بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده مهندسی شیمی

بررسی امکان تولید بیوسورفاکتانت بوسیله گونه‌های میکروبی جدا شده از خاک‌های آلوده‌نفتی

دانشجو:

سعید امجدی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی‌ارشد

در رشته مهندسی‌شیمی گرایش بیوتکنولوژی

خردادماه ۱۳۸۶

دانشکده مهندسی شیمی

بررسی امکان تولید بیوسورفاکتانت بوسیله گونه‌های میکروبی جدا شده از خاک‌های آلوده‌نفتی

دانشجو:

سعید امجدی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی‌ارشد

در رشته مهندسی‌شیمی گرایش بیوتکنولوژی

استاد راهنما:

دکتر فرشته نعیم‌پور

خردادماه ۱۳۸۶

تقدیم به:

پدر و مادر مهربانم که موفقیت امروز من، حاصل تلاش و پشتیبانی همیشگی آنهاست.

همسر عزیزم که بهترین مشوق ادامه تحصیل و همواره یار و یاورم بوده است.

تنها گل زندگیم خانم زهرای دوست‌داشتنی و عزیزتر از جانم.

تشکر و قدردانی:

بر خود لازم می‌دانم از تمامی عزیزانی که اینجانب را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

از سرکار خانم دکتر نعیم‌پور استاد گرامی که راهنمائی این پایان‌نامه را پذیرفته و باعث شدند تا به نحو مطلوب زحمات اینجانب به نتیجه برسد، نهایت سپاسگزاری را دارم.

چکیده

سورفاکتانت‌ها مواد فعال سطحی می‌باشند که در صنایع مختلف از جمله آرایشی و بهداشتی، کاغذسازی، رنگ‌سازی، غذایی، نفت و نساجی کاربرد دارند. امروزه به کمک زیست‌فناوری گروه جدیدی از مواد فعال‌سطحی که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند، معرفی شده‌اند که اصطلاحا بیوسورفاکتانت نامیده می‌شوند و دامنه گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های تولیدکننده این ترکیبات دوقطبی که قادر به کاهش کشش‌سطحی می‌باشند، شناسایی شده‌اند. بیوسورفاکتانت‌ها نسبت به انواع شیمیایی خود، مزیت‌های بسیاری از جمله سمیّت کمتر، تخریب‌زیستی آسان‌تر و سریعتر، تنوع بیشتر، سازگاری بهتر با محیط‌زیست، قدرت تولید کف بالا و توانایی سنتز از منابع ارزان‌قیمت و تجدیدشدنی دارند.

در این پژوهش ابتدا از خاک‌های آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها تحت شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال و در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های تجزیه کننده نفت قرار داده شدند. به این ترتیب غنی‌سازی و بعد از آن جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه صورت گرفت. بمنظور بررسی توانایی تولید بیوسورفاکتانت توسط میکروارگانیسم‌های جداشده، روشهای مختلفی مانند بررسی فعالیت همولیتیک، روش فروپاشی قطره، تکنیک گسترش‌روغن، فعالیت امولسیفیکاسیون و اندازه‌گیری کشش‌سطحی مورد استفاده قرار گرفتند.

از نمونه‌های خاک تهیه‌شده، ۱۷ سویه جدا و خالص‌سازی شد که در ۹ سویه حداقل دو تست غربالگری بیوسورفاکتانت مثبت بود. ۳ مورد از این ۹ سویه قادر به بیشترین کاهش کشش‌سطحی بعنوان بهترین معیار تولید بیوسورفاکتانت بودند که از میان آنها با توجه به نتایج تست‌های دیگر غربالگری، سویه $GS_1(2)$ بعنوان بهترین سویه تولیدکننده بیوسورفاکتانت انتخاب شد. کشت این سویه در محیط نمک‌های معدنی محتوی ۲٪ گلوکز بعنوان منبع کربن، باعث کاهش کشش‌سطحی محیط کشت از ۷۵ mN/m به ۳۵ mN/m می‌گردد. میزان بیوسورفاکتانت تولیدی نیز ۱/۲۴ گرم بر لیتر و وزن خشک توده سلولی بدست آمده ۲/۴۷ گرم بر لیتر می‌باشد. در انتها با استفاده از روش آماری تاگوچی، تاثیر مقادیر مختلف اجزای محیط کشت از جمله گلوکز، نیترات، فسفات، آهن و گازوئیل بر تولید محصول بررسی شد.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفاکتانت، خاک، جداسازی و انتخاب میکروارگانیسم‌ها، کشش‌سطحی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل۱ مقدمه ۱

فصل۲ بیوسورفاکتانت‌ها - کلیات ۴

۲-۱. مقدمه ۵

۲-۲. بیوسورفاکتانت‌ها ۸

۲-۳. کاربردهای تجارتی بیوسورفاکتانت‌ها ۱۳

۲-۳-۱. کاربرد بیوسورفاکتانت‌ها در صنایع نفت ۱۳

۲-۳-۲. کاربردهای زیست محیطی بیوسورفاکتانت‌ها ۱۷

۲-۳-۳. کاربرد بیوسورفاکتانت‌ها در صنایع‌غذایی ۱۸

۲-۳-۴. کاربرد بیوسورفاکتانت‌ها در صنایع آرایشی و بهداشتی ۱۸

۲-۳-۵. کاربرد بیوسورفاکتانت‌ها در پزشکی و بعنوان عوامل درمانی ۱۹

۲-۳-۶. کاربرد بیوسورفاکتانت‌ها در کشاورزی ۲۰

۲-۴. طبقه‌بندی بیوسورفاکتانت‌ها ۲۱

۲-۴-۱. گلیکولیپیدها ۲۳

۲-۴-۲. فسفولیپیدها و اسیدهای چرب ۲۹

۲-۴-۳. لیپوپپتیدها و لیپوپروتئین‌ها ۳۰

۲-۴-۴. بیوسورفاکتانت‌های پلیمری ۳۳

۲-۴-۵. بیوسورفاکتانت‌های خاص ۳۵

۲-۵. نقش فیزیولوژیک بیوسورفاکتانت‌ها ۳۶

۲-۶. سنتز بیوسورفاکتانت‌ها ۳۷

۲-۷. عوامل موثر بر تولید بیوسورفاکتانت‌ها ۳۹

۲-۷-۱. منبع کربن ۳۹

۲-۷-۲. منبع نیتروژن ۴۳

۲-۷-۳. فاکتورهای محیطی ۴۵

۲-۸. مکانیزم‌های تنظیم تولید بیوسورفاکتانت ۵۰

۲-۸-۱. القاء ۵۱

۲-۸-۲. بازدارندگی ۵۱

۲-۸-۳. اثر نیتروژن و یون‌های فلزات ۵۲

۲-۹. تولید بیوسورفاکتانت بوسیله میکروارگانیسم‌ها ۵۳

۲-۹-۱. وابستگی تولید بیوسورفاکتانت‌ها به رشد سلولی ۵۳

۲-۹-۲. تولید در صورت فراهم شدن پیش سازها ۵۶

۲-۹-۳. تولید تحت تاثیر غیر مستقیم فاکتورهای مختلف ۵۷

۲-۹-۴. تولید بیوسورفاکتانت از طریق بیوترانسفورماسیون ۵۷

۲-۹-۵. تولید بیوسورفاکتانت در شرایط دشوار ۵۸
۲-۱۰. استخراج و بازیافت بیوسورفاکتانت‌ها ۶۰
۲-۱۱. روشهای شناسایی بیوسورفاکتانتها ۶۰
۲-۱۲. مقایسه روشهای شناسایی بیوسورفاکتانت‌ها ۶۴

فصل۳ خاک و جداسازی میکروارگانیسم‌های آن ۶۷
۳-۱. خاک و اجزای تشکیل‌دهنده آن ۶۸
۳-۲. اکولوژی میکروارگانیسم‌ها ۶۹
۳-۲-۱. اکولوژی میکروارگانیسم‌ها در گیاهان عالی ۷۰
۳-۲-۲. پراکنش میکروارگانیسم‌ها در خاک ۷۱
۳-۳. تأثیر عوامل محیطی بر میکروارگانیسم‌ها ۷۲
۳-۳-۱. عوامل فیزیکی ۷۲
۳-۳-۲. عوامل شیمیایی ۷۴
۳-۳-۳. تاثیر دیگر موجودات زنده ۷۴
۳-۴. میکروارگانیسم‌های موجود در خاک ۷۵
۳-۴-۱. باکتری‌ها ۷۵
۳-۴-۲. قارچ‌ها ۸۰
۳-۴-۳. جلبک‌ها ۸۱
۳-۴-۴. پروتوزوئرها ۸۲
۳-۴-۵. ویروسها ۸۳
۳-۵. تغذیه میکرو ارگانیسم‌ها ۸۳
۳-۵-۱. عناصر ضروری محیط کشت ۸۳
۳-۵-۲. تغذیه گروه‌های مختلف باکتری‌ها ۸۴
۳-۶. میکروارگانیسم‌ها و چرخه‌های بیو شیمیایی ۸۴
۳-۶-۱. چرخه کربن ۸۵
۳-۶-۲. چرخه ازت ۸۶
۳-۶-۳. تغییر و تبدیل سایر عناصر ۸۷
۳-۷. هیدروکربن‌ها و تجزیه بیولوژیکی آنها ۸۸
۳-۷-۱. هیدروکربن‌های خاک ۸۸
۳-۷-۲. هیدروکربن‌های سنگین خاک ۸۹
۳-۸. جداسازی و انتخاب میکروارگانیسم‌های بومی ۹۰
۳-۸-۱. مراحل‌کلی جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی ۹۱
۳-۸-۲. جداسازی و انتخاب میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفاکتانت ۹۳
۳-۸-۳. مروری بر جداسازی‌های انجام‌شده ۹۳

فصل۴ مواد و روشها ۹۹
۴-۱. مواد و محیط کشت‌های مورد استفاده ۱۰۰

۴-۱-۱. محیط نمک‌های معدنی مایع ۱۰۰
۴-۱-۲. محیط نمک‌های معدنی جامد ۱۰۳
۴-۱-۳. محیط مایع LB ۱۰۳
۴-۱-۴. محیط جامد نوترینت آگار ۱۰۴
۴-۱-۵. محیط کشت جامد بلاد آگار ۱۰۵
۴-۲. وسایل مورد استفاده ۱۰۵
۴-۲-۱. هود بیولوژیکی ۱۰۶
۴-۲-۲. انکوباتور ۱۰۶
۴-۲-۳. اسپکتوفترومتر ۱۰۶
۴-۲-۴. سانتریفوژ ۱۰۷
۴-۲-۵. اتوکلاو ۱۰۷
۴-۲-۶.pH متر ۱۰۷
۴-۲-۷. ورتکس میکسر ۱۰۸
۴-۲-۸. ترازو ۱۰۸
۴-۳. نمونه‌برداری ۱۰۸
۴-۳-۱. نقاط نمونه برداری ۱۰۸
۴-۳-۲. نمونه‌برداری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ۱۰۹
۴-۴. غنی‌سازی نمونه‌های جمع‌آوری شده ۱۰۹
۴-۵. جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها ۱۱۰
۴-۶. غربالگری گونه‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت ۱۱۲
۴-۶-۱. بررسی فعالیت همولیتیک ۱۱۲
۴-۶-۲. روش فروپاشی قطره ۱۱۳
۴-۶-۳. تکنیک گسترش روغن ۱۱۴
۴-۶-۴. اندازه‌گیری کشش‌سطحی ۱۱۶
۴-۶-۵. بررسی فعالیت امولسیفیکاسیون ۱۲۰
۴-۷. انتخاب مناسب‌ترین سویه ۱۲۱
۴-۸. رشد سویه انتخاب شده ۱۲۲
۴-۸-۱. محاسبه وزن خشک سلولی ۱۲۲
۴-۸-۲. اندازه‌گیری مقدار سوبسترای باقیمانده ۱۲۳
۴-۸-۳. محاسبه غلظت بیوسورفاکتانت تولیدی ۱۲۴
۴-۹. بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت ۱۲۴

فصل۵ نتایج و بحث **۱۳۰**
۵-۱. آزمایشات اولیه برای انتخاب میکروارگانیسم‌ها ۱۳۱
۵-۲. انتخاب بهترین سویه ۱۳۱
۵-۳. بررسی رشد سویه $GS_1(2)$ ۱۳۴
۵-۳-۱. رشد سلولی ۱۳۴

۵-۳-۲. وزن خشک سلولی ۱۳۵
۵-۳-۳. تغییرات pH محیط کشت ۱۳۷
۵-۳-۴. تغییرات کشش‌سطحی محیط کشت ۱۳۸
۵-۳-۵. تغییرات فعالیت امولسیفیکاسیون محیط کشت ۱۳۹
۵-۳-۶. تعیین مقدار بیوسورفاکتانت تولیدشده ۱۴۰
۵-۳-۷. غلظت بحرانی مایسل (CMC) ۱۴۱
۵-۳-۸. بررسی وابستگی تولید به رشد سلولی ۱۴۱
۵-۴. نتایج بهینه‌سازی محیط کشت بر اساس روش تاگوچی ۱۴۳
۵-۵. تجزیه و تحلیل نتایج تاگوچی ۱۴۵
۵-۵-۱. تعیین شرایط بهینه اجزای محیط کشت ۱۴۵
۵-۵-۲. تحلیل واریانس نتایج تاگوچی ۱۴۶

فصل۶ جمع‌بندی و پیشنهادات **۱۵۰**
۶-۱. جمع‌بندی ۱۵۱
۶-۲. پیشنهادات ۱۵۲

پیوست **۱۵۴**

مراجع و مآخذ **۱۶۰**

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۲-۱. تشکیل مایسل کروی در محلول‌های آبی ۱۰
شکل۲-۲. ارتباط بین خواص فیزیکی و غلظت سورفاکتانت ۱۰
شکل۲-۳. تشکیل قطرات ریز بعد از اختلاط دو فاز انحلال‌ناپذیر، در حضور سورفاکتانت (تشکیل امولسیون) ۱۲
شکل۲-۴. ساختمان شیمیایی انواع گلیکولیپیدها ۲۴
شکل۲-۵. ساختمان چهار نوع رامنولیپید مختلف تولیدشده توسط سودوموناس آئروجینوزا ۲۶
شکل۲-۶. ساختمان شیمیایی ترهالوز دی‌مایکولات ۲۷
شکل۲-۷. ساختمان فرم‌های لاکتونی و اسیدی سوفرولیپید تولید شده توسط C.bombicola ۲۹
شکل۲-۸. ساختمان فسفاتیدیل اتانل‌آمین ۳۰
شکل۲-۹. ساختمان سورفاکتین تولیدشده توسط باسیلوس سابتیلیس ۳۱
شکل۲-۱۰. همولیز بتا یا لیزشدن گویچه‌های قرمز پستانداران ۳۲
شکل۲-۱۱. ساختمان شیمیایی امولسان ۳۴
شکل۲-۱۲. تاثیر نوع و غلظت منبع کربن روی تولید رامنولیپید بوسیله سودوموناس آئروجینوزا J4 ۴۲
شکل۲-۱۳. تاثیر منبع نیتروژن بر تولید رامنولیپید و میزان بیومس آزادشده ۴۴
شکل۲-۱۴. اثر درجه‌حرارت روی سرعت رشد ویژه و تولید بیوسورفاکتانت بوسیله سودوموناس آئروجینوزا J4 ۴۶
شکل۲-۱۵. تغییرات کشش‌سطحی و بین‌سطحی مقابل هگزادکان با تغییرات pH سوپرناتانت ۴۸
شکل۲-۱۶. تاثیر زمان انکوباسیون روی رشد سودوموناس آئروجینوزا J4، کشش‌سطحی و امولسیفیکاسیون ۴۹
شکل۲-۱۷. اثر سرعت هوادهی روی سرعت رشد ویژه و تولید رامنولیپید بوسیله سودوموناس آئروجینوزا J4 ۵۰
شکل۲-۱۸. ارتباط تولید بیوسورفاکتانت‌ها با رشد سلولی ۵۴
شکل۲-۱۹. ساختمان سوکروز مونواستر ۵۸
شکل۲-۲۰. نتیجه تست فروپاشی قطره برای شناسایی بیوسورفاکتانت‌ها ۶۳
شکل۲-۲۱. ارتباط بین قطر ناحیه شفاف بدست آمده در تکنیک گسترش‌روغن و کشش‌سطحی ۶۵
شکل۳-۱. پیگمان‌های فلوئورسین و پیوسیانین تولیدی توسط سودوموناس آئروجینوزا ۷۶
شکل۳-۲. چرخه کربن ۸۵
شکل۳-۳. چرخه ازت ۸۷
شکل۳-۴. توزیع باکتری‌های جداشده از محیط آلوده نفتی توسط رحمان و همکارانش ۹۵
شکل۴-۱. نمونه‌ای از جداسازی صورت‌گرفته ۱۱۱
شکل۴-۲. دو نمونه از خالص‌سازی سویه‌های موجود در نمونه خاک‌های شماره ۱و۲ ۱۱۱
شکل۴-۳. همولیز بتا یا وجود هاله شفاف در اطراف کلنی ۱۱۳
شکل۴-۴. نمونه‌ای از نتیجه تست فروپاشی قطره ۱۱۴
شکل۴-۵. نمونه‌ای از نتیجه تکنیک گسترش روغن ۱۱۵
شکل۴-۶. رابطه بین قطر ناحیه شفاف بدست آمده در تکنیک گسترش روغن و غلظت سورفاکتین ۱۱۶

شکل۴-۷. وسیله اندازه‌گیری کشش‌سطحی با استفاده از لوله مویین ۱۱۸
شکل۴-۸. وسیله اندازه‌گیری کشش‌سطحی در تحقیق انجام شده ۱۲۰
شکل۴-۹. تست امولسیفیکاسیون با گازوئیل ۱۲۱
شکل۴-۱۰. منحنی استاندارد وزن خشک توده سلولی نسبت به جذب نوری برای سویه $GS_1(2)$ ۱۲۳
شکل۵-۱. نتیجه آماری تست‌های غربالگری روی ۱۷ سویه جداشده ۱۳۳
شکل۵-۲. تغییرات جذب نوری محیط کشت سویه $GS_1(2)$ با زمان ۱۳۵
شکل۵-۳. تغییرات وزن خشک توده سلولی سویه $GS_1(2)$ با زمان ۱۳۵
شکل۵-۴. منحنی تغییرات pH محیط کشت سویه $GS_1(2)$ با زمان ۱۳۷
شکل۵-۵. منحنی تغییرات کشش‌سطحی محیط کشت سویه $GS_1(2)$ با زمان ۱۳۸
شکل۵-۶. منحنی تغییرات درصد امولسیفیکاسیون محیط کشت سویه $GS_1(2)$ با زمان ۱۳۹
شکل۵-۷. میزان بیوسورفاکتانت تولیدی توسط سویه $GS_1(2)$ ۱۴۰
شکل۵-۸. تغییرات کشش‌سطحی محیط کشت سویه $GS_1(2)$ با غلظت بیوسورفاکتانت ۱۴۱
شکل۵-۹. تغییرات رشد سلولی، تولید محصول و مصرف گلوکز سویه $GS_1(2)$ با زمان ۱۴۲
شکل۵-۱۰. تغییرات رشد سلولی و کاهش کشش‌سطحی سویه $GS_1(2)$ با زمان ۱۴۲
شکل۵-۱۱. منحنی ارائه شده توسط نرم افزار تاگوچی برای طراحی محیط کشت سویه $GS_1(1)$ ۱۴۳
شکل۵-۱۲. قطر ناحیه شفاف ایجاد شده برحسب غلظت‌های مختلف گلوکز در روش تاگوچی ۱۴۳
شکل۵-۱۳. قطر ناحیه شفاف ایجاد شده برحسب غلظت‌های مختلف نیترات در روش تاگوچی ۱۴۴
شکل۵-۱۴. قطر ناحیه شفاف ایجاد شده برحسب غلظت‌های مختلف فسفات در روش تاگوچی ۱۴۴
شکل۵-۱۵. قطر ناحیه شفاف ایجاد شده برحسب غلظت‌های مختلف آهن در روش تاگوچی ۱۴۵
شکل۵-۱۶. قطر ناحیه شفاف ایجاد شده برحسب درصدهای مختلف گازوئیل در روش تاگوچی ۱۴۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱. کشش بین‌سطحی چند ماده مختلف در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد ۹
جدول۲-۲. مقایسه خواص فعال‌سطحی چند سورفاکتانت میکروبی و شیمیایی ۱۱
جدول۲-۳. انواع بیوسورفاکتانت‌ها و میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آن‌ها ۲۲
جدول۲-۴. تقسیم‌بندی بیوسورفاکتانت‌ها بر اساس وزن‌مولکولی آن‌ها ۲۳
جدول۲-۵. تاثیر منابع مختلف کربن روی تولید بیوسورفاکتانت ۴۰
جدول۲-۶. تاثیر منبع کربن بر تولید رامنولیپید ۴۵
جدول۲-۷. تاثیر شرایط محیطی روی تولید بیوسورفاکتانت از طریق کاهش کشش‌سطحی ۴۷
جدول۲-۸. مقایسه روش‌های مختلف سنجش بیوسورفاکتانت‌ها ۶۵
جدول۳-۱. کشش‌سطحی محیط کشت و درصد امولسیفیکاسیون گونه‌های جداشده از خاک جنگلی برزیل ۹۷
جدول۴-۱. الف- محیط نمک‌های معدنی مورد استفاده در غنی‌سازی و جداسازی ۱۰۱
جدول۴-۱.ب- اجزای کم مقدار محیط نمک‌های معدنی مورد استفاده در غنی‌سازی و جداسازی ۱۰۱
جدول۴-۲. الف- محیط نمک‌های معدنی مورد استفاده در تولید بیوسورفاکتانت ۱۰۲
جدول۴-۲.ب- اجزای کم مقدار محیط نمک‌های معدنی مورد استفاده در تولید بیوسورفاکتانت ۱۰۲
جدول۴-۳. ترکیب اجزای محیط LB ۱۰۳
جدول۴-۴. ترکیب اجزای محیط پایه نوترینت آگار ۱۰۴
جدول۴-۵. مقایسه کشش‌سطحی واقعی و محاسبه شده با استفاده از لوله مویین برای چند ماده مختلف ۱۱۹
جدول۴-۶. متغیرها و سطوح انتخاب شده در طراحی آزمایش‌ها به روش تاگوچی ۱۲۶
جدول۴-۷. طراحی آزمایش‌ها با استفاده از روش تاگوچی ۱۲۷
جدول۵-۱. نتیجه تست‌های انجام گرفته روی کلیه سویه‌های جداشده از نمونه‌های خاک ۱۳۲
جدول۵-۲. نتیجه تست‌های غربالگری روی سویه‌های انتخابی از مرحله اول ۱۳۳
جدول۵-۳. تحلیل واریانس نتایج تاگوچی ۱۴۸
جدول ۱- پیوست. رشد سویه $GS_1(2)$ در محیط نمک‌های معدنی محتوی ۲٪ گلوکز ۱۵۵
جدول ۲- پیوست. نتایج روش تاگوچی بر اساس تست گسترش روغن ۱۵۶
جدول ۳- پیوست. جدول تغییرات وزن خشک سلولی، تولید محصول، مصرف سوبسترا و کشش‌سطحی با زمان ۱۵۷
جدول ۴- پیوست. تاثیر مقدار گلوکز بر تولید محصول در روش تاگوچی ۱۵۸
جدول ۵- پیوست. تاثیر مقدار نیترات بر تولید محصول در روش تاگوچی ۱۵۸
جدول ۶- پیوست. تاثیر مقدار فسفات بر تولید محصول در روش تاگوچی ۱۵۸
جدول ۷- پیوست. تاثیر مقدار آهن بر تولید محصول در روش تاگوچی ۱۵۹
جدول ۸- پیوست. تاثیر مقدار گازوئیل بر تولید محصول در روش تاگوچی ۱۵۹

فصل۱

مقدمه

سورفاکتانت‌ها مولکول‌های آمفی‌پاتیک[1] یا دوگانه‌دوستی می‌باشند که از دو بخش هیدروفیل یا آبدوست و هیدروفوب یا آبگریز (معمولا هیدروکربنی) تشکیل شده‌اند. این مولکول‌ها با قرار گرفتن در فصل مشترک فازهای سیالات با قطبیت‌ها و پیوندهای هیدروژنی متفاوت مانند آب – روغن و آب - هوا باعث کاهش کشش‌سطحی و بین‌سطحی و همچنین تشکیل میکرومولسیون‌هایی که ناشی از انحلال جزیی هیدروکربن در آب و یا آب در هیدروکربن می‌باشد، می‌گردند [۱].

بیوسورفاکتانت‌ها ترکیبات فعال سطحی میباشند که بوسیله میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله انواع باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. بخش هیدروفوب این ترکیبات عمدتا از جنس هیدروکربن نظیر زنجیره هیدروکربنی اسیدهای‌چرب بوده و بخش هیدروفیل آن‌ها از ترکیبات مختلفی که عمده‌ترین آنها گروه‌های الکلی، استری، اسیدهای‌چرب، فسفولیپیدها و قندها می‌باشد، را در برمی‌گیرد [۲]. از آنجایی که بیوسورفاکتانت‌ها در مقایسه با انواع شیمیایی مزیت‌هایی از قبیل سمیّت‌کمتر، تخریب‌زیستی آسان و سریع‌تر، تنوع بیشتر، کم خطر بودن برای محیط زیست و سازگاری بهتر با آن، توانایی سنتز از منابع ارزان قیمت و تجدید شدنی، امکان تولید از طریق تخمیر و کارایی بسیار خوب در دما، شوری و pH های غیرمتداول و بالا دارند، در این پروژه تولید آنها با استفاده از سویه‌های میکروبی موجود در خاک‌های آلوده نفتی مورد بررسی قرار گرفته است که به این منظور خاک‌های آلوده نفتی پالایشگاه تهران و اطراف آن انتخاب و جداسازی میکروارگانیسم‌های ساکن در این خاک‌ها بمنظور تولید بیوسورفاکتانت توسط این نوع سویه‌ها انجام شد.

در فصل دوم این پایان‌نامه کلیاتی پیرامون بیوسورفاکتانت‌ها از جمله انواع، ساختار شیمیایی و نقش فیزیولوژیکی آنها، نحوه سنتز و عوامل موثر بر تولید مانند منابع کربن، نیتروژن و فاکتورهای محیطی، مکانیزم‌های تنظیم تولید از قبیل القا و بازدارندگی، روش‌های شناسایی و تشخیص بیوسورفاکتانت‌ها و مقایسه این روشها و همچنین کاربردهای متنوع آنها بیان می‌شود. در فصل سوم اکولوژی میکروارگانیسم‌ها و یکی از مهمترین زیستگاه‌های آن‌ها یعنی خاک مورد بررسی قرار می‌گیرد. علاوه بر این، انواع میکروارگانیسم‌های خاک و تاثیر عوامل محیطی بر آنها، تغذیه میکروارگانیسم‌ها و به دنبال آن چرخه‌های بیوشیمیایی کربن و ازت توضیح داده می‌شود. در خاتمه این فصل چگونگی جداسازی میکروارگانیسم‌ها از خاک مورد بررسی قرار گرفته و تعدادی از

1 -Amphipatic

جداسازی‌های انجام شده توسط افراد مختلف و همچنین نتایج بدست آمده از این جداسازی‌ها ذکر می‌گردد. در فصل‌چهارم تحت عنوان روش‌ها و وسایل، در ابتدا مواد، محیط کشت‌ها و دستگاه‌های مورد استفاده معرفی می‌شوند سپس نحوه انجام کار که شامل نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده به نفت، غنی‌سازی نمونه‌های تهیه شده بمنظور افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های مطلوب، همچنین جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه‌های غنی‌شده و در نهایت انتخاب و غربال‌گری سویه‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت از بین میکروارگانیسم‌های جداشده می‌باشد، مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای انتخاب سویه‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت، فعالیت سطحی محیط کشت‌های آنها با استفاده از روشهایی نظیر تست همولیز بلاد آگار، تکنیک‌های فروپاشی قطره و گسترش روغن، فعالیت امولسیفیکاسیون و اندازه‌گیری کشش‌سطحی بررسی شد. در این قسمت ۱۷ سویه میکروبی از نمونه‌های جمع‌آوری شده جدا گردید که از میان آنها، نتایج تکنیک گسترش روغن در ۱۰ سویه، فعالیت همولیتیک در ۸ سویه، فعالیت امولسیفیکاسیون در ۷ سویه و تست فروپاشی قطره در ۹ سویه مثبت بود. در ادامه فصل چهارم، نحوه انتخاب بهترین سویه تولیدکننده بیوسورفاکتانت از بین سویه های جداشده، بررسی رشد و همچنین بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت سویه انتخاب شده با استفاده از یکی از روشهای کسری از فاکتوریل کامل یعنی روش تاگوچی ذکر می‌گردد. در فصل پنجم، نتایج بدست آمده از آزمایشات که بر اساس آنها ۳ سویه از ۱۷ سویه جداشده بعنوان بهترین تولیدکننده‌های بیوسورفاکتانت معرفی می‌شوند، ارائه و مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد. در فصل ششم به جمع‌بندی کارهای صورت گرفته و ارائه پیشنهاداتی برای اقدامات آتی پرداخته می‌شود.

فصل۲

بیوسورفاکتانت‌ها – کلیات

۲-۱. مقدمه

بیوسورفاکتانت‌ها که توسط میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شوند بنا به دلایلی از قبیل سمیّت‌کمتر، تخریب‌زیستی آسان‌تر و سریع‌تر، تنوع‌بیشتر، کم‌خطر بودن برای محیط‌زیست و سازگاری بهتر با آن، قدرت تولید کف بالا، توانایی سنتز از منابع ارزان‌قیمت و تجدیدشدنی، امکان تولید از طریق تخمیر، کارایی و فعالیت خوب در دما، شوری و pH های غیرمتداول و بالا و در نهایت مقرون به‌صرفه بودن تولید از جنبه اقتصادی، بر سورفاکتانت‌های شیمیایی ترجیح داده می‌شوند [۱].

خصوصیات ویژه بیوسورفاکتانت‌ها عبارتند از : کاهش کشش‌سطحی و بین‌سطحی، مرطوب‌کنندگی و تاثیر در پدیده‌های نفوذ مولکولی، پراکنش مواد توسط آنها، خصلت آب‌دوستی و چربی‌دوستی، امولسیون‌سازی، خصلت ژل‌کنندگی، تولید کف، فعالیت‌های لخته‌سازی، افزایش رشد میکروبی، جداسازی فلزات و فعالیت‌های ضدمیکروبی [۳].

از کاربردهای صنعتی بیوسورفاکتانت‌ها، استفاده در صنعت نفت بمنظور افزایش بازیافت نفت و زیست‌پالایی محیط‌های آلوده نفتی و همچنین استفاده آنها در صنایع کاغذسازی، رنگ‌سازی، نساجی، صنایع‌غذایی، آرایشی و بهداشتی می‌باشد [۳].

یکی از مهم‌ترین کاربردهای بیوسورفاکتانت‌ها در صنعت نفت می‌باشد. این ترکیبات در مقایسه با سورفاکتانت‌های شیمیایی، اختصاصی‌تر عمل کرده، در مقادیر کم، بر حجم وسیع در شرایط عمومی مخازن نفتی موثر می‌باشند. همانطورکه می‌دانیم در اثر استخراج مکرر نفت، به علت کاهش گرادیان فشار و گیر افتادن نفت در صخره‌های مخزن، حرکت نفت از عمق به سطح کاهش می‌یابد. در این گونه موارد از آنجایی‌که میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت کشش‌سطحی را کاهش داده و اتصال نفت به صخره‌ها را از بین می‌برند، آنها را به منظور افزایش بازیافت نفت به چاه‌های نفت تزریق می‌کنند. همچنین استفاده از بیوسورفاکتانت‌ها باعث کاهش ویسکوزیته نفت می‌شود که به این ترتیب انتقال نفت و پمپ‌کردن آن در لوله‌های نفتی راحت‌تر صورت می‌گیرد. کاربرد دیگر بیوسورفاکتانت‌ها

در زیست‌پالایی یا پاک‌سازی هیدروکربن‌ها و نفت از خاک‌های آلوده می‌باشد. در این راستا با استفاده از رامنولیپید تولیدشده توسط سودوموناس آئروجینوزا مقادیر زیادی نفت از خاک‌های آلوده پاک‌سازی شده است [۴].

بیوسورفاکتانت‌ها با مکانیزم‌های زیر باعث تجزیه بیولوژیکی سریع آلاینده‌ها در محیط زیست می‌شوند:

۱- رهاسازی آلاینده‌های هیدروکربنی جذب‌شده به مواد آلی.
۲- آزادکردن قطرات قرارگرفته در منافذ از طریق کاهش کشش‌سطحی.
۳- افزایش سطح تماس آلاینده‌ها برای اتصال میکروبی.

هزینه تولید بیوسورفاکتانت‌ها حدوداً ۳ تا ۱۰ برابر مشابه شیمیائی آنها می‌باشد که با طراحی و توسعه فرایندهای تخمیری، استفاده از مواد اولیه ارزان‌قیمت و افزایش تولید از طریق بکارگیری موتان‌های فعال و باکتری‌های دستکاری‌شده به روش مهندسی ژنتیک، می‌توان هزینه تولید آن‌ها را کاهش داد. براساس برآوردهای انجام‌شده حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد از هزینه‌های تولید بیوسورفاکتانت مربوط به مواد خام اولیه می‌باشد و از آنجایی که هیدروکربن‌ها بعنوان مواد خام تولید بیوسورفاکتانت‌ها معمولاً گران‌قیمت هستند، استفاده از آنها باعث بالارفتن هزینه‌های تولید می‌شود. بر طبق مطالعات انجام‌شده برای یافتن سوبستراهای ارزان‌قیمت، ضایعات و تفاله‌های صنعتی گزینه‌های مناسبی برای این کار می‌باشند که بعنوان مثال می‌توان به تولید رامنولیپید از تفاله‌های روغن ذرت توسط گونه‌های سودوموناس اشاره کرد [۱]. همچنین باکتری باسیلوس سابتلیس[1] با مصرف سیب‌زمینی که حاوی ۸۰ ٪ آب، ۱۷ ٪ کربوهیدرات، ۲ ٪ پروتئین، ۰/۱ ٪ چربی و ۰/۹ ٪ ویتامین و موادمعدنی می‌باشد و استفاده از آنزیم آلفا – آمیلاز آن، می‌تواند بیوسورفاکتانت لیپوپپتیدی تولید کند. ذکر این نکته نیز لازم است که از سیب‌زمینی چیزی در حدود ۶۰ ٪ به صورت خوراکی مورد مصرف قرار می‌گیرد و بقیه آن که غنی از نشاسته می‌باشد، دور ریز می‌شود.

امروزه تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت شناسایی شده‌اند که با بررسی خصوصیات و تغییرات ژنتیکی می‌توان از آنها جهت تولید بهینه، استفاده کرد. در این راستا

1 -*Bacillus subtilis*

بعضی از محققین سعی‌کرده‌اند با دست‌کاری شرایط فیزیولوژیکی و ترکیب محیط‌کشت، میزان تولید را افزایش دهند. تلاش‌هایی نیز با استفاده از تغییرات ژنتیکی صورت گرفته است که بر پایه آن‌ها موتان‌هائی با توان تولید غلظت‌های چند برابر بیوسورفاکتانت نسبت به سویه مادر جدا شده‌اند. بعنوان نمونه برای تغییر در سوبسترای مورد نیاز گونه‌های سودوموناس آئروجینوزا[1]، می‌توان با وارد کردن یک پلاسمید از اشیرشیاکلی، امکان تولید رامنولیپید از ضایعات کارخانجات نوشابه‌های الکلی را ممکن ساخت. با این روش، قدرت تولید بیوسورفاکتانت در یک‌باکتری را با توانائی استفاده از مواد زائد بعنوان سوبسترا در باکتری دیگر پیوند زده، می‌توان به نتیجه مطلوب در استفاده از سوبسترای ارزان‌قیمت برای تولید بیوسورفاکتانت دست یافت [۱].

پیشرفتهای زیادی در زمینه بهینه‌سازی شرایط تخمیر جهت افزایش تولید بیوسورفاکتانت صورت گرفته است. همچنین در سالهای اخیر توسعه و تکمیل روشهای غربالگری سریع و ساده برای یافتن میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت، اطلاعات ما را در زمینه خصوصیات بیوشیمیایی و ویژگیهای ژنتیکی بیوسورفاکتانت‌ها افزایش داده، ژن‌های مسئول تولید بیوسورفاکتانت‌ها نیز شناسایی شده‌اند. بنابراین می‌توان به‌کمک مهندسی ژنتیک سویه‌های میکروبی فعالی ساخت که بتوانند بیوسورفاکتانت‌های موثر را در مقادیر زیاد با استفاده از پسماندهای مختلف بعنوان سوبسترا تولید نمایند.

صنایع غذائی، آرایشی و دارویی از جمله صنایع با ارزش بالایی هستند که می‌توانند بیوسورفاکتانت‌ها را در قیمت‌های بالا نیز به مصرف برسانند. در حالیکه با توجه به هزینه بالای تخلیص بیوسورفاکتانت‌ها، این ترکیبات در صنایع نفت و پتروشیمی با حداقل خلوص مورد استفاده قرار می‌گیرند، به گونه‌ای که کل محیط کشت برای افزایش بازیافت نفت و رفع آلودگی‌های نفتی قابل استفاده می‌باشد.

صنعت تولید سورفاکتانت‌ها به سرعت در حال رشد می‌باشد. در سال ۱۹۸۹ مقدار کل سورفاکتانت تولیدشده در دنیا ۱۵۵۰۰ میلیون پوند بوده که از این مقدار، ۷۶۰۰ میلیون پوند مربوط به ایالات متحده می‌باشد و جالب این که تمامی آن به صورت شیمیایی از نفت سنتز می‌شده است [۱]. در سال

1 -*Pseudomonas aeruginosa*