Kerman University of Medical Sciences

Pharmaceutics Research Center

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مرکز توسعه تحقیقات و فناوری دانش بنیان
کتابخانه مرکزی

In Partial Fulfillment

of the Requirements for the Degree of

Doctor of Philosophy in pharmaceutics

Title:
Isolation and identification of biosurfactant-producing bacterial strain from oil contaminated soil samples, characterization of produced biosurfactant and evaluation of factors affecting on biosurfactant production

By: Mandana Ohadi

Supervisors:

Dr. Gholamreza Dehghannoudeh

Dr.Hamid Forootanfar

Advisor:

Dr. Mojtaba Shakibaie

Year: 2018

چکیده:

مقدمه و اهداف: بیوسورفکتانت ها ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم ها هستند که دارای دو بخش هیدوفوب و هیدروفیل هستند و می توانند کشش سطحی و بین سطحی بین مایعات را کاهش دهند. در این مطالعه سویه مولد بیوسورفکتنت از نمونه های خاک آلوده به آلاینده های نفتی درجنوب ایران جداسازی و شناسایی شده، و بررسی فاکتورهای موثر بر تولید آن وهمچنین خصوصیات بیوسورفکتنت تولیدی، مورد بررسی قرار گرفته است. در پژوهش حاضر خواص آنتی اکسیدانی بیوسورفکتانت استخراج شده و تاثیر آن برترمیم زخم برشی پوست در در آزمایشات درون تنی و برون تنی موردبررسی قرار گرفته است.

روشها: غنی سازی محیط کشت معدنی توسط نفت خام (۱درصد) جهت جداسازی باکتری مصرف کننده نفت به عنوان تنها منبع کربن و تولید کننده بیوسورفکتانت انجام شد. خصوصیات فیزیکوشیمیای (تعیین غلظت بحرانی میسل و HLB) و همچنین ساختار بیوسورفکتانت تولید شده با استفاده از آزمون های FTIR, ^{1}HNMR, UV, CD, HPTLC مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین رفتار تجمعی بیوسورفکتانت تولید شده در محلول نمکِ فسفات با استفاده از روشهای DLS, TEM و سنجش میزان کدورت مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی خواص آنتی اکسیدانی لیپوپپتید بیوسورفکتانت از دو روش FRAP و DPPH استفاده شد. جهت بررسی میزان ترمیم زخم بیوسورفکتانت تولید شده از۳۶ رت نر نژاد ویستار (که قبلا زخم دایره ای در ناحیه قفسه سینه ایجاد شده است) استفاده شد.حیوانات به شش گروه کاملا تصادفی تقسیم شده و سنجش میزان تغییرات سطح بیرونی زخم ها وآزمایشات هیستوپاتولوژیکال جهت تعیین میزان بهبودی زخم انجام شد. سنجش تنش های اکسیداتیو پس از ترمیم بافت توسط بیوسورفکتانت تولیدی با استفاده از بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین تعیین میزان گلوتاتیون و پراکسید هیدروژن مورد بررسی قرار گرفت. و همچنین سمیت حاد بیوسورفکتانت بررسی شد.

یافته ها: بر اساس یافته های مولکولی و بیوشیمیایی سویه منتخب به عنوان اسینتوباکتر جوینی B6 شناسایی شد. با استفاده از روش آماری فاکتوریل دو سطحی میزان کشش سطحی در شرایط بهینه ($NaNO_3$ ۲ گرم بر لیتر، دما ۲۵ درجه سانتی گراد، دور شیکر ۳۰۰ rpm، نفت ۵ درصد و میزان تلقیح ۲ درصد) به ۳۸ میلی نیوتون بر مترمربع کاهش یافت. بر اساس آنالیز گاز کروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی سویه اسینتوباکتر جوینی B6 قادر به تجزیه ترکیبات آلکانی در نفت خام به عنوان تنها منبع کربن می باشد. از استخراج حلالی برای جداسازی بیوسورفکتانت از محیط کشت استفاده شد. بیوسورفکتنت جداسازی شده بر اساس روشهای آنالیتیکال به عنوان یک کمپلکس لیپوپپتیدی شناسایی شد. غلظت بحرانی میسل لیپوپپتید بیوسورفکتنت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. تشکیل ساختارهای میسلی در غلظت بالاتر از غلظت بحرانی میسل کاملا مشهود بود و با استفاده از روش طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ساختارغالب دوم لیپوپپتید بیوسورفکتنت صفحات بتا تعیین شد. HLB بیوسورفکتانت تولید شده حدود ۱۰ مشخص گردید که مشحصه امولسیون روغن در آب می باشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که لیپوپپتید بیوسورفکتانت تولید شده دارای اثر آنتی اکسیدانی قوی می باشد که وابسته به دوز اثر می کند. مقدار IC50 حدود ۰/۷ میلیگرم در میلی لیتر بدست آمد. بهترین نتایج هیستوپاتولوژیک پس از درمان با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر لیپوپپتید بیوسورفکتانت به دست آمد. در منطقه زخم گروه درمان شده با لیپوپپتید بیوسورفکتانت (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) در روز ۱۳علاوه بر این که کمترین میزان ضایعه دیده می شد، افزایش مجدد اپیتلیالیزاسیون، تشخیص فولیکول مو و ناپدید شدن سلول

های التهابی کاملا مشهود بود. نتایج حاصل از سطوح MDA، H_2O_2 و GSH نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی قوی لیپوپپتید بیوسورفکتانت از طریق مهار رادیکالهای اکسیژن آزاد بود.
نتیجه گیری: بر اساس نتایج حاصل می توان استنباط کرد که سویه شناسایی شده و همچنین لیپوپپتید بیوسورفکتانت تولیدی در صنایع مختلف مانند صنعت نفت و داروسازی کاربرد دارد.
کلمات کلیدی: لیپوپپتید بیوسورفکتانت، اسینتو باکتر جوینی، رفتار تجمعی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ترمیم زخم، استرسهای اکسیداتیو

Abstract

Background and Objectives: Microbial derived biosurfactants are amphipathic molecules consisting of both the hydrophobic and hydrophilic domains which allow them to be aggregated at interfaces of immiscible liquids such as water and oil. The study focused on isolation and identification of biosurfactant-producing bacterial strain from oil contaminated soil samples, characterization of produced biosurfactant and evaluation of factors affecting on biosurfactant production and also antioxidant potential and wound healing activity of produced biosurfactant.

Methods: An enrichment program for hydrocarbon-utilizing bacteria capable of biosurfactant production isolated from soil samples was carried out on mineral salt medium supplemented with ILCO, 1%. The organic solvent extraction method was performed in order to extract the biosurfactant. Produced biosurfactant was characterized by physicochemical properties and analytical characterization such as FTIR, ^{1}HNMR, HPTLC, CD and UV spectroscopy. The aggregation behavior of the biosurfactant was evaluated in a PBS solution (pH 7.4) by using DLS technique, turbidity measurement, and TEM inspection. DPPH radical scavenging activities and FRAP assays were used to measure the antioxidant properties. To evaluate the wound healing activity, 36 rats (previously wounded in the depilated thoracic region) were randomly distributed into six groups and chromatic, wound contraction, and histopathological feature were examined. Assessments the level of ROS after biosurfactant exposure were determined using MDA, H_2O_2, and glutathione GSH assay kits. In addition, the acute toxicity of the obtained biosurfactant was also determined.

Results: The most promising isolate was identified as *Acinetobacter junii* B6 using 16S rDNA sequencing and biochemical characterization .Application of two-level fractional factorial design showed that surface tension of culture broth was maximally reduced to 38 mN/m in the optimize condition (NaNO3 2 g/L, ILCO 5%, temperature of 25 °C, aeration rate of 300 rpm, and inoculum size of 2%). GC-MS analysis of the culture broth showed the ability of *A. junii* B6 to degrade most of the alkanes' components of ILCO when used as sole carbon source. According to the analytical characterization, the biosurfactant was lipopeptide compound. The produced biosurfactant decreased the surface tension of water to 36 mN m^{-1} with the CMC of approximately 300 mg/l. The biosurfactant showed the spherical-shaped vesicles at a concentration higher than its CMC and the circular dichroism (CD) spectra showed that the secondary structure of the biosurfactant vesicles is dominated by the β sheet. The biosurfactant showed an HLB value of 10 that reflects suitable O/W emulsifying property. DPPH assay showed notable scavenging activities at the corresponding concentrations with the IC50 value of 0.7 mg/ml. The best histopathological remission was achieved following treatment by 5 mg/ml of the LBS. Scar wounds at day 13 showed the lowest lesion sizes, increased re-epithelialization, hair follicle detection, and decreased amounts of neutrophilic inflammation, the immaturity of the wound bed, erythema, edema, capillary, and retention of necrotic tissue. Results from MDA, H_2O_2, and GSH levels of the treated sample confirmed the scavenging property of the bacterial - derived LBS through ROS

Conclusion: It can be concluded that both strain and product has potential applications in various industries such as oil and pharmaceutical.

Keywords: Lipopeptide biosurfactant; *Acinetobacter junni*; Aggregation behaviors; physicochemical properties; Wound healing; Oxidative stress.

تاریخ ۹۷/۲/۴

شماره ۳۲۹/۱۰/۱

پیوست .....

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی خانم **ماندانا اوحدی** دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی (Ph.D.) رشته **فارماسیوتیکس مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس** دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان **"جداسازی و شناسایی سویه مولد بیوسورفکتنت از نمونه های خاک به آلاینده های نفتی، تعیین خصوصیات بیوسورفکتنت تولیدی، بررسی فاکتورهای موثر بر تولید آن"** درساعت **چهارشنبه** مورخ **۹۷/۱/۲۹** با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف:استاد(ان) راهنما	۱- دکتر غلامرضا دهقان نوده ۲- دکتر حمید فروتن فر	
ب: استاد(ان) مشاور	دکتر مجتبی شکیبایی	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	دکتر صالحه صبوری	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	دکتر بهزاد بهنام	
د :عضو هیات داوران (خارجی)	دکتر محمدعلی فرامرزی	
د :عضو هیات داوران (خارجی)	دکتربی بی صدیقه فضلی بزاز	
عضو هیات داوران (خارجی)	دکتر حسن شاهیان	
ه :نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر بهزاد بهنام	
نماینده مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس	دکتر غلامرضا دهقان نوده	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه ..... الف - عالی ..... و نمره ..... ۲۰ بیست ..... مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

دانشکده داروسازی