دانشکده علوم‌پایه

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد(M.Sc) در رشته زیست‌شناسی

گرایش میکروبیولوژی

عنوان:

جداسازی وشناسایی باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت ازمخازن نفتی، نفت‌شهر کرمانشاه

توسط:

محمد جواد مصطفی پور

اساتید راهنما:

دکترسلمان احمدی اسب چین- دکتر طاهره ولدبیگی

شهریور۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحيم

به نام خدا

عنوان:

جداسازی وشناسایی باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت از مخازن نفتی، نفت شهر کرمانشاه

توسط:

محمد جواد مصطفی پور

پایان نامه ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

زیست شناسی-میکروبیولوژی

از دانشگاه ایلام

ایلام

جمهوری اسلامی ایران

درتاریخ ۱۳۹۱/۶/۳۱ **توسط هیأت داوران زیر ارزیابی و با درجه** ۱۹/۲۰ **به تصویب نهایی رسید.**

دکتر سلمان احمدی اسب چین، استادیار(راهنما و رئیس هیأت داوران).....

دکترطاهره ولدبیگی، استادیار (راهنما و رئیس هئیت داوران).....

دکتر آرمان رستم زاد، استادیار(داور).....

دکتر محمد جواد زارع، استادیار (داور) .....

شهریور ماه ۱۳۹۱

تقدیم به

مادرم که نخستین درس عشق و ایثار را به من آموخت

پدرم که همواره و در تمامی مراحل یاور و پشتیبانم بود

سپاسگزاری

سرما و آستان حضرت دوست　　که هر چه بر سرما می رود ارادت اوست

باحمد یکتای بی همتا و درود به رسول اکرم محمد مصطفی (ص) و عرض ادب به محضر ولی الله اعظم امام الحی و الهدی روحی له الفداء که توفیق گام نهادن در مسیری آشنا اما با نگاهی تازه را به این بنده حقیر عنایت نمودند تا آینده ای روشن تر را بتوان رقم زد. حال که به لطف پروردگار این کار به انجام رسیده بر خود لازم می دانم از کلیه سرورانی که مرا را در طول انجام این پایان نامه یاری نموده-اند تشکر و قدردانی نمایم. در ابتدا جا دارد از اساتید راهنمای فرهیخته و فرزانه ام جناب آقای دکتر سلمان احمدی اسب چین و سرکار خانم دکتر طاهره ولدبیگی که با راهنمایی های کار ساز و سازنده من را در این پایان نامه یاری دادند تقدیر و تشکر نمایم. همچنین از اساتید داور بزرگوارم جناب آقایان دکتر آرمان رستم زاد و دکتر محمد جواد زارع که داوری این پایان نامه را تقبل کردند ممنون و سپاسگزارم.

از خانواده عزیزم، برادر و خواهرانم که در تمامی دوران زندگی و در طول دوره تحصیل همواره در کنار من بودند و همچنین از دوستان خوبم حسین مرادی، پرویز حیدری، مهران فلک ناز، هادی محمدی، سعید صمدی، امین راستکو، وحید اکبرپور، جابر خالص حقیقی و همینطور از اساتید و کارشناسان آزمایشگاه های دانشکده کشاورزی و پیراپزشکی جناب آقایان دکتر نورالهی، سیفی، هوشمندفر، موسوی، فلاحی، فتاحی و خانم عباس پور که در اجرای این پایان نامه مرا یاری دادند ممنون و سپاسگزارم. باشد که این یادآوری نمایان گر سپاس بی پایان من نسبت به زحمات تمامی کسانی باشد که در این راه پر فراز و نشیب مرا یاری دادند.

محمد جواد مصطفی پور

۱۳۹۱

چکیده:

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات زیستی آمفی‌فیلیکی تولید شده بصورت خارج سلولی یا بخشی از غشاءهای سلول بوسیله انواع باکتری، مخمر و قارچ هستند که کاربرد وسیعی در حذف آلودگی‌های آلی و فلزی محیط زیست، افزایش بازیافت نفت، صنایع آرایشی، پزشکی، بهداشتی و کشاورزی دارند.هدف از این پژوهش شناسایی باکتری‌هایی بود که قابلیت به‌کارگیری در فرایند ازدیاد برداشت نفت و فعالیت‌های پزشکی را داشته باشند. در این پژوهش ۸۸ سویه باکتریایی، از نمونه‌های مختلف نفت، آب و خاک آلوده به نفت از مخازن نفتی نفت شهر کرمانشاه، بر روی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های تجزیه کننده نفت جداسازی شدند. فعالیت همولیتیک، فعالیت امولسیفیه کنندگی و اندازه‌گیری کشش سطحی به ترتیب به عنوان غربالگری اولیه و جداسازی مولدین بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفتند.بیست وچهار سویه از بین سویه‌های جداسازی شده دارای فعالیت همولیتیک بودند که از میان آنها ۱۲ سویه فعالیت امولسیفیه کنندگی بالای ۷۰ درصد داشتند و در نهایت از میان آنها ۴ سویه ۴۳، ۴۷، ۸۳ و ۸۸ قادر به رساندن کشش سطحی به کمتر از mN/m ۴۰ بودند. سویه‌های انتخابی در این پژوهش، دوسویه باکتری۴۳ و۴۷ بی‌هوازی اختیاری، گرم مثبت و میله‌ای شکل و دو سویه باکتری ۸۳ و۸۸ بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، میله‌ای و کوکوباسیلی شکل هستند که براساس تست‌های بیوشیمیایی، به ترتیب به عنوان باسیلوس سرئوس۴۳، باسیلوس پومیلیس۴۷، سودوموناس آئروژینوزا۸۳، آسینتوباکتر لوفی۸۸ شناسایی شدند. همچنین نتایج بررسی تست مقایسه‌ای سمیت نفت خام سویه‌های انتخابی همراه با سوبسترا هیدروکربن نفت نسبت به میزان رشد سویه‌ها بدون سوبسترا هیدروکربن نفت به ترتیب در سویه‌های آسینتوباکتر لوفی۸۸، باسیلوس پومیلیس۴۷، باسیلوس سرئوس۴۳ و پسودوموناس آئروژینوزا۸۳ بدست آمد. ماهیت بیوسورفکتانت‌ها با کروماتوگرافی لایه نازک[1] مشخص گردید، از نوع گلیکولیپیدی بودند. همچنین تمام بیوسورفکتانت‌های تولیدی سویه‌های انتخابی دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه شش باکتری عفونت‌زا، استافیلوکوکوس اورئوس 1112 PTCC، اشرشیاکلی PTCC 1330 ، سودوموناس آئروژینوزا PTCC 1074، استافیلوکوکوس اپیدرمیس 2405 ATCC، پروتئوس میرابیلیس ATCC 2601 و سالمونلا تیفی موریوم ATCC 1679 بودند. بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق مشاهده شده که هرچه سویه‌های باکتری امولسیون سازی بالای ۷۰ درصد وکاهش کشش سطحی زیر mN/m ۴۰ داشته باشند قادر به تولید بیوسورفکتانت، تجزیه نفت خام و دارای اثرات ضد میکروبی قوی‌تری می‌باشند.

کلمات کلیدی: بیوسورفکتانت، کشش سطحی، امولسیفیه کنندگی،گلیکولیپید، ضد باکتریایی

[1] - TLC

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فهرست مطالب.....ه

فهرست جداول.....ی

فهرست شکل‌ها ونمودارها.....ل

فصل اول(مقدمه و کلیات).....۱

۱-۱- مقدمه.....۱

۱-۲-علت انتخاب موضوع و اهداف.....۳

۱-۳- بیوسورفکتانت‌ها.....۴

۱-۳-۱-طبقه‌بندی بیوسورفکتانت‌ها.....۴

۱-۳-۱-۱- بیوسورفکتانت‌ها با وزن مولکولی کم.....۵

۱-۳-۱-۱-۱- تره‌هالولیپیدها.....۶

۱-۳-۱-۱-۲- رامنولیپیدها.....۷

۱-۳-۱-۱-۳- سوفورولیپیدها.....۱۰

۱-۳-۱-۱-۴- لیپوپپتیدها و لیپوپروتئین.....۱۱

۱-۳-۱-۱-۵- اسیدهای چرب، فسفولیپیدها، و لیپیدهای خنثی.....۱۳

۱-۳-۱-۲- بیوسورفکتانت‌ها با وزن مولکولی زیاد.....۱۴

۱-۳-۱-۳- بیوسورفکتانت‌های ویژه.....۱۶

۱-۳-۲- ژنتیک بیوسنتز برخی از بیوسورفکتانت‌ها.....۱۷

۱-۳-۲-۱-ژنتیک سنتز رامنولیپید.....۱۷

۱-۳-۲-۲- ژنتیک سنتز سورفاکتین.....۱۹

۱-۳-۳- فاکتورهای تاثیرگذار بر تولید بیوسورفکتانت.....۲۰

۱-۳-۳-۱- منبع کربن.....۲۰

۱-۳-۳-۲- منبع نیتروژن.....۲۲

۱-۳-۳-۳- فاکتورهای محیطی.....۲۳

۱-۳-۴-کنیتیک تولید تخمیری بیوسورفکتانت.....۲۴

۱-۳-۴-۱- تولید وابسته به رشد.....۲۴

۱-۳-۴-۲- تولید تحت شرایط محدودکننده رشد.....۲۴

۱-۳-۴-۳- تولید بوسیله سلول‌های در حالت استراحت و ثابت..... ۲۵
۱-۳-۴-۴- تولید با افزودن پیش ساز بیوسورفکتانت به عنوان مکمل غذایی..... ۲۶
۱-۳-۵- تولید بیوسورفاکتانت با استفاده از از سوبستراهای تجزیه پذیر..... ۲۷
۱-۳-۵-۱- پساب کارخانه زیتون..... ۲۷
۱-۳-۵-۲- چربی حیوانی..... ۲۷
۱-۳-۵-۳- روغن سرخ کردنی..... ۲۸
۱-۳-۵-۴- مایع صابونی..... ۲۹
۱-۳-۵-۵- ملاس ها..... ۳۱
۱-۳-۵-۶- آب پنیر ۳۲
۱-۳-۵-۷-ضایعات غنی از نشاسته..... ۳۳
۱-۳-۶- اهمیت بیوسورفکتانت برای میکروارگانیسم‌ها..... ۳۴
۱-۳-۶-۱- افزایش دسترسی به هیدروکربن ها..... ۳۵
۱-۳-۶-۲- اتصال به فلزات سنگین..... ۳۶
۱-۳-۶-۳- نقش آنها در بیماریزایی..... ۳۷
۱-۳-۶-۴-تنظیم اتصال و جدا شدن میکروارگانیسم از سطح..... ۳۷
۱-۳-۷- کاربرد های صنعتی بیوسورفکتانت..... ۳۸
۱-۳-۸- کاربردهای پزشکی بیوسورفاکتانت‌ها..... ۴۰
۱-۳-۸-۱- فعالیت آنتی‌بیوتیکی..... ۴۰
۱-۳-۸-۲- ضد چسبندگی..... ۴۱
۱-۳-۹- بیوسورفاکتانت‌ها در صنایع غذایی..... ۴۲
۱-۳-۹-۱- فرمولاسیون مواد غذایی..... ۴۲
۱-۳-۹-۲- عامل ضدچسبندگی در صنایع غذایی..... ۴۳
۱-۳-۱۰- کاربردهای دیگر زیست‌پزشکی و درمانی ۴۴
۱-۳-۱۱- بازیافت بیوسورفکتانت‌ها..... ۴۵
فصل دوم (مرور بر منابع)..... ۴۸
فصل سوم(مواد و روش‌ها)..... ۵۵
۳-۱-مواد و محیط کشت‌ها..... ۵۵
۳-۲- نمونه برداری..... ۵۵
۳-۳-غنی‌سازی و کشت میکروبی..... ۵۶

۳-۴-خالص‌سازی..... ۵۹
۳-۵- انتخاب مناسب‌ترین سویه ها..... ۶۰
۳-۵-۱- تست همولیز..... ۶۰
۳-۵-۲- اندازه گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی..... ۶۰
۳-۵-۳-اندازه گیری فعالیت کشش سطحی..... ۶۱
۳-۶- شرایط نگهداری..... ۶۲
۳-۷- خصوصیات باکتری ها..... ۶۲
۳-۷-۱- مورفولوژی کلنی‌ها..... ۶۲
۳-۷-۲- رنگ آمیزی گرم..... ۶۳
۳-۷-۳- رنگ آمیزی اسپور..... ۶۳
۳-۷-۴-تست کاتالاز..... ۶۴
۳-۷-۵-تست اکسیداز..... ۶۴
۳-۵-۶- تست سیترات..... ۶۴
۳-۷-۷- تست TSI ۶۵
۳-۷-۸- تست SIM..... ۶۵
۳-۷-۹-تست VP-MR ۶۶
۳-۷-۱۰- تست اوره‌آز..... ۶۶
۳-۷-۱۱- تست احیا نیترات..... ۶۶
۳-۷-۱۲- بررسی الگوی مقاومت سویه های انتخابی..... ۶۷
۳-۸- بررسی مقایسه‌ای سمیت نفت خام برای سویه انتخابی..... ۶۷
۳-۹- بررسی مقایسه ای میزان رشد سویه های انتخابی بر روی منابع دیگر..... ۶۸
۳-۱۰-آنالیز بیوسورفکتانت‌های حاصل از سویه های انتخابی..... ۶۸
۳-۱۰-۱-استخراج بیوسورفکتانت..... ۶۸
۳-۱۰-۲-تعیین وزن خشک بیوسورفکتانت ها..... ۶۹
۳-۱۰-۳-کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)..... ۶۹
۳-۱۱- بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت‌ها..... ۷۰
۳-۱-۱۱- استخراج بیوسورفکتانت..... ۷۰
۳-۱۱-۲- سویه های میکروبی..... ۷۱
۳-۱۱-۳-تهیه سوسپانسیون میکروبی..... ۷۱

۳-۱۱-۴- بررسی خاصیت ضد باکتری بیوسورفکتانت..... ۷۱
۳-۱۱-۵- تجزیه تحلیل آماری..... ۷۳
فصل چهارم(نتایج و بحث)..... ۷۴
۴-۱- نتایج..... ۷۴
۴-۱-۱- جداسازی ، خالص سازی و شمارش سلول‌های باکتری..... ۷۴
۴-۱-۲- انتخاب مناسب‌ترین سویه‌ها..... ۷۵
۴-۱-۲-۱- تست همولیز..... ۷۵
۴-۱-۲-۲- اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی..... ۷۶
۴-۱-۲-۳- اندازه گیری کشش سطحی..... ۷۷
۴-۱-۳- خصوصیات سویه‌های باکتری..... ۷۸
۴-۱-۳-۱- خصوصیات ظاهری کلنی‌ها..... ۷۸
۴-۱-۳-۲- رنگ آمیزی گرم..... ۷۹
۴-۱-۳-۳- رنگ آمیزی اسپور..... ۸۰
۴-۱-۳- ۴-تست کاتالاز..... ۸۱
۴-۱-۳-۵- تست اکسیداز..... ۸۱
۴-۱-۳-۶- تست سیترات..... ۸۲
۴-۱-۳-۷- تستTSI..... ۸۳
۴-۱-۳-۸- تست SIM..... ۸۳
۴-۱-۳-۹- تست VP-MR..... ۸۴
۴-۱-۳-۱۰- تست اوره‌آز..... ۸۴
۴-۱-۳-۱۱- تست احیای نیترات..... ۸۴
۴-۱-۳-۱۲- بررسی الگوی مقاومت سویه‌های انتخابی..... ۸۵
۴-۱-۴- شناسایی باکتری‌ها..... ۸۵
۴-۱-۵- بررسی مقایسه‌ای سمیت نفت برای سویه های انتخابی..... ۸۶
۴-۱-۶- بررسی مقایسه‌ای میزان رشد سویه‌های انتخابی بر روی منابع دیگر..... ۸۶
۴-۱-۷-آنالیز بیوسورفکتانت‌های حاصل از سویه های انتخابی..... ۸۸
۴-۱-۷-۱- تعیین وزن خشک بیوسورفکتانت‌ها ۸۸
۴-۱-۷-۲-کروماتوگرافی لایه نازک..... ۸۹
۴-۱-۸- بررسی اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت ها..... ۹۰

۴-۱-۸-۱ تجزیه تحلیل آماری داده های حاصل از بیوسورفکتانت‌ها..... ۹۰
۴-۱-۸-۲-تأثیر رقت های مختلف بیوسورفکتانت‌ها بر هر یک از باکتری ها..... ۹۱
۴-۱-۸-۲-۱- اثر بیوسورفکتانت‌ها در رقت ۱۰۰۰ بر مهار رشد شش باکتری..... ۹۳
۴-۱-۸-۲-۲- اثر بیوسورفکتانت‌ها در رقت ۵۰۰ بر مهار رشد شش باکتری..... ۹۴
۴-۱-۸-۲-۳- اثر بیوسورفکتانت‌ها در رقت ۲۵۰ بر مهار رشد شش باکتری..... ۹۵
۴-۱-۸-۲-۴- اثر بیوسورفکتانت‌ها در رقت۱۲۵ بر مهار رشد شش باکتری..... ۹۶
۴-۱-۸-۲-۵- اثر بیوسورفکتانت‌ها در رقت۶۳ بر مهار رشد شش باکتری..... ۹۷
۴-۱-۸-۳- مقایسه تأثیر ضد باکتریایی بیوسورفکتانت ها در رقت های مختلف با تاثیر بازدارنده آنتی بوتیک‌ها..... ۱۰۲
۴-۲- بحث..... ۱۰۷
۴-۳- نتیجه گیری..... ۱۱۴
۴-۴- پیشنهادات..... ۱۱۵
منابع..... ۱۱۶

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۱-۱ مصارف اصلی سورفکتانت‌های شیمیایی در صنعت..... ۳

جدول ۱-۲ بیوسورفکتانت ها با وزن مولکولی کم..... ۹

جدول ۱-۳ بیوسورفکتانت های با وزن مولکولی زیاد..... ۱۸

جدول ۴-۱کلونی کانتر نمونه های نفت خام، خاک و آب بر حسب CFU/ml..... ۷۵

جدول۴-۲ نتایج حاصل از فعالیت امولسیفیه‌کنندگی سویه‌های باکتری..... ۷۶

جدول۴-۳ کشش سطحی حاصل از ۱۴ سویه انتخابی بعد از ۷۲ ساعت..... ۷۸

جدول۴-۴-خصوصیات ظاهری ایزوله‌های تولید کننده بیوسورفکتانت..... ۷۸

جدول۴-۵ بررسی اثر منابع دیگر بر روی میزان رشد سویه‌های باکتری..... ۸۷

جدول۴-۶ خصوصیات بیوشیمیایی ایزوله‌های انتخابی تولیدکننده بیوسورفکتانت..... ۸۸

جدول۴-۷- وزن خشک بیوسورفکتانت سویه‌های انتخابی..... ۸۹

جدول۴-۸ تجزیه واریانس بیوسورفکتانت بدست آمده از باسیلوس سرئوس۴۳..... ۹۰

جدول۴-۹ تجزیه واریانس بیوسورفکتانت بدست آمده از باسیلوس پومیلیس ۴۷..... ۹۱

جدول۴-۱۰ تجزیه واریانس بیوسورفکتانت بدست آمده از سودوموناس آئروژینوزا۸۳..... ۹۱

جدول۴-۱۱ تجزیه واریانس بیوسورفکتانت بدست آمده از آسینتوباکتر لوفی ۸۸ ..... ۹۱

جدول۴-۱۲مقایسه میانگین بین باکتری ها متاثر از بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس۴۳..... ۹۲

جدول۴-۱۳ مقایسه میانگین بین باکتری ها متاثر از بیوسورفکتانت باسیلوس پومیلیس۴۷..... ۹۲

جدول۴-۱۴- مقایسه میانگین بین باکتری ها متاثر از بیوسورفکتانت پسودوموناس آئروژینوزا۸۳..... ۹۲

جدول۴-۱۵- مقایسه میانگین بین باکتری ها متاثر از بیوسورفکتانت آسینتوباکترلوفی ۸۸..... ۹۳

جدول۴-۱۶- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد شش باکتری مختلف که تحت تأثیر رقت‌های مختلف بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس۴۳ وآنتی بوتیک..... ۹۸

جدول۴-۱۷- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد شش باکتری مختلف که تحت تأثیر رقت های مختلف بیوسورفکتانت باسیلوس پومیلیس ۴۷ وآنتی بوتیک..... ۹۹

جدول۴-۱۸- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد شش باکتری مختلف که تحت تأثیر رقت های مختلف بیوسورفکتانت پسودوموناس آئروژینوزا۸۳ وآنتی بوتیک..... ۱۰۰

جدول۴-۱۹- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد شش باکتری مختلف تحت تأثیررقت های مختلف بیوسورفکتانت آسینتوباکتر لوفی ۸۸ وآنتی بوتیک..... ۱۰۱

جدول ۴-۲۰- اثرات ضدباکتری آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی شش باکتری مختلف.....۱۰۴
جدول ۴-۲۱- تعیین میزان حداقل غلظت مهارکننده رشدMIC حداقل غلظت کشنده رشد MBC
بیوسورفکتانت ها بر روی شش باکتری مختلف.....۱۰۷

فهرست شکل‌ها ونمودارها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱ بتا، بتا-تره‌هالوز-۶،۶'- دی کربوکسیلیک‌استر..... ۶

شکل۱-۲- ساختار رامنولیپید پسودوموناس آئروژینوزا..... ۸

شکل۱-۳- لاکتونیک لیپید سوفوروز ترولوپسیس بومیکولا..... ۸

شکل۱-۴- ساختار برخی از بیوسورفکتانت‌های معمول گلیکولیپید..... ۸

شکل ۱-۵- ساختار لیپوپتید حلقوی سورفاکتین تولید شده توسط باسیلوس سوبتیلیس..... ۱۱

شکل۱-۶- پلی‌میگسین B، ۲و۴- دیآمینوبوتیریک اسید..... ۱۳

شکل ۱-۷- ساختار فسفاتیدیل اتانول‌آمین ، بیوسورفکتانت قوی تولید شده توسط گونه اسینتوباکتر..... ۱۳

شکل ۱-۸- ساختار امولسان تولیدی توسط اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس ۱۴

شکل۱-۹- ساختارپلی‌ساکارید امولسان اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس BD4..... ۱۵

شکل ۱-۱۰- ژن‌های درگیر در سنتز و تنظیم رامنولیپید درسودوموناس آئروژینوزا..... ۱۹

شکل ۱-۱۱- تصویر شماتیک انواع مختلف کینیتیک تخمیری تولید بیوسورفکتانت..... ۲۶

شکل ۱-۱۲- ساختار لاکتون سوفورولیپید..... ۲۸

شکل۱-۱۳- ساختار رامنولیپید از پسودوموناس 400044 NCIB 47T2..... ۲۹

شکل ۱-۱۴قطعات دی رامنولیپیدها اصلی تولید شده توسط پسودوموناس آئروژینوزا LBI ۳۰

شکل۱-۱۵ ساختار امولسان شبه‌پلیمر..... ۳۰

شکل۱-۱۶- مشاهدات میکروسکوپی شکل کریستالی بیوسورفکتانت از پسودوموناس..... ۳۳

شکل ۱-۱۷- ساختار اولیه سورفاکتین..... ۳۴

شکل۳-۱- دستگاه کلونی کانتر..... ۵۷

شکل ۳-۲- نمونه‌ای از خالص سازی باکتری..... ۵۹

شکل۳-۳- دستگاه کشش سطحی..... ۶۲

شکل ۳-۴- بیوسورفکتانت خام..... ۶۹

شکل ۴-۱ -نمونه‌ای از فعالیت همولیز بتا در باکتری‌ها..... ۷۵

شکل ۴-۲- نمونه‌ای از فعالیت امواسیفیه کنندگی باکتری ها..... ۷۷

شکل۴-۳- ایزوله ۴۳ باسیلی شکل..... ۷۹

شکل۴-۴- ایزوله ۴۷ باسیلی شکل..... ۷۹

شکل۴-۵- ایزوله ۸۸ باسیلی شکل..... ۷۹

شکل ۴-۶- ایزوله ۸۳ کوکوباسیلی..... ۷۹
شکل۴-۷- سویه۴۳ دارای اسپور..... ۸۰
شکل۴-۸- سویه ۴۷ دارای اسپور..... ۸۰
شکل۴-۹- سویه ۸۸ دارای اسپور..... ۸۰
شکل ۴-۱۰- نمونه‌ای از فعالیت کاتالاز مثبت..... ۸۱
شکل۴-۱۱- واکنش اکسیداز ایزوله ۸۳..... ۸۲
شکل۴-۱۲- واکنش سیترات ایزوله ۸۳..... ۸۲
شکل۴-۱۳- واکنش اوره‌آز ایزوله ۸۳..... ۸۴
شکل۴-۱۴- وجود بخش لیپیدی باسیلوس سرئوس ۴۳ ..... ۸۹
شکل۴-۱۵- بخش لیپیدی و کربوهیدراتی باسیلوس پومیلیس ۴۷..... ۸۹
شکل۴-۱۶- بخش لیپدی و کربوهیدراتی پسودوموناس آئروژینوزا۸۳ ..... ۹۰
شکل۴-۱۷- بخش کربوهیدارتی و لیپیدی آسینتوباکتر لوفی ۸۸..... ۹۰
نمودار۴-۱-اثر نفت خام بر رشد سویه‌های انتخابی در محیط M.S.S ۸۶
نمودار۴-۲- -نتایج مقایسه میانگین بین رقت های بیوسورفکتانت باسیلوس سرئوس۴۳ و آنتی بیوتیک..... ۹۹
نمودار۴-۳- -نتایج مقایسه میانگین بین رقت های بیوسورفکتانت باسیلوس پومیلیس ۴۷ و آنتی بیوتیک ۱۰۰
نمودار۴-۴ -نتایج مقایسه میانگین بین رقت های بیوسورفکتانت پسودوموناس آئروژینوزا۸۳ و آنتی بیوتیک.... ۱۰۱
نمودار۴-۵- -نتایج مقایسه میانگین بین رقت های بیوسورفکتانت آسینتوباکتر لوفی ۸۸ و آنتی بیوتیک..... ۱۰۲

فصل اول
مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

سورفکتانت‌ها مولکول‌های دوگانه دوستی هستند، که باعث کاهش کشش سطحی و امولسیونه شدن ترکیبات هیدروکربنی در آب می‌شوند، پخش آب گریز سورفکتانت‌ها اغلب از هیدروکربن‌ها و بخش آب دوست آنها از عوامل یونی، غیریونی و آمفوتر تشکیل شده است. بازارهای کنونی سورفاکتانت در سراسر جهان حدود ۹.۴ میلیارد دلار به قرار هر سال و تقاضا آنها انتظار می‌رود به میزان ۳۵ درصد نسبت به پایان قرن افزایش یابد. تقریبا همه سورفاکتانت‌ها در حال حاضر مورد استفاده بصورت شیمیایی از نفت مشتق شده‌اند سورفکتانت‌ها را با توجه به ساختار شیمیایی آنها به سه دسته یونی، غیریونی و آمفوتر تقسیم‌بندی می‌کنند (جدول۱-۱). متداولترین سورفکتانت‌های غیریونی را اتوکسیلات[2]ها، کوپلیمرهای اکسید اتیلن یا پروپیلن و استرهای سوربیتان تشکیل می‌دهند. سورفکتانت‌های یونی پر مصرف شامل اسیدهای چرب، استر-های سولفونات یا سولفات (آنیونی) و نمک‌های چهارگانه آمونیوم (کاتیونی) می‌باشند [۱]. با این حال، علاقه و توجه به سورفکتانت‌های میکروبی در سال‌های اخیر به طور پیوسته با توجه به تنوع آنها، سازگاری با محیط زیست، احتمالاً تولید محصولات آنها از طریق تخمیر، و کاربردهای بالقوه آنها را در حفاظت از محیط زیست، بازیابی نفت خام، مراقبت‌های بهداشتی و صنایع غذایی افزایش یافته است.

این سورفکتانت‌های میکروبی یا بیوسورفکتانت‌ها[3]، ترکیبات فعال سطحی[4] هستند که توسط برخی میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولید می‌شوند که یا به سطح سلول

---

[2] - Ethoxylate

[3] - Biosurfactant

[4] - Surface active compound

چسبیده یا به خارج از سلول ترشح می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها، مولکول‌های آمفی پاتیک هستند که از دو بخش هیدروفیلیک و هیدروفوبیک تشکیل شده‌اند، بخش هیدروفیلیک آنها شامل مونو، اولیگو یا پلی‌ساکاریدها و بخش هیدروفوبیک آنها اسیدهای چرب اشباع، غیراشباع، و یا الکل‌های چرب می‌باشند. به دلیل وجود گروه‌های هیدروفیل و هیدروفوب داخل یک مولکول، بیوسورفکتانت‌ها می توانند در مرز بین فازهای مایع با درجه قطبیت مختلف (مانند نفت/آب) قرار بگیرند، بیوسورفکتانت‌ها کشش سطحی و بین‌سطحی را در هر دو محلول آبی و مخلوط‌های هیدروکربن کاهش می‌دهند [۲].

لفظ بیوسورفکتانت و امولسیفایر[5] مکراً به جای یکدیگر به کار می‌روند. بیوسورفکتانت‌ها معمولاً دارای هر دو بخش هیدروفیل و هیدروفوب می‌باشند در صورتیکه لفظ بیوامولسیفایر را اغلب برای توصیف تمام ترکیبات فعال سطحی ترشح شده توسط سلول که با تشکیل امولسیون باعث تسهیل مصرف سوبستراهای نامحلول می‌شوند، به کار می‌برند. بیوسورفکتانت به دلیل داشتن مزیت‌هایی از قبیل سمیت[6] پایین، قابلیت تجزیه زیستی، سازگاری بهتر با محیط زیست، توانایی بالای تولید کف، فعالیت‌های ویژه در درجه حرات‌های بالا، درجات مختلف pH، شوری و تنوع ساختاری و توانایی سنتزشان از منابع غذایی گوناگون نسبت به سورفکتانت‌های سنتتیک (شیمیایی) ارجحیت دارند [۳ و ۴].

بیوسورفکتانت‌ها از لحاظ تجاری به دلیل استفاده در صنایع مختلف از جمله صنعت نفت، پتروشیمی، غذایی، داروسازی- پزشکی، آرایشی، کشاورزی، نساجی، کاغذ سازی، چرم سازی و غیره از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند به همین جهت میکروارگانیسم‌های تولید کننده این ترکیبات به دلیل دارا بودن نسبت بالای سطح به حجم و ظرفیت متنوع بیوسنتتیک، کاندیدای مناسبی در تحقق برای گسترش تولید بیوسورفکتانت می‌باشند [۵ و ۶].

---

[5] - Emulsifier
[6] - Toxicity

جدول ۱-۱- مصارف اصلی سورفکتانت‌های شیمیایی در صنعت[۱]

سورفکتانت	مثال	سهم تولید٪	مصارف اصلی
آنیونی	کربوکسیلات، سولفونات و استر های اسید سولفوریک	٪۶۶	پودر های لباسشویی
کاتیونی	آمین اکسیدها، منوآمین ها و نمک های چهار گانه آمونیوم	۹	شامپو، نرم کننده های پارچه
غیر یونی	استر های اسید کربوکسیلیک، گلیسرید ها	۲۴	سورفکتانت های کمکی در رختشویی و مواد غذایی
آمفوتریک	الکل بتایین ها	۱	کاربرد های خاص

۱-۲- علت انتخاب موضوع و اهداف

علی‌رغم حضور همه جایی و اهمیت فراوان بیولوژیک، بیوسورفکتانت‌ها تنها به مدت کمتر از نیم قرن است که بطور منظم و قاعده‌مند مورد بررسی قرار می‌گیرند. این تحقیق گذشته از بعد جهانی آن، برای کشور ما از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که می توان دلایل آنرا بدین صورت ذکر کرد:

- بنیاد اقتصادی ایران بر صنعت نفت استوار است؛ اکتشاف، استحصال و پالایش این ماده آلودگی‌های جنبی را همراه دارد.
- نشت طبیعی مخازن نفتی نزدیک به سطح زمین و نیز پوسیدگی خطوط انتقال نفت، موجب آلودگی محیط می‌گردد.
- جنگ و حوادث نفتی روی داده در مناطق جنوب، خلیج فارس و سواحل آن.
- دفع غیراصولی پساب‌های مربوط به کارخانجات و صنایع مرتبط با نفت به محیط.
- با توجه به مطالب فوق و اینکه مخازن نفتی غرب کشور می تواند منبع بزرگ رشد این باکتری‌ها باشد بنابراین تولید ترکیبات زیستی که ازنظر تجاری مهمند، از قبیل بیوسورفکتانت‌ها که کاربرد وسیعی در صنایع نفت، پزشکی، کشاورزی، و... دارند؛ متابولیت های تولیدی حاصل از تجزیه میکروبی نفت و کود بیولوژیکی. لذا می طلبد در این راستا پژوهش‌های کاربردی صورت گیرد که **اهداف** اصلی این تحقیق عبارتند از:

۱- جداسازی باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت
۲- شناسایی باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت
۳- بررسی میزان فعالیت امولسیون سازی باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت
۴- بررسی میزان فعالیت کشش سطحی این باکتری‌ها
۵- بررسی فعالیت‌های ضد باکتریایی بیوسورفکتانت‌ها

۱-۳- بیوسورفکتانت‌ها

بیوسورفکتانت‌ها، ماکروملکول‌های دو قطبی هستند که در فاز رشد یا سکون میکروارگانیسم-های زنده‌ای همچون باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها ساخته می‌شوند. سه منبع اصلی تولید بیوسورفکتانت توسط یک سلول میکروارگانیسم عبارت است از:

۱) درون سلولی: که شامل چربی‌های غشای پلاسمایی و ترکیبات چرب جامد یا مایع درون سلولی می‌باشند.
۲) سطح سلولی: که چربی‌ها و پلیمرهای چرب کمپلکس دیواره سلولی، کپسول و بیوسورفکتانت‌های رها شده از سلول که برسطح آن رسوب کرده را شامل می‌شوند.
۳) برون سلولی: شامل فراورده‌های دوگانه دوستی هستند که توسط میکروارگانیسم به خارج ترشح می‌شوند.

ساختار دوگانه دوست بیوسورفکتانت‌ها سبب کاهش کشش سطحی و بین سطحی مایعات با درجه قطبیت می‌شوند. میکروارگانیسم‌ها از این ویژگی برای افزایش سطح تماس خود با ترکیبات آب‌گریز و امولسیونه کردن آنها در آب جهت تجزیه و بدست آوردن انرژی استفاده می‌کنند [۵].

۱-۳-۱- طبقه بندی بیوسورفکتانت‌ها

بر خلاف سورفاکتانت‌های شیمیایی سنتز شده، که طبقه بندی آنها با توجه به ماهیت قطبی‌شان صورت می‌گیرد، بیوسورفکتانت‌ها عمدتا توسط ترکیب شیمیایی و منشا میکروبی‌شان دسته بندی می‌شوند. به طور کلی، ساختار آنها شامل یک بخش آبدوست متشکل از اسیدهای آمینه یا

کاتیون‌ها یا آنیون‌های پپتیدی، مونو، دی، و یا پلی‌ساکارید و بخش آبگریز متشکل از اسیدهای غیراشباع، اشباع شده یا چرب است. بر این اساس، طبقات عمده‌ای از بیوسورفکتانت‌ها عبارتند از گلیکولیپیدها، لیپوپتیدها و لیپوپروتئین‌ها، فسفولیپیدها واسیدهای چرب، سورفاکتانت‌های پلیمری و سورفکتانت ذرات وجود دارند. اگر چه تعدادی از گزارش‌ها بر روی سنتز بیوسورفکتانت‌ها توسط میکروارگانیسم‌های تخریب کننده هیدروکربن وجود دارد، برخی از بیوسورفکتانت‌ها در تولید ترکیبات محلول در آب مانند گلوکز، ساکروز، گلیسرول یا اتانول گزارش شده است. البته میکروب‌های تولید کننده بیوسورفکتانت در میان طیف گسترده‌ای از جنس توزیع شده است [۷و۸].

۱-۳-۱-۱- بیوسورفکتانت‌ها با وزن مولکولی کم

بیوسورفکتانت‌های بیشتر شناخته شده گلیگولیپیدها هستند. آنها کربو هیدرات‌ها در ترکیب با زنجیره بلند اسیدهای آلیفاتیک یا اسیدهای هیدروکسی آلیفاتیک هستند (جدول ۱-۲). در سال-های اخیر، یک کلاس جدید از گلیکولیپید، به نام لیپیدهای گلوکز کشف شده است. این لیپید-های گلوکز توسط جنس و گونه باکتری جدید، به نام آلکانیورکس بورکومنسیس[۷] تولید شدند. که در طی کشت بر روی N –آلکانها به عنوان تنها منبع کربن و انرژی، این باکتری‌های دریایی جدید لیپیدهای گلوکز فعال سطحی محدود به سلول و خارج سلولی تولید، که موجب کاهش کشش سطحی آب از ۷۲ به ۲۹ میلی نیوتون‌برمتر شدند.

ده تا از لیپیدهای مختلف گلوکز از هم جدا و ساختار آنها توضیح داده شدند همه آنها از لیپید گلوکزهای آنیونی با زنجیره جانبی اکسی‌اسیل تترامریک تشکیل شدند. لیپید گلوکز از پوشش سلولی استریفیه شده N- ترمینالی با گلایسین استخراج شده‌اند. لیپید گلوکز در طول زنجیره از یک یا دو تا چهار بتا هیدروکسی اسیدهای چرب متفاوت است اما بهترین امولسیون کننده‌های زیستی گلیکولیپید مورد مطالعه، تره هالولیپیدها، رامنولیپیدها و سوفرولیپیدها،که دی‌ساکارید-هایی در ترکیب با اسیدهای چرب زنجیره بلند یا هیدروکسی اسیدهای چرب هستند (شکل ۱-۱، شکل ۱-۲ و شکل ۱-۳) [۹ و۱۰].

[7]- *Alcanivorax borkumensis*