

تولید بیوسورفکتانت در اکتینومیست های هالوتولرانت جدا شده از خاک دریاچه نمک قم

سید سهیل آقائی ۱، فرزانه فخاریان ۲، محمدرضا ذوالفقاری ۱، محمد سلیمانی درجاق ۱

۱ عضو هیات علمی تمام وقت گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم،

۲ دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی قم

#### چکیده

سورفکتانت ها به طور گسترده ای در صنایع مختلف کاربرد دارند. علاوه بر مشکلات زیستی ناشی از این سورفکتانت ها، ناکارآمدی آن ها در برخی از زمینه ها موجب توجه محققین به سمت استفاده از بیوسورفکتانت ها گردیده است. سورفکتانت ها با منشا زیستی، ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم ها از جمله قارچ، مخمر و باکتری ها هستند که با قرار گرفتن در بین سطوح، باعث کاهش کشش سطحی و بین سطحی می شوند. از جمله مزیت های بیوسورفکتانت ها نسبت به سورفکتانت های سنتتیک سازگاری آن ها با محیط زیست، قابلیت تجزیه پذیری به صورت طبیعی، سمیت پایین، عملکرد اختصاصی، فعالیت بالا تحت شرایط سخت دمایی، فشار و اسموالیتی بالا و هم چنین قدرت کف کنندگی بالای آن هاست. اکتینومیست های نمک دوست می توانند در خاک های شور یا محیط های آبی با درصد بالای نمک مانند دریاچه نمک قم حضور داشته باشند. میکروارگانیسم ها زمانی که در شرایط افراطی و استرس قرار می گیرند، برای زنده ماندن نیاز به سازگاری با شرایط جدید دارند. این سازگاری مستلزم تولید برخی متابولیت های جدید توسط میکروارگانیسم ها می باشد. از آن جایی که شوری یک فاکتور استرس برای باکتری به حساب می آید، به جداسازی اکتینومیست های مولد بیوسورفکتانت از خاک های 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 تست های بیوشیمیایی، جدایه های اکتینومیست هالوتولرانت برای تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به تست های رایج بررسی تولید بیوسورفکتانت ( رشد بر روی منبع هیدروفوب، همولیز گلوبول قرمز، کنار زدن نفت، سنجش ظرفیت امولسیون کنندگی، انهدام قطره روغن و سنجش کشش سطح) ۸ جدایه اکتینومیست به عنوان جدایه هایی با توان تولید بیوسورفکتانت انتخاب شدند. با توجه به نتایج به دست آمده، جدایه ۹ به عنوان بهترین جدایه انتخاب گردید

میکروارگانسیم ها موجوداتی هستند که در زیستگاه های<sup>1</sup> اکولوژی مختلفی وجود دارند . بنابراین دارای توانایی های منحصر به فردی هستند که آن ها را قادر به سازگاری در این محیط ها و گاهی شرایط افراطی<sup>2</sup> از لحاظ pH و دما و شوری می سازد (Valantine *et al.*, 2007, Khopade *et al.*,2012).

یکی از مهم ترین دلایل سازگاری میکروارگانسیم ها و رشد سریعشان در این محیط ها دارا بودن نسبت بالای سطح به حجم است که به آن ها اجازه جذب مواد غذایی و دفع مواد زاید را می دهد. این توانایی با تولید عوامل فعال سطحی<sup>3</sup> با نام بیوسورفکتانت<sup>4</sup> میسر می شود (Rosenberg, 2001 , Manivasagan *et al.*,2013).

بیوسورفکتانت ها ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانسیم ها از جمله قارچ و مخمر و باکتری ها هستند، (Anadaraj *et al.*, 2010, Gandhimathi, R. *et al.*,2009, Rismani *et al.*,2006) و می توانند در بین سطوح<sup>5</sup> قرار گیرند و کشش سطحی و بین سطحی را کاهش دهند (Joshi *et al.*, 2008). از آنجاییکه این ترکیبات دارای دو بخش آبگریز<sup>6</sup> و آبدوست<sup>7</sup> اند، به آنها دوگانه دوست<sup>8</sup> گفته می شود (Joshi *et al.*, 2008 ; Karanth *et al.*,1999). این ترکیبات آمفی پاتیک روی سطوح زنده تولید می شوند و می توانند 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).

سره های هیدروفوب و هیدروفیل به عنوان امولسیفایر<sup>9</sup> عمل کرده و باعث افزایش حلالیت هیدروکربن های نامحلول در آب می شود و از این جهت در پاکسازی محیط از آلاینده های نفتی<sup>10</sup> 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) بیوسورفکتانت ها در گروه های گلیکولیپیدی، لیپوپپتیدی، اسید چرب، فسفولیپید، لیپوپروتئین، لیپوپلی ساکارید، مایکوتیک اسید و ترکیبات پلیمری قرار می گیرند (Makkar , 2011 , Kitamoto , 2001 , Banat *et al.*,2000).

برخی بیوسورفکتانت ها دارای وزن مولکولی پائین مثل گلیکولیپید، لیپوپپتید هستند و برخی دیگر با وزن مولکولی بالا مثل پلی ساکارید، لیپوپلی ساکارید و لیپوپروتئین ها می باشند (Franzetti *et al.*,2012).

<sup>1</sup>Ecological niche

<sup>2</sup>Extreme environment

<sup>3</sup>Surface active agent

<sup>4</sup>biosurfactants

<sup>5</sup>interface

<sup>6</sup>Hydrophobe

<sup>7</sup>Hydrophile

<sup>8</sup>amphipathic

<sup>9</sup>emulsifier

<sup>10</sup>Oil remediation

بیوسورفکتانت ها یکی از مهم ترین محصولات بیوتکنولوژی به حساب می آیند که برای مصارف صنعتی و پزشکی مورد استفاده قرار گرفته اند.

به طور کلی بیوسورفکتانت ها به جهت توانایی هایی نظیر کاهش کشش سطحی و کشش بین سطحی یا قدرت امولسیون کنندگی دارای پتانسیل استفاده در زمینه های مختلفی اعم از صنایع شیمیایی، صنایع نفت و پتروشیمی، پلاستیک ها و مواد کامپوزیتی، شوینده ها (دترجنت ها) و پاک کننده ها، صنعت نساجی، ساخت و دباغی چرم و خز، صنعت رنگ و لاک و الکل و سایر محصولات پوشش دهنده، کاغذ و سایر محصولات سلولزی، زمینه کشاورزی، فرآیند های زیستی، دارویی، صنایع غذایی و محصولات آرایشی و پوستی هستند. در زمینه دارویی از بیوسورفکتانت ها به عنوان ضد ویروس<sup>۱۱</sup>، ضد قارچ<sup>۱۲</sup>، ضد باکتری<sup>۱۳</sup>، ضد تومور و سرطان ، ضد توکسین، تنظیم کننده سیستم ایمنی<sup>۱۴</sup>، تولید واکسن، ژن تراپی و عامل بازدارنده تشکیل بیوفیلم استفاده میشوند

(Williamsuk *et al.*, 2009 , Rodrigues *et al.*, 2006 ,Singh *et al.* 004 ,Muligan *et al.*, 2001 ,Rosenberg , 2001 , Banat *et al.*, 2000).

بیوسورفکتانت ها نسبت به سورفکتانت های سنتزی که از مشتقات نفتی اند و بسیار سمی و غیر قابل تجزیه می باشند، مزیت های بسیاری دارند (Kiran *et al.*, 2009).

از جمله این مزیت ها سازگاری آن ها با محیط زیست<sup>۱۵</sup>، قابلیت تجزیه پذیری به صورت طبیعی<sup>۱۶</sup>، سمیت پایین، عملکرد اختصاصی، فعالیت بالا تحت شرایط سخت دما، فشار و اسمولاریتی بالا و همچنین قدرت کف کنندگی بالای آن هاست (Kiran *et al.*, 2010, Kumar *et al.*, 2006, Gandhimathi *et al.*, 2009).

تاکنون گزارش های بسیار محدودی در زمینه تولید کنندگان بیوسورفکتانت در محیط های بسیار نمکی وجود داشته است (Cameotra , Makkar , 1998 )

از جمله بهترین گروه های میکروبی نمک دوست مولد بیوسورفکتانت باسیلوس<sup>۱۷</sup> ها هستند. گونه های باسیلوس قادر به تولید بیوسورفکتانت لیپوپپتیدی به نام سورفاکتین<sup>۱۸</sup> هستند که یکی از قوی ترین بیوسورفکتانت های شناخته شده تا به امروز می باشد (Kiran *et al.*, 2010) . سورفاکتین و سایر بیوسورفکتانت های لیپوپپتیدی مانند استرپتوفاکتین<sup>۱۹</sup> و گرامیسیدین<sup>۲۰</sup> که توسط دیگر میکروارگانیسم ها تولید می شوند، دارای توان آنتی بیوتیکی بالایی می باشند (Pey poux *et al.*, 1999).

---

<sup>11</sup>Antiviral

<sup>12</sup>Antifungal

<sup>13</sup>Antibacterial

<sup>14</sup>Immunomodulator

<sup>15</sup>Ecofriendly

<sup>16</sup>Biodegradation

<sup>17</sup>Bacillus

<sup>18</sup>Surfactin

<sup>19</sup>Streptofactin

باکتری دیگری که در این گروه می توانیم نام ببریم هالوموناس<sup>۲۱</sup> می باشد. هالوموناس ها باکتری های گرم منفی هستند که قادر به تشکیل اسپور نمی باشند و بیشتر در محیط های آبی حضور دارند (Kaye, Baross , 2000, Donio *et al.*,2013).

یکی دیگر از بهترین میکروارگانیسم های مولد بیوسورفکتانت استرپتومایسز ها<sup>۲۲</sup> هستند که از شاخه اکتینوباکتريا<sup>۲۳</sup> میباشند. این ارگانیسم ها در دسته ارگانیسم های خارق العاده ای که منبع تولید ترکیبات فعال زیستی<sup>۲۴</sup> هستند قرار می گیرند (Deepika *et al.*,2010). اکتینوباکتريا همچنین کاربرد های زیادی در زمینه محیطی،زیست دارویی و صنعتی دارند. اکتینوباکتريا ها متابولیت های منحصر به فرد و پیچیده ای را تولید می کنند. در میان جوامع میکروبی اکتینوباکتريا ها به علت تولید مقدار زیاد متابولیت های ثانویه شهرت زیادی یافته اند و تا به حال همتمایی برای آن ها پیدا نشده است (Nathan *et al.*,2004 ).

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

اکتینوباکتريا به خصوص گونه های استرپتومایسز اغلب برای تولید متابولیت های ثانویه غربالگری<sup>۲۵</sup> می شوند. جنس استرپتومایسز برای اولین بار در سال ۱۹۴۳ توسط واکسمن و هنریک شناسایی و گزارش شد (Waksman , Henrici , 1943).

استرپتومایسز ها ارگانیسم های هوازی و شیمیوارگانوتروفی هستند که دارای متابولیسم اکسیداتیوند و توانایی تولید کلنی های پودری ودانه ای و مخملی را دارند (Stanley *et al.*,2001).

استرپتومیست های نمک دوست می توانند در خاک های شور یا محیط های آبی با درصد بالای نمک مانند دریاچه نمک قم حضور داشته باشند.

تاکنون در داخل کشور بر روی جداسازی و شناسایی انواع باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت در چنین محیط هایی کار تحقیقی خاصی انجام نشده است. از سوی دیگر، شناسایی و تعیین ویژگی های متابولیت بیوسورفکتانت در سویه های بومی کشور به خصوص در استرپتومیست های نمک دوست، زمینه پژوهشی جدید و تازه ای محسوب می گردد.

---

<sup>20</sup>Gramicidin

<sup>21</sup>Halomonas

<sup>22</sup>Streptomyces

<sup>23</sup>Actinobacteria

<sup>24</sup>Bioactive compound

<sup>25</sup>Screening

بنابر این انجام این تحقیق قدم های موثری در بدست آوردن اطلاعات لازم و مفید در به کارگیری این سویه ها در تولید بیوسورفکتانت و کاربردی نمودن این محصولات زیستی در صنایع مختلف می باشد.

## مواد و روش ها :

### 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 جمع آوری نمونه های خاک، ابتدا بخش های 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 بسته های پلی تن (Polythene) استریل گذاشته شد. سپس تمامی نمونه ها در دمای ۴۰ 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 جمع آوری گردید. در هنگام نمونه برداری پارامترهای میزان شوری، pH بررسی گردید.



شکل (۱) : جمع آوری نمونه های خاک

### غربالگری و غنی سازی و جدا سازی اولیه

ابتدا نمونه ها 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.

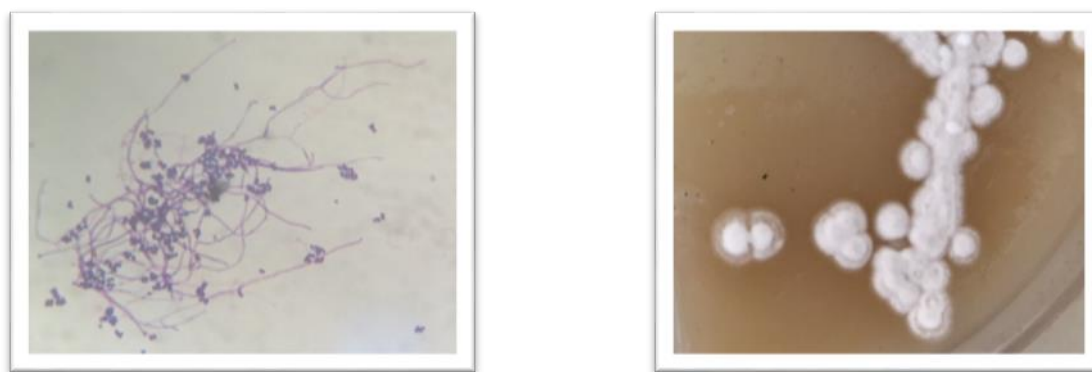
سپس ۰,۱ میلی لیتر از هر رقت را روی محیط آگار حاوی کازئین و نشاسته (Starch Casein Agar) که یک محیط غنی کننده اکتینومیست است (ISP International Streptomyces Project) در شرایط استریل با روش Spread کشت داده شد و پلیت ها به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (Collins *et al.*, 1995).

## شناسایی اولیه کلنی های احتمالی اکتینومیست

کلنی های اکتینومیست را می توان از نظر مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بر اساس دستورالعمل های (ISP) بررسی کرد (Shirling *et al.*, 1996).

۱. بررسی میکروسکوپی : در این مرحله کلنی های احتمالی اکتینومیست که از نظر مورفولوژی با دیگر کلنی ها متفاوت بودند انتخاب شدند. این کلنی ها ممکن است ظاهری خشن، صاف، سفت، چسبنده و یا پودری شکل داشته باشند و با رنگ های 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 میکروسکوپی و میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی گرم بزرگ نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری

## خالص سازی و نگهداری

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

## شناسایی جدایه ها در حد جنس

تست های بیوشیمیایی : در این مرحله تست های بیوشیمیایی و افتراقی مطابق با آخرین چاپ کتاب برگی (Bergey's manual) بر روی کلنی های تک و خالص جدایه های مرحله قبل انجام شد. تست های 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 جدایه ها :

در این مرحله توانایی تولید بیوسورفکتانت در جدایه ها با انجام آزمایش های ذیل بررسی و کلنی های هدف انتخاب شدند.

در این مرحله توانایی تولید بیوسورفکتانت در جدایه ها با انجام آزمایش های ذیل بررسی و کلنی های هدف انتخاب شدند.

۱- تولید همولیزین<sup>۲۶</sup>

۲- میزان انهدام قطره روغن معدنی<sup>۲۷</sup>

۳- تولید لیپاز

۴- پخش روغن<sup>۲۸</sup>

۵- فعالیت امولسیون کنندگی<sup>۲۹</sup>

۶- اندازه گیری کشش سطحی

### تولید همولیزین

کشت خالص/کتینومیست ها در محیط آگار خون دار حاوی ۰.۵٪ 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 کلنی ها، میزان تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفت. زیرا دانشمندان معتقدند ارتباط مستقیمی بین فعالیت همولیتیک باکتری ها با تولید بیوسورفکتانت وجود دارد (Banat , Mulligan *et al.*, 1984) (Carrillo *et al.*, 1996,1995).

### 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 میکروتیتیر ۹۶ خانه ای<sup>۳۰</sup> افزوده (Youssef *et al.*, 2004) و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۱ ساعت هم تراز<sup>۳۱</sup> 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 می شود (Deepika and Kannabiran 2010).

لازم به ذکر است برای تهیه سوپرناتانت، کشت جدایه ها به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت مایع مناسب برای کتینومیست (ISP<sub>1</sub>) کشت داده شدند و سپس برای استخراج بیوسورفکتانت، محیط کشت مایع به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید.

<sup>26</sup> Hemolytic test

<sup>27</sup> Drop collapse

<sup>28</sup> Oil displacement – Oil spreading

<sup>29</sup> Emulsification activity

<sup>30</sup> 96-well microtiter

<sup>31</sup> Equilibrate

## تولید لیپاز

در این مرحله بررسی تولید لیپاز در محیط حاوی توئین ۸۰ انجام شد. پس از گذشت مدت ۷-۹ 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 و ۲۰ میکرولیتر نفت خام<sup>۳۲</sup> 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

## فعالیت امولسیون‌کنندگی

به منظور محاسبه E<sub>24</sub>، 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 ۲۴ ساعت 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 هیدروکربن های متفاوتی هم چون نفت خام، گازوئیل و کروزن مورد بررسی قرار گرفتند

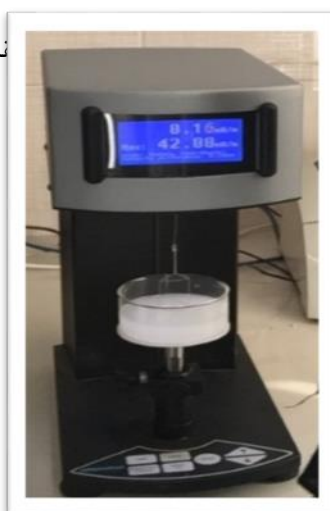


شکل (۴): سنجش ظرفیت امولسیون کنندگی نفت خام و گازوئیل

#### اندازه گیری کشش سطحی

سنجش کاهش کشش سطحی به وسیله دستگاه تنسیومتر<sup>۳۳</sup> به عنوان معیار اصلی تولید ترکیبات فعال سطحی زیستی در نظر گرفته شد. بدین منظور هریک از جدایه های 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 آوری های نوین در مهندسی علوم زیستی دانشگاه تهران اندازه گیری شد. در روش مذکور حلقه دستگاه که از جنس آلیاژ پلاتین می باشد در مایع غوطه ور می گردد، نیروی وارد بر حلقه غوطه ور شده بر روی صفر تنظیم می گردد و حلقه به آرامی از درون مایع به خارج کشیده می شود. نیروی



شکل (۵): دستگاه تنسیومتر

نظر گرفته می شود. برای انجام این تست، مقدار ۲۵ میلی لیتر از کشت ۹ روزه هر یک از نمونه ها 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 آنالیز های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. بهتر است برای شستشوی ظرف نمونه از دترجنت استفاده نشود زیرا باعث خطا در نتیجه آزمایش می شود (Banat 1995).

#### نتایج

پس از کشت سوسپانسیون خاک بروی محیط استارچ کازئین آگار کلنی های مشکوک رنگ آمیزی شدند و تست های بیوشیمیایی لازم مطابق با کتاب برژی انجام شد. در این میان ۵۰ سویه اکتینومیست جداسازی شد. سپس به محیط استارچ کازئین آگار نمک با درصد های متفاوت اضافه شد. حدوداً ۱۵ سویه تحمل نمک نسبتاً بالایی داشتند که در جدول زیر مشاهده می شود.

جدول (۱): رشد جدایه های اکتینومیست در درصد های متفاوت نمک

درصد نمک	جدایه ها

	%۵	%۸	%۹	%۱۰
۱	+	-	-	-
۲	+	-	-	-
۳	+	-	-	-
۴	+	+	+	-
۵	+	+	+	-
۶	+	-	-	-
۷	+	+	+	+
۸	+	+	+	+
۹	+	+	+	+
۱۰	+	+	+	-
۱۱	+	+	+	+
۱۲	+	+	+	+
۱۳	+	+	+	+
۱۴	+	+	+	+
۱۵	+	+	-	-

سپس اکتینومیست ها برای تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل بر اساس قطر هاله در تست پخش روغن به صورت زیر می باشد.

جدول (۲) : قطر هاله نفت کنار زده شده

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

جدول (۳) : سنجش فعالیت امولسیون کنندگی: سوپرناتانت کشت ۹ روزه جدایه ها با هیدروکربن های مختلف

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

جدول (۴) : نتایج حاصل از اندازه گیری کشش سطحی جدایه های اکتینومیست هالتولرانت

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 می شود که از بین نمونه های خاک دریاچه نمک قم، ۵۰ جدایه اکتینومیست شناسایی شدند که در این بین حدودا ۱۵ جدایه هالتولرانت بودند و توانستند ۱۰٪ نمک را تحمل کنند. همچنین با توجه به تست های اولیه بیوسورفکتانت حدود ۷ جدایه توانایی تولید بیوسورفکتانت بالایی را از خود نشان دادند که از این بین جدایه 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. آن ها دریافتند که

در غلظت نمک ۵٪ شاخص امولسیون کنندگی این باکتری %  $E_{24} = 23$  بود. همچنین بیوسورفکتانت گلیکولیپیدی این باکتری دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل برخی پاتوژن های انسانی می باشد (Manivasagan et al., 2013). با توجه به اهمیت بیوسورفکتانت ها در صنایع مختلف و کاربرد گسترده آن ها در علوم پزشکی، دارویی، افزایش بازیافت نفت و پاکسازی محیطی و با عنایت به تحقیقات مهمی که در مورد جداسازی و شناسایی سویه های 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 اکتینومیست های هالوتولرانت انجام و سپس انواع تولید کننده بیوسورفکتانت در آن ها غربالگری و مطالعه شود.

### نتیجه گیری

نتایج حاصل نشان می دهد که خاک دریاچه نمک قم دارای اکتینومیست های هالوتولرانت مولد بیوسورفکتانت می باشد و با توجه به کاربرد گسترده بیوسورفکتانت در جوامع امروزی می توان از این جدایه ها در صنایع مختلف استفاده کرد.

### منابع

- 1) Valentine DL., 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat Rev Microbiol* 5(4):316–323.
- 2) Khopade A, Biao R, Liu XY, Mahadik K, Zhang L, Kokare C., 2011. Production and characterization of biosurfactant from marine Streptomyces species B3. *J Colloid Interface Sci* 367:311–318.
- 3) 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.
- 4) Ron Ez, Rosenberg E., 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, 3: 229-236.
- 5) Anandaraj B, Thivakara P., 2010. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *J. Biosci Tech*, Vol 1 (3): 120-126..

- 6) 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 alba* MSA10. *Bioprocess Biosystems Engineering*, DO I 10.1007/s00449-009-0309-x.
- 7) 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.
- 8) Joshi S, Bharucha C, Desai AJ., 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresour Technol* 99:4603–4608
- 9) Karanth N, Deo P, Veenanadig N., 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Cur Sci* 77:116–126.
- 10) Darvishi P, Ayatollahi S, Mowla, D, Niazi A., 2011. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids and Surfaces B*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.011>.
- 11) Cameotra SS, Bollag JM ., 2003. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit Rev Environ Sci Technol* 30:111–126 .
- 12) Makkar RS, Cameotra SS, Banat IM., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1, 5.
- 13) 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.

- 14) 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.
- 15) 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 proylei* mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40(2): 419–427.
- 16) 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.
- 17) Peypoux F, Bonmatin J, Mand Wallach J.,1999.Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:553–563.
- 18) Kaye JZ, Baross JA.,2000. High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 32:249–260.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.



- 22) Waksman SA, Henrici AT., 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal Bacteriology*, 46: 337- 41.
- 23) 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.
- 24) Jaysree RC., 2013, Biosurfactant production by halophilic bacteria. *Int J Pharm Bio Sci* 4(4): (B) 904 – 912.
- 25) Collins CH, Lyne PM, Granje JM., 1995. In: *Microbiological methods*, Butterworth and Heinemann Publishers, London, pp: 129-31.
- 26) Shirling EB, Gottlieb D., 1966. *Methods, classification, identification and description of genera and species*. Vol. 2, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 61-292.
- 27) Mulligan CN, Cooper DG, Neufeld RJ., 1984. Selection of microbes producing biosurfactants on media without hydrocarbons. *J. Ferment. Technol.* 62(4), 311-314.
- 28) 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.
- 29) 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.

Abstract

Surfactants are widely used in the various industries, for some environmental problems scientific has led to use natural surfactants which named biosurfactants.

Biosurfactants are surface-active compounds synthesized by a wide variety of microorganisms. They are molecules that have both hydrophobic and hydrophilic domains and are capable of lowering the surface tension and the interfacial tension of the growth medium. They are nontoxic biomolecules that are biodegradable. Halotolerant actinomycetes can isolate from saline soil and lake with a high concentration of sodium chloride like qom saline lake. Bacteria need to adapt when are under extreme condition like salinity, If adaptation to the environment is due to metabolic changes, the production of new bioactive compounds as biosurfactants may be expected. In this research, 100 actinomycete species isolated from qom saline lake which 15 isolate among them were able to tolerate high salt concentrations, up to approximately 10% of NaCl, these 15 halotolerant actinomycetes were examined for biosurfactant production by common tests ( growth on the hydrophobic resources, hemolysis of erythrocytes, oil spreading test, surface tension measurement and etc.) . according to the results 8 actinomycete isolates were selected as biosurfactant producer. Results show that the species 9 has the best potential production..