Archive of SID

بررسی عملکرد میکروارگانیسم ها جهت تولید بیوسورفکتانت و تعیین شرایط بهینه تولید آن در مقیاس آزمایشگاهی به منظور استفاده در فرآیند ازدیاد برداشت نفت

علی حسینی[1] – سیدعطاءالله سیّد[2] – محمدامین غلامزاده[3]

[1و3] دانشگاه آزاد اسلامی واحد گچساران – گروه مهندسی نفت - گچساران - ایران

[2] دانشگاه آزاد اسلامی واحد امیدیه – گروه مهندسی نفت - امیدیه – ایران

[1]عهده دار مکاتبات(aa199049@yahoo.com)

چکیده

یکی از روشهای ثالثیه ازدیاد برداشت نفت روش میکروبی است چندین مکانیسم برای این فرآیند پیشنهاد شده است که شامل مکانیسم های تولید گاز، تولید اسید، تولید بیوسورفکتانت، تولید بیوپلمیر و انسداد انتخابی است. یکی از مهمترین مکانیسم ها تولید بیوسورفکتانت می باشد.در این مقاله از گونه ی Bacillus subtillis که از خاک های آلوده نفتی ایران جدا شده است به تولید بیوسورفکتانت پرداخته شده است. شرایط تولید آن بهینه می شود و تاثیر حامل های جامد روی تولید بیومس و محصول بررسی گردید و در نهایت تأثیر مقادیر مختلف پر شدن محیط کشت در یک ارلن ۵۰۰ سی سی بررسی گردید. همچنین مشاهده گردید که افزودن مقدار کمی کربن اکتیو سبب افزایش قابل توجه بیومس و محصول شده افزایش تولید به خاطر تحریک رشد سلولی به خاطر حضور حامل کربن اکتیو تلقی شد. نرخ مناسب همزدن ۲۵۰ به دست آمده و کاهش کشش سطحی آب از ۷۲ به ۲۵ رسید.

کلمات کلیدی:Biosurfactant,Surfactin,Carbonactivated,Biomass,Emulsifier

www.Reservoir.ir

www.SID.ir

Archive of SID

۱-مقدمه:

بیوتکنولوژی صنعتی با توجه به پیشرفتهای حاصله در سیستم های پیچیده بیولوژیکی و نیاز روزافزون به محصولات حاصل از فرآیندهای تخمیری در اقتصاد، بسیار قایل توجه می باشد. از حدود شصت سال پیش به میکرواورگانیسم ها برای بهبود شرایط تولید نفت توجه بیشتری شده است. در دهه ۱۹۴۰ نخستین بار زوبل(Claude Zobell) نشان داد که باکتری های بی هوازی احیاء کننده نفت سولفات میتوانند سبب آزاد شدن قیر نفت از ماسه های نفتی شوند. باید توجه کرد که افزایش بازده تولید با روش میکروبی برای تمام مخازن امکان پذیر نیست. شوری بالا(بیش از ٪ ۱۲)، دمای بالا(بیش از ^{o}C ۵۰) و نفوذپذیری بسیار اندک شرایطی هستند که کاربرد ازدیاد برداشت میکروبی را دشوار میکنند[۴]. بدیهی است که انتخاب میکرواورگانیسم، نحوه تغذیه آن، دوره افزودن مواد غذایی و اکسیژن و....، به عمق چاه، نوع نفت، مقدار آب و ساختار زمین شناسی مخزن بستگی دارد. تیمار چاه گاه با فرستادن میکرواورگانیسم های ویژه به درون مخزن است، گاهی برای تقویت میکرواورگانیسم ها و تسریع حصول نتیجه، مواد مغذی (نمکهای معدنی مثل نمکهای فسفر و نیتروژن و یا ترکیبات آلی مانند ملاس) نیز به چاه تزریق می شوند. گاهی هدف پروژه فعال کردن میکروفلور طبیعی منطقه به کمک تزریق مواد مغذی است و باکتری اضافی تزریق نمی شوند [۳].

۲-مواد و روشها:

گونه ی باسیلوس سابتیلس از خاکهای سطحی یک منطقه فعال کشاورزی و نیز خاک آلوده به مواد نفتی جدا گردید. یک لوپ از باکتری فوق را به یک ارلن ۲۵۰ سی سی که حاوی نوترینت براث به مقدار ۱۵۰ سی سی می باشد منتقل نموده و به مدت ۲۴ ساعت در rpm ۱۵۰ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرما گذاری شد.
سپس به مقدار ۲۰ سی سی از نوتریت براث حاوی گونه فوق به ۲۵۰ سی سی محیط کشت اصلی که درون یک ارلن ۵۰۰ سی سی قرار دارد اضافه می کنیم و سپس آن را در شیکرانکوباتور قرار می‌دهیم.
اجزای محیط کشت اصلی بیوسورفکتانت به شرح زیر است. تمامی ترکیبات از شرکت X خریداری شده است.

جدول ۱: اجزای محیط کشت تولید بیوسورفکتانت (E-medium)

محلول A:

نام ترکیب	میزان مصرف (گرم در لیتر)
KH_2PO_4	۲/۷
K_2HPO_4	۱۳/۹
Sucrose	۱۰
NaCl	۵۰
Yeast extract	۰/۵
$NaNo_3$	۱

pH محلول برابر ۶/۹ تنظیم می شود

محلول B:

نام ترکیب	میزان مصرف (گرم در لیتر)
$Mg\ SO_4$	۲۵

محلول C:

نام ترکیب	میزان مصرف (گرم در لیتر)

www.Reservoir.ir

www.SID.ir

Archive of SID

$(NH_4)_2SO_4$	۱۰۰

محلول D:

نام ترکیب	میزان مصرف (گرم در لیتر)
EDTA	۰/۵
$MnSO_4.H_2O$	۳
NaCl	۱
$CaCl_2.2H_2O$	۰/۱
$ZnSO_4.7H_2O$	۰/۱
$FeSO_4.7H_2O$	۰/۱
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۱
$AlK(So_4)_2$	۰/۰۱
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۱
Boric acid	۰/۰۱
Na_2SeO_4	۰/۰۰۵
$NiCl_2.6H_2O$	۰/۰۰۳

برای تهیه محیط کشت محلولهای A و B و C به صورت جداگانه اتوکلاو می شوند و محلول D از طریق فیلتراسیون استریل می شود و در شرایط استریل ۱۰ میلی لیتر از محلولهای B و C و D به یک لیتر از محیط A افزوده می شود.

۳-آزمایش بررسی اثر pH:

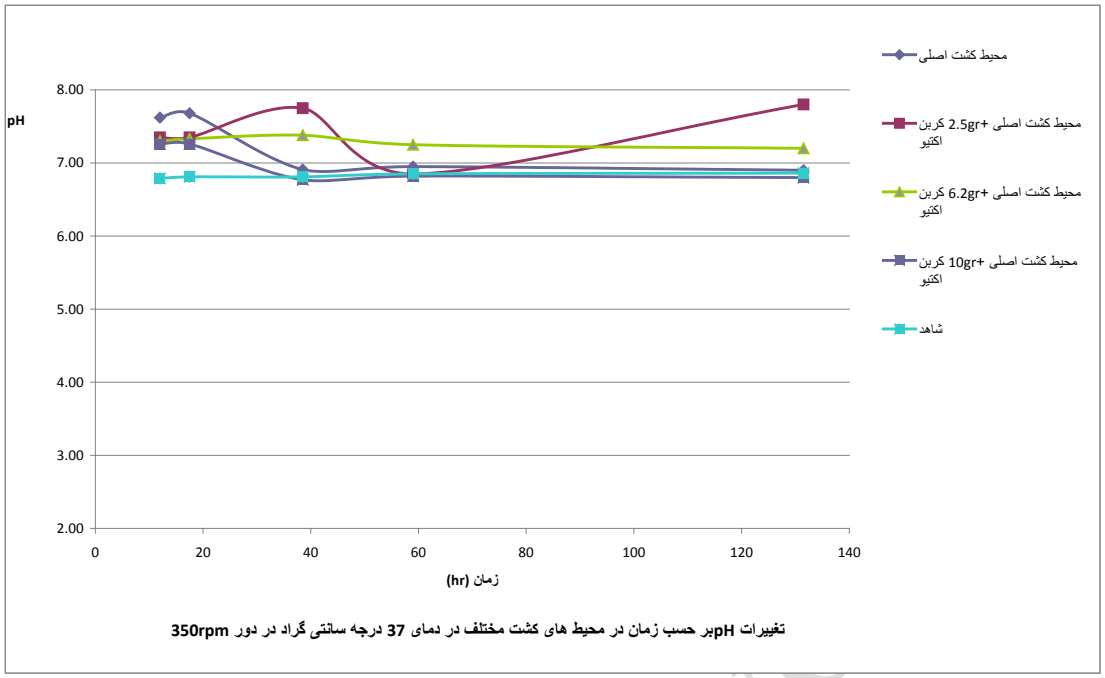
یکی از مشخصه‌هایی که می‌تواند رشد متابولسیم میکروب ها را تحت تأثیر قرار دهد pH است که البته در مخازن نفتی زیاد عامل محدود کننده ای نیست. در اکثر مخازن نفتی pH بین ۳ تا ۹/۹ است اما مقادیر بیشتر از ۱۰ و کمتر از ۳ هم مشاهده شده است. محدوده pH رشد میکروبی بین ۴ تا ۹ است اما میکروب هایی هستند که می توانند در pH کمتر از ۱ و بیشتر از ۱۲ هم رشد کنند. تولید اسید به عنوان یکی از مکانیسم‌های ازدیاد برداشت می تواند باعث کاهش pH مخزن و حل شدن سنگ های کربناتی و افزایش ازدیاد برداشت گردد. جدول ۲ میزان تغییرات pH را در طول زمان نشان می دهد.

جدول۲: میزان تغییرات pH با زمان

زمان بر حسب ساعت	t=12	t=17/5	t=38/5	t=59	t=131/5
محیط کشت اصلی	7/62	7/68	6/91	6/95	6/90
محیط کشت اصلی +۲/۵gr کربن اکتیو	7/35	7/35	7/75	6/85	7/80
محیط کشت اصلی +۶/۲gr کربن اکتیو	7/30	7/33	7/38	7/25	7/20
محیط کشت اصلی +۱۰gr کربن اکتیو	7/26	7/26	6/77	6/82	6/80
شاهد	۶/۷۹	۶/۸۱	۶/۸۱	۶/۸۵	۶/۸۶

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: میزان تغییرات pH با زمان

۴-آزمایش بررسی تولید بیومس و تاثیر کربن اکتیو روی تولید آن:

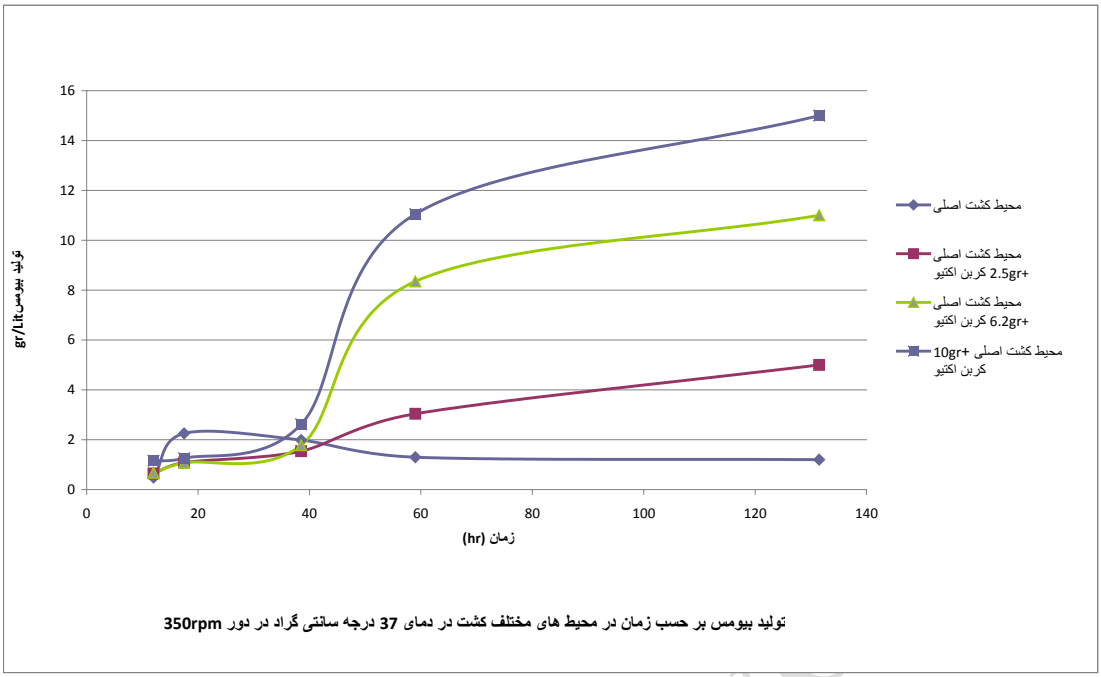
۲۰ سی سی از محیط کشت را در زمانهای مختلف از ارلن خارج کرده و در ۱۰۰۰rpm به مدت سی دقیقه سانتریفوژ می کنیم بیومس آن را از مایع رو شناور جدا نموده و پس از خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد آن را وزن می نماییم. وزن بیومس‌های تولید شده در جدول ۳ بر حسب میلی‌گرم می‌باشد.

جدول۳: وزن بیومس‌های تولید شده

زمان بر حسب ساعت(hr)	t=12	t=17/5	t=38/5	t=59	t=131/5
محیط کشت اصلی	۰/۴۸۳۵	۲/۲۵۳۵	۱/۹۹۰۰	۱/۳۰۰۰	۱/۲۰۰۰
محیط کشت اصلی +۲/۵gr کربن اکتیو	۰/۶۴۷۰	۱/۰۸۳۵	۱/۵۴۰۰	۳/۰۴۰۰	۵/۰۰۰۰
محیط کشت اصلی +۶/۲gr کربن اکتیو	۰/۶۷۳۵	۱/۰۷۳۵	۱/۷۸۰۰	۸/۳۵۰۰	۱۱/۰۰۰۰
محیط کشت اصلی +۱۰gr کربن اکتیو	۱/۱۵۵۰	۱/۲۵۳۵	۲/۶۲۰۰	۱۱/۰۵۰۰	۱۵/۰۰۰۰

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳: وزن بیومس‌های تولید شده

۵-آزمایش بررسی رابطه تولید بیوسورفکتانت و رشد میکروبی:

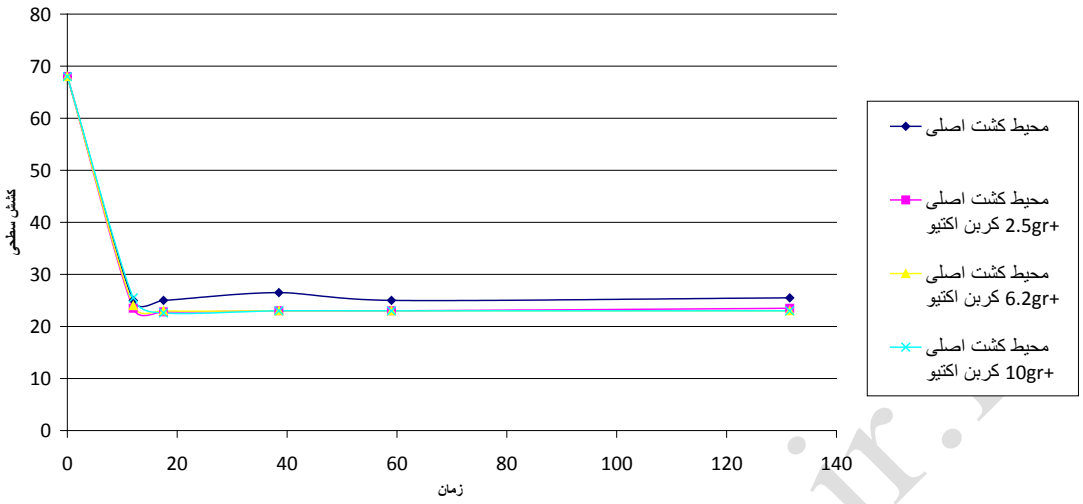
یکی از متابولیت های موثر در فرآیند ازدیاد برداشت سورفکتانت ها هستند که می توانند روی کشش سطحی تغییراتی ایجاد کنند. همانطور که قبلاً اشاره شد به منظور اندازه گیری میزان تولید سورفکتانت از شاخص تعلیق استفاده شده است. جدول ۴ نتایج کاهش کشش سطحی با زمان در دور ۲۵۰ rpm می باشد.

جدول۴: نتایج کاهش کشش سطحی با زمان در دور ۲۵۰ rpm

زمان بر حسب ساعت	t=0	t=12	t=17/5	t=38/5	t=59	t=131/5
محیط کشت اصلی	68	۲۵	۲۵	۲۶/۵	25	۲۵/۵
محیط کشت اصلی +۲/۵gr کربن اکتیو	68	۲۳/۵	۲۲/۸	23	23	۲۳/۵
محیط کشت اصلی +۶/۲gr کربن اکتیو	68	۲۴	۲۳	23	23	23
محیط کشت اصلی +۱۰gr کربن اکتیو	68	۲۵/۵	۲۲/۶	23	23	23

www.SID.ir

Archive of SID



کشش سطحی بر حسب زمان در محیط های کشت مختلف در دمای 37 درجه و دور 250rpm

شکل۴: نتایج کاهش کشش سطحی با زمان در دور ۲۵۰ rpm

۶-آزمایش تأثیر دور روی کشش سطحی، تولید بیومس، pH :

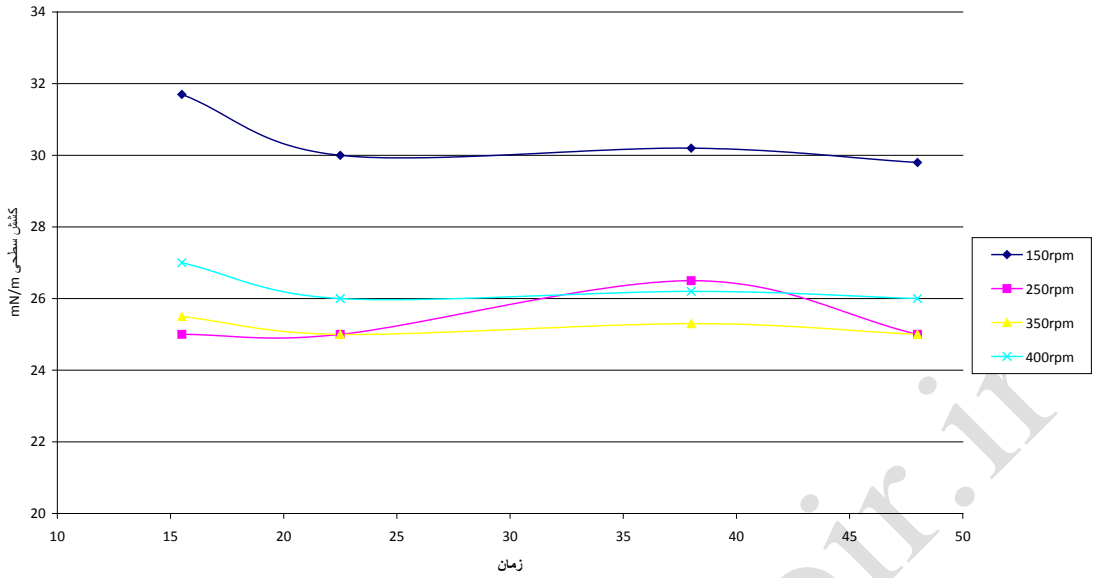
آزمایش قبلی را در دورهای ۱۵۰ و ۳۵۰ و ۴۰۰ مجدداً در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام می دهیم.

جدول ۵:کاهش کشش سطحی بر حسب دور و زمان های مختلف

t	150 rpm	250 rpm	350rpm	400rpm
15/5	31/7	25	25/5	27
22/5	30	25	25	26
38	30/2	26/5	25/3	26/2
48	29/8	25	25	26

www.SID.ir

Archive of SID

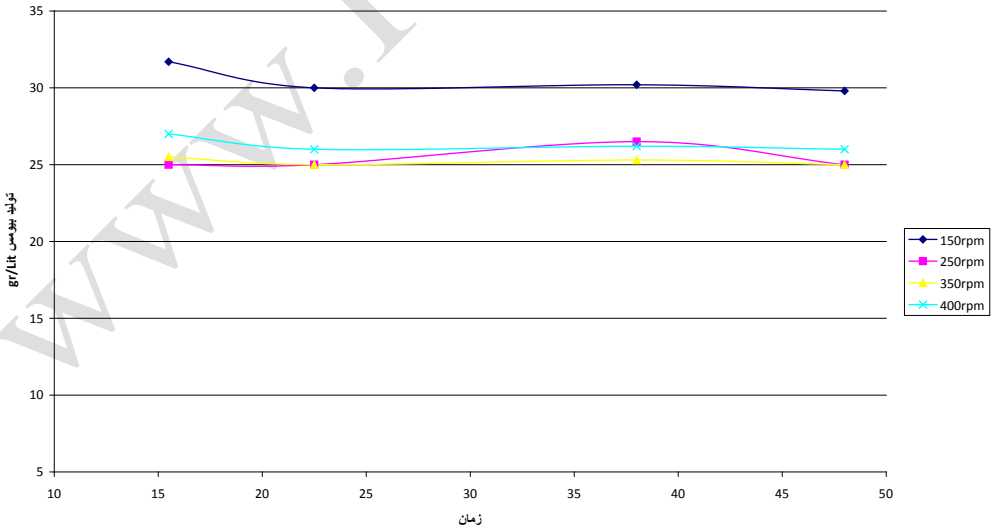


نمودار کشش سطحی برحسب زمان در دورهای مختلف در دمای 37درجه سانتی گراد

شکل ۵: کاهش کشش سطحی بر حسب دور و زمان های مختلف

جدول۶: تولید بیومس بر حسب دور و زمان های مختلف

t	150 rpm	250 rpm	350rpm	400rpm
15/5	18	9/67	20/5	1/125
22/5	24/2	45/07	25	1/42
38	26/3	39/8	30	2/19
48	27	26	27/9	2/13



نمودار تولید بیومس برحسب زمان در دورهای مختلف در دمای 37درجه سانتی گراد

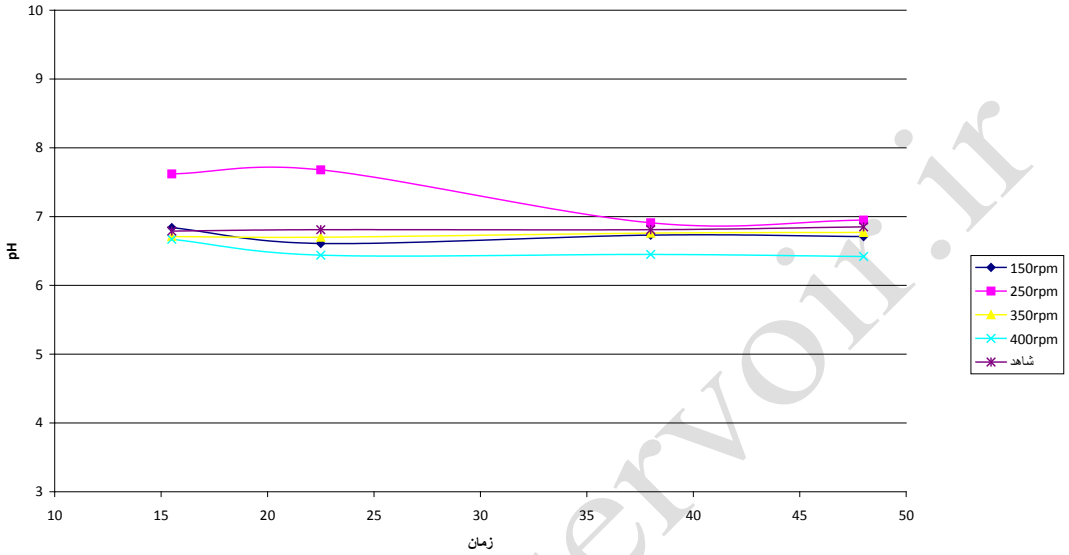
شکل۶: تولید بیومس بر حسب دور و زمان های مختلف

جدول۷: تغییرات pH بر حسب دور و زمان های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

t	150 rpm	250 rpm	350rpm	400rpm	شاهد
15/5	6/84	7/62	6/71	6/67	6/79
22/5	6/61	7/68	6/7	6/44	6/81
38	6/73	6/91	6/76	6/45	6/81
48	6/71	6/95	6/77	6/42	6/85



نمودار pH برحسب زمان در دورهای مختلف در دمای 37درجه سانتی گراد

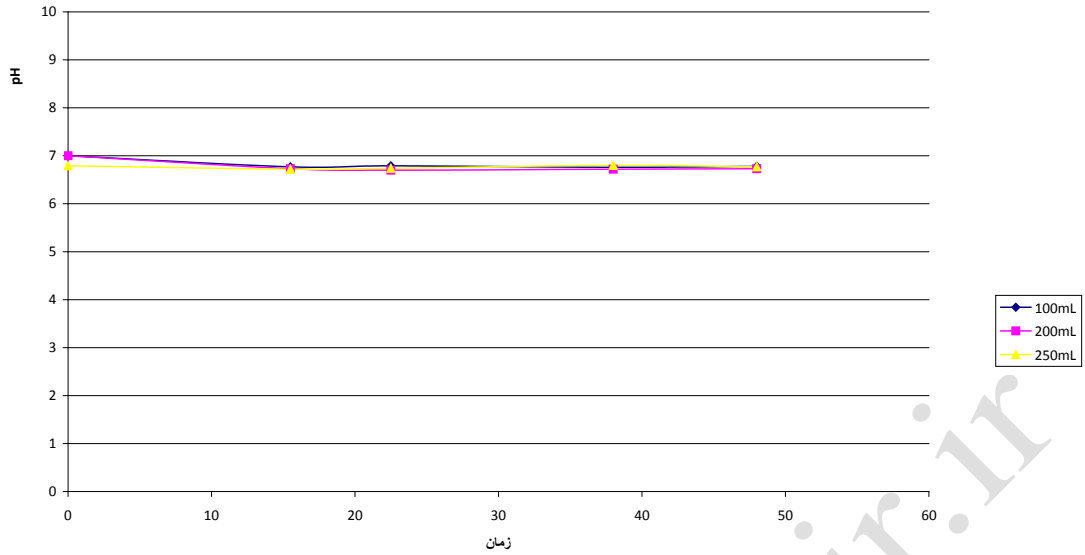
شکل۷: تغییرات pH بر حسب دور و زمان های مختلف

جدول ۸:تغییرات pH و کشش سطحی و بیومس برای سه حجم مختلف ۲۵۰ و ۲۰۰ و ۱۰۰ میلی لیتر برای دور ۳۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

t (hr)	250 mL			200 mL			100 mL		
	pH	کشش سطحی	بیومس	pH	کشش سطحی	بیومس	pH	کشش سطحی	بیومس
0	6/79	68	0	7	68	0	7	68	0
15/5	6/72	25	1/025	6/73	26	1/015	6/77	25/9	0/805
22/5	6/74	25	1/25	6/7	25	1/1	6/79	25/4	0/91
38	6/8	25/3	1/5	6/72	25.9	1/15	6/76	25/8	0/925
48	6/77	25	1/395	6/73	25	1/175	6/78	25	1

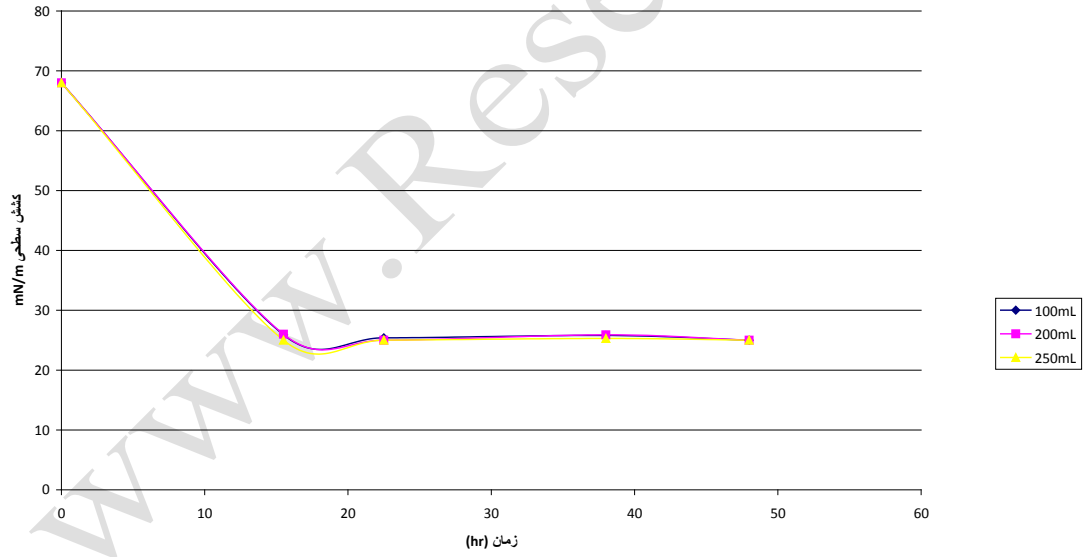
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار pH در مقابل زمان برای 3 حجم مختلف در دور 350rpm و دمای 37 درجه

شکل۷: تغییرات pH بر حسب دور و زمان های مختلف

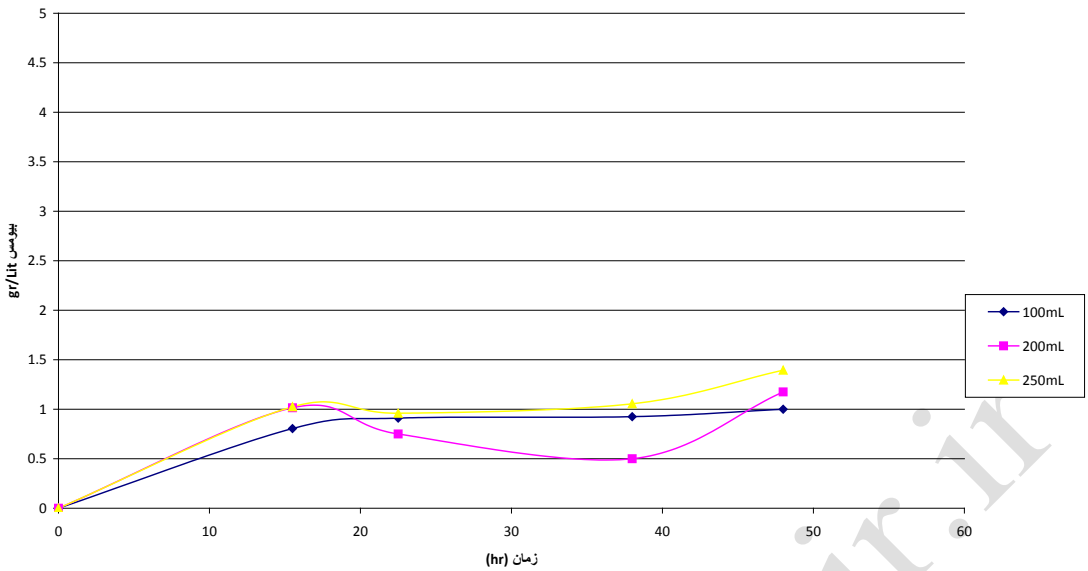


نمودار کشش سطحی در مقابل زمان برای 3 حجم مختلف در دور 350rpm و دمای 37 درجه

شکل۷: تغییرات pH بر حسب دور و زمان های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار بیومس در مقابل زمان برای 3 حجم مختلف در دور 350rpm و دمای 37درجه سانتی گراد

شکل۸: تغییرات بیومس در دور ۳۵۰ rpm

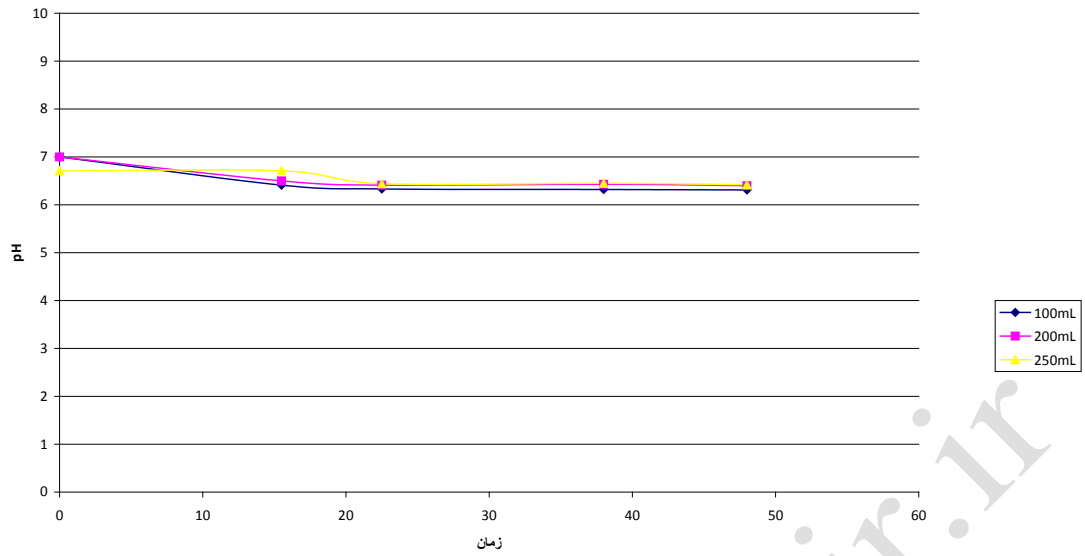
جدول ۹ تغییرات pH و کشش سطحی و بیومس برای سه حجم مختلف ۲۵۰ و ۲۰۰ و ۱۰۰ میلی لیتر برای دور ۴۰۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد را نشان می دهد.

جدول ۹: تغییرات pH و کشش سطحی و بیومس برای سه حجم مختلف

t (hr)	250 mL			200 mL			100 mL		
	pH	کشش سطحی	بیومس	pH	کشش سطحی	بیومس	pH	کشش سطحی	بیومس
0	7	68	0	7	68	0	7	68	0
15/5	6/71	26	1/125	6/5	28	1/445	6/41	23	1/25
22/5	6/44	29	1/42	6/41	27	1/465	6/33	27	1/3
38	6/45	27	2/19	6/43	26	1/87	6/32	27	1/5
48	6/42	26/2	2/13	6/4	26/2	2/15	6/31	25/5	1/55

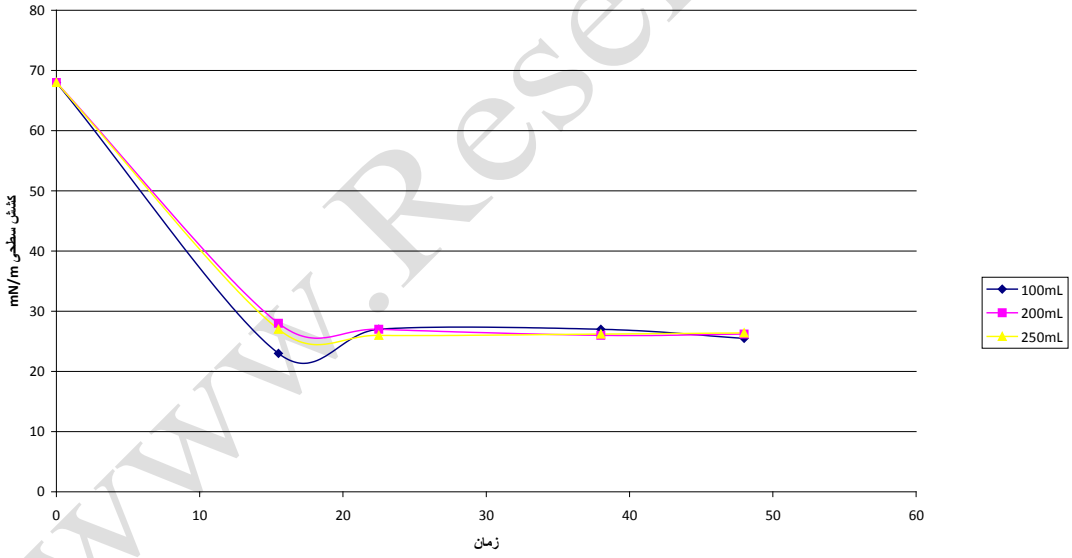
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار pH در مقابل زمان برای 3 حجم مختلف در دور 400rpm در دمای 37درجه سانتی گراد

شکل۹: تغییرات pH در دور ۴۰۰ rpm

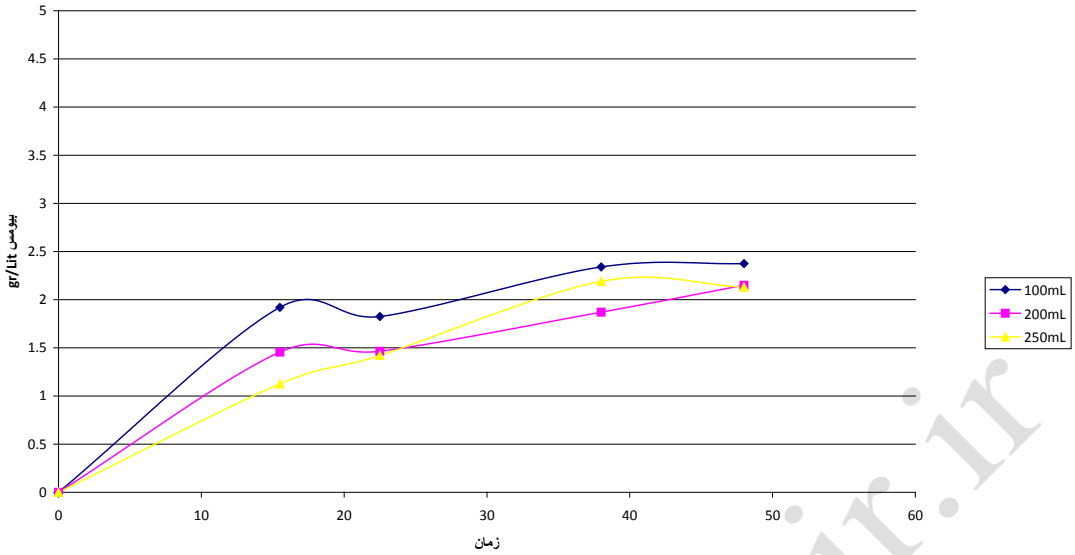


نمودار کشش سطحی در مقابل زمان برای 3 حجم مختلف در دور 400rpm در دمای 37درجه سانتی گراد

شکل۱۰: تغییرات کشش سطحی در دور ۴۰۰ rpm

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار بیومس در مقابل زمان برای 3 حجم مختلف در دور 400rpm در دمای 37درجه سانتی گراد

شکل۱۱: تغییرات بیومس در دور ۴۰۰ rpm

نتیجه گیری

تولید بهینه بیوسورفکتانت وابسته به میزان دما و تحمل شوری می باشد. دمای بهینه هرگونه باکتری در محدوده مناسبی از دما است که در آن، میکرواورگانیسم ها با بالاترین کیفیت فعالیت می کنند که این امر نشان دهنده وابستگی فرآیند تولید بیوسورفکتانت به دما نیز میباشد. افزایش دما باعث سرعت واکنش های شیمیایی و تولید متابولیسم میکروبی می شود. داده های به دست آمده نشان می دهد که Bacillus Subtillis در محدوده دمایی ۲۸ تا ^{o}C ۵۵ رشد بسیار سریع و خوبی داشتند و در محدوده pH ۵تا۹ فعالیت خوبی از خود نشان دادند. یکی از خصوصیات مهم بیشتر میکرواورگانیسم ها وابستگی بسیار زیاد به pH برای رشد سلول و متابولیت های ثانویه است. محیط کشت به میزان قابل ملاحظه ای بر رشد و فعالیت باسیلوس ها تأثیر میگذارد. ترکیبی از نمکهای معدنی مختلف مانند منبع کربنی، نیتروژن و نمکها برای رشد بهینه و حداکثری بیوسورفکتانت مورد نیاز است. در این تحقیق به این نتیجه رسیدیم که شوری یا غلظت نمک، یکی از پارامترهای مهم برای تولید بیوسورفکتانت است، به گونه ای که در غیاب نمک، رشد و تولید بسیار کم است. از آنجایی که این باکتریها، آبزی می باشند، بالاترین فعالیت را در محیطهای دارای نمک با غلظت ۷ تا ٪ ۹ نشان دادند و بهترین منبع کربن برای باکتری Bacillus Subtillis آب پنیر است[۲].

منابع

[۱] Henson M.A. "Exploiting cellular biology to manufacture high-val
ue products" , IEEE control system magazine., pp.54-62. 2006.
[۲] Myers d., surfactant science and technology, Hoboken, new jersey: john wiley and Sons, Inc., 2006.

www.SID.ir

Archive of SID

[۳] Duvnjak Z., Cooper D. G. and Kosaric N. "production of surfactant by arthrobacter paraffineus ATCC 19558," Biotechnol. Bioeng. Vol. 24, pp. 165-175, 1982.
[۴] Morikawa M., Daido H., Takao T., Murata S., Shimonishi Y., and Imanaka T., " A new lipopeptide biosurfactant produced by arthrobacter sp. MIS38," J. bacterial., pp. 6459-6466, 1993.

www.Reservoir.ir

www.SID.ir