

# بررسی اثر نانوذرات مغناطیسی ( $Fe^0$ و $Fe^{3+}$ ) پوشش دار شده در میزان تولید بیوسورفکتانت باکتری باسیلوس سابتیلوس در بیوراکتور

گلایل مدبر<sup>1</sup>، عباس اخوان سپهی<sup>2\*</sup>، فاطمه یزدیان<sup>3</sup>، حمید راشدی<sup>4</sup>

1- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

2- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

4- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: 99/9/23

تاریخ دریافت: 98/11/2

صندوق پستی: 1669717413

\*نویسنده مسئول: akhavansepahy@gmail.com

## چکیده:

بیوسورفکتانت‌ها، مولکول‌هایی هستند که میکروارگانیسم‌ها آنها را تولید می‌کنند. سورفکتین یکی از مهم‌ترین بیوسورفکتانت‌های لیپوپپتیدی است که گونه‌های مختلف باسیلوس سابتیلوس آن را تولید می‌کنند. هدف از این پژوهش، بررسی اثر نانوذرات  $Fe^0$  و  $Fe^{3+}$  پوشیده شده با نشاسته در میزان تولید سورفکتین حاصل از باسیلوس سابتیلوس است. برای این منظور 20 باسیلوس از 70 نمونه خاک، جداسازی و با روش‌های بیوشیمیایی خالص و با روش  $16S rRNA$  توالی ژنوم شدند. به منظور جداسازی و تشخیص تولید بیوسورفکتانت از روش‌های کمی و کیفی غربالگری، مانند آزمون همولیز، تست انهدام قطره، سنجش فعالیت امولسیون‌کنندگی و کشش سطحی استفاده شد. دو گونه 61 و 63 (*Bacillus subtilis* subspecies. *Inaquaosorum*) انتخاب شدند. سپس در آزمون همولیز، تولید بیوسورفکتانت و کاهش کشش سطحی در محیط حداقل نمکی حاوی نانوذرات  $Fe^0$  و  $Fe^{3+}$  در 48، 72 و 96 ساعت بعد از کشت بررسی شد. SEM اتصال نانوذرات به سورفکتانت را تأیید کرد. بهترین باکتری، سویه 61 و بهترین نانوذره،  $Fe^{3+}$  به دست آمد و در بیوراکتور کشت داده شد. این نتایج با نتایج حاصل از بیوراکتور بدون نانوذره مقایسه شد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد سورفکتین حاصل از کشت سویه 61 در بیوراکتور حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$  پس از 72 ساعت از رشد، تولید بیشتری از کشت همین سویه پس از 72 ساعت بدون نانوذره  $Fe^{3+}$  دارد که در صورت ادامه تحقیقات می‌توان از این سویه برای تجاری‌سازی استفاده کرد.

کلیدواژگان: باسیلوس سابتیلوس، بیوسورفکتانت، نانوذرات  $Fe^0$  و  $Fe^{3+}$ ، کشش سطحی، سورفکتین

## مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها، مولکول‌های دوگانه‌دوست منحصربه-فردی هستند که در حذف آلودگی‌های آلی و فلزی محیط زیست کاربرد بسیاری دارند [1]. بیوسورفکتانت‌ها در صنایعی مانند صنعت نفت، صنایع غذایی، دارویی و آرایشی به کار می‌روند. برخی از ویژگی‌های شاخص بیوسورفکتانت‌ها که سبب برتری آنها در مقایسه با سورفکتانت‌های شیمیایی می‌شود، عبارت‌اند از: کاهش کشش سطحی و بین سطحی، سمی بودن پایین، زیست تخریب‌پذیری بالا، امولسیون‌کنندگی، عملکرد انتخابی، فعالیت اختصاصی، امکان تولید از مواد خام ارزان قیمت، خواص ضد میکروبی، تولید آسان‌تر و تنوع بیشتر بیوسورفکتانت‌ها و همچنین مقاومت در شرایط افراطی مانند درجه حرارت‌های بالا و غلظت‌های زیاد نمک و تغییرات pH [2-5]. بیوسورفکتانت‌ها با افزایش حلالیت و امولسیون نیز باعث می‌شوند تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی افزایش یابد [6]. سورفکتین مولکولی با وزن مولکولی 1036/3 گرم بر مول تولیدشده توسط گونه‌های مختلف باسیلوس سابیلوس از مؤثرترین بیوسورفکتانت‌ها با قابلیت کشش سطحی تا 25 میلی‌نیوتن بر متر هستند. ساختار سورفکتین لیپوپتیدی از 7 اسیدآمینو متصل به گروه کریوکسیل و هیدروکسیل یک اسید چرب 14 کربنی تشکیل شده است [7 و 8]. سورفکتین از مؤثرترین بیوسورفکتانت‌هاست که می‌تواند کشش سطحی آب را در غلظت‌های کمتر از  $1 \times 10^{-5} M$ ، از 72 mN/m به 27 mN/m کاهش دهد [9]. بنابراین، خواص بیواکتیو زیادی چون فعالیت‌های ضد میکروبی [10]، ضد ویروسی [11]، ضد قارچی و ضد تومور [12] دارد. بررسی‌های علمی محققان نشان می‌دهد تولید سورفکتین به رشد باکتری وابسته است [1]. امروز دانشمندان به منظور افزایش مقدار تولید و افزایش اثر بیوسورفکتانت تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از نانوذراتی مثل آهن، طلا، نقره و

اکسید آهن انجام می‌دهند. اخیراً مطالعاتی با هدف بررسی اثر نانوذرات مختلف در میزان تولید بیوسورفکتانت حاصل از باکتری‌های متفاوت به منظور کاربرد در صنعت گزارش شده است [13]. براساس این گزارش‌ها برخی از نانوذرات‌ها در غلظت‌های خاصی نه فقط اثرات ضد میکروبی ندارند، بلکه سبب افزایش سطح تماس باکتری با ترکیبات موجود در محیط کشت، تبادل بیشتر مواد غذایی و در نتیجه افزایش میزان تولید بیوسورفکتانت می‌شوند. نتایج این مطالعات بسته به نوع باکتری، نوع نانوذره، غلظت نانوذره، مدت زمان میان‌کنش نانوذره با باکتری متفاوت است، ولی مطالعات مختلف نشان می‌دهد، نانوذرات سبب می‌شود رشد برخی از باکتری‌ها افزایش یابد و تأثیر سمی بر آنها ندارد [13]. در سال‌های اخیر، نانوذرات آهن باتوجه به داشتن خواص مغناطیسی عالی و سازگاری بالا کاربردهای بسیاری داشته است. در تحقیقات گسترده‌ای اثرات نانوذره آهن و مشتقات آن، بر فرایندهای مختلف باکتریایی مانند میزان رشد باکتری مطالعه و نتایج خوبی مشاهده شده است [14].

رنجارجان و همکاران، دوز وابسته به زمان  $Fe^{2+}$  را در تولید سورفکتانت از باسیلوس بررسی کردند. مطالعات انجام‌شده با مکمل تک‌دوز  $Fe^{2+}$  (0/48 میلی‌مول بر لیتر)، پس از 8 ساعت تخمیر باعث افزایش غلظت لیپوپتید به مقدار  $0/1 \pm 3/3$  گرم بر لیتر شد. نتایج نشان می‌دهد، تولید لیپوپتید با اتخاذ یک استراتژی تغذیه چند دوز  $Fe^{2+}$  به میزان  $4/2 \pm 0/15$  گرم بر لیتر افزایش یافت. در نهایت، غلظت بیوسورفکتانت تولیدی با تغذیه تک‌دوز  $Fe^{2+}$  4/7 برابر و با چنددوز  $Fe^{2+}$  5/8 برابر، نسبت به غلظت بیوسورفکتانت بدون نانوذره بهبود یافت [15]. در مطالعه راشدی و همکاران، استفاده از نانوذره زیست‌عملگرار شده به بهبود میزان تجزیه زیستی ترکیبات نرمال دکان و هگزادکان به ترتیب به میزان 91% و 89% منجر شد. علت این افزایش، تأثیر نانوذره در افزایش تولید بیوسورفکتانت

در محیط آزمایش است [16]. نانوذرات Fe به دلیل سطوح واکنش پذیرشان، پتانسیل زیادی برای عامل دار شدن دارند. نانوذرات آهن صفر ( $Fe^0$ ) تمایل دارند به سرعت متراکم شوند. این امر به نداشتن واکنش آنها منجر می شود [17 و 18].

پوشش سطحی نانوذرات با ترکیبات یونی، سبب افزایش نیروی دافعه بین نانوذرات نزدیک به هم می شود و از آگلومره شدن و تجمع آنها جلوگیری می کند [19]. اخیراً انواع پلیمرها به عنوان ماتریس های سبک جهت پوشش دهی و اصلاح سطح نانوذرات بررسی شده است [20]. پوشش پلیمری موجب حفظ هسته و خواص مغناطیسی آن و عملگر کردن نانوذرات می شود. همچنین، باعث جلوگیری از تجمع نانوذرات، افزایش پایداری، کاهش سمی بودن و مدت زمان نگهداری آنها می شود [21]. پلی آکرلیک، پلی اتیلن گلیکول و پلی وینیل الکل از پلیمرهای مصنوعی هستند که برای پوشش دهی نانوذرات استفاده می شوند. از رایج ترین پلیمرهای طبیعی پلی ساکاریدها (گروهی از بیوپلیمرها) هستند. پلی ساکاریدها زیست سازگار، غیرسمی و تجدیدپذیر هستند و وجود گروه های شیمیایی ویژه در ساختارشان، به زیست عملگر کردن بیشتر نانوذرات می انجامد [18]. رایج ترین پلی ساکاریدها برای پوشش نانوذرات، آگاروز [22]، کیتوزان [23]، دکستران [24] و آلژینات [25] است. در میان پلی ساکاریدها، بیوپلیمر نشاسته ارزان ترین و در دسترس ترین است که با توجه به ویژگی های منحصر به فردی چون زیست سازگاری، زیست تجزیه پذیری، غیرسمی بودن و داشتن گروه عاملی OH، برای تثبیت و پوشش برخی نانوذرات ها استفاده شده است [22]. پوشش دار کردن نانوذره Fe اغلب به دلیل کاهش میزان اکسید کنندگی این نانوذره صورت گرفته است [26 و 27]. رضازاده و همکاران، تولید بیوسورفکتانت زیستی توسط سودوموناس آئروژینوزا را با استفاده از نانوذرات آهن/نشاسته بررسی کرده اند. در این مطالعه،

نانوذرات آهن پوشیده شده با نشاسته هیچ گونه سمی بودن باکتریایی را در 1 میلی گرم بر میلی لیتر نشان نداد و سرعت رشد و تولید بیوسورفکتانت را به ترتیب تا 23,91% و 20,62% افزایش داد [28].

هدف از این پژوهش، بررسی مقدار سورفکتین حاصل از باسیلوس سابتیلوس و میزان کاهش کشش سطحی به دست آمده از سویه های جدا شده بومی خاک های ایران در بیوراکتور همزن دار بدون نانوذره، در مقایسه با مقدار سورفکتین و کاهش کشش سطحی در بیوراکتور حاوی - نانوذرات  $Fe^0$  و  $Fe^{3+}$  پوشش دار شده با نشاسته در 48، 72 و 96 ساعت پس از رشد است.

#### مواد و روش ها

##### جداسازی و خالص سازی باسیلوس ها

70 نمونه خاک از قسمت های مختلف ایران و از عمق 10-7 سانتیمتری زمین جمع آوری و در ظروف شیشه ای دردار استریل در دمای  $4^{\circ}C$  به آزمایشگاه منتقل شد [29]. برای جدا و خالص سازی باسیلوس ها از باکتری های دیگر، حفظ اسپورها و حذف سلول های رویشی، ابتدا از تیمار حرارتی استفاده شد و باکتری ها به مدت 10 دقیقه در دمای  $80^{\circ}C$  قرار داده شدند [30]. برای انجام کشت پورپلیت، پس از تهیه سری رقت، 1 میلی لیتر از هر رقت - همراه 15 میلی لیتر محیط کشت نوترین آگار در دمای  $45^{\circ}C$  درون پلیت ریخته شد. پس از سرد شدن به مدت 72-48 ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}C$  قرار داده شد [31]. پس از انجام مراحل خالص سازی، سویه های جدا شده با رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز بررسی و فقط سویه های گرم مثبت و کاتالاز مثبت انتخاب شدند. برای تشخیص بیوشیمیایی سویه باسیلوس ها، از محیط های متیلرِد، نشاسته آگار، SIM (Sulfide) (MR)/(VP)

### تست انهدام قطره

میزان انهدام یک قطره روغن معدنی در سوسپانسیون کشت میکروبی را تست انهدام قطره گویند. این تست، یک روش حساس و سریع برای غربالگری کلنی‌های باکتریایی است که سورفکتانت تولید می‌کنند. ثبات قطره به غلظت سورفکتانت زیستی وابسته است و با تنش سطح ارتباط دارد، اما با فعالیت امولسیون‌کننده ارتباط ندارد. با استفاده از این روش می‌توان برای تولید سورفکتانت به آسانی غربالگری کرد [36].

### تست شاخص امولسیون‌کنندگی

ظرفیت امولسیون، توانایی محلول پروتئین یا تعلیق برای روغن امولسیون است. برای گزینش سویه‌های مناسب‌تر از روش Broderick Cooney [37] استفاده شد. درون 4 لوله آزمایش با قطر یکسان، 4 میلی‌لیتر محیط کشت 24 ساعته باکتری در محیط MSM حاوی 3% گلوکز و 0/03% مخمر و 5 میلی‌لیتر نفت سفید ریخته شد. هر نمونه به مدت 1 دقیقه تحت ورتکس شدید قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت 24 ساعت به شکل ساکن در محیط قرار گرفتند و بعد ارتفاع امولسیون باقی‌مانده و ارتفاع کل مایع درون لوله آزمایش اندازه‌گیری و با فرمول 1 میزان پایداری امولسیون تشکیل‌شده محاسبه شد [41-38]. تست شاخص امولسیون‌کنندگی در سه تکرار انجام شد.

$$(1) \quad \text{شاخص امولسیون‌کنندگی} = \frac{\text{ارتفاع لایه امولسیون}}{\text{ارتفاع کل مایع}} \times 100$$

### اندازه‌گیری کشش سطحی

برای تعیین سویه‌های اصلی تولیدکننده بیوسورفکتانت، از آزمون کشش سطحی به وسیله دستگاه تنسیومتر (556 FTM-TN- شرکت توس نانو) سه بار استفاده شد. کشش سطحی به روش Du Nouy Ring Method سنجیده شد. در این روش حلقه دستگاه که از جنس آلایژ پلاتین است

(Indol Motility)، محیط سیمون سترات، احیای نیترات و لیسیتین استفاده شد (تمام مواد مرک آلمان) [30].

### انتخاب سویه‌های برتر جنس باسیلوس تولیدکننده سورفکتین

برای جداسازی سویه‌های برتر جنس باسیلوس، از تست-های همولیز گلبول‌های قرمز، میزان انهدام قطره<sup>1</sup>، امولسیفیکاسیون و کاهش کشش سطحی استفاده شد [32]. به منظور انجام تست همولیز گلبول‌های قرمز از محیط کشت بلاد آگار و برای تست‌های میزان انهدام قطره، امولسیفیکاسیون و کاهش کشش سطحی از محیط‌های به‌منظور استفاده شد. به این منظور سویه‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند و نمونه‌ها به محیط اصلی<sup>2</sup> (MSM) محیط حداقل نمکی که عبارت‌اند از 40 گرم گلوکز، 1/36 گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، 0/0007 گرم  $\text{CaCl}_2$ ، 0/63 گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، 0/001 گرم  $\text{MnSO}_4$ ، 4 گرم  $\text{NaNO}_3$ ، 5/68 گرم  $\text{Na}_2\text{HO}_4$ ، 0/0014 گرم  $\text{Na-EDTA}$  و 0/0022 گرم  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (تمام مواد مرک آلمان) است [33]. پس از انتقال به محیط MSM نمونه‌ها به مدت 72 ساعت در انکوباتور 37°C با 150 rpm نگهداری شدند.

### آزمایش همولیز گلبول‌های قرمز

در این روش، تمام سویه‌های خالص‌شده، روی پلیت‌های حاوی آگار خونی به مدت 48 ساعت در 37°C کشت داده شدند. سویه‌های همولیز مثبت دارای هاله بتا (حضور منطقه شفاف اطراف کلونی‌های باکتریایی)، جهت ادامه غربالگری سویه‌های تولیدکننده سورفکتین انتخاب شدند [34 و 35].

1. Drop Collapses  
2. Minimal Salt Medium

در مایع غوطه‌ور می‌شود، نیروی وارد بر حلقه غوطه‌ور شده روی صفر تنظیم و حلقه به آرامی از درون مایع به خارج کشیده می‌شود. حداکثر نیروی ثبت شده به وسیله دستگاه برای خارج کردن حلقه از سطح مایع، به عنوان کشش سطحی مایع در نظر گرفته می‌شود. مقدار 25 میلی لیتر از کشت 48 ساعته هریک از نمونه‌ها در ظرف نمونه دستگاه ریخته شد. دمای نمونه قبل از اندازه‌گیری کشش سطحی به 25°C رسانده شد [42].

#### تشخیص مولکولی سویه‌های منتخب به روش PCR

برای تشخیص مولکولی سویه‌های منتخب، از تست مولکولی (PCR)<sup>3</sup> استفاده شد. به منظور جداسازی DNA باکتری‌های همولیز مثبت حاوی ژن مورد نیاز تولید سورفکتین، به 2 میلی لیتر محیط (LB)<sup>4</sup>، یک کلنی از هر نمونه تلقیح و در دمای 37°C به مدت یک شبانه‌روز قرار داده شد. محیط‌های حاوی باکتری در 6000 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع رویی از بیومس جدا شد. برای استخراج DNA از رسوب، از کیت استخراج DNA (BAC) ساخته شده در گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه شهید بهشتی) استفاده شد. برای صحت استخراج DNA، محصول حاصل روی ژل آگاروز 1% برده شد. برای انجام PCR از DNA مکمل (cDNA) استخراج شده به عنوان DNA الگو استفاده شد. پرایمر مورد استفاده برای انجام PCR، Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC3') و Fd1 (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG3'-A) و Gene Amp PCR 2700 (Applied Biosystems) است.

بعد از تکثیر، محصول PCR با برنامه System Genetic Analyzer (Applied Biosystems USA) ABI PRISM™ 3100، به لحاظ توالی مطالعه و نتایج با نرم افزار Chromas pluse و با استفاده از پایگاه

NCBI، BLAST بررسی شد [43-45]. کشت سویه-های منتخب در محیط اصلی جهت تولید سورفکتین و استخراج سورفکتین تولیدی پس از انجام PCR انجام شد. سویه‌های خالص شده دارای همولیز بتا در 1 لیتر محیط MSM کشت داده و سپس محیط با 3HCl مولار اسیدی و در 6000 دور در دقیقه مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد [46]. به مایع رویی (حاوی سورفکتین خام) دی کلرومتان افزوده و مدت 14 ساعت روی شیکر 180 دور در دقیقه قرار داده و از کاغذ صافی واتمن برای جداسازی ناخالصی‌ها استفاده شد. سورفکتین محلول در دی کلرومتان، دوبار با حجم مساوی از آب مقطر شستشو و مدت 20 دقیقه تکان داده شد. برای جداسازی دو فاز مایع، مدت 3 ساعت در حالت سکون باقی ماند. رسوب سفید تا زرد حاصل با سانتریفوژ با دور 15000 در دقیقه در دمای 10°C مدت 25 دقیقه جدا و در دسیکاتور مدت 24 ساعت خشک و یک شب در دمای 4°C نگهداری شد. این رسوب همان سورفکتین است [47-49].

#### تهیه نانوذرات $Fe^0$ و $Fe^{3+}$ و بهبود سطح نانوذرات با نشاسته

روش این پژوهش برای سنتز نانوذرات آهن، روش کاهش در فاز مایع است که عبارت از افزودن کاهنده قوی داخل محلول حاوی یون‌های آهن و کاهش آن‌ها به نانوذرات فلزی [50].

#### مراحل ساخت نانوذرات آهن پایدار شده با نشاسته:

ابتدا در یک بالن سه دهانه مجهز به حباب ساز، کندانسور و قیف جداکننده، 6 گرم کلرید آهن بدون آب و 8/4 گرم کلرید آهن سه ظرفیتی شش آب ریخته و به آن 100 میلی لیتر آب مقطر و 30 میلی لیتر اتانول اضافه

3. Polymerase Chain Reaction

4. Luria-Bertani

شد. مخلوط با همزن مغناطیسی در دمای محیط و 250 دور در دقیقه هم زده شد و محلول یکنواختی به رنگ نارنجی به دست آمد. برای خارج کردن اکسیژن محلول، جریان ضعیفی از نیتروژن از طریق اسپارژر به محلول وارد شد. 2 گرم نشاسته محلول در آب به محلول اضافه شد. پس از 30 دقیقه، محلول 5/4 گرم پتاسیم بوروهیدرید در 20 میلی لیتر آب و 30 میلی لیتر اتانول از طریق قیف جداکننده قطره قطره و با نرخ 1-2 قطره در ثانیه به محتویات بالن اضافه شد. با اضافه شدن قطرات محلول پتاسیم بوروهیدرید ذرات سیاه رنگ نانوذرات آهن تشکیل می شوند. سپس، مخلوط که کاملاً سیاه رنگ است، مدت یک ساعت در دمای محیط به هم زده و بعد صاف شد. سپس، دو بار با آب مقطر، یک بار با اتانول و در انتها برای خشک شدن سریع با استون شستشو داده و به مدت یک شبانه روز در دمای 80°C خشک شد [51و 52].

**بررسی نانوذرات  $Fe^0$  و  $Fe^{3+}$  پوشش دار شده با نشاسته در میزان تولید سورفکتین کاهش کشش سطحی سویه های منتخب**

4500 میلی لیتر محیط MSM تهیه و تحت فشار 1/5 اتمسفر و دمای 121 °C اتوکلاو شد، 250 میلی لیتر از آن در ظروف مورد نظر قرار گرفت. کشت تازه ای از هر دو سویه باکتری در محیط نوترین براث تهیه و به 250 میلی لیتر محیط کشت MSM تلقیح و در انکوباتور شیکردار دمای 30 °C با دور 150 دور در دقیقه قرار داده شد. 1 میلی گرم بر لیتر از نانوذرات  $Fe^{3+}$  و  $Fe^0$  [53] پوشش دار شده با نشاسته استریل شده به محیط های کشت اضافه شد. برای بررسی میزان تولید سورفکتین 48، 72، 96 ساعت بعد از رشد، از محیط کشت

نمونه گیری و آزمون های همولیز، سورفکتین تولیدی و کاهش کشش سطحی انجام شد.

**بررسی میزان سورفکتین و کاهش کشش سطحی سویه 61 حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$  و بدون نانوذره  $Fe^{3+}$  در بیوراکتور**

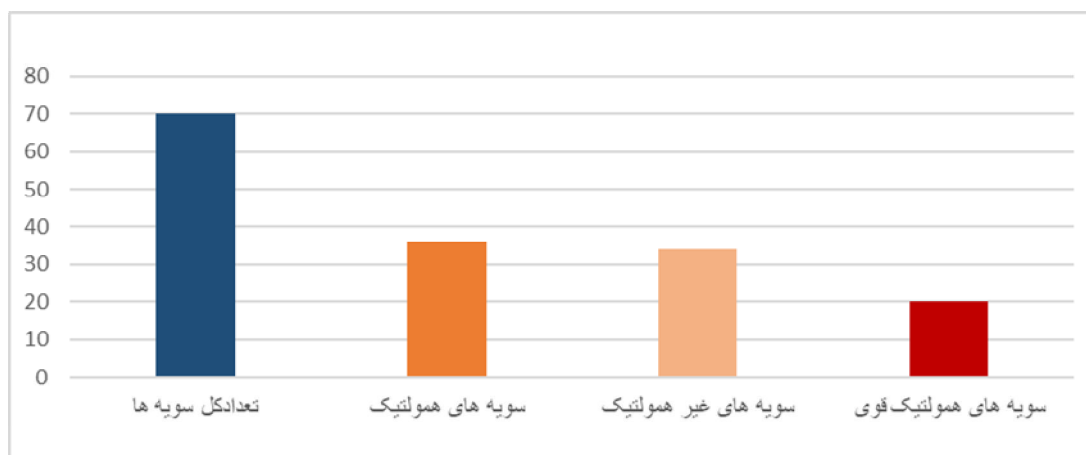
از استوک نگهداری شده باکتری، روی محیط آگاردار مورب کشت داده شد و 48 ساعت در دمای 30°C گرماگذاری شد. محیط آگاردار مورب رشد یافته، به محیط کشت LB منتقل شد و یک شبانه روز در شیکر انکوباتور دمای 30°C و 150 دور در دقیقه قرار داده شد تا به جذب نوری (Agilent Spectrophotometer Uv-Vis 4000) معادل نیم مک فارلند ( $10^8 \times 1/5$ ) برسد. سپس به بیوراکتور 5 لیتری همزن دار (شرکت صبا، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک) افزوده شد. از دو فرمانتور 5 لیتر به صورت هم زمان (یکی حاوی 1 گرم بر لیتر نانوذره  $Fe^{3+}$  همراه با سویه 61 و دیگری بدون نانوذره همراه با سویه 61)، استفاده شد. پس از گذشت 48، 72 و 96 ساعت از رشد، نمونه گیری از هر دو بیوراکتور انجام شد.

## نتایج

### همولیز گلوبول های قرمز

در این پژوهش فعالیت همولیتیک باکتری ها به عنوان نخستین شاهد کیفی برای تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد. مانرات و همکاران نیز از این روش برای بررسی تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری های جداسازی شده خود استفاده کردند [54]. نخستین بار برن-هیمیر و آویگاد در سال 1970 برای بیوسورفکتانت تولیدی باسیلوس سابتیلوس، فعالیت همولیتیک بیوسورفکتانت ها را گزارش کردند [55]. در این مطالعه،

از میان 70 نمونه خاک، 36 نمونه همولیز مثبت بودند که 20 مورد همولیز بتای قوی (شکل 1) داشتند و ادامه تست‌ها روی این 20 مورد همولیز مثبت قوی انجام شد (منحنی 1).



منحنی 1- مقایسه نمونه‌های جدا شده از خاک (سطح افقی گروه‌های باکتری و سطح عمودی میزان فراوانی)



شکل 1- همولیز بتای سریع گلبول‌های قرمز گوسفند توسط سورفکتین تولیدی

**تست انهدام قطره**  
در این روش سویه‌ها در محیط NA به مدت 48 ساعت و دمای 30°C قرار گرفته و سپس به محیط کشت پایه انتقال داده شد. نتایج به شرح جدول 1 است.

جدول 1- نتایج آزمون انهدام قطره

| نمونه‌ها/نتایج |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 2              | 3 | 7 | 11 | 13 | 15 | 21 | 22 | 25 | 26 | 31 | 53 | 56 | 58 | 61 | 62 | 63 |
| ++             | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -+ | +  | ++ | *+ | ++ |
|                |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | -  |
|                |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | ++ |
|                |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |

++ سریع (کمتر از 5 دقیقه)، \*+ (15 دقیقه)، -+ (20 دقیقه)، + (بعد از 20 دقیقه)  
نمونه ATCC: ++ سریع (کمتر از 5 دقیقه)

### تست شاخص امولسیون کنندگی

روی تمام نمونه‌ها تست شاخص امولسیون کنندگی سه بار تکرار شد و طبق فرمول 1 نتایج محاسبه شد. میانگین نتایج سه بار تکرار، در جدول 2 نشان داده شده است:

نتایج حاصل از تست انهدام قطره نشان می‌دهد، از 20 نمونه همولیز مثبت قوی در مقایسه با استاندارد ATCC21332، 4 مورد سریعاً (کمتر از 5 دقیقه) مثبت شدند (سویه‌های 2، 61، 63 و 66) که مؤید تولید بیوسورفکتانت است.

جدول 2- نتایج حاصل از تست امولسیون کنندگی

| نمونه‌ها/نتایج |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| شاهد           | 2     | 3     | 7     | 11    | 13    | 15    | 21    | 22    | 25    | 26    |
| 88/88          | 81/25 | 86/66 | 85/10 | 84/44 | 88/88 | 82/60 | 88/88 | 85/10 | 88/88 | 84/44 |
| -              | 31    | 53    | 56    | 58    | 61    | 62    | 63    | 64    | 66    | 70    |
| -              | 86/66 | 88/88 | 85/10 | 88/88 | 88/88 | 88/88 | 88/84 | 88/88 | 88/88 | 88/88 |

منع کرین ملاس در شرایط ترموفیلیک بیوسورفکتانت لیوپیتیدی تولید کردند. استفاده از ملاس توسط دو-گونه باکتری باسیلوس جهت تولید بیوسورفکتانت و رشد در دمای 45°C به تولید بیوسورفکتانت و کاهش - کشش سطحی محیط کشت تا 29 و 31 دین بر سانتیمتر منجر شد [56]. همچنین تحقیق صاحب‌نظر و همکاران در ارتباط با استفاده از رامنولیپید برای تصفیه لجن روغنی نشان می‌دهد، بیوسورفکتانت خالص (رامنولیپید) کشش سطحی را از 27 تا 1/2 میلی‌نیوتن بر متر کاهش می‌دهد. درحالی‌که رامنولیپید غیرتصفیه‌شده کشش سطحی را از 27 به 6/7 میلی‌نیوتن بر متر کاهش می‌دهد [57].

مقایسه نتایج حاصل از داده‌ها با نمونه استاندارد ATCC21332 (شاهد) نشان می‌دهد، سویه‌های 13، 21، 25، 53، 58، 61، 62، 63، 64، 66 و 70 نتایج یکسانی با سویه استاندارد دارند.

### تست کاهش کشش سطحی

نتایج سه بار تکرار تست کاهش کشش سطحی 20 نمونه همولیز مثبت قوی در مقایسه با کشش سطحی آب (71/5 میلی‌نیوتن بر متر) و محیط کشت بدون باکتری (50/2 میلی‌نیوتن بر متر) (به‌عنوان شاهد) قرار گرفت (جدول 3). نتایج نشان می‌دهد، 13 نمونه دارای کشش سطحی کمتر از 40 میلی‌نیوتن بر متر بودند. ماکار و همکاران دوسویه باسیلوس سابتیلوس، با استفاده از

جدول 3. نتایج کشش سطحی سویه‌های خالص شده با استفاده از روش حلقه دونوی

| شماره | نمونه    | کشش سطحی |
|-------|----------|----------|
| 1     | آب مقطر  | 71,5     |
| 2     | محیط کشت | 50,2     |
| 3     | 70       | 32,3     |
| 4     | 61       | 32,3     |
| 5     | 15       | 48,6     |
| 6     | 3        | 48,0     |
| 7     | 63       | 32,2     |
| 8     | 21       | 40,5     |
| 9     | 2        | 34,1     |
| 10    | 13       | 55,8     |
| 11    | ATCC     | 47,3     |
| 12    | 26       | 33,6     |
| 13    | 66       | 33,2     |
| 14    | 22       | 37,8     |
| 15    | 58       | 34,9     |
| 16    | 25       | 35       |
| 17    | 53       | 32,9     |
| 18    | 64       | 34,1     |
| 19    | 37       | 36       |
| 20    | 56       | 32,4     |
| 21    | 7        | 48,6     |
| 22    | 11       | 46,3     |
| 23    | 62       | 46,2     |

#### شناسایی فیلوژنتیک سویه‌های منتخب

نتایج توالی‌یابی سویه‌های 70، 63، 61 به ترتیب با 99/9% *Bacillus subtilis* subspecies. سویه‌های *Inaquosorum* و *Bervibacterium frigurtiolrance* تطابق داشت. از آنجایی که در این مطالعه جداسازی باسیلوس‌های خاک (که تولیدکننده سورفکتین هستند) مهم است، سویه 70 که با این بررسی *Bervibacterium frigurtiolrance* تشخیص داده شده است، از ادامه بررسی‌ها حذف می‌شود. باتوجه به مجموع تست‌های انجام‌شده، نهایتاً دوسویه 61 و 63 که هر دو *Bacillus subtilis* subspecies *Inaquosorum* هستند، انتخاب شدند تا بهترین سویه تولیدکننده سورفکتین از این میان شناسایی شود.

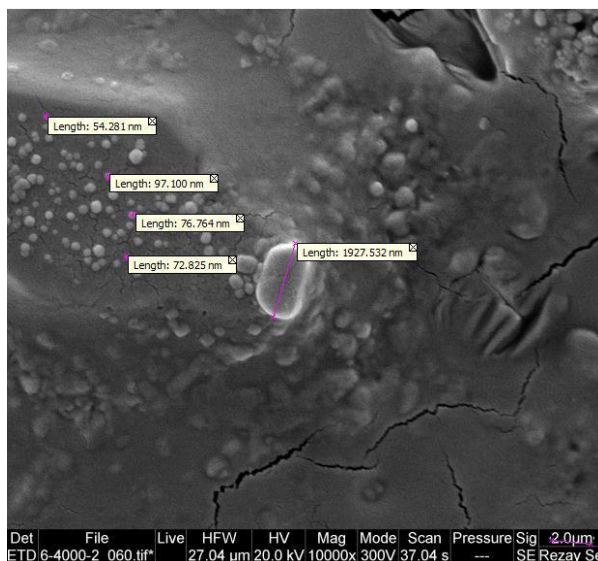
#### بررسی میزان همولیز، سورفکتین تولیدی، امولسیون-

#### کنندگی و کاهش کشش سطحی سویه‌های منتخب حاوی

#### نانوذرات $Fe^0$ و $Fe^{3+}$ و فاقد نانوذرات $Fe^0$ و $Fe^{3+}$

پس از بررسی 18 نمونه ارلن‌های حاوی 250 میلی لیتر محیط کشت بدون نانوذرات و حاوی نانوذرات سویه‌های 61 و 63 در 48، 72 و 96 ساعت پس از رشد، نتایج همولیز، میزان بیوسورفکتین تولیدی، میزان امولسیون‌کنندگی و کاهش کشش سطحی تعیین شد (جدول 4). برای اطمینان از قرارگیری نانوذرات بر سطح باکتری، تصویربرداری به کمک SEM (KYKY\_EM3200 model) انجام شد. وجود نانوذرات با SEM بررسی و تأیید شد. شایان ذکر است تصاویر SEM که از باکتری همراه نانوذره گرفته شده است هم نبودن اثرات تخریبی نانوذره بر دیواره و غشای باکتری را نشان می‌دهد، هم مشخص می‌کند نانوذرات کاملاً بر سطح

باکتری قرار می گیرد و احتمالاً با افزایش سطح و جذب بیشتر مواد غذایی سبب می شود میزان رشد و تولید بیوسورفکتانت افزایش یابد.



شکل 2. تصویر SEM وجود نانوذرات  $Fe^0$  و  $Fe^{3+}$  در محلول محیط کشت باکتری

جدول 4. بررسی نتایج میزان همولیز، سورفکتین، میزان امولسیون کنندگی و کاهش کشش سطحی ارلن های حاوی محیط کشت بدون نانوذرات آهن و حاوی نانوذرات آهن در دو سویه منتخب 61 و 63 در زمان های 48.72.96 ساعت پس از رشد

| شماره | نمونه   | کاهش کشش سطحی (میلی نیوتن بر متر) | امولسیون کنندگی | همولیز |
|-------|---------|-----------------------------------|-----------------|--------|
| 1     | 61/48   | 36                                | 83              | +      |
| 2     | 61/72   | 32                                | 84/5            | ++     |
| 3     | 61/96   | 36,2                              | 84/5            | +      |
| 4     | 63/48   | 37,5                              | 84              | ++     |
| 5     | 63/72   | 34                                | 84/4            | ++     |
| 6     | 63/96   | 35,2                              | 83/4            | +      |
| 7     | 61/o/48 | 32,25                             | 84              | ++     |
| 8     | 61/o/72 | 30,1                              | 88/2            | +++    |
| 9     | 61/o/96 | 30,2                              | 86              | +      |
| 10    | 63/o/48 | 34                                | 84/5            | ++     |
| 11    | 63/o/72 | 32                                | 83/3            | +++    |
| 12    | 63/o/96 | 33,5                              | 83/5            | +      |
| 13    | 61/F/48 | 25                                | 86/5            | +      |
| 14    | 61/F/72 | 23,95                             | 88/9            | ++     |
| 15    | 61/F/96 | 25,3                              | 88/3            | +++    |
| 16    | 63/F/48 | 31,25                             | 84/4            | +      |
| 17    | 63/F/72 | 30                                | 84/5            | ++     |
| 18    | 63/F/96 | 30,2                              | 84/2            | +++    |

\*\*\* منظور از o نانوذره  $Fe^0$  و منظور از F نانوذره  $Fe^{3+}$  (پوشش دار شده بانشاسته) است.

**میزان سورفکتین و کاهش کشش سطحی سویه 61**  
 حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$  و بدون نانوذره  $Fe^{3+}$  در بیوراکتور

از استوک نگهداری شده باکتری، روی محیط آگاردار مورب، کشت داده و مدت 48 ساعت در دمای  $30^{\circ}C$  گرماگذاری شد. از محیط آگاردار مورب رشدیافته، به محیط کشت LB منتقل و یک شبانه‌روز در شیکر انکوباتور با دمای  $30^{\circ}C$  و 150 دور در دقیقه تا رسیدن به جذب نوری معادل نیم مک‌فارلند ( $1/5 \times 10^8$ ) (Spectrophotometer Uv-Vis 4000 Agilent کمپانی) قرار داده شد. سپس، به بیوراکتور 5 لیتری همزن‌دار

شرکت صبا (پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک) (با 3/5 لیتر محیط MSM) افزوده شد. از دو فرمانتور 5 لیتر هم‌زمان که یکی حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$  همراه با سویه شماره 61 و دیگری بدون نانوذره همراه با سویه 61 بود، استفاده شد. به بیوراکتور اول مقدار 1 گرم بر لیتر نانوذره  $Fe^{3+}$  افزوده شد. پس از گذشت 48، 72 و 96 ساعت از رشد، از هر دو بیوراکتور نمونه‌گیری‌ها انجام شد. مقدار سورفکتین و میزان کاهش کشش سطحی (جداول 5 و 6) در هر یک از بیوراکتورها تعیین شد.

**جدول 5.** مقادیر سورفکتین و کاهش کشش سطحی در بیوراکتور بدون نانوذره  $Fe^{3+}$

| مقادیر SD   | سورفکتین (گرم بر لیتر) | مقادیر SD  | کاهش کشش سطحی (میلی‌نیوتن بر متر) | زمان (ساعت) |
|-------------|------------------------|------------|-----------------------------------|-------------|
| $\pm 0/005$ | 2/01                   | $\pm 0/09$ | 34/50                             | 48          |
| $\pm 0/001$ | 2/7                    | $\pm 0/08$ | 34/21                             | 72          |
| $\pm 0/002$ | 2/7                    | $\pm 0/07$ | 34/35                             | 96          |

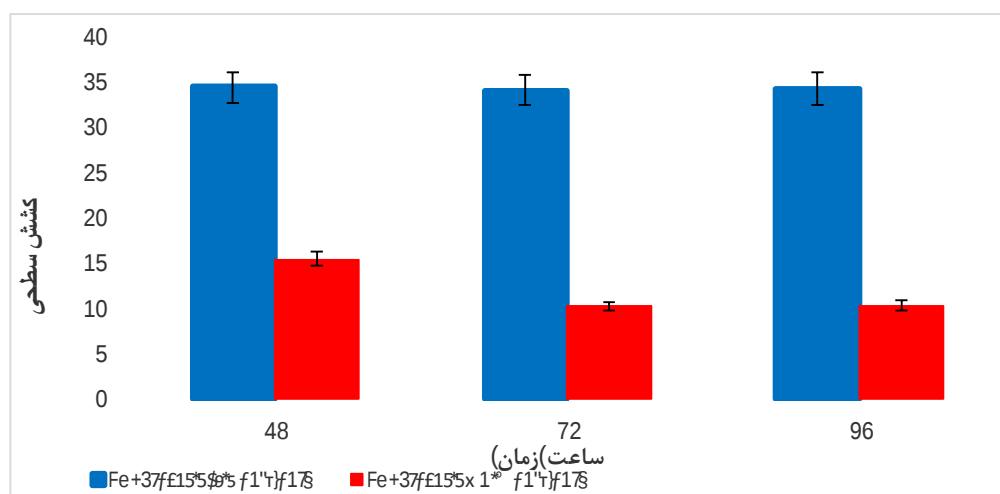
**جدول 6.** مقادیر سورفکتین و کاهش کشش سطحی در بیوراکتور حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$

| مقادیر SD   | سورفکتین (گرم بر لیتر) | مقادیر SD   | کاهش کشش سطحی (میلی‌نیوتن بر متر) | زمان (ساعت) |
|-------------|------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------|
| $\pm 0/009$ | 4/76                   | $\pm 0/05$  | 15/41                             | 48          |
| $\pm 0/008$ | 6/02                   | $\pm 0/01$  | 10/30                             | 72          |
| $\pm 0/005$ | 6/00                   | $\pm 0/009$ | 10/32                             | 98          |

نتایج حاصل از کشت در بیوراکتور 5 لیتری نشان می‌دهد، محیط‌های حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$  در مقایسه با محیط‌های بدون نانوذره  $Fe^{3+}$  میزان سورفکتین تولیدی بیشتر و میزان کشش سطحی کمتر دارند. با بررسی

مطالعات محققان دیگر نیز مشاهده شد، مقدار کشش سطحی در حین آزمون بررسی شده است. این نتایج نشان می‌دهد با افزایش تولید سورفکتین کشش سطحی کاهش می‌یابد.

## نمودار 2- مقادیر کشت سطحی در بیوراکتور فاقد نانوذره و حاوی نانوذره



## بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق از بین 70 نمونه باکتری جدا شده از خاک 36 نمونه باکتری با آزمون همولیز بتا جداسازی شد. از این تعداد باکتری، 20 گونه همولیز قوی بتا داشتند که در تحقیق از آنها استفاده شد. از این 20 نمونه همولیز مثبت، جهت غربالگری بهترین سویه های تولیدکننده سورفکتین، از آزمون های انهدام قطره، امولسیفیکاسیون و کاهش کشت سطحی استفاده شد. سه سویه باکتری پذیرفته شده بودند و دو مورد باسیلوس برای ادامه کار انتخاب شدند. این روش را کشور و همکارانش در سال 2007 انجام دادند. در این مطالعه با تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی، پروفیل RP-HPLC و طیف IR نشان داده شد که هیچ تفاوت کیفی و کمی در ترکیب بیوسورفکتانت های خام تولید شده در سیستم SmF یا در SSF وجود ندارد [58].

سویه ها برای تأیید گونه آنها، با روش PCR تعیین توالی ژنوم شدند. در نهایت از سه محیط کشت (محیط کشت حاوی نانوذرات  $Fe^0$  پوشش دار شده با نشاسته، محیط کشت حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$  پوشش دار شده با نشاسته و محیط کشت بدون نانوذرات) برای رشد دوسویه منتخب (61 و 63) در ارلن های 250 میلی لیتری لرزان با

دور 150 در دقیقه به وسیله شیکر انکوباتور در دمای  $30^\circ C$  انجام شد. پس از 24، 48 و 72 ساعت از افزودن نانوذرات به محیط کشت ارلن های لرزان نتایج بررسی شد.

در این مطالعه سویه 61 حاوی نانوذرات  $Fe^{3+}$  دارای میزان همولیز، سورفکتین، امولسیون کنندگی و کاهش کشت سطحی بالاتری پس از 72 ساعت از رشد، در مقایسه با محیط کشت بدون نانوذره  $Fe^{3+}$  بوده است. در این پژوهش بهترین شرایط عملیاتی تولید بیوسورفکتانت در 2 بیوراکتور همزن دار در دمای  $30^\circ C$  و با همزن 150 دور در دقیقه با میزان اکسیژن دهی 0/75 V/V به دست آمده است که این مطلب با نتایجی که محققانی مانند لی و کوپرائه کرده اند مطابقت دارد [59 و 60].

کمترین کشت سطحی در محیط حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$  10/30 (میلی نیوتن بر متر)، پس از 72 ساعت به دست آمده است. نتایج نشان می دهد، سورفکتین حاصل از کشت سویه 61 در بیوراکتور حاوی نانوذره  $Fe^{3+}$  پس از 72 ساعت از رشد، تولید بیشتری از کشت همین سویه پس از 72 ساعت بدون نانوذره  $Fe^{3+}$  دارد که در صورت

11. Sarwar A, Hassan MN, Imran M, Iqbal M. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease, *Microbiol Res.* 2018; 209: 1–13.
12. Paraszkiwicz K, Bernat P, Siewiera P, Moryl M, Paszt LS, Trzciński P, Jałowiecki Ł. Agricultural potential of rhizospheric *Bacillus subtilis* strains exhibiting varied efficiency of surfactin production, *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2017; 225: 802–809.
13. Rezazadeh Mofradnia S, Yazdian F, Rashedi H, Rasekh B, Omid M, Sheikhpour M, Esmaeili Bidhendi M, Experimental and Simulation of Nanoparticle Capability for Biosurfactant Production Using in MEOR. *J App Biotechnol Reports*. 2017; 4(2): 177.
14. Lia J, Vipulanandan C. Effects of Au/Fe and Fe Nanoparticles on *Serratia* Bacterial Growth and Production of Biosurfactant. *Mater Sci Eng C*. 2013; 33(7): 3909-3915.
15. Rangarajan V, Dhanarajan G, Kumar R, Sen R, Mandal M. Time-dependent dosing of  $Fe^{2+}$  for improved lipopeptide production by marine *Bacillus megaterium*. *J Chem Technol Biotechnol*. 2012; 87(12): 1661-1669.
16. Rashedi H, Farmani F, Yazdian F, Motevaselin M. Comparative Assessment of Crude Oil Biodegradation by *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 in the Presence and Absence of Biofunctional Magnetic Nanoparticles. *Modares J Biotechnol*. 2018; 9(2): 309-315.
17. Rajab M, Yazdian F, Rasekh B, Rashedi H. Effect of metal nanoparticles on biological denitrification process: a review. *J Appl Biotechnol Rep*. 2016; 3: 353–358.
18. Rezazadeh Mofradnia S, Ashouri R, Tavakoli Z, Shahmoradi F, Rashedi H, Yazdian F. Effect of Zero-valent iron/starch Nanoparticle on Nitrate Removal Using MD Simulation. *Int J Biolog Macromol*. 2019; 121: 727-733
19. Nassar NN. Rapid removal and recovery of Pb (II) from wastewater by magnetic nano adsorbents. *J Hazard Mat*. 2010; 184: 538–546.
20. Darder M, Aranda P, Ruiz-Hitzky, E. Bio nanocomposites: a new concept of ecological, bioinspired and functional hybrid materials. *Adv Mat J*. 2007; 19: 1309-1319.
21. Shin S, Jang J. Thiol containing polymer encapsulated magnetic nanoparticles as reusable and efficiently separable adsorbent for heavy

ادامه تحقیقات می‌توان از این سویه جهت تجاری‌سازی استفاده کرد.

## References

1. Khajavi-Shojaei Sh, Moezzi AA, Enayatizamir N. Investigation of biosurfactant production by *Bacillus pumilus* 1529 and *Bacillus subtilis* WPI. *Biol J Micro Organ*. 2016; 5(17): 97-110.
2. Fracchia L, Cavallo M, Giovanna Martinotti M, Banat IM. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications–Present Status and Future Potentials. *Biomed Sci Eng Technol*. 2012; 325-370.
3. 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.
4. Kaskatep B, Yildiz S, Gumustas M, Ozkan SA. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* in kefir and fish meal. *Brazil J Microbiol*. 2015; 46(3): 855-859.
5. Rashedi HR, Mazaheri Assadi M, Jamshidi E, Bonakdarpour B. Optimization of the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* HR Isolated from an Iranian Southern Oil well. *J Chem Chem Eng*. 2006; 25 (1): 25-30.
6. Nievas MI, Commendatore MG, Estevas JL, Bucalá V. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. *J Hazard Mater*. 2008; 154 (1- 3): 96-104.
7. Chen CY, Baker SC, Darton RC. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. *Chem Technol Biotechnol*. 2006; 18: 1923-1931.
8. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health*. 2006; 41(12): 2699-2711.
9. Zou A, Liu J, Garamus VM, Yang Y. Micellization activity of the natural lipo peptide [Glu 1, Asp 5] surfactin-C15 in aqueous solution, *J Phys Chem. B*. 2010; 114: 2712–2718.
10. Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis TJ. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on plant pathogens, *J Chem Ecol*. 2013; 39: 869–878.

- of citrus fruit. *Postharvest Biol Technol.* 2008; 48(1):113-121.
32. Naghizadeh S, Rashedi H, Yazdian F. Recovery and purification of rhamnolipid from fermentation broth, by use of a nanotechnology process. *New Biotechnol.* 2012; 29: 23–26.
33. Herrera Y, Katnik C, Rodriguez JD, Hall AA, Willing A, Pennypacker KR, Cuevas J.  $\sigma$ -1 Receptor modulation of acid-sensing ion channel a (ASIC1a) and ASIC1a-induced  $Ca^{2+}$  influx in rat cortical neurons. *J Pharmacol Experim Therapeutic.* 2008; 327(2): 491-502.
34. Bicca FC, Fleck LC, Ayub MAZ. Production of bio surfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiol.* 1999; 30(3): 231-236.
35. Ghayyomi zadeh M, Forghani F, Oh BH. Bio surfactant Production by *Bacillus* sp. Isolated from Petroleum Contaminated Soils of Sirri Island. *Americ. J Appl Sci.* 2012; 9(1):1-6.
36. Collins-Thompson DL, Lee H, Trevors JT. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Method.* 1991; 13 (4): 271-279
37. Broderick LS, Cooney JJ. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from fresh water ecosystems. *Dev Indust Microbiol.* 1979; 23: 425–434.
38. Jones M, Sheridan L. Back translation: an emerging sophisticated cyber strategy to subvert advances in ‘digital age’ plagiarism detection and prevention. *Assess Evalu Higher Edu.* 2015; 40(5): 712-724.
39. Kalinova E. Bulgarian Intelligentsia and the Reforms in the Sphere of Culture at the End of 1980s. *Bulgarian Historical Review.* 2015; 3-4, 27-33.
40. Todorova TT, Tsankova G, Tsankova D, Kostadinova T, Lodozova N. Knowledge and attitude towards hepatitis B and hepatitis C among dental medicine students. *J IMAB–Annual Proc Scient Paper.* 2015; 21(3): 810-813.
41. Bhawsar N, 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). *Inter J Adv Res.* 2014; 2(6): 778-783.
- metal ions. *Chem Communic J.* 2007; 22: 4230–4232.
22. Dias AMGC, Hussain A, Marcos AS, Roque ACA. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnol Adv.* 2011; 29: 142–155.
23. Liua G, Honga RY, Guo L, Li YG, Li HZ. Preparation, characterization and MRI application of carboxy methyl dextran coated magnetic nanoparticles. *Appl Surf Sci.* 2011; 257: 6711–6717.
24. Ma X F, Chang PR, Yang JW, Yu JG. Preparation and properties of glycerol plasticized-pea starch/zinc oxide-starch bio nanocomposites. *Carbohydr Poly J.* 2009; 75: 472–478.
25. Ma H, Xian-rong Qi, Maitani Y, Nagai T. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. *Inter J Pharmaceu.* 2007; 333: 177–186.
26. Kiran G, Nishanth L, Priyadharshini S, Anitha K, Selvin J. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid bio surfactant production under solid state culture by marine *Nocardiopsis* sp. *MSA13A. BMC Biotechnol.* 2014; 10: 14-48.
27. Eslami1 Sh, Ebrahimzadeh MA, Bi-parva P, Abedi Rad SM. Zero Valent Iron-Based Nanoparticles: Synthesis, Characterization and their Application in Biology and Medicine, *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2016; 26 (142): 285-310.
28. Rezazadeh Mofradnia S, Tavakoli Z, Yazdian F, Rashedi H, Rasekh B. Fe/starch nanoparticle - *Pseudomonas aeruginosa*: Bio-physiochemical and MD studies. In *J Biol Macromol.* 2018; 117: 51–61.
29. Cazorla F, Romero D, Pérez-García A, Lugtenberg B, Vicente Ad, Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J appl Microbial.* 2007; 103(5): 1950-1959.
30. Imen M, Hanene B, Ichraf K, Aida R, Ilhem T, Naziha K, Neziha GK. Methyl malonic acidemia and hyperglycemia: an unusual association. *Brain Develop.* 2012; 34(2): 113-114.
31. Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc)

- nanoparticles on *E. coli*. *Environ Sci Technol*. 2008; 42: 4927- 4933.
52. Rajab beigy M, Rasekh B, Yazdian F, Amin zadeh B, Shekarriz M. High nitrate removal by starch- stabilized FeO nanoparticles in aqueous solution in a controlled system. *Eng in Life Sci*. 2018. 18(3), 187-195.
  53. Alamdar N, Rasekh B, Yazdian F. Effects of Fe/SDS and Au nanoparticles on *P. aeruginosa* bacterial growth and bio-surfactant production. *IET Nano biotech*. 2018; 12(4): 520-525.
  54. Maneerat S, Phetrong K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. Songklanakarin *J Sci Technol*. 2007; 29 (3): 781-791.
  55. Bernheimer AW, Avigad LS. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *General Microbiol*. 1970; 61 (3): 361-369.
  56. Makkar RS, Cameotra SS. Biosurfactant by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J Indust Microbiol Biotech*. 1997; 18 (1): 37- 42.
  57. Saheb nazari Z, Mowla D, Karimi G, Yazdian F. Zero-valent iron nanoparticles assisted purification of rhamnolipid for oil recovery improvement from oily sludge, *J Environ Chem Eng*. 2018; 6: 917-922.
  58. Das K, Mukherjee AK. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of bio surfactants. *Process Bio chem*. 2007; 42(8):1191-1199.
  59. Lee JY, Tan B, Cooper AI. CO<sub>2</sub>-in-water emulsion-templated poly (vinyl alcohol) hydrogels using poly (vinyl acetate)-based surfactants. *Macro mol*. 2007; 40(6):1955-1961.
  60. Aizawa M, Cooper AM, Malac M, Buriak JM. Silver nano-inukshuks on germanium. *Nano lett*. 2005; 5(5): 815-819.
  42. Boogar RS, Gheshlaghi R, Mahdavi MA. The effects of viscosity, surface tension, and flow rate on gasoil-water flow pattern in micro channels. *Korean J Chem Eng*. 2013; 30(1): 45-49.
  43. De Rienzo MAD, Banat IM, Dolman B, Winterburn J, Martin PJ. Sophoro lipid bio-surfactants: possible uses as antibacterial and anti-biofilm agent. *New biotech*. 2015; 32(6): 720-726.
  44. Elshafie AE, Joshi SJ, Al-Wahaibi YM, Al-Bemani AS, Al-Bahry SN, Al-Maqbali D, Banat IM. Sophoro lipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. *Front Microbial*. 2015; 6: 1324.
  45. Sarubbo L, Rocha Jr R, Luna J, Rufino R, Santos V, Banat I. some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. *Chem Ecolo*. 2015; 31(8): 707-723.
  46. Carrillo PG, Mardaraz C, Pitta-Alvarez SI, Giulietti AM. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J Microbiol Biotech*. 1996; 12(1): 82-84.
  47. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J microbial Method*. 2004; 56(3): 339-347.
  48. Cheng FY, Su CH, Yang YS, Yeh CS, Tsai CY, Wu CL, Wu MT, Shieh DB. Characterization of aqueous dispersions of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and their biomedical applications. *Biomater*. 2005; 26(7): 729-738.
  49. Lian B, Chen Y, Zhao J, Teng HH, Zhu L, Yuan S. Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: applications and mechanisms. *Bioresource Technol*. 2008; 99(11): 4825-4831.
  50. Liu Y, Li Sh, Chen Z, Megharaj M, Naidu R. Influence of zero-valent iron nanoparticles on nitrate removal by *Paracoccus sp*. *Chemosphere*. 2014; 108: 426-432.
  51. Lee C, Kim JY, Lee WI, Nelson KL, Yoon J, Sedlak DL. Bactericidal effect of zero-valent iron

## Glaylor Modabber<sup>1</sup>, Abbas Akhavan Sepahi<sup>2\*</sup>, Fatemeh Yazdian<sup>3</sup>, Hamid Rashedi<sup>4</sup>

1-PhD student of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

2-Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

3-Associate Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

4-Associate Professor, Department of Biotechnology, School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 2020/1/22

Accepted: 2020/12/13

\*Corresponding author: akhavansepahy@gmail.com P.B:1669717413

### ABSTRACT

Biosurfactants are produced by microorganisms. Surfactin is one of the main lipopeptide biosurfactants produced by different species of *Bacillus subtilis*. This study aims to analyze the effect of starch-coated Fe<sup>0</sup> and Fe<sup>3+</sup> nanoparticles on the biosurfactant production of *Bacillus subtilis*. Out of 70 soil samples, 20 *Bacillus* were isolated and genome sequenced by biochemical methods and 16S rRNA gene. Quantitative and qualitative screening methods were used to isolate and detect biosurfactant production. For the aim of this study, 61 and 63 (*Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*) were selected. Then, hemolytic activity, surfactant production and reduction of surface tension in Minimal Salt Medium containing Fe<sup>0</sup> and Fe<sup>3+</sup> nanoparticles were examined after 48h, 72h and 96h of culture. The binding of the nanoparticles to the surfactant was confirmed by SEM. Strain 61 was the best bacterium and Fe<sup>3+</sup> was the best nanoparticle and it was cultured. The results were compared with the results of non-nanoparticle bioreactor. Surfactin from strain 61 culture in the Fe<sup>3+</sup> nanoparticle bioreactor after 72 hours of growth showed higher production than the same strain culture after 72 hours without Fe<sup>3+</sup>. This strain has the potential to be commercialized in the future.

**KEYWORDS:** *Bacillus subtilis*, Biosurfactant, Fe<sup>0</sup> and Fe<sup>3+</sup> Nanoparticles, Surface Tension, Surfactin