جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت از نمونه خاک‌های آلوده به نفت جزیره سیری

سید منصور میبدی[۱]، محمد قیومی جزه*[۲]، عباس اخوان سپهی[۳]، فریدون فرقانی[۲] و محمدرضا کوچکی[۱]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تنکابن - گروه میکروبیولوژی
۲- دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تنکابن - باشگاه پژوهشگران جوان
۳- دانشگاه آزاداسلامی تهران شمال
mohammad.ghayyomi@yahoo.com

پژوهش نفت
سال بیست و دوم
شماره ۷۲
صفحه۱۱۹-۱۱۰، ۱۳۹۱
تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۲/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۱/۳۰

چکیده

بیوسورفاکتانت‌ها ترکیبات فعال سطحی هستند که توسط گروهی از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. این مولکول‌ها به ترتیب کشش سطحی و بین سطحی را در محلول‌های آبی و سامانه‌های دوفازی کاهش می‌دهند. مهم‌ترین کاربرد بیوسورفاکتانت‌ها در صنعت نفت، افزایش بازیافت نفت است. هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت و بررسی شرایط بهینه از لحاظ دما و pH برای تولید بیشتراین مواد توسط جدایه‌ها می‌باشد. نمونه‌برداری از ۸ نقطه منتخب خاک‌های آلوده به نفت جزیره سیری انجام گرفت. به طورکلی ۱۶۰ سویه باکتری، جداسازی و تحت بررسی ریخت‌شناسی و رنگ‌آمیزی گرم قرار گرفتند. ۵۹ سویه‌دارای فعالیت همولیتیک و ٤٦سویه دارای توانایی فروپاشی قطره هستند. همچنین نتایج آزمایش جابه‌جایی روغن در مورد ۲۰ سویه مثبت می‌باشد.در ادامه ۱۸ سویه برای آزمایش‌های غربال‌گری تکمیلی از جمله فعالیت امولسیفیکاسیون و تشکیل کف و اندازه‌گیری کشش سطحی انتخاب شدند. در نهایت ۲ سویه در دمای C ° ۳۷ و pH=۷، قادر بودند کشش سطحی را بیشتر از mN/m ۳۰ کاهش دهند. در مطالعه حاضر دو سویه برتر با توانایی تولید بیوسورفاکتانت و ظرفیت امولسیفیکاسیون بالا به دست آمد. با توجه به پتانسیل بالای بیوسورفاکتانت تولید شده توسط باکتری‌های منتخب،پیشنهاد می‌شود از آنها به منظور کاربردهای تجاری از جمله افزایش بازیافت نفت، اصلاح زیستی محیط‌های خاکی و دریایی و صنایع غذایی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفاکتانت، جزیره سیری، خاک‌های آلوده ، باکتری، بازیافت نفت

مقدمه

بیوسورفاکتانت‌ها، ترکیبات زیستی آمفی‌پاتیکی هستند که توسط انواع متنوعی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شوند [۱]. این مواد غالباً ترکیبات لیپیدی هستند که ویژگی‌های آن به دو انتهای موجود در مولکول بستگی دارد. یک انتها بخش هیدروکربنی (آب گریز) است که حلالیت کمتری در آب دارد و از زنجیره‌ای بلند از اسیدهای چرب، هیدروکسی اسیدچرب، هیدروکسیل اسیدچرب و یا α-آلکیل هیدروکسی اسیدچرب تشکیل شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

انتهای دیگر آب دوست است که حلالیت بالایی در آب داشته و از کربوهیدارت، آمینواسید، پپتید حلقوی، فسفات و کربوکسیلیک اسید تشکیل شده است [۲-٤].

بیوسورفاکتانت‌ها به‌دلیل دارا بودن مزیت‌هایی از قبیل: سمیت پایین، قابلیت تجزیه زیستی بالا، افزایش تولید کف (این ویژگی در صنایع آرایشی و بهداشتی به عنوان تسهیل‌کننده شستشو و مرطوب کنندگی می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد)، سازگاری خوب با محیط، توانایی فعالیت در دمای بالا، pH و درجه شوری مختلف و قابلیت دسترسی آسان و ارزان قیمت نسبت به سورفاکتانت شیمیایی و سینتیک ارجحیت دارند. این ترکیبات، کاربرد وسیعی در صنایع مختلف از قبیل نفت، پتروشیمی، داروسازی، پزشکی، آرایشی، غذایی، کشاورزی، نساجی، چرم‌سازی و... داشته [۵-۷] و بیشترین کاربرد و میزان فروش آنها در صنعت نفت می‌باشد [۸].

از میکروارگانیزم‌های مولد بیوسورفاکتانت می‌توان برای اصلاح زیستی[1] و پاک‌سازی نشت نفت[2] در محیط‌های آبی و خاکی استفاده کرد [۹ و ۱۰].

یکی از جنبه‌های بسیار جدید و کاربردی بیوسورفاکتانت، افزایش بازیافت میکروبی نفت است. با جداسازی سویه‌های مناسب و بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، متابولیک و بهره‌برداری از سوبسترای خام ارزان قیمت با کمک دانش زیست فناوری، می‌توان به تولید نیمه‌صنعتی و صنعتی بیوسورفاکتانت دست یافت [۱۰-۱۳].

هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت و بررسی شرایط بهینه از لحاظ دما و pH برای تولید بیشتر این مواد توسط سویه‌های جدا شده است.

مواد و روش

نمونه‌گیری

نمونه برداری از ۸ نقطه منتخب جزیره سیری انجام گرفت و نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شدند. می‌توان به این نکته اشاره کرد که نفت خام جزیره سیری از نوع شیرین بوده و میزان سولفور آن پایین است. نفت خام شیرین[3] دارای چگالی ویژه (API) بالاتری است و در پالایش آن می‌توان مقادیر بیشتری فرآورده‌های سبک‌تر و با ارزش‌تر چون بنزین، نفت سفید و گازوئیل به دست آورد. در این تحقیق نمونه‌ها با حرف s و اندیس‌های متفاوت علامت‌گذاری شده‌اند (جدول ۱).

محیط‌های کشت مورد استفاده

در این پژوهش از محیط پیشنهاد شده توسط بنات [۱٤] برای غنی‌سازی میکروارگانیزم‌ها و از محیط پیشنهادی رابرت وهمکاران [۱۵] برای تولید بیوسورفاکتانت استفاده شد .مواد استفاده شده همگی از شرکت‌های Merck و Scharlau می‌باشند.

ترکیبات محیط نمک‌های معدنی جهت غنی‌سازی برحسب gr/lit:
KH_2PO_4(۲/٤)،$(NH_4)_2SO_4$(۲), KH_2PO_4(٤/۸), $MgCl_2$ (۰/۰۸)
$(NH_4)MO_7O_{24}.4H_2O$ (۰/۰۱)، Acid Citric(۰/٤)،

جدول ۱- محل‌های نمونه‌برداری خاک‌آلوده به نفت

شماره نمونه	نوع نمونه	محل نمونه گیری
۱	خاک آلوده به نفت	مجاور مخزن نگه‌داری TO_4 (آب هم‌زاد نفت)
۲	خاک آلوده به نفت	محل تخلیه نفت مخازن نصر وایلام‌برای بازگشت به سیستم پالایش
۳	خاک آلوده به نفت	مجاور مخزن نفتی نصر
٤	خاک آلوده به نفت	مجاور مخزن نگه‌داری T_{10}
۵	خاک آلوده به پساب نفتی	مجاور مخزن نفتی ایلام
٦ و ۷	خاک آلوده به لجن‌های نفتی	لجن‌های نفتی انباشته شده از سال ۱۳٦۲ تا کنون
۸	خاک آلوده به پساب نفتی	جریان پساب نفتی برگشتی کل پالایشگاه

1. Bioremediation
2. Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR)
3.Sweet Crude Oil

Archive of SID

www.SID.ir

($CaCl_2.2H_2O$ (۰/۰۳، عناصر کم مقدار (۲ میلی‌لیتر) و منبع کربن(۲٪ نفت خام (مخزن نفتی نصر)).ترکیبات محیط نمک‌های معدنی جهت تولید بیوسورفاکتانت برحسب gr/lit: K_2HPO_4 (۱)، KH_2PO_4 (۰/۵)، KCl (۰/۱)، $FeSO_4.7H_2O$ (۰/۰۱)، $NaNO_3$(٤)، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۵)، عصاره مخمر (۰/۰۱)، عناصر کم مقدار (۰/۰۵ میلی لیتر) و منبع کربن (۲٪ نفت خام (مخزن نفتی نصر)).

اجزای کم مقدار محیط نمک‌های معدنی برای غنی‌سازی و تولید بیوسورفاکتانت شامل (گرم لیتر):(۱) $FeSO_4.7H_2O$، (۲) $NaMoO_4$، (۱) $MnCl_2$، (/۳) $ZnSO_4.7H_2O$، (/۲۵) $CuSO_4.5H_2O$، (/۲۵) $CoCl_2.6H_2O$، (۱/۵) H_3BO_3.

کشت‌های میکروبی

بعد از انجام نمونه‌گیری و انتقال نمونه‌ها در شرایط سترون به آزمایشگاه، غنی‌سازی به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۰ °C با سرعت همزن ۲۰۰ rpm، انجام شد [۱۶-۱۹]. پس از غنی‌سازی، با استفاده از محلول نمکی نرمال ۰/۹٪ رقت‌های متوالی 10^{-6}، 10^{-5}، 10^{-4} از نمونه‌ها تهیه و در محیط نمک‌های معدنی آگاردار به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ °C کشت داده شد. جهت تأمین منبع کربن در محیط‌های نمک‌های معدنی آگار دار از کاغذ صافی آغشته به نفت سفید سترون شده با فیلتر میلی‌پور (Milipore Filter) ۰/۲ میکرون، در کف در بشقاب کشت استفاده شد.به این ترتیب بخارات حاصل از نفت در فضای داخلی پلیت جمع شده و میکروارگانیزم‌ها به عنوان منبع کربن از آن استفاده می‌کنند.

بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی پرگنه‌های خالص با انجام رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت. سپس پرگنه‌های خالص برای تولید بیوسورفاکتانت در محیط نمک‌های معدنی به مدت ۹٦ ساعت در دمای ۳۰ °C با سرعت هم‌زن ۲۰۰ rpm، گرم‌خانه‌گذاری شدند [۲۰]. این محیط برای انجام آزمایش‌های غربال‌گری سویه‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت استفاده شد. لازم به ذکر است در مواردی که نیاز به کشت بدون سلول بود، محیط کشت به دست آمده را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ °C و سرعت ٤۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده ورومانند (سوپرناتانت) حاصله، برای انجام آزمایش‌های غربال‌گری مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش‌های اولیه برای غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت

بررسی فعالیت همولیتیک[1]

جدایه‌ها در محیط ژلوز خون‌دار حاوی ۵٪ خون گوسفندی در دمای ۳۷ °C به مدت ٤۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس پلیت‌ها برای بررسی ناحیه شفاف اطراف پرگنه (همولیز) به‌منظور تشخیص تولید بیوسورفاکتانت مورد بررسی قرار گرفتند [۲۱ و ۲۲].

روش فروپاشی قطره[2]

در این آزمایش طبق روش بودور و میلر-مایر مقداری نفت خام (مخزن نفتی نصر) روی یک لام پخش شده، به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر از روماند میکروبی به شکل قطره روی سطح لام تلقیح وپس از زمان ۱ دقیقه، شکل قطره با عدسی ۱۰ میکروسکوپ نوری بررسی شد [۲۳]. از آب مقطرغیر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

تکنیک جابه جایی روغن[3]

برای انجام این آزمایش طبق روش یوسف و همکاران [۲۲] و پلازا وهمکاران [۲۱] مقدار ۵۰ میلی لیتر آب مقطر داخل پلیت بزرگ (با قطر ۲۵ cm) ریخته، سپس ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام (مخزن نفتی نصر) به سطح آب اضافه شد. پس از پخش شدن نفت، ۱۰ میکرولیتر روماند میکروبی به مرکز پلیت افزوده گردید و وجود بیوسورفاکتانت با ایجاد ناحیه شفاف (دایره) روی سطح نفت مشخص شد. از ۱۰ میکرولیترآب مقطرغیر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

آزمایش‌های تکمیلی برای غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت

جدایه‌هایی که بهترین نتایج مثبت را در آزمایش‌های اولیه داشتند، برای آزمون‌های تکمیلی انتخاب شدند.

اندازه‌گیری کشش سطحی

این آزمایش متداول‌ترین و مطمئن‌ترین روش تشخیص تولید بیوسورفاکتانت است. چون کشش سطحی تابع درجه حرارت محیط است، کشش سطحی روماند تمامی نمونه‌ها

1. Hemolytic Activity
2 .Drop-Collapse Method
3. Oil Displacement Method

Archive of SID
www.SID.ir

در شرایط دمایی یکسان (۲٤ °C) به وسیله دستگاه تنسیومتر اندازه‌گیری شد. (KRÜSS GmbH Hamburg, Germany) نتایج کشش سطحی به دست آمده با کشش سطحی آب مقطر غیر سترون یا محیط کشت سترون به‌عنوان شاهد منفی و Tween 20 به‌عنوان شاهد مثبت بررسی گردید [۲٤ و ۲۵].

بررسی فعالیت امولسیفیکاسیون[1]

این آزمایش اساس روش رحمان و همکاران صورت گرفت [۲۰ و ۲٦]. به‌این‌ترتیب حجم‌های مساوی (mL ۵) از نفت خام و روماند (سوپرناتانت) داخل لوله آزمایش ریخته شد و برای ۲ دقیقه به شدت هم زده شد. پس از ۲٤ ساعت قرار دادن لوله‌ها در محیط آزمایشگاه و در حالت سکون، حجم کل ستون مایع و حجم لایه امولسیون اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه E_{24}، درصد امولسیفیکاسیون بررسی گردید. در این مرحله از یک لوله محیط کشت سترون به عنوان شاهد منفی و از سدیم دودسیل سولفات[2] به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

E_{24}٪ = حجم کل ستون مایع/حجم لایه امولسیون ×۱۰۰

بررسی فعالیت شکل‌گیری کف

با اندازه‌گیری فعالیت شکل‌گیری کف، می‌توان به میزان پایداری امولسیون ایجاد شده توسط بیوسورفاکتانت تولیدی سویه‌های برتر پی برد [۲۷]. همه سویه‌هایی که طی مراحل اولیه غربال‌گری نتایج مثبتی داشتند، به‌طور جداگانه درون ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی لیتر که حاوی ۵۰ میلی لیتر آب‌گوشت مغذی بود، تلقیح و به مدت ۹٦ ساعت، در دمای ۳۷ °C درون گرم‌خانه شیکردار (۲۰۰ rpm) قرار داده شد. سپس فعالیت تشکیل کف براساس پایداری و ارتفاع کف تولید شده، بررسی گردید. از محیط کشت سترون به عنوان شاهد منفی و از سدیم دودسیل سولفات به عنوان شاهد مثبت استفاده شد [۲۸].

نتایج و بحث

در این پژوهش، ۱٦۰ باکتری جداسازی شد که طی بررسی‌های ریخت‌شناسی مشتمل بر ۱۱۰ باسیل گرم مثبت،۱۵ کوکسی گرم مثبت،۲۰ باسیل گرم منفی و ۱۵ کوکسی گرم منفی بودند که روی محیط نوترنیت آگار کشت داده شدند. از این بین، ۵۹ سویه بتا همولیتیک، ٤٦ سویه دارای توانایی فروپاشی قطره و ۲۰ سویه دارای توانایی جابه‌جایی روغن بودند. در نهایت، طی آزمایش‌های غربال‌گری اولیه، ۱۸ سویه برای آزمون غربال‌گری تکمیلی انتخاب شدند. با توجه به نتایج، ۱۱ جدایه فعالیت شکل‌گیری کف از ۲۵ min تا ۱۳۵ min را از خود نشان دادند (جدول ۲ و شکل ۱). هم‌چنین این جدایه‌ها، کاهش کشش سطحی از ۲۹ mN/m تا ٥٦ mN/m و فعالیت امولسیفیکاسیون از ۵۱/٥٤٪ تا ۸۰/۳٦٪ را بروز دادند (جدول ۳ و شکل ۲). لازم به ذکر است که آزمون‌های مربوطه با۳ تکرار صورت گرفت.

با توجه به نتایج و بررسی جداول مشخص شد که دو سویه باکتری S_7-7 و S_5-6 بهترین نتایج را طی آزمایش‌های اولیه و تکمیلی برای تولید بیوسورفاکتانت از خود نشان دادند.

بهینه‌سازی دما و pH برای افزایش تولید بیوسورفاکتانت

برای افزایش میزان تولید، مقادیر pH محیط از ٦ تا ۸/۵ (با گام‌های ۰/۵) تغییر داده شد که مطابق شکل ۳ بیشترین رشد و تولید بیوسورفاکتانت در pH=۷ در سویه‌های S_7-7 و S_5-6 دیده شد. همچنین دمای بهینه برای تولید بیوسورفاکتانت نیز تعیین گردید که نتایج آن در شکل ٤ رسم شده است.

ضرورت جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی بومی تولید کننده بیوسورفاکتانت

آنچه موجب شده است خلیج فارس و جزایر آن در زمره مهم‌ترین مناطق استراتژیک دنیا قرار گیرد، وجود میادین و مخازن وسیع نفتی در آب‌های خلیج فارس است. ۵۵٪ ذخایر نفت و ٤۱٪ ذخایر شناخته شده گاز جهان، در منطقه خلیج فارس واقع شده است [۲۹]. همان‌طورکه انتظار می‌رفت ارگانیسم‌های به‌دست آمده از خاک‌های آلوده نفتی توانایی زیادی در تولید بیوسورفاکتانت دارند. با توجه به نمونه‌گیری انجام شده از مناطق مختلف جزیره سیری، یکی از سویه‌ها که توانایی کاهش کشش سطحی را تا ۲۹ mN/m داشت، از منطقه‌ای جدا شد که از سال ۱۳٦۲ آلوده به لجن نفتی بود.

1. Emulsification
2 .Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

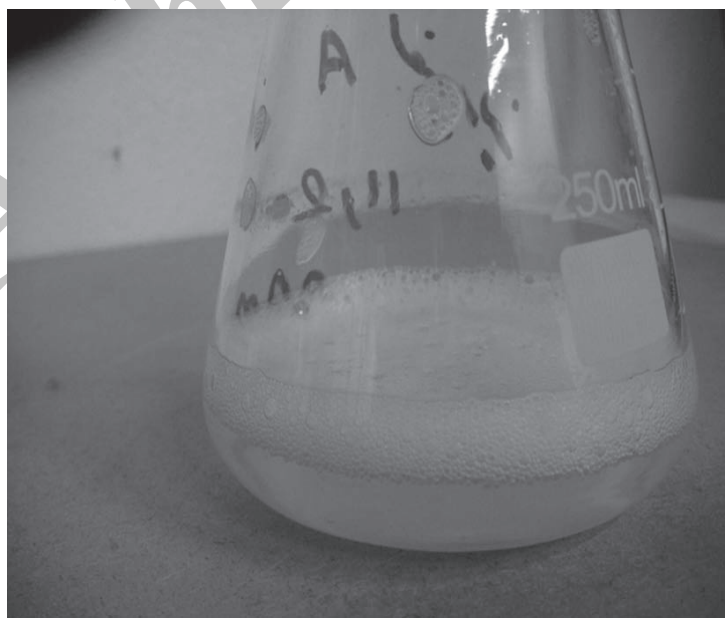
Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲- فعالیت شکل‌گیری کف ۱۱ جدایه

جدایه	پایداری کف (دقیقه)	ارتفاع کف (میلی متر)	خصوصیات کف
S_1- 4	۵۵	۸	+
S_3- 13	۲۰	۷	+
S_3- 1	۲۵	۷	+
S_4- 8	٤۵	۸	+
S_4- 4	٦۰	۹	+
S_5- 6	۹۵	۱۳	++
S_6- 3	۳۰	۷	+
S_6- 12	۱۰۵	۱٦	++
S_7- 7	۱۳۵	۲۸	+++
S_8- 12	۳۵	۷	+
S_8- 5	۷۵	۱۱	++
Culture medium	٦	۳	–
SDS 1%	۳۸	۷	+

(+):حباب‌های بزرگ، پراکنده، پایداری کم
(++):حباب‌های متوسط، متمرکز، پایداری متمرکز
(+++):حباب‌های ریز، متمرکز، پایداری بالا



شکل ۱- آزمایش شکل‌گیری کف برای سویه S_7-7

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تشخیص بیوسورفاکتانت تولیدی توسط جدایه‌ها با تکیه بر آزمایش‌های غربال‌گری اولیه و تکمیلی

جدایه	فعالیت همولیتیک	جابجایی روغن*	فروپاشی قطره**	فعالیت شکل‌گیری کف	درصد امولسیفیکاسیون نفت خام (E_{24})	کشش سطحی mN/m
S_1- 4(A)	++	+	+	+	٪۶۹/۱۲	۴۲
S1- 4	++	+	++	–	٪۵۷/۱۴	۵۵
S_2- 12	++	+	++	–	٪۵۹/۹۶	۴۶
S_2- 5	+	+	+	–	٪۵۸/۰۱	۴۷
S_2- 16	++	+	++	–	٪۵۵/۱۶	۵۵
S_3- 19	+	+	+	–	٪۶۱/۱۲	۵۰
S_3- 13	–	++	+	+	٪۵۷/۰۵	۵۳
S_3- 1	++	+	+	+	٪۶۵/۰۸	۴۹
S_4- 8	++	++	–	+	٪۶۹/۰۵	۴۵
S_4- 4	++	++	+	+	٪۷۱/۲۶	۴۹
S_5- 6	++	–	++	++	٪۷۹/۹۸	۴۰
S_6- 3	+	++	++	+	٪۶۶/۷۳	۴۹
S_6- 12	–	+	++	++	٪۸۰/۰۶	۵۱
S_7- 7	+++	++	+	+++	٪۸۰/۳۶	۲۹
S_7- 2	++	++	+	–	٪۵۱/۵۴	۴۵
S_8- 14	+	++	–	–	٪۵۹/۵۱	۵۰
S_8- 5	–	+	+	++	٪۷۲/۸۵	۵۶
S_8- 12	+	+	+	+	٪۶۷/۵۳	۵۱
Water	–	–	–	–	–	۷۰
Culture medium	–	–	–	–	–	۶۵
Tween 20	–	–	–	–	–	۳۵
SDS 1%	–	–	–	+	٪۶۸/۵	–

* (+): نواحی شفاف با قطر کمتر از ۱ cm

(++): نواحی شفاف با قطر ۱ تا ۳ cm

(+++): نواحی شفاف با قطر بیشتر از ۳ cm

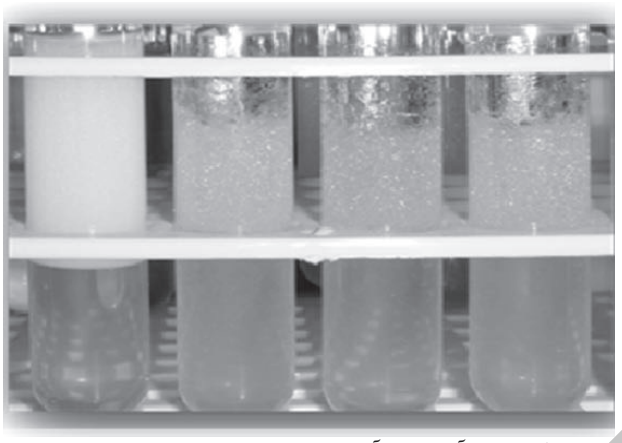
**(+): قطراتی که کمتر از ۱ cm پخش می‌شوند

(++): قطراتی که ۱ تا ۱/۵ cm پخش می‌شوند

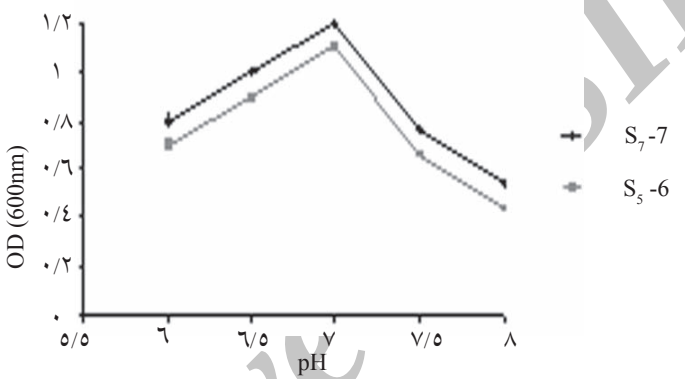
(+++)**: قطراتی که بیشتر از ۱/۵ cm پخش می‌شوند

Archive of SID

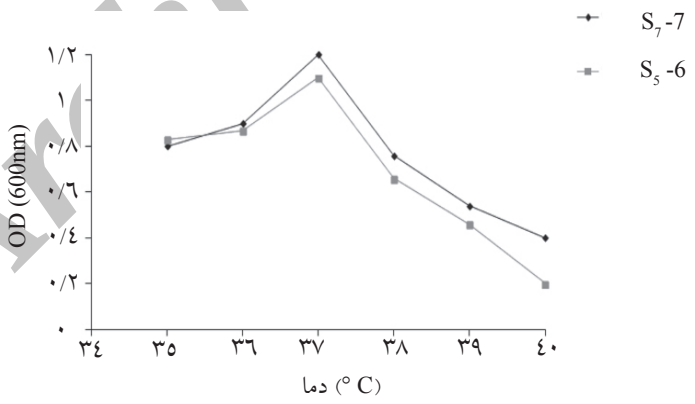
www.SID.ir



شکل ۲- آزمایش آمولسیفیکاسیون برای سویه S_5-6



شکل ۳- بهینه‌سازی pH



شکل ٤- بهینه‌سازی دما

چنین نتیجه‌ای توسط فرانسی در سال ۱۹۹۰ نیز تأیید شده است [۳۰]. فرانسی با مطالعه نشت سوخت هواپیماکه به مدت طولانی سبب آلوده شدن خاک آن منطقه در شهر تراورس در ایالت میشیگان آمریکاشده بود، ثابت کرد که تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده آلاینده‌ها و تولیدکننده بیوسورفاکتانت در مناطقی که به مدت طولانی آلوده به نفت هستند یک تا دو برابر بیشتر از سایر مناطق است.

تولید و جداسازی بیوسورفاکتانت توسط سویه‌های منتخب

سورفاکتانت‌های زیستی مزیت‌های بسیاری نسبت به سورفاکتانت‌های شیمیایی دارند. به همین دلیل، در حال حاضر بیشتر مطالعات بر روی تولید سورفاکتانت‌های زیستی به روش تخمیر، انجام کشت‌های پیوسته، تغییرات ژنتیکی سویه‌های تولیدکننده این ترکیبات و بررسی کاربردهای تجاری آنها صورت می‌گیرد.

Archive of SID
www.SID.ir

تلفیق روش بررسی فعالیت همولیتیک با روش غنی‌سازی روی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی که در این تحقیق صورت گرفت، باعث کاهش قابل ملاحظه در تعداد سویه‌های موجود در نمونه‌های خاک‌های آلوده شد که این عمل تا حد زیادی از حجم کار در مرحله غربال‌گری اولیه کم کرد. بر این اساس، از نمونه‌های خاک تهیه شده ۱۶۰ سویه میکروبی جدا شد. باکتری‌های برتر در pH= ۷ بیشترین رشد و تولید بیوسورفاکتانت را داشتند که این نتیجه تطابق خوبی با بررسی تورکُوس کایا وهمکارانش [۳۱] داشت که باکتری‌های جدا شده توسط آنها در pH=۷ بیشترین میزان رشد، افزایش تولید بیوسورفاکتانت و حذف آلاینده‌های نفتی را نشان دادند. مدت زمان بهینه گرم‌خانه‌گذاری به منظور انجام آزمایش‌های غربالگری و افزایش تولید بیوسورفاکتانت، ۹۶ ساعت تعیین شد. باید به این نکته اشاره کرد که هر ۲۴ ساعت یک‌بار از زمان شروع گرم‌خانه‌گذاری، روماند میکروبی هریک از نمونه‌ها جدا و تغییرات کشش سطحی و فعالیت امولسیفیکاسیون آنها اندازه‌گیری شد. در نهایت پس از ۹۶ ساعت، بالاترین میزان جذب نوری و بهترین نتایج در آزمایش‌های غربالگری تکمیلی مشاهده شد. لذا می توان گفت، بیوسورفاکتانت یک متابولیت اولیه است که افزایش تولید آن در فاز رشد و با افزایش توده سلولی رابطه مستقیمی دارد، که این نتیجه تطابق خوبی با بررسی‌های باقری لطف آباد و همکاران [۱]، حداد و همکاران [۷] و پریا و اوشارانی [۳۲] دارد طبق یافته‌های این محققین باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت بیشترین میزان تولید را در فاز رشد و ابتدای فاز سکون از خود نشان می‌دهند. میزان درصد امولسیفیکاسیون جدایه S_7-7 نسبت به سایرین بیشتر بود. بدین ترتیب نتیجه به دست آمده توسط آروم و پکدمیر [۲۵] در سال ۲۰۰۴ واکرنتوگبا وازرونی [۱۱] در سال ۲۰۰۳ تأیید شد که ثابت کردند توانایی امولسیفیکاسیون باکتری‌های جدا شده از مناطقی که به مدت طولانی در معرض آلودگی هستند، بیشتر از سایرمناطق است. همان‌گونه‌که در جدول ۳ مشاهده شد، دو جدایه منتخب، کشش سطحی را تا کمتر از ۴۰ mN/m کاهش دادند که نصر و همکارانش [۱۰] نشان دادند بیوسورفاکتانتی موثر و کار آمد است که بتواند کشش سطحی را تا کمتر از ۴۰ mN/m کاهش دهد.

نتیجه‌گیری

تولید ترکیبات فعال سطحی یا بیوسورفاکتانت‌ها در سال‌های اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، خصوصاً در زمینه کاربردهای بالقوه این ماده در افزایش بازیافت نفت که نقش مهمی را ایفا می‌کند [۳۳]. با توجه به نتایج، باکتری‌های منتخب (S_5-6، S_7-7) جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت با کاهش کشش سطحی به میزان بیش از ۳۰ mN/m مولد مناسب بیوسورفاکتانت هستند. با بهینه کردن شرایط محیطی جدایه‌ها از جمله دما و pH، افزایش تولید بیوسورفاکتانت در دمای ۳۷ °C و pH=۷ مشاهده شد. این مسأله نشان می‌دهد که با بهینه‌سازی محیط کشت، امکان فراهم ساختن شرایط مناسب‌تر برای ترشح بیشتر بیوسورفاکتانت وجود دارد. با توجه به پتانسیل بالای باکتری‌های منتخب از جمله کاربردهای بالقوه آن‌ها در افزایش بازیافت میکروبی نفت (MEOR) و حذف آلاینده‌های نفتی، می‌توان امیدوار بود بررسی بیشتر خصوصیات سویه‌ها و جستجو برای جداسازی سویه‌های بومی جدید بتواند نقش حیاتی در به کارگیری سویه‌های بومی کشور در صنعت نفت داشته باشد.

قدردانی

نگارندگان لازم می دانند مراتب سپاس خود را از آقای مهندس سید جلال موسوی ریاست محترم واحد پژوهش و توسعه شرکت نفت فلات قاره و همچنین کارکنان آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن اعلام نمایند.

Archive of SID

www.SID.ir

مراجع

[1]. Bagheri L. T., Shourian M., Rootaazad R., Rouholamini N. A., Adelzadeh A. R., and Noghabi K., "*An efficient biosurfactant-producing bacterium Pseudomonas aeruginosa MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran*",Colloids and surface B:Biointerfaces.,Vol. 69, pp.183-193, 2009.

[2]. Chen S. Y., Wei Y. H., and Chnd J. S., "*Repeated PH-salt fed-batch fermentation for rhmnoloipid production with indigenous Pseudomonas aeruginosa S2*", Applied Microbial Biotechnol., Vlo. 76, pp. 67-74, 2007.

[3]. Mata-Sandoval J. C., and Karns J. A., "*Torrents.High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhmmnolipid mixtures produced by Pseudomonas aeruginosa UG2 on corn oil*", J .Chromatogr., Vol. 846, pp. 211-220, 1999.

[4]. Maier R. M., and Soberon Chavez G., "*Pseudomonas aeruginosa rhamonolipid:Biosynthesis and Potential Application*", Biotechnol., Vol. 54, pp. 625-633, 2000.

[5]. Makkar S., Cameotra S., and Banat I. M., "*Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production*" , AMB Express., Vol.1, pp.1-5, 2011.

[6]. Babu P. S., Vaidya A. N., Bai A. S., Kapur R., Juwarkar A., and Kaanna P., "*Kinetics of biosurfactant , production by Pseudomonas aeruginosa Strain BS2 from Industrial Wastes*" , Biotech Letters., Vol. 18, pp. 263-268, 1996.

[7]. Haddad I. A., Wang J., and Mu B., "I*dentification of a Biosurfactant producing Strain:Bacillus subtilis HOB2*", protein&peptide letter., Vol. 16, pp. 7-13, 2009.

[8]. Dyke M.,"*Evaluation of microbial surfactant for recovery of hydrophobic pollutants from soil*", J of industrial Microb.,Vol. 11, pp. 163-170, 1993.

[9]. Ghojavand H., Vahabzadeh F., and Azizmohseni F., "*A Halotolerant , Thermotolerant, and Facultative Biosurfactant Producer: Identification and Molecular Characterization of a Bacterium and Evolution of Emulsifier Stability of a Lipopeptide Biosurfactant*" , Biotechnology and Bioprocess Engineering, Vol. 16, pp. 72-80, 2011.

[10]. Nasr S., Soudi M. R., Mehrian M. R., and Sarrafzadeh M. H., "*Characterization of novel biosurfactant producing strains of Bacillus spp. Isolated from petroleum contaminated soil*". IJM ., Vol. 1, pp. 54-61, 2009.

[11]. Okerentugba P. O., and Ezerony O. U., "*Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria*" ,African Journa of biotechnology., Vol. 2, pp. 288-292, 2003.

[12]. Fiechter A., "*Biosurfactant moving toward industrial application*". BIOTECH., Vol. 10, pp. 208-217, 1992.

[13]. Mulligan C. N., "*Environmental applications for biosurfactants*", Environ Pollut., Vol. 133, pp. 183-198, 2005.

[14]. Banat I.M., "*The isolation of thermophilic biosurfactant producing Bacillus sp.*" Biotechnol Lett., Vol. 15, pp. 591-594, 1993.

[15]. Robert M., Mercade M. E., Bosch M. P., Parra J. L., Espuny M. J., Manresa M. A. and Guinea J. "*Effect of the carbon source on Biosurfactant Production by Psuedomonas aeruginosa 44T1*", Biotechnology Letters., Vol. 11, pp .871-874, 1989.

[16]. Rahman K. S. M., Rahman T. J., Lakshmanaperummalsamy P. and Banat I. M., "*Occurrence of Crude Oil Degrading Bacteria in Gasoline and Diesel Station Soils"*, J Basic Microbial., Vol. 42, pp. 284-291, 2002.

[17]. Rahamn K. S. M., Rahamn T. J., Lakshmanaperumalsamy P., and Banat I. M., "*Towards Efficient Crude Oil*

Archive of SID
www.SID.ir

Degradation by a Mixed Bacteria Consortium", Bioresource Technology., Vol. 85, pp. 257-261, 2002.

[18]. Cunha C. D., Rosario M., Rosado A. S. and Leite S. G. F., "*Serratia sp.SVGG16:A Promising Biosurfactant Producer Isolated From Tropical Soil During Growth with Ethanol –Blended Gasoline*", Process Biochemistry., Vol. 39, pp. 2277-2282, 2004.

[19]. Bicca F. C., Fleck L.C. and Ayub M. A. Z., "*Production of Biosurfactant by Hydrocarbon Degrading Rhodococcus Erythropolis*" , Revista de Microbiologia., Vol. 30, pp. 231-236, 1999.

[20]. Rahamn K. S. M., Rahamn T. J., Lakshmanaperumalsamy P., Marchant R. and Banat I. M., "*The Potential of Bacteria Isolates for Emulsification with a Range of Hydrocarbons*", Acta Biotechno., Vol. 23, pp. 335-345, 2003.

[21]. Plaza G. A., Zjawiony I. and Banat I. M., "*Use of defferent methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils*", J petroleum Sci Eng., Vol. 50 pp. 71-77, 2006.

[22]. Youssef N. H., Duncan K. E., Nagle D. P., Savage K. N., Knapp R. M., and Mclnerney M. J., "*Comparison of methods to detect biosurfactant production be diverse microoraganism*", J Microbiol Methods., Vol. 56, pp. 339-347, 2004.

[23]. Youssef N. H., Duncan K. E., Nagle D. P., Savage K. N., Knapp R. M., and Mclenerney M. J., "*Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms*", Journal of Microbiological Methods., Vol. 56, pp. 339-347, 2004.

[24]. Batista S.B., Mounteer A.H., Amorim F.R. and Totola M.R. "*Isolation and characterization of biosurfactant / bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites*", Bioresour Technol., Vol. 97, pp. 868-875, 2006.

[25]. Urum K., and Pekdemir T., "*Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing*", Chemosphere., Vol. 57, pp. 1139-1150, 2004.

[26]. Rahman K. S. M., Rahman T. J., Mcclean S., Marchant R. and Banat I.M., "*Rhmonoloipid Biosurfactant Production by Strains of Pseudomonas aeruginosa Using Low-Cost Raw Materials*", Biotechnol Prog., Vol. 18, pp. 1277-1281, 2002.

[27]. Dehghan-Noudeh G., Moshafi M. H., Behravan E., Torkzadeh S. and Ahmadi Afzad M., "*Screening Three Strains of Pseudomonas aeruginosa:Prediction of Biosurfactant-Producer Strain*", American Journal of Applied Sciences.,Vol. 6 , pp.1453-1457, 2009.

[28]. Chayabutra C., Wu J., and Ju L. K., "*Rhmonolipd production by Pseudomonas aeruginosa under denitrification: Effects of Limiting nutrients and carbon substrates*", Biotechnol Bioeng., Vol. 72, pp. 25-33, 2001.

[29]. Boghrati N., "Omission of ‹Persian Gulf› Name Angers Iran", http://www.worldpress.org/Mideast/2616.cfm , 2006.

[30]. Francy D.S., "*Emulsification of hydrocarbons by subsurface Bacteria*", J of Industrial Microb., Vol. 8, pp. 237-246, 1991.

[31]. Turkovskaya O. V., Dmitrieva T.V., and Muratova A. "*A Biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa Strain*" , Applied Biochemistry and Microbiology., Vol. 37, pp. 71-75, 2001.

[32]. Priya T., and Usharani G., "*Comparative Study for Biosurfactant Production by Using Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa*", Botany Research International., Vol. 2 , pp. 284-287, 2009.

[33]. Banat I. M., "*Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation*", A review. Bioresource Technol., Vol. 51, pp. 1-12, 1995.

Archive of SID

www.SID.ir