

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۹۷-۱۱۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط دو باکتری *Bacillus pumilus* 1529 و *Bacillus subtilis* WPI

شیلا خواجوی شجاعی*: دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، shila_khajavi@yahoo.com
عبدالامیر معزی: دانشیار شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، moeezi251@gmail.com
نعمه عنایتی ضمیر: استادیار خاکشناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، n.enayatzmir@scu.ac.ir

چکیده

مقدمه: بیوسورفکتانت‌ها، مولکول‌های دو گانه دوست منحصر به فردی هستند که کاربرد وسیعی در حذف آلودگی‌های آلی و فلزی محیط‌زیست دارند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی و تعیین شرایط بهینه تولید بیوسورفکتانت توسط دو باکتری *Bacillus pumilus* 1529 و *Bacillus subtilis* WPI است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، اثر منبع کربن، دما و زمان گرماگذاری بر تولید بیوسورفکتانت بررسی شد. به منظور تشخیص تولید بیوسورفکتانت از روش‌های کمی و کیفی غربال‌گری، مانند همولیز آگار خون‌دار، روش پراکنش نفت، روش فروپاشی روغن، سنجش فعالیت امولسیون‌کنندگی، سنجش آب‌گریزی سلول و اندازه‌گیری کشش سطحی استفاده شد. سپس، با توجه به نتایج حاصل بهترین شرایط تولید بیوسورفکتانت توسط دو باکتری *Bacillus pumilus* 1529 و *Bacillus subtilis* WPI تعیین شد.

نتایج: در این پژوهش، هر دو باکتری قادر به تولید بیوسورفکتانت در سطح قابل قبولی بودند. از میان چهار منبع کربن مورد بررسی گلوکز، نفت سفید، ملاس نیشکر و فناترن به‌عنوان منبع کربن و انرژی توسط این دو باکتری استفاده شدند. باکتری *Bacillus subtilis* WPI بیش‌ترین کاهش کشش سطحی را در منبع کربن نفت سفید پس از ۱۵۶ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نشان داد و توانست کشش سطحی را تا 10.3 ± 3.3 (میلی‌نیوتن بر متر) کاهش دهد. بیش‌ترین کاهش کشش سطحی توسط باکتری *Bacillus pumilus* 1529 در محیط حاوی ملاس نیشکر حاصل شد. کشش سطحی نمونه شاهد بدون باکتری حاوی ملاس معادل 1.5 ± 5.4 (میلی‌نیوتن بر متر) بود که این سویه توانست پس از ۱۵۶ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشش سطحی محلول را تا 22.83 (میلی‌نیوتن بر متر) کاهش دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: باکتری *Bacillus pumilus* 1529 و *Bacillus subtilis* WPI قابلیت بالایی برای تولید بیوسورفکتانت و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی و فناترن دارند. بنابراین، می‌توان گفت این دو باکتری قابلیت استفاده در زیست‌پالایی و دیگر کاربردهای زیست‌محیطی و بیوتکنولوژی را دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، کشش سطحی، فناترن، ملاس، *Bacillus*

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

سورفکتانت یکی از مواد شیمیایی است که بیشتر در زندگی روزمره استفاده می‌شود. از آغاز قرن بیستم تولید طیف گسترده‌ای از سورفکتانت‌های مصنوعی از منابع نفتی به شدت افزایش یافته است اما استفاده از بیوسورفکتانت‌های طبیعی مانند صابون (نمک اسید چرب)، لسیتین (فسفولیپید) و یا ساپونین (گلیکولیپید) در صنعت و منازل قدمت بیشتری دارد. سورفکتانت شامل یک بخش آب‌گریز و یک بخش آب‌دوست است. از سورفکتانت‌ها در صنعت به‌عنوان ماده هم‌اور^۱، مرطوب‌کننده، عامل کف‌ساز، امولسیون‌کننده و روان‌کننده استفاده می‌شود. توانایی کاهش کشش سطحی یکی از ویژگی‌های مهم سورفکتانت است (۱). امروزه بیوسورفکتانت‌ها با استفاده از مواد زائد حاصل از فرآیندهای مختلف، به‌عنوان منبع کربن تولید می‌شود. مصرف مواد ارزان قیمت تجدیدپذیر طبیعی، پسماندهای کشاورزی و یا پساب‌های صنعتی و شهری به‌عنوان سوبستراهای جایگزین، علاوه بر کمک به عدم تجمع این مواد در طبیعت به تولید ماده‌ای با ارزش نیز کمک می‌کند (۲).

آلودگی خاک به نفت یکی از مشکلات شایع زیست‌محیطی است. روش‌های پاک‌سازی خاک از نفت دشوار بوده و یا به لحاظ اقتصادی امکان‌پذیر نیست. یکی از اقتصادی‌ترین روش‌های زیست‌پالایی استفاده از میکروارگانیسم‌هاست که باعث ساده‌سازی و یا تخریب کامل ساختار مولکولی آلاینده‌های زیست‌محیطی می‌شود (۱، ۳، ۴).

دسترسی زیستی آلاینده‌های نفتی در محیط زیست به علت حلالیت ناچیز این ترکیبات بسیار کم است، از این رو موجب تخریب محیط زیست و سلامت انسان‌ها

می‌شوند. بنابراین، بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند به‌عنوان عامل محرک برای افزایش تجزیه زیستی این ترکیبات مؤثر باشند. بیوسورفکتانت با کاهش کشش سطح و بین‌سطحی، افزایش سطح ترکیبات نامحلول به افزایش تحرک و فراهمی زیستی هیدروکربن‌ها منجر می‌شود. در نتیجه، بیوسورفکتانت به افزایش تجزیه زیستی و حذف هیدروکربن‌ها منجر می‌شود. علاوه بر این، بیوسورفکتانت از طریق افزایش حلالیت و امولسیون نیز باعث افزایش تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی می‌شود (۵ و ۶).

جمعی از پژوهشگران آثار رامنولیپید تولیدشده توسط *Pseudomonas aeruginosa* در آب‌گریزی سطح سلول و تجزیه زیستی فنانتین توسط دو باکتری گرم‌دوست *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* و ترکیبی از هر دو سویه را بررسی کردند. در غیاب رامنولیپید ترکیب دو سویه ۸۲/۲ درصد از فنانتین را در کمتر از ۳۰ روز حذف کرد. در حالی که افزودن رامنولیپید جذب فنانتین را به‌واسطه سورفکتانت افزایش داد (۷). کالو و همکاران^۲ در اسپانیا با استفاده از باکتری *Bacillus pumilus* تجزیه نفتالین و تولید بیوسورفکتانت را مطالعه کردند. پس از جداسازی سویه‌های باکتری، آن را در حضور ۰/۱ درصد (وزنی) نفت خام و نفتالین در شرایط هوازی رشد دادند. نتایج نشان داد که این باکتری ظرفیت امولسیون‌کنندگی نفت خام را داراست و از این رو می‌توان برای حذف هیدروکربن‌های نفتی به روش زیستی از آن استفاده کرد (۸).

بر این اساس، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت و انتخاب بهترین منبع کربن برای تولید بیوسورفکتانت انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری: *Bacillus pumilus* 1529

به شکل لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و باکتری *Bacillus subtilis* WPI از کلکسیون میکروبی گروه خاک‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار مغذی^۳ کشت شد. باکتری *Bacillus pumilus* 1529 از مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی و باکتری *Bacillus subtilis* WPI از پساب کارخانجات کاغذسازی استان خوزستان (۹) جداسازی شده بودند.

شرایط کشت و تولید بیوسورفکتانت: برای تولید

بیوسورفکتانت از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت مایع مغذی^۴ (چگالی نوری = ۱) استفاده شد. به این شکل که پنج درصد از کشت شبانه باکتری به ارلن‌های حاوی محیط کشت نمک معدنی^۶ (جدول ۱) با اسیدیته ۷/۲ و منابع مختلف کربن، شامل: ۱/۲ درصد (وزنی / حجمی) گلوکز، پنج درصد (وزنی / حجمی) ملاس، دو درصد (وزنی / حجمی) نفت سفید و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فناترن تلقیح شد. همچنین، به تمامی محیط کشت‌ها ۰/۱ درصد (وزنی / حجمی) آمونیوم سولفات به عنوان منبع نیتروژن اضافه شد. نمونه‌ها در دو درجه حرارت ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس و با سرعت دورانی ۱۸۰ دور در دقیقه^۷ در دو دوره زمانی ۴۸ و ۱۵۶ ساعته نگهداری شدند. پس از گذشت دوره گرماگذاری، محلول باقیمانده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۵۰۰ سانتیفریژ شد تا سلول‌ها و ذرات معلق از آن حذف شود (۲). مایع رویی به دست آمده برای تولید بیوسورفکتانت بررسی شد.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت نمک معدنی (۱۰)

مقدار	ترکیبات
۲ گرم	پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات
۰/۱ گرم	آمونیم نترات
۰/۱ گرم	منیزیم سولفات
۰/۱ گرم	سدیم کلرید
۰/۱ گرم	سولفات آهن ۷ آب
۲/۴ گرم	دی‌سدیم هیدروژن فسفات
۰/۰۱۳ گرم	کلسیم کلرید ۲ آب
۱/۴ گرم	سولفات روی ۷ آب
۱/۲ گرم	سولفات منگنز ۷ آب
۰/۲۵ گرم	سولفات مس ۵ آب
۱۰۰۰ میلی‌لیتر	آب مقطر

غربال‌گری بیوسورفکتانت

آزمایش همولیز خون: به منظور تعیین توانایی تولید

بیوسورفکتانت ابتدا فعالیت همولیتیکی باکتری‌ها بررسی شد. بدین منظور تک کلونی‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته دو باکتری، بر روی پلیت‌های حاوی آگار خون‌دار^۸ (دارای ۵ درصد (حجمی / حجمی) خون گوسفند)، کشت شد و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. فعالیت همولیتیک با حضور منطقه شفاف اطراف کلونی‌های باکتریایی شناسایی می‌شود (۱۱).

آزمون پراکنش نفت: در این آزمون، ۳۰ میلی‌لیتر

آب مقطر درون یک پلیت ریخته، ۲۰ میکرولیتر نفت خام به مرکز پلیت اضافه و در پایان، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه حاصل از سانتیفریژ بر لایه نفتی ایجاد شده ریخته شد. چنانچه محلول رویی حاصل از سانتیفریژ حاوی بیوسورفکتانت باشد، قادر خواهد بود لایه نفتی را کنار بزند و در سطح آب ناحیه شفاف ایجاد کند (۱۲).

فروپاشی روغن: در این مرحله ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ به درون هر چاهک پلیت الیزا حاوی ۱۰۰ میکرولیتر پارافین اضافه گردید. در این آزمایش از سورفکتانت شیمیایی تویین ۲۰ به‌عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت نمک معدنی همراه با منبع کربن به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. در صورت تشکیل قطره کروی در سطح پارافین امتیاز منفی به چاهک و در صورتی که قطره اضافه شده به ته چاهک منتقل شود یا از حالت کروی خارج شود امتیاز مثبت می‌گیرد. نتایج در زمان‌های ۱، ۳۰ و ۶۰ دقیقه یادداشت شد (۱۳).

فعالیت امولسیون‌کنندگی: برای انجام این آزمون، دو میلی‌لیتر از هر نمونه حاصل از سانتریفوژ، درون لوله‌های آزمایش جداگانه ریخته و دو میلی‌لیتر نفت سفید نیز به هر کدام اضافه شد. سپس، هر نمونه به مدت دو دقیقه تحت ورتکس شدید قرار گرفت، پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط به‌شکل ساکن قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، ارتفاع امولسیون باقیمانده درون هر لوله آزمایش اندازه‌گیری شد و نسبت ارتفاع این امولسیون به ارتفاع کل مایع درون لوله آزمایش، به‌عنوان شاخص امولسیفیکاسیون برای هر نمونه گزارش شد (۱۲).

آب‌گریزی سطح سلول: این روش از روش‌های غیرمستقیم برای غربال‌گری تولید بیوسورفکتانت ریز موجودات است. با وجود این، برای شناسایی سریع سویه‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت می‌توان از این روش استفاده کرد (۱۴ و ۱۵). این روش به‌میزان چسبندگی سلول به هیدروکربن‌های مختلف مایع بستگی دارد. برای اندازه‌گیری این فاکتور، از کشت باکتری در منابع مختلف کربن استفاده شد. سلول‌های

باکتریایی در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ شده و دو بار در محلول بافر فسفات منیزیم اوره (ترکیبات (گرم در لیتر): دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات: ۱۹/۷، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات: ۷/۲۶، اوره: ۱/۸، سولفات منیزیم ۷ آب: ۰/۲) شسته شد. سپس، به حالت سوسپانسیون در آمده تا چگالی نوری اولیه (A_0) به یک برسد. چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل (PD-303 UV) خوانده شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر هگزاکان به پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه و به مدت دو دقیقه با دور بالا ورتکس شد. پس از ۱۰ دقیقه، چگالی نوری فاز آبی اندازه‌گیری شد (A_1). میزان آب‌گریزی از معادله (۱) محاسبه شد (۱۶). این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

معادله (۱): $\left[1 - \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100\right] =$ درصد آب‌گریزی
اندازه‌گیری کشش سطحی: به‌منظور اندازه‌گیری کشش سطحی پنج میلی‌لیتر از مایع به‌دست آمده از سانتریفوژ نمونه‌ها به لوله آزمایشی که در حمام آب در درجه حرارت ثابت ۲۸ درجه سلسیوس قرار داشت اضافه شد. کشش سطحی با اندازه‌گیری ارتفاع صعود مایع در لوله موئین و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. در هر مورد برای اطمینان از درستی نتایج، اندازه‌گیری کشش سطحی سه مرتبه انجام شد (۱۷).

$$\gamma = \frac{rh\delta g}{2} \quad \text{معادله (۲)}$$

r = شعاع لوله موئین (سانتی‌متر)، h = ارتفاع صعود مایع (سانتی‌متر)، δ = چگالی (گرم بر میلی‌لیتر)، g = نیروی ثقل (۹۸۰ سانتی‌متر بر مجذور ثانیه)، γ = کشش سطحی (میلی‌نیوتن بر متر^۲) است.

رسم منحنی رشد باکتری: به‌منظور رسم منحنی رشد، باکتری در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌متری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط نمک معدنی همراه با منابع مختلف کربن

شفافی در سطح لایه نفتی ایجاد شد. این پدیده نشان‌دهنده حضور ترکیبات دوگانه دوست بیوسورفکتانت در محیط کشت باکتری *Bacillus subtilis* WPI و *Bacillus pumilus* 1529 در چهار منبع کربن است؛ اما با توجه به ایجاد نواحی شفاف با قطر بیشتر در برخی از نمونه‌ها مشخص شد فعالیت بیوسورفکتانت تولیدشده در برخی منابع کربن بیشتر است (جدول ۲).

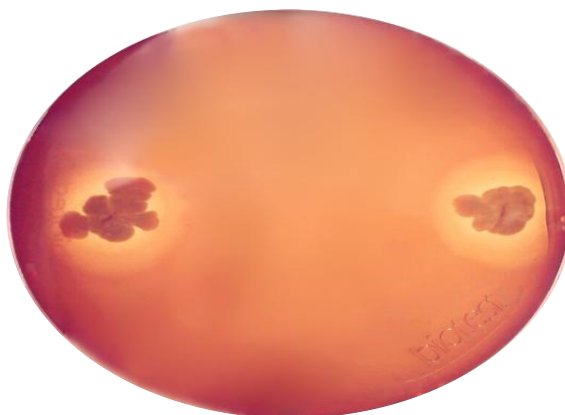
فروپاشی روغن: مشاهدات نشان داد شاهد منفی (آب مقطر) در لایه پارافینی موجود در چاهک پلیت سقوط نکرده و مانند یک مهره در سطح پارافین قرار گرفت. درحالی که شاهد مثبت (تویین ۲۰ درصد) در مدت زمان یک دقیقه فرو ریخت و به ته چاهک منتقل شد. این حالت به طور مشابه، برای محلول‌های حاوی متابولیت‌های هر دو باکتری *Bacillus pumilus* 1529 و *Bacillus subtilis* WPI در هر چهار منبع کربن مشاهده شد. از سوی دیگر در نمونه‌های شاهد حاوی منابع کربن هیچ گونه سقوط و یا تغییر حالت در سطح پارافین مایع مشاهده نشد. نتایج این آزمون در جدول ۲ آورده شده است.

فعالیت امولسیون‌کنندگی: آزمون (EI24) برای تمامی نمونه‌ها انجام شد. امولسیون‌های ایجاد شده به وسیله باکتری *Bacillus pumilus* 1529 در دو منبع کربن ملاس و گلوکز به ترتیب با $42/2 \pm 1$ و $33/7 \pm 1/9$ درصد پایدارتر از سایر منابع کربن به نظر می‌رسیدند. نتایج نشان داد باکتری *Bacillus subtilis* WPI توانایی تشکیل امولسیون پایدار را ندارد و امولسیون‌های تشکیل شده به وسیله این باکتری چند ساعت پس از تشکیل از بین رفتند (جدول ۲).

(ملاس نیشکر، گلوکز، نفت سفید و فناترن) در ۳ تکرار کشت داده شد. ارلن‌ها در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ (دور در دقیقه) به منظور هوادهی، گرماگذاری شد. چگالی نوری باکتری‌ها در زمان‌های صفر، ۱۲، ۳۶، ۶۰، ۸۴، ۱۰۸، ۱۳۲ و ۱۵۶ ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد.

نتایج

آزمایش همولیز خون: در این روش، ۴۸ ساعت پس از کشت باکتری‌ها در پلیت‌های حاوی آگار خون‌دار هاله‌ای از نوع بتا در اطراف کلونی باکتری *Bacillus pumilus* 1529 مشاهده شد (شکل ۱). قطر هاله ایجادشده پس از دو روز گرماگذاری به دو سانتی‌متر رسید. نتیجه فعالیت همولیتیکی باکتری *Bacillus subtilis* WPI منفی بود و هیچ هاله‌ای در اطراف کلونی‌های این باکتری ایجاد نشد.



شکل ۱- فعالیت همولیتیکی باکتری *Bacillus pumilus* 1529

آزمون پراکنش نفت: در این روش، نفت اضافه شده در سطح آب مقطر لایه‌ای به قطر ۱۰ سانتی‌متر تشکیل داد که با افزودن محلول حاصل از سانتریفوژ هر دو باکتری در منابع مختلف کربن به شکل جداگانه، ناحیه

جدول ۲- نتایج تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *Bacillus subtilis* WPI و *Bacillus pumilus* 1529

۴۸ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد		۱۵۶ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد		۴۸ ساعت، ۳۰ درجه سانتی‌گراد		۱۵۶ ساعت، ۳۰ درجه سانتی‌گراد		زمان و دمای آزمایش باکتری	منبع کربن	
<i>B. 1529</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. 1529</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. 1529</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. 1529</i>	<i>B. subtilis</i>			
++	+	++	+	++	+	++	+	-	گلوکز	پراکنش نفت*
++	++	++	++	++	++	++	++	-	نفت سفید	
++	++	+++	++	+	++	+++	++	-	ملاس	
++	+	++	++	+	+	++	++	-	فنانترن	
+	+	+	+	+	+	+	+	-	گلوکز	فروپاشی نفت**
+	+	+	+	+	+	+	+	-	نفت سفید	
+	+	+	+	+	+	+	+	-	ملاس	
+	+	+	+	+	+	+	+	-	فنانترن	
۱۱ ± ۰/۲	۳/۸ ± ۱/۲	۳۳/۷ ± ۱/۹	۵/۶ ± ۲/۱	۷/۱ ± ۲/۶	۵/۸ ± ۱/۱	۱۹ ± ۱/۹	۳/۶ ± ۰/۸	۰	گلوکز	EI24 (درصد)
۵/۵ ± ۰/۶	۴/۴ ± ۱/۲	۹/۱ ± ۱/۲	۱۰ ± ۱/۸	۴/۴ ± ۰/۷	۴/۶ ± ۲/۱	۱۱ ± ۰/۴	۵/۸ ± ۱/۹	۰	نفت سفید	
۱۸ ± ۰/۵	۱۰/۵ ± ۲/۵	۴۲/۲ ± ۱	۱۲ ± ۲/۳	۱۳ ± ۱	۹/۳ ± ۱/۷	۲۰/۱ ± ۱/۱	۱۰/۲ ± ۲/۳	۰	ملاس	
۵/۷ ± ۱/۹	۴/۶ ± ۱	۱۳ ± ۰/۶	۱۱/۱۱ ± ۱/۷	۵ ± ۰/۶	۷/۱ ± ۲/۳	۹/۴ ± ۰/۷	۱۳/۷ ± ۱/۵	۰	فنانترن	

* نواحی با قطر کمتر از ۱ سانتی‌متر، ++ نواحی با قطر ۱-۳ سانتی‌متر، +++ نواحی با قطر بیش‌تر از ۳ سانتی‌متر،

** + نواحی فروریخته با قطر کمتر از ۰/۶ سانتی‌متر، ++ نواحی فروریخته با قطر ۰/۷-۱ سانتی‌متر، +++ نواحی فروریخته با قطر بیش‌تر از ۰/۱ سانتی‌متر

جدول ۳- اثر منبع کربن بر آب‌گریزی *Bacillus subtilis* WPI و *Bacillus pumilus* 1529 پس از ۱۵۶ ساعت

درصد آب‌گریزی				باکتری
گلوکز	ملاس	نفت سفید	فنانترن	
۳۱/۲ ± ۳/۱	۶۰/۵ ± ۱/۲	۶۸/۳ ± ۱/۸	۵۵/۷ ± ۰/۸	<i>Bacillus pumilus</i> 1529
۱۶/۹ ± ۱/۶	۳۸/۴ ± ۰/۹	۵۱/۳ ± ۲/۱	۲۱/۳ ± ۱/۶	<i>Bacillus subtilis</i> WPI

قابل قبول کشش سطحی در چهار منبع کربن هستند. همان‌طور که در جدول ۴ در میان منابع کربن مورد استفاده بیش‌ترین کاهش کشش سطحی و در نتیجه، تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *Bacillus subtilis* WPI منبع کربن نفت سفید ایجاد شد و این باکتری توانست کشش سطحی را تا $± ۰/۳$ (میلی‌نیوتن بر متر) کاهش دهد. پس از منبع کربن نفت سفید، بیش‌ترین کاهش کشش سطحی به وسیله باکتری *Bacillus subtilis* WPI در محیط کشت حاوی فنانترن و گلوکز به ترتیب با کشش سطحی $± ۰/۱$

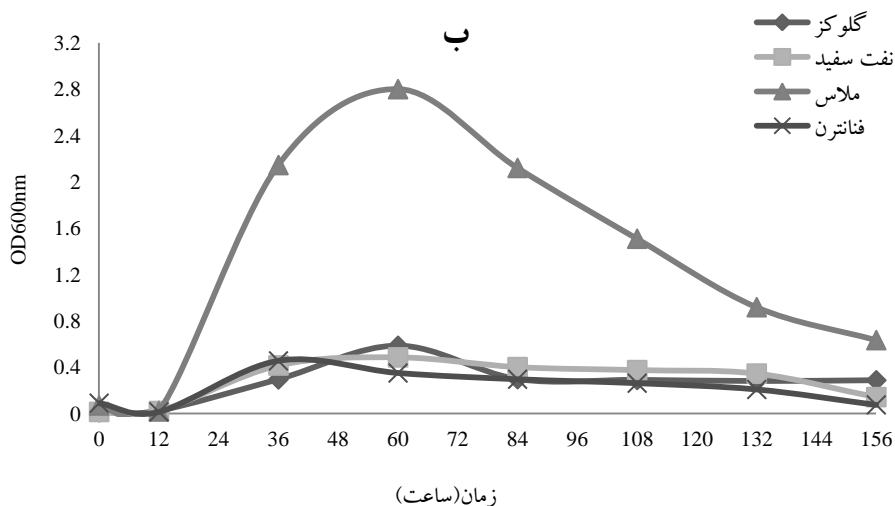
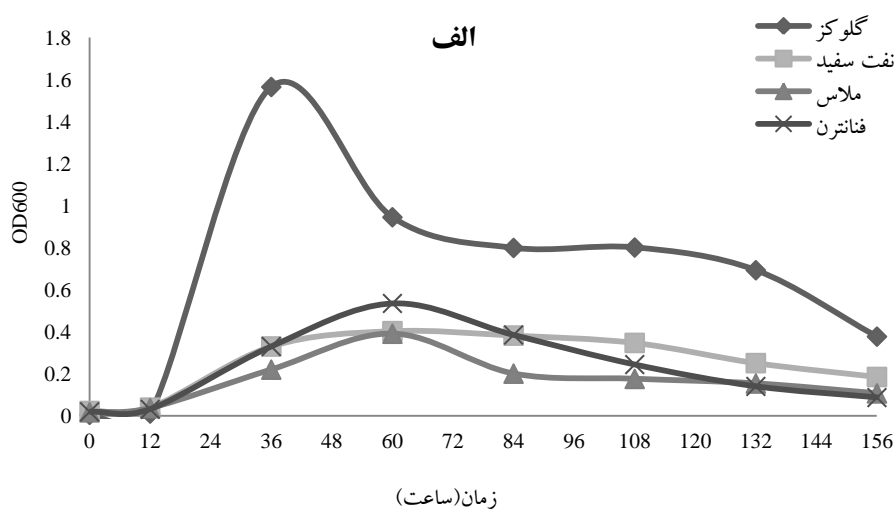
آب‌گریزی سطح سلول: برای بررسی بیشتر تأثیر منبع کربن استفاده شده، آب‌گریزی سطح سلول هر دو باکتری اندازه‌گیری شد. نتایج این آزمون نشان داد آب‌گریزی سطح سلول با توجه به نوع منبع کربن موجود در محیط کشت تغییر می‌کند. در هر دو باکتری بالاترین میزان آب‌گریزی مربوط به منبع کربن نفت و کم‌ترین آب‌گریزی مربوط به گلوکز است (جدول ۳).
اثر منبع کربن بر رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت: تأثیر منابع کربن مختلف در تولید بیوسورفکتانت نشان داد هر دو سوبه قادر به کاهش

کربن در محیط حاوی ملاس نیشکر نشان داد. اثر دمای گرماگذاری بر رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت: نتایج این بررسی نشان داد رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بسیار بیشتر و سریع‌تر از دمای ۳۰ درجه سلسیوس بوده و با افزایش دما کاهش کشش سطحی نیز افزایش یافته است. رشد باکتری در چهار منبع کربن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شکل ۲ آورده شده است. افزایش دما از ۳۰ درجه سلسیوس به ۳۷ درجه سلسیوس به کاهش کشش سطحی در تمامی منابع کربن منجر شد که می‌توان گفت افزایش دما به افزایش میزان تولید بیوسورفکتانت منجر شد (شکل ۳). بیش‌ترین میزان کاهش کشش سطحی در اثر افزایش دما در دوره زمانی ۱۵۶ ساعته توسط باکتری *Bacillus subtilis* WPI و در منبع نفت سفید ایجاد شد.

۳۲/۳۱ (میلی‌نیوتن بر متر) و $0.5 \pm 35/81$ (میلی‌نیوتن بر متر) ایجاد شد. همچنین، بیش‌ترین کاهش کشش سطحی به‌وسیله باکتری *Bacillus pumilus* 1529 در محیط حاوی ملاس نیشکر رخ داد. کشش سطحی نمونه شاهد بدون باکتری حاوی ملاس معادل $1.5 \pm 50/4$ (میلی‌نیوتن بر متر) بود که این سویه توانست پس از ۱۵۶ ساعت کشش سطحی محلول را تا ۲۲/۸۳ (میلی‌نیوتن بر متر) کاهش دهد. پس از ملاس بیش‌ترین کاهش کشش سطحی در محیط حاوی نفت سفید و فنانترین ایجاد شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در بین چهار منبع کربن استفاده شده، باکتری *Bacillus pumilus* 1529 در محیط حاوی گلوکز رشد بیشتری نسبت به سایر منابع کربن دارد. همچنین، باکتری *Bacillus subtilis* WPI بالاترین رشد را در بین منابع

جدول ۴- کشش سطحی باکتری *Bacillus subtilis* WPI و *Bacillus pumilus* 1529

کشش سطحی (میلی‌نیوتن بر متر)				زمان و دمای گرماگذاری	باکتری
گلوکز	نفت سفید	ملاس نیشکر	فنانترین		
$40/13 \pm 1/8$	$42/65 \pm 2/1$	$34/36 \pm 2/1$	$38/51 \pm 0/9$	۴۸ ساعت - ۳۷ درجه سانتی‌گراد	<i>Bacillus pumilus</i> 1529
$38/07 \pm 1/5$	$36/07 \pm 1/4$	$29/87 \pm 0/9$	$22/83 \pm 1/1$	۱۵۶ ساعت - ۳۷ درجه سانتی‌گراد	
$49/26 \pm 2/8$	$48/29 \pm 1/8$	$39/74 \pm 1/5$	$46/61 \pm 1/7$	۴۸ ساعت - ۳۰ درجه سانتی‌گراد	
$47/02 \pm 2/8$	$40/43 \pm 2/3$	$28/91 \pm 2/8$	$33/28 \pm 1/3$	۱۵۶ ساعت - ۳۰ درجه سانتی‌گراد	
$47/09 \pm 0/3$	$36/6 \pm 0/5$	$49/41 \pm 0/7$	$35/81 \pm 0/5$	۴۸ ساعت - ۳۷ درجه سانتی‌گراد	<i>Bacillus subtilis</i> WPI
$39/32 \pm 0/1$	$33/1 \pm 0/3$	$41/23 \pm 0/4$	$37/96 \pm 0/1$	۱۵۶ ساعت - ۳۷ درجه سانتی‌گراد	
$45/89 \pm 0/2$	$33/65 \pm 0/4$	$47/82 \pm 0/3$	$36/75 \pm 0/8$	۴۸ ساعت - ۳۰ درجه سانتی‌گراد	
$45/08 \pm 0/3$	$32/31 \pm 0/1$	$46/32 \pm 0/2$	$37/58 \pm 0/2$	۱۵۶ ساعت - ۳۰ درجه سانتی‌گراد	
$56/12 \pm 1/7$	$63/6 \pm 0/8$	$50/4 \pm 1/5$	$56/6 \pm 1/3$		شاهد (بدون تلقیح باکتری)

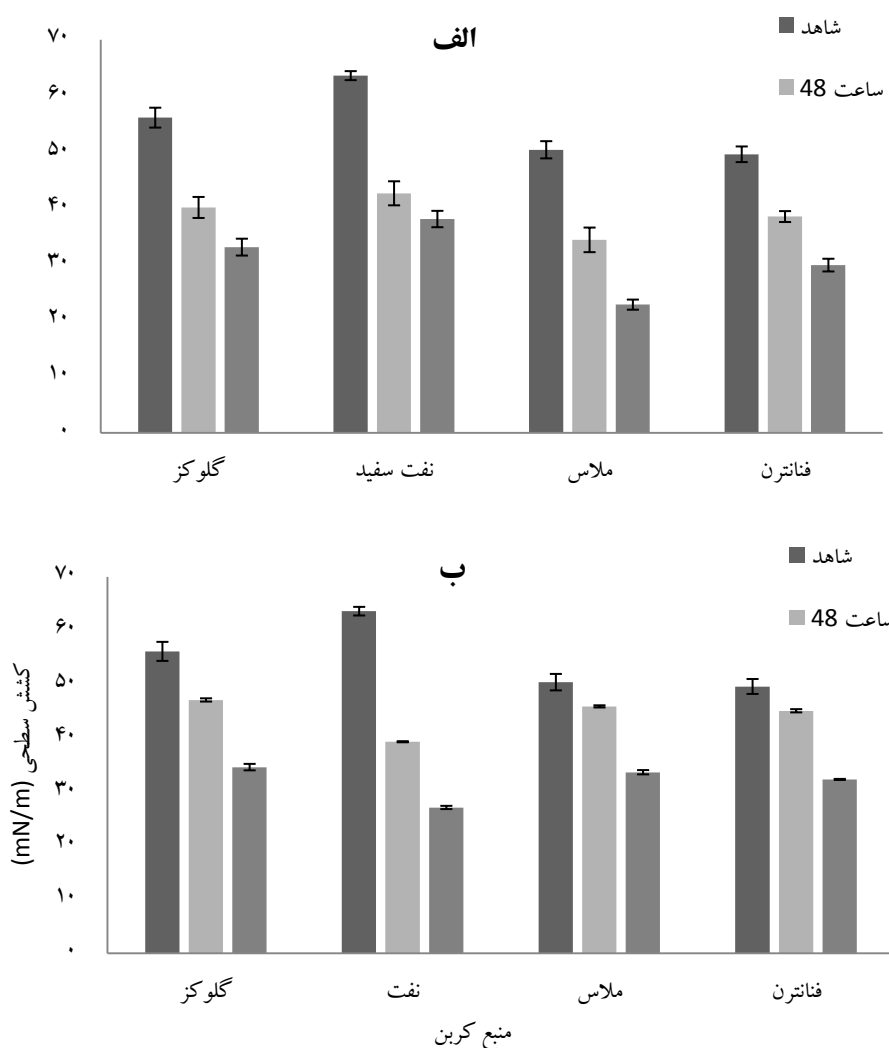


شکل ۲- نمودار تغییرات رشد در منابع مختلف کربن در دمای ۳۷°C
الف) باکتری *Bacillus pumilus* 1529، ب) باکتری *Bacillus subtilis* WPI.

کاهش یافته و به تدریج وارد فاز سکون می‌شود. بیش‌ترین میزان کاهش کشش سطحی محیط نیز پس از ۱۵۶ ساعت که رشد در فاز سکون قرار دارد، مشاهده شد. به طوری که کشش سطحی در هر دو باکتری در دوره زمانی ۱۵۶ ساعت ۵ تا ۱۴ (میلی‌نیوتن بر متر) نسبت به دوره ۴۸ ساعته کاهش نشان داده است (شکل ۳).

اثر زمان گرماگذاری بر رشد باکتری و تولید

بیوسورفکتانت: به منظور بررسی اثر زمان بر تولید بیوسورفکتانت، آزمایش‌ها در دو زمان ۴۸ و ۱۵۶ ساعت انجام شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است بیش‌ترین میزان رشد در هر دو باکتری بیشتر بین ۳۶ تا ۶۰ ساعت رخ داده است. رشد باکتری‌ها در این زمان در فاز نمایی قرار دارد و پس از آن رشد هر دو باکتری



شکل ۳- تغییرات کشش سطحی در دو دوره‌ی زمانی ۴۸ و ۱۵۶ ساعت در چهار منبع کربن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

الف) باکتری *Bacillus pumilus* 1529 ، ب) باکتری *Bacillus subtilis* WPI

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر با توجه به کاربردهای فراوان بیوسورفکتانت در صنایع مختلف، تولید بیوسورفکتانت در پژوهش‌های فراوانی بررسی شده است. پژوهشگران از روش‌های مختلفی برای بهبود تولید بیوسورفکتانت استفاده کرده‌اند که از میان این روش‌ها بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت ارزان‌تر و آسان‌تر از سایر روش‌هاست. در پژوهش حاضر، قابلیت تولید ترکیبات بیوسورفکتانتی به‌وسیله دو باکتری *Bacillus pumilus* 1529 و

Bacillus subtilis WPI در دو دوره زمانی (۴۸ و ۱۵۶

ساعت) و توانایی مصرف گلوکز، ملاس نیشکر، نفت سفید و فناثرن به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی در دو دمای متفاوت شناسایی شد.

در پژوهش حاضر فعالیت همولیتیک باکتری‌ها به‌عنوان نخستین شاهد کیفی برای تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد. مانرات و همکاران^{۱۳} نیز از این روش برای بررسی تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های جداسازی شده خود استفاده کردند (۱۳). فعالیت

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد، بیش‌ترین شاخص امولسیون در باکتری *Bacillus pumilus* 1529 و در دو منبع کربن ملاس و گلوکز ایجاد شده است. فعالیت امولسیونی باکتری *Bacillus subtilis* WPI در هر چهار منبع کربن پایین بود که با نتایج برخی از پژوهش‌های قبلی هم سواست (۲، ۲۱ و ۲۲). باقری و همکاران^{۱۷} با بررسی ارتباط بین فعالیت امولسیون‌کنندگی و کشش سطحی ۱۶ سویه باکتریایی اعلام داشتند تشابهی بین روند داده‌های حاصل از کشش سطحی و شاخص امولسیون‌کنندگی وجود ندارد. از طرفی در این پژوهش مشاهده شد میزان امولسیون‌کنندگی نمونه‌ها در هگزان نرمال و نفت خام کاملاً متفاوت است و میزان امولسیون‌کنندگی به ماده امولسیون شونده نیز بستگی دارد (۲). برای اطمینان بیش‌تر از تولید بیوسورفکتانت و تعیین شرایط بهینه برای تولید آن کشش سطحی نمونه‌ها نیز اندازه‌گیری شد.

در پژوهش حاضر، پتانسیل باکتری *Bacillus subtilis* WPI و *Bacillus pumilus* 1529 برای استفاده از گلوکز، ملاس نیشکر، نفت سفید و فانترن به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی از طریق اندازه‌گیری رشد و تولید بیوسورفکتانت بررسی شد. کمیت و کیفیت تولید بیوسورفکتانت تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها تحت تأثیر ماهیت منبع کربن است (۲۳). پسماندهای حاصل از صنایع و کشاورزی پتانسیل بالایی برای تولید بیوسورفکتانت دارند. در این مطالعه، باکتری *Bacillus subtilis* WPI بیش‌ترین کاهش کشش سطحی را در محیط حاوی نفت سفید نشان داد و توانست به میزان ۳۰/۵ (میلی‌نیوتن بر متر) کشش سطحی محیط را نسبت به نمونه شاهد کاهش دهد. الایه و همکاران^{۱۸} با بررسی فعالیت بیوسورفکتانتی در سویه‌های

همولیتیک بیوسورفکتانت‌ها، نخستین بار توسط برن هایمر و اویقاد^{۱۴} در سال ۱۹۷۰ برای بیوسورفکتانت تولید شده توسط *Bacillus subtilis* گزارش شد (۱۸). مصطفی پور و احمدی^{۱۵} با استفاده از گونه‌ای از باکتری *Bacillus cereus* دارای فعالیت همولیتیکی کشش سطحی محیط حاوی نفت خام را به کمتر از ۴۰ میلی‌نیوتن بر متر کاهش دادند (۱۹). اختصاصی نبودن این روش، از جمله محدودیت‌های آن محسوب می‌شود، زیرا ممکن است هاله شفاف اطراف کلونی در نتیجه حضور آنزیم‌های لیتیک تولید شده توسط باکتری به وجود آمده باشد. همچنان که در نتایج این مطالعه باکتری *Bacillus subtilis* WPI همولیز منفی بوده، اما توانایی تولید بیوسورفکتانت آن در غربال‌گری اولیه مثبت ارزیابی شد. عدم همولیز سلول‌های قرمز خون نیز می‌تواند ناشی از محدودیت انتشار سورفکتانت در محیط حاوی آگار باشد. به همین منظور در ادامه، توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط این دو باکتری با روش دقیق‌تر و کمی بررسی شد. نتایج آزمون فروپاشی روغن و پراکنش نفت در مورد هر دو باکتری مثبت بود و مؤید تولید بیوسورفکتانت است. نتایج حاصل نشان داد بیش‌ترین میزان پراکنش و فروپاشی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و پس از ۱۵۶ ساعت گرماگذاری حاصل می‌شود. روش پراکنش نفت و فروپاشی روغن روش سریع و آسان برای تشخیص بیوسورفکتانت است که بدون نیاز به تجهیزات و تنها با حجم کوچکی از نمونه انجام می‌شود. این روش نسبت به مقادیر کم بیوسورفکتانت نیز واکنش نشان می‌دهد. یوسف و همکاران^{۱۶} گزارش دادند که پراکنش نفت روش قابل اعتمادی برای تشخیص بیوسورفکتانت تولید شده به وسیله ریز موجودات است (۲۰).

بررسی اثر دما بر رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت نشان داد کشش سطحی در محیط کشت هر دو باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کاهش بیشتری می‌یابد. در واقع تولید بیوسورفکتانت کاملاً به دمای گرماگذاری وابسته است. باقری و همکاران نشان دادند با افزایش دما گرماگذاری میزان بیوسورفکتانت تولیدی توسط سویه *Pseudomonas aeruginosa* افزایش می‌یابد (۲).

بررسی اثر زمان بر رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت توسط دو باکتری نشان داد بیش‌ترین میزان تولید بیوسورفکتانت پس از ۱۵۶ ساعت از دوره گرماگذاری حاصل می‌شود و اینطور به نظر می‌رسد که بیوسورفکتانت تولیدی توسط این دو باکتری جزو متابولیت‌های ثانویه باکتری است. ایلوری و همکاران^{۲۲} گزارش دادند بیش‌ترین میزان رشد و تولید بیوسورفکتانت گلیکولیپیدی توسط گونه *Aeromonas* در محیط کشت حاوی نفت پس از ۸ روز ایجاد شد (۳۰). تولید بیوسورفکتانت در فاز سکون و استراحت در گونه‌های *Pseudomonas*، *Rhodococcus erythropolis* و *Candida apicola* گزارش شده است (۳۱-۳۵).

بررسی آب‌گریزی سطح سلول باکتری‌ها در مطالعه حاضر نشان داد بیش‌ترین میزان آب‌گریزی سطح سلول توسط باکتری *Bacillus pumilus* 1529 در دو منبع کربن ملاس و نفت سفید مشاهده شد. نتایج این آزمون نشان داد باکتری *Bacillus pumilus* 1529 آب‌گریزی بیشتری نسبت به باکتری *Bacillus subtilis* WPI در هر چهار منبع کربن دارد. آب‌گریزی بالای هر دو باکتری در دو منبع نفت و ملاس نتایج حاصل از کشش سطحی را تأیید کرده و مؤید تولید بیوسورفکتانت است. بالا

تجزیه‌کننده هیدروکربن دریافتند تولید بیوسورفکتانت در باکتری‌ای از گونه *Pseudomonas* در محیط کشت حاوی نفت سفید بسیار بیشتر از محیط حاوی گلوکز به عنوان تنها منبع کربن و انرژی است (۲۴). بیش‌ترین کاهش کشش سطحی و در نتیجه تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *Bacillus pumilus* 1529 در محیط حاوی ملاس نیشکر رخ داد. ماکار و همکاران^{۱۹} توسط دو سویه *Bacillus* و با استفاده از منبع کربن ملاس در شرایط ترموفیلیک بیوسورفکتانت لیوپپتیدی تولید کردند. استفاده از ملاس توسط دو گونه از باکتری *Bacillus Subtilis* برای تولید بیوسورفکتانت و رشد در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به تولید بیوسورفکتانت و کاهش کشش سطحی محیط کشت تا ۲۹ و ۳۱ دین بر سانتی متر^{۲۰} منجر شد (۲۵). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد هر دو باکتری توانایی رشد و استفاده از چهار منبع کربن (گلوکز، ملاس، نفت سفید و فناترن) را دارا هستند. رشد بالای باکتری *Bacillus pumilus* 1529 در محیط حاوی گلوکز و باکتری *Bacillus pumilus* 1529 در محیط حاوی ملاس احتمالاً به علت سهولت دسترسی ملاس و گلوکز به علت حلالیت بیش‌تر و میزان بالای قند موجود در ملاس و قابلیت استفاده آن توسط باکتری نسبت به نفت و فناترن بوده است. استفاده از ملاس به عنوان منبع کربن ارزان‌قیمت برای تولید بیوسورفکتانت در پژوهش‌های پیشین نیز بر کارایی و کاهش قابل توجه کشش سطحی تأکید دارد (۲۵-۲۸). تولوا و همکاران^{۲۱} توانستند با استفاده از سویه *Pseudomonas putida* 21 BN بیوسورفکتانت رامولیپید تولید کنند. تولید بیوسورفکتانت بر بستر محلول مانند گلوکز و بسترهای کم محلول مانند هگزادکان به عنوان تنها منبع کربن انجام شد (۲۹).

References

- (1) Mulligan CN., Gibbs BF. Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 70 (1): 31- 55.
- (2) Lotfabad TB., Shourian M., Roostaazad R., Najafabadi AR., Adelzadeh MR., Noghabi KA. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009; 69 (2): 183- 93.
- (3) Das K., Mukherjee AK. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. *Journal of Applied Microbiology* 2007; 102 (1): 195- 203.
- (4) Singh A., Van Hamme JD., Ward OP. Surfactants in microbiology and biotechnology: part2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 2007; 25 (1): 99- 121.
- (5) Nguyen TT., Youssef NH., McInerney MJ., Sabatini DA. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *water research* 2008; 42 (6- 7): 1735- 43.
- (6) Nievas ML., Commendatore MG., Estevas JL., Bucalá V. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil- type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. *Journal of Hazardous Materials* 2008; 154 (1- 3): 96- 104.
- (7) Zhao Z., Selvam A., Wong JW. Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. *Bioresource Technology* 2011; 102 (5): 3999- 4007.

بودن آبگریزی سلول به باکتری اجازه می دهد تا به طور مستقیم با قطره نفت یا هیدروکربن های جامد تماس پیدا کنند (۳۶). به گفته ژانگ و میلر^{۳۳}، جاذبه متقابل بین بیوسورفکتانت و سلول های میکروبی می تواند به افزایش آب گریزی سلول منجر شود، در نتیجه سلول ها تماس بهتری با بستر آب گریز داشته و در نهایت، تجزیه زیستی بالاتری به دست می آید (۳۷).

در پژوهش حاضر پتانسیل تولید بیوسورفکتانت دو باکتری *Bacillus subtilis* و *Bacillus pumilus* 1529 با WPI با چندین روش بررسی شد. هر دو سویه با وجود درصد فعالیت امولسیون کمی در دو یا سه آزمون دیگر نتایج مثبت نشان دادند. هر دو باکتری قادر به رشد در چهار منبع کربن (گلوکز، ملاس نیشکر، نفت سفید و فنانترن) بوده و کشش سطحی را به میزان قابل قبولی کاهش دادند. نتایج حاصل از آبگریزی سطح سلول تا حدودی نتایج حاصل از کشش سطحی و تولید بیوسورفکتانت را تأیید کرد. بررسی اثر زمان و دما نشان داد بیشترین کاهش کشش سطحی در هر دو باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و پس از ۱۵۶ ساعت از زمان گرماگذاری حاصل می شود. به علت کاهش قابل توجه کشش سطحی در محیط حاوی نفت و فنانترن توسط این دو باکتری می توان برای پالایش مکان های آلوده به هیدروکربن های نفتی از این سویه ها استفاده شود. با وجود این، برای اطمینان از میزان تجزیه هیدروکربن های نفتی و رسیدن به شرایط بهینه رشد نیاز به انجام پژوهش های بیشتری است. همچنین به علت دشواری در تشخیص تولید بیوسورفکتانت مختلف با استفاده از یک روش پیشنهاد می شود از روش های مختلف برای شناسایی سویه های تولیدکننده بیوسورفکتانت استفاده شود.

- (8) Calvo C., Toledo FL., González- López J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004; 109 (3): 255- 62.
- (9) Sheikhi F., Roayaei Ardakani M., Enayatizamir N., Rodriguez- Couto S. The Determination of Assay for Laccase of *Bacillus subtilis* WPI with Two Classes of Chemical Compounds as Substrates. *Indian Journal of Microbiology*. 2012; 52 (4): 701- 7.
- (10) Mukred AM., Hamid AA., Hamzah A., Yusoff WMW. Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum- oil in Contaminated Water. *Journal of Biological Sciences* 2008; 8 (4): 73- 9.
- (11) Ghayyomi Jazeh M., Forghani F., Oh DH. Biosurfactan Production by *Bacillus* sp. Isolated from Petroleum Contaminated Soils of Sirri Island. *American Journal of Applied Sciences* 2012; 9 (1): 1- 6.
- (12) Chandankere R., Yao J., Choi MMF., Masakorala K., Yu C. An Efficient Biosurfactant- Producing and Crude- Oil Emulsifying Bacterium *Bacillus Methylophilus* USTBa Isolated from Petroleum Reservoir. *Biochemical Engineering Journal* 2013; 74 (1): 46- 53.
- (13) Maneerat S., Phetrong K. Isolation of biosurfactant- producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2007; 29 (3): 781- 91.
- (14) Nakar D., Gutnick DL. Involvement of a protein tyrosine kinase in production of the polymeric bioemulsifier emulsan from the oil- degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG- 1. *Journal of Bacteriology* 2003; 185 (3): 1001- 9.
- (15) Whitfield C., Roberts IS. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 1999; 31 (5): 1307- 19.
- (16) Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell- surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 1980; 9 (1): 29- 33.
- (17) Viramontes- Ramos S., Portillo- Ruiz MC., Ballinas- Casarrubias ML., Torres- Muñoz JV., Rivera- Chavira BE., Nevárez- Moorillón GV. selection of biosurfactant/bioemulsifier production bacteria from hydrocarbon contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41 (3): 668- 75.
- (18) Bernheimer AW., Avigad LS. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *General Microbiology* 1970; 61 (3): 361- 9.
- (19) Mostafapour- Rami MJ., Ahmady- Asbchin S. Isolation and identification of biosurfactant- producing strains from the genus *Pseudomonas aeruginosa* and antibacterial effects of biosurfactant production in vitro. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (6): 41- 58.
- (20) Youssef NH., Duncan KE., Nagle DP., Savage KN., Knapp RM., McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 2004; 56 (3): 339- 47.
- (21) Hamed S., Smii L., Ghram A., Maaroufi A. Screening of potential biosurfactant- producing bacteria isolated from seawater biofilm. *African Journal of Biotechnology* 2012; 11 (77): 14153- 8.
- (22) Pereira JFB., Gudina EJ., Costa R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 2013; 111 (1): 259- 68.
- (23) Raza ZA., Khan MS., Khalid ZM. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray- induced *Pseudomonas putida* mutant. *Process Biochemistry* 2007; 42 (4): 686- 92.

- (24) Ellaiah P., Prabhakar T., Sreekanth M., Taleb AT., Raju PB., Saisha V. Production of glycolipids containing biosurfactant by *Pseudomonas* species. *Indian Journal of Experimental Biology* 2002; 40 (9): 1083- 6.
- (25) Makkar RS., Cameotra SS. Biosurfactant by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J Industrial Microbiology & Biotechnology* 1997; 18 (1): 37- 42.
- (26) Aparna A., Srinikethana G., Smithab H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2012; 95 (1): 23- 9.
- (27) Joshi S., Bharucha Ch., Jha S. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology* 2008; 99 (1): 195- 9.
- (28) Onbasli D., Aslim B. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* sp. *Journal of Environmental Biology* 2009; 30 (1): 161- 3.
- (29) Tuleva BK., Ivanov GR., Christova NE. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift für Naturforschung B* 2002; 57 (3- 4): 356- 60.
- (30) Ilori MO., Amobi CJ., Odocha AC. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* sp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere* 2005; 61 (7): 985- 92.
- (31) Hommel RK., Huse K. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Biotechnology Letters* 1993; 15 (8): 853- 8.
- (32) Margaritis A., Kennedy K., Zajic JE. Application of an air lift fermenter in the production of biosurfactants. *Developments in industrial microbiology* 1980; 21 (1): 285- 94.
- (33) Reiling HE., Wyass UT., Guerra- Santos LH., Hirt R., Kappeli O., Fiechter A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 1986; 51 (5): 985- 9.
- (34) Syldatk C., Lang S., Matulovic U., Wagner FZ. Production of four interfacial active rhamnolipids from n- alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* sp. DSM 2874. *Zeitschrift für Naturforschung B* 1985; 40 (1): 61- 67.
- (35) Syldatk C., Wagner F. Production of biosurfactants. In N. Kosaric., W. L. Cairns., and N. C. C. Gray (ed.), *Biosurfactant biotechnology* 1987; 25 (1): 89- 120.
- (36) Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Smyth TJ., Banat IM. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2010; 112 (6): 617- 27.
- (37) Zhang Y., Miller RM. Effect of a *Pseudomonas rhamnolipides* biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60 (1): 2101- 6.

¹- Flocculation Agent

²- Calvo *et al.*

³- Nutrient Agar

⁴- Nutrient Broth

⁵- Optical Density

⁶- Mineral Salt Medium

⁷- rpm

⁸- Blood Agar plate

⁹- Oil spreading

¹⁰- Drop Collapse

¹¹- EI24

¹²- mN/m

¹³- Maneerat *et al.*

¹⁴- Bernheimer and Avigad

¹⁵- Mostafapour Rami and Ahmady-Asbchin

¹⁶- Youssef *et al.*

¹⁷- Bagheri *et al.*

¹⁸- Ellaiah *et al.*

¹⁹- Makkar *et al.*

²⁰- dyne/cm

²¹- Tuleva *et al.*

²²- Ilori *et al.*

²³- Zhang and Miller

Investigation of biosurfactant production by *Bacillus pumilus* 1529 and *Bacillus subtilis* WPI

Shila Khajavi Shojaei *

M.Sc. of Soil chemistry and fertility, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, shila_khajavi@yahoo.com

Abdolamir Moezzi

Associate professor of Soil chemistry and fertility, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, moeezi251@gmail.com

Naeimeh Enayatizamir

Assistant professor of Soil microbiology, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran, n.enayatizamir@scu.ac.ir

Abstract

Introduction: Biosurfactants are unique amphipathic molecules with extensive application in removing organic and metal contaminants. The purpose of this study was to investigate production of biosurfactant and determine optimal conditions to produce biosurfactant by *Bacillus pumilus* 1529 and *Bacillus subtilis* WPI.

Materials and methods: In this study, effect of carbon source, temperature and incubation time on biosurfactant production was evaluated. Hemolytic activity, emulsification activity, oil spreading, drop collapse, cell hydrophobicity and measurement of surface tension were used to detect biosurfactant production. Then, according to the results, the optimal conditions for biosurfactant production by and *Bacillus subtilis* WPI was determined.

Results: In this study, both bacteria were able to produce biosurfactant at an acceptable level. Glucose, kerosene, sugarcane molasses and phenanthrene used as a sole carbon source and energy for the mentioned bacteria. *Bacillus subtilis* WPI produced maximum biosurfactant in the medium containing kerosene and reduced surface tension of the medium to 33.1 mN/m after 156 hours of the cultivation at 37°C. Also, the highest surface tension reduction by *Bacillus pumilus* 1529 occurred in the medium containing sugarcane molasses and reduce the surface tension of culture medium after 156 hours at 37°C from 50.4 to 28.83 mN/m.

Discussion and conclusion: *Bacillus pumilus* 1529 and *Bacillus subtilis* WPI had high potential in production of biosurfactant and degradation of petroleum hydrocarbons and Phenanthrene. Therefore, it could be said that these bacteria had a great potential for applications in bioremediation and other environmental process.

Key words: *Bacillus*, Biosurfactant, Molasses, Phenanthrene

* Corresponding author

Received: August 12, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014