

[20.1001.1.17354226.1400.16.2.4.9](https://doi.org/10.1001.1.17354226.1400.16.2.4.9)

Original article

Evaluation of the effect of gold nanostructure on the production of bio surfactants from *Pseudomonas aeruginosa*

Ahsani Arani Y¹, Noormohammadi Z², Rasekh B^{3*}, Yazdian F⁴, Kazemi H⁵

1. PhD Student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Director Environment & Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Analytical Chemistry Research Group, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), P.O. Box 14665-137, Tehran, Iran

*Corresponding Author: e-mail: rasekhb@ripi.ir, P.O. Box: 14665-137

Abstract

Raminolipids belong to the group of glycolipid bio surfactants and were first isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Rhamnolipids* are a good alternative to synthetic surfactants due to their low toxicity, biodegradability and selective performance. In this study, the effect of gold (Au) nanoparticles on the growth and production of *Pseudomonas aeruginosa* PBCC5 bio surfactant was evaluated. Different concentrations of 1, 500 and 1000 mg / l nanoparticles were used. In this study, bio surfactant surface tension and emulsification indices (24E) were measured. The presence of nanoparticles on the bacterial surface was investigated by TEM and the morphology of nanoparticles was investigated by SEM. Binding of nanoparticles to bio surfactants was confirmed by TEM. The results showed that gold nanoparticles were not bactericidal and also increased bacterial growth and bio surfactant production. The surface tension of all samples was reduced from 72 mN / m distilled water to 35-32 mN / m.

Keywords: Bio surfactant, Gold nanoparticles (Au), *Pseudomonas aeruginosa*

مقاله تحقیقی

ارزیابی اثر نانو ساختار طلا بر میزان تولید بیوسورفکتانت حاصل از باکتری سودوموناس آئروژینوزا

یاسر احسنی ارانی^۱، زهرا نورمحمدی^۲، بهنام راسخ^{۳*}، فاطمه یزدیان^۴، حجت کاظمی^۵

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. دانشیار پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران
۴. دانشیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵. استادیار گروه پژوهش شیمی تجزیه، پژوهشگاه صنعت نفت تهران، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: rasekhh@ripi.ir صندوق پستی: ۱۳۷-۱۴۶۶۵

محل انجام تحقیق: پژوهشگاه صنعت نفت تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴

چکیده

رامنولپیدها به گروه بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی متعلق هستند و اولین بار از باکتری سودوموناس آئروژینوزا جدا شدند. رامنولپیدها به دلیل سمیت پایین، زیست‌تخریب‌پذیری و عملکرد انتخابی، جایگزین مناسبی برای سورفکتانت‌های صنعتی هستند. در این مطالعه اثر نانوذرات طلا (Au) بر رشد و تولید بیوسورفکتانت سودوموناس آئروژینوزا $\Delta PBCC$ مورد ارزیابی قرار گرفت. از غلظت‌های مختلف ۱، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات استفاده گردید. در این تحقیق کشش سطحی بیوسورفکتانت و شاخص‌های امولسیون‌سازی (E_{۲۴}) اندازه‌گیری شد. وجود نانوذرات بر سطح باکتری توسط TEM و مورفولوژی نانوذرات توسط SEM بررسی گردید. اتصال نانوذرات به بیوسورفکتانت توسط TEM تأیید شد. نتایج نشان داد، نانوذرات طلا سمیت باکتریایی نداشتند، همچنین رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت را افزایش دادند. کشش سطحی همه نمونه‌ها از ۳۲-۳۵ mN/m به ۷۲ آب مقطر به ۳۲-۳۵ کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، نانوذرات طلا (Au)، سودوموناس آئروژینوزا

مقدمه

به سایر سطوح سلولی کمک می‌کنند. آنها در تنظیم حرکت باکتری‌ها و سنجش حدنصاب نقش دارند (۱). این ترکیبات پتانسیل استفاده در صنایع زیست پزشکی، دارویی، آرایشی و بهداشتی، صنایع غذایی، نفت و گاز را دارند، زیرا بسیار زیست تخریب‌پذیر بوده و سمیت کمی دارند (۲). تحقیق و

بیوسورفکتانت‌ها مولکول‌های فعال سطحی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها یا در سطح سلول یا خارج از سلول ترشح می‌شوند. آنها یک لایه نازک روی سطح میکرو ارگانیسم‌ها تشکیل می‌دهند و به جدا شدن یا اتصال آنها

نفت به روش میکروبی و حذف آلاینده‌های نفتی از محیط زیست و همچنین پاک‌سازی نفت‌کش‌ها و حمل و نقل و انتقال آسان‌تر نفت خام می‌باشد (۱۰). امروزه مطالعه روی تعامل نانوذرات با باکتری‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. گزارش‌های مختلف نشان داده‌اند نانوذرات می‌توانند رشد باکتری‌ها و تولید بیوسورفکتانت را بهبود بخشند. نانوذرات طلا (Au) سمیت بسیار کمی برای میکروارگانیسم‌ها دارند و در حسگرهای زیستی و سایر کاربردهای زیست پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱). نانوذرات فلزی روی رشد باکتری‌ها و تولید بیوسورفکتانت‌ها حائز اهمیت است. تحقیقات اخیر خواص آنتی باکتریال نانوذرات را نشان داده که علت آن تخریب فیزیکی دیواره سلولی، یا ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد (۱۲). کاربردهای فراوان بیوسورفکتانت‌ها در صنایع مختلف، آنها را به‌عنوان یکی از بیشترین ترکیبات مورد تقاضا در صنعت معرفی می‌کند. به صورت اجمالی در گزارشی عنوان شده است مصرف بیوسورفکتانت‌ها در صنعت نفت ۰.۳۳٪، صنعت آرایشی بهداشتی و شوینده‌ها ۰.۱۵٪، صنعت پزشکی به‌عنوان ضد میکروب ۰.۱۲٪ و صنعت محیط زیست به منظور حذف آلودگی‌های زیست محیطی ۰.۱۱٪ می‌باشد (۱۳). رضازاده و همکاران تولید بیوسورفکتانت زیستی توسط *Sodomonas*-*آئروژینوزا* با استفاده از نانوذرات آهن/نشاسته را بررسی کردند. در این مطالعه، نانوذرات آهن پوشیده با نشاسته هیچ سمیت باکتریایی را در ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان نداد و سرعت رشد و تولید بیوسورفکتانت تا ۶۲٪ افزایش داد (۱۴). در این مطالعه، اثر نانوذرات طلا بر رشد باکتری *Sodomonas آئروژینوزا* PBCC5 و تولید بیوسورفکتانت آن بررسی و فعالیت امولسیون‌سازی (E_{۲۴}) اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

همه معرف‌ها (متانول، اتانول، کلروفرم، محلول نمک بافر فسفات (PBS)، نوترین‌براث و HCl بدون خالص‌سازی استفاده شدند. نانوذرات طلا از شرکت مهندسی زیست تجهیز پارس تهران خریداری شد. نانوذرات با استفاده از اتانول استریل شده و با دور ۸۰۰۰ مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن، نانوذرات در شرایط استریل خشک شدند و در نهایت در

توسعه بیوسورفکتانت‌ها و تجاری‌سازی آنها، طی سال‌های گذشته شاهد شتاب چشمگیری بوده است (۳). فعالیت سطحی، بیوسورفکتانت‌ها را به امولسیون‌کنندگان عالی و کف‌زا تبدیل کرده است (۴). بیوسورفکتانت‌هایکی از فرآورده‌های مهم میکروبیولوژی صنعتی می‌باشند و توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها در فاز سکون^۱ تولید می‌شوند (۵). برخی ویژگی‌های شاخص بیوسورفکتانت‌ها که سبب برتری آنها در مقایسه با سورفکتانت‌های شیمیایی می‌شود شامل: کاهش کشش سطحی و بین سطحی، سمیت پایین، زیست‌تخریب‌پذیری بالا، امولسیون‌کنندگی، عملکرد انتخابی، فعالیت اختصاصی، امکان تولید از مواد خام ارزان قیمت، خواص ضد میکروبی، تولید آسان‌تر و تنوع بیشتر بیوسورفکتانت‌ها (۶). کاهش در اندازه کشش سطحی محیط کشت نشان‌دهنده تولید مواد دارای فعالیت سطحی توسط کشت‌های باکتریایی است (۷). عمده فعالیت بیوسورفکتانت‌ها صنایع نفت می‌باشد که به‌عنوان پاک‌سازی نفت و آلودگی‌زدایی ترکیبات آلی، افزایش دسترس پذیری زیستی این ترکیبات، جابه‌جایی و حذف آلودگی با حلال‌پذیری و امولسیون‌سازی در طول پاک‌سازی، حذف باقی‌مانده نفت از تانک‌های ذخیره‌ای، ازدیاد برداشت نفت و تصفیه زیستی خاک و آب می‌توانند استفاده شوند (۸). رامنولیپیدها از مهمترین بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی بوده که توسط دوگونه - باکتریایی *Sodomonas آئروژینوزا*^۲ و *Burkholderia آئروژینوزا*^۳ تولید می‌شوند (۹). گونه‌های متعلق به جنس *Sodomonas* بزرگترین مولدین رامنولیپید هستند. *Sodomonas* از مهمترین باکتری‌های خاک‌زی است که می‌تواند هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای را شکسته و رامنولیپید، کینولون، سینایدیدروژن و لکتین تولید کند. *Sodomonas آئروژینوزا* دو نوع مختلف رامنولیپید تولید کرده که در تعداد قند رامنوز متفاوت است. مونورامنولیپید و دی‌رامنولیپید جزء رامنولیپیدهای اصلی می‌باشند. این مولکول‌ها دارای فعالیت سطحی بسیار زیادی بوده و در زمینه‌های مختلف پزشکی به‌عنوان ضد قارچ، ضدباکتری و ضدویروس کاربرد دارند. کاربرد دیگر رامنولیپیدها در صنعت نفت به منظور افزایش بازیافت

¹ Stationary Phase

² *Pseudomonas aeruginosa*

³ *Burkholderia*

سلولی با ۱ تا ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ۳ بار شستشو داده شدند و روی فویل آلومینیومی خشک و وزن شده، ریخته شدند و رسوب سلول‌ها در دمای ۸۰ درجه‌سانتی‌گراد مدت ۱۲ ساعت در آون داغ کاملاً خشک شدند و توسط ترازوی دیجیتالی وزن گردید (۱۷ و ۱۸). اختلاف وزن بین فویل خالی و فویل پر، میزان بیومس در مقدار مشخصی از محیط کشت می‌باشد، وزن حاضر به صورت گرم برلیتر تبدیل و گزارش شد.

تست وزن خشک رامنولیپید

جهت اندازه‌گیری وزن خشک بیوسورفکتانت ابتدا نمونه‌گیری از محیط کشت صورت گرفت. با انجام سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm و مدت ۲۰ دقیقه سلول‌ها از محیط کشت جدا شده و پس از آن سوپ رویی را برداشته و درون فالتکون‌هایی تمیز، خشک و وزن شده ریخته و توسط اسید هیدروکلریدریک ۱ مولار تا pH ۲ اسیدی شده و یک شب درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در صبح روز بعد نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰ rpm در هر دقیقه و مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع شفاف رویی دور ریخته شد. سپس روی رسوبات حاصل (رامنولیپید) به نسبت ۱:۲ کلروفرم و متانول ریخته شد و در دمای محیط زیر هود نگهداری شد تا کاملاً خشک شده و وزن رامنولیپید حاصل توسط ترازو اندازه‌گیری شد (۱۷ و ۱۸).

برهمکنش نانوذرات و باکتری‌ها

غلظت نانوذرات مورد استفاده برای آزمایش‌های برهم‌کنش طلا برابر ۱، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. نانوذرات مدت ۳۰ دقیقه در بافر PBS فراصوت شدند و سپس به کشت باکتری اضافه شدند (۱۱). نمونه‌ها با یک نمونه شاهد (یک فلاسک حاوی سلول‌ها به علاوه محیط‌های بدون نانوذرات) مقایسه شدند.

تولید بیوسورفکتانت

مقدار بیوسورفکتانت با استخراج رامنولیپیدها از محیط کشت اندازه‌گیری شد. نمونه‌های کشت در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و ۴ درجه‌سانتی‌گراد مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سلول‌ها، همچنین نانوذرات حذف شوند. مایع رویی

بافر PBS معلق شدند و با حمام اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه پراکنده شدند. از بافر نمکی KH_2PO_4 pH 7.4، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.78 g/L، KCl 0.2 g/L، NaCl 8.01 g/L) استفاده شد. از بافر جهت ایجاد امولسیون پایدار نانوذرات استفاده گردید (۱۵).

میکروارگانیسم

میکروارگانیسم مورد استفاده *سودوموناس آئروژینوزا* PBCC5 (ایزوله و جداسازی توسط راسخ و همکاران سال ۲۰۰۸، از خاک آلوده به نفت خام ایران) از بانک ذخایر زیستی پژوهشکده صنعت نفت تهیه شد. خصوصیات این باکتری گرم‌منفی و میله‌ای با روش‌های تشخیصی و مشاهده میکروسکوپی با چشم‌غیرمسلح، پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در محیط نوترینت آگار، بررسی گردید.

تهیه منحنی رشد باکتری در محیط کشت ملاس

سودوموناس آئروژینوزا PBCC5 در نوترین‌براث استریل شده یک شبه (۱۶ ساعت) رشد داده شد. برای تهیه منحنی رشد باکتری، تلقیح میکروبی به محیط کشت ملاس ۱۵٪ (وزنی/حجمی) به‌عنوان محیط کشت اصلی برای رشد و تولید رامنولیپید صورت گرفت و در ۱۸۰ دور در دقیقه و ۳۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور مدت ۹۶ ساعت هم زده شد. هر ۲ ساعت در شرایط استریل ۲ میلی‌لیتر از محیط-کشت نمونه‌گیری و رشد باکتری براساس میزان تراکم سلولی توسط اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۲ و ۱۶). در این تحقیق، منحنی رشد نشان داد فاز تاخیری *سودوموناس آئروژینوزا* پس از ۶ تا ۸ ساعت رشد رد و فاز لگاریتمی آغاز شد. باکتری‌ها در فاز لگاریتمی به سرعت شروع به تکثیر و تولید متابولیت می‌کنند. فاز ثابت پس از ۲۰ تا ۲۲ ساعت از رشد باکتری‌ها شروع شد و بیوسورفکتانت در این مرحله تولید شدند (۱۵).

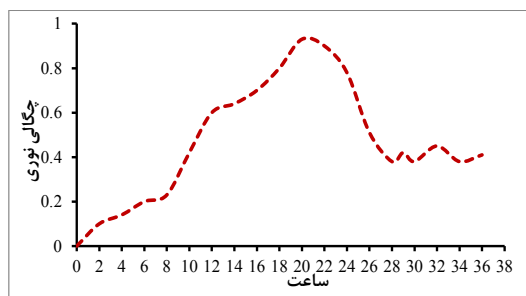
تست وزن توده خشک سلولی

رشد باکتری با وزن خشک زیست‌توده اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری وزن خشک توده سلولی ابتدا از محیط-کشت نمونه‌برداری و مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس رسوبات

نتایج

منحنی رشد باکتری

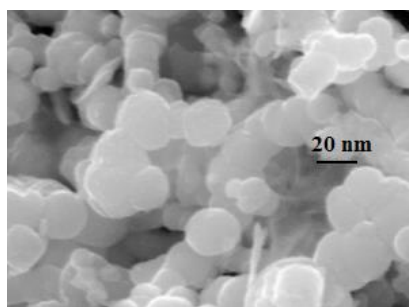
شکل ۱ منحنی رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا می-باشد. طبق این منحنی، باکتری در ۱۰ امین ساعت از رشد خود فاز Lag را پشت سر گذاشته و وارد فاز لگاریتمی می-شود و مرحله سکون باکتری در ۲۸ امین ساعت آغاز می-شود، تولید رامنولپید در این مرحله از رشد صورت می-گیرد.



شکل ۱- منحنی رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا PBCC5 در محیط کشت ملاس.

مورفولوژی نانوذرات طلا با باکتری

شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانوذرات طلا را نشان می-دهد، مطابق تصویر، نانوذرات کروی بوده و قطری حدود ۲۰ نانومتر دارند.



شکل ۲- تصویر SEM نانوذره طلا.

برای حصول اطمینان از قرار گرفتن نانوذره بر سطح باکتری تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام شد. شکل ۳ نشان‌دهنده قرار گرفتن نانوذرات روی سطح و غشاء باکتری می-باشد. مجاورت کردن نانوذرات طلا با باکتری در آغاز فاز رشد باکتری و در غلظت ۱ میلی-گرم برلیتر، انجام و نتایج با نمونه کنترل (بدون حضور نانوذره) مقایسه گردید.

با استفاده از رسوب اسیدی (HCl) ۱ مولار جدا شد و برای ته‌نشینی بهتر رامنولپیدها در یخچال ۴ درجه سانتیگراد یک شبه نگهداری شد، سپس با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصل با حلال‌های متانول و کلروفرم با نسبت حجمی ۱:۲ شسته شد، رسوبات شسته‌شده در روتاری خشک، سپس وزن شدند (۱۹).

فعالیت امولسیون سازی (E₂₄)

این تست جهت بررسی میزان پایداری و امولسیون-کندگی سوپ حاصل از باکتری پس از ۲۴ ساعت می-باشد. پس از نمونه‌گیری از محیط کشت و حذف سلول‌ها، حدود ۲ میلی‌لیتر نفت گاز به ۲ میلی‌لیتر مایع رویی با نسبت حجمی ۱:۱ اضافه شد. مخلوط با سرعت بالا مدت ۲ دقیقه گرداب شد (۲۰ و ۲۱). نمونه‌ها ۲۴ ساعت در حالت پایدار نگهداری شدند، شاخص‌های امولسیون (E₂₄) پس از ۲۴ ساعت توسط فرمول زیر محاسبه گردید (۲۲ و ۲۳).

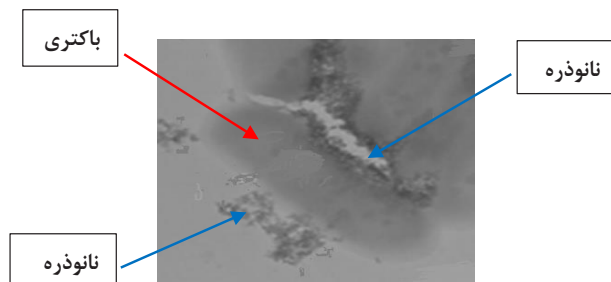
$$E_{24} = \frac{\text{ارتفاع بخش امولسیون شده}}{\text{ارتفاع کل}} \times 100$$

تست کشش سطحی

محیط‌های کشت در روز چهارم (۹۶ ساعت) با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سلول‌ها خارج شوند، سپس میزان کشش سطحی سوپ رویی توسط دستگاه کشش سطحی KRUESS KLO K9 سنجیده شد. یک بیوسورفکتانت کارآمد می‌تواند کشش سطحی آب را از ۷۲ به ۳۵ mN/m کاهش دهد (۲۴).

مطالعه میکروسکوپی

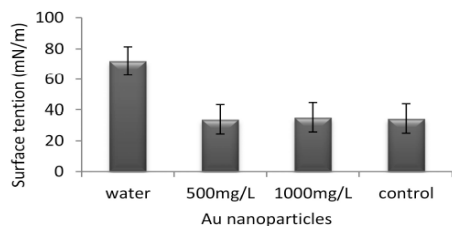
حدود ۱ میلی‌لیتر از کشت با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سلول‌های ته‌نشین شده در بافر PBS معلق شدند. برای حصول اطمینان از قرار گرفتن نانوذرات بر سطح باکتری و بررسی مورفولوژی سطح، تصویربرداری به کمک TEM و SEM KYKY_EM3200 (model) انجام شد. پس از ۱۲ ساعت (فاز ورود) تلقیح باکتری‌ها و نانوذرات مشاهده شد (۱۱).



شکل ۳- تصویر TEM باکتری همراه نانوذره طلا، فلش قرمز نشان‌دهنده باکتری و فلش آبی نانوذره را نشان می‌دهد.

کشش سطحی

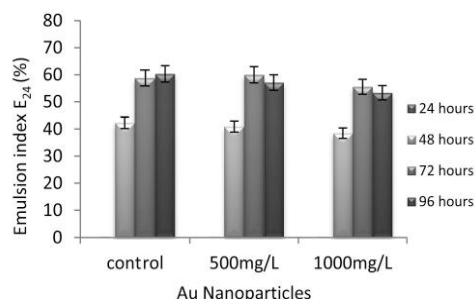
کشش سطحی همه نمونه‌ها پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد تمامی نمونه‌ها کشش سطحی آب مقطر را از ۷۲ به ۳۵-۳۲ mN/m کاهش دادند. با مقایسه نتایج حاصل از تست کشش سطحی در روز چهارم (۹۶ ساعت)، تغییری در میزان کشش سطحی رامنولیپید تولید شده در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذره در مقایسه با نمونه کنترل، مشاهده نشد. این امر نشان‌دهنده بی‌تأثیر بودن نانوذرات طلا در غلظت‌های مختلف بر میزان کشش سطحی رامنولیپید می‌باشد. به عبارتی تمامی رامنولیپیدهای تولید شده در مجاورت غلظت‌های مختلف این نانوذره همانند نمونه کنترل (فاقد نانوذره) سبب کاهش کشش سطحی آب از ۷۲ به ۳۵-۳۲ mN/m شده‌اند (نمودار ۲). نتایج نشان داد نانوذرات طلا در غلظت‌های مختلف تأثیر منفی بر کشش سطحی ندارد، زیرا مقدار بیوسورفکتانت تولید شده به غلظت بحرانی میسر رسیده بود. این نتایج از نظر خلوص قابل قبول بوده و توسط EL-Shishtawy و همکاران بیان شد که یک بیوسورفکتانت خوب می‌تواند کشش سطحی آب را از ۷۲ تا ۳۵ mN/m کاهش دهد (۲۴). همچنین، گزارش دادند بیوسورفکتانت تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا ATCC-10145 کشش سطحی را از ۷۲ آب مقطر به ۳۲ کاهش داد.



نمودار ۲- اثر غلظت نانوذرات طلا بر کشش سطحی بیوسورفکتانت پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون

تست شاخص امولسیون‌کنندگی (E_{24})

این تست برای تثبیت بیوسورفکتانت پس از ۲۴ ساعت استفاده شد. در این مطالعه با ۲ روش مختلف قابلیت تولید رامنولیپید توسط سودوموناس آئروژینوزا در غلظت‌های مختلف نانوذرات بررسی گردید. در تست امولسیون‌کنندگی و کشش سطحی تمامی رامنولیپیدهای تولید شده در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذرات قابلیت امولسیون‌کنندگی و کاهش کشش سطحی خود را حفظ نمودند که نشان از عدم تأثیر نانوذرات در غلظت‌های مختلف بر این دو ویژگی می‌باشد. با بررسی تست امولسیون‌کنندگی بیوسورفکتانت تولید شده در مجاورت نانوذرات مشخص شد در ۲۴ ساعت اول در هیچ یک از نمونه‌های موجود تولید رامنولیپید صورت نگرفته است، در نتایج تست E_{24} روزهای دوم، سوم و چهارم نیز هیچ‌یک از غلظت‌های نانوذرات بر شاخص‌های امولسیونی تأثیر گذار نبودند (نمودار ۱). در پژوهش‌های پیشین تست E_{24} اغلب جهت تعیین میزان توانایی بیوسورفکتانت در امولسیون‌کنندگی استفاده شد و جهت تعیین بیوسورفکتانت تولیدی، تست تعیین وزن خشک بیوسورفکتانت آزمایش شد (۲۲ و ۲۳).



نمودار ۱: نتایج تست E_{24} رامنولیپید تولید شده در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذره طلا

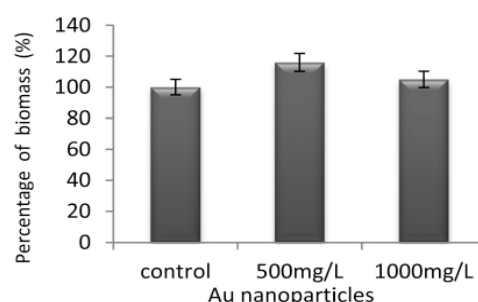
این نتایج مطابق با مشاهداتی بود که توسط لیو و همکاران روی باکتری *Serratia* انجام شد. آنها گزارش دادند نانوذرات Au/Fe سمیت کمتری در مقایسه با نانوذرات آهن روی *Serratia* نشان می‌دهد. حدود ۱ میلی‌گرم در لیتر آهن برای *Serratia* مضر نبود، درحالی که غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر آهن منجر به کاهش شدید تراکم باکتری شد. این می‌تواند به دلیل تعامل حداقل در غلظت‌های کمتر نانوذرات با باکتری‌ها باشد (۱۵ و ۱۱). مطابق شکل‌های ۳ و ۴، نانوذرات طلا بر رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت در ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تأثیری نداشت، که مشابه مطالعه لیو و همکاران (۱۵) و Chatterjee و همکاران بود (۱۲). نانوذرات طلا سمیت بیولوژیکی بسیار کم دارند که احتمالاً به دلیل واکنش‌پذیری پایین این نانوذرات بوده و به‌طور گسترده در کاربردهای بیولوژیکی استفاده می‌شوند (۱۱ و ۱۲).

بحث

امروزه تحقیقات متعدد در زمینه مطالعه اثرات نانوذرات فلزی روی رشد باکتری‌ها و تولید بیوسورفکتانت‌ها در زمینه‌های مختلف صنعتی انجام گرفته است. اثر نانوذرات مختلفی چون Fe/Au, Fe₃O₄, Fe, Au, مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج مطالعه علمدار و همکاران نشان داد، در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات Fe/SDS، رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت به ترتیب ۲۳/۲۱٪ و ۲۰/۷۳٪ افزایش می‌یابد (۲۵). صاحب‌نظر و همکاران به منظور افزایش رشد سودوموناس آئروژینوزا و افزایش تولید رامنولپید از نانوذرات آهن-سیلیکا در محیط کشت ملاس استفاده کردند. نتایج نشان داد بیشترین رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت در حضور ۱۵٪ ملاس و بدون نمک می‌باشد (۱۶). در تحقیق حاضر تصویر TEM نانوذره طلا، نشان‌دهنده قرار گرفتن نانوذرات روی سطح و غشاء باکتری می‌باشد و احتمالاً نانوذره در غلظت‌های مختلف از طریق افزایش سطح باکتری سبب افزایش تبادلات موادغذایی باکتری با محیط کشت شده و در نتیجه میزان رشد و تولید بیوسورفکتانت افزایش یافته است، گرچه در

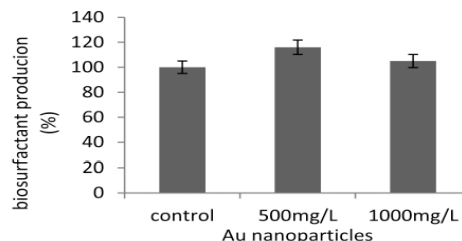
اثر نانوذرات بر تولید زیست توده و بیوسورفکتانت

رشد سلول‌های باکتریایی توسط زیست توده پس از ۹۶ ساعت آنکوباسیون همزمان با نانوذرات نشان داده شد. طبق نتایج، غلظت نانوذرات اثرات متفاوت بر رشد باکتری‌ها داشت. نانوذرات طلا رشد سلولی را در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۱۶٪ و ۵٪ افزایش دادند. احتمالاً این غلظت می‌تواند تغذیه محیط را برای فعال کردن باکتری‌ها افزایش دهد (نمودار ۳).



نمودار ۳- تاثیر نانوذرات طلا بر تولید زیست توده و رشد باکتری پس از ۹۶ ساعت

تولید بیوسورفکتانت پس از ۹۶ ساعت آنکوباسیون همزمان با نانوذرات در محیط تخمیر باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. مطابق نمودار ۴، تولید بیوسورفکتانت در حضور ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات طلا نسبت به نمونه شاهد ۱۴.۶۳٪ و ۴.۸۷٪ افزایش یافت. این ممکن است به دلیل سمیت کم نانوذرات طلا حتی در غلظت‌های بالا باشد. نکته مهم این است که با افزایش غلظت نانوذرات طلا از ۵۰۰ به ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، افزایش رشد سلولی و تولید بیوسورفکتانت کمتر بوده که نشان می‌دهد در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، نانوذرات طلا بر رشد سلول اثر منفی می‌گذارد.



نمودار ۴- تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری پس از ۴ روز قرار گرفتن در معرض مقادیر مختلف نانوذرات طلا

شد. نتایج حاصل نشان داد نانوذرات طلا بر رشد و تولید بیوسورفکتانت در غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر تأثیری نداشتند. در تست امولسیون‌کنندگی و کشش‌سطحی تمام رامنولپیدهای تولیدشده در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذرات قابلیت امولسیون‌کنندگی و کاهش کشش-سطحی خود را حفظ نمودند که نشان‌دهنده عدم تأثیر نانوذرات در غلظت‌های مختلف بر این دو ویژگی می‌باشد.

شواهد تجربی نشان داد نانوذرات طلا نه تنها هیچ سمیتی برای رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت نداشتند، بلکه رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت را نیز تسریع کردند. این یافته‌ها ثابت کرد نانوذرات می‌توانند محیط تغذیه‌ای را تقویت کنند که باعث تحریک باکتری‌ها و همچنین آسیب رساندن به غشای سلولی در غلظت‌های بالا می‌شود. گرچه ممکن است نانوذرات بر عملکرد سلول‌ها یا سطح پروتئین‌ها و ژن‌ها موثر باشند، با این حال، هنوز کشف نشده است.

غلظت‌های بالاتر اثرات سمی و منفی بر میزان رشد سلول‌ها و تولید بیوسورفکتانت داشته است. هدف از این تحقیق بررسی بررسی شرایط بهینه تولید رامنولپید و مطالعه ویژگی‌های رامنولپید تولیدی جهت به‌کارگیری در صنایع نفتی به منظور ایجاد امولسیون‌های پایدار بود. ابتدا رشد باکتری در محیط کشت ملاس انجام گرفت. سپس نانوذرات طلا با غلظت‌های متفاوت به محیط کشت باکتری اضافه شدند و با تست‌های مربوطه میزان تولید رامنولپید ارزیابی

نتیجه‌گیری

امروزه اثرات منفی سورفکتانت‌های شیمیایی در صنایع به ویژه در صنعت محیط زیست به اثبات رسیده است. استفاده از بیوسورفکتانت‌ها به‌عنوان جایگزین مناسب برای سورفکتانت‌های شیمیایی در صنایع مختلف حائز اهمیت است. انتظار می‌رود انجمن بیوتکنولوژی برچالش‌های تولید بیوسورفکتانت در مقیاس صنعتی غلبه کند. در این تحقیق، اثرات نانوذرات طلا بر رشد سودوموناس آئروژینوزا *PBCC5* و تولید بیوسورفکتانت بررسی شد. نانوذرات براساس غلظت، بر رشد سودوموناس آئروژینوزا و تولید رامنولپیدها بررسی گردیدند.

تقدیر و تشکر

از خانم دکتر سپیده خالقی و آقای محمد فاضل فروغیان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Sharma J, Sundar D, Srivastava P. Bio surfactants: Potential Agents for Controlling Cellular Communication, Motility, and Antagonism, *Front. Mol. Bio sci* 2021; 8:727070. doi: 10.3389/fmolb.2021.727070.
- Naughton P.J, Marchant R, Naughton V, Banat I.M. Microbial bio surfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries, *J Applied Microbiol* 2019; 127: 12-28.
- Henkel, M., Hausmann R., 2019. Chapter 2- Diversity and Classification of Microbial Surfactants, *Biobased Surfactants* (Second Edition), Synthesis, Properties, and Applications 41-63.
- Nayariseri, A., Singh, P. and Singh, SK., 2018. Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinforma* 14(6): 304-314.
- Khajavi-Shojaei, S.h., Moezzi, A.A., Enayatizamir, N., 2016. Investigation of biosurfactant production by *Bacillus pumilus* 1529 *Bacillus subtilis* WPI. *Biol J Micro Org* 5(17): 97-110.
- Bagheri Lotfaabad, T., Shahceraghi, F., shooraj, F., 2013. Assessment of Antibacterial Capability

- of Rhamnolipids Produced by Two Indigenous *Pseudomonas Aeruginosa* Strains. Jundishapur J Microbiol 6 (1): 29-35.
7. Liu, F., Liua, D., Zhou, W., Wang, S., Chen, F., Wei, J., 2020. Weakening or losing of surfactant drag reduction ability: A coarse-grained molecular dynamics study. Chem Eng Sci 219 : 115610.
 8. Kardena, E., Helmy, Q., Funamizu, N., 2014. Bio surfactants and Soil Bioremediation. In: N. Kosaric, F. Vardar-Sukan & Sukan, eds. Bio surfactants Production and Utilization-Processes, Technologies, and Economics CRC Press New York 327-360.
 9. Fracchia, L., Cavallo, M., Martinotti, M., Banat, IM., 2012. Bio surfactants and Bio Emulsifiers Biomedical and Related Applications-Present Status and Future Potentials. In: Ghista DN. Biomedical Science, Eng Technol. Norderstedt: Books on Demand 325-370.
 10. Kask, B., Yildiz, S., Gumustas, M., Ozkan, SA., 2015. Bio surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* in kefir and fish meal. Braz J Microbiol 46(3): 855-859.
 11. Lia, J., Vipulanandan, C., 2013. Effects of Au/Fe and Fe nanoparticles on *Serratia* bacterial growth and production of bio surfactant. Mater Sci Eng 33: 1-28.
 12. Chatterjee, S., Bandyopadhyay, A., Sarkar K., 2011. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. J Nano biotechnol 9 (34): 1-7.
 13. Reis, R.S., Pacheco, G.J., Pereira, A.G., Freire, D.M.G., 2013. Bio surfactants: Production and Applications. Biodegradation - Life of Science. DOI: 10.5772/56144.
 14. Rezazadeh Mofradnia, S., Tavakoli, Z., Yazdian, F., Rashedi, H., Rasekh, B., 2018. Fe/starch nanoparticle-*Pseudomonas aeruginosa*: Bio-physiochemical and MD studies. In J Biol Macromol 117: 51-61.
 15. Liu, J., Vipulanandan, C., Cooper, T.F., Vipulanandan, G., 2013. Effects of Fe nanoparticles on bacterial growth and biosurfactant production. J Nanopart Res. 15 (1405): 1-13.
 16. Sahebnazar, Z., Mowla, D., Karimi, Gh., 2018. Enhancement of *Pseudomonas Aeruginosa* Growth and Rhamnolipid Production Using Iron-Silica Nanoparticles in Low-Cost Medium. J Nanostruct 8(1): 1-10.
 17. Rikalovic, MG., Cvijovic, G.G., Vrvic, M.M., Karadzic, I., 2012. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. J Serbian chem societ. 77(1): 27-42.
 18. Gomathy, C., Senthilkumar, R., 2013. Production of Rhamnolipid bio surfactant from a marine *Pseudomonas aeruginosa*. Inter J Res Environmen Sci Technol. 3(3): 86-91.
 19. Bagheri Lofabad, T., Partovi, M., Bahmaei, M., 2013. Rhamnolipid bio surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 using vegetable oil refinery wastes. New Cell Mol Biotechnol J Res. 2 (9): 91-109.
 20. Kiran, G., Nishanth, L., Priyadharshini, S., et al., 2014. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid bio surfactant production under solid state culture by marine *Nocardioopsis* sp. MSA13A BMC. Biotechnol Res. 14(48): 1-10.
 21. Bendaha, M., Mebrek, S., Naimi, M., et al., 2012. Isolation and comparison of rhamnolipids production in *Pseudomonas aeruginosa* P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V:10. Sci Rep Res. 1 (12): 1-7.
 22. EL-Amine Bendaha, M., Mebrek, S., Naimi, M., Tifrit, A., Belaouni, H.A., Abbouni, B., 2012. Isolation and Comparison of Rhamnolipids Production in *Pseudomonas aeruginosa* P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V:10. Scient Rep.
 23. Bhawsar, N., Singh, M., 2014. Isolation and Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from Waste Soybean Oil as Bio Surfactants Which Enhances Biodegradation of Industrial Waste with Special Reference to Kosmi Dam, Betul District. Inter J Adv Res. 2(6): 778-783.
 24. El-Sheshtawy, H.S., Doheim, M., 2014. Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for bio surfactant production and studies of its antimicrobial activity. Egypt J Pet Res DOI: 10.1016/j.ejpe.2014.02.001.
 25. Alamdar, N., Rasekh, B., Yazdian F., 2018. Effects of Fe/SDS and Au nanoparticles on *P. aeruginosa* bacterial growth and bio-surfactant production. IET Nano biotech 12(4):520-525.
 26. Seyedinkhorasani, M., Keramati, M., Ahangari Cohan, R., Roohvand, F., Norouzian, Dm., 2020. Evaluation and comparison of affinity chromatography and precipitation-based methods on purification of recombinant streptokinase. Med Sci J Islamic Azad Uni, Tehran Med Branch 30(4): 387 -395.
 27. Towbin, H., staehelin, T., Gordon, J., 1979. electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 76 (9), 4350-5354.