





دانشکده مهندسی شیمی

گروه بیوتکنولوژی

بررسی امکان تولید بیوسورفکتانت از گونه سودوموناس

دانشجو:

حسین شهامی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته مهندسی شیمی گرایش بیوتکنولوژی

استاد راهنما:

دکتر فرشته نعیم پور

خرداد ماه ۱۳۸۶

چکیده

سورفکتانتها مواد فعال سطحی هستند که توانایی کاهش کشش سطحی، امولسیون کنندگی، قدرت شویندگی، قابلیت ترکنندگی و کف کنندگی را دارا می‌باشند. بیوسورفکتانتها، سورفکتانت‌های تولید شده توسط میکروارگانیسمها، بدلیل زیست‌تخریب‌پذیر بودن، سمیت کمتر و مؤثرتر بودن در فرآیند زیست‌درمانی، همواره مورد توجه بوده‌اند. رامنولیپیدها از مهمترین بیوسورفکتانتها بشمار می‌آیند که توسط سوشهای مختلفی از باکتری سودوموناس آئروجینوزا تولید می‌گردد. در این پروژه چهار سوش ۱۰۷۴، ۱۵۹۹، ۱۴۳۰ و ۱۳۱۰ از باکتری فوق، موجود در کلکسیون میکروبی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران بمنظور شناسایی سوش برتر مولد بیوسورفکتانت، مورد بررسی قرار گرفته و فعالیت سطحی و توانایی امولسیون کنندگی آنها ارزیابی شد.

بررسیهای اولیه نشان داد که هر چهار سوش به تست فعالیت همولیتیک پاسخ مثبت می‌دهند. همه سوشها قادر به رشد در محیط کشت با منبع کربنی گلوکز بوده ولی مشخص شد که میزان رشد گونه ۱۵۹۹ حدوداً نصف سوشهای دیگر می‌باشد. قطر منطقه شفاف در تکنیک گسترش روغن بعنوان معیاری در بیوسورفکتانت تولید شده برای سوشهای ۱۳۱۰، ۱۰۷۴ و ۱۴۳۰ بترتیب برابر ۲۵، ۱۲ و ۸ سانتیمتر بدست آمد. خاصیت امولسیون کنندگی گازوئیل فقط در سوش ۱۳۱۰ و بمقدار ۷۵٪ مشاهده گردید. سوش ۱۵۹۹ تنها گونه‌ای بود که هیچگونه فعالیت سطحی از خود نشان نداد. لذا سوش ۱۳۱۰، بعنوان سوش برتر مولد بیوسورفکتانت در بین باکتریهای تست شده شناسایی گردید.

منبع نیترات با غلظت ۵ گرم بر لیتر بعنوان منبع نیتروژنی برتر نسبت به آمونیوم و اوره برای سوش ۱۳۱۰ بر مبنای غلظت مناسب گلوکز (۲۰ گرم بر لیتر) شناسایی گردید. منابع روغنی شامل روغن زیتون، روغن آفتابگردان، روغن سویا و گلیسرول بعنوان منبع کربن در محیط کشت تولید بیوسورفکتانت برای هر چهار باکتری استفاده گردید و مشاهده گردید که سوش ۱۳۱۰ بهترین تولید کننده با قطر منطقه شفاف ۴۰ سانتیمتر می‌باشد.

از روش تاگوچی برای طراحی محیط کشت بهینه سوش ۱۳۱۰ استفاده گردید و اثرات غلظتهای منابع گلوکز، نیترات سدیم، فسفات (KH_2PO_4 و K_2HPO_4) و سولفات آهن مورد بررسی قرار گرفت. نهایتاً جواب روش تاگوچی بترتیب ۲۰، ۱، ۲، ۳ و ۰/۰۲ گرم بر لیتر بدست آمد. این جواب مورد آزمایش قرار گرفت و توانست قطر منطقه شفاف به میزان ۲۰ سانتیمتر را ایجاد کند.

| | |
|----------|--------------------|
| ۱ | فصل ۱ مقدمه |
| ۲ | ۱-۱. مقدمه..... |

| | |
|----------|--|
| ۶ | فصل ۲ سورفکتانتها، کشش سطحی و امولسیون کنندگی |
| ۷ | ۱-۲. مقدمه..... |
| ۹ | ۲-۲. مفهوم کشش سطحی..... |
| ۱۱ | ۳-۲. سورفکتانتها عامل کاهش کشش سطحی و بین سطحی..... |
| ۱۴ | ۴-۲. مایسلها..... |
| ۱۶ | ۱-۴-۲. غلظت بحرانی مایسل..... |
| ۱۹ | ۵-۲. دیگر اثرات مفید سورفکتانتها..... |
| ۱۹ | ۱-۵-۲. اثر مرطوب کنندگی..... |
| ۲۱ | ۲-۵-۲. اثر امولسیون کنندگی..... |
| ۲۲ | ۳-۵-۲. اثر کف کنندگی..... |
| ۲۳ | ۴-۵-۲. اثر پاک کنندگی..... |
| ۲۴ | ۶-۲. پایداری امولسیون..... |
| ۲۴ | ۷-۲. معیار HLB..... |
| ۲۵ | ۸-۲. سورفکتانت و لزجت..... |
| ۲۵ | ۹-۲. کشش سطحی و موینگی..... |
| ۲۶ | ۱۰-۲. طبقه بندی کلی سورفکتانتها..... |
| ۲۷ | ۱-۱۰-۲. سورفکتانتهای غیر یونی..... |
| ۲۷ | ۲-۱۰-۲. سورفکتانتهای یونی..... |
| ۲۹ | ۱۱-۲. اندازه گیری کشش سطحی..... |
| ۲۹ | ۱-۱۱-۲. حلقه تنسیومتر دونوی..... |
| ۳۱ | ۲-۱۱-۲. صفحه تنسیومتر ویلهلمی..... |
| ۳۲ | ۳-۱۱-۲. آنالیز قطره در حال چرخش..... |
| ۳۳ | ۴-۱۱-۲. آنالیز قطره در حال افتادن..... |

| | |
|-----------|--|
| ۳۶ | فصل ۳ بیوسورفکتانتها |
| ۳۷ | ۱-۳. مقدمه..... |
| ۳۷ | ۲-۳. مزیت های بیوسورفکتانتها..... |
| ۳۹ | ۳-۳. میکروارگانسیم های مولد بیوسورفکتانت..... |
| ۴۰ | ۴-۳. سودوموناس آئرو جینوزا..... |
| ۴۰ | ۱-۴-۳. شکل و رنگ آمیزی..... |
| ۴۱ | ۲-۴-۳. فیزیولوژی..... |
| ۴۲ | ۵-۳. دسته بندی بیوسورفکتانتها و مشخصات آنها..... |
| ۴۳ | ۱-۵-۳. گلیکولیپیدها..... |
| ۴۴ | ۲-۵-۳. رامنولیپیدها..... |
| ۴۷ | ۳-۵-۳. ترهالولیپیدها..... |
| ۴۷ | ۴-۵-۳. سوفورولیپیدها..... |
| ۴۹ | ۵-۵-۳. لیپوپتیدها و لیپوپروتئین ها..... |

- ۵۰-۳-۵. اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و لیپیدهای خنثی.....
- ۵۱-۳-۷. بیوسورفکتانت‌های پلیمریک.....
- ۵۳-۳-۸. بیوسورفکتانت‌های خاص.....
- ۵۳-۳-۶. دسته‌بندی بیوسورفکتانت‌ها براساس وزن مولکولی.....
- ۵۴-۳-۷. شناسایی میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت.....
- ۵۵-۳-۷-۱. تست فعالیت همولیتیک.....
- ۵۶-۳-۷-۲. تکنیک فروپاشی قطره.....
- ۵۷-۳-۷-۳. تکنیک گسترش روغن.....
- ۵۸-۳-۸. مقایسه سه تکنیک شناسایی باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت.....

۶۱

فصل ۴ تولید بیوسورفکتانت

- ۶۲-۴-۱. بیوستز بیوسورفکتانت‌ها.....
- ۶۴-۴-۱-۱. تولید انواع بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی.....
- ۶۶-۴-۲. سینتیک تولید بیوسورفکتانت.....
- ۶۶-۴-۲-۱. تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم در ضمن رشد.....
- ۶۷-۴-۲-۲. تولید بیوسورفکتانت در شرایط محدود کننده رشد.....
- ۶۷-۴-۲-۳. تولید بیوسورفکتانت توسط سلول‌های در حال استراحت.....
- ۶۸-۴-۳. تولید رامنولیپید از منابع روغنی.....
- ۶۹-۴-۴. تولید رامنولیپید از باکتری جهش یافته.....
- ۶۹-۴-۵. بررسی اثر دما و pH بر روی بیوسورفکتانت.....
- ۷۱-۴-۶. حضور بیوسورفکتانت در غشاء سلولی.....
- ۷۲-۴-۷. استفاده از آب پنیر بعنوان منبع کربن.....
- ۷۲-۴-۸. بررسی منبع نیتروژن.....
- ۷۴-۴-۹. بررسی میزان حساسیت رامنولیپیدها نسبت به تغییرات pH.....
- ۷۵-۴-۱۰. استفاده از روغن‌های خوراکی سوخته در تولید رامنولیپید.....
- ۷۵-۴-۱۱. خالص‌سازی بیوسورفکتانت رامنولیپید.....
- ۷۶-۴-۱۲. آنالیز بیوسورفکتانت رامنولیپید.....

۷۸

فصل ۵ کاربردهای بیوسورفکتانت‌ها

- ۷۹-۵-۱. مقدمه.....
- ۷۹-۵-۲. بیوسورفکتانت‌ها و تجزیه زیستی.....
- ۸۱-۵-۳. بیوسورفکتانت‌ها و پاکسازی تانک‌های ذخیره نفت.....
- ۸۲-۵-۴. بیوسورفکتانت‌ها و ازدیاد برداشت میکروبی نفت (MEOR).....
- ۸۴-۵-۵. بیوسورفکتانت‌ها و استفاده در کشاورزی.....
- ۸۴-۵-۶. استفاده از بیوسورفکتانت‌ها در معدن کاری.....
- ۸۵-۵-۷. بیوسورفکتانت‌ها و مراقبت‌های فردی.....
- ۸۶-۵-۸. بیوسورفکتانت‌ها و صنایع غذایی.....
- ۸۶-۵-۹. بررسی مکانیسم زیست‌درمانی در باکتری‌ها.....
- ۸۷-۵-۱۰. بررسی زمان لازم در فرآیند زیست‌درمانی توسط بیوسورفکتانت.....

۸۹

فصل ۶ مواد و روشها

- ۹۰-۶-۱. میکروارگانیسم‌ها و شرایط نگهداری.....
- ۹۱-۶-۲. محیط‌های کشت جامد.....
- ۹۱-۶-۲-۱. محیط کشت نوترینت آگار.....
- ۹۲-۶-۲-۲. محیط کشت بلاد آگار.....

| | |
|-----|---|
| ۹۳ | ۳-۶. محیط‌های کشت مایع |
| ۹۳ | ۳-۶-۱. محیط کشت مایه تلقیح لوریا-برتانی |
| ۹۴ | ۳-۶-۲. محیط کشت پایه (نمکی) تولید بیوسورفکتانت |
| ۹۵ | ۳-۶-۴. تهیه مایه تلقیح |
| ۹۵ | ۳-۶-۵. منابع کربنی |
| ۹۶ | ۳-۶-۶. تهیه محیط کشت تولید بیوسورفکتانت و تلقیح به آن |
| ۹۷ | ۳-۶-۷. دستگاهها |
| ۱۰۰ | ۳-۶-۸. نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌ها برای آنالیز |
| ۱۰۰ | ۳-۶-۹. تعیین وزن خشک توده سلولی |
| ۱۰۳ | ۳-۶-۱۰. اندازه گیری کشش سطحی |
| ۱۰۴ | ۳-۶-۱۱. سنجش کمی بیوسورفکتانت با استفاده از تکنیک گسترش روغن |
| ۱۰۷ | ۳-۶-۱۲. تعیین میزان امولسیون کنندگی |
| ۱۰۸ | ۳-۶-۱۳. تست گلوکز |
| ۱۰۸ | ۳-۶-۱۳-۱. روش انجام آزمایش |
| ۱۰۹ | ۳-۶-۱۴. آزمایشهای انجام شده |
| ۱۰۹ | ۳-۶-۱۴-۱. آزمایشهای مربوط به غربالگری میکروارگانیسرها به روش تعیین فعالیت همولیتیک |
| | ۳-۶-۱۴-۲. آزمایشهای مربوط به مقایسه منحنیهای رشد و تولید بیوسورفکتانت برای چهار سوش مورد نظر بر روی محیط حاوی گلوکز |
| ۱۱۰ | ۳-۶-۱۴-۳. بررسی اثر غلظتهای مختلف گلوکز بر تولید بیوسورفکتانت برای سوش ۱۳۱۰ |
| ۱۱۱ | ۳-۶-۱۴-۴. بررسی اثر منابع متفاوت نیتروژن بر تولید بیوسورفکتانت برای سوش ۱۳۱۰ |
| ۱۱۱ | ۳-۶-۱۴-۵. بررسی اثر غلظت منبع نیترات بر تولید بیوسورفکتانت برای سوش ۱۳۱۰ |
| ۱۱۱ | ۳-۶-۱۴-۶. بررسی اثر روغنهای خوراکی بعنوان منبع کربن بر تولید بیوسورفکتانت برای هر چهار سوش مورد نظر |
| ۱۱۲ | ۳-۶-۱۴-۷. استفاده از روش تاگوچی در طراحی محیط کشت برای سوش ۱۳۱۰ |

۱۱۳

فصل ۷ نتایج و بحث

| | |
|-----|---|
| ۱۱۴ | ۷-۱. مقدمه |
| ۱۱۴ | ۷-۲. غربالگری به روش تعیین فعالیت همولیتیک |
| ۱۱۶ | ۷-۳. مقایسه منحنیهای رشد و تولید بیوسورفکتانت برای چهار سوش مورد نظر بر روی محیط حاوی گلوکز |
| ۱۱۸ | ۷-۳-۱. بررسی میزان بیوسورفکتانت تولید شده در طول رشد |
| ۱۲۱ | ۷-۳-۲. بررسی میزان فعالیت سطحی در طول رشد |
| ۱۲۳ | ۷-۳-۳. ارتباط میان کاهش کشش سطحی و قطر تکنیک گسترش روغن جهت بدست آوردن نقطه CMC |
| ۱۲۷ | ۷-۳-۴. بررسی توانایی امولسیون کنندگی در طول رشد |
| ۱۳۰ | ۷-۴. بررسی اثر غلظت گلوکز بر تولید بیوسورفکتانت و توانایی امولسیون کنندگی توسط سوش ۱۳۱۰ |
| ۱۳۴ | ۷-۵. بررسی اثر منابع متفاوت نیتروژن بر تولید بیوسورفکتانت |
| ۱۳۶ | ۷-۶. بررسی اثر غلظت منبع نیترات |
| ۱۳۷ | ۷-۷. بررسی اثر روغنهای خوراکی بعنوان منبع کربنی بر تولید بیوسورفکتانت |
| ۱۴۰ | ۷-۸. استفاده از روش تاگوچی در طراحی محیط کشت |
| ۱۴۵ | ۷-۸-۱. آنالیز داده ها بدون استفاده از نرم افزار (روش دستی) |

۱۴۹

فصل ۸ جمع بندی و پیشنهادات

| | |
|-----|----------------|
| ۱۵۰ | ۸-۱. جمع بندی |
| ۱۵۱ | ۸-۲. پیشنهادات |

۱۵۲

پیوست الف

۱۶۵

۱۶۹

۱۷۷

پیوست ب

پیوست ج

مراجع

| | |
|-----------|--|
| ۱ | فصل ۱ مقدمه |
| ۴ | شکل ۱-۱. بازار مصرف سورفکتانتهای شیمیایی..... |
| ۶ | فصل ۲ سورفکتانتهای، کشش سطحی و امولسیون کنندگی |
| ۷ | شکل ۲-۱. ارتباط بین آب و روغن در حضور سورفکتانت..... |
| ۹ | شکل ۲-۲. مدل ملکول سورفکتانت..... |
| ۹ | شکل ۲-۳. ساختار مسطح و سه بعدی سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات..... |
| ۱۰ | شکل ۲-۴. وضعیت متفاوت ملکولهای سطحی نسبت به ملکولهای درون یک مایع..... |
| ۱۲ | شکل ۲-۵. مدلی برای بیان دلیل کاهش کشش سطحی توسط سورفکتانتهای..... |
| ۱۳ | شکل ۲-۶. مقایسه کاهش کشش بین سطحی آب و روغن پارافین با اضافه کردن نمکهای سدیم اسیدهای چرب با گروه آب گریزی که تعداد اتمهای کربن آن متفاوت می باشد..... |
| ۱۵ | شکل ۲-۷. دو راه برای پایدار شدن ملکولهای سورفکتانت در آب..... |
| ۱۵ | شکل ۲-۸. حالتیهای مختلف تشکیل مایسل..... |
| ۱۶ | شکل ۲-۹. روند کاهش کشش سطحی آب با افزایش غلظت سورفکتانت در آن..... |
| ۱۷ | شکل ۲-۱۰. ارتباط بین تغییر غلظت سورفکتانت و رفتار آن (مفهوم CMC)..... |
| ۱۸ | شکل ۲-۱۱. پایداری دینامیکی ملکولهای سورفکتانت..... |
| ۲۱ | شکل ۲-۱۲. نیروهای وارد بر یک قطره (روی سطح جامد)..... |
| ۲۲ | شکل ۲-۱۳. اثر امولسیون کنندگی سورفکتانتهای (راست- گازوییل در آب بدون حضور سورفکتانت، چپ- گازوییل در آب با حضور سورفکتانت)..... |
| ۲۲ | شکل ۲-۱۴. اثر کف کنندگی سورفکتانتهای..... |
| ۲۳ | شکل ۲-۱۵. ارتباط بین کشش سطحی، امولسیون کنندگی و پاک کنندگی با تغییر غلظت سورفکتانت..... |
| ۲۵ | شکل ۲-۱۶. کشش سطحی و موینگی..... |
| ۲۷ | شکل ۲-۱۷. مثالی از یک سورفکتانت غیر یونی..... |
| ۲۷ | شکل ۲-۱۸. مثالی از یک سورفکتانت آنیونیک..... |
| ۲۸ | شکل ۲-۱۹. مثالی از یک سورفکتانت کاتیونیک..... |
| ۲۸ | شکل ۲-۲۰. مثالی از یک سورفکتانت خنثی..... |
| ۳۰ | شکل ۲-۲۱. حلقه تنسیومتر دونوی..... |
| ۳۰ | شکل ۲-۲۲. روند تغییرات نیرو در اندازه گیری کشش سطحی توسط حلقه تنسیومتر دونوی..... |
| ۳۱ | شکل ۲-۲۳. صفحه تنسیومتر ویلهلمی..... |
| ۳۲ | شکل ۲-۲۴. قطره در حال چرخش..... |
| ۳۲ | شکل ۲-۲۵. آنالیز قطره در حال چرخش..... |
| ۳۵ | شکل ۲-۲۶. آنالیز قطره در حال افتادن..... |
| ۳۵ | شکل ۲-۲۷. تجهیزات مورد استفاده در آنالیز قطره در حال افتادن..... |
| ۳۶ | فصل ۳ بیوسورفکتانتهای |
| ۴۱ | شکل ۳-۱. رنگ آمیزی گرم سلولهای سودوموناس آئروجینوزا..... |

- شکل ۳-۲. کلونی مربوط به سودوموناس آئروجینوزا بر روی آگار ۴۱
- شکل ۳-۳. ساختار رامنولیپید نوع اول تا چهارم تولیدی توسط *P. aeruginosa* ۴۵
- شکل ۳-۴. ساختار رامنولیپید نوع A و B تولیدی توسط *P. aeruginosa* ۴۵
- شکل ۳-۵. مسیر متابولیکی تولید رامنولیپید ۴۶
- شکل ۳-۶. بیوسورفکتانت ترهالوز دی‌مایکولات توسط باکتری *R. erythropolis* ۴۷
- شکل ۳-۷. بیوسورفکتانت سوفولیپید توسط باکتری *T. bombicola* ۴۸
- شکل ۳-۸. بیوسورفکتانت سورفکتین توسط باکتری *B. subtilis* ۵۰
- شکل ۳-۹. بیوسورفکتانت فسفاتیدل اتانول آمین تولیدی توسط گونه‌ای از باکتری *Acinetobacter* (R_2 R_1) ۵۱
- شکل ۳-۱۰. ساختار بیوسورفکتانت امولسان تولیدی توسط باکتری *A. calcoaceticus* ۵۲
- شکل ۳-۱۱. فعالیت همولیتیک چهار باکتری بر روی بلاداآگار ۵۶
- شکل ۳-۱۲. مایع بالای سانتریفیوژ باکتری *P. aeruginosa* روی سطح روغنی (چپ- قطره پخش شده). آب مقطر روی سطح روغنی (راست- قطره پخش نشده) ۵۷
- شکل ۳-۱۳. تکنیک گسترش روغن (راست- بدون حضور بیوسورفکتانت، چپ- مایع بالای سانتریفیوژ باکتری *P. aeruginosa*) ۵۸

فصل ۴ تولید بیوسورفکتانت

- شکل ۴-۱. سینتیک تولید بیوسورفکتانت: (A) تولید توسط میکروارگانیسیمهای در حال رشد، (B) تولید در شرایط محدود کننده رشد، (C) تولید توسط سلولهای در حال استراحت ۶۷
- شکل ۴-۲. میزان توانایی امولسیون کنندگی بیوسورفکتانت‌های بدست آمده از روغنهای بومی برزیل ۶۸
- شکل ۴-۳. اثر تغییرات pH بر توانایی امولسیون کنندگی بیوسورفکتانت ۷۰
- شکل ۴-۴. اثر منبع نیتروژن بر تولید رامنولیپید ۷۳
- شکل ۴-۵. بازده رامنولیپید تولیدی نسبت به توده سلولی و سوسترا ۷۳
- شکل ۴-۶. تغییر ساختار رامنولیپید نسبت به تغییرات pH ۷۴
- شکل ۴-۷. پیکهای اسپکترومتری جرمی برای آنالیز رامنولیپید خالص شده ۷۷

فصل ۵ کاربردهای بیوسورفکتانتها

- شکل ۵-۱. چهار مکانیسم مورد استفاده باکتری برای مصرف آلاینده PAH ۸۷
- شکل ۵-۲. تاسیسات مورد استفاده در فرآیند زیست‌درمانی خاک آلوده توسط بیوسورفکتانت ۸۸

فصل ۶ مواد و روشها

- شکل ۶-۱. چهار سوش از باکتری *P. aeruginosa* تهیه شده از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران (از چپ به راست- PTCC ۱۰۷۴، PTCC ۱۵۹۹، PTCC ۱۳۱۰، PTCC ۱۴۳۰ و PTCC ۱۴۳۰) ۹۰
- شکل ۶-۲. اسپکتروفوتومتر ۹۸
- شکل ۶-۳. شیکر انکوباتور ۹۸
- شکل ۶-۴. سانتریفیوژ ۹۹
- شکل ۶-۵. ورتکس میکسر ۹۹
- شکل ۶-۶. انکوباتور ۹۹
- شکل ۶-۷. اتوکلاو ۱۰۰
- شکل ۶-۸. منحنی استاندارد وزن خشک سلول سوش ۱۳۱۰ ۱۰۱

- شکل ۶-۹. منحنی استاندارد وزن خشک سلول سوش ۱۰۷۴ ۱۰۲
- شکل ۶-۱۰. منحنی استاندارد وزن خشک سلول سوش ۱۴۳۰ ۱۰۲
- شکل ۶-۱۱. منحنی استاندارد وزن خشک سلول سوش ۱۵۹۹ ۱۰۳
- شکل ۶-۱۲. شماتیک دستگاه اندازه‌گیری کننده صعود مویینگی ۱۰۳
- شکل ۶-۱۳. دستگاه ساخته شده برای اندازه‌گیری صعود مویینگی ۱۰۴
- شکل ۶-۱۴. ارتباط بین قطر ناحیه شفاف در تکنیک گسترش روغن و غلظت بیوسورفکتانت سورفکتین ۱۰۵
- شکل ۶-۱۵. ظرف مدرج استفاده شده قبل از ریختن نفت خام بر روی سطح آب ۱۰۶
- شکل ۶-۱۶. ظرف مدرج استفاده شده با پوشش نفت خام بر روی سطح آب ۱۰۶
- شکل ۶-۱۷. ایجاد ناحیه شفاف بر روی سطح ظرف (مرکز) مدرج بعد از ریختن نمونه حاوی بیوسورفکتانت ۱۰۷

۱۱۳

فصل ۷ نتایج و بحث

- شکل ۷-۱. میزان فعالیت همولیتیک سوش ۱۴۳۰ ۱۱۵
- شکل ۷-۲. میزان فعالیت همولیتیک سوش ۱۵۹۹ ۱۱۵
- شکل ۷-۳. میزان فعالیت همولیتیک سوش ۱۰۷۴ ۱۱۵
- شکل ۷-۴. میزان فعالیت همولیتیک سوش ۱۳۱۰ ۱۱۶
- شکل ۷-۵. مقایسه منحنی رشد برای چهار سوش ۱۳۱۰، ۱۰۷۴، ۱۴۳۰ و ۱۵۹۹ ۱۱۷
- شکل ۷-۶. مقایسه تغییرات pH در طول رشد برای چهار سوش ۱۳۱۰، ۱۰۷۴، ۱۴۳۰ و ۱۵۹۹ ۱۱۸
- شکل ۷-۷. تغییر قطر منطقه شفاف در تکنیک گسترش روغن بر حسب زمان (در طول رشد سوش ۱۳۱۰) ۱۱۹
- شکل ۷-۸. تغییر قطر منطقه شفاف در تکنیک گسترش روغن بر حسب زمان (در طول رشد سوش ۱۰۷۴) ۱۲۰
- شکل ۷-۹. تغییر قطر منطقه شفاف در تکنیک گسترش روغن بر حسب زمان (در طول رشد سوش ۱۴۳۰) ۱۲۰
- شکل ۷-۱۰. ارتباط بین بیوسورفکتانت تولید شده و رشد سلول در تحقیق یوهونگ و همکارانش ۱۲۱
- شکل ۷-۱۱. تغییرات ارتفاع در صعود مویینگی برای سوش ۱۳۱۰ در طول رشد ۱۲۲
- شکل ۷-۱۲. تغییرات ارتفاع در صعود مویینگی برای سوش ۱۰۷۴ در طول رشد ۱۲۲
- شکل ۷-۱۳. تغییرات ارتفاع در صعود مویینگی برای سوش ۱۴۳۰ در طول رشد ۱۲۳
- شکل ۷-۱۴. ارتباط ارتفاع در صعود مویینگی و قطر در تکنیک گسترش روغن برای سوش ۱۳۱۰ در طول رشد ۱۲۴
- شکل ۷-۱۵. ارتباط ارتفاع در صعود مویینگی و قطر در تکنیک گسترش روغن برای سوش ۱۰۷۴ در طول رشد ۱۲۴
- شکل ۷-۱۶. ارتباط ارتفاع در صعود مویینگی و قطر در تکنیک گسترش روغن برای سوش ۱۴۳۰ در طول رشد ۱۲۵
- شکل ۷-۱۷. ارتباط بین غلظت بیوسورفکتانت تولید شده و کاهش کشش سطحی در تحقیق سانتا و همکارانش ۱۲۶
- شکل ۷-۱۸. ارتباط بین غلظت بیوسورفکتانت تولید شده و کاهش کشش سطحی در تحقیق آدریا و همکارانش ۱۲۶
- شکل ۷-۱۹. ارتباط بین غلظت سدیم دودسیل سولفات (SDS) و کاهش کشش سطحی در تحقیق آدریا و همکارانش ۱۲۷
- شکل ۷-۲۰. توانایی امولسیون کنندگی سوش ۱۳۱۰ بر حسب قطر گسترش روغن ۱۲۸
- شکل ۷-۲۱. درصد امولسیون کنندگی (گازوییل/آب) سوش ۱۳۱۰ ۱۲۸
- شکل ۷-۲۲. توانایی امولسیون کنندگی (گازوییل/آب) سوش ۱۳۱۰ (از راست به چپ- روز اول، دوم، سوم و چهارم) ۱۲۹
- شکل ۷-۲۳. میزان امولسیون کنندگی (نفت/آب) توسط بیوسورفکتانت تولید شده از *P. aeruginosa* در تحقیق راشدی و همکارانش ۱۲۹
- شکل ۷-۲۴. میزان امولسیون کنندگی (گازوییل/آب) و (کروسن/آب) توسط بیوسورفکتانت تولید شده از *P. aeruginosa* در تحقیق یوهونگ و همکارانش ۱۳۰

- شکل ۷-۲۵. تغییرات دانسیته نوری، قطر گسترش روغن، درصد امولسیفیکاسیون و غلظت گلوکز برحسب زمان برای سوش ۱۳۱۰ در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز..... ۱۳۱
- شکل ۷-۲۶. تغییرات دانسیته نوری، قطر گسترش روغن، درصد امولسیفیکاسیون و غلظت گلوکز برحسب زمان برای سوش ۱۳۱۰ در غلظت ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز ۱۳۱۰..... ۱۳۲
- شکل ۷-۲۷. تغییرات دانسیته نوری، قطر گسترش روغن، درصد امولسیفیکاسیون و غلظت گلوکز برحسب زمان برای سوش ۱۳۱۰ در غلظت ۳۰ گرم بر لیتر گلوکز ۱۳۱۰..... ۱۳۲
- شکل ۷-۲۸. تغییرات دانسیته نوری، قطر گسترش روغن، درصد امولسیفیکاسیون و غلظت گلوکز برحسب زمان برای سوش ۱۳۱۰ در غلظت ۴۰ گرم بر لیتر گلوکز ۱۳۱۰..... ۱۳۳
- شکل ۷-۲۹. مقایسه تغییرات قطر منطقه شفاف در تکنیک گسترش روغن برحسب زمان برای غلظتهای مختلف از گلوکز برحسب گرم بر لیتر (سوش ۱۳۱۰)..... ۱۳۳
- شکل ۷-۳۰. مقایسه میزان امولسیون کنندگی (گازوئیل/آب) توسط سوش ۱۳۱۰ برحسب زمان در غلظتهای مختلف از گلوکز برحسب گرم بر لیتر..... ۱۳۴
- شکل ۷-۳۱. اثر منابع متفاوت نیتروژن بر تولید بیوسورکتانت و میزان امولسیون کنندگی توسط سوش ۱۳۱۰..... ۱۳۵
- شکل ۷-۳۲. اثر منابع متفاوت نیتروژن بر تولید بیوسورفکتانت توسط *P. aeruginosa* در تحقیق سانتا و همکارانش..... ۱۳۶
- شکل ۷-۳۳. اثر غلظتهای متفاوت از منبع نیترات بر تولید بیوسورفکتانت و میزان امولسیون کنندگی سوش ۱۳۱۰..... ۱۳۷
- شکل ۷-۳۴. تاثیر روغن زیتون بر میزان بیوسورفکتانت تولید شده توسط سوشهای مختلف..... ۱۳۸
- شکل ۷-۳۵. تاثیر روغن سویا بر میزان بیوسورفکتانت تولید شده توسط سوشهای مختلف..... ۱۳۹
- شکل ۷-۳۶. تاثیر روغن آفتاب گردان بر میزان بیوسورفکتانت تولید شده توسط سوشهای مختلف..... ۱۳۹
- شکل ۷-۳۷. تاثیر گلیسرول بر میزان بیوسورفکتانت تولید شده توسط سوشهای مختلف..... ۱۴۰
- شکل ۷-۳۸. منحنی های جواب تاگوچی (خروجی نرم افزار WinRobust)..... ۱۴۳

| صفحه | عنوان |
|------|---|
| ۱ | فصل ۱ مقدمه |
| ۶ | فصل ۲ سورفکتانتها، کشش سطحی و امولسیون کنندگی |
| ۱۲ | جدول ۱-۲. مثالهایی از کشش سطحی مایعات |
| ۱۲ | جدول ۲-۲. مثالهایی از کاهش کشش سطحی آب توسط مواد شیمیایی مختلف |
| ۱۹ | جدول ۳-۲. مثالهایی از مقادیر واقعی CMC به همراه روشهای اندازه گیری آن برای چند سورفکتانت |
| ۳۶ | فصل ۳ بیوسورفکتانتها |
| ۳۹ | جدول ۱-۳. گونه های باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت |
| ۳۹ | جدول ۲-۳. قارچهای تولید کننده بیوسورفکتانت |
| ۴۳ | جدول ۳-۳. انواع میکروارگانیسمهای مولد بیوسورفکتانت به همراه نوع بیوسورفکتانت |
| ۵۴ | جدول ۴-۳. دسته بندی بیوسورفکتانتها بر اساس وزن ملکولی |
| ۵۹ | جدول ۵-۳. مقایسه تکنیکهای شناسایی باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتانت (۲۰۵ باکتری آزمایش شده) |
| ۵۹ | جدول ۶-۳. تنوع میکروارگانیسمهای مورد استفاده در مقایسه تکنیکهای شناسایی میکروارگانیسمهای تولید کننده بیوسورفکتانت |
| ۵۹ | جدول ۷-۳. میزان همبستگی بین تکنیکها و کشش سطحی |
| ۶۱ | فصل ۴ تولید بیوسورفکتانت |
| ۶۴ | جدول ۱-۴. اطلاعات مربوط به بیوسورفکتانتهای گلیکولیپیدی |
| ۶۵ | جدول ۲-۴. ویژگیهای بیوسورفکتانتهای گلیکولیپیدی |
| ۶۶ | جدول ۳-۴. سنتز آنزیمی بیوسورفکتانتهای گلیکولیپیدی |
| ۶۸ | جدول ۴-۴. مقدار و خواص رامنولیپید بدست آمده از روغنهای بومی برزیل |
| ۶۹ | جدول ۵-۴. مقایسه میزان رامنولیپید تولیدی توسط باکتری مادر و باکتری جهش یافته |
| ۷۰ | جدول ۶-۴. اثر تغییرات دما بر توانایی امولسیون کنندگی بیوسورفکتانت |
| ۷۰ | جدول ۷-۴. توانایی امولسیون کنندگی |
| ۷۱ | جدول ۸-۴. توانایی امولسیون کنندگی در دو حالت با سلول و بدون حضور سلول |
| ۷۲ | جدول ۹-۴. مقادیر کشش سطحی بدست آمده در مدت زمان ۷۲ ساعت (کشت پیوسته) |
| ۷۵ | جدول ۱۰-۴. میزان فعالیت سطحی باکتری <i>P. aeruginosa</i> رشد کرده بر روی روغنهای خوراکی سوخته |
| ۷۸ | فصل ۵ کاربردهای بیوسورفکتانتها |
| ۸۸ | جدول ۱-۵. خواص خاک و آلاینده ها در چاههای زیست درمانی |
| ۸۹ | فصل ۶ مواد و روشها |
| ۹۱ | جدول ۱-۶. ترکیبات محیط کشت نوترینت آگار |
| ۹۲ | جدول ۲-۶. ترکیبات محیط کشت بلاد آگار |
| ۹۳ | جدول ۳-۶. ترکیبات محیط کشت مایه تلقیح L.B (استاندارد Difco) |

| | |
|---|----|
| جدول ۶-۴. محیط کشت پایه تولید بیوسورفکتانت..... | ۹۴ |
| جدول ۶-۵. عناصر کم مقدار..... | ۹۵ |
| جدول ۶-۶. منابع کربنی..... | ۹۶ |

۱۱۳

فصل ۷ نتایج و بحث

| | |
|---|-----|
| جدول ۷-۱. نتایج بررسی فعالیت همولیتک..... | ۱۱۶ |
| جدول ۷-۲. پارامترها و سطوح استفاده شده در روش تاگوچی..... | ۱۴۱ |
| جدول ۷-۳. متغیرها و سطوح آن در آزمایشهای تاگوچی..... | ۱۴۱ |
| جدول ۷-۴. نتایج آزمایشهای روش تاگوچی..... | ۱۴۳ |
| جدول ۷-۵. جدول جواب تاگوچی (خروجی نرم افزار WinRobust)..... | ۱۴۴ |
| جدول ۷-۶. جواب نهایی روش تاگوچی..... | ۱۴۴ |

فصل ۱

مقدمه

۱-۱. مقدمه

سورفکتانتها^۱ یا مواد فعال سطحی^۲، ملکولهایی دوگانه دوست هستند که دارای یک بخش هیدروفیلیک (آبدوست) و یک بخش هیدروفوبیک (آبگریز) می‌باشند. بخش آبگریز عمدتاً شامل یک زنجیر هیدروکربنی می‌باشد، اما بخش آبدوست تنوع فراوانی دارد. این ملکولها به علت دوقطبی بودن، تمایل به قرار گرفتن در سطح مشترک بین مایع و هوا و یا سطح مشترک بین مایعات با درجه قطبیت و باندهای هیدروژنی مختلف (مانند آب/نفت)، دارند. تشکیل چنین فیلم ملکولی منظمی در سطح مشترک، سبب کاهش انرژی سطحی و بین سطحی (کشش سطحی و بین سطحی) شده، که ویژگی منحصر به فرد ملکولهای سورفکتانت می‌باشد. سورفکتانتها کاربردهای زیادی دارند که این کاربردها به واسطه توانایی‌های آنها در کاهش کشش سطحی، افزایش حلالیت، قدرت شویندگی، قابلیت ترکنندگی و کف‌کنندگی می‌باشند. میزان موثر بودن یک سورفکتانت با توانایی آن در کاهش کشش سطحی، که همان انرژی مورد نیاز برای افزایش سطح مایع به میزان یک واحد می‌باشد، تعیین می‌گردد. به واسطه وجود سورفکتانت کار کمتری برای آوردن یک ملکول از درون مایع به سطح مورد نیاز می‌باشد و به این ترتیب کشش سطحی نیز کاهش می‌یابد. به عنوان مثال، یک سورفکتانت خوب می‌تواند میزان کشش سطحی آب را از 72 mN/m به 35 mN/m کاهش دهد. انتخاب سورفکتانتها بر مبنای هزینه‌های تولید صورت می‌پذیرد. به طور کلی سورفکتانتها برای صرفه‌جویی در مصرف انرژی و هزینه‌های مربوط به آن (همچون انرژی لازم برای پمپ کردن) مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. سورفکتانتها بواسطه خاصیت دوقطبی، قادر به حرکت دادن آلاینده‌ها در خاک می‌باشند و بهمین دلیل نیز در فرآیند پاکسازی خاک آلوده بکار می‌روند و لذا بازار سورفکتانتها برای استفاده از آنها در

فرآیند زیست‌درمانی محل‌های آلوده در حال توسعه روز افزون می‌باشد. سورفکتانتها در افزایش زدایش فلزات نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲،۳].

سورفکتانت‌هایی که به صورت بیولوژیکی توسط موجودات زنده تولید می‌گردند تحت عنوان بیوسورفکتانت نامیده می‌شوند. بیوسورفکتانتها بصورت خارج سلولی و یا بعنوان بخشی از غشاء سلولی توسط باکتریها، قارچها و مخمرها تولید می‌گردند [۴].

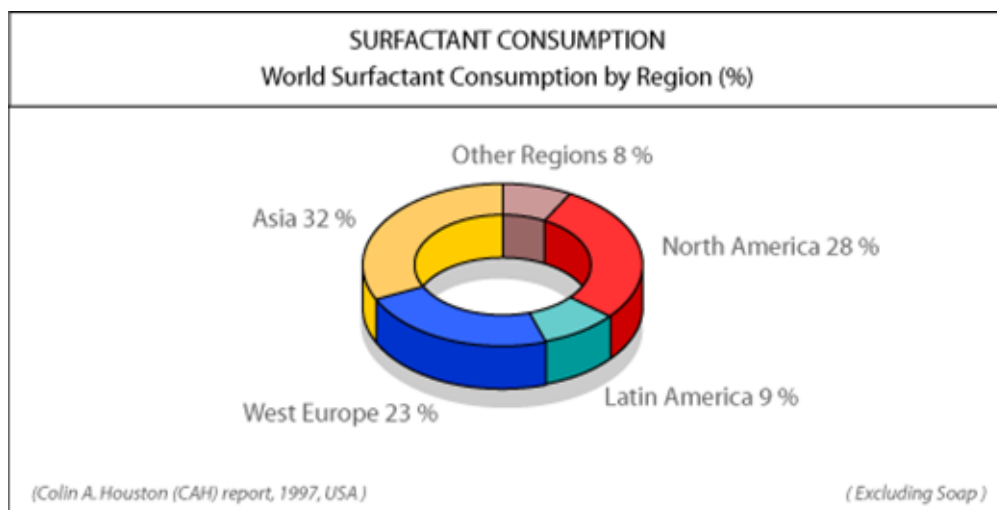
تقاضای زیادی که برای سورفکتانتها وجود دارد، عمدتاً بوسیله سورفکتانت‌های شیمیایی برآورده می‌گردد، شکل (۱-۱). در حالیکه این ترکیبات علاوه بر سمیت بالا، تجزیه‌پذیر نیز نمی‌باشند با توجه به انباشته شدن آنها در محیط و زیان بخش بودن فرآیندهای تولید آنها و محصولات جانبی‌شان برای محیط زیست، بیوسورفکتانتها به عنوان جانشینی مناسب برای آنها مورد توجه قرار گرفته‌اند.

صنعت نفت از عمده‌ترین بازار برای بیوسورفکتانتها محسوب می‌گردد. از کاربردهای بیوسورفکتانتها که مرتبط با صنایع نفتی می‌باشد می‌توان به تجزیه کردن و پراکنده ساختن لکه‌های نفتی در آب و دریا، زدایش و پاک نمودن لجن نفتی از تانکهای ذخیره نفت، تسهیل بازیافت و جابه جایی و انتقال نفت خام در خطوط لوله به واسطه کاهش ویسکوزیته نفت سنگین و ازدیاد برداشت نفت، اشاره نمود. در فرآیند ازدیاد برداشت میکروبی نفت (MEOR) میکروارگانیسمهای موجود در مخزن برای تولید سورفکتانتها تحریک شده و با تولید این مواد کشش بین سطحی در سطح مشترک بین نفت و سنگ بستر کاهش یافته و استخراج نفت تسهیل می‌گردد [۴].

Bioremediation

Glycolipids

Microbial Enhanced Oil Recovery



شکل ۱-۱. بازار مصرف سورفکتانت‌های شیمیایی^۱

این ترکیبات باعث کاهش نیروی موینگی گردیده و تسهیل حرکت نفت در بین منافذ مخزن را ممکن می‌سازند. علاوه بر کم کردن کشش سطحی توسط بیوسورفکتانتها، اثراتی همچون تجمع بیوماس و مسدود نمودن منافذ و تجزیه ملکولهای هیدروکربنی درشت نفت از دیگر عوامل کاهش ویسکوزیته نفت و تسهیل استخراج آن می‌باشند.

بیوسورفکتانتها در صنایع رنگ، آبکاری، نساجی، پاکسازی فلزات، معدن کاری، غذایی، آرایشی، پراکنده‌ساز کودها و آفت کشها در کشاورزی، کاربرد وسیعی دارند. بیوسورفکتانتها در فرآیند شستشوی خاکهای آلوده و افزایش میزان تخریب بیولوژیکی آلاینده‌ها نقش بسیار مهمی را ایفا می‌نمایند [۵].

P. aeruginosa یکی از میکروارگانیسمهای مطرح در تولید بیوسورفکتانتها می‌باشد. در این تحقیق به بررسی و مقایسه عملکرد چهار سوش سودوموناس گرفته شده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران از نظر رشد و تولید بیوسورفکتانت پرداخته می‌شود. سورفکتانتها در فصل دوم این تحقیق معرفی شده و به بررسی عملکرد سورفکتانتها در کاهش کشش سطحی و نحوه امولسیون کنندگی و دیگر اثرات مفید یک سورفکتانت، پرداخته شده و ضمن

دسته‌بندی سورفکتانتها، مفاهیم پایه و مهم مربوطه نظیر غلظت بحرانی مایسل به‌مراه روشهای اندازه‌گیری کشش سطحی شرح داده شده است. در فصل سوم، ضمن معرفی بیوسورفکتانتها و مقایسه آنها با سورفکتانتهای شیمیایی و بیان مزیت‌های آنها، دسته‌بندی بیوسورفکتانتها و میکروارگانیزم‌های معروف تولید کننده در هر دسته و هم‌ینطور تکنیک‌های شناسایی این میکروارگانیزم‌ها بررسی شده است. بررسی تولید بیوسورفکتانتها با تمرکز بر رامنولیپیدها موضوع فصل چهارم می‌باشد. ضمن آنکه اثر دما و pH و حساسیت رامنولیپید نسبت به تغییرات pH و خالص‌سازی و آنالیز این بیوسورفکتانت نیز در این فصل بررسی شده است. در فصل پنجم کاربردهای بیوسورفکتانتها بیان گردیده است. مواد و روشهای مورد استفاده در فصل ششم و نتایج و بحث در فصل هفتم آورده شده است. در فصل هشتم به جمع‌بندی و ارائه پیشنهادات پرداخته شده است. جهت تکمیل مطالب سه پیوست در انتهای این تحقیق گنجانده شده است.

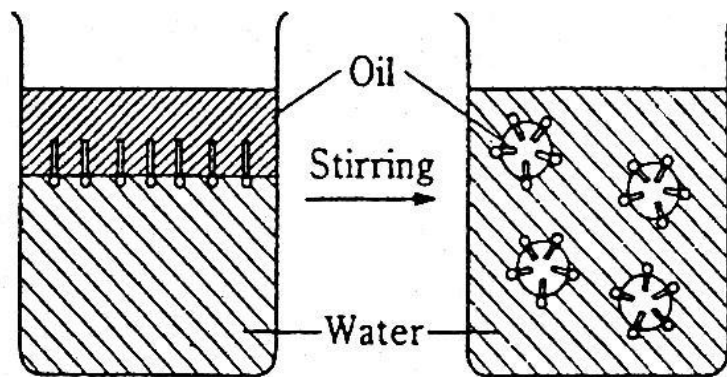
فصل ۲

سورفکتانتها، کشش سطحی و
امولسیون کنندگی

۱-۲. مقدمه

می‌دانیم زمانیکه آب و روغن در یک بشر کنار یکدیگر نگهداری شوند، به دو لایه (فاز) مجزا از یکدیگر تقسیم می‌شوند. آب و روغن در ناحیه فصل مشترک یعنی جاییکه لایه بالایی را روغن و لایه پایینی را آب تشکیل می‌دهد، با یکدیگر در تماس هستند. زمانیکه بشدت محتوای بشر را بهم بزنیم آب و روغن بطور موقت با یکدیگر مخلوط می‌شوند اما بسرعت به دو لایه اصلی خود تفکیک شده و از یکدیگر جدا می‌شوند [۱].

اگر مقدار کمی سورفکتانت (که در صابون و یا دترجنتهای شیمیایی یافت می‌شوند) به مخلوط آب و روغن اضافه و مجدداً بهم زده شود، روغن بصورت ذرات بسیار ریزی (شیری رنگ) درون فاز آب پخش می‌گردد که به این پدیده امولسیون شونده می‌گویند، شکل (۱-۲) [۱].



شکل ۱-۲. ارتباط بین آب و روغن در حضور سورفکتانت [۱]