



Research Article

Preliminary Screening and Identification of Biosurfactant-Producing Bacteria Derived from Olive Waste and Petroleum Hydrocarbon–Contaminated Soils

Ali Ebadi^{1*}, Sepideh Al-Sadat Jamali¹, and Mehran Kamrani¹

¹ Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Karaj, Iran.

Article Info

Received: 2026-01-05

Accepted: 2026-02-21

Keywords:

Biosurfactant,
Molecular identification,
Native strains,
Pseudomonas,
Screening of
biosurfactant production.

Corresponding author's email:

aebadi@aeoi.org.ir

Doi:

10.22092/SBJ.2026.3718
94.292

Extended Abstract

Background and Objectives: The global shift toward sustainable agriculture has intensified interest in environmentally friendly alternatives to conventional chemical inputs. Biofertilizers, which exploit beneficial microorganisms and their secondary metabolites, play a critical role in improving nutrient availability, solubility, and uptake efficiency in plants. Among these metabolites, biosurfactants—surface-active compounds of microbial origin—have attracted increasing attention due to their high biodegradability, low toxicity, and production from renewable resources. These characteristics make biosurfactants promising substitutes for synthetic surfactants in both agricultural and environmental applications. In agricultural systems, biosurfactants contribute to soil quality improvement by enhancing the solubilization of hydrophobic compounds, increasing the bioavailability of micronutrients such as iron and phosphorus, and facilitating the mobilization of heavy metals. These properties are particularly relevant in contaminated or nutrient-deficient soils, where biosurfactants can support phytoremediation processes and improve plant growth under stress conditions. Anionic biosurfactants, especially rhamnolipids, are of particular interest because of their strong surface activity, metal-chelating capacity, and compatibility with soil–plant systems. Despite their considerable potential, the practical application of biosurfactants is constrained by the limited availability of efficient, high-yield microbial producers, particularly indigenous strains adapted to harsh or contaminated environments. Systematic screening and comparative evaluation of biosurfactant-producing bacteria are therefore essential to identify promising candidates for future development of biofertilizers and nano-biofertilizer formulations. The present study aimed to isolate, screen, and characterize indigenous bacterial strains from olive oil mill waste and petroleum-contaminated soils, with a specific focus on identifying efficient producers of anionic biosurfactants using a combination of qualitative, semi-quantitative, chromatographic, and molecular approaches.

Materials and Methods: Soil and waste samples were collected under sterile conditions from olive oil mill residues in Tarom region and from petroleum-contaminated soil at Pond No. 4 of the Shahid Tondguyan Oil Refinery, Tehran. Samples were transported to the laboratory under cooled conditions and subjected to an enrichment process in mineral salt medium supplemented with 3% (v/v) vegetable oil as the sole carbon source. Enrichment was conducted at 30 °C with shaking at 120 rpm over three successive cycles, totaling 21 days. Following enrichment, serial dilutions were prepared and plated on blood agar medium. Isolates exhibiting alpha or beta hemolysis were selected and purified on tryptic soy agar. A total of 30 bacterial isolates were retained for further analysis. Hemolytic activity was evaluated by measuring colony diameter and hemolytic zone, and the halo-to-colony ratio was calculated. To specifically screen for anionic biosurfactant production, isolates were tested on CTAB–methylene blue agar, and complex formation around colonies was recorded. Biosurfactant production was further assessed in liquid biosurfactant-forming broth, after which cell-free supernatants were obtained by centrifugation. Oil spreading and drop collapse assays were performed as indicators of surface tension reduction. Thin-layer

2/ Preliminary Screening and Identification of Biosurfactant-Producing...

chromatography (TLC) was used for preliminary chemical characterization of biosurfactants. Extracted compounds were separated using chloroform–methanol–water solvent systems and visualized with phenol–sulfuric acid, ninhydrin, and iodine reagents to detect glycolipid, lipopeptide, and lipid components, respectively. Molecular identification of the four most promising isolates was carried out by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. Phylogenetic analysis was performed using the Maximum Likelihood method with the Tamura–Nei model, and statistical analyses were conducted using one-way ANOVA and Duncan’s multiple range test at a 5% significance level.

Results: Analysis of variance revealed significant differences among the isolates for all evaluated traits at the 1% probability level. All 30 isolates exhibited hemolytic activity, with halo-to-colony ratios ranging from 1.28 to 2.90. Isolate 23 showed the highest hemolytic index, while isolate 21 displayed the lowest value. However, only approximately 23% of the isolates formed visible complexes on CTAB agar, indicating the production of anionic biosurfactants. The halo-to-colony ratio in this assay ranged from 1.42 to 2.23, with isolate 28 exhibiting the highest anionic biosurfactant activity. Oil spreading diameters varied widely, from 3.46 to 50.6 mm. Isolates 19 and 17 demonstrated significantly greater oil displacement compared to other isolates, reflecting superior surface tension–reducing capability. Drop collapse assay results showed droplet diameters ranging from 3.93 to 14.8 mm, with more than 73% of isolates outperforming the distilled water control. A significant positive correlation was observed between CTAB complex formation and both oil spreading and drop collapse assays, whereas hemolytic activity did not correlate significantly with other traits. TLC analysis revealed distinct biosurfactant profiles among the superior isolates. Isolates 17 and 23 reacted positively with all three detection reagents, suggesting the production of polymeric lipo-glyco-protein biosurfactants with strong emulsifying properties. Isolate 19 showed positive reactions with phenol–sulfuric acid and iodine, indicating glycolipid biosurfactants, likely rhamnolipids. Isolate 28 reacted with phenol–sulfuric acid and ninhydrin, suggesting mixed carbohydrate–peptide biosurfactants. Phylogenetic analysis identified isolate 17 as closely related to *Klebsiella sp.*, isolates 19 and 28 as members of the genus *Pseudomonas*, and isolate 23 related to *Microbacterium paraoxydans*.

Conclusion: This study demonstrated substantial diversity among indigenous bacterial isolates in terms of biosurfactant production, chemical composition, and functional performance. While hemolytic activity served as a useful preliminary screening tool, it was insufficient for identifying anionic biosurfactant producers without complementary assays. Indigenous *Pseudomonas* isolates exhibited the highest surface activity and glycolipid production potential, whereas *Klebsiella* and *Microbacterium* isolates primarily produced polymeric biosurfactants with strong emulsifying properties. The strong agreement between chromatographic profiles, functional assays, and phylogenetic identification highlights the importance of an integrated screening strategy. Overall, isolates 17, 19, 23, and 28 represent promising candidates for further optimization and development of biosurfactant-based biofertilizers and bioremediation agents. These findings provide a solid foundation for future studies focusing on production optimization, molecular characterization, and application of indigenous biosurfactants in sustainable agriculture and environmental management.

Cite this article: Ebadi, A., Jamali, S., Kamrani, M., 2026. Preliminary Screening and Identification of Biosurfactant-Producing Bacteria Derived from Olive Waste and Petroleum Hydrocarbon–Contaminated Soils. Research article, *Journal of Soil Biology*, 14 (1), 1-18 .



DOI: 10.22092/SBJ.2026.371894.292

Publisher: Soil Science Society of Iran



مقاله پژوهشی

غربالگری و شناسایی اولیه باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت حاصل از پسماند زیتون و

خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی

علی عبادی^{۱*}، سپیده السادات جمالی^۱ و مهران کامرانی^۱

^۱ پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای (NSTRI)، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۲

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات زیستی فعال سطحی با کاربردهای گسترده در کشاورزی و حفاظت محیط‌زیست هستند. شناسایی سویه‌های بومی تولیدکننده بیوسورفکتانت، گامی مهم در توسعه کاربردهای زیست‌فناورانه این ترکیبات در کشاورزی و محیط‌زیست است. هدف این پژوهش شناسایی و ارزیابی توان تولید بیوسورفکتانت در باکتری‌های جداشده از محیط‌های آلوده به ترکیبات هیدروکربنی بود. در این پژوهش، باکتری‌های بالقوه تولیدکننده بیوسورفکتانت به روش غنی‌سازی انتخابی از پسماند زیتون و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی جداسازی و خالص‌سازی شدند. پس از جداسازی و خالص‌سازی اولیه، مجموعه‌ای از آزمون‌های فیزیکوشیمیایی شامل همولیز خون، تشکیل کمپلکس در محیط آگار آبی حاوی CTAB، آزمون پخش نفت و پاشش قطره برای غربال‌گری توان کاهش کشش سطحی انجام شد. تمامی جدایه‌ها توان همولیز مثبت نشان دادند، اما تنها حدود ۲۳ درصد قادر به تشکیل کمپلکس آنیونی در محیط CTAB بودند. دامنه پخش نفت بین ۳/۴۶ تا ۵۰/۶ میلی‌متر متغیر بود و سویه‌های ۱۷ (PX944924) و ۱۹ (PX944925) بالاترین مقادیر را نشان دادند، درحالی‌که بالاترین توان پاشش قطره مربوط به سویه ۲۸ (PX944927) بود. تحلیل کروماتوگرافی لایه نازک ترکیب بیوسورفکتانت‌ها را در چهار سویه منتخب مشخص کرد؛ به‌طوری‌که سویه‌های ۱۷ و ۲۳ (PX944926) ترکیبات لیپوگلیکوپروتئینی، سویه ۱۹ گلیکولیپیدهای مشابه رامنولیبید و سویه ۲۸ ترکیبات مختلط قندی-پپتیدی تولید کردند. شناسایی فیلوژنتیکی نیز نشان داد این چهار سویه به جنس‌های *Pseudomonas*، *Klebsiella* و *Microbacterium* تعلق دارند. هم‌پوشانی نتایج ساختاری و عملکردی بیانگر پتانسیل بالای این جدایه‌ها برای کاربرد در زیست‌پالایی هیدروکربن‌ها و توسعه زیست‌کودهای مبتنی بر بیوسورفکتانت‌های بومی است.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، شناسایی مولکولی، سویه‌های بومی، سودوموناس، غربال‌گری تولید بیوسورفکتانت.

مقدمه

توجه جهانی به توسعه پایدار در کشاورزی باعث شده است که استفاده از مواد سبز و دوستدار محیط‌زیست جایگزین ترکیبات شیمیایی پرخطر شود. کودهای زیستی با بهره‌گیری از زادمایه کارآمد و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها، از جمله بیوسورفکتانت‌ها، با افزایش حلالیت، تحرک و فراهمی زیستی عناصر غذایی، نقش مؤثری در بهبود جذب عناصر معدنی توسط گیاه ایفا می‌کنند. بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات فعال سطحی زیستی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند کشش سطحی و بین‌سطحی را کاهش دهند. این ترکیبات به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری، سمیت پایین و سازگاری با محیط، کاربردهای گسترده‌ای در کشاورزی، محیط‌زیست و صنایع مختلف دارند. در این میان، توسعه کودهای مرکب زیستی- شیمیایی به‌عنوان سامانه‌های نوین تلفیقی، امکان هم‌افزایی میان نهاده‌های میکروبی، کودهای شیمیایی و فناوری نانو را فراهم ساخته و با افزایش کارایی مصرف عناصر غذایی و کاهش تلفات و آلودگی‌های زیست‌محیطی، مسیر گذار به کشاورزی پایدار را تقویت می‌کند (Lahiji & Rejali, 2025; Khoshru et al., 2025). در این میان، بیوسورفکتانت‌ها، ترکیبات فعال سطحی با منشأ میکروبی، به دلیل ویژگی‌هایی همچون زیست‌تجزیه‌پذیری بالا، سمیت اندک و قابلیت تولید از منابع تجدیدپذیر، به‌عنوان جایگزین‌های مناسب برای سورفکتانت‌های شیمیایی مطرح شده‌اند (Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Garg et al., 2025). اهمیت این ترکیبات در کشاورزی زمانی دوچندان می‌شود که بهبود تغذیه گیاه، افزایش قابلیت دسترسی به عناصر غذایی و نیز کنترل عوامل بیماری‌زا مورد

توجه قرار گیرد. یکی از اصلی‌ترین حوزه‌های کاربرد بیوسورفکتانت‌ها در بهبود کیفیت خاک است. این ترکیبات توانایی بالایی در افزایش حلالیت ترکیبات هیدروفوب مانند آلاینده‌های نفتی و همچنین در دسترس‌سازی فلزات سنگین دارند و بدین ترتیب نقش اساسی در فرآیندهای زیست‌پالایی ایفا می‌کنند (Singh et al., 2007; Pacwa-Płociniczak et al., 2011). علاوه بر این، توانایی آن‌ها در کلاته‌سازی و تشکیل میسل موجب افزایش دسترسی گیاه به عناصر کم‌مصرفی چون فسفات و آهن می‌شود که این امر مستقیماً بر افزایش رشد و کارایی فتوسنتز گیاهان اثرگذار است (Singh et al., 2018; Stacey et al., 2008). در این میان، بیوسورفکتانت‌های آنیونی، به‌ویژه رامنولپیدها^۱، اهمیت ویژه‌ای دارند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این ترکیبات در حلال‌سازی فلزات سمی مانند سرب، روی و آهن بسیار مؤثر هستند و حتی بازدهی بالای ۷۰ درصد در حذف این عناصر از محیط گزارش شده است (Garg et al., 2025).

بیوسورفکتانت‌ها علاوه بر اثرات مستقیم بر محیط خاک و گیاه، در تعاملات گیاه-ریزویسفر نیز نقش کلیدی دارند. آن‌ها با تقویت توانایی ریزوباکتری‌ها در تشکیل بیوفیلم، حرکت و پیامک‌های بین سلولی، شرایط را برای کلونیزاسیون موفق ریشه فراهم می‌کنند (Nihorimbere et al., 2012). این امر در نهایت منجر به افزایش دسترسی گیاه به مواد مغذی و نیز افزایش تحمل به تنش‌های محیطی می‌شود. از سوی دیگر، اثرات زیست‌کنترلی بیوسورفکتانت‌ها به‌ویژه در مهار قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا اثبات شده است. به‌عنوان مثال، لپوپتیدها توانسته‌اند رشد قارچ‌های عامل آنتراکوز را مهار کنند و سورفاکتین^۲ نیز با القای تولید آنزیم‌های دفاعی در ذرت، مقاومت گیاه

¹ Rhamnolipids

² Surfactin

لیپیدی، بستر مناسبی برای رشد و انتخاب میکروارگانیسم‌های سازگار با ترکیبات هیدروفوب و تولیدکننده بیوسورفکتانت محسوب می‌شود. در این مطالعه، جداسازی باکتری‌ها از پسماند زیتون در کنار خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی انجام شد تا نقش منشأ اکولوژیک متفاوت در تنوع و عملکرد بیوسورفکتانت‌های تولیدی مورد بررسی قرار گیرد. در این پژوهش، از مجموعه‌ای از آزمون‌های غربالگری شامل همولیز خون، آزمون انتشار نفت، آزمون پاشش قطره، آگار CTAB و کروماتوگرافی لایه نازک^۳ استفاده شد تا سویه‌های با پتانسیل بالا برای کاربردهای کشاورزی و زیست‌محیطی شناسایی شوند. این رویکرد می‌تواند گامی مهم در جهت استفاده عملی از بیوسورفکتانت‌ها در کشاورزی پایدار باشد، چرا که شناسایی و توسعه سویه‌های کارآمد امکان جایگزینی پایدارتر و ایمن‌تر برای سورفکتانت‌های شیمیایی را فراهم می‌سازد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی

در این پژوهش جهت دستیابی به جدایه‌های مولد بیوسورفکتانت نمونه‌برداری در شرایط استاندارد از دو منبع پسماند صنایع روغن‌کشی منطقه طارم و خاک آلوده پوند شماره چهار پالایشگاه نفت شهید تندگویان تهران انجام شد و نمونه‌ها در جعبه‌های حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت غنی‌سازی^۴ و افزایش جمعیت هدف ۱۰ گرم از هر نمونه در محیط کشت معدنی^۵ حاوی روغن دانه آفتابگردان (۳ درصد حجمی) به عنوان منبع کربن اضافه و در دمای ۳۰°C با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. غنی‌سازی با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر

در برابر بیماری‌ها را افزایش داده است (Borah et al., 2016; Ali et al., 2022). ترکیب این ویژگی‌ها موجب شده است که بیوسورفکتانت‌ها در کشاورزی نه تنها به عنوان عوامل اصلاح‌کننده خاک بلکه به عنوان ابزارهای بالقوه برای ارتقای سلامت گیاه و افزایش عملکرد محصول مورد توجه قرار گیرند. به‌ویژه بیوسورفکتانت‌های آنیونی به دلیل بار منفی سطحی، سازگاری بالایی با سیستم‌های خاک و گیاه دارند و در کاربردهایی نظیر افزایش جذب مواد مغذی، بهبود ریزوسفر و کنترل عوامل بیماری‌زا پتانسیل چشمگیری از خود نشان داده‌اند. با وجود این مزایا، چالش‌های مهمی نیز وجود دارد. یکی از اصلی‌ترین موانع، شناسایی و جداسازی سویه‌های بومی میکروبی است که توانایی تولید بیوسورفکتانت‌ها را با بازدهی بالا داشته باشند. ارزیابی و مقایسه نظام‌مند این ویژگی در میان گروه‌های مختلف باکتریایی، گامی کلیدی در شناسایی و انتخاب سویه‌های برتر با بیشترین کارایی زیستی و پتانسیل کاربردی در توسعه کودهای زیستی نسل جدید محسوب می‌شود (Khosravi et al., 2025). علاوه بر این، شرایط محیطی، ترکیب خاک و نوع آلودگی می‌توانند بر میزان و نوع بیوسورفکتانت تولیدی تأثیر بگذارند؛ بنابراین، غربالگری دقیق و انتخاب سویه‌های امیدبخش در این حوزه اهمیت اساسی دارد. بر همین اساس، هدف مطالعه حاضر تمرکز بر غربالگری سویه‌های باکتریایی جداشده از منابعی مانند پسماند زیتون و خاک‌های آلوده به نفت است. این منابع به دلیل غنای زیستی و حضور میکروارگانیسم‌های سازگار با شرایط سخت، می‌توانند بستری مناسب برای یافتن تولیدکنندگان کارآمد بیوسورفکتانت‌های آنیونی باشند. پسماند زیتون به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیبات آلی، فنولیک و

⁵ Mineral Salt Medium

³ Thin Layer Chromatography

⁴ Enrichment

پس از انجام دو مرتبه واکشت و خالص سازی جهت انجام آزمون‌های مختلف در دمای 4°C ذخیره‌سازی شدند. برای انجام هر آزمون سوسپانسیون میکروبی هر جدایه با کشت در محیط TSB و گرماگذاری در دمای 30°C به مدت ۲۴ ساعت تهیه و به عنوان زادمایه استفاده گردید. در (جدول ۱) خلاصه‌ای از آزمون‌های مختلف انجام شده در این مطالعه برای ارزیابی میزان و نوع بیوسورفکتانت را نشان می‌دهد.

سوسپانسیون حاصل تا دو مرتبه دیگر تکرار و در مجموع در ۲۱ روز انجام شد. پس از آن سری رقت دهی از نمونه نهایی تهیه و بر روی محیط کشت آگار خونی^۶ انتقال و به مدت ۴۸ ساعت در دمای 30°C گرماگذاری شد (Ebadi et al., 2018). در ادامه جدایه‌هایی با توانایی همولیز گلبول‌های قرمز خون (همولیز بتا و آلفا) انتخاب و در محیط کشت عمومی تریپتیک سوی آگار^۷ کشت شد. در نهایت ۳۰ جدایه

جدول ۱- روش‌ها و شاخص‌های مورد استفاده جهت شناسایی و ارزیابی تولید بیوسورفکتانت

Table 1. Methods and indicators used for the identification and evaluation of biosurfactant production

منبع Reference	شاخص بررسی Evaluation Indicator	هدف Purpose	آزمون Test	ردیف Row
Zhang et al., 2012	اندازه گیری قطر هاله و کلنی Measuring the diameter of the halo and colony	بررسی غیرمستقیم توانایی تولید ترکیبات سطح‌فعال Indirect assessment of the ability to produce surfactant compounds شناسایی کیفی تولید بیوسورفکتانت‌های	همولیز خون Hemolysis of blood	1
Siegmund & Wagner, 1991	قطر هاله Halo diameter	آنیونی Identification of the qualitative production of anionic biosurfactants	آگار آبی Blue Agar	2
Zhang et al., 2012	قطر ناحیه شفاف ایجادشده روی سطح آب A transparent area created on the water surface	ارزیابی توانایی بیوسورفکتانت تولیدی در کاهش کشش سطحی Evaluation of the effectiveness of the produced biosurfactant in reducing surface tension	پخش نفت Oil spreading	3
Sass et al., 2023	قطر پخش شدن قطره The drop's diameter	ارزیابی توانایی بیوسورفکتانت تولیدی در کاهش کشش سطحی Evaluation of the effectiveness of the produced biosurfactant in reducing surface tension	پاشش قطره Drops collapse	4
Zhang et al., 2012	وجود/عدم وجود لکه و تعیین ضریب نگهداری (Rf) Presence/absence of a spot and determination of the retention factor (Rf) value	شناسایی کیفی و نیمه‌کمی ترکیبات بیوسورفکتانتی و تعیین نوع کلی آن‌ها Identification of qualitative and semi-quantitative bio-surfactant compounds and determination of their general type	کروماتوگرافی لایه نازک Thin layer chromatography	5

آزمون همولیز خون

به همراه خون دفیبرینه^۸ گوسفندی (۵ درصد حجمی) استفاده شد. برای تهیه این محیط بعد از ساخت و استریل کردن محیط کشت آگار خونی، خون دفیبرینه گوسفندی در دمای 50°C به آن اضافه شده و درون

آزمون همولیز خون برای شناسایی و مقایسه اولیه سویه‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت انجام شد. برای انجام این آزمون از محیط کشت پایه آگار خونی

⁸ Defibrinated

⁶ Blood agar

⁷ Tryptic Soy Agar

بیوسورفکتانت^۹ استفاده شد (Zhang et al., 2012). ترکیبات و مقادیر (گرم بر لیتر) موجود در این محیط عبارت بودند از: NaNO_3 ۲/۵، K_2HPO_4 ۴، KH_2PO_4 ۴، CaCl_2 ۰/۱، MgSO_4 ۰/۲، NaCl ۱۷/۵۵، KCl ۱، عصاره مخمر ۱ و روغن دانه آفتابگردان ۳ درصد (حجمی/حجمی) و $\text{pH}=7$. بعد از ساخت و استریل کردن محیط BFB ۵۰ میلی‌لیتر از این محیط توسط ۲/۵ میلی‌لیتر مایه تلقیح تهیه شده برای هر جدایه در محیط TSB تلقیح شده و در دمای 30°C بر روی شیکر با سرعت (rpm) ۱۲۰ گرم‌گذاری شد. بعد از گذشت ۵ روز از زمان تلقیح، سوسپانسیون میکروبی با سرعت ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شده و محلول صاف رویی برای اندازه‌گیری میزان پخش نفت، پاشش قطره و کروماتوگرافی لایه نازک جداسازی گردید. اندازه‌گیری میزان پخش نفت بر اساس روش ارائه شده توسط ژانگ و همکاران انجام گرفت (Zhang et al., 2012). در این روش ابتدا ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون ظروف پتری ۹۰ میلی‌متری ریخته و ۵۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آن اضافه گردید تا لایه نازکی از نفت در سطح آب تشکیل شود. در ادامه مقدار ۵ میکرولیتر از محلول صاف رویی حاصل از محیط BFB که با استفاده از آب دیونیزه ۱۰ برابر رقیق شده بود در وسط لایه نفتی قرار داده شد و میزان عقب رانده شدن نفت در سطح آب برای جدایه‌های مختلف اندازه‌گیری گردید.

آزمون پاشش قطره

برای اجرای آزمایش، یک برگه معمولی چاپگر روی یک صفحه شیشه‌ای قرار داده شده و سطح آن با روغن معدنی سبک^{۱۰} پوشش داده می‌شود تا سطح روغنی یکنواخت ایجاد شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول صاف رویی حاصل از محیط BFB به همراه

ظروف پتری پخش گردید. در ادامه میزان ۳۰ میکرولیتر از زادمایه هر جدایه در محیط کشت مذکور به صورت نقطه‌گذاری تلقیح شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای 30°C گرم‌گذاری شدند (Zhang et al., 2012). به منظور مقایسه توان تولید بیوسورفکتانت قطر هاله و کلونی در جدایه‌های مختلف اندازه‌گیری و نسبت هاله به کلونی محاسبه شد.

آزمون آگار آبی

برای غربالگری تولید بیوسورفکتانت‌های آنیونی از محیط آگار آبی بر پایه روش سیگموند-واگنر استفاده شد (Siegmund & Wagner, 1991). محیط کشت شامل ترکیبات زیر (گرم در لیتر) بود: مانیتول (۱۰) به‌عنوان منبع کربن، KH_2PO_4 (۲)، Na_2HPO_4 (۳)، NH_4NO_3 (۱)، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (۰/۲)، CaCl_2 (۰/۰۲)، آگار (۱۵ گرم)، CTAB (۰/۲) و متیلن‌بلو (۰/۰۰۵). ابتدا محیط پایه بدون CTAB و متیلن‌بلو تهیه و استریل شد و پس از کاهش دما به حدود 50°C ، محلول‌های استریل CTAB و متیلن‌بلو افزوده و سپس محیط در ظروف پتری ریخته شد. پس از جامد شدن، مقدار ۳۰ میکرولیتر از زادمایه جدایه‌ها به صورت نقطه‌گذاری تلقیح گردید و ظروف پتری به مدت ۹۶ ساعت در دمای 30°C گرم‌گذاری شدند. تشکیل هاله آبی یا رسوبی در اطراف کلنی‌ها به‌عنوان شاخص تولید بیوسورفکتانت آنیونی ثبت شد و برای مقایسه عملکرد جدایه‌ها، قطر کلنی و هاله اندازه‌گیری و نسبت هاله به کلنی محاسبه گردید.

آزمون پخش نفت

برای اندازه‌گیری مقدار و نوع بیوسورفکتانت تولید شده توسط جدایه‌ها از محیط کشت مایع تولید

¹⁰ Light Mineral Oil

⁹ Biosurfactant Fermentation Broth

الیگونوکلوئوتیدی تکثیر شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase آماده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) با یک مرحله واسرشت اولیه در $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه آغاز شد و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت در $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در $55^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه (یا دمای اتصال مورد استفاده در مطالعه)، و طول‌سازی در $72^{\circ}C$ به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. در پایان، مرحله طول‌سازی نهایی در $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه اجرا گردید. محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و باندها پس از یک ساعت ران در ولتاژ ۸۰ ولت مشاهده گردید. توالی‌یابی به روش سانگر انجام شد و توالی‌های خام پس از بازبینی و ویرایش اولیه با نرم‌افزار BioEdit تصحیح شدند. در ادامه، توالی نهایی شده برای تعیین جنس و گونه باکتری‌ها در پایگاه داده NCBI تحت فرآیند BLAST مورد مقایسه قرار گرفت. درخت فیلوژنیک با استفاده از روش بیشترین احتمال^{۱۱} و بر اساس مدل جانشین نوکلئوتیدی Tamura-Nei ترسیم شد. انتخاب مدل تکاملی با استفاده از آزمون انتخاب بهترین مدل در نرم‌افزار MEGA انجام گرفت. به‌منظور یکنواختی، تمامی توالی‌ها به ناحیه مشترک (~۷۰۰ جفت‌باز) برش داده شدند. پایداری شاخه‌ها با آزمون ۱۰۰۰ بوت استرپ^{۱۲} ارزیابی شد.

آنالیز آماری

در این پژوهش، کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار زیستی مستقل انجام

۰/۰۱ درصد معرف رنگی (Orange G) روی سطح روغنی کاغذ ریخته شد. پس از خشک شدن قطره در دمای اتاق، قطر آن در دو جهت عمود بر هم (عرض و طول) اندازه‌گیری گردید (Sass et al., 2023).

آزمون کروماتوگرافی لایه نازک

آزمون TLC برای تعیین ساختار شیمیایی و دسته‌بندی کلی بیوسورفکتانت تولید شده توسط جدایه‌ها انجام پذیرفت. در این روش بیوسورفکتانت تولید شده توسط جدایه میکروبی با استفاده از حلال آلی کلروفرم: متانول با نسبت ۱:۲ (حجمی/حجمی) از مایه رویی سوسپانسیون میکروبی محیط کشت BFB عصاره‌گیری و بر روی صفحه TLC نقطه‌گذاری گردید. در این مرحله از مخلوط کلروفرم: متانول: آب با نسبت حجمی/حجمی/حجمی ۶۵:۱۵:۲ به عنوان حلال انتقال‌دهنده درون تانک استفاده شد. در ادامه بعد از خشک کردن صفحه TLC، محلول تثبیت‌کننده فنول-سولفوریک اسید (۳ گرم فنول در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اتانول: سولفوریک اسید با نسبت ۹۵:۵)، محلول نین هیدرین (۰/۵ درصد) و بخار ید به ترتیب جهت تشخیص ترکیبات گلیکولیپیدی، لیپوپپتیدی و لیپیدی به صورت یکنواخت بر روی صفحه اسپری شده و نقاط رنگی به عنوان شاخص حضور گروه‌های عاملی مشاهده و ثبت گردید (Zhang et al., 2012).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای شناسایی مولکولی چهار جدایه برتر، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت شرکت سیناژن و مطابق دستورالعمل سازنده انجام گرفت. ژن 16S rRNA با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی

¹¹ Maximum Likelihood

¹² Bootstrap

یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۲). نتایج ارزیابی فعالیت همولیتیک نشان داد تمامی ۳۰ جدایه مورد بررسی دارای این توانایی بالقوه تولید بیوسورفکتانت بودند که دامنه آن بین ۱/۲۸ تا ۲/۹۰ بود. با انجام آزمون مقایسه میانگین مشخص شد جدایه شماره ۲۳ با اختلاف معنی‌دار بیشترین نسبت هاله به کلونی (۲/۹) در محیط آگار-خونی را داشت. کمترین مقدار این صفت نیز در جدایه شماره ۲۱ به میزان ۱/۲۸ مشاهده شد (جدول ۳). این شاخص بیانگر شدت فعالیت همولیتیک بوده و به‌طور غیرمستقیم به توان فعالیت سورفکتانتی جدایه‌ها وابسته است. هرچند یک معیار غربالگری کیفی-نیمه کمی است و به‌تنهایی مبنای شناسایی قطعی نوع بیوسورفکتانت قرار نمی‌گیرد.

شد. داده‌های حاصل از آزمون‌های کمی پس از بررسی نرمال بودن، با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین‌ها، از تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد و در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) انجام و داده‌ها به صورت میانگین گزارش شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد باکتری‌های مورد ارزیابی از نظر فعالیت همولیتیک، توانایی تشکیل کمپلکس، پخش نفت و پاشش قطره در سطح احتمال

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در جدایه‌های جداسازی شده از منابع مختلف

Table 2. Results of analysis of variance for measured traits in strains separated from different sources

مجموع مربعات				درجه آزادی df	منبع تغییرات SOV
پاشش قطره Drop collapse	پخش نفت Oil dispersion	تشکیل کمپلکس Complex formation	فعالیت همولیتیک Hemolytic activity		
913**	10653**	9.75**	8.48**	29	باکتری Bacteria
5	770	0.30	0.84	60	خطا Error
918	11423	10.05	9.32	89	کل Total
8.3	8.6	11.3	7.5		ضریب تغییرات (%) CV (%)

** و * معنی‌داری در سطح یک و پنج درصد، ns غیرمعنی‌داری.

** and * indicate significance at the 1% and 5% levels, and ns indicates non-significance.

ویژگی اختصاصی بودن این آزمون نسبت به انواع مختلف بیوسورفکتانت متغیر است و همواره نیاز به تأییدهای کمی و شیمیایی وجود دارد (Youssef, 2004; Ebadi, 2018). بر اساس گزارش‌های پیشین، در محیط‌های آلوده به هیدروکربن فشار انتخابی ناشی از ترکیبات آب‌گریز می‌تواند به‌طور کلی موجب غلبه باکتری‌هایی از جنس‌هایی مانند *Pseudomonas* و *Klebsiella* به‌عنوان تولیدکنندگان بالقوه

آزمون همولیز خون به‌عنوان یک معیار غربالگری سریع برای کشف تولیدکنندگان بیوسورفکتانت به‌طور گسترده‌ای در مطالعات میکروبیولوژی کاربرد دارد؛ اگرچه باید به‌عنوان یک شاخص اولیه و نه قطعی تفسیر شود. مطالعات مروری و مقالات تجربی نشان داده‌اند که همولیز با تولید مولکول‌های آمفی‌فیلیک همراه است که قادرند ساختار غشایی اریتروسیت‌ها را تخریب کنند، اما حساسیت و

مقدار آن نیز در جدایه شماره ۵ (۱/۴۲) مشاهده شد (جدول ۳). این یافته نشان می‌دهد که اگرچه همولیز خون نشان‌دهنده فعالیت سطحی است، اما همه‌ی بیوسورفکتانت‌های تولیدی الزاماً دارای بار منفی و از نوع آنیونی (مانند گلیکولیپیدها یا رامنولیپیدها) نیستند (Dini et al., 2024). دامنه نسبت قطر هاله به کلونی بین ۱/۴۲ تا ۲/۲۳ متغیر بود، به طوری که بیشترین مقدار در جدایه شماره ۲۸ و کمترین در جدایه شماره ۵ مشاهده شد (جدول ۳). تفاوت مشاهده شده احتمالاً به اختلاف در نوع و غلظت ترکیبات ترشح شده، تفاوت در مسیرهای متابولیکی مرتبط با تولید بیوسورفکتانت و یا ساختار بار سطحی مولکول‌ها باز می‌گردد. در مطالعات مشابه، گونه‌های *Pseudomonas* معمولاً با تشکیل هاله آبی پررنگ در محیط CTAB شناسایی شده‌اند، در حالی که برخی سویه‌های *Klebsiella* و *Mycobacterium* ترکیبات خنثی یا کاتیونی تولید می‌کنند (Markam et al., 2024; Youssef et al., 2004). از آنجا که آزمون CTAB بر پایه برهم‌کنش بین مولکول‌های بیوسورفکتانت با بار منفی و کاتیون چهارتایی CTAB است، مشاهده کمپلکس رنگی تنها در بخشی از جدایه‌ها حاکی از وجود بیوسورفکتانت‌های آنیونی در میان جمعیت میکروبی است. این نتایج نشان می‌دهد که ترکیب دو شاخص همولیز و CTAB می‌تواند در کنار آزمون‌های کمی مانند کاهش کشش سطحی و شاخص امولسیون‌سازی، ابزار غربالگری مؤثری برای شناسایی سویه‌های دارای بیشترین پتانسیل زیست‌فناورانه در فرآیندهای پاکسازی زیستی ترکیبات هیدروکربنی باشد (Carrillo et al., 1996).

در (جدول ۳) میزان پخش نفت لایه نفتی به عنوان شاخصی از کاهش کشش سطحی در جدایه‌های مختلف را نشان می‌دهد. دامنه پخش نفت در جدایه‌های مختلف بین ۳/۴۶ - ۵۰/۶ میلی‌متر بدست

بیوسورفکتانت شود. گزارش‌های مروری جدید نشان می‌دهند که گونه‌ها و ساختارهای مولکولی (گلیکولیپیدها، لیپوپتیدها، گلیکوپروتئین‌ها) خواص فیزیکوشیمیایی و زیستی متفاوتی دارند که رفتار همولیتیک و توانایی کاهش کشش سطحی را تعیین می‌کنند. (Markam, 2024; Dini, 2024) نتایج همولیتیک مشاهده شده در این مطالعه باید به عنوان شاخص اولیه تعبیر شوند: همولیز مثبت احتمال تولید ترکیبات فعال سطحی را نشان می‌دهد اما نمی‌تواند نوع مولکولی (مثلاً گلیکولیپید در برابر لیپوپروتئین) را با قطعیت مشخص کند. لذا توصیه می‌شود که همولیز به همراه مجموعه‌ای از آزمون‌های تکمیلی شامل اندازه‌گیری کشش سطحی، شاخص امولسیون‌سازی (E24)، واکنش فنول-سولفوریک برای شناسایی گروه‌های قندی و تعیین بار یونی (CTAB یا سایر تست‌های انتخابی) به کار رود تا ماهیت و کارایی بیوسورفکتانت‌ها به درستی تعیین شوند (Ebadi, 2018). در نتیجه، آزمون همولیز یک ابزار کاربردی و اقتصادی برای غربالگری اولیه است ولی برای ادعاهای قطعی درباره پتانسیل بیوسورفکتانت و کاربردهای زیست‌محیطی آن لازم است ارزیابی‌های کمی و شیمیایی پی‌درپی انجام شود تا از تفسیرهای نادرست جلوگیری شود.

نتایج این پژوهش نشان داد که تمامی جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی قادر به همولیز خون بودند که این ویژگی معمولاً به عنوان شاخصی از توان بالقوه در تولید ترکیبات فعال سطحی تلقی می‌شود. با این حال، ارزیابی اختصاصی‌تر در محیط آگار آبی حاوی CTAB و متیلن آبی نشان داد تنها حدود ۲۳ درصد از جدایه‌ها توانایی تشکیل کمپلکس آنیونی داشتند. دامنه نسبت هاله به کلونی در محیط آگار آبی بین ۱/۴۲ تا ۲/۲۳ بدست آمد. بیشترین میزان تشکیل کمپلکس آنیونی در جدایه شماره ۲۸ (۲/۲۳) و کمترین

بیوسورفکتانت‌های میکروبی معتبر همخوانی دارد. آزمایش‌های متعدد در پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که افزایش قطر حلقه پخش نفت رابطه مستقیم با کاهش کشش سطحی ناشی از بیوسورفکتانت ترشح شده دارد (Li et al., 2023; Sun et al., 2018). علاوه بر این، نتایج نشان داد که میزان پاشش قطره توسط جدایه‌ها بین ۳/۹۳ تا ۱۴/۸ میلی‌متر متغیر بوده است و در بیش از ۷۳ درصد از جدایه‌ها، توانایی پاشش قطره نسبت به نمونه شاهد دیده شده است. این یافته نیز تأییدگر فعالیت سطحی بالا در بسیاری از جدایه‌هاست؛ زیرا پاشش قطره معمولاً هنگامی رخ می‌دهد که ترکیب فعال سطحی کافی وجود داشته باشد تا کشش سطحی قطره را کاهش دهد و باعث گسترش آن شود. با این حال، قابل‌توجه است که اگرچه همه جدایه‌ها در آزمون همولیز مثبت بوده‌اند، اما فقط برخی از آن‌ها در آزمون‌های پخش نفت و پاشش قطره عملکرد برجسته‌ای داشته‌اند. این موضوع بر تنوع تولید و کیفیت بیوسورفکتانت‌ها تأکید می‌کند. به‌عنوان مثال نوع مولکولی، غلظت و ساختار بار سطحی مولکول می‌تواند کارایی کاهش کشش سطحی را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بیوسورفکتانت‌هایی که بار منفی بالاتری دارند و زنجیره هیدروفوب قوی‌تر، عملکرد بهتر در کاهش کشش سطحی و ایجاد پخش بیشتر نفت دارند (Shaimerdenova et al., 2024). در نتیجه، نتایج (جدول ۳) به ما این امکان را می‌دهد که جدایه‌های شماره ۱۹ و ۲۸ را به‌عنوان کاندیداهای خوب برای تولید بیوسورفکتانت با قابلیت بالا در کاهش کشش سطحی شناسایی کنیم.

آمد. جدایه‌های شماره ۱۹ و ۱۷ به ترتیب با میانگین ۵۰/۶ و ۴۴/۸ میلی‌متر به طور معنی‌داری نسبت به سایر جدایه‌ها بالاتر بودند. کمترین میزان پخش نفت نیز در جدایه شماره ۱ با میانگین ۳/۴۶ مشاهده شد. میزان پاشش قطره توسط جدایه‌های مختلف نیز بین ۳/۹۳ تا ۱۴/۸ میلی‌متر متغیر بود. در بیش از ۷۳ درصد جدایه‌ها توانایی پاشش قطره نسبت به نمونه شاهد (آب مقطر) مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد جدایه شماره ۲۸ با میانگین ۱۴/۸ میلی‌متر به طور معنی‌داری از سایر جدایه‌ها بالاتر بود (جدول ۳). همچنین بررسی همبستگی بین صفات بررسی شده نشان داد میزان همولیز خون فاقد همبستگی معنی‌داری سایر صفات مورد بررسی بود. با این حال تشکیل کمپلکس در محیط آگار آبی همبستگی مثبت معنی‌دار با پخش نفت و پاشش قطره (به ترتیب $r=0/40^*$ و $r=0/78^{**}$) نشان داد.

نتایج (جدول ۳) نشان می‌دهد که دامنه پخش نفت در جدایه‌های مختلف بین ۳/۴۶ تا ۵۰/۶ میلی‌متر بوده است، به طوری که جدایه‌های شماره ۱۹ و ۱۷ به ترتیب با میانگین‌های ۵۰/۶ و ۴۴/۸ میلی‌متر به طور معناداری از سایر جدایه‌ها جلوتر بوده‌اند. این پدیده نشان‌دهنده توانایی بالاتر این جدایه‌ها در کاهش کشش سطحی یا بین‌فازی است که یکی از شاخص‌های قدرتمند تولید بیوسورفکتانت محسوب می‌شود. در این مطالعه، کاهش کشش سطحی توسط سویه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمون‌های پخش نفت و پاشش قطره ارزیابی شد. اگرچه این روش‌ها شاخص‌های کیفی و نیمه‌کمی خوبی برای غربالگری بیوسورفکتانت‌ها فراهم می‌کنند، اندازه‌گیری مستقیم کشش سطحی با تانسیومتر که در مطالعات مرجع به‌عنوان استاندارد اصلی شناخته می‌شود، امکان‌پذیر نبود. با این حال، الگوی تغییرات پخش نفت و قطره‌های آب با نتایج گزارش شده برای

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان فعالیت همولیتیک (تولید بیوسورفکتانت)، تشکیل کمپلکس (بیوسورفکتانت آنیونی)، پخش نفت (کاهش کشش سطحی) و پاشش قطره (کاهش کشش سطحی) توسط جدایه‌های جداسازی شده از منابع مختلف. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p < 0.05$) می‌باشند.

Table 3. Comparison of the average levels of hemolytic activity (biosurfactant production), complex formation (anionic biosurfactant), oil dispersion (reduction of surface tension), and droplet spreading (reduction of surface tension) by strains isolated from different sources. Means with the same letters are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

جدایه Isolate	فعالیت همولیتیک (هاله / کلونی) Hemolytic activity (halo/colony)	تشکیل کمپلکس (هاله / کلونی) Complex formation (halo/colony)	پخش نفت (mm) Oil spreading	پخش قطره (mm) Drop collapse
1	1.43 ^{g-1}	1 ^f	3.46 ^k	5.92 ^{jk}
2	1.48 ^{f-k}	1 ^f	8.20 ^{ijk}	5.36 ^{lm}
3	1.77 ^{cde}	1.60 ^{cd}	15.5 ^{e-h}	9.91 ^{def}
4	1.25 ^k	1.65 ^c	21.6 ^{de}	9.55 ^{fgh}
5	1.55 ^{e-1}	1.42 ^e	15.5 ^{e-h}	10.2 ^{de}
6	1.63 ^{d-g}	1.68 ^c	21.8 ^{de}	10.3 ^d
7	1.50 ^{f-k}	1 ^f	7.18 ^{jk}	6.18 ^j
8	1.54 ^{f-j}	1 ^f	11.6 ^{f-j}	5.50 ^{klm}
9	1.40 ^{g-1}	1 ^f	21.6 ^{de}	9.15 ^h
10	1.83 ^{bcd}	1 ^f	10.6 ^{g-j}	3.98 ⁿ
11	1.85 ^{bc}	1 ^f	15.1 ^{e-h}	3.93 ⁿ
12	1.32 ^{ijk}	1 ^f	16.7 ^{efg}	5.38 ^{lm}
13	1.54 ^{f-j}	1 ^f	32 ^{bc}	9.79 ^{efg}
14	1.36 ⁱ⁻¹	1 ^f	17.9 ^{ef}	5.39 ^{lm}
15	1.83 ^{bcd}	1 ^f	28 ^{bcd}	9.34 ^{gh}
16	1.36 ⁱ⁻¹	1 ^f	14.5 ^{f-i}	4.06 ⁿ
17	1.53 ^{f-j}	1 ^f	44.8 ^a	8.38 ⁱ
18	1.49 ^{f-k}	1 ^f	12 ^{f-j}	4.05 ⁿ
19	1.99 ^b	1.95 ^b	50.6 ^a	13.5 ^b
20	1.57 ^{e-1}	1 ^f	16.1 ^{e-h}	4.07 ⁿ
21	1.28 ^{jk}	1 ^f	7.94 ^{ijk}	5.10 ^m
22	1.68 ^{c-f}	1 ^f	33.5 ^b	6.40 ^j
23	2.90 ^a	1 ^f	30.1 ^{bc}	11.1 ^c
24	1.39 ^{h-1}	1 ^f	9.37 ^{h-k}	5.07 ^m
25	1.60 ^{e-h}	1 ^f	13.6 ^{f-j}	3.97 ⁿ
26	1.36 ⁱ⁻¹	1 ^f	25.5 ^{cd}	4.25 ⁿ
27	1.61 ^{e-h}	1 ^f	11.6 ^{f-j}	5.64 ^{lm}
28	1.47 ^{f-1}	2.23 ^a	28.8 ^{bc}	14.8 ^a
29	1.62 ^{e-h}	1.49 ^{de}	27.5 ^{bcd}	13.2 ^b
30	1.25 ^k	1 ^f	13.5 ^{f-j}	4.24 ⁿ

نشان داد و دارای R_f بالاتری نسبت به سایر جدایه‌ها بود که این الگو با ماهیت آمفی‌فیلیک ترکیبات گلیکولپیدی، به‌ویژه رامنولپیدها، همخوانی دارد. همچنین سویه شماره ۲۸ واکنش مثبت به فنول-سولفوریک اسید و ناین‌هیدرین و عدم واکنش به ید را نشان داد که مؤید غالب بودن اجزای قندی و پروتئینی و فقدان بخش لیپیدی قابل توجه است. R_f پایین‌تر این جدایه نیز با ماهیت غالباً قطبی بیوسورفکتانت‌هایی نظیر امولسان مطابقت دارد (جدول ۴). به‌طور کلی، با توجه به چندجزئی بودن بیوسورفکتانت‌های میکروبی، مقادیر R_f به‌صورت نسبی تفسیر شده و در کنار واکنش به شناساگرهای شیمیایی، به‌عنوان شاخص‌های مکمل برای شناسایی اولیه نوع بیوسورفکتانت‌ها به کار گرفته شدند (Satpute et al., 2010).

بررسی نوع بیوسورفکتانت تولیدشده توسط سویه‌های برتر با استفاده از آزمون کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) نشان داد که الگوی واکنش جدایه‌ها به شناساگرهای شیمیایی مختلف، همراه با مقادیر نسبی ضریب نگهداری^{۱۳} (R_f)، امکان طبقه‌بندی اولیه ترکیبات را فراهم می‌کند. سویه‌های شماره ۱۷ و ۲۳ در حضور هر سه شناساگر فنول-سولفوریک اسید، ناین‌هیدرین و ید واکنش مثبت نشان دادند که بیانگر حضور هم‌زمان اجزای قندی، پروتئینی و لیپیدی است. تحرک متوسط این ترکیبات روی صفحه سیلیکا با ماهیت چندجزئی و قطبیت بالای بیوسورفکتانت‌های پلیمری سازگار بوده و از این‌رو، این ترکیبات به‌عنوان بیوسورفکتانت‌های پلیمری از نوع لیپوگلیکوپروتئینی (بیوامولسیفایر) در نظر گرفته شدند. در مقابل، سویه شماره ۱۹ واکنش مثبت به شناساگرهای فنول-سولفوریک اسید و ید و واکنش منفی به ناین‌هیدرین

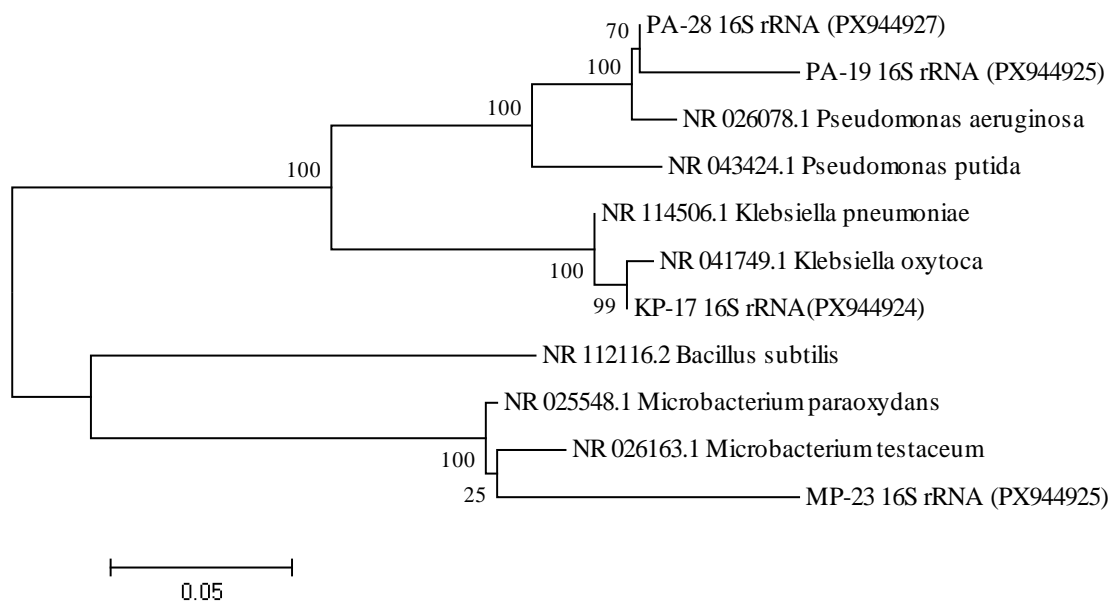
جدول ۴- آزمون کروماتوگرافی لایه نازک جهت شناسایی نوع بیوسورفکتانت‌های تولید در جدایه‌های برتر با استفاده از شناساگرهای مختلف

Table 4- Thin layer chromatography test for identification of the type of biosurfactants produced in the top isolates using different indicators

ضریب نگهداری (R_f) Retention factor	نوع ترکیب/بیوسورفکتانت احتمالی Possible type of biosurfactant	شناساگر Indicator			جدایه Isolate
		ید Iodine	ناین‌هیدرین Ninhydrin	فنول-سولفوریک اسید Phenol-sulfuric acid	
0.25-0.40	لیپوگلیکو پروتئین/امولسیفایر Lipoglycoprotein/Emulsifier	+	+	+	17
0.41-0.65	گلیکولپید/رامنولپید Glycolipid/Rhamnolipid	+	-	+	19
0.25-0.40	لیپوگلیکو پروتئین/امولسیفایر Lipoglycoprotein/Emulsifier	+	+	+	23
0.17-0.43	گلیکوپروتئین/امولسان-الاسان Glycoprotein/Emulsan- Alasan	-	+	+	28

جدایه‌های ۱۹ و ۲۸ در خوشه‌ای مشترک از جنس *Pseudomonas* و در نزدیکی گونه‌ی *Pseudomonas aeruginosa* (NR_026078.1) جای گرفتند، که نشان‌دهنده‌ی هم‌تبار بودن این دو جدایه و شباهت ژنتیکی بالای آن‌ها با *P. aeruginosa* است. جدایه‌ی ۲۳ در شاخه‌ای مجزا از جنس *Microbacterium* قرار گرفت. نتایج حاصل از تحلیل فیلوژنتیکی تأیید می‌کند که جدایه‌های بومی شناسایی شده به ترتیب متعلق به جنس‌های *Microbacterium* و *Klebsiella* هستند. هدف از این درخت، تعیین جایگاه نسبی سویه‌های مورد مطالعه در میان جنس‌های مختلف بوده و مقایسه درون‌جنسی مدنظر نبود. *Bacillus subtilis* به‌عنوان گونه خارج‌گروه^{۱۶} استفاده شد.

به‌منظور تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های بومی جداسازی‌شده، توالی ژن 16S rRNA آن‌ها تعیین و با توالی‌های مرجع موجود در پایگاه داده‌ی NCBI GenBank مقایسه گردید. هم‌ترازسازی چندگانه^{۱۴} با استفاده از الگوریتم ClustalW انجام شد و درخت فیلوژنتیکی با روش حداکثر احتمال^{۱۵} و با مدل جایگزینی Tamura-Nei در نرم‌افزار MEGA 6 ترسیم گردید. اعتبار شاخه‌ها با بوت‌استرپ بر پایه‌ی ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد تا اطمینان آماری ساختار درخت تضمین گردد. درخت حاصل جایگاه چهار جدایه‌ی مورد مطالعه را (PX944924- PX944927) نشان می‌دهد. جدایه‌ی شماره ۱۷ در شاخه‌ای با اطمینان بالای بوت‌استرپ (۹۹ درصد) در کنار گونه‌ی *Klebsiella oxytoca* (NR041749.1) قرار گرفت.



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه (PX944924- PX944927) جهت تعیین جایگاه نسبی آن‌ها بر اساس توالی ژن 16S rRNA به روش Maximum Likelihood.

Figure 1. Phylogenetic tree of the studied bacterial strains (PX944924- PX944927) for determining their relative position based on the 16S rRNA gene sequence using the Maximum Likelihood method

¹⁶ Outgroup

¹⁴ Multiple Sequence Alignment

¹⁵ Maximum Likelihood

نتایج کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که بین ترکیب شیمیایی بیوسورفکتانت‌ها و توانایی کاهش کشش سطحی در آزمون‌های پخش نفت و پاشش قطره ارتباط مستقیمی وجود دارد. سویه‌های شماره ۱۷ و ۲۳ که در آزمون‌های فنول-سولفوریک‌اسید، ناین هیدرین و ید هر سه واکنش مثبت نشان دادند، احتمالاً بیوسورفکتانت‌های پلیمری از نوع لیپوگلیکوپروتئین تولید کرده‌اند. این گروه از ترکیبات معمولاً پتانسیل امولسیون‌سازی بالایی دارند و قادرند فازهای آبی و آلی را به‌طور پایدار مخلوط نگه دارند، بنابراین برای فرآیندهای زیستی مانند پالایش و افزایش استخراج نفت بسیار ارزشمندند (Begum et al., 2023). در مقابل، سویه ۱۹ که در آزمون‌های فنول-سولفوریک‌اسید و ید مثبت بود، نشان‌دهنده تولید گلیکولیپیدهایی از نوع رامنولیپید است؛ ترکیباتی که به‌ویژه در گونه‌های *Pseudomonas* شایع بوده و یکی از قوی‌ترین بیوسورفکتانت‌های شناخته‌شده از نظر کاهش کشش سطحی محسوب می‌شوند (Shaimerdenova et al., 2024). این موضوع با نتایج آزمون پخش نفت که در آن سویه ۱۹ بالاترین قطر پخش را داشت، همخوانی کامل دارد و تأکید می‌کند که ساختار گلیکولیپیدی موجب کارایی بالاتر در کاهش کشش سطحی می‌شود. از سوی دیگر، سویه ۲۸ که نسبت به شناساگرهای فنول-سولفوریک‌اسید و ناین هیدرین واکنش مثبت داشت، احتمالاً ترکیباتی از نوع امولسان یا بیوسورفکتانت‌های دارای گروه‌های قندی و پپتیدی تولید می‌کند. این ترکیبات معمولاً نسبت به گلیکولیپیدها بار سطحی قوی‌تری ندارند، اما پایداری بالاتری در امولسیون‌ها نشان می‌دهند (Sharma et al., 2023). در مجموع، هم‌پوشانی داده‌های حاصل از TLC با آزمون‌های عملکردی مانند پخش نفت و پاشش قطره نشان می‌دهد که تنوع ساختاری بیوسورفکتانت‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در کارکرد

فیزیکوشیمیایی آن‌ها دارد (Li et al., 2023). این نتایج تأیید می‌کند که سویه‌های ۱۹ و ۱۷ به‌ترتیب نماینده تولید گلیکولیپید و لیپوگلیکوپروتئین با پتانسیل اولیه برای توسعه در مقیاس صنعتی هستند. بررسی‌های آینده شامل طیف‌سنجی جرمی (LC-MS) و آنالیز FTIR می‌تواند نوع دقیق پیوندها و گروه‌های عاملی را تعیین کند تا کارایی این ترکیبات در کاربردهای زیست‌فناورانه، به‌ویژه در افزایش فراهمی و جذب عناصر ریزمغذی، به‌صورت دقیق‌تر ارزیابی شود. یکی از محدودیت‌های این مطالعه، عدم استفاده از کنترل مثبت استاندارد (شیمیایی یا بیولوژیک) در آزمون‌های غربالگری شامل پخش نفت، پاشش قطره و CTAB است. این انتخاب به دلیل هدف اصلی مطالعه که غربالگری اولیه و شناسایی کیفی/نیمه‌کمی سویه‌های بومی بوده است، اتخاذ شد؛ بنابراین، نتایج ارائه‌شده صرفاً به‌صورت مقایسه نسبی بین جدایه‌ها قابل تفسیر هستند و قدرت عملکرد سویه‌ها نسبت به استانداردهای تجاری یا شیمیایی تعیین نشده است. این محدودیت می‌تواند موضوعی برای مطالعات آتی باشد تا عملکرد کمی و مقایسه با کنترل‌های استاندارد مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی در تداوم یافته‌های کروماتوگرافی و آزمون‌های عملکردی، هم‌تراز با ویژگی‌های بیوسورفکتانت تولیدی هر سویه بود. حضور جدایه‌های ۱۹ و ۲۸ در خوشه‌ی *Pseudomonas* با توان بالای کاهش کشش سطحی و تولید گلیکولیپیدها سازگار است، زیرا این جنس به‌طور شناخته‌شده‌ای تولیدکننده‌ی رامنولیپیدها است. در مقابل، جدایه‌ی ۱۷ از جنس *Klebsiella* که بیوسورفکتانت‌های لیپوگلیکوپروتئینی تولید کرد، با نقش غالب این جنس در تولید امولسیفایرهای پلیمری همخوانی دارد. همچنین، شناسایی جدایه ۲۳ به‌عنوان *Microbacterium* تولیدکننده‌ی ترکیبات مختلط پروتئینی-قندی، نشانگر تنوع بیوسنتزی میان

جدایه‌های بومی و ارزش بالقوه‌ی آن‌ها برای کاربردهای زیستی است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، مجموعه‌ای از باکتری‌های جداشده از محیط‌های آلوده به هیدروکربن با بهره‌گیری از آزمون‌های فیزیکوشیمیایی، کروماتوگرافی و فیلوژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند تا توان بالقوه آن‌ها در تولید بیوسورفکتانت مشخص شود. نتایج نشان داد که جدایه‌ها از نظر ساختار، نوع و کارایی بیوسورفکتانت‌ها تنوع قابل توجهی دارند. سویه‌های ۱۷ و ۱۹ که از پسماند زیتون جداسازی شدند، شامل *Klebsiella* و *Pseudomonas* بومی بودند و به ترتیب به تولید بیوسورفکتانت‌های پلیمری/لیپوگلیکوپروتئینی و گلیکولیپیدها با توانایی کاهش کشش سطحی بالا مرتبط بودند. در مقابل، سویه‌های ۲۳ و ۲۸ که از خاک آلوده به نفت جدایه شدند، شامل *Pseudomonas* و *Microbacterium* بودند و بیشترین توانایی در تولید لیپوگلیکوپروتئین و گلیکوپروتئین و توانایی بالقوه امولسیون‌کنندگی نشان

دادند. هم‌ترازی نتایج کروماتوگرافی لایه نازک، آزمون‌های پخش نفت، پاشش قطره و همولیز با یافته‌های فیلوژنتیکی، مؤید نقش تعیین‌کننده منشأ تبارشناختی و اکولوژیک در نوع و عملکرد بیوسورفکتانت‌ها بود. به طور کلی، جدایه‌های شناسایی شده، به‌ویژه سویه‌های ۱۷، ۱۹، ۲۳ و ۲۸، گزینه‌هایی ارزشمند برای توسعه بیوسورفکتانت‌های بومی در کاربردهایی مانند زیست‌پالایی هیدروکربن‌ها، بهبود جذب عناصر غذایی و تولید زیست‌کودهای مبتنی بر یوسورفکتانت‌ها به شمار می‌آیند. این نتایج مسیر تحقیقات آینده را برای بهینه‌سازی تولید، خالص‌سازی و ارزیابی تولید اقتصادی کاربری صنعتی این بیوسورفکتانت‌ها با هموار می‌کند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی در خصوص انتشار این مقاله وجود ندارد.

References

1. Ali, S. A. M., Sayyed, R. Z., Mir, M. I., Mir, M., Khan, M. Y., Bee, H. and Poczai, P., 2022. Induction of systemic resistance in maize and antibiofilm activity of surfactin from *Bacillus velezensis* MS20. *Frontiers in Microbiology*, 13, 879739, pp.1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.879739>
2. Begum, W., Saha, B. and Mandal, U., 2023. A comprehensive review on production of bio-surfactants by biodegradation of waste carbohydrate feedstocks: an approach towards sustainable development. *RSC Advances*, 13(36), pp.25599–25615. <https://doi.org/10.1039/D3RA05051C>
3. Borah, S. N., Goswami, D., Sarma, H. K., Cameotra, S. S. and Deka, S., 2016. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides*: potential biocontrol agent. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1505, pp.1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01505>
4. Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Álvarez, S. I. and Giulietti, A. M., 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), pp.82–84. <https://doi.org/10.1007/BF00327807>
5. Dini, S., Bekhit, A.-E.-D. A., Roohinejad, S., Vale, J. M. and Agyei, D., 2024. The physicochemical and functional properties of biosurfactants: a review. *Molecules*, 29(11), 2544, pp.1–37. <https://doi.org/10.3390/molecules29112544>
6. Ebadi, A., Olamaee, M., Khoshkholgh Sima, N. A., Ghorbani Nasrabadi, R. and Hashemi, M., 2018. Isolation and characterization of biosurfactant producing and crude oil degrading bacteria from oil contaminated soils. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42(3), pp.1149–1156. <https://doi.org/10.1007/s40995-018-0521-8>
7. Garg, R., Garg, R., Anjum, A., Eddy, N.O. and Watandost, H., 2025. Comprehensive review of the synthesis and sustainable applications of biosurfactants. *Discover Applied Sciences*, 7(10), p.1168. <https://doi.org/10.1007/s42452-025-07603-z>
8. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Khosravi, H., Asgharzadeh, A., Faridian, L. (2025). 'Enhancing agricultural productivity using PGPR and nanoparticles: mechanisms, challenges, and future directions', *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp. 279-313. (In Persian). doi: 10.22092/sbj.2025.368425.277
9. Khosravi, H., Otadi, A., Alikhani, H., Etesami, H. (2025). 'Evaluation and Comparative Analysis of Plant Growth-Promoting Traits in Diverse Groups of Rhizosphere Bacteria', *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp. 235-260. (In Persian). doi: 10.22092/sbj.2025.367286.271
10. Lahiji, A., Rejali, F. (2025). 'Investigating the effect of biofertilizers on improving the absorption of nutrients, growth and yield of hazelnut (*Corylus avellana* L.) trees in Eshkavrat area of Rudsar city in Gilan province', *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp. 213-233. (In Persian). doi: 10.22092/sbj.2024.366006.264
11. Li, H., Fang, C., Liu, X., Bao, K., Li, Y. and Bao, M., 2023. Quantitative analysis of biosurfactants in water samples by a modified oil spreading technique. *RSC Advances*, 13(15), pp.9933–9944. <https://doi.org/10.1039/D3RA00102D>
12. Markam, S. S., Raj, A., Kumar, A. and Khan, M. L., 2024. Microbial biosurfactants: Green alternatives and sustainable solution for augmenting pesticide remediation and management of organic waste. *Current Research in Microbial Sciences*, 13, 100266, pp.1–14. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100266>
13. Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P. and Ongena, M., 2012. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant-beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), pp.176–191. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x>
14. Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z. and Cameotra, S. S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), pp.633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
15. Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., and Chopade, B. A., 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews*

- in biotechnology*, 30(2), pp.127-144.
<https://doi.org/10.3109/07388550903427280>
16. Sass, G., Groleau, M.C., Déziel, E. and Stevens, D.A., 2023. Simple method for quantification of anionic biosurfactants in aqueous solutions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, Article 1253652, pp.1–10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1253652>
 17. Siegmund, I. and Wagner, F., 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4), pp.265–268. <https://doi.org/10.1007/BF00165127>
 18. Shaimerdenova, U., Kaiyrmanova, G., Lewandowska, W., Bartoszewicz, M., Swiecicka, I. and Yernazarova, A., 2024. Biosurfactant and biopolymer producing microorganisms from West Kazakhstan oilfield. *Scientific Reports*, 14(1), 2294, pp.1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52906-7>
 19. Sharma, N., Lavania, M. and Lal, B., 2023. Biosurfactant: an emerging tool for the petroleum industries. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1254557, pp.1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254557>
 20. Singh, A., Van Hamme, J. D. and Ward, O. P., 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25(1), pp.99–121. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.10.004>
 21. Singh, R., Glick, B. R. and Rathore, D., 2018. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: A review. *Pedosphere*, 28(4), pp.561–576. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60029-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60029-1)
 22. Stacey, S. P., McLaughlin, M. J., Hettiarachchi, G. M. and Lombi, E., 2008. Root uptake of lipophilic zinc–rhamnolipid complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), pp.5775–5781. <https://doi.org/10.1021/jf0729311>
 23. Sun, W., Cao, W., Jiang, M., Saren, G., Liu, J., Cao, J. and Naz, I., 2018. Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading *Pseudomonas* sp. CQ2 from Changqing oil field, China. *RSC Advances*, 8(69), pp.39710–39720. <https://doi.org/10.1039/C8RA06917J>
 24. Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M. and McInerney, M. J., 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), pp.339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>
 25. Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T. and Scherr, K.E., 2012. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*, 209, pp.138–146. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.08.058>