جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت از مخازن نفتی گچساران و بهینه‌سازی شرایط رشد آن‌ها

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۵/۱ ؛ تاریخ پذیرش مقاله ۹۰/۱۰/۷

زهرااستخر[۱*]، بیژن هنرور[۲]، نصراله شکیبا صفت[۳]، فرزانه آرام[٤]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی شیمی
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه مهندسی شیمی
۳- دانشگاه آزاداسلامی، واحد فیروزآباد، گروه نفت
٤- پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز
Zahra.estakhr@gmail.com

پژوهش نفت
سال بیست و دوم
شماره ۶۹
صفحه ۴۱-۳۳ ۱۳۹۱

چکیده

سال‌های اخیر شواهدی بر کارآیی میکروارگانیسم‌ها و محصولات متابولیک آنها در افزایش میزان نفت قابل استحصال که اصطلاحاً ازدیاد برداشت میکروبی (MEOR) نامیده می‌شود، گزارش گردیده است. در این تحقیق نمونه نفت یکی از مخازن نفتی گچساران به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های آنها، با استفاده از محیط‌های کشت عمومی و اختصاصی و در نظر گرفتن توانایی تولید بیوسورفکتانت، مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور تعیین بهترین شرایط رشد سلولی دو سویه منتخب، منابع کربنی مختلف (از جمله آب پنیر، سویا، نشاسته، ملاس و آب نخود) به محیط کشت رشد اضافه شد و منحنی رشد باکتری‌ها طی مدت ۷ روز برای هر کدام از باکتری‌های منتخب رسم گردید. بهترین رشد باکتری‌ها ناشی از مصرف منبع کربنی آب پنیر و بعد به ترتیب نشاسته و سویا بود. شناسایی باکتری‌ها با دو روش مولکولی و بیوشیمیایی انجام شد. در مجموع با توجه به نتایج بیوشیمیایی و تست‌های 16srRNA، این باکتری‌ها در جنس باسیلوس طبقه‌بندی گردیدند. در ضمن باکتری اول تحت عنوان Bacillus Licheniformis با کد شناسایی ۱٤٥٥٥٥ و باکتری دوم تحت عنوان Bacillus Subtillis، با کد شناسایی ۱٤٥٥٥٧ در بانک ژن آمریکا NCBI ثبت گردید.

واژه‌های کلیدی: ازدیاد برداشت میکروبی، بیوسورفاکتانت، باکتری، Bacillus Subtillis، Bacillus Licheniformis

مقدمه

نقش انرژی در تعیین ثبات اجتماعی و قدرت اقتصادی یک ملت بسیار حائز اهمیت است. به گزارش آژانس بین‌المللی انرژی، نفت خام همچنان از مهم‌ترین منابع انرژی برای ۳۰ سال آینده محسوب می‌شود وتقاضای انرژی کل دنیا طی ۲۵ سال آینده ۵۰٪ رشد خواهد داشت. لذا نفت خام، نقش مهمی در اقتصاد دنیا بازی می‌کند [۱ و ۲]. بیوتکنولوژی صنعتی با توجه به پیشرفت‌های حاصله در سیستم‌های

Archive of SID
www.SID.ir

پیچیده بیولوژیکی و نیاز روزافزون به محصولات حاصل از فرایندهای تخمیری در اقتصاد، بسیار قابل توجه می‌باشد [۳]. یک مخزن نفتی تا زمانی که فشار و انرژی کافی داشته باشد، می‌تواند نفت تولید کند اما پس از آن که انرژی طبیعی خود را برای تولید از دست داد، می‌توان با اعمال انرژی خارجی، نفت هرچه بیشتری را از مخزن استخراج نمود.ابتدا فشار با تزریق گاز و یا آب به لایه آبده مخزن تأمین می‌شود. سپس سیلاب‌زنی گازی[1] یا سیلاب‌زنی آبی[2] برای جابجایی نفت اجرا می‌شوند. پس از آن که این روش‌ها نیز کارآیی خود را از دست دادند، روش‌های ازدیاد برداشت استفاده می‌شوند. روش‌های اولیه و ثانویه تولید تقریباً تنها می‌توانند یک سوم نفت مخزن را تولید کنند و بیشتر از دوسوم نفت در مخزن باقی می‌ماند. روش‌های مختلف ازدیاد برداشت به روش‌های حرارتی، شیمیایی، امتزاجی و سایر روش‌ها از جمله میکروبی MEOR تقسیم‌بندی می‌شود [٤]. از حدود شصت سال پیش به میکرواورگانیسم‌ها برای بهبود شرایط تولید نفت توجه شده است.در دهه ۱۹٤۰ نخستین بار زوبل[3] نشان داد که باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفات می‌توانند سبب آزاد شدن قیر نفت از شن‌های نفتی شوند. اولین حق اختراع مربوط به نقش باکتری‌ها در آزاد کردن نفت مخزن، در سال ۱۹٤٤ ثبت شده است.

باید توجه کرد که افزایش بازده تولید با روش میکروبی برای تمام مخازن امکان‌پذیر نیست [۵]. شوری بالا (بیش از ۱۲٪)، دمای بالا (بیش از ۵۰ °C) و نفوذپذیری بسیار اندک شرایطی هستند که کاربرد ازدیاد برداشت میکروبی[4] را دشوار می‌کنند. دو مشکل اول را شاید بتوان در آینده با یافتن سویه‌های هالوفیل و ترموفیل و یا روش‌های مهندسی ژنتیک حل کرد ولی به نظر می‌رسد که حل مشکل سوم به یک استراتژی چند مرحله‌ای و یا تلفیقی از شیوه‌های شیمیایی و بیوکاتالیتیک نیاز دارد [٦].

بدیهی است که انتخاب میکرواورگانیسم، نحوه تغذیه آن، دوره افزودن مواد غذایی و اکسیژن و...، به عمق چاه، نوع نفت، مقدار آب و ساختار زمین‌شناختی مخزن بستگی دارد. در برخی موارد تجربه اجرای ازدیاد برداشت میکروبی نشان داده است که عوامل اضافه شده به مخزن در این روش در فرآیند پالایش مشکلی پیش نمی‌آورند. حتی در بسیاری از میدان‌های نفتی تداوم فعالیت فلور میکروبی سبب کاهش آب باقی‌مانده به همراه نفت شده و مقدار سولفید هیدروژن و فرآیندهای خوردگی را نیز کاهش می‌دهد. تیمار چاه گاه به صورت فرستادن میکروارگانیسم‌های ویژه به درون مخزن[5] است؛ گاهی برای تقویت میکرواورگانیسم‌ها و تسریع حصول نتیجه، مواد مغذی (نمک‌های معدنی مثل نمک‌های فسفر و نیتروژن و یا ترکیبات آلی مانند ملاس) نیز به چاه تزریق می‌شوند. گاهی هدف پروژه فعال‌کردن میکروفلور طبیعی منطقه به کمک تزریق مواد مغذی است و باکتری اضافی تزریق نمی‌شود [۷].

روش ازدیاد برداشت میکروبی نفت یک روش کم هزینه و سازگار با محیط زیست است که به آسانی در میدان انجام می‌گیرد و به تصحیح تجهیزات تزریق آب موجود نیازی ندارد. همچنین کارخانه‌های تولید سلول میکروبی به انرژی ورودی کمی نیاز دارند تا عوامل ازدیاد برداشت میکروبی را تولید کنند. به علاوه کاربرد فرآیندهای میکروبی مستقیماً به قیمت جهانی نفت خام بستگی ندارد. با توجه به تجربه‌های میدانی انجام شده، فرآیند ازدیاد برداشت میکروبی یک روش موثر در مخازن کربناته و ماسه سنگی می‌باشد [۸]. تمامی این موارد روش ازدیاد برداشت میکروبی را به یک روش اقتصادی مؤثر و کارا برای استفاده در مخزن تبدیل می‌کند. این تحقیق با هدف شناخت بهتر پتانسیل میکروبی مخازن نفتی گچساران و برای دست‌یابی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های مفید موثر بر ازدیاد برداشت و مطالعه دقیق شرایط بهینه رشد و تکثیر آنها انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و انجام برنامه غربال: ابتدا نمونه نفت خام از یکی از مخازن نفتی گچساران در ظرف‌های استریل تهیه گردید. پس از انتقال نمونه به آزمایشگاه، با استفاده

1. Gas flooding
2. Water flooding
3. Claude Zobell
4. Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR)
5. Bioaugmentation

Archive of SID
www.SID.ir

از روش‌های میکروبیولوژی اقدام به جداسازی و کشت اولیه سویه‌های باکتریایی گردید. بدین منظور cc ۱۰ از نمونه نفت خام را وارد محیط کشت مغذی نوترینت براث[1] (NB) کرده و سپس برای مدت هفت روز در دمای ۳۷/۵ °C و دور rpm ۱۸۰ گرماگذاری شد. البته به دلیل جلوگیری از حذف ناخواسته برخی از باکتری‌ها، این فرآیند در دمای ٤٦ °C نیز تکرار گردید. چون حلالیت نفت در محیط کشت بسیار پایین بوده و همچنین بسته بودن فاز نفتی، از سورفاکتانت شیمیایی Tween80 استفاده شد، تا با کاهش کشش سطحی بین نفت و محیط کشت، باکتری‌های موجود در نفت، راحت‌تر بتوانند وارد محیط کشت شده و از آن استفاده کنند. پس از گذشت هفت روز با کدر شدن محیط، رشد باکتری کاملاً مشاهده شد.

محیط کشت اصلاح‌شده MSSO[2] در پی حذف منبع ساکارز آن و اضافه کردن منابع کربنی مورد نظر، مورد استفاده قرار گرفت. از جنبه دیگر، هدف اصلی استفاده از این محیط کشت در واقع رشد باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت می‌باشد. در کشت مخلوط همزمان با رشد باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت، سایر باکتری‌های موجود در محیط که دارای این توانایی نیستند نیز در حال رشد می‌باشند. بنابراین انتخاب محیط کشت بر توانایی ما در جداسازی و رشد باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت موثر می‌باشد. بنابراین با اجرای برنامه غنی‌سازی در محیط معدنی سعی در حذف باکتری های دیگر داشتیم. ترکیب محیط کشت اصلاح شده MSSO در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- ترکیب محیط کشت اصلاح شده MSSO

جزء	غلظت (g/lit)
KH_2PO_4	۲/۷
K_2HPO_4	۱۳/۹
NaCl	۵۰
$NaNO_3$	۱/۰۰
Yeast Extract	۰/۵

پس از تهیه این محلول آن را اتوکلاو نموده و پس از سرد شدن مقدار cc ۱۰ محلول ۱۰٪ جرمی $(NH_4)_2SO_4$ و محلول ۲/۵ درصد جرمی $MgSO_4$ و محلول عناصر کم مقدار ویلسون (جدول شماره ۲)، با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر به آن افزوده شد.

استفاده از کیت گرم و میکروسکوپ برای تشخیص خلوص

جدول ۲- ترکیب محیط عناصر کم مقدار ویلسون

جزء	غلظت (g/lit)	جزء	غلظت (g/lit)
EDTA	۰/۵	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۱
$MnSO_4$ H2O	۳	$AlK(SO_4)_2$	۰/۰۱
NaCl	۱	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۱
$CaCl_2.2H_2O$	۰/۱	boric acid	۰/۰۱
$ZnSO_4.7H_2O$	۰/۱	Na_2SeO_4	۰/۰۰۵
$FeSO_4.7H_2O$	۰/۱	$NiCl_2.6H_2O$	۰/۰۰۳

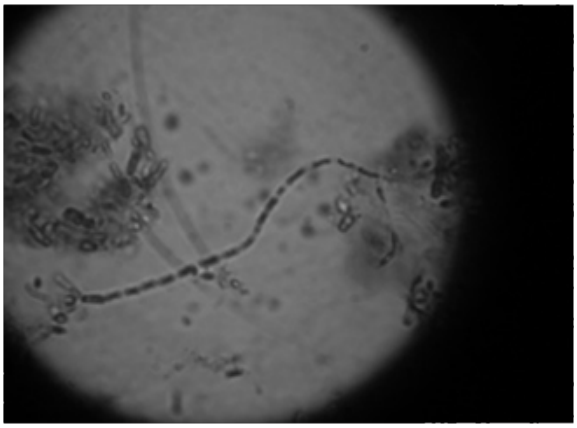
پس از اجرای مرحله غنی‌سازی و رسیدن به تک‌کلنی خالص، باکتری توسط کیت گرم رنگ آمیزی شده و میکروسکوپ مشاهده گردید تا علاوه بر پی بردن به خالص بودن گونه باکتری، نوع گرم مثبت و یا گرم منفی بودن نیز مشخص گردد. چنانچه نمونه‌ای در مشاهدات میکروسکوپی خالص نبود، بار دیگر در محیط کشت جامد کشت خطی داده شد تا به خلوص کامل برسد. نمونه‌ای از مشاهدات میکروسکوپی را می‌توانید در شکل ۱ و ۲ مشاهده نمایید.

سینتیک تولید بیوسورفکتانت و فعالیت بیوسورفکتانت با استفاده از روش جابجایی روغن تعیین و بررسی میزان رشد باکتری بر حسب زمان، انجام شد [۹]. جهت تهیه پیش کشت، ابتدا یک کلنی باکتریایی به ml ۵ محیط کشت مغذی نوترینت براث (NB) تلقیح و در دمای ۳۷/۵ °C و دور rpm ۱۸۰ گرماگذاری گردید. سپس نمونه‌ای از این کشت تازه به محیط کشت اصلاح شده MMSO تلقیح و تحت شرایط فوق گرمخانه‌گذاری شد. نمونه برداری در بازه‌های زمانی مشخص، انجام گرفت و پارامترهای سینتیکی نمونه، اعم از میزان رشد باکتری، قطر منطقه شفاف در روش جابجایی روغن، تولید بیوسورفکتانت تعیین شد. همان طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود یکی از خصوصیات و نشانه‌های تولید بیوسورفکتانت به وجود آمدن کف روی سطح محیط کشت است.

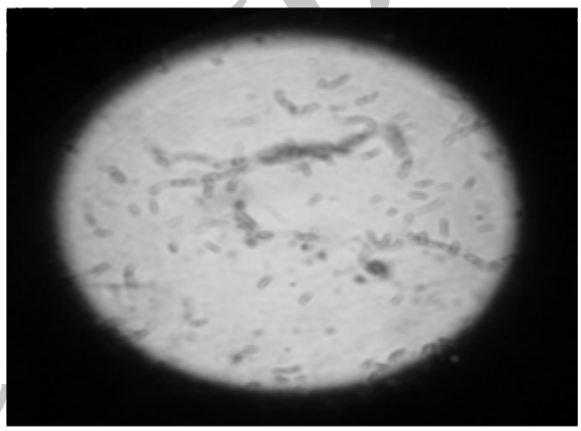
1. Nutriant Broth
2. Mineral Salt Solution

Archive of SID

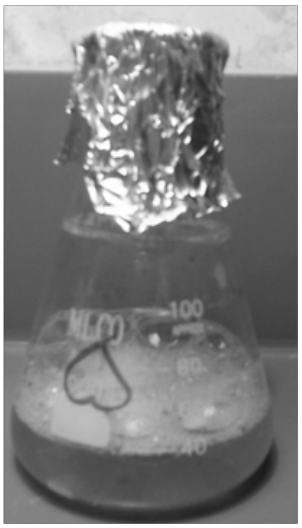
www.SID.ir



شکل ۱- تست گِرم و مشاهده جدایه ۵ زیر میکروسکوپ

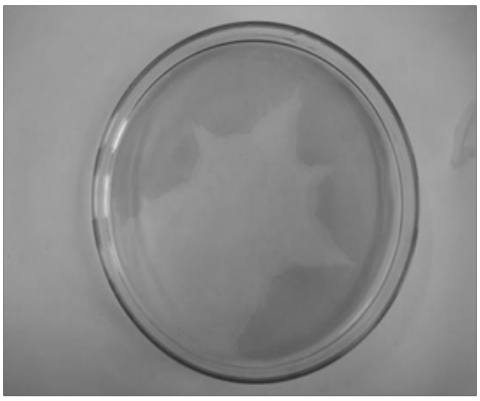


شکل ۲- تست گِرم و مشاهده جدایه ۷ زیر میکروسکوپ



شکل ۳- توانایی تولید کف توسط برخی از باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت بیوسورفکتانت از روش اندازه‌گیری میزان جابجایی روغن[1] استفاده شد. این تست طبق روش موریکاوا و همکاران [۹] همراه با تغییرات جزیی انجام گرفت. برای این منظور ابتدا ۲۰ mL آب مقطر درون پلیت ۱۰ cm ریخته و به آرامی ۱۰ mL نفت خام به آن اضافه گردید و اجازه داده شد به تعادل برسد. سپس حجم مناسبی از نمونه به آرامی روی آن قرار داده شد. در صورت وجود بیوسورفکتانت در نمونه تحت بررسی، نفت روی سطح پلیت جابه جا شده و به حاشیه رانده می‌شد؛ سپس قطر این منطقه اندازه‌گیری و مساحت منطقه شفاف محاسبه گردید (شکل ٤).



شکل ٤- تست جابجایی روغن بعد از اضافه کردن بیوسورفکتانت

برای بررسی اثر منبع کربن از منابع مختلف کربن از جمله پنج منبع کربنی نشاسته، ملاس، سویا، آب پنیر، آب نخود استفاده شد [۱۰]، منابع کربنی به صورت کاملاً اتوکلاو به محیط کشت اصلاح شده MSSO اضافه شد (شکل ۵).

شکل ۵- اضافه کردن پنج منبع کربنی به باکتری‌های منتخب

در مورد سویا، سویای خشک را در داخل بشر قرار داده و به آن آب معمولی اضافه می‌کنیم. روی بشر را با یک پارا فیلم بسته و آن را در یک مکان گرم قرار می‌دهیم، پس از گذشت ۵ تا ۷ روز مایع تغییر رنگ مشهودی می‌دهد، مایع را به بشری دیگر منتقل کرده و عمل اتوکلاو انجام می‌شود؛برای آب نخود هم کاملاً مثل سویا عمل می‌شود.

1. Oil Displacement

www.SID.ir

اما در مورد منبع کربنی آب پنیر از روش سنتی (تهیه آب پنیر خانگی بدون اضافه کردن نمک) عمل گردید. برای تعیین میزان تحمل نمک، محیط کشت مغذی آگار حاوی غلظت‌های ٤، ۷، ۱۰ و ۱۵٪ نمک طعام تهیه و پس از اتو کلاو در پتری‌ها پخش شد. بعد از منجمد شدن محیط، ایزوله‌ها به آن تلقیح و بعد از ۱-۲ روز نگهداری در انکوباتور با دمای °C ۲۸-۲۵، رشد آنها مورد بررسی قرار گرفت [۹]. جهت به‌دست آوردن بهترین pH برای تولید بیوسورفکتانت و ازریابی میزان تحمل pH های مختلف، علاوه بر pH استاندارد محیط کشت اصلاح شده MSSO که ۷/۲ بود، رشد جدایه‌ها درpH های ٤ و ۹ نیز بررسی شد [۱۱].

آزمایش لازم برای بررسی تحمل دماهای مختلف انجام گرفت. بدین صورت که جدایه‌ها را در محیط کشت اصلاح شده MSSO کشت داده و در دماهای ۲۵، ۳۷، ٤۵، ۵۵، ٦۰ و °C ۷۰ به مدت ۳ روز گرماگذاری شد [۱۲].

تعیین هویت و شناسایی باکتری‌های مورد نظر با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی انجام شد.۳۱ تست بیوشیمیایی با استفاده از محیط‌های کشت و تست‌های گوناگون در بخش باکتریولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انجام گرفت.

شناسایی مولکولی باکتری‌ها در بخش میکروب‌شناسی پژوهشکده بیوتکنولوژی شیراز انجام شد. از آنجا که خصوصیات ژن 16SrRNA، روش مناسبی جهت مطالعه روابط موجود در میان گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها می‌باشد، جهت تعیین هویت ملکولی سویهٔ منتخب تولید کنندهٔ بیوسورفکتانت، از روش 16S rRNA gene Sequencing استفاده گردید [۱۳ و ۱٤] سپس این ژن با استفاده از PCR تکثیر شد و پس از آن محصول PCR، تعیین توالی گردید. تشابه توالی 16SrRNA باکتری مورد نظر با سایر توالی های موجود در بانک اطلاعاتی که در NCBI[1] قرار دارد، به کمک نرم‌افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج تست‌های بیو شیمیایی انجام شده، در جداول ۳ تا ٦ ارائه شده است.

جدول ۳- نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه ۵

جدایه ۵	
+	واکنش گرم
-	اکسیداز
+	کاتالاز
+	تشکیل لوان
+	هیدرولیز آسکولین
-	لیستیناز
بی هوازی اختیاری	O/F
+	هیدرولیز نشاسته
+	آرجینین دهیدرولاز
-	هیدرولیز توین ۸۰
-	استفاده از سیترات
+	احیای نیترات
+	تولید اوره آز
غیر متحرک	تحرک
تولید اسپور	تولید یا عدم تولید اسپور

جدول٤- نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه ۷

جدایه ۷	
+	واکنش گرم
-	اکسیداز
+	کاتالاز
-	تشکیل لوان
+	هیدرولیز آسکولین
+	لیستیناز
بی‌هوازی اختیاری	O/F
+	هیدرولیز نشاسته
+	آرجینین دهیدرولاز
+	هیدرولیز توین ۸۰
+	استفاده از سیترات
+	احیای نیترات
+	تولید اوره آز
متحرک	تحرک
تولید اسپور	تولید یا عدم تولید اسپور

جدول ۵- نتایج تست‌های حساسیت جدایه ۵ به آنتی بیوتیک‌ها

حساسیت جدایه ۵ به آنتی بیوتیک‌ها	
جدایه۵	آنتی بیوتیک‌ها
حساس	آموکسی سیلین
حساس	آمیکاسین
حساس	جنتامایسین
حساس	کانامایسین
حساس	کلرامفیکول
حساس	ونکومایسین
حساس	نیتروفورانتوئین

1. National Center for Biotechnology Information

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٦- نتایج تست‌های حساسیت جدایه ۷ به آنتی‌بیوتیک‌ها

حساسیت جدایه ۷ به آنتی‌بیوتیک‌ها	
جدایه۷	آنتی‌بیوتیک‌ها
غیر حساس	آموکسی سیلین
حساس	آمیکاسین
حساس	جنتامایسین
حساس	کانامایسین
حساس	کلرامفیکول
حساس	ونکومایسین
حساس	نیتروفورانتوئین

نتایج تست‌های مولکولی

با به دست آوردن نتایج توالی ژن، با استفاده از داده‌های موجود در بانک ژنی NCBI عملیات BLAST انجام گردیده و با توجه به شباهت بالای ۹۰ درصد این توالی‌ها با توالی 16srRNA باکتری‌های Bacillus، Bacillus Subtillis Licheniformis، جدایه‌های ۵ و ۷ به ترتیب در این ۲ گونه طبقه‌بندی شدند [۱۰]

یک نمونه از contig توالی‌های Forward و Reverse که با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI ایجاد شده و مربوط به باکتری Bacillus Subtillis می‌باشد در زیر مشاهده می‌شود.

CAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTG-
CAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTT-
TATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTG-
CAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGT-
GTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTG
ACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACC
GGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGAT
GGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
TGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTG
CTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTT
TCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT
CGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCAC
CGTAAACTTSWGSGTGRCCAAMMMRTCAAA
ATWMMTGTTGAGTWWMRGMSTKGMKSCCS
TMCTCCTSCAGGSKSARWRMWKRATGTMKTT
AAAYTTCRGTCAGYTAATAAKRKYGKAATAG
CACCTGYTAAAACASKTARCRMTCAWMGTW
KAMGGAAMGCTGKAMTWCCGAGTGKTCAA
WCWAATAMMKGTGYWGCTCAAACGMYAMR
YTTTCGCGYCKCAKWKTCAGTWWCRKACCA
GAAARTCRCMTTMGYCAMYGGKGTTCCTCM
ATATCTSTRSRCMTTTSACCGMWACWCRTGGA
ATTCCAMTTTCCTCTTCYGCAYTCAAGTCTCC
CAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGT
GGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCT
GCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAA
CGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGGCTGCT
GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGG
TACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCA
CTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGAC
CCGGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGGCGTT
GCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAAGA
TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
GCCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCCCGAW
YCMMCCATGTCTCAGGTCGG

Archive of SID

نتایج روش جابجایی روغن جهت بررسی تولید بیوسورفکتانت

در جدول ۷ نتایج اجرای روش جابجایی روغن که برای بررسی تولید بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت قابل مشاهده است.

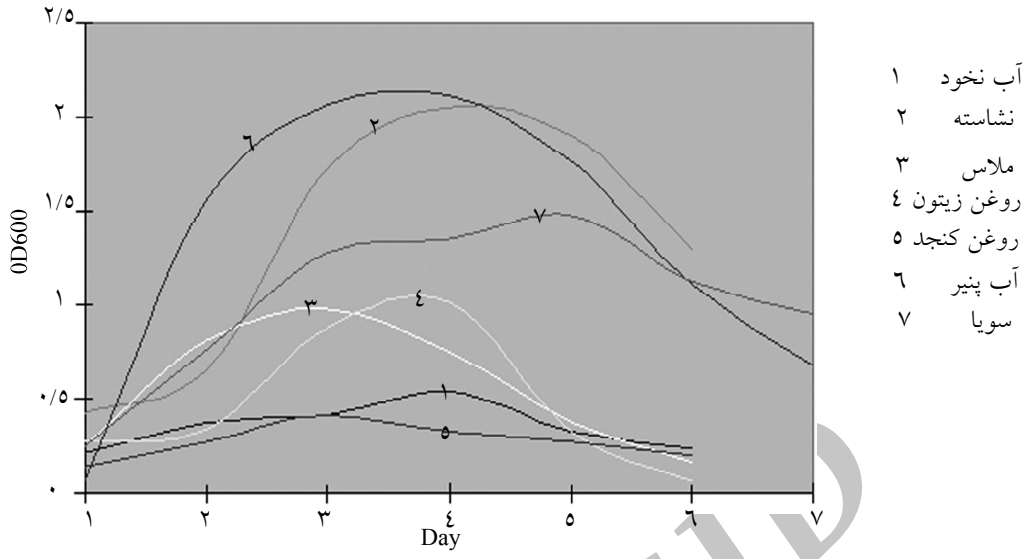
جدول ۷- مقایسه روش‌های تولید بیوسورفکتانت توسط منتخب

جدایه	قطر منطقه شفاف در روش جابجایی روغن (mm)
Bacillus Licheniformis	۸
Bacillus Subtillis	۵/۵

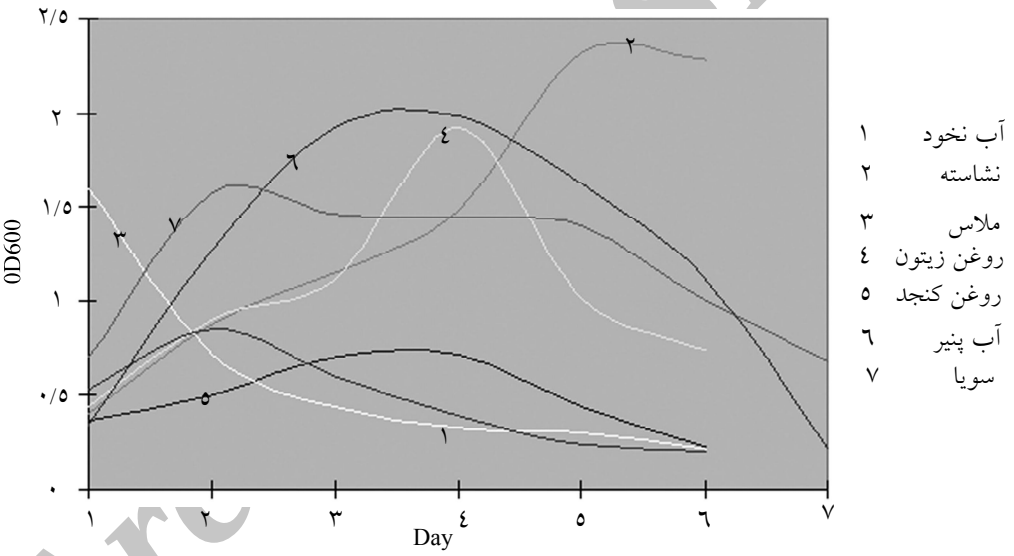
رشد سلولی باکتری‌ها با منابع کربنی مختلف برای تولید بیوسورفکتانت

از بین منابع کربنی نشاسته، ملاس، سویا، آب پنیر، آب نخود، روغن زیتون و روغن کنجد که مورد بررسی قرار گرفت، سه منبع نشاسته، آب پنیر و سویا برای تولید بیوسورفکتانت مناسب بودند و در نهایت بیشترین تولید بیوسورفکتانت زمانی حاصل شد که از نشاسته به عنوان منبع کربن استفاده گردید (شکل‌های ٦و۷). البته در طول آزمایش از گلوکز به عنوان منبع کربن استاندارد و ثابت، استفاده شده است.

www.SID.ir



شکل ٦- تغییرات OD باکتری Bacillus Subtillis با زمان برای منابع کربنی مختلف



شکل ۷- تغییرات OD باکتری Bacillus Licheniformis با زمان برای منابع کربنی مختلف

نتیجه‌گیری

با توجه به آزمایشات انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که روش جابجایی روغن به عنوان یک روش آسان، مورد اعتماد و بدون نیاز به دستگاه‌های ویژه قابل انجام است، یکی از مزایای این روش این است که به حجم بسیار اندکی از نمونه را برای آنالیز نیاز دارد. نکته حائز اهمیت این است که پس از نقطهٔ بحرانی تشکیل میسل، اندازه‌گیری کشش سطحی قادر به نشان دادن افزایش بیوسورفکتانت نیست و تنها با روش جابجایی روغن می‌توان کار را دنبال کرد. بنابراین، محدودهٔ کاربرد روش جابجایی روغن گسترده‌تر از کشش سطحی است؛ لذا روش جابجایی روغن به عنوان بهترین تست برای غربالگری اولیه سویه‌های مولد بیوسورفکتانت مخصوصاً زمانی که تعداد نمونه ها زیاد است پیشنهاد می‌شود. به منظور افزایش دقت در انجام آزمایشات و انتخاب سویه مناسب، علاوه بر روش جابجایی روغن، از روش اندازه گیری کشش سطحی نیز به طور همزمان با صرف زمان و انرژی بیشتر می‌توان استفاده کرد.

تولید بهینه بیوسورفکتانت وابسته به میزان دما، و تحمل شوری می‌باشد. دمای بهینه هرگونه باکتری در محدوده مناسبی از دما است که در آن، میکرواورگانیسم‌ها با بالاترین کیفیت فعالیت می‌کنند که این امر نشان دهنده وابستگی

www.SID.ir

فرآیند تولید بیوسورفکتانت به دما نیز می‌باشد. افزایش دما باعث افزایش سرعت واکنش‌های شیمیایی و تولید متابولیسم میکروبی می‌شود. داده‌های یه دست آمده نشان می‌دهد که Bacillus Subtillis و Bacillus Licheniformis در محدوده دمایی ۲۸ تا ۵۵ °C رشد بسیار سریع و خوبی داشتند و در محدودهٔ pH ۵تا۹ فعالیت خوبی از خود نشان دادند. یکی از خصوصیات مهم بیشتر میکروارگانیسم‌ها وابستگی بسیار زیاد به pH برای رشد سلول و متابولیت‌های ثانویه است.

محیط کشت به میزان قابل ملاحظه‌ای بر رشد و فعالیت باسیلوس‌ها تأثیر می‌گذارد. ترکیبی از نمک‌های معدنی مختلف مانند منبع کربن، نیتروژن و نمک‌ها برای رشد بهینه و حداکثری بیوسورفکتانت مورد نیاز است. در این مطالعه به این نتیجه رسیدیم که شوری یا غلظت نمک، یکی از پارامترهای مهم برای تولید بیوسورفکتانت است؛ به گونه‌ای که در غیاب نمک، رشد و تولید بسیار کم است [۱۱]. از آنجایی که این باکتری‌ها، آبزی می‌باشند، بالاترین فعالیت را در محیط‌های دارای نمک با غلظت ۷ تا۹٪ نشان دادند و بهترین منبع کربن برای باکتری Bacillus Licheniformis نشاسته و برای باکتری Bacillus Subtillis آب پنیر بود.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر علی نیازی رئیس پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز تشکر و قدردانی می‌نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

مراجع

[1] Trondheim O.S. *An Experimental Study of Viscous Surfactant Flooding for Enhanced Oil Recover*, Master Thesis, 2005.

[2] Okpokwasili G.C., and Ibiene A.A. "*Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug*", African Journal of Biotechnology,Vol. 5, No. 5, pp. 453-456, 2006.

[3] Henson M.A. "*Exploiting cellular biology to manufacture high-value products*", IEEE Control Systems Magazine., pp. 54-62, 2006.

[4] Myers D., *Surfactant Science and Technology*, Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2006.

[5] Singh A., Van Hamme J.D., and Ward O.P. "*Surfactants in microbiology and biotechnology:Part 2.*", Application aspects. Biotechnology Advances, Vol. 25 No. 1, pp. 99-121., 2007.

[6] Namani M. and Haghighi M., "*Investigation of the Water Coning Phenomenon in Iranian Carbonate Fractured Reservoirs*", SPE 108254, Presented at the International Oil Conference and Exhibition, Mexico, June 2007.

[7] Amy P.S and Haldeman D.L., (eds), CRV Press, 356, 1997.

[8] Neidleman S.L., and Geigert J., "*Biotechnology and oleochemicals: changing patterns,*" J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 61, pp. 290-297, 1984.

[9] Morikawa M., daido H., Takao T., murata S., Shimonishi Y., and Imanaka T., "*A new lipopeptide biosurfactant producedby Arthrobacter sp. strain MIS38,"* J. Bacteriol., pp. 6459- 6466, 1993.

[10] Thaniyavarn J., Chongchin A., Wanitsuksombut N., Thaniyavarn S., Pinphanichakarn P. and Leepipatpiboon N. "*Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa A41 using palm oil as carbon source,*" J. Gen. Appl. Microbiol., Vol. 52, pp. 215-222, 2006.

[11] Duvnjak Z., Cooper D.G. and Kosaric N. "*Production of surfactant by Arthrobacter paraffineus ATCC 19558*," Biotechnol. Bioeng. Vol. 24, pp.165-175, 1982.

[12] Kosaric, N. "*Biosurfactants in industry*," Pure and Appl. Chern.,Vol. 64, No. 11, pp. 1731-1737, 1992.

[13] Chandler D.P., Brockman F.J.,Bailey T.J. and Fredrickson J.K., Microb Ecol.;36, :37-50, 1998.

[14] Pedersen K., Arlinger J., Ekendahl S. and Hallbeck L., FEMS Microbiol Ecol.;19, :249-262, 1996.

Archive of SID

www.SID.ir