

آزمون توان ساخت بیوسورفکتانت باکتری جدا شده از یک خاک آلوده به ترکیب های نفتی در کشتگاه ها و دماهای گوناگون

نعیمه عنایتی ضمیر^{۱*}، عبدالامیر معزی^۱ و شیلا خواجوی شجاعی^۲

۱- دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخچه مقاله	چکیده
دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۹ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۵/۰۲	بیوسورفکتانت ها ترکیبات آمفی فیلیک هستند که ریزجانداران گوناگونی توانایی ساخت آنها را دارند. این ریزجانداران در صنایع گوناگون و پاکسازی زیستگاه های آبی و خاکی کارایی ویژه ای دارند. این پژوهش با هدف جداسازی باکتری های سازنده بیوسورفکتانت انجام شد و توان ساخت بیوسورفکتانت توسط باکتری جداسازی شد و در کشتگاه های دارای کربن آلی گوناگون (نفت سفید، گلوکز و ملاس نیشکر) در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس و زمان گرماگذاری ۴۸ و ۱۵۶ ساعت بررسی و ارزیابی گردید. برای شناسایی توان ساخت بیوسورفکتانت از روش های کمی و کیفی غربالگری گوناگونی مانند توان همولیز، پراکنش نفت، فروپاشی نفت، فعالیت امولسیون کنندگی، سنجش آبگریزی یاخته و اندازه گیری کشش روئین بهره گیری گردید؛ سپس بر پایه یافته ها بهترین زیستگاه برای ساخت بیوسورفکتانت باکتری بررسی شد. در این پژوهش توان یک جدایه سازنده بیوسورفکتانت در شرایط گوناگون بررسی و آزمون شد. سوبه جداسازی شده دارای همولیز مثبت یا β در محیط آگار خون دار بود. ترکیب های ساخته شده سوبه جداسازی شده در همه کشتگاه های با کربن آلی گوناگون در زمان ها و دماهای به کار رفته به ته چاهک ته نشین شدند. این باکتری بیشترین کاهش کشش روئین را در کشتگاه دارای ملاس پس از ۴۸ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس داشت و توانست کشش روئین آن را تا ۲۲/۸۳ میلی نیوتون بر متر کاهش دهد؛ همچنین بیشترین درصد امولسیون کنندگی (۵۶/۲ درصد) نیز در کشتگاه دارای ملاس پس از ۴۸ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به دست آمد. بیشینه درصد آبگریزی رویه یاخته در کشتگاه دارای ملاس (۶۶/۶۳ درصد) دیده شد. بر پایه این نتایج نیاز به تحقیقات بیشتری برای استفاده از ملاس نیشکر به عنوان مواد پسماند کشاورزی برای تولید بیوسورفکتانت در سطح تجاری برای کاربردهای مختلف است.
کلمات کلیدی: آبگریزی، امولسیون، بیوسورفکتانت، کشش سطحی، همولیز	
*عهده دار مکاتبات n.enayatzamir@scu.ac.ir	

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات آملی فیلکی هستند که از یک بخش آب‌گریز و یک بخش آب‌دوست پدید آمده‌اند و در باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها ساخته می‌شوند. بخش آب‌دوست پدید آمده از ترکیبات آب‌دوست مانند ساکارید، کربوکسیلیک اسید، اسید آمینه یا یک پپتید است. بخش آب‌گریز می‌تواند به گونه یک اسید چرب اشباع‌شده، اشباع‌نشده و یا هیدروکسیله باشد (۲۶).

بر پایه بخش‌های آب‌گریز و آب‌دوست، بیوسورفکتانت‌ها به چهار گروه دسته بندی می‌شوند. این گروه‌ها: (۱) گلیکولیپید دارای کربوهیدرات و چربی، (۲) فسفولیپید دارای فسفات و الکل جایگزین چربی، (۳) لیپوپپتید و (۴) لیپوپروتئین دارای پلی پپتیدی و چربی و پلیمری دربرگیرنده ساکاریدها و اسیدهای چرب موجود در ساختار پلیمری هستند. اگر چه بیوسورفکتانت‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند ولی بسیاری از آنها کارایی ویژه‌ای در زنده مانی جانداران در حال رشد در بسترهای با حلالیت کم مانند هیدروکربن‌ها دارند (۲۰). سرشت و گوناگونی بیوسورفکتانت به گونه ریزجاندار بستگی دارد. بسیاری از ریزجانداران سازنده بیوسورفکتانت از خاک‌های آلوده، مخازن نفتی، فاضلاب و پساب جدا شده‌اند؛ بنابراین توانایی رشد در زیستگاه‌های آلوده را بهتر از دیگر ریزجانداران دارا هستند (۹، ۱۴). تاکنون پژوهشگران با بهره‌گیری از ریزجانداران گوناگون در زیستگاه‌های با کربن آلی ویژه بیوسورفکتانت‌های گوناگون و فراوانی را ساخته و فرآوری نموده‌اند. کربن بهره‌گیری شده در این کشتگاه‌ها برای ساخت بیوسورفکتانت دربرگیرنده؛ هیدروکربن‌ها، کربوهیدرات‌ها و روغن‌های گیاهی است. علی‌رغم برتری‌های بیوسورفکتانت‌ها بر سورفکتانت‌ها از دیدگاه تجزیه‌پذیری بیشتر، پایداری در برابر دگرگونی دما، شوری، pH و زهری بودن کمتر، اکنون ساخت آن‌ها در برابر با گونه‌های شیمیایی بسیار بهتر و ارزان تر است (۲۰). مهم‌ترین عامل بازدارنده در کاربرد کلان از

بیوسورفکتانت گران بودن آن است؛ زیرا که هم‌اکنون بالا بودن هزینه‌ها و بهای ساخت این گونه فرآورده‌ها به اندازه‌ای است که در بسیاری از صنایع بزرگ مانند نفت، شیمی و پتروشیمی، جایگزین کردن بیوسورفکتانت بجای سورفکتانت‌ها و امولسفايرهای سنتزی بهره‌گیری شده کنونی، توجیه اقتصادی ندارد. برای کاستن هزینه‌های ساخت، راهکارهایی مانند افزایش راندمان ساخت فرآورده، پیشرفت فرآیندهای اقتصادی و بهره‌گیری از خاستگاه کربن آلی ارزان برای ریزجانداران مانند زباله و پساب کارخانه‌های فرآوری روغن، آب‌پنیر، پسماند روغن‌های گیاهی، ملاس و زباله‌های صنعتی می‌تواند برای ساخت بیوسورفکتانت بهره‌گیری شود (۲۱، ۳۳، ۲۸). آبالوس و همکاران (۲۰۰۱) بیشینه ساخت بیوسورفکتانت رامنولیپیدی *Pseudomonas aeruginosa* AT10 را از پسماند پالایشگاه روغن سویا را ۹/۵ گرم بر لیتر گزارش نمودند (۱). نیتسچاک و همکاران (۲۰۰۵) اندازه ساخت بیوسورفکتانت رامنولیپیدی از پسماند روغن سویا سویه *Pseudomonas aeruginosa* LBI را ۱۱/۲۲ گرم بر لیتر گزارش کردند (۲۷). این پژوهش با هدف جداسازی باکتری‌های سازنده بیوسورفکتانت انجام شد و توان ساخت بیوسورفکتانت توسط باکتری جداسازی شده در کشتگاه‌های دارای کربن آلی گوناگون (نفت سفید، گلوکز و ملاس نیشکر) در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس و زمان گرماگذاری ۴۸ و ۱۵۶ ساعت بررسی و ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌های خاک از زمین‌های کشاورزی پیرامون چاه‌های نفت مارون اهواز آماده گردید. برای آن ۱۲ نمونه به گونه تصادفی برداشت و سپس نمونه مرکب از آن آماده گردید.

کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌گذاری شدند. فعالیت همولیتیک با حضور منطقه شفاف (هاله) اطراف کلونی‌های باکتریایی شناسایی شدند (۵). به‌طور کلی واکنش همولیتیک برپایه ظاهر منطقه اطراف کلنی با آلفا، بتا و گاما در محیط آگار خون‌دار مشخص می‌شود (۳۷ و ۱۳).

پرواکنش نفت^۲

این آزمون طبق روش موریکاو و همکاران (۲۰۰۰) همراه با تغییر جزئی انجام گرفت (۲۴)، بدین منظور ابتدا مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری ریخته، سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به مرکز پلیت افزوده شد. پس از به تعادل رسیدن نفت در رویه آب، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ بر روی لایه نفتی ایجاد شده ریخته شد. چنانچه محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ دارای بیوسورفکتانت باشد، قادر خواهد بود لایه نفتی را کنار بزند و در رویه آب ناحیه شفافی ایجاد کند. در این آزمون از Tween 20 (۲ درصد) همانند شاهد مثبت و از کشتگاه MSM همراه با منبع کربن همانند شاهد منفی بهره‌گیری شد (۲). در این آزمون اگر قطر دایره شفاف ایجاد شده عصاره حاصل از سانتریفیوژ کمتر از ۱۰ میلی‌متر باشد با علامت + و اگر بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر باشد به ترتیب با ++ و +++ نشان داده می‌شود (۲۵).

فروپاشی نفت^۳

در این آزمون ۲۰ میکرولیتر از روشناور هر نمونه به درون پلیت الایزا دارای ۱۰۰ میکرولیتر پارافین افزوده شد. از سورفکتانت شیمیایی (Tween 20) همانند شاهد مثبت و از محیط کشت نمک معدنی (MSM) همراه با منبع کربن همانند شاهد منفی بهره‌گیری شد. در گونه تشکیل قطره کروی در سطح پارافین امتیاز منفی به چاهک و در گونه‌ی که قطره افزوده شده به ته چاهک منقل گردید یا از حالت کروی خارج شود امتیاز مثبت می‌گیرد (۲۳). در این

جداسازی باکتری

برای جداسازی باکتری از خاک از روش سری رقت و کشت ۱۰۰ میکرولیتر از سری‌های 10^{-4} تا 10^{-8} بر روی محیط کشت آگار مغذی بهره‌گیری شد (۷). پس از جداسازی کشت ناب باکتری‌ها بر اساس ریخت پرگنه آن‌ها، از آزمون همولیز، کشش روئین و شاخص امولسیون-کنندگی برای غربال‌گری باکتری‌های سازنده بیوسورفکتانت بهره‌گیری شد. باکتری‌هایی که به این آزمون‌ها پاسخ مثبت دادند، برای ادامه آزمون‌های تولید ساخت بیوسورفکتانت و نیز بررسی اثر منبع کربن، دما و زمان گرم‌گذاری گزینش شدند.

کشتگاه به‌کاررفته برای ساخت بیوسورفکتانت

در این پژوهش از محیط کشت نمک معدنی^۱ با ترکیب‌های آلی ارزان و در دسترس گوناگون همانند خاستگاه کربن آلی برای کشت باکتری بهره‌گیری شد (۳۶). کشتگاه نمک معدنی با کربن آلی گوناگون با ۱/۲ درصد (وزنی/حجمی) گلوکز و ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) سولفات آمونیوم همانند آغازکننده و خاستگاه نیتروژن، نیز تیمار شدند. ترکیب کشتگاه نمک معدنی دارای پنج میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات (مقادیر بر حسب $g L^{-1}$ شامل $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ ۲۱/۷۵، KH_2PO_4 ۸/۵، $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ ۳۳/۴، (NH_4Cl) ۵/۰، $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ۳ میلی‌لیتر از محلول $MgSO_4$ ($22/5 g L^{-1}$)، یک میلی‌لیتر از محلول $FeCl_3$ ($0/25 g L^{-1}$)، یک میلی‌لیتر از محلول $CaCl_2$ ($36/4$) و یک میلی‌لیتر از محلول عناصر کم مصرف (مقادیر بر حسب $mg L^{-1}$ شامل $39/9$ ، $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ۳۴/۷، $MnSO_4 \cdot H_2O$ ۴۲/۸، $ZnSO_4 \cdot H_2O$) در لیتر بود و مقدار pH محیط بر روی ۷ تنظیم شد.

غربالگری ساخت بیوسورفکتانت

آزمون همولیز

باکتری‌های جداسازی شده بر روی کشتگاه آگار خون‌دار (بلاد آگار) دارای ۵ درصد (v/v) خون گوسفند،

2- Oil spreading
3- Drop collapse

1- Mineral Salt Medium (MSM)

عنایتی ضمیر و همکاران: آزمون توان ساخت بیوسورفکتانت باکتری...

آب‌گریزی سطح سلول

برای اندازه‌گیری این فاکتور، از کشت باکتری در منابع گوناگون کربن بهره‌گیری شد. یاخته‌های باکتریایی در ۷۰۰۰ rpm به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ شده و دو بار در محلول بافر فسفات منیزیم اوره شسته شد. سپس یاخته‌ها در این محلول به حالت سوسپانسیون درآمد تا چگالی نوری اولیه (A_0) به یک برسد. چگالی نوری در ۶۰۰nm با دستگاه Spectrophotometer UV-Visible قرائت شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر هگزادکان به پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی افزوده و به مدت دو دقیقه با دور بالا ورتکس شد. پس از ۱۰ دقیقه، OD فاز آبی اندازه‌گیری شد (A_1). میزان آب‌گریزی از معادله (۲) محاسبه شد (۳۴). این آزمایش در سه تکرار انجام گردید. اثر منبع کربن بر آب‌گریزی سطح یاخته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و زمان ۱۵۶ ساعت در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

معادله (۲)

$$[1 - (A_0 - A_1) / A_0] \times 100\% = \text{درصد آب‌گریزی}$$

سطح سلول

شناسایی باکتری سازنده بیوسورفکتانت

۱۳ جدایه بر اساس تفاوت در ویژگی‌های مورفولوژیکی جداسازی شدند؛ اما بر اساس نتایج حاصل از غربال‌گری ساخت بیوسورفکتانت (آزمون همولیز، کشش رویین و شاخص امولسیون‌کنندگی) تنها یک جدایه شاخص که به تمام آزمون‌ها پاسخ مثبت داد برای شناسایی تکمیلی و بررسی اثر منابع گوناگون کربن بر ساخت بیوسورفکتانت گزینش شد.

شناسایی جدایه سازنده بیوسورفکتانت بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی و انجام تست‌های بیوشیمیایی و بر مبنای طبقه‌بندی باکتری‌ها برگی انجام شد (۸ و ۱۵). برای شناسایی ملکولی جدایه، پس از کشت شبانه باکتری در محیط مایع مغذی از کیت استخراج DNA باکتری شرکت سیناژن بهره‌گیری شد. برای اطمینان از

آزمون علامت - برای نمایش قطره‌های گرد، علامت + برای نمایش پخش جزئی قطر و علامت +++ برای پخش کامل قطره به کار برده شد (۲۳، ۲۶).

فعالیت امولسیون‌کنندگی (EI24)

برای انجام این آزمون، ۲ میلی‌لیتر از هر نمونه حاصل از سانتریفوژ، درون لوله‌های آزمایش جداگانه ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر نفت سفید به هر کدام اضافه گردید. سپس هر نمونه به مدت دو دقیقه تحت ورتکس شدید قرار گرفت، پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق به‌گونه ساکن قرار گرفتند. بعد از گذشت این زمان، ارتفاع امولسیون باقیمانده درون هر لوله آزمایش اندازه‌گیری شده و نسبت ارتفاع این امولسیون به ارتفاع کل مایع درون لوله آزمایش، همانند شاخص امولسیفیکاسیون برای هر نمونه گزارش گردید (۱۹). در این آزمایش از سورفکتانت شیمیایی Tween20 همانند شاهد مثبت و از محیط کشت نمک معدنی همراه با منبع کربن همانند شاهد منفی استفاده شد.

اندازه‌گیری کشش سطحی

بدین منظور پنج میلی‌لیتر از مایع به‌دست‌آمده از سانتریفوژ به لوله آزمایشی که در حمام آب در درجه حرارت ثابت ۲۸ درجه سلسیوس قرار داشت، افزوده گردید. لوله موئین (با شعاع ۰/۰۵ سانتی‌متر) درون لوله آزمایش قرار گرفت و ارتفاع صعود مایع در لوله موئین اندازه‌گیری شد و کشش رویین با بهره‌گیری از فرمول زیر محاسبه گردید. در هر مورد برای اطمینان از صحت نتایج، اندازه‌گیری کشش سطحی سه بار تکرار گردید (۳۸)

$$\gamma = \frac{r h \delta g}{2} \quad \text{معادله (۱)}$$

که در این فرمول $r = \text{شعاع لوله موئین (cm)}$ ، $h = \text{ارتفاع صعود مایع (cm)}$ ، $\delta = \text{چگالی (g/ml)}$ ، $g = \text{نیروی ثقل (cm/sec}^2\text{)}$ ، $\gamma = \text{کشش رویین (N/m)}$ است.

دقیقه با سرعت دورانی ۸۵۰۰ دور بر دقیقه سانتیفیوژ شد تا یاخته‌ها و ذرات معلق از آن حذف شود (۲۱). از مایع رویی به دست آمده برای بررسی ساخت بیوسورفکتانت بر اساس روشهای ذکر شده بهره‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

اثر منبع کربن (ملاس نیشکر، نفت سفید، گلوکز، فناترن)، دمای گرماگذاری (۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس)، زمان گرماگذاری (۴۸ و ۱۵۶ ساعت) بر شاخص امولسیون‌کنندگی و کشش سطحی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و اثر چهار منبع کربن (ملاس نیشکر، نفت سفید، گلوکز، فناترن) بر ضریب آبریزی سلول در قالب طرح کاملاً تصادفی با بهره‌گیری از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ بررسی شد. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام شد. نمودارها و اشکال با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

نتایج شناسایی جدایه

برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه برتر در جدول (۱) ارایه شده است. نتیجه تکثیر ژنوم با پرایمر عمومی در شکل (۱) آورده شده است. قطعه ۱۵۰۰bp در شکل (۱) نشان دهنده تکثیر صحیح ژنوم است. برپایه یافته‌های مقایسه توالی 16S rRNA، جدایه‌سازنده بیوسورفکتانت، تشابه ۹۸ درصدی با باسیلوس پومیلیس^۱، با کد دسترسی (KX898448) داشت که با آزمون‌های بیوشیمیایی نیز همخوانی داشت.

غربالگری ساخت بیوسورفکتانت توسط باسیلوس پومیلیس

آزمون همولیز

در این روش، ۴۸ ساعت پس از کشت باکتری در پلیت‌های دارای آگار خون‌دار هاله‌ای از نوع بتا در اطراف کلنی مشاهده شد که مؤید تولید ترکیبات بیوسورفکتانتی توسط *Bacillus pumilus* است.

استخراج و بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده، ۵ میکرولیتر از محلول دارای ژنوم به علاوه یک میکرولیتر محلول رنگی لودینگ دای بر روی ژل آگارز یک درصد دارای Safe stain با ولتاژ ۸۰ ولت و به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد. برای انجام واکنش‌های زنجیره ای پلیمرز از پرایمرهای عمومی که قابلیت تکثیر ژنوم در ناحیه ژن 16s rRNA را داشتند (پرایمر رفت: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3' و پرایمر برگشت: 5'-CCCGGATCCAAGCTTACGGTTAC CTTGTTACGACTT-3')، بهره‌گیری شد (۳۹). پرایمرهای فوق شرکت ژن فن‌آوران سنتز شده و براساس دستورالعمل شرکت سازنده آماده شد. نتایج مربوط به تعیین توالی قطعه تکثیر شده باکتری با بهره‌گیری از نرم‌افزار Bioedit ویرایش و با برنامه Blast، نوع باکتری مشخص شد.

اثر زمان و دمای گرماگذاری بر ساخت بیوسورفکتانت

ساخت بیوسورفکتانت در این آزمایش در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس و دو بازه زمانی ۴۸ و ۱۵۶ ساعت در ۴ منبع کربن بررسی شد. جهت ساخت بیوسورفکتانت از کشت ۲۴ ساعته باکتری در کشتگاه مایع مغذی بهره‌گیری شد. به این گونه که پنج درصد از کشت شبانه باکتری به ارلن‌های دارای کشتگاه نمک معدنی و ۱/۲ درصد (وزنی/حجمی) گلوکز، پنج درصد (وزنی/حجمی) ملاس، دو درصد (وزنی/حجمی) نفت سفید و ۱۰۰ mg/l فناترن مایه‌زنی شد. نمونه‌های دارای گلوکز و ملاس در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شدند. فناترن و نفت سفید نیز پس از عبور از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتر به کشتگاه استریل شده افزوده گردید. هر نمونه در سه تکرار تهیه شد. نمونه‌ها در درجه حرارت ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت دورانی ۱۵۰ دور بر دقیقه در شیکر انکوباتور نگهداری شدند. پس از گذشت دوره گرماگذاری، محلول باقی‌مانده در ارلن‌ها به مدت ۱۵

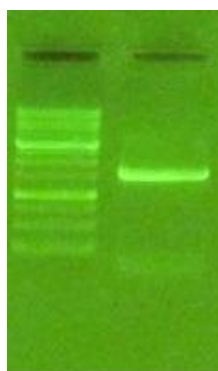
1- *Bacillus pumilus*

عنایتی ضمیر و همکاران: آزمون توان ساخت بیوسورفکتانت باکتری...

جدول (۱) نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مشخصات باسیلوس پوهیلیس

Table (5) Biochemical characteristics of *Bacillus pumilus*

نتایج	آزمون‌ها	نتایج	آزمون‌ها
Results	Tests	Results	Tests
-	تولید سولفید هیدروژن H ₂ S production	باسیل کوتاه منظم Bacill	شکل سلول Cell shape
-	اندول Indole	+	واکنش گرم Gram staining
+	SIM	+	تست اسنات Snot test
-	نشاسته Starch	بیضوی مرکزی Central oval	اسپور Spore
+	OF	+	کاتالاز Catalase
-	MR	+	اکسیداز Oxidase
+	VP	+	ژلاتیناز Gelatinase
-	دنیتریفیکاسیون Denitrification	+	مصرف سترات Citrate
-	اوره آز Urease	K/A	TSI



شکل (۱) محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز. چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست: مارکر با وزن ملکولی

یک کیلو جفت باز (1kb)، قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر 16S rDNA

Figure (1) Images of DNA on agarose gel From right to left: 1Kb Ladder, PCR products (1500bp)

فروپاشی نفت روشی حساس و آسان برای شناسایی ساخت بیوسورفکتانت است (۳۰) و روش کمی نیز به حساب می آید (۶). نتایج این آزمون در جدول (۳) آورده شده است. مشاهدات نشان داد که شاهد منفی (آب مقطر) در لایه پارافینی موجود در چاهک پلست سقوط نکرده و مانند یک ساچمه در سطح پارافین قرار گرفته است. درحالی که شاهد مثبت (توین ۲۰ درصد) در مدت زمان یک دقیقه فروریخت و به ته چاهک منتقل شد. این حالت به طور مشابه، برای محلول‌های دارای متابولیت‌های باکتری در هر چهار منبع کربن مشاهده گردید. از سوی دیگر در نمونه‌های شاهد دارای منابع کربن هیچ گونه سقوط و یا تغییر حالت در سطح پارافین مایع مشاهده نگردید. سورفکتانت‌ها به دلیل خاصیت خود در کاهش کشش روئین و بین سطحی، قادر به کاهش کشش روئین آب و روغن می گردند و منجر به پخش شدن قطره می شوند. از سوی دیگر، قطرات بدون بیوسورفکتانت به دلیل خاصیت آب‌گریزی روغن و در نتیجه فشار بین سطوح در سطح روغن تجمع کرده و به ساچمه شباهت پیدا می کنند (۱۷). بیشترین فروپاشی نفت با این آزمون در کشت‌های حاوی گلوکز و ملاس در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۴۸ ساعت به دست آمد؛ به این ترتیب که با کاهش دما و زمان گرماگذاری قطر قطرات در چاهک پلست افزایش یافت. این نتایج مؤید تولید بهتر بیوسورفکتانت در دوره زمانی ۴۸ ساعت و ۳۰ درجه سلسیوس در برابر سایر شرایط است.

آزمون فروپاشی نفت

تأثیر تیمارهای گوناگون بر شاخص امولسیون-کنندگی

شاخص امولسیون‌کنندگی مقیاسی از قدرت و توانایی بیوسورفکتانت در امولسیون کردن هیدروکربن و ترکیبات نفتی و نشان دهنده میزان پایداری امولسیون حاصل از آب و ترکیبات نفتی است. اندازه‌گیری شاخص امولسیون‌کنندگی در محیط دارای نفت سفید و فناترن نشان داد که باکتری در این دو محیط قادر به

قطر هاله پدید آمده پس از دو روز گرما گذاری به ۳/۱ سانتی‌متر رسید. اختصاصی نبودن این روش، از جمله محدودیت‌های آن محسوب می‌شود؛ زیرا ممکن است هاله شفاف اطراف کلونی در نتیجه فعالیت لایتیک باکتری به وجود آمده باشد. عدم همولیز یاخته‌های قرمز خون نیز می‌تواند ناشی از محدودیت انتشار سورفکتانت در محیط دارای آگار باشد (۴۰). به همین دلیل روش قابل‌اعتمادی برای تأیید قطعی حضور و یا عدم حضور بیوسورفکتانت در محیط محسوب نمی‌شود و لازم است روش‌های کمی دقیق‌تری نیز مورد بهره‌گیری قرار گیرد.

آزمون پراکنش نفت

در این روش، نفت افزوده شده در رویه آب مقطر لایه‌ای به قطر ۱۰ سانتی‌متر تشکیل داد که با افزودن کشتگاه باکتری دارای منابع گوناگون کربن، ناحیه شفافی در سطح لایه نفتی ایجاد شد. این پدیده نشان‌دهنده حضور ترکیبات دوگانه دوست بیوسورفکتانت در کشتگاه باسیلوس پومیلیس در چهار منبع کربن است؛ اما بر پایه ایجاد دایره‌های با قطر بیشتر در برخی از نمونه‌ها مشخص شد فعالیت بیوسورفکتانت تولید شده در برخی منابع کربن بیشتر است. با کاهش دما و زمان گرما گذاری، قطر ناحیه شفاف پدید آمده در پلست دارای نفت خام افزایش یافت. محیط دارای ملاس پس از ۱۵۶ ساعت گرما گذاری توانست لایه نفتی را بیش از سه سانتی‌متر کنار بزند که بیشترین میزان در بین منابع کربن موجود است. نتایج این آزمون در جدول (۲) آورده شده است. روش پراکنش نفت روش سریع و آسان جهت شناسایی تولید بیوسورفکتانت است که بدون نیاز به تجهیزات و تنها با حجم کوچکی از نمونه انجام می‌شود. این روش در برابر مقادیر کم بیوسورفکتانت (۱۰ ppm) نیز واکنش نشان می‌دهد (۳۰). یوسف و همکاران^۱ (۲۰۰۴) گزارش دادند که پراکنش نفت روش قابل‌اعتمادی جهت شناسایی بیوسورفکتانت تولید شده به وسیله ریز موجودات است (۴۰).

عنایتی ضمیر و همکاران: آزمون توان ساخت بیوسورفکتانت باکتری...

جدول (۲) نتایج آزمون پراکنش نفت با *Bacillus pumilus*
Table (2) Results of oil spreading by *Bacillus pumilus*

زمان و دمای گرماگذاری				منبع کربن
Time and temperature of incubation				Carbon source
156h, 30 °C	48h, 30 °C	156h, 37 °C	48h, 37 °C	
++	++	+	++	گلوکز Glucose
+	++	++	++	نفت سفید kerosene
+++	+	+	++	ملاس Molasses
++	++	+	+	فنانترن Phenathrane
				محیط دارای منبع کربن و بدون باکتری Medium containing carbon source, without bacterium
-	-	-	-	توئین ۲۰ (شاهد مثبت) Tween20 (Positive control)
		+++		آب مقطر (شاهد منفی) Distilled water (Negative control)
		-		

+ نواحی با قطر کمتر از ۱ cm، ++ نواحی با قطر ۱-۳ سانتیمتر، +++ نواحی با قطر بیش از ۳-۱ سانتی متر

(+): For areas with less than 1 cm in diameter, (++): For areas with a diameter of 1 to 3 cm, (+++): For areas with more than 3 cm in diameter,

بر ارتباط مستقیم بین کشش روئین و فعالیت امولسیون-کنندگی، توانایی یک مولکول برای تشکیل یک امولسیون پایدار، همیشه با کاهش کشش روئین توأم نیست و در نتیجه، این روش تنها همانند نشانه‌ای از ساخت بیوسورفکتانت مورد بهره‌گیری قرار می‌گیرد و قطعی نیست (۳۵). برای اطمینان بیش‌تر از تولید بیوسورفکتانت و تعیین شرایط بهینه جهت تولید آن کشش سطحی نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید.

تأثیر تیمارهای گوناگون بر کشش روئین

بیشترین کاهش کشش روئین در حضور باکتری در محیط دارای ملاس پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری

تشکیل امولسیون‌های پایدار نیست و امولسیون‌های پدید آمده با گذشت زمان به تدریج ناپدید شدند (شکل ۲). روی هم رفته امولسیون‌های پدید آمده در کشتگاه دارای ملاس (۵۶/۲ درصد) پایدارتر از سایر منابع کربن به نظر می‌رسیدند.

شاخص امولسیون‌کنندگی تنها در منبع ملاس در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و در هر دو زمان ۴۸ و ۱۵۶ ساعت مقادیر بالایی نشان داد. فعالیت امولسیون‌کنندگی یکی از معیارهای شناسایی اولیه ریزموجودات سازنده بیوسورفکتانت است. با وجود گزارش‌های ارائه‌شده مبنی

قابلیت بهره‌گیری آن باکتری است. این کاهش مؤید تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری در بودن ملاس است. بهره‌گیری از ملاس همانند منبع کربن ارزان جهت ساخت بیوسورفکتانت در پژوهش‌های پیشین نیز بر کارایی و کاهش قابل‌توجه کشش رویین تأکید دارد (۳،۲۹).

حاصل گردید، بدین ترتیب که کشش رویین فاز آبی کشتگاه دارای ملاس در این مرحله در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس به ترتیب ۲۲/۸ mN/m و ۲۸/۹۱ mN/m اندازه‌گیری شد که در برابر کشش رویین محیط شاهد (محیط دارای ملاس بدون مایه زنی باکتری) با کشش رویین ۵۰/۴ mN/m به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این امر احتمالاً به دلیل میزان بالای قند موجود در ملاس و

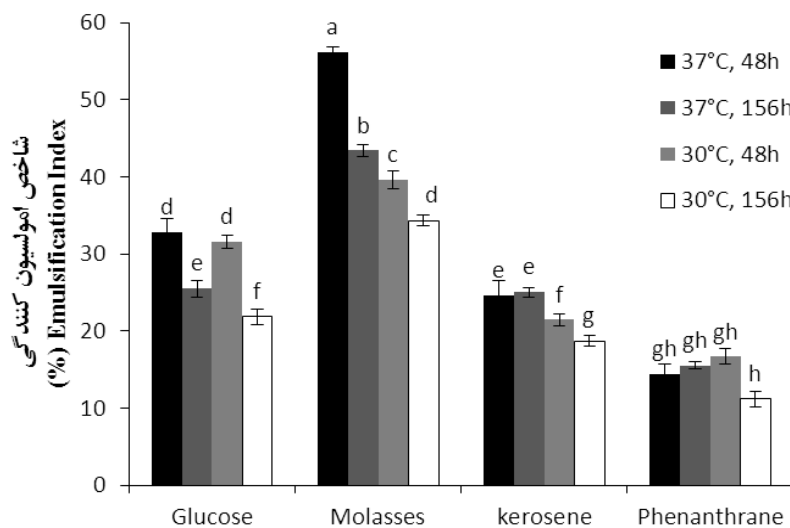
جدول (۳) نتایج آزمون فروپاشی نفت با باسیلوس پومیلیس
Table (3) Results of drop collapse test by *Bacillus pumilus*

زمان و دمای گرماگذاری				منبع کربن Carbon source
Incubation time and temperature				
156h, 30 °C	48h, 30 °C	156h, 37 °C	48h, 37 °C	
+	+++	+	+	گلوکز Glucose
+	+	+	+	نفت سفید kerosene
+	+++	+	+	ملاس Molasses
+	+	+	+	فنانترن Phenathrane
-	-	-	-	محیط دارای منبع کربن و بدون باکتری Medium containing carbon source, without bacterium
		+++		توئین ۲۰ (شاهد مثبت) Tween20 (Positive control)
		-		آب مقطر (شاهد منفی) Distilled water (Negative control)

+ نواحی نسبتاً فروریخته ، ++ نواحی کاملاً فروریخته.

(-): Rounded drops, (+): Flat drops (partial spreading), (+++): Complete spreading

عنایتی ضمیر و همکاران: آزمون توان ساخت بیوسورفکتانت باکتری...



شکل (۲) اثر تیمارهای گوناگون بر شاخص امولسیون‌کنندگی (میانگین‌های با حروف متفاوت، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی دار می‌باشند).

Figure (2) Effect of treatments on emulsification index. Means followed by different letters are significant at $p < 0.05$.

محیط دارای فناترن بدون مایه‌زنی باکتری) با کاهش رویین $49/6 \text{ mN/m}$ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش دمای گرماگذاری در محیط دارای گلوکز به‌طور معنی‌داری در زمان ۴۸ ساعت منجر به کاهش کشش رویین شد؛ به این گونه که کشش رویین در دمای گرما گذاری ۳۰ درجه سلسیوس و در زمان ۴۸ ساعت $38/0 \text{ mN/m}$ بود که در برابر کشش رویین محیط شاهد (محیط دارای گلوکز بدون مایه‌زنی باکتری) با کاهش رویین $56/1 \text{ mN/m}$ کاهش یافت.

این نتایج مؤید تولید مقادیر بیشتر بیوسورفکتانت در منبع کربن ملاس و پس از آن فناترن است. پرابو و فاله^۱ (۲۰۰۳) گزارش دادند که ساخت بیوسورفکتانت به وسیله سودوموناس در بودن فناترن همانند تنها منبع کربن در مقایسه با گلوکز و بنزوات بیشتر بوده است؛ این محققان همچنین مشاهده کردند یاخته‌های باکتریایی در محیط دارای فناترن آب‌گریزی بیشتری در برابر گلوکز داشتند که منجر به کاهش جذب فناترن و ساخت بیوسورفکتانت در برابر گلوکز گردید (۳۱). جاشی و

اندازه‌گیری کشش رویین در محیط دارای نفت سفید نشان داد باکتری قادر به مصرف نفت سفید است. کاهش دمای گرماگذاری در محیط دارای نفت سفید به‌طور معنی‌داری در هر دو زمان ۴۸ و ۱۵۶ ساعت منجر به کاهش کشش رویین شد؛ نتایج حاصل از اندازه‌گیری کشش رویین محیط دارای نفت سفید نشان داد باکتری به‌طور معنی‌داری پس از ۴۸ ساعت گرما گذاری، به این آزمون پاسخ مثبت داد. کشش رویین فاز آبی کشتگاه دارای نفت سفید در این مرحله در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس به ترتیب $38/0 \text{ mN/m}$ و $40/4 \text{ mN/m}$ اندازه‌گیری شد که در برابر کشش رویین محیط شاهد (محیط دارای نفت سفید بدون مایه‌زنی باکتری) با کاهش رویین $42/6 \text{ mN/m}$ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که نشان‌دهنده مصرف نسبتاً خوب آن همانند تنها منبع کربن باکتری و تولید مؤثر بیوسورفکتانت است (شکل ۳).

بیشترین کاهش کشش رویین در محیط دارای فناترن پس از ۴۸ ساعت از زمان مایه‌زنی رخ داد. کشش رویین فاز آبی کشتگاه دارای فناترن در این مرحله در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به ترتیب $29/8 \text{ mN/m}$ اندازه‌گیری شد که در برابر کشش رویین محیط شاهد

باکتری *Bacillus licheniformis* R2 در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و $pH=6/5-7/2$ توانستند کشتش رویین محیط را تا 28 mN/m در مدت زمان ۱۰ ساعت کاهش دهند (۱۸). البته در برخی مطالعات نیز بیشترین کاهش کشتش رویین پس از ۷-۸ روز گرماگذاری حاصل شده است (۱۶ و ۴۱). کاهش کشتش سطحی محیط رشد مهم ترین و اصلی ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت می باشد. برای و واسودوان (۲۰۰۱) و امتیازی و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که اندازه گیری کشتش سطحی می تواند نشان دهنده تولید بیوسورفکتانت و ویژگی مناسب سویه های میکروبی مورد بررسی در تجزیه هیدروکربن های نفتی باشد (۴،۱۱). طبق روش دسای و بنت (۱۹۹۷) توانایی کاهش کشتش سطحی پایین تر از ۴۰ میلی نیوتون بر متر نشان دهنده قابلیت گونه مورد نظر به- عنوان تولید کننده بیوسورفکتانت است (۱۰).

آب گریزی سطح یاخته باکتری

نتایج این آزمون نشان داد آب گریزی سطح یاخته برپایه نوع منبع کربن موجود در کشتگاه تغییر می کند (شکل ۴). این باکتری بالاترین میزان آب گریزی را در منبع کربن نفت سفید نشان داد. بالا بودن آب گریزی یاخته به باکتری اجازه می دهد تا به طور مستقیم با قطره نفت یا هیدروکربن های جامد تماس پیدا کنند؛ در حالی آب گریزی کم یاخته باعث چسبندگی باکتری به میسل یا روغن های امولسیون کننده می شود (۱۲).

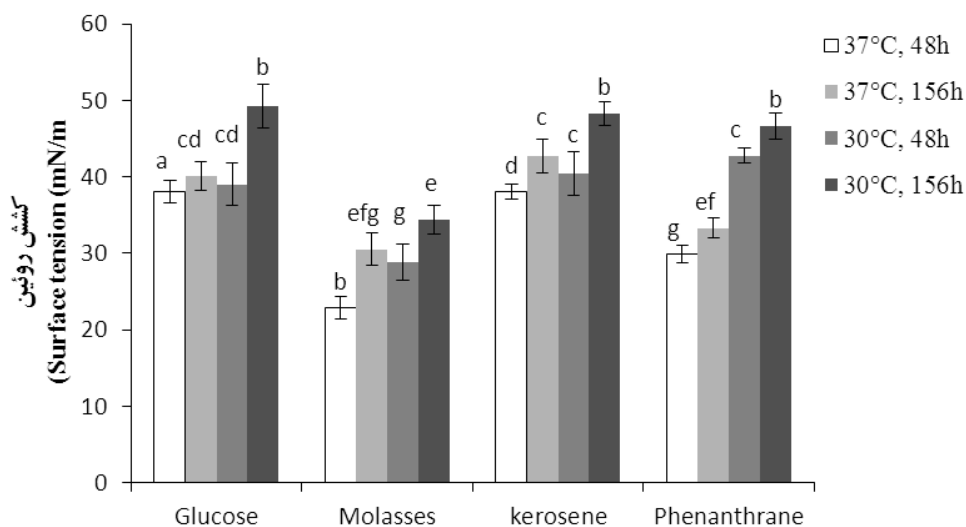
به گفته ژانگ و میلر^۲ (۱۹۹۴)، جاذبه متقابل بین بیوسورفکتانت و یاخته های میکروبی می تواند به کاهش آب گریزی یاخته منجر شود (۴۲). بیشترین میزان آب گریزی سطح یاخته باسیلوس پومیلوس در منبع کربن ملاس مشاهده شد. باکتری ها برای این که بتوانند از هیدروکربن ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده بهتری نمایند، باید قادر به وارد کردن میزان بیشتری از فاز آلی (غیرقطبی) به فاز آبی (قطبی) باشند؛

همکاران^۱ (۲۰۰۸) با بررسی ساخت بیوسورفکتانت در راکتورهای دارای گلوکز با باکتری *Bacillus licheniformis* R2 در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و $pH=6/5-7/2$ توانستند کشتش رویین محیط را تا 28 mN/m در مدت زمان ۱۰ ساعت کاهش دهند (۱۸).

روی هم رفته کمیت و کیفیت ساخت بیوسورفکتانت تولید شده ریزجانداران تحت تأثیر ماهیت منبع کربن است (۳۲). طبق نتایجی که در بالا آورده شد باسیلوس پومیلوس توانایی مصرف انواع منابع کربنی (از قبیل محلول در آب و انواع هیدروکربنی) و ساخت بیوسورفکتانت را دارا است. بررسی کشتش رویین کشتگاه مؤید این مطلب است که بیشترین میزان ساخت بیوسورفکتانت در دمای ۳۰ سلسیوس به ترتیب در محیط دارای ملاس نیشکر، فناترن و گلوکز و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به ترتیب در محیط دارای ملاس نیشکر، گلوکز و فناترن حاصل شد. لطف آباد و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند با کاهش دما میزان بیوسورفکتانت تولیدی سویه *Pseudomonas aeruginosa* MR01 افزایش یافت (۲۲). گلوکز اگرچه منبع کربن مناسبی برای رشد باکتری محسوب می شود اما از آنجا که جهت ساخت بیوسورفکتانت در سطوح تجاری نیاز به مصرف مقادیر زیاد گلوکز است؛ بهره گیری از آن غیراقتصادی و غیرمنطقی خواهد بود. بنابراین همانند یک جایگزین مناسب می توان از ملاس که علاوه بر دارا بودن ترکیبات قندی، حاوی ترکیبات نیتروژنی و سایر مواد مورد نیاز جهت رشد ریز موجودات است بهره گیری گردد.

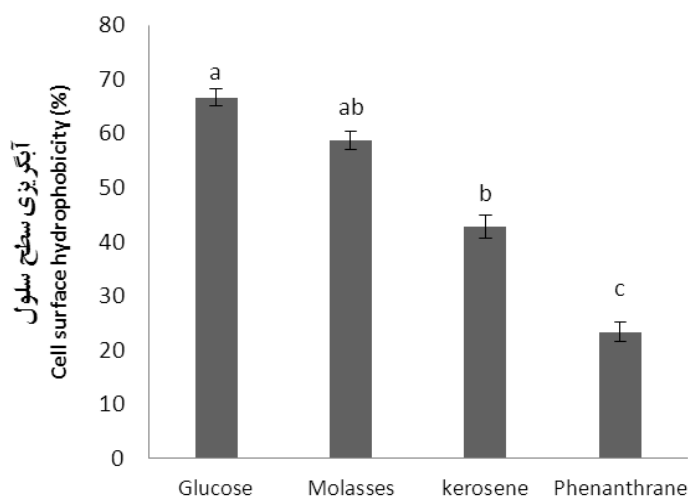
نتایج حاصل از بررسی اثر زمان گرماگذاری حاکی از آن است که کاهش کشتش رویین محیط پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری به طور معنی داری بیشتر از کاهش کشتش رویین نمونه های حاصل از ۱۵۶ ساعت گرماگذاری است. جاشی و همکاران^۱ (۲۰۰۸) با بررسی ساخت بیوسورفکتانت در راکتورهای دارای گلوکز

عنایتی ضمیر و همکاران: آزمون توان ساخت بیوسورفکتانت باکتری...



شکل (۳) اثر تیمارهای گوناگون بر کشش رویین (میانگین‌های با حروف متفاوت، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی دار می باشند).

Figure (3) Effect of treatments on surface tension. Means followed by different letters are significant at $p < 0.05$.



شکل (۴) اثر منبع کربن بر آبگریزی یاخته *Bacillus pumilus* (میانگین‌های با حروف متفاوت، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی دار می باشند).

Fig. (4) Effect of carbon source on cell-surface hydrophobicity of *Bacillus pumilus*. Means followed by different letters are significant at $p < 0.05$.

آبگریزی و تولید بیوسورفکتانت وجود دارد. نتایج حاصل از بررسی آبگریزی این باکتری در منابع گوناگون کربن مشابه نتایج حاصل از کشش رویین است. نشان از ساخت بیوسورفکتانت در این منابع کربن دارد.

به‌همین منظور هرچه سطح سلول باکتری آب‌گریزتر باشد یا به عبارت دیگر آبگریزی سطح سلولی بیشتر باشد، تولید بیوسورفکتانت بیشتر می‌شود. پروئی و کاموترا (۱۹۹۷) دریافتند که رابطه مستقیمی بین

نتیجه گیری

گرماگذاری در ۳۰ درجه سلسیوس پدید آمد. بر اساس این نتایج نیاز به تحقیقات بیشتری برای استفاده از ملاس نیشکر به عنوان پسماند کشاورزی برای تولید بیوسورفکتانت در سطح تجاری برای کاربردهای مختلف است.

در این پژوهش تنها یک جدایه که به آزمون‌های همولیز، کشش روئین و شاخص امولسیون کنندگی پاسخ مثبت داد، شناسایی شد. بررسی ساخت بیوسورفکتانت توسط *باسیلیوس پومیلیوس* نشان داد که این باکتری توان رشد و بهره‌گیری از منابع کربنی محلول در آب (گلوکز و ملاس) و هیدروکربن‌های نامحلول در آب (نفت سفید و فنانترن) را دارد. نتایج غربالگری اولیه (همولیز، پراکنش و فروپاشی نفت) توانایی ساخت بیوسورفکتانت را در هر چهار منبع کربن به کار رفته نشان داد. بیشترین شاخص امولسیون کنندگی و کمترین کشش روئین در محیط دارای ملاس پس از ۴۸ ساعت

سپاس‌گزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ فراهم نمودن اعتبار پژوهشی این تحقیق در قالب طرح با شماره ۱۲۴۹ تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., García, F., and Manresa, A. 2001. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soyabean oil refinery wastes. *Langmuir*, 17: 1367-1371.
2. Anandaraj, B., and Thivakaran, P. 2010. Isolation and production of biosurfactant producing organisms from oil spilled soil. *Journal of Bioscience and Technology*, 1(3): 120-126.
3. Aparna, A., Srinikethan, G., and Smitha, H. 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95: 23-29.
4. Barathi, S., and Vasudevan, N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*, 26(5): 413-416.
5. Bicca, F.C., Fleck, L.C., and Ayub, M.A.Z. 1999. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, 30(3): 231-236.
6. Bodour, A., and Miller-Maier, R. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiology Methods*, 32(3): 273-280.

7. Bordoloi, N. K., and Konwar, B. K. 2008. Microbial surfactant enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids Surface, B: Biointerfaces*, 63: 73-82.
8. Cappiccinio, J. 1992. *Microbiology: A laboratory manual*. The Benjamin Cummings publishing company, INC. 39. Bridge parkway Redwood city, California, 94065.
9. Chandankere, R., Yao, J., Choi, M., Masakorala, K., and Chan, Y. 2013. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochemical Engineering Journal*, 74: 46-53.
10. Desai, J.D and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1): 47-64.
11. Emtiazi, G, Shakarami, H, Nahvi, I., and Mirdamadian, S.H. 2005. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas sp.* and transformed *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 4(2): 172-176.
12. Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T., and Banat, I. 2010. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6): 617-627.
13. Ghayyomi Jazeh, M., Forghani, F., and Oh, D.H. 2012. Biosurfactan Production by *Bacillus sp.* isolated from petroleum contaminated soils of Sirri Island. *American Journal of Applied Sciences*, 9(1):1-6.
14. Haba, E, Espuny, M.J, Busquets, M., and Manresa, A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 379-387.
15. Harrigan, W.F., and Mc Cance, M.E. 1976. *Laboratory methods in foods and microbiology* Academic press.
16. Ilori, M., Amobi, C., and Odocha, A. 2005. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas sp.* isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, 61(7): 985-992.
17. Jain, D., Lee, H., and Trevors, J. 1992. Effect of Addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *Journal of Industrial Microbiology*, 10: 87-93.
18. Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai, A. 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99(1): 195-199.
19. Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., and Kokare, C. 2012. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis sp.* B4. *Desalination*, 285; 198-204.

20. Lin, S. 1996. Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 66(2): 109-120.
21. Lotfabad, T., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A., Adelzadeh, M., and Noghabi, K. 2009. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69(2): 183-193.
22. Lotfabad, T., Partoei, M., and Bahmani, M. 2012. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 by processing waste of plant oil. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 2(9): 91-99.
23. Maneerat, S., and Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 29(3): 781-791.
24. Morikawa, M., Hirata, Y., and Imanaka, T. 2000. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3): 211-218.
25. Nasr, S, Soudi, MR., and Mehrnia, M.R. 2009. Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus spp.* isolated from petroleum contaminated soil. *Iranian Journal of Microbiology*, 1(2): 54-61.
26. Nawawi, W.M.F.W., Jamal, P., and Alam, M.Z. 2010. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology*, 101(23): 9241-9247.
27. Nitschke, M., Costa, S.G., Haddad, R., Gonçalves, L.A., Eberlin, M.N., and Contiero, J. 2005. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1. *Biotechnology Progress*, 21:1562-1566.
28. Nitschke, M., Ferraz, C., and Pastore, G. 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agro industrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1-2): 81-85.
29. Onbasli, D., and Aslim, B. 2009. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* sp. *Journal of Environmental Biology*, 92: 161-163.
30. Plaza, G., Zjawiony, I., and Banat, I. 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 50(1): 71-77.
31. Prabhu, Y., and Phale, P. 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(4): 342-351.

32. Raza, Z., Khan, M., and Khalid, Z. 2007. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. *Process Biochemistry*, 42(4): 686-692.
33. Raza, Z.A., Khan, M.S., Khalid, Z.M., and Rehman, A. 2006. Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. *Biotechnology Letters*. 28, 1623–1631.
34. Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 29–33.
35. Sen, R. 2010. *Biosurfactants* (1st Ed.). New York, N.Y. Springer Science Business Media.
36. Tao, X., Lu, G., Dang, Z., Yi, X., and Yang, C. 2007. Isolation of phenanthrene-degrading bacteria and characterization of phenanthrene metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5): 647-654.
37. Varjani, S.J, Rana, D.P, Bateja, S., Sharma M.C., and Upasani, V.N. 2014. Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. *International journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(2): 9205-9213.
38. Viramontes-Ramos, S., Portillo-Ruiz, M., Ballinas-Casarrubias, M., Torres-Muoz, J., Rivera-Chavira, B., and Nevrez-Moorilln, G. 2010. Selection of biosurfactant/bioemulsifier production Bactria from hydrocarbon contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 668-675.
39. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
40. Youssef, N., Duncan, K., Nagle, D., Savage, K., Knapp, R., and McInerney, M. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3): 339-347.
41. Zhang, X., Xu, D., and Zhu, C., Lundaa, T., and Scherr, K. 2012. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*, 209: 138-146.
42. Zhang, Y., and Miller, R. 1994. Effect of a *Pseudomonas rhamnolipides* biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2101–2106.