

فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی

شماره پیاپی ۱، جلد ۱، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه ۳۲ تا ۳۷

تأثیر پراکندگی بر تجزیه‌ی میکروبی ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی

مریم دارابی^۱، سید محمد حیدریان^۲، منصور جهانگیری^۲، مهناز مظاهری اسدی^۲

۱- دانشگاه سمنان، دانشکده‌ی مهندسی شیمی، نفت و گاز گروه مهندسی شیمی

۲- تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی mheydarian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۲۹

چکیده

به دلیل افزایش نیاز به برش‌های سبک نفتی، تبدیل برش‌های با وزن مولکولی بالا نظیر ته پسمانده برج تقطیر در خلأ به محصولات با ارزش توجه زیادی را به خود جلب کرده است. ته مانده برج تقطیر در خلأ شامل ترکیبات با جرم مولکولی بالا هستند، که احتمالاً به دلیل حالیت کمشان در آب و انرژی‌های رزونانسی بالای ساختارهایشان، به کندی و با بازدهی کم تجزیه می‌شوند. پراکندگی می‌تواند به عنوان روشی برای کاهش محدودیت‌های انتقال جرم با افزایش سطح تماس بین این ترکیبات و میکروارگانیسم‌ها به کار رود. در مطالع حاضر تأثیر افزایش سطح تماس ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی به وسیله‌ی پراکندگی مکانیکی، روی رشد میکروبی در فرماتور حباب‌دار بررسی شد. به این منظور، از یک مخلوط میکروبی بومی با قابلیت مصرف ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد.

بر اساس نتایج این تحقیق، با افزایش زمان هموژناسیون، مقدار کمتری از ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی حل می‌شود، و اندازه‌ی ذرات آن افزایش پیدا می‌یابد. به منظور سنجش اثر هموژناسیون بر رشد میکروبی از اندازه‌گیری غلظت پروتئین در طول فرماتاسیون استفاده شد. با توجه به نتایج حاصل، هموژناسیون تأثیر معناداری روی افزایش رشد میکروبی نداشت.

واژه‌های کلیدی: ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ، پراکندگی مکانیکی، رشد میکروبی، فرماتور حباب‌دار.

مقدمه

میشوند (۱۵،۱۲). روش‌های مختلفی به منظور افزایش دسترسی زیستی این ترکیبات به کار برده می‌شود. در بسیاری از موارد حلال‌های آلی برای بهبود حالیتشان به کار برده می‌شود، اما این حلال‌ها سمی هستند و دوستدار محیط زیست نیستند. روش جایگزین دیگر برای افزایش دسترسی زیستی این ترکیبات، اضافه کردن سورفکتانت‌ها در غلظت بالای غلظت بحرانی میسلشان است. همچنین افزایش دما به منظور افزایش حالیت و نرخ انتقال جرم این ترکیبات در محلول‌های آبی به کار برده می‌شود. در نهایت، پراکندگی می‌تواند به عنوان روش دیگری برای کاهش محدودیت‌های انتقال جرم با افزایش سطح تماس بین این ترکیبات و میکروارگانیسم‌ها

در پالایشگاه، نفت خام بعد از عملیات نمک زدایی، وارد برج تقطیر اتمسفریک شده، و به تعدادی فرآورده‌های اصلی و میانی تبدیل می‌شود. باقیمانده‌های سنگین‌ترین برج، به برج تقطیر در خلأ وارد می‌شوند. سنگین‌ترین برش حاصل از برج تقطیر در خلأ، ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ نامیده می‌شود. ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ شامل مقادیر زیاد آسفالتن‌ها و رزین‌ها و هم چنین درصد بالای اتم‌های ناهمگون از جمله سولفور، نیتروژن و برخی عناصر فلزی است (۶). باقیمانده‌های سنگین نفتی، شامل ترکیبات با جرم مولکولی بالا هستند، و به دلیل حالیت کمشان در آب و انرژی‌های رزونانسی بالای ساختارهایشان، به کندی و با بازدهی کم سبک‌سازی

آبی پراکنده شد. در طول هموژناسیون نیز بشر حاوی فاز آبی و ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ روی هیتز با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داشت.

به منظور بررسی اثر زمان هموژناسیون بر اندازه ذرات و حل شدن ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک‌های معدنی، سه نمونه با زمان‌های هموژناسیون ۱۵، ۲۵ و ۴۰ دقیقه، مطابق روش فوق آماده شد. به منظور بررسی اثر زمان هموژناسیون بر اندازه ذرات و حل شدن ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در آب مقطر، دو نمونه با زمان‌های هموژناسیون ۲۵ و ۴۰ دقیقه آماده شد. هر یک از نمونه‌ها با دو تکرار تهیه شد.

پیش کشت

برای تهیه‌ی پیش کشت، در ابتدا ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات (۸ گرم/لیتر) در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. در مرحله‌ی بعد یک لوپ خاک حاوی مخلوط میکروبی، بومی پالایشگاه نفت تهران، در شرایط استریل به ارلن مذکور اضافه شد، و در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد.

فرآیند فرمانتاسیون

فرمانتور ۳ لیتری با حجم کاری ۲ لیتر حاوی محیط کشت دارای نمک‌های معدنی و ۵ درصد وزنی ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. سپس ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت با استفاده از هموژنایزر با سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، تحت شرایط استریل، پراکنده شد. تلقیح به فرمانتور به میزان ۱۰ درصد حجمی با استفاده از پیش کشت آماده شد. فرمانتور دیگری هم با همین شرایط بدون ایجاد پراکندگی آماده شد. هر نمونه با دو بار تکرار انجام شد. فرآیند فرمانتاسیون به مدت حدوداً ۳۱۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با نرخ هوادهی ۰/۰۷۵ V.V.M انجام شد.

آنالیزها

بعد از هموژناسیون ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در فاز آبی، با استفاده از میکروسکوپ Olympus PX60 و کامپیوتر

به کار رود (۷). علیرغم افزایش اطلاعات درباره تجزیه‌ی میکروبی نفت خام، مطالعه‌ی فعالیت میکروارگانیزم‌ها روی باقیمانده‌های سنگین نفتی از جمله ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ توجه کمتری را به خود جلب کرده است. قبلاً مناسبترین باکتریهای بومی مؤثر بر سبک سازی ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ پالایشگاه تهران شناسایی شده اند (۱۰). همچنین برخی از پارامترهای عملیاتی مؤثر (دما، نرخ هوادهی، میزان تلقیح و pH) بر سبک سازی ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ بررسی شده اند (۵). در مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر افزایش سطح تماس ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در فاز آبی به وسیله‌ی پراکندگی مکانیکی، روی رشد یک مخلوط میکروبی، بومی پالایشگاه نفت تهران، پرداخته می شود. به این منظور در ابتدا، تأثیر زمان هموژناسیون بر انحلال ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در فاز آبی و اندازه‌ی ذرات آن پرداخته می شود. سپس به بررسی تأثیر هموژناسیون ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی، بر رشد میکروبی پرداخته می شود.

مواد و روش‌ها

محیط کشت و میکروارگانیزم مورد استفاده

محیط کشت حاوی نمک‌های معدنی با اضافه کردن ترکیبات زیر به یک لیتر آب مقطر تهیه شد:

۰/۵ گرم فسفات هیدروژن دی پتاسیم، ۱ گرم کلرید آمونیوم، ۲ گرم سولفات سدیم، ۲ گرم نترات پتاسیم، ۰/۰۰۱ گرم کلرید کلسیم شش آبه، ۱ گرم سولفات منیزیم هفت آبه، ۰/۰۰۱ گرم سولفات آهن هفت آبه (۵،۱). pH محیط کشت روی ۱/۰ ± ۷ تنظیم شد. جزئیات میکروارگانیزم مورد استفاده کنسرسیون میکروبی در مراجع (۵، ۱۱ و ۱۰) ارائه شده است.

هموژناسیون ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط آبی

به منظور پراکنده کردن ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط آبی از هموژنایزر Heidolph مدل DiAx 900 استفاده شد. ابتدا یک لیتر محیط کشت حاوی نمک‌های معدنی یا آب مقطر (با توجه به شرایط آزمایش) حاوی ۵۰ گرم ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ را تا دمای ۶۵-۶۰ درجه سانتیگراد پیش گرم کرده، سپس با استفاده از هموژنایزر با سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه، ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در فاز

نتایج و بحث

تأثیر زمان هموژناسیون بر اندازه ذرات و حل شدن ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک های معدنی به منظور بررسی اثر زمان هموژناسیون بر اندازه ذرات، آزمایشات با زمان های مختلف انجام و درصد مساحت ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ حل شده در محیط کشت حاوی نمک های معدنی و قطر متوسط ذرات آن در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. تأثیر زمان هموژناسیون بر اندازه ذرات و حل شدن ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک های معدنی

زمان هموژناسیون (دقیقه)			نمونه ها
۴۰	۲۵	۱۵	پارامترها
۱/۲±۰/۱۳	۱/۲±۰/۱۱	۲/۶±۰/۱۶	درصد مساحت ته مانده ی برج تقطیر در خلأ
۱۷/۵۶±۱/۶	۱۵/۳±۰/۹	۱۴/۱۸±۱	اندازه متوسط ذرات (μm)

منظور انتخاب شد. با توجه به مشاهدات چشمی در زمان های کمتر (۱۰ دقیقه و ۵ دقیقه) پراکندگی مؤثر ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در فاز آبی صورت نگرفت. به منظور اطمینان از تأثیر منفی افزایش زمان هموژناسیون و انحلال بیشتر نمک ها بر حل شدن ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک های معدنی مطابق روش ذکر شده، نمونه هایی در غیاب نمک های معدنی آماده شد. با مقایسه نتایج حاصل از آزمایش های با زمان های مشابه (جدول ۲) مشخص می شود در حضور نمک ها، میزان کمتری از ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در داخل فاز آبی پراکنده می شود، و اندازه ذرات آن افزایش می یابد.

مجهز به نرم افزار آنالیز تصاویر AG aquinto تصاویری از امولسیون ایجاد شده گرفته شد، و درصد مساحت ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط آبی به دست آمد؛ سپس متوسط اندازه ی ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ محاسبه شد. نمونه گیری از فرماتورها به صورت روزانه انجام شد. رشد مخلوط میکروبی با اندازه گیری غلظت پروتئین با استفاده از روش لاری بهسازی شده تعیین شد.

همان طور که از نتایج پیداست، با افزایش زمان اندازه ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ هم در داخل فاز آبی افزایش می یابد. نتیجه ی حاصل می تواند به این دلیل باشد که انحلال پذیری نمک ها با افزایش زمان هموژناسیون در فاز آبی بیشتر می شود، بنابراین محلول قطبی تر می شود، در این صورت ترکیبات غیر قطبی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ بیشتر با هم تجمع پیدا کرده و اندازه ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ هم در داخل محلول افزایش پیدا می کند (۴، ۹). از آنجایی که هدف از پراکندگی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت، افزایش دسترسی میکروارگانیسم ها به ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت می باشد، بنابراین با توجه به نتایج، زمان کمتر هموژناسیون یعنی ۱۵ دقیقه به این

جدول ۲. تأثیر هموژناسیون بر اندازه ذرات و حل شدن ته مانده ی برج تقطیر در خلأ، در محیط کشت حاوی نمک های معدنی در مقایسه با آب مقطر

پارامترها		درصد مساحت ته مانده ی برج تقطیر در خلأ		اندازه متوسط ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ (μm)	
زمان (دقیقه)		۴۰	۲۵	۴۰	۲۵
شرایط هموژناسیون					
هموژناسیون ته مانده ی برج		۲±۰/۱۱	۲±۰/۱۳	۳±۰/۹	۵۶±۱/۶
تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک های معدنی		۱	۱	۱۵	۱۷

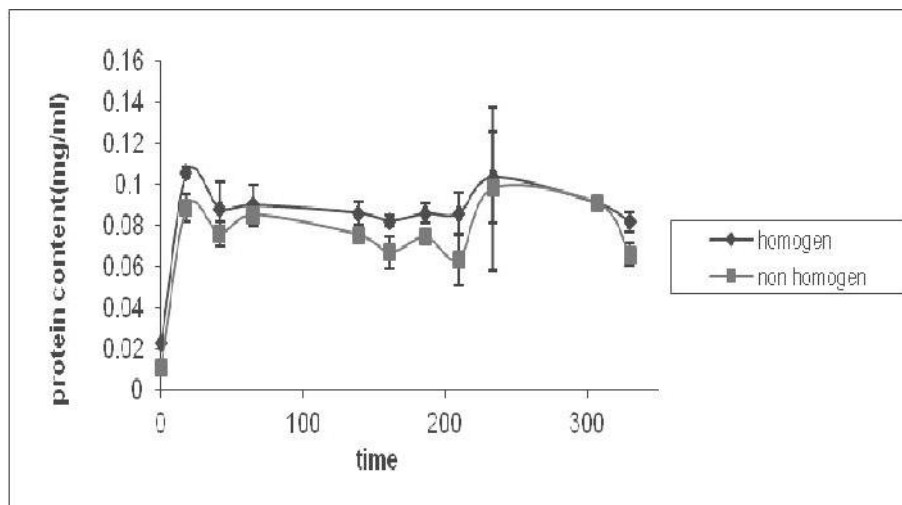
هموژناسیون ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در آب مقطر	۴±۰/۱۲	۱۱±۰/۷۳	۹±۰/۹۳
	۴	۱۱	

کوچکتر شده است، که این نتیجه برعکس زمان حضور نمکها می‌باشد.

تأثیر هموژناسیون ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک‌های معدنی بر رشد میکروب

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان پروتئین محیط کشت در دو حالت هموژن و غیر هموژن در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتیجه‌ی حاصل می‌تواند به این دلیل باشد که در حالتی که در فاز آبی نمک داریم، به علت حضور نمک‌های قطبی در داخل محلول از انحلال پذیری ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ کم شده و این ترکیبات نفتی با هم تجمع پیدا می‌کنند و قطرات نسبت به حالتی که نمک نداریم افزایش می‌یابد (۹،۴). همچنین جدول ۲ مویده این است که در حالت عدم حضور نمک‌ها با افزایش زمان هموژناسیون اندازه ذرت



شکل ۱- مقایسه تغییرات پروتئین در دو حالت استفاده از هموژنایزر و عدم استفاده از هموژنایزر

مانده‌ی برج تقطیر در خلأ شود (۳). با توجه به شکل ۱ و تداخل خطوط نشانگر خطا به نظر می‌رسد، رشد میکروبی در دو حالت استفاده از هموژنایزر و عدم استفاده از آن تفاوت معناداری با هم ندارند. هموژن سازی موجب اختلاط دو فاز آبی و آلی می‌شود. افزایش سطح تماس و کاهش سایز ذرات در اثر هموژن سازی افزایش انتقال جرم را به همراه خواهد داشت. از این رو دسترسی هیدروکربن‌های لازم برای رشد میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌یابد (۲). اما از سوی دیگر به دلیل بهبود انتقال جرم و افزایش نرخ حلالیت ترکیبات موجود در فاز آلی در محیط کشت آبی در اثر هموژناسیون، احتمال تجمع مواد سمی برای میکروارگانیسم‌ها در حالت هموژن بیشتر است. مقدار کم هیدروکربن قابل دسترس در حالت غیر هموژن به دلیل محدودیت انتقال جرم، رشد را محدود می‌کند، اما از سوی دیگر اثرات سمی حداقل است (۸). در اینجا

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، هماهنگی قابل توجهی بین عملکرد نمونه‌ها وجود دارد. میزان پروتئین در روز اول به حداکثر رسیده و سپس کمی کاهش یافته و یا با تغییرات کم همراه بوده است. میزان پروتئین در روز یازدهم مجدداً افزایش پیدا کرده است و در پی آن مجدداً کاهش می‌یابد. منحنی رشد میکروبی استاندارد، دارای یک پیک است. اما در اینجا احتمالاً به دلیل آن که میکروارگانیسم مورد استفاده در فرمانتاسیون ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ به صورت مخلوطی از چند گونه میکروبی است و از طرفی چون محیط کشت مصرفی نیز آمیخته‌ای از هیدروکربن‌های مختلف است، در نتیجه نمودار رشد میکروبی دارای چندین پیک می‌شود. هر کدام از این پیک‌ها می‌تواند مربوط به استفاده یک گونه میکروبی از ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ و یا یک ترکیب در حال مصرف از میان ترکیبات موجود در ته

پیدا می‌کند. بنابراین زمان کمتر هموژناسیون (۱۵ دقیقه) به منظور افزایش دسترسی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت استفاده شد. به منظور بررسی اثر استفاده از هموژناسیون بر رشد میکروبی، از مقایسه فرآیند همراه با هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت شامل ۵ درصد ته مانده ی برج تقطیر در خلأ اولیه، با فرآیند مشابه فاقد هموژناسیون استفاده شد. با توجه به نمودار رشد میکروارگانسیم ها، به نظر می‌رسد رشد میکروبی در دو حالت استفاده از هموژنایزر و عدم استفاده از آن تفاوت معناداری با هم ندارند، که این بدان معناست که احتمالاً مجموع اثرات بهبود انتقال جرم و تجمع مواد سمی بیشتر برای میکروارگانسیم ها در اثر هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی، به گونه ای بوده که تغییر معناداری در رشد میکروبی نمونه ی هموژن نسبت به نمونه ی غیر هموژن ایجاد نکرده است.

احتمالاً مجموع اثرات بهبود انتقال جرم و تجمع مواد سمی بیشتر برای میکروارگانسیم ها در اثر هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی، به گونه ای بوده که تغییر معناداری در رشد میکروبی نمونه ی هموژن نسبت به نمونه ی غیر هموژن ایجاد نکرده است.

با توجه به نتایج حاصل از اندازه گیری درصد مساحت ته مانده ی برج تقطیر در خلأ پراکنده شده در محیط کشت حاوی نمک های معدنی، مشخص می‌شود افزایش زمان هموژناسیون باعث کاهش میزان ته مانده ی برج تقطیر در خلأ پراکنده شده در محیط کشت حاوی نمک های معدنی و افزایش قطر ذرات آن شد. نتیجه ی حاصل می‌تواند به این دلیل باشد که انحلال پذیری نمک ها با افزایش زمان هموژناسیون در فاز آبی بیشتر می‌شود، بنابراین محلول قطبی- تر می‌شود، در این صورت ترکیبات غیر قطبی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ بیشتر با هم تجمع پیدا کرده و اندازه ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ هم در داخل محلول افزایش

منابع

- 1- Berekaa, M., Steinbuchel, A. (2000). Microbial Degradation of the Multiply Branched. Applied and Environmental Microbiology, 10, 4462-4467.
- 2- Bernardez, L.A. (2008). Dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from a non-aqueous phase liquid into a surfactant solution using a rotating disk apparatus. Colloids Surf, 320, 175-182.
- 3- Duhalt R. V., Ramirez R. Q. (2004). Petroleum biotechnology (Developments and perspectives), first edition., Elsevier Science.
- 4- Greenwood, N., Earnshaw, A. Chemistry of the Element. second edition. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1997.
- 5- Mohammadi, S., Heydarian, S. M., Mazaheri Assadi, M., Jahangiri, M. (2011). Vacuum Residue biodegradation using bubble column fermentor. Petroleum Science and Technology, In press.
- 6- Morawski, I., Mosio-Mosiewski, J. (2006). Effects of parameters in Ni-Mo catalysed hydrocracking of vacuum residue on composition and quality of obtained products. Fuel Processing Technology, 87, 659-669.
- 7- Pantyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J. L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J. (2011). Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. Chemosphere, 83, 29-33.
- 8- Sikkema, J., Bont, J., Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological reviews, 2, 201-222.
- 9- Steven S. R., William H. T. (1981). Solubility behavior of three aromatic hydrocarbons in distilled water and Natural Seawater. Environmental Science & Technology, 15 (6), 715-716
- 10- Tabatabaee, M., Mazaheri Assadi, M., Heydarian, S. M., Akhavan Sepahi, A. (2011). Soil microbial degradation of vacuum residue. Petroleum Science and Technology, In press.
- 11- Tabatabaee, M., Mazaheri Assadi, M. (2013). Vacuum distillation residue upgrading by an indigenous bacillus cereus. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 11-18.
- 12- Venkateswaran, K., Harayama, S. (1995) Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil.

Can. J. Microbiol, 41, 767–775.

13- Willumsen, P.A., Karlson, U. (1998) Effect of calcium on the surfactant tolerance of a fluoranthene degrading bacterium. *Biodegradation*, 9, 369–379.

14- Whyte, L.G., Bourbonnière, L., Greer, C.W. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and

naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl. Environ. Microbiol*, 63, 3719–3723.

15- Yuste, L., Eugenia Corbella, M., Karlson, U., Puyet, A., Rojo, F. (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 69–75.

