



## Screening and molecular identification of actinomycetes producing biosurfactant with properties Antimicrobial and biofilm inhibition against pathogenic bacteria

Seyed Soheil Aghaei

Associate Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran  
(Corresponding author), [soheilaghaee@yahoo.com](mailto:soheilaghaee@yahoo.com)

Fatemeh Talebi Darabi

MSc, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.  
[fatemeh.td623@gmail.com](mailto:fatemeh.td623@gmail.com)

Seyed Ali Rezaei

Instructor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran  
[sarezaie2000@gmail.com](mailto:sarezaie2000@gmail.com)

### Abstract

**Purpose:** The purpose of the present study was to isolate and identify molecularly native actinobacteria that produce biosurfactant with antimicrobial and anti-biofilm activity against some pathogenic bacteria.

**Materials and methods:** initial screening was done based on oil dispersion test and the best isolate was selected. Ethyl acetate solvent was used for extraction. Antimicrobial and anti-biofilm properties were evaluated using the well diffusion method in agar and 96-well microplate, respectively. FTIR and GC-MS techniques were used for biosurfactant analysis. Finally, the superior isolate was identified using the molecular PCR method.

**Findings:** Biosurfactant of the superior isolate showed the highest and lowest antimicrobial effect at concentrations of 0.4 and 0.3 mg/ml against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, respectively. The highest and lowest anti-biofilm effects against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria were observed at concentrations of 2 mg/ml. Structural analysis of biosurfactant with FTIR and GC-MS confirmed the structure of amino acid ring with chain of fatty acids and lipopeptide type. The selected isolate was 95% similar to *Streptomyces* genus and B1AY species.

**Conclusion:** The local isolate of *Streptomyces* has a remarkable ability to produce biosurfactant with antimicrobial and anti-biofilm effects against pathogenic bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and can be used in the field of pharmaceutical biotechnology.

**Keywords:** antimicrobial, anti-biofilm, actinomycetes, biosurfactant, pathogenic bacteria.

Received: 2023/06/22 ; Revised: 2023/08/06 ; Accepted: 2023/09/12 ; Published online: 2023/09/20

Cite: Aghaei, S.S., Talebi Darabi, F. & Rezaei, S.A. (2023). Screening and molecular identification of actinomycetes producing biosurfactant with properties Antimicrobial and biofilm inhibition against pathogenic bacteria. *Applied Biology*, 13(3), p. 87-105.

Article type: Research Article

© the authors




Publisher: Qom Islamic Azad University





## غربالگری و شناسایی مولکولی آکتینومیسیت‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت با خواص ضد میکروبی و مهار بیوفیلم بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا

دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران (نویسنده مسئول): soheilghaee@yahoo.com  
کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران: fatemeh.td623@gmail.com  
مربی، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران: sarezaie2000@gmail.com

سید سهیل آقایی   
فاطمه طالبی دارابی   
سید علی رضایی 

### چکیده

**هدف:** هدف پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی مولکولی آکتینوباکتری‌های بومی تولیدکننده بیوسورفکتانت دارای فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلم بر علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زا بود.  
**مواد و روش‌ها:** غربالگری اولیه براساس تست پراکندگی نفت انجام شده و برترین جدایه انتخاب گردید. حلال اتیل استات برای استخراج استفاده شد. خصوصیات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی به ترتیب با استفاده از روش انتشار چاهک در آگار و میکروپلیت ۹۶ چاهکی ارزیابی شد. برای آنالیز بیوسورفکتانت از تکنیک‌های FTIR و GC-MS استفاده شد. نهایتاً جدایه برتر با استفاده از روش مولکولی PCR شناسایی گردید.  
**یافته‌ها:** بیوسورفکتانت جدایه برتر بیشترین و کمترین اثر ضد میکروبی را در تراکم‌های ۰/۴ و ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به ترتیب بر علیه باکتری‌های سودوموناس اثرزینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند. بیشترین کم‌ترین اثر ضد بیوفیلمی بر علیه باکتری‌های اشرشیاکلی و سودوموناس اثرزینوزا در تراکم‌های ۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر مشاهده شد. آنالیز ساختاری بیوسورفکتانت با FTIR و GC-MS ساختار حلقه آمینو اسیدی با زنجیره‌ای از اسیدهای چرب و از نوع لیپوپپتید را تایید کرد. جدایه منتخب به جنس استرپتومایسس و گونه B1AY با ۹۵ درصد تشابه داشت.

**نتیجه‌گیری:** جدایه بومی استرپتومیسیت توانایی قابل ملاحظه‌ای در تولید بیوسورفکتانت با اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا از جمله سودوموناس اثرزینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی داشته و می‌تواند در زمینه بیوتکنولوژی دارویی استفاده شود.

**کلیدواژه‌ها:** ضد میکروبی، ضد بیوفیلم، آکتینومیسیت‌ها، بیوسورفکتانت، باکتری‌های بیماری‌زا.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۵/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۱؛ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹  
استاد به این مقاله: آقایی، سید سهیل؛ طالبی دارابی، فاطمه؛ رضایی، سید علی (۱۴۰۲). غربالگری و شناسایی مولکولی آکتینومیسیت‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت با خواص ضد میکروبی و مهار بیوفیلم بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا. *بیولوژی کاربردی*، ۱۳(۳)، ص ۸۷-۱۰۵.

نوع مقاله: پژوهشی

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه قم



## ۱. مقدمه

یکی از مهم‌ترین سازگاری‌هایی که میکروارگانیسم‌ها برای زیستن در خود ایجاد کرده‌اند، تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. یکی از متابولیت‌های ثانویه‌ای که امروزه از اهمیت بالایی برخوردار است، سورفکتانت‌ها می‌باشند. سورفکتانت‌هایی که منشاء بیولوژیکی دارند، توسط میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها) تولید می‌شوند که به عنوان بیوسورفکتانت شناخته می‌شوند (۱). بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها، فعالیت ضد میکروبی، ضد چسبندگی و ضد بیوفیلمی را در برابر چندین میکروارگانیسم دیگر به نمایش گذاشته‌اند (۲). در میان فعالیت‌هایی که توسط بیوسورفکتانت‌ها انجام می‌شود، فعالیت ضد میکروبی، ضد چسبندگی و ضد بیوفیلمی آنها امروزه به خصوص در صنایع پزشکی و داروسازی حائز اهمیت است (۳). بیوفیلیم‌های باکتریایی، مجموعه‌های پیچیده‌ای از باکتری‌های متصل به سطح هستند که توسط ماتریکس‌های پلیمری خود تولید شده، که عمدتاً از پلی ساکاریدها، پروتئین‌های ترشح شده و DNAهای خارج سلولی تشکیل شده‌اند. از عملکردهای ماتریکس می‌توان به سد نفوذی اشاره کرد که مانع از ورود ترکیبات سمی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدعفونی به درون بیوفیلیم شده و در نتیجه از سلول‌ها محافظت می‌کند (۴). تشکیل بیوفیلیم گاهی اوقات مضراتی را به دنبال دارد. به عنوان مثال، در صنایع غذایی، باکتری‌های بیماری‌زا قادر به تشکیل بیوفیلیم در داخل تأسیسات فرآوری هستند که منجر به فساد مواد غذایی می‌شود و سلامت مصرف‌کننده را به خطر می‌اندازد (۵). در محیط‌های بیمارستانی، نشان داده شده است که بیوفیلیم‌ها روی سطوح تجهیزات پزشکی و روی بافت‌های بیمار باقی می‌مانند و باعث عفونت‌های مداوم می‌شوند (۶). ارگانیسم‌های مرتبط با بیوفیلیم، بیش از ۶۵ درصد از تمام عفونت‌های میکروبی را تشکیل داده و مقاومت بالایی در برابر عوامل ضد میکروبی و سیستم دفاعی میزبان نشان می‌دهند (۷). با توجه به تأثیر جدی بیوفیلیم بر سلامت انسان و سایر جنبه‌ها، محققان و مردم مدت‌هاست که بر پیشگیری و کنترل بیوفیلیم‌های مضر تمرکز کرده‌اند.

در بین میکروارگانیسم‌های موجود، آکتینوباکتری‌ها به دلیل تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه با ویژگی‌های ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی، نقش بسیار مهمی در تولید داروهای ایفا می‌کنند. یکی از این متابولیت‌های ثانویه، بیوسورفکتانت‌ها می‌باشند. این ترکیبات با استفاده از مکانیسم‌های خاص خود و هدف قرار دادن قسمت‌های مختلف ساختار بیوفیلیم، قادر به شکست و از بین بردن آن می‌باشند. که در نتیجه این شکست، نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد میکروبی به درون بیوفیلیم بوده و مرگ باکتری‌های محصور شده را به دنبال دارد و می‌تواند عفونت ایجاد شده را درمان نماید (۸).

آکتینوباکتری‌ها، باکتری‌های گرم مثبتی هستند که در DNA خود دارای مقادیر زیادی از گوانین و سیتوزین می‌باشند. حدود ۸۰ درصد از آنتی‌بیوتیک‌های جهان توسط آکتینوباکتری‌ها به ویژه گونه *استرپتومایسس* تولید شده‌اند. استرپتومیسیت‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت با خاصیت ضد میکروبی، ضد چسبندگی و ضد بیوفیلمی می‌توانند در خاک‌های مناطق مختلف حضور داشته باشند (۹). تاکنون در ایران در مورد شناسایی و جداسازی آکتینوباکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت با خاصیت ضد میکروبی، ضد چسبندگی و ضد بیوفیلمی تحقیق خاصی انجام نشده است، بنابراین، شناسایی و تعیین ویژگی‌های بیوسورفکتانت در سویه‌های بومی ایران، به خصوص در آکتینوباکتری‌ها پژوهش جدید و تازه‌ای محسوب می‌شود. بنابراین، انجام این تحقیق به شناسایی هرچه بهتر این سویه‌ها و استفاده مفید از بیوسورفکتانت تولید شده توسط آنها در صنایع پزشکی و زیستی کمک می‌کند.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲-۱. تهیه نمونه

ابتدا نمونه‌ها از عمق ۵ سانتیمتری خاک مناطق ریزوسفری اطراف ریشه گیاهان دارویی جمع‌آوری شد و پس از ترکیب شدن با  $\text{CaCO}_3$  درون کاغذ و پلاستیک استریل قرار داده شد و به آزمایشگاه انتقال یافت (۱۰). در این بخش، حدود ۵ نمونه خاک از مناطق مختلف جمع‌آوری گردید.

### ۲-۲. غربالگری و جداسازی اولیه

از هریک از نمونه‌های خاک به میزان یک گرم به ارلن حاوی آب مقطر و توئین ۸۰ اضافه شد و در دمای اتاق با دور ۲۰۰ rpm به مدت یک ساعت درون انکوباتور شیکردار قرار گرفت. سپس از مایه رویی تهیه رقت انجام شد. بعد از تهیه رقت، سریال یک میلی‌لیتر از هر کدام از لول‌ها به روش پورپلیت در محیط کشت آکتینومیسیت آیزولیشن آگار کشت داده شد. سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷-۱۵ روز درون انکوباتور گرماگذاری شدند (۱۱).

### ۲-۳. شناسایی اولیه کلنی‌های آکتینومیسیت

**خصوصیات ماکروسکوپی:** کلونی آکتینومیسیت‌ها، مخروطی شکل با حالت پودری و خشک بر روی محیط کشت که با میسلیوم‌های هوایی پوشانده شده است. پیگمان‌ها به رنگ‌های سفید، طوسی، و ارغوانی بر روی سطح محیط و یا بر روی میسلیوم‌ها مشاهده شدند (۱۲).  
**خصوصیات میکروسکوپی:** از کلونی‌ها رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و باکتری‌های گرم مثبت به

همراه میسیلیوم و کندی‌ها در زیر میکروسکوپ مشاهده گردیدند (۱۲).

#### ۴-۲. خالص‌سازی و نگهداری

برای خالص‌سازی و نگهداری، کلونی‌های آکتینومیست به روش کشت خطی، بر روی محیط‌های اینترنشنال استرپتومیست پروجکت (ISP)، استارچ کازئین آگار (SCA) و آکتینومیست آیزولیشن کشت داده شده و برای مطالعات بعدی نگهداری شدند.

#### ۲-۵. شناسایی جدایه‌ها در حد جنس

تست‌های بیوشیمیایی: در این مرحله تست‌های بیوشیمیایی و افتراقی مطابق با آخرین چاپ کتاب برجی بر روی کلنی‌های خالص جدایه‌های مرحله قبل انجام شد (۱۲).

**شناسایی مولکولی جدایه‌ها:** بعد از جداسازی نمونه مورد نظر، برای انجام تست مولکولی، این نمونه‌ها ابتدا کشت داده شدند. DNA با استفاده از کیت تخلیص DNP (شرکت سیناکلون-ایران) براساس دستورالعمل کیت استخراج گردید. انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش 2X، ۱ میکرولیتر از جفت پرایمرهای 16srRNA (1492R: 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3' و 27F: 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3')، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۵ میکرولیتر از DNA استفاده شد. باند تشکیل شده جهت تشخیص این ژن بر روی ژل آگاروز، bp ۱۵۲۰ می‌باشد.

**برنامه دمایی:** ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه به مدت ۳۵ ثانیه، ۵۷ درجه به مدت ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR بایستی قطعه‌ای به طول ۱۴۹۸ جفت باز بود و در ادامه نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد ران شدند. پس از اتمام واکنش، نمونه‌ها در حجم ۱۰ میکولیتتر و حداقل غلظت ۳۰ نانوگرم برای تعیین توالی ارسال گردیدند. نتایج با نرم‌افزار finch TV نسخه ۱/۴/۰ مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۱۰ دندروگرام فیلوژنتیک به روش neighbor-joining براساس مدل تعداد اختلاف نوکلئوتیدی ترسیم گردید و ایزوله‌های مشابه در یک کلاستر قرار گرفتند (۱۳).

#### ۲-۶. ارزیابی اولیه تولید بیوسورفکتانت در جدایه‌ها

در این مرحله با انجام تست پراکندگی نفت خام، توانایی تولید بیوسورفکتانت در جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و جدایه با بیشترین میزان تولید برای مطالعات بعدی انتخاب گردید (۱۴).

**پراکندگی نفت خام:** در این تست سوپرناتانت کشت مورد استفاده قرار گرفت. ۲۰ میکرولیتر از نفت خام به ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک پلیت اضافه گردید. ۱۰ میکرولیتر سوپرناتانت به

سطح آبی که با روغن پوشانده شده، اضافه شد. ایجاد هاله شفاف و کنار زدن نفت خام بیانگر تولید بیوسورفکتانت بوده و قطر هاله اندازه‌گیری شد (۱۴).

## ۲-۷. استخراج بیوسورفکتانت از جدایه منتخب

با استفاده از روش حلال اتیل استات، بیوسورفکتانت از جدایه منتخب استخراج گردید (۱۴).  
**استفاده از حلال اتیل استات:** ابتدا سویه مورد نظر در یک ارلن حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط براث LB کشت داده شد و به مدت ۶ شبانه‌روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، گرم‌گذاری گردید، سپس محتویات ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۲۰۰۰ rpm با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ گردید، سلول‌های باکتریایی کاملاً ته‌نشین شدند، سپس pH سوپرناتانت بدست آمده با اسید کلریک ۱ نرمال، به ۲ رسید و به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا بیوسورفکتانت رسوب کند. سپس به حجم برابر اتیل استات اضافه شد و به مدت سه ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در گام بعدی، محتویات ارلن به قیف دکانتور انتقال داده شد، تا فاز آلی و آبی از هم جدا شدند. بیوسورفکتانت درون فاز آلی (اتیل استات) قرار دارد، سپس فاز آلی جدا شد و به بالن دستگاه روتاری، انتقال داده شد. حلال تبخیر شده و رسوب باقیمانده به داخل پلیت شیشه‌ای منتقل شد، باقیمانده حلال در زیر هود شیمیایی تبخیر گردید و رسوب بدست آمده خشک شد. رسوب حاصل به رنگ قهوه‌ای و قوام‌دار مشاهده شد (۱۴).

## ۲-۸. تعیین ویژگی‌ها و خصوصیات بیوسورفکتانت تولید شده در جدایه منتخب

**طیف‌سنجی مادون قرمز FTIR:** تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی برای تعیین ساختار شیمیایی و اجزای بیوسورفکتانت استخراج شده انجام شد. نمونه‌ها با پراکندگی اختصاصی ۱ میلی‌گرم بیوسورفکتانت تهیه و سپس طیف جذب IR در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ سانتیمتر به دست آمد (۱۵).  
**کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی GC-MS:** در این روش از ترکیب کروماتوگرافی گازی و خواص طیف‌سنج جرمی برای بررسی ترکیبات آلی موجود در نمونه استفاده شد (۱۵).

## ۲-۹. تعیین اثرات ضد میکروبی بیوسورفکتانت منتخب

*اشرشیا کلی* ATCC 25922، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *سودوموناس انروژیوزا* ATCC 27853 جهت اطمینان بیشتر و تایید بهتر نتایج، با استفاده از دو روش زیر خاصیت ضد میکروبی بیوسورفکتانت منتخب مورد بررسی قرار گرفت (۱۵).

**الف) روش انتشار در آگار با حفر چاهک:** باکتری‌های بیماری‌زای مورد نظر در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند، با استفاده از یک چاهک‌ساز استریل در محیط آگار، چاهک‌ها ایجاد و در هریک از این چاهک‌ها غلظت معینی از بیوسورفکتانت منتخب (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و بعد از آن هاله شفاف ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت.

**ب) روش انتشار در آگار با دیسک‌گذاری:** باکتری‌های بیماری‌زای مورد نظر در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. دیسک‌ها در محیط آگار قرار گرفتند. در هریک از این دیسک‌ها غلظت معینی از بیوسورفکتانت منتخب اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و بعد از آن هاله شفاف ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت.

#### ۲-۱۰. تعیین خواص مهار بیوفیلیم توسط بیوسورفکتانت منتخب

با استفاده از تکنیک زیر خاصیت ضد چسبندگی بیوسورفکتانت منتخب در برابر بیوفیلیم تشکیل شده توسط باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت و درصد مهار با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۶).

$$\text{Percentage} = (\text{OD experimental well} / \text{OD control well}) \times 100$$

**تشخیص با روش میکروتیتر پلیت:** ابتدا سوسپانسیون بیوسورفکتانت منتخب در غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا که براساس کدورت نیم مک فارلند تهیه شد، به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های بیوسورفکتانت درون چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور گرماگذاری گردید. سپس چاهک‌ها با استفاده از آب مقطر شستشو داده شد و ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به هریک از چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳ درصد اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از آن جذب توسط دستگاه میکروتیتر ریدر در طول موج‌های ۴۰۵، ۴۵۰، ۴۹۰، ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد مهار بیوفیلیم با استفاده از فرمول ذکر شده محاسبه شد (۱۶).

#### ۲-۱۱. تعیین خواص حذف بیوفیلیم توسط بیوسورفکتانت منتخب

با استفاده از تکنیک زیر خاصیت ضدبیوفیلیم بیوسورفکتانت منتخب در برابر بیوفیلیم تشکیل شده توسط باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت و درصد مهار با استفاده از فرمول زیر

محاسبه شد.

$$\text{Percentage} = (\text{OD experimental well} / \text{OD control well}) \times 100$$

**تشخیص با روش میکروتیتر پلیت:** ابتدا سوسپانسیون بیوسورفکتانت منتخب در غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا که براساس کدورت نیم مک فارلند تهیه شد، درون چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد درون انکوباتور گرماگذاری گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بیوسورفکتانت درون چاهک‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس چاهک‌ها با استفاده از آب مقطر شستشو داده شد و ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳ درصد اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از آن جذب توسط دستگاه میکروتیتر ریدر در طول موج‌های ۴۰۵، ۴۵۰، ۴۹۰، ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد حذف بیوفیلم با استفاده از فرمول ذکر شده محاسبه گردید (۱۶).

### ۳. نتایج

از خاک‌ها و سویه‌های مورد آزمایش ۵۰ کلنی مشکوک به تیپ‌های آکتینوباکتر شناسایی شدند که با انجام رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده خصوصیات ظاهری کلنی‌ها در نهایت ۳۰ سویه آکتینومیست شناسایی و خالص‌سازی شد. سپس آکتینومیست‌ها برای توانایی تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل براساس قطر هاله پراکندگی نفت خام به صورت زیر می‌باشد.



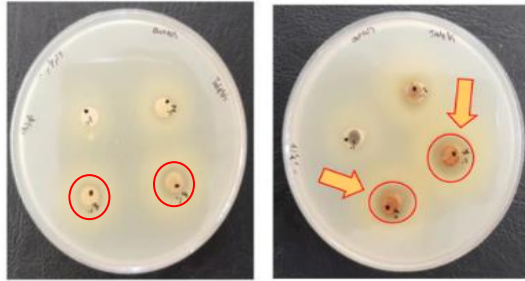
شکل ۱\_ اشکال ماکروسکوپی و میکروسکوپی آکتینومیست‌ها

جدول ۱- قطر هاله نفت پراکنده شده

جدایه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
قطر هاله نفت کنارزده شده (mm)	۱۰	۳۰	۱۵	۹۰	۱۰	۳۵	۱۵

نتایج به دست آمده از فعالیت ضد میکروبی بیوسورفکتانت منتخب و قطر هاله عدم رشد تشکیل شده در دوروش چاهک و دیسک در جدول‌های زیر آمده است.

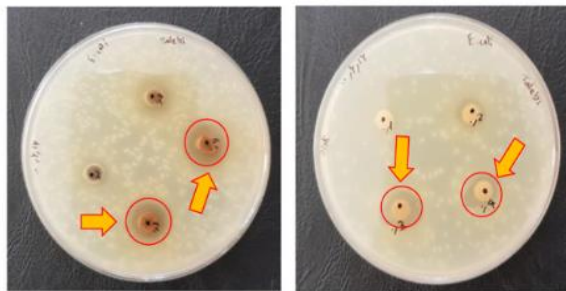




شکل ۲- هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش انتشار در آگار چاهک (سمت چپ) دیسک (سمت راست)

جدول ۲\_ قطر هاله عدم رشد در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

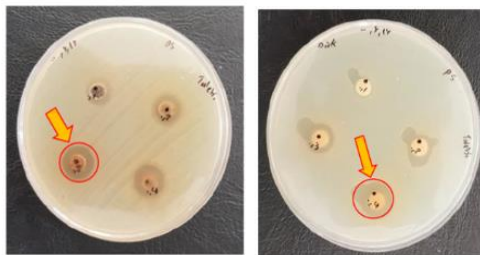
چاهک (میلی‌متر)	دیسک (میلی‌متر)	غلظت (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)
۷	۱۰	۰/۱
۱۰	۱۴	۰/۲
۱۰	۱۵	۰/۳
۱۳	۱۵	۰/۴



شکل ۳- هاله عدم رشد باکتری اشرشیا کلی به روش انتشار در آگار چاهک (سمت چپ) دیسک (سمت راست)

جدول ۳\_ قطر هاله عدم رشد در باکتری اشرشیا کلی

چاهک (میلی‌متر)	دیسک (میلی‌متر)	غلظت (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)
۰	۱۲	۰/۱
۱۰	۱۳	۰/۲
۱۵	۱۵	۰/۳
۱۵	۱۵	۰/۴



شکل ۴\_ هاله عدم رشد باکتری سودوموناس ائروژینوزا به روش انتشار در آگار چاهک (سمت چپ) دیسک (سمت راست)

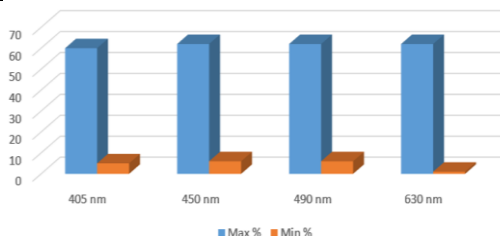
جدول ۴\_ قطر هاله عدم رشد در باکتری سودوموناس ائروژینوزا

چاهک (میلی‌متر)	دیسک (میلی‌متر)	غلظت (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)
۱۴	۷	۰/۱
۱۷	۹	۰/۲
۱۷	۱۵	۰/۳
۲۰	۱۵	۰/۴

بیشترین هاله عدم رشد باکتری بیماری‌زا در اثر فعالیت ضد میکروبی بیوسورفکتانت منتخب، در باکتری سودوموناس ائروژینوزا و به میزان ۲۰ میلی‌متر مشاهده شد و پس از آن دو باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس با هاله عدم رشد به میزان ۱۵ میلی‌متر در جایگاه دوم قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از فعالیت مهار بیوفیلم (ضدچسبندگی) بیوسورفکتانت منتخب و درصد مهار آن، در جدول‌های زیر آورده شده است.

جدول ۵- درصد مهار بیوفیلم در باکتری سودوموناس ائروژینوزا

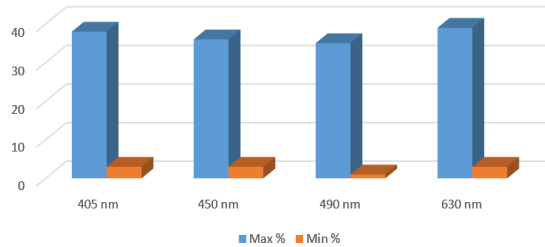
غلظت (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	کمترین درصد مهار	بیشترین درصد مهار	طول موج (نانومتر)
۰/۵	٪۵	٪۶۰	۴۰۵
۰/۵	٪۶	٪۶۲	۴۵۰
۰/۵	٪۶	٪۶۲	۴۹۰
۰/۵	٪۱	٪۶۲	۶۳۰



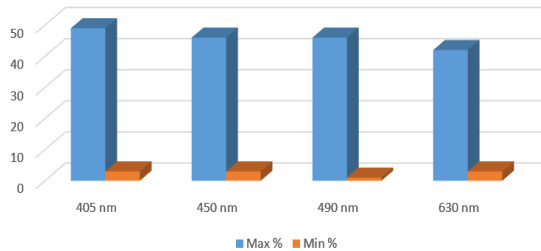
نمودار ۱- درصد مهار بیوفیلم در باکتری سودوموناس ائروژینوزا

جدول ۶- درصد مهار بیوفیلم در باکتری *اشرشیا کلی*

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)	کمترین درصد مهار	بیشترین درصد مهار	طول موج (نانومتر)
۰/۵	٪۴	٪۳۸	۴۰۵
۰/۵	٪۴	٪۳۵	۴۵۰
۰/۵	٪۱	٪۳۵	۴۹۰
۱	٪۶	٪۳۹	۶۳۰

نمودار ۲- درصد مهار بیوفیلم در باکتری *اشرشیا کلی*جدول ۷- درصد مهار بیوفیلم در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)	کمترین درصد مهار	بیشترین درصد مهار	طول موج (نانومتر)
۲	٪۳	٪۴۹	۴۰۵
۲	٪۳	٪۴۶	۴۵۰
۲	٪۱	٪۴۶	۴۹۰
۲	٪۴	٪۴۲	۶۳۰

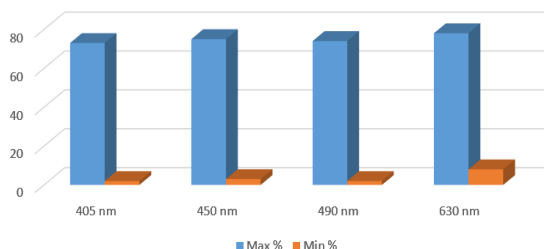
نمودار ۳- درصد مهار بیوفیلم در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

بیشترین میزان درصد مهار بیوفیلم توسط بیوسورفکتانت منتخب در باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* و به میزان ۶۲٪ مشاهده شد و پس از آن مهار بیوفیلم تشکیل شده توسط *استافیلوکوکوس*

اورئوس با ۴۹٪ در جایگاه دوم و باکتری اشرشیا کلی با ۳۹٪ در جایگاه سوم قرار دارند. نتایج به دست آمده از فعالیت حذف بیوفیلم (ضد بیوفیلم) بیوسورفکتانت منتخب و درصد حذف آن، در جدول‌های زیر آمده است.

جدول ۸- درصد حذف بیوفیلم در باکتری اشرشیا کلی

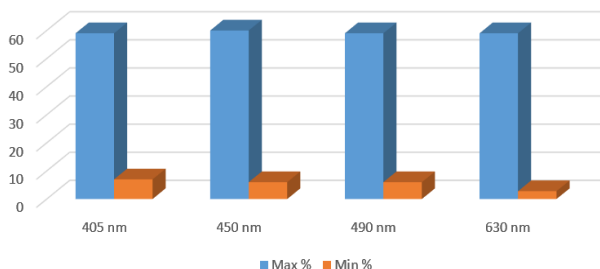
غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)	کمترین درصد مهار	بیشترین درصد مهار	طول موج (نانومتر)
۲	۱٪	۶۰٪	۴۰۵
۲	۳٪	۷۵٪	۴۵۰
۲	۲٪	۷۴٪	۴۹۰
۲	۸٪	۷۸٪	۶۳۰



نمودار ۴- درصد حذف بیوفیلم در باکتری اشرشیا کلی

جدول ۹- درصد حذف بیوفیلم در باکتری سودوموناس اتروژینوزا

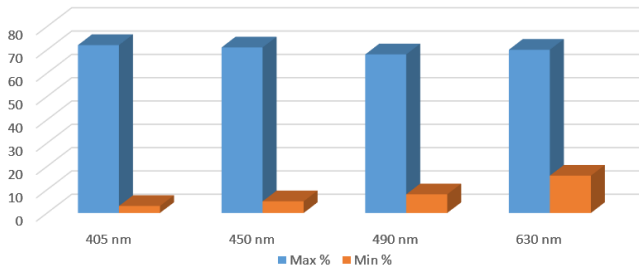
غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)	کمترین درصد مهار	بیشترین درصد مهار	طول موج (نانومتر)
۲	۷٪	۵۸٪	۴۰۵
۲	۶٪	۵۹٪	۴۵۰
۲	۶٪	۵۸٪	۴۹۰
۱	۶٪	۵۸٪	۶۳۰



نمودار ۵- درصد حذف بیوفیلم در باکتری سودوموناس اتروژینوزا

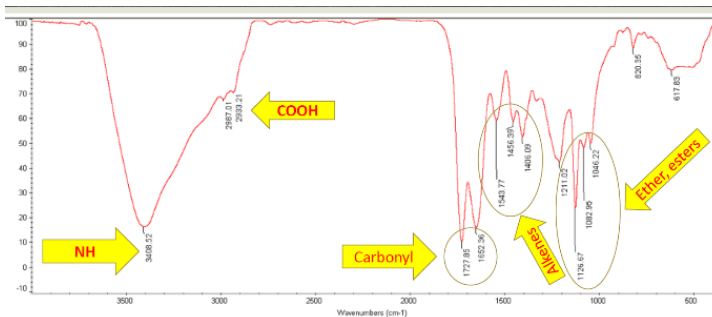
جدول ۱۰- درصد حذف بیوفیلم در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

غلظت (میلی گرم/ میلی لیتر)	کمترین درصد مهار	بیشترین درصد مهار	طول موج (نانومتر)
۰/۵	۳٪	۶۰٪	۴۰۵
۰/۵	۵٪	۷۱٪	۴۵۰
۰/۵	۸٪	۶۸٪	۴۹۰
۰/۵	۱۹٪	۷۰٪	۶۳۰



نمودار ۶- درصد حذف بیوفیلم در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

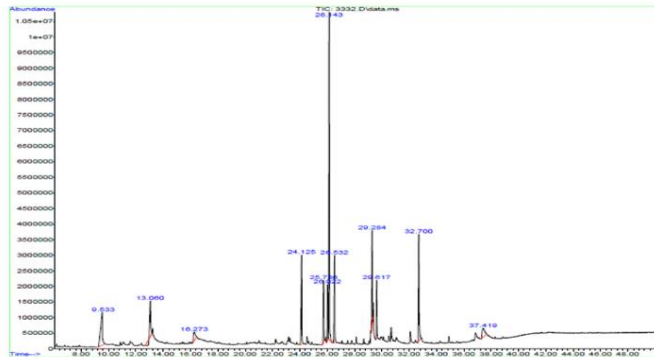
بیشترین میزان درصد حذف بیوفیلم توسط بیوسورفکتانت منتخب در باکتری اشرشیا کلی و به میزان ۷۸٪ مشاهده شد. پس از آن حذف بیوفیلم تشکیل شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس با ۷۱٪ در جایگاه دوم و سودوموناس اثرورینوزا با ۵۹٪ در جایگاه سوم قرار دارند. نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی مادون قرمز FTIR، در نمودار (۷) آمده است. ترکیبات آلی و ساختارهای شیمیایی موجود در بیوسورفکتانت منتخب مشخص شده است.



نمودار ۷- طیف‌سنجی مادون قرمز بیوسورفکتانت منتخب

ترکیبات آلی از جمله آمین‌ها، کربوکسیلیک اسیدها، گروه کربونیل، آلکین‌ها، اتر و استرها در ساختار شیمیایی بیوسورفکتانت منتخب مشاهده شدند، که بیانگر ساختار لیپوپپتیدی بیوسورفکتانت می‌باشند.

نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی GC-MS در جدول و نمودار زیر آمده است که نشانگر ترکیبات شیمیایی موجود در بیوسورفکتانت منتخب می‌باشد.



نمودار ۸- کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی

جدول ۱۱- کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی

No	RT (min)	Area%	Name	Quality	CAS Number
1	9.532	9.71	4-Thiapentanoic acid	72	000646-01-5
2	13.06	4.60	o-Toluic acid	91	000103-82-2
3	16.272	2.51	o-Aminobenzoic acid	94	000118-82-3
4	24.122	9.78	Cyclo(leucyloprolyl)	42	000000-00-0
5	25.736	5.14	Resorcinol, 5-methoxy-4-methyl-	47	055382-24-6
6	26.021	4.40	Diethyltrisulphide	43	003446-90-0
7	26.141	29.26	Acetyl-1,3-dimethylindole	86	030368-36-6
8	26.53	7.93	n-Hexadecanoic acid	99	000057-10-3
9	29.285	7.52	trans-delta.9-Octadecenoic acid	99	000112-79-8
10	29.617	4.47	stearic acid	99	000057-11-4
11	32.699	11.14	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-	99	014705-60-3
12	37.421	3.54	Methyl cyclohexylenacetate	35	000000-00-0

براساس میزان درصد ترکیبات موجود، ۵ عدد از ترکیبات به عنوان ترکیب اصلی بیوسورفکتانت انتخاب شدند که عبارتند از:

۱) 2-Acetyl-1, 3-dimethylindole که ۲۹/۲۶ درصد از ترکیبات را تشکیل می‌دهد.

۲) Cyclo (leucyloprolyl) که ۹/۷۸ درصد از ترکیبات را تشکیل می‌دهد.

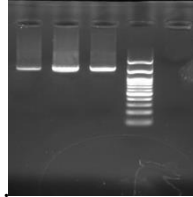
۳) 4-Thiapentanoic acid که ۹/۷۱ درصد از ترکیبات را شامل می‌شود.

۴) 1-hexadecanoic acid که ۷/۹۳ درصد از ترکیبات را شامل می‌شود.

۵) Trans-delta. 9-octadecanoic acid که ۷/۵۲ درصد از ترکیبات را شامل می‌شود.

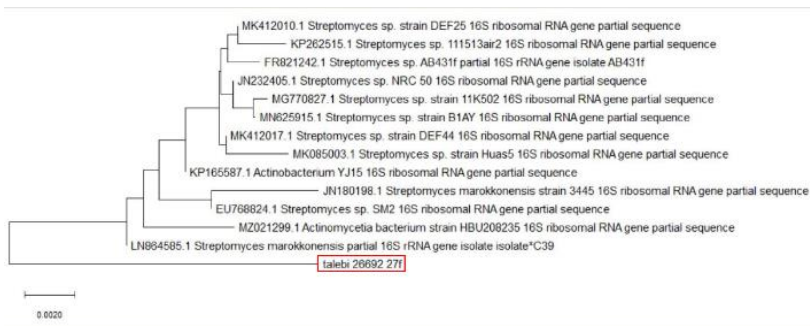
با توجه به نتایج به دست آمده و ترکیبات ذکر شده، بیوسورفکتانت انتخاب شده از ساختار حلقه آمینو اسیدی با زنجیره‌ای از اسیدهای چرب تشکیل شده است. بنابراین، بیوسورفکتانت انتخاب شده یک لیپوپپتید است.

نتایج مولکولی شناسایی جدایه منتخب تولیدکننده بیوسورفکتانت در شکل‌های زیر آمده است. پس از استخراج DNA باکتری، کیفیت و کمیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد در واکنش بانده ۱۴۹۸ جفت بازی را نشان داد که مربوط به تکثیر ژن هدف می‌باشد.



شکل ۵- از راست NC کنترل منفی، سایز مارکر ۱۰۰

جفت باز، و شماره‌های ۱ تا ۳ نمونه مورد نظر می‌باشد که به صورت تکرار گذاشته شده است. نتایج تعیین توالی در بخش BLAST سایت NCBI انجام گرفت و مشابهت ۹۸ درصدی به توالی‌های استرپتومایسس را نشان داد. سپس سکانس‌ها ویرایش شدند و در نرم‌افزار MEGA با توالی‌های دیگر هم‌ردیف شدند و آنالیز مقایسه‌ای انجام گرفت، و طبق دندروگرام زیر بررسی دقیق‌تری انجام شد.



شکل ۶- دندروگرام فیلوژنتیک براساس قطعه مورد نظر با روش Neighbor-joining

اطلاعات آنالیز ژن توسط اختلاف سکانس بین سویه‌ها حدود ۴٪ بود که ۷۰٪ توالی ژن‌ها در میان سویه‌ها ثابت و ۳۰٪ آن دستخوش تغییرات شده بود. لازم به ذکر است که سویه منتخب تحت نام فاطمه طالبی دارای در سایت NCBI به شماره ثبت OM755696، به ثبت رسیده است.

#### ۴. بحث

با توجه به نتایج حاصل مشاهده شد که از بین نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در استان قم،

حدود ۳۰ جدایه آکتینومیسیت شناسایی شدند که در میان آنها ۷ جدایه توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارند که یکی از جدایه‌ها، جدایه شماره (۴)، با قوی‌ترین بیوسورفکتانت تولید شده به عنوان جدایه منتخب، انتخاب شد. همچنین بیوسورفکتانت تولید شده توسط این جدایه فعالیت ضد میکروبی، ضد چسبندگی و ضد بیوفیلمی قابل توجهی را در برابر بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری‌های بیماری‌زا از خود نشان داد. هاله پراکندگی نفت خام ایجاد شده توسط بیوسورفکتانت جدایه منتخب در حدود ۹۰ میلی‌متر گزارش شد. بیشترین میزان فعالیت ضد میکروبی آن در باکتری سودوموناس ائروژینوزا و ایجاد ۲۰ میلی‌متر هاله عدم رشد باکتری مشاهده شد. فعالیت مهار تشکیل بیوفیلم این بیوسورفکتانت در بیشترین مقدار درصد مهار، در باکتری سودوموناس ائروژینوزا و به میزان ۶۲٪ مشاهده شد. بیشترین مقدار درصد حذف بیوفیلم توسط بیوسورفکتانت منتخب نیز در باکتری اشرشیا کلی و به میزان ۷۸٪ مشاهده گردید.

جوادی و همکاران (۲۰۲۱) در پژوهشی باکتری نوکاردیا را شناسایی کردند که بیوسورفکتانت آن توانایی پراکنده کردن نفت خام به میزان ۶۰ میلی‌متر را دارا بود (۱۷).

در تحقیق دیگری بت‌شکن و همکاران (۲۰۱۹)، باکتری رودوکوکوس را شناسایی کردند که بیوسورفکتانت تولیدی آن توانایی پراکنده کردن نفت خام به میزان ۹۰ میلی‌متر را دارا بود (۱۸). در رابطه با فعالیت ضد میکروبی بیوسورفکتانت تولید شده در آکتینومیسیت‌ها، در Achmad Arifiyanto و همکاران (۲۰۲۰)، در پژوهشی نشان دادند که بیوسورفکتانت تولید شده باعث ایجاد ۱۲ میلی‌متر هاله عدم رشد در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، و ۶ میلی‌متر هاله عدم رشد در باکتری اشرشیا کلی می‌گردد (۱۹). در رابطه با فعالیت مهار بیوفیلم بیوسورفکتانت آکتینومیسیت‌ها، بت‌شکن و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که بیوسورفکتانت تولید شده در باکتری رودوکوکوس، ۴۲/۵ درصد توانایی مهار بیوفیلم را در باکتری سودوموناس ائروژینوزا دارد. فعالیت حذف بیوفیلم ایجاد شده به وسیله اشرشیا کلی توسط بیوسورفکتانت تولید شده در رودوکوکوس به میزان ۴۹ درصد گزارش شد. جورج و همکاران (۲۰۱۸)، در پژوهشی روی فعالیت ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت تولیدی آکتینومیسیت‌ها، نشان دادند که این باکتری به میزان ۹۰ درصد توانایی حذف بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را دارد (۲۰). تاکنون تحقیقات بسیاری روی آکتینوباکترها و توانایی تولید بیوسورفکتانت آنها در سرتاسر دنیا انجام شده و بیشتر این تحقیقات در خارج از کشور بوده که پیشینه طولانی مدتی ندارند و اکثر آنها طی ۱۰ سال گذشته انجام شده‌اند.



**۵. نتیجه گیری**

با توجه به نتایج به دست آمده، در این پروژه برای اولین بار در ایران، باکتری استرپتومایست از خاک شناسایی شد که قادر به تولید متابولیت ثانویه به نام بیوسورفکتانت است. بیوسورفکتانت استخراج شده از این باکتری، فعالیت ضد بیوفیلم، ضد چسبندگی و ضد میکروبی قابل قبولی را در برابر باکتری‌های بیماری‌زای تولیدکننده بیوفیلم نشان داد. با توجه به اهمیت ساختار بیوفیلم در پزشکی، می‌توان از این بیوسورفکتانت در صنایع پزشکی و داروسازی استفاده کرد.

**۶. ملاحظات اخلاقی****۶-۱. پیروی از اصول اخلاق پژوهش**

این پژوهش به علت عدم استفاده از نمونه‌های حیوانی مطابق دستورالعمل دانشگاه آزاد اسلامی، نیازی به اخذ کد اخلاق نداشت.

**۷. تشکر و قدردانی**

از همه کارمندان و مسئولین آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم که با فراهم آوردن منابع و تجهیزات به انجام این پژوهش کمک کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

1. Sobrinho HB, Luna JM, Rufino RD, Porto AL & Sarubbo LA. Biosurfactants: classification, properties and environmental applications. *Recent developments in biotechnology*. 2013; 11(14): 1-29.
2. Gudiña EJ, Teixeira JA & Rodrigues LR. Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. *Marine drugs*. 2016; 14(2): 38.
3. Santos DK, Rufino RD, Luna JM, Santos VA & Sarubbo LA. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*. 2016; 17(3): 401.
4. Flemming HC & Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17(4): 247-260.
5. Galie S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ & Lombó F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9: 898.
6. Percival SL, Suleman L, Vuotto C & Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of medical microbiology*. 2015; 64(4): 323-34.
7. Ciofu O & Tolker-Nielsen T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10: 913.
8. Coughlan LM, Cotter PD, Hill C & Alvarez-Ordóñez A. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*. 2016; 7: 1641.
9. van Dissel D, Claessen D & van Wezel GP. Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Advances in applied microbiology*. 2014; 89: 1-45.
10. Deepika TL & Kannabiran K. A report on antidermatophytic activity of Actinomycetes isolated from Ennore coast of Chennai, Tamil Nadu, India. *Int J Integr Biol*. 2009; 6(3): 132-6.
11. Sujatha J, Suriya P & Rajeshkumar S. Biosynthesis and Characterization of silver Nanoparticles by Actinomycetes isolated from Agriculture field and its application on antimicrobial activity. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2017; 10(6): 1963-8.
12. Ranjani A, Gopinath PM, Rajesh K, Dhanasekaran D & Priyadharsini P. Diversity of silver nanoparticle synthesizing Actinobacteria isolated from marine soil, Tamil Nadu, India. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 2016; 41: 25-32.
13. Yousefi Z, Aghaei S, Morovvati A & Zolfaghari MR. Isolation, Molecular Identification, and Phylogenetic Analysis of Antimicrobial Agents Producing Actinomycetes in Farming Saline Soils of Qom City (Iran). *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2019; 13(3): 63-73. [in persian]
14. Alav I, Sutton JM & Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018; 73(8): 2003-20.

15. Kumar CG, Mamidyala SK, Das B, Sridhar B, Devi GS & Karuna MS. Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2010; 20(7): 1061-8.
16. Silva VO, Soares LO, Silva Junior A, Mantovani HC, Chang YF & Moreira MA. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. *Applied and environmental microbiology*. 2014; 80(19): 6136-45.
17. Javadi A, Pourmand MR, Hamed J, Gharebaghi F, Baseri Z, Morovvati A, Mohammadzadeh R & Eshraghi SS. Evaluation of anti-biofilm potential of biosurfactant extracted from *Nocardia* species. *Folia Medica*. 2021; 63(3): 392-9. [in persian]
18. Botshekan F, Aghaei S & Haghghi N. *Studying the anti-adhesion and anti-biofilm properties of biosurfactant production by native isolates of Rhodococcus on pathogenic bacteria*. 2019. [in persian]
19. Arifiyanto A, Surtiningsih T, Agustina D & Alami NH. Antimicrobial activity of biosurfactants produced by Actinomycetes isolated from rhizosphere of Sidoarjo mud region. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020; 24: 101513.
20. George S & Jayachandran K. *Biosurfactants from processed wastes*. Waste to Wealth. 2018: 45-58.