



پژوهشکده علوم پایه کاربردی

عنوان طرح:

تولید محصول میکروبی ازدیاد برداشت مخازن نفت خام با قابلیت حذف باکتری‌های SRB و کاهش H_2S مخزن

گزارش پیشرفت ۱

- ۱- فاز مطالعاتی
- ۲- فرمولاسیون و تولید نمونه آزمایشگاهی محصول

کارفرما:	جهاد دانشگاهی – معاونت پژوهشی
واحد مجری:	پژوهشکده علوم پایه کاربردی – گروه پژوهشی میکروبیولوژی نفت
مجری طرح:	علی ابوالحسنی سورکی

تاریخ تنظیم: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵

بنام خداوند جان و خرد

فهرست مطالب

۱- مروری بر مطالعات پیشین.....	۶
۱-۱- مقدمه.....	۷
۱-۲- بیوسورفکتانت‌های میکروبی.....	۹
۱-۲-۱- کاربرد صنعتی بیوسورفکتانت‌ها.....	۱۱
۱-۳- کاربرد بیوسورفکتانت‌ها در صنعت نفت.....	۱۳
1-3-1- بیوسورفکتانت‌ها و ازدیاد برداشت میکروبی نفت.....	۱۵
۱-۴- شاخص‌های مهم در زمینه عملکرد سورفکتانت‌ها.....	۱۸
۱-۴-۱- کشش سطحی.....	۱۸
۱-۴-۲- غلظت بحرانی تشکیل مسیل (CMC).....	۱۸
۱-۵- طبقه‌بندی بیوسورفکتانت‌ها.....	۱۹
۱-۵-۱- گلیکولیپیدها.....	۲۱
۱-۵-۱-۱- رامنولیپیدها.....	۲۱
۱-۵-۱-۲- ترهالولیپیدها.....	۲۱
۱-۵-۱-۳- سوفورولیپیدها.....	۲۲
۱-۵-۲- لیپوپتیدها و لیپوپروتئین‌ها.....	۲۳
۱-۵-۳- اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و لیپیدهای طبیعی.....	۲۳
۱-۵-۴- بیوسورفکتانت پلیمری.....	۲۴
۱-۵-۵- بیوسورفکتانت ذره‌ی.....	۲۵
1-6- فاکتورهای مؤثر بر سنتز و تولید بیوسورفکتانت.....	۲۵
۱-۶-۱- منبع کربن.....	۲۵
۱-۶-۲- اثرات منابع نیتروژنی و کاتیون‌های چند ظرفیتی.....	۲۷
۱-۶-۳- فاکتورهای محیطی.....	۲۹
۱-۷- غربالگری میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت.....	۳۰
۱-۷-۱- تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های اکستروموفیل.....	۳۱
۱-۸- بازیافت بیوسورفکتانت.....	۳۲
۱-۹- تولید بیوسورفکتانت با روش زیست دگرگونی (بیوترانسفورماسیون).....	۳۴

- ۱-۹-۱- اصلاح ژنتیکی گونه‌های میکروبی برای تولید بیوسورفکتانت ۳۵
- ۲-۲- فرمولاسیون و تولید نمونه آزمایشگاهی محصول ۳۶
- ۲-۱- مواد و محیط‌های کشت ۳۷
- 2-2- دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده ۳۸
- ۲-۳- نمونه‌برداری ۳۹
- ۲-۳-۱- اندازه‌گیری مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه ۴۱
- ۲-۴- آنالیزهای آماری ۴۲
- ۲-۵- جداسازی سویه‌های باکتریایی ۴۲
- ۲-۵-۱- جداسازی مستقیم ۴۲
- ۲-۵-۲- جداسازی بعد از غنی‌سازی در محیط نفت ۴۳
- ۲-۶- غربالگری باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت ۴۴
- 2-7- شناسایی باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت ۴۵
- 2-7-1- بررسی خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی ۴۵
- ۲-۷-۱-۱- مورفولوژی ۴۵
- ۲-۷-۱-۲- خصوصیات بیوشیمیایی ۴۵
- 2-7-2- شناسایی باکتری به روش تعیین توالی ژن 16S rRNA ۴۷
- 2-7-2-1- استخراج DNA ۴۷
- ۲-۷-۲-۲- تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) ۴۷
- 2-7-2-3- جداسازی و رنگ‌آمیزی قطعه تکثیرشده 16S rRNA ۴۹
- ۲-۷-۲-۴- تعیین توالی ۴۹
- ۲-۷-۲-۵- بیوانفورماتیک ۵۰
- ۲-۸- بررسی منحنی رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت ۵۴
- 2-9- بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت ۵۵
- ۲-۹-۱- انتخاب محیط کشت بهینه تولید بیوسورفکتانت ۵۵
- ۲-۹-۲- بهینه‌سازی شرایط تولید بیوسورفکتانت به روش طراحی آزمایش تاگوچی ۵۷
- ۲-۱۰- تعیین خصوصیات کشش سطحی ۶۱
- ۲-۱۰-۱- تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل (CMC) ۶۱
- ۲-۱۰-۲- بررسی مقاومت بیوسورفکتانت تولیدی به دما و شوری ۶۵

- ۶۷۳-۱۰-۲- فرمولاسیون محصول بیوسورفکتانت میکروبی جهت ازدیاد برداشت نفت
- ۶۸۱۱-۲- تعیین نوع و ساختار بیوسورفکتانت‌های تولیدشده توسط سویه KE1
- ۶۹۱۱-۱-۲- استخراج بیوسورفکتانت‌ها از محیط کشت سویه KE1
- ۶۹۱۱-۲-۲- خالص‌سازی بیوسورفکتانت‌های حاصل از سویه KE1
- ۷۰۱۱-۳-۲- هیدرولیز ترهالولپید حاصل از سویه KE1
- ۷۰۱۱-۴-۲- آنالیز GC-MS
- ۷۱۱۱-۵-۲- نتایج تعیین نوع و ساختار بیوسورفکتانت‌های تولیدشده توسط سویه KE1
- ۷۲ منابع

فهرست شکل‌ها و جدول‌ها

- شکل ۲-۱- تجمعی از بیوسورفکتانت در سطح بین آب و هوا [۲] ۹
- شکل ۲-۲- رابطه بین کشش سطحی، غلظت بیوسورفکتانت و تشکیل میسل [۲] ۱۸
- جدول ۲-۱- مهم‌ترین بیوسورفکتانت‌ها همراه با منشأ میکروبی [۲۲] ۲۰
- شکل ۲-۳- ساختمان رامنولپید [۲۴] ۲۱
- شکل ۲-۴- ساختمان ترهالولپید [۲۴] ۲۲
- شکل ۲-۵- ساختمان سوفورولپیدها [۲۴] ۲۲
- شکل ۲-۶- ساختمان مولکولی سورفکتین [۲۴] ۲۳
- شکل ۲-۷- ساختار فسفاتیدیل اتانول آمین [۲۴] ۲۴
- شکل ۲-۸- ساختمان مولکولی امولسان. اسیدهای چرب به اسکلت هتروپلیساکاریدی متصل شده‌اند [۲۴] ۲۴
- جدول ۳-۱- ترکیب محیط کشت لینهارد ۳۷
- جدول ۳-۲- ترکیب شیمیایی Trace element ۳۷
- جدول ۳-۳- ترکیب محیط کشت پایه معدنی ۳۸
- جدول ۳-۴- فهرست دستگاه‌ها و تجهیزات ۳۸
- شکل ۳-۱- عکس هوایی از محل نمونه‌برداری در جزیره خارک ($29^{\circ}13'41.10''$ N $50^{\circ}18'10.91''$ E) ۴۰
- شکل ۳-۲- عکس هوایی از محل نمونه‌برداری در حوضچه پسماند کارخانه گل حفاری در منطقه مارون خوزستان ($31^{\circ}7'40.53''$ N $49^{\circ}18'18.81''$ E) ۴۰
- جدول ۳-۵- مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های گرفته‌شده به تفکیک محل نمونه‌برداری ۴۱
- جدول ۳-۶- نرم‌افزارهای مورد استفاده ۴۲
- جدول ۳-۲- ترکیب شیمیایی Trace element ۴۲
- شکل ۳-۳- فعالیت امولسیفیکاسیون هگزادکان حاصل از سویه‌های مورد بررسی ۴۴
- شکل ۳-۴- کیت API 20E مورد استفاده جهت بررسی خصوصیات بیوشیمیایی قبل (بالا) و بعد (پایین) از انجام تست ۴۶
- جدول ۳-۷- خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه KE1 ۴۶
- فرمول ۲-۳- اندازه‌گیری غلظت DNA ۴۷
- جدول ۳-۸- مخلوط واکنش PCR (Ampliqon Taq DNA polymerase master mix) ۴۷
- جدول ۳-۹- مواد لازم برای انجام واکنش PCR و حجم هر یک در واکنش ۴۸

- جدول ۳-۱۰- پرایمرهای مورد استفاده و توالی آن‌ها ۴۸
- جدول ۳-۱۱- برنامه چرخه دمایی انجام واکنش PCR ۴۸
- جدول ۳-۱۲- توالی اصلاح‌شده ژن 16S rRNA سویه KE1 ۵۱
- جدول ۳-۱۳- نتیجه آنالیز BLASTn سویه MK-1 در پایگاه Genbank ۵۲
- شکل ۳-۶- درخت فیلوژنتیکی نشان‌دهنده سویه KE1 در بین گونه‌های باکتریایی مشابه ۵۳
- جدول ۳-۱۴- ساختار رده‌بندی سویه KE1 ۵۳
- فرمول ۲-۳- محاسبه نرخ رشد: ۵۴
- فرمول ۳-۳- محاسبه زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی: ۵۴
- شکل ۳-۷- منحنی رشد و تولید محصول بیوسورفکتانت توسط سویه KE1 در محیط کشت پایه معدنی حاوی ۱٪ ملاس ۵۵
- شکل ۳-۸- تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1 در محیط کشت‌های مختلف ۵۶
- جدول ۳-۱۵- فاکتورها و سطوح در نظر گرفته در طراحی آزمایش‌ها جهت بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت. (-) فقر فسفر و ازت، (+) عدم فقر فسفر و ازت ۵۷
- جدول ۳-۱۶- جدول آزمایش‌های آرایه L16 طراحی شده به روش تاگوچی ۵۸
- جدول ۳-۱۷- نتایج آزمایش‌های طراحی شده به روش تاگوچی برای سویه KE1 ۵۹
- شکل ۳-۹- نمودار حاصل از آنالیز تاگوچی جهت بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1 ۶۰
- شکل ۳-۱۰- پودر حاصل از استخراج و خالص‌سازی جزئی بیوسورفکتانت ۶۲
- شکل ۳-۱۱- تعیین CMC بیوسورفکتانت حاصل از سویه KE1 با استفاده از روش اندازه‌گیری کشش سطحی و فعالیت امولسیفیکاسیون ۶۴
- شکل ۳-۱۲- منحنی فعالیت امولسیفیکاسیون بیوسورفکتانت حاصل از سویه KE1 در دماهای مختلف ۶۶
- شکل ۳-۱۳- بررسی اثر نمک بر فعالیت بیوسورفکتانت حاصله سویه KE1 ۶۶
- شکل ۳-۱۴- ساختار ترهالوز بخش هیدروفیل بیوسورفکتانت‌های ترهالولپیدی ۶۸
- شکل ۳-۱۵- ساختار یک بیوسورفکتانت ترهالولپیدی ۶۸
- جدول ۳-۱۸- جزئیات آنالیز اسیدهای چرب توسط دستگاه GC-MS ۷۰
- جدول ۳-۱۹- جزئیات آنالیز اسیدهای چرب توسط دستگاه GC-MS ۷۱

۱- مروری بر مطالعات پیشین

۱-۱- مقدمه

در حال حاضر سوخت‌های فسیلی همچون نفت و مشتقات آن مهم‌ترین منابع تأمین نیاز روزافزون به انرژی هستند و میزان ذخایر نفتی رو به کاهش نهاده است. مطالعات آماری نشان می‌دهد که تقاضای انرژی در جهان با شتاب بالایی رو به رشد است. لذا انتظار می‌رود که کشورهای تولیدکننده نفت به نسبت سهم ایشان از منابع نفتی و همچنین سهم ایشان از بازار فعلی عرضه، نسبت به افزایش تولید اقدام کرده و درواقع سهم خود را در بازار حفظ کنند.

عمر بیشتر مخازن نفتی دنیا به نیمه دوم خود رسیده است، به همین دلیل میزان برداشت نفت از آن‌ها به میزان قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافته و شرکت‌های نفتی از روش‌های ازدیاد برداشت با استفاده از فناوری‌های نوین برای بهره‌وری بیشتر در برداشت از ذخایر نفتی استفاده می‌کنند. با توجه به اینکه نفت، مشتقات و فرآورده‌های نفتی بخش عمده تولید ناخالص ملی کشورمان را تشکیل می‌دهند، استفاده صحیح از منابع نفتی کشور، به‌منظور افزایش طول عمر آن‌ها و برخورداری نسل‌های آینده از این ذخایر خدادادی، ایجاب می‌کند با مدیریت صحیح این منابع حداکثر بهره‌وری از آن‌ها را فراهم نمود. بدون تردید مهم‌ترین موضوع در مدیریت مخازن نفتی، اتخاذ روش‌هایی برای حفظ و صیانت مخزن، بالا بردن راندمان تولید، و سعی بر نگه‌داشتن آن در حد مطلوب در طول زمان می‌باشد.

از دیدگاه تاریخی، برداشت نفت از مخازن به سه مرحله تقسیم می‌شود. مرحله آغازین تولید با استفاده از انرژی طبیعی موجود در مخزن که منبع اصلی انرژی برای جابجایی نفت به سمت چاه تولیدی است، انجام می‌شود. منبع این انرژی طبیعی رانش کلاهک گازی (Gas Cap Drive)، رانش آبده (Aquifer Drive)، رانش گاز محلول (Solution Gas Drive)، انبساط سنگ و سیال (Rock and Fluid Expansion)، و ریزش ثقلی (Gravity Segregation) است. در این مرحله تنها در حدود ۳۰-۵ درصد نفت اولیه موجود در مخزن Original Oil in Place (OOIP) برداشت می‌شود.

مرحله دوم عملیات به‌طور معمول بعد از کاهش انرژی مخزن و در نتیجه کاهش برداشت نفت، استفاده می‌شود. برداشت ثانویه با افزایش انرژی طبیعی مخزن با کمک تزریق آب یا گاز انجام می‌شود. در این فرآیند گاز و آب را می‌توان برای تثبیت فشار با انبساط کلاهیگ گازی و آبدی و یا رویکرد جابه‌جایی غیرامتزاجی نفت داخل ستون نفتی تزریق کرد. با این وجود جابه‌جایی غیرامتزاجی گازی به اندازه سیلاب‌زنی (Water Flooding) مفید نیست و امروزه به ندرت به‌عنوان برداشت ثانویه استفاده می‌شود. بنابر این سیلاب‌زنی به‌طور معمول معادل این برداشت طبقه‌بندی می‌شود. آب، نفت را به سمت چاه‌های تولیدی می‌راند و این فرآیند تا زمانی که نسبت آب به نفت در چاه‌های تولیدی زیاد شود و تولید نفت بیشتر صرفه اقتصادی نداشته باشد، ادامه می‌یابد. در پایان این مرحله برداشت نفت به ۶۰-۴۰ درصد می‌رسد. تزریق آب به مخزن دو اثر عمده را در پی دارد:

۱. با نگه‌داشتن فشار مخزن بالاتر از نقطه حباب، از آزاد شدن گاز در مخزن جلوگیری کرده و نفوذپذیری نسبی نفت را بالا نگه می‌دارد.

۲. نفت را در جلوی جبهه آب به سمت چاه‌های تولیدی می‌راند.

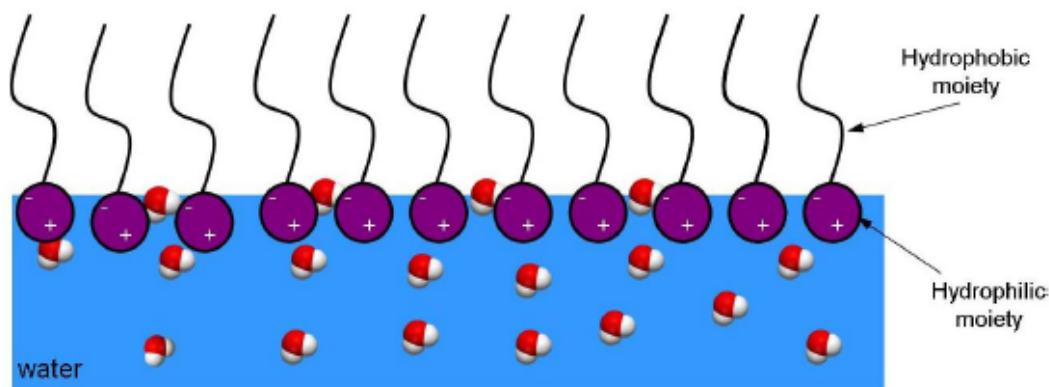
در پایان این مرحله، در اثر عواملی که به‌طور عمده ناشی از شرایط ترشوندگی نامطلوب، ناهمگنی سنگ مخزن و به دام افتادن نفت در اثر موئینگی است، مقدار قابل توجهی از نفت (۶۰-۴۰٪ نفت درجا) در مخزن باقی می‌ماند. برای برداشت این مقدار نفت و افزایش برداشت نهایی، روش‌های ازدیاد برداشت نفت (Enhanced Oil Recovery - EOR) مورد استفاده قرار می‌گیرند.

ازدیاد برداشت نفت به مجموعه تکنیک‌ها و فرایندهایی اطلاق می‌گردد، که طی آن سعی می‌شود با استفاده از انرژی یا مواد خارج از میدان نفتی، میزان نفت خامی را که استخراج آن‌ها با روش‌های معمولی امکان‌پذیر یا تولید آن اقتصادی و مقرون‌به‌صرفه نیست، استخراج و مورد بهره‌برداری قرار دهند.

روش‌های مختلف ازدیاد برداشت نفت عبارت‌اند از: روش‌های آب‌روبی، روش‌های گرمایی، (تحریک دوره‌ای با بخار آب، بخار روبی، رانش با آب گرم و احتراق درجا) روش‌های شیمیایی، (رانش با پلیمرها، سورفکتانت‌ها، بازها و پلیمرهای مسیلی) روش‌های امتزاجی، (تزریق گازهای هیدروکربنی، تزریق دی‌اکسید کربن و نیتروژن، همچنین تزریق گازهای حاصل از احتراق به‌صورت امتزاجی یا غیرامتزاجی) و روش‌های میکروبی. درمجموع هدف همه روش‌های ازدیاد برداشت نفت، به حرکت واداشتن نفت‌های باقیمانده درون مخزن، به سمت چاه تولیدی در سطح مخزن نفتی می‌باشد.

۲-۱- بیوسورفکتانت‌های میکروبی

بیوسورفکتانت‌ها گروهی از مولکول‌های فعال در سطح با ساختار بسیار متنوع هستند که توسط برخی باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها مولکول‌های دوگانه‌دوست با دو بخش آب‌دوست و آب‌گریز هستند که امکان تشکیل میسل در حدفاصل دو فاز با قطبیت متفاوت مانند روغن آب یا هوا-آب را دارا می‌باشند. این ویژگی آن‌ها را قادر به کاهش کشش سطحی مایعات، توقف تشکیل پیوند-های هیدروژنی و برهمکنش‌های آب‌دوست و آب‌گریز کرده و با تشکیل میکروامولسیون قابلیت حل شدن هیدروکربن‌ها در آب و یا بالعکس را باعث می‌شوند. این ویژگی باعث خصوصیات پاک‌کنندگی، امولسیون-کنندگی، کف‌کنندگی و پراکنده‌کنندگی سورفکتانت‌ها می‌شود [۱، ۲].



شکل ۲-۱- تجمعی از بیوسورفکتانت در سطح بین آب و هوا [۲]

استفاده از فناوری‌های سازگار با محیط‌زیست، یکی از رویکردهای نسبتاً نوین در صنایع مختلف می‌باشد و تحقیقات بسیار گسترده‌ای در کشورهای توسعه‌یافته و رو به توسعه دنیا در این زمینه در حال انجام است. تقریباً تمام سورفکتانت‌هایی که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند، از مشتقات نفت خام سنتز می‌شوند [۳]. سورفکتانت‌های شیمیایی که محصول فرعی صنعت پتروشیمی می‌باشند شامل آلکیل بنزن سولفونات، آلکیل فنول اتوکسیلات و مشتقات آن‌ها هستند. این محصولات ۷۵-۷۰٪ از مصرف سورفکتانت کشورهای صنعتی را تشکیل می‌دهند [۴].

بیوسورفکتانت‌ها مولکول‌های منحصر به فردی هستند که کاربردهای وسیعی را در حذف آلودگی-های آلی و فلزی محیط‌زیست، افزایش بازیافت نفت، لجن‌زدایی تانک‌های ذخیره نفت، و پمپاژ و انتقال نفت سنگین در خطوط لوله، دارند. به علت سازگاری زیست‌محیطی، بیوسورفکتانت به سهولت در طبیعت تجزیه شده و نسبت به سورفکتانت‌های سنتزی، غیرسمی و یا کم‌سمی‌تر می‌باشند. مزایای بالقوه‌ی بیوسورفکتانت‌ها شامل زیست‌تخریب‌پذیری، سمیت کم، زیست سازگاری، قابلیت تولید از مواد خام ارزان که در مقادیر زیاد در دسترس است و قابلیت هضم شدن می‌باشد که باعث کاربرد آن‌ها در لوازم آرایشی، افزودنی‌های غذایی و دارویی شده است. همچنین این ترکیبات دارای ماهیت شیمیایی و اختصاصیت برای سوبستراهای هیدروکربنی هستند. سازگاری آن‌ها با محصولات شیمیایی باعث فرمولاسیون novel آن‌ها شده است [۵-۸].

در سال‌های اخیر توجه به سمت استخراج و بهره‌برداری از سورفکتانت‌های ارزشمند، برای استفاده‌های مختلف صنعتی، افزایش یافته است و به باکتری‌ها که شرایط اکستریم را دوست دارند و بیوسورفکتانت تولید می‌کنند، بسیار توجه شده است [۹]. بنابراین میکروارگانیسم‌های که قادر به تحمل شرایط سخت می‌باشند به دلیل داشتن این توانایی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان عوامل امولسیون کننده در اصلاح زیستی هیدروکربن‌ها فلزات سمی در خاک و فاضلاب‌ها آلوده استفاده کرد [۱۰]. میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت در اغلب محیط‌های خاکی و آبی یافت

شده‌اند ولی درمجموع تحقیقات زیادی در رابطه با جداسازی جامع و وسیع این دسته از میکروارگانیسم‌ها صورت نگرفته است [۱۱].

۱-۲-۱- کاربرد صنعتی بیوسورفکتانت‌ها

در حال حاضر اغلب سورفکتانت‌های تجاری به طریقه‌ی شیمیایی سنتز می‌شوند، با این حال در سال‌های اخیر توجه بیشتری به تولید بیوسورفکتانت‌های میکروبی معطوف شده است. بیوسورفکتانت‌ها دارای مزیت‌های مهمی نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی می‌باشند که به آن‌ها امکان استفاده در مصارف صنعتی و محیطی را می‌دهد. برخی از این مزایا عبارت‌اند از:

- i. تجزیه‌پذیری زیستی: برخلاف سورفکتانت‌های سنتزی، سورفکتانت‌های بیولوژیکی، به‌آسانی توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه می‌شوند. این واقعیت توسط mulligan در سال ۲۰۰۵ بر اساس استفاده از بیوسورفکتانت‌ها در پاک‌سازی زیستی و پراکنده کردن لکه‌های نفتی، مشخص شده است [۱۲].
- ii. سمیت پایین: نشان داده شد که تأثیر سورفکتانت مشتق شده از ترکیبات شیمیایی، بیشتر بوده اما بیوسورفکتانت‌ها غیر سمی بوده و جهش‌زا نبودند. کورگزیت (Corexit) که یک سورفکتانت آنیونی سنتزی است، LD₅₀ آن (غلظت کشندگی برای کشتن ۵۰ درصد از جمعیت مورد آزمایش) بر علیه *Photobacterium phosphoreum*، ۱۰ برابر کمتر از رامنولیپید است [۱۳].
- iii. سازگاری زیستی: به‌طوری‌که امکان کاربرد بیوسورفکتانت‌ها را در صنایع آرایشی، و نیز در صنایع غذایی به‌عنوان افزودنی غذا می‌دهد [۱۳].
- iv. امکان تولید از مواد خام ارزان و در دسترس: بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند از مواد خام ارزان‌قیمت که در مقادیر زیادی موجود می‌باشند، تولید شوند. منبع کربن می‌تواند شامل هیدروکربن‌ها، کربوهیدرات‌ها و یا لیپیدها باشد که به‌طور جداگانه و یا با یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

v. فاکتورهای فیزیکی: بسیاری از بیوسورفکتانت‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی مثل دما و pH قرار نمی‌گیرند و در برابر نیروی یونی تحمل دارند. Lichenysim که توسط سویه‌ای از *Bacillus licheniformis* تولید می‌شود تحت تأثیر طیفی از دما تا ۵۰ درجه، طیفی از pH، از ۴/۵ تا ۹ و شوری ۵٪ و غلظت کلسیم ۱-۲۵g قرار نمی‌گیرد [۱].

vi. سطح و فعالیت سطحی. Molligan در سال ۲۰۰۵ اظهار داشت که یک بیوسورفکتانت خوب می‌تواند کشش سطحی آب را از ۷۲ mN m⁻¹ به ۳۵ mN m⁻¹ کاهش دهد و کشش بین سطحی بین آب/هگزادکان را از ۴۰ mN m⁻¹ به ۱ mN m⁻¹ کاهش دهد. سورفکتین دارای توانایی کاهش کشش سطحی آب، تا ۲۵ mN m⁻¹ است و می‌تواند کشش بین سطحی آب/هگزادکان را تا کمتر از mN m⁻¹ ۱ کاهش دهد [۱۳].

vii. اختصاصی بودن: بیوسورفکتانت‌ها مولکول‌های آلی با گروه‌های اختصاصی، اغلب به‌طور اختصاصی عمل می‌کنند. به دلیل این ویژگی، در سمیت‌زدایی آلودگی‌های خاص، امولسیون‌زدایی امولسیون‌های صنعتی، صنایع غذایی، آرایشی و داروسازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۳].

یکی از کاربردهای بسیار مهم بیوسورفکتانت‌ها در صنایع نفت خام می‌باشد. با توجه به خاصیت کاهش کشش سطحی و بین سطحی مخلوط‌های هیدروکربنی، این مواد به‌عنوان کاندیدای بالقوه‌ای برای ازدیاد برداشت نفت خام مطرح می‌باشند. از دیگر کاربردهای بیوسورفکتانت‌ها، امکان استفاده از آن‌ها در پمپاژ و انتقال نفت (به‌ویژه نفت سنگین) در خطوط لوله از طریق کاهش ویسکوزیته نفت خام، و پاک‌سازی لجن نفتی از مخازن ذخیره نفت و بازیافت نفت باقیمانده در آن‌ها می‌باشد. از دیدگاه زیست‌محیطی استفاده از باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت به‌منظور افزایش تجزیه میکروبی آلودگی‌های هیدروکربنی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

۳-۱- کاربرد بیوسورفکتانت‌ها در صنعت نفت

کاربرد بیوسورفکتانت در صنعت نفت شامل تجزیه و رفع آلودگی‌های نفتی، پاک‌سازی لجن نفتی از تانکرهای ذخیره نفت و ازدیاد برداشت نفت خام به روش میکروبی (MEOR) می‌باشد.

نفت در ابتدا به طور طبیعی در نتیجه فشار داخلی مخزن با قدرت بیرون زده می‌شود که فاز اولیه برداشت ۱ نامیده می‌شود.

برداشت طبیعی بوسیله فرایند ازدیاد برداشت نفت ادامه پیدا می‌کند. فرایند افزایش بازیافت ۲ با تزریق آب یا گاز به درون مخزن انجام می‌شود که برداشت ثانویه ۳ نامیده می‌شود.

بازیافت ثالثیه شامل استفاده از گرما، مواد شیمیایی و محصولات میکروبی می‌باشد [۱۴، ۱۵].

تولید کم برخی از چاه‌های نفت ممکن است ناشی از نفوذپذیری کم مخازن و یا ویسکوزیته بالای نفت خام باشد. که منجر به تحرک کم نفت در مخازن می‌شود. MEOR نزدیک به ۸۰ سال قبل پیشنهاد شد، اما از سال ۱۹۸۰ اولین مطالعات آزمایشگاهی آن آغاز شده است [۷].

MEOR شامل کاربرد میکروارگانیسم‌ها، فرایندهای میکروبی و محصولات آن‌ها به منظور ازدیاد برداشت باقیمانده‌های نفتی از مخازن نفت می‌باشد اولین پیشنهاد برای استفاده از MEOR قبل از سال ۱۹۲۶ داده شد، زمانیکه بک‌من^۱ رشد باکتری‌ها را روی روغن‌های معدنی را گزارش کرده [۱۵، ۱۶]. در گذشته، میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل زیان‌آور در صنعت نفت مطرح بودند اما امروزه می‌دانند که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در مراحل از برداشت نفت بسیار مفید واقع شوند [۱۷]. MEOR، ممکن است بوسیله تزریق مستقیم مواد غذایی به میکروارگانیسم‌هایی با توانایی تولید محصولات مطلوب در مخزن، برای افزایش تحرک نفت خام و یا تزریق خود محصول به تنهایی، انجام شود. در این فرایند فیلم‌های نفتی از صخره‌ها جدا شده و نفت امولسیون می‌شود [۸]. کاهش کشش سطحی، فشار مورد نیاز برای

¹ Primery

² EOR(Enhanced Oil Recovery)

³ Secondry recovery

⁴ Becman

رهایی نفت محبوس شده از خلل و فرج صخره‌های مخزن را کاهش داده و نفت را از این منافذ جابه‌جا کرده به سمت چاه بهره‌برداری وادار به حرکت می‌کند.

سه راه ممکن که میکروارگانیسم‌ها از طریق آن می‌توانند در ازدیاد برداشت نفت شرکت کنند عبارتند از:

۱. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند بیوسورفکتانت‌ها و بیوپلیمرهایی روی سطح تولید کنند.
۲. میکروارگانیسم‌ها در منافذ صخره‌های مخازن رشد کرده و گازهایی تولید می‌کنند. که این تولید گاز فشار مخزن را بالا برده و به فرایند استخراج نفت کمک می‌کند.
۳. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به طور انتخابی کانال‌های با نفوذپذیری بالا در صخره‌های مخزن را مسدود کرده و باعث افزایش فرایند بازیافت شوند [۱۸].

باقیمانده نفت خام در منافذ ممکن است بالاتر از حدود ۶۷٪ کل نفت مخزن باشد و این نشان‌دهنده راندمان بازیافت نسبی نفت در تولید اولیه و ثانویه است. میکروارگانیسم‌ها چندین ترکیب تولید می‌کنند که توانایی بالقوه برای افزایش فشار مخزن، ویسکوزیته و گرانروی نفت خام را کاهش داده و اجازه حرکت آسان‌تر محصول از دیواره چاه را فراهم می‌سازد. گاز تولید شده در مخزن می‌تواند در تنظیم دوباره فشار خالی شده مخزن نیز شرکت کند. همچنین ممکن است این گازها در نفت خام حل شده، ویسکوزیته آن را کاهش دهند. از طرف دیگر باکتری‌ها با تولید اسیدهایی مانند اسید استیک و پروپیونیک اسید می‌توانند صخره‌های کربناتی را حل کرده، نفوذپذیری و ضریب تخلخل آن‌ها را افزایش دهند. یک مشکل عمده در کاربرد عملیاتی این روش، دما و غلظت بالای نمک در مخازن نفتی می‌باشد. موفقیت عملیات MEOR در سطح مخزن وابسته به کاربرد میکروارگانیسم‌هایی است که بتوانند در مخازن دارای هیدروکربن‌ها، آب نمک و درجه حرارت بالا زنده مانده و محصول مناسب و متابولیت مورد نظر را تولید کنند [۱۸].

سه راه ممکن برای کاربرد بیوسورفکتانت‌ها در MEOR عبارتند از:

۱. تولید بیوسورفکتانت در محیط بسته^۵ یا مداوم^۶ و اضافه کردن آن به مخزن با استفاده از روش‌های معمول

^۵ Batch

^۶ Continuous

۲. تزریق باکتری‌ها به درون مخزن و تولید بیوسورفکتانت در فاز میان سلول باکتری و لایه‌های نفتی
۳. تزریق مواد غذایی انتخاب شده به مخزن به منظور تحریک رشد باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت موجود در درون مخزن

میکروارگانیسم‌های هوازی تولیدکننده بیوسورفکتانت برای استفاده مستقیم باکتری در مخزن جهت افزایش بهره‌برداری از مخازن نفتی مناسب نیستند. میکروارگانیسم‌هایی که به این منظور به کار می‌روند باید توانایی رشد و تولید سورفکتانت تحت شرایط محیطی مخازن نفتی را دارا باشند، زیرا تقریباً تمام مخازن نفتی دارای دما و نمک بالا و شرایط بی‌هوازی هستند. تاکنون تنها یک میکروارگانیسم به نام *Bacillus Lichniformis* JF-2 نشان داده شده است که تحت شرایط بی‌هوازی بیوسورفکتانت عمده ای تولید می‌کند که کشش سطحی محیط را به کمتر از 30 mN m^{-1} کاهش می‌دهد. مطالعه بر روی این باکتری نشان می‌دهد که این گونه، توانایی رشد و تولید سورفکتانت در مخازن نفتی را دارا می‌باشد و افزایش بهره‌برداری از نفت را تا ۱۳٪ امکان‌پذیر می‌کند. شرایط موجود در مخازن نفتی برای رشد این باکتری در حد مطلوب می‌باشد. کاهش کشش سطحی حتی در غلظت اشباع نمکی ۳۰٪ هم اتفاق می‌افتد [۱۹].

۱-۳-۱- بیوسورفکتانت‌ها و ازدیاد برداشت میکروبی نفت

MEOR در سومین مرحله بازیافت نفت از چاه که معروف به بازیافت نفت ثالثیه می‌باشد استفاده می‌شود. میکروارگانیسم‌های استفاده شده در MEOR می‌توانند برای یک چاه یا مخزن نفتی به صورت زنده در درون مخزن نفت به کار برده شوند. میکروارگانیسم‌ها معمولاً شرایط خاصی را برای زنده ماندن نیاز دارند، بنابراین اغلب نوترینت‌ها و اکسیژن هم‌زمان به درون چاه تزریق می‌شود. MEOR همچنین به آب نیز نیاز دارد. انتخاب میکروب‌ها و ناحیه‌ی زیرسطحی مخزن نقش بسیار مهمی را در MEOR ایفا می‌کند. میکروارگانیسم‌ها بین سطوح رشد می‌کنند تا بازیافت نفت را با متدهای زیر افزایش دهند:

- کاهش ویسکوزیته نفت: نفت مایع غلیظی است که به راحتی جاری نمی‌شود. میکروارگانیسم‌ها کمک می‌کنند تا ساختارهای مولکولی نفت خام را بشکنند و باعث شوند تا سیالیت آن بیشتر شده و آسان تر از چاه بازیافت شود.
 - تولید گاز دی‌اکسید کربن: میکروارگانیسم‌ها گاز دی‌اکسید کربن را به عنوان یک محصول فرعی متابولیسم تولید می‌کنند. به مرور زمان این گاز تجمع یافته و جایگزین نفت در چاه شده و آن را به بیرون می‌رانند.
 - تولید بیوماس: وقتی میکروارگانیسم‌ها مواد غذایی را جهت زنده ماندن تجزیه می‌کنند بیوماس عالی را به عنوان یک محصول فرعی تولید می‌کنند که این محصول فرعی بین نفت و صخره‌های سطح چاه تجمع می‌یابد و از لحاظ فیزیکی جایگزین نفت شده و باعث می‌شود تا راحت تر بازیافت شود.
 - انسداد انتخابی: تعدادی از میکروارگانیسم‌ها مواد لزجی به نام اگزوپلی ساکارید ترشح می‌کنند تا به وسیله‌ی آن از خشک شدن خود محافظت کنند. این مواد همچنین به باکتری کمک می‌کنند تا در برابر دیگر ارگانیسم‌ها از خود دفاع کند. علاوه بر این، اگزوپلی ساکاریدها در مسدود کردن منافذ چاه و در نتیجه خروج بهتر نفت نیز به باکتری کمک می‌کنند. این فرآیند مسدود کردن منافذ جهت تسهیل حرکت نفت به عنوان selective plugging شناخته می‌شود.
 - تولید بیوسورفکتانت: بیوسورفکتانت‌ها شبیه پاک کننده‌های لغزنده‌ای عمل کرده و به نفت کمک می‌کنند تا در طول صخره‌ها و شکاف‌ها آزادانه تر حرکت کند و بدین صورت راحت تر از چاه بیرون بیاید.
- در یک تحقیق *Pseudomonas aeruginosa* از آب آلوده به نفت خام برای تولید بیوسورفکتانت جداسازی شد. تست‌های آزمایشگاهی و تست‌های پایلوت کاربرد موفقیت آمیزش را در جهت بازیافت نفت

از میدان نفتی داکینگ چین را نشان داد [۲۰]. محصولات متابولیک استفاده شده (PIMP⁷) توانست بازیافت نفت را تا ۱۱/۲ درصد افزایش دهد و همچنین فشار تزریق را تا ۴۰ درصد کاهش دهد.

PIMP که به عنوان بیوسورفکتانت مصرف می‌شد، قادر بود ویسکوزیته نفت خام را تا ۳۵ درصد کاهش دهد. در تست‌های پایلوت حدود ۸۰ درصد از چاه‌های استفاده شده بعد از تزریق PIMP و حبس حدود یک ماه، افزایش معنی‌داری در تولید نفت خام نشان دادند. تست پایلوت همچنین نشان داد که PIMP می‌تواند سیکل شستن چاه نفتی را افزایش دهد تا جایی که کل نفت تولیدی افزایش یابد.

یکی دیگر از کاربردهای بیوسورفکتانت‌ها در صنعت نفت، لجن‌زایی ۸ تانک‌های ذخیره نفت می‌باشد. بانات ۹ و همکارانش استفاده از بیوسورفکتانت‌ها را، برای لجن‌زایی یک تانک ذخیره نفت شرکت نفت خام کویت نشان دادند و به بازیافت ۹۰ درصد نفت محبوس در لجن با استفاده از یک سویه مناسب تولید کننده بیوسورفکتانت دست یافتند [۱۲، ۲۱]. تشکیل لجن‌های نفتی در مخازن ذخیره کننده نفت خام منجر به محبوس شدن درصد بالایی از این ماده گرانبها در تانکرها و عدم دسترسی به آن می‌شود، علاوه بر این تخلیه لجن‌های نفتی در محیط تهدید بسیار بزرگی برای اکوسیستم‌های زیستی محسوب می‌شوند. از این رو استفاده از فن‌آوری‌های سازگار با محیط زیست یکی از رویکردهای نوین علم بیوتکنولوژی می‌باشد. لجن‌زدایی مخازن نفتی به روش میکربی یکی از جدیدترین مباحث میکروبیولوژی نفت در دو دهه گذشته به شمار می‌رود.

Pseudomonas aeruginosa metabolic products ⁷

⁸ Desludging

⁹ Banat

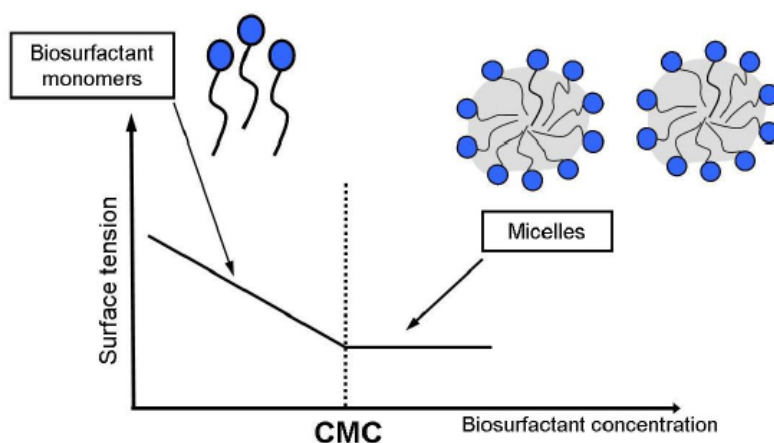
۱-۴- شاخص‌های مهم در زمینه عملکرد سورفکتانت‌ها

۱-۴-۱- کشش سطحی

نیرو در واحد طول است که توسط مایعی که در تماس با یک جامد یا مایع دیگری است بکار برده می‌شود. همچنین کشش سطحی به عنوان مقداری از انرژی آزاد در واحد سطح تلقی می‌شود که مرتبط با سطح یا بین دو سطح است. [۱۳].

۱-۴-۲- غلظت بحرانی تشکیل میسل (CMC)

وقتی تعداد زیادی مولکول سورفکتانت در یک محلول به هم متصل شوند، تشکیل توده‌ای به نام میسل می‌دهند. به غلظتی از یک سورفکتانت که در آن این میسل‌ها شروع به تشکیل شدن می‌کنند CMC یا غلظت بحرانی تشکیل میسل می‌گویند. وقتی میسل‌ها شروع به تشکیل شدن کردند دم آن‌ها تشکیل یک هسته آب‌گریز و سر یونی آن‌ها یک پوسته بیرونی می‌سازد که تماس مطلوب با آب را بهبود می‌بخشد [۲].



شکل ۲-۲- رابطه بین کشش سطحی، غلظت بیوسورفکتانت و تشکیل میسل [۲].

۵-۱- طبقه‌بندی بیوسورفکتانت‌ها

سورفکتانت‌های شیمیایی بر اساس گروه‌های قطبی به انواع آنیونی، کاتیونی و خنثی طبقه‌بندی می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها را نیز بر اساس ترکیب شیمیایی و منشأ میکروبی آن‌ها دسته‌بندی می‌کنند. به‌طور کلی ساختار یک بیوسورفکتانت، از یک بخش آب‌دوست شامل اسیدآمینه، پپتیدهای آنیونی و کاتیونی، منو، دی و پلی‌ساکاریدها، و یک بخش آب‌گریز شامل اسیدهای چرب تشکیل شده است [۲۲]. بر این اساس بیوسورفکتانت‌ها به گروه‌های زیر طبقه‌بندی می‌شوند:

۱. بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی
۲. بیوسورفکتانت‌های لیپوپپتیدی و لیپوپروتئینی
۳. فسفولیپیدها و اسیدهای چرب
۴. بیوسورفکتانت‌های پلیمری
۵. بیوسورفکتانت‌های ذره‌ای

مهم‌ترین انواع بیوسورفکتانت‌ها به همراه خصوصیات و منشأ میکروبی آن‌ها در جدول ۱-۲ نشان داده شده است.

جدول ۱-۲- مهم‌ترین بیوسورفکتانت‌ها همراه با منشأ میکروبی [۲۲].

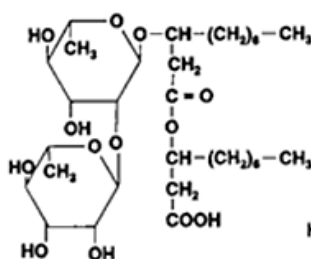
Biosurfactant	Organisms	Surface tension (mN/m)	CMC	Interfacial tension (mN/m)
Glycolipids				
Rhamnolipids	<i>P. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp</i>	29 25-30	o. 1-10	0. 25 1
Trehalolipids	<i>R. erythropolis</i> <i>N. erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp</i>	32-36 30 38	4 20 o. 3	14-17 3. 5 1. 5
Sophorolipids	<i>T. bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. petrophilum</i>	33 30		1. 8 0. 9
Cellobiolipids	<i>U. zee</i> , <i>U. maydis</i>			
Lipopeptides and lipoproteins				
Peptide-lipid	<i>B. licheniformis</i>	27	12-20	0. 1-o. 3
Serrawettin	<i>S. marcescens</i>	28-33		
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	26. 5	150	
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	27-32	23-160	
Subtilisins	<i>B. subtilis</i>			
Gramicidins	<i>B. brevis</i>			
Polymyxins	<i>B. polymyxa</i>			
Fatty acid, neutral lipids and phospholipid				
Fatty acids	<i>C. lepus</i>	30	150	2
Natural lipids	<i>N. erythropolis</i>	32		
Phospholipid	<i>T. thiooxidans</i>			
Polymeric surfactants				
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>			
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>			
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>			
Liposan	<i>C. lipolytica</i>			
Carbohydrate-protein-lipid	<i>P. fluorescens</i>	27	10	
Particulate biosurfactant				
Vesicles and fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>			

۱-۵-۱- گلیکولیپیدها

گلیکولیپیدها، بیشترین بیوسورفکتانت‌های شناخته‌شده هستند. آن‌ها کربوهیدرات‌هایی هستند که شامل منو، دی، تری و تتراساکارید می‌باشند و شامل گلوکز، مانوز، گالاکتوز، رامنوز، گالاکتوسولفات و گلوکورونیک اسید می‌باشند. این کربوهیدرات به زنجیره بلند اسیدهای آلیفاتیک هیدروکسی آلیفاتیک متصل شده‌اند. معروف‌ترین بیوسورفکتانت‌ها گلیکولیپیدی شامل رامنولیپیدها، ترهالولیپیدها و سوفورولیپیدها می‌باشند [۲۲، ۲۳].

۱-۵-۱-۱- رامنولیپیدها

رامنولیپیدها از گلیکولیپیدهایی هستند که بیشترین مطالعه روی آن‌ها انجام شده است. آن‌ها از یک یا دو مولکول رامنوز که به یک یا دو مولکول بتا هیدروکسی دکانویک اسید متصل شده است، تشکیل شده‌اند (شکل ۱-۱). تولید گلیکولیپیدهای حاوی رامنوز، اولین بار در *Pseudomonas aeruginosa* توسط جرویس و جانسون در سال ۱۹۴۹، ارائه شد [۲۳].

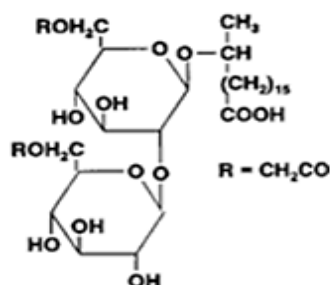


شکل ۳-۲. ساختمان رامنولیپید [۲۴].

۱-۵-۱-۲- ترهالولیپیدها

تاکنون چندین بیوسورفکتانت ترهالولیپیدی شناخته شده است. در اکثر گونه‌های *Corynebacterium* و *Nocardia*، *Mycobacterium* دی‌ساکارید ترهالوز در موقعیت‌های C-6 و C-6' به مایکولیک اسید متصل شده است (شکل ۲-۴). ترهالولیپیدهای حاصل از میکروارگانیسم‌های مختلف از نظر

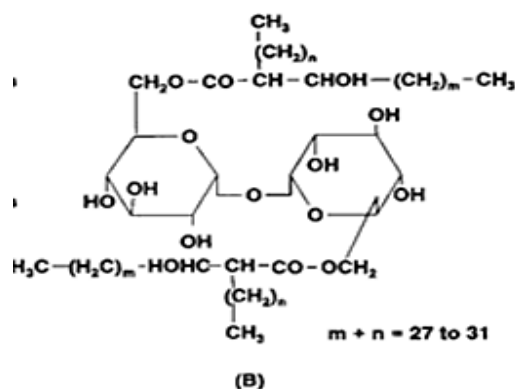
اندازه و ساختار مایکولیک اسید، تعداد اتم‌های کربن و درجه غیراشباع بودن با یکدیگر تفاوت دارند. تولید ترهالولپید با رشد باکتری مرتبط است [۲۳].



شکل ۴-۲. ساختمان ترهالولپید [۲۴].

۳-۱-۵-۱- سوپورولپیدها

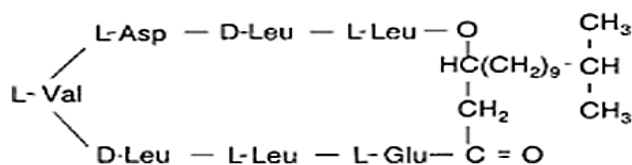
سوپورولپیدها عمدتاً توسط مخمرهایی مانند *Torulopsis apicola*، *Torulopsis bombicola* و *Torulopsis petrophilum* تولید می‌شوند. سوپوروز، کربوهیدرات دایمری که با پیوند گلیکوزیدی به زنجیره بلند اسید چرب متصل شده است، ساختار سوپورولپیدها را تشکیل می‌دهد (شکل ۵-۲). این بیوسورفکتانت‌ها پایداری قابل توجهی را در برابر تغییرات pH (۶-۹)، درجه حرارت (۲۰ تا ۹۰°C) و غلظت-های مختلف نمک نشان داده‌اند [۱].



شکل ۵-۲. ساختمان سوپورولپیدها [۲۴].

۲-۵-۱- لیپوپتیدها و لیپوپروتئین‌ها

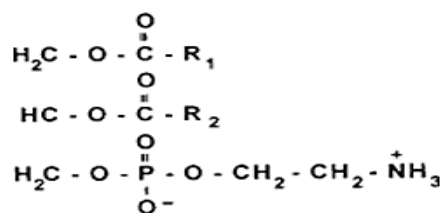
تمامی بیوسورفکتانت‌های لیپولپیدی شامل چندین اسیدآمینه می‌باشند که با پیوند کوالان به گروه‌های هیدروکسی و کربوکسی در اسیدهای چرب بتا هیدروکسی متصل شده‌اند. بسیاری از لیپیدهای حلقوی شامل آنتی‌بیوتیک‌های دکاپتیدی (گرام‌سیدین‌ها) و آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپتیدی (پلی‌میکسین‌ها) که به ترتیب به‌وسیله *Bacillus polymixa* و *Bacillus brevis* تولید می‌شوند، خصوصیات فعال در سطح قابل توجهی از خود نشان می‌دهند. لیپوپتید حلقوی سورفکتین که به‌وسیله *Bacillus ATCC 21332 subtilis* تولید می‌شود یکی از قوی‌ترین بیوسورفکتانت‌ها بشمار می‌آید (شکل ۶-۲). این ترکیب در غلظت ۰/۰۰۵ درصد، کشش سطحی را از ۷۲ به $27/9 \text{ mN m}^{-1}$ کاهش می‌دهد. یکی از ویژگی‌های این ترکیب، توانایی آن در تخریب سلولی گلبول‌های قرمز پستانداران و تشکیل اسفروبلست می‌باشد که از این خاصیت برای تعیین تولید سورفکتین بر روی آگار خون‌دار استفاده می‌شود [۲۵].



شکل ۶-۲. ساختمان مولکولی سورفکتین [۲۴].

۳-۵-۱- اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و لیپیدهای طبیعی

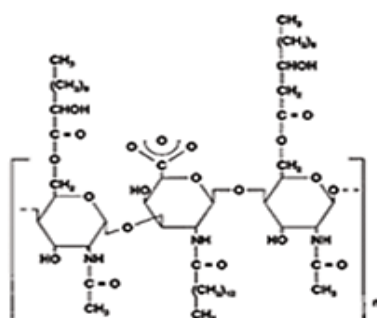
باکتری‌ها و مخمرهای تجزیه‌کننده هیدروکربن خاص، مقادیر قابل ارزیابی از فسفولیپیدها و اسیدهای چرب را در طی رشد بر روی آلکان‌ها تولید کرده‌اند، که فعالیت سورفکتانتی از خود نشان داده‌اند. باکتری‌ها و مخمرهای مولد فسفولیپیدها شامل *Thiobacillus*، *Acinetobacter* HO1-N، *R. erythopolis*، *Arthrobacter* AK-19، *thiooxidans*، *P. aeruginosa* 44T1 و *Aspergillus* می‌باشد. در سویه *Acinetobacter* HO1-N، وزیکول‌های فسفاتیدیل اتانول آمین ایجاد می‌شوند. این ترکیب میکروامولسیون از آن-آلکان‌ها را در آب ایجاد می‌کند.



شکل ۷-۲. ساختار فسفاتیدیل اتانول آمین [۲۴].

۴-۵-۱- بیوسورفکتانت پلیمری

جنس‌های مختلف تعداد زیادی از باکتری‌ها، بیوسورفکتانت‌های پلیمری خارج سلولی را تولید می‌کنند که ترکیبی از پلی ساکارید و پروتئین‌ها، لیپوساکاریدها، لیپوپروتئین‌ها یا کمپلکسی از این بیوپلیمرها می‌باشد. معروف‌ترین بیوسورفکتانت‌های پلیمری، امولسان، لیپوزان، مانوپروتئین و دیگر کمپلکس‌های پلی ساکارید-پروتئین می‌باشد. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 یک بیوامولسیفایر هتروپلی ساکاریدی دوگانه‌دوست پلی آنیونی تولید می‌کند که امولسان نامیده می‌شود (۵-۱). امولسان، قوی‌ترین امولسیون کننده است که تاکنون شناخته شده است و حتی مخلوط آب-روغن را به نسبت ۱ به ۴ به صورت امولسیون تثبیت می‌کند [۲۵].



شکل ۸-۲. ساختمان مولکولی امولسان. اسیدهای چرب به اسکلت هتروپلی ساکاریدی متصل شده‌اند [۲۴].

۵-۵-۱- بیوسورفکتانت ذره‌ی

تجمع وزیکول‌های غشایی خارج سلولی با قطر ۲۰-۵۰ و چگالی شناور $1/158 \text{ gcm}^{-3}$ در سلول‌های *Acinetobacter* HO1-N گزارش شده است. هیدروکربن‌های دیواره وزیکول‌ها به شکل میکروامولسیون می‌باشند که در مصرف آلکان‌ها توسط سلول‌های میکروبی نقش مهمی بازی می‌کنند. وزیکول‌ها از پروتئین، فسفولیپید و لیپوپلی‌ساکارید تشکیل شده‌اند. در وزیکول‌ها، مقداری فسفولیپیدها با ۵ بار و مقدار پلی‌ساکاریدها با ۳۶۰ بار بیشتر نسبت به آنچه در غشایی خارجی همان میکروارگانیسم وجود دارد، می‌باشد. اجزای سطحی که در فعالیت سورفکتانتی شرکت می‌کنند شامل: M-پروتئین و اسید لیپوتایکوئیک در *Sterptococcus group A*، پروتئین A در *Staphylococcus aureus*، لایه A در *Aeromonas salmonicida*، پرودیزئوسین^{۱۰} در *Serratia spp*، گرامیسی‌دین‌ها در اسپورهای *Bacillus brevis* و فیمبریای نازک^{۱۱} در *A. calcoaceticus* RAG-1 می‌باشند [۱].

۶-۱- فاکتورهای مؤثر بر سنتز و تولید بیوسورفکتانت

۱-۶-۱- منبع کربن

تعداد زیادی از منابع کربنی در تحقیقات بسیاری، برای تولید بیوسورفکتانت‌ها، مورد استفاده قرار گرفته است. کیفیت و کمیت تولید بیوسورفکتانت‌ها، تحت تأثیر نوع (ماهیت) سوبسترای کربنی قرار دارد. گزارش شده است که گازوئیل، نفت خام، گلوکز، ساکارز و گلیسرول منبع سوبسترای کربنی خوبی برای تولید بیوسورفکتانت می‌باشند [۲۶]. واضح است که اهمیت سوبسترای هیدروکربنی نقش مهمی در سنتز بیوسورفکتانت دارد، اما اهمیت آن بستگی به نوع ارگانیسم دارد به‌طوری‌که در طی تولید بیوسورفکتانت‌ها

¹⁰ Prodigiosin

¹¹ Thin fimbrae

توسط *Pseudomonas* sp. منابع مختلف کربنی در محیط کشت بر ترکیب بیوسورفکتانت تولید شده اثر می‌گذارد. اما سوبستراهایی که زنجیره‌هایی با طول‌های مختلف دارند، تأثیری بر طول زنجیره‌ی بخش اسید چرب گلیکولیپیدها ندارند. بیشترین بیوسورفکتانت‌های شناخته شده، به‌وسیله میکروارگانیسم‌های رشد کرده بر روی هیدروکربن‌های نامحلول در آب سنتز می‌شوند، اما برخی دیگر توسط سوبستراهای قابل حل در آب مانند گلوکز، گلیسرول و اتانول تولید شده‌اند [۲۷]. به‌طور متداول هیدروکربن‌های نامحلول در آب به‌عنوان سوبسترا برای تولید بیوسورفکتانت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. کربوهیدرات‌های محلول به‌ندرت به‌عنوان منبع کربن و انرژی برای تولید بیوسورفکتانت به کار می‌روند [۲۸]. Dunjak و Kosaric حضور مقادیر زیادی از بیوسورفکتانت متصل به سلول‌های *Corynebacterim lepus* را در زمان رشد بر روی گلوکز نشان داده و ثابت کرده‌اند که افزودن هگزادکان، آزاد شدن سورفکتانت از سلول‌ها تسهیل می‌کند [۲۹]. در موارد دیگری نیز نشان داده شده است زمانی که سلول‌ها در حال رشد بر روی منبع کربن محلول‌اند، تولید بیوسورفکتانت بسیار پایین بوده است و تنها هنگامی که تمام کربن محلول مصرف شود و منبع کربن نامحلول وجود داشته باشد تولید بیوسورفکتانت آغاز می‌شوند. اضافه کردن هیدروکربن‌های نامحلول به محیط کشت، تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری را افزایش می‌دهد. همچنین مشخص شده است که هیدروکربن‌های خطی قبل از همه‌ی هیدروکربن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. مقدار انحلال نفت خام در محیط کشت باکتری با نوع نفت خام ارتباط دارد [۳۰]. باوجوداین عنوان می‌شود که تولید بیوسورفکتانت با سوبستراهای محلول در آب امتیازاتی را نسبت به سوبستراهای هیدروکربنی دارا می‌باشند. از دیدگاه مهندسی، تجهیزات پیشرفته و انرژی ورودی بالایی برای تفرق و انتشار مناسب هیدروکربن‌های موردنیاز می‌باشد. علاوه بر این، اگر کاربرد بیوسورفکتانت در زمینه دیگری به‌جز MEOR باشد منبع هیدروکربنی محدود می‌باشد [۳۱].

روغن پالم نیز به‌عنوان منبع کربن برای تولید بیوسورفکتانت توسط *Pseudomonas aeruginosa* A41 استفاده شد [۳۲]. حتی پسماند حاصل از تصفیه‌ی روغن گیاهی همراه با سدیم نیترات

برای افزایش محصول بیوسورفکتانت در گونه‌ی جهش‌یافته‌ی سودوموناس آئروجینوزا استفاده شد. کشت حاصل از صنایع لبنی نیز به‌عنوان سوبسترا برای تولید رامنولپید در *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2، *Lactobacillus lactis* 53 و *Streptococcus thermophiles* بسیار ارزان و بادوام بود. سوبستراهای نشاسته‌ای همچون پساب پردازش سیب‌زمینی نیز به‌عنوان سوبسترا برای تولید بیوسورفکتانت لیوپپتید توسط باسیلوس سابتیلیس گزارش شده است. فاضلاب آرد کاساوا نیز به همین منظور توسط باکتری *Bacillus subtilis* ATCC 21332 و *Bacillus subtilis* LB5a مصرف می‌شود [۳۳، ۳۴].

به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی با یا بدون منبع نیتروژن *Clarified black strap molasses* سنتزی کمکی برای تولید رامنولپید توسط سویه‌ی موتانت *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 استفاده شد [۳۵]. باقیمانده‌های کشاورزی مختلف مانند جو، ساقه‌ی ذرت و اکالیپتوس به‌عنوان ماده‌ی خام برای تولید هم‌زمان لاکتیک اسید و بیوسورفکتانت توسط *Lactobacillus pentosus* استفاده شدند. اخیراً بهینه‌سازی آماری محیط تخمیر برای تولید بیوسورفکتانت از *Bacillus licheniformis* K51 گزارش شده است که در این بررسی اجزای مهم محیط با روش غربالگری Plackett-Burman که از متد Box-Behnken تبعیت می‌کند شناسایی شده‌اند. بنابراین محصول نسبی بیوسورفکتانت از 10X به 105X افزایش یافت که ۱۰ برابر بیشتر از محیط غیر بهینه شده بود [۳۶].

۲-۶-۱- اثرات منابع نیتروژنی و کاتیون‌های چند ظرفیتی

علاوه بر منبع کربن، دیگر اجزای محیط کشت نیز بر تولید بیوسورفکتانت تأثیر دارند. از بین منابع ازت بررسی شده املاح آمونیوم و اوره برای تولید بیوسورفکتانت توسط *Arthrobacter paraffineus* ترجیح داده می‌شوند. درحالی‌که *P. aeruginosa* و گونه *Rhodococcus* با املاح نترات بیشترین مقدار بیوسورفکتانت را تولید می‌کنند. تولید بیوسورفکتانت در *A. paraffineus* با افزودن ال-آمینواسیدهایی مانند گلوتامیک‌اسید، آسپارتیک‌اسید، آسپاراژین و گلیسین به محیط کشت افزایش می‌یابد. Robert و

همکارانش نشان دادند که نیتрат بهترین منبع ازت برای تولید *P. aeruginosa* 44T1 رشد داده شده بر روی روغن زیتون می‌باشد. تولید بیوسورفکتانت پس از ۳۰ ساعت رشد، یعنی زمانی که کشت به مرحله محدودیت نیتروژن می‌رسد، آغاز شده و تا ۵۸ ساعت بعد از تخمیر ادامه می‌یابد [۳۷]. Syldatk و همکارانش نشان دادند که محدودیت نیتروژن نه تنها باعث افزایش تولید بیوسورفکتانت می‌شود بلکه موجب تغییر در ترکیب بیوسورفکتانت تولیدی نیز می‌شود [۳۸]. محدودیت کاتیون‌های چند ظرفیتی نیز سبب افزایش تولید بیوسورفکتانت می‌شوند [۳۹]. گواراسانتوس^{۱۲} و همکارانش در سال ۱۹۸۶ ثابت کردند که با محدود کردن غلظت نمک‌های منیزیم، کلسیم، پتاسیم، سدیم، و عناصر جزئی، *P. aeruginosa* DSM 2659 رامنولیپید را با بازده بهتر تولید کرده است. از عناصر جزئی، آهن تأثیر بسیار مهمی بر تولید بیوسورفکتانت نشان داده است. محدود کردن آهن تولید بیوسورفکتانت را در *P. aeruginosa* و *P. fluorescens* تحریک می‌کند. با اعمال اثر تعاملی یون‌های فلزی انتخابی (Mg^{2+} , K^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+}) افزایش دو برابری در تولید سورفکتین به وسیله *Bacillus licheniformis* ATCC 21332 مشاهده شد. افزودن یون‌های فلزی مختلف (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Trace element) زمانی که همراه باهم اضافه شدند نسبت به حالتی که به تنهایی افزوده شده بودند باعث افزایش دو برابری محصول بیوسورفکتانت شدند [۴۰].

بین افزایش فعالیت گلوتامین سنتتاز و افزایش تولید بیوسورفکتانت در *P. aeruginosa* رشد یافته در محیط نیترات و پپتون نیز یک رابطه‌ی مستقیم یافت شده است. افزایش غلظت آمونیوم و گلوتامین هر دو پدیده را مهار کرده است [۴۱].

¹² Guerra-santos

۳-۶-۱- فاکتورهای محیطی

فاکتورهای محیطی و شرایط رشد مانند pH، دما، میزان هوادهی و نوع سوبسترا از طریق اثر بر رشد یا فعالیت سلولی بر تولید بیوسورفکتانت تأثیر می‌گذارند. pH محیط نقش بسیار مهمی در تولید سوفورولپید توسط *T. bombicola* ایفا می‌کند. تولید رامنولپید در سویه‌های *Pseudomonas* در دامنه pH ۶-۶/۵ بالاترین میزان می‌باشد و در pH بالاتر از ۷ به میزان زیادی کاهش می‌یابد. در *A. Paraffineus* و *Pseudomonas* DSM-2874 تغییر دما باعث تغییر در ترکیب بیوسورفکتانت تولید شده می‌شود. یک گونه گرمادوست باسیلوس، در دمای بالای ۴۰ درجه سانتی‌گراد رشد کرده و بیوسورفکتانت تولید می‌نماید. تیمار حرارتی برخی بیوسورفکتانت‌ها تغییر محسوسی در خصوصیات آن‌ها ایجاد نمی‌کند، به‌طوری‌که این خصوصیات پس از اتوکلاو در ۱۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه ثابت باقی می‌ماند [۲۲]. هوادهی و دور همزن محیط کشت، به دلیل این‌که هر دو عامل، انتقال اکسیژن را از فاز گازی به فاز مایع تسهیل می‌بخشند عوامل مهمی هستند که بر تولید بیوسورفکتانت تأثیر می‌گذارند. همچنین این عوامل با عملکرد فیزیولوژیکی ترکیبات امولسیون‌ساز میکروبی نیز ارتباط دارند. پیشنهاد شده است که تولید ترکیبات امولسیون‌ساز می‌تواند حلالیت سوبستراهای نامحلول در آب را افزایش دهد و در نهایت سبب بهبود بخشیدن به انتقال مواد غذایی به میکروارگانیسم شوند. با ارزیابی و بررسی تأثیر هوادهی در بیوسنتز یک سورفکتانت *Candida antartica* توسط Adamczak و Bednaski در سال ۲۰۰۲ مشاهده شد که بهترین مقدار تولید این سورفکتانت $45/5 \text{ g l}^{-1}$ زمانی به دست می‌آید که سرعت جریان هوا 1 vvm و غلظت اکسیژن محلول بر روی ۵۰ درصد از اشباع هوا حفظ شود با تغییر سرعت جریان هوا، به 2 vvm تشکیل کف و حباب افزایش می‌یابد و تولید بیوسورفکتانت تا ۸۴ درصد کاهش می‌یابد که تشکیل کف در طی پروسه‌ی زیستی نامطلوب است. چون که سبب حذف بیوسورفکتانت‌ها، مقداری بیوماس و لیپیدها از محیط فعال کشت می‌شود [۲۵]. افزایش در سرعت هوادهی محیط، به دلیل متلاشی شدن سلول‌ها باعث کاهش محصول بیوسورفکتانت در *Nocardia erythropolis* می‌شود از طرف دیگر در مخمرها، تولید بیوسورفکتانت با

افزایش سرعت هوادهی افزایش می‌یابد Cooper و Sheppard اخیراً به این نتیجه رسیدند که انتقال اکسیژن یک پارامتر کلیدی مهم در انبوه‌سازی فرایند تولید سورفکتین در *B. subtilis* می‌باشد. غلظت املاح نیز با تأثیر بر فعالیت سلولی می‌تواند بر تولید سورفکتانت مؤثر باشد. با این وجود برخی از بیوسورفکتانت‌ها تا غلظت ۱۰ درصد نمک تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند، هرچند کاهش ناچیزی در مقادیر غلظت بحرانی تشکیل مسیل (CMC) آن‌ها ایجاد می‌شود [۱۲].

۷-۱- غربال‌گری میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت

یکی از ساده‌ترین معیارها برای جداسازی اولیه باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت بررسی همولیز بر روی Blood agar و تعیین شاخص امولسیفیکاسیون آن‌ها می‌باشد [۴۲، ۴۳]. در متد Drop-Collaps که جهت غربالگری بیوسورفکتانت‌های رامنولپید تولید شده با میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود از پلیت‌هایی که دارای سطح پلی‌استیرن و چاهک‌های کوچک می‌باشند استفاده می‌شود. اگر محیط مایع دارای بیوسورفکتانت باشد قطرات محیط در چاهک پوشیده شده با نفت سقوط می‌کند [۴۴]. در متد ADSA-P (axisymmetric drop shape analysis profile) سوسپانسیون بیوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری، بر روی سطح جامد پوشیده شده با فلورواتیلن پروپیلن ریخته شده و مشخصات قطره با نمایشگر کنتور مشخص می‌گردد و کشش سطحی اندازه‌گیری می‌شود. از نشانگر متیلن‌بلو نیز استفاده می‌شود تا در صورت وجود بیوسورفکتانت لیپوپتیدی باکتریایی، با آن تشکیل کمپلکس داده و به این ترتیب باعث شناسایی آن شود. متد HPLC با ستون C18 که بسیار حساس می‌باشد برای آنالیز بیوسورفکتانت تولید شده با *Bacillus licheniformis* JF-2 استفاده شد. تست (ELISA) (enzyme-linked immunosorbent assay) برای تشخیص بیوسورفکتانت‌های لیپوپتیدی حاصل از *B. licheniformis* JK-2 استفاده شد. این متد بسیار حساس بود و قابلیت اندازه‌گیری شمار زیادی از نمونه‌ها را به صورت هم‌زمان دارا بود [۴۵-۴۷].

در مورد تولید سورفکتین از باسیلوس سوبتیلیس، ناحیه ژنتیکی نقش مهمی را ایفا می‌کند. محققین، PCR باسیلوس سوبتیلیس را (به عنوان ابزاری جهت شناسایی باکتری باسیلوس که سورفکتین

تولید می‌کند) همراه با بررسی همولیز و همچنین تعیین کمیت با HPLC و NMR انجام داده‌اند و با کمک تمامی این روش‌ها مخاطبان خود را متقاعد کرده‌اند که PCR نتایج صحیحی را فراهم می‌کند [۴۳، ۴۲].

۱-۷-۱- تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های اکسترموفیل

هرچند گزارش‌های مختلفی مبنی بر میکروارگانیسم‌های مزوفیل تولیدکننده بیوسورفکتانت یا بیوامولسیفایرها وجود دارد اما گزارش‌ها درباره میکروارگانیسم‌های ترموفیل ترشح‌کننده این ترکیبات فعال سطحی بسیار کم می‌باشد [۴۸]. میکروارگانیسم‌هایی که در دمای بالای ۵۰ درجه رشد کنند به عنوان ترموفیل در نظر گرفته می‌شوند. مهم‌ترین مزایای استفاده از ترموفیل برای تولید بیوسورفکتانت سرعت واکنشی سریع‌تر آن‌ها، ریسک آلودگی کمتر، کاهش ویسکوزیته رشد، انحلال‌پذیری بیشتر مولکول‌ها در محیط تخمیر و حذف پاتوژن‌ها در نتیجه دمای انکوباسیون بالاتر می‌باشد [۴۹]. باکتری‌های ترموفیل گرم مثبت و گرم منفی هر دو از محیط‌های حرارتی و غیرحرارتی گزارش شده‌اند. و تعداد زیادی از این باکتری‌ها می‌توانند از هیدروکربن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند [۵۰].

از آب تزریقی میدان نفتی، گونه‌ی جدید *Bacillus licheniformis* JF-2 جداسازی شد که در محیطی با غلظت نمک تا ۱۰ درصد و در دمایی تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد و PH حدود ۶-۴/۹ رشد می‌کرد و بیوسورفکتانت Lichenysin را تحت شرایط بی‌هوازی تولید می‌کرد. در این میان امولسیفایر کننده‌ی زیستی نمک دوست و گرمادوست *Metbanobacterium thermoautotrophicum* که تا ۸۰ درجه رشد می‌کرد و در PH حدود ۵-۱۰ و غلظت بسیار بالای نمک (بیشتر از ۲۰۰ گرم بر لیتر) فعال بود جداسازی شد [۵۱]. در آزمایشگاه بعد از غربالگری بیشتر از ۳۰ گونه‌ی مختلف باکتریایی از چشمه‌ی آب گرم و بررسی توانمندی آن‌ها در سنتز بیوسورفکتانت تحت شرایط ترموفیل سوپه‌ی *Bacillus stearothermophilus* VR-8 گزارش شد [۵۲]. فعالیت امولسیون‌کنندگی ایجاد شده توسط این سوپه در رنج PH حدود ۲-۸ رخ می‌داد که در مقایسه با لیپوزان (Liposan) که در یک رنج PH کم که حدود ۲-۵

بود بسیار پایدارتر است. همچنین در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نیز حدود ۳۰ دقیقه به صورت صد درصد و در ۹۰ و ۱۰۰ درجه نیز تا ۶۰ درصد پایدار می‌ماند. اما لیپوزان فقط تا ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌توانست پایدار بماند. در یک غلظت ۵ درصدی نمک فقط ۸ درصد کاهش فعالیت رخ داد که در مقایسه با کل کاهش فعالیت امولسیفیکاسیون باکتری‌های *Candida tropicalis* و *Debaromyces polymorphus* در حضور غلظت بالای نمک چشمگیر بود [۵۳، ۵۴]. گزارش‌های کمی درباره‌ی تولید بیوسورفکتانت توسط سایکروفیل‌ها وجود دارد.

در طول رشد یک ارگانیسم بر روی یک منبع کربنی مخلوط نشدنی به نام هگزادکان بیوسورفکتانت جدیدی از سویه‌ی *Arthrobacter protophormiae* در قطب جنوب تولید شده است که کشش سطحی محیط را از 68 nNm^{-1} به $30/68 \text{ nNm}^{-1}$ کاهش می‌دهد و نتایج خوبی را از امولسیون کنندگی نشان داد [۵۵]. این بیوسورفکتانت دارای ویژگی مقاومت دمایی و PH بود. و همچنین قادر بود حتی در غلظت بالای ۱۰ درصد نمک نیز بیوسورفکتانت تولید کند. علاوه بر این ۹۰ درصد نفت را نیز از ستون شن و ماسه بازیافت می‌کرد.

۸-۱- بازیافت بیوسورفکتانت

یکی از مهم‌ترین گام‌ها در تولید بیوسورفکتانت سرعت، کارایی و بازیافت ارزان آن می‌باشد به طوری که حدود ۶۰ درصد از کل هزینه‌ی تولید شود. به طور کلی مراحل بازیافت بیوسورفکتانت وابسته به کاربرد نهایی محصول می‌باشد. بنابراین بیوسورفکتانت مورد نیاز برای استفاده در MEOR همچون کاربردهای دارویی و آرایشی به خلوص بیش از حد نیاز ندارد.

رایج‌ترین روش بازیافت بیوسورفکتانت، استخراج با حلال‌ها (مثل کلروفرم، متانول، دیکلرومتان- متانول، بوتانول، اتیل استات، پنتن، هگزان، استیک اسید و اتر) یا رسوب‌دهی با اسید می‌باشد. هرچند

گزارش‌هایی از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات، Crystalization centrifugation، جذب سطحی، رسوب-دهی با فوم و... وجود دارد.

رسوب‌دهی بیوسورفکتانت با آمونیوم سولفات درباره‌ی بیوسورفکتانتی از *Arthrobacter* و *Bacillus subtilis* گزارش شده است [۵۶]. لیپوپتید ساخته شده توسط *Bacillus subtilis* A8-8 با رسوب‌دهی به‌وسیله‌ی اسید کلرید، تیمار با متانول و کروماتوگرافی سیلیکاژل به‌صورت جزئی خالص‌سازی شد [۵۷]. بیوسورفکتانت مربوط به *Bacillus coagulans* از محیط تخمیری با رسوب‌دهی با اسید و سپس خنثی‌سازی و لیوفیلیزه کردن، جداسازی شد. بیوسورفکتانت *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 با رسوب‌دهی اسیدی و استخراج حلال محلول رویی جداسازی شد [۵۸]. درحالی‌که استون برای رسوب‌دهی بیوسورفکتانت باکتری *Pseudomonas PG-1* استفاده شد [۵۹]. از متیل ترشری بوتیل‌اتر برای استخراج بیوسورفکتانت از رودوکوکوس استفاده شد [۶۰]. اولترافیلتراسیون غشایی پروسه‌ای سریع و یک مرحله‌ای با سطح خلوص بالا است که به واحدهای اولترافیلتراسیون ویژه با غشای پلیمری متخلخل نیاز دارد و از آن برای تخلیص لیپوپتید از باسیلوس سوبتیلیس استفاده می‌شود [۶۱]. برای استخراج رامنولپتید از *Pseudomonas aeruginosa* کروماتوگرافی تبادل یونی استفاده می‌شود. به‌طوری‌که بیوسورفکتانت روی رزین تبادل یونی جذب و سپس با بافر مناسب شستشو داده می‌شود [۶۲]. شکننده‌ی فوم به‌ویژه در طراحی بیورآکتورهایی که بازیافت فوم را در طول فرمانتاسیون تسهیل می‌کنند نیاز است و اولین بار در تولید سورفکتین گزارش شده است [۶۳]. در حالتی که از پساب‌های کارخانه‌ای به‌عنوان مواد غذایی جهت تولید سورفکتانت در *Pseudomonas aeruginosa* BS2 استفاده شود متدهای بازیافت بیوسورفکتانت شامل استخراج با حلال، رسوب‌دهی، کریستاله کردن، سانتریفیوژ و فوم شکن قابل استفاده نیستند زیرا این متدها رنگ را به بیوسورفکتانت انتقال می‌دهند.

۹-۱- تولید بیوسورفکتانت با روش زیست دگرگونی (بیوترانسفورماسیون)

در طول چند سال اخیر چندین گزارش مبنی بر تولید بیوسورفکتانت از مسیر بیوترانسفورماسیون ارائه شده است. سورفکتانت‌های میکروبی با فرمانتاسیون تولید می‌شوند تا بیوسورفکتانت‌های هیدروفیلیک و هیدروفوبیک که می‌توانند با تیمارهای آنزیمی به هم متصل شوند به دست آید و به این ترتیب سورفکتانت‌های اقتصادی تولید کنند. این متدهای آنزیمی در مقایسه با سنتزهای شیمیایی چندین مزیت دارند مثل نیاز کم به انرژی، حداقل تخریب حرارتی، تخریب زیستی بالا و گزارش‌های مختلفی از این ترانسفورماسیون ساده با استفاده از مخمر وجود دارد که در آن‌ها با اشباع سازی یا غیراشباع سازی اجزای اسید چرب کیفیت نفت را ارتقا داده‌اند.

گزارش‌هایی مبنی بر تبدیل اولئیک اسید به رسین اولئیک اسید توسط باکتری خاکی BMD-120 و همچنین تبدیل لسیتین سویا به یک بیوسورفکتانت جدید توسط فسفولیپاز D در باکتری *Streptococcus chromofuscus* ارائه شده است [۶۴-۶۶]. مهم‌ترین مضرات کاربرد آنزیم‌ها برای تولید سورفکتانت‌ها، قیمت بالای آن‌ها و همچنین مشکل بودن حل شدن هر دو سوبسترای هیدروفیلیک و هیدروفوبیک در محیط می‌باشد. اما این مسائل می‌تواند با استفاده از آنزیم‌های تثبیت‌شده و افزایش دادن پایداری و فعالیت آنزیم با مهندسی ژنتیک حل شود.

علاوه بر این پیشرفت‌های اخیر در سیستم‌های واکنش آنزیمی چندفازی و تکنیک‌های سیال فوق بحرانی کمک خواهد کرد تا مسئله‌ی انحلال‌پذیری کم سوبسترا را حل کند. همچنین پیشرفت‌هایی در مهندسی متابولیک و توسعه‌ی تکنیک‌های فرمانتاسیون جدید مثل Self cycling fermentation در افزایش محصول بیوسورفکتانت کمک خواهد کرد.

۱-۹-۱- اصلاح ژنتیکی گونه‌های میکروبی برای تولید بیوسورفکتانت

یکی از فاکتورهای مهم برای تولید اقتصادی بیوسورفکتانت، استفاده از گونه‌های جهش‌یافته‌ای است که بتوانند بر روی مواد خام ارزان تقویت‌شده رشد کنند. باکتری *Pseudomonas putida* PCL1445 دو بیوسورفکتانت لیپوپپتیدی به نام‌های putisolvin یک و دو را تولید می‌کند. مطالعات برای تنظیم تولید این بیوسورفکتانت نشان داده‌اند که ژن *dnak* همراه با *dnaj* و *grpE* در تنظیم (مستقیم یا غیرمستقیم) سطح رونویسی دخالت می‌کنند [۶۷]. باکتری‌های *B. subtilis* AB01335-1M4 و *B. subtilis* AB02238-1R2 توسط اشعه‌ی گاما تحریک شدند و مشخص شد که تولید سورفکتین در نمونه‌ی تحریک‌شده نسبت به سویه‌ی والدی آن‌ها به ترتیب ۵ و ۳ برابر افزایش یافته است. جداسازی سویه‌ی بی‌هوازی اجباری که می‌توانست با استفاده از نفت به‌عنوان منبع کربن بیوسورفکتانت تولید کند و کشش سطحی را از ۳۶/۱۶ mN/m به ۴۹/۶ mN/m کاهش دهد [۶۸]. محققین همچنین جهش‌یافته‌ی این سویه را نیز با هر دو روش UV و EMS جداسازی کرده‌اند که می‌تواند کشش سطحی را تا ۳۲ درصد کاهش دهد.

۲ - ۲ - فرمولاسیون و تولید نمونه آزمایشگاهی محصول

۱-۲- مواد و محیط‌های کشت

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از درجه خلوص آنالیتیکی برخوردار بوده و به‌جز در موارد ذکر شده از شرکت Merck آلمان تهیه گردیدند. نفت خام مورد استفاده از نوع نفت خام سنگین بود که از شرکت پایانه‌های نفتی ایران تهیه گردید. ملاس مورد استفاده در این پژوهش از نوع ملاس چغندر قند بود که از شرکت قند هگمتانه خریداری شد. ترکیب محیط کشت لینهارد (lindhard) و محیط پایه معدنی (MSM)، در جدول ۱-۳، جدول ۲-۳ و جدول ۳-۳ آورده شده است.

جدول ۱-۳- ترکیب محیط کشت لینهارد

غلظت	مواد شیمیایی
۰/۵ (g)	MgSO ₄ . 7H ₂ O
۱/۱ (g)	KCL
۰/۵ (g)	Yeast extract
۱۰۰ (μl)	Trace element
۱۵ (g)	NaNO ₃
۳/۴ (g)	Kh ₂ po ₄
۴/۴ (g)	K ₂ hpo ₄
۶۰ (g)	Corn. oil
۱۰۰۰ (ml)	D. W

جدول ۲-۳- ترکیب شیمیایی Trace element

غلظت (100x:30ml)	مواد شیمیایی
۰/۹ (g)	FeSO ₄ . 7H ₂ O
۰/۵۴ (g)	MnCl ₂ . 4H ₂ O
۰/۳۹ (g)	Co(NO ₃). 6H ₂ O
۰/۱۲ (g)	ZnSO ₄ . 7H ₂ O
۰/۰۶ (g)	H ₂ MoO ₄
۰/۰۰۳ (g)	CuSO ₄ . 5H ₂ O
۳ (g)	CaCl ₂
۳۰ (ml)	HCl(0.1M)
۱۰۰۰ (ml)	D. W

جدول ۳-۳- ترکیب محیط کشت پایه معدنی

غلظت	مواد شیمیایی
۰/۴ (g)	MgSo ₄ . 7H ₂ O
۴۰ (g)	NaCl
۲۰۰ (μl)	Trace element
۲ (g)	NH ₄ CL
۲/۱۸ (g)	Kh ₂ po ₄
۴/۲۸ (g)	Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O
۲۰۰۰ (ml)	D. W

۲-۲- دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده

برای انجام پژوهش حاضر از وسایل و تجهیزات متعددی استفاده شد که در جدول ۳-۴ فهرستی از دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده معرفی شده است.

جدول ۳-۴- فهرست دستگاه‌ها و تجهیزات

نام دستگاه	مدل دستگاه
شیکر انکوباتور	Labteck، کره جنوبی
اتوکلاو	Wise Clare، کره جنوبی
لامینارفلو	Azotech، ایران
pH متر	Metrohm، سوئیس
آون	Memmert، آلمان
انکوباتور	Memmert، آلمان
استیرر	ULTRA UM-607
ترازوی دیجیتالی (0. 0001 g)	Shimadzu AEU-Z10، ژاپن
سمپلر	Eppendorf، آلمان
اسپکتروفتومتر	Labomed، آلمان
ترموسایکلر	Corbett، استرالیا

Hettich، آلمان	میکرو سانتریفیوژ یخچال دار
Hettich، آلمان	سانتریفیوژ
پایا پژوهش پارس	الکتروفورز
UVP، آمریکا	ژل داکومننت

۳-۲- نمونه برداری

نمونه برداری از دو محل آلوده به نفت شامل حوضچه باران گیر شرکت پایانه‌های نفتی در جزیره خارک و حوضچه پسماند گل حفاری مربوط به شرکت ملی مناطق نفت خیز جنوب در منطقه مارون خوزستان به روش random strata صورت گرفت [۶۹]. در هر نمونه برداری ۲۰ نمونه مختلف از آب و رسوبات منطقه هوازی (۱۰ سانتی متر سطحی) ، به طور تصادفی در محدوده مورد نمونه برداری توسط اسپاتول برداشته شد. نمونه‌ها که شامل حدود ۲۰۰ گرم آب و رسوبات آلوده و لجن‌های نفتی بود داخل ظرف‌های درپیچدار استریل بر روی یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی نفت پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی فرستاده شد.

شکل ۱-۳- عکس هوایی از محل نمونه‌برداری در جزیره خارک (29°13'41. 10" N 50°18'10. 91" E).

شکل ۲-۳- عکس هوایی از محل نمونه‌برداری در حوضچه پسماند کارخانه گل حفاری در منطقه مارون خوزستان
(31°7'40. 53" N 49°18'18. 81" E).

۱-۳-۲- اندازه‌گیری مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه

جدول ۵-۳ میانگین مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های برداشته‌شده را به تفکیک محل نمونه‌برداری نشان می‌دهد. دمای آب و رسوبات در محل نمونه‌برداری به‌وسیله ترمومتر دیجیتال پرتابل اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری شوری و pH نمونه، مقدار ۱۰ گرم از نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به‌وسیله استیرر کاملاً هم زده شد. سپس سوسپانسیون سانتیفریوژ شد (۱۲,۰۰۰ دور در دقیقه) و میزان شوری و pH در مایع حاصل به ترتیب به‌وسیله دستگاه رفرکتومتر و pH-متر تعیین شد. میزان هیدروکربن‌های نفتی کل (TPH) به روش استخراج با حلال n-هگزان در سه تکرار اندازه‌گیری شد [۷۰]. به‌این ترتیب که ابتدا مقدار ۱ گرم از نمونه توزین شد و در ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۳ گرم دانه‌های شیشه‌ای (Glass beads, 0.2 mm) و ۲۰ میلی‌لیتر n-هگزان به آن اضافه شد و به‌وسیله مگنت استیرر کاملاً مخلوط گردید. مخلوط حاصله جهت رسوب‌دهی ذرات جامد، در ۱۲,۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شد و محلول رویی به‌وسیله دستگاه تبخیر در خلأ (Vacuum evaporator) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید و میانگین وزن ترکیبات هیدروکربنی باقیمانده محاسبه شد.

جدول ۵-۳- مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های گرفته‌شده به تفکیک محل نمونه‌برداری

Physicochemical property	Sampling 1 (Catchment)	Sampling 2 (Mud pit)	Sampling 3 (Catchment)
Temperature	34 °C	39 °C	27 °C
Salinity	26 ppt	54 ppt	32 ppt
pH	7. 34	7. 61	7. 58
TPH	366. 48 mg/gr	530. 33 mg/gr	296. 05 mg/gr

۲-۴- آنالیزهای آماری

جهت انجام آنالیزهای آماری از نرم افزارهای ذکر شده در جدول ۳-۶ استفاده شد. تمامی آزمایش های صورت گرفته به جز در موارد ذکر شده، در ۳ تکرار انجام شد و میانگین نتایج در محاسبات و تجزیه و تحلیل ها مورد استفاده قرار گرفت. جهت انجام تست های بهینه سازی روش آماری تاگوچی به کار برده شد که در ادامه توضیح داده خواهد شد.

جدول ۳-۶- نرم افزارهای مورد استفاده

نرم افزار	کاربرد
Excel 2010	رسم نمودار و آنالیزهای آماری
Mega 5	رسم درخت فیلوژنی
(Bioedit (version 7.0.9.0	ویرایش توالی DNA
Minitab 16 Statistical	آزمایش های آماری بهینه سازی
EndNote X4	رفرنس دهی

۲-۵- جداسازی سویه های باکتریایی

۲-۵-۱- جداسازی مستقیم

سویه های میکروبی موجود در نمونه آلوده به نفت به روش کشت سریال رقت بر روی پلیت های محیط پایه معدنی حاوی نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی، جداسازی شدند. برای این منظور ابتدا محیط کشت نامبرده طبق

جدول ۳-۲- ترکیب شیمیایی Trace element

غلظت (100x:30ml)	مواد شیمیایی
۰/۹ (g)	FeSo ₄ . 7H ₂ O
۰/۵۴ (g)	MnCl ₂ .4H ₂ O
۰/۳۹ (g)	Co(NO ₃).6H ₂ O

۰/۱۲ (g)	ZnSo ₄ . 7H ₂ O
۰/۰۶ (g)	H ₂ MoO ₄
۰/۰۰۳ (g)	CuSo ₄ . 5H ₂ O
۳ (g)	CaCl ₂
۳۰ (ml)	HCl(0.1M)
۱۰۰۰ (ml)	D. W

جدول ۳-۳ تهیه شد، و پس از استریل کردن در اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار 15 psi به مدت ۱۵ دقیقه) در پلیت‌های یک‌بارمصرف استریل توزیع گردید. بر روی پلیت‌ها پس از سرد شدن ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام استریل به وسیله میله شیشه‌ای استریل پخش شد. سپس ۱۰ گرم نمونه آب و رسوبات و لجن در ۱۰ میلی‌لیتر محلول NaCl 2.6%، 5.4% یا 3.2% (بر اساس شوری محل نمونه‌برداری) کاملاً مخلوط شد. از سوسپانسیون حاصل سریال رقت ۱ به ۱۰ تا 10^{-8} در محلول نمکی نامبرده تهیه شد و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت‌های محیط کشت فوق کشت شد. پلیت‌ها به منظور رشد در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی پلیت‌ها، از پلیت‌هایی که حاوی حدود ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی مجزا بودند، کلنی‌های مختلف جداسازی و با کشت متوالی بر روی محیط کشت TSA خالص شدند.

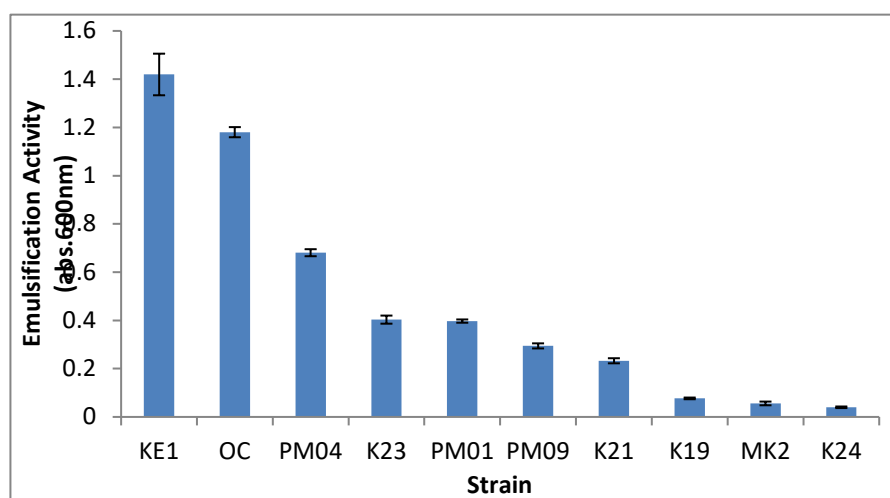
۲-۵-۲- جداسازی بعد از غنی‌سازی در محیط نفت

برای این منظور ابتدا ۱ گرم از نمونه موردنظر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع پایه معدنی استریل حاوی ۱٪ نفت خام در داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری کشت داده شدند. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با دور 150 rpm به مدت ۲۰ روز گرماگذاری شدند. از این محیط‌های غنی‌سازی شده روزانه ۱۰۰ میکرولیتر نمونه‌برداری شده و باکتری‌های زنده قابل کشت در آن به روشی که در بخش جداسازی مستقیم توضیح داده شد، کشت و خالص‌سازی گردید.

۶-۲- غربالگری باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت

فعالیت امولسیون‌کنندگی به‌عنوان شاخص تولید بیوسورفکتانت، با اندازه‌گیری میزان کدورت حاصل از ایجاد امولسیون هگزادکان در آب تعیین شد. این تست ۴۸ ساعت بعد از کشت باکتری‌ها در محیط پایه معدنی حاوی ۱٪ ملاس با استفاده از هگزادکان به‌عنوان هیدروکربن انجام شد. برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی بیوسورفکتانت به ۴۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر در یک لوله‌آزمایش، اضافه شد. سپس بعد از اندازه‌گیری کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۵۰۰ میکرولیتر هگزادکان به مخلوط فوق اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس لوله به مدت ۳۰ ثانیه در حالت ساکن قرار داده شد و کدورت مجدداً اندازه‌گیری شد. اختلاف میزان جذب به‌عنوان شاخص فعالیت امولسیفیکاسیون در نظر گرفته شد [۷۱].

شکل ۳-۳ نتایج این تست را نشان می‌دهد. فعالیت امولسیفیکاسیون هر سویه در این نمودار با میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ناشی از ایجاد کدورت حاصل از امولسیون شدن هگزادکان در آب، نمایش داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود سویه KE1 با میانگین کدورت امولسیفیکاسیون ۱/۸۴ به‌عنوان سویه برتر انتخاب شد.



شکل ۳-۳- فعالیت امولسیفیکاسیون هگزادکان حاصل از سویه‌های موردبررسی

۲-۷-۲- شناسایی باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت

۲-۷-۱- بررسی خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی

۲-۷-۱-۱- مورفولوژی

مورفولوژی کلنی‌ها از لحاظ رنگ، فرم (دایره‌ای، رشت‌های و غیره) مخاطی بودن، نوع اتصال به سطح آگار در محیط TSA مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۷-۱-۲- خصوصیات بیوشیمیایی

جهت بررسی خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌ها از کیت میکروبیولوژی AP20E (BioMérieux، فرانسه) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد [۷۲]. این کیت تست‌های نیتروفلن گالاکتوپیرانوزید (ONPG)، آرژنین دهیدروکسیلاز (ADH)، لیزین دکربوکسیلاز (LDC)، اورنتین دکربوکسیلاز (ODC)، مصرف سیتрат (CIT)، تولید H₂S، اوره‌آز (URE)، تریپتوفان دامینار (TDA)، تولید ایندول (IND)، تولید استوئین (VP)، ژلاتیناز (GEL)، احیای نیترات به نیتريت (NO₂) و گاز (N₂)، و تولید اسید از قندهای گلوکز (GLU)، مانیتول (MAN)، اینوزیتول (INO)، سوربیتول (SOR)، رامنوز (RHN) و ساکارز (SAC) را به‌طور هم‌زمان انجام می‌دهد.

این کیت حاوی ۲۰ چاهک است که سوبسترای دهیدراته دارند. در طی عمل متابولیسم تغییرات رنگی را به وجود می‌آورد که یا به‌صورت هم‌زمان و یا با افزودن معرف‌ها مشخص می‌شود. جهت انجام تست، پس از آماده نمودن جعبه تلقیح (شامل سینی و صفحه رویی)، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به چاهک‌های لانه‌زنبوری سینی اضافه شد تا محیط مرطوب فراهم شود. سپس نوارها داخل جعبه تلقیح قرار داده شد و چاهک‌ها به‌وسیله مایع تلقیح شامل سوسپانسیون هموژنیزه باکتری در محلول سرم فیزیولوژی، پر شد. بعد از انکوباسیون نوارها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، در صورت نیاز به هر یک از

تولید محصول میکروبی ازدیاد برداشت مخازن نفت خام با قابلیت حذف
باکتری‌های SRB و کاهش H₂S مخزن

گزارش پیشرفت ۱

چاهک‌ها معرف مربوطه اضافه شد و نتایج آزمون‌ها با بررسی تغییر در رنگ چاهک مورد بررسی قرار گرفت
(شکل ۳-۴). جدول ۳-۷ نتایج این آزمایش را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۴- کیت API 20E مورد استفاده جهت بررسی خصوصیات بیوشیمیایی قبل (بالا) و بعد (پایین) از انجام تست

جدول ۳-۷- خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه KE1

تست	KE1
نیتروفلن گالاکتوپیرانوزید (ONPG)	-
آرژنین دهیدروکسیلاز (ADH)	-
لیزین دکربوکسیلاز (LDC)	-
اورنتین دکربوکسیلاز (ODC)	-
مصرف سیترات (CIT)	+
تولید H ₂ S	-
اوره‌آز (URE)	-
تریپتوفان دامینار (TDA)	-
تولید ایندول (IND)	-
تولید استوئین (VP)	-
ژلاتیناز (GEL)	-
مصرف گلوکز (GLU)	+
مصرف مانیتول (MAN)	+
مصرف اینوزیتول (INO)	-
مصرف سوربیتول (SOR)	-
مصرف رامنوز (RHN)	-
مصرف ساکارز (SAC)	-

۲-۷-۲- شناسایی باکتری به روش تعیین توالی ژن 16S rRNA

۱-۲-۷-۲- استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده کیت مخصوص استخراج DNA ژنوم باکتریایی (Fermentase K0512) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. برای این منظور ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۴۰۰ میکرولیتر از محلول lysis به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و چندین بار در درون تیوپ وارونه شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آرامی به نمونه افزوده و توسط وارونه کردن (۳ تا ۵ بار) به حالت تعلیق درآمد و در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از انتقال محلول رویی حاوی DNA به لوله جدید، ۸۰۰ میکرولیتر محلول تازه آماده شده محلول رسوب‌دهی به آن افزوده و به آرامی چندین بار در دمای اتاق در حدود ۱ تا ۲ دقیقه وارونه گشت و سپس در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف مایع رویی، رسوب DNA در ۱۰۰ میکرولیتر NaCl حل شد. ۳۰۰ میکرولیتر اتانول سرد به محلول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سانتریفیوژ به مدت ۳ تا ۴ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، رسوب DNA مجدداً توسط اتانول شستشو داده شد و پس از خشک شدن در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شد. نمونه‌های DNA برای استفاده طولانی‌مدت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 200 \times 50$$

فرمول ۲-۳- اندازه‌گیری غلظت DNA

۲-۷-۲-۲- تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از واکنش زنجیره پلیمرز (PCR)

واکنش زنجیره‌های پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Corbet، استرالیا) در حجم ۵۰ میکرولیتر صورت گرفت. مخلوط master mix، اجزای واکنش و غلظت آن‌ها، پرایمرهای مورد استفاده و برنامه چرخه دمایی واکنش PCR در جدول ۸-۳ تا ۹-۲ نشان داده شده است [۷۳].

جدول ۸-۳- مخلوط واکنش PCR (Ampliqon Taq DNA polymerase master mix)

Component	Concentration
-----------	---------------

Triss_Hcl (pH 8. 5)	75 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
MgCl ₂	1. 5 mM
Tween 20	0. 1%
dNTPs	0. 2 mM
Ampliqon Taq DNA polymerase	0. 025 u/μl
Inert red dye and stabilizer	

جدول ۹-۳- مواد لازم برای انجام واکنش PCR و حجم هر یک در واکنش

Component	Volume
Forward Primer (16S-27F)	0. 6 μl
Reverse Primer (16S-1492R)	0. 6 μl
PCR master mix	8. 2 μl
DNA sample	4. 0 μl
Deionized water	36. 6 μl
Total	68 μl

جدول ۱۰-۳- پرایمرهای مورد استفاده و توالی آن‌ها

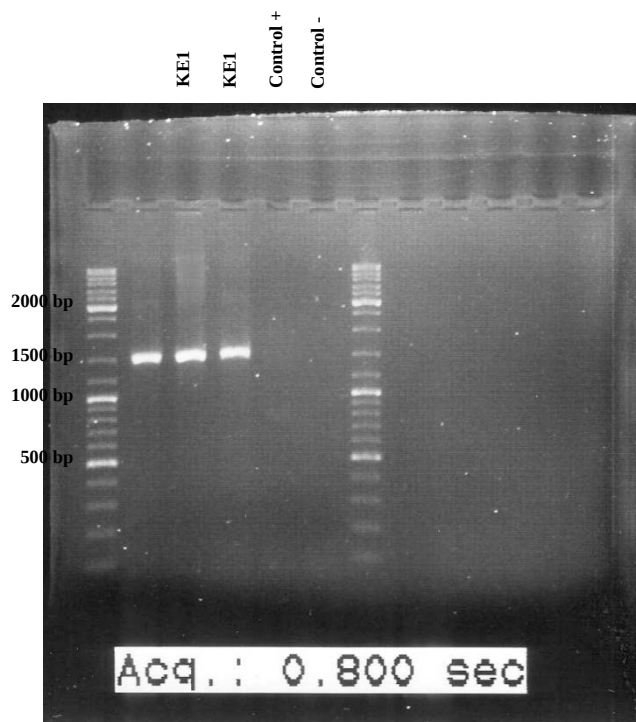
Primers	Sequences
16S_27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
16S_1510R	5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

جدول ۱۱-۳- برنامه چرخه دمایی انجام واکنش PCR

Stage	Time	Temprature	Repeats
Initial denaturation	3. 00 min	94 °C	1
Three-step cycling			35
Denaturation	1. 00 min	94 °C	
Annealing	30 sec	48 °C	
Extension	1. 00 min	72 °C	
Final Extension	7. 00 min	72 °C	1
Storage	∞	4 °C	

۲-۷-۲-۳- جداسازی و رنگ آمیزی قطعه تکثیرشده 16S rRNA

پس از اتمام چرخه‌های PCR به‌منظور مشاهده الگوی باندی محصول PCR، الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ (w/v) با ولتاژ ۷۰ به مدت ۱ ساعت انجام شد. از بافر TAE برای تهیه ژل و نیز به‌عنوان بافر تانک الکتروفورز استفاده گردید. برای تعیین اندازه محصولات PCR، نشانگر اندازه مولکولی 1Kb (Fermentase GenRuller SM0373) مورد استفاده قرار گرفت. عکس‌برداری توسط دستگاه ژل‌داکومنت (UVP، امریکا) انجام شد [۷۳]. شکل ۳-۵ باندهای ناحیه تکثیرشده 16S rRNA را در مورد نمونه مورد بررسی را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۵- عکس ژل الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rRNA سویه KE1 تولیدکننده بیوسورفکتانت.

۲-۷-۲-۴- تعیین توالی

۲۵ میکرولیتر از محصول PCR ژن 16S rRNA جهت تعیین توالی به شرکت MacroGen (کره جنوبی) ارسال شد.

۵-۲-۷-۲- بیوانفورماتیک

۱-۵-۲-۷-۲- ویرایش توالی

توالی حاصل از تعیین توالی ژن 16s rRNA به وسیله نرم‌افزارهای Bioedit (version 7.0.9.0) ویرایش گردید [۷۴]. با تعیین توالی دو رشته و مکمل سازی آن‌ها، اشتباهات احتمالی در توالی‌های حاصل کنترل و اصلاح گردید. توالی پاکیزه شده سپس به فرمت FASTA ذخیره گردید. جدول ۱۲-۳ توالی اصلاح‌شده مربوط به سویه KE1 نشان می‌دهد.

جدول ۱۲-۳- توالی اصلاح‌شده ژن 16S rRNA سویه KE1.

Strain	Sequence
KE1	>Strain KE1 16S rRNA gene, Partial Sequence TGCAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGCGCAACGGGTGAGTAACACGTGGGTG ATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCTCGGGATGCAT GTTCCGGGGTGGAAGGTTTTCCGGTGCAGGATGGGCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAAC GGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACG GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGAC GCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGTACCGACGAAGCGCAAGTGACGGT AGGTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTG TCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGTTTGTGCGCTCGTCTGTGAAAACCCGACAGCTC AACTGCGGGCTTGACGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAG CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACCTGACG CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGG GCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGG AGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGA TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGACCGCCCCAGAGATGGGGT TTCCCTTGTTGGTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGC CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACA CATGCTACAATGGCCGTACAGAGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCT CAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGAGGACCCCGTGGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACA CCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTCGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA AGT

۲-۵-۲-۲- آنالیز BLAST

با آنالیز BLAST توالی حاصل در پایگاه genbank، سویه‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). با استفاده از این آنالیز توالی ژن 16S rRNA سویه مورد بررسی با کلیه توالی‌های این ژن در پایگاه Genbank مورد مقایسه قرار می‌گیرد و سویه‌های دارای بیشترین شباهت به ترتیب از بالا به پایین در جدول حاصل نشان داده می‌شوند که به استفاده از این نتایج می‌توان سویه مورد بررسی را شناسایی کرد. جدول ۱۳-۳ به‌طور خلاصه نشان می‌دهد که ژن 16S rRNA مربوط به سویه KE1 شباهت بسیار بالایی (حدود ۹۹/۵۸٪) را با گونه *Rhodococcus ruber* دارا می‌باشد و تنها در ۶ اسید نوکلئیک با این سویه باکتریایی متفاوت می‌باشد.

تولید محصول میکروبی ازدیاد برداشت مخازن نفت خام با قابلیت حذف
باکتری‌های SRB و کاهش H₂S مخزن

گزارش پیشرفت ۱

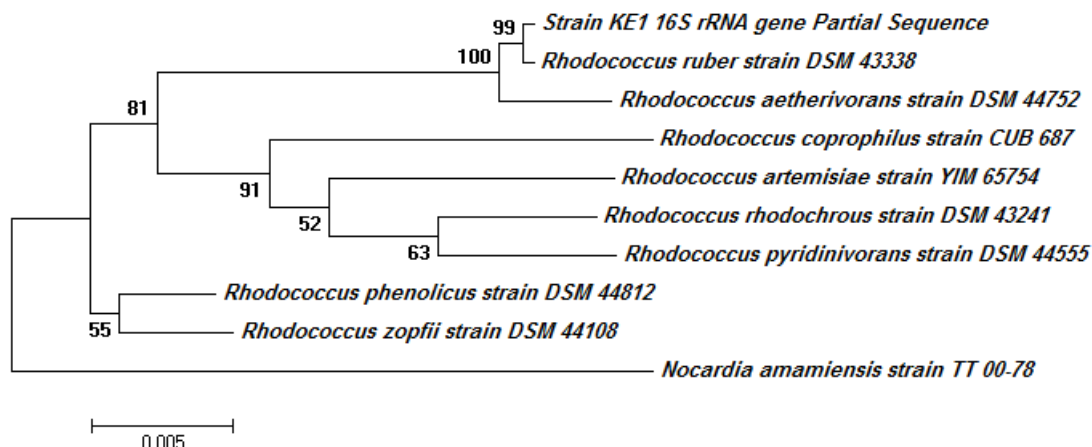
جدول ۱۳-۳: نتیجه آنالیز BLASTn سویه MK-1 در پایگاه Genbank.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Rhodococcus ruber</i> strain DSM 43338 16S ribosomal RNA gene	2595	2595	100%	0.0	99%	NR_026185.1
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> strain DSM 44752 16S ribosomal RNA gene	2470	2470	96%	0.0	99%	NR_118619.1
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> strain 10bc312 16S ribosomal RNA gene	2451	2451	96%	0.0	99%	NR_025208.1
<i>Rhodococcus phenolicus</i> strain DSM 44812 16S ribosomal RNA gene	2435	2435	100%	0.0	98%	NR_115082.1
<i>Rhodococcus zopfii</i> strain DSM 44108 16S ribosomal RNA gene	2429	2429	100%	0.0	97%	NR_041775.1
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> strain PDB9 16S ribosomal RNA gene	2399	2399	100%	0.0	97%	NR_025033.1
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> 16S ribosomal RNA,	2394	2394	100%	0.0	97%	NR_121768.1
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain 372 16S ribosomal RNA gene	2383	2383	100%	0.0	97%	NR_037023.1
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain DSM 43241 16S ribosomal RNA gene	2372	2372	99%	0.0	97%	NR_116689.1
<i>Rhodococcus phenolicus</i> strain DSM 44812 16S ribosomal RNA gene	2357	2357	96%	0.0	98%	NR_118611.1
<i>Rhodococcus coprophilus</i> strain CUB 687 16S ribosomal RNA gene	2351	2351	100%	0.0	96%	NR_029206.1
<i>Rhodococcus zopfii</i> strain DSM 44108 16S ribosomal RNA gene	2342	2342	96%	0.0	97%	NR_118609.1
<i>Rhodococcus artemisiae</i> strain YIM 65754 16S ribosomal RNA gene	2337	2337	100%	0.0	96%	NR_108785.1
<i>Rhodococcus rhodnii</i> strain B/O 16S ribosomal RNA gene	2331	2331	97%	0.0	97%	NR_037029.1
<i>Rhodococcus triatoma</i> strain IMMIB RIV-085 16S ribosomal RNA gene	2309	2309	97%	0.0	97%	NR_042352.1
<i>Rhodococcus phenolicus</i> strain G2P 16S ribosomal RNA gene	2305	2305	97%	0.0	97%	NR_042950.1
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> strain DSM 44555 16S ribosomal RNA gene	2303	2303	95%	0.0	97%	NR_118620.1
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> strain DSM 20151 16S ribosomal RNA gene	2303	2303	100%	0.0	96%	NR_041873.1
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain DSM 43241 16S ribosomal RNA gene	2302	2302	96%	0.0	97%	NR_118621.1
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> strain DSM 20151 16S ribosomal RNA gene	2300	2300	100%	0.0	96%	NR_119107.1
<i>Rhodococcus coprophilus</i> strain DSM 43347 16S ribosomal RNA gene	2292	2292	96%	0.0	97%	NR_118607.1
<i>Rhodococcus gordoniae</i> strain W4937 16S ribosomal RNA gene	2289	2289	96%	0.0	97%	NR_025730.1
<i>Nocardia amamiensis</i> strain TT 00-78 16S ribosomal RNA gene	2285	2285	97%	0.0	97%	NR_041531.1

۳-۵-۲-۲- رسم درخت فیلوژنتیکی

جهت تعیین موقعیت فیلوژنتیکی سویه‌های مورد بررسی، با استفاده از نرم‌افزار Mega 5 آنالیز clustering بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining بر روی توالی‌های ژن 16S rRNA سویه‌های مورد بررسی و گونه‌های باکتریایی مشابه، صورت گرفت [۷۵]. این توالی‌ها از پایگاه Genebank به دست آمد. جهت

تست آماری درخت حاصل مقادیر Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ درخت فیلوژنتیکی محتمل به صورت درصد در محل انشعابات نشان داده شد (شکل ۳-۶).



شکل ۳-۶: درخت فیلوژنتیکی نشان‌دهنده سویه KE1 در بین گونه‌های باکتریایی مشابه

همان‌گونه که ذکر گردید سویه KE1 نیز با تشابه ۹۹/۵۸ درصدی به گونه *Rhodococcus ruber* نزدیک بود. در درخت فیلوژنتیکی حاصل نیز این سویه با گونه مذکور در یک خوشه قرار گرفت. بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نیز اختلافی را بین این سویه و گونه مذکور نشان نداد. بر این اساس پیشنهاد می‌گردد سویه KE1 متعلق به جنس و گونه *R. ruber* باشد. جدول ۳-۱۴ ساختار رده‌بندی این سویه را نشان می‌دهد.

جدول ۳-۱۴ - ساختار رده‌بندی سویه KE1

Kingdom:	Bacteria
Phylum:	Actinobacteria
Class:	Actinobacteria
Order:	Actinomycetales
Family:	Nocardiaceae
Genus:	<i>Rhodococcus</i>
Species:	<i>ruber</i>

۸-۲- بررسی منحنی رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت

جهت بررسی کنتیک رشد سویه مورد نظر، منحنی رشد سویه KE1 در محیط ملاس چغندر قند به روش کلنی کانت تعیین گردید. سویه مورد نظر در ۱۰ میلی لیتر محیط مایع ملاس چغندر قند کشت داده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و بعد از رسیدن کدورت سلولی به ۱ (جذب در ۶۰۰ نانومتر)، از آن بعنوان استارتر استفاده شد. سپس از این کشت استارتر ۲ میلی لیتر به ۲۰۰ میلی لیتر محیط ملاس استریل در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری افزوده شد و در داخل شیکر انکوباتور با دور ۱۳۰ rpm و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. جهت شمارش سلولی، هر ۳ ساعت یک بار از این محیط نمونه برداری صورت گرفت و تعداد سلول‌های زنده به روش کلنی کانت مورد شمارش قرار گرفت. بدین منظور از پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد که در آن سری رقت از سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید و با کشت بر روی پلیت محیط TSA و محاسبه ضریب رقت، تعداد سلولی اندازگیری گردید. نرخ رشد (μ)، وزمان دوباره شدن باکتری (GT) با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد. جهت بررسی کینتیک تولید محصول بر روی هر یک از نمونه‌ها تست اموسیفیکاسیون انجام شد [۷۶].

$$\mu = \frac{(LN \frac{N_2}{N_1})}{T_2 - T_1}$$

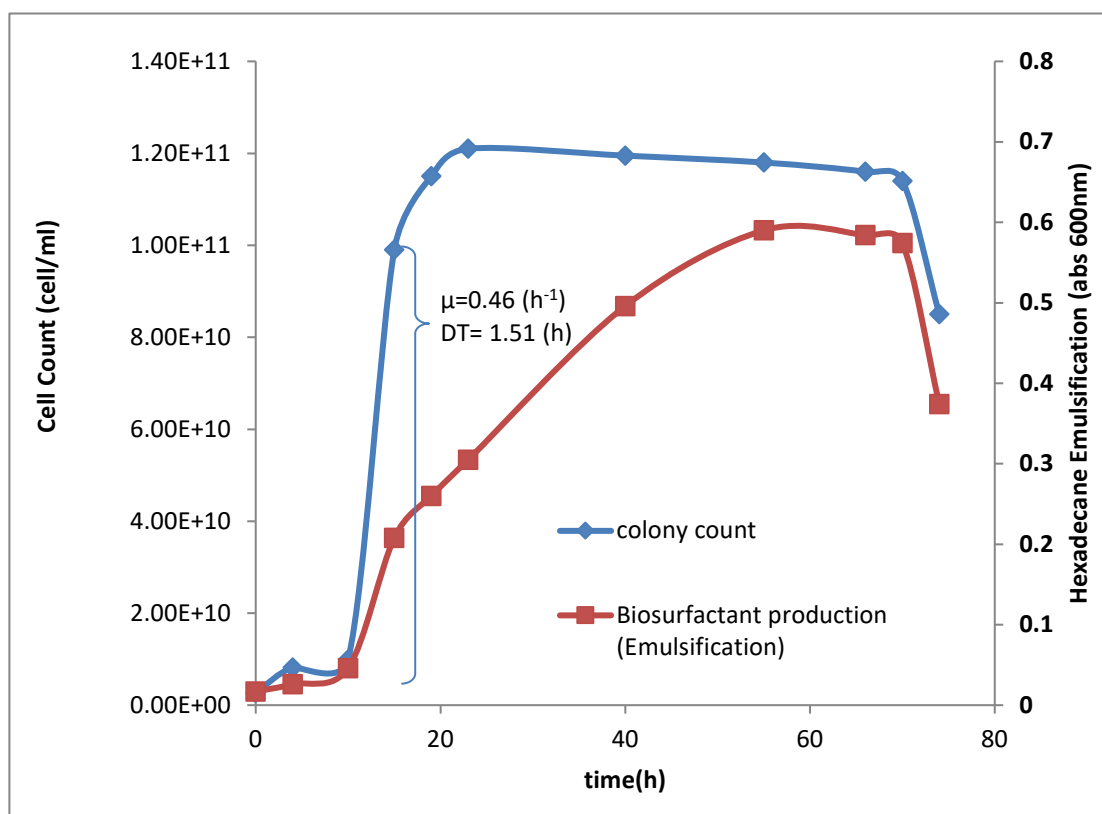
فرمول ۳-۲- محاسبه نرخ رشد:

$$GT = \frac{(LN 2)}{\mu}$$

فرمول ۳-۳- محاسبه زمان دوباره شدن جمعیت سلولی:

شکل ۷-۳ نتایج حاصل از این بررسی را در مورد سویه KE1 نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار مشاهده می‌شود باکتری بعد از ۱۰ ساعت وارد فاز رشد لگاریتمی شده که این فاز تا ساعت ۲۳ ادامه می‌یابد. از ساعت ۲۳ منحنی رشد وارد فاز سکون شده که این فاز تا ساعت ۷۰ ادامه دارد. از ساعت ۷۰ به بعد نیز فاز مرگ شروع می‌شود می‌شود. تولید بیوسورفکتانت نیز از زمان ورود باکتری به فاز رشد لگاریتمی شروع می‌شود. با این وجود تولید بیوسورفکتانت در ساعت ۵۵ به اوج خود می‌رسد. نرخ رشد ویژه (μ_m) این باکتری در فاز رشد لگاریتمی (h^{-1}) ۰/۴۶. و زمان دوباره شدن سلول (generation time) ۱/۵۱ ساعت

محاسبه گردید. مقایسه نمودارهای کینتیک رشد با تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1، نشان می‌دهد که تولید بیوسورفکتانت در باکتری مورد نظر زمانیکه که وارد فاز سکون می‌شود، افزایش می‌یابد که این ویژگی مشخصه متابولیت‌های ثانویه بوده و به نظر می‌رسد بیوسورفکتانت تولیدی توسط این سویه، از نوع متابولیت‌های ثانویه باشد..



شکل ۷-۳- منحنی رشد و تولید محصول بیوسورفکتانت توسط سویه KE1 در محیط کشت پایه معدنی حاوی ۱٪ ملاس

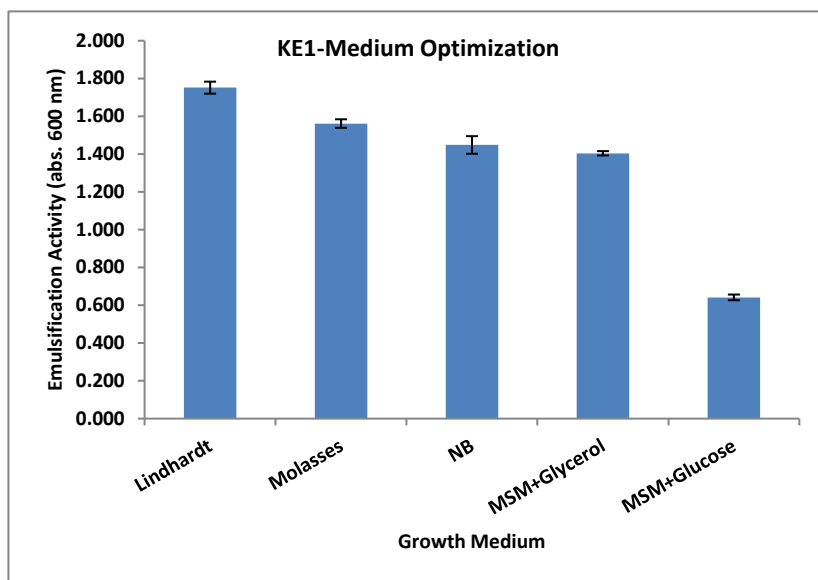
۲-۹- بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت

۲-۹-۱- انتخاب محیط کشت بهینه تولید بیوسورفکتانت

در این پژوهش، تولید بیوسورفکتانت در حضور منابع کربنی محلول در آب مانند گلیسرول، گلوکز و ملاس و یک منبع کربنی نامحلول در آب (روغن ذرت) مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به دلیل مشکلاتی که برای فرمانتور ایجاد می‌نماید مطلوب نمی‌باشد. برای انجام این تست سویه KE1 در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث، محیط پایه معدنی

حاوی ۱٪ ملاس، محیط پایه معدنی حاوی ۱٪ گلوکز، محیط پایه معدنی حاوی ۱٪ گلیسرول، و محیط کشت لینهارد استریل در چهار تکرار کشت داده شد. pH محیطها قبل از اتوکلاو، بر روی ۷ تنظیم شد. فلاسکها پس از تلقیح ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در شیکر انکوباتور با دمای ۳۵ درجه و دور ۱۳۰ rpm گرماگذاری شدند. بعد از رشد مناسب و تولید بیوسورفکتانت (بر اساس منحنی کینتیک تولید بیوسورفکتانت)، از هریک از محیطها نمونه برداری صورت گرفت و جهت تعیین میزان تولید بیوسورفکتانت، تست امولسیفیکاسیون انجام شد.

بالاترین میزان تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1، در محیط لینهارد مشاهده شد (شکل ۸-۳). میانگین فعالیت امولسیون کنندگی در این محیط ۱/۷۵۲ اندازه گیری شد. همچنین میانگین میزان فعالیت امولسیون کنندگی در نتیجه تولید بیوسورفکتانت توسط این سویه در محیطهای ملاس، نوترینت براث، گلیسرول و گلوکز، به ترتیب ۱/۵۶۲، ۱/۴۴۸، ۱/۴۰۴ و ۰/۶۴۲ اندازه گیری شد.



شکل ۸-۳- تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1 در محیط کشت های مختلف

۲-۹-۲- بهینه سازی شرایط تولید بیوسورفکتانت به روش طراحی آزمایش تاگوچی

به منظور بررسی اثر عوامل گوناگون مؤثر بر تولید بیوسورفکتانت از روش آماری تاگوچی، که روش مناسب و سیستماتیک برای بررسی همزمان اثر چندین فاکتور بر یک پارامتر می‌باشد، استفاده شد. در این روش از آرایه‌های متعددی برای طراحی آزمایشات به منظور بررسی تعداد زیادی فاکتور با تعداد کمی آزمایش استفاده می‌شود.

برای بررسی تأثیر عوامل در تعیین شرایط بهینه رشد میکروارگانیسم‌ها ۵ فاکتور در نظر گرفته شد که ۳ فاکتور در ۴ سطح و ۲ فاکتور دیگر در ۲ سطح مختلف در نظر گرفته شد. جدول ۳-۱۵ مقادیر هر یک از این عوامل را با نمادگذاری نشان می‌دهد. سطوح مورد نظر با توجه با محدوده عملیاتی متداول آن‌ها که در منابع مختلف ذکر گردیده است به نسبت C:N:P معادل 100:10:1، انتخاب شد. به منظور طراحی آزمایش‌ها از نرم‌افزار Minitab 16 statistical soft ware استفاده شد. طراحی آزمایش توسط نرم افزار نامبرده، آرایه L16 (با ۱۶ آزمایش) را پیشنهاد داد که آزمایش‌های مورد نظر در جدول ۳-۱۶ آمده است.

جدول ۳-۱۵- فاکتورها و سطوح در نظر گرفته در طراحی آزمایش‌ها جهت بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت. (-) فقر فسفر و ازت، (+) عدم فقر فسفر و ازت

Number	Factor	Level1	Level2	Level3	Level4
1	pH	6.5	7	7.5	8
2	Salinity(%)	0%	1%	2%	3%
3	Temperature	30	35	40	45
4	Nitrogen	+	-		
5	Phosphorus	+	-		

جدول ۱۶-۳- جدول آزمایش های آرایه L16 طراحی شده به روش تاگوچی

Trial	pH	Salinity(%)	Temperature	N	P
1	6.5	0	30	+	+
2	6.5	1	35	+	+
3	6.5	2	40	-	-
4	6.5	3	45	-	-
5	7	0	35	-	-
6	7	1	30	-	-
7	7	2	45	+	+
8	7	3	40	+	+
9	7.5	0	40	+	-
10	7.5	1	45	+	-
11	7.5	2	30	-	+
12	7.5	3	35	-	+
13	8	0	45	-	+
14	8	1	40	-	+
15	8	2	35	+	-
16	8	3	30	+	-

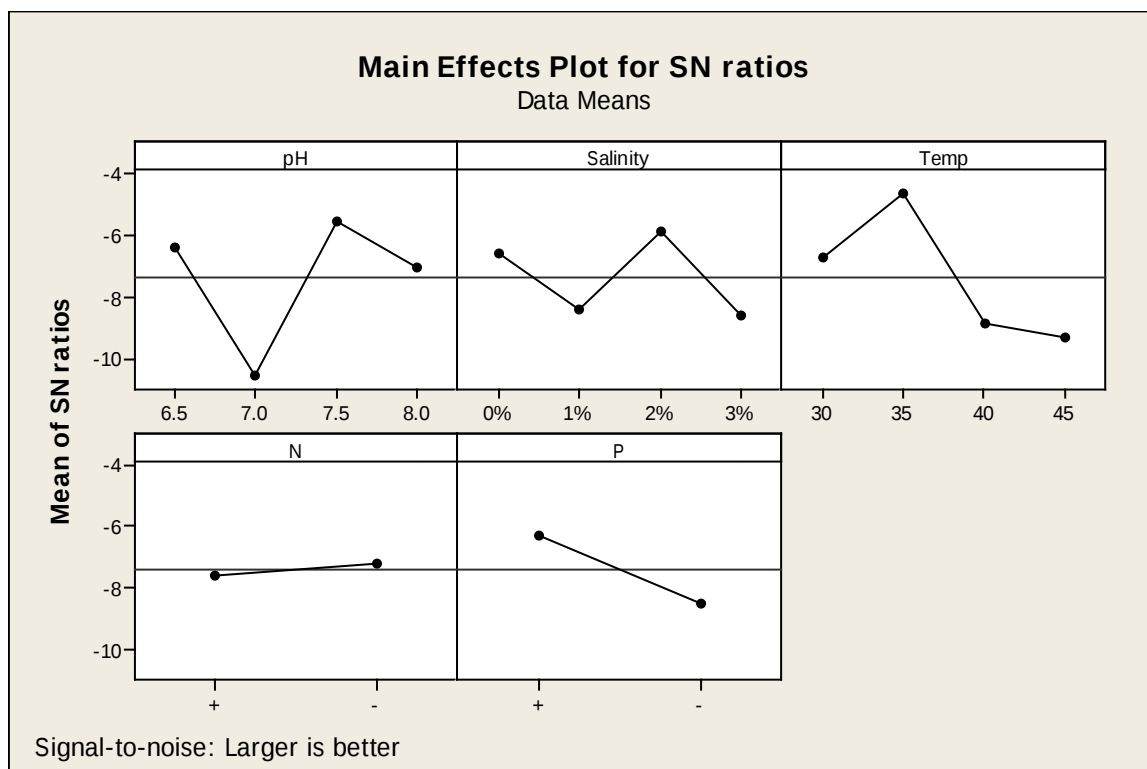
برای انجام آزمایش های بهینه سازی که در ۳ تکرار انجام شد، ۴ ارلن مایر ۲۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مناسب (طبق نتایج محیط کشت بهینه) فاقد منابع نیتروژن و فسفر و نمک تهیه شد. سپس pH محیط ها به ترتیب روی ۶.۵، ۷، ۷.۵، ۸، تنظیم شد. جهت افزودن منابع ازت، فسفر و تنظیم میزان شوری، ۳ استوک حاوی بترتیب مقدار ۶ گرم در لیتر NaNO_3 به عنوان منبع نیتروژن، ۱/۳۶ و ۱/۷۶ گرم در لیتر K_2HPO_4 و KH_2PO_4 بعنوان منبع فسفر، و ۱۲ گرم در لیتر NaCl بعنوان استوک تنظیم شوری، تهیه شد. سپس ۴۸ لوله ی آزمایش آماده شد و در هر لوله مطابق جدول طراحی تاگوچی ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت مورد نظر و مقادیر ۱۰۰۰ میکرولیتر منابع نیتروژن و فسفات (در صورت نیاز) و مقدار مناسب از شوری، اضافه شد. به کلیه لوله ها بعد از اتوکلاو شدن در ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر از میکروارگانیسم معلق شده در سرم فیزیولوژی اضافه شد. برای هر فاکتور نیز یک لوله با همان شرایط ولی بدون میکروارگانیسم به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. لوله ها سپس در ۴ انکوباتور با دماهای ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. جهت تعیین میزان

بیوسورفکتانت تولیدی، برای هر یک از سویه های مورد بررسی در زمان مناسب (مطابق با نتایج کینتیک تولید بیوسورفکتانت)، تست امولسیفیکاسیون صورت گرفت.

جدول ۱۷-۳ نتایج انجام تست های مربوطه را برای سویه مورد نظر در سه تکرار نشان می دهد. شکل ۹-۳ نیز نتایج آنالیز داده ها را با استفاده از نرم افزار Minitab نشان می دهد. آنالیز s/n با استفاده از نرم افزار مذکور نشان داد که این باکتری در شرایط دمای رشد ۳۵ درجه سانتی گراد، pH محیط کشت ۷/۵، شوری ۲٪، فقر نیتروژن و عدم فقر منبع فسفر، بیشترین میزان تولید بیوسورفکتانت را دارا می باشد.

جدول ۱۷-۳- نتایج آزمایش های طراحی شده به روش تاگوچی برای سویه KE1

Trial	pH	Salinity (%)	Temperature	N	P	Result 1	Result 2	Result 3
1	6.5	0	30	+	+	0.592	0.574	0.572
2	6.5	1	35	+	+	0.717	0.708	0.997
3	6.5	2	40	-	-	0.436	0.453	0.442
4	6.5	3	45	-	-	0.289	0.300	0.287
5	7	0	35	-	-	0.441	0.429	0.455
6	7	1	30	-	-	0.218	0.301	0.203
7	7	2	45	+	+	0.350	0.344	0.362
8	7	3	40	+	+	0.217	0.207	0.207
9	7.5	0	40	+	-	0.430	0.417	0.462
10	7.5	1	45	+	-	0.303	0.311	0.319
11	7.5	2	30	-	+	0.795	0.823	0.783
12	7.5	3	35	-	+	0.733	0.724	0.725
13	8	0	45	-	+	0.429	0.433	0.424
14	8	1	40	-	+	0.407	0.411	0.416
15	8	2	35	+	-	0.536	0.524	0.524
16	8	3	30	+	-	0.416	0.420	0.423



شکل ۹-۳- نمودار حاصل از آنالیز تاگوچی جهت بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1

در نهایت برای اطمینان از صحت نتایج آنالیز تاگوچی، در شرایط بهینه بدست آمده از آنالیز تاگوچی، کشت داده شدند. مشاهده شد که افزایش تولید بیوسورفکتانت توسط KE1 رشد یافته تحت شرایط بهینه، شاخص امولسیفیکاسیون هگزادکان به ترتیب ۸۶/۱ باعث شد. این نتایج، داده‌های تست بهینه‌سازی را تأیید می‌نماید.

۲-۱۰- تعیین خصوصیات کشش سطحی

کشش سطحی یکی از خواص مایعات بوده و از نیروی‌های جاذبه بین مولکولی ناشی می‌شود. کشش سطحی به روش Du Nouy Method و با استفاده از دستگاه تنسیومتر (Kruss مدل K100) اندازه‌گیری شد. در این روش، حلقه دستگاه که از جنس آلایژ پلاتین می‌باشد در مایع (محیط کشت و محیط حاوی بیوسورفکتانت) غوطه‌ور می‌گردد، نیروی وارد بر حلقه غوطه‌ور شده بر روی صفر تنظیم می‌گردد و حلقه به آرامی از درون مایع به خارج کشیده می‌شود. حداکثر نیروی ثبت شده توسط دستگاه مورد نیاز برای خارج کردن حلقه از سطح مایع، به عنوان کشش سطحی مایع در نظر گرفته می‌شود.

به منظور اندازه‌گیری میزان کاهش کشش سطحی محیط کشت در نتیجه تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری مورد آزمایش، سویه مورد نظر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت لینهارد در ۳ تکرار کشت داده شد و در دمای بهینه که قبلاً تعیین گردید، در شیکر انکوباتور با دور ۱۳۰ rpm گرماگذاری شد. یک ارلن نیز بدون تلقیح باکتری بعنوان کنترل تعیین گردید. میزان کشش سطحی محیط‌های کشت و کنترل تعیین گردید و میزان کاهش کشش سطحی با کم کردن کشش سطحی محیط رشد یافته از محیط کنترل، تعیین گردید.

کشش سطحی محیط کشت سویه KE1، بعد از رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد 37.83 ± 0.04 mN/m اندازه‌گیری شد. کشش سطحی آب مقطر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۷۲ mN/m می‌باشد.

۲-۱۰-۱- تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل (CMC)

شاخص CMC، حداقل غلظتی از یک سورفکتانت است که ساختارهای میسل شروع به تشکیل شدن می‌کنند و در واقع فعالیت امولسیفیکاسیون در نقطه CMC شروع به افزایش می‌نماید. برای اندازه‌گیری CMC از دو روش اندازه‌گیری کشش سطحی و فعالیت امولسیفیکاسیون استفاده شد. برای تعیین

CMC نیاز به خالص سازی بیوسورفکتانت می باشد که در این پژوهش از روش استخراج با حلال بیوسورفکتانت های تولید از سویه های مورد آزمایش، بطور جزئی مورد خالص سازی قرار گرفتند.

سویه مورد نظر در ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت لینهارد استریل که با توجه به شرایط بهینه کشت باکتری آماده شده بود، کشت داده شده و در شرایط بهینه مربوطه گرماگذاری شدند. سپس محیط کشت های مورد نظر به منظور جلوگیری از کاهش فعالیت بیوسورفکتانت، در معرض هوای سرد خشک شدند. در ادامه، محیط کشت خشک شده حاصل، بوسیله ۶۰ میلی لیتر متانول عصاره گیری شد. سپس عصاره های حاصل به مدت ۲ دقیقه در $14000 \times g$ سانتریفوژ شد و سوپرناتانت آن ها جداسازی شد. تست امولسیفیکاسیون، حل شدن بیوسورفکتانت را در سوپرناتانت عصاره متانولی تأیید نمود. عصاره حاصل مجدداً در دمای محیط خشک شد. به خشک شده حاصل سپس بوسیله n-هگزان عصاره گیری شد. تست امولسیفیکاسیون مجدداً حضور بیوسورفکتانت را در عصاره n-هگزان نشان داد. عصاره حاصل در نهایت تبخیر شد و در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱۰-۳- پودر حاصل از استخراج و خالص سازی جزئی بیوسورفکتانت.

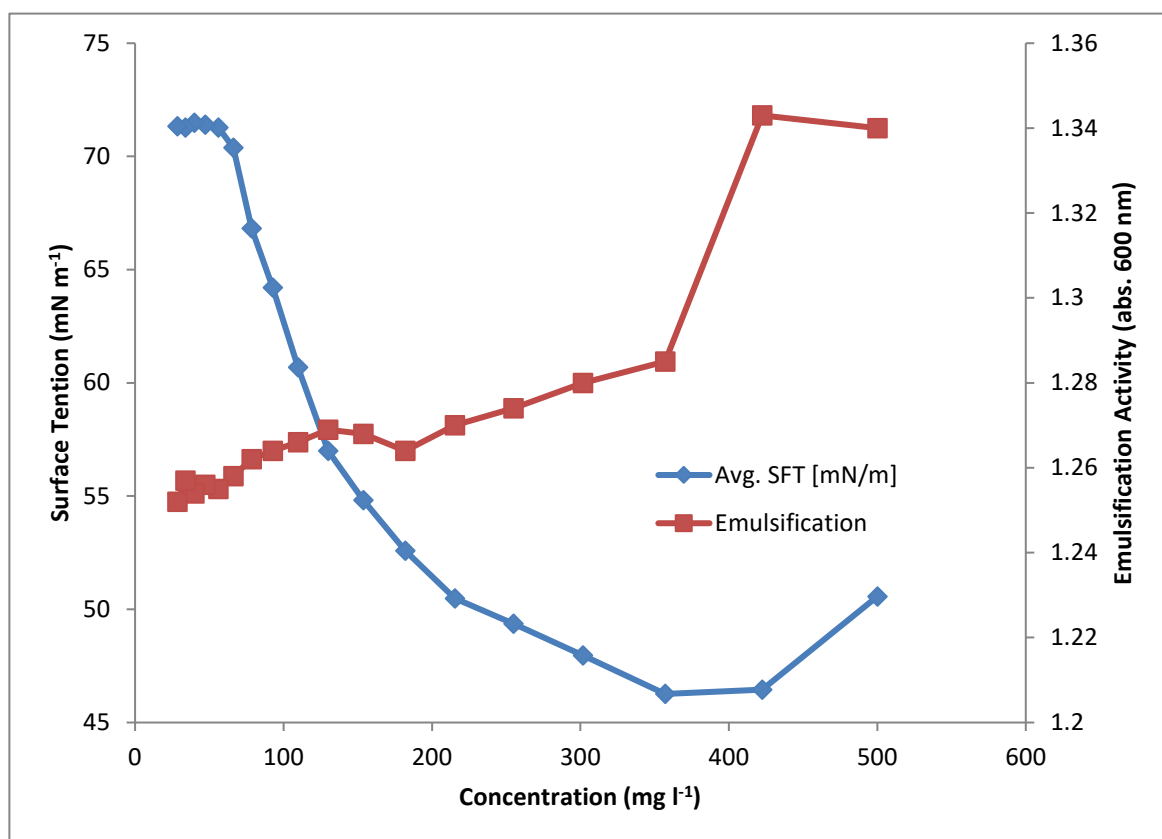
جهت محاسبه CMC به روش اندازه گیری کشش سطحی، رقت های متوالی از استوک غلیظ (5000 mg/l) هر یک از بیوسورفکتانت ها در آب مقطر ایجاد و کشش سطحی هر غلظت با استفاده از دستگاه تنسیومتر (Krusss مدل K100، آلمان) اندازه گیری شد. با استفاده از داده های حاصل منحنی تغییرات کشش

سطحی نسبت به غلظت بیوسورفکتانت رسم شد. با افزایش غلظت بیوسورفکتانت کشش سطحی آب کاهش یافته تا به نقطه بحرانی می‌رسد که از این نقطه به بعد با افزایش غلظت بیوسورفکتانت، کشش سطحی ثابت مانده و در بسیاری از موارد افزایش نیز نشان می‌دهد. غلظت بیوسورفکتانت‌ها در این نقطه بعنوان CMC تعیین شد [۷۱].

همچنین جهت تعیین CMC به روش بررسی فعالیت امولسیفیکاسیون، رقت‌های متوالی از استوک غلیظ بیوسورفکتانت (5000 mg/l) تهیه شد و شاخص فعالیت امولسیفیه کنندگی هر رقت با اندازه‌گیری میزان کدورت حاصل از ایجاد امولسیون هگزادکان در آب تعیین شد. برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از هر رقت فوق به ۴۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس بعد از اندازه‌گیری کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ۵۰۰ میکرولیتر هگزادکان به مخلوط فوق اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس کدورت مجدداً اندازه‌گیری شد اختلاف میزان جذب به عنوان شاخص فعالیت امولسیفیکاسیون در نظر گرفته شد. جهت تعیین CMC منحنی تغییرات فعالیت امولسیفیکاسیون نسبت به تغییرات غلظت رسم شد. CMC غلظتی از هر بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد که در آن با افزایش غلظت بیوسورفکتانت میزان امولسیفیکاسیون شروع به افزایش نمود [۲۴].

شکل ۱۱-۳ نمودار تغییرات کشش سطحی و امولسیفیکاسیون را نسبت به غلظت بیوسورفکتانت تولیدی از سویه KE1 نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت بیوسورفکتانت، کشش سطحی نیز کاهش پیدا کرده تا سرانجام در غلظت $1073/72 \text{ mg l}^{-1}$ با افزایش غلظت تغییری در کشش سطحی صورت نگرفته است این نقطه همان نقطه CMC می‌باشد. میزان کشش سطحی در این نقطه mN m^{-1} ۴۶/۲۶ اندازه‌گیری شده است. همین نتیجه در مورد فعالیت امولسیفیکاسیون نیز مشاهده شد. با افزایش غلظت میزان امولسیفیکاسیون تغییر چشمگیری را نشان نمی‌دهد تا اینکه سرانجام در غلظت mg l^{-1} ۱۰۷۳/۷۲، افزایش جهشی در میزان امولسیفیکاسیون ایجاد می‌شود. به این ترتیب CMC بیوسورفکتانت حاصل از سویه KE1 توسط هر دو روش معادل غلظت $1073/72 \text{ mg l}^{-1}$ میلی گرم بر لیتر تعیین گردید.

CMC یعنی حداقل غلظت ماده سورفکتانتی که توانایی ایجاد ساختارهای میسل را دارد، مهمترین پارامتر برای مقایسه قدرت امولسیون کنندگی امولسیفایرها می‌باشد، بطوریکه هر چه CMC پایین‌تر باشد قدرت پراکنده‌کنندگی بالاتر است. شاخص CMC را می‌توان به روش‌های مختلف به دست آورد که در این پژوهش از هر دو روش اندازه‌گیری کشش سطحی و سنجش فعالیت امولسیفیکاسیون غلظت‌های متوالی بیوسورفکتانت‌های خالص‌سازی شده پارامتر مذکور تعیین گردید که در هر دو روش نتایج یکسانی بدست آمد. شاخص CMC برای یک سورفکتانت سنتزی استاندارد مانند Sodium Dodecyl Sulfate ۲۳۰۶/۹۷ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. این در حالی است که CMC بیوسورفکتانت تولید شده توسط سویه KE1 در غلظت 357.01 mg l^{-1} مشاهده گردید.



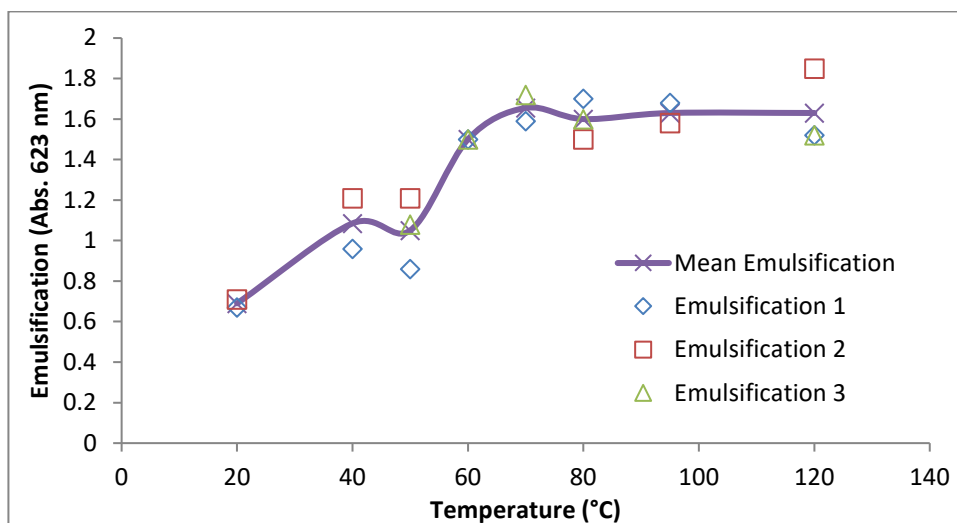
شکل ۱۱-۳- تعیین CMC بیوسورفکتانت حاصل از سویه KE1 با استفاده از روش اندازه‌گیری کشش سطحی و فعالیت امولسیفیکاسیون

۲-۱۰-۲- بررسی مقاومت بیوسورفکتانت تولیدی به دما و شوری

دارا بودن مقاومت به دما و شوری به منظور حفظ فعالیت بیوسورفکتانت در فرآیندهای پایین دستی تولید محصول که شامل تغلیظ کردن و خشک کردن محصول است حائز اهمیت می‌باشد. همچنین، از آنجایی که کاربرد بیوسورفکتانت تولید شده توسط سویه میکروبی در از دیاد برداشت نفت از مخازن نفتی می‌باشد بنابراین بیوسورفکتانت مورد استفاده برای این کار باید توانایی مقاومت به مقادیر بالای نمک و دما را دارا باشد.

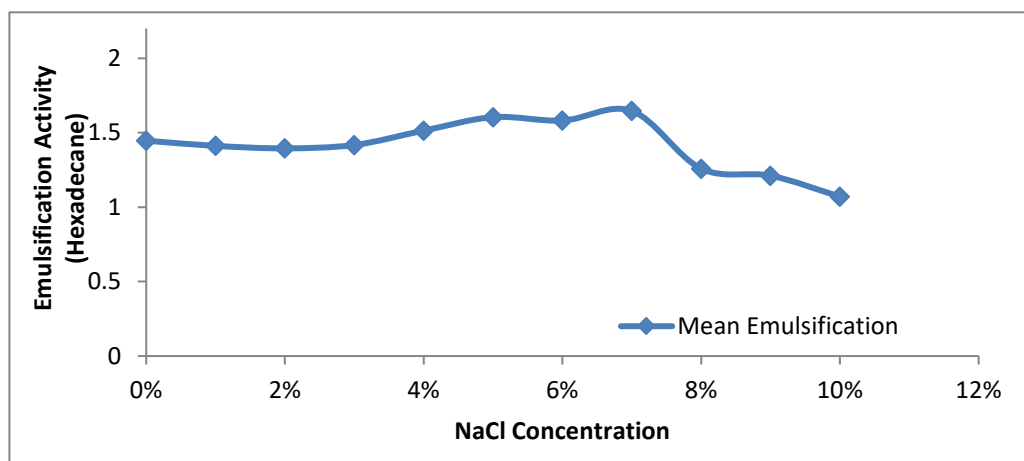
برای انجام این آزمایش ابتدا از کشت خالص باکتری مورد نظر سوسپانسیون تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط لینهارد افزوده شد و در شیکر انکوباتور با دور ۱۳۰ rpm و دمای ۳۵ درجه گرماگذاری شد. پس از زمان مناسب جهت رشد و تولید بیوسورفکتانت (بر اساس منحنی کینتیک تولید بیوسورفکتانت)، محیط کشت در $14000 \times g$ سانتریفیوژ شد تا سلول‌های باکتریایی جدا شوند. سپس جهت بررسی مقاومت بیوسورفکتانت تولیدی به نمک، به سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت، غلظت ۰ تا ۱۰ درصد نمک افزوده شد و پس از ۳۰ دقیقه، فعالیت امولسیفیکاسیون اندازه‌گیری شد. همچنین به منظور بررسی مقاومت بیوسورفکتانت تولیدی به دما، سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت به مدت ۱ ساعت در معرض دماهای ۳۵، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ درجه قرار داده شده و فعالیت امولسیفیکاسیون کننده‌ی برای بیوسورفکتانت تولید شده اندازه‌گیری شد [۷۷].

شکل ۱۲-۳ نتایج حاصل از بررسی مقاومت دمایی بیوسورفکتانت حاصل از سویه KE1 را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود فعالیت امولسیفیکاسیون بیوسورفکتانت حاصل از این باکتری با افزایش دما بتدریج افزایش یافته و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به اوج خود می‌رسد و با افزایش دما تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت امولسیفیکاسیون ثابت می‌ماند.



شکل ۱۲-۳: منحنی فعالیت امولسیفیکاسیون بیوسورفکتانت حاصل از سویه KE1 در دماهای مختلف

شکل ۱۳-۳ نیز نتایج حاصل از بررسی مقاومت بیوسورفکتانت تولید شده توسط سویه KE1 را به شوری نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود فعالیت امولسیون کنندگی با افزایش شوری تا ۷٪ نه تنها کاهشی را نشان نداد بلکه در غلظت ۴٪، ۵٪ و ۶٪ بتدریج زیاد شده و در ۷٪ نمک به اوج خود رسیده است. با افزایش غلظت نمک به بیش از ۸٪، کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان فعالیت امولسیون کنندگی این بیوسورفکتانت ایجاد می‌گردد. این نتایج نشان می‌دهد که بیوسورفکتانت میکروبی حاصل از این سویه ظرفیت بالقوه‌ای در کاربردهای صنعتی که گاه در دما و شوری بالا صورت می‌گیرد، دارد.



شکل ۱۳-۳: بررسی اثر نمک بر فعالیت بیوسورفکتانت حاصله سویه KE1

۳-۱۰-۲- فرمولاسیون محصول بیوسورفکتانت میکروبی جهت ازدیاد برداشت نفت

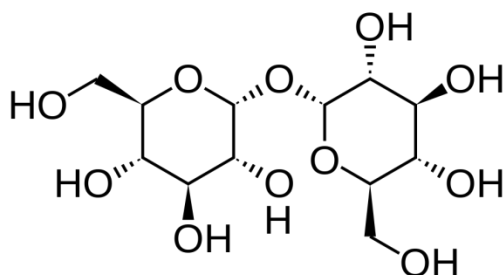
برخلاف سورفکتانت‌های سنتزی و شیمیایی، که بر اساس طبیعت گروه‌های قطبی به آنیونی، کاتیونی، و خنثی طبقه‌بندی می‌شوند، بیوسورفکتانت‌ها را بر اساس ترکیب شیمیایی و منشأ میکروبی آن‌ها دسته‌بندی می‌کنند. به‌طور کلی ساختار یک بیوسورفکتانت از یک بخش هیدروفیل شامل اسیدهای آمینه یا پپتیدهای آنیونی، کاتیونی و یا منو، دی، و پلی ساکاریدها، و یک بخش هیدروفوب شامل اسیدهای چرب تشکیل شده است. بر این اساس بیوسورفکتانت‌ها را می‌توان به بیوسورفکتانت‌های گلیکوپپتیدی، بیوسورفکتانت‌های لیپوپپتیدی و لیپوپروتئینی، فسفولیپیدها و اسیدهای چرب، بیوسورفکتانت‌های پلیمری، و بیوسورفکتانت‌های ویژه طبقه‌بندی کرد [۷۸].

هرچند اغلب بیوسورفکتانت‌ها توسط میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها سنتز می‌شوند ولی برخی از بیوسورفکتانت‌ها نیز گزارش شده است که از ترکیبات محلول در آب مانند گلوکز، ساکارز، گلیسرول، و اتانول تولید می‌شوند. میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت به جنس‌های بسیار متنوعی تعلق دارند که می‌توان به جنس‌های سودوموناس، باسیلوس، اسینتوباکتر و رودوکوکوس اشاره نمود [۷۸].

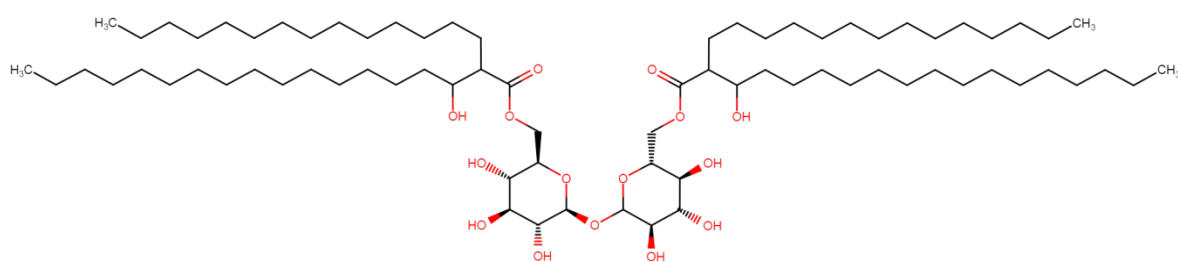
گونه‌های مختلفی از رودوکوکوس مانند *Rhodococcus erythropolis*، *Rhodococcus aurantiacus*، *Rhodococcus ruber*، *Rhodococcus rubropertinctus*، *Rhodococcus terrae* و *Rhodococcus percolatus* از جمله گونه‌های مهم تولیدکننده بیوسورفکتانت هستند که به دلیل قابلیت کاربرد صنعتی آن‌ها مطالعات زیادی بر روی آن‌ها صورت گرفته است [۷۹، ۸۰].

گونه *R. rubber* انواع مختلفی از بیوسورفکتانت‌ها را تولید می‌کند که تولید این بیوسورفکتانت‌ها به‌ویژه در زمان رشد در محیط‌های حاوی منبع کربن غیر محلول در آب مانند n-هگزان افزایش می‌یابد. اغلب بیوسورفکتانت‌های تولیدی توسط این گونه ساختار گلیکولیپیدی دارند. بخش هیدروفیل این گلیکولیپیدها شامل دی‌ساکاریدی بنام trehalose است که خود از دو گلوکوز با پیوند آلفا-۱،۱ به هم متصل شده‌اند (شکل ۱۴-۳). بخش هیدروفوب ساختارهای شیمیایی متنوعی را مانند مونوکورینومایکولات، دی‌کورینومایکولات و تتراسترها شامل می‌شوند. ترهالولیپیدهای حاصل از میکروارگانیسم‌های مختلف

از نظر اندازه و ساختار مایکولیک اسید، تعداد اتم‌های کربن، و درجه غیراشباع بودن با یکدیگر تفاوت دارند. مایکولیک اسیدها، ترکیبات بلند زنجیره α -branched- β -hydroxy fatty acid هستند (شکل ۱۵-۳) [۸۱].



شکل ۱۴-۳- ساختار ترهالوز بخش هیدروفیل بیوسورفکتانت‌های ترهالولیپیدی



شکل ۱۵-۳- ساختار یک بیوسورفکتانت ترهالولیپیدی

۱۱-۲- تعیین نوع و ساختار بیوسورفکتانت‌های تولیدشده توسط سویه KE1

در گزارش مرحله اول پروژه توضیح داده شد که بر پایه میزان پراکنده‌کنندگی هگزادکان در فاز آبی به‌عنوان شاخص تولید بیوسورفکتانت و همچنین مقاومت بیوسورفکتانت تولیدی به فاکتورهای شوری و دما، سویه KE1 به‌عنوان سویه برتر تولیدکننده بیوسورفکتانت با قابلیت تولید صنعتی انتخاب شد. همچنین شناسایی مولکولی بر اساس تعیین توالی ژن 16S rRNA و بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مشخص کرد که این باکتری با درصد شباهت بسیار بالا (حدود ۹۹/۵۸٪) متعلق به جنس و گونه

Rhodococcus ruber می‌باشد. بر این اساس آزمایش GC-Mass Spectroscopy جهت تعیین نوع و ساختار بیوسورفکتانت‌های ترهالولپیدی آن صورت گرفت که در ادامه توضیح داده می‌شود.

۱-۱-۲- استخراج بیوسورفکتانت‌ها از محیط کشت سویه KE1

برای تولید بیوسورفکتانت، سویه KE1 در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه معدنی حاوی (v/v) 2% n-هگزاکان به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی کشت داده شد و به مدت ۵۵ ساعت در شیکرانکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. محیط کشت سپس در 6000 ×g سانتریفیوژ گردید و لایه هیدروفوب سطحی جدا گردید. این لایه سپس به‌وسیله ۵۰ میلی‌لیتر حلال دی‌کلرومتان در قیف جداکننده استخراج گردید. حلال سپس در روتاری‌اوپراتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید و عصاره خام حاصل در فریزر ۲۰ °C نگهداری شد.

۲-۱۱-۲- خالص‌سازی بیوسورفکتانت‌های حاصل از سویه KE1

عصاره خام سپس در ۲۰ میلی‌لیتر حلال اتیل‌استات حل شد و در یک ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل (با مش 60-200) بارگذاری شد. ستون ابتدا با n-هگزان شستشو داده شد تا باقیمانده n-هگزاکان خارج شود. سپس با استفاده از حلال Chloroform/Methanol (2:1, v/v) شستشو داده شد تا بیوسورفکتانت‌ها استخراج گردد. عصاره حاصل مجدداً در روتاری‌اوپراتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید. عصاره بیوسورفکتانتی حاصل سپس به‌وسیله TLC سیلیکاژل (F₂₅₀ 10×20, 0.6 mm thick) و با استفاده از سیستم حلالی (chloroform/methanol/water, 85:12.5:2, v/v/v) کاملاً خالص‌سازی شد. باند مربوط به بیوسورفکتانت‌های ترهالولپیدی از سطح پلایت TLC تراشیده شد و با همان سیستم حلالی عصاره‌گیری شد تا ترهالولپید خالص به دست آید. ترهالولپید حاصل سپس در فریزر - 20 °C نگهداری شد.

۳-۱۱-۲- هیدرولیز ترهالولیپید حاصل از سویه KE1

جهت شکستن مولکول‌های ترهالولیپیدی و تفکیک بخش هیدروفوب حاوی اسیدهای چرب از بخش کربوهیدراتی (هیدروفیل)، هیدرولیز قلیایی عصاره ترهالولیپیدی خالص در محلول NaOH 1 M در اتانول در دمای 90 °C به مدت ۱ ساعت انجام شد. pH محلول واکنش سپس به وسیله HCl 1 M به ۷ رسانده شد و سپس به وسیله حلال اتر، عصاره گیری شد. فازهای اتری حاوی اسیدهای چرب سپس به وسیله قیف جداکننده تفکیک شد.

۴-۱۱-۲- آنالیز GC-MS

جهت تشخیص نوع و درصد اسیدهای چرب مختلف آنالیز GC-MS روی عصاره اتری انجام شد. برای این منظور ابتدا اسیدهای چرب با استفاده از محلول واکنش شامل 1M HCl in methanol در دمای 100 درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ دقیقه استریفیه شدند. پس از خنک شدن، متیل استرهای اسید چرب به وسیله n-هگزان بازیافت شدند و با دمیدن گاز نیتروژن حجم حلال به 1 ml رسانده شد.

۱ میکرولیتر از این عصاره جهت آنالیز به دستگاه Shimadzu GC-MS QP2010 تزریق شد. شرایط آنالیز GC در جدول زیر نشان داده شده است. طیف‌های Mass حاصل سپس با داده‌های دیتابیس دستگاه تطابق داده شد و مورد شناسایی قرار گرفت.

جدول ۱۸-۳- جزئیات آنالیز اسیدهای چرب توسط دستگاه GC-MS

Instrument:	GC-MS QP2010 Shimadzu
Detector	Mass Spectroscope
Column	Rtx-5 MS (30 meter, 0.2 mm ID, 0.25 um df)
Carrier gas	helium
Flow Rate	1.5 ml/min
Injection Volume	1 µl
Injection Temperature	260 °C
Injection Volume	1 µl
Temperature Program	60 °C (1 min); 5 °C/min to 260 °C; 260 °C (10 min)

۵-۱۱-۲- نتایج تعیین نوع و ساختار بیوسورفکتانت‌های تولیدشده توسط سویه KE1

نتایج آنالیز GC-MS در جدول ۱۹-۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که سویه KE1 طیفی از بیوسورفکتانت‌های ترهالولپیدی تولید می‌کند که جزء غالب بخش هیدروفوب بیوسورفکتانت‌های تولیدشده توسط این سویه را اسیدهای چرب غیراشباع تشکیل می‌دهند (56.5%) که از بین آن‌ها اولئیک اسید با 27.2% بیشترین فراوانی را داشت. از بین اسیدهای چرب اشباع هگزادکانوئیک اسید 34.2% کل اسیدهای چرب را تشکیل داد.

جدول ۱۹-۳- جزئیات آنالیز اسیدهای چرب توسط دستگاه GC-MS

Fatty Acid Type	Percent Of total Fatty Acids
12:0	1.2
13:0	0.4
13:1	1.1
14:0	5
15:0	1.4
15:1	1.7
16:0	34.2
16:1	9.5
17:0	1.3
17:1	0.5
18:1	27.2
18:2	0.3
20:1	11.5
21:2	4.7
Saturated Fatty Acids	43.5
Unsaturated Fatty Acids	56.5

منابع

1. Muthusamy, K., et al., *Biosurfactants: Properties, Commercial Production and Application*. current science, 2008. **94**: p. 6-25.
2. Pacwa-Plociniczak, M., et al., *Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances*. International journal of molecular sciences, 2011. **12**: p. 633-654.
3. Nitschke, M., C. Ferraz, and G.M. Pastore, *Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes*. Brazilian Journal of Microbiology, 2004. **35**(1-2): p. 81-85.
4. Edser, C., *Latest market analysis*. Focus on Surfactants, 2006. **2006**(5): p. 1-2.
5. Lin, S.C., *Biosurfactants: recent advances*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1996. **66**(2): p. 109-120.
6. Makkar, R. and S. Cameotra, *An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **58**(4): p. 428-434.
7. Mukherjee, S., P. Das, and R. Sen, *Towards commercial production of microbial surfactants*. TRENDS in Biotechnology, 2006. **24**(11): p. 509-515.
8. Singh, A., J.D. Van Hamme, and O.P. Ward, *Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects*. Biotechnology advances, 2007. **25**(1): p. 99-121.
9. Jain, R.M., et al., *Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium< i> Cronobacter sakazakii</i> isolated from oil contaminated wastewater*. Carbohydrate Polymers, 2012. **87**(3): p. 2320-2326.
10. Nicolaus, B., M. Kambourova, and E.T. Oner, *Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology*. Environmental technology, 2010. **31**(10): p. 1145-1158.
11. Bodour, A.A., K.P. Drees, and R.M. Maier, *Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(6): p. 3280-3287.
12. Mulligan, C.N., *Environmental applications for biosurfactants*. Environmental pollution, 2005. **133**(2): p. 183-198.
13. Satpute, S.K., et al., *Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review*. Critical reviews in biotechnology, 2010. **30**(2): p. 127-144.
14. Shueb, E., et al., *CLASSIFICATION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS OF BIOSURFACTANTS*. 2013.

15. Okpokwasili, G. and A. Ibiene, *Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug*. Afr J Biotechnol, 2006. **5**(5): p. 453-456.
16. Amani, H., et al., *Production of Microbial Rhamnolipid by Pseudomonas Aeruginosa MM1011 for Ex Situ Enhanced Oil Recovery*. Applied biochemistry and biotechnology, 2013: p. 1-14.
17. Sen, R., *Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR*. Progress in Energy and Combustion Science, 2008. **34**(6): p. 714-724.
18. Shavandi, M., et al., *Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, < i> Rhodococcus</ i> sp. strain TA6*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **82**(2): p. 477-482.
19. Yakimov, M.M., et al., *Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface Bacillus licheniformis BAS50*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(5): p. 1706-1713.
20. Li, Q., et al., *Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield*. Biochemical Engineering Journal, 2002. **11**(2): p. 197-199.
21. Hisatsuka, K.-i., et al., *Formation of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa and its function in hydrocarbon fermentation*. Agric. Biol. Chem, 1971. **35**(5): p. 686-692.
22. Gautam, K. and V. Tyagi, *Microbial surfactants: a review*. Journal of Oleo Science, 2006. **55**(4): p. 155-166.
23. Mazaheri Assadi, M. and M. Tabatabaee, *Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: A review*. International Journal of Environmental Research, 2010. **4**(4): p. 549-572.
24. Banat, I.M., et al., *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. **87**(2): p. 427-444.
25. Okoliegbe, I. and O. Agarry, *Application of microbial surfactant (a review)*. Scholarly J Biotechnol, 2012. **1**(1): p. 15-23.
26. Aparna, A., G. Srinikethan, and S. Hegde, *Isolation, screening and production of biosurfactant by Bacillus clausii 5B*. Research in Biotechnology, 2012. **3**(2).
27. Tabatabaee, A., et al., *Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs*. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 2005. **2**(1).

28. Desai, et al., *Microbial production of surfactants and their commercial potential*. Microbiology and molecular Biology reviews, 1997. **61**(1): p. 47-64.
29. Duvnjak, Z. and N. Kosaric, *Production and release of surfactant by Corynebacterium lepus in hydrocarbon and glucose media*. Biotechnology letters, 1985. **7**(11): p. 793-796.
30. Queiroga, C.L., L.R. Nascimento, and G.E. Serra, *Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by Bacillus subtilis in the presence of crude oil*. Brazilian Journal of Microbiology, 2003. **34**(4): p. 321-324.
31. Guerra-Santos, L., O. Käppeli, and A. Fiechter, *Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source*. Applied and Environmental Microbiology, 1984. **48**(2): p. 301-305.
32. Thaniyavarn, J., et al., *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa A41 using palm oil as carbon source*. The Journal of general and applied microbiology, 2006. **52**(4): p. 215-222.
33. Dubey, K. and A. Juwarkar, *Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing Pseudomonas aeruginosa strain BS2*. Indian Journal of Biotechnology, 2004. **3**(1): p. 74-81.
34. Rodrigues, L., J. Teixeira, and R. Oliveira, *Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria*. Biochemical Engineering Journal, 2006. **32**(3): p. 135-142.
35. Raza, Z.A., M.S. Khan, and Z.M. Khalid, *Physicochemical and surface-active properties of biosurfactant produced using molasses by a Pseudomonas aeruginosa mutant*. Journal of Environmental Science and Health Part A, 2007. **42**(1): p. 73-80.
36. Joshi, S., et al., *Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by Bacillus licheniformis K51*. Journal of microbiology and biotechnology, 2007. **17**(2): p. 313.
37. Nitschke, M., S.G. Costa, and J. Contiero, *Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules*. Biotechnology Progress, 2005. **21**(6): p. 1593-1600.
38. Sylatk, C., et al., *Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from Pseudomonas spec. DSM 2874 grown on n-alkanes*. Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences, 1985. **40**(1-2): p. 51.

39. Yu, H. and G.H. Huang, *Isolation and characterization of biosurfactant- and bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites in Western Canada*. Soil and Sediment Contamination, 2011. **20**(3): p. 274-288.
40. Makkar, R. and S.S. Cameotra, *Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of Bacillus subtilis at 45 C*. Journal of surfactants and detergents, 2002. **5**(1): p. 11-17.
41. Rodríguez-Blanco, A., et al., *Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea*. Environmental pollution, 2010. **158**(3): p. 663-673.
42. Rashedi, H., et al., *Optimization of the production of biosurfactant by Psuedomonas aeruginosa HR Isolated from an Iranian southern oil well*. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE), 2006. **25**(1): p. 25-30.
43. Rodrigues, L., et al., *Kinetic study of fermentative biosurfactant production by Lactobacillus strains*. Biochemical Engineering Journal, 2006. **28**(2): p. 109-116.
44. Tugrul, T. and E. Cansunar, *Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005. **21**(6-7): p. 851-853.
45. Lin, S.C., M.M. Sharma, and G. Georgiou, *Production and deactivation of biosurfactant by Bacillus licheniformis JF-2*. Biotechnology progress, 1993. **9**(2): p. 138-145.
46. Shulga, A., et al., *The method for determination of anionogenic bacterial surface-active peptidolipids*. Microbiol. J, 1993. **55**: p. 85-88.
47. Van der Vegt, W., et al., *Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991. **35**(6): p. 766-770.
48. Banat, I.M., *The isolation of a thermophilic biosurfactant producing Bacillus sp.* Biotechnology letters, 1993. **15**(6): p. 591-594.
49. Herbert, R., *The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms*. Microbes in extreme environments, 1986: p. 1-23.
50. PHILLIPS JR, W.E. and J.J. PERRY, *Thermomicrobium fosteri sp. nov., a Hydrocarbon-Utilizing Obligate Thermophile*¹. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1976. **26**(2): p. 220-225.
51. de Acevedo, G.T. and M.J. McInerney, *Emulsifying activity in thermophilic and extremely thermophilic microorganisms*. Journal of industrial microbiology, 1996. **16**(1): p. 1-7.

52. Gurjar, M., J. Khire, and M. Khan, *Bioemulsifier production by Bacillus stearothermophilus VR-8 isolate*. Letters in applied microbiology, 1995. **21**(2): p. 83-86.
53. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman, *Isolation of a bioemulsifier from Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology, 1984. **48**(4): p. 747-750.
54. Singh, M. and J. Desai, *Hydrocarbon emulsification by Candida tropicalis and Debaryomyces polymorphus*. Indian journal of experimental biology, 1989. **27**(3): p. 224-226.
55. Pruthi, V. and S.S. Cameotra, *Production and properties of a biosurfactant synthesized by Arthrobacter protophormiae—an antarctic strain*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997. **13**(1): p. 137-139.
56. Rosenberg, E., et al., *Production of biodispersant by Acinetobacter calcoaceticus A2*. Applied and environmental microbiology, 1988. **54**(2): p. 317-322.
57. Lee, S.-C., et al., *Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from Bacillus subtilis A8-8*. Journal of microbiology and biotechnology, 2006. **16**(5): p. 716-723.
58. Huszcza, E. and B. Burczyk, *Biosurfactant production by Bacillus coagulans*. Journal of surfactants and detergents, 2003. **6**(1): p. 61-64.
59. Cameotra, S.S. and H.D. Singh, *Purification and characterization of alkane solubilizing factor produced by Pseudomonas PG-1*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990. **69**(6): p. 341-344.
60. Kuyukina, M.S., et al., *Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction*. Journal of microbiological methods, 2001. **46**(2): p. 149-156.
61. Lin, S.-C. and H.-J. Jiang, *Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of Bacillus subtilis by ultrafiltration*. Biotechnology techniques, 1997. **11**(6): p. 413-416.
62. Reiling, H., et al., *Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa*. Applied and environmental microbiology, 1986. **51**(5): p. 985-989.
63. Chen, C.Y., S.C. Baker, and R.C. Darton, *Batch production of biosurfactant with foam fractionation*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006. **81**(12): p. 1923-1931.
64. Haferburg, D., et al., *Extracellular microbial lipids as biosurfactants*, in *Bioproducts*. 1986, Springer. p. 53-93.

-
65. Montet, D., et al., *A study of the influence of the growth media on the fatty acid composition in Candida lipolytica diddens and lodder*. Biotechnology letters, 1985. **7**(10): p. 733-736.
 66. Ratledge, C., *Lipid biotechnology: a wonderland for the microbial physiologist*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1987. **64**(12): p. 1647-1656.
 67. Dubern, J.-F., et al., *The heat shock genes dnaK, dnaJ, and grpE are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in Pseudomonas putida PCL1445*. Journal of bacteriology, 2005. **187**(17): p. 5967-5976.
 68. Liu, Q. and Q. Li, *Breeding of biosurfactant producing strain*. Weishengwuxue Zazhi, 2005. **25**: p. 54-56.
 69. Mason, B.J., *PREPARATION OF SOIL SAMPLING PROTOCOLS: SAMPLING TECHNIQUES AND STRATEGIES*. 1992, United States Environmental Protection Agency: Washington DC 20460. p. 3-7.
 70. Thouand, G., et al., *Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula*. Canadian journal of microbiology, 1999. **45**(2): p. 106-15.
 71. Correa, B.F., F.L. Colombo, and M.A. Zachia Ayub, *Production of biosurfactat by hydrocarbon degrading Rhodococcus rubber and rhodococcus erythropolis*. Rev. Microbiol., 1999. **30** (3): p. 245-258.
 72. Janeka, T., M. Łukaszewicza, and A. Krasowska, *Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium Pseudomonas putida BD2*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013. **5**: p. 287-298.
 73. Sanders, R.E. and J.H. Miller, *Molecular analysis of cultivated bacteria communities*, in *I microbiologist: a discovery-based course in microbial ecology and molecular evolution*. 2010, ASM Press: Washington, DC. p. 69-109.
 74. Hall, T.A., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acids. Symp., 1999. **41**: p. 95-98.
 75. Tamura, K., et al., *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology and Evolution, 2011. **28**: p. 2731-2739.
 76. Ric, d., p. Gilles, and v. Richard, *Biosurfactant Production by a Soil Pseudomonas Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 1996. **3**: p. 1908-1912.
-

77. Abu Ruwaida, A., et al., *Isolation of biosurfactant-producing bacteria, product characterization, and evaluation*. Acta Biotechnologica, 1991. **11**(4): p. 315-324.
78. Saharan, B., R. Sahu, and D. Sharma, *A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives*. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 2011. **2011**(1): p. 1-14.
79. Bicca, F.C., L.C. Fleck, and M.A.Z. Ayub, *Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcus ruber and Rhodococcus erythropolis*. Revista de Microbiologia, 1999. **30**(3): p. 231-236.
80. Ramsay, B., et al., *Biosurfactant production and diauxic growth of Rhodococcus aurantiacus when using n-alkanes as the carbon source*. Canadian Journal of Microbiology, 1988. **34**(11): p. 1209-1212.
81. Shao, Z., *Trehalolipids*, in *Biosurfactants*. 2011, Springer. p. 121-143.
82. Pornsunthorntawe, O., et al., *Isolation and comparison of biosurfactants produced by Bacillus subtilis PT2 and Pseudomonas aeruginosa SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery*. Biochemical Engineering Journal, 2008. **42**(2): p. 172-179.
83. Bordoloi, N. and B. Konwar, *Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2008. **63**(1): p. 73-82.