# بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت به‌منظور پاک‌سازی نفت خام شناور از روی آب

حسین امانی؛ دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

## چکیده

در این تحقیق توانایی *پسودوموناس آرجینوزا*[۱] NP۲ به‌منظور تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید بررسی شد. رامنولیپید در صنایع نفت برای پاک‌سازی فیلترهای تصفیه لجن‌های نفتی و پاک‌سازی تانک‌های ذخیرهٔ نفتی و تیمار بیولوژیك فاضلاب‌های نفتی حائز اهمیت است. هدف دیگر این تحقیق بهینه‌سازی محیط رشد تولید بیوسورفکتانت برای کاهش هزینه‌ها با استفاده از روش تاگوچی است. شرایطی از قبیل منابع کربنی مختلف، اثر غلظت نمک، فسفر و نیتروژن در سه سطح بر میزان تولید رامنولیپید بررسی شد. بهترین شرایط برای تولید رامنولیپید وقتی مشاهده شد که از ساکاروز به‌عنوان منبع کربن، ۵۰ g/l NaCl، ۶/۷۵ g/l ($NaH_2PO_4$, $Na_2HPO_4$) و g/l $(NH_4)_2SO_4$ ۱ به‌ترتیب برای منبع نمک، فسفر و نیتروژن استفاده می‌شود. بیش‌ترین مقدار تولید رامنولیپید از میان آزمایش‌های مختلف برابر ۲/۸ g/l به‌دست آمد. هم‌چنین شاخص امولسیون‌سازی برای رامنولیپید تولید شده به‌کمک آزمون $E_{24}$ بررسی شد و مقدار امولسیون برای نفت خام (API =۳۴) برابر ۸۰% به‌دست آمد.

## مقدمه

در سال‌های اخیر موارد متعددی از آلودگی‌های نفتی در اقیانوس‌ها و نواحی ساحلی گزارش شده است. امولسیون کردن نفت خام با سورفکتانت‌های شیمیایی و جمع‌آوری آن از روش‌های مرسوم است که به‌طور گسترده استفاده می‌شود. سورفکتانت‌ها یا ترکیبات فعال سطحی مولکول‌های دوگانه‌دوستی هستند که با قرار گرفتن در سطح بین دو فاز منجر به کاهش کشش سطحی و بین‌سطحی و تشکیل میکروامولسیون‌های ناشی از انحلال جزئی هیدروکربن در آب و یا آب در هیدروکربن می‌گردند. بیوسورفکتانت‌ها که با میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌گردند از فراورده‌های مهم در میکروبیولوژی صنعتی هستند[۱]-[۳]. بنا به‌دلایلی استفاده از بیوسورفکتانت‌ها بر سورفکتانت‌های شیمیایی ترجیح داده می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها را می‌توان تنوع زیاد، کم خطر بودن برای محیط زیست، سمیت کم‌تر و قابلیت بازگشت به اکوسیستم نام برد. [۴]-[۶]. از کاربردهای مهم بیوسورفاکتانت‌ها در محیط زیست می‌توان به مواردی از جمله تیمار بیولوژیکی

**واژه‌های کلیدی:** بیوسورفکتانت، تاگوچی، رامنولیپید، فرمانتاسیون، امولسیون‌سازی
دریافت ۹۳/۶/۲ پذیرش ۹۳/۸/۱۸

***نویسنده مسئول** hamani@nit.ac.ir

۱. *Pseudomonas aeruginosa* NP2



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

فاضلاب‌های نفتی، جابه‌جایی و تجزیه لکه‌های نفتی در آب دریا و پاك کردن نفت از سطح تانکرهای ذخیره نفت و کشتی‌ها اشاره کرد. تحقیقات بسیاری بر روی تجزیهٔ بیولوژیکی ترکیبات نفتی انجام شده است. به‌طور مثال لی[۱] و همکارانش توانستند میکروارگانیسمی را شناسایی کنند که قادر به مصرف نفت‌خام به‌صورت قطرات ریز است [۷]. همچنین طلایی و همکارانش با استفاده از دو باکتری نفت‌خوار توانستند نفت‌خام را تا ۲۳% به‌صورت امولسیون در آورند [۸]. چمن رخ[۲] و همکاران نیز با استفاده از باکتری *استنوباکتر*[۳] موفق به تولید امولسان شدند که با استفاده از آن توانستند نفت خام را تا ۸۰% امولسیون کنند [۹]. در تحقیقات مشابه دیگری راشدی و همکارانش نیز توانستند با استفاده از میکروارگانسیم *سودوموناس آرجینیوزا*[۴] جدا شده از مخازن نفتی ایران (چاه‌های ایلام و سیری) درصد امولسیون نفت خام را تا ۸۲/۵ % برسانند [۱۰].

هزینهٔ زیاد از مشکلات مهم در مسیر تولید بیوسورفکتانت‌ها است. راه حل‌های مختلفی برای تولید بیوسورفکتانت ارزان پیشنهاد شده است از جمله می‌توان به بهینه‌سازی محیط کشت، بهینه‌سازی شرایط عملیاتی بیوراکتورها و جهش ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها اشاره کرد. در این پژوهش سعی شده است به بررسی بهینه‌سازی محیط کشت برای کاهش هزینه‌ها از طریق استفاده از مواد ارزان قیمت پرداخته شود زیرا استفاده از مواد ارزان قیمت باعث کاهش هزینه‌ها تا ۵۰ % از کل هزینه تولید می‌شود [۱۱]. برای رسیدن به این منظور می‌توان از مواد زائد صنایع دیگری مانند لبنی، کشاورزی و ... استفاده کرد تا باعث کاهش هزینه‌ها شود. به‌عنوان مثال پسماندهای صنعتی و کشاورزی با داشتن مقدار زیادی کربوهیدرات و لیپید بسیار می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای خوراک باکتری‌ها در تولید بیوسورفکتانت‌ها باشند [۱۰]، [۵]. در این پژوهش از آب پنیر که به‌عنوان مواد آلاینده محیطزیست در صنایع لبنی بسیار مطرح است به‌عنوان مواد غذایی برای تولید بیوسورفکتانت استفاده می‌شود. آب پنیر از پس‌ماندهای این گونه صنایع است که به‌همراه پنیر تولید می‌شود و مقادیر زیادی لاکتوز و پروتئین دارد. علاوه بر آن مواد معدنی و اسیدهای آلی و ویتامین‌ها نیز در آن وجود دارد. بنا بر این با مصرف آب پنیر به‌عنوان مادهٔ اولیهٔ غذایی برای باکتری‌ها هم تولید بیوسورفکتانت از طریق کاهش هزینه بهینه می‌شود و هم معضل آلودگی آب پنیر از بین می‌رود [۱۱]. نفت خام نیز به‌دلیل ارزان بودن در کشور ما و داشتن ترکیبات کربنی می‌تواند به‌عنوان منبع کربن مواد غذایی مناسب مطرح باشد.

هدف از پژوهش حاضر، بهینه‌سازی محیط کشت توسط روش تاگوچی[۵] برای تولید بیوسورفکتانت رامنولیپیدی توسط باکتری بومی *پسودوموناس آرجینیوزا* NP۲[۱] است که از آب پنیر و نفت خام و ساکاروز به‌عنوان تنها منبع کربنی استفاده می‌کند و در نهایت بررسی امولسیون‌شوندگی نفت خام با استفاده از رامنولیپید تولید شده است. در این راستا، نتایج این تحقیق می‌تواند به‌عنوان مدلی بومی به‌منظور امولسیون و پاک‌سازی نفت خام از روی سطح آب برای صنایع استفاده شود.

۱.Taguchi ۲. National Laboratory of Industrial Microbiology ۳. LB-Medium
۴.Yeast extract ۵. Nutrient agar ۶. Autoclave ۷. Shaking Incubator ۸. E-medium



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

## مواد و روش‌ها

### باکتری

باکتری *پسودوموناس آرجینیوز* NP۲ از آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه الزهرا[۱] تهیه شد. این باکتری از مناطق آلوده نفتی جداسازی شده بود.

### پیش کشت

از محیط LB [۲] (شامل عصاره مخمر[۳] ، تریپتون و NaCl به‌ترتیب ۵ ، ۱۰ و ۱۰ گرم در لیتر) به‌عنوان پیش کشت برای تولید رامنولیپید استفاده شد. برای تهیهٔ پیش کشت، ابتدا یک لوپ از باکتری رشد کرده در محیط نوترینت آگار[۴] را به یک ارلن cc ۵۰۰ که حاوی LB به مقدار cc ۱۰۰ است و از قبل به‌مدت۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C درون دیگ بخار[۵] قرار داده شده است منتقل کرده و سپس آن را ۲۴ ساعت در rpm ۱۵۰ و دمای ۳۷ °C در یک گرم خانهٔ لرزان[۶] ()[۷] قرار می‌دهیم.

### ترکیب محیط کشت تولید رامنولیپید

رشد سویه به‌صورت هوازی در محیط E[۸] انجام شد[۱۳]. همهٔ مواد شیمیایی مورد نیاز در این تحقیق از شرکت مرک آلمان خریداری شد. برای تهیهٔ محیط کشت ابتدا محلول A بر حسب گرم بر لیتر شامل ۱۳/۹ $Na_2HPO_4$ و ۲/۷ $NaH_2PO_4$ و۱۰ ساکاروز و۵۰ NaCl و ۰/۵عصارهٔ مخمر و ۱ $NaNO_3$ و محلول B شامل ۲۵ گرم بر لیتر از $MgSO_4$ و محلول C شامل ۱۰۰ گرم بر لیتر از $(NH_4)_2SO_4$ به‌صورت جداگانه به‌مدت۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C درون دیگ بخار قرار داده می‌شوند و سپس محلول D بر حسب گرم بر لیتر شامل ۰/۵ EDTA و۳ $MnSO_4,1H_2O$, و۰/۰۱ اسید بوریک و۱ NaCl و ۰/۱ $CaCl_2, 2H_2O$ و۰/۱ $ZnSO_4,7H_2O$ و ۰/۱ $FeSO_4,7H_2O$ و۰/۰۱ $CuSO_4,5H_2O$ ۰/۰۱ و $AlK(SO_4)_2$, ۰/۰۱ و $Na_2MoO_4,2H_2O$, و ۰/۰۰۵ $Na_2SeO_4$ و۰/۰۰۳ $NiCl_2,6H_2O$ به‌دلیل حساسیت به حرارت با فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی استریل می‌شود. در شرایط استریل ۱۰ml از محلول‌های B و C و D به یک لیتر از محیط A افزوده می شود. از آن‌جاکه تأمین سه منبع کربن، نیتروژن، و فسفر برای رشد باکتری کاملاً ضروری است و میکروارگانیسم‌ها در شرایط بهینه رشد بیش‌ترین میزان تولید بیوسورفکتانت‌ها را خواهند داشت، بنا بر این شناسایی شرایط بهینه برای رشد میکروارگانیسم‌ها امری ضروری به‌نظر می‌رسد. در این تحقیق، فاکتورهای[۹] مورد نیاز برای بررسی اثر مواد غیرآلی مانند منبع کربن، غلظت فسفر، غلظت نیتروژن و غلظت نمک برای بهینه‌سازی محیط

---

۱. National Laboratory of Industrial Microbiology ۲. LB-Medium ۳. Yeast extract
۴. Nutrient agar ۵. Autoclave ۶. Shaking Incubator ۷. Climo-shaker ISF1-X Kuhner
۸. E-medium
۹. پارامتری است که آزمایش به‌منظور بررسی اثر آن بر فرایند طراحی شده است



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

کشت انتخاب شده‌اند. طراحی آزمایش به معنی بررسی و در کنار هم قرار دادن آزمایش‌ها به‌منظور رسیدن به شرایط بهینه فرایندی با کم‌ترین هزینه است. طراحی آزمایش‌ها به‌صورت‌های مختلفی انجام می شود. طراحی نیرومند روشی مهندسی برای بهینه کردن شرایط فرآیند و محصول است، به‌گونه‌ای که محصول و فرآیند کم‌ترین حساسیت را نسبت به عوامل تغییر داشته و در نتیجه تولیداتی با کیفیت زیاد را به‌همراه دارد. طراحی پارامتر به روش تاگوچی ازابزارهای مهم برای طراحی نیرومند است [۱۲]. در این تحقیق از روش تاگوچی (DX۸ - ترایل)[۱] استفاده شد. جدول ۱ فاکتورهای بررسی شده و سطوح[۲] آن‌ها را نشان می‌دهد. همچنین جدول ۲ آرایهٔ $L_9$[۳] استفاده شده در این آزمایش و ترکیب محیط کشت در هر آزمایش را نشان می‌دهد. برای انجام آزمایش‌ها از ۹ ارلن ۵۰۰ سی‌سی که درون هر یک از آن‌ها ۱۰۰cc محیط کشت ریخته شده بود استفاده شد. لازم به ذکر است که برای بررسی تأثیر منبع کربن از هرکدام به غلظت (g/l)۱۰ یا (w/v) ۱% استفاده شدند. نفت خام با فیلتر ۰/۲۲µm استریل و آب پنیر بر طبق روش جوشی[۴] و همکارانش به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد [۱۱]. پس از آن‌که محتویات درون ارلن‌ها طبق جدول ۲ که با نرم‌افزار تا گوچی پیشنهاد شده بود آماده شدند، ۵ میلی‌لیتر از پیش کشت (باکتری رشده کرده در محیط LB) به درون هر یک از ارلن‌ها تلقیح و سپس درون شیکر انکوباتور در ۳۷°C و ۲۵۰ rpm به‌مدت ۵ روز قرار داده شدند.

**جدول ۱. فاکتورها و سطوح ۳ گانه به‌کار رفته در آزمایش‌ها**

| فاکتور | منبع کربن | NaCl (g/l) | $NaH_2PO_4$, $Na_2HPO_4$ (g/l) | $(NH_4)_2SO_4$ (g/l) |
|---|---|---|---|---|
| **سطح۱** | نفت | ۲۵ | ۰ | ۰/۵ |
| **سطح۲** | آب پنیر | ۵۰ | ۶/۷۵ | ۱ |
| **سطح۳** | ساکاروز | ۷۵ | ۱۳/۵۳ | ۲ |

**جدول ۲. طراحی آزمایش‌ها بر اساس $L_9$ تاگوچی**

| شماره آزمایش | منبع کربن | NaCl (g/l) | $NaH_2PO_4$, $Na_2HPO_4$ (g/l) | $(NH_4)_2SO_4$ (g/l) |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | نفت | ۲۵ | ۰ | ۰/۵ |
| ۲ | نفت | ۵۰ | ۶/۷۵ | ۱ |
| ۳ | نفت | ۷۵ | ۱۳/۵۳ | ۲ |
| ۴ | آب پنیر | ۲۵ | ۶/۷۵ | ۲ |
| ۵ | آب پنیر | ۵۰ | ۱۳/۵۳ | ۰/۵ |
| ۶ | آب پنیر | ۷۵ | ۰ | ۱ |
| ۷ | ساکاروز | ۲۵ | ۱۳/۵۳ | ۱ |
| ۸ | ساکاروز | ۵۰ | ۰ | ۲ |
| ۹ | ساکاروز | ۷۵ | ۶/۷۵ | ۰/۵ |

۱. DX8- trial

۲. سطح مقدار نسبت داده شده به هر فاکتور را نشان می‌دهد

۳. اندیس نشان‌دهندهٔ تعداد آزمایش‌هایی است که باید انجام گیرد

۴. Joshi



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

**جداسازی زیست توده، استخراج و خالص‌سازی بیوسورفکتانت تولید شده**

به ml ۱ از نمونه گرفته شده محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر $H_3PO_4$ و ml ۱/۲۵ اتیل‌استات اضافه می‌شود [۱۳]-[۱۶]. مدت ۳۰ دقیقه در g ×۱۲۰۸۶ در$^{\circ}C$۴ سانتریفیوژ شد. (هرئوس، مولتی‌فوژل)[۱] و سپس فاز آلی آن جدا شد. برای اطمینان بیش‌تر از جداسازی، بار دیگر فاز آبی با ml ۱/۲۵ اتیل‌استات استخراج شد. بعد از تبخیر اتیل‌استات در دمای ۵۰ و rpm۲۰۰۰ درون یک تبخیر کننده، رامنولیپید زرد رنگ ظاهر می‌شود. خالص‌سازی بیش‌تر با استفاده از TLC[۲] یا کروماتوگرافی لایه‌نازک ( 25% 60 F254 plates ) صورت می‌گیرد. در این روش فاز متحرک شامل کلروفرم: متانل:استیک اسید (۲:۱۵:۶۵) است که این فاز متحرک باعث جدایی ۴ نوع رامنولیپید می‌شود. بعد از این مرحله کاغذ را درون محلول اسید ولفوریک:اسیتیک اسید (۵۰:۱) آغشته کرده و بعد از خشک شدن از آن عکس گرفته می‌شود. از استاندارد جنیل[۳] ()[۴] به‌عنوان شاهد استفاده شد [۱۴]-[۱۶]. استاندارد جنیل شامل رامنولیپیدهای ۱ و ۲ و۳ و ۴ است که با *پسودوموناس آرجینیوزا* تولید می‌شود. برای تعیین غلظت رامنولیپید از دستگاه HPLC[۵] ()[۶] استفاده شد. ستون استفاده شده در دستگاه C۱۸ با قطر ۵ میکرومتر و دبی تزریق ml/min ۰/۸ است. برای استفاده از دستگاه HPLC ابتدا باید آن‌را آماده کرد. برای این منظور ابتدا به آماده کردن محلول A (۴۰ میلی‌مولار ۴- بروم فناکیل برمید در استونیتریل)[۷] و محلول B (۲۰ میلی‌مولار ۳-اتیل آمونیوم در استونیتریل)[۸] و محلول C ( مخلوط کردن محلول A وB به نسبت مساوی) می‌پردازیم سپس به نمونه‌های رامنولیپید که از قبل استخراج و در۳۶۰ میکرولیتر استونیتریل حل شده‌اند، ۴۰ میکرولیتر از محلول C اضافه می‌کنیم. هم‌چنین از محلول ۹۵% آب مقطر و ۵% متانل به‌عنوان فاز متحرک در دستگاه استفاده می‌شود.

**اندازه‌گیری میزان امولسیون کنندگی**

چهار میلی‌لیتر از محلول بیوسورفکتانت تولید شده با باکتری با غلظت g/l ۲/۸ به لولهٔ مدرج حـــاوی چهار میلی‌لیتر از نفت خام افزوده شد. این لوله‌ها مدت سه دقیقه به‌شدت مخلوط شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت فاکتور[۹] $E_{24}$ ، از تقسیم ارتفاع ناحیهٔ سوسپانسیون شده بر مجموع ارتفاع دو سیال محاسبه می‌شود[۹]، [۱۰].

یکی از فاکتورهای بسیار مهم در فرآیند ازدیاد برداشت میکروبی پس از تولید بیوسورفکتانت میزان پایداری حالت تعلیق است. برای کنترل آزمایش‌ها، محیط کشت بدون میکرو اورگانیسم به نفت خام به‌عنوان محلول شاهد اضافه شد.

---

۱. Multifuge1S-R, Heraeus ۲. Thin Layer Chromatography ۳. Jeneil
۴. United States, Saukkville ۵. High Performance Liquid Chromatography
۶. Agilent 1100 Series ۷. Bromphenacylbromid (C6H6Br2O) in Acetonitril
۸. Triethylammonium (C5H15N) in Acetonitril ۹. Emulsion index



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

**اندازه‌گیری گسترش نفت خام[1]**

ابتدا۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون پلیت ریخته می‌شود سپس ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام به آن افزوده خواهد شد. بعد از ۱ تا ۲ دقیقه که لایهٔ یک‌نواختی بر سطح آب تشکیل شد، ۱۰ میکرولیتر از بیوسورفکتانت تولید شده را به آن افزوده و قطر ناحیهٔ شفاف ایجاد شده در سطح لایهٔ نفتی را در مقایسه با شاهد (حجم یکسانی آب مقطر) بررسی می‌شود [۸]، [۱۰]. این آزمایش نشان‌دهندهٔ قوی و کارا بودن بیوسورفکتانت تولیدی برای کنار زدن نفت خام از روی آب است.

## نتایج و بحث

**بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت**

طراحی آزمایش‌ها طبق نرم‌افزار تاگوچی انجام شد. جدول ۳ آرایه $L_9$ استفاده شده در این آزمایش، ترکیب محیط کشت و در نهایت تولید بیوسورفکتانت را به‌عنوان پاسخ یا تابع هدف در هر آزمایش نشان می‌دهد. برای بهینه‌سازی محیط کشت، اثر فاکتورهای منبع کربن، غلظت نیتروژن، غلظت فسفر و غلظت نمک بر میزان تولید بررسی شد. برای این منظور، مقدار تولید بیوسورفکتانت در هر ۹ آزمایش اندازه‌گیری شد.

**جدول۳. نتایج مربوط به تولید رامنولیپید بر اساس طراحی تاگوچی**

| شمارهٔ آزمایش | منبع کربن | NaCl (g/l) | $NaH_2PO_4$, $Na_2HPO_4$ (g/l) | $(NH_4)_2SO_4$ (g/l) | تولید بیوسورفکتانت (g/l) |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | نفت | ۲۵ | ۰ | ۰/۵ | ۱/۶ |
| ۲ | نفت | ۵۰ | ۶/۷۵ | ۱ | ۱/۸ |
| ۳ | نفت | ۷۵ | ۱۳/۵۳ | ۲ | ۱/۲ |
| ۴ | آب پنیر | ۲۵ | ۶/۷۵ | ۲ | ۲ |
| ۵ | آب پنیر | ۵۰ | ۱۳/۵۳ | ۰/۵ | ۲/۲ |
| ۶ | آب پنیر | ۷۵ | ۰ | ۱ | ۱/۸ |
| ۷ | ساکاروز | ۲۵ | ۱۳/۵۳ | ۱ | ۲/۸ |
| ۸ | ساکاروز | ۵۰ | ۰ | ۲ | ۲/۶ |
| ۹ | ساکاروز | ۷۵ | ۶/۷۵ | ۰/۵ | ۲/۵ |

همچنین به‌منظور بررسی اثر هر یک از فاکتورها و چگونگی اثرگذاری این فاکتورها بر روی تولید بیوسورفکتانت، تأثیر هر یک از عوامل چهارگانه در سطوح مختلف محاسبه شدند. نمودارهای میله‌ای مربوط به نتایج در شکل‌های ۱ و۲ نشان داده شده است. به‌منظور بررسی درصد سهم هر یک از فاکتورها در تولید بیوسورفکتانت، از تحلیل واریانس که در نرم‌افزار وجود دارد استفاده شد. جدول ۴ میانگین هر یک از فاکتورها

۱. Oil Spreading



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

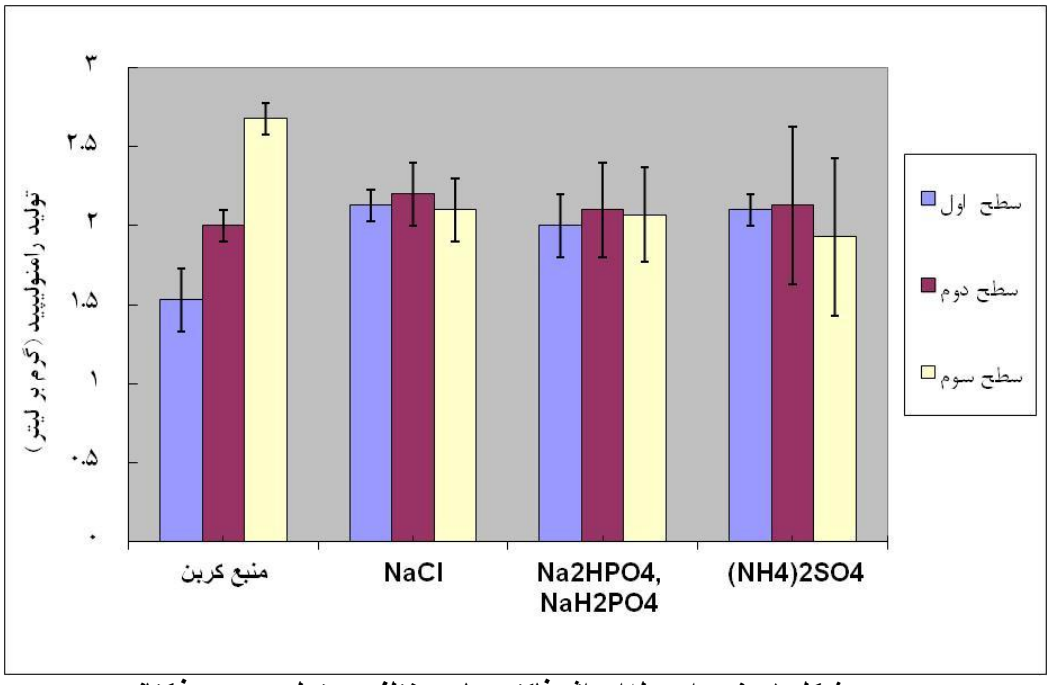
و همچنین جدول ۵ آنالیز واریانس در مورد نتایج تولید را نشان می‌دهد. شکل ۳ نیز درصد سهم هریک از فاکتورها را در تولید بیوسورفکتانت نشان می‌دهد.

**جدول ۴. میانگین هر یک از فاکتورها**

| فاکتور | منبع کربن (g/l) | NaCl (g/l) | $NaH_2PO_4$, $Na_2HPO_4$ (g/l) | $(NH_4)_2SO_4$ (g/l) |
|---|---|---|---|---|
| | متوسط | متوسط | متوسط | متوسط |
| سطح اول | ۱/۵۳ | ۲/۱۳ | ۲ | ۲/۱ |
| سطح دوم | ۲ | ۲/۲ | ۲/۱ | ۲/۱۳ |
| سطح سوم | ۲/۶۳ | ۱/۸۳ | ۲/۰۶۵ | ۱/۹۳ |

**جدول ۵. آنالیز واریانس در مورد نتایج تولید رامنولیپید**

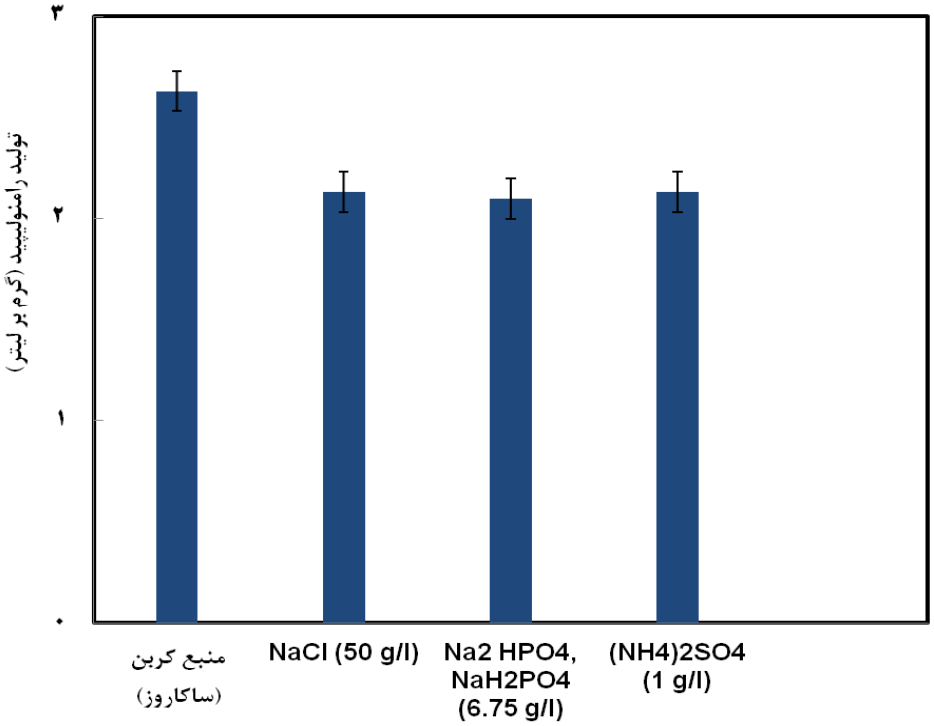
| فاکتور | مجموع مربعات | مربع میانگین | سهم (%) |
|---|---|---|---|
| منبع کربن | ۱/۹۳ | ۰/۹۱ | ۸۶/۳۱ |
| NaCl | ۰/۲۳ | ۰/۱۱ | ۱۰/۲۸ |
| NaH $N_2PO_4$, $Na_2HPO_4$ | ۰/۰۱۶ | ۰/۰۰۷۷ | ۰/۷۱ |
| $(NH_4)_2SO_4$ | ۰/۰۶۰ | ۰/۰۳۴ | ۳/۰۸ |



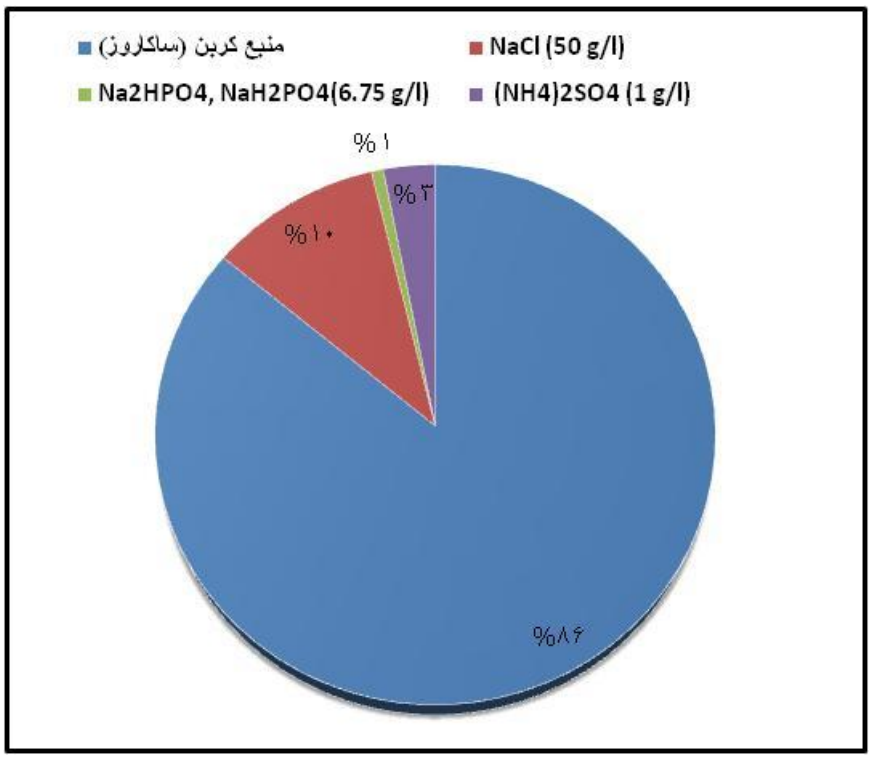

**شکل ۱. نمودار میله‌ای اثر فاکتورهای مختلف بر تولید بیوسورفکتانت**



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]




**شکل ۲. سطوح بهینه برای تولید بیوسورفکتانت**




**شکل ۳ . درصد سهم هر یک از فاکتورها در تولید بیوسورفکتانت**



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

شکل‌های ۱و ۲ نشان می‌دهند که باکتری *پسودوموناس آرجینوزا* NP۲ بیش‌ترین میزان تولید بیوسورفکتانت استفاده شده در این تحقیق، در شرایط ۵۰ گرم بر لیتر منبع نمک ،۶/۷۵ گرم بر لیتر منبع فسفر و ۱ گرم بر لیتر منبع نیتروژن با منبع کربنی ساکاروز تولید می‌شود. هم‌چنین از شکل ۳ مشخص است منبع کربن بیش‌ترین سهم برای تولید بیوسور فکتانت دارد. با توجه به این‌که سطوح بهینه تولید بیوسورفکتانت در موقعی صورت گرفته است که رشد باکتری روی ساکاروز رخ داده است می‌توان این نتیجه را به راحت‌تر هضم شدن یا به‌عبارت دیگر به آسان‌تر تخمیر شدن ساکاروز نسبت به آب‌پنیر و نفت خام نسبت داد. اما در تولید صنعتی بیوسورفکتانت به‌دلیل این‌که ساکاروز زیادی لازم است، استفاده از آن اقتصادی نیست بنا بر این به‌عنوان جای‌گزین مناسب از آب پنیر می‌توان استفاده کرد. آب پنیر مایعی است که به‌همراه پنیر تولید می‌شود و حاوی عناصر قابل حل در آب است و مقادیر زیادی لاکتوز و پروتئین دارد. علاوه بر آن مواد معدنی و اسیدهای آلی و ویتامین‌ها نیز در آن وجود دارد. بنا بر این با مصرف آب پنیر به‌عنوان مادۀاولیه غذایی برای باکتری‌ها معضل آلودگی آب پنیر برای صنایع لبنی از بین می‌رود. نفت خام نیز به‌دلیل ارزانی در کشور ما و داشتن ترکیبات کربنی می‌تواند به‌عنوان منبع کربن در تولید بیوسورفکتانت‌ها مطرح باشد. شکل ۳ نشان می‌دهد بعد از غلظت کربن، غلظت نمک نقش مهمی در تولید بیوسورفکتانت دارد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در مورد رشد باکتری در سطح بهینه غلظت نمک (۵۰ g/l)، این باکتری گزینۀ خوبی برای رشد در محیط‌های نمکی است. از آن‌جا که نفت خام معمولاً به‌وسیلۀ کشتی‌ها و یا شکستگی لوله‌ها به دریا و اقیانوس‌ها ریخته می‌شود، در عمل برای امولسیون کردن نفت خام با توجه به شوری آب دریا و اقیانوس‌ها استفاده از باکتری‌های نفت‌خوار و نمک دوست برای تولید بیوسورفکتانت ضروری است. بنا بر این با توجه به نتیجه این قسمت می‌توان باکتری استفاده شده در این تحقیق را برای امولسیون کردن نفت خام در دریا و اقیانوس‌ها پیشنهاد کرد. هم‌چنین با توجه به شکل ۳ می‌توان دریافت منبع نیتروژن نیز در حدود ۳% سهم در تولید بیوسورفکتانت دارد و کم‌ترین سهم متعلق به منبع فسفر است. البته این نکته قابل توجه است که وجود مقداری ترکیبات فسفری در محیط کشت به‌منظور رشد سلولی کاملاً ضروری است زیرا در صورتی که میکروارگانیزم قادر به رشد مناسب نباشد ممکن است بسیاری از متابولیت‌های مناسب را تولید نکند.

**اثبات تولید رامنولیپید**

به‌دلیل این‌که معمولاً باکتری‌های *سودوموناس آرجینوزا* بیوسورفکتانت رامنولیپید تولید می‌کند، در این تحقیق از شاهد و استاندارد جنیل برای تشخیص رامنولیپید استفاده شد. برای این منظور بعد از استخراج رامنولیپید با اتیل‌استات، ابتدا به بررسی تولید آن (۹ آزمایش) با کروماتوگرافی لایۀ نازک (TLC ) پرداخته شد. نتایج این آزمایش در شکل ۴ نشان داده شده است. چنان‌که در این شکل دیده می‌شود، شاهد جنیل ایجاد ۴ لکۀ زرد رنگ روی کاغذ TLC میکند که ناشی از وجود ۴ نوع رامنولیپید با ساختارهای مختلف است [ ۱۴]. این



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

بیوسورفکتانت‌ها متشکل از یک یا دو مولکول رامنوز در اتصال با یک یا دو مولکول بتاهیدروکسی دکانوئیک اسید هستند [۱۴]، [۱۵]. بر طبق مقالات قبلی [۱۳]، [۱۴] ساختمان رامنولیپید نوع ۱ شامل یک حلقه رامنوز به‌همرا دو مولکول اسید (Rha-C۱۰-C۱۰)، رامنولیپید نوع ۲ شامل دو حلقه رامنوز به‌همراه دو مولکول اسید (Rha۲–C۱۰-C۱۰)، رامنولیپید نوع ۳ شامل یک حلقه رامنوز به‌همراه یک مولکول اسید (Rha-C۱۰) و رامنولیپید نوع ۴ شامل دو حلقه رامنوز به‌همراه یک مولکول اسید است (Rha۲–C۱۰). همچنین نتایج حاصل از این شکل بیانگر این است که باکتری *پسودوموناس آرجینیوزا* NP ۲ استفاده شده در این تحقیق توانسته است رامنولیپید نوع ۱ و نوع ۳ را تولید کند. این نتیجه با نمونه‌های ذکر شده دیگر محققین سازگار است به‌عنوان مثال این نتیجه با نتایج ذکر شدهٔ هورمان[۱] و همکارانش [۱۴]، و مولر[۲] همکارانش [۱۵] و سیلداک[۳] و همکارانش تایید می‌شود [۱۶]. آن‌ها نیز در آزمایش‌های خود با دیدن دو لکهٔ زرد رنگ به وجود دو نوع بیوسورفکتانت رامنولیپید پی بردند. این یافته‌ها نشان‌دهندهٔ معتبر بودن نتایج این تحقیق است.

**شکل ۴. نتایج کروماتوگرافی از محصول به‌دست آمده از ۹ آزمایش طراحی شده به‌وسیلهٔ تاگوچی با استفاده از لایه چهار لکه وسط به‌عنوان شاهد از استاندارد جنیل به‌دست آمده است**

توجه به این نکته لازم است که برای اندازه‌گیری غلظت رامنولیپید باید از دستگاه HPLC استفاده کرد. برای این منظور، ابتدا تزریق رمنولیپیدهای نوع اول و دوم به تنهایی با دستگاه انجام شد و دو پیک در خروجی بین زمان‌های ۲۵-۲۰ دقیقه مشاهده شد. سپس تزریق نمونه‌های مجهول حاصل از این تحقیق صورت گرفت. نتایج نشان از وجود دو پیک در همان محل‌ها و زمان‌ها بود که نشان‌دهندهٔ معتبر بودن نتایج حاصل از این تحقیق است. بنا بر این استفاده از دستگاه HPLC این مزیت را دارد که با توجه به زمان خرو جی پیک‌ها و مقایسهٔ آن‌ها ، هم وجود رامنولیپیدها اثبا ت می‌شود و هم غلظت اندازه‌گیری می‌شود.

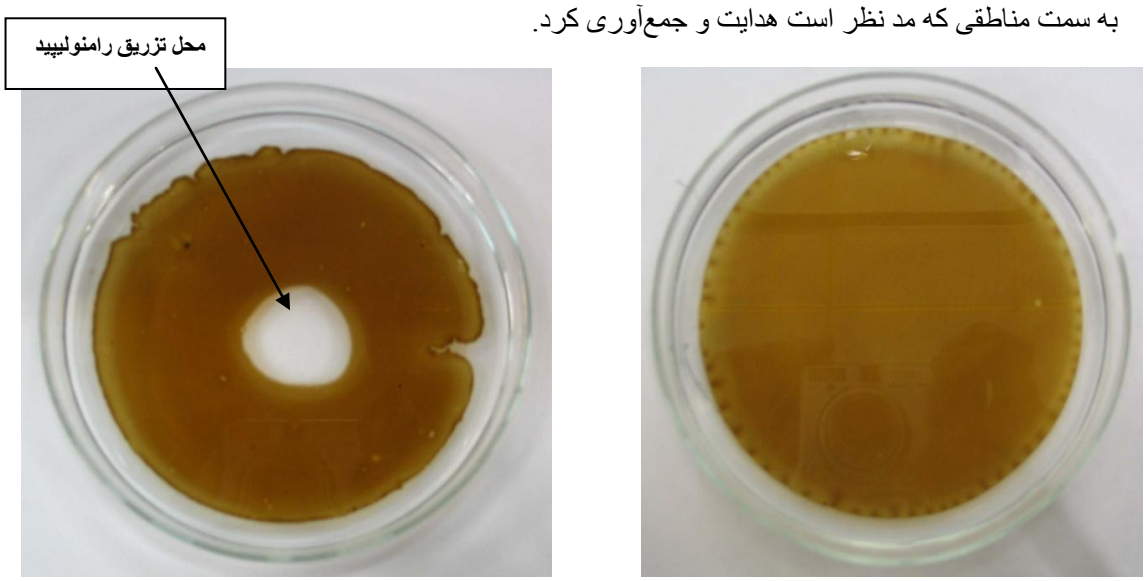
۱. Müller ۲. Hörmann ۳. Syldatk



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

**نتایج آزمایش‌های مربوط به محیط زیست**

با توجه به هدف نهایی این تحقیق مبنی بر تعیین مقدار امولسیون شوندگی نفت خام، بررسی میزان حالت تعلیق ($E_{۲۴}$) امری ضروری است. اما علاوه بر مقدار امولسیون پایداری امولسیون تشکیل شده نیز مهم است. نتایج نشان داد رامنولیپید تولید شده در این پژوهش با غلظت ۲/۸ g/l توانایی امولسیون کردن نفت خام تا ۸۰% را دارد و پایداری این حالت امولسیون تا ۱۵ روز پس از آزمایش باقی ماند که نتایج خوبی است. این نتایج نشان می‌دهد که بیوسورفکتانت تولید شده با این باکتری پتانسیل خوبی برای امولسیون‌سازی نفت خام دارد. این نتایج با نتایج تحقیقات مشابهی که راشدی و همکاران [۱۰] و همچنین چمن رخ و همکاران [۹] با اندازه‌گیری فعالیت امولسیون کنندگی بیوسورفکتانت روی هیدروکربن‌های مختلف انجام دادند، سازگار است. در آزمایش تکمیلی دیگر برای بررسی قدرت کنارزنی نفت خام از روی آب، ابتدا۱۰۰ میکرولیتر نفت خام بر روی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده می‌شود و سپس ۱۰ میکرولیتر از رامنولیپید تولید شده را با غلظت ۲/۸ g/l به آن افزوده می‌شود و قطر ناحیهٔ شفاف ایجاد شده در سطح لکهٔ نفتی بررسی می‌شود. چنان‌که در شکل ۵ دیده می‌شود وقتی بیوسورفکتانت رامنولیپید به ظرف اضافه می‌شود، این ماده بین دو فاز نفت و آب قرار می‌گیرد و می‌تواند به‌راحتی نفت خام را کنار بزند یا به‌عبارت دیگر ناحیهٔ شفافی روی نفت خام ظاهر می‌گردد به‌طوری‌که طرف دیگر ظرف به‌راحتی دیده می‌شود. این آزمایش نشان‌دهندهٔ مناسب بودن بیوسورفکتانت تولید شده به‌منظور جداسازی نفت خام از روی آب است. از این خاصیت می‌توان جداسازی نفت خام از روی آب دریا وقتی که در اثر سوانح دریایی نفت خام روی آب ریخته می‌شود استفاده کرد. به‌عبارت دیگر می‌توان نفت خام را با این روش به سمت مناطقی که مد نظر است هدایت و جمع‌آوری کرد.




**شکل ۵. ایجاد لایهٔ نفتی بر روی سطح آب (شکل سمت راست) و تشکیل ناحیهٔ شفاف در سطح لایهٔ نفتی پس از افزودن رامنولیپید تولید شده (شکل سمت چپ)**



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

## نتیجه‌گیری

در این تحقیق، از باکتری *پسودوموناس آرجینیوزا* NP۲ برای تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید استفاده شد تا قدرت آن در امولسیون کردن نفت خام و کنار زدن آن از روی آب بررسی شود. اما از مشکلات مهم در مسیر تولید بیوسورفکتانت‌ها هزینه زیاد تولید آن‌هاست. در این پژوهش سعی شد به بررسی بهینه‌سازی محیط کشت برای کاهش هزینه‌ها از طریق استفاده از مواد ارزان قیمت به‌عنوان یکی از این راه حل‌ها برای رفع مشکل پرداخته شود. شرایط بهینه محیط کشت از قبیل منابع کربنی مختلف، اثر غلظت نمک، فسفر و نیتروژن برای تولید رامنولیپید به کمک روش تاگوچی تعیین شد. نتایج نشان داد که ساکاروز بهترین منبع کربن برای تولید رامنولیپید است و بهترین میزان هر یک از منابع دیگر به‌ترتیب ۵۰ ،۶/۷۵ و ۱ گرم بر لیتر تعیین شد. حداکثر مقدار تولید رامنولیپید در این شرایط به g/l ۲/۸ رسید. نتایج نشان داد غلظت کربن دارای نقش مهمی در تولید بیوسورفکتانت است، اما در تولید صنعتی بیوسورفکتانت به‌دلیل این‌که ساکاروز زیادی نیاز است، استفاده از آن اقتصادی نیست بنا براین می‌توان آب پنیر یا نفت خام را به‌عنوان جای‌گزین مناسب پیشنهاد داد. پس از اثبات تولید این ماده با آزمون TLC و استاندار جنیل مقدار قدرت امولسیون‌کنندگی آن اندازه گیری شد. شاخص امولسیون‌سازی رامنولیپید تولید شده ۸۰% برای نفت خام به‌دست آمد. این نتایج نشان‌گر پتانسیل خوب *پسودوموناس آرجینیوزا* NP۲ برای تولید رامنولیپید و همچنین مؤثر بودن تکنیک استفاده شده برای امولسیون‌سازی نفت خام به‌عنوان مدلی بومی است. با توجه به موارد موفقیت‌آمیز ذکر شده و همچنین آلودگی‌های فراوان ناشی از نشت نفت خام در دریا، به‌نظر می‌رسد انجام پژوهشی در زمینه تولید بیوسورفکتانت‌ها و استفاده از آن‌ها برای این منظور ضروری است.

## منابع


1. R. Sen, "Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR", Progress in Energy and Combustion Science, 34 (2008) 714-724.
2. M. M. Mueller, J. H. Kuegler, M. Henkel, M.Gerlitzki, B. Hörmann, M. Pöhnlein, C. Syldatk, R. Hausmann, "Rhamnolipids-next generation surfactants?", Journal of Biotechnology, 162 (2012) 366-380.

۳. رضا رمضانی، مهناز مظاهری اسدی، مهرداد آذین، *تولید رامنولیپید توسط باکتری سودوموناس ائروجینوزا از ملاس چغندر قند تیمار شده*، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، جلد ۹، شماره ۳ (۱۳۹۰) ۵۲۴-۵۱۱.

4. M. Benincasa, J. Contiero, M.A. Manresa, I.O. Moraes, "Rhamnolipid production by pseudomonas aeruginosa Lbi.", Journal of Food Engineering, 54 (2004) 283-288.




[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

5. D. Sharma, B.S.Saharan, "Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic Lactobacillus casei MRTL3", International Journal of Microbiology, (2014) Article ID 698713.

6. H. Amani, M. R. Mehrnia, M. Haghighi , M. H. Sarrafzadeh , M. R. Soudi, "Scale up and Application of Biosurfactant from Bacillus subtilis in Enhanced Oil Recovery", Applied Biochemistry and Biotechnology, 162 (2010) 510-523.

7. Q. Li, K. Congbao, Z. Changkai, "Wastewater produced from an oilfield and continuous treatment with and oil-degrading bacterium", Process Biochemistry, 40 (2005) 873-877.

8. A. R.Talaie, M. R Talaie, N. J. Haghighifar, "Optimizing biodegradation of floating diesel fuel contaminated wastewater using the taguchy method", Journal of Water and Wastewater, 20 (2009) 57-68.

9. P. Chamanrokh, M. Mazaheri, G. Amoabediny, H. R. Rashedi, "Cleaning oil contaminated vessel by emulsan producers (Autochthonous Bacteria)", Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering, 7 (2010) 209-222.

10. H. R. Rashedi, M. Mazaheri, E. Jamshidi, B. Bonakdarpour, "Optimization of the production of biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa HR isolated from an IranianSouthern oil well", Iranian Journal of chemical Engineering, 25 (2006) 25-30.

11. S. Joshi, C. Bharucha, S. Jha, S. Yadav, A. Nerurkar, A.J. Desai, "Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions", Bioresource Technology, 99 (2008) 195-199.

12. M. Teruo, "The New Experimental Design, Taguchi's Approach To Quality Engineering", ASI Press, First Editon, Printed In The United States Of American (1990).

13. N. H. Youssef, K. E. Duncan, D. P. Nagle, K. N. Savage, R. M. Knapp, M. J. McLnerney, "Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms", J.of Microbiol, Meth., 56 (2004) 339-347.

14. B. Hörmann, M. M. Müller, C. Syldatk, R. Hausmann, "Rhamnolipid production by Burkholderia plantarii DSM 9509", Eur. J. Lipid Sci. Technol., 112 (2010) 674-680.



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]

15. M. M. Müller, B. Hörmann, C. Syldatk, R. Hausmann., " Pseudomonas aeruginosa PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor system", Appl. Microbiol. Biotechnol., 87 (2010) 167-174.
16. C. Syldatk, S. Lang, F. Wagner, V. Wray, L. Witte, "Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from Pseudomonas spec. DSM 2874 grown on n-alkanes", Z Naturforsch, 40 (1985) 51-57.

[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22 ]