

## بررسی امکان وجود باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتانت در نفت

اکرم طباطبایی\*<sup>1</sup>، دکتر مهناز مظاهری اسدی<sup>2</sup>، دکتر اشرف السادات نوحی<sup>3</sup>

- 1- کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (akram\_tabatabaee@yahoo.com)
- 2- سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران
- 3- استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

### خلاصه

در این تحقیق وجود باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتانت اثبات و مشخص شدند. نمونه های نفت مورد نظر از مخازن نفت جمع آوری شدند. جهت اثبات توانایی تولید بیوسورفکتانت در سویه های جدا شده، تستهای همولیز، امولسیفیکاسیون و اندازه گیری کشش سطحی صورت گرفت. 8 سویه قادر به کاهش کشش سطحی تا کمتر از 40 mN/m بودند. سویه 4 (باسیلوس sp.) و سویه 5 (باسیلوس sp.) و سویه 30 (کوکسی گرم منفی) به عنوان سویه های برتر تعیین شدند. همچنین، ما تاثیر pH، دما را بر تولید بیوسورفکتانت بررسی کردیم. بهترین pH بین 6/2-7/2 و بهترین دما بین 30-40 درجه سانتیگراد تعیین شد.

کلمات کلیدی: باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتانت، امولسیفیکاسیون، بیوسورفکتانت، افزایش برداشت میکروبی نفت

بیوسورفکتانتها گروه ناهمگنی از مولکولهای دارای فعالیت سطحی هستند که توسط میکروارگانیسمها تولید می شوند (Francy, D.S,etal 1991). به طور کلی ساختار بیوسورفکتانتها شامل یک بخش آبدوست و آبگریز هستند. این مولکولها کشش سطحی را در محلولهای آبی و همینطور در مخلوطهای هیدروکربنه کاهش می دهند. بیوسورفکتانتها دارای مزایای ویژه ای چون سمیت پایین و قابلیت تجزیه بیولوژیکی در محیط هستند. آنها، کاندیدای مناسبی جهت برای بسیاری از کاربردهای تجاری در صنایع دارویی، غذایی استخراج نفت هستند (Banat. I.M 1995, Jitentdra etal, 1990).

### مواد و روشها

#### کشت میکروبی:

باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتانت با اضافه کردن یک میلی لیتر از نمونه های نفتی به 99 میلی لیتر محیط SNB جداسازی شدند. تمامی کشتها بر روی شیکر به منظور تشکیل سوسپانسیون یکنواخت و جداسازی باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتانت قرار داده شدند. سپس از آنها بر روی محیط SNA کشت داده شدند و پلیتها در دمای 30 درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند (Francy, D.S,etal 1991).

#### (A) تست همولیز:

سویه های باکتریایی جدا شده جهت بررسی فعالیت همولیتیک بر روی بلاد آگار کشت داده شدند و به مدت 72 h در دمای 30 درجه گرما گذاری شدند (Flavio Correa,etal 1999).

#### (B) تست امولسیفیکاسیون (E24):

چندین کلونی از کشتهای خالص باکتریایی در لوله های آزمایش حاوی 2ml، محیط MSS کشت داده شدند سپس 2ml از هیدروکربن مورد نظر (نفت) به آنها اضافه شد به مدت یک دقیقه با سرعت بالا ورتکس شدند و به مدت 24h در دمای 30 درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. درصد امولسیفیکاسیون (E24) با توجه (Cooper&Goldenberg) تعیین شد (Goldenberg and Cooper, 1987).

درصد امولسیفیکاسیون (%) = ارتفاع لایه امولسیفای شده  $\times 100$   
ارتفاع کل ستون مایع

#### (C) اندازه گیری کشش سطحی:

1ml از مایع تلقیح باکتریها (OD<sub>600</sub>=1) به 100ml محیط MSS 1% نفت فیلتر شده (به عنوان منبع کربن) اضافه شد. کشتها به همراه نمونه های کنترل در دمای 30 درجه سانتی گراد بر روی شیکر با دور 150rpm به مدت 30 روز گرما گذاری شدند. کشش سطحی با استفاده از تنسیومتر KRUSF6 اندازه گیری شد (ABU, Ruwaida,etal, 1991).

#### (D) بررسی اثر دما و pH بر روی تولید بیوسورفکتانت:

اثر pH (9/2-4/2) و دما (50°C-25) بر روی کشش سطحی (تولید بیوسورفکتانت) با تغییر pH و دمای محیط کشت بررسی شد (Michail M. Yakimov, etal 1995).

#### نتیجه و بحث:

در طی روش غربالگری، 45 سویه باکتریایی (کوکسی، باسیل) جداسازی شدند. اولین مرحله در غربالگری باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتانت، تست همولیز است. 35 سویه دارای فعالیت بودند که جهت غربالگری بیشتر انتخاب شدند (Francy, D.S,etal 1999). 23 سویه دارای فعالیت امولسیفیکاسیون بالای 70% بودند.

در بین این سویه ها، 8 سویه قادر به کاهش کشش سطحی تا کمتر از 40 mN/m بودند. سویه 4 (باسیلوس sp.) و سویه 5 (باسیلوس sp.) و سویه 30 (کوکسی گرم منفی) به عنوان سویه های برتر تعیین شدند. (جدول 1) ماکزیم کاهش کشش سطحی در رنج pH 6/2 - 7/2 (جدول 2 و نمودار 1) و دمای 30-40°C (جدول 3 و نمودار 2) مشاهده شد. Banat و همکارانش در سال 1991 به همین نتیجه دست یافتند. همچنین AbuRuwaida و همکارانش در سال 1991 جهت تولید اپتیمم تولید بیوسورفکتانت توسط سویه ای از *Rhodococcus* به همین نتیجه دست یافتند (Prommachanetal, 2001).

### تشکر و قدردانی:

از سرکار خانم دکتر معظمی ریاست محترم سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران و آقای همزه لو مسئول آزمایشگاه شیمی دانشگاه تهران از همکاریشان در انجام این پروژه متشکرم.

### منابع:

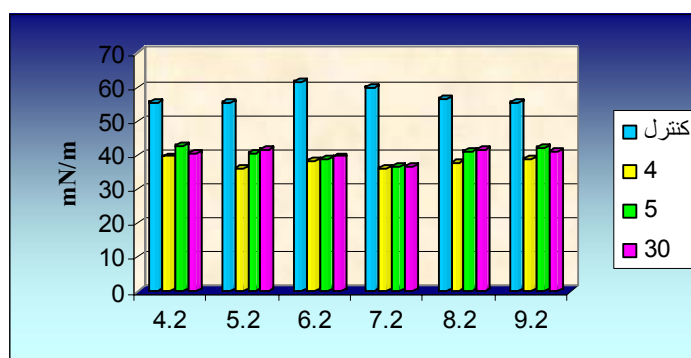
- 1-ABU-Ruwaida, A.S, Banat, .M, Haditirto, S.Salem, A.Kadri (1991) Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria product characterization and Evaluation. Acta
- 2-Adria A. Bodour, Claudia Gerrero- Barajas, M.Maier (2004) Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. Applied and Environmental Microbiology. 10(6) 1114-120.
- 3- Banat. I.M. (1995) Biosurfactant production and possible uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: review. Bioresource Technology 51: 1-12.
- 4-David G. Cooper and Goldenberg. (1987). Surface-active agents from two Bacillus species. Applied and Environmental Microbiology. pp224-229.
- 5-Fletcher A (1992).Biosurfactant moving toward industrial application.Tibtech .10: 208-217.
- 6- Francy, D.S., J.M. Thomas, R.L. Raymond and C.H. Ward. (1991).Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. Journal of Industrial Microbiology, 8: 237-246.
- 7- Flavio Correa Bicca, Leonardo Colombo Fleck, Marco Antonio Zachio (1999).Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. Rev. Microbiol. 30 (3).
- 8-HEF-Sik Kim, B. Young – Dae yoon, Chung-Ho Lee, Hyun-hyo suh, HEF- Mock oh, Tohoru Katsuragi and Yoshiki Tani (1997) Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. Journal of Fermentation and Bioengineering., 84(1) 41-46.
- 9- Jitendra D. Desai, Anjana j. Desai,(1990) Production of Biosurfactants, 66-9 2.
- 10- Michail M. Yakimov, Kenneth , Timmis, Victor Wray, Herbert L.Fredrickson (1995) Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Applied Environmental Microbiology. pp: 1706-1713
- 11- Prommachan, O., H-Kittikun and Kawai, F. (2001). Production of biosurfactant from Bacillus MUV4. The Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Bio Thailand: From Research to Market. , 7-10, Bangkok, Thailand. Chapter 1

جدول شماره (1) کشش سطحی بهترین سویه های جداشده از نفت

سویه های باکتریایی	کشش سطحی (mN/m)
1	39
2	37/8
4	36
5	36/6
10	39/6
18	38/4
25	37/2
30	36/6

جدول شماره (2) تاثیر PH های مختلف بر تولید بیوسورفکتانت

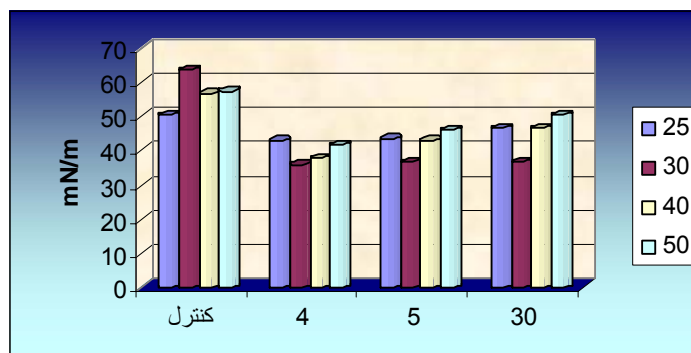
pH / سویه ها	4/2	5/2	6/2	7/2	8/2	9/2
کنترل	55/44	55/44	61/74	60	56/7	55/44
4	39/69	39/06	38/43	36	39/06	42/21
5	42/84	40/32	39/06	36/6	40/95	41/58
30	40/32	41/58	39/69	36/6	41/58	37/8



نمودار (1) \_ تاثیر PH های مختلف بر تولید بیوسورفکتانت

جدول شماره (3) تاثیر دماهای مختلف بر تولید بیوسورفکتانت

دما / سویه ها	25	30	40	50
کنترل	50/4	63/6	56/7	57/33
4	42/84	36	37/8	41/58
5	43/47	36/6	42/84	45/99
30	46/62	36/6	46/62	50/4



نمودار (2) \_ تاثیر دما های مختلف بر تولید بیوسورفکتانت