مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی سویه تولید کننده بیوسورفکتانت از جنس آسینتوباکتر و بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت تولید شده از آن بر روی برخی از باکتری های گرم مثبت و منفی در محیط آزمایشگاه

محمد جواد مصطفی پور رمی*[۱]، سلمان احمدی اسبچین[۲]، معین صفری[۳]

[۱] کارشناس ارشد میکروب شناسی،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
[۲] استادیار میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

چکیده :

سابقه و هدف: بیوسورفکتانتها ترکیبات زیستی آمفیفیلیک خارج سلولی یا بخشی از غشاءهای سلولی تولید شده بوسیله انواع میکروارگانیسم ها هستند. هدف از این پژوهش شناسایی یک سویه باکتری از جنس آسینتوباکتر تولید کننده بیوسورفکتانت بود.

مواد و روش: در این پژوهش نمونه های مختلف از نفت، آب و خاک آلوده به نفت تهیه شدند. فعالیت همولیتیک، فعالیت امولسیفیه کنندگی و اندازهگیری کشش سطحی مورد استفاده قرار گرفتند و سویه انتخابی بوسیله تست های بیوشیمیایی شناسایی شدند. همچنین ماهیت بیوسورفکتانت و اثرات ضد باکتریایی نیز برای سویه انتخابی بررسی شد.

یافته ها: در این پژوهش ۸۸ سویه باکتریایی جداسازی شدند. از میان آنها۲۴ سویه دارای فعالیت همولیتیک بودند که از میان آنها ۱۲ سویه فعالیت امولسیفیه کنندگی بالای۷۰ درصد داشتند و در نهایت از میان آنها۴سویه قادر به رساندن کشش سطحی به کمتر از ۴۰ mN/m بودند. براساس تستهای بیوشیمیایی، یک سویه انتخابی در این پژوهش به عنوان آسینتوباکتر ۸۸ شناسایی و انتخاب شد. نتایج بررسی ماهیت بیوسورفکتانت با کروماتوگرافی لایه نازک مشخص گردید، از نوع گلیکولیپیدی بود. همچنین بیوسورفکتانت تولیدی سویه انتخابی دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه شش باکتری عفونتزا بودند. حساسترین باکتری نسبت به تاثیر عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر لوفی ۸۸، استافیلوکوکوس اورئوس و مقاومترین باکتری نسبت به این عصاره؛ پروتئوس میرابیلیس میباشد. نتایج MIC , MBC نشان داد که MIC عصاره در رقت ۶۳ و MBC عصاره در رقت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس و سودوموناس آئروزینوزا بیشترین اثرداشت.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این تحقیق میتوان گفت که این باکتری دارای پتانسیل فراوانی برای کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست محیطی می باشند.

کلمات کلیدی: بیوسورفکتانت، کشش سطحی، امولسیفیه کنندگی،گلیکولیپید، ضد باکتریایی

مقدمه:

بیوسورفکتانتها ترکیبات زیستی آمفیفیلیکی تولید شده بصورت خارج سلولی یا بخشی از غشاءهای سلول بوسیله انواع باکتری، مخمر و قارچ هستند. بیوسورفکتانتها از لحاظ تجاری به دلیل استفاده در صنایع مختلف از جمله صنعت نفت، پتروشیمی، غذایی، داروسازی- پزشکی، آرایشی، کشاورزی، نساجی، کاغذ سازی، چرم سازی و غیره از اهمیت ویژهای برخوردار هستند

آدرس نویسنده مسئول : گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
Email :javadmostafapur@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۱
تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۵

به همین جهت میکروارگانیسمهای تولید کننده این ترکیبات به دلیل دارا بودن نسبت بالای سطح به حجم و ظرفیت متنوع بیوسنتتیک، کاندیدای مناسبی در تحقق برای گسترش تولید بیوسورفکتانت میباشند (۵ و ۱۰). در پزشکی حرکت سوارمینگ و تشکیل بیوفیلم اعمال مهم در کلونیزاسیون سطح به وسیله باکتریها هستند و احتمال بروز عفونتها را افزایش میدهد. بیوسورفاکتانتها برای جلوگیری از چسبندگی ارگانیسمهای بیماریزا به سطوح جامد یا به سایتهای عفونت، تولید شدهاند. سورفاکتین باعث کاهش میزان تشکیل بیوفیلم بوسیله سالمونلا تیفیموریوم، سالمونلا انتریکا، اشرشیاکلی و پروتئوسمیرابیلیس در پلیوینیلکلراید و همچنین در سوندهای مجرای وینیل میشود. اخیراً، از بیوسورفکتانت ال-فرمنتوم به منظور مهار عفونت استافیلوکوکوس اورئوس و چسبندگی برای ایمپلنتهای جراحی گزارش شده است (۱۶). بیوسورفاکتانت‌ها کاربردهای بسیار گسترده‌ای در صنایع غذایی هم دارند. در حال حاضر، گروهی از این ترکیبات به‌عنوان افزودنی‌های مجاز مواد غذایی بکار می‌روند. برای مثال، لسیتین و مشتقات آن، استرهای اسیدهای چرب حاوی گلیسرول، سوربیتان[1] یا اتیلنگلیکول و مشتقات اتیوکسیلات منوگلیسریدهای حاوی یک الیگوپپتید، در تمام دنیا به‌عنوان عوامل امولسیونهکننده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸ و ۱۵). اما بیوفیلم به عنوان گروهی از باکتریهاییست که در یک سطح کلونیزه میشوند. بیوفیلم نه تنها شامل باکتریها، بلکه توصیف همه مواد خارجسلولی تولید شده در سطح و هر نوع مواد به دام افتاده در داخل ماتریس به دستآمده است. مرحله اول در ایجاد بیوفیلم چسبندگی باکتریایی است که تحتتاثیر فاکتورهای از جمله گونههای میکروارگانیسم، آبگریزی سطح و بارهای الکتریکی درگیر، شرایطمحیطی و توانایی میکروارگانیسمها برای تولید پلیمرهای خارجسلولی که در اتصال سلولها به سطوح کمک میکند واقع شده است (۱۲). .بیوفیلم در حال حاضر در سطوح صنایعغذایی منابع مهم آلودگی هستند، که ممکن است منجر به فساد مواد غذایی و انتقال بیماری شود. با توجه به این واقعیت که نگه دارندههای مواد غذایی دارای سطح تحمل صفر برای پاتوژن مانند سالمونلا و همچنین در بسیاری از کشورها برای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز هستند، سلولهای چسبنده منفرد ممکن است به طور قابل توجهی به صورت بیوفیلم به خوبی توسعه یافته باشد. در نتیجه کنترل چسبندگی میکروارگانیسمها به سطوح در تماس با مواد غذایی یک مرحله اساسی در فراهم آوردن ایمنی و محصولات با کیفیت به مصرفکنندگان است از این رو، دخالت بیوسورفکتانتها در چسبندگی میکروبی و جداشدن از سطوح مورد بررسی قرارگرفته است. به عنوان مثال سورفاکتانت منتشرشده بوسیله استرپتوکوکوس ترموفیلوس برای کنترل زنگ زدگی صفحات مبدل حرارتی در پاستوریزه کردن استفاده میشود که کلونیزاسیون گونههای دیگر گرما دوست استرپتوکوکها که مسئول زنگ زدگی هستند را به تاخیرمیاندازد(۱۲). در پژوهش کنونی جداسازی و شناسایی جنس آسینتوباکتر لوفی تولید کننده بیوسورفکتانت و بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت تولید شده از آن بر روی رشد شش باکتری گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از روش دیسک گذاری مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد وروش ها

نمونه برداری

برای جداسازی باکتریهای مولد بیوسورفکتانت، نمونه ها از منابع مختلف از جمله نفت خام مخازن نفتی نفتشهر کرمانشاه (چاه ۲۵)، آب و خاکهای آلوده به نفت نواحی اطراف مخازن نفتی، نفت شهر کرمانشاه جمع آوری شدند. برای نمونهگیری از شیشه های در پوشدار استفاده شد. قبل از نمونهگیری تمامی شیشهها در داخل اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۲۱ درجه استریل گردید.

غنی سازی و کشت میکروبی

پس از انجام نمونهگیری و ارسال به آزمایشگاه ۵ میلیلیتر ازنمونه آب و ۵ گرم ازنمونه خاک آلوده به نفت در ۹۵ میلیلیتر محیط Strenghted Nutrient Broth در داخل ارلن مایر ۲۵۰ تلقیح ودر دمای ۳۰ درجه به مدت۷۲ ساعت شیکر (۱۵۰ rpm) وگرمخانهگذاری شدند (۳ و۱۷). محیط SNB استفاده شده در این تحقیق محتوای ۵۰۰ میلیلیتر نوترینت براث و ۵۰۰

[1] Sorbitan

میلیلیترمحلول نمک معدنی[۲] . محلول نمک معدنی استفاده شده در این تحقیق در هر لیتر آب مقطر محتوای ۲ گرم KH-$_2PO_4$، ۵ گرم K_2HPO_4، ۳گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰,۱ گرم Nacl، ۰,۰۱گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۰,۰۱ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۲گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰,۰۰۲ گرم $MnSO_4.7H_2O$، ۰,۲۵گرم Cu-$SO_4.5H_2O$، ۰,۲۴گرم $ZnSO_4.7H_2O$، ۰,۰۳ درصد گلوکز و ۰,۰۳ درصد عصاره مخمر[۳]، به pH=7.2 تنظیم شد پس از آن از این محیط از$^{-1}$۱۰ تا$^{-6}$۱۰ در فسفات بافر سالین رقتهای متوالی تهیه گردید و سپس هر رقت در محیط کشت Streng-hted Nutrient Agar (SNB ۱,۲ همراه با ۲ درصد آگار) به صورت پورپلیت[۴] کشت داده شد اما به منظور افزایش دادن تعداد باکتریهای مولد بیوسورفکتانت برای نمونه نفت ابتدا ۱ میلیلیتر نفت خام در۹۹ میلیلیتر محیط SNB در داخل ارلن مایر ۲۵۰ کشت داده شد و همینطور ۱ میلی لیتر نفت فیلتر شده نیز به همراه ۹۹ میلیلیتر محیط SNB به عنوان شاهد قرار داده شد. هر دوارلن در دمای ۳۰ درجه به مدت ۲ ساعت شیکر وگرمخانهگذاری شدند (۱۵۰ rpm). پس از ۲ساعت از کشت مورد نظر رقتهای متوالی تهیه شد اما برای رقتسازی بجای بافر فسفات سالین از SNB استفاده کردیم و از هر رقت در محیط کشت SNA به صورت پورپلیت کشت داده شد و از محیطهای Glucose Yeast extract Agar، GYA_1، GYA_2 جهت جداسازی سایر باکتریها و از محیط مکانکی آگار، EMB، ENDO آگار جهت جداسازی باکتریهای گرم منفی از گرم مثبت استفاده شد. تمام پلیتها در دمای^{0}C ۳۰ به مدت ۲۴ ساعت گرمخانهگذاری شدند (۱۱ و ۲۱).

انتخاب مناسبترین سویه ها

تست همولیزخون

اولین تست غربال گری برای شناسایی و جداسازی باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت تست همولیز است. تک کلنیهای تازه از تمام کشتهای خالصی بدست آمده بودند بر روی آگار خوندار بطور خطی کشت داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ^{oC} ۳۰ گرمخانهگذاری شدند (۱۱ و۲۴).

اندازه گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی:

در این مرحله هر کدام از کلنی جدا شده از غربالگری اولیه در لوله آزمایش محتوای ۳ میلیلیتر محیط محلول نمک معدنی به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد پس از تلقیح دو کلنی در هر محیط، به میزان ۱۰ درصد هیدروکربن (نفت خام) به لوله اضافه و پس از مخلوط کردن با دستگاه ورتکس[۵] به مدت ۱ دقیقه، در دمای ۳۰ درجه به مدت ۳ روز گرمخانهگذاری گردید. پس از گرمخانه گذاری لولهها خوب با ورتکس مخلوط و در ادامه ضخامت لایه نفت امولسیفیه شده به صورت زیر محاسبه شد (۱۱ و۱۱). EC طول کل ستون مایع / طول لایه امولیسیفیه شده ۱۰۰

تائید ترشح بیوسورفکتانت با اندازهگیری کشش سطحی:

برای اندازهگیری کشش سطحی از دستگاه Tensiome-ter-Kruess Klot استفاده شد. بدین منظور یک کلنی از کشت خالص هر یک از سویه های جدا شده از غربالگری ثانویه به محیط کشت نوترینت براث تلقیح گردید، پس از آنکه OD_{620} کشت مذکور به ۰/۸-۰/۹ رسیده از آن به عنوان مایع تلقیح استفاده شد. ۱ میلیلیتر از کشت مذکور به ۱۰۰ میلیلیتر محیط محلول نمک معدنی و ۱ درصد نفت فیلتر شده به عنوان منبع هیدروکربن اضافه شد. مخلوط همراه با نمونه کنترل در دمای ۳۰ درجه در ۱۵۰ rpm به مدت ۳ روز گرمخانهگذاری شد (۱۱و۲۴).

خصوصیات سویه انتخابی تولیدکننده بیوسورفکتانت

خصوصیات سویه انتخابی تولید کننده بیوسورفکتانت بواسطه تستهای مختلف تعیین شده بود. این تستها شامل: خصوصیات ظاهری کلنیها، رنگ آمیزی گرم، رنگآمیزی اسپور، تست کاتالاز، تست اکسیداز، تست سیترات، تست TSI، تست SIM، تست VP-MR، تست اورهآز، تست احیا نیترات و همچنین الگوی مقاومت سویه های انتخابی به ۱۶ آنتیبیوتیک عبارتند از: جنتامایسین ۱۰µg/ml،کلیندامایسین۲µg/ml، متیسیلین ۵µg/ml، آمپیسیلین ۱۰µg/ml، استرپتومایسین ۱۰µg/ml،

۲ Mineral Salt Solution
۳ Yeast extract
۴ Pour Plate
۵ Vortex

اکسیتتراسایکلین ۳۰µg/ml، سیپروفلوکساسین ۵µg/ml، ونکومایسین ۳µg/ml، اپی پنم ۱۰µg/ml، اریترومایسین ۱۵µg/ml، باسیتراسین µg/ml ۰/۰۴، اگزاسیلین µg/ml ۱، نالیدیکسیکاسید µg/ml ۳۰، سفیپیم ۳۰µg/ml، کلرامفنیکل ۳۰µg/ml، پنیسیلین ۱۰µg/ml مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج بیوسورفکتانت:

به این صورت که کلنی سویه انتخابی به ارلن ۱۰۰۰ میلیلیتر محتوای ۵۰۰ میلیلیتر نوترینت براث کشت و همراه با ۱۰ میلیلیتر n-هگزان به عنوان منبع هیدروکربن اضافه شد سپس مخلوط در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز با شیکر rpm ۱۵۰ گرمخانهگذاری شد. پس از آن سلولهای باکتری بوسیله سانتریفیوژ در rpm۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت۲۰ دقیقه حذف و مایعرویی جمعآوری شد. pH مایع با استفاده از اسیدسولفوریک ۱ مولار به ۲ تنظیم شد و بعد از آن به حجم برابر کلروفرم و متانول (۱:۲) اضافه شد. سپس فاز آلی مجزا شده و حلال در آون و در دمای ۶۰ درجه تبخیر گردید. فراورده نهایی به رنگ قهوهای تیره و قوام چرب به عنوان بیوسورفکتانت خام بدست آمد (شکل ۱) بیوسورفکتانت خشک بدست آمده از هر سویه وزن شد واز آنها رقتهای متوالی شامل ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و۶۳ میلیگرم بر میلیلیتر در ۱ میلیلیترحلال دی متیل سولفوکساید[۶] تهیه شد رقتهای هر بیوسورفکتات جهت بررسیهای ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت (۳).

شکل ۱- بیوسورفکتانت خام

تعیین وزن خشک بیوسورفکتانت ها

در این مرحله پلیت استریل را گرفته و وزن پلیتها اندازهگیری شد، رسوب حاصل از استخراج بر روی پلیتها ریخته شد سپس پلیتها در آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد پس از خشککردن، پلیتها وزن شد. وزن خشک بیوسورفکتانتها بوسیله فرمول زیر محاسبه شد (۳).

وزن پلیت خالی - وزن پلیت پس از خشک کردن =وزن خشک بیوسورفکتانت

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

یکی از روشهای اطمینان از حضور بیوسورفکتانت در محیط، کروماتوگرافی لایه نازک است. پس از استخراج بیوسورفکتانت، ۵۰۰ میلیگرم از بیوسورفکتانت خام را در ۱۰۰۰ میلیلیترآب دیونیزه شده مخلوط میکنیم و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن را بر روی صفحه TLC بارگذاری میکنیم. سیستم حلال مورد استفاده شامل: کلروفرم/ متانول/ اسیداستیک/ آب(V/V/V/V ۲۵:۱۵:۴:۱) بود. صفحه TLC آماده، در داخل تانک حاوی حلال قرار میگیرد سپس صفحه TLC بعد از خشک شدن آن را زیر UV میگذاریم تا ببینیم واکنش انجام شده است یا نه، اگر واکنش انجام شده کروماتوگرام را با معرفهای نین هیدرین[۷] (۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلیلیتر استون بدون آب) برای کشف بخشهای لیپیدی به عنوان نقاط قهوهای و معرف آنترون[۸] (۱گرم در ۵ میلیلیتر اسید سولفوریک ترکیب شده با ۹۵ میلیلیتر اتانول) برای کشف بخشهای کربوهیدراتی به عنوان نقاط زرد اسپری مینماییم (۳، ۱۱و۲).

سویه های میکروبی

برخی از سویه های استاندارد باکتریهای مورد آزمایش در این تحقیق ازگروه میکروبشناسی موسسه سرمسازی رازی کرج به نام استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112، اشرشیاکلی PTCC 1330 و سودوموناس آئروژینوزا PTCC 1074 و برخی دیگر را از کلکسیون میکروبشناسی تهران به نام سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیس ATCC 2405، پروتئوس میرابیلیس ATCC 6012، سالمونلا تیفی موریوم ATCC 1679 تهیه شد.

---

۶ DMSO

۷ Ninhydrin

۸ Anthrone

تهیه سوسپانسیون میکروبی

ازتمام سویه ها در سرم فیزیولوژی سدیم کلراید ۰/۹ درصد سوسپانسیون میکروبی تهیه شد به این صورت که برای هر سری آزمایش کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه شد برای این کار یک لوپ از هر میکروب در cc ۵ سرم فیزیولوژی فوق تلقیح شد. جذب نوری سوسپانسیون میکروبی با دستگاه اسپکترفتومتری در طول موج ۶۲۰ به ۱-۰/۸ تنظیم شد، سپس از این سوسپانسیون میکروبی برای تلقیح در محیط کشت مولر-هینتونآگار استفاده گردید.

بررسی خاصیت ضد باکتری بیوسورفکتانت

برای تعیین حساسیت کیفی و کمی از سوسپانسیون تهیه شده استفاده شد در روش کیفی از انتشار در آگار[۹] به شیوه کربی بائر[۱۰] استفاده شد که طی آن از سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده به روش چمنی در سطح محیط کشت مولرهینتونآگار[۱۱] کشت انجام شد و سپس برای بررسی خواصی ضدباکتریایی، دیسکهای کاغذی بلانک(ساخت پادتن طب) با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی آگار قرار داده شد و حدود ۲۰ میکرولیتر از غلظت های حاوی ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و۶۳ میلیگرم بر میلیلیتر در محلول دی متیل سولفوکساید، روی دیسکها اضافه شد. از دیسک آنتیبیوتیک جنتامایسین با غلظت ۱۰ µg/ml به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس محیطهای کشت حاوی باکتریها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس با اندازهگیری قطر هالههای تشکیل شده در اطراف صفحهها، نتایج مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آنتی بیوتیک را با جداول استاندارد CLSI مقایسه کردیم جهت حصول اطمینان از هر یک از غلظتهای مختلف بیوسورفکتانت و آنتی بیوتیک این آزمایشها برای هر سویه باکتریایی سه بار تکرار شد. همچنین آزمایشهای کمی برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده[12] (MIC) وحداقل غلظت کشنده[13](MBC) بیوسورفکتانت ها انجام شد. به این ترتیب آزمایش MIC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد. ابتدا ازمولر هینتون براث (مرکآلمان) ۱۰۰ میکرولیتر داخل چاهکهای مربوط به رقتهای مورد نظر میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بیوسورفکتانت اضافه گردید و از خانه دوم وسوم به همین ترتیب تا خانه ششم رقیق شدند درآخر به همه چاهکها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون رقیق شده (نوترینت براث) معادل لوله نیم مک فارلند اضافه گردید بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کف پلیت را زیر نور در آینه مشاهده میکنیم. وجود کدورت را که نشان دهنده رشد یا عدم رشد باکتری است، درجدول مخصوص یادداشت کرده طبق تعریف غلظت آخرین (رقیقترین) چاهکی هیچ کدورتی در آن ایجاد نشده است معادل MIC قرار داده شده است خانه کنترل اسانس، محیط کشت و میکروب نیز جداگانه منظور شد. برای آزمایش MBC همه چاهکهای فاقد کدورت جداگانه بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت دادیم. بعد از ۲۴ ساعت کمترین غلظتی از بیوسورفکتانت که باکتری در آن رشد نکرده به عنوان غلظتکشندگی MBC گزارش کردیم (۴).

تجزیه تحلیل آماری

بررسی خواص ضدباکتریایی در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای تجزیه واریانس دادهها از نرم افزار SAS در سطح ۱ درصد و برای مقایسه میانگین دادهها از آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

جداسازی، خالص سازی

در نهایت در این مطالعه از نمونه ها بعد از سپری شدن مراحل غنیسازی، رقت تهیه شده و بر روی محیطکشتهای اختصاصی کشت داده شدند. در نتیجه نمونه ها از نفت خام، خاک و آب آلوده به نفت تهیه شده بودند، که بر اساس مشخصات ظاهری و صفات کلنیها، ۸۸ سویه باکتریایی مختلف جداسازی گردیدند در این روش به علت خالص بودن کشتها، میزان آلودگیهای قارچی تا حد زیادی کاهش پیدا میکند و چون تنها سویه هایی

۹ Disk diffusion

۱۰ Kirby Bauer

۱۱ Muller hinton agar

۱۲ Minimal Inhibitory Concentration(MIC)

۱۳ Minimal Bacteriocidal Concentration(MBC)

که بر روی محیط کشت اختصاصی خالصسازی شدهاند، مورد استفاده قرار گرفتند.

انتخاب مناسبترین سویه ها

تست همولیزخون

تمام سویه های جدا شده در مرحله قبل، برای بررسی فعالیت همولیتیک بر روی محیط کشت بلادآگار کشت داده شدند. از بین ۸۸ سویه جداسازی شده، تنها ۲۴ سویه دارای فعالیت همولیز بتا بودند (شکل۲) در نتیجه سویه هایی که دارای همولیز بتا بودند به عنوان فعالیت همولیتیک مثبت در نظرگرفته و برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

شکل ۲- نمونه ای از فعالیت همولیز بتا در باکتریها

اندازه گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی

نتایج حاصل از فعالیت امولسیفیهکنندگی کشت سویه های غربال شده از مرحله قبل با هیدروکربن نفت نشان داد که از میان ۲۴ سویه حاصل از غربالگری اولیه، ۱۲ سویه توانایی امولسیفیهکنندگی ۷۰٪ یا بیشتر را داشتند که این سویهها برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند.

اندازه گیری کشش سطحی

کشش سطحی یکی از معیارهای نشان دهنده تولید مواد فعال سطحی در محیط است جدول ۱ کشش سطحی کشت سویه های انتخابی همراه با ۱٪ نفت را نشان میدهد کشش سطحی شاهد (محیطکشت فاقد باکتری) ۷۲ میلینیوتن برمتر بود. در این مرحله با توجه به نتایج غربالگری اول و دوم ۱۲ سویه برای اندازهگیری کشش سطحی انتخاب شدند همانطور که دراین جدول نشان داده شده از بین ۱۲ سویه تست شده تنها سویه های ۴۳، ۴۷، ۸۳ و ۸۸ قادر به کم کردن کشش سطحی تا کمتر از ۴۰ میلینیوتن برمتر هستند البته هر ۴ سویه متعلق به نمونه نفت بودند.

جدول۱- کشش سطحی حاصل از ۱۲ سویه انتخابی بعد از ۷۲ ساعت (mN/m)

شماره سویه	کشش سطحی mN/m] [
۱	۴۳
۵	۴۲
۴۰	۴۸
۴۱	۴۷
۴۳	۳۸/۶
۴۷	۳۸
۵۳	۴۰
۵۶	۵۵
۷۷	۵۳
۷۸	۵۸
۸۰	۶۲
۸۳	۳۹
۸۷	۵۷
۸۸	۳۶

جدول۲- خصوصیات بیوشیمیایی سویه انتخابی تولیدکننده بیوسورفکتانت

خصوصیات	۸۸	الگوی مقاومت	۸۸
مورفولوژی سلول	باسیلی	جنتامایسین	-
واکنش گرم	-	کلیندامایسین	+
تشکیل اسپور	+	متیسیلین	+
کاتالاز	+	آمپیسیلین	+
اکسیداز	-	استرپتومایسین	-
حرکت	-	اکسیتتراسایکلین	-
اندول	-	سیپروفلوکساسین	-
H_2S	-	ونکومایسین	-
متیل رد	+	اریترومایسین	-
وجس- پروسکوآر	-	باسیتراسین	+
گلوکز	+	اگزاسیلین	+
لاکتوز	-	نالیدیکسیک اسید	-
اورهآز	-	سفیپنم	
سیترات	-	کلرامفنیکل	-
احیای نیترات	-	پنیسیلین	+
پیگمان	-	اپیپنم	-

: نتیجه منفی، + : نتیجه مثبت

خصوصیات وشناسایی سویه های باکتری

اما در این مطالعه یکی از باکتریهای تولیدکننده بیوسورفکتانت به نام سویه ۸۸ که دارای کاهش کشش سطحی زیر ۴۰ میلی نیوتن برمتر بود براساس تست های بیوشیمیایی برای استخراج بیوسورفکتانت انتخاب شد. اولین سویه شناسایی شده مطابق با جدول ۲ است. در بررسیهای صورت گرفته بر اساس تستهای بیوشیمیایی و براساس طبقهبندی ارائه شده در چاپ هشتم کتاب برگی، سویه جدا شده تا حد امکان تعیین هویت شد به این ترتیب سویه ۸۸؛ *Acinetobacter*. ssp

وزن خشک بیوسورفکتانت

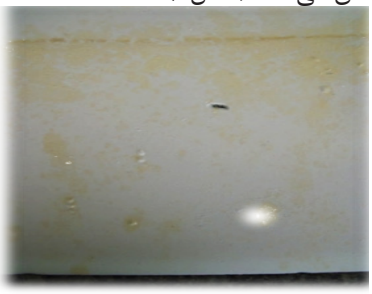
وزن خشک بیوسورفکتانت مطابق با جدول ۶ اندازه گیری و تعیین شده بود

جدول۳- وزن خشک بیوسورفکتانت سویه های انتخابی(برحسب گرم)

سویه	وزن پلیت	وزن پلیت پس از خشک کردن بیوسورفکتانت	وزن خشک بیوسورفکتانت
آسینتوباکتر ۸۸	۴۸/۹۸	۴۹/۴۰۲	۰/۴۲۲

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

با قرار دادن صفحه TLC در سیستم حلال، جابجایی لکهها زیر UV بررسی شد که نمونه تشکیل لکه بزرگ و مشخصی بر روی صفحه TLC دادند که زیر UV به صورت لکه صورتی رنگ مشاهده شدند. همچنین با اسپری معرف نینهیدرین بر روی صفحه TLC لکه لیپیدی به رنگ قهوهای در سویه انتخابی مشاهده شد همچنین با اسپری معرف آنترون لکه زرد در سویه آسینتوباکتر ۸۸ دیده شد که وجود بخش کربوهیدراتی را در این سویه نشان می دهد(شکل۳).



شکل۳- آسینتوباکتر لوفی ۸۸

بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت ها تجزیه تحلیل آماری داده های حاصل از بیوسورفکتانت ها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس دادههای مربوط (جدول۴) نشان دادند که اثر باکتری و رقتهای مختلف و همچنین اثر متقابل بین باکتری و رقت برای تمام بیوسورفکتانتهای مورد آزمایش در سطح یک درصد معنادار می باشند.

تأثیر رقتهای مختلف بیوسورفکتانتها بر هر یک از باکتریها

آنالیز آماری دادهها نشان داد که اولاً تفاوت بین میانگینهای قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر رقتهای مختلف بیوسورفکتانت برای شش باکتری مختلف در سطح پنج درصد معنادار است (جدول۴). همچنین بررسی قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر رقت های مختلف بیوسورفکتانت بر روی هر باکتری و سپس مقایسه باکتریها با هم نشان داد که حساسترین باکتری نسبت به تاثیر عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ ؛ استافیلوکوکوس اورئوس مقاومترین باکتری در برابر عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ ؛ پروتئوس میرابیلیس میباشد (جدول۵).

جدول۴- نتایج تجزیه واریانس بیوسورفکتانت بدست آمده از آسینتوباکتر ۸۸

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۵	۳۷۷/۸۵**
رقت	۵	۷۱۷/۶۱**
باکتری*رقت	۲۵	۲۴/ ۶۱**
خطا	۷۲	۰/۲
کل	۱۰۷	
CV% (ضریب تغییرات)	۲/۷۰	

** معنی دار

جدول۵- مقایسه میانگین بین باکتری ها متاثر از بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸

سویه باکتری	میانگین
اشرشیا کلی	^{C} ۱۳/۵۵
استاف ارئوس	۲۳/^{A}۶۱
استاف اپیدرمیس	^{B}۱۹
پروتئوس میرابیلیس	۱۰/۸۳ ^{F}
سالمونلا تیفیموریوم	۱۴/^{E}۶۱
سودوموناس آئروژینوزا	۱۸/^{D}۵

اثر بیوسورفکتانتها در رقت ۱۰۰۰ میلیلیتر بر میلیلیتر بر مهار رشد شش باکتری مختلف با یکدیگر

مقایسه میانگین های قطر هاله ممانعت از رشد وتجزیه وتحلیل دادهها مشخص کرد که رقت۱۰۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر از عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر۸۸ بیشترین اثر بازدارندگی را بر استافیلوکوکوس اورئوس داشته که تفاوت آن با دیگر باکتریها معنیدار بود. پس از آن بیشترین اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر۸۸ بترتیب بر سودوموناسآئروژینوزا، سالمونلا تیفیموریوم، اشرشیاکلی و پروتئوس میرابیلیس وجود داشت که تفاوت آنها نیز با هم معنیدار بود (جدول۶). با توجه به آنالیز آماری دادهها می توان اثر بازدارنده رقت۱۰۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر۸۸ بر رشد باکتریها را به صورت زیر با هم مقایسه کرد.

S.aureus>S.epidermis>E.coli>P. aueruginosa>S. tiphi-morium>P.mirabilis

اثر بیوسورفکتانتها در رقت۵۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر بر مهار رشد شش باکتری مختلف با یکدیگر

آنالیز دادهها نشان داد که رقت ۵۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر از عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ بیشترین اثر بازدارندگی بر استافیلوکوکوس اورئوس داشت که تفاوت آنها با دیگر باکتریها معنیدار بود. پس ازآن بیشترین اثربازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ بر سودوموناسآئروژینوزا وجود داشت که تفاوت آن با سالمونلا تیفیموریوم، اشرشیاکلی که اختلاف معناداری با هم نداشتند و همچنین پروتئوس میرابیلیس که کمترین اثربازدارندگی را برروی آن داشت معنیدار بود (جدول۶).

اثر بیوسورفکتانتها دررقت ۲۵۰ میلیگرم بر میلیلیتر برمهار رشد شش باکتری مختلف با یکدیگر

تجزیه و تحلیل آماری دادهها نشان داد اثربازدارندگی رقت ۲۵۰ میلیگرم بر میلیلیتر از عصاره بیوسورفکتانتهای آسینتوباکتر لوفی۸۸ در مورد استافیلوکوکوس اورئوس بیشتراز سایر باکتریها میباشد که تفاوت آنها با دیگر باکتریها معنیدار بود. پس از آن بیشترین اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ بر استافیلوکوکوس اپیدرمیس و سودوموناس آئروژینوزا وجود داشت که تفاوت آنها نیز با هم و با سالمونلا تیفیموریوم و اشرشیاکلی که اختلاف معناداری با هم نداشتند و همچنین پروتئوس میرابیلیس که کمترین اثر بازدارندگی را برروی آن داشت معنی دار بود. (جدول۶).

اثر بیوسورفکتانتها در رقت۱۲۵ میلیگرم بر میلیلیتر بر مهار رشد شش باکتری مختلف با یکدیگر

تجزیه وتحلیل آماری دادهها نشان داد اثر بازدارندگی رقت ۱۲۵ میلیگرم بر میلیلیتر از عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر لوفی۸۸ در مورد استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از سایر باکتریها میباشد که تفاوت آنها با دیگر باکتریها معنیدار بود پس از آن بیشترین اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ استافیلوکوکوس اپیدرمیس و سودوموناسآئروژینوزا که با هم اثرمشابهای داشتند وجود داشت و تفاوت آنها با پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفیموریوم و اشرشیاکلی که تفاوت معنی داری با هم نداشتند و کمترین تاثیر را داشتند معنی دار بودند (جدول۶).

اثر بیوسورفکتانتها در رقت۶۳ میلیگرم بر میلیلیتر بر مهاررشد شش باکتری مختلف با یکدیگر

آنالیز داده ها نشان داد که تجزیه و تحلیل آماری دادهها نشان داد اثر بازدارندگی رقت ۶۳ میلیگرم بر میلیلیتر از عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ بر استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناسآئروژینوزا بیشتر از سایر باکتریها میباشند که تفاوت آنها با هم و با باکتریها دیگر معنیدار بود پس از آن بیشترین اثر بازدارندگی بر استافیلوکوکوس اپیدرمیس وجود داشت که تفاوت آن با سالمونلا تیفیموریوم، اشرشیا کلی و پروتئوس میرابیلیس که با هم اختلاف معنیداری نداشتند و کمترین اثر بازدارندگی را داشتند معنیدار بود (جدول۶).

جدول۶- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد شش باکتری مختلف که تحت تأثیر رقت های مختلف بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ وآنتی بوتیک(میلیمتر)

باکتری	رقت	میانگین	باکتری	رقت	میانگین
اشرشیاکلی	۱۰۰	۲۱ h	پروتئوس میرابیلیس	۱۰۰	۱۴ mn
	۵۰۰	۱۵/۶۶ l		۵۰۰	۸/۶۶ tu
	۲۵۰	۱۰/f۶۶		۲۵۰	۸/۶۶ tu
	۱۲۵	۸/۶۶ tu		۱۲۵	۸ u
	۶۳	۶ v		۶۳	۶ v
	جنتامایسین	۱۹/۳۳ ij		جنتامایسین	۱۹/۳۳ ij
استاف اورئوس	۱۰۰	۳۶/۶۶ a	سالمونلا تیفیموریوم	۱۰۰	۲۳/۶۶ f
	۵۰۰	۳۱ b		۵۰۰	۱۵/f۶۶
	۲۵۰	۲۱ h		۲۵۰	۱۰/۶۶ r
	۱۲۵	۱۴/m۶۶		۱۲۵	۸/۶۶ tu
	۶۳	۱۳ o		۶۳	۶ v
	جنتامایسین	۲۵/۳۳ de		جنتامایسین	۲۳ fg
استاف اپیدرمیس	۱۰۰	۲۸/۶۶ c	سودوموناس آئروژینوزا	۱۰۰	۲۵/۶۶ d
	۵۰۰	۲۲/۳۳ g		۵۰۰	i۲۰
	۲۵۰	i۲۰		۲۵۰	۱۷/۳۳ k
	۱۲۵	۱۲/۶۶ op		۱۲۵	۱۲/op۶۶
	۶۳	۱۰ rs		۶۳	۱۱/۶۶ q
	جنتامایسین	۲۰/hi۳۳		جنتامایسین	۲۳/f۶۶

حروف مشابه بیان کننده عدم وجود اختلاف معنی دار است

مقایسه تأثیر ضدباکتریایی بیوسورفکتانت ها در رقتهای مختلف با تاثیر بازدارنده آنتیبوتیک ها

تجزیه تحلیل آماری دادهها طبق جدول۷ نشان داد که در مورد باکتری اشرشیا کلی اثر بازدارنده رقت ۱۰۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸، از تمام آنتی بیوتیکهای موثر بر این باکتری کمتر ولی از آنتی بیوتیک اریترومایسین موثر بر این باکتری بیشتر است. در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تاثیر بازدارنده رقت ۱۰۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر بر این باکتری نسبت به جنتامایسین و همینطور نسبت به کلیه آنتیبیوتیکهای مورد آزمایش دراین پژوهش بطور معنیداری بیشتر است که از اهمیت قابل توجهی برخوردار است به این دلیل که این باکتری از نوع باکتریهای عفونتزا است وهم اثر بازدارندگی این بیوسورفکتانت از آنتیبیوتیکهای وسیعالطیف مهمی ازجمله سفیپیم، اپیپنم و سیپروفلوکساسین بطور معنیداری بیشتر است. در مورد باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیس، اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر در رقت ۱۰۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر تنها نسبت به آنتیبیوتیک سیپروفلوکساسین موثر بر این باکتری اثر مشابه ای ولی در برابر آنتی بیوتیکهای دیگر بطور معنیداری کمتر بود (جدول۶ و۷). در مورد باکتری پروتئوس میرابیلیس اثر بازدارندگی عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر نسبت کلیه آنتی بیوتیکهای موثر بر این باکتری کمتر بود

جدول ۷- اثرات ضد باکتری آنتیبیوتیکها بر روی شش باکتری مختلف(میلیمتر)

سویه باکتری / آنتی بیوتیک	اشرشیا کلی	استاف اورئوس	استاف	سالمونلا		
کلیندامایسین	R ۱۲/۳۳	S ۲۳	R ۶	S ۱۷/۶۶	R ۶	R ۶
متیسیلین	R ۶	R ۱۵/۶۶	R ۶	R ۶	R ۶	R ۶
آمپیسیلین	R ۶	S ۳۰/۳۳	R ۶	R ۹/۳۳	R ۶	R ۶
استرپتومایسین	R ۱۲/۶۶	R ۱۲/۶۶	R ۶	R ۹/۳۳	R ۱۱	R ۱۰/۳۳

اکسیتتراسایکلین	۲۵ S	S ۳۲/۳۳	۶ R	۶ R	۲۲/۶۶ S	۲۰ S
سیپروفلوکساسین	S ۳۵/۳۳	S ۳۵/۳۳	S ۲۸/۳۳	۲۵ S	۲۶/۳۳ S	۳۵/۳۳ S
وا نکومایسین	۶ R	S ۲۰/۳۳	۶ R	۶ R	۶ R	۶ R
اپیپنم	۳۵ S	S ۳۳/۶۶	۳۰ S	۳۱ S	۳۸/۳۳ S	۳۳/۶۶ S
اریترومایسین	۱۵ I	۶ R	S ۳۳/۶۶	۶ R	۱۲/۶۶ R	۶ R
باسیتراسین	۶ R	R ۱۶/۳۳	۶ R	۶ R	۶ R	۶ R
اگزاسیلین	۶ R	S ۲۲/۶۶	۶ R	۶ R	۶ R	۶ R
نالیدیکسیک اسید	R ۱۰/۳۳	I ۱۴/۳۳	R ۱۰/۳۳	۶ R	۲۸ S	۱۲/۳۳ R
سفیپیم	S ۲۸/۳۳	S ۳۱/۳۳	۳۰ S	۳۰ S	۳۴/۳۳ S	۲۹/۳۳ S
کلرامفنیکل	۱۳ R	۱۳ R	S ۳۱/۳۳	۱۲ R	۳۱ S	۶ R
پنیسیلین	۶ R	۶ R	S ۳۴/۳۳	S ۲۵/۶۶	۲۱/۳۳ I	۱۰ R

R: Resistant, I: Intermediate/moderatelysusceptible, S: Susceptible

برای باکتری سالمونلا تیفیموریوم، اثر بازدارندگی رقت ۱۰۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر در برابر کلیندامایسین، اکسیتتراسایکلین و پنیسیلین زیادتر ودر مقابل سیپروفلوکساسین، اپیپنم، سفیپیم و کلرامفنیکل اثرکمتری را از خود نشان داد.. در مورد باکتری سودوموناس آئروژینوزا تاثیر بازدارنده رقت ۱۰۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ از جنتامایسین و اکسیتتراسایکلین بطور معنیداری زیاد و نسبت به اپیپنم، سیپروفلوکساسین و سفیپیم کمتر بود (جدول۶ و۷). همانگونه که نتایج این پژوهش نشان داد، عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ دارای خاصیت ضد باکتریایی میباشد که این خصوصیت بسته به رقت بیوسورفکتانت و جنس باکتری متفاوت میباشد. بطوری که برحسب تجزیه تحلیل آماری دادهها مطابق با جداول ۵ و۶ نشان داد که بیشترین اثر بازدارندگی رقتهای مختلف عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر لوفی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین اثر برروی پروتئوس میرابیلیس باکتری مشاهده شد. همچنین عصاره بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ، دررقت ۶۳ میلیگرم بر میلیلیتر برای باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و سودوموناسآئروژینوزا و در رقت۲۵۰ میلیگرم بر میلیلیتر برای باکتری اشرشیاکلی اثر باکتریواستاتیکی داشت ولی اثر باکتریوسیدالی عصاره این بیوسورفکتانت برای باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و سودوموناسآئروژینوزا دررقت ۱۲۵ میلیگرم بر میلیلیتر و برای باکتریهای اشرشیاکلی و سالمونلا تیفیموریوم دررقت ۵۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر مشاهده شد اما برای باکتری پروتئوس میرابیلیس، هم اثر باکتریواستاتیکی و هم اثر باکتریوسیدالی عصاره این بیوسورفکتانت در رقت۱۰۰۰ میلیگرم بر میلیلیتر مشاهده شد (جدول۸).

جدول ۸- تعیین میزان حداقل غلظت مهارکننده رشدMIC حداقل غلظت کشنده رشد MBC بیوسورفکتانتها بر روی شش باکتری مختلف(میلیگرم بر میلیلیتر)

بیوسورفکتانتها	سویه باکتری	MIC	MBC
آسینتوباکتر لوفی ۸۸	اشرشیا کلی	۲۵۰	۵۰۰
	استاف اورئوس	۶۳	۱۲۵
	استاف اپیدرمیس	۶۳	۱۲۵
	پروتئوس میرابیلیس	۱۰۰۰	۱۰۰۰
	سالمونلا تیفیموریوم	۲۵۰	۵۰۰
	سودوموناس آئروژینوزا	۶۳	۱۲۵

بحث

تعداد زیادی از باکتریها و قارچها قادر به تجزیه زیستی آلایندههای نفتی هستند. این ارگانیسمها به طور گستردهای در مخازن نفتی و اکوسیستمهای آبی و خاکی پراکنده میباشند (۱۴). بررسیها نشان داده است اگر چه امکان وجود باکتری با توان تجزیهکنندگی بالا در آب ها و خاکهای بدون سابقه آلودگی قبلی با ترکیبات نفتی وجود دارد، ولی در اکثر پژوهشهای مشابه، به آب، خاکها و مناطقآلوده به نفت توجه میشود. چون که امکان یافتن میکروارگانیسمی با توان تجزیهکنندگی بالا در این مناطق بیشتر از مناطق غیرآلوده به ترکیبات نفتی میباشد. در مطالعه ای که در بلغارستان توسط کانکووا[۱۴] و گالابووا[۱۵] در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت نیز جداسازی میکروارگانیسمها از مناطق آلوده (آبهای آلوده به پسابهای نفتی) گزارش گردیده است(۲۲). در سال ۲۰۰۳ در مطالعهای که توسط اوکرنتوگبا

۱۴ Tonkova

۱۵ Galabova

و ازرونی[16] در نیجریه انجام شد باکتریهای تجزیهکننده نفت ازآبهای آلوده به نفت در اطراف پالایشگاه جدا شد (۱۸). در تحقیقی دیگر بولا[17] در سال ۲۰۰۶ در نیجریه از ترکیبات ماسهای همراه با نفت سنگین که به صورت کلوخ درآمده بودند باکتریهایی جداسازی شد که در تجزیه نفت خام بسیار موثر عمل میکردند. این باکتریها بیشتر از جنس سودوموناس بودند. از آنجایی که باکتریهای مولد بیوسورفکتانت در تجزیه نفت موثرتر عمل میکنند، لذا از بین باکتریهای جدا شده سویه های مولد بیوسورفکتانت جدا شدند (۹). در مطالعاتی که با هدف جداسازی باکتریهای مولد بیوسورفکتانت از منابع محیطی انجام شده معمولاً از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان معیاری برای جداسازی اولیه سویه های مولد بیوسورفکتانت استفاده شده است (۲۴). به طوری که در مطالعاتی مشابه که طباطبایی در سال ۲۰۰۵ و آناندارج[18]در سال ۲۰۱۰ برای جداسازی باکتریهای مولد بیوسورفکتانت انجام شد از فعالیت همولیتیک برای جداسازی اولیه استفاده کرد (۳و۱۱). ولی غربالگری دیگر، فعالیت امولسیونسازی است با توجه به بررسیهای انجام شده میتوان گفت که فعالیت امولسیفیهکنندگی یک امولسیفایر به تمایل آن نسبت به سوبسترای هیدروکربنی استفاده شده برای اندازه گیری EC بستگی دارد. نتایج (E24) به دست آمده برای سویه های غربال شده از مرحله قبل مطابق با نتایج این پژوهش بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق، از نتایج گزارش شده در مطالعات مشابه توسط بودوئر[19] و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۸)، فرنسی[20] و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۲۱) و بیکا[21] و همکارانش در سال ۱۹۹۹ (۷)، بهتر و چشمگیرتر میباشد. اما یکی دیگر از فعالیتهای غربالگری کشش سطحیست از آنجایی که کاهش کششسطحی محیط رشد، مهمترین و اصلیترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت محسوب میشود به همین دلیل در این تحقیق پس از غربالگری اول و دوم و کاهش تعداد سویه های باکتری انتخاب شده، از این آزمایش برای بررسی و تائید توان این سویهها در تولید بیوسورفکتانت استفاده شد مطالعات مشابهی در این زمینه توسط بنت[22] در سال ۱۹۹۱ و طباطبایی در سال ۲۰۰۵ برای جداسازی باکتریهای مولد بیوسورفکتانت انجام شد (۲۱ و۲۴). اما یکی از قابلیتهای جالب توجه باکتریهای مولد بیوسورفکتانت، توانایی آنها در ازدیاد برداشت میکروبی نفت از مخازن نفتی است. ازدیاد برداشت میکروبی نفت یک روش ثالثیه ازدیاد برداشت است که علیرغم برخوردار بودن از قدمت وسابقه تاریخی طولانی به تازگی مورد توجه فراوان قرار گرفته است. مکانیسمهایی که برای ازدیاد برداشت نفت بوسیله میکروارگانیسمها پیشنهاد شدهاند بسیار پیچیده، متنوع و فراوان هستند اما بدون شک تولید بیوسورفکتانت و کمکردن کشش سطحی و کاهش قدرت مویینگی یکی از دلایل اصلی افزایش تولید نفت توسط میکروارگانیسمها به شمار میرود (۵ و ۱۹). علاوه بر این، در آنالیز عصاره حاصل از کشت سویه آسینتوباکتر ۸۸، لکه بدست آمده بر روی صفحه TLC در اثر اسپری با معرف نیهیدرین، تولید رنگ قهوهای، و با اسپری با معرف آنترون تولید رنگ زرد میکرد که نشان میدهد که عصاره بیوسورفکتانت سویه حاوی ترکیبات لیپیدی و کربوهیدراتی است. در مطالعهای که توسط طباطبایی و همکاران در سال ۲۰۰۵، آناندارج و همکاران و روسا[23] و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شده، ماهیت بیوسورفکتانت که بوسیله آنها جداسازی شده بود نیز کاملاً مشابه با نتایج حاصل از سویه آسینتوباکتر ۸۸، گزارش شده است (۳، ۲۱ و۱۹). اما یکی دیگر از کاربردهای بیوسورفکتانتها فعالیت ضدمیکروبی آنها است. هر روزه مقاومت باکتریها در برابر آنتی بیوتیکها بیشتر میشود. تحقیق در مورد کشف مواد جدید با خواص ضدمیکروبی قویتر همپای افزایش مقاومت در باکتریها رو به گسترش است و از این رو بیوسورفاکتانت یک جایگزین مناسب برای داروهای ترکیبی هستند و عوامل ضد میکروبی و عوامل موثر درمانی یا پروبیوتیک به عنوان ایمنی(بیخطر) به خصوص در زمانی که مقاومت در برابر داروها در میان ارگانیسمها برای بسیاری از بیماریهای تهدیدکننده زندگی رو به افزایش است می تواند مورد استفاده قرار گیرد.که به عنوان یک انتخاب مناسب برای این نوع تحقیقات به شمار میروند. بیوسورفکتانتها با اثرات ضدمیکروبی بر روی طیف گستردهای

۱۶ - Okerentugba and Ezeronye
۱۷ - Bola
۱۸ - Anandaraj
۱۹ - Bodour
۲۰ - Tabatabaee
۲۱ - Bicca
۲۲ - Banat
۲۳ - Rosa

از ارگانیسمها و همچنین قابلیت مصارف غذایی آنها در برخی موارد وکمتر بودن اثرات جانبی آنها نسبت به آنتی بوتیک های رایج می توانند در برخی موارد جایگزین آنتی بیوتیکها شوند (۲۰). در راستای بررسی اثرات ضدمیکروبی بیوسورفکتانتها، اثرات ضدباکتریایی بیوسورفکتانت که در مصارف غذایی و آرایشی و بهداشتی نیز مورد استفاده قرار میگیرد، بر روی شش باکتری مختلف عفونتزا به ویژه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که هم ایجاد کننده مسمومیتهای غذایی است و هم یکی از باکتری های مهم در ایجاد عفونت هاست همچنین بر روی سودوموناس آئروژینوزا که از مقاومترین باکتریها و بیماریزاست مورد ارزیابی قرار گرفتند به این صورت که بیوسورفکتانت آسینتوباکتر ۸۸ در رقت های بالا بر رشد پروتئوس میرابیلیس و اشرشیاکلی اثر مهارکنندگی و کشندگی داشت که نشان دهنده اثر آنتیباکتریال قوی این بیوسورفکتانت به این باکتریها میباشد همچنین عصاره بیوسورفکتانت بر استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، سالمونلا تیفیموریوم، سودوموناس آئروژینوزا هم اثر باکتریوسیدال و هم باکتریواستاتیک داشت که اعداد نزدیک به هم MBC و MIC نیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال بیوسورفکتانتها بر این باکتریهاست. در بررسی مطالعات مشابه، تحقیقات کمی خصوصاً در ایران در مورد خواص ضد میکروبی بیوسورفکتانتها صورت گرفته و یا دراین مطالعات در مورد جزئیات خصوصیات آنتی باکتریالی از جمله به نتایج هالههای عدم رشد اشاره نشده است با این حال بعضی از بیوسورفکتانتهای دکاپپتیدی حلقوی جدید از گونههای سودوموناس جدا شدند، که در شرایط in vitro فعالیت ضدمیکروبی بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم آویوم داخل سلولی یافت شد (۱۳). در تحقیقاتی که توسط وتسا و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد گزارش دادند که رامنولیپیدها جدا شده از سودوموناس دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه باکتری گرم منفی؛ سودوموناس آئروژینوزا و باکتری گرم مثبت؛ استافیلوکوکوس بودند (۲۳). همچنین فعالیت ضدمیکروبی بر اساس مقادیر MIC بیوسورفکتانت رامنولیپیدها از سودوموناس AT10 بر روی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، مخمر، و سویه های قارچ به دست آمده است. که با نتایج تحقیقات این پژوهش مشابه میباشد (۱). با این حال وجود برخی تفاوتها در میزان اثرات ضد میکروبی مشاهده شده در این مطالعه و تحقیقات مشابه می تواند به دلیل تفاوت سوبستراهای مختلف برای رشد باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت، استفاده از روشهای مختلف برای استخراج و ... باشد. همچنین تفاوت در اثرات ضد میکروبی نشان دهنده تفاوتهای موجود در ترکیبات بیوسورفکتانتها میباشد با توجه به نتایج این تحقیق میتوان گفت که این باکتری دارای پتانسیل فراوانی برای کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست محیطی است. بنابراین ما میتوانیم در مورد استفاده از آن در آینده به عنوان اجزاء تشکیلدهنده چندمنظوره فکرکنیم، بنابراین، با وجود پتانسیل بسیار زیاد بیوسورفاکتانتها در این زمینه، استفاده از آنها هنوز محدود است، احتمالا به دلیل هزینههای تولید نسبتاً بالا آنها است و همچنین اطلاعات اندکی درمورد سمیت آنها نسبت به سیستمهای انسانی وجود دارد با این وجود، تقاضای استفاده از آنها به صورت مکملهای غذایی، موادآرایشی و محصولات دارویی نشاندادن علاقه زیاد با استفاده از این محصولات میکروبی بدست آمده است.

منابع

1. Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcı´a F, Manresa A. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. Langmuir. 2001; 17(5): 1367-1371.

2. Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lepine F, Muller MM, Deziel E. Rhamnolipid: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regalation and Bioengineering of production. In: Gloria Soberón-Chávez, editor, *Biosurfactants*. 20th ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. p 13-55.

3. Anandaraj B, Thivakaran P. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *J Biosci Technol*. 2010; 1(3): 120-126.

4. Androw JM. BSAC Standardized disc susceptibility testing method. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 7(5): 48 – 57.

5. Banat I, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti M, Fracchia L. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiolol and Biotechnol*. 2010; 87(2): 427-444.

6. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *App and Env Microbiol***.** 2000; 53(5): 495-508.

7. Bicca FC, Fleck LC, Zachio MA. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev Microbiol*. 1999; 30: (3): 231-236.

8. Bodour AA, Gerrero-Barajas C, Maier M. Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *Appl and Env Microbiol*. 2004; 10(6): 14-20.

9. Bola O. Hydrocarbon Degrading Potentials Of Bacteria Isolated From a Nigerian Bitumen (Transand) Deposit. *Nature sci*. 2006; 4(3): 51-57.

10. Cameotra SS, Makkar RS, Kaur J, Mehta SK. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. In: Ramkrishna Sen, editor. *Biosurfactants*. 20rd ed. Springer NewYork; 2010. p 261-280.

11. Francy DS, Thomas JM, Raymond RL, Ward CH. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J Ind Microbiol*. 1991; 8, 237-246.

12. Hood SK, Zottola EA. Biofilms in food processing. *Food Control*. 1995; 6(1): 9-18.

13. Joachim V. Matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *B. subtilis* C1 isolated from petroleum sludge. *App Env Microbiol*. 2002; 68(12): 6210-6219.

14. Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrientsupplemented sea water. *Env Microbiol*. 2002; 4(3): 141-147.

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

16. Mireles JP, Toguchi A, Harshey RM. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001; 183(20): 5848-5854

17. Namir I, Haddad Wang J, Bozhong M. Identification of a biosurfactant producing strain: Bacillus subtilis HOB2. *Pro and Pep Lett*. 2009; 16: 7-13.

18. Okerentugba PO, Ezeronye OU. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluents in Nigeria. *Afr J Biotechnol*. 2003; 2(9): 288-292.

19. Rosa CFC, Michelon M, Burkert JFM, Kalil SJ, Burkert CAV. production of a rhamnolipid-type biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa LBM 10 grown on glycerol. *Afr J Biotechnol*. 2010; 9(53): 9012-9017.

20. Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Tre Biotechnol*. 2004; 22(3): 142-146.

21. Tabatabaee, A, Mazaheri Assadi, M, Noohi, A.A. and V.A. Sajadian, Isolation of biosurfactant producing Bacteria from oil reservoirs. *Iranian J Env Health Sci Eng*. 20056-12 :(1)2 ;.

22. Tonkova EV, Galabova D. Hydrolytic Enzymes and Surfactants of Bacterial Isolates from Lubricant-Contaminated Wastewater. *Z Naturforsch*. 2003; 58(c): 87-92.

23. Vatsa p, Sanchez L, Clement C, Baillieul F, Dorey S. Rhamnolipid Biosurfactants as new players in Animal and plant defens aginst microbes. *Int J Mol Sci*. 2010; 11(12): 5095-5908.

24. Walter V, Syldatk C, Hausmann R. Screening concepts for the isolation of Biosurfactant producing Microorganisms. In: Ramkrishna Sen, editor. *Biosurfactants*. 29th ed. Germany, Landes Bioscience and Springer Science; 2010. p 1-13.