

تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *Pseudomonas putida* 1694 در منابع مختلف کربن

محبوبه ورناصری قندعلی^۱، عبدالامیر معزی^{۲*}، نعیمه عنایتی ضمیر^۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۴/۱۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۳- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: moezzi251@gmail.com

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات فعال سطحی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. در این مطالعه تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *Pseudomonas putida* 1694 در منابع مختلف کربن (نفت سفید، گلوکز و ملاس نیشکر) تحت تأثیر دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس و زمان گرماگذاری ۴۸ و ۱۶۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور تشخیص تولید بیوسورفکتانت از روش‌های کمی و کیفی غربالگری مانند، آزمون همولیز، آزمون فروپاشی، پراکنش نفت، درصد امولسیون‌کنندگی، کاهش کشش سطحی و آبگریزی سطح سلول استفاده شد. نتایج نشان داد *P.putida* 1694 توانایی رشد در هر سه منبع کربن را دارد. بر اساس نتایج غربالگری تولید بیوسورفکتانت، سویه به‌کار رفته در این پژوهش دارای همولیز مثبت یا β در محیط آگار خون‌دار بود. ترکیبات تولید شده توسط باکتری *P.putida* 1694 در تمام منابع کربن در زمان‌ها و دماهای اعمال شده به‌تدریج کاهش یافتند، همچنین نتایج نشان داد این باکتری بیشترین کاهش کشش سطحی را در منبع کربن نفت سفید پس از ۱۶۸ ساعت و در دمای گرماگذاری ۳۷ درجه سلسیوس داشت و توانست کشش سطحی آن را تا ۲۰/۳۳ میلی‌نیوتون بر متر کاهش دهد. بیشترین درصد امولسیون‌کنندگی در منبع کربن ملاس (۲۸ درصد) به‌دست آمد. همچنین بیشینه درصد آبگریزی سطح سلول به منبع کربن نفت سفید (۷۰ درصد) اختصاص داشت. میزان بیوسورفکتانت تولید شده در منابع کربن نفت سفید، گلوکز و ملاس به‌ترتیب ۱۰/۲، ۱/۷ و ۵/۵ گرم بر لیتر بود. با توجه به تولید بیشتر بیوسورفکتانت در حضور نفت سفید، به‌نظر می‌رسد از این باکتری برای پالایش خاک‌های آلوده به نفت می‌توان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، کشش سطحی، منبع کربن، نفت سفید

Biosurfactant Production by *Pseudomonas putida*1694 in Various Carbon Sources

M Varnaseri Ghand Ali ¹, A Moezzi ^{2,*}, N Enayatizamir ³

Received: 8 December 2015 Accepted: 3 July 2016

1. M.Sc. Graduate, Dept., of Soil Sci., Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

2. Assoc. Prof., Dept., of Soil Sci., Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

3. Assist. Prof., Dept., of Soil Sci., Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

*Corresponding Author, Email: moezzi251@gmail.com

Abstract

Bio-surfactants as surface active compounds are produced by microorganisms. In this study bio-surfactant production by *Pseudomonas putida*1694 were evaluated in different carbon sources (kerosene, sugar cane molasses and glucose) at 30 and 37 °C within the incubation periods of 48 and 168 hours. For screening bio-surfactant production, hemolysis, and oil collapse and emulsification index, surface tension reduction and cell surface hydrophobicity tests were done. Results showed that *P. putida*1694 was able to grow in all carbon sources. Based on bio-surfactant production, this strain had a positive or β hemolysis on blood agar medium. The Compounds produced by this strain in each of carbon sources at both temperatures and incubation periods collapsed down. The maximum surface tension reduction was recorded in the samples containing kerosene as carbon source incubated at 37 °C for 168 hours, in which bacterium reduced surface tension to 20.33 mNm⁻¹. The maximum emulsifying and cell hydrophobicity were recorded in molasses (28%) and kerosene (70%) respectively. Bio-surfactant production amounts by *P. putida*1694 in kerosene, glucose and molasses as carbon sources were 10.2, 1.7 and 5.5 g L⁻¹, respectively. Due to higher production of bio-surfactant in the presence of kerosene, it seems that the bacteria can be used for refining oil-contaminated soils.

Keywords: Biosurfactant, Carbon source, Kerosene, Surface tension

مقدمه

مختلفی اعم از صنایع شیمیایی، صنعت نفت و پتروشیمی، پلاستیکها و مواد کامپوزیتی، شویندهها (دترجنتها) و پاک کنندهها، محصولات آرایشی، صنعت نساجی، صنعت معدن، صنایع غذا و بسته بندی غذایی، مواد دارویی، تحقیقات پزشکی و غیره هستند (میرس ۲۰۰۶، سینگ و همکاران ۲۰۰۷)؛ اما تولید بیوسورفکتانتها با وجود کاربردهای فراوانی که در صنایع مختلف دارند و نیز برخورداری از مزایایی نظیر سازگاری با طبیعت، قابلیت تجزیه پذیری به صورت

بیوسورفکتانتها از ترکیباتی هستند که عمدتاً توسط میکروارگانیسمهای هوازی رشد یافته در محیطهای آبی حاوی منابع مختلف کربن مانند کربوهیدراتها، هیدروکربنها، روغن و دیگر چربیها و یا مخلوطی از آنها تولید می شوند (ژانگ و همکاران ۲۰۱۲). بیوسورفکتانتها به جهت تواناییهایی نظیر کاهش کشش سطحی و کشش بین سطحی یا قدرت امولسیون کنندگی، دارای پتانسیل استفاده در حوزههای

گلوکز (جوشی و همکاران ۲۰۱۳)، پوست میوه پرتقال (جورج و همکاران ۲۰۰۸)، روغن زیتون (خوپد و همکاران ۲۰۱۲) استفاده شده است. اما همچنان انتخاب بستر مناسب به منظور رشد بهینه میکروارگانیسم‌ها و بیشترین تولید بیوسورفکتانت توجه محققان را جلب نموده است. جاین و همکاران (۲۰۱۳) تولید بیوسورفکتانت توسط یکی از سویه‌های باکتری *klebsiella* را با استفاده از ذرت مطالعه نموده و بیشینه تولید بیوسورفکتانت را ۱۵/۴۰ گرم بر لیتر گزارش کردند. آبالوس و همکاران (۲۰۰۱) بیشینه تولید بیوسورفکتانت رامنولیبیدی توسط *Pseudomonas aeruginosa* AT۱۰ را از پسماند تصفیه روغن سویا را ۹/۵ گرم بر لیتر گزارش نمودند. هابا و همکاران (۲۰۰۰)، بیشینه تولید بیوسورفکتانت رامنولیبیدی از مخلوط پسماند روغن سرخ‌کردنی آفتابگردان و زیتون توسط سویه *Pseudomonas aeruginosa* را ۲/۷ گرم بر لیتر اعلام کردند. نیتسچاک و همکاران (۲۰۰۵) مقدار تولید بیوسورفکتانت رامنولیبیدی از پسماند روغن سویا توسط سویه *Pseudomonas aeruginosa* LBI را ۱۱/۷۲ گرم بر لیتر گزارش کردند. این پژوهش به منظور بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت و انتخاب بهترین منبع کربن برای تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *P. putida* 1694 انجام شد.

مواد و روش‌ها

باکتری مورد استفاده در این پژوهش *P. putida* 1694 می‌باشد که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. تولید بیوسورفکتانت در محیط ¹MSM حاوی منابع مختلف کربن

از کشت شبانه باکتری *P. putida* 1694 در محیط مایع مغذی^۲، به میزان ۵ درصد حجمی (۳×۱۰^۸cfu/ml) به ارلن های جداگانه حاوی محیط کشت نمک معدنی با منابع مختلف کربن شامل ۱/۲ درصد (وزنی/حجمی) گلوکز، ۲ درصد (وزنی/حجمی) نفت سفید و ۵ درصد (وزنی/حجمی) ملاس و

طبیعی، سمیت پایین، عملکرد اختصاصی، کف‌کنندگی و فعالیت بالا تحت شرایط سخت دما، فشار و اسمولاریتی بالا هنوز به میزان انبوه و گسترده و صنعتی در نیامده است (کریستوفی و ایوشین ۲۰۰۲، گواتام و تایگی ۲۰۰۶). عمده‌ترین عامل بازدارنده، بحث اقتصادی موضوع است، چرا که هم اکنون بالا بودن هزینه‌ها و قیمت تمام‌شده برای تولید این محصول در حدی است که در بسیاری از صنایع بزرگ نظیر نفت، شیمی و پتروشیمی، جایگزین کردن بیوسورفکتانت بجای سورفکتانت‌ها و امولسیفایرهای سنتزی مورد استفاده کنونی، توجیه اقتصادی ندارد. از این رو یکی از استراتژی‌هایی که انتظار می‌رود این مشکل را به نوعی تخفیف دهد، استفاده از سوبستراهای تجدیدپذیر طبیعی، مواد پسماند و ضایعات صناعی است که قابل استفاده برای تولید بیوسورفکتانت باشند (ماکار و همکاران ۲۰۱۱، طواسی ۲۰۱۱). زاجیک و گروسون (۱۹۹۰) نشان دادند که افزودن مواد غذایی تکمیلی به محیط رشد *Corynebacterium lepus* منجر به افزایش تولید بیوسورفکتانت توسط این باکتری می‌شود. این مسئله بیان‌کننده این مهم است که با بهینه‌سازی محیط کشت، امکان فراهم ساختن شرایط مناسب‌تر برای ترشح بیوسورفکتانت وجود دارد (فرانسی ۱۹۹۱، جاین ۱۹۹۲). از بررسی تحقیقات به عمل آمده چنین برمی‌آید که چند سویه از *Pseudomonas* ها یافت شده‌اند که قادرند مواد فعال سطحی (بیوسورفکتانت) تولید کنند. بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط *Pseudomonas* ها از نوع گلیکولیبیدها هستند. ویژگی‌های شیمیایی این ماکرو مولکول‌ها زمانی که *Pseudomonas* ها روی منابع کربن هیدروفوبیک یا لیپوفیلیک رشد می‌کند باعث شده آن‌ها را به رامنولیبیدها نسبت دهند (راشدی ۱۳۸۵). امروزه بیوسورفکتانت‌ها با استفاده از مواد زائد حاصل از فرآیندهای مختلف به عنوان منبع کربن تولید می‌گردند. برای تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها از بسترهایی مانند نفت خام (ایبراهیم و همکاران ۲۰۱۳)،

¹ Mineral salts medium

² Nutrient broth

نباشد، هیچ همولیزی در آگار خون دار رخ نداده است و اکنش همولیز گاما است (وارجانی و همکاران ۲۰۱۴).

آزمون پراکنش نفت

این آزمون طبق روش موریکاوا و همکاران (۲۰۰۰) همراه با تغییر جزئی انجام گرفت، بدین منظور ابتدا مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون پلیت‌های ۱۵ سانتی‌متری ریخته، سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به مرکز پلیت اضافه شد. پس از به تعادل رسیدن نفت در سطح آب، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ بر روی لایه نفتی ایجاد شده ریخته شد. چنانچه محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ حاوی بیوسورفکتانت باشد، قادر خواهد بود لایه نفتی را کنار بزند و در سطح آب ناحیه شفاف ایجاد کند. در این آزمون از Tween 20 (۲ درصد) به‌عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت MSM همراه با منبع کربن به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد (آناندراج و تیواکاران ۲۰۱۰). در این آزمون اگر قطر دایره شفاف ایجاد شده توسط عصاره حاصل از سانتریفیوژ کمتر از ۱۰ میلی‌متر باشد با علامت + و اگر بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر باشد به‌ترتیب با ++ و +++ نشان داده می‌شود (نصر و همکاران ۲۰۰۹).

آزمون فروپاشی نفت^۱

در این آزمون ۲۰ میکرولیتر از روشناور هر نمونه به درون پلیت الیزا حاوی ۱۰۰ میکرولیتر پارافین اضافه شد. از سورفکتانت شیمیایی (Tween 20) به‌عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت نمک معدنی (MSM) همراه با منبع کربن به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. در صورت تشکیل قطره کروی در سطح پارافین امتیاز منفی به چاهک و در صورتی که قطره اضافه‌شده به ته چاهک منقل گردید یا از حالت کروی خارج شود امتیاز مثبت می‌گیرد (مانیرات و فترونگ ۲۰۰۷). در این آزمون علامت + برای نمایش قطره‌هایی که قطر کمتر از ۰/۶

درصد (وزنی/حجمی) سولفات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن، تلقیح شد. ترکیبات محیط کشت نمک معدنی شامل ۵ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات (شامل $8/5 \text{ g L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، $21/75 \text{ g L}^{-1}$ KH_2PO_4 ، $33/4 \text{ g L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، $5/0 \text{ g L}^{-1}$ NH_4Cl ، $12 \text{H}_2\text{O}$ Na_2HPO_4)، ۳ میلی‌لیتر از محلول ($22/5 \text{ g L}^{-1}$) MgSO_4 ، یک میلی‌لیتر از محلول ($0/25 \text{ L}^{-1}$) FeCl_3 ، یک میلی‌لیتر از محلول ($37/4 \text{ g L}^{-1}$) CaCl_2 و یک میلی‌لیتر از محلول عناصر کم مصرف (شامل 1 mg L^{-1} $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، $39/9 \text{ mg L}^{-1}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، $34/7 \text{ mg L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، $42/8 \text{ mg L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) در لیتر بود (تائو و همکاران ۲۰۰۷). مقدار pH محیط بر روی ۷ تنظیم شد. در مجموع ۳۶ ارلن (هر منبع کربن در سه تکرار آزمایش شد) در دو دوره زمانی دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور بر دقیقه به مدت ۴۸ و ۱۶۸ ساعت گرماگذاری شدند. پس از اتمام گرماگذاری، به منظور جداسازی باکتری و ذرات معلق محیط کشت با دور ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. روشناور به‌دست آمده برای انجام آزمون‌های سنجش تولید بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت (بابو و همکاران ۱۹۹۶).

غربال‌گری و روش‌های تشخیص تولید بیوسورفکتانت

آزمون همولیز

باکتری بر روی محیط کشت آگار خون‌دار (بلاد آگار) دارای ۵ درصد (v/v) خون گوسفند، کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. فعالیت همولیتیک با حضور منطقه شفاف (هاله) اطراف کلونی‌های باکتریایی شناسایی شد (بیبا و همکاران ۱۹۹۹). به‌طور کلی واکنش همولیتیک با توجه به ظاهر منطقه اطراف کلنی با آلفا، بتا و گاما در محیط آگار خون‌دار مشخص می‌شود. همولیز آلفا زمانی است که محیط اطراف کلنی به‌صورت یک منطقه سبز رنگ و همولیز بتا به‌صورت یک منطقه روشن در اطراف کلنی باکتریایی در آگار خون‌دار به‌نظر می‌رسد. در صورتی که هیچ تغییری در محیط اطراف کلنی

¹ Drop collapsing

در این فرمول $r = \text{شعاع لوله موئین (cm)}$ ، $h = \text{ارتفاع صعود مایع (cm)}$ ، $\delta = \text{چگالی مایع (g cm}^{-3}\text{)}$ ، $g = \text{شتاب ثقل (cm s}^{-2}\text{)}$ و $\gamma = \text{کشش سطحی (mN m}^{-1}\text{)}$ است.

آزمون آب‌گریزی سطح سلول

نسبت آب‌گریزی سلول‌های باکتریایی *P. putida* 1694 از روش BATH² طبق روش روزنبرگ و همکاران (۱۹۸۰) و ژانگ و میلر (۱۹۹۴) انجام شد. بدین منظور، سلول‌های باکتریایی رشد یافته در محیط کشت MSM با منابع کربن مختلف، در ۷۰۰۰ rpm به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شده و به منظور حذف هرگونه باقی‌مانده محیط کشت و مواد پلیمری خارج سلولی سه بار در محلول نمکی بافر حاوی (ترکیبات (گرم بر لیتر): دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات: ۱۹/۷، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات: ۷/۲۶، اوره: ۱/۸، سولفات منیزیم ۷ آب: ۰/۲) با $\text{pH}=7$ شسته شدند. سپس سلول‌ها در این محلول به حالت سوسپانسیون درآمد تا حدی که چگالی نوری اولیه سوسپانسیون (A_0) به یک برسد. چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Apel (PD-303 UV) قرائت شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر هگزادکان به ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه و به مدت ۲ دقیقه با دور بالا ورتکس شد. پس از ۱۰ دقیقه، چگالی نوری فاز آبی اندازه‌گیری شد (A_1). میزان آب‌گریزی از معادله ۲ محاسبه شد. این آزمایش در سه تکرار انجام و نتایج بصورت طرح آزمایشی کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شد.

[۲]

$$\text{درصد آب گریزی سطح سلول} = \left[1 - \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \right] \times 100$$

جداسازی بیوسورفکتانت تولید شده

برای جداسازی بیوسورفکتانت، روشناور به- دست آمده از سانتریفیوژ توسط اسید کلریدریک ۶ نرمال تا $\text{pH}=2$ اسیدی گردید، سپس به مدت یک شبانه

میلی‌متر و علامت ++ برای قطره‌هایی که قطر بیشتر از ۰/۶ میلی‌متر داشتند بکار برده شد (ناوای و همکاران ۲۰۱۰).

اندازه‌گیری فعالیت امولسیون‌کنندگی

برای بررسی فعالیت امولسیون‌کنندگی از آزمون E24^۱ استفاده شد. برای انجام این آزمون، ۲ میلی‌لیتر از هر نمونه به دست آمده از سانتریفیوژ، درون لوله‌های آزمایش جداگانه ریخته شد و مقدار ۲ میلی‌لیتر نفت سفید نیز به هر کدام اضافه گردید. سپس به مدت ۲ دقیقه تحت ورتکس شدید قرار گرفتند و پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یک محیط ساکن قرار داده شدند. بعد از گذشت این زمان، ارتفاع امولسیون باقیمانده درون هر لوله آزمایش اندازه‌گیری شد و نسبت ارتفاع این امولسیون به ارتفاع کل مایع درون لوله آزمایش، به عنوان شاخص امولسیون‌کنندگی نمونه گزارش گردید (کوپر و گلدن برگ ۱۹۸۷). در این آزمایش از Tween 20 (۲ درصد) به عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت MSM همراه با منبع کربن به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

اندازه‌گیری کشش سطحی

کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهم‌ترین اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت محسوب می‌شود. به این منظور ۵ میلی‌لیتر از روشناور هر نمونه به لوله آزمایشی که در حمام آب در درجه حرارت ۲۸ درجه سلسیوس قرار داشت اضافه گردید. لوله موئین (با شعاع ۰/۵ و ارتفاع ۷۵ میلی‌متر) درون لوله آزمایش قرار گرفت و کشش سطحی به وسیله اندازه‌گیری ارتفاع صعود مایع در لوله موئین با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (راموس و همکاران ۲۰۱۰).

$$\gamma = \frac{rh\delta g}{2} \quad [1]$$

² Bacterial adhesion to hydrocarbon

¹ Emulsification index

نتایج و بحث

غربالگری تولید بیوسورفکتانت

آزمون همولیز

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که سویه بکار رفته در این پژوهش دارای همولیز مثبت یا β بود. در مطالعاتی که توسط برنهمایر و آویگاد (۱۹۷۰) صورت گرفت از همولیز بتا در محیط بلاد آگار به عنوان معیار تولید بیوسورفکتانت استفاده شد.

اثر منابع مختلف کربن بر پراکنش نفت

در این آزمون، نفت اضافه شده در سطح آب مقطر دایره‌ای به قطر ۱۰ سانتی‌متر تشکیل داد که با افزودن محلول حاصل از سانتریفیوژ باکتری در منابع مختلف کربن به صورت جداگانه، ناحیه شفاف در سطح لایه نفتی ایجاد شد. این پدیده نشان‌دهنده حضور ترکیبات دوگانه دوست بیوسورفکتانت در محیط کشت باکتری *P. putida* 1694 در سه منبع کربن است اما با توجه به ایجاد نواحی شفاف با قطر بیشتر در برخی از نمونه‌ها مشخص شد فعالیت بیوسورفکتانت تولیدشده در برخی منابع کربن بیشتر است (جدول ۱).

روز در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. رسوب حاصل، توسط سانتریفیوژ با دور ۸۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری و پس از آن ۱۰ میلی لیتر محلول حاوی کلروفرم و متانول که شامل ۲ حجم کلروفرم و یک حجم متانول بود به آن اضافه و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰ دور بر دقیقه تکان داده شد. محتویات درون ظرف با دور ۸۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده، حلال آن با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تبخیر و رسوب باقی مانده بوسیله ترازو وزن گردید (چاندر و همکاران ۲۰۱۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل منبع کربن (نفت سفید، ملاس نیشکر و گلوکز)، دمای گرماگذاری (۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس) و زمان گرماگذاری (۴۸ و ۱۶۸ ساعت) هر کدام در ۳ تکرار بودند.

جدول ۱- نتایج آزمون پراکنش نفت توسط باکتری *Pseudomonas putida* 1694.

زمان و دمای آزمایش				
منبع کربن	۴۸ ساعت، ۳۷°C	۱۶۸ ساعت، ۳۷°C	۴۸ ساعت، ۳۰°C	۱۶۸ ساعت، ۳۰°C
گلوکز	+	++	+	+
نفت سفید	+++	+++	++	++
ملاس	++	+++	+	++
توفین ۲۰	+++	+++	+++	+++
آب مقطر	-	-	-	-

+ نواحی با قطر کمتر از ۱ cm، ++ نواحی با قطر ۱-۲ cm و +++ نواحی با قطر بیش از ۲ cm.

حاصل از سانتریفیوژ باکتری در منابع کربن نفت سفید و ملاس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و زمان گرماگذاری ۱۶۸ ساعت، دایره‌های با قطر بیش از ۲ سانتی‌متر در سطح نفت خام ایجاد کرد. سات‌پیوت و همکاران (۲۰۰۸) و والتر و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد با افزایش دما از ۳۰ به ۳۷ درجه سلسیوس و همچنین افزایش زمان از ۴۸ به ۱۶۸ ساعت قطر دایره ایجاد شده افزایش یافت که نشان‌دهنده تولید بیشتر بیوسورفکتانت است. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش محلول

حالیست که شاهد منفی (آب مقطر) به صورت قطره کروی در سطح چاهک باقی ماند. مشاهدات نشان داد با افزایش دما و زمان گرماگذاری از ۳۰ به ۳۷ درجه سلسیوس و از ۴۸ به ۱۶۸ ساعت سرعت سقوط و قطر قطره محلول حاصل از سانتریفیوژ در منبع کربن نفت سفید بیشتر بود (جدول ۲). جاین و همکاران (۱۹۹۱) از این روش به عنوان یک روش کیفی سریع برای تایید تولید بیوسورفکتانت استفاده کردند. پاویترن و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند رابطه مستقیمی بین قطر نمونه و غلظت بیوسورفکتانت وجود دارد، غلظت کم بیوسورفکتانت با توجه به آبریز بودن نفت باعث باقی ماندن قطره و تجمع آن روی سطح می شود. این روش به غلظت های کم بیوسورفکتانت حساس نیست.

تاثیر تیمارهای مختلف بر شاخص امولسیون کنندگی

نتایج تجزیه واریانس داده ها (جدول ۳) نشان داد اثر هریک از تیمارهای دما، زمان، منبع کربن و اثر متقابل آنها بر شاخص امولسیون کنندگی *P. putida* 1694 در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار است.

روش پراکنش نفت یک روش سریع و بسیار حساس برای تشخیص ترکیبات فعال سطحی است. موریکاوا و همکاران (۲۰۰۰) این روش را برای مقایسه فعالیت شکل های حلقوی و خطی سورفکتین و آرتروفکتین استفاده کردند و بیان کردند قطر ناحیه شفاف ایجاد شده رابطه مستقیمی با غلظت بیوسورفکتانت موجود در محیط دارد.

آزمون فروپاشی نفت

در آزمون فروپاشی نفت، قطره ای که حاوی بیوسورفکتانت می باشد در سطح نفت منهدم و پخش می گردد. این روش ساده بوده و برای غربالگری همزمان تعداد زیادی سویه استفاده می شود (یوسف و همکاران ۲۰۰۴). نتایج حاصل از این آزمون نشان داد متابولیت های تولید شده توسط باکتری *P. putida* 1694 در تمام منابع کربن در زمان ها و دماهای اعمال شده قادر بودند به ته چاهک سقوط کند که بیانگر تولید بیوسورفکتانت بود. همچنین شاهد مثبت (توئین ۲۰) به سرعت به ته چاهک سقوط کرد و منهدم گردید این در

جدول ۲- نتایج آزمون فروپاشی نفت توسط باکتری *P. putida* 1694

زمان و دمای آزمایش				منبع کربن
۳۰°C، ساعت، ۱۶۸	۳۰°C، ساعت، ۴۸	۳۷°C، ساعت، ۱۶۸	۳۷°C، ساعت، ۴۸	
+	+	+	+	گلوکز
+	+	++	+	نفت سفید
+	+	+	+	ملاس
+++	+++	+++	+++	توئین ۲۰
-	-	-	-	آب مقطر

+ نواحی فروریخته با قطر کمتر از ۰/۶ cm، ++ نواحی فروریخته با قطر ۰/۶-۱ cm

۴۸ به ۱۶۸ ساعت، شاخص امولسیون کنندگی افزایش معنی داری را در هر سه منبع کربن نشان داد، که این نتیجه با نتایج سایر آزمون های تایید کننده تولید بیوسورفکتانت در این پژوهش مطابقت داشت. بیشترین درصد امولسیون کنندگی (۲۸ درصد) به منبع کربن ملاس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و زمان گرماگذاری ۱۶۸

شاخص امولسیون کنندگی 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. مقایسه میانگین داده ها (شکل ۱) برای این باکتری نشان داد با افزایش دما از ۳۰ به ۳۷ درجه سلسیوس و زمان گرماگذاری از

PTCC1969 را مورد بررسی قرار دادند آنها از شاخص امولسیون‌کنندگی به‌عنوان روش غربال‌گری تولید بیوسورفکتانت استفاده نموده و عنوان کردند بیشینه درصد امولسیون‌کنندگی با ۶۴/۴ درصد به منبع کربن سیکلوهگزان اختصاص دارد که توانست نفت خام را به خوبی امولسیون کند. بانات (۱۹۹۵) و مایر و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند بیوسورفکتانتی که بتواند نفت خام را امولسیون کند می‌تواند در پاک‌سازی آلودگی‌های هیدروکربنی کاربرد داشته باشد و دسترسی به هیدروکربن‌های مقاوم را افزایش دهد.

ساعت اختصاص داشت، که این مقدار نسبت به درصد امولسیون‌کنندگی سایر منابع کربن اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد نشان داد. به‌طورکلی تفاوت بین سه منبع کربن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت معنی‌دار بود در حالی‌که با توجه به شکل‌آیین منابع مختلف کربن در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در هر دو زمان ۴۸ و ۱۶۸ ساعت این اختلاف معنی‌دار نبود. قوجاوند و همکاران (۲۰۰۸) تولید بیوسورفکتانت را در منابع مختلف کربن شامل π -هگزان، π -هپتان، سیکلوهگزان و π -نونان توسط باکتری *Bacillus subtilis*

جدول ۳- میانگین مربعات منبع کربن، دما، زمان و اثرات متقابل آنها بر درصد امولسیون‌کنندگی و کشش سطحی باکتری *P. putida* 1694

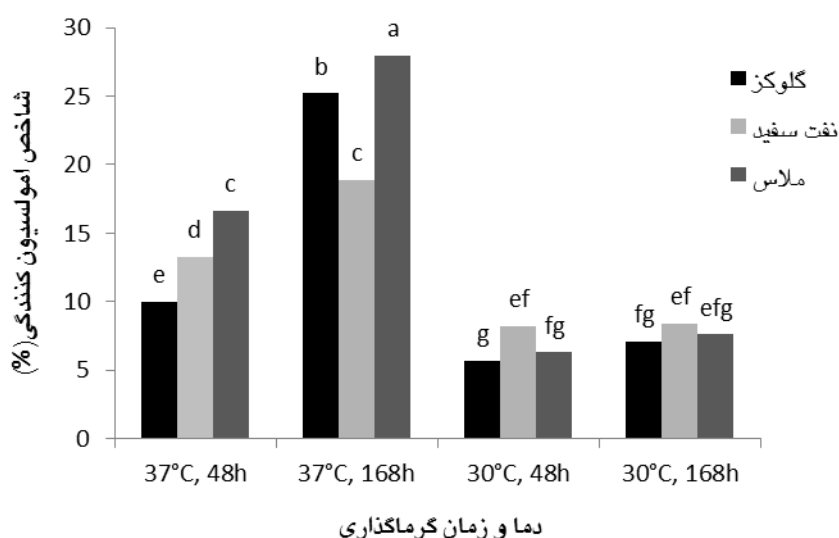
منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	شاخص امولسیون‌کنندگی	کشش سطحی
منبع کربن	۲	۲۵/۹۴ **	۴۱/۲۶ **
دما	۱	۱۱۸۱/۹۸ **	۵۳۷/۰۷ **
زمان	۱	۳۰۶/۶۰ **	۱۷۴/۲۸ **
کربن*دما	۲	۴۳/۳۰ **	۲/۴۷ **
کربن*زمان	۲	۲۲/۳۴ **	۴/۶۳ **
دما*زمان	۱	۲۱۳/۷۴ **	۱۳/۳۳ **
کربن*دما*زمان	۲	۱۳/۳۰ **	۱۰/۵۸ **
خطا	۲۴	۲/۱۰	۰/۰۲

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.

کشش سطحی می‌شود. با افزایش دما و زمان گرماگذاری به‌ترتیب از ۳۰ درجه سلسیوس و ۴۸ ساعت به ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۶۸ ساعت، کشش سطحی محیط‌های حاوی گلوکز، نفت سفید و ملاس به ترتیب از ۳۷/۱۲، ۳۲/۱۸ و ۳۵/۵۸ میلی نیوتون برمتر (mNm^{-1}) به ۲۶/۵۱، ۲۰/۳۳ و ۲۱/۶۶۳ میلی نیوتون بر متر کاهش یافت.

تاثیر تیمارهای مختلف بر کشش سطحی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر هر یک از تیمارهای دما، زمان، منبع کربن و اثر متقابل آنها بر کشش سطحی باکتری *P. putida* 1694 در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر کشش سطحی باکتری *P. putida* 1694 در منابع مختلف کربن نشان داد که افزایش دما و زمان به‌طور معنی‌داری باعث کاهش



شکل ۱- اثر متقابل دما و زمان گرماگذاری و منبع کربن بر شاخص امولسیون کنندگی *P. putida* 1694.

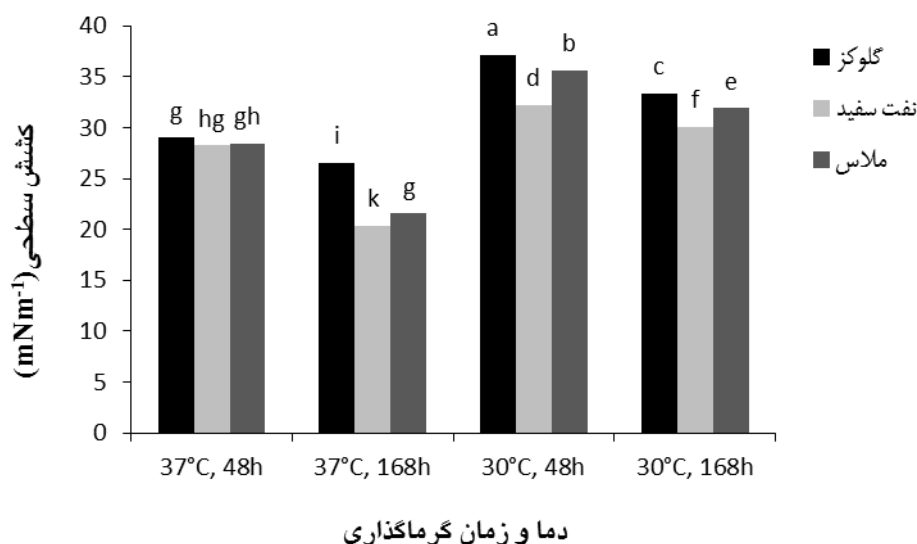
بنت (۱۹۹۷) توانایی کاهش کشش سطحی پایین تر از ۴۰ میلی نیوتون بر متر نشان دهنده قابلیت گونه مورد نظر به عنوان تولید کننده بیوسورفکتانت است. بررسی اثر دما بر تولید بیوسورفکتانت نشان داد کشش سطحی در محیط کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کاهش بیشتری می یابد. در واقع تولید بیوسورفکتانت کاملاً به دمای گرماگذاری وابسته است. بررسی اثر زمان بر تولید بیوسورفکتانت نیز نشان داد بیشترین کاهش کشش سطحی پس از ۱۶۸ ساعت دوره گرماگذاری حاصل می گردد. ایلوری و همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند بیشترین میزان تولید بیوسورفکتانت گلیکولپیدی توسط باکتری *Aeromonas* در محیط کشت حاوی نفت پس از ۸ روز ایجاد می گردد. دی سوسا و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند بیشینه تولید رامنولپید توسط سویه *Pseudomonas aeruginosa* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس می باشد. همچنین ابوسعود و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند افزایش دما از ۲۵ به ۵۰ درجه سلسیوس کشش سطحی را به صورت خطی کاهش می دهد ولی این افزایش دما هیچ تأثیری بر درصد امولسیون کنندگی نداشت. باقری و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند کاهش درجه حرارت از ۳۷ به ۳۰ و ۲۵ درجه سلسیوس منجر

منبع کربن نفت سفید پایین ترین و گلوکز بالاترین کاهش کشش سطحی را در تمام دماها و زمانها داشتند (شکل ۲). این نتیجه با نتایج سایر آزمونهای تایید تولید بیوسورفکتانت بجز امولسیون کنندگی مطابقت داشت. باقری و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی ارتباط بین فعالیت امولسیون کنندگی و کشش سطحی شانزده سویه باکتریایی اعلام داشتند تشابهی بین روند داده های حاصل از کشش سطحی و شاخص امولسیون کنندگی وجود ندارد. از طرفی در این پژوهش مشاهده شد میزان امولسیون کنندگی نمونه ها در هگزان نرمال و نفت خام کاملاً متفاوت است و میزان امولسیون کنندگی به ماده امولسیون شونده نیز بستگی دارد. برای اطمینان بیشتر از تولید بیوسورفکتانت و تعیین شرایط بهینه جهت تولید آن کشش سطحی نمونه ها را اندازه گیری کردند. کاهش کشش سطحی محیط رشد مهم ترین و اصلی ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت می باشد. براتی و واسودوان (۲۰۰۱) و امتیازی و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که اندازه گیری کشش سطحی می تواند نشان دهنده تولید بیوسورفکتانت و ویژگی مناسب سویه های میکروبی مورد بررسی در تجزیه هیدروکربن های نفتی باشد. طبق روش دسای و

شکل ۳) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین منابع کربن گلوکز، نفت سفید و ملاس از نظر آبگریزی سطح سلول باکتری است. درصد آبگریزی سطح سلول باکتری *P. putida* 1694 در منبع کربن نفت سفید، ملاس و گلوکز به ترتیب ۷۰، ۶۰ و ۵۶ درصد بود؛ که با نتایج دیگر آزمون‌های غربال‌گری تولید بیوسورفکتانت (با بیشترین کاهش کشش سطحی در منبع کربن نفت سفید) همخوانی داشت. از آنجایی‌که هیدروکربن‌ها ترکیبات غیرقطبی هستند، بنابراین میزان انحلال آنها در آب بسیار پایین است و در نتیجه قابلیت دسترسی باکتری به آنها به‌سختی خواهد بود.

به افزایش کشش سطحی محیط کشت (به ترتیب ۳۳ و ۴۵ میلی‌نیوتون بر متر) و کاهش سریع تولید بیوسورفکتانت می‌شود.

تأثیر تیمارهای مختلف بر آبگریزی سطح سلول باکتری تجزیه واریانس و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد (جدول ۴) اثر منبع کربن بر آبگریزی سطح سلول باکتری *P. putida* 1694 در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. نتایج نشان داد آبگریزی سطح سلول با توجه به منبع کربن در محیط کشت تغییر می‌کند؛ و شدیداً به خصوصیات منبع کربن وابسته است (کازوریک و همکاران ۲۰۱۲). مقایسه میانگین داده‌ها (

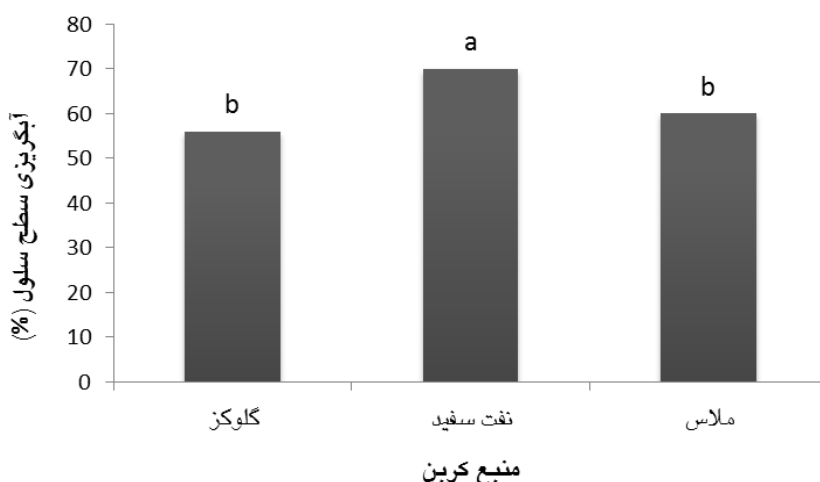


شکل ۲- اثر متقابل منبع کربن، دما و زمان بر کشش سطحی باکتری *P. putida* 1694

جدول ۴- میانگین مربعات اثر منابع مختلف کربن بر آبگریزی *P. putida* 1694

منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات
منبع کربن	۲	۱۵۶/۰۰ **
خطا	۶	۴/۷۵

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۳- اثر منابع کربن مختلف بر آبگریزی سطح سلول باکتری *P. putida* 1694

در یک درصد ملاس به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۹۶ ساعت گرماگذاری، ۴/۹۷ گرم بر لیتر گزارش کردند. وگا و همکاران (۲۰۰۷) تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *Candida ingens* در محیط معدنی حاوی ۲ درصد روغن ذرت به‌عنوان منبع کربن را به مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند بیشینه تولید بیوسورفکتانت (۴/۸ میلی-گرم بر لیتر) در روز هفتم بود. بنین‌کاسا و همکاران (۲۰۰۴) مقدار تولید بیوسورفکتانت رامنولپید توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* LBI را در پسماند تولید روغن آفتابگردان ۱۶ گرم بر لیتر گزارش کردند. استفاده از فناوری‌های سازگار با محیط زیست، یکی از رویکردهای نوین در صنایع مختلف می‌باشد و تحقیقات بسیار گسترده‌ای در کشورهای توسعه‌یافته و رو به توسعه دنیا، در این زمینه در حال انجام است. با توجه به مزایای عمده بیوسورفکتانت‌ها نسبت به سورفکتانت‌های سنتزی و کاربرد وسیع این ترکیبات در صنایع مهم و اهمیت بالای زیست‌محیطی، مطالعه و پژوهش در جهت دستیابی به سورفکتانت‌های زیستی قابل استفاده در صنعت و محیط در جهت کاهش هزینه و افزایش بهره‌وری از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. به‌طور متداول هیدروکربن‌ها به‌عنوان سوبسترا برای

باکتری‌ها برای اینکه بتوانند از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده بهتری نمایند باید قادر به وارد کردن میزان بیشتری از فاز آلی (غیرقطبی) به فاز آبی (قطبی) باشند. به همین منظور هرچه سطح سلول باکتری آب‌گریزتر باشد یا به عبارت دیگر آبگریزی سطح سلولی بیشتر باشد، تولید بیوسورفکتانت بیشتر می‌شود و می‌تواند میزان بیشتری از هیدروکربن‌ها را مورد استفاده قرار دهد. پروثی و کامپوترا (۱۹۹۷) دریافتند که رابطه مستقیمی بین آبگریزی و تولید بیوسورفکتانت وجود دارد.

مقدار تولید بیوسورفکتانت

مقدار بیوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری *P. putida* 1694 در منابع کربن گلوکز، نفت سفید و ملاس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و زمان گرماگذاری ۱۶۸ ساعت که دما و زمان بهینه تولید بیوسورفکتانت بود، جداسازی و اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد مقدار بیوسورفکتانت تولید شده در منبع کربن نفت سفید با ۱۰/۲ گرم بر لیتر نسبت به منبع گلوکز (۱/۷ گرم بر لیتر) و ملاس (۶/۵ گرم بر لیتر) بالاتر بود که بیشترین کاهش کشش سطحی نیز مربوط به منبع کربن نفت سفید بود. آپارنا و همکاران (۲۰۱۲)، بیشینه تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری *Pseudomonas SP.2B* را

منبع کربن برای تولید بیوسورفکتانت به وسیله *P. putida* 1694 نفت سفید بود. به دلیل کاهش قابل توجه کشش سطحی در محیط حاوی نفت سفید توسط *P. putida* 1694 می‌توان قابلیت استفاده از این باکتری را برای پالایش مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی و فن-آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ فراهم نمودن اعتبار پژوهشی این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تولید بیوسورفکتانت‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اضافه کردن هیدروکربن به محیط کشت تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری را افزایش می‌دهد. در پژوهش حاضر نیز نفت سفید و ملاس نیشکر به‌عنوان منابع عمده موجود در کشور به منظور تولید بیوسورفکتانت استفاده شد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد با افزایش دما و زمان گرماگذاری به ترتیب از ۳۰ به ۳۸ درجه سلسیوس و ۴۸ به ۱۶۸ ساعت، بر اساس نتایج آزمون‌ها تولید بیوسورفکتانت افزایش می‌یابد. همچنین بهترین

منابع مورد استفاده

- باقری لطف آباد ط، پرتوی م و بهمنی م، ۱۳۹۱. تولید بیوسورفکتانت رامنولپیدی توسط *Sordomonas آئروجینوزا* MR01 از ضایعات فرآوری روغن گیاهی. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، جلد ۲، شماره ۹، صفحه‌های ۹۱ تا ۹۹.
- راشدی ح، ۱۳۸۵. بررسی تولید رامنولپید توسط میکروارگانیسم *Sordomonas آئروجینوزا* جدا شده از مخازن نفتی. نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، جلد ۲۵، شماره ۱، صفحه‌های ۱۷ تا ۲۵.
- Abalos A, Pinazo A, Infante MR, 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.
- Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, Boudergua S, and Nabi A, 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination* 223: 143-151.
- 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.
- Aparna A, Srinikethan G and Smith H, 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 95: 23-29.
- Babu P S, Vaidya A N, Bai A S and Kapur R, 1996. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotechnology Letters* 18(3): 263-268.
- Bagheri L, Shourian M, Rootaazad R, Rouholamini NA, Adelzadeh AR, and Noghbi 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: 183-193.
- Banat IM, 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology* 51(1): 1-12.
- 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.
- Benincasa M, Abalos A, Oliveira I and Manresa A, 2004. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 85(1): 1-8.
- Bernheimer AW and Avigad LS, 1970. Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *General Microbiology Journal* 61(3): 361-369.
- Bicca FC, Fleck LC and Ayub MAZ, 1999. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia* 30(3): 231-236.
- Christofi N and Ivshina I, 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology* 93(6): 915-929.
- Chander CR, Lohitnath T, Kumar DJ and Kalaichelvan PT, 2012. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC 441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food biopreservative. *Advances in Applied Science Research* 3(3): 1827-1831.

- Cooper DG and Goldenberg BG, 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 53(2): 224-229.
- deSousa j, Correia J, Almeida J, Sueli Rodrigues S, Pessoa O, Melod V and Goncalves L, 2011. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P.aeruginosa* MSIC02. *Process Biochemistry* 46: 1831-1839.
- Desai JD and Banat IM, 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(1): 47-64.
- 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.
- Francy DS, Thomas, JM, Raymond, RL and Ward CH, 1991. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology* 8 (4): 237-246.
- Gautam K and Tyagi V, 2006. Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science* 55:155-166.
- Ghojavand H, Vahabzadeh F, Roayaei E and Shahraki A K, 2008. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). *Journal of Colloid and Interface Science* 324(1-2): 172-176.
- George S and Jayachandran K, 2008. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. *Applied Biochemistry Biotechnology* 158(3): 694-705.
- Haba E, Espuny MJ, 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.
- Ibrahim ML, Ijah UJJ, Manga SB, Bilbis LS and Umar S, 2013. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 81: 28-34.
- Ilori MO, Amobi CJ and Odocha AC, 2005. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp.* isolated from a tropical environment. *Chemosphere* 61(7): 985-92.
- Jain DK, 1992. Effect of addition of *P.aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *Journal of Industrial Microbiology* 10(2): 87-93.
- Jain DK, Collins-Thompson DL, Lee H and Trevors JT, 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 13(4): 271-279.
- Jain RM, Mody K, Joshi N, Mishra A and Jha B, 2013. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 52-58.
- Joshi SJ, Geetha SJ, Yadav S and Desai AJ, 2013. Optimization of bench-Scale production of biosurfactant by *Bacillus Licheniformis* R2. Pp. 232-236. 4th International Conference on Environmental Science and Development- ICESD. APCBEE Procedia.
- Kaczorek E, 2012. Effect of external addition of rhamnolipids biosurfactant on the modification of Gram positive and Gram negative bacteria cell surfaces during biodegradation of hydrocarbon fuel contamination. *Polish Journal Environmental of Studies* 21(4): 901-909.
- Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L and Kokare C, 2012. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardioopsis sp.* B4. *Desalination* 285: 198-204.
- Maier RM and Soberon Chavez G, 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamonolipid: biosynthesis and potential application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 625-633.
- Makkar RS, Cameotra S and Banat I M, 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production (Mini Review). *AMB Express* 1: 1-19.
- Maneerat S and Phetrong K, 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 29(3): 781-791.
- Morikawa M, Hirata Y and Imanaka T, 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488(3): 211-218.
- Myers D, 2006. *Surfactant Science and Technology*. 3rd Edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Nasr S, Soudi MR and Mehrnia MR, 2009. Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus spp.* isolated from petroleum contaminated soil. *Iranian Journal of Microbiology* 1(2): 54-61.
- Nawawi WMFW, Jamal P and Alam MZ, 2010. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology* 101(23): 9241-9247.
- Nitschke M, Costa SG, Haddad R, Goncalves LA, Eberlin MN and Contiero J, 2005. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1. *Biotechnology Progress* 21:1562-1566.
- Pavitrans S, Balasubramanian S, Kumar P and Bisen PS, 2004. Emulsification and utilization of high-speed diesel by a *Brevibacterium* species isolated from hydraulic oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(8): 811-816.
- Pruthi V and Cameotra SS, 1997. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Techniques* 11(9): 671-674.

- Ramos S, Cristina P, de Lourdes m, Vinicio, Estela B and Virginia G, 2010. Selection Of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 668-675.
- 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.
- Satpute SK, Bhawsar BD, Dhakephalkar PK and Chopade BA, 2008. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences* 37(3): 243-250.
- Singh A, Van Hamme JD and Ward OP, 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25: 99-121.
- 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.
- Thavasi R, Subramanyam Nambaru VRM, Jayalakshmi S, Balasubramanian T and Banat IM, 2011. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources. *Indian of Journal Microbiology* 51(1): 30-36.
- Varjani SJ, Rana DP, Bateja S, Sharma MC and Upasani VN, 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.
- Vega C, Varaldo H, Garcí'a F. Leal E and Va'zquez R, 2007. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresources Technology* 98(1): 237-240.
- Walter V, Syldatk C and Hausmann R, 2010. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 672: 1-13.
- Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM and McInerney MJ, 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56(3): 339-347.
- Zhang X, Xu D, Zhu CH, 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.
- Zhang Y and Miller R, 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 60(6): 2101-2106.