نشریه علوم و مهندسی جداسازی
دوره هشتم، شماره اول، سال ۱۳۹۵، صفحه ۳۵-۴۳

Journal of Separation Science and Engineering
Vol. 8, No. 1, pp. 35-43

جداسازی سویه‌ای از *Bacillus Licheniformis* و *Bacillus Subtilis* از مخازن نفتی گچساران و چشمه خوش و بهینه‌سازی شرایط رشد آن‌ها

زهرا استخر [۱]، فاطمه حیدری [۲،*]، نصرالله شکیباصفت [۳]

۱. دانشکده مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲. گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
۳. شرکت مناطق نفت‌خیز جنوب، اهواز، ایران

مشخصات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۲۶ آبان ۹۴
دریافت پس از اصلاح: ۲۹ بهمن ۹۴
پذیرش نهایی: ۲۶ اسفند ۹۴

کلمات کلیدی:
جداسازی
بیوسورفاکتانت
باکتری
باسیلوس سوبتیلیس
باسیلوس لیکنیفورمیس

چکیده

به‌منظور بررسی قابلیت استفاده از روش ازدیاد برداشت میکروبی نفت در ایران، جداسازی باکتری از نمونه نفت خام مخازن نفتی گچساران و چشمه خوش انجام شد. قابلیت جداسازی به‌منظور تولید بیوسورفاکتانت توسط محیط کشت اختصاصی بررسی شد. باکتری‌ها نیز در محیط‌های غنی‌شده با منابع مختلف کربنی ازجمله آب پنیر، سویا، نشاسته، ملاس، آب نخود، روغن زیتون و کنجد کشت داده شدند و درنهایت منحنی رشد آن‌ها پس از ۷ روز به‌منظور تعیین وضعیت رشد مطلوب آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. مؤثرترین مواد مغذی آب پنیر، نشاسته و آب سویا بودند. شناسایی باکتری‌ها با دو روش مولکولی و بیوشیمیایی انجام شد. درمجموع با توجه به نتایج بیوشیمیایی و تست‌های *16sr RNA*، این سویه‌ها در جنس باسیلوس طبقه‌بندی گردیدند. سویه‌های شماره ۵، *Bacillus licheniformis* با کد شناسایی JN033541 و شماره ۷,*Bacillus subtilis* با کد شناسایی JN0335542 در بانک ژن آمریکا ثبت شدند.

* عهده‌دار مکاتبات
f.heidari@yu.ac.ir

حقوق ناشر محفوظ است.

۱-مقدمه

انرژی نقش مهمی در ثبات اجتماعی و قدرت اقتصادی یک کشور ایفا می‌کند. با توجه به گزارش آژانس بین‌المللی انرژی[1]، نفت خام همچنان هم به عنوان یکی از منابع مهم انرژی در ۳۰ سال آینده می‌باشد، این در حالی است که تقاضای جهانی انرژی برای نفت خام در طول ۲۵ سال آینده با ۵۰٪ افزایش همراه خواهد بود [۱ و ۲].

یک مخزن نفتی می‌تواند تا زمانی که فشار و انرژی کافی دارد، نفت تولید کند و بعد از از دست دادن انرژی طبیعی‌اش، نفت خام بیشتر می‌تواند با اعمال انرژی خارجی استخراج گردد. اول، گاز به مخزن تزریق شده و یا آب به لایه آب خوان به‌منظور تأمین فشار مورد نیاز تزریق می‌شود. پس از آن، جاری شدن سیل گاز و یا جاری شدن سیلآب باعث حرکت نفت می‌شود. هنگامی که اثربخشی این روش کاهش یافت، تکنیک ازدیاد برداشت نفت[2] مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳]. ازدیاد برداشت را می‌توان با روش‌های مختلف از جمله حرارتی، شیمیایی و میکروبی انجام داد [۳]. ازدیاد برداشت میکروبی نفت[3] (MEOR) به هر روش بازیافت نفت که در آن یک میکروارگانیسم تنها با محصولات جانبی‌اش مورد استفاده قرار می‌گیرد، اطلاق می‌شود. میکروارگانیسم‌ها به‌منظور بهبود استخراج و تولید نفت از بیش از ۶۰ سال پیش تاکنون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در دهه ۱۹۴۰ میلادی، زوبل برای اولین بار نشان داد که باکتری‌های بی‌هوازی احیاکننده گوگرد می‌توانند نفت قیر را از ماسه‌های نفتی جدا کنند. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند بازیافت نفت را با چند مکانیزم مختلف افزایش دهند [۴]. تولید بیوسورفاکتانت شایع‌ترین مکانیزم مورد استفاده در MEOR است، زیرا می‌تواند کشش سطحی را کاهش داده و نفت را به حالت تعلیق درآورد. شوری (بیش از ۱۲٪)، دما (بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد)، pH و نفوذپذیری بسیار کم از جمله محدودیت‌های روش MEOR می‌باشند. سه مسئله‌ی اول ممکن است در آینده با پیدا کردن سویه‌های نمک دوست و گرمادوست حل شود، اما مشکل آخر نیاز به یک استراتژی چندمرحله‌ای و یا یکپارچه‌سازی روش‌های شیمیایی و بیوکاتالیک[4] دارد [۵]. به عنوان مثال پروماچان و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که Arthrobacter protophormiae می‌تواند در محدوده دمای ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بیوسورفاکتانت تولید کند [۶]. کیم و همکارانش (۱۹۹۷) دریافتند که باسیلوس سوبتیلیس C9 می‌تواند کشش سطحی را در محدوده pH گسترده ۵ تا ۹/۵ کاهش دهد [۷]. همچنین، یاکیموو و همکاران (۱۹۹۵) باسیلوس فرمیس BAS50 تشکیل‌شده در عمق ۱۵۰۰ متر چاه نفت را که می‌تواند در شوری ۱۳ درصد رشد کند جداسازی کردند [۸].

بدیهی است که انتخاب میکرواورگانیسم، نحوه تغذیه آن، دوره افزودن مواد غذایی و اکسیژن و...به عمق چاه، نوع نفت، مقدار آب و ساختار زمین‌شناختی مخزن بستگی دارد. تجربه به‌کارگیری ازدیاد برداشت میکروبی در مخازن مختلف و برای انواع مختلف نفت نشان داده است که عوامل اضافه‌شده مذکور مشکلی در فرآیند پالایش پیش نمی‌آورند. حتی در بسیاری از میدان‌های نفتی تداوم فعالیت فلور میکروبی سبب کاهش آب همراه نفت و مقدار سولفید هیدروژن و خوردگی می‌شود. گاهی برای تقویت میکرواورگانیسم‌ها و تسریع حصول نتیجه، مواد مغذی (نمک‌های معدنی مثل نمک‌های فسفر و نیتروژن و یا ترکیبات آلی مانند ملاس) نیز به چاه تزریق می‌شوند؛ گاهی هدف پروژه فعال کردن میکروفلور طبیعی منطقه به کمک تزریق مواد مغذی است و باکتری اضافی تزریق نمی‌شود لذا مقرون به صرفه‌تر است [۹].

ازدیاد برداشت میکروبی تکنیکی مؤثر و سازگار با محیط‌زیست است و نیازی به اصلاح تجهیزات تزریق آب به مخزن ندارد. همچنین کارخانه‌های تولید سلول میکروبی به انرژی ورودی کمی برای تولید عوامل میکروبی نیاز دارند. به علاوه کاربرد فرآیندهای میکروبی مستقیماً به قیمت جهانی نفت خام بستگی ندارد. با توجه به تجربه‌های میدانی انجام‌شده، فرآیند ازدیاد برداشت میکروبی یک روش مؤثر در مخازن کربناته و ماسه سنگی می‌باشد [۱۱-۱۰]. تمامی مزایای فوق نشان می‌دهد که این روش یک روش کارآمد و مقرون‌به‌صرفه برای مخازن نفتی می‌باشد. نوآوری این پژوهش در استفاده از باکتری‌ها به‌منظور ازدیاد برداشت میکروبی، فراهم کردن شرایط مناسب تولید بیوسورفاکتانت و پایین آوردن کشش سطحی نفت می‌باشد. این تحقیق با هدف جداسازی سویه‌ای از باکتری‌های مخازن نفتی دو منطقه گچساران و چشمه خوش برای دست‌یابی به شرایط بهینه و شناسایی باکتری‌های مفید جهت ازدیاد برداشت از نظر بیوشیمیایی و مولکولی و مطالعه دقیق بر چگونگی رشد و شرایط تکثیر آن‌ها انجام گرفت.

[1] International Energy Agency
[2] Enhanced Oil Recovery
[3] Microbial Enhanced Oil Recovery
[4] Biocatalytic

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- نمونه‌سازی

نمونه‌های نفت خام از چشمه خوش و گچساران جمع‌آوری شد. جهت نمونه‌برداری از بطری‌های شیشه‌ای سترون شده استفاده شد.

۲-۲- محیط کشت

محیط کشت اختصاصی محلول نمک معدنی MSSO[1] مطابق با کار موریکاوا و همکارانش انتخاب گردید [۱۲]. این محیط به‌منظور حذف منبع ساکارز آن و اضافه کردن منابع کربنی مورد نظر، مدنظر قرار گرفت. از جنبه دیگر، هدف اصلی استفاده از محیط کشت اختصاصی در واقع رشد باکتری‌های مورد نیاز برای تولید بیوسورفاکتانت می‌باشد. چرا که همزمان با رشد باکتری‌های مورد نظر ما، سایر باکتری‌های موجود در محیط که دارای این توانایی نیستند نیز در حال رشد می‌باشند؛ بنابراین با انتخاب چند محیط کشت معروف که توانایی جداسازی و رشد باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت را دارند، سعی بر آن شد تا باکتری‌های دیگر حذف گردند.

۲- ۳- جداسازی و خالص‌سازی

جداسازی باکتری‌ها با دو روش انجام شد. در روش مستقیم یک قطره از نفت خام در محیط کشت نوترینت آگار[2] ریخته شد و ظروف پتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند [۱۱]. در روش غیرمستقیم مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نفت خام به ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت NB اضافه شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۹۰ دور در دقیقه در یک شیکر دوار برای ۷ روز گرماگذاری شدند. دو قطره توبین ۸۰ به‌منظور تسهیل رشد باکتری نفت خام و استفاده از محیط کشت با کاهش کشش سطحی بین نفت خام و محیط مورد استفاده قرار گرفت. پس از گذشت ۷ روز و مشاهده رشد باکتری‌ها (تیره شدن محیط)، مراحل قبل می‌تواند به‌منظور افزایش رشد باکتری تکرار شود؛ بنابراین در این زمان ۱۰ میلی‌لیتر از کشت مایع قبلی به ۹۰ میلی‌لیتر محیط NB اضافه شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۹۰ دور در دقیقه در یک شیکر دوار به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. این روش با MSSO اصلاح‌شده نیز انجام شد. سپس چند قطره از مایع کشت به‌دست‌آمده (شامل NB و MSSO) در ظروف پتری NA تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از ۴۸ ساعت و مشاهده کلنی‌های باکتری، هر کلنی در یک صفحه جدید NA برای چندین بار ریخته شد تا کلنی‌ها کاملا خالص‌سازی شوند. به‌منظور اطمینان از خلوص کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و سلول‌های باکتریایی به کمک میکروسکوپ مشاهده شدند.

۲-۴- بررسی اثر امولسیفایری باکتری‌ها بدون مواد مغذی

به این منظور، ۵۰ میلی‌لیتر از MSSO توسط یک حلقه از ظرف کشت جدید در یک فلاسک ارلن تلقیح شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری، یک میلی‌لیتر نفت خام به فلاسک حاوی کشت باکتری افزوده شد. پس از تکان دادن فلاسک و چند دقیقه بدون حرکت نگه‌داشتن آن، ذرات شکل‌گرفته معلق شده به دلیل تخریب نفت از صفرتا پنج درجه‌بندی شدند.

۲-۵- تهیه مواد مغذی

مواد مغذی مورد استفاده در این تحقیق شامل ملاس، نشاسته، آب پنیر، آب سویا، آب نخود، روغن زیتون و روغن کنجد بودند. ملاس از کارخانه قند مرودشت تهیه‌شده و با نسبت ملاس به آب ۱۰:۱ رقیق‌شده و اتوکلاو شد. نشاسته در اتوکلاو قرار نگرفت؛ بنابراین، برای نشاسته استریلیزه شده از کاغذ صافی استفاده شد. برای تهیه آب سویا و آب نخود، دانه‌های خشک آن‌ها با نسبت ۱۰:۱ گرم در آب خیسانده شد و در یک محل گرم قرار گرفت. پس از ۵ تا ۷ روز که رنگ آب در بشر تغییر کرد، اتوکلاو شد. برای تهیه آب پنیر، از روش سنتی ساخت پنیر (پنیرخانگی بدون اضافه کردن نمک) استفاده شد. به‌منظور تعیین تحمل میزان نمک محیط کشت مغذی آگار حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵٪ نمک طعام تهیه و پس از اوتوکلاو در پتری‌ها پخش شد. روغن کنجد و زیتون نیز توسط کاغذ صافی، فیلتر شدند.

۲-۶- بررسی اثر امولسیفایری باکتری‌ها با مواد مغذی

مواد غذایی شامل ملاس، نشاسته، آب پنیر، آب سویا و آب نخود در شرایط گرمادوست و مزوفیل (۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۸ درجه سانتی‌گراد) مورد استفاده قرار گرفتند. اول، یک لوپ از سویه خالص و ۵۰ میلی‌لیتر از MSS با ۰/۸ گرم ملاس و ۲/۵ گرم سایر مواد مغذی در دو دمای مختلف (۲۸ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. سپس، دو میلی‌لیتر نفت خام اضافه شد و بعد از تکان

[1] Mineral Salt Solution
[2] Nutrient agar

دادن، چند دقیقه به آن استراحت داده شد. ذرات شکل‌گرفته معلق شده به دلیل تخریب نفت از صفر تا پنج درجه‌بندی شدند.

۲-۷- اندازه‌گیری رشد باکتری‌ها با روش توربیدیمتری[1]

رشد باکتری در هفت محیط کشت مختلف با اندازه‌گیری دانسیته نوری (OD) از باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV / VSP-3000 پلاس (اپتیما شرکت توکیو، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت. این محیط‌ها NB، MSS، MSS ساکارز آزاد در کنار یکی از مواد مغذی مثل ملاس، نشاسته، آب پنیر، آب سویا، آب نخود، روغن زیتون و روغن کنجد بودند.

۲-۸- ارزیابی فعالیت بیوسورفاکتانت

در این پژوهش، روش جابجایی نفت مطابق با کار موریکوا و همکارانش (۱۹۹۳) و با تغییر انجام شد. ده میلی‌لیتر نفت خام به آرامی به پتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و اجازه داده شد تا به تعادل برسد. سپس چند قطره از نمونه (کشت باکتری) به آرامی بر روی مخلوط قرار داده شد. زمانی که در نمونه بیوسورفاکتانت وجود داشت، نفت خام به سمت مرزهای ظرف حرکت کرد. سپس قطر منطقه شفاف اندازه‌گیری و مساحت آن محاسبه گردید [۱۲].

۲-۹- شناسایی باکتری‌ها

۲-۹-۱- خصوصیات بیوشیمیایی

آزمایشات بیوشیمیایی عبارت بودند از: آزمون‌های گرم (رنگ‌آمیزی و KOH)، F/O[۱۳]، اکسیداز [۱۴]، کاتالاز، هیدرولیز ژلاتین، تولید اوره آز، احیا نیترات، نشاسته هیدرولیز، اسکولین هیدرولیز [۱۵]، لسیتیناز و واکنش زرده تخم‌مرغ [۱۶]، هیدرولیزتوئین ۸۰، تشکیل لوان، دی هیدرولاز آرژنین، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک از جمله آموکسی سیلین (آموکسی سیلین، ۲۵ میکروگرم / دیسک)، آمیکاسین (آمیکاسین، ۳۰ میکروگرم / دیسک)، جنتامایسین (جنتامایسین، ۱۰ میکروگرم / دیسک)، کانامایسین (کانامایسین، ۳۰ میکروگرم / دیسک)، کلرامفنیکل (کلرامفنیکل، ۳۰ میکروگرم / دیسک)، وانکومایسین (وانکومایسین 30 میکروگرم / دیسک)، نیتروفورانتوئین (۳۰ میکروگرم / دیسک)، ساکروز، آزمون استفاده از اسید آمینه، آزمون استفاده از سیترات، آزمون تحمل نمک (۴٪، ۷٪، ۱۰٪ و ۱۵٪)، آزمون تحمل pH(۴ و ۹)، آزمون تحمل دما (۲۵،۳۷، ۴۵، ۵۵، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری برای ۳ روز) و آزمون همولیز [۱۷].

۲-۹-۲- استخراج DNA ژنومی از باکتری‌ها

استخراج DNA، با روش آلوارز و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد. در این روش ابتدا یک لوپ از باکتری کشت‌شده در محیط نوترینت آگار را در محیط LB مایع کشت داده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار داده تا کاملاً رشد نمایند، آنگاه با استفاده از روش CTAB استخراج DNA انجام گردید [۱۸].

۲-۹-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر TECHNE انجام گردید. ترکیبات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عبارت بودند از: یک صد نانوگرم DNA، دو میکرولیتر 10X PCR Buffer، یک و نیم میلی مول MgCl2، یک‌دهم میلی مول dNTP mix، صد نانوگرم پرایمر و آنزیم TaqDNAPolymerase به‌منظور افزایش دقت و نیز جلوگیری از اتلاف وقت، مواد واکنش (به‌جز DNA) کل نمونه‌ها در حجم تجمعی با هم مخلوط شد و سپس در تیوب‌های PCR حاوی DNA توزیع گردید. جهت رساندن حجم کل واکنش به ۲۰ میکرولیتر، از آب مقطر استریل استفاده گردید.

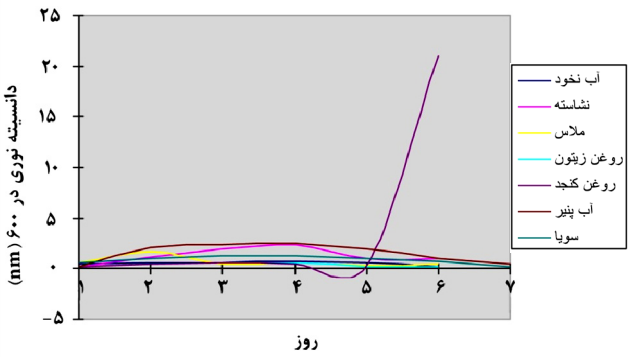
چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز عبارت بودند از: دمای واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد بود که در این مرحله رشته‌های DNA با ۲۶ چرخه طی مدت زمان ۳۶۰ ثانیه گسیخته می‌شوند. اتصال پرایمر در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۲۵ چرخه و همچنین گسترش سنتز رشته جدید DNA با دو واحد آنزیم Taq polymeraseدر دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و با ۲۵ چرخه طی مدت زمان ۹۰ ثانیه انجام گردید. محصول PCR پس از گذشت ۶۰۰ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکمیل گردید.

۲- نتایج و بحث

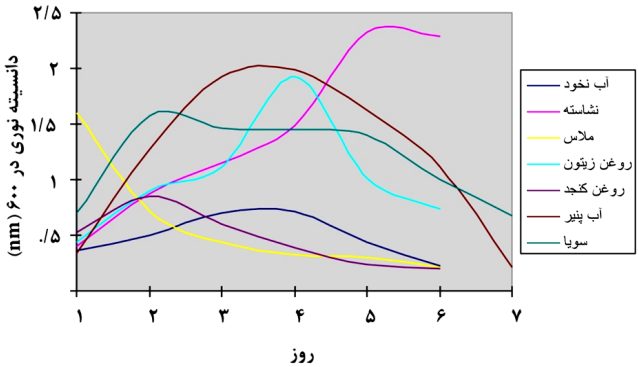
۳-۱- جداسازی، انتخاب سویه و ارزیابی شرایط رشد

بیست و هشت کلنی با ویژگی‌های مختلف مورفولوژیکی از نفت خام جدا شدند. شش سویه برای آزمایش‌های بیشتر با توجه به اثر امولسیفایری آن‌ها با یا بدون مواد مغذی و رشد آن‌ها در حضور MSSO اصلاح‌شده انتخاب شدند. سویه ۳ و ۵ در pH اسیدی و غلظت‌های مختلف نمک رشد مطلوب داشت.

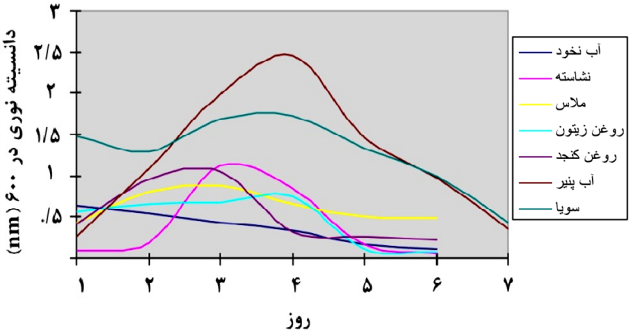
[1] Turbidimetry



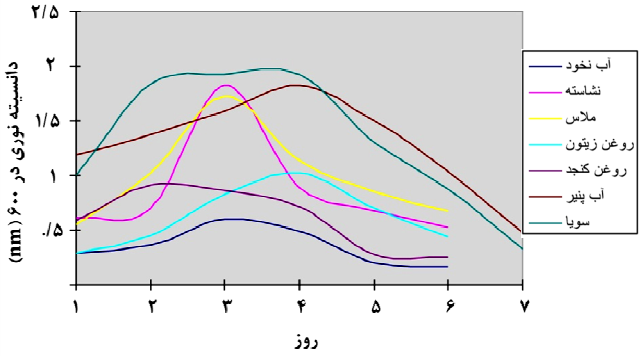
شکل (۱) نمودار رشد سویه ۲ در محیط‌های کربنی مختلف



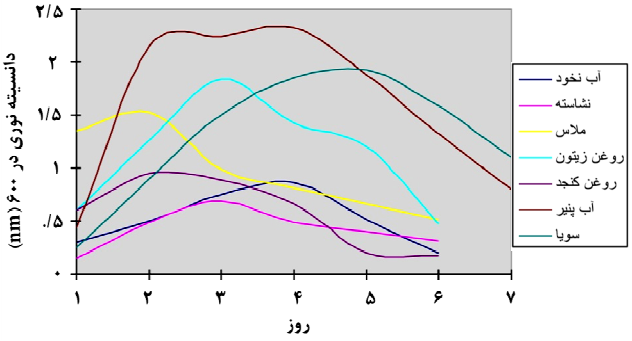
شکل (۲) نمودار رشد سویه ۳ در محیط‌های کربنی مختلف



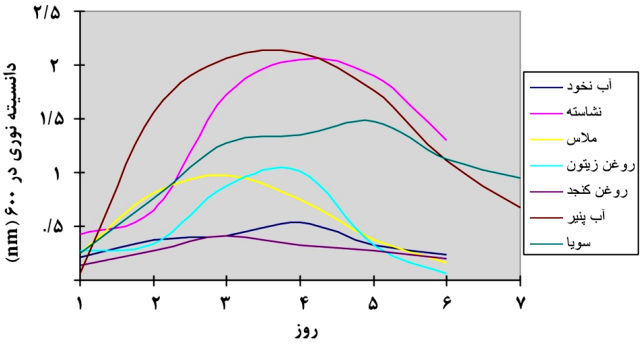
شکل (۳) نمودار رشد سویه ۴ در محیط‌های کربنی مختلف



شکل (۴) نمودار رشد سویه ۵ در محیط‌های کربنی مختلف



شکل (۵) نمودار رشد سویه ۶ در محیط‌های کربنی مختلف



شکل (۶) نمودار رشد سویه ۷ در محیط‌های کربنی مختلف

سویه ۳ رشد بهینه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد را نشان داد. در حالی که سویه‌های ۴ و ۷ نتوانستند در غلظت نمک در حدود ۱۰٪رشد قابل توجهی داشته باشند و سویه ۴ در pH<۵ رشد محدودی داشت (جدول ۱).

۳-۲- رشد باکتری در منابع مختلف کربن

منابع مختلف کربن اثرات مختلف در روند رشد سویه داشتند. آب پنیر منبع مؤثر کربن در رشد سلول باکتری بود. رشد سویه ۴، ۵ و ۶ در آب سویا قابل توجه بود، در حالی که سویه‌های ۲، ۳ و ۷ به نحو مطلوب در نشاسته رشد کردند. آب نخود، یک منبع کربن مناسب برای بیشتر سویه‌ها بشمار نمی‌رود چرا که آن‌ها نمی‌توانند به یک OD مطلوب در این منبع کربن برسند. آب پنیر و نشاسته منابع کربن مؤثر برای

جدول (۱) شرایط رشد سویه‌های انتخاب‌شده

جدایه	شوری (٪)	pH	دما (°C)
۲	رشد مطلوب تا ۱۰٪	۵-۷/۲	۲۵-۶۰
۳	رشد مطلوب تا ۱۰ و ۱۵٪	۴-۷/۲	۳۷-۶۰
۴	رشد مطلوب کمتر از ۱۰٪	۵-۷/۲	۲۸-۶۰
۵	رشد مطلوب تا ۱۰ و ۱۵٪	۴-۷/۲	۲۸-۶۰
۶	رشد مطلوب تا ۱۵٪	۴-۷/۲	۲۸-۶۰
۷	رشد مطلوب تا ۱۵٪	۴-۷/۲	۲۸-۶۰

سویه‌های ۲ و ۷ بودند به طوری که OD سویه در حضور این ترکیبات به ۲ رسید، اما روغن زیتون، روغن کنجد و آب سویا اثر منفی بر روی این سویه‌ها داشتند (شکل ۱ و ۶). سویه ۳ رشد قابل توجهی در حضور روغن زیتون داشت و بالاترین OD آن در منابع کربنی در حضور آب پنیر بود که به ۲ رسید این

در حالی بود که در حضور آب نخود، ملاس و روغن کنجد رشد مطلوبی نداشت (شکل ۲). سویه ۴ در آب نخود روند رشد نزولی داشت و حداکثر OD آن توانست به کمتر از ۱ در نشاسته، روغن کنجد، روغن زیتون و ملاس برسد؛ اما توانست در آب پنیر و آب سویا با OD بیشتر از ۲ (شکل ۳) رشد کند. آب نخود منبع کربن مناسب برای سویه ۵ نبود به این دلیل نتوانست در آب نخود به‌اندازه آب پنیر یا آب سویا (شکل ۴) رشد کند. سویه ۶ کمترین رشد در نشاسته با OD در حدود ۰.۵ را داشت در حالی که بالاترین رشد خود را در آب پنیر و آب سویا با OD در حدود ۲ (شکل ۵) نشان داد. روغن کنجد و آب نخود برای سویه ۷ مناسب نبودند در حالی که آب پنیر و نشاسته توانستند بیشترین منابع کربن مناسب برای این سویه باشند (شکل ۶).

۳-۳- توانایی امولسیونی و جابجایی نفت

با توجه به بررسی میزان کف کنندگی، توانایی امولسیفایری سویه‌ها بررسی گردید. به این ترتیب که هرچه کف کنندگی بیشتر بود میزان امولسیون آن‌ها بیشتر تخمین زده شد. به این ترتیب در میان سویه‌های انتخاب‌شده، سویه ۵ بیشترین توانایی امولسیفایری بدون مواد مغذی را داشت. توانایی امولسیفایری سویه‌های ۲ و ۷ نیز مطلوب بود در حالی که سویه‌های ۳ و ۴ توانایی کمتری در امولسیفایری نفت نسبت به بقیه داشتند.

جدول ۲ توانایی امولسیفایری سویه انتخاب‌شده با مواد مغذی از جمله نشاسته، آب پنیر، آب سویا، آب نخود، روغن زیتون و روغن کنجد را نشان می‌دهد. سویه ۵ توانایی امولسیفایری‌اش را به میزان قابل توجهی در حضور آب نخود، روغن زیتون و روغن کنجد و همچنین با نسبت کمتر با ملاس از دست داد. از سوی دیگر، سویه ۳ می‌تواند توانایی امولسیفایری قابل قبول در حضور آب پنیر و روغن زیتون را نشان می‌دهد. نتایج کلی توانایی امولسیفایری باکتریایی در حضور مواد مغذی مختلف نشان می‌دهد که آب پنیر موثرترین ماده مغذی برای بهبود توانایی امولسیفایری از سویه منتخب می‌باشد. نشاسته تنها اثر منفی بر سویه ۶ داشت در حالی که توانایی سویه‌های دیگر در حضور این ماده مغذی بهبود یافت. سویا برای همه سویه‌ها به‌جز برای سویه ۷ مؤثر بود. آب نخود، روغن کنجد و ملاس توانایی امولسیفایری همه سویه‌ها را کاهش دادند. روغن زیتون اثرات متفاوتی در سویه‌های مختلف داشت. اثر آن برای سویه ۳ مثبت، برای سویه ۵ منفی داشته و برای سویه ۴ بی‌اثر بود.

۴-۲- شناسایی سویه‌های انتخاب‌شده

با توجه به جدول ۳ تمام سویه‌ها گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بودند. چون سویه‌ها از چاه نفت استخراج شدند انتظار بر این بود که باکتری‌ها بی‌هوازی باشند. همه سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند به‌جز سویه ۷ که در حضور آموکسیسیلین زنده ماند. همه آن‌ها توانستند از مالتوز استفاده کنند اما هیچ‌کدام نتوانستند از لاکتوز استفاده کنند. نتایج قندهای دیگر در سویه‌ها (جدول ۳) متفاوت بود.

سویه‌های ۵ و ۷ کاندیدای شناسایی مولکولی توالی ژن 16S rDNA شدند چرا که این دو سویه بالاترین توانایی تولید ترکیبات بیولوژیکی را دارند. آنلیز توالی به‌دست‌آمده توسط بلاست بانک ژن نشان داد که سویه ۵ بیش از ۹۰ درصد شبیه باسیلوس فرمیس و سویه ۷ بیش از ۹۰ درصد شبیه باسیلوس سوبتیلیس است. دو مورد آنالیز ژن‌های سویه ۵ و ۷ (باسیلوس لیکنیفورمیس و باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب) به NCBI توسط بانک ژن ارسال شد. شماره JN0335541 و JN0335542 به این دو ژن اطلاق گردید. مطالعات قبلی توانایی باسیلوس سوبتیلیس به تولید بیوسورفاکتانت را گزارش داد [۲۱-۱۹]. همچنین باسیلوس لیکنفورمیس تولیدکننده بیوسورفاکتانت معرفی شد [۸ و ۲۳-۲۲].

شوری و دما دو عامل محدودکننده برای رشد باکتری در مخازن نفتی می‌باشد. محدوده pH بهینه نیز مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که سویه انتخاب‌شده توانایی قابل توجهی برای رشد در همان محدوده دما و pH مخازن نفتی را دارد.

شوری می‌تواند بر جدایش فازها [۲۴] و تولید بیوسورفاکتانت، شناسایی کرنش‌هایی که می‌توانند کشش سطحی را در شوری بالا کاهش دهند اثر بگذارد. در این پژوهش، تمامی سویه‌ها توانستند شوری ۵٪ را تحمل کنند حال آنکه تنها سویه‌های ۵ و ۷ بودند که توانستند شوری ۱۵٪ را تحمل کنند.

دیگر عوامل محیطی از جمله دما و pH نیز در تولید بیوسورفاکتانت و کاهش کشش سطحی [۲۵] تأثیر می‌گذارد. نتایج حاصل از این پژوهش تطابق خوبی با یافته‌های قبلی داشت [۷-۶] و نشان داد باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس فرمیس در محدوده دمایی ۲۸ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد رشد سریع و خوبی دارند و در محدوده pH بین ۵ تا ۹ فعالیت خوبی از خود نشان می‌دهند. یکی از خصوصیات مهم بیشتر میکرواورگانیسم‌ها وابستگی بسیار زیاد آن‌ها به pH برای رشد سلول و متابولیت‌های ثانویه است. نتایج نشان داد که آب پنیر

جدول (۲) توانایی امولسیونی سویه‌های انتخاب‌شده با مواد مغذی

مواد مغذی	سویه ۲	سویه ۳	سویه ۴	سویه ۵	سویه ۶	سویه ۷
نشاسته	+++++	+++++	++++	+++++	+	+++++
ملاس	++	+	++	+++	+++	+++
آب پنیر	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	+++++
آب سویا	++++	+++	+++++	+++++	+++++	++
آب نخود	+++	++	+	+	++	++
روغن زیتون	+	++++	++	++	+++	++++
روغن سویا	++	++	+++	++	++	+

* **علامت (+) توانایی امولسیون سویه‌ها را نشان می‌دهد.**

ماده مغذی مناسبی برای بهبود توانایی امولسیونی باکتری‌ها است. با استفاده از این ماده مغذی به تولید بیوسورفاکتانت و کاهش کشش سطحی در یک مطالعه بر روی سودوموناس گزارش شده است [۲۷-۲۶]. این پتانسیل بالا از آب پنیر ممکن است به این دلیل باشد که آب پنیر شامل تمام اجزای مورد نیاز برای رشد باکتری هست. تولید ترکیبات زیستی مانند رامنولیپیدیس یکی از استراتژی‌های باکتریایی برای از بین بردن امولسیون آب نفت است. با توجه به یافته‌های ما به نظر می‌رسد که باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس فرمیس را می‌توان به عنوان نامزدهای بررسی توانایی آن‌ها برای تولید ترکیبات بیولوژیکی معرفی کرد. باسیلوس سوبتیلیس به عنوان یک تولیدکننده بیوسورفاکتانت در تحقیقات قبلی معرفی شده است [۲۱-۱۹]. همچنین گزارش‌های متعددی از توانایی باسیلوس فرمیس به تولید بیوسورفاکتانت وجود دارد [۲۳-۲۲]. شناسایی ترکیبات که باعث بهبود توانایی امولسیونی باکتری‌ها می‌شوند می‌تواند اثر مثبت بر بهره‌برداری نفت، تولید و استخراج آن داشته باشد. در میان مواد مغذی مورد استفاده در این مطالعه، آب پنیر و نشاسته ترکیبات مؤثر برای بهبود توانایی امولسیون باکتریایی بودند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از رشد باکتری، به نظر می‌رسد که ترکیبی از آب پنیر با باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس فرمیس می‌تواند یک راه بسیار مؤثر در تولید بیوسورفاکتانت باشد.

۳- جمع‌بندی

سویه ۵ بیشترین توانایی امولسیفایری بدون مواد مغذی را داشت. آب سویا برای همه سویه‌ها به جز سویه ۷ مؤثر بود. آب نخود، روغن کنجد و ملاس توانایی امولسیفایری همه سویه‌ها را کاهش دادند. روغن زیتون اثر متفاوتی در سویه‌های

جدول (۳) نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و مقاومت آنتی بیوتیک سویه‌های انتخاب‌شده

	سویه ۷	سویه ۶	سویه ۵	سویه ۴	سویه ۳	سویه ۲
واکنش گرام	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	-	-	-	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+	+	+
تشکیل لاوان	-	+	+	+	+	+
هیدرولیز اسکولین	+	+	+	-	+	+
لسیتیناز	+	-	-	-	-	-
O/F	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+	+
آرجینین اهیدرولاز	+	+	-	-	+	-
هیدرولیز توین ۸۰	+	-	-	-	-	-
تولید سیترات	+	-	-	-	-	-
احیای نیترات	+	+	+	+	+	+
تولید اوره آز	+	+	-	-	+	-
موبیلیتی	+	-	+	+	-	+
تولید اسپور	+	-	-	-	-	-
هیدرولیز ژلاتین	+	-	-	-	-	-
آموکسیسیلین	غیرحساس	حساس	حساس	حساس	حساس	**حساس**
آمیکاسین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	**حساس**
جنتامایسین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	**حساس**
کانامایسین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	**حساس**
کلرامفنیکل	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	**حساس**
ونکومایسین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	**حساس**
نیتروفورانتوئین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	**حساس**
گلوکز	-	-	+	+	+	+
مالتوز	+	+	+	+	+	+
ساکروز	-	+	+	+	+	+
لاکتوز	-	-	-	-	-	-
فراکتوز	+	+	-	-	+	-
آرابینوز	+	+	-	-	+	-

مختلف داشت. آب پنیر موثرترین ماده مغذی برای بهبود توانایی امولسیفایری از سویه منتخب بود. تمام سویه‌ها گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بودند. همه سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند به‌جز سویه ۷ که در حضور آموکسیسیلین زنده ماند. همه آن‌ها توانستند از مالتوز استفاده کنند اما هیچ‌کدام نتوانستند از لاکتوز استفاده کنند.

مراجع

[1] O.S. Trondheim (2005) “An Experimental Study of Viscous Surfactant Flooding for Enhanced Oil Recovery”, Master Thesis, Norges University.

[2] G.C.Okpokwasili, and A.A. Ibiene (2006) “Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug”, African Journal of Biotechnology, 5, 453-456.

[3] D. Myers (2006) Surfactant Science and Technology, Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

[4] C. Zobell (1964) “Geochemical aspects of the microbial modification of carbon compounds”, Advanced in Organic Geochemistry, 339-356.

[5] M. Namani, and M. Haghighi (2007) “Investigation of the Water Coning Phenomenon in Iranian Carbonate Fractured Reservoirs”, SPE 108254, International Oil Conference and Exhibition, Mexico.

[6] O. Prommachan, H-Kittikun, and F. Kawai (2001) “Production of biosurfactant from Bacillus MUV4”, The Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Bio Thailand: From Research to Market., Bangkok, Thailand, 7-10.

[7] H.S. Kim, B. Daeyoon, and C. Lee (1997) “ HYUN-hyo Suh.Production and properties of a Lipopeptide Biosurfactant from Bacillus subtilis C9”, J. Fermentation and Bioengineering, 84, 41-46.

[8] M.M. Yakimov, K.N. Timmis, V. Wray, H.L. Fredrickson (1995) “Characterisation of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface Bacillus licheniformis BAS50”, Appl. Environ. Microbiology, 61, 1706-1713.

[9] P.S. Amy and D.L. Haldeman (1997) (eds), CRV Press, 356.

[10] S.L. Neidleman, and J. Geigert (1984) “Biotechnology and oleochemicals: changing patterns” Journal of Am. Oil Chemistry. Soc., 61, 290-297.

[۱۱] آ. محسنی، ا. عطایی، م.ح. فضائلی پور (۱۳۹۰) "جداسازی سویه‌ای از باسیلوس سوبتیلیس از پساب کارخانه شیر پگاه کرمان برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات"، نشریه علوم و مهندسی جداسازی، دوره سوم، شماره دوم، ۴۱-۳۵.

[12] M. Morikawa, H. daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, and T. Imanaka (1993) “A new lipopeptide biosurfactant producedby Arthrobacter sp. strain MIS38”, Journal of Bacteriology, 6459-6466.

[13] R. Hugh and E. Leifson (1953) “The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria”, Journal of Bacterial, 66, 24-26.

[14] J.J. Tabe, F.D. Martin and R.S. Seright(1996) “EOR Screening Criteria Revisited,”paper SPE 35385, SPE Improved Oil Recovery Symposium, Tulsa, OK, April 21-24.

[15] D.W. Dye (1968) “A taxonomic study of the genus Erwinia.I.”, The amylovora group.N.Z.Journal of Science, 12, 81-97.

[16] N.W. Schaad (1980) “Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria” .Amer.Phytopathol.Soc.,St.Paul,Minnesota,U.S.A.72P.

[17] P.C. Fahy and A.C.Hayward (1983) “Media and methods for isolation and diagnostic tests”, Plant Bacterial Diseases A Dignostic Guide.Academic press, Sidny,Australia, 338.

[18] V. M. Alvarez, D. Jurelevicius, J. M. Marques,P. M. Souza, L. V. Araújo, Th. G. Barros, R. O. Mendonc¸, A. Souza, D. M. Guimarães Freire,L. Seldin (2015) “Bacillus amyloliquefaciens TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strainwith biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 136, 14–21.

[19] M. Nitschke, and G.M. Pastore (2006) “Production and properties of a surfactant obtained from Bacillus subtilis grown on cassava wastewater”, Bioresour. Technology, 97, 336–341.

[20] D.G. Cooper, C.R. MacDonald, S.J.B. Duff, and N. Kosaric (1981) “ Enhanced production of surfactin from Bacillus subtilis by continuous product removal and metal cation additions”, Appl. Environ. Microb., 42, 408–412.

[21] O. Pornsunthorntawee, N. Arttaweeporn, S. Paisanjit, P. Somboonthanate, M. Abe, R. Rujiravanit, S. Chavadej (2008) “Isolation and comparison of biosurfactants produced by Bacillus subtilis PT2 and Pseudomonas aeruginosa SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery”, Biochemical Engineering, 42, 172–179.

[22] S. Horowitz, J.N. Gilbert, W.N. Griffin (1990) “Isolation and characterization of a surfactant produced by Bacillus licheniformis 86”, J. Ind. Microbiology, 6, 243-248.

[23] C.U. Anyanwu, S.K.C. Obi, and B.N. Okolo (2011) “Lipopeptide Biosurfactant Production by Serratia marcescens NSK-1 Strain Isolated from Petroleum-contaminated Soil”, J. Applied Science Research, 7(1),79-87.

[۲۴] ح. غفوریان نصیری، م.ت. حامد موسویان، ر. کدخدایی (۱۳۹۱)"جداسازی امولسیون های پایدار نفتی در میدان امواج ایستای فراصوت با شدت بالا به همراه روش‌های تنظیم pH و شیمیایی"، نشریه علوم و مهندسی جداسازی، دوره چهارم، شماره اول، ۳۴-۲۵.

[25] S.S. Cameotra (2008) “Biosurfactant—Enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants”, *J. Biotechnology*, *136, 678.*

[26] J. Reiser (1988) “Macromolecular Sequencing and Synthesis: Selected Methods and Applications”, J. *Biotechnology*, *8(3), 257.*

[27] O. Kappeli, and W.R. Finnerty (1998) “Characteristics of hexadecane partition by the growth medium of Acinetobacter sp”, Biotechno logy Bioengineering, 22, 495-503.

Isolation of *Bacillus Licheniformis* and *Bacillus Subtilis* from Gachsaran and Cheshmeh khosh petroleum reservoirs and optimizing their growth

Zahra Estakhr[1], Fatemeh Heidari[*2], Nasrollah Shakiba Sefat[3]

1. Dept. of Eng., Tehran Science and Research branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of material engineering, Yasouj University, Yasouj, Iran
3. National iranian south oil company, Ahvaz, Iran

ABSTRACT

In order to investigate the potential of applying microbial enhanced oil recovery technique in Iran, bacterial isolation was carried out from crude oil samples of Gachsaran and Cheshmeh Khosh petroleum reservoirs. The ability of isolates to produce biosurfactant was checked by specific culture media. Isolates were also cultured in media enriched by different carbon sources and evaluated their growth curve after 7 days to determine the optimum growth condition of them. The most effective nutrients were whey, starch and soybean water. Finally isolates were characterized by conventional biochemical tests and two isolate with the highest performance were selected for molecular characterization. The nucleotide BLAST similarity search analysis, based on the 16S DNA gene sequence revealed that these isolates belong to *Bacillus subtilis* (JN0335542) and *Bacillus licheniformis* (JN0335541).

All right reserved.

ARTICLE INFO

Article history:
Received in: Nov. 17, 2015
Revised from: Feb. 18, 2016
Accepted: March 16, 2016

Key words:
Isolation
Biosurfactant
Bacteria
Bacillus subtilli
Bacillus licheniformis

* Corresponding author
f.heidari@yu.ac.ir