مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم، شماره اول (پیاپی ۱۴) بهار ۱۳۹۲
صفحات ۶۱-۵۳

Original Article

جداسازی، شناسایی و تعیین ویژگی دو گونه *شیوانلای* تولید کننده بیوسورفکتانت از خلیج فارس

مرضیه عادلی*[۱]، مهدی حسن شاهیان[۲]، اشرف کریمی نیک[۳]

[۱] کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات کرمان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، [۳] مربی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: بیوسورفکتانت ها مواد فعال سطحی تولید شده توسط برخی از میکروارگانیسم ها می باشند. این مولکول ها از دو بخش آب دوست و آب گریز تشکیل شده اند و از این رو قادر به افزایش تجزیه زیستی مواد آلی نامحلول می باشند. مطالعه حاضر با هدف جداسازی، شناسایی و تعیین ویژگی دو گونه *شیوانلای* تولید کننده بیوسورفکتانت از خلیج فارس انجام گردید.

مواد و روش ها: با نمونه گیری از شن های ساحلی و آب آلوده به ترکیبات نفتی خلیج فارس، ۲۵ سویه مولد بیوسورفکتانت جداسازی گردید. با استفاده از روش های غنی سازی در محیط بوشنل هاس با گازوئیل جداسازی باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت انجام گرفت. سپس سویه های برتر با استفاده از روش های کمی و کیفی غربالگری مانند همولیز در محیط بلاد آگار، روش گسترش نفت، تست انهدام قطره، فعالیت امولسیونه کنندگی(آمیزندگی) و سنجش آب گریزی سلولی تولید کننده انتخاب شدند. تعیین هویت سویه های احتمالی با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی انجام شد. سپس با استفاده از پرایمرهای یونیورسال و روش 16S rRNA و تعیین توالی، سویه های برتر تولید کننده بیوسورفکتانت شناسایی گردیدند.

یافته ها: در مجموع ۷ سویه باکتریایی تولید کننده بیوسورفکتانت جداسازی گردید. از این بین ۲ سویه به نام های N4 و E14 به عنوان سویه های برتر شناخته شدند. پس از شناسایی مولکولی تعلق سویه ها به *شیوانلا آلگا* و *شیوانلایوپنی* تایید گردید.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که سویه های جداسازی شده سطح آب گریزی، توانایی تولید ترکیبات فعال کننده سطحی و ویژگی تجزیه ترکیبات هیدروکربنی را در حد مناسبی دارند. بنابراین ارزیابی پتانسیل کاربردی این سویه ها به منظور زیست درمانی و حذف پساب ناشی از صنایع نفت پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، بیوسورفکتانت، زیست درمانی، محیط دریایی.

دریافت مقاله: آذر ماه ۱۳۹۱ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۹۱

مقدمه

بیوسورفکتانت ها گروه متنوعی از ترکیبات فعال سطحی بوده که توسط برخی از باکتری ها، مخمرها و قارچ ها تولید می شوند (۱). بیشتر بیوسورفکتانت ها چربی هایی هستند که ساختار دوگانه دوست سورفکتانت ها را دارا می باشند و امکان تشکیل میسل در حد فاصل دو فاز با قطبیت متفاوت را دارند (۲). این مولکول ها به علت دو قطبی بودن ترجیحاً تمایل دارند در سطح بین مایع با هوا یا بین مایعات با درجه قطبیت و باندهای هیدروژنی مختلف مانند آب/هوا یا آب/نفت قرار بگیرند (۳). قسمت قطبی و محلول در آب آنها ممکن است از

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات کرمان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۳۷۸۷۸۰۰۲۰ پست الکترونیک: mar.a2012@yahoo.com

کربوکسیلات، هیدروکسیلات و یا از ساختارهای پیچیده تر شامل فسفات، اسیدآمینه یا پپتیدها، آنیون ها و کاتیون ها، منو، دی یا پلی ساکارید تشکیل شده باشد. در حالی که قسمت چربی دوست آنها دم هیدروکربنی است که از زنجیره بلند اسیدهای چرب اشباع، غیر اشباع و هیدروکسیله و یا الکل های چرب تشکیل می شود (۲). یکی از ویژگی های مشخصه بیوسورفکتانت ها تعادل هیدروفیلیک- لیپوفیلیک (HLB) در بخش مشخصی از اجزا تشکیل دهنده آب دوست و آب گریز در مواد فعال سطحی است. با توجه به ساختار آمفی فیلیک شان، بیوسورفکتانت ها ناحیه سطحی آب گریز مواد نامحلول در آب را افزایش می دهند و باعث بهتر جذب شدن مواد نامحلول در آب می شوند (۴).

این مولکول ها قادرند با قرار گرفتن در حد فاصل سیالات غیرامتزاج پذیر، موجب کاهش کشش سطحی و بین سطحی در حد فاصل مایعات، جامدات و گازها شده و امکان مخلوط شدن یا پراکنده شدن این ترکیبات را به عنوان امولسیون در آب یا سایر سیالات تسهیل کنند. و بدین ترتیب حلالیت، قابلیت حرکت، دسترسی زیستی و به دنبال آن تجزیه زیستی مواد هیدروفوبیک و مواد آلی نامحلول را افزایش دهند (۵ و ۶). به طورمعمول هیدروکربن های مخلوط نشدنی با آب به عنوان سوبسترا برای تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری ها مصرف می شوند. بدیهی است که عملکرد بیولوژیکی ترکیبات فعال سطحی به ترکیبات هیدروکربنی وابسته است. کربوهیدرات ها به ندرت به عنوان منبع کربن و انرژی برای تولید بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار می گیرند (۷).

بر اساس ساختار شیمیایی و منشأ میکروبی، بیوسورفکتانت ها به ۵ گروه اصلی شامل گلیکولیپیدها، لیپوپپتید و لیپوپروتئین، اسیدهای چرب، فسفولیپیدها، بیوسورفکتانت های پلیمری و بیوسورفکتانت های خاص تقسیم می شوند (۸). این ترکیبات با داشتن مزایایی چون امکان تولید از منابع تجدید پذیر و ارزان قیمت، سازگاری بیشتر با محیط زیست، سمیت کمتر و قابلیت تجزیه زیستی بالاتر، تولید کف بیشتر نسبت به سورفکتانت های شیمیایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند (۹). بیوسورفکتانت ها در صنایع مختلف کشاورزی، معادن، صنایع نساجی، صنایع دارویی و بهداشتی-آرایشی و به خصوص صنایع نفتی و حفاری به عنوان عوامل کاهش دهنده کشش سطحی، مرطوب کننده، تشکیل دهنده کف و امولسیون کننده به کار می روند (۵، ۸ و ۱۰). بزرگ ترین بخش بازار مصرف بیوسورفکتانت ها به صنعت نفت اختصاص دارد.

این ترکیبات برای تولید نفت، حفاری، روان سازی و نیز در کاربردهای وابسته به صنایع نفتی شامل پاکسازی زیستی آلاینده های هیدروکربنی ناشی از نشت ترکیبات هیدروکربنی در خشکی و دریا، زدودن و به حرکت در آوردن لجن نفتی در تانکرهای نفتی و خطوط لوله و نیز ازدیاد برداشت میکروبی نفت (Microbial Enhanced Oil Recovery=MEOR) مورد استفاده قرار می گیرند (۵). هدف از این پژوهش، جداسازی، شناسایی و تعیین ویژگی دو گونه *شیوانلا* (*Shewanella*) تولید کننده بیوسورفکتانت از خلیج فارس بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری: به منظور جداسازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت، شن های ساحلی و نمونه های آب دریا از مناطق مختلف خلیج فارس شامل جزیره خارک، بندر گناوه، بندر سیراف، عسلویه، هلیله و بندرگاه شهر بوشهر جمع آوری گردید. نمونه برداری در شرایط استریل انجام شد.

در مورد نمونه های آب دریا، نمونه برداری از عمق ۲ سانتی متری در درون لوله های فالکون استریل انجام گرفت. همچنین نمونه های رسوبات نیز از عمق ۳ سانتی متری با استفاده از چاقوی استریل جمع آوری و درون لوله های استریل ریخته شدند. نمونه های آب و رسوبات جمع آوری شده بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

ب) جداسازی و غربال گری سویه های تولیدکننده بیوسورفکتانت: به منظور جداسازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت از محیط کشت بوشنل-هاس (Bushnell-Hass) به همراه یک درصد گازوئیل به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده شد. محیط بوشنل-هاس (pH ۷) حاوی

ترکیبات: (گرم بر لیتر) ۱ گرم KH_2PO_4، ۱ گرم K_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۲ $CaCl_2$، ۱ گرم NH_4NO_3 و دو قطره از $FeCl_3$ ۶۰ درصد بود. میزان ۵ گرم از نمونه های رسوب و ۵ میلی لیتر از نمونه های آب درون این محیط جهت غنی سازی اولیه تلقیح شد و بر روی شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از گذشت یک هفته، ۵ میلی لیتر از محیط برداشته شد و به محیط بوشنل هاس جدید انتقال یافت. این عمل تا ۳ پاساژ ادامه یافت تا اینکه کدورت به دست آمده ناشی از رشد باکتری ها باشد و آلودگی ترکیبات دیگر در نمونه کاهش یابد. از پاساژ نهایی میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت مارین آگار منتقل گردید. پس از رشد، باکتری ها به صورت تک کلنی جداسازی و به محیط مارین آگار جدید انتقال یافتند (۱۱).

ج) تست های غربالگری:

۱- تست همولیز: برای این تست از روش فعالیت همولیتیک استفاده شد. از آنجایی که این روش ساده و سریع است به عنوان معیار انتخاب باکتری های مولد بیوسورفکتانت استفاده شد. برای انجام این تست باکتری هایی که در مراحل قبلی جداسازی شده بودند، در محیط کشت بلاد آگار کشت داده شده و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. همولیز که به صورت هاله نمایان می شود نشان دهنده مثبت بودن فعالیت همولیتیک است و باکتری که فعالیت همولیتیک مثبت دارد، می تواند مولد بیوسورفکتانت باشد (۱۲).

۲- روش گسترش نفت خام: برای این منظور ابتدا سویه ها درون محیط کشت مارین براث تلقیح شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت و رشد سویه ها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی برداشته شد. ۵۰ میلی لیتر آب مقطر در یک پلیت بزرگ ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آن افزوده گردید که به صورت یک لایه نازک یکپارچه بر روی سطح آب مقطر قرار گرفت. در ادامه نمونه ۱۰ میکرولیتری که از محیط کشت برداشته شده بود بر روی سطح نفت ریخته شد. با افزودن این سوسپانسیون میکروبی حاوی بیوسورفکتانت، ناحیه شفافی در لایه نفتی ایجاد گردید که نشان دهنده حضور بیوسورفکتانت در محیط است. در ادامه قطر هاله ایجاد شده اندازه گیری شد (۱۳).

۳- تست انهدام قطره: ابتدا سویه ها در محیط کشت مارین براث تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردیدند. پس از رشد سویه ها، ۱۰ میکرولیتر نفت خام بر روی صفحه شیشه ای قرار داده شد و در ادامه ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی بر روی نفت خام گذاشته شد. پس از گذشت یک دقیقه شکل قطره ایجاد شده در سطح نفت خام بررسی گردید. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. در صورت تولید بیوسورفکتانت به وسیله ی سوسپانسیون میکروبی، قطره به حالت مسطح و در غیر این صورت قطره کاملاً گرد خواهد بود. نتایج به صورت یک مثبت (قطره کمی متمایل)، دو مثبت (قطره خیلی متمایل) و سه مثبت (قطره کاملاً پهن) گزارش شد (۱۴).

د) فعالیت آمیزندگی: باکتری های جداسازی شده ابتدا در محیط مارین براث کشت داده شدند. پس از آنکه باکتری ها به رشد لگاریتمی رسیدند، میزان ۴ میلی لیتر از محیط کشت درون لوله آزمایش حاوی ۶ میلی لیتر نفت سفید ریخته شد و به مدت ۲ دقیقه با سرعت بالا با ورتکس مخلوط گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت به صورت ساکن در دمای محیط قرار داده شدند و پس از آن فعالیت آمیزندگی (امولسیونه کنندگی) با فرمول زیر محاسبه شد (۱۵).

ه) سنجش هیدروفوبیسیته سلولی: ابتدا سوسپانسیون باکتریایی

$$E24 = \frac{\text{ارتفاع لایه امولسیون شده}}{\text{کل ارتفاع مایع}} \times ۱۰۰$$

در بافر واجد ترکیبات (گرم بر لیتر): ۲۲ گرم K_2HPo_4، ۲۲ گرم KH_2Po_4، ۷/۲۶ گرم اوره و ۰/۲ گرم $MgSo_4$ تهیه شد. سپس به مدت ۲ دقیقه همزنی شدید انجام گرفت و میزان جذب اولیه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر هگزادکان به آن اضافه و به

مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. پس از گذشت زمان انکوباسیون، مخلوط بعد از ۲ دقیقه همزنی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. نتایج به صورت اختلاف درصد جذب فاز آبی پس از تیمار و جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی به جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد (۱۶).

و) شناسایی باکتری های مولد بیوسورفکتانت: با استفاده از آزمون های میکروبی مانند رنگ آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، آزمون حرکت، آزمایش اکسیداز و کاتالاز و تولید اسید از گلوکز شناسایی اولیه باکتری های مولد بیوسورفکتانت انجام گرفت. در ادامه شناسایی مولکولی باکتری ها با تکثیر قسمتی از ژن 16S rRNA توسط پرایمرهای :

Uni-1492 R: 5′- TACGYTACCTTGTTACGACTT-3′ و Bac-27 F: 5′- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′انجام شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA ی الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر dNTP Mix (100mM)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (50mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ، ۰/۲میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۴/۸ میکرولیتر D.D.W انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf AG Humborg) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. سپس باند ۱۴۰۰ جفت بازی از ژل آگاروز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و به منظور تعیین توالی ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک ژن بلاست (BLAST) شد و همولوژی آنها بررسی گردید. قرابت بالاتر از ۹۷٪ به عنوان جنس و گونه باکتری مجهول در نظر گرفته شد.

یافته ها

بیست و پنج سویه باکتریایی تولید کننده بیوسورفکتانت از شن های ساحلی و آب خلیج فارس در مناطق مورد بررسی جداسازی گردید. از مجموع سویه های شناسایی شده، ۱۰ سویه در تست همولیز بهترین فعالیت همولیتیکی را نشان دادند. در تست انهدام قطره ۱۷ سویه بهترین شکل قطره را ایجاد کردند و در تست گسترش نفت ۱۰ سویه ناحیه شفافی در سطح لایه نفت خام ایجاد کردند (جدول ۱).

در نهایت بر اساس این سه تست ۷ سویه به عنوان سویه های مولد بیوسورفکتانت برای مراحل بعدی غربالگری انتخاب شدند. نتایج فعالیت امولسیونه کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی باکتری های مناسب انتخابی درجدول ۲ نشان داده شده است. از ۷ سویه غربالگری شده مولد بیوسورفکتانت براساس شباهت های مورفولوژیک و فیزیولوژیک و همچنین تست‌های غربالگری، فعالیت امولسیونه کنندگی (E24) و هیدروفوبیسیته سطح سلولی (BATH)، دو باکتری کوکوباسیل گرم منفی به عنوان سویه های برتر مولد بیوسورفکتانت انتخاب شدند. سویه N4 که از نمونه رسوب نبش فرودگاه جزیره خارک جداسازی شد، یک کوکوباسیل گرم منفی متحرک با تست اکسیداز و کاتالاز مثبت و عدم توانایی تولید اسید از گلوکز بود که در جنس *شیوانلا* قرار گرفت. سویه E14 که از نمونه آب اسکله پتروشیمی جزیره خارک به دست آمد، یک باکتری کوکوباسیل گرم منفی متحرک، تست اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت و عدم توانایی تولید اسید از گلوکز بود و در جنس *شیوانلا* قرار گرفت.

پس از شناسایی مولکولی و تعیین توالی قسمتی از ژن، مشخص گردید که سویه N4 مربوط به جنس و گونه *شیوانلا آلگا* (*Shewanella algae*) و سویه E14 به جنس و گونه *شیوانلا یوپنی* (*Shewanella upenei*) تعلق دارد.

جدول ۱: نتایج غربالگری باکتری های جداسازی شده به منظور بررسی تولید بیوسورفکتانت

نام سویه	تست همولیز	تست انهدام قطره	تست گسترش نفت
A	-	-	۰
C1	+	++	۶ mm
C2	+	++	۲ mm
C3	+	++	۸ mm
E1	-	+	۲ mm
E2	-	-	۰
E3	-	++	۱۴ mm
E14	+	++	۱۰ mm
F1	-	+	۰
F2	-	+	۰
H1	-	+	۳ mm
H2	-	++	۸ mm
H3	-	+	۰
H4	-	+++	۱۰ mm
H14	+	++	۵ mm
M1	-	++	۱۲ mm
M2	+	++	۳ mm
M3	+	+++	۱۵ mm
N1	-	++	۲ mm
N2	-	++	۲ mm
N3	-	+++	۵ mm
N4	+	++	۸ mm
T1	-	+	۳ mm
T26	+	++	۱۰ mm
U15	+	++	۱۳ mm

جدول ۲: نتایج فعالیت آمیزندگی و درصد هیدروفوبیسیته سطح سلولی باکتری های غربالگری شده

سویه های غربالگری شده	فعالیت آمیزندگی (E24%)	درصد هیدروفوبیسیته سطح سلولی (BATH%)
E3	٪۲۰	٪۳/۲
E14	٪۱۴	٪۳۸/۸
M1	٪۶/۹	٪۱/۶
M3	٪۶	٪۷/۶
N4	٪۲۳	٪۲۷
T26	٪۴۴	٪۴
U15	٪۲۰	٪۱۹

سپس سویه های یاد شد به ترتیب با شماره های دسترسی HF968433 و HF968436 در پایگاه EMBL به ثبت رسید.

بحث

تاکنون باکتری های مولد بیوسورفکتانت از محیط های گوناگون جداسازی شده اند. این باکتری ها قادرند از هیدروکربن ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند. اخوان (Akhavan) و همکاران در سال ۲۰۱۰ دو سویه تولید کننده بیوسورفکتانت به نام های *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis* BCRC) و *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis* HAZ2) را از مناطق آلوده به نفت در مسجد سلیمان و پالایشگاه نفت تهران جداسازی کردند (۱۷).

طواسی (Thavasi) و جایالاکشمی (Jayalakshmi) در سال ۲۰۰۳ نمونه ایی از باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت مانند *باسیلوس مگاتریوم* (*B.megaterium*)، کورینه *باکتریوم کوتشری* (*C.kutsheri*) و *سودوموناس آئروژینوسا* (*P.aeruginosa*) را از نمونه های آب بندر توتیکورین (Tuticorin) در سواحل جنوب شرق هند جداسازی نمودند (۱۸). هزبی (Hasbi) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸، ۱۶ باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت را از نمونه های آب و لجن آلوده به مواد نفتی جداسازی کردند. که از این میان ۴ سویه به عنوان سویه های برتر مولد بیوسورفکتانت شناسایی شدند (۱۹).

در پژوهش حاضر باکتری های مولد بیوسورفکتانت از اکوسیستم دریایی، رسوبات و آب آلوده به مواد نفتی (منطقه ساحلی استان بوشهر) جداسازی گردیدند. اکوسیستم های انتخاب شده در این تحقیق با اکوسیستم های انتخاب شده توسط محققین یاد شده هم خوانی دارد. زیرا طبق اصل تطابق، باکتری های مولد بیوسورفکتانت در مکان هایی یافت می شوند که در تماس با آلودگی مواد نفتی و هیدروکربنی باشند و در این پژوهش نیز از همین اصل به منظور دستیابی به این باکتری ها استفاده گردید. ۳ روش همولیز بر روی محیط بلاد آگار، روش انهدام قطره و روش گسترش نفت برای غربالگری

باکتری های مولد بیوسورفکتانت استفاده شد. این روش ها توسط سایر محققین نیز انجام شده است.

فعالیت همولیتیک باکتری های مولد بیوسورفکتانت، اولین بار توسط بنهیمر (Bernheimer) و اویگید (Avigad) در سال ۱۹۷۰ برای بیوسورفکتانت تولید شده توسط *باسیلوس سوبتیلیس* گزارش گردید (۲۰). مولیگان (Mulligan) و همکاران در سال ۱۹۸۴ روش همولیز بر روی محیط بلاد آگار را به عنوان یک روش غربالگری اولیه در تولید بیوسورفکتانت معرفی نمودند (۲۱).

روش همولیز، باوجود آسان و سریع بودن دارای محدودیت هایی نیز می باشد. زیرا برخی از سویه هایی که همولیز مثبت داشتند با روش های دیگر نتایج مثبت نشان دادند. همچنین بعضی از سویه هایی که در روش های دیگر نتایج مثبت داشتند قادر به انهدام گلبول های قرمز نبودند. این نتایج نشان می دهد که همولیز سلول های خونی یک روش قابل اعتماد برای تشخیص تولید بیوسورفکتانت نمی باشد.

نوها (Noha) و همکاران در سال ۲۰۰۴ عنوان کردند که ۱۶٪ از نتایج مثبت کاذب در فعالیت همولیتیک ممکن است به دلیل فرآورده های میکروبی مانند فاکتورهای ویرولانس باشد که قادر به همولیز می باشند. همچنین عدم همولیز سلول های خونی می تواند ناشی از محدودیت انتشار سورفکتانت در محیط بلاد آگار باشد (۲۲-۲۰). در روش انهدام قطره، قطره ایی که حاوی بیوسورفکتانت می باشد در سطح نفت منهدم شده و پخش می گردد. این روش ساده بوده و برای غربالگری هم زمان تعداد زیادی سویه استفاده می شود (۲۲).

این روش به اندازه گسترش لکه نفتی حساس نیست و اگر غلظت بیوسورفکتانت تولید شده کم باشد با این روش تشخیص داده نمی شود. در روش گسترش لکه نفتی، زمانی که قطره ایی از محلول حاوی بیوسورفکتانت در سطح لکه نفتی شناور بر سطح آب قرار گیرد، تشکیل هاله می دهد.

با افزایش غلظت بیوسورفکتانت، هاله شفاف ایجاد شده در سطح لکه نفتی وسیع تر می شود. در این تحقیق از ۲۵ سویه جداسازی شده، ۱۰ سویه بهترین فعالیت همولیتیکی را داشته و بر روی محیط بلاد آگار هاله شفاف ایجاد کردند. در تست انهدام قطره ۱۷ سویه قطره مسطح ایجاد کردند و در روش گسترش نفت، با افزون محیط کشت باکتری به آن، ناحیه شفافی در سطح لایه نفتی توسط ۱۰ سویه ایجاد شد. از آنجایی که هیدروکربن ها ترکیبات غیر قطبی هستند، بنابراین میزان انحلال آنها در آب بسیار پایین است و در نتیجه قابلیت دسترسی باکتری ها به آنها به سختی خواهد بود. باکتری ها برای اینکه بتوانند از هیدروکربن ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده بهتری نمایند باید قادر به وارد کردن میزان بیشتری از فاز آلی (غیر قطبی) به فاز آبی (قطبی) باشند. به همین منظور هر چه سطح سلول باکتری آب گریزتر باشد یا به عبارت دیگر هیدروفوبیسیته سطح سلولی بیشتر باشد، تولید بیوسورفکتانت بیشتر می شود و می تواند میزان بیشتری از هیدروکربن ها را مورد استفاده قرار دهد.

تولید بیوسورفکتانت علاقه مندی زیادی در سال های اخیر برای افزایش استخراج نفت و از بین بردن آلودگی های نفتی ایجاد کرده است. چسبندگی باکتری ها به هیدروکربن حلالیت هیدروکربن را افزایش داده و تجزیه آن را تحریک می نماید. پروتی (Pruthi) و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که سویه های گرم منفی قادر به اتصال به هیدروکربن های متعدد می باشند. آنها ثابت کردند که بیش از ۸۰٪ *سودوموناس*، *باسیلوس* و *اسینتوباکترها* (*Acinetobacter*) به هیدروکربن های متعدد می چسبند (۱۶).

در این تحقیق هیدروفوبیسیته سطح سلول و میزان فعالیت امولسیونه کنندگی در باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت غربالگری شده نیز نشان داد که باکتری هایی که دارای سطح سلولی آب گریز بالاتری هستند می توانند بیوسورفکتانت بیشتری تولید کنند. از طرف دیگر این باکتری ها میزان فعالیت آمیزندگی بیشتری نیز از خود نشان دادند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سویه های جداسازی شده دارای سطح آب گریزی قابل توجهی هستند و در نتیجه پتانسیل بالایی

در تولید ترکیبات فعال سطحی و تجزیه ترکیبات هیدروکربنی از جمله نفت و گازوئیل دارند. از طرفی این سویه ها می توانند به منظور پاکسازی آلودگی های محیطی و نیز در صنایع سورفکتانت سازی مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات کرمان و گروه زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Besson F, Michel G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis:* Evidence for amino acid activating enzymes. Biotechnol Lett.1992; 14(11): 1013-1018.

2. Islam Janpen H, Kitten A, Dassara Y. Screening of biosurfactants producing bacteria and optimization of production process..Basic J Microbiol. 2000; 1-3.

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

4. Lang S. Biological amphiphiles, microbial biosurfactant. Curr Opin Colloid Inter Sci. 2002; 7 (2): 12-20.

5. Banat IM, Makkar RS, Cametora SS. Potential commercial application of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol. 2000; 53: 495-508.

6. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol Advances. 2006; 24(6): 604-620.

7. Haddad NI, Wang J, Mu B. Identification of a biosurfactant producing strain *Bacillus subtilis* HOB2. Protein Pept Lett. 2009; 16(1): 7-13.

8. Gautam KK, Tyagi VK. Microbial surfactants. A Review. Oleo Sci. 2006; 55(4): 155-166.

9. Christofi N, Ivshina IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. Appl Microbiol. 2002; 93(6): 915-929.

10. Rahman KSM, Rahman TG, Lakshmanaperumalsmy P, Marchant R, Banat IM. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. Acta Biotechnol. 2003; 23(4): 335-345.

11. Alef K, Nannipieri P. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press New York. 1995; 569-576.

12. Gerson DF. Biosurfactants production, properties, applications (surfactant science) CRC Press. The 1st edition. 1998; 269-270.

13. Talaie AR. Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms. Sci Res Azad Uni Branch Ahvaz. 2008; 21(75): 20-27. [In Persian]

14. Bodour AA, Miller Maier RM. Application of a modified dropcollapse technique for surfactant quantization and screening of biosurfactant-producing microorganisms. Microbiol Methods. 1998; 32: 273-280.

15. Batista SB, Mounteer AH. Isolation and characterization of biosurfactant / bioemulsifier producing bacteria from petroleum contaminated sites. Bioresource Technol. 2006; 97: 868-875.

16. Pruthi V, Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains a cell surface hydrophobicity technique. Biotechnol Tech. 1997; 11(9): 671-674.

17. Akhavansepahy A, Haghighat S, Pasdar H. Ability of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis BCRC* and *Bacillus subtilis HAZ2*. Med Sci. 2010; 35(1): 67-74. [In Persian]

18. Mishra S, Sarma PM, Lal B. Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm. FEMS Microbiol Lett. 2004; 235(2): 323-331.

19. Widiarti W, Hasbi M. Isolation of biosurfactant producer bacteria from central mud treatment facility (cmtf) pt. bumisiakpusako, riau province. Int Seminar Biotechnol. 2010, 333-395.

20. Bernbeimer AW, Avigad LS. Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. J Gen Microbiol. 1970; 61(3): 361-369.

21. Mulligan CN, Cooper DG, Neufeld RJ. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. J Fermentation Technol. 1984; 62(4): 311-314.

22. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Method. 2004; 56(3): 339-347.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 1, April 2013

Original Article

Isolation, identification and characterization of biosurfactant-producing *Shewanella* species from the Persian Gulf

Marzieh Adeli[1], Mehdi Hassanshahian[2], Ashraf Kariminik[3]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[3] Lecturer, Department of Microbiology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Biosurfactants are a group of amphipathic molecules produced by microorganisms, which are constructed from two portions: hydrophilic and hydrophobic; these compounds increase biodegradation of insoluble pollutants. This study was carried out to isolation, identification and characterization of biosurfactant-producing *Shewanella* species from the Persian Gulf.

Material and Methods: In this study, 25 biosurfactant producing strains were isolated from polluted sediments and seawater from Persian Gulf. Biosurfactant producing bacteria were isolated in Bushnell-Hass medium enriched with diesel. Then, dominant strains were screened by using quantitative and qualitative tests, including hemolysis in blood agar, oil spreading, drop collapse, emulsification activity and BATH test. Probable strains were identified by biochemical methods. Finally, dominant biosurfactant producing bacteria were recognized by using universal primers for 16s rRNA and sequencing .

Results: In total of seven biosurfactant producing bacteria were isolated. Two of them, *Shewanella* E14 and *Shewanella* N4, were identified as predominant strains. Also, *Shewanella algae* and *Shewanella upenei* confirmed by molecular method.

Conclusion: Based on the results, the isolates were able to produce biosurfactants and at the same time were able to degrade hydrocarbons. Therefore, the evaluation of applied potential of these strains for bioremediation of oil spillages is recommended.

Keywords: Biodegradation, Biosurfactant, Bioremediation, Marine environment.

Correspondance to: Marzieh Adeli

Tel: +989378780020

E-mail: mar.a2012@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(1): 53-61.