Archive of SID

فصلنامه علمی – پژوهشی «دانش زیستی ایران» - جلد ۳/ شماره ۱/ بهار ۱۳۸۷

بررسی نقش باکتری‌های جداشده از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در پاک‌سازی محیط زیست

سمیه وحید[۱]، عباس اخوان سپهی [*۲]، اشرف السادات نوحی[۳]

۱-کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۲- استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۳- استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

مکان انجام تحقیق: آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی تهران شمال

***مسؤول مکاتبات**: دکتر عباس اخوان سپهی، تهران، میدان قدس، خیابان دربند، کوچه پرتوی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران شمال، پست الکترونیکی: bioabbas@tco.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱/۲۵

چکیده

هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتری‌های مصرف‌کننده نفت به‌عنوان منبع انرژی و کربن و تجزیه آن به مواد قابل بازیافت و شناسایی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت است. برای این منظور از خاک‌ها و آب‌های آلوده به ترکیبات نفتی سبک و سنگین نمونه‌گیری به‌عمل آمد. برای جداسازی باکتری‌ها از خاک و آب آلوده, نمونه‌ها پس از تهیه رقت، کشت داده و برای افزایش تعداد باکتری‌های جدا شده، نمونه‌ها در محیط کشت MS1، غنی‌سازی، و در محیط کشت آگار+ ۱٪ نفت خام استریل کشت داده شدند. سپس از محیط آگار خون‌دار و محیط MSS +۱٪ عصاره مخمر استفاده شد و با بررسی سمیت نفت خام، اندازه‌گیری تولید بیوسورفکتانت در غلظت‌های مختلف نمک و فعالیت امولسیفیه‌کنندگی، سویه‌ای که بالاترین نتایج مربوط به آن بود به‌عنوان بهترین سویه مولد بیوسورفکتانت انتخاب شد. در نهایت با استفاده از تعیین توالی 16SrRNA هویت باکتری منتخب تحت عنوان سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه زیستی، نفت خام، بیوسورفکتانت

مقدمه

امروزه ترکیبات نفتی، محیط‌های آبی و خاکی پیرامون ما را به‌شدت آلوده کرده‌اند و آلودگی‌های نفتی، یکی از معضلات جوامع پیشرفته است. در خاک، میکروارگانیسم‌های مختلفی وجود دارند که قادرند در اثر تماس طولانی‌مدت با مشتقات نفتی, از هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک به‌عنوان منبع کربن استفاده نموده و خاک‌های آلوده به نفت و مشتقات آن نظیر بنزین، نفت کوره، گازوئیل و ... را پاک‌سازی کنند. مساله اصلی، پیداکردن بهترین میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی و سپس بهترین شرایط برای رشد آن‌ها است.

پاک‌سازی زیستی، تکنیکی است که می‌تواند برای جابه‌جایی روغن و نفت زاید تحت شرایط محیطی و جغرافیایی با استفاده از فعالیت طبیعی میکروارگانیسم‌ها مفید باشد. بسیاری از ترکیبات در روغن برای محیط زیست بی‌خطرند, ولی اجزای شاخص آن، موتاژن یا سمی هستند. پاک‌سازی زیستی

www.SID.ir

Archive of SID

(Bioremediation) تکنیکی است که تبدیل ترکیبات سمی به غیرسمی را بدون آلودگی بیشتر انجام می‌دهد (۱).

از میان تمام آلوده‌کننده‌ها، نفت و هیدروکربورهای نفتی، از نظر علمی و اقتصادی دارای اهمیت بین‌المللی خاصی است. از میلیون‌ها سال قبل، نشت نفت از منابع مختلف به‌داخل آب و خاک به‌عنوان آشکارترین نوع آلودگی وجود داشته است. این پدیده بر اثر سوراخ شدن منابع نفتی به‌وجود می‌آید, اما با در نظر گرفتن مقدار کل نفت ورودی، جزو مهم‌ترین انواع آلودگی به‌شمار نمی‌آید (۲). تجزیه بیولوژیک، یکی از روش‌های تقریباً جدید در پاک‌سازی محیط زیست از آلودگی‌های نفتی است که توسط تعدادی از میکروارگانیسم‌ها انجام می‌گیرد و از سایر روش‌ها کاربردی‌تر و دارای هزینه و عوارض خطرناک بعدی کمتری است. همچنین، مواد حاصل از تجزیه ترکیبات نفتی به‌جا مانده، نه تنها باعث دردسر نمی‌شوند، بلکه قابلیت بازیافت و استفاده بعدی را نیز دارند.

مهمترین عوامل موثر بر تجزیه بیولوژیک، نوع ترکیب نفتی و میزان هوا خوردن آن‌ها است.

هوا خوردن باعث تبخیر سریع‌تر ترکیبات نفتی سمی شده و در آب‌های گرم با انجام سرعت بیشتر، روند کاهش سمیت این مواد بیشتر می‌شود.

میزان اکسیژن در روند تجزیه، نقش به‌سزایی دارد؛ چرا که در اعماق به‌علت عدم وجود اختلاط آب، اکسیژن کافی جهت انجام عمل تجزیه وجود ندارد، به‌خصوص این‌که در این مناطق، مواد نفتی به‌صورت امولسیون آب در نفت است. تحت این شرایط، به‌علت کمبود اکسیژن، نرخ تجزیه بیولوژیکی کاهش می‌یابد و هیدروکربن‌ها در دریا پایدار می‌مانند.

میکروارگانیسم‌ها علاوه بر اکسیژن به مواد دیگری همچون نیتروژن، گوگرد، مواد فسفردار، کلسیم و فلزات سنگین نیازمندند. به‌علت اتصال محکم این‌گونه مواد به ملکول‌ها, دسترسی باکتری‌ها به آن‌ها مشکل است. این عمل را می‌توان در محل‌هایی که به مواد نفتی آلوده شده‌اند با افزایش کودهای فسفاته و ازته بهبود بخشید (۳).

خواص فیزیکی و شیمیایی نفت خام

وزن مخصوص (چگالی)، گرانروی، نقطه ریزش (سیلان) و درجه حرارت تقطیر جزئی، خواص فیزیکی نفت‌خام است. نفت خام ترکیب پیچیده‌ای از هیدروکربن‌ها با وزن ملکولی ۱۰۰۰۰۰-۱۶ بوده و علاوه بر کربن و هیدروژن، دارای مقادیر قلیلی اکسیژن، گوگرد، نیتروژن و نیز مقادیر اندکی فلزات است. علت تنوع هیدروکربورهای نفت خام به‌واسطه مقدار اتم‌های هیدروژن و کربن موجود در آن است و نفت‌خام از اجزای مختلفی شامل گازهای تصفیه شده، بنزین, نفت، نفت سفید، روغن‌های گازی‌شکل, روغن ماشین و روغن‌های باقی‌مانده تشکیل می‌شود.

محصولات هرز و بی‌فایده حاصل از مصارف انسانی، همواره مشکلی بزرگ بوده که محدوده آن از محصولات هرز باقی‌مانده از مصارف انسانی تا ضایعات هسته‌ای را شامل می‌شود. امروزه توجه بشر به پاک‌سازی زیستی جلب شده که هر دو نوع تغییرشکل و تجزیه آلودگی شیمیایی خطرناک یا بی‌خطر را شامل می‌شود. در این روش عموماً از باکتری‌ها استفاده می‌شود, ولی استفاده از قارچ‌ها و جلبک‌ها وگیاهان نیز در برخی موارد گزارش شده است (۴).

سه دسته‌بندی برای پاک‌سازی زیستی وجود دارد:

۱-تغییرشکل زیستی

۲-تجزیه زیستی

۳-معدنی‌شدن

این طبقه‌بندی به دو صورت در محل (In situ) و در بیرون (Ex situ) است.

گروه گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها ترکیبات فعال‌کننده سطحی(Surface active compound) به‌نام بیوسورفکتانت ترشح می‌کنند. ترشح این ترکیبات توسط سلول‌های میکروبی باعث سهولت در جذب سوبستراهای غیر قابل حل می‌شود. اهمیت

www.SID.ir

Archive of SID

بیوسورفکتانت‌های بیولوژیک در مقایسه با انواع سنتزی در این است که از نظر نوع و خصوصیت نسبت به انواع سنتزی، گستردگی بیشتری دارند و از طریق بیولوژیک هم قابل‌تجزیه‌اند. ارزشمندترین جنبه کاربردی بیوسورفکتانت‌ها در صنعت نفت است که جهت بهبود کیفیت، تسهیل در استخراج و تقلیل ویسکوزیته (روانی) استفاده می‌شوند (۵).

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات آمفی‌پاتیک (دوقطبی) میکروبی هستند که یک بخش آب‌دوست (هیدروفیلیک) و یک بخش آبگریز (هیدروفوبیک) دارند. بخش هیدروفوبیک عمدتاً یک زنجیره هیدروکربنی است، اما بخش‌های هیدروفیلیک، تنوع بسیار فراوانی دارند و باعث کاهش کشش سطحی و کشش بین دو سطح می‌شوند. غالباً بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات لیپیدی هستند و خصوصیات آن‌ها به بخش‌های قطبی و غیرقطبی در مولکول بستگی دارد. اهمیت بیوسورفکتانت‌ها از آن جهت است که از نظر خصوصیت، گستردگی بیشتری نسبت به انواع سنتزی دارند و مهمتر این‌که از طریق بیولوژیک قابل‌تجزیه‌اند و بدین ترتیب با استفاده از آن‌ها دیگر مشکل دیرپا بودن بیوسورفکتانت‌های سنتزی و آلودگی محیطی را نخواهیم داشت. از طرف دیگر، می‌توان با استفاده از منابع ارزان قیمت، این ترکیبات را تولید کرد و با تغییر کارآیی و ساختمان بیوسورفکتانت حاصله را تغییر داد.

این ملکول‌ها به‌علت دوقطبی بودن ترجیحاً تمایل دارند در سطح بین مایع با هوا یا بین مایعات با درجه قطبیت و باندهای هیدروژنی مختلف مانند آب/هوا یا آب/نفت قرار گیرند. تشکیل چنین لایه مولکولی منظمی در اینترفاز سبب کاهش انرژی سطحی و بین سطحی شده و عامل ویژگی‌های منحصر به‌فرد مولکول‌های سورفکتانت است.

بیشترین کاربرد و میزان فروش بیوسورفکتانت‌ها در صنعت نفت است، چون در فرمولاسیون و تولید نفت نقش دارند. از میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت می‌توان جهت پاک‌سازی محیطی استفاده نمود. با افزودن ارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت، پاک‌سازی آلودگی‌های ناشی از نشت نفت در محیط‌های آبی و خاکی سرعت بیشتری پیدا می‌کند (۶).

مواد و روش‌ها

انتخاب نقاط نمونه‌برداری در مناطقی که برای جداسازی باکتری از نمونه‌ها و منابع محیطی انتخاب شده‌اند یکی از مراحل مهم محسوب می‌شود و در موفقیت یا عدم آن نقش اصلی را دارد. برای انجام این پروژه از محیط‌های مختلف، شامل خاک‌ها و آب‌های آلوده به ترکیبات نفتی، نفت خام سبک و سنگین، محل‌های نشت دائمی خطوط انتقال ترکیبات نفتی و خاک‌ها نمونه‌گیری به‌عمل آمد از آب‌های غیرآلوده به ترکیبات نفتی نیز جهت ارزیابی و نمونه شاهد استفاده شد. مهمترین نقاطی که نمونه‌برداری از آن‌ها انجام شد، عبارتند از: لجن آلوده به نفت از بخش سرچاه و خاک‌های آلوده به نفت تعدادی از چاه‌های حوزه نفتی (۱۰ ایستگاه) در منطقه مسجد سلیمان، خاک‌های آلوده به گازوئیل اطراف تانک‌های ذخیره گازوئیل از پمپ بنزین‌ها، خاک آلوده به روغن اطراف تعویض روغنی‌ها.

تمامی مناطق فوق‌الذکر دارای سابقه آلودگی طولانی‌مدت به ترکیبات نفتی هستند؛ به‌طوری‌که برخی از آن‌ها مانند نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق نفتی جنوب به‌مدت بیش از ۳۰ سال در معرض آلودگی به ترکیبات نفتی، عمدتاً نفت خام بوده‌اند.

از نمونه‌های غیرآلوده به نفت نیز می‌توان به نمونه آب از رودخانه‌ها، نمونه آب و خاک از پارک‌ها، فضاهای سبز و نمونه خاک تعدادی از باغات حومه شهر اشاره نمود که همگی فاقد آلودگی عمده به ترکیبات نفتی بودند.

جهت نمونه‌برداری، از ظروف شیشه‌ای درب‌دار استفاده گردید. کلیه ظروف، قبل از استفاده به دفعات متوالی، اسیدشویی و سپس با آب شیر و آب مقطر آب‌کشی شدند و توسط اتوکلاو به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل گردیدند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در

www.SID.ir

Archive of SID

کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه، منتقل و در محیط مناسب، کشت داده شدند.

محیط‌های کشت

کلیه مواد و محیط کشت‌هایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند از محصولات شرکت Merck آلمان تهیه گردید.

برای جداسازی باکتری‌ها از آب یا خاک، از محیط آگار +۱٪ نفت و برای جداسازی قارچها از محیط ***PDA,***SDA استفاده گردید. برای تعیین فعالیت همولیزی آن‌ها نیز از محیط Blood Agar استفاده شد (۷).

به‌منظور افزایش دادن تعداد باکتری‌ها و بالا بردن احتمال جداسازی آن‌ها تمامی نمونه‌هایی که از منابع مختلف محیطی جمع‌آوری شده بودند، در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت، محیط نمک‌های معدنی MS1 کشت داده شدند که ترکیبات آن در یک لیتر آب مقطر به شرح زیر است:

Na_2HPo_4 (2.2 g), KH_2Po_4 (1.4 g), $MgSo_4$ (0.6 g), $(NH_4)_2So_4$ (3 g), NaCl (0.05 g), $CaCl_2$ (0.02 g), $FeSo_4$ (0.01 g)

کشت میکروبی

از محیط نوترینت آگار یا براث همراه با ۰٫۱٪ کلرید کلسیم به‌عنوان محرک پیگمان‌زایی برای کشت باکتری‌ها استفاده شد. برای تهیه مایع تلقیحی، باکتری‌های جدا شده به‌طور جداگانه در یک ارلن مایر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مناسب (آگار +۱٪نفت) به‌عنوان منبع کربن و انرژی در دمای ۳۵ درجه به‌مدت ۴۸ ساعت همراه با هوادهی کشت داده شدند و سپس میزان جذب نوری آن در طول موج ۴۵۰nm خوانده شد (۸).

غنی‌سازی

در روش غنی‌سازی، برای بالا بردن تعداد و افزایش احتمال جداسازی باکتری‌ها، تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت MS1 +۱٪ نفت که به‌عنوان منبع هیدروکربن است، کشت داده شدند. نفت خام (Crude Oil) با فیلتر غشایی (صافی میلی‌پور 0.45 µ) توسط سرنگ استریل به محیط فوق اضافه شد.

تائید ترشح بیوسورفکتانت با اندازه‌گیری کشش سطحی

برای اندازه‌گیری کشش سطحی از دستگاه Tensiometer استفاده شد و چون کشش سطحی، تابع درجه حرارت محیط است تمامی نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه اندازه‌گیری شد. ابتدا کشش سطحی نمونه کنترل (بدون تلقیح میکروبی) و بعد، نمونه‌های مورد آزمایش، اندازه‌گیری شد. برای این کار محیط کشت MSS (Mineral Salt Solution) استفاده شد که شامل ترکیبات زیر بر اساس گرم در لیتر آب مقطر بود (۹):

$MnSO_4$ (0.002 g), NaCl (0.1 g), $(NH_4)_2SO_4$ (3 g), K_2HPO_4 (5 g), $CaCl_2$ (0.01 g), $MgSO_4$ (0.2 g), $FeSO_4$ (0.01 g)

تست غربالگری

برای این تست از روش فعالیت همولیتیک استفاده شد. از آن‌جایی که این روش، ساده و سریع است، به‌عنوان معیار انتخاب باکتری مولد بیوسورفکتانت استفاده شد. برای این کار باکتری‌هایی که در مراحل قبلی جدا شده بود، در محیط کشت Blood Agar در دمای ۳۰ درجه به‌مدت ۷۲-۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. همولیز بتا که به‌صورت هاله نمایان می‌شود، نشان‌دهنده مثبت‌بودن فعالیت همولیتیک است و باکتری که فعالیت همولیتیک مثبت دارد، می‌تواند مولد بیوسورفکتانت باشد (۱۰).

بررسی سمیت نفت خام

بدین منظور یک کلنی از کشت خالص هر یک از سویه‌های جداشده به محیط نوترینت براث تلقیح

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. پس از آن‌که OD_{450} کشت مذکور به ۰,۸ یا ۰,۹ رسید، از آن به‌عنوان مایع تلقیح استفاده شد.

به دو ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری، ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS2 اضافه شد که این محیط کشت، دارای کلیه نمک‌های معدنی مورد نیاز برای رشد باکتری‌ها به‌علاوه سوکروز به‌عنوان یک منبع کربن سهل‌الوصول است که باکتری می‌تواند کلیه نیازهای متابولیکی خود را با استفاده از آن برآورده سازد که شامل ترکیبات زیر در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است:

KNO_3 (0.3 g), Na_2HPO_4 (0.22 g), KH_2PO_4 (0.13 g), NaCl (0.001 g), $MgSO_4$ (0.06 g), $CaCl_2$ (0.004 g), $FeSO_4$ (0.002 g), Sucrose (2 g), Trace Mineral Solution (1 ml)

به ارلن اول، ۱۰ میلی‌لیتر نفت خام پایدار اضافه شد و ارلن دوم که فاقد هرگونه برش نفتی بود، به‌عنوان شاهد نگهداری شد. میزان یک میلی‌لیتر از مایع تلقیح به هر یک از ۲ ارلن فوق اضافه شد و در شرایط یکسان در دمای ۳۰ درجه و با شیکر ۲۰۰ rpm قرار داده شدند. OD_{450} هر یک از نمونه‌ها پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد و به‌عنوان معیار رشد باکتری برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت (۱۱).

بررسی میزان تحمل نمک

برای اندازه‌گیری رشد و تولید بیوسورفکتانت در محیط نمکی و بررسی میزان تحمل باکتری در غلظت‌های مختلف نمک، باکتری‌های جداشده مراحل قبل، پس از کشت و رسیدن به OD_{450} مناسب (۰,۹-۰,۸) به ارلن‌های حاوی غلظت‌های مختلف نمک، اضافه گردید و پس از ۴۸ ساعت میزان جذب نوری آن‌ها مجدداً خوانده شد. مقادیر g\l ۰, ۲, ۴, ۶, ۸, ۱۰ نمک طعام در محیط MS1 در این مرحله استفاده شد (۱۱).

فعالیت امولسیفیه کنندگی

فعالیت امولسیفیه‌کنندگی که با ضریب امولسیفیکاسیون (EC) و به روش کوپر (Cooper) مشخص می‌شود، مقیاسی است برای نشان‌دادن توانایی بیوسورفکتانت حاصله در امولسیفیه کردن هیدروکربن‌های مختلف که علاوه بر فاکتورهای فوق، یکی از اندیکاتورهای متداول فعالیت سطحی بیوسورفکتانت به شمار می‌آید. برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه‌کنندگی از روش کوپر استفاده شد که ۴ میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعت باکتری را به‌همراه ۶ میلی‌لیتر هیدروکربن مورد نظر (هیدروکربن را به‌روش تندالیزاسیون) چند دقیقه در ۱۰۰ درجه، ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده می‌شود و این عمل به‌مدت سه روز تکرار می‌شود و با استفاده از بن‌ماری استریل شد (۲۰) در لوله آزمایش درب‌دار مدرج ریخته و به‌مدت ۲ دقیقه در شیکر هم‌زده و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت به‌حالت سکون قرار داده شد و طبق فرمول زیر Emulsification Capacity به‌دست آمد (۷).

EC = طول کل ستون مایع/ طول لایه امولسیفیه شده

در این بخش، هیدروکربن‌های مورد استفاده شامل نفت سنگین، نفت خام سبک و گازوئیل است.

تولید بیوسورفکتانت از هیدروکربن‌های غیرنفتی

برای سنجش تولید بیوسورفکتانت از هیدروکربن‌های غیرنفتی، از محیط کشت کوپر استفاده شد که علاوه بر املاح، حاوی قند گلوکز به‌عنوان منبع کربن است. کشش سطحی کشت ۲۴ ساعت باکتری در این محیط، معیار تولید بیوسورفکتانت است (۱۲).

اندازه‌گیری مقاومت گرمایی

برای اندازه‌گیری مقاومت گرمایی بیوسورفکتانت حاصله در مقابل درجه حرارت بالا، این ماده به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه قرار داده شد و کشش سطحی آن اندازه‌گیری شد. مایع کشت، شامل ۵۰۰ میلی‌لیتر کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط

www.SID.ir

Archive of SID

MS1 حاوی نفت بود که در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع‌آوری شد. رسوب حاصله مجدداً در ۵۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به‌صورت سوسپانسیون در آمده بود (۷).

بررسی اثر pH بر فعالیت بیوسورفکتانت حاصله

برای بررسی اثر pH بر فعالیت بیوسورفکتانت حاصله، کشش سطحی کشت ۴۸h باکتری در pH های مختلف ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ اندازه‌گیری شد. برای تنظیم pH از محلول‌های ۱M اسید کلریدریک و NaOH استفاده گردید (۱۳).

استخراج فرآورده

کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط برای استخراج بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا با استفاده از قیف دکانتور، باقی‌مانده هیدروکربن‌هایی مصرف نشده از کشت مجزا گردید. باقی‌ماندن این ترکیبات در محیط کشت سبب می‌شود که در حین استخراج وارد فاز آلی شده و چون تبخیر آن‌ها نیازمند زمان طولانی است، دچار مشکل خواهیم شد. ۲۰۰ میلی‌لیتر کشت باکتری به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ ومایع رویی جمع‌آوری شد. pH مایع با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال به ۲ رسانده شد و سپس دو بار و هر بار با مقدار دو برابر حجم اتیل اتر با استفاده از پمپ خلا استخراج شد و فاز آلی در دکانتور مجزا شده و حلال در دمای آزمایشگاه و توسط پمپ خلاتبخیر گردید و ۳ میلی‌لیتر دی‌کلرو متان نیز به باقی‌مانده درون ظرف افزوده و از نمونه به‌دست آمده، برای لکه‌گذاری در مراحل کروماتوگرافی استفاده شد (۸).

بررسی دینامیک تولید بیوسورفکتانت

جهت رسم منحنی رشد باکتری‌های انتخابی، از کشت خالص باکتری به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه و استریل MS1 تلقیح گردید و ۱ میلی‌لیتر نفت استریل به آن افزوده شد. از کشت ۴۸ ساعته فوق، پس از کشت خطی و اطمینان از خالص‌بودن، به‌عنوان مایع تلقیح استفاده شد. ۵ میلی‌لیتر مایع تلقیح به ۱ لیتر محیط MS1 افزوده شد و نیم ساعت به‌هم زده شد تا یکنواخت شود. سپس در ۲۰ ارلن ۵۰ میلی‌لیتری، تقسیم و به هر ارلن ۱ میلی‌لیتر نفت به‌عنوان منبع کربن افزوده شد و روی شیکر ۳۰درجه با ۲۰۰ rpm قرار داده شد و با فاصله زمانی ۶ ساعته OD_{450} و کشش سطحی آن‌ها اندازه‌گیری شد و از میانگین حاصل از هر نقطه زمانی برای رسم منحنی استفاده شد (۹).

نتایج

جداسازی اولیه و غربال‌گری

از تعداد کل ۶۰ نمونه، ۴۰ نمونه که روی محیط غنی‌کننده (Enrichment) قادر به رشد بودند، در محیط Blood Agar کشت داده شد و ۱۲ نمونه که قادر به تولید همولیزین و دارای فعالیت همولیتیک بودند، برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

از بین قارچ‌هایی نیز که از خاک‌ها و آب‌های آلوده در محیط کشت PDA, SDA رشد نمودند، پس از بررسی ماکروسکوپی و مشاهده کلنی و همچنین تهیه لام و بررسی میکروسکوپی و مشاهده اشکال و ساختار و رنگ‌آمیزی با بلودومتیلن، دو نوع قارچ آسپرژیلوس و فوزاریوم شناسایی شدند.

تولید بیوسورفکتانت در سویه‌های انتخابی

سویه‌های قادر به تولید همولیز بتا در محیط کشت MSS حاوی عصاره مخمر کشت داده شد و کشش سطحی کشت ۴۸ ساعته آن‌ها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نمونه شاهد دارای کشش سطحی mN/m ۶۴ بود. نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات روی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، هر سویه باکتریایی که قادر به کم‌کردن کشش سطحی تا کمتر از ۴۰ باشد، می‌تواند به‌عنوان سویه مناسب برای ادامه آزمایش انتخاب شود. کاهش کشش سطحی محیط کشت،

www.SID.ir

Archive of SID

نشان‌دهنده تولید مواد دارای فعالیت سطحی توسط کشت‌های باکتریایی است که این ترکیبات به متابولیسم سوبسترا که یک ترکیب غیرمحلول در آب است، کمک می‌کنند.

بررسی سمیت نفت خام

جدول ۲ نتایج حاصل از رشد سویه‌های انتخابی در مرحله قبل را در محیط MS2 در دو حالت همراه با نفت و بدون نفت نشان می‌دهد. در این مطالعه OD_{450} که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد، به‌عنوان معیار رشد باکتری‌ها در نظر گرفته شد و در سویه‌هایی که نسبت به وجود نفت خام در محیط حساسیت دارند، OD_{450} کشت حاوی نفت‌خام در مقایسه با کشت شاهد که فاقد نفت خام بود، کاهش نشان داد که این کاهش را می‌توان به سمیت نفت‌خام برای باکتری نسبت داد. در مقابل، در سویه‌هایی که ترکیبات نفت خام، اثر سمی روی آن‌ها ندارد، OD_{450} کشت نه‌تنها کاهش نشان نمی‌دهد، بلکه در برخی موارد حتی نسبت به کشت شاهد افزایش یافته است.

اندازه‌گیری رشد و تولید بیوسورفکتانت در شرایط نمکی

جدول ۳ اثر غلظت‌های مختلف نمک بر رشد سویه‌های انتخابی و تفسیر نتایج به‌دست آمده، پس از ۴۸ ساعت رشد در محیط MS1 را نشان می‌دهد.

جدول۱- میزان کشش سطحی سویه های انتخابی.

شماره سویه	محل نمونه‌برداری	کشش سطحی mN/m
۱	خاک آلوده به نفت-مسجدسلیمان	۴۶
۲	خاک آلوده به نفت- مسجد سلیمان	۳۸
۳	خاک آلوده به نفت- مسجد سلیمان	۵۰
۴	خاک آلوده به گازوئیل- پمپ بنزین	۵۸
۵	نمونه نفت مسجد سلیمان	۳۹
۶	نمونه نفت جزیره سیری	۴۷
۷	لجن نفتی اطراف چاه- مسجد سلیمان	۳۷
۸	آب آلوده به نفت- مسجد سلیمان	۴۱
۹	خاک آلوده به نفت- سیری	۴۷
۱۰	خاک آلوده به نفت- سیری	۴۲
۱۱	خاک اطراف تعویض روغنی	۴۹
۱۲	خاک اطراف پمپ بنزین	۵۰

جدول۲- میزان رشد نمونه‌های بدون نفت و همراه با نفت در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت.

مدت زمان نمونه ها	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
نمونه ۱ بدون نفت	۰/۶۸۶	۱/۳۵۳
نمونه ۱ همراه با نفت	۱/۹۸۶	۲/۴۸۱
نمونه ۲ بدون نفت	۱/۰۱۴	۱/۵۴۵
نمونه ۲ همراه با نفت	۱/۷۴۸	۲/۰۱۴
نمونه ۳ بدون نفت	۱/۲۳۱	۱/۸۴۳
نمونه ۳ همراه با نفت	۰/۲۰۲	۱/۵۴۹

از آن‌جایی که هدف از رشد دادن این سویه‌ها در حضور NaCl بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت در محیط‌های نمکی و شور بود، علاوه بر اندازه‌گیری رشد سلولی یا بیوماس که توسط OD اندازه‌گیری شد، کشش سطحی ۴۸ ساعته آن‌ها نیز اندازه‌گیری شد که نتایج به‌شرح زیر و معیار تفسیر نتایج بر اساس طبقه‌بندی زیر است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری کشش سطحی نشان می‌دهد که اغلب سویه‌های انتخاب شده، علی‌رغم آن‌که در حضور مقادیر مختلف نمک NaCl رشد نسبی دارند، اما قادر به تولید حد قابل‌قبولی از بیوسورفکتانت نیستند.

اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه‌کنندگی

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصله از اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه‌کنندگی در جدول ۳ به شرح زیر بدست آمد.

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف نمک بر رشد سویه‌های برتر.

غلظت / نمونه‌ها	2gr/lit	4gr/lit	6gr/lit	8gr/lit	10gr/lit
۱	۱،۲۴۳	۰،۵۶۸	۰،۲۷۰	۰،۲۲۲	۰،۰۶۷
تفسیر	+++	++	+	+	+
۲	۱،۵۹۲	۰،۸۴۳	۰،۵۲۸	۰،۴۷۶	۰،۳۲۹
تفسیر	+++	++	++	+	+
۳	۲،۴۶۹	۱،۸۷۹	۱،۵۴۱	۰،۹۷۰	۰،۷۸۰
تفسیر	++++	+++	+++	++	++

+<0.5, ++=0.5-1.00, +++=1.00-2.00, ++++>2.00

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف نمک روی میزان کشش سطحی.

کشش سطحی / نمونه‌ها	بدون نمک	2gr/lit	4gr/lit	6gr/lit	8gr/lit	10gr/lit
۱	۲۹,۵	۳۰,۸	۳۱,۵	۳۴	۳۸	۴۳
۲	۲۸,۷	۳۳	۳۷	۴۶	۵۰	۵۵
۳	۲۸,۳	۲۸,۹	۳۰,۵	۳۲,۲	۳۵,۶	۳۸

جدول ۵- میزان فعالیت امولسیفیه‌کنندگی هیدروکربن‌های مختلف.

گازوئیل	نفت خام سبک	نفت سنگین	فعالیت امولسیفیه کنندگی(٪)
۴۲	۴۳	۲۶	۱
۵۲	۳۹	۲۸	۲
۴۶	۵۸	۴۷	۳

آنالیز نتایج حاصل از آزمایش‌های تکمیلی و انتخاب بهترین سویه

در این مرحله با توجه به نتایجی که از انجام آزمایش‌های تکمیلی روی ۳ سویه برتر که کمترین کشش سطحی را در بین سایرین داشتند، بهترین و مناسب‌ترین سویه برای مطالعات نهایی، شناسایی و انتخاب شد.

نتایج آزمون سمیت و بررسی اثر نمک و فعالیت امولسیفیه‌کنندگی نشان می‌دهد که سویه شماره ۳ بهترین و قابل قبول‌ترین نتایج را داشته است و به‌عنوان سویه برتر برای شناسایی انتخاب شد.

مشخصات مورفولوژیک و تعیین هویت سویه

کلنی‌های سویه شماره ۳ روی محیط کشت نوترینت آگار به‌صورت کلنی‌های صاف, گرد و منظم با لبه‌های پهن و برآمده و گاهی اوقات به‌صورت نادر، کوچک و خشن و واجد سوارمینگ بود. سویه فوق، هوازی مطلق بوده و درجه حرارت مناسب برای آن‌ها ۳۶-۳۵ است و در pH=7 بهترین رشد را داشت. در

www.SID.ir

Archive of SID

محیط پیگمان‌های سبز آبی تولید می‌کرد و کلنی‌های آن‌ها بوی گل اقاقیا (شکوفه بهاری) می‌داد.

در محیط‌هایEMB, Mac Conkey Agar کلنی، همرنگ محیط و در محیط نوترینت یا Skim Milk و BHI Agar سبز رنگ بود.

تست‌های بیوشیمیایی عبارت بودند از:

کاتالاز +، اکسیداز +، نیترات +، اوره‌آز -، TSI SH2,:Alk/Alk و اندول _، حرکت ضعیف، سیترات +، MRVP_ ، ژلاتین_ .

همچنین، وقتی سویه موردنظر به‌روش رنگ‌آمیزی گرم، رنگ شد، در زیر میکروسکوپ ۱۰۰× به‌صورت باسیل‌های کوتاه و گاهی کوکوباسیل گرم منفی به‌صورت کشیده و مستقیم بدون اسپور و کپسول دیده می‌شد.

با استفاده از کتاب تعیین هویت باکتری‌ها Bergeys Manual of systematic Bacteriology (2000) نام و مشخصات به‌دست آمده به شرح زیر بود:

کوکوباسیل گرم منفی، کلنی‌های گرد و محدب و شفاف، اطراف کلنی صاف، همولیز بتا، پیگمان سبز، فاقد کپسول؛ بوی بادام تلخ: Pseudomonas) (aeruginosa ، سویه به‌دست آمده به‌طور کامل تخلیص شد و برای تعیین توالی DNA به انستیتو پاستور فرستاده شد که جواب شامل توالی زیر بود:

CTAGATTNNAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
GAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAT
CTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGA
GAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT
GGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG
AAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGT
TGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGG
CTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
GCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACT
GAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCA
CCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTG
CCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAA
CCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAA
TCGGATCCCGGGCC

پس از ساخت رشته مکمل توسط نرم افزار (Gene Runner) در نرم افزار PSI-Blast(Blast pgp) در سایت ncbi قرار داده شد و نتیجه حاصله، سودوموناس آئروژینوزا بود که ۱۰۰درصد با توالی سویه موردنظر هم‌خوانی داشت. برای اطمینان بیشتر، گراف‌های آن‌ها توسط نرم افزار Chromas با هم مقایسه شد و نوکلئوتیدهای ناشناخته، شناسایی شد (NN) که مربوط به توالی پرایمر بود و داخل آن قرار داشت و تمام نوکلئوتیدهای قبل از آن نیز چون مربوط به وکتور بودند، حذف شدند که تماما به‌جز ۳ مورد در ۱۷۷۶ نوکلئوتید با هم یکسان بودند (با حروف Italic و برجسته نشان داده شده اند).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از تعیین 16SrRNA مشخص کرد که سویه فوق ۱۰۰ درصد *Pseudomonas aeruginosa* است (۱۳،۱۴).

دینامیک تولید بیوسورفکتانت توسط سویه انتخابی

نمودارهای زیر، وابستگی تولید بیوسورفکتانت و تغییرات کشش سطحی، ضریب امولسیفیکاسیون را در محیط کشت نمک‌های معدنی MS1 حاوی نفت، به‌عنوان تنها منبع کربن، نشان می‌دهد. تمامی نمودارها میانگین سه تکرار هستند؛ زیرا برای هر قسمت، سه بار تمامی مراحل آزمایش‌ها تکرار شد.

کشش سطحی محیط‌های رشد بلافاصله پس از تلقیح و گرماگذاری کاهش پیدا می‌کرد. کمترین میزان کشش سطحی اندازه‌گیری شده، برای این سویه در فاز رشد تصاعدی، برابر با ۲۸ mN/m بود که تقریباً پس از گذشت ۴۸ ساعت از رشد آن به‌دست آمد.

ضریب امولسیفیکاسیون برای سویه سودوموناس به‌طور هماهنگ با رشد باکتری افزایش پیدا می‌کرد و با گذشت ۴۸ تا ۶۰ ساعت از رشد باکتری به حداکثر میزان رشد خود می‌رسید و از این نقطه به بعد، تقریباً در اندازه نسبتاً ثابتی باقی می‌ماند.

این نتایج نشان می‌دهد که تولید بیوسورفکتانت از سوبسترای هیدروکربنی در این سویه در طی فاز رشد با سرعت نسبتاً ثابتی انجام می‌گیرد و لذا می‌توان گفت که بیوسورفکتانت، یک متابولیت اولیه است که تولید آن نیز همراه با افزایش رشد سلول, افزایش می‌یابد.

بررسی اثر نمک بر فعالیت بیوسورفکتانت حاصله

جهت بررسی فعالیت بیوسورفکتانت‌های حاصله، کشش سطحی و جذب نوری کشت باکتری در حضور غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری مقاومت گرمایی بیوسورفکتانت حاصله به درجه حرارت‌های بالا

اثر تیمار حرارتی ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه به‌مدت ۱۵ دقیقه روی فعالیت امولسیفیه‌کنندگی و کشش سطحی سوسپانسیون سلولی و مایع کشت مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی بیوسورفکتانت حاصل از سودوموناس آئروژینوزا

به‌کارگیری معرف اختصاصی برای مشتقات اسید فسفریک نشان می‌دهد که کشت سویه، فاقد مقادیر قابل ملاحظه فسفولیپید به‌عنوان ترکیب دارای فعالیت سطحی است.

در آنالیز عصاره لیپیدی حاصل از کشت سویه, یکی از لکه‌های به‌دست آمده روی صفحه TLC در اثر اسپری با معرف آلفانفتول/سولفوریک اسید، تولید رنگ قرمز نمود که نشان‌دهنده عصاره لیپیدی سویه حاوی کربوهیدرات است.

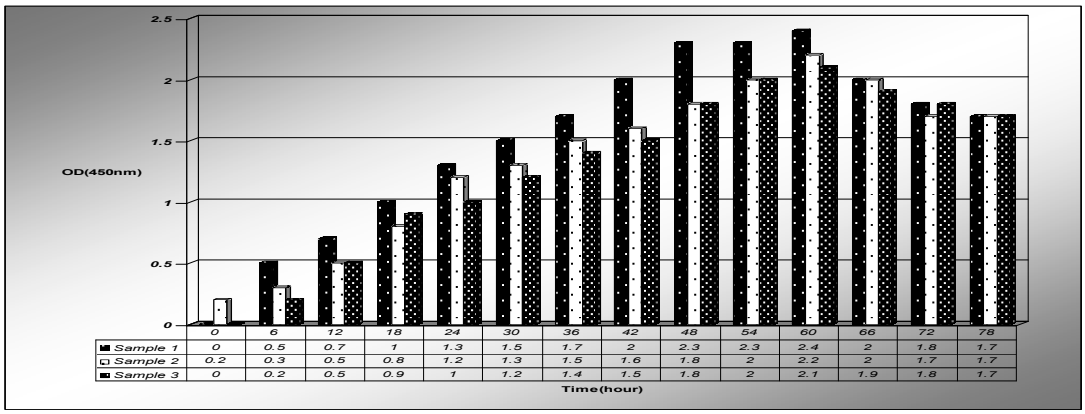
بر اثر پاشیدن معرف نین هیدرین بر روی صفحه TLC که حاوی لکه حاصل از فراورده میکروبی بود, لکه به رنگ قرمز در آمد که معرف حضور اسید آمینه و ترکیبات آمینی است.

بررسی اثر pH بر فعالیت بیوسورفکتانت حاصله

جهت بررسی اثر pH های مختلف بر فعالیت سطحی بیوسورفکتانت حاصل، کشش سطحی و OD کشت ۴۸ ساعته باکتری ها در pH های مختلف اندازه گیری شد(میانگین سه تکرار).

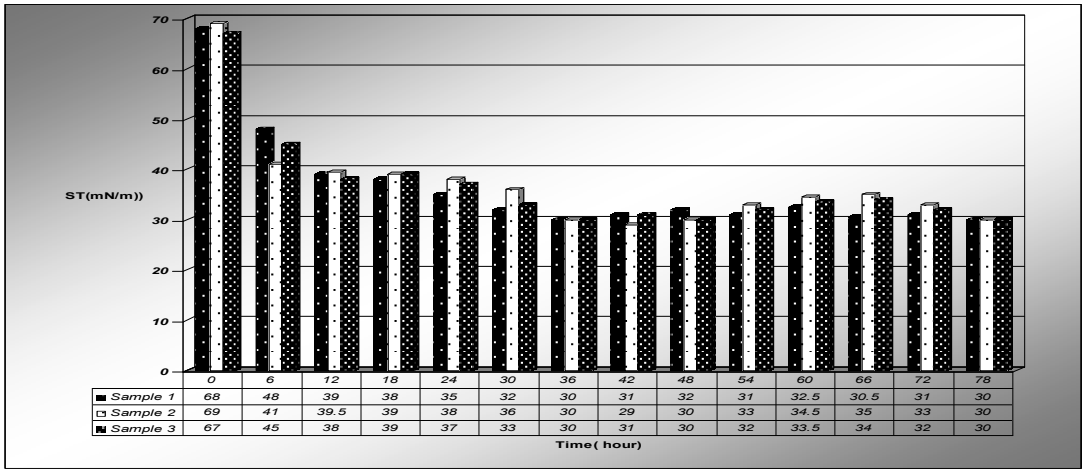
www.SID.ir

Archive of SID



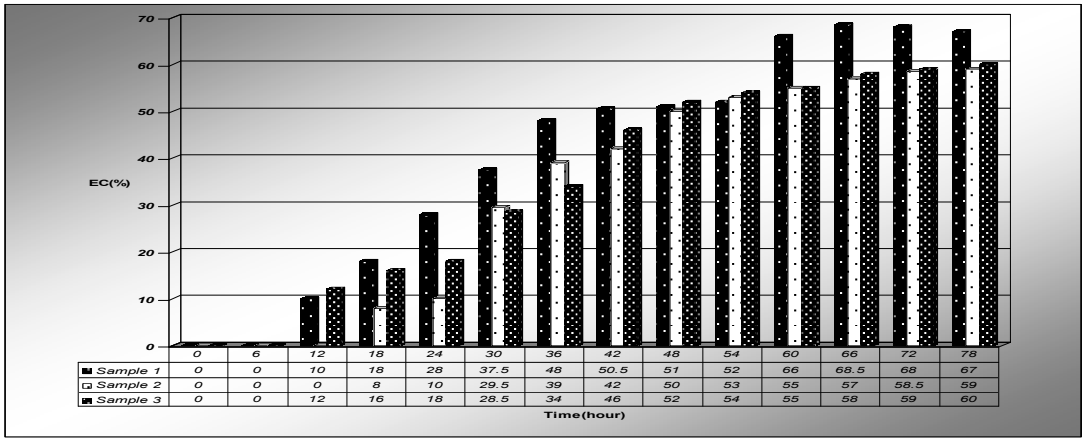
	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78
Sample 1	0	0.5	0.7	1	1.3	1.5	1.7	2	2.3	2.3	2.4	2	1.8	1.7
Sample 2	0.2	0.3	0.5	0.8	1.2	1.3	1.5	1.6	1.8	2	2.2	2	1.7	1.7
Sample 3	0	0.2	0.5	0.9	1	1.2	1.4	1.5	1.8	2	2.1	1.9	1.8	1.7

نمودار ۱- دینامیک تولید بیوسورفکتانت در نمونه‌های انتخابی.



	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78
Sample 1	68	48	39	38	35	32	30	31	32	31	32.5	30.5	31	30
Sample 2	69	41	39.5	39	38	36	30	29	30	33	34.5	35	33	30
Sample 3	67	45	38	39	37	33	30	31	30	32	33.5	34	32	30

نمودار ۲- میزان کاهش کشش سطحی در زمان‌های مختلف.

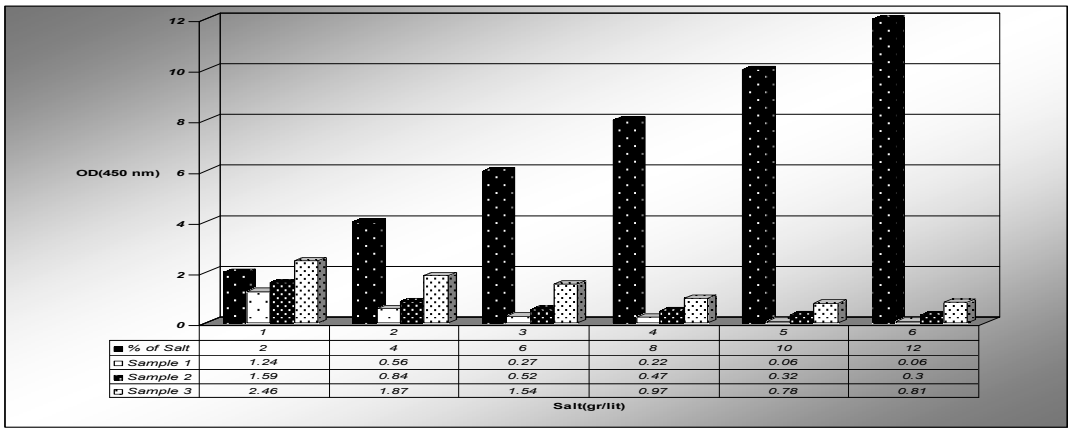


	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78
Sample 1	0	0	10	18	28	37.5	48	50.5	51	52	66	68.5	68	67
Sample 2	0	0	0	8	10	29.5	39	42	50	53	55	57	58.5	59
Sample 3	0	0	12	16	18	28.5	34	46	52	54	55	58	59	60

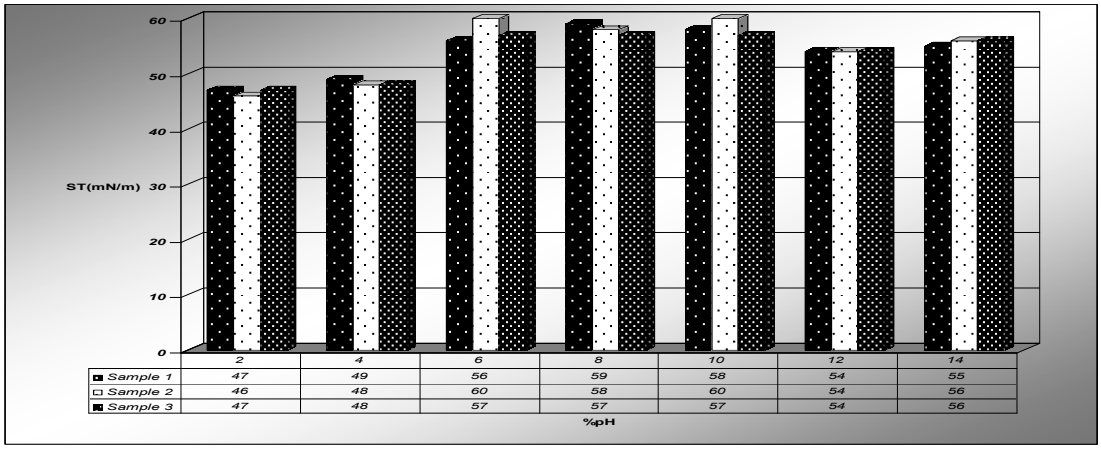
نمودار ۳- میزان فعالیت امولسیفیه‌کنندگی در زمان‌های مختلف.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۴- تاثیر نمک روی میزان جذب نوری.



نمودار ۵- بررسی میزان تاثیر pH بر روی میزان کشش سطحی.

جدول ۶- اثر تیمار حرارتی روی بیوسورفکتانت حاصله.

خاصیت بیوسورفکتانت	قبل از تیمار حرارتی	تیمارحرارتی ۱۵/۱۰۰ ^{o}c دقیقه	بعداز ۱۵/ ۱۲۰ ^{o}c دقیقه
مایع کشت			
فعالیت امولسیفیه کنندگی	۶۷	۶۷	۶۷
کشش سطحی	۳۱,۳	۳۱,۵	۳۱
سوسپانسیون سلولی			
فعالیت امولسیفیه کنندگی	۷۳	۷۳	۷۳
کشش سطحی	۳۰,۴	۳۰,۶	۳۰,۹

بحث

بیوسورفکتانت‌ها گروهی از ترکیبات بیولوژیک هستند که توسط طیف گسترده‌ای از موجودات زنده تولید می‌شوند. این ترکیبات آمفی‌پاتیک، سبب امولسیفیه‌شدن هیدروکربن‌ها در محیط رشد میکروارگانیسم‌ها و تسهیل روند رشد آن‌ها می‌شود. در مطالعاتی که با هدف جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت از منابع محیطی انجام گرفته، معمولاً از

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی فعالیت همولیتیک به‌عنوان معیاری برای جداسازی اولیه سویه‌های مولد بیوسورفکتانت استفاده شده است. با وجود سهولت این روش می‌توان معایبی را برای آن برشمرد، از جمله متغیر بودن نتایج حاصله در فواصل زمانی مختلف و غیراختصاصی بودن محیط کشت و غیره.

در مطالعه‌ای که توسط Carrillo به‌منظور جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت انجام شد، کلیه نمونه‌های محیطی مورد استفاده فاقد سابقه آلودگی به ترکیبات نفتی بودند؛ مانند خاک‌های غیرآلوده و نمونه آب شیرین. تنر و جنینگز (۱۹۹۹) پس از بررسی نمونه‌های آلوده و غیرآلوده و تعداد باکتری‌ها به این نتیجه رسیدند که اگر چه نفت محرکی مهم در جهت تولید بیوسورفکتانت به‌حساب می‌آید، اما تفاوت فاحشی بین تعداد باکتری مولد بیوسورفکتانت ایجاد نمی‌کند (۱۵).

کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهمترین و اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتانت محسوب می‌شود.

قوی‌ترین بیوسورفکتانت گزارش شده، سورفاکتین است که یک آنتی‌بیوتیک پپتیدولیپیدی با فعالیت سطحی قابل‌توجه است و توسط *Bacillus subtilis* و با استفاده از منابع کربن محلول در آب تولید می‌شود که قادر است کشش سطحی محیط رشد را از mN/m ۷۰ به ۲۶mN/m کاهش دهد. سویه جدا شده توسط Abu-Ruwaida و همکارانش در کویت نشان‌دهنده کاهش کشش سطحی از mN/m ۶۹ به mN/m ۲۷ بود که از باسیلوس سوبتیلیس جدا شده بود (۱۶).

فعالیت امولسیفیه‌کنندگی مقیاسی از تولید بیوسورفکتانت و توانایی در امولسیفیه کردن هیدروکربن‌ها و ترکیبات نفتی است و نشان‌دهنده میزان پایداری امولسیون حاصل از آب و ترکیب نفتی است (۱۶).

اگر چه به‌عنوان نمونه، فعالیت امولسیفیه‌کنندگی نمونه حاصل با سه هیدروکربن گازوئیل، نفت‌خام سبک و نفت سنگین مقایسه شد، مشاهده می‌شود. در حالی‌که برای اندازه‌گیری آن از کشت ۴۸ ساعته باکتری روی محیط کشت یکسان استفاده شد، میزان کشش سطحی و سایر فاکتورهای فعالیت سطحی آن‌ها بالطبع باید با هم برابر باشد، اما مقادیر EC آن‌ها به‌ترتیب ۴۸ و ۷۰ و ۸۲ درصد بود که تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد که با توجه به یکسان‌بودن شرایط رشد و آزمایش تنها این تفاوت را می‌توان به نوع هیدروکربن و تمایل بیوسورفکتانت به آن، نسبت داد.

در مطالعه مشابهی که توسط Banat انجام شده، آنالیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه‌کنندگی بیوسورفکتانت حاصل از سویه به‌دست آمده با هیدروکربن‌های مختلف نشان می‌دهد که این بیوسورفکتانت نیز همانند سویه مورد مطالعه ما به روغن موتور تمایل زیادی دارد و در مقابل تمایل آن به هیدروکربن‌های کوتاه زنجیر مانند هپتان اندک است (۱۸).

اغلب بیوسورفکتانت‌هایی که تا به امروز شناخته شده‌اند، جزو دسته بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی هستند، این ترکیبات، کربوهیدرات‌هایی هستند که با اسید چرب آلیفاتیک بلند زنجیره یا هیدروکسی آلیفاتیک اسیدها ترکیب شده‌اند. در اغلب میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت به‌عنوان محصول اصلی تعدادی ترکیب دارای فعالیت سطحی دیگر با ترکیب بیوشیمیایی متفاوت نیز سنتز می‌گردد. نتایج حاصل از انجام TLC با ترکیبات دارای فعالیت سطحی، بیوسورفکتانت حاصل از تحقیق Banat مشابه سویه جدا شده در تحقیق ما عمدتاً گلیکولیپیدی است. اما در کنار آن لکه‌های لیپیدی دیگر, فاقد بخش کربوهیدراتی نیز مشاهده می‌شود (۱۹).

در بررسی اثر تیمار حرارتی بر بیوسورفکتانت حاصله مشاهده می‌شود که میزان کشش سطحی مایع کشت و سوسپانسیون سلولی حاصل از این سویه حتی پس از تیمار حرارتی ۱۲۰ درجه نیز تغییر معنی‌داری پیدا نمی‌کند که نشان‌دهنده مقاومت کامل آن به تیمار حرارتی حتی تا ۱۲۰ درجه است که با نمونه گزارش شده توسط Banat کاملاً قابل مقایسه است.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت در برابر قدرت یونی نیز یکی دیگر از مزایای بیوسورفکتانت‌ها در مقابل رقبای شیمیایی آن‌ها محسوب می‌شود، در حالی‌که نمک ۲-۳ درصد برای غیرفعال‌نمودن اکثر سورفکتانت‌های شیمیایی کافی است، اکثر بیوسورفکتانت‌ها حتی در محلول‌های نمکی ۱۰ درصد و بالاتر نیز غیرفعال نمی‌شوند.

Brown و همکارانش نیز نتایج مشابهی از اثر غلظت ۵ درصد نمک کلرید سدیم بر فعالیت بیوسورفکتانت حاصله توسط یک سویه باکتریایی هوازی گزارش کرده‌اند. نتایج Abu-Ruwaida و همکارانش در مورد اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر فعالیت بیوسورفکتانت نیز نشان‌دهنده افزایش اندک فعالیت آن در حضور نمک است (۱۵).

منابع مورد استفاده

1. Leung, M., 2003. Bioremediation: Techniques for Cleaning up a Mess. 18-22
2. Sung-Chyr, L., 1996. Biosurfactant: Recent Advances. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 109-120
3. Venosa, A. D., 1981. Bioremediation in oil spill response. 1-4.
4. Sillivan, E. R., 1998. Molecular genetics of Biosurfactant Production. 263-273
5. Mendelssohn, I. A., Atilla, N., Debusschere, K., Scott miles, M., Portier, R. J., Roberts, P. O., Lin, Q., Henry, C. H. B., Overton, E. B., Rabalais, N. N., Walsh, M. M., 2003. Development of Bioremediation for Oil Spill Cleanup in Coastal Wetlands 1-6, 47-57.
6. Islam Janpen, H., Kitten, A., Dassara, Y., 2000. Screening of Biosurfactants Producing Bacteria and Optimization of Production Process.1-3
7. Abed, M. M., 2004. The direct role of aerobic heterophilic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. Appl. Microbiol 3: 110-115.
8. Banat, I. M., Makkar, R. S., Cameotra, S. S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol 53: 495-508.
9. Banat Ibrahim, M., 1995. Bosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. Bioresource Technol 51: 1-12.
10. Gerson, D. F., 1993. Biosurfactants: Production, Properties, Applications (Surfactant Science). CRC Press; 1 edition; 269-270.
11. Arino, S., Marshal, R., Vandecasteele, J. P., 1996. Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* Species. Appl. Microbial biotechnol 45: 162-168.
12. Bognolo, G., 1999. Biosurfactant as Emulsifying for Agents for Hydrocarbons. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 152: 41-52.
13. Garg, F. C., 2005. Experimental Microbiology, CBS Publishers & Distributors, 117-118.
14. Cappuccino, J., Sherman, N., 2005. Microbiology, A laboratory manual, Pearson international edition, pp. 339-370.
15. Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., Giulietti, A. M., Bisaillon Jean-guy, D., 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol 62: 1908-1912.
16. Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S., Salem, A., Kadri, M., 1991. Isolation of biosurfactant-producing bacteria. Product characterization and Evaluation. Acta Biotechnology 11: 315-324.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Makkar, R. S., Cameotra, S. S., 1998. Biosurfactant Producing by a Thermophilic Bacillus Strain. 37-42
18. Banat Ibrahim, M., 1993. The isolation of thermophilic biosurfactant producing bacteria. Biotechnology Lettters 15: 591-594.
19. Banat Ibrahim, M., Desai Jitendra, D., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev: 3: 47-64.

www.SID.ir