ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(1):21-28

Induction of Biosurfactant Production from a Native Isolated Moderately Halophilic Bacterium, Halomonas sp. MM93 in the Presence of Olive Oil and Study of its Stability

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Karbalaei-Heidari H.*[1] *PhD,*
Taghavi L.[1] *MSc,*
Hasani Zadeh P.[2] *MSc*

How to cite this article
Karbalaei-Heidari H, Taghavi L, Hasani Zadeh P. Induction of Biosurfactant Production from a Native Isolated Moderately Halophilic Bacterium, Halomonas sp. MM93 in the Presence of Olive Oil and Study of its Stability. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(1):21-28.

[1]Biology Department, Sciences Faculty, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2]Biological Sciences Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Biology Department, Sciences Faculty, Shiraz University, Shiraz, Iran
Phone: -
Fax: -
karbalaei@shirazu.ac.ir

Article History
Received: October 28, 2018
Accepted: September 4, 2019
ePublished: March 14, 2020

ABSTRACT

Biosurfactants are valuable microbial metabolites that have considerable applications in different industries. They offer so many advantages over their synthetic counterparts such as biodegradability, low toxicity, activity at extreme conditions, ability to be produced from renewable wastes and by-products. In the present study, biosurfactant production of Halomonas sp. MM93 in nutrient broth medium at 30°C after 72h was investigated using oil spreading and hemolysis tests. The emulsification capacity of the biosurfactant was also evaluated in a defined production medium during 96h. Effect of olive oil, n-Hexan, and kerosene as hydrophobic carbon sources to induction of biosurfactant production by the strain MM93 was also investigated. Due to the importance of stability in the case of industrial use, the effect of extreme temperature, pH and salinity on the stability of bacterial culture supernatant was evaluated. This strain created a clear zone of 2.5cm diameter in an oil-spreading test and its E24 index was 45%. Halomonas sp. MM93 could reduce the surface tension of the culture medium from 70 to 40 mN/m. Also, the produced biosurfactant showed remarkable stability at high temperature (100°C), extreme acidic and alkaline conditions (pH=2-12), and high salinity (20g/L). According to obtained data, native isolated moderately halophilic bacterium, Halomonas sp. MM93 could be considered as a potent strain in terms of producing stable biosurfactants for various industries especially the processes of increasing microbial recovery of oil that need Compounds with High surface activity and high stability.

Keywords Biosurfactant]; Inducing Method; Halomonas sp.; MEOR; Emulsification Activity

CITATION LINKS

[1] Biosurfactant: Production and application [2] On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil [3] Biosurfactants: Production and applications [4] Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil [5] Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: A review [6] Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects [7] Biosurfactants: Properties, commercial production and application [8] Biosurfactant production and use in oil tank clean-up [9] Isolation, identification, biochemical properties and potential application of an organic solvent-tolerant lipase from Pseudomonas sp [10] Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons [11] Isolation and characterization of a biosurfactant-producing Fusarium sp [12] Surface-active agents from two Bacillus species [13] A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms [14] Production and characterisation of glycolipid biosurfactant by Halomonas sp [15] Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants [16] Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms [17] Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers [18] Genetically-manipulated microorganisms and their products in the oil service industries [19] The fermentation of long-chain compounds by torulopsis magnoliae: I. structures of the hydroxy fatty acids obtained by the fermentation of fatty acids and hydrocarbons [20] Microbial production of biosurfactants and their importance [21] Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil [22] Comparative study for biosurfactant production by using Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa [23] Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine Nocardiopsis sp [24] Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species Trichosporon asahii isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil [25] Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by Pseudomonas sp

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

القای تولید سورفکتانت زیستی توسط باکتری نمک‌دوست بومی *Halomonas* sp. MM93 در حضور روغن زیتون و مطالعه پایداری آن

حمیدرضا کربلائی‌حیدری* **PhD**
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
لادن تقوی MSc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
پروین حسنی‌زاده MSc
دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده
سورفکتانت‌های زیستی از جمله فرآورده‌های میکروبی ارزشمند هستند که کاربردهای قابل توجهی در صنایع مختلف دارند. از مزیت‌های این ترکیبات نسبت به انواع شیمیایی خود می‌توان به زیست‌تخریب‌پذیری، سمیت پایین، فعالیت در شرایط محیطی حاد و قابلیت تولید از پسماندها اشاره کرد. در مطالعه حاضر، توانایی سویه بومی *Halomonas* sp. MM93 در تولید بیوسورفکتانت با استفاده از روش گسترش روغن و همولیز در محیط کشت نوترینت براث و دمای ۳۰°C پس از ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت امولسیون‌کنندگی سورفکتانت زیستی نیز در یک محیط تولید تعریف‌شده طی ۹۶ ساعت، توسط آزمون سنجش فعالیت امولسیون‌کنندگی بررسی شد. اثر روغن زیتون، ان- هگزان و نفت سفید به‌عنوان منابع کربنی آب‌گریز در القای تولید سورفکتانت زیستی توسط این سویه مورد بررسی قرار گرفت. به واسطه اهمیت پایداری سورفکتانت‌های زیستی در استفاده‌های صنعتی، پایداری مایع رویی محیط کشت باکتری در شرایط افراطی دما، pH و غلظت نمکی سنجیده شد. این سویه در آزمون گسترش روغن، هاله‌ای به قطر ۲/۵سانتی‌متر ایجاد کرد و شاخص E24 آن برابر ۴۵% محاسبه شد. *Halomonas* sp. MM93 به‌واسطه تولید این سورفکتانت زیستی قادر به کاهش کشش سطحی محیط کشت از ۷۰ به ۴۰میلی‌نیوتون بر متر بود. همچنین سورفکتانت زیستی تولیدشده پایداری قابل ملاحظه‌ای در دمای بالا (۱۰۰°C)، شرایط اسیدی و بازی حاد (pH=۲-۱۲) و غلظت نمک بالا (۲۰گرم بر لیتر) را نشان داد. طبق نتایج حاصل، باکتری نمک‌دوست بومی Halomonas sp. MM93 می‌تواند به‌عنوان یک سویه توانمند در تولید سورفکتانت زیستی پایدار در صنایع مختلف به‌ویژه فرآیندهای افزایش بازیافت میکروبی نفت که نیازمند ترکیبات دارای فعالیت سطحی با پایداری زیاد هستند، مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: سورفکتانت زیستی، روش القایی، هالوموناس، افزایش بازیافت میکروبی نفت، فعالیت امولسیون‌کنندگی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۳

*نویسنده مسئول: karbalaei@shirazu.ac.ir

مقدمه

سورفکتانت‌ها ترکیباتی فعال و سطحی هستند که می‌توانند به‌طور شیمیایی تولید شوند و یا منشا زیستی داشته باشند. این مولکول‌ها توانایی قرارگیری در سطح بین دو فاز با درجه قطبیت و پیوندهای هیدروژنی متفاوت را دارند و باعث تغییر در کشش سطحی و به‌طور کلی تغییر در فعالیت‌های سطحی می‌شوند[1]. ساختار و عملکرد سورفکتانت‌ها بسیار متنوع است. این ترکیبات دارای نقش‌های گوناگونی مانند شوینده، پایدارکننده امولسیون، مخلوط‌کننده، برهم‌زننده امولسیون، مرطوب‌کننده، پایدارکننده، کنترل‌کننده کف و ژله‌ای‌کننده هستند[2]. سالانه چندین میلیون تن از سورفکتانت‌های شیمیایی تولید می‌شوند و سرعت رشد تولید این ترکیبات رو به افزایش است. سورفکتانت‌های شیمیایی به‌طور عمده بر پایه نفت و معمولاً سخت‌تجزیه‌پذیر هستند و در محیط باقی می‌مانند. فرآیندهای تولید سورفکتانت‌ها و محصولات فرعی حاصل از آنها نیز می‌توانند از لحاظ زیست محیطی خطرناک باشند[3].

سورفکتانت‌های زیستی دسته‌ای از سورفکتانت‌ها با منشا میکروارگانیزمی هستند که مزیت‌های فراوانی نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی دارند. از مهم‌ترین این مزیت‌ها می‌توان به زیست‌تخریب‌پذیری، سمیت پایین، تنوع ساختاری و کارآیی بالاتر اشاره کرد[4]. سورفکتانت‌های زیستی توسط طیفی از میکروارگانیزم‌ها شامل قارچ‌های رشته‌ای، باکتری‌ها و مخمرها تولید می‌شوند. این ترکیبات کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف از جمله صنایع نفتی، غذایی و دارویی، پزشکی، کشاورزی، آرایشی و بهداشتی و غیره دارند. در صنعت نفت از این ترکیبات برای پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی از آب و خاک و همچنین در فرآیند افزایش بازیافت میکروبی نفت (MEOR) از مخازن حاشیه‌ای استفاده می‌شود. درواقع این مولکول‌های دوگانه‌دوست، حلالیت و دسترس‌پذیری ترکیبات آب‌گریز از جمله هیدروکربن‌های نفتی را افزایش می‌دهند و از این طریق تخریب زیستی این ترکیبات توسط میکروارگانیزم‌ها را سرعت می‌بخشند[5]. باکتری‌ها به‌دلیل اندازه کوچکتر، پایداری زیاد نسبت به دماهای بالا، pH و شوری، نسبت به سایر میکروارگانیزم‌ها گزینه مناسب‌تری برای استفاده در فرآیند MEOR به نظر می‌رسند و در میان باکتری‌ها، انواع نمک دوست (هالوفیل‌ها) و گرمادوست (ترموفیل‌ها) برای استفاده در این فرآیند ارجحیت دارند[6].

استفاده از سورفکتانت‌های زیستی در صنایع مختلف به‌ویژه در صنعت نفت و صنایع غذایی مستلزم پایداری بالای این ترکیبات در شرایط سخت محیطی از جمله دما و شوری بالا است. براساس گزارش‌ها، سورفکتانت‌های زیستی نسبت به انواع شیمیایی آنها بسیار پایدارتر هستند. عملکرد بسیاری از سورفکتانت‌های زیستی تحت تاثیر تغییر شرایط محیطی مانند pH، دما و قدرت یونی قرار نمی‌گیرد. این سورفکتانت‌ها به دماهای بالا تا حدود ۹۰°C مقاوم هستند و فعالیت سطحی آنها تحت تاثیر تیمارهای حرارتی قرار نمی‌گیرد[7]. اگرچه غلظت ۲ تا ۳% نمک برای غیرفعال‌کردن اکثر سورفکتانت‌های شیمیایی کافی است، سورفکتانت‌های زیستی در محلول‌های نمکی بالاتر از ۱۰% نیز ته‌نشین یا غیرفعال نمی‌شوند. به‌طور مثال سورفکتانت زیستی لیکنیسین (Lichenysin) که توسط *Bacillus licheniformis* تولید می‌شود، در گستره دمایی کمتر از ۵۰°C، pH برابر ۴ تا ۹، غلظت نمک سدیم‌کلرید برابر ۵۰گرم بر لیتر و کلسیم برابر ۲۵گرم بر لیتر پایدار و فعال است[7].

با توجه به اهمیت سورفکتانت‌های زیستی در زیست‌پالایی و مزیت‌های این ترکیبات نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی، هدف مطالعه حاضر در مرحله اول بررسی پتانسیل تولید سورفکتانت زیستی توسط سویه نمک دوست *Halomonas* sp. MM93 و فراهم‌کردن شرایط افزایش تولید در محیط‌های ارزان‌قیمت بود. همچنین با توجه به لزوم دست‌یابی به سورفکتانت‌های زیستی مقاوم به دما، pH و نمک به‌منظور استفاده در صنایع مختلف به‌ویژه صنعت نفت، در مرحله دوم بررسی پایداری بیوسورفکتانت تولیدشده در شرایط سخت مورد توجه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

نوترینت براث، عصاره مخمر، انواع نمک‌های آمونیوم‌سولفات، سدیم‌کلرید و سدیم‌فسفات تهیه شدند (مرک؛ آلمان). روغن زیتون، ملاس و نفت سفید نیز به‌صورت نمونه‌های تجاری موجود در بازار خریداری شدند. همچنین در مطالعه حاضر پرایمر مورد نیاز سنتز شد (شرکت بیونیر؛ کره‌جنوبی). حلال‌های استفاده‌شده دیگر همگی در گرید آنالیتیک بودند (مرک؛ آلمان).

آماده‌سازی مایع تلقیح

به‌منظور آماده‌سازی مایع تلقیح، سویه *Halomonas* sp. MM93 در محیط نوترینت براث، دمای ۳۰°C و با سرعت شیکر ۲۱۰دور بر دقیقه به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. سپس باکتری در فاز رشد پایدار با فراوانی ۴% در محیط کشت تولید تلقیح شد (جدول ۱).

جدول ۱) اجزای محیط کشت تولید بیوسورفکتانت توسط *Halomonas* sp. MM93

اجزا	غلظت (درصد)
آمونیوم‌سولفات	۱
سدیم‌کلرید	۵
سدیم‌فسفات	۰/۲۵
عصاره مخمر	۰/۵
ملاس	۰/۵
روغن زیتون	۲
pH	۸

تولید سورفکتانت زیستی به روش القایی

به‌منظور تولید سورفکتانت زیستی در این سویه از روش القایی استفاده شد[8]. به این منظور محیط کشت تولید سورفکتانت زیستی (به جز روغن) تهیه و در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. سپس ۴% از مایع تلقیح در محیط کشت تولید تلقیح و گرماگذاری سویه مذکور در دمای ۲۸°C با سرعت ۲۱۰دور در دقیقه انجام شد. پس از ۱۶ ساعت گرماگذاری، ۲% از هر یک از سوبستراهای روغن زیتون، نفت و ان- هگزان به‌عنوان محرک تولید بیوسورفکتانت به فلاسک‌های جداگانه حاوی محیط کشت اضافه شد. سپس میزان تولید بیوسورفکتانت و رشد سلولی (OD_{600}) در طی زمان مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت پس از ۴ روز میزان فعالیت امولسیون‌کنندگی سورفکتانت زیستی تولیدشده در محیط کشت باکتری بررسی شد.

تعیین جنس جدایه MM93

بخشی از ژن 16S rDNA جدایه MM93 با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای HRK1 و HRK2 همانند گزارش‌های قبلی تکثیر شد[9]. تعیین توالی بخش مرکزی ژن مذکور با طول ۱۰۱۹ نوکلئوتید انجام شد که با شماره دسترسی KM261524 در GenBank ثبت شده است. به‌منظور بررسی رابطه فیلوژنتیک جدایه MM93 با سایر باکتری‌ها ابتدا هم‌ردیفی توالی با استفاده از نرم‌افزار Blast انجام شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 و به‌کارگیری الحاق همسایه (Neighbor joining) و بوت‌استرپ بر پایه ۱۰۰۰ (Bootstrap) درخت فیلوژنی رسم و جدایه در سطح جنس شناسایی شد.

آزمون شکست گلبول قرمز (همولیز)

از آزمون همولیز به‌عنوان روشی اولیه در تشخیص تولید سورفکتانت استفاده می‌شود. در این روش پس از ۱۶ ساعت کشت باکتری در محیط نوترینت براث، ۱۰۰میکرولیتر از محیط کشت حاوی سویه با رقت 10^{4} روی پلیت بلاد آگار حاوی ۵% خون گوسفند پخش و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸°C گرماگذاری می‌شود. پس از گرماگذاری، حضور هاله شفاف روی پلیت به‌عنوان شاخصی از تولید سورفکتانت زیستی بررسی می‌شود[10].

روش گسترش روغن

روش گسترش روغن، آزمونی کارآمد و سریع برای غربالگری اولیه سویه‌های مولد سورفکتانت زیستی است. در این روش ابتدا ۴۰میلی‌لیتر آب مقطر درون یک پلیت شیشه‌ای تمیز با قطر ۸سانتی‌متر ریخته شد. سپس ۲۰میکرولیتر نفت خام در مرکز این پلیت قرار داده، به‌صورتی که یک لایه نفت خام روی سطح آب درون پلیت تشکیل شد. ۱۰میکرولیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ مایع تخمیر در مرکز لایه نفت ایجادشده در سطح پلیت ریخته شد. کنارزدن نفت و ایجاد هاله با اضافه‌کردن مایع تخمیر، به‌عنوان شاخصی از تولید سورفکتانت زیستی مورد بررسی قرار گرفت. در این روش قطر هاله ایجادشده متناسب با غلظت سورفکتانت موجود در مایع تخمیر است[11].

فعالیت امولسیون‌کنندگی (شاخص E_{24})

این روش به‌منظور سنجش توانایی مایع تخمیر در امولسیون‌کردن ترکیبات آب‌گریز مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای انجام این آزمایش در یک لوله آزمایش ۲میلی‌لیتر مایع تخمیر و یا محلول سورفکتانت خام استخراج‌شده از مایع تخمیر به ۲میلی‌لیتر ان- هگزان اضافه و محتویات لوله با استفاده از ورتکس به مدت ۲ دقیقه به‌شدت مخلوط شد. این لوله آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده و سپس شاخص E_{24} با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد[12]:

$$E24 = \frac{\text{ارتفاع لایه امولسیفیه‌شده}}{\text{ارتفاع کل ستون مایع}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری کشش سطحی

اندازه‌گیری کشش سطحی با استفاده از دستگاه آنالیز شکل قطره (Drop shape analyzer)، مدل DSA-100 (KRUSS؛ آلمان) انجام شد. این دستگاه براساس روش قطره آویزان، کشش سطحی را اندازه‌گیری می‌کند[13].

مطالعات پایداری سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط *Halomonas* sp MM93

بررسی اثر دما

مایع رویی عاری از سلول حاصل از کشت ۷۲ساعته مربوط به سویه *Halomonas* sp MM93. به مدت ۲ ساعت در دماهای ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۱°C قرار گرفت. سپس ۲میلی‌لیتر از نمونه‌های تیمارشده در هر دما به لوله آزمایش حاوی ۲میلی‌لیتر ان- هگزان اضافه و پس از ۲ دقیقه ورتکس شدید و سپس ۲۴ ساعت سکون، شاخص E_{24} برای هر نمونه محاسبه شد.

بررسی اثر pH

pH نمونه‌های مایع رویی عاری از سلول در گستره ۲ تا ۱۲ تنظیم و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. سپس ۲میلی‌لیتر از هر نمونه به همراه ۲میلی‌لیتر ان- هگزان به یک لوله آزمایش اضافه و شاخص E_{24} برای هر نمونه محاسبه شد.

بررسی اثر شوری (نمک سدیم‌کلرید)

غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰% از نمک سدیم‌کلرید از مایع رویی عاری از سلول مربوط به سویه *Halomonas* sp MM93. تهیه و سپس با استفاده از حلال ان- هگزان به‌عنوان سوبسترای هیدروکربنی، شاخص E_{24} هر نمونه محاسبه شد.

بررسی فعالیت امولسیون‌کنندگی مایع تخمیر بر روی سوبستراهای مختلف

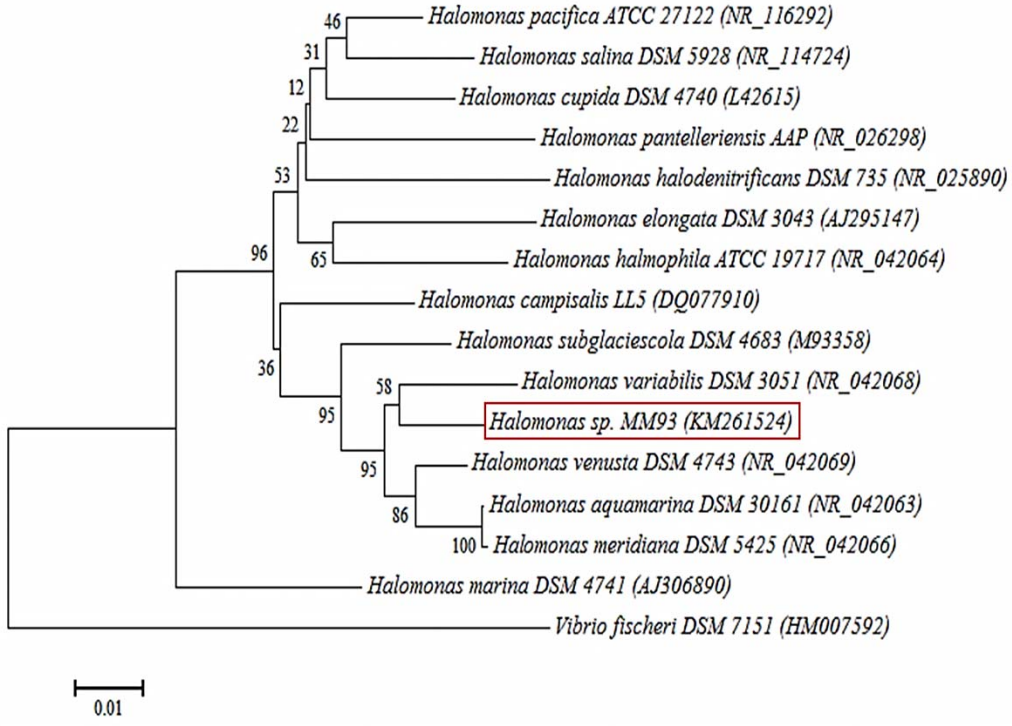
در این آزمایش توانایی مایع تخمیر جدایه MM93 در امولسیفیه‌کردن سوبستراهای آب‌گریز مختلف شامل هگزان، هپتان و نفت سفید مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور ۲میلی‌لیتر از مایع تخمیر حاوی سورفکتانت زیستی و ۲میلی‌لیتر از حلال آب‌گریز درون لوله آزمایش ریخته و شاخص E_{24} محاسبه شد.

آنالیز آماری

همه آزمایش‌ها با اندازه‌گیری حداقل ۳ تکرار مستقل انجام شد و داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Prism تجزیه و تحلیل شدند و نتایج واریانس به دست آمد. سپس با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن، میانگین داده‌ها در پایه آماری ۵% با یکدیگر سنجیده شدند.

یافته‌ها

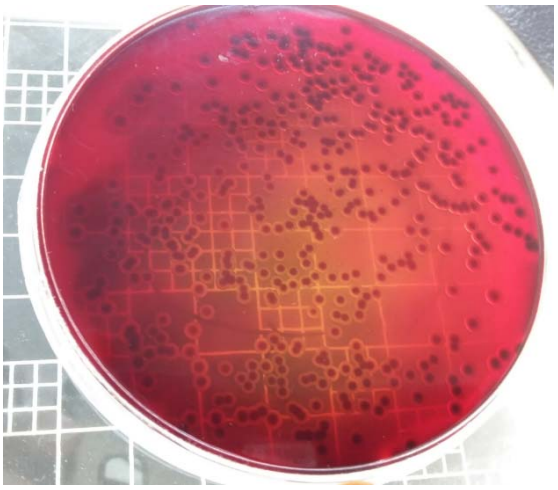
تجزیه و تحلیل توالی 16S rDNA جدایه MM93 به‌منظور تعیین موقعیت فیلوژنی این باکتری در میان سایر باکتری‌ها نشان داد که این سویه به جنس هالوموناس تعلق دارد و با نام *Halomonas* sp. MM93 معرفی شد. این سویه بیشترین قرابت ژنتیکی را با *Halomonas variabilis* DSM 3051 نشان داد. باکتری *Vibrio fischeri* DSM 7151 به‌عنوان گروه خارجی (Outgroup) مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱) درخت فیلوژنی براساس توالی ژن 16S rDNA سویه *Halomonas* sp. MM93

بررسی تولید سورفکتانت زیستی سویه *Halomonas* MM93 sp.

روش شکست گلبول قرمز به‌عنوان یک روش اولیه به‌منظور بررسی تولید سورفکتانت زیستی توسط این سویه استفاده شد. این سویه طی آزمون همولیز، هاله‌ای شفاف ایجاد کرد که نشان‌دهنده تولید سورفکتانت توسط این سویه بود (شکل ۲).



شکل ۲) فعالیت همولایتیک سویه *Halomonas* sp. MM93 (هاله همولیز قابل توجهی در اطراف کلنی‌ها قابل مشاهده است.)

نتایج حاصل از آزمون گسترش روغن نشان داد که این سویه قادر است لایه نفت روی آب را کنار بزند و هاله‌ای به قطر ۲/۵سانتی‌متر ایجاد کند (شکل ۳- الف). در مطالعه حاضر فعالیت امولسیون‌کنندگی مایع تخمیر جدایه مولد سورفکتانت زیستی بر روی حلال ان- هگزان با استفاده از آزمون E_{24} مورد بررسی قرار گرفت و میزان شاخص E_{24} محاسبه‌شده برای این سویه ۴۵% بود (شکل ۳- ب). این سویه همچنین قادر بود که طی مدت ۸۰ ساعت رشد در محیط کشت، کشش سطحی محیط را از میزان ۷۰ به ۴۰میلی‌نیوتون بر متر کاهش دهد.

پروفایل تولید سورفکتانت زیستی و رشد سویه MM93 *Halomonas* sp.

بررسی همزمان تولید سورفکتانت زیستی به روش القایی و رشد سویه *Halomonas* sp. MM93 نشان داد که در ۲۴ ساعت اولیه گرماگذاری، OD_{600} مایع تخمیر به‌طور سریعی افزایش پیدا کرد و سپس رشد این سویه وارد فاز سکون شد. تولید سورفکتانت توسط این سویه نیز ۲۴ ساعت پس از گرماگذاری شروع شد و پس از ۸۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰°C به میزان بیشینه خود رسید (نمودار ۱).

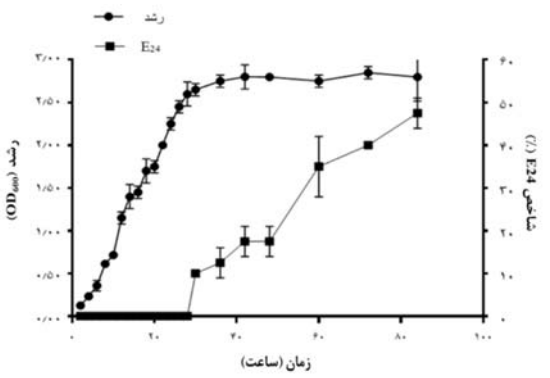
مطالعات پایداری سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط MM93 *Halomonas* sp.

در مطالعه حاضر، فعالیت امولسیون‌کنندگی سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط *Halomonas* sp MM93 در شوری بالا حفظ شد و غلظت‌های نمک به‌کاررفته تاثیری در فعالیت سورفکتانت تولیدشده نداشت و این ترکیب حتی در غلظت ۲۰% سدیم‌کلرید نیز فعالیت امولسیون‌کنندگی خود را به‌طور کامل حفظ کرد (نمودار ۲- الف). همچنین سورفکتانت زیستی تولیدشده، از نظر دمایی ترکیبی پایدار بود که حرارت‌دادن آن به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۰۰°C نیز تاثیری بر فعالیت آن نداشت، اما فعالیت این ترکیب در دمای ۱۲۱°C تحت تاثیر قرار گرفت و میزان فعالیت امولسیفیه‌کنندگی آن به ۳۳% کاهش پیدا کرد (نمودار ۲- ب). علاوه بر این فعالیت امولسیون‌کنندگی این سورفکتانت نسبت به pH نیز به‌شدت مقاوم بود، به‌طوری که فعالیت خود را در گستره pH ۲ تا ۱۲ حفظ کرد (نمودار ۲- ج).

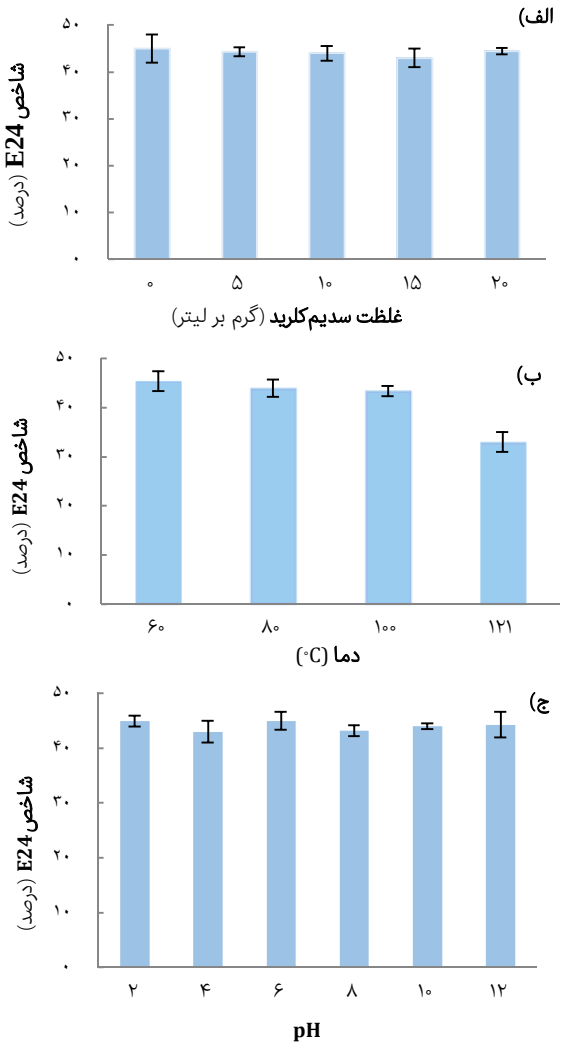
(الف)

(ب)

شکل ۳) هاله شفاف حاصل از کناررزدن نفت از سطح آب توسط مایع تخمیر (الف)؛ فعالیت امولسیون‌کنندگی مایع تخمیر بر روی سوبسترای آب‌گریز نفت (ب)



نمودار ۱) تولید سورفکتانت زیستی براساس فعالیت امولسیون‌کنندگی و رشد (OD_{600}) سویه *Halomonas* sp. MM93 در حضور روغن زیتون به‌عنوان سوبسترا طی مدت ۸۴ ساعت



نمودار ۲) بررسی تاثیر غلظت سدیم کلرید (الف)، حرارت (ب) و pH (ج) بر فعالیت سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط سویه *Halomonas* sp. MM93

بحث و نتیجه‌گیری

سویه *Halomonas* sp. MM93 یک باکتری مقاوم به نمک است که از دریاچه بختگان در استان فارس جدا شده است. جنس هالوموناس یکی از شناخته‌شده‌ترین جنس‌های باکتریایی نسبتاً نمک‌دوست محسوب می‌شود که از نظر زیست‌فناوری بسیار مورد توجه است[14]. جدایه‌های مختلف این جنس همچنین به‌واسطه توانایی در حذف هیدروکربن‌های نفتی آلاینده، می‌توانند در محیط‌های آلوده به هیدروکربن با شوری بالا مورد استفاده قرار بگیرند[15]. گزارش‌هایی از تولید سورفکتانت زیستی توسط جنس هالوموناس وجود دارد. به‌طور مثال تولید بیوسورفکتانت پنج سویه از این جنس توسط *کبوچه- گانا* و همکاران مورد بررسی قرار گرفت که از میان آنها دو سویه قادر به تولید سورفکتانت زیستی بودند[15]. به‌علاوه براساس گزارش‌ها و همچنین نتایج مطالعه حاضر، سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط باکتری‌های نمک‌دوست از جمله هالوموناس‌ها پایداری بسیار بالایی دارند که این موضوع از لحاظ کاربرد صنعتی این ترکیبات بسیار مورد توجه است.

تولید سورفکتانت زیستی توسط *Halomonas* sp. MM93 با روش‌های گسترش روغن، همولیز، بررسی فعالیت امولسیون‌کنندگی و اندازه‌گیری میزان کاهش کشش سطحی بررسی شد و محلول رویی محیط کشت این سویه در هر سه آزمون نتایج قابل توجهی نشان داد (شکل‌های ۲ و ۳- الف). با توجه به ماهیت سورفکتانت‌های زیستی این ترکیبات قادر هستند که با تداخل در غشای سلولی باعث شکستن گلبول‌های قرمز شوند. اگرچه روش شکستن گلبول‌های قرمز در غربالگری اولیه سویه‌های مولد سورفکتانت زیستی رایج است، اما این روش محدودیت‌هایی نیز دارد که در برخی موارد منجر به ایجاد نتایج اشتباه می‌شود. به‌طور مثال در این روش هاله ایجادشده ممکن است حاصل از تخریب آنزیمی باشد و به‌صورت کاذب نتیجه مثبتی را ایجاد کند[13]. در این مطالعه، درستی نتیجه حاصل از آزمون شکستن گلبول‌های قرمز با روش گسترش روغن و تعیین کشش سطحی تایید شد. روش گسترش روغن، آزمونی کارآمد و سریع برای غربالگری سویه‌های مولد سورفکتانت زیستی است. قطر هاله ایجادشده متناسب با غلظت سورفکتانت موجود در مایع تخمیر است و این روش می‌تواند به‌عنوان یک روش کمی برای سنجش نسبی میزان سورفکتانت زیستی تولیدشده مورد استفاده قرار بگیرد[16]. همچنین توانایی سورفکتانت زیستی تولیدشده در کنارزدن نفت از روی آب در آزمون گسترش روغن می‌تواند طی فرآیند پاک‌سازی، در هدایت لایه‌های نفتی موجود در سطح آب‌های آلوده به جهت دلخواه مورد استفاده قرار گیرد. براساس تعریف *ویلومسن* و *کارلسون* یک سویه توانمند در تولید سورفکتانت زیستی قادر است کشش سطحی محیط کشت را در مقایسه با آب مقطر به میزان ۲۰ واحد (میلی‌نیوتن بر متر) کاهش دهد[17]. سویه *Halomonas* sp. MM93 نیز کشش سطحی محیط کشت را از ۷۰ به ۴۰میلی‌نیوتن بر متر کاهش داد. بنابراین طبق تعریف ذکرشده این سویه با کاهش کشش سطحی محیط کشت به میزان ۳۰ واحد (میلی‌نیوتن بر متر) در تولید سورفکتانت زیستی کارآمد است.

با توجه به اینکه سورفکتانت‌های زیستی از متابولیت‌های ثانویه هستند، در این مطالعه از روش القایی به‌منظور افزایش تولید سورفکتانت زیستی استفاده شد. در این روش پس از ورود سلول به فاز ایستایی، ماده محرک یعنی روغن زیتون به محیط کشت آن اضافه شد. این زمان، زمان مهمی برای ترشح عوامل فعال در سطح توسط باکتری‌ها است. آزمایش مشابهی نیز توسط *بانات* و همکاران انجام و مشاهده شد که پس از مصرف سوبسترای گلوکز طی ۸ ساعت، اضافه‌کردن سوبسترای هیدروکربنی منجر به تولید سورفکتانت زیستی می‌شود[8]. طبق مطالعات، نوع منبع کربن استفاده‌شده می‌تواند نوع و میزان سورفکتانت تولیدشده را با مکانیسم القا/مهار تحت تاثیر قرار دهد. در مطالعات زیادی تولید سورفکتانت زیستی به روش القایی با استفاده از سوبسترای آب‌گریز تایید شده است. به‌طور مثال می‌توان به اثر القایی

اسیدهای چرب و گلیسیریدها بر تولید سورفکتانت زیستی توسط *Torulopsis magnoliae* اشاره کرد[18]. همچنین گزارش شده است که تولید گلیکولیپید EM توسط *Pseudomonas aeruginosa* SB-30 با اضافه‌کردن آلکن‌ها القا می‌شود[19]. در مطالعه حاضر، علاوه بر روغن زیتون از نفت و همچنین ان- هگزان به‌عنوان سوبستراهای القاکننده تولید سورفکتانت استفاده و مشخص شد که سوبسترای آب‌گریز روغنی قادر به القای تولید سورفکتانت زیستی توسط سویه *Halomonas* sp. MM93 است (نمودار ۱). در حالی که تولید سورفکتانت در حضور ان- هگزان انجام نشد و در حضور نفت نیز کاهش چشمگیری در تولید مشاهده شد.

سینتیک تولید سورفکتانت‌های زیستی در میان سیستم‌های مختلف بسیار متغیر است، ولی برای فاکتورهای سینتیکی معمول چهار حالت در نظر گرفته می‌شود. اولین حالت تولید وابسته به رشد است که در آن یک ارتباط موازی میان رشد، تولید سورفکتانت و مصرف سوبسترا وجود دارد. تولید رامنولیپید توسط جنس سودوموناس، از این حالت پیروی می‌کند. دومین حالت تولید سورفکتانت زیستی تحت شرایط محدودیت رشد است. در این حالت بر اثر محدودیت یکی از اجزای محیط، افزایش قابل توجهی در سطح تولید سورفکتانت زیستی اتفاق می‌افتد. افزایش تولید سورفکتانت زیستی توسط جنس سودوموناس در فاز سکون بر اثر کمبود نیتروژن در این فاز، نمونه‌ای از این حالت است. حالت سوم تولید توسط سلول‌های در حال استراحت و حالت چهارم، تولید تحت شرایط تامین پیش‌سازها است[20]. در مطالعه حاضر، تولید سورفکتانت زیستی توسط *Halomonas* sp. MM93 در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون آغاز شد و می‌توان گفت تولید این ترکیب غیروابسته به رشد است و از حالت سینتیکی دوم پیروی می‌کند (نمودار ۱).

سویه مورد بررسی در این مطالعه، قادر به امولسیفیه‌کردن ان- هگزان به میزان ۴۵% بود. در مطالعه *بنتو* و همکاران بیشترین میزان شاخص E_{24} محاسبه‌شده برای مایع تخمیر سویه‌های مولد سورفکتانت زیستی با استفاده از دیزل به‌عنوان سوبسترای آب‌گریز، ۱۸/۴% و مربوط به *Bacillus cereus* بود. میزان شاخص E_{24} محاسبه‌شده برای کنسرسیوم این سویه‌های مولد نیز ۴۸% گزارش شد[21]. علاوه بر ان- هگزان، سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط *Halomonas* sp MM93. قادر به امولسیفیه‌کردن حلال هپتان و نفت سفید هم بود و شاخص E_{24} مایع تخمیر برای این حلال‌ها نیز حدود ۴۵% بود (شکل ۳- ب). توانایی سورفکتانت تولیدشده توسط این سویه در امولسیفیه‌کردن هپتان، هگزان و نفت سفید نشان دهنده پتانسیل این ترکیب در استفاده به‌منظور پاک‌سازی زیستی آلودگی‌های هیدروکربنی است. در آزمایش مشابه انجام‌شده توسط *پریا* و *اوشارانی* از میان چهار ترکیب آب‌گریز نفت سفید، بنزین، روغن گیاهی و دیزل، مایع تخمیر سویه *B. subtilis* بیشترین میزان E_{24} را بر روی دیزل و به میزان ۶۰% داشت[22].

کاربرد سورفکتانت‌های زیستی در حوزه‌های مختلف بستگی به پایداری آنها در دماها، pHها و گاهی درجه‌های شوری متفاوت دارد. براساس مطالعات انجام‌شده، سورفکتانت‌های زیستی ترکیبات پایداری هستند که فعالیت آنها نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی کمتر تحت تاثیر عوامل فیزیکی از جمله دما و pH قرار می‌گیرد[23].

سورفکتانت زیستی تولیدشده در این مطالعه فعالیت خود را در غلظت ۲۰گرم بر لیتر نمک سدیم‌کلرید به‌طور کامل حفظ کرد (نمودار ۲- الف)، در حالی‌که غلظت ۲ تا ۳% نمک باعث غیرفعال‌شدن سورفکتانت‌های شیمیایی می‌شود[23]. در مطالعه‌ای دیگر، سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط سویه *Nocardiopsis* sp. B4 در غلظت ۳% نمک سدیم‌کلرید بیشترین فعالیت را دارد و فعالیت آن تا غلظت ۸گرم بر لیتر تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد[23]. *چاندران* و *داس* نیز با بررسی پایداری سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط *Trichosporon asahii* نشان دادند که غلظت سدیم‌کلرید ۱۰% پس از ۱۵ دقیقه منجر به کاهش ۳۵% از فعالیت امولسیفیه‌کنندگی می‌شود[24]. این در حالی است که نتایج حاصل از بررسی پایداری سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط سویه MM93 پایداری مطلوبی حتی در غلظت‌های بسیار بالا از نمک یعنی ۲۰گرم بر لیتر را نشان داد. بنابراین سورفکتانت تولیدشده توسط این سویه برای استفاده در محیط‌های دریایی که دارای شوری بالایی هستند، مناسب است. این ترکیب همچنین پایداری دمایی بالایی را نشان داد، به‌طوری که حرارت‌دادن آن به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۲۱°C تاثیری زیادی بر فعالیت آن نداشت (نمودار ۲- ب). در حالی که فعالیت سورفکتانت‌های شیمیایی مثل SDS در دماهای بالاتر از ۷۰°C به میزان قابل توجهی تحت تاثیر قرار می‌گیرد[23]. براساس گزارش *اوبایوری* و همکاران قدرت امولسیون‌کنندگی سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط سویه *Pseudomonas* sp. LP1 در دمای بالاتر از ۵۰°C تحت تاثیر قرار می‌گیرد و در دمای ۱۰۰°C به ۶۶% میزان اولیه خود می‌رسد[25]. پایداری دمایی بالای سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط *Halomonas* sp. MM93 نشان می‌دهد که این سورفکتانت می‌تواند در صنایعی مثل صنایع غذایی، دارویی و آرایشی مورد استفاده قرار گیرد، زیرا در این صنایع حرارت‌دادن این ترکیبات طی استریلیزه‌کردن لازم است. علاوه بر این به‌علت پایداری دمایی بالا، سورفکتانت تولیدشده توسط این سویه می‌تواند در فرآیند MEOR که در شرایط دمای بالای چاه‌های نفت نیاز به عملکرد مطلوب ترکیبات فعال سطحی دارد، استفاده شود. این ترکیب همچنین فعالیت خود را در pH=۲-۱۲ به‌طور کامل حفظ کرد (نمودار ۲- ج). در مطالعه‌ای مشابه، بررسی پایداری سورفکتانت زیستی تولیدشده توسط سویه *Nocardiopsis* sp. B4 نشان داد که این ترکیب در pH=۸-۱۲ پایدار و فعال است، در حالی‌که فعالیت این ترکیب در pHهای کمتر از ۷ به نصف کاهش می‌یابد[23]. پایداری

سورفکتانت تولیدشده توسط *Halomonas* sp. MM93 تحت شرایط شوری و فعالیت آن در دامنه pH اسیدی و بازی، استفاده از آن برای پاک‌سازی زیستی حفره‌های دریایی آلوده به ترکیبات نفتی را مناسب می‌کند، زیرا در این مکان‌ها درجه شوری و اسیدیته بالا است.

سویه *Halomonas* sp MM93. می‌تواند به‌عنوان یک سویه توانمند در تولید سورفکتانت زیستی مورد توجه قرار گیرد و سورفکتانت تولیدشده توسط این سویه به‌دلیل پایداری بسیار بالا، گزینه مناسبی برای استفاده در صنایع مختلف از جمله صنعت نفت و به‌ویژه فرآیند MEOR است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز ابراز می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: حمیدرضا کربلائی‌حیدری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/ تحلیلگر آماری/ نگارنده بحث (۴۰%)؛ لادن تقوی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/ تحلیلگر آماری/ نگارنده بحث (۴۰%)؛ پروین حسنی‌زاده (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/ نگارنده بحث (۲۰%).

منابع مالی: منابع مالی مطالعه حاضر از محل اعتبار پژوهشی پایان‌نامه نویسنده دوم تامین شده است.

منابع

1- Fakruddin MD. Biosurfactant: Production and application. J Pet Environ Biotechnol. 2012;3(4):1000124.
2- Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. Environ Prog. 1999;18(1):50-4.
3- Reis R, Pacheco G, Pereira A, Freire D. Biosurfactants: Production and applications. New York: InTech; 2013.
4- Bezza FA, Nkhalambayausi Chirwa EM. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. Chemosphere. 2016;144:635-44.
5- Bustamante M, Duran N, Diez MC. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: A review. J Soil Sci Plant Nutr. 2012;12(4):667-87.
6- Al-Sulaimani H, Joshi S, Al-Wahaibi Y, Al-Bahry S, Elshafie A, Al-Bemani A. Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects. Biotechnol Bioinf Bioeng. 2011;1(2):147-58.
7- Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK, Sivachidambaram P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Curr Sci. 2008;94(6):736-47.
8- Banat IM, Samarah N, Murad M, Horne R, Banerjee S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. World J Microbiol Biotechnol. 1991;7(1):80-8.
9- Abdollahi M, Karbalaei Heidari HR. Isolation, identification, biochemical properties and potential application of an organic solvent-tolerant lipase from Pseudomonas sp. strain NEB-1. Iran J Sci Technol. 2014;38(3):221-9.
10- Mulligan CN, Cooper DG, Neufeld RJ. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. J Ferment Technol. 1984;62(4):311-4.
11- Qazi MA, Kanwal T, Jadoon M, Ahmed S, Fatima N. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing Fusarium sp. BS-8 from oil contaminated soil. Biotechnol Prog. 2014;30(5):1065-75.
12- Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-active agents from two Bacillus species. Appl Environ Microbiol. 1987;53(2):224-9.
13- Jain DK, Collins-Thompson DL, Lee H, Trevors JT. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. J Microbiol Methods. 1991;13(4):271-9.
14- Dhasayan A, Kiran GS, Selvin J. Production and characterisation of glycolipid biosurfactant by Halomonas sp. MB-30 for potential application in enhanced oil recovery. Appl Biochem Biotechnol. 2014;174(7):2571-84.
15- Kebbouche-Gana S, Gana ML, Khemili S, Fazouane-Naimi F, Bouanane NA, Penninckx M, et al. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009;36(5):727-38.
16- Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Methods. 2004;56(3):339-47.
17- Willumsen PA, Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation. 1996;7(5):415-23.
18- Chakrabarty AM. Genetically-manipulated microorganisms and their products in the oil service industries. Trends Biotechnol. 1985;3(2):32-9.
19- Tulloch AP, Spencer JF, Gorin PA. The fermentation of long-chain compounds by torulopsis magnoliae: I. structures of the hydroxy fatty acids obtained by the fermentation of fatty acids and hydrocarbons. Can J Chem. 1962;40(7):1326-38.
20- Karanth NG, Deo PG, Veenanadig NK. Microbial production of biosurfactants and their importance. Curr Sci. 1999;77(1):116-26.
21- Bento FM, De Oliveira Camargo FA, Okeke BC, Frankenberger Jr WT. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. Microbiol Res. 2005;160(3):249-55.
22- Priya T, Usharani G. Comparative study for biosurfactant production by using Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa. Bot Res Int. 2009;2(4):284-7.
23- Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine Nocardiopsis sp. B4. Desalination. 2012;285:198-204.
24- Chandran PR, Das N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species Trichosporon asahii isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. Int J Eng Sci Technol. 2010;2(12):6942-53.
25- Obayori OS, Ilori MO, Adebusoye SA, Oyetibo GO, Omotayo AE, Amund OO. Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by Pseudomonas sp. strain LP1. World J Microbiol Biotechnol. 2009;25(9):1615-23.