تولید بیوسورفکتانت در اکتینومیست‌های هالوتولرانت جداشده از خاک دریاچه نمک قم

سید سهیل آقائی[1*]، فرزانه فخاریان[2]، محمدرضا ذوالفقاری[1]، محمد سلیمانی درجاق[1]

۱. عضو هیات علمی تمام وقت گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۰۸)

چکیده

سورفکتانت‌ها به طور گسترده ای در صنایع مختلف کاربرد دارند. علاوه بر مشکلات زیستی ناشی از این سورفکتانت‌ها، ناکارآمدی آن‌ها در برخی از زمینه‌ها موجب توجه محققین به سمت استفاده از بیوسورفکتانت‌ها گردیده است. سورفکتانت‌ها با منشا زیستی، ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ، مخمر و باکتری‌ها هستند که با قرار گرفتن در بین سطوح، باعث کاهش کشش سطحی و بین سحطی می‌شوند. از جمله مزیت‌های بیوسورفکتانت‌ها نسبت به سورفکتانت‌های سنتتیک سازگاری آن‌ها با محیط زیست، قابلیت تجزیه پذیری به صورت طبیعی، سمیت پایین، عملکرد اختصاصی، فعالیت بالا تحت شرایط سخت دمایی، فشار و اسموالریتی بالا و هم چنین قدرت کف کنندگی بالای آن‌هاست. اکتینومیست‌های نمک دوست می‌توانند در خاک‌های شور یا محیط‌های آبی با درصد بالای نمک مانند دریاچه نمک قم حضور داشته باشند. میکروارگانیسم‌ها زمانی که در شرایط افراطی و استرس قرار می‌گیرند، برای زنده ماندن نیاز به سازگاری با شرایط جدید دارند. این سازگاری مستلزم تولید برخی متابولیت‌های جدید توسط میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. از آن جایی که شوری یک فاکتور استرس برای باکتری به حساب می‌آید، به جداسازی اکتینومیست‌های مولد بیوسورفکتانت از خاک‌های نمکی پرداخته شد .در این تحقیق ۱۱۱ سویه اکتینومیست از خاک دریاچه نمک قم جداسازی شدند که از این بین ۱۱ جدایه توانستند نمک ۱۱ ٪ را تحمل کنند و در گروه هالوتولرانت جای بگیرند. سپس بر اساس تست‌های بیوشیمیایی، جدایه‌های اکتینومیست هالوتولرانت برای تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به تست‌های رایج بررسی تولید بیوسورفکتانت (رشد بر روی منبع هیدروفوب، همولیز گلبول قرمز، کنار زدن نفت، سنجش ظرفیت امولسیون کنندگی، انهدام قطره روغن و سنجش کشش سطح) ۸ جدایه اکتینومیست به عنوان جدایه‌هایی با توان تولید بیوسورفکتانت انتخاب شدند. با توجه به نتایج به دست آمده، جدایه ۹ به عنوان بهترین جدایه انتخاب گردید.

کلیدواژگان

آکتینومیست، بیوسورفاکتانت، تحمل‌کننده نمک، دریاچه نمک، قم.

* نویسنده مسئول، رایانامه: soheilaghaee@yahoo.com

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها موجوداتی هستند که در زیستگاه‌های[1] اکولوژی مختلفی وجود دارند. بنابراین دارای توانایی‌های منحصر به فردی هستند که آن‌ها را قادر به سازگاری در این محیط‌ها و گاهی شرایط افراطی[2] از لحاظ pH و دما و شوری می‌سازد (Valantine et al., 2007, Khopade et al., 2012).

یکی از مهم‌ترین دلایل سازگاری میکروارگانیسم‌ها و رشد سریعشان در این محیط‌ها دارا بودن نسبت بالای سطح به حجم است که به آن‌ها اجازه جذب مواد غذایی و دفع مواد زاید را می دهد. این توانایی با تولید عوامل فعال سطحی[3] با نام بیوسورفکتانت[4] میسر می شود (Rosenberg, 2001, Manivasagan et al., 2013).

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ و مخمر و باکتری‌ها هستند، (Anadaraj etal., 2010, Gandhimathi, R. et al., 2009, Rismani et al., 2006) و می‌توانند در بین سطوح[5] قرار گیرند وکشش سطحی وبین سطحی را کاهش دهند (Joshi *et al.*, 2008). از آنجاییکه این ترکیبات دارای دو بخش آبگریز[6] و آبدوست[7] اند، به آنها دوگانه دوست[8] گفته می‌شود (Joshi et al., 2008; Karanth et al.,1999). این ترکیبات آمفی پاتیک روی سطوح زنده تولید می‌شوند و می‌توانند به خارج سلول هم ترشح شوند و در بین فازهای مایع تجمع یابند و کشش سطحی و بین سطحی را کاهش دهند (Karanth, 1999, Desai & Banat, 1997).

سرهای هیدروفوب و هیدروفیل به عنوان امولسیفایر[9] عمل کرده و باعث افزایش حلالیت هیدروکربن‌های نامحلول در آب می‌شود و ازاین جهت در پاکسازی محیط از آلاینده‌های نفتی[10] نقش دارند (Darvishi et al., 2011, Ron, Rosenberg et al., 2002 , Urum et al., 2004, Cameotra et al., 2003, Koch et al., 1991, Banat et al., 2002) بیوسورفکتانت‌ها در گروه‌های گلیکولیپیدی، لیپوپپتیدی، اسید چرب، فسفولیپید، لیپوپروتئین، لیپوپلی ساکارید، مایکوئیک اسید و ترکیبات پلیمری قرار می‌گیرند (Makkar, 2011, Kitamoto, 2001, Banat et al., 2000).

برخی بیوسورفکتانت‌ها دارایوزن مولکولی پائین مثل گلیکو لیپید،لیپوپپتید هستند و برخی دیگر با وزن مولکولی بالا مثل پلی ساکارید،لیپوپلی ساکارید و لیپوپروتئین‌ها می‌باشند (Franzetti et al., 2012).

بیوسورفکتانت‌ها یکی از مهم ترین محصولات بیوتکنولوژی به حساب می‌آیند که برای مصارف صنعتی و پزشکی مورد استفاده قرار گرفته اند.

به طور کلی بیوسورفکتانت‌ها به جهت توانایی‌هایی نظیر کاهش کشش سطحی و کشش بین سطحی یا قدرت امولسیون کنندگی دارای پتانسیل استفاده در زمینه‌های مختلفی اعم از صنایع شیمیایی، صنایع نفت و پتروشیمی، پلاستیک‌ها و مواد کامپوزیتی، شوینده‌ها (دترجنت‌ها) و پاک کننده‌ها، صنعت نساجی، ساخت و دباغی چرم و خز، صنعت رنگ و

1. Ecological niche
2. Extreme environment
3. Surface active agent
4. Biosurfactants
5. Interface
6. Hydrophobe
7. Hydrophile
8. Amphipathic
9. Emulsifier
10. Oil remediation

لاک و الکل و سایرمحصولات پوشش دهنده، کاغذ و سایر محصولات سلولزی، زمینه کشاورزی، فرآیندهای زیستی، دارویی، صنایع غذایی و محصولات آرایشی و پوستی هستند. در زمینه دارویی از بیوسورفکتانت‌ها به عنوان ضد ویروس[1]، ضد قارچ[2]، ضد باکتری[3]، ضد تومور و سرطان ، ضد توکسین،تنظیم کننده سیستم ایمنی[4]،تولید واکسن، ژن تراپی و عامل بازدارنده تشکیل بیوفیلم استفاده می‌شوند (Williamsuk et al., 2009, Rodrigues et al., 2006, Singh et al., 2004, Muligan et al., 2001, Rosenberg, 2001, Banat et al., 2000).

بیوسورفکتانت‌ها نسبت به سورفکتانت‌های سنتزی که از مشتقات نفتی اند وبسیار سمی و غیر قابل تجزیه می‌باشند، مزیت‌های بسیاری دارند (Kiran et al., 2009).

از جمله این مزیت‌ها سازگاری آن‌ها با محیط زیست[5]، قابلیت تجزیه‌پذیری به صورت طبیعی[6]، سمیت پایین، عملکرد اختصاصی، فعالیت بالا تحت شرایط سخت دما، فشار و اسمولاریتی بالا و همچنین قدرت کف کنندگی بالای آن‌هاست (Kiran et al., 2010, Kumar et al., 2006, Gandhimathi et al., 2009).

تاکنون گزارش‌های بسیار محدودی در زمینه تولیدکنندگان بیوسورفکتانت در محیط‌های بسیار نمکی وجود داشته است (Cameotra, Makkar, 1998).

از جمله بهترین گروه‌های میکروبی نمک دوست مولد بیوسورفکتانت باسیلوس[7]ها هستند. گونه‌های باسیلوس قادر به تولید بیوسورفکتانت لیپوپپتیدی به نام سورفاکتین[8] هستند که یکی از قوی ترین بیوسورفکتانت‌های شناخته شده تا به امروز می‌باشد (Kiran et al., 2010). سورفاکتین و سایر بیوسورفکتانت‌های لیپوپپتیدی مانند استرپتوفاکتین[9] و گرامیسیدین[10] که توسط دیگر میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند، دارای توان آنتی بیوتیکی بالایی می‌باشند (Pey poux et al., 1999).

باکتری دیگری که در این گروه می‌توانیم نام ببریم‌هالوموناس[11] می‌باشد. هالوموناس‌ها باکتری‌های گرم منفی هستند که قادر به تشکیل اسپور نمیباشند و بیشتر در محیط‌های آبی حضور دارند (Kaye, Baross, 2000, Donio et al., 2013).

یکی دیگر از بهترین میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت استرپتومایسزها[12] هستند که از شاخه اکتینوباکتریا[13] می‌باشند. این ارگانیسم‌ها در دسته ارگانیسم‌های خارق العاده ای که منبع تولید ترکیبات فعال زیستی[14] هستند قرار می‌گیرند (Deepika et al., 2010). اکتینوباکتریا همچنین کاربردهای زیادی در زمینه محیطی، زیست دارویی و صنعتی دارند. اکتینوباکتریاها متابولیت‌های منحصر به فرد و پیچیده‌ای را تولید می‌کنند. در میان جوامع میکروبی اکتینوباکتریاها به علت تولید مقدار زیاد متابولیت‌های ثانویه شهرت زیادی یافته اند و تا به حال همتایی برای آن‌ها پیدا نشده است (Nathan et al., 2004).

1. Antiviral
2. Antifungal
3. Antibacterial
4. Immunomodulator
5. Ecofriendly
6. Biodegradation
7. Bacillus
8. Surfactin
9. Streptofactin
10. Gramicidin
11. Halomonas
12. Streptomyces
13. Actinobacteria
14. Bioactive compound

اکتینوباکتریا پروکاریوت‌های رشته ای و گرم مثبت هستند که دارای G + C بالایی در محتوای ژنتیکی خود هستند (69-78%) (Deepika et al., 2009).

اکتینوباکتریا به خصوص گونه‌های استرتپتومایسز اغلب برای تولید متابولیت‌های ثانویه غربالگری[1] می‌شوند.

جنس استرپتومایسز برای اولین بار در سال ۱۹۴۳ توسط واکسمن و هنریک شناسایی و گزارش شد (Waksman, Henrici, 1943).

استرپتومایسزها ارگانیسم‌های هوازی و شیمیوارگانوتروفی هستند که دارای متابولیسم اکسیداتیوند و توانایی تولید کلنی‌های پودری ودانه ای و مخملی را دارند (Stanley et al., 2001).

استرپتومیست‌های نمک دوست می‌توانند در خاک‌های شور یا محیط‌های آبی با درصد بالای نمک مانند دریاچه نمک قم حضور داشته باشند.

تاکنون در داخل کشور بر روی جداسازی و شناسایی انواع باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت در چنین محیط‌هایی کار تحقیقی خاصی انجام نشده است. از سوی دیگر، شناسایی و تعیین ویژگی‌های متابولیت بیوسورفکتانت در سویه‌های بومی کشور به خصوص در استرپتومیست‌های نمک دوست، زمینه پژوهشی جدید و تازه ای محسوب می‌گردد.

بنابر این انجام این تحقیق قدم‌های موثری در بدست آوردن اطلاعات لازم و مفید در به کارگیری این سویه‌ها در تولید بیوسورفکتانت و کاربردی نمودن این محصولات زیستی در صنایع مختلف می‌باشد.

1. Screening

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه

ابتدا مناطق مورد نظر دریاچه نمک مشخص و به طور تصادفی از خاک اطراف دریاچه به روش زیگزاک نمونه گیری انجام شد.

برای جمع‌آوری نمونه‌های خاک، ابتدا بخش‌های سطحی خاک (حدود ۵ سانتی متر) کنار زده شده و با بیلچه کاملا تمیز و استریل از عمق ۵ تا ۱۵-۲۰ سانتی متر خاک برداشت کرده و در بسته‌های پلی تن (Polythene) استریل گذاشته شد. سپس تمامی نمونه‌ها در دمای ۴° سانتیگراد قرار گرفت و به آزمایشگاه انتقال یافت (Deepika et al., 2010, Jaysree et al., 2013).

در این بخش از کار، حدود ۵۰ نمونه خاک جمع‌آوری گردید. در هنگام نمونه برداری پارامترهای میزان شوری، pH بررسی گردید.

شکل ۱- جمع آوری نمونه‌های خاک

غربالگری و غنی سازی و جدا سازی اولیه

ابتدا نمونه‌ها را الک کرده و سپس ۱ گرم خاک از هر نمونه وزن شد و داخل ارلن حاوی بافر فسفات (pH=7) و توئین ۸۰ (Tween 80) ریخته شد. سپس ارلن را به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفت. پس از ته نشین شدن رسوبات

خاک، از مایع رویی حاوی سلول‌های باکتری تهیه رقت انجام شد.

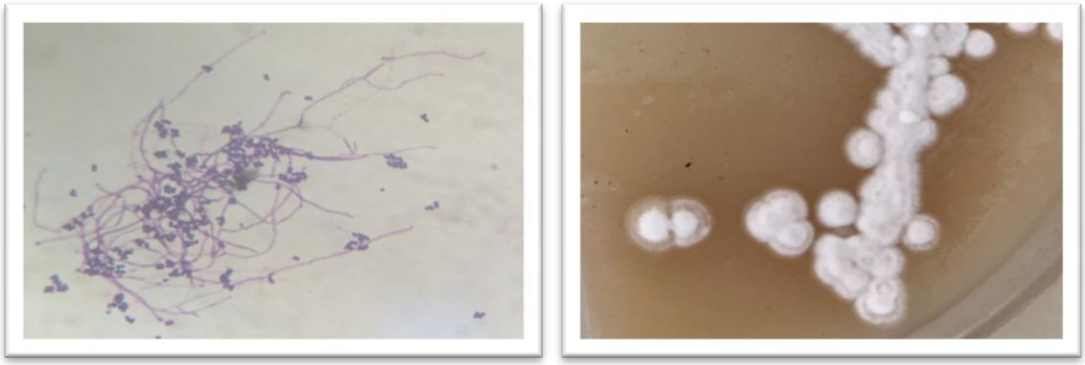
سپس ۰,۱ میلی لیتر از هر رقت را روی محیط آگار حاوی کازئین و نشاسته (Starch Casein Agar) که یک محیط غنی کننده اکتینومیست است (ISP International Streptomyces Project) در شرایط استریل با روش Spread کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۲۸°-۳۰ گرماگذاری گردید (Collins et al.,1995).

شناسایی اولیه کلنی‌های احتمالی اکتینومیست

کلنی‌های اکتینومیست را می‌توان از نظر مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بر اساس دستورالعمل‌های (ISP) بررسی کرد (Shirling et al., 1996).

۱. بررسی ماکروسکوپی: در این مرحله کلنی‌های احتمالی اکتینومیست که از نظر مورفولوژی با دیگر کلنی‌ها متفاوت بودند انتخاب شدند. این کلنی‌ها ممکن است ظاهری خشن، صاف، سفت، چسبنده و یا پودری شکل داشته باشند و با رنگ‌های مختلف مثل سفید،خاکستری و یا زرد دیده شوند .

۲. بررسی میکروسکوپی: سپس از آن‌ها رنگ آمیزی گرم انجام شد و هیف و کندیا اکتینومیست‌ها مشاهده گردید.



شکل ۲- اشکال ماکروسکوپی و میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی گرم بزرگ نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری

خالص سازی و نگهداری

به منظور خالص سازی، از کلنی‌های احتمالی اکتینومیست روی محیط‌های (ISP) کشت خطی انجام شد و برای مطالعات بعدی نگهداری گردید.

شناسایی جدایه‌ها در حد جنس

تست‌های بیوشیمیایی: در این مرحله تست‌های بیوشیمیایی و افتراقی مطابق با آخرین چاپ کتاب برگی (Bergey's manual) بر روی کلنی‌های تک و خالص جدایه‌های مرحله قبل انجام شد. تست‌های دیگر مانند تست حرکت، تولید گاز، تجزیه قند و چربی و غیره نیز مورد بررسی قرار گرفت (Deepika et al., 2009).

بررسی تولید بیوسورفکتانت در جدایه‌ها

در این مرحله توانایی تولید بیوسورفکتانت در جدایه‌ها با انجام آزمایش‌های ذیل بررسی و کلنی‌های هدف انتخاب شدند.

در این مرحله توانایی تولید بیوسورفکتانت در جدایه‌ها با انجام آزمایش‌های ذیل بررسی و کلنی‌های هدف انتخاب شدند.

۱. تولید همولیزین[1]
۲. میزان انهدام قطره روغن معدنی[2]
۳. تولید لیپاز
۴. پخش روغن[3]
۵. فعالیت امولسیون کنندگی[4]
۶. اندازه گیری کشش سطحی

تولید همولیزین

کشت خالص اکتینومیست‌ها در محیط آگار خون دار حاوی ۵٪ خون انسان کشت داده شد و سپس به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه ی سانتیگراد گرماگذاری گردید.

با مشاهده هاله همولیز بتا اطراف کلنی‌ها، میزان تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفت. زیرا دانشمندان معتقدند ارتباط مستقیمی بین فعالیت همولیتیک باکتری‌ها با تولید بیوسورفکتانت وجود دارد (Mulligan et al., 1984, Banat 1995, Carrillo, et al., 1996).

انهدام قطره روغن

در این مرحله تولید بیوسورفکتانت با تست کیفی انهدام قطره روغن مورد غربالگری قرار گرفت. بدین صورت که ۲ میکرولیتر روغن به پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه ای[5] افزوده (Youssef et al., 2004) و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۱ ساعت هم تراز[6] گردید. سپس ۵ میکرولیتر از سوپرناتانت کشت اضافه شد و پس از ۱ دقیقه شکل قطره روغن را مورد بررسی قرار گرفت. در صورتی که قطره روغن پس از افزودن سوپرناتانت کشت خالص جدایه مورد نظر از بین برود، نتیجه تولید بیوسورفکتانت مثبت تلقی می‌شود (Deepika and Kannabiran 2010).

1. Hemolytic test
2. Drop collapse
3. Oil displacement – Oil spreading
4. Emulsification activity
5. 96-well microtiter
6. Equilibrate

لازم به ذکر است برای تهیه سوپرناتانت، کشت جدایه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت مایع مناسب برای اکتینومیست (ISP1) کشت داده شدند و سپس برای استخراج بیوسورفکتانت، محیط کشت مایع به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

تولید لیپاز

در این مرحله بررسی تولید لیپاز در محیط حاوی توئین ۸۰ انجام شد. پس از گذشت مدت ۹-۷ روز، به بررسی هاله صابونی ایجاد شده اطراف کلنی‌ها پرداختیم.

تست گسترش روغن

برای انجام این تست، سوپرناتانت کشت مورد استفاده قرار گرفت. ۲۵ میکرولیتر آب مقطر در پلیت ریخته و۲۰ میکرولیتر نفت خام[7] به عنوان منبع هیدروکربن به آن افزوده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت کشت به مجموع اضافه گردید. در این تست، از توئین ۸۰ به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پخش روغن به عنوان نتیجه مثبت تلقی و در واحد سانتیمتر اندازه گیری شد.

شکل ۳- گسترش نفت خام توسط سوپرناتانت کشت ۹ روزه باکتری

7. Crude oil

فعالیت امولسیون کنندگی

به منظور محاسبه E_{24}، ۴ میلی لیتر محیط کشت SCM عاری از سلول به همراه ۶ میلی لیتر از هیدروکربن مورد بررسی در یک لوله آزمایش درب دار و مدرج ریخته شد. محتویات لوله آزمایش به مدت دو دقیقه در دور بالا با شیکر لوله به هم زده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط سکون قرار داده شدند و پس از ۲۴ساعت این شاخص از تقسیم ارتفاع لایه ی امولسیون شده بر ارتفاع کل ضرب در ۱۰۰ همانند فرمول زیر محاسبه گردید (Cooper and Goldenberg 1987).

$$EV(\%) = \text{Emulsion height (cm)} / \text{Total liquid volume} \times 100$$

در این تست هیدروکربن‌های متفاوتی هم چون نفت خام، گازوئیل و کروزن مورد بررسی قرار گرفتند.

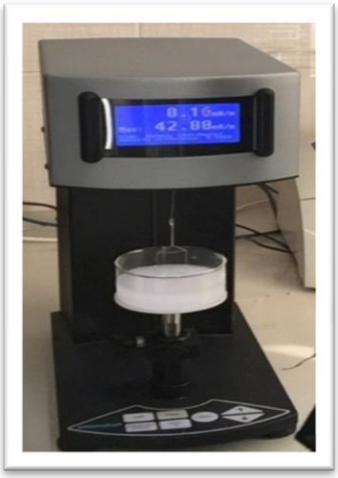
شکل ٤- سنجش ظرفیت امولسیون کنندگی نفت خام و گازوئیل

اندازه گیری کشش سطحی

سنجش کاهش کشش سطحی به وسیله دستگاه تنسیومتر[1] به عنوان معیار اصلی تولید ترکیبات فعال سطحی زیستی در نظر گرفته شد. بدین منظور هریک از جدایه‌های انتخاب شده به ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت SCM استریل تلقیح شد و سپس مقدار ۰/۵ میلی لیتر روغن زیتون استریل به آن اضافه گردید و به مدت ۹ روز در دمای ۳۰ – ۲۸ درجه سانتیگراد بر روی انکوباتور شیکر با دور ۱۷۰ rpm قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده، کشش سطحی نمونه مورد نظر اندازه گیری گردید.

کشش سطحی به روش Du Nouy Ring Method و با استفاده از دستگاه تنسیومتر موجود در مرکز پژوهشی فن آوری‌های نوین در مهندسی علوم زیستی دانشگاه تهران اندازه گیری شد. در روش مذکور حلقه دستگاه که از جنس آلیاژ پلاتین می‌باشد در مایع غوطه ور می‌گردد، نیروی وارد بر حلقه غوطه ور شده بر روی صفر تنظیم می‌گردد و حلقه به آرامی از درون مایع به خارج کشیده می‌شود. نیروی مورد نظر برای خارج کردن حلقه از سطح مایع، به عنوان کشش سطحی مایع در نظر گرفته می‌شود. برای انجام این تست، مقدار ۲۵ میلی لیتر از کشت ۹ روزه هر یک از نمونه‌ها در ظرف دستگاه ریخته شد . پس از هر مرحله اندازه گیری، حلقه و ظرف نمونه دستگاه به دقت با آب مقطر و سپس استون شستشو داده شد و برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. بهتر است برای شستشوی ظرف نمونه از دترجنت استفاده نشود زیرا باعث خطا در نتیجه آزمایش می‌شود (Banat 1995).

1. Tensiometer



شکل ۵- دستگاه تنسیومتر

نتایج

پس از کشت سوسپانسیون خاک بروی محیط استارچ کازئین آگار کلنی‌های مشکوک رنگ آمیزی شدند و تست‌های بیوشیمیایی لازم مطابق با کتاب برژی انحام شد.در این میان ۵۰ سویه اکتینومیست جداسازی شد. سپس به مجیط استارچ کازئین آگار نمک با درصدهای متفاوت اضافه شد. حدودا ۱۵ سویه تحمل نمک نسبتا بالایی داشتند که در جدول زیر مشاهده می‌شود.

جدول ۱- رشد جدایه ها ی اکتینومیست در درصد های متفاوت نمک

جدایه‌ها	درصد نمک			
	٪۵	٪ ۸	٪۹	٪۱۰
۱	+	–	–	–
۲	+	–	–	–
۳	+	–	–	–
۴	+	+	+	–
۵	+	+	+	–
۶	+	–	–	–
۷	+	+	+	+
۸	+	+	+	+
۹	+	+	+	+
۱۰	+	+	+	–
۱۱	+	+	+	+
۱۲	+	+	+	+
۱۳	+	+	+	+
۱۴	+	+	+	+
۱۵	+	+	–	–

سپس اکتینومیست‌ها برای تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل بر اساس قطر هاله در تست پخش روغن به صورت زیر می‌باشد.

جدول ۲- قطر هاله نفت کنار زده شده

جدایه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
قطر هاله نفت کنار زده شده (cm)	۱	۲	۴	۳	۲	۲	۴	۲	۷	۲	۲	۲	۶	۵	۵

جدول ۳- سنجش فعالیت امولسیون کنندگی: سوپرناتانت کشت ۹ روزه جدایه‌ها با هیدروکربن‌های مختلف

جدایه	نفت خام	گازوئیل	کروزن
۱	۶۰	۱۶	۱۶
۲	۱۵	۱۲	۱۲
۳	۱۸	۵	۵
۴	۳۷	۳۷	۲۵
۵	۵۰	۳۸	۴۲
۶	۴۸	۲۵	۲۰
۷	۲۳	۲۰	۱۵
۸	۳۰	۲۵	۳۲
۹	۸۴	۸۰	۷۲
۱۰	۳۵	۲۸	۱۸
۱۱	۱۲	۵	۲۵
۱۲	۳۷	۲	۲
۱۳	۳۷	۱۲	۱۲
۱۴	۵۰	۱۰	۱۵
۱۵	۴۲	۱۸	۲۰

جدول ٤- نتایج حاصل از اندازه گیری کشش سطحی جدایه‌های اکتینومیست هالوتولرانت

جدایه	کشش سطحی mN/m
۱	۵۰,۲
۲	۳۷,۶
۳	۴۴,۶
۴	۳۹,۱
۵	۴۹,۴
۶	۳۸,۱
۷	۴۴,۶
۸	۳۴,۸
۹	۲۸,۱
۱۰	۵۱,۲
۱۱	۴۵,۲
۱۲	۳۷,۸
۱۳	۳۵,۴
۱۴	۳۴,۸
۱۵	۳۸,۵

بحث

با توجه به نتایج حاصل مشاهده می‌شود که از بین نمونه‌های خاک دریاچه نمک قم، ۵۰ جدایه اکتینومیست شناسایی شدند که در این بین حدودا ۱۵ جدایه هالوتولرانت بودند و توانستند ۱۰ ٪ نمک را تحمل کنند. همچنین با توجه به تست‌های اولیه بیوسورفکتانت حدود ۷ جدایه توانایی تولید بیوسورفکتانت بالایی را از خود نشان دادند که از این بین جذایه ۹ بهترین جدایه تولید کننده بیوسورفکتانت شناخته شد.

در مطالعات قبلی که در سال ۲۰۱۳ انجام گرفته است Manivasagan و همکارانش باکتری *Streptomyces sp.* MAB36 را جداسازی کردند که قدرت رشد و تولید بیوسورفکتانت در غلظت نمک ۰,۵ – ۵ ٪ را دارا بود. آن‌ها دریافتند که در غلظت نمک ۵ ٪ شاخص امولسیون کنندگی این باکتری E24 = 23 % بود. همچنین بیوسورفکتانت گلیکولیپیدی این باکتری دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل برخی پاتوژن‌های انسانی می‌باشد (Manivasagan et al., 2013). با توجه به اهمیت بیوسورفکتانت‌ها در صنایع مختلف و کاربرد گسترده آن‌ها در علوم پزشکی، دارویی، افزایش بازیافت نفت و پاکسازی محیطی و با عنایت به تحقیقات مهمی که در مورد جداسازی و شناسایی سویه‌های میکروبی مولد این ترکیبات فعال زیستی در سراسر دنیا انجام گرفته است،هدف اصلی و مهم این طرح این بوده است که با انتخاب خاک از زیستگاه نمکی منحصر به فردی نظیر دریاچه نمک قم، جداسازی و شناسایی اکتینومیست‌های هالوتولرانت انجام و سپس انواع تولید کننده بیوسورفکتانت در آن‌ها غربالگری و مطالعه شود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل نشان می‌دهد که خاک دریاچه نمک قم دارای اکتینومیست‌های هالوتولرانت مولد بیوسورفکتانت می‌باشد و با توجه به کاربرد گسترده بیوسورفکتانت در جوامع امروزی می‌توان از این جدایه‌ها در صنایع مختلف استفاده کرد.

منابع و مآخذ

1. Anandaraj B, Thivakara P., 2010. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. J. Biosci Tech, Vol 1 (3): 120-126.
2. *Cameotra SS, Bollag JM., 2003*. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons.*Crit Rev Environ Sci Technol 30*:*111*–126.
3. Collins CH, Lyne PM, Granje JM., 1995. In: Microbiological methods, Butterworth and. Heinemann Publishers, London, pp: 129-31.
4. Darvishi P, AyatollahiS, Mowla, D, NiaziA., 2011. Biosurfactant production underextreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. Colloids and Surfaces B. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.011.
5. Deepika TL, Kannabiran K., 2009. A report on antidermatophytic activity of actinomycetes isolated from Ennore coast of Chennai, Tamil Nadu, India. International Journal of Integrative Biology,6: 132-136.
6. Deepika TL, Kannabiran K., 2009. A report on antidermatophytic activity of actinomycetes isolated from Ennore coast of Chennai, Tamil Nadu, India. International Journal of Integrative Biology,6: 132-136.
7. DeepikaTL, Kannabiran K, Dhanasekaran., 2009. Diversity of antidermatophytic Streptomyces in the coastal region of Chennai, Tamil Nadu, India. Journal of Pharmacy Research, 2: 22-26.
8. Donio MB, Ronica SF, Viji VT, Velmurugan S, Jenifer JA, Michaelbabu M, Citarasu T., 2013.Halomonas sp. BS4, A biosurfactant producing halophilic bacterium isolated from solar salt works in India and their biomedical importance.Asian Pac J Trop Med.;6(11):876-83. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60156-X.
9. Gandhimathi R., Seghal K, Hema TA, Joseph S, Rajeetha RT, Shanmughapriya PS., 2009. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge- associated marine actinomycetes Nocardiopsis albaMSA10. Bioprocess Biosystems Engineering,DO I 10.1007/s00449-009-0309-x.
10. Jaysree RC,. 2013, Biosurfactant production by halophilic bacteria. Int J Pharm Bio Sci 4(4): (B) 904 – 912.
11. Joshi S, Bharucha C, Desai AJ., 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate Bacillussubtilis 20B. Bioresour Technol 99:4603–4608.
12. Karanth N, Deo P, Veenanadig N., 1999.Microbial production of biosurfactants and their importance. Cur Sci 77:116–126.
13. Kaye JZ, Baross JA., 2000. High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. FEMS Microbiol Ecol 32:249–260.
14. KhopadeA, BiaoR, LiuXY, MahadikK, Zhang L, Kokare C., 2011. Production and characterization of biosurfactant from marine Streptomyces species B3. J Colloid Interface Sci 367:311–318.
15. Kiran GS, Hema TA, Gandhimathi R, Rajeetha RT, Natarajaseenivasana K., 2009. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus Aspergillus ustus MSF3. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 73: 250-256.
16. Kiran GS, Thomas TA, Selvin J, Sabarathnam B, Lipton A.,2010.Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine Brevibacterium aureum MSA13 in solid state culture. Bioresour Technol 101:2389–2396.
17. Kumar KP, Muralidhar M& Nagaraju J., 2006. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, Bombyx mori from Chinese Bombyx mandarina and paternal inheritance of Antheraea proyleimitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 40(2): 419–427.

18. Makkar RS, Cameotra SS , 1998. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of Bacillus subtilis. J Ind Microbiol Biotechnol 20: 48±52.

19. Makkar RS, CameotraSS, Banat IM., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express 1, 5.

20. Manivasagan P, Sivasankar P, Venkatesan V et al.,2013.Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, Streptomyces sp. MAB36. Bioprocess Biosyst Eng . DOI:10.1007/s00449-013-10486.

21. Mulligan CN, Cooper DG , Neufeld RJ.,1984. Selection of microbes producing bio-surfactants on media without hydrocarbons. J. Ferment. Technol. 62(4), 311-314.

22. Peypoux F, Bonmatin J, Mand Wallach J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl Microbiol Biotechnol 51:553–563.

23. Rismani E, Fooladi J, Ebrahimi Por GH., 2006. Biosurfactant production in batch culture by a Bacillus licheniformis isolated from the Persian gulf. Pak J Biolog Sci 9: 2498-2502.

24. Ron Ez, Rosenberg E., 2001. Natural roles of biosurfactants. Environ. Microbial., 3: 229-236.

25. Shirling EB, Gottlieb D., 1966. Methods, classification, identification and description of genera and species. Vol. 2, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 61-292.

26. Stanley TW, Elizabeth M, Sharpe J, Holt G., 2001. Bergeys's manual of systematic bacteriology, 2nd edition. Williams and Wilkins. ISBN: 978-0-387-98771-2.

27. *Valentine DL., 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. Nat Rev Microbiol 5*(4):*316–323*.

28. WaksmanSA, Henrici AT., 1943. Thenomenclature and classification of the actinomycetes.Journal Bacteriology, 46: 337- 41.

29. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ.,2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Methods 56:339–347.