در سال ۲۰۰۵ برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت انجام شد (۱۰ و ۱۹). اما یکی از قابلیت‌های جالب توجه باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، توانایی آن‌ها در ازدیاد برداشت میکروبی نفت از مخازن نفتی است. ازدیاد برداشت میکروبی نفت یک روش سوم ازدیاد برداشت است که با وجود برخوردار بودن از قدمت وسابقه تاریخی طولانی، به تازگی مورد توجه فراوان قرار گرفته است. مکانیسم‌هایی که برای ازدیاد برداشت نفت به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد شده‌اند بسیار پیچیده، متنوع و فراوان هستند اما بدون شک تولید بیوسورفکتانت و کم‌کردن کشش‌سطحی و کاهش قدرت مویینگی یکی از دلایل اصلی افزایش تولید نفت توسط میکروارگانیسم‌ها به شمار می‌رود (۱ و ۲۰).

علاوه بر این، در تحلیل عصاره حاصل از کشت سویه *سودوموناس آئروژینوزا*۸۳، لکه به دست آمده بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک در اثر اسپری با معرف نانیهیدرین، تولید رنگ قهوه‌ای، و با اسپری با معرف آنترون تولید رنگ زرد می‌کرد که نشان می‌دهد که عصاره بیوسورفکتانت سویه حاوی ترکیبات لیپیدی و کربوهیدراتی است. در مطالعه‌ای که توسط طباطبایی و همکاران در سال ۲۰۰۵، آناندارج و همکاران و روسا و همکاران[۳۳] در سال ۲۰۱۰ انجام شده، ماهیت بیوسورفکتانت که به‌وسیله آن‌ها جداسازی شده بود نیز کاملاً مشابه با نتایج حاصل از سویه *سودوموناس آئروژینوزا*۸۳، گزارش شده است (۷، ۱۰ و ۲۰).

اما یکی دیگر از کاربردهای بیوسورفکتانت‌ها فعالیت ضدمیکروبی آن‌هاست. هر روزه مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها بیشتر می‌شود. تحقیق در مورد کشف مواد جدید با خواص ضدمیکروبی

قوی‌تر همپای افزایش مقاومت در باکتری‌ها رو به گسترش است و از این رو بیوسورفاکتانت یک جایگزین مناسب برای داروهای ترکیبی هستند و عوامل ضد میکروبی و عوامل موثر درمانی یا پروبیوتیک به عنوان ایمنی (بی‌خطر) بویژه در زمانی که مقاومت در برابر داروها در میان ارگانیسم‌ها برای بسیاری از بیماری‌های تهدیدکننده زندگی رو به افزایش است می‌تواند استفاده شود؛ که به عنوان یک انتخاب مناسب برای این نوع تحقیقات به شمار می‌روند. بیوسورفکتانت‌ها با اثرات ضدمیکروبی بر روی طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌ها و همچنین، قابلیت مصارف غذایی آن‌ها در برخی موارد وکمتر بودن اثرات جانبی آن‌ها نسبت به آنتی بوتیک‌های رایج می‌توانند در برخی موارد جایگزین آنتی بیوتیک‌ها شوند (۲۱).

در راستای بررسی اثرات ضدمیکروبی بیوسورفکتانت‌ها، اثرات ضدباکتریایی بیوسورفکتانت که در مصارف غذایی و آرایشی و بهداشتی نیز استفاده می‌شود، بر روی ۶ باکتری مختلف عفونت‌زا به ویژه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که هم ایجاد کننده مسمومیت‌های غذایی و هم یکی از باکتری‌های مهم در ایجاد عفونت‌هاست همچنین، بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* که از مقاوم‌ترین باکتری‌ها و بیماریزاست ارزیابی شدند. به این شکل که بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ در رقت‌های بالا بر رشد *پروتئوس میرابیلیس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی* اثر مهارکنندگی و کشندگی داشت که نشان دهنده اثر آنتی‌باکتریال قوی این بیوسورفکتانت بر روی این باکتری‌هاست. همچنین، عصاره بیوسورفکتانت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۳ بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* هم اثر باکتریوسیدال و هم باکتریواستاتیک داشت که اعداد نزدیک به هم حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت کشنده نیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال بیوسورفکتانت بر این باکتری‌هاست. در بررسی مطالعات مشابه، تحقیقات کمی به‌ویژه در ایران در مورد خواص ضد میکروبی بیوسورفکتانت‌ها انجام شده و یا دراین مطالعات در مورد جزئیات ویژگی‌های آنتی باکتریالی از جمله به نتایج هاله‌های عدم رشد اشاره نشده است با این حال برخی از بیوسورفکتانت‌های دکاپپتیدی حلقوی جدید از گونه‌های *سودوموناس* جدا شدند، که در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضدمیکروبی بر علیه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم آویوم* داخل سلولی یافت شد (۲۲). وتسا و همکاران[۳۴] در سال ۲۰۱۰ گزارش دادند که رامنولیپیدها جدا شده از *سودوموناس* دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه باکتری گرم منفی؛ *سودوموناس آئروژینوزا* و باکتری گرم مثبت؛ *استافیلوکوکوس* بودند (۲۳). همچنین، فعالیت ضدمیکروبی بر اساس مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی بیوسورفکتانت رامنولیپید از *سودوموناس* AT10 بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مخمر، و سویه‌های قارچ به دست آمده است. که با نتایج این پژوهش مشابه است (۲۴). با این حال وجود برخی تفاوت‌ها در میزان اثرات ضد میکروبی مشاهده شده در این مطالعه و تحقیقات مشابه می تواند به دلیل تفاوت سوبستراهای مختلف برای رشد باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت، استفاده از روش‌های مختلف برای استخراج وسایر... باشد. تفاوت در اثرات ضد میکروبی نشان دهنده تفاوت‌های موجود در ترکیبات بیوسورفکتانت‌هاست.

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که این باکتری دارای پتانسیل فراوانی برای کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست محیطی است. بنابراین، ما می‌توانیم در مورد استفاده از آن در آینده به عنوان اجزا تشکیل‌دهنده چندمنظوره فکر کنیم. بنابراین، با وجود پتانسیل بسیار زیاد بیوسورفاکتانت‌ها در این زمینه، استفاده از آن‌ها هنوز محدود است. شاید دلیل آن هزینه‌های تولید کمابیش بالا و همچنین، اطلاعات اندکی درمورد سمیت آن‌ها نسبت به سیستم‌های انسانی است با وجود این، تقاضای استفاده از آن‌ها به شکل مکمل‌های غذایی، موادآرایشی و محصولات دارویی نشان‌دادن علاقه زیاد به استفاده از این محصولات میکروبی به دست‌آمده است.

References

(1) Banat I, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti M, Fracchia L. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiolol and Biotechnol*. 2010; 87 (2): 427-44.

(2) Cameotra SS, Makkar RS, Kaur J, Mehta SK. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. In: Ramkrishna Sen, editor. *Biosurfactants*. 20rd ed. NewYork: Springer 2010; 261-80.

(3) Mireles JP, Toguchi A, Harshey RM. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001; 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*. 2004; 10 (6): 14-20.

(5) Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol and Biotechnol*. 2001; 39 (4): 295-304.

(6) Hood SK, Zottola EA. Biofilms in food processing. *Food Control*. 1995; 6 (1): 9-18.

(7) Anandaraj B, Thivakaran P. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *J Biosci Technol*. 2010; 1 (3): 120-6.

(8) Namir I, Haddad Wang J, Bozhong M. Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Pro and Pep Lett*. 2009; 16: 7-13.

(9) Francy DS, Thomas JM, Raymond RL, Ward CH. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J Ind Microbiol*. 1991; 8, 237-46.

(10) Tabatabaee, A, Mazaheri Assadi, M, Noohi, A.A. and V.A. Sajadian, Isolation of biosurfactant producing Bacteria from oil reservoirs. *Iranian J Env Health Sci Eng*. 2005**;** 2 (1): 6-12.

(11) Walter V, Syldatk C, Hausmann R. Screening concepts for the isolation of Biosurfactant producing Microorganisms. In: Ramkrishna Sen, editor. *Biosurfactants*. 29th ed. Germany: Landes Bioscience and Springer Science; 2010

(12) Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lepine F, Muller MM, Deziel E. Rhamnolipid: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regalation and Bioengineering of production. In: Gloria Soberón-Chávez, editor, *Biosurfactants*. 20th ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011.

(13) Androw JM. BSAC Standardized disc susceptibility testing method. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 7 (5): 48 – 57.

(14) Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrientsupplemented sea water. *Env Microbiol*. 2002; 4 (3): 141-7.

(15) Tonkova EV, Galabova D. Hydrolytic Enzymes and Surfactants of Bacterial Isolates from Lubricant-Contaminated Wastewater. *Z Naturforsch*. 2003; 58 (c): 87-92.

(16) Okerentugba PO, Ezeronye OU. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluents in Nigeria. *Afr J Biotechnol*. 2003; 2 (9): 288-92.

(17) Bola O. Hydrocarbon Degrading Potentials Of Bacteria Isolated From a Nigerian Bitumen (Transand) Deposit. *Nature sci*. 2006; 4 (3): 51-57.

(18) Bicca FC, Fleck LC, Zachio MA. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev Microbiol*. 1999; 30: (3): 231-6.

(19) Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *App and Env Microbiol***.** 2000; 53 (5): 495-508.

(20) Rosa CFC, Michelon M, Burkert JFM, Kalil SJ, Burkert CAV. production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM 10 grown on glycerol. *Afr J Biotechnol*. 2010; 9 (53): 9012-17.

(21) Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Tre Biotechnol*. 2004; 22 (3): 142-6.

(22) Joachim V. Matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *B. subtilis* C1 isolated from petroleum sludge. *App Env Microbiol*. 2002; 68 (12): 6210-19.

(23) Vatsa p, Sanchez L, Clement C, Baillieul F, Dorey S. Rhamnolipid Biosurfactants as new players in Animal and plant defens aginst microbes. *Int J Mol Sci*. 2010; 11 (12): 5095-8.

(24) Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcı´a F, Manresa A. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir*. 2001; 17 (5): 1367-71.

---

[1]. TLC
[2]. Minimal Inhibitory Concentration (MIC)
[3]. Minimal Bacteriocidal Concentration (MBC)
[4]. Sorbitan
[5]. Strenghted Nutrient Broth
[6]. rpm
[7]. Mineral Salt Solution
[8]. Yeast extract
[9]. Strenghted Nutrient Agar
[10]. Pour Plate
[11]. Glucose Yeast extract Agar
[12]. EMB
[13]. Vortex
[14]. Tensiometer-Kruess Klot
[15]. Triple Sugar Iron Agar
[16]. Sulfide Indole Motility
[17]. Methyl Red- Voges Proskauer
[18]. DMSO
[19]. Ninhydrin
[20]. Anthrone
[21]. Disk diffusion
[22]. Kirby Bauer
[23]. Muller hinton agar
[24]. Clinical and Laboratory Standards Institute
[25]. Tonkova & Galabova
[26]. Okerentugba and Ezeronye
[27]. Bola
[28]. Anandaraj
[29]. Bodour
[30]. Francy
[31]. Bicca
[32]. Banat
[33]. Rosa et al
[34]. Vatsa et al

Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus *Pseudomonas aeruginosa* and antibacterial effects of biosurfactant production *in vitro*

Mohammad javad Mostafapour-Rami *
M.Sc of Microbiology, University of Ilam, Iran, javadmostafapur@yahoo.com
Salman Ahmady-Asbchin
Assistant Professor of Industrial Microbiology, University of Ilam, Iran, sahmadyas@yahoo.fr

Abstract

Introduction: Biosurfactants are amphiphilic biological compounds produced extracellularly or as part of the cell membranes by a variety of microorganisms. Because of their use in various industries, they are of a particular importance. The aim of this study was to identify a strain of bacteria of the genus *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant producers.

Materials and methods: In this study, different samples of oil, water and soil contaminated with oil were prepared. Hemolytic activity, emulsification activity and measurement of surface tension were used and selected strains were identified by biochemical tests. The nature and effect of antibacterial biosurfactant was evaluated for strain selection.

Results: In this study, eighty eight bacterial strains were isolated. Twenty four strains were isolated from the isolated strains with hemolytic activity. Among which, 14 strains have emulsification activity more than 70% and at last four strains reached surface tension to be less than 40 mN/m. Selected strain based on biochemical tests was recognized as a *Pseudomonas aeruginosa*. The nature of biosurfactant was determined by TLC, and proved to be of glycolipid kind. Therefore, the produced biosurfactant of the selected strain had antibacterial activity against six bacterial infectious. Sensitive bacteria to the effects of biosurfactant extract of *Pseudomonas aeruginosa83,* was *Staphylococcus aureus* and the most resistant bacteria to these extract, was the *Proteus mirabilis*. The results of MIC, MBC showed that MIC of the extract in concentration of 63 and 125 mg/ml on *Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* respectively. Also, the MBC were extract in concentration of 63 and 125mg/ml on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* respectively.

Discussion and conclusion: *Pseudomonas aeruginosa* had high potential in reducing the surface tension and biosurfactant extracted had high antibacterial effects. Therefore, it could be said that this bacterium had a great potential for applications of biotechnology and the environment.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa,* Biosurfactant, Surface tension, Emulsification, Glycolipid, Antibacterial

* Corresponding Author
Received: April 9, 2013 / **Accepted:** July 6, 2013