بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه آزاد اسلامي

واحد شاهرود

دانشكده فني مهندسي، گروه مهندسي شيمي

پايان نامه براي دريافت درجه كارشناسي ارشد «M.Sc.»

گرایش: بیوتکنولوژی

عنوان:

جداسازی باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت ازلجن مخازن انبارهای فرآورده های نفتی

استاد راهنما:

دکتر زهرا بیگم مختاری حسینی

نگارش:

ابوطالب ابوچناری

تیرماه ۱۳۹۳

تقدیم به

مادر مهربان و همسرعزیزم

سپاسگزاری

بعد از حمد و ستایش خداوند متعال که به من توفیق انجام این پژوهش را عطا فرمودند، لازم می‌دانم از سرکار خانم دکتر زهرا بیگم مختاری حسینی که راهنمایی این پژوهش را بر عهده داشتند و در طول مراحل تحقیق با صبر و حوصله و جدیت، چراغ راه من بودند و در راهنمایی اینجانب از هیچ مساعدتی دریغ نورزیدند، سپاسگزاری نموده و کمال تشکر را دارم. در پایان لازم می‌دانم از تمامی افرادی که به طور مستقیم و غیرمستقیم در به ثمر رسیدن این کار تحقیقی مرا مرهون مساعدت و همکاری خود نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

چکیده

سالیانه مقادیر زیادی لجن در مخازن ذخیره سازی فراورده های نفتی کشور تولید می گردد. این لجن در نتیجه جذب ترکیبات روغنی بر روی ذرات جامد و ته نشینی آن تشکیل می شود. از آنجاییکه این لجن می تواند حاوی مقادیر بالای از ترکیبات آلی سمی و فلزات سنگین باشد به عنوان منبعی از آلاینده ها محسوب می شود و رها سازی آن در محیط بدون اعمال روشهای تصفیه آثار سویی به همراه دارد. بیوسورفکتانتها، گروه نا همگنی از مولکولهای دارای فعالیت سطحی هستند که توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند. این مولکولها کشش سطحی را در محلولهای آبی و همینطور در مخلوطهای هیدرو کربنه کاهش می دهند. بیوسورفکتانت ها دارای مزایای ویژه چون سمیت پایین و قابلیت تجزیه بیولوژیکی در محیط می باشند. با جداسازی سویه های مناسب و بررسی ویژگی های فیزیولوژیکی متابولیک امکان حذف آلاینده های نفتی فراهم خواهد شد.

در این مطالعه باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتانت که توانایی مصرف لجن را نیز دارند جداسازی شدند. بدین منظور از سه لجن مخزن گازوئیل انبار نفت منطقه شاهرود، لجن استخر رو باز واقع در منطقه دامغان و لجن مخزن گازوئیل انبار نفت منطقه سبزوار نمونه برداری صورت گرفت، نمونه ها با کشت در محیط معدنی حاوی۱۰% v/v گازوئیل غنی سازی شدند و سپس با استفاده از محیط مغذی جامد حاوی گازوئیل باکتری های خالص جداسازی شدند.

در این مرحله چندین سویه باکتریهایی که اغلب گرم مثبت بودند خالص سازی گردید، سپس آزمون های بیوشیمیایی شامل رنگ آمیزی گرم، آزمون KOH برای تایید رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز پراکسیداز، اکسیداز، آزمون تخمیرکربوهیدراتها، آزمون رشد برروی محیط TSI صورت پذیرفت.

کلمات کلیدی : جداسازی، لجن مخازن، بیوسورفکتانت، گازوئیل، تجزیه بیولوژیکی

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده ۱

مقدمه ۲

فصل اول: کلیات ۳

۱-۱. بیان مساله ۴

۱-۲. اهداف پژوهش ۶

۱-۳. چگونگی تنظیم گزارش پایان نامه ۷

فصل دوم: کلیات و مروری بر مطالعات گذشته ۸

۲-۱. مقدمه ۹

۲-۲. خواص فیزیکی و شیمیایی نفت خام ۹

۲-۳. شناسایی میکرو اورگانیسم های تولید کننده بیوسورفکتانت ۹

۲-۴. طبقه بندی بیوسورفکتانت و منشا میکروبی آنها ۱۱

۲-۴-۱. گلیکولیپیدها ۱۱

۲-۴-۱-۱. رامنولیپیدها ۱۱

۲-۴-۱-۲. ترهالولیپیدها ۱۲

۲-۴-۱-۳. سوفورولیپیدها ۱۲

۲-۴-۲. لیپوپپتیدها و لیپوپروتیئین ها ۱۳

۲-۴-۳. بیوسورفکتانت های پلیمری ۱۴

۲-۵. فیزیولوژی و ژنتیک بیوسورفکتانت ها ۱۵

۲-۵-۱. بیوسنتز بیوسورفکتانت ها ۱۵
۲-۵-۲. تنظیم ۱۶
۲-۶. کاربردهای صنعتی بیوسورفکتانت ها ۱۷
۲-۶-۱. کاربرد در صنایع نفت ۱۷
۲-۶-۲. پاکسازی محیط زیست از فلزات سنگین ۱۸
۲-۶-۳. کاربرد در صنایع غذایی ۱۸
۲-۶-۴. کاربرد در صنایع بهداشتی و آرایشی ۱۹
۲-۶-۵. سایر کاربردها ۱۹
۲-۷. مروری بر مطالعات گذشته ۱۹

فصل سوم: روش اجرا و تجهیزات پژوهش ۲۱
۳-۱. نمونه برداری ۲۲
۳-۱-۱. انتخاب محل نمونه برداری ۲۲
الف: شرکت پالایش و پخش فراورده های نفتی منطقه شاهرود و منطقه دامغان ۲۲
ب: شرکت پالایش و پخش فراورده های نفتی منطقه سبزوار ۲۲
۳-۱-۲. روش نمونه برداری ۲۳
۳-۲. غنی سازی ۲۳
۳-۲-۱. تهیه محیط کشت معدنی مایع ۲۳
۳-۲-۲. کشت نمونه ها ۲۵
۳-۲-۳. تهیه محیط کشت جامد ۲۶
۳-۳. خالص سازی ۲۶
۳-۳-۱. تهیه محیط مغذی مایع جهت بررسی توانایی تولید بیوسورفکتانت ۲۸
۳-۴. تست غربالگری ۳۰
۳-۴-۱. بررسی فعالیت همولیتیک ۳۰

۳-۴-۲. اندازه گیری کشش سطحی به عنوان معیار تولید بیوسورفکتانت ۳۰
۳-۵. اندازه گیری توده سلولی ۳۱
۳-۵-۱. اندازه گیری میزان OD ۳۱
۳-۵-۲. روش جذب نوری و رسم منحنی رشد ۳۲
۳-۵-۳. تعیین وزن خشک سلولی ۳۲
۳-۶.شناسایی باکتری ها ۳۴
۳-۶-۱. رنگ آمیزی افتراقی گرم ۳۴
۳-۶-۲. آزمون KOH ۳۵
۳-۶-۳. آزمون کاتالاز _ پراکسیداز ۳۵
۳-۶-۴. آزمون اکسیداز ۳۵
۳-۶-۵. آزمون تخمیر کربوهیدراتها ۳۵
۳-۶-۶. آزمون رشد برمحیط TSI ۳۶

فصل چهارم: بحث و نتایج ۳۷
۴-۱. غنی سازی و جداسازی و شناسایی باکتریها ۳۸
۴-۱-۱. غنی سازی و جداسازی ۳۸
۴-۱-۲. بررسی فعالیت همولیتیک ۳۸
۴-۱-۳. بررسی اندازه گیری کشش سطحی ۳۹
۴-۱-۴. رسم منحنی رشد ۴۰
۴-۱-۵. اندازه گیری وزن خشک سلولی ۴۴
۴-۲. شناسایی اولیه ایزوله ها ۴۵
۴-۲-۱. رنگ آمیزی افتراقی گرم ۴۵
۴-۲-۲. آزمون KOH ۴۷
۴-۲-۳. آزمون کاتالاز _ پراکسیداز ۴۷

۴-۲-۴. آزمون اکسیداز ۴۸
۴-۲-۵. آزمون تخمیر کربوهیدراتها ۴۹
۴-۲-۶. آزمون رشد بر روی محیط TSI ۵۰

فصل پنجم: نتیجه‌گیری و
پیشنهادات .....
۵۲

۵-۱. نتیجه‌گیری ۵۳
۵-۲. پیشنهادات ۵۴

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۳-۱. کدهای مربوط به مناطق نمونه برداری ۲۳
جدول ۳-۲. اجزای محیط کشت MSM ۲۴
جدول ۳-۳. عناصر کم مقدار ۲۴
جدول ۳-۴. مربوط به لیبل گذاری نمونه ها ۲۶
جدول ۳-۵. اجزاء محیط کشت آزمون تخمیر هیدروکربن ها برای باکتری های گرم مثبت ۳۶
جدول ۴-۱. مقایسه کشش سطحی محیط کشت ایزوله ها و نمونه شاهد ۳۹
جدول ۴-۲. مقایسه وزن خشک باکتری های جدا شده ۴۴
جدول ۴-۳. نتایج شناسه اولیه ایزوله های خالص شده ۵۱

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۲-۱.تصویری از رامنولیپید تولید شده توسط گونه P.aeruginosa ۱۱
شکل ۲-۲. Trehalose dimycolateتولید شده توسطRhodococus erythropolis..... ۱۲
شکل ۲-۳. سوفورولیپید تولید شده توسط Troulopsis bombicola ۱۳
شکل ۲-۴. ساختمان شیمیایی سورفکتین تولید شده توسط Bacillus Subtilis..... ۱۳
شکل ۲-۵. ساختمان شیمیایی emulsan تولید شده توسطAcinetobacter ۱۴
شکل ۳-۱. تصویری از انکوباتور شیکردار جهت غنی سازی نمونه ها ۲۵
شکل ۳-۲. تصویری از انکوباتور برای کشت نمونه ها..... ۲۶
شکل ۳-۳ .تصاویر باکتری های ایزوله شده ۲۷
شکل ۳-۴. رشد باکتری در محیط معدنی ۲۹
شکل ۳-۵. تصویری از دستگاه تنسیومتر ۳۱
شکل ۳-۶. تصویری از دستگاه اسپکتروفوتومتر جهت اندازه گیری OD..... ۳۲
شکل ۳-۷. تصویری از دستگاه سانتریفیوژ..... ۳۳
شکل ۳-۸. تصویری از دستگاه ورتکس ۳۳
شکل ۳-۹. خشک کردن باکتری ها به وسیله فویل درون آن..... ۳۴
شکل ۴-۱ .تصویری از تست همولیتیک ایزوله C_3..... ۳۸
شکل ۴-۲. رنگ آمیزی گرم ایزوله ها..... ۴۶
شکل ۴-۳. تشکیل حباب های اکسیژن به نشانه فعالیت آنزیم کاتالاز ایزوله Shs_2 ..... ۴۷
شکل ۴-۴. نتایج تست اکسیداز ۴۸
شکل ۴-۵. نتایج آزمون تخمیر کربو هیدراتها ۴۹
شکل ۴-۶. نتایج مربوط به آزمون TSI..... ۵۰

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار ۴-۱. منحنی رشد ایزوله C_1 در محیط MSM ۴۰
نمودار ۴-۲. منحنی رشد ایزوله C_2 در محیط MSM ۴۰
نمودار ۴-۳. منحنی رشد ایزوله C_3 در محیط MSM ۴۱
نمودار ۴-۴. منحنی رشد ایزوله Shs_1 در محیط MSM ۴۱
نمودار ۴-۵. منحنی رشد ایزوله Shs_2 در محیط MSM ۴۲
نمودار ۴-۶. منحنی رشد ایزوله F_1 در محیط MSM ۴۲
نمودار ۴-۷. منحنی رشد ایزوله F_2 در محیط MSM ۴۲
نمودار ۴-۸. منحنی رشد باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت جدا شده ۴۳
نمودار ۴-۹. مقایسه نموداری وزن خشک باکتری های جدا شده ۴۴

منابع ومآخذ

فهرست منابع فارسی ۵۵
فهرست منابع غیر فارسی ۵۵
چکیده انگلیسی ۶۰

مقدمه

گسترش علم و دانش بشر و توجه به بهبود شرایط زیست محیطی و نیز کاربرد بهینه از امکانات محیطی، پژوهندگان را بر آن داشته تا روش های مناسبی را برای از بین بردن این آلودگی های زیانبار ارزیابی کنند. یکی از روشهای بازیابی این مناطق و وارد نمودن آنها در چرخه کشاورزی، کاهش و زدودن آلاینده ها با روش های زیستی یا غیر زیستی است که از این میان روش تجزیه زیستی با توجه به بهره گیری از توان طبیعی و توانایی های نهفته طبیعت بیشتر مورد توجه بوده است[۱۱].

بیوسورفکتانت ها[1] مولکول های دوگانه دوستی با هر دو دنباله آب دوست و آب گریز می باشند که به طور ترجیحی در سطح مشترک بین سیالات با درجات قطبیت و پیوندهای هیدروژنی مختلف، همانند آب، نفت یا آب، هوا شرکت می کنند. این خاصیت منجر به آن می شود که بیوسورفکتانت ها قادر به کاهش کشش سطحی و بین سطحی شده، میکروامولسیون تشکیل دهند و به این ترتیب قادر به انحلال هیدروکربن در آب و یا آب در هیدروکربن می باشند. بدین جهت از بیوسورفکتانت ها به عنوان یک پاک کننده، امولسیون ساز، پخش کننده و فوم ساز قوی در فرایندهای شیمیایی به طور وسیعی استفاده می شود. تقریبا بیشتر بیوسورفکتانت هایی که در حال حاضر مورد استفاده قرار می گیرند به صورت شیمیایی از مواد نفتی سنتز می شوند. با این حال استفاده از بیوسورفکتانت های میکروبی با توجه به ویژگی های مثبتی از جمله تنوع، سازگاری با محیط زیست، قابلیت تولید از طریق فرایندهای تخمیری، قابلیت تجزیه پذیری بیشتر، فعالیت ویژه بیشتر در دما، PH و غلظت های بالای نمک و همچنین قابلیت سنتز از مواد اولیه تجزیه پذیر منجر به افزایش کاربرد آنها در محافظت از محیط زیست، ازدیاد برداشت نفت و مراقبت از بهداشت و صنایع غذایی شده است.

به بیان دیگر بیوسورفکتانت ها یک گروه ساختاری متنوع از مولکول های فعال کننده سطح می باشند که توسط میکروارگانیسم ها سنتز می شوند. این مولکول ها کشش سطحی و بین سطحی را در هر گروه از محلول های آبی و مخلوط های هیدروکربنی کاهش می دهند که این خواص منجر به استفاده از آنها در فرایندهای شکستن امولسیون می شود. پژوهش های اولیه انجام شده بر روی بیوسورفکتانت ها بیشتر بر روی ویژگی های بیوسنتز آنها تمرکز داشته است. اگرچه در سال های اخیر کارهای تحقیقاتی زیادی بر روی تولید تخمیری، ژنتیک و همچنین کاربرد اقتصادی آنها انجام شده است[۱۵، ۱۶].

[1] *Biosurfactant*

فصـــل اول

کلیات

۱-۱- بیان مساله

اهمیت نفت و گاز در جامعه مدرن امروزی به خوبی شناخته شده است. با این وجود در بسیاری از عملیات استخراج نفت و گاز، فرایندهای تولید فراورده های نفتی و ذخیره سازی فراورده ها مقادیر زیادی لجن تولید می گردد. لجن تولیدی حاوی ترکیبات معدنی و آلی است و تخلیه آن باعث آلودگی آب های سطحی، زیرزمینی و خاک می شود. از این رو جهت حفظ منابع طبیعی بایستی این لجن ها پیش از رها سازی در محیط به طور موثری تصفیه گردند [۵].

تاکنون تعداد زیادی از باکتریهای تجزیه کننده اجزای نفتی جداسازی شده اند، ولی با این وجود به نظر می رسد تعداد کمی از آنها در تجزیه زیستی نفت در محیط های طبیعی حائز اهمیت باشند.

پاکسازی زیستی به عنوان راهکاری شایسته برای بهسازی لجن ها و خاک های آلوده می باشد. پاکسازی زیستی یک واژه همه گیر برای زدودن و کاهش آلودگی محیط زیست با فرایندهای بیولوژیکی و به کمک جانداران ریز و بویژه باکتری، قارچ و مخمر در لجن ها، خاک ها و آب های آلوده می باشد [۶].

بسیاری ازترکیبات درنفت برای محیط زیست بی خطرند، ولی اجزای شاخص آن موتاژن یا سمی هستند. پاک سازی زیستی تکنیکی است که تبدیل ترکیبات سمی به غیر سمی را بدون آلودگی بیشتر انجام می دهد[۷].

ازمیان تمام آلوده کننده ها، نفت و هیدرو کربورهای نفتی، از نظر علمی و اقتصادی دارای اهمیت بین المللی خاصی است. از میلیون ها سال قبل نشت نفت از منابع مختلف به داخل آب و خاک به عنوان آشکارترین نوع آلودگی وجود داشته است، این پدیده بر اثر سوراخ شدن منابع نفتی بوجود می آید[۱].

تجزیه زیستی، یکی از روشهای تقریبا جدید در پاکسازی محیط زیست از آلودگی های نفتی است که توسط تعدادی از میکرو ارگانیسم ها انجام می گیرد و از سایر روشها کاربردی تر و دارای هزینه و عوارض خطرناک بعدی کمتری است. همچنین مواد حاصل از تجزیه ترکیبات نفتی به جا مانده، نه تنها باعث درد سر نمی شوند، بلکه قابلیت بازیافت و استفاده بعدی را نیز دارند.

مهمترین عوامل موثر بر تجزیه زیستی، نوع ترکیب نفتی و میزان در معرض هوا بودن آن ها است. دریافت اکسیژن باعث تبخیر سریع تر ترکیبات نفتی سمی شده و در آب های گرم با تبخیر بیشتر روند کاهش سمیت این مواد بیشتر می شود.

همچنین میزان اکسیژن در روند تجزیه، نقش بسزایی دارد؛ چرا که در اعماق به علت عدم وجود اختلاط آب، اکسیژن کافی جهت انجام عمل تجزیه وجود ندارد، به خصوص اینکه در این مناطق، مواد نفتی بصورت امولسیون آب در نفت است. تحت این شرایط، به علت کمبود اکسیژن، نرخ تجزیه بیولوژیکی کاهش می یابد و هیدرو کربن ها در دریا پایدار می مانند.

میکروارگانیسم ها علاوه بر اکسیژن به مواد دیگری همچون نیتروژن، گوگرد، مواد فسفردار، کلسیم و فلزات سنگین نیازمندند. به علت اتصال محکم این گونه مواد به ملکول ها، دسترسی باکتریها به آن ها مشکل است. این عمل را می توان در محل هایی که به مواد نفتی آلوده شده اند با افزایش کودهای فسفاته و ازته بهبود بخشید [۸].

مهمترین عامل در انجام پاکسازی زیستی، دست یابی به گونه های میکروبی فعال در تجزیه موادآلاینده می باشد [۹]. باکتریهای گرم مثبت به ویژه گونه های *باسیلوس*[1] در فرایندهای پاکسازی زیستی کارایی ویژه ای دارند[۱۰].

---

[1] *Bacillus*
[2] *Pseudomonas*
[3] *Acinetobacter*
[4] *Alcaligenes*
[5] *Nocardia*
[6] *Rhodococcus*
[7] *Achromobacter*

گروه گسترده ای از باکتریها همانند گونه های *سودوموناس*[۲]، *آکینتوباکتر*[۳]، *آلکالیژنس*[۴]، *نوکاردیا*[۵] و *رودوکوکوس*[۶] توان تجزیه زیستی هوازی ترکیب های نفتی را دارند [۱۱]. از میان باکتریها، باکتری *سودوموناس* از جمله جنس هایی هست که بررسی های فراوانی بر روی آن برای تجزیه شمار فراوانی از ترکیب های نفتی از جمله آروماتیکها انجام گرفته است [۱۲]. در بررسی های گوناگون از باکتریهای تجزیه کننده هیدرو کربن ها مانند *آکروموباکتر*[۷]، *آلکالیژنس*، *آکینتوباکتر*، *سودوموناس*، *نوکاردیا*، *فلاوباکتریوم*[۸]، *اشرشیاکلی*[۹]، *آرتروباکتر*[۱۰] و *باسیلوس*، در محیطهای آبی و خاکی آلوده نام برده شده است [۱۳].

بیوسورفکتانت ها غالبا ترکیبات لیپیدی هستند که ویژگیهای آن به دو انتهای موجود در مولکول بستگی دارد. یک انتها بخش هیدرو کربنی است که حلالیت کمتری در آب دارد و از زنجیره ای بلند از اسید های چرب، هیدرو کسی اسید چرب، هیدروکسیل اسید چرب ویا آلکیل هیدروکسی اسید چرب تشکیل شده است. انتهای دیگر آب دوست است که حلالیت بالایی درآب داشته و از کربو کسیلیک اسید تشکیل شده است[۱۴].

بیوسورفکتانتها به دلیل دارا بودن مزیتهایی از قبیل: سمیت پایین، قابلیت تجزیه زیستی بالا، افزایش تولید کف (این ویژگی در صنایع آرایشی و بهداشتی به عنوان تسهیل کننده شستشو و مرطوب کنندگی می تواند بسیار حائز اهمیت باشد)، سازگاری خوب با محیط، توانایی فعالیت در دمای بالا،pH و درجه شوری مختلف و قابلیت دسترسی آسان و ارزان قیمت نسبت به سورفکتانت شیمیایی و سینتیک ارجحیت دارند[۱۵و۱۶].

بیوسورفکتانت ها از نظر نوع و ویژگی کاربردی، گستردگی بیشتری را نسبت به انواع سنتزی دارند. همچنین از طریق زیستی قابل تجزیه می باشند و بدین صورت با استفاده از آنها دیگر مشکل دیر پا بودن بیوسورفاکتانت های سنتزی و آلودگی های محیطی را نخواهیم داشت. از طرفی می توان با استفاده از منابع ارزان قیمت این ترکیبات را تولید و یا با تغییر در مواد اولیه کارایی و ساختمان بیوسورفاکتانت های حاصله را تغییر داد[۱۷و۱۸].

۱-۲- اهداف پژوهش

کاربرد فراوان مواد نفتی در ایران سبب آلودگی بسیاری از زیستگا ها و هم چنین ایجاد لجن در مخازن انبارهای فراورده های نفتی شده است .

در راستای کاهش این آلودگی ها با بهره گیری از باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت ها روشی کم هزینه و سازگار با محیط زیست می باشد ،که هدف اصلی این پژوهش شناسایی بهترین سویه تولید کننده بیوسورفکتانت به عنوان گروهی از باکتری های موجود در لجن و آلودگی های نفتی می باشد.

با توجه به این هدف اصلی، اهداف فرعی شامل موارد زیر می باشد:

۱- جداسازی سویه های تولید کننده بیوسورفکتانت از لجن مخازن انبارهای نفتی

۲- شناسایی باکتریهای جدا شده

---

[8] *Flavobacterium*
[9] *Escherichia coli*
[10] *Arthrobacter*

۱-۳- چگونگی تنظیم گزارش پایان نامه

با توجه به اهداف تعیین شده، مطالب این گزارش به شرح ذیل تنظیم شده است :
پس از ارائه مقدمه در فصل اول ،کلیات و مروری بر مطالعات انجام شده در فصل دوم آورده شده است. روش ها و مواد استفاده شده در این پژوهش در فصل سوم تشریح شده است. در فصل چهارم نتایج آزمایش ها و بحث مربوط به آنها آمده است و سر انجام در فصل پنجم نتیجه گیری ارائه شده اند.

فصـــل دوم
کلیـات و مروری بر مطالعات گـذشته

۲ـ۱ـ مقدمه

تولید لجن های نفتی یکی از معضلات شرکت پخش فرآورده های نفتی ایران است و در حال حاضر در کشور مدیریت جامعی در ارتباط با این لجن ها وجود ندارد و تنها در بعضی موارد به حذف آب و نهایتا دفن لجن باقیمانده بسنده شده است.

درسال های اخیر برای حل این گونه آلودگی ها راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است که در آن بین روش تجزیه زیستی بوسیله میکروارگانیسم ها به خاطر امتیازات خاص و نیز سازگاری این روش با طبیعت، بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است[۱۹].

۲-۲- خواص فیزیکی و شیمیایی نفت خام

وزن مخصوص (چگالی)، گرانروی، نقطه ریزش (سیلان)و درجه حرارت از خواص فیزیکی نفت خام است. نفت خام ترکیب پیچیده ای از هیدروکربن ها با وزن ملکولی ۱۰۰۰۰۰-۱۶بوده و علاوه بر کربن و هیدروژن، دارای مقادیر قلیلی اکسیژن، گوگرد، نیتروژن و نیز مقادیر اندکی فلزات است.علت تنوع هیدرو کربن های نفت خام به واسطه مقدار اتم های هیدروژن و کربن موجود در آن است و نفت خام از اجزای مختلفی شامل گازهای تصفیه شده، بنزین، نفت، نفت سفید، روغن ماشین و روغن های باقی مانده تشکیل می شود[۲۰].

گروه گسترده ای از میکرو ارگانیسم ها ترکیبات فعال کننده سطحی[1] به نام بیوسورفکتانت ترشح می کنند. ترشح این ترکیبات توسط سلول های میکروبی باعث سهولت در جذب سوبستراهای غیر قابل حل می شود. اهمیت بیوسورفکتانت های بیولوژیک در مقایسه با انواع سنتزی در این است که از نظر نوع و خصوصیت نسبت به انواع سنتزی،گستردگی بیشتری دارند و از طریق بیولوژیک هم قابل تجزیه اند[۲۱] .

۲-۳- شناسایی میکرو ارگانیسم های تولید کننده بیوسورفکتانت

پیشرفتهای اخیر بوجود آمده در زمینه سورفکتانتهای میکروبی به میزان قابل توجهی به توسعه روشهای سریع و قابل اطمینان جهت شناسایی میکرو ارگانیسم های تولید کننده بیوسورفکتانت کمک کرده است. به عنوان نمونه شولگا[2] و همکارانش[۲۲] از توانایی بیوسورفکتانت های آنیونی در واکنش با نشانگرهای کاتیونی جهت تشکیل یک کمپلکس رنگی استفاده کرده و این روش را به عنوان روشی جهت تخمین تولید بیوسورفکتانت معرفی کرده اند. روشهای سریع دیگری نیز جهت این منظور توسط محققان مختلف معرفی شده اند که از جمله میتوان به:

۱- تست متلاشی شدن قطره[2] که در آن یک قطره از محیط کشت میکروبی بر روی سطح پوشیده از نفت قرار داده میشود و در صورتیکه قطره مورد نظر حاوی بیوسورفکتانت باشد متلاشی شده و در غیر این صورت به حالت پایدار باقی می ماند[۲۳].

---

[1] *Surface active compound*
[2] *Shulga*

[2] *drop-collapsing*
[2] *Abu-Ruwaida*
[3] *Wagner*
[4] *Hanesen*
[5] *Cooper,Goldenberg*

۲- روش مستقیم کروماتوگرافی لایه نازک که جهت شناسایی سریع میکرو ارگانیسم های تولید کننده بیوسورفکتانت توسط ابوروویدا[۲] و همکارانش[۲۴] معرفی شده است. در این روش پس از اینکه بیوسورفکتانت از محیط MSM حاوی ۱% هگزادکان (تنها منبع کربن و انرژی) استخراج می شود و مجددا در اب مقطر حل شده، سپس با پیپت پاستور قطره بسیار کوچکی از محلول بیوسورفکتانت بر روی کاغذ TLC قرار داده می شود. فاصله هر لکه از لبه صفحه و لکه مجاور باید یک سانتیمتر باشد و قطر لکه نباید از دومیلی متر بیشتر شود. از سیستم حلال آب مقطر، اسید استیک، متانول، اتیل استات، کلروفرم با نسبت های متفاوت (۵:۱۰:۱۵:۲۰:۲۵ V/V/V/V/V) و(۱:۲۰:۲۵:۵:۱۰ V/V/V/V/V) و (۵:۲۰:۲۵:۲۰:۲۵ V/V/V/V/V) برای جابجایی لکه قرار داده شده بر روی سطح کاغذ TLC استفاده می شود.

از هر یک از نسبت حلال های بالا به ارتفاع ۱/۵-۱ سانتی متر در تانک کروماتوگرافی ریخته و سپس صفحه TLC درون حلال قرار می گیرد و درب تانک بسته می شود، وقتی حلال از کاغذ بالا رفت صفحه کروماتوگرام از تانک خارج و خشک می شود سپس صفحه TLC در معرض نور uv قرار می گیرد که مشاهده یک لکه صورتی رنگ روی صفحه TLC نشان دهنده خالص بودن ترکیب بیوسور فکتانت می باشد.

۳- روشهای کالریمتری که توسط وگنر[۳] [۲۵] و همچنین هانسن[۴] [۲۶] ارائه شده است.
۴- تخمین اندازه ضریب امولسیون سازی (E24) که بوسیله تکان شدید نمونه حاوی محیط کشت و حجم مساوی از نفت سفید و اندازه گیری درصد امولسیون سازی پس از ۲۴ ساعت به گونه ای که کوپر گولدنبرگ[۵] [۲۷] مشخص کرده اند. این روش در شناسایی بیوسورفکتانتهای امولسیون ساز بسیار سودمند می باشد.

۲-۴- طبقه بندی بیوسورفکتانت و منشا میکروبی آنها

بر خلاف بیوسورفکتانت های شیمیایی که بر اساس طبیعت گروهای قطبیشان طبقه بندی می شوند، بیوسورفکتانت ها بر پایه ترکیب شیمیایی و منشا میکروبی شان گروه بندی می شوند .به طور کلی ساختار آنها از یک زنجیره آب دوست که شامل آمینو اسیدها یا پپتیدها، آنیون ها یا کاتیون ها، پلی ساکاریدها و یک زنجیر آب گریز که شامل اسیدهای چرب یا غیر اشباع می باشد تشکیل شده است. دنباله های آب دوست و آب گریز بیوسورفکتانت ها به چند طبقه اصلی شامل گلیکولیپیدها، لیپوپپتیدها و لیپو پروتئین ها، فسفولیپیدها و اسیدهای چرب، بیوسورفکتانت های پلیمری و بیوسورفکتانت های ذره ای تقسیم می شوند[۲۸].

۲-۴-۱- گلیکولیپیدها

یکی از شناخته شده ترین انواع بیوسورفکتانت ها گلیکولیپیدها می باشند. گلیکولیپیدها شامل کربوهیدرات هایی که متصل به یک زنجیر بلند از اسیدهای آلیفاتیک یا اسیدهای هیدروکسی آلیفاتیک می باشند. مهمترین انواع گلیکولیپیدها شامل رامنولیپیدها، ترهالولیپیدها و سوفورولیپیدها می باشند[۲۹].