

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

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

زهرا استخر^{۱*}، بیژن هنرور^۲، نصراله شکیبیا صفت^۳، فرزانه آرام^۴

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی شیمی

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه مهندسی شیمی

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فیروزآباد، گروه نفت

۴- پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز

Zahra.estakhr@gmail.com

پژوهش‌نفت

سال بیست و دوم

شماره ۶۹

صفحه ۴۱-۳۳ ۱۳۹۱

چکیده

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

باسیلوس طبقه‌بندی گردیدند. در ضمن باکتری اول تحت عنوان *Bacillus Licheniformis* با کد شناسایی ۱۴۵۵۵۵۰ و باکتری دوم تحت عنوان *Bacillus Subtilis*، با کد شناسایی ۱۴۵۵۵۵۷ در بانک ژن آمریکا NCBI ثبت گردید.

واژه‌های کلیدی: ازدیاد برداشت میکروبی، بیوسورفاکتانت، باکتری، *Bacillus Licheniformis*، *Bacillus Subtilis*

مقدمه

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

در فرآیند پالایش مشکلی پیش نمی‌آورد. حتی در بسیاری از میدان‌های نفتی تداوم فعالیت فلور میکروبی سبب کاهش آب باقی‌مانده به همراه نفت شده و مقدار سولفید هیدروژن و فرآیندهای خوردگی را نیز کاهش می‌دهد. تیمار چاه گاه به صورت فرستادن میکروارگانیسم‌های ویژه به درون مخزن^۱ است؛ گاهی برای تقویت میکروارگانیسم‌ها و تسریع حصول نتیجه، مواد مغذی (نمک‌های معدنی مثل نمک‌های فسفر و نیتروژن و یا ترکیبات آلی مانند ملاس) نیز به چاه تزریق می‌شوند. گاهی هدف پروژه فعال کردن میکروفلور طبیعی منطقه به کمک تزریق مواد مغذی است و باکتری اضافی تزریق نمی‌شود [۷].

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

مواد و روش‌ها

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

پیچیده بیولوژیکی و نیاز روزافزون به محصولات حاصل از فرایندهای تخمیری در اقتصاد، بسیار قابل توجه می‌باشد [۳]. یک مخزن نفتی تا زمانی که فشار و انرژی کافی داشته باشد، می‌تواند نفت تولید کند اما پس از آن که انرژی طبیعی خود را برای تولید از دست داد، می‌توان با اعمال انرژی خارجی، نفت هرچه بیشتری را از مخزن استخراج نمود. ابتدا فشار با تزریق گاز و یا آب به لایه آبد مخزن تأمین می‌شود. سپس سیلاب‌زنی گازی^۱ یا سیلاب‌زنی آبی^۲ برای جابجایی نفت اجرا می‌شوند. پس از آن که این روش‌ها نیز کارایی خود را از دست دادند، روش‌های ازدیاد برداشت استفاده می‌شوند. روش‌های اولیه و ثانویه تولید تقریباً تنها می‌توانند یک سوم نفت مخزن را تولید کنند و بیشتر از دوسوم نفت در مخزن باقی می‌ماند. روش‌های مختلف ازدیاد برداشت به روش‌های حرارتی، شیمیایی، امتزاجی و سایر روش‌ها از جمله میکروبی MEOR تقسیم‌بندی می‌شود [۴]. از حدود شصت سال پیش به میکروارگانیسم‌ها برای بهبود شرایط تولید نفت توجه شده است. در دهه ۱۹۴۰ نخستین بار زوبل^۳ نشان داد که باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفات می‌توانند سبب آزاد شدن قیر نفت از شن‌های نفتی شوند. اولین حق اختراع مربوط به نقش باکتری‌ها در آزاد کردن نفت مخزن، در سال ۱۹۴۴ ثبت شده است.

باید توجه کرد که افزایش بازده تولید با روش میکروبی برای تمام مخازن امکان‌پذیر نیست [۵]. شوری بالا (بیش از ۱۲٪)، دمای بالا (بیش از ۵۰ °C) و نفوذپذیری بسیار اندک شرایطی هستند که کاربرد ازدیاد برداشت میکروبی^۴ را دشوار می‌کنند. دو مشکل اول را شاید بتوان در آینده با یافتن سویه‌های هالوفیل و ترموفیل و یا روش‌های مهندسی ژنتیک حل کرد ولی به نظر می‌رسد که حل مشکل سوم به یک استراتژی چند مرحله‌ای و یا تلفیقی از شیوه‌های شیمیایی و بیوکاتالیتیک نیاز دارد [۶].

بدیهی است که انتخاب میکروارگانیسم، نحوه تغذیه آن، دوره افزودن مواد غذایی و اکسیژن و...، به عمق چاه، نوع نفت، مقدار آب و ساختار زمین‌شناختی مخزن بستگی دارد. در برخی موارد تجربه اجرای ازدیاد برداشت میکروبی نشان داده است که عوامل اضافه شده به مخزن در این روش

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

میکرومتر به آن افزوده شد.

استفاده از کیت گرم و میکروسکوپ برای تشخیص خلوص

جدول ۲- ترکیب محیط عناصر کم مقدار ویلسون

غلظت (g/lit)	جزء	غلظت (g/lit)	جزء
۰/۵	EDTA	۰/۰۱	CuSO ₄ .5H ₂ O
۳	MnSO ₄ .H ₂ O	۰/۰۱	AlK(SO ₄) ₂
۱	NaCl	۰/۰۱	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
۰/۱	CaCl ₂ .2H ₂ O	۰/۰۱	boric acid
۰/۱	ZnSO ₄ .7H ₂ O	۰/۰۰۵	Na ₂ SeO ₄
۰/۱	FeSO ₄ .7H ₂ O	۰/۰۰۳	NiCl ₂ .6H ₂ O

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

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

از روش‌های میکروبیولوژی اقدام به جداسازی و کشت اولیه سویه‌های باکتریایی گردید. بدین منظور ۱۰ cc از نمونه نفت خام را وارد محیط کشت مغذی نوترینت برات^۱ (NB) کرده و سپس برای مدت هفت روز در دمای ۳۷/۵ °C و دور ۱۸۰ rpm گرماگذاری شد. البته به دلیل جلوگیری از حذف ناخواسته برخی از باکتری‌ها، این فرآیند در دمای ۴۶ °C نیز تکرار گردید. چون حلالیت نفت در محیط کشت بسیار پایین بوده و همچنین بسته بودن فاز نفتی، از سورفاکتانت شیمیایی Tween80 استفاده شد، تا با کاهش کشش سطحی بین نفت و محیط کشت، باکتری‌های موجود در نفت، راحت‌تر بتوانند وارد محیط کشت شده و از آن استفاده کنند. پس از گذشت هفت روز با کدر شدن محیط، رشد باکتری کاملاً مشاهده شد.

محیط کشت اصلاح شده MMSO^۲ در پی حذف منبع ساکارز آن و اضافه کردن منابع کربنی مورد نظر، مورد استفاده قرار گرفت. از جنبه دیگر، هدف اصلی استفاده از این محیط کشت در واقع رشد باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت می‌باشد. در کشت مخلوط همزمان با رشد باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، سایر باکتری‌های موجود در محیط که دارای این توانایی نیستند نیز در حال رشد می‌باشند. بنابراین انتخاب محیط کشت بر توانایی ما در جداسازی و رشد باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت موثر می‌باشد. بنابراین با اجرای برنامه غنی‌سازی در محیط معدنی سعی در حذف باکتری‌های دیگر داشتیم. ترکیب محیط کشت اصلاح شده MMSO در جدول ۱ ارائه شده است.

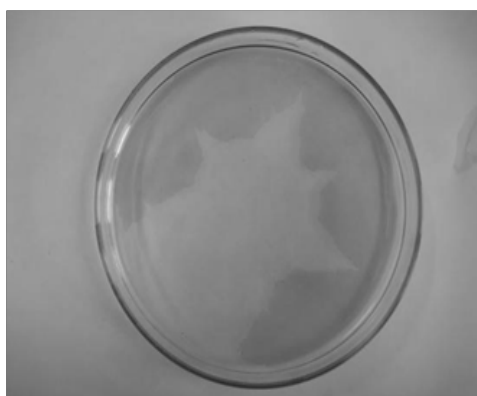
جدول ۱- ترکیب محیط کشت اصلاح شده MMSO

غلظت (g/lit)	جزء
۲/۷	KH ₂ PO ₄
۱۳/۹	K ₂ HPO ₄
۵۰	NaCl
۱/۰۰	NaNO ₃
۰/۵	Yeast Extract

پس از تهیه این محلول آن را اتوکلاو نموده و پس از سرد شدن مقدار ۱۰ cc محلول ۱۰٪ جرمی (NH₄)₂SO₄ و محلول ۲/۵ درصد جرمی MgSO₄ و محلول عناصر کم مقدار ویلسون (جدول شماره ۲)، با استفاده از فیلتر ۰/۲

1. Nutrient Broth
2. Mineral Salt Solution

درون پلیت ۱۰ cm ریخته و به آرامی ۱۰ mL نفت خام به آن اضافه گردید و اجازه داده شد به تعادل برسد. سپس حجم مناسبی از نمونه به آرامی روی آن قرار داده شد. در صورت وجود بیوسورفکتانت در نمونه تحت بررسی، نفت روی سطح پلیت جابه جا شده و به حاشیه رانده می‌شد؛ سپس قطر این منطقه اندازه‌گیری و مساحت منطقه شفاف محاسبه گردید (شکل ۴).



شکل ۴- تست جابجایی روغن بعد از اضافه کردن بیوسورفکتانت

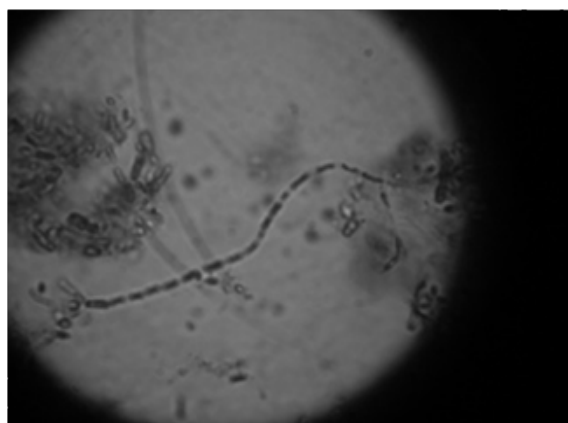
برای بررسی اثر منبع کربن از منابع مختلف کربن از جمله پنج منبع کربنی نشاسته، ملاس، سویا، آب پنیر، آب نخود استفاده شد [۱۰]، منابع کربنی به صورت کاملاً اتوکلاو به محیط کشت اصلاح شده MSSO اضافه شد (شکل ۵).



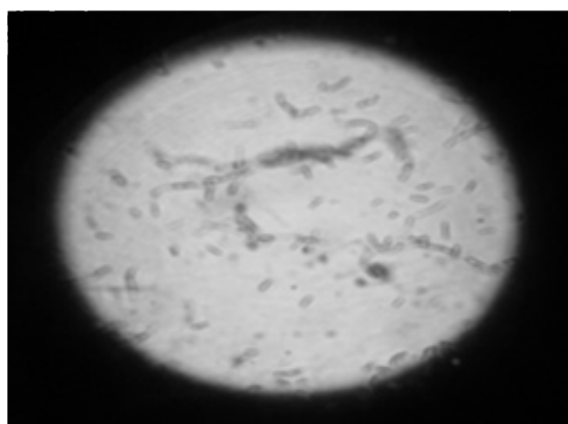
شکل ۵- اضافه کردن پنج منبع کربنی به باکتری‌های منتخب

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

1. Oil Displacement



شکل ۱- تست گرم و مشاهده جدایه ۵ زیر میکروسکوپ



شکل ۲- تست گرم و مشاهده جدایه ۷ زیر میکروسکوپ



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

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت بیوسورفکتانت از روش اندازه‌گیری میزان جابجایی روغن^۱ استفاده شد. این تست طبق روش موریکاوا و همکاران [۹] همراه با تغییرات جزئی انجام گرفت. برای این منظور ابتدا ۲۰ mL آب مقطر

جدول ۳- نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه ۵

جدایه ۵	
واکنش گرم	+
اکسیداز	-
کاتالاز	+
تشکیل لوان	+
هیدرولیز آسکولین	+
لیستیناز	-
O/F	بی‌هوازی اختیاری
هیدرولیز نشاسته	+
آرجینین دهیدرولاز	+
هیدرولیز توپین ۸۰	-
استفاده از سیترات	-
احیای نیترات	+
تولید اوره آز	+
تحرك	غير متحرك
توليد يا عدم توليد اسپور	توليد اسپور

جدول ۴- نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه ۷

جدایه ۷	
واکنش گرم	+
اکسیداز	-
کاتالاز	+
تشکیل لوان	-
هیدرولیز آسکولین	+
لیستیناز	+
O/F	بی‌هوازی اختیاری
هیدرولیز نشاسته	+
آرجینین دهیدرولاز	+
هیدرولیز توپین ۸۰	+
استفاده از سیترات	+
احیای نیترات	+
تولید اوره آز	+
تحرك	متحرك
توليد يا عدم توليد اسپور	توليد اسپور

جدول ۵- نتایج تست‌های حساسیت جدایه ۵ به آنتی‌بیوتیک‌ها

حساسیت جدایه ۵ به آنتی‌بیوتیک‌ها	
جدایه ۵	آنتی‌بیوتیک‌ها
حساس	آموکسی‌سیلین
حساس	آمپیکاسین
حساس	جنتامایسین
حساس	کانامایسین
حساس	کلرامفیکول
حساس	ونکومایسین
حساس	نیتروفوران‌توتین

اما در مورد منبع کربنی آب پنبه از روش سنتی (تهیه آب پنبه خانگی بدون اضافه کردن نمک) عمل گردید. برای تعیین میزان تحمل نمک، محیط کشت مغذی آگار حاوی غلظت‌های ۴، ۷، ۱۰ و ۱۵٪ نمک طعام تهیه و پس از اتو کلاو در پتری‌ها پخش شد. بعد از منجمد شدن محیط، ایزوله‌ها به آن تلقیح و بعد از ۱-۲ روز نگهداری در انکوباتور با دمای °C ۲۸-۲۵، رشد آنها مورد بررسی قرار گرفت [۹]. جهت به دست آوردن بهترین pH برای تولید بیوسورفکتانت و ارزیابی میزان تحمل pH های مختلف، علاوه بر pH استاندارد محیط کشت اصلاح شده MSSO که ۷/۲ بود، رشد جدایه‌ها در pH های ۴ و ۹ نیز بررسی شد [۱۱].

آزمایش لازم برای بررسی تحمل دماهای مختلف انجام گرفت. بدین صورت که جدایه‌ها را در محیط کشت اصلاح شده MSSO کشت داده و در دماهای ۲۵، ۳۷، ۴۵، ۵۵، ۶۰ و °C ۷۰ به مدت ۳ روز گرماگذاری شد [۱۲].

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

شناسایی مولکولی باکتری‌ها در بخش میکروبی‌شناسی پژوهشکده بیوتکنولوژی شیراز انجام شد. از آنجا که خصوصیات ژن 16SrRNA، روش مناسبی جهت مطالعه روابط موجود در میان گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها می‌باشد، جهت تعیین هویت مولکولی سویه منتخب تولید کننده بیوسورفکتانت، از روش 16S rRNA gene Sequencing استفاده گردید [۱۳ و ۱۴] سپس این ژن با استفاده از PCR تکثیر شد و پس از آن محصول PCR، تعیین توالی گردید. تشابه توالی 16SrRNA باکتری مورد نظر با سایر توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی که در 'NCBI قرار دارد، به کمک نرم‌افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج تست‌های بیوشیمیایی انجام شده، در جداول ۳ تا ۶ ارائه شده است.

CACCTGYTAAAACASKTARCRMTCAWMGTW
KAMGGAAMGCTGKAMTWCCGAGTGKTCAA
WCWAATAMMKTGYWGCTCAAACGMYAMR
YTTTCGCGYCKCAKWKTCAGTWWCRKACCA
GAAARTCRCMTTMGYCAMYGGKGTTCCTCM
ATATCTSTRSRCMTTTSACCGMWACWCRTGGA
ATTCCAMTTTCTCTTCYGCAYTCAAGTCTCC
CAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGT
GGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCT
GCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATAA
CGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGGCTGCT
GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGG
TACCGTCAAGGTGCCAGCTTATCAACTAGCA
CTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTACGAC
CCGGAAAGCCTTCACTACTCACGCGGGCGTT
GCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAAGA
TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
GCCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCCCGAW
YCMCCATGTCTCAGGTCGG

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

جدول ۷- مقایسه روش های تولید بیوسورفکتانت توسط منتخب

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

**رشد سلولی باکتری ها با منابع کربنی مختلف برای
تولید بیوسورفکتانت**

از بین منابع کربنی نشاسته، ملاس، سویا، آب پنیر، آب نخود، روغن زیتون و روغن کنجد که مورد بررسی قرار گرفت، سه منبع نشاسته، آب پنیر و سویا برای تولید بیوسورفکتانت مناسب بودند و در نهایت بیشترین تولید بیوسورفکتانت زمانی حاصل شد که از نشاسته به عنوان منبع کربن استفاده گردید (شکل های ۶ و ۷). البته در طول آزمایش از گلوکز به عنوان منبع کربن استاندارد و ثابت، استفاده شده است.

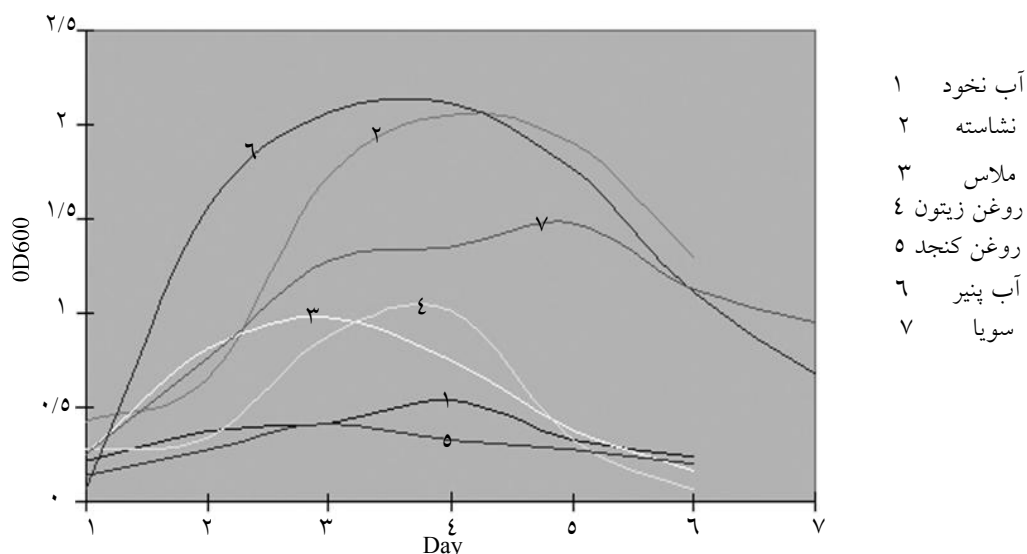
جدول ۶- نتایج تست های حساسیت جدایه ۷ به آنتی بیوتیک ها

حساسیت جدایه ۷ به آنتی بیوتیک ها	
آنتی بیوتیک ها	جدایه ۷
آموکسی سیلین	غیر حساس
آمیکاسین	حساس
جتنامایسین	حساس
کانامایسین	حساس
کلرامفیکول	حساس
ونکومایسین	حساس
نیتروفورانتوئین	حساس

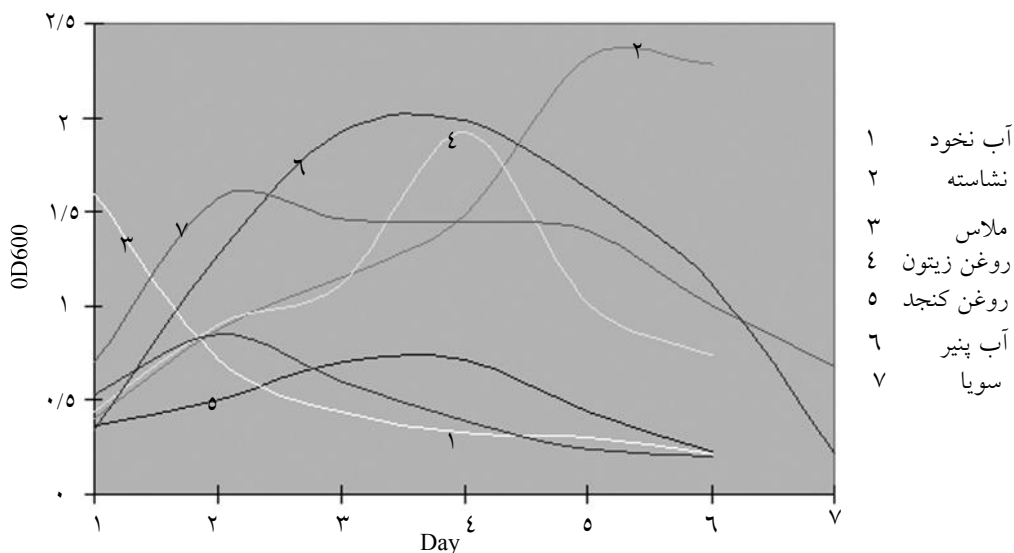
نتایج تست های مولکولی

با به دست آوردن نتایج توالی ژن، با استفاده از داده های موجود در بانک ژنی NCBI عملیات BLAST انجام گردیده و با توجه به شباهت بالای ۹۰ درصد این توالی ها با توالی 16srRNA باکتری های Bacillus Subtilis، Bacillus Licheniformis، جدایه های ۵ و ۷ به ترتیب در این ۲ گونه طبقه بندی شدند [۱۰]

یک نمونه از contig توالی های Forward و Reverse که با استفاده از نرم افزار Vector NTI ایجاد شده و مربوط به باکتری Bacillus Subtilis می باشد در زیر مشاهده می شود.
CAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTG-
CAGCCTACAATCCGAAGTGAACGGTTT-
TATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTG-
CAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGT-
GTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTG
ACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACC
GGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGAT
GGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
TGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTG
CTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTT
TCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT
CGCGTTGCTTTCGAATTAACACATGCTCCAC
CGTAACTTSWGS GTGRCCAAMMMRTCAAA
ATWMMTGTTGAGTWWMRGMSTKGMKSCCS
TMCTCCTSCAGGSKSARWRMWKRATGTMKTT
AAAYTTCRGT CAGYTAATAAKRKYGAATAG



شکل ۶- تغییرات OD باکتری *Bacillus Subtillis* با زمان برای منابع کربنی مختلف



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

نتیجه‌گیری

روش جابجایی روغن به عنوان بهترین تست برای غربالگری اولیه سویه‌های مولد بیوسورفکتانت مخصوصاً زمانی که تعداد نمونه‌ها زیاد است پیشنهاد می‌شود. به منظور افزایش دقت در انجام آزمایشات و انتخاب سویه مناسب، علاوه بر روش جابجایی روغن، از روش اندازه‌گیری کشش سطحی نیز به طور همزمان با صرف زمان و انرژی بیشتر می‌توان استفاده کرد.

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

با توجه به آزمایشات انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که روش جابجایی روغن به عنوان یک روش آسان، مورد اعتماد و بدون نیاز به دستگاه‌های ویژه قابل انجام است، یکی از مزایای این روش این است که به حجم بسیار اندکی از نمونه را برای آنالیز نیاز دارد. نکته حائز اهمیت این است که پس از نقطه بحرانی تشکیل میسل، اندازه‌گیری کشش سطحی قادر به نشان دادن افزایش بیوسورفکتانت نیست و تنها با روش جابجایی روغن می‌توان کار را دنبال کرد. بنابراین، محدوده کاربرد روش جابجایی روغن گسترده‌تر از کشش سطحی است؛ لذا

مطالعه به این نتیجه رسیدیم که شوری یا غلظت نمک، یکی از پارامترهای مهم برای تولید بیوسورفکتانت است؛ به گونه‌ای که در غیاب نمک، رشد و تولید بسیار کم است [۱۱]. از آنجایی که این باکتری‌ها، آبی می‌باشند، بالاترین فعالیت را در محیط‌های دارای نمک با غلظت ۷ تا ۹٪ نشان دادند و بهترین منبع کربن برای باکتری *Bacillus Licheniformis* و برای باکتری *Bacillus Subtillis* آب پنیر بود.

تشکر و قدردانی

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

فرآیند تولید بیوسورفکتانت به دما نیز می‌باشد. افزایش دما باعث افزایش سرعت واکنش‌های شیمیایی و تولید متابولیسم میکروبی می‌شود. داده‌های یه دست آمده نشان می‌دهد که *Bacillus Licheniformis* و *Bacillus Subtillis* در محدوده دمایی ۲۸ تا ۵۵ °C رشد بسیار سریع و خوبی داشتند و در محدوده pH ۵ تا ۹ فعالیت خوبی از خود نشان دادند. یکی از خصوصیات مهم بیشتر میکروارگانیسم‌ها وابستگی بسیار زیاد به pH برای رشد سلول و متابولیت‌های ثانویه است.

محیط کشت به میزان قابل ملاحظه‌ای بر رشد و فعالیت باسیلوس‌ها تأثیر می‌گذارد. ترکیبی از نمک‌های معدنی مختلف مانند منبع کربن، نیتروژن و نمک‌ها برای رشد بهینه و حداکثری بیوسورفکتانت مورد نیاز است. در این

مراجع

- [1] Trondheim O.S. *An Experimental Study of Viscous Surfactant Flooding for Enhanced Oil Recover*, Master Thesis, 2005.
- [2] Okpokwasili G.C., and Ibiene A.A. "Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5, No. 5, pp. 453-456, 2006.
- [3] Henson M.A. "Exploiting cellular biology to manufacture high-value products", *IEEE Control Systems Magazine*, pp. 54-62, 2006.
- [4] Myers D., *Surfactant Science and Technology*, Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2006.
- [5] Singh A., Van Hamme J.D., and Ward O.P. "Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2.", Application aspects. *Biotechnology Advances*, Vol. 25 No. 1, pp. 99-121., 2007.
- [6] Namani M. and Haghighi M., "Investigation of the Water Coning Phenomenon in Iranian Carbonate Fractured Reservoirs", SPE 108254, Presented at the International Oil Conference and Exhibition, Mexico, June 2007.
- [7] Amy P.S and Haldeman D.L., (eds), CRV Press, 356, 1997.
- [8] Neidleman S.L., and Geigert J., "Biotechnology and oleochemicals: changing patterns," *J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol. 61, pp. 290-297, 1984.
- [9] Morikawa M., daido H., Takao T., murata S., Shimonishi Y., and Imanaka T., "A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter sp. strain MIS38*," *J. Bacteriol.*, pp. 6459- 6466, 1993.
- [10] Thaniyavarn J., Chongchin A., Wanitsuksombut N., Thaniyavarn S., Pinphanichakarn P. and Leepipatpiboon N. "Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa A41* using palm oil as carbon source," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Vol. 52, pp. 215-222, 2006.
- [11] Duvnjak Z., Cooper D.G. and Kosaric N. "Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558," *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 24, pp.165-175, 1982.
- [12] Kosaric, N. "Biosurfactants in industry," *Pure and Appl. Chem.*, Vol. 64, No. 11, pp. 1731-1737, 1992.
- [13] Chandler D.P., Brockman F.J., Bailey T.J. and Fredrickson J.K., *Microb Ecol.*;36, :37-50, 1998.
- [14] Pedersen K., Arlinger J., Ekendahl S. and Hallbeck L., *FEMS Microbiol Ecol.*;19, :249-262, 1996.