



The effect of Nanoparticles on the Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* for Use in the Oil Industry

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Alamdari N.¹ MSc,
Rasekh B.^{2*} PhD,
Yazdian F.³ PhD

How to cite this article

Alamdari N, Rasekh B, Yazdian F.
The effect of Nanoparticles on the
Biosurfactant production by *Pseu-*
domonas aeruginosa for Use in the
Oil Industry. Modares Journal of Bi-
otechnology. 2019;10(2):223-229.

¹Biotechnology Department, Ad-
vanced Science & Technology Facul-
ty, Pharmaceutical Sciences Branch,
Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Microbiology & Biotechnology Re-
search Department, Research Insti-
tute of Petroleum Industry, Tehran,
Iran

³Science Engineering Department,
New Sciences & Technology Faculty,
Tehran University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Microbiology & Biotechnol-
ogy Research Department, Research
Institute of Petroleum Industry, Teh-
ran, Iran

Phone: +98 (21) 48255141

Fax: -

b.rasekh@gmail.com

Article History

Received: October 18, 2016

Accepted: May 27, 2017

ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Biosurfactants are surface tension reducing compounds produced by a wide range of microorganisms. These compounds are caused to facilitate the absorption insoluble substrate by microbial cells. The aim of this study was to investigate the effects of nanoparticles of Fe/SDS on the biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* in culture is molasses.

For this purpose were used different concentrations of nanoparticles 1, 500 and 1000 mg/L. As a result the concentration of 1mg /L of Fe/SDS nanoparticles has the best effect on the growth of bacteria and biosurfactant production. This concentration increased 23.21% cell growth and 20.73% biosurfactant production compared with control samples. By increasing the concentration of nanoparticles reduced growth rate and biosurfactant production was observed. This indicates that the nanoparticles having negative effects of higher concentrations. The results showed that low concentrations of nanoparticles Fe/SDS has positive effects on bacterial biosurfactant production and therefore a good alternative to chemical surfactants for use in the petroleum industry.

Keywords Biosurfactant; *Pseudomonas aeruginosa*; Nanoparticles; Fe/SDS

CITATION LINKS

[1] Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* strains [2] Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications-Present Status and Future Potentials [3] Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai [4] Biosurfactant-isolation, production, purification & significance [5] Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains [6] Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications [7] Production of Microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for ex situ enhanced oil recovery [8] Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* in kefir and fish meal [9] Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application [10] Effects of Au/Fe and Fe nanoparticles on *Serratia* bacterial growth and production of biosurfactant [11] Effects of Fe nanoparticles on bacterial growth and biosurfactant production [12] Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardia* sp [13] Biosurfactant: Production and Application [14] Production of Rhamnolipid biosurfactant from a marine *Pseudomonas aeruginosa* [15] Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil [16] Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925 [17] Microbial production of surfactants and their commercial potential [18] Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs [19] Enhancement of *Pseudomonas Aeruginosa* Growth and Rhamnolipid Production Using Iron-Silica Nanoparticles in Low-Cost Medium [20] Rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 using vegetable oil refinery wastes [21] Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus *Acinetobacter* spp and antibacterial effects of biosurfactant produced on some of the negative and gram-positive bacteria in vitro [22] Isolation and comparison of Rhamnolipids production in *Pseudomonas aeruginosa* P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V:10 [23] Isolation And Characterization Of *Pseudomonas aeruginosa* From Waste Soybean Oil As Biosurfactants Which Enhances Biodegradation Of Industrial Waste With Special Reference To Kosmi Dam, Betul District, (M.P.) [24] Antimicrobial sensibility of *Streptococcus mutans* serotypes to silver nanoparticles ...

بررسی اثر نانوذره Fe/SDS بر میزان تولید بیوسورفاکتانت حاصل از باکتری سودوموناس آئروژینوزا برای کاربرد در صنایع نفتی

ندا علمدار MSc

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

بهنام راسخ PhD

گروه پژوهش میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

فاطمه یزدیان PhD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، ایران

چکیده

بیوسورفاکتانت‌ها ترکیبات کاهش‌دهنده کشش سطحی بوده که توسط طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات سبب تسهیل در جذب سوپستراهای غیرقابل حل توسط سلول‌های میکروبی می‌شوند. ارزشمندترین جنبه کاربردی بیوسورفاکتانت‌ها به‌ویژه رامنولیبید حاصل از سودوموناس آئروژینوزا مربوط به صنعت نفت بوده که به‌منظور تسهیل استخراج و انتقال نفت خام و پاکسازی نفت‌کش‌ها می‌تواند استفاده شود. هدف پژوهش تجربی حاضر بررسی اثر نانوذره Fe/SDS بر میزان تولید رامنولیبید حاصل از سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت ملاس بود. برای این منظور از غلظت‌های مختلف یک، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره Fe/SDS استفاده شده است. در بین سایر غلظت‌های استفاده‌شده، غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر از نانوذره Fe/SDS دارای بهترین میزان اثر بر میزان رشد باکتری و در نتیجه میزان تولید بیوسورفاکتانت بوده است. به‌طوری‌که سبب افزایش ۲۳/۲۱٪ رشد سلول‌ها شده که در نتیجه این تعداد از سلول‌ها سبب افزایش تولید بیوسورفاکتانت به میزان ۲۰/۷۳٪ در مقایسه با نمونه کنترل شد. لازم به ذکر است افزایش غلظت این نانوذره از یک میلی‌گرم بر لیتر به ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش تدریجی میزان رشد سلول‌ها و تولید بیوسورفاکتانت شد که این امر ممکن است نشان‌دهنده دارابودن اثرات منفی این نانوذره در غلظت‌های بالاتر است و همچنین بهترین میزان امولسیون‌کنندگی بیوسورفاکتانت مربوط به نمونه کنترل در روز سوم (۷۲ ساعت) است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد با استفاده از غلظت‌های کم نانوذره Fe/SDS می‌توان میزان تولید رامنولیبید حاصل از سودوموناس آئروژینوزا را افزایش داد.

کلیدواژه‌ها: بیوسورفاکتانت، سودوموناس آئروژینوزا، نانوذره، Fe/SDS

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۱۶

* نویسنده مسئول: b.rasekh@gmail.com

مقدمه

بیوسورفاکتانت‌ها برای اولین بار در اواخر سال ۱۹۶۰ به‌عنوان عوامل حل‌کننده هیدروکربن‌ها مورد توجه قرار گرفتند. در طول دو دهه گذشته بیوسورفاکتانت‌ها تحت بررسی‌های مستمر بودند تا به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای سورفاکتانت‌های شیمیایی باشند [1, 2]. بیوسورفاکتانت‌ها از متابولیت‌های ثانویه خارج سلولی یا متصل به غشای سلولی هستند که توسط گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها اعم از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها در آغاز فاز سکون تولید می‌شوند که بسته به گونه تولیدکننده آن دارای خواص شیمیایی و اندازه مولکولی متفاوتی هستند [3, 4].

برخی از ویژگی‌های مهم و شاخص بیوسورفاکتانت‌ها که سبب برتری آنها در مقایسه با سورفاکتانت‌های شیمیایی می‌شود شامل سمیت پایین، زیست‌تخریب‌پذیری بالا، عملکرد انتخابی، فعالیت اختصاصی، امکان تولید از مواد خام ارزان‌قیمت، خواص ضد میکروبی، تولید آسان‌تر و تنوع بیشتر بیوسورفاکتانت‌ها و همچنین مقاومت در شرایط افراطی مانند درجه حرارت‌های بالا و

غلظت‌های زیاد نمک و تغییرات pH هستند [2, 5-8].

در عصر حاضر علم نانوتکنولوژی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و یکی از مهم‌ترین علوم بین‌رشته‌ای محسوب می‌شود. توسعه و کاربرد نانوتکنولوژی این پتانسیل را دارد که تا حد زیادی سبب بهبود کیفیت زندگی شود. اگرچه پتانسیل بسیار زیادی در فناوری نانو وجود دارد اما ایجاد سمیت سلولی توسط نانوذرات همیشه به‌عنوان یک نگرانی عمده محسوب می‌شود [9].

نانوذره Fe به‌دلیل سازگاری بالا و خاصیت مغناطیسی که دارد، در دارورسانی هدفمند بسیاری از سرطان‌ها استفاده می‌شود. در اکثر مقالات اثرات نانوذره Fe و مشتقات آن، روی فرآیندهای مختلف باکتریایی مانند میزان رشد باکتری، مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج قابل قبولی مشاهده شده است. فرآیند پوشش‌دارکردن نانوذره Fe اغلب به‌دلیل کاهش میزان اکسیدکنندگی نانوذره Fe صورت گرفته است [9-12].

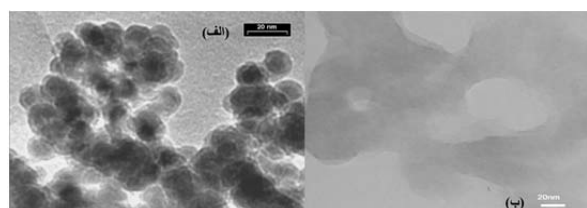
از این رو نانوذره آهن‌دار انتخاب‌شده در این تحقیق توسط سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) پوشش‌دار شده است. انتخاب SDS به‌عنوان پوششی برای نانوذره آهن به‌دلیل استفاده از این دترجنت در صنایع مرتبط با حذف آلودگی‌های نفتی از محیط زیست به‌ویژه خاک صورت گرفته است. کاربردهای فراوان بیوسورفاکتانت‌ها در صنایع مختلف، آنها را به‌عنوان یکی از بیشترین ترکیبات مورد تقاضا در صنعت معرفی می‌کند. به‌صورت اجمالی در سال ۲۰۱۳ در گزارشی عنوان شده است که مصرف بیوسورفاکتانت‌ها در صنعت نفت ۳۳٪، صنعت آرایشی بهداشتی و شوینده‌ها ۱۵٪، صنعت پزشکی به‌عنوان ضد میکروب ۱۲٪ و صنعت محیط زیست به‌منظور حذف آلودگی‌های زیست‌محیطی ۱۱٪ است [13].

رامنولیبیدها از مهم‌ترین بیوسورفاکتانت‌های گلیکولیپیدی هستند که توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شوند. مهم‌ترین کاربرد آنها در صنعت نفت به‌منظور افزایش بازیافت نفت به روش میکروبی MEOR [1, 3] یا حذف آلاینده‌های نفتی از محیط زیست [14-16] و همچنین پاکسازی نفت‌کش‌ها و حمل‌ونقل آسان‌تر نفت خام است [8, 17].

هدف از این تحقیق بررسی میزان رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا و تولید بیوسورفاکتانت حاصل از آن در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذرات است که امیدواریم نتایج حاصل بتواند به‌عنوان یک راهنمای مفید برای کاربردهای مختلف در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد: نانوذره Fe/SDS استفاده‌شده در تحقیق تجربی حاضر، از شرکت مهندسی زیست‌تجهیز پارس خریداری شده است. خصوصیات این نانوذره توسط تصویر میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. شکل حاصل نشان‌دهنده نانوذرات کروی با قطر ۲۰ نانومتر بود (شکل ۱- الف و ب).



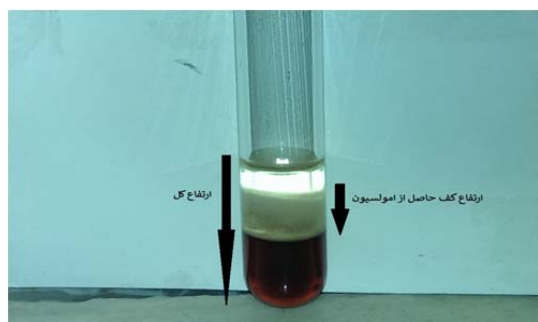
شکل ۱) الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM گرفته‌شده از نانوذره Fe/SDS؛ ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM گرفته‌شده از سوپانسیون نانوذره Fe/SDS در محیط کشت باکتری

روز بعد نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰rpm در هر دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع شفاف رویی دور ریخته شد. سپس روی رسوبات حاصل که همان رامنولپید هستند به نسبت ۱:۲ کلروفرم و متانول ریخته شد و در دمای محیط به زیر هود نگهداری شد تا کاملاً خشک شود و وزن رامنولپید حاصل توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد [1, 3, 14, 20, 21].

تست شاخص امولسیون‌کنندگی: این تست به منظور بررسی میزان پایداری و امولسیون‌کنندگی سوپ حاصل از باکتری پس از گذشت ۲۴ ساعت است. پس از نمونه‌گیری از محیط کشت و حذف سلول‌ها، به نسبت ۱:۱ سوپ رویی و گازوئیل درون لوله آزمایش ریخته و نمونه به مدت ۲ دقیقه با سرعت بالا همزده شد. سپس امولسیون ایجادشده به مدت ۲۴ ساعت به صورت ساکن و بدون حرکت قرار گرفت و در نهایت پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان پایداری امولسیون تشکیل‌شده توسط فرمول زیر محاسبه شد [20-23] (شکل ۲).

$$E24 = \frac{\text{ارتفاع بخش امولسیون شده}}{\text{ارتفاع کل}} \times 100$$

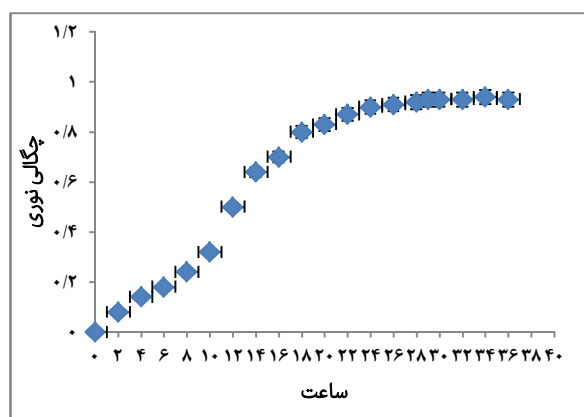
تست کشش سطحی: میزان کشش سطحی سوپ رویی توسط دستگاه کشش سطحی KRUESS KLOT K9 سنجیده شده است.



شکل ۲) کف حاصل از فعالیت امولسیون‌کنندگی رامنولپید

یافته‌ها

همان‌طور که پیش از این گفته شد ابتدا منحنی رشد باکتری در محیط کشت ملاس مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ۱ منحنی رشد به‌دست‌آمده از باکتری سودوموناس آئروجینوزا PBCC5 است. براساس این نمودار باکتری تقریباً در دهمین ساعت از رشد خود مرحله کمون را پشت سر گذاشت، وارد مرحله لگاریتمی شده و مرحله سکون باکتری بین ساعت‌های ۱۸ تا ۲۰ آغاز شد.



نمودار ۱) منحنی رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا PBCC5 در محیط کشت ملاس

بافر استفاده‌شده در این تحقیق، بافر نمکی PBS (کلریدسدیم ۸/۰۱ گرم بر لیتر، کلریدپتاسیم ۰/۲ گرم بر لیتر، دی‌سدیم‌هیدروژن‌فسفات ۲/۷۸ گرم بر لیتر، پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات ۰/۲۷ گرم بر لیتر، میزان pH برابر با ۷/۴) بوده که یک بافر پرکاربرد زیستی محسوب می‌شود. از این بافر به‌منظور ایجاد یک امولسیون پایدار برای نانوذره استفاده شده است [9-11].

میکروارگانیزم استفاده‌شده در تحقیق حاضر باکتری سودوموناس آئروژینوزا PBCC5 است که از بانک ذخایر زیستی پژوهشکده صنعت نفت تهیه شده است. این باکتری اولین‌بار از خاک‌های آلوده به نفت جنوب ایران جداسازی شده و توانایی تولید بیوسورفاکتانت آن سنجیده شده است. این باکتری دارای DNA خطی با ۱۴۱۰ جفت‌باز در بانک ژنی ثبت شده است. خصوصیات این باکتری توسط روش‌های تشخیصی رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی توسط چشم غیرمسلح، پس از ۴۸ ساعت نگهداری در انکوباتور درون محیط کشت نوترینت‌آگار، مورد بررسی قرار گرفت [18].

تهیه منحنی رشد باکتری در محیط کشت ملاس: ملاس استفاده‌شده در این تحقیق از کارخانه قند و شکر مروودشت شیراز خریداری شد. تمامی محیط کشت‌ها حاوی ملاس ۱۵٪ (وزنی-حجمی) بوده‌اند. ابتدا pH محیط توسط اسیدهیدروکلریدریک یک‌مولار به ۷ رسید و توسط دستگاه اتوکلاو سترون‌سازی انجام شد [19].

پس از تهیه کشت شبانه، تلقیح میکروبی به محیط کشت ملاس صورت گرفت و هر دو ساعت در شرایط کاملاً سترون از محیط کشت نمونه‌گیری شد و توسط دستگاه اسپکتوفتومتر رشد باکتری براساس میزان تراکم سلولی در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [9]. در پژوهش‌های متعددی نانوذرات از طریق کاهش فاز کمون و افزایش فاز لگاریتمی و سکون سبب افزایش رشد میکروارگانیزم‌ها می‌شوند که بدین‌منظور در ابتدا به محیط کشت باکتری اضافه می‌شوند. در این تحقیق به‌منظور یافتن این نکته که اگر نانوذرات پس از گذر باکتری از فاز کمون به محیط کشت اضافه شوند آیا باز هم روی رشد سلول‌ها و تولید بیوسورفاکتانت اثرگذار هستند یا خیر، تلقیح نانوذرات در انتهای فاز کمون و ابتدای فاز لگاریتمی به محیط کشت باکتری صورت گرفت [9, 10, 12].

تست وزن توده خشک سلولی: برای اندازه‌گیری وزن خشک توده سلولی ابتدا از محیط کشت نمونه‌برداری شد و با دور ۱۰۰۰rpm در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس رسوبات سلولی به کمک یک تا ۲ سی‌سی آب مقطر سترون سه‌بار شست‌وشو داده شدند و به روی فویل آلومینیومی تمیز، کاملاً خشک و وزن‌شده ریخته شدند و درون آون با دمای ۸۰°C به مدت ۱۲ ساعت کاملاً خشک کرده و سپس توسط ترازوی دیجیتال وزن شدند [3, 14]. اختلاف وزن موجود بین فویل خالی و فویل پر میزان بیومس در مقدار مشخصی از محیط کشت است، وزن حاضر به‌صورت گرم بر لیتر تبدیل گزارش شد.

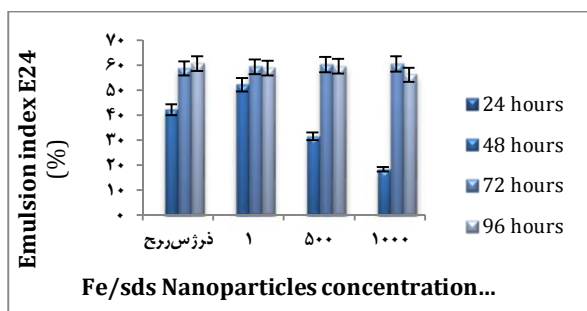
تست وزن خشک رامنولپید: برای اندازه‌گیری وزن خشک بیوسورفاکتانت ابتدا نمونه‌گیری از محیط کشت صورت گرفت. سپس با انجام سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰rpm و به مدت ۲۰ دقیقه سلول‌ها از محیط کشت جدا شده و پس از آن سوپ رویی را برداشته و درون فالکون‌هایی تمیز، خشک و وزن‌شده ریخته و توسط اسیدهیدروکلریدریک یک‌مولار تا pH ۲ اسیدی شده و به مدت یک شب درون یخچال در دمای ۴°C نگهداری شد. در صبح

مورد محاسبه قرار گرفت که براساس آن مقدار بیوسورفاکتانت تولید شده در مجاورت یک میلی گرم بر لیتر از نانوذره بیشترین میزان را نشان داد (نمودار ۵).

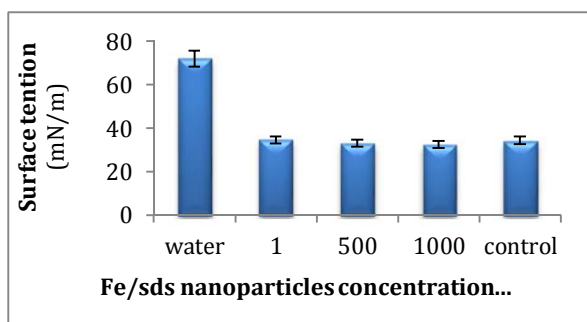
به طور کلی نتایج حاصل از وزن خشک رامنولیپید تولید شده در مجاورت غلظت های مختلف نانوذره Fe/SDS کاملاً با نتایج حاصل از وزن خشک توده سلولی در روز چهارم هم خوانی داشته است. نتایج حاصل از این تست نشان دهنده افزایش ۲۰/۷۳٪ تولید رامنولیپید در مجاورت غلظت یک میلی گرم بر لیتر نانوذره Fe/SDS و کاهش ۸/۵۴٪ و ۴۱/۴۷٪ تولید رامنولیپید به ترتیب در مجاورت غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر این نانوذره در مقایسه با نمونه کنترل شده است.

نتایج نشان دهنده دارا بودن اثرات مثبت این نانوذره در غلظت یک میلی گرم بر لیتر روی تولید بیوسورفاکتانت باکتری و دارا بودن اثرات منفی در غلظت های بالاتر از ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر بر تولید رامنولیپید حاصل از باکتری بوده است. به عبارتی همان طور که غلظت یک میلی گرم بر لیتر نانوذره Fe/SDS سبب بیشترین میزان بیومس سلولی می شد، موجب تولید بیشترین میزان رامنولیپید نیز شده بود، یعنی رشد بیشتر سلول ها سبب افزایش تولید رامنولیپید شده است و با افزایش غلظت نانوذره به ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر همان طور که رشد سلول ها کاهش یافته، تولید بیوسورفاکتانت نیز کاهش یافته است (نمودار ۵).

برای حصول اطمینان از قرار گرفتن نانوذره بر سطح باکتری تصویربرداری به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام شده است. شکل به دست آمده نشان دهنده قرار گرفتن نانوذرات روی سطح و غشای باکتری است و احتمالاً نانوذره در غلظت های مختلف از طریق افزایش سطح باکتری سبب افزایش تبادلات مواد غذایی باکتری با محیط کشت شده و در نتیجه میزان رشد و تولید بیوسورفاکتانت افزایش یافته است. در حالی که در غلظت های بالاتر اثرات سمی و منفی بر میزان رشد سلول ها و تولید بیوسورفاکتانت داشته است (شکل ۳).



نمودار ۲) نتایج تست E24 رامنولیپید تولید شده در مجاورت غلظت های مختلف نانوذره Fe/SDS



نمودار ۳) نتایج کشش سطحی رامنولیپید تولید شده در مجاورت نانوذره Fe/SDS پس از ۹۶ ساعت گرمخانه گذاری باکتری

در این مطالعه براساس دو روش مختلف قابلیت تولید رامنولیپید توسط سودوموناس آئروژینوزا در حضور غلظت های مختلف نانوذره مورد بررسی قرار گرفت. در تست امولسیون کنندگی و کشش سطحی تمامی رامنولیپید های تولید شده در مجاورت غلظت های مختلف نانوذرات قابلیت امولسیون کنندگی و کاهش کشش سطحی خود را حفظ نموده اند که این امر نشان دهنده عدم تاثیر نانوذرات در غلظت های مختلف بر این دو ویژگی است.

با بررسی تست امولسیون کنندگی بیوسورفاکتانت تولید شده در مجاورت نانوذره مشخص شد که در ۲۴ ساعت اول در هیچ یک از نمونه های موجود تولید رامنولیپید صورت نگرفته است، با اندازه گیری تست E24 در روز دوم، سوم و چهارم (۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) تمامی نمونه ها (نمونه های دارای غلظت های مختلف نانوذره و نمونه کنترل) دارای کف حاصل از امولسیون رامنولیپید بود که نشان دهنده آغاز تولید رامنولیپید از ۴۸ ساعت پس از رشد باکتری بود.

در نتایج تست E24 روزهای دوم، سوم و چهارم مشاهده شد که با افزایش غلظت این نانوذره از یک میلی گرم تا ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میزان کف حاصل از امولسیون تشکیل شده، کاهش یافته است که این امر نشان دهنده افزایش اثر منفی نانوذره روی باکتری در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره است. به طور کلی غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره سبب کاهش شدید تولید بیوسورفاکتانت در ۴۸ ساعت اول شده است. اما غلظت یک میلی گرم بر لیتر نه تنها سبب به تاخیر افتادن تولید بیوسورفاکتانت نشد بلکه باعث شد تا باکتری با سرعت بیشتری رشد کرده و تولید بیوسورفاکتانت را هر چه سریع تر آغاز کند (نمودار ۲). در پژوهش های قبل از تست E24 اغلب به منظور تعیین میزان توانایی بیوسورفاکتانت در امولسیون کنندگی استفاده شده است و به منظور تعیین مقدار بیوسورفاکتانت تولیدی، تست تعیین وزن خشک بیوسورفاکتانت مورد آزمایش قرار گرفته است [20-22].

با مقایسه نتایج حاصل از تست کشش سطحی در روز چهارم (۹۶ ساعت)، تغییری در میزان کشش سطحی رامنولیپید تولید شده در مجاورت غلظت های مختلف نانوذره در مقایسه با نمونه کنترل، مشاهده نشد. این امر نشان دهنده بی تاثیر بودن نانوذره Fe/SDS در غلظت های مختلف بر میزان کشش سطحی حاصل از رامنولیپید تولید شده است. به عبارتی دیگر تمامی رامنولیپید های تولید شده در مجاورت غلظت های مختلف این نانوذره همانند نمونه کنترل (فاقد نانوذره) سبب کاهش کشش سطحی آب از ۷۲ میلی نیوتن بر متر به ۳۰ تا ۳۵ میلی نیوتن بر متر شده اند (نمودار ۳).

براساس نمودار ۴ سلول هایی که در مجاورت غلظت یک میلی گرم بر لیتر از نانوذره بودند طی سیکل رشد (۴ روز) بیومس بیشتری نسبت به نمونه کنترل داشتند و همچنین میزان امولسیون کنندگی بیوسورفاکتانت این نمونه در تمامی روزها بیشتر از نمونه کنترل مشاهده شد. که این امر نشان دهنده وجود اثرات مثبت این نانوذره در غلظت های کم بر میزان رشد باکتری بوده است. در صورتی که نمونه های در مجاورت غلظت های بالاتر نانوذره نسبت به نمونه کنترل رشد کمتری داشته اند اما میزان امولسیون کنندگی بیوسورفاکتانت های تولید شده در این نمونه ها تفاوت چندانی با نمونه کنترل نداشته است که این امر نشان دهنده این است که غلظت بیوسورفاکتانت های تولید شده اثر چندانی بر میزان امولسیون کنندگی ندارند بلکه ماهیت و ساختار بیوسورفاکتانت های تولید شده اثر بیشتری بر توانایی امولسیون کنندگی آنها دارد. برای اطمینان از این امر وزن خشک بیوسورفاکتانت ها در روز چهارم

شاهد کاهش تدریجی رشد باکتری‌ها و در نتیجه کاهش تدریجی میزان تولید رامنولپید بوده‌ایم.

امروزه تحقیقات متعددی در زمینه مطالعه اثرات نانوذرات فلزی روی رشد باکتری‌ها و تولید بیوسورفاکتانت‌ها در زمینه‌های مختلف صنعتی صورت گرفته است. اثر نانوذرات مختلفی مانند آهن، Au، Fe/Au و آهن (III) اکسید روی رشد باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج این مطالعات بسته به نوع باکتری، نوع نانوذره و غلظت نانوذره متفاوت بوده است. مطالعات مختلفی نشان داده است که نانوذرات در غلظت‌های مشخصی سبب افزایش رشد برخی از باکتری‌ها شده و اثرات سمی روی آنها ندارند [9-12, 24].

ممکن است الکترون‌های تولیدشده توسط نانوذرات سبب افزایش عملکرد آنزیمی پروتئین‌های غشای باکتری شده یا عملکرد زنجیره انتقال الکترون غشای باکتری‌ها را افزایش دهند که این امر به نوبه خود موجب تسهیل سوخت‌وساز سلول شده و در نتیجه رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت افزایش یابد. با این حال در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته نفوذ و اثرگذاری مستقیم و آشکار نانوذرات روی باکتری‌ها مشاهده نشده است [11, 12].

به‌طور مثال در سال ۲۰۱۱ کترجی و همکاران اثر دو نانوذره Fe_3O_4 و Au روی رشد باکتری *E. Coli* را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که نانوذرات اکسید آهن یک اثر مهاری وابسته به غلظت نانوذره، روی رشد باکتری داشته است [9].

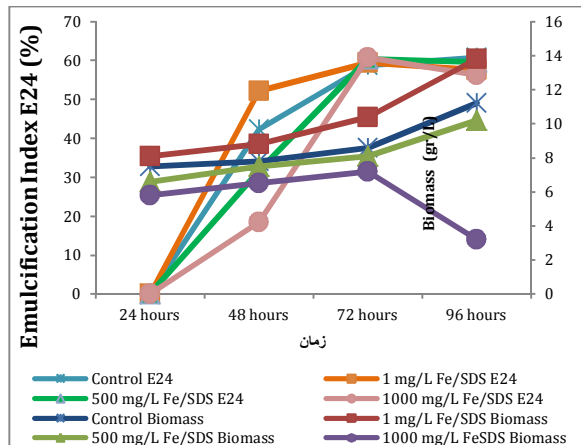
و همچنین در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۳ جیا/لیو و همکاران به بررسی اثر دو نانوذره آهن و نانوذره آهن پوشش‌دار شده توسط طلا، در غلظت‌های مختلف یک میلی‌گرم، تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم روی رشد و تولید بیوسورفاکتانت حاصل از باکتری سریشیا پرداختند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باکتری در مجاورت غلظت یک میلی‌گرم از نانوذره Fe دارای افزایش رشد بوده اما به محض افزایش غلظت نانوذره باکتری شدیداً دچار کاهش رشد می‌شود، در صورتی که نانوذره Fe/Au نه تنها اثر مهاری روی رشد باکتری در غلظت‌های ذکر شده نداشته بلکه با افزایش غلظت نانوذره رشد باکتری نیز افزایش یافته است [10].

و در سال ۲۰۱۴ کیوان و همکاران به بررسی اثر نانوذره Fe بر میزان تولید بیوسورفاکتانت باکتری *Nocardiopsis sp. MSA13A* پرداختند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده این امر بود که نانوذره آهن نه تنها سبب کاهش رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت نشده، بلکه سبب افزایش ۸۰٪ میزان تولید بیوسورفاکتانت این باکتری شده است [12].

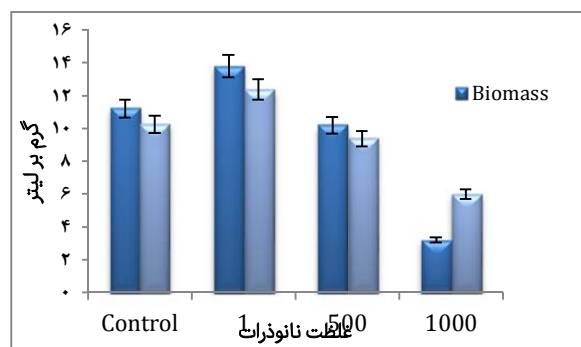
نتایج موجود با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر کاملاً مطابقت داشته و نانوذرات در غلظت‌هایی کم نه تنها فاقد اثرات منفی و مهاری روی باکتری بوده بلکه سبب افزایش تعداد باکتری و تولید رامنولپید نیز شده است. در این تحقیق مشخص شده که نانوذره Fe/SDS در کمترین میزان غلظت خود سبب بیشترین میزان افزایش تولید رامنولپید شده است (۲۰/۷۳٪).

در این تحقیق به‌منظور بررسی میزان کارایی رامنولپید تولیدی تست سنجش کشش سطحی و E_{24} صورت گرفت که نشان‌دهنده عملکرد مناسب رامنولپید تولیدشده در مجاورت نانوذرات در مقایسه با رامنولپید تولیدشده در نمونه کنترل (فاقد نانوذره) بوده است. به عبارتی نانوذرات اثری بر میزان امولسیون‌کنندگی رامنولپید نداشته و فقط سبب افزایش تولید رامنولپید باکتریایی شده است.

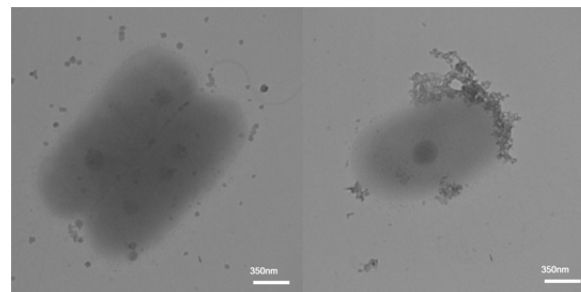
در عصر حاضر اثرات مثبت نانوذرات بر رشد میکروارگانیسم‌ها و تولیدات بیولوژیک حاصل از آنها که مورد استفاده‌ای مثبت بشر



نمودار ۴) سینتیک رشد باکتری به همراه میزان امولسیون‌کنندگی بیوسورفاکتانت تولیدشده در واحد زمان



نمودار ۵) نتایج سینتیک توده خشک سلولی و وزن خشک بیوسورفاکتانت روز چهارم (۹۶ ساعت) براساس گرم بر لیتر



شکل ۳) تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM باکتری به همراه نانوذره Fe/SDS

بحث

هدف از این تحقیق بررسی شرایط بهینه تولید رامنولپید و همچنین مطالعه ویژگی‌های رامنولپید تولیدی جهت به‌کارگیری در صنایع نفتی به‌منظور ایجاد امولسیون‌های پایدار بود. ابتدا رشد باکتری در محیط کشت ملاس صورت گرفت. سپس نانوذرات Fe/SDS با غلظت‌های متفاوت به محیط کشت باکتری اضافه شد و با تست‌های مربوطه میزان تولید رامنولپید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان‌دهنده افزایش تولید رامنولپید در حضور یک میلی‌گرم بر لیتر از نانوذره Fe/SDS بود. این امر نشان داد که این نانوذره در غلظت‌های کم، نه تنها اثرات منفی بر باکتری‌ها نداشته بلکه سبب افزایش رشد باکتری‌ها و در نتیجه افزایش تولید رامنولپید نیز شده‌اند. در صورتی که نانوذره در غلظت‌های بالاتر دارای اثرات منفی روی رشد باکتری و در نتیجه تولید رامنولپید حاصل از باکتری داشته است. به‌طوری که با افزایش غلظت نانوذره Fe/SDS از یک میلی‌گرم بر لیتر به ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

- Potentials. In: Ghista DN. Biomedical Science, Engineering and Technology. Norderstedt: Books on Demand; 2012. pp. 325-70
- 3- Rikalovic MG, Cvijovic GG, Vrvic MM, Karadzic I. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain. J Serbian Chem Soc. 2012;77(1):27-42.
- 4- Singh V. Biosurfactant-isolation, production, purification & significance. Int J Sci Res Publ. 2012;2(7).
- 5- Bagheri Lotfaabad T, Shahceraghi F, Shooraj F. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains. Jundishapur J Microbiol. 2013;6(1):29-35.
- 6- Pereira J, Gudina E, Costa R, Vitorino R, Teixeira J, Coutinho J, Rodrigues L. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. Fuel. 2013;111:259-68.
- 7- Amani H, Muller MM, Sylatk Ch, Hausmann R. Production of Microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for ex situ enhanced oil recovery. Appl Biochem Biotechnol. 2013;170(5):1080-93.
- 8- Kaskatep B, Yildiz S, Gumustas M, Ozkan SA. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* in kefir and fish meal. Braz J Microbiol. 2015;46(3):855-9.
- 9- Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. J Nanobiotechnology. 2011;9:34.
- 10- Lia J, Vipulanandan C. Effects of Au/Fe and Fe nanoparticles on *Serratia* bacterial growth and production of biosurfactant. Mater Sci Eng. 2013;33(7):3909-15.
- 11- Liu J, Vipulanandan C, Cooper TF, Vipulanandan G. Effects of Fe nanoparticles on bacterial growth and biosurfactant production. J Nanopart Res. 2013;15:1405.
- 12- Kiran GS, Nishanth LA, Priyadarshini S, Anitha K, Selvin J. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardiopsis* sp. MSA13A. BMC Biotechnol. 2014;10:14-48.
- 13- Fakruddin Md. Biosurfactant: Production and Application. J Pet Environ Biotechnol. 2012;3(4):124.
- 14- Gomathy C, Senthilkumar R. Production of Rhamnolipid biosurfactant from a marine *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Res Environ Sci Technol. 2013;3(3):86-91.
- 15- Rosa C, Freire D, Ferraz H. Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil. J Environ Chem Eng. 2015;3(1):89-94.
- 16- Rocha CA, Pedregosa AM, Laborda F. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. AMB Express 2011;1(1):9.
- 17- Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61(1):47-64.
- 18- Tabatabaee A, Mazaheri M, Noohi A, Sajadian VA. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. Iranian J Environ Health Sci Eng. 2005;2(1):6-12.
- 19- Sahebnazar Z, Mowla D, Karimi GH. Enhancement of *Pseudomonas Aeruginosa* Growth and Rhamnolipid Production Using Iron-Silica Nanoparticles in Low-Cost Medium. J Nanostructures. 2018;8(1):1:10.
- 20- Bagheri Lotfaabad T, Partovi M, Bahmaei M. Rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas*

قرار می‌گیرد ثابت شده و حایض اهمیت است. متاسفانه مطالعات در این زمینه ناچیز بوده و مقالات مربوط به اثرات سایر نانوذرات بر میکروارگانیسم‌ها نیز محدود هستند. امیدواریم که مطالعه اخیر نقطه‌عطی برای آغاز تحقیقات جدید در این زمینه و هر چه بهتر شدن زندگی بشر باشد.

با توجه به بی‌ضرر بودن امولسیفایر طبیعی تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در مقایسه با امولسیفایرهای مصنوعی که بعضی اثرات جانبی نامطلوبی دارند، می‌توان میزان آسیبه‌های وارده به محیط زیست را تا حد مطلوبی کاهش داد. با انجام تحقیقات بیشتر به منظور یافتن نانوذره مناسب‌تر و همچنین سوبسترای ارزان‌تر به منظور افزایش تولید رامنولیپید، می‌توان هزینه تولید این ترکیبات طبیعی را کاهش داده و صنایع نفتی را به سمت استفاده از امولسیفایرهای طبیعی و جایگزین نمودن آنها به جای امولسیفایرهای مصنوعی سوق داد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که رامنولیپید تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت ملاس و در حضور نانوذرات، دارای توانایی قابل قبولی در میزان کاهش کشش سطحی بوده و می‌توان از آن به عنوان یک امولسیفایر طبیعی در صنایع نفتی استفاده کرد. با توجه به نتایج حاصل باکتری‌های مجاور شده با یک میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات Fe/SDS سبب افزایش رشد باکتری‌ها به میزان ۲۳/۲۱٪ و افزایش تولید رامنولیپید به میزان ۲۰/۷۳٪ در مقایسه با نمونه کنترل شده‌اند. همچنین با افزایش غلظت نانوذرات کاهش رشد و تولید مشاهده شد که احتمال می‌رود این امر به دلیل دارا بودن اثرات منفی این نانوذرات در غلظت‌های بالاتر روی باکتری است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از گروه بیوتکنولوژی پژوهشگاه صنعت نفت و دانشگاه تهران و همچنین حمایت شرکت ملی پالایش و پخش فرآورده‌های نفتی ایران، که در به ثمر رسیدن این پژوهش نهایت همکاری را به عمل آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی کنند.

تأییدیه اخلاقی: این مقاله تاکنون در نشریه دیگری به چاپ نرسیده، برای بررسی و چاپ برای نشریه دیگری فرستاده نشده و تا زمان تعیین تکلیف نهایی از سوی نشریه زیست‌فناوری برای نشریه دیگری ارسال نخواهد شد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ندا علمدارا (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ بهنام راسخ (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰٪)؛ فاطمه یزدیان (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۰٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Amini F, Samadi N, Harande M, Naghdi M, Sharifan A. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* strains. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2009;4(1):33-8.
- 2- Fracchia L, Cavallo M, Martinotti M, Banat IM. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications-Present Status and Future

Pseudomonas aeruginosa P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V:10. Open Access Sci Rep. 2012;1(12).
23- Bhawsar NA, Singh M. Isolation And Characterization Of *Pseudomonas aeruginosa* From Waste Soybean Oil As Biosurfactants Which Enhances Biodegradation Of Industrial Waste With Special Reference To Kosmi Dam, Betul District, (M.P.). Int J Adv Res. 2014;2(6):778-83.
24- Cristobal E, Castanon M, Martinez-Martinez RE, Rodriguez L, Marin P, Macias R, Ruiz F. Antimicrobial sensibility of *Streptococcus mutans* serotypes to silver nanoparticles. Mater Sci Eng C. 2012;32(4):896-901.

aeruginosa MR01 using vegetable oil refinery wastes. New Cell Mol Biotechnol J. CMBJ. 2013;3(9):91-9. [Persian]
21- Mostafapour M, Ahmady- Abchin S, Saffari M. Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus *Acinetobacter* spp and antibacterial effects of biosurfactant produced on some of the negative and gram-positive bacteria in vitro. New Cell Mol Biotechnol J. 2014;4(14):79-91. [Persian]
22- EL-Amine Bendaha M, Mebrek S, Mostefa N, Abdelkrim T, Ahmed Belaouni H, Bouziane A. Isolation and comparison of Rhamnolipids production in