مقاله تحقیقی

بررسی رشد و تحمل پذیری بالای *Bacillus cereus* JQ340870 بومی ایران با توانایی تجزیه آسفالتین موجود درته‌ماند برج تقطیر خلاء

میترااالسادات طباطبائی*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

***مسؤول مکاتبات:** میتراسادات طباطبائی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، پست الکترونیکی: Mitra_tabatabaee@yahoo.com,Mit.Tabatabaee@iauctb.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۸

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۴

چکیده

امروزه کاهش روز افزون نفت خام سبک و مرغوب، دانشمندان را به سمت تحقیق و بررسی بیشتر در جهت یافتن راه‌کارهایی برای امکان بهره برداری و استفاده از نفتهای سنگین پیش برده است که علم بیوتکنولوژی به علت مزایای هزینه‌ای و زیست‌محیطی در این زمینه پیشگام است. به این منظور باکتری بومی *Bacillus cereus* JQ340870 برای بررسی توانایی‌های بالقوه‌اش در زمینه سبک‌سازی نفت خام مورد بررسی قرار گرفت.کشت و غنی‌سازی اولیه در محیط کشت MSM صورت گرفت.سپس دامنه تحمل-پذیری فیزیکوشیمیایی باکتری‌بررسی شد. تاثیرمیزان تلقیح اولیه،تاثیر میزان هوادهی، میزان اسیدیته و دما بر رشد باکتری هدف مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایش‌های انجام شده برای بررسی توانایی‌های باسیلوس سرئوس مورد مطالعه عبارت بودند از: امکان استفاده ازبخش محلول و سمی ته‌ماند برج تقطیر خلا پالایشگاه نفت (WSFV)،توانایی باکتری‌ها در استفاده از ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH)،توانایی باکتری‌ها در استفاده از ترکیبات آلیفاتیک بلند زنجیره، توانایی باکتری‌ها در تولید ترکیبات سطحی فعال و نیز استفاده از ته‌ماند برج تقطیر خلا پالایشگاه نفت(VR) بعنوان تنها منبع کربن و گوگرد و انرژی. در بخش دیگر این تحقیق تاثیرVRروی میزان آب‌گریزی و یا چسبندگی باکتری‌ها به هیدروکربن‌ها، فعالیت امولسیفیکاسیون و توانایی باکتری در استفاده از VR به عنوان منبع تمام نیازهای غذایی انجام گرفت. در نهایت تغییرات VR پس از تیمار میکروبی طریق آنالیز شیمیایی VRبوسیله تست SARA برررسی شد.این باکتری مولد بیوسورفکتانت دارای بهترین رشد در دمای°C ۴۰ و rpm ۱۵۰ وpH ۷ می‌باشد. توانایی استفاده از VR به عنوان منبع کربن و گوگرد و انرژی و نیز ادامه رشد در حضور WSFV و قدرت استفاده

و تجزیه هم ترکیبات آروماتیک و هم آلیفاتیک، امولسیفیه کردن نفت به میزان ۲۰ درصد و در نهایت کاهش ۷۱ درصدی آسفالتین در محیط کشت معدنی حداقل یاMSM باکتری را تبدیل به یک گزینه بسیار کاربردی در صنعت نفت می‌کند.باکتری *Bacillus cereus* JQ340870می‌تواند در شرایط بهینه رشد به عنوان یکی از راه‌کارهای بیولوژیک در حل بسیاری از معضلات زیست محیطی صنعت نفت و نیز در عرصه های جدیدتر این صنعت مثلا ازدیاد برداشت میکروبی نفت و یا سبکسازی زیستی نفت‌های سنگین کاربرد عملی داشته باشد.

کلید واژه ها:باسیلوس سرئوس، ته ماند برج تقطیر در خلا (VR)، سبکسازی زیستی، تجزیه زیستی، نفت خام

مقدمه

متخصصین بر سر این موضوع توافق دارند که نفت خام دنیا دارای ظرفیت محدودی بوده و ذخایر نفتی به طرز قابل‌توجهی در گذر زمان کاهش خواهد یافت(۱). لذا انسان به منظور رفع نیاز به منابع انرژی سراغ ذخایر سوختی گران‌تری مثل ذخایر نفتی غیرقابل استخراج، مواد قیری و سوخت‌های زغال‌سنگ خواهد رفت که فرایندهای استخراج و پالایش آنها بسیار پیچیده و دشوار می‌باشد (۳،۲). گرایش به استفاده از نفت‌های خام سنگین و قیرهای طبیعی باعث شده که امروزه مطالعات وسیع‌تری در مورد چگونگی نقل و انتقال و جابجایی برش‌های سنگین نفتی با وزن مولکولی بالا و همچنین تبدیل آنها به سوخت‌های قابل پالایش و قابل استفاده در صنایع پتروشیمی انجامگیرد.کاهش ویسکوزیته نفت خام و ارتقاء کیفیت به طور معمول یا از طریق تغییر و تبدیلات حرارتی (Cokingو Cracking) و یا از طریق تبدیل کاتالیستی انجام می‌گیرد(۴).بر خلاف روش‌های فیزیکوشیمیایی متداول موجود، روش‌های بیولوژیک می‌تواند امکان انجام فراوری نفت را با دشواری کمتر و دقت بیشتر فراهم آورد.

ته‌ماند برج تقطیر در خلا در واقع آخرین برش باقیمانده حاصل از تقطیر نفت خام تحت شرایط بسیار حاد خلاءمی‌باشد که دیگر قابل تقطیر و تفکیک به ترکیبات سازنده آن نیست. دستگاه‌های تقطیر نفت خام، نخستین واحدهای پالایش عمده در پالایشگاه هستند(۵). تفکیک نفت خام در دو مرحله صورت می‌گیرد، اول تفکیک جزء به جزء همه نفت خام در فشار اتمسفرو سپس ارسال باقیمانده دیرجوش این مرحله به سیستم تفکیک دیگری که تحت خلاء شدید عمل می‌کند(۶). البته شایان ذکر است که دمای تقطیر با توجه به نوع خوراک برج تقطیر متفاوت است چنانکه دما در برج تقطیر اتمسفری در پالایشگاه تهران حدود ۳۲۰ درجه سانتی‌گراد می باشد(۷).

بنابراین،مقدارترکیبات گوگردی موجود در نفت متناسب است با افزایش نقطه جوش هر برش نفتی در برج تقطیر پالایشگاهکه به طور محسوسی افزایش می‌یابد(۸). بیشترین میزان ترکیبات گوگردی نفت در ته‌ماند برج تقطیر در خلاء(heavy distillate) یافت می شود که موضوع این مطالعه می‌باشد. معمولاً پالایشگاه‌ها به منظور حذف اینگونه ترکیبات از نفت از روش متداول هیدرودسولفوریزاسیون (HDS)

استفاده می‌کنند(۹), اما امروزه توجه خاصی به روش-های بیولوژیک حذف گوگرد از نفت شده است(۱۰،۱۱).بنابر آنچه گفته شد دستیابی و بهینه-سازی رشد یک باکتری ساکن نفت خام که می‌تواند ترکیبات مختلف نفتی اعم از ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک را بشکند و ضمنا پیوندهای گوگردی و ساختارهای سنگین آسفالتنیک و پارافینی را مورد حمله قرار دهد، در واقع دستآوردی بسیار مفید و کابردی در صنعت نفت محسوب می‌گردد. در این راستا یکی از جنس‌های باکتریایی که بسیار مورد توجه دانشمندان قرار دارد باسیلوس‌ها می‌باشند، چراکه این باکتری‌ها با دارا بودن مقاومت فیزیکوشیمیایی بالا بواسطه توانایی تولید اندوسپور از یک طرف و تولید بسیاری از ایدیولیت‌های موثر در صنعت نفت مثل بیوسورفکتانت، انواع اسیدها و حلال‌های آلی از طرف دیگر یکی از کاربردی‌ترین باکتری‌ها در بیوتکنولوژی نفت محسوب می-شوند(۵،۷،۱۲).

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی اولیه

باکتری *Bacillus cereus* JQ34080که هم از خاک‌های آلوده به نفت منطقه لاوان و هم از نفت خام لاوان در تحقیقات جداگانه‌ای جداسازی و تخلیص شده بود و برخی ویژگی‌های خاص و برجسته آن در تجزیه زیستی ترکیبات نفتی پیش از این مورد بررسی قرار گرفته بود (۱۲)،با هدف بهینه سازی شرایط رشد و بررسی تاثیر آن در ارتقائ کیفیت نفت مورد بررسی‌های متفاوتی قرار گرفت.

روش کار در این مرحله به این صورت بود که ابتدا یک preculture تیمار شده با VR تهیه شد. به این صورت که ابتدا از یک کلونی تک از باکتری به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰°C در محیط نوترینت براث به منظور غنی‌سازی،تلقیح و گرماگذاری شد. سپس ۱ml (۵٪) از این سوسپانسیون به ۲۵ ml محیط کشت MSM دارای ۵٪ ترکیب VR به عنوان منبع اصلی کربن و ۰/۰۱ درصد گلوکز به عنوان محرک رشد تلقیح شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت در ۳۰°C و هوادهی با ۱۵۰ rpm کدورت نمونه با دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی شد تا در ۶۰۰nmبه ODیک رسیده باشد(۱۳).سپس از این preculture آماده شده در این مرحله به میزان ۵٪ (۵ml) به ارلن‌های اصلی که حاویMSM (۱۴) همراه با VR بودند، تلقیح انجام گرفت و نمونه در۳۰°Cدر ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند(۱۵). محیط کشتMSMدر این تحقیق با کمی اصلاحات در مقادیر شامل ترکیباتی است که عبارتند ازK_2HPO_4 1g, NH_4Cl۰/۵ g و g $Na_2SO_4$۲ و $KNO_3$۲ g ,$CaCl_2.6H_2O$۰/۰۰۱وg $MgSO_4.7H_2O$۱g , $FeSO_4.7H_2O$۰/۰۰۱ در ml ۱۰۰۰آب مقطر. سپس pH محیط روی ۷ تنظیم می شود.

بررسی تاثیر فاکتوهای فیزیکوشیمیایی بر رشد

در اینمرحله از مطالعه تاثیر برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی بر میزان رشدبررسی شد. این فاکتورها عبارت بودند از:

تاثیرمیزان تلقیح اولیه یاinitial inoculumبین ۵ تا ۷ درصد بر سرعت و میزان رشد نمونه بررسی شد(۱۶).میزان تاثیر هوادهی در ۱۰۰ و ۱۵۰rpm بررسی شد (۱۶).تاثیر دما بر میزان رشد بین ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توانایی نمونه‌ها در شکستن VR بررسی شد. تحمل دما در دمای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گرادو تحمل اسیدیته از pH=۴ تا pH=

۱۰ مورد بررسی قرار گرفت(۱۷).روش کار برای بررسی تمامی فاکتورهای محیطی به طور پایه به این صورت بودکه ابتدا از کلونی تک مورد نظر در نوترینت براث و سپس MSM بنابه روش شرح داده شدهpreculture با OD معادل ۱ تهیه شد. به طور پایه مبنای کشت در محیط MSMبا pH ۷، دور ۱۵۰rpm و دمای $۳۰^{o}C$ و ۵٪ تلقیح در نظر گرفته شد(۱۵-۱۷) و در هر آزمایش بنا بر فاکتور محیطی مورد نظر، سایر پارامترها ثابت ماند و پارامتر مورد نظر تغییر داده می‌شد.همه آزمایشات با ۳ تکرار، به مدت ۲۰ روز گرماگذاری شدند و با فواصل زمانی صفر، ۳، ۷، ۱۰، ۱۳، ۲۰ روز تغییرات OD و CFU بررسی شد. یک ارلن در هر آزمون بدون تلقیح به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

بررسی توانایی باکتری در استفاده از VR به عنوان منبع گوگرد

در اینبخش از مطالعه فرض براین بود که بسیاری از باکتری‌های توانا در شکستن و Upgrading ترکیبات بسیار سنگین هیدروکربنی علاوه بر توانایی در شکستن پیوندهای C-C و مصرف کربن آلی به عنوان منبع غذایی قاعدتاً قادر به گوگردزدایی و شکستن پیوندهای C-Sنیز می باشد(۱۸).به این منظور از محیط کشت پایه BSM(Basal Sulfur Medium) استفاده شد که فاقد منبع گوگرد و کربن بود که ترکیبات آن عبارت بود از(۱۹):K_2HPO_4 ۴ gr و Na_2HPO_4 ۴ gr و ۲ gr NH_4Clو $MgCl.6H_2O$ ۰/۲ gr و ۰/۰۰۱ gr $CaCl_2.2H_2O$و $FeCl_3.6H_2O$ ۰/۰۰۱ gr در یک لیتر آب دوبار تقطیر.سپس pH محیط روی ۷/۲ تنظیم شد و ۵٪ VR به عنوان تنها منبع گوگرد و کربن به محیط افزودهو استریل شد سپس برای تعیین میزان رشد از طریق کدورت سنجی و شمارش کلونی بررسی شد و پایش تغییرات VRو pHدر فواصل زمانی طی ۲۰ روز انجام گرفت. منحنی تغییرات ODو CFUرسم شد.

بررسی در آب ته ماند برج تقطیر خلا

یکی از آزمایش‌های انجام شدهبررسی توانایی باسیلوس سرئوس مورد مطالعه در استفاده از ترکیبWSFV(Water Soluble Fraction of VR) بود(۱۹).برای تهیه WSFV از روش اصلاح شده ارائه شده توسط Pendrys, J. P.(۱۹۸۹)استفاده شد(۲۰).سپس محیط کشتMSM Agar با WSFV تهیه شد کهMSM-WSFV Agarنامیده شد.سپس از باکتری کشت داده و بعد از طی شدن مدت انکوباسیون رشد در این محیط کشت بررسی شد.

بررسی امکان تجزیه زیستی پلی سیکلیک آروماتیک (PAH)

برای بررسی توانایی تجزیه زیستی و استفاده از پلی‌سیکلیک آروماتیک‌ها ترکیب ماده سه حلقه‌ای آنتراسن تولید شرکت merck بود که به عنوان تنها منبع کربن به میزان ۵۰ mg در هر لیتر به محیط کشت MSM افزوده شد. سپس نمونه باکتری در$۳۰^{o}C$و ۱۵۰ rpmگرماگذاری شدند(۲۱).

بررسی امکان تجزیه زیستی و استفاده از آلیفاتیک‌های بلند زنجیره پارافینی

در این مطالعه ایکوزان بیست کربنه سفید جامد شرکت merck، برای بررسی توانایی باکتری‌هادر استفاده از ترکیبات آلیفاتیک سنگین و بلند زنجیره به عنوان تنها منبع کربن، مورد استفاده قرار گرفت.در

این آزمایش، پارافین به روش Thin layer (۲۲) به میزان ۱٪ روی سطح ارلن پخش شد.در روزهای دوم، چهارم و ششم برای بررسی رشد کشت در پلیت نوترینت آگار به روش خطی انجام شد. برای هر نمونه بررسی با ۲ تکرار انجام گرفت.

بررسی توانایی تولید بیو سورفکتانت

به منظور بررسی توانایی ترکیبات فعال سطحی یا بیوسورفکتانت توسط باکتری مورد مطالعه ابتدا از همولیز گلوبول‌های قرمز خون گوسفندی به روش ارائه شده توسط Balogun و Fagade ۲۰۰۸ استفاده شد(۲۳). سپس تکنیک پخش شدن نفت به روش Techaoei و همکاران ۲۰۰۷ بکار رفت(۲۴). در پایان تکنیک فروریختن قطره به روش ارائه شده توسط Tugrul و Cansunar ۲۰۰۵ استفاده شد(۲۴).هر آزمون با ۳ بار تکرار انجام شد.

بررسی تغییر هیدروفوبیسیته سطحی باکتری در مواجهه با VR

تست اصلاح شده BATH یا Bacterial Adhesion To Hydrocarbonsمطابق روش ارائه شده توسط Rosenbergدر سال۱۹۸۰ انجام گرفت (۲۵). در این آزمایش از سوسپانسیون میکروبی از محیط نوترینت براث تهیه شد. سپس میزان هیدروفوبسیته یا آب‌گریزی که به درصد گزارش می-شود با فرمول زیر محاسبه شد. در این فرمول a میزان کدورت اولیه فاز آبی و b میزان کدورت فاز آبی بعد از ورتکس کردن با هیدروکربن بود.

$$[(a-b)/a]\times 100$$

بررسی فعالیت امولسیفیکاسیون

آزمون بررسی فعالیت امولسیفیکاسیون مطابق روش ارائه شده توسط Krepsleyو همکاران(۲۰۰۷) انجام شد. درصدامولسیفیکاسیون با استفاده از رابطه زیر تعیین شد(۲۶).

طول کل ستون / طول لایه امولسیفای شده =EC

x۱۰۰

بررسی توانایی زندگی شیمیولیتوتروفیک (اتوتروفی) باکتری

توانایی رشد باکتری‌ها در محیط کشت حداقل MSM در گستره ای از pH و دما همچنین توانایی استفاده از ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک، شکستن پیوندهای C-S و تولید بیوسورفکتانت این فرضیه را ایجاد کرد که قاعدتاً این باکتری‌های انتخاب شده می توانند از VR به عنوان منبع همه نیازهای خود اعم از کربن و انرژی ازت ، گوگرد و نیز نمک‌های مورد نیاز خود استفاده کنند. بنابراینآزمایش جدیدی طراحی شد که در آن هدف بررسی رشد باکتری‌ها در آب مقطر در حضور VR بود. اما برای جلوگیری از لیز شدن باکتری‌ها در لحظه تلقیح به محیط در اثر تورژسانس به جای آب مقطر از سرم فیزیولوژی (یا سالین) استفاده شد. برای حصول اطمینان از عدم حضور هر نوع ترکیب خارجی اعم از نمک‌ها یا مواد مغذی برای بررسی اولیه از سطح کلونی باکتری‌ها از محیط نوترینت آگار در ارلن حاوی سالین به همراه ۵٪ VR تلقیح انجام شد و رشد با کشت خطی از ارلن در فواصل زمانی در محیط نوترینت براث مورد تائید قرار گرفت.

آنالیز شیمیایی VR جهت بررسی تاثیر تیمار میکروبی

در مرحله بعدکه هدف آنالیز تغییر ساختار VR در چنین شرایطی بود باکتری‌های انتخاب شده در نوترینت براث به منظور غنی‌سازی در۳۰°C در rpm ۱۵۰ به مدت۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. سپس ۲۰ml‌از کشت اخیر در ۷۵۰۰ دور به مدت۲۰ دقیقهسانتریوفوژ شدند. سپس تهماندهٔ (Pellet) سانتریوفوژ با بافرفسفات شستشو شد و مجدداً پس از حل‌کردن رسوب در ۱۰ml سالین به مدت ۲۰ دقیقهدیگر در ۷۵۰۰ دور سانتریوفوژ شد. سپس رسوب در سالین حل شد و OD آن معادل ۱ تنظیم شد و نهایتاً ٪۵ از سوسپانسیون حاصل به محیط سالین همراه با ٪۵ VR تلقیح شد و نمونه ها در rpm ۱۵۰ در دمای۳۰°Cبه مدت ۳۰ روز گرماگذاری شد. بعد از طی شدن این مدت نمونه‌ها برای آنالیز شیمیایی به منظور بررسی تغییرات ایجاد شده در ساختار آنها از محیط کشت استخراج شدند.به منظور بررسی درصد تغییرات شیمیایی ایجاد شده به واسطه عملکرد میکروبی روی VR پس از سپری شدن دوره انکوباسیون،VR از فاز آبی محیط کشت استخراج شد. برای این منظور از ترکیب دی-کلرومتانشرکت Merck استفاده شد.

تهماند برج تقطیر خلا که فاقد هر نوع هیدروکربن فرار می‌باشد،از طریق آزمایش SARAASTM D-4124-01 (2002)به چهار بخش هیدروکربنی سنگین تبدیل می‌شود که عبارتند از هیدروکربن‌های اشباع خطی، ترکیبات حلقوی آروماتیک، رزین‌هاو آسفالتین‌ها(۲۷).اولین بخش از VR که در تست SARA از آن جدا می‌شود، nC5 آسفالتین‌ها هستند که در واقع ترکیبات نامحلول در *n*-هپتان می‌باشد. مابقی ترکیبات که با نام عمومی مالتین (maltene) شناخته می‌شوند، در برگیرنده ترکیبات اشباع، آروماتیک‌ها و رزین‌ها می‌باشند. این سه جزء باقی مانده از طریق کروماتوگرافی ستون مایع از هم جدا می‌شوند.

هیدروکربن‌های اشباع ترکیبات محلول در *n*-پنتان هستند که وقتی به ستون تزریق می‌شوند، جذب سیلیکاژل موجود در ستون نمی‌شوند. جزء اشباع VR در ۱ لیتر *n*-پنتان با سرعت min/ml ۵ از ستون عبور داده می‌شود. سپس حلال بوسیله rotary vacuum evaporator تبخیر می‌شود تا بخش اشباع VR از این طریق تخلیص شود.

هیدروکربن‌های آروماتیک روی سیلیکا فعال در حضور *n*-پنتان می‌چسبد و نهایتا پس از جدا شدن ترکیبات اشباع از روی سیلیکا بوسیله تلوئن کنده می‌شود. بخش آروماتیک VR بوسیله تلوئن با سرعت min/ml ۵ از ستون کروماتوگرافی عبور داده می‌شود. در آخر بخش رزینی بوسیله محلول ۹۰/۱۰ متانول/تلوئن با سرعت min/ml ۵ از ستون عبور داده می‌شود. این بخش‌ها به صورت wt% گزارش می-شوند. این آزمایش در محیط‌های MSM، BSM و سالین قبل و بعد از تیمار میکروبی برای تعیین چگونگی اثر میکروب‌ها روی نسبت ترکیبات VR انجام گرفت. این آزمون برای هر نمونه ۳ بار انجام شد.پس از اندازه‌گیری میزان ترکیبات موجود در VRدر صد تغییرات هر ترکیب قبل و بعد از تیمار میکروبی از فرمول زیر محاسبه شد که در این فرمول a میزان درصد اولیه هر ترکیب قبل از اثر میکروبی است و b میزان ترکیب پس از تیمار میکروبی بود.

$$[(a-b)/a]\times 100$$

نتایج

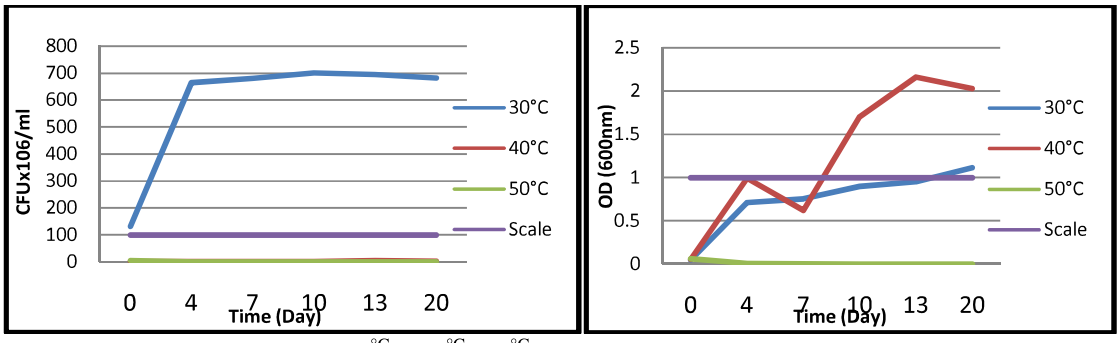
باکتری*Bacillus cereus* JQ340870باسیل اسپوردار گرم مثبتی بود که از نمونه خاک آلوده به نفت خام لاوانو همچنین از نفت خام منطقه لاوان مورد بررسی قرار گرفت (۱۲).نتایج حاصل از آمایش-ها نشان داد که این باکتری مولد بیوسورفکتانت می-باشد(تصویر ۱). قطر هاله ایجاد شده در همولیز گلبول قرمز ۰/۵ سانتی‌متر می‌باشد.ضمنا تست فروریختن قطره و پخش شدن در پلیت با قطر یک سانتی‌متر تایید کننده این امر بود.این باکتری محدودهٔ دمایی بین ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کند. بهترین رشد در۳۰°C می‌باشد(نمودار ۱). ضمناً قادر به تحمل pH بین ۵/۵ تا ۸ است و اپتیمم رشد در pH خنثی می‌باشد (نمودار ۲). این باکتریدر هوادهی بیشتر(rpm۱۵۰) دارای بیشترین توانایی در تجزیه زیستی ترکیبات هیدروکربنی است (نمودار ۳). به علت تولید بیوسورفکتانت که منجر به ایجاد میکروامولسیون در شرایط استرسِ دمای ۴۰°C می‌شود، ODبه مرور بالا می‌رود، ولی این مطلب به معنای افزایش رشد نیست بلکه رشد کمی در دمای ۴۰°C دیده می شود. این باکتری قادر به تکثیر و رشد در دمای ۵۰°C نمی‌باشد.

تصویر ۱ - همولیزخون در اثر تولید بیوسورفکتانت.

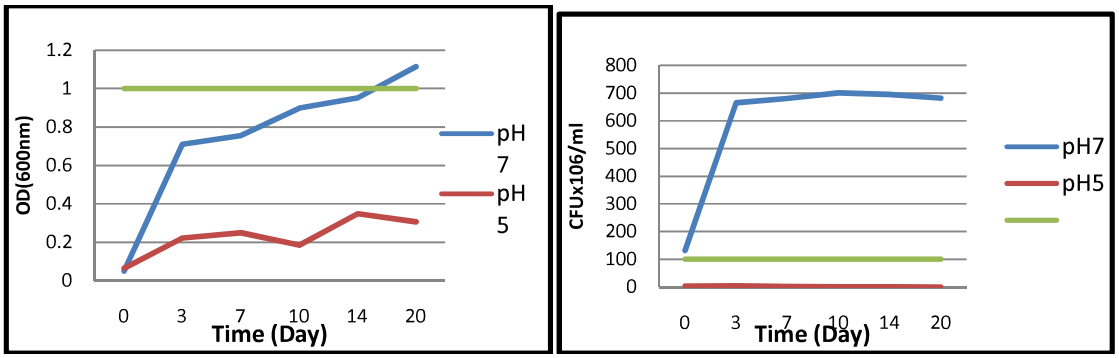
از دیگر مطالعات انجام شده بررسی توانایی باکتری در استفاده از WSFV به عنوان تنها منبع کربن بود. نتایج نشان داد که باکتری مورد بررسی قادر به استفاده از بخش محلول در آب VR به عنوان تنها منبع کربن و تحمل سمیت این ترکیبات محلول در آب را دارد. یکی از توانایی‌هایی که انتظار می رفت باکتری انتخاب شده داشته باشند، توانایی آن در استفاده از پلی‌آروماتیک هیدروکربن‌ها بود که رشد در حضور انتراسن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی موید این امر بود. همچنین این باکتری علاوه بر توانایی استفاده ار آروماتیک‌های چند حلقه‌ای می-تواند در صورتی‌که آلکان‌های بلند زنجیره پارافینی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کرده و آن را تجزیه کند. این باکتری دارای توانایی۲۰ درصد امولسیفیه کردن نفت بوده و هیدروفوبیسیته سطحی آن در مواجهه با VR ۳/۲۶ درصد تغییر کرد. این باکتری هم در محیط نمک‌های معدنی پایه، هم در محیط فاقد گوگرد و هم در سالین می‌تواند در حضور ته ماند برج رشد در محیط فاقد منبع گوگرد بیانگر توانایی دسولفوریزاسیون این باکتری علاوه بر سایر ویژگی‌های منحصر به فرد آن می‌باشد (نمودار ۴).

نتایج آزمون SARA قبل و بعد از تیمار میکروبی بیانگر کاهش ۷۱ درصدی آسفالتین در

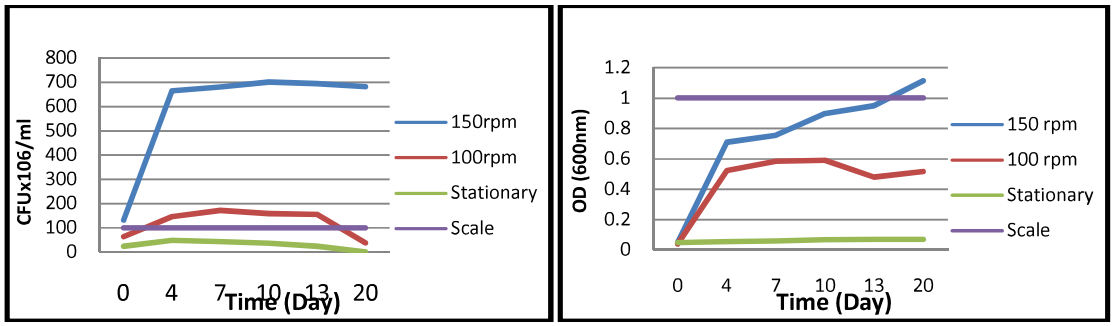
محیط MSM و ۵۳ درصدی در آب (سرم فیزیولوژی) توسط این باکتری می‌باشد (نمودار ۵).



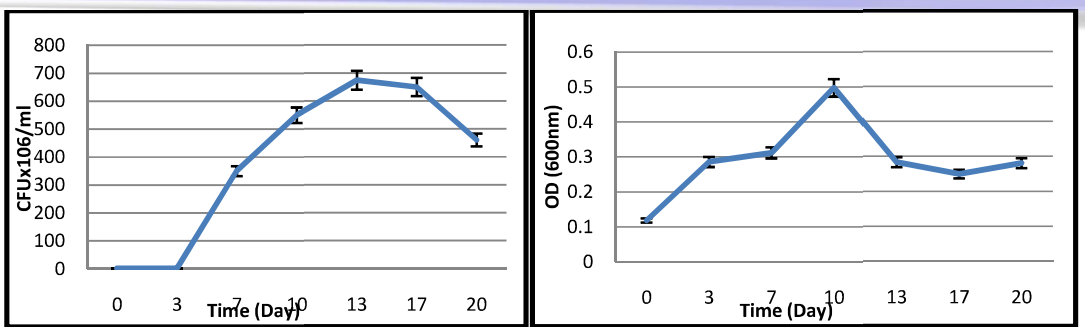
نمودار ۱ -مقایسهٔ تغییرات OD و CFU در ۳۰ °C، ۴۰ °C و ۵۰ °C در باکتری S2M.



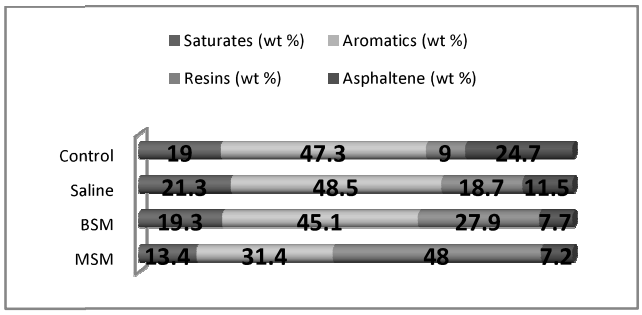
نمودار ۲ -مقایسهٔ تغییرات OD و CFU در pH ۵ و ۷ در باکتری S2M.



نمودار ۳ - مقایسهٔ تغییرات OD و CFU در شرایط سکون، ۱۰۰rpm و ۱۵۰rpm در باکتری S2M.



نمودار ۴ -تغییرات ODو CFUدر محیط کشت BSM.



نمودار ۵ – نتایج آزمایش SARA.

بحث

باکتری*Bacillus cereus* JQ340870یک باسیل اسپوردار گرم مثبت است. یکی از اصلی‌ترین توانایی-های باکتری‌های مصرف‌کننده یا تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها و ساکن در زیست‌بوم‌های هیدروکربنی اعم از سبک و سنگین توانایی تولید ترکیبات فعال سطحی یا بیوسورفکتانت‌ها به منظور افزایش دسترسی زیستی برای تاثیر آنزیمی و کاتالیتیکی روی این ترکیبات است(۲۹،۲۳).یافته‌های این مطالعه تایید کرد که این باکتری مطابق با یافته‌های Hesueh و همکاران ۲۰۰۷ و صعودی و همکاران ۲۰۰۹ مولد بیوسورفکتانت می‌باشد. باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت دارای توانایی امولسیفیه‌کردن انواع هیدروکربن‌ها با مقادیر مختلف مطابق یافته-های Krepsky و همکاران در سال۲۰۰۷ می‌باشند. در این تحقیق نیز باکتری هدف امولسیفیکاسیون قابل توجهی را روی ترکیبات هیدروکربنی اعمال کرده است(۳۰). چنانکه پیش بینی می‌شد مشابه گزارش Mariano در سال ۲۰۰۸ (۳۱) این باکتری در هوادهی بیشتر(rpm۱۵۰) عملکرد بهتری در تجزیه زیستی ترکیبات هیدروکربنی دارد. از آنجایی که این باکتری یک باکتری نفت‌زی بوده و از مناطق نفتی ایران جداشده است، همانگونه که نتایج آزمایش‌های این تحقیق نشان می‌دهد دارای تحمل-پذیری فیزیکوشیمیایی بالایی است گرچه فاکتورهای محیطی مثل دما و اسیدیته بنابر آنچه Seddique و همکاران در گزارش خود اذعان داشته اند، بر میزان و بهینه رشد موثر می‌باشند(۳۲).از آزمایش‌های انجام شده در این مطالعهتوانایی تحمل و استفاده از ترکیب WSFV(Water Soluble Fraction of VR)به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود. غالبا ترکیبات آروماتیک ساده و نفتنیک اسیدها، بخش-های محلول در آب قیرهای طبیعی محسوب می‌شوند که گرچه دارای سمیت برای سیستم‌های بیولوژیک

هستند، اما گزارش‌های متنوعی نیز در مورد تجزیه زیستی آنها وجود دارد (۱۹). برای این بررسی، WSFV از روش اصلاح شده ارائه شده توسط Pendrysاستفاده شد(۲۰) که نهایتا این توانایی بالقوه باسیلوس سرئوس مورد مطالعه را نیز آشکار کرد.توانایی تحمل و تجزیه این ترکیبات سمی از برتری‌های اکولوژیکی است که در باکتری‌های نفتی دیده می‌شود(۴).

گرچه پلی‌سیکلیک آروماتیک‌های با وزن مولکولی بالا غالبا برای زمان‌های طولانی در خاک‌های آلوده به این ترکیبات باقی می‌مانند، اما مستندات چندی حاکی بر تجزیه زیستی این گونه ترکیبات سنگین مولکول و بزرگ در مدت زمان طولانی درطبیعت وجود داردو هر چه این ترکیبات بزرگتر باشند، زمان بقای آنها در محیط بیشتر است (۲۲،۲۱). توانایی مشابهی در بسیاری از باکتری‌ها دیده شده است. برای مثال Boutchez و همکارانوقوع این پدیده را به صورت کومتابولیسم به اثبات رساندند (۳۳). Harwood و Gibson امکان تجزیه زیستی هوازی و بی‌هوازی انواعی از پلی‌سیکلیک آروماتیک‌ها را مطالعه کردند(۳۴). Johnson و همکاران امکان استفاده از روش زیستی در حذف پلی‌آروماتیک‌های آلاینده محیط را بررسی کردند(۳۵).

یکی از بخش‌های سنگین و عمده موجود در ته-ماند برج تقطیر خلاء پالایشگاه موم‌های پارافینی سنگین هستند که نحوه اثر باکتری‌ها روی آن و توانایی استفاده از آن به عنوان تنها منبع کربن در سبک‌سازی VR موثر خواهد بود (۲۲). رشد میکروارگانیسم‌ها غالباً در سوبستراهای جامد مثل آلکان‌های نرمال پارافینی به علت محدودیت در دسترسی زیستی، همچنین محدودیت در سطح تماس مشکل به نظر می‌رسد (۳۶). دما و فشار نفت خام به محض اینکه به سطح مخازن پمپ می‌شود، کاهش پیدا می‌کندکه این امر باعث جدا شدن هیدروکربن‌های پارافینی از نفت خام می‌گردد و در سطح تجهیزات تولید نفت رسوب می‌نماید. این رسوبات پارافینی سالانه هزینه‌ای معادل میلیون‌ها دلار برای شرکت‌های تولید کننده نفت به منظور پاکسازی این رسوبات و نیز از طریق کاهش دادن میزان تولید، به بار می‌آورد(۴). امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها در حل این معضل از راه‌حل‌های پیش روست. همانگونه که Sood و همکاران در سال ۲۰۰۸ و طباطبایی در سال ۲۰۱۵ و همچنین در این تحقیق نشان داده شد، ویژگی تجزیه زیستی پارافین-ها می‌تواند از توانایی‌های باکتری‌های بومی در مناطق نفت خیز می‌باشد(۳۷،۲۲).

از آنجایی که گوگردزدایی از برتری باکتری‌های زیست بوم نفت خام می‌باشد، این توانایی نیز مورد بررسی قرار گرفت. تحقیق مشابهی توسط Ishaq و همکاران برای بررسی توانایی سودوموناس در سولفورزدایی ته‌ماند تقطیر انجام گرفته است (۹).

تاکنون تحقیقات محدودی روی تجزیه و حذف آسفالتین به روش میکروبی انجام شده است و در مطالعات موجود هیچکدام تجزیه بالاتر از ۵۱/۵ درصد را گزارش نکرده اند(۳۶-۳۴). در این تحقیقات انواعی از باسیلوس‌ها، بر روی باسیلوس‌ها و استافیلوکوک‌ها، کورینه‌باکتریوم و سیتروباکتر مورد بررسی قرار گرفته اند(۴۰-۳۸). اما چنانکه نتایج تحقیق حاضر بعد از تیمار میکروبی نشان می‌دهد بیانگر کاهش۷۱درصدی آسفالتین در محیط MSM و ۵۳ درصدی در آب (سرم فیزیولوژی) توسط این باکتری می‌باشد. توانایی تجزیه زیستی آسفالتین، از یک طرف رسوبات آسفالتین آلاینده محیط را کاهش می‌دهد و از طرف

دیگر به منظور کاهش ویسکوزیته نفت‌های سنگین کاربرد دارد (۴۱).

این ویژگی‌های منحصر به فرد دراین باکتری سازش یافته با VR که از خاک آلوده به آن جدا شده است، آنرا به عنوان گزینهٔ بسیار مناسبی در فرآیند سبک‌سازی ترکیبات بسیار سنگین ته ماندهٔ تقطیر نفت خام و فرایندهای زیست پالایی تبدیل می‌کند. ضمنا این باکتری بسیار توانا گزینه بسیار مناسبی برای حل معضلات زیست محیطی در حذف آلاینده-های هیدوکربنی محسوب می‌شود.

امروزه گرایش به استفاده از راه حل‌های زیستی برای حل بسیاری از مشکلات صنعتی دانشمندان را به صورت روزافزونی به تحقیق و مطالعه در این زمینه ترقیب می‌کند. یکی از این صنایعی که به علت اهمیت سوخت و انرژی در زندگی انسان از یکسو؛ و آثار و تبعات زیست محیطیکه بر محیط زیست بجای می‌گذارد، از سوی دیگر به شدت گرایش به استفاده از بیوتکنولوژی پیدا کرده است، صنعت نفت می‌باشد. در این مطالعه با تحقیق و بررسی بر یکی از باکتری-های بومی نفت ایران بسیاری از توانایی‌های بالقوه این باکتری در صنعت نفت روشن شد. باکتری باسیلوس سرئوس JQ340870 با توانایی تجزیه زیستی ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک و نیز کاهش قابل توجه آسفالتین در ضمن تحمل زندگی در شرایط دشوار و سمی حاصل از ته‌ماند برج تقطیر خلا به یک باکتری بسیار کاربردی در صنعت نفت تبدبل شده است. این باکتری نه تنها به عنوان یک گزینه خوب برای حذف آلاینده‌های نفتی محیط زیست قابل استفاده است، به علاوه می‌تواند در فرایند زیست پالایی، ارتقاء کیفیت نفت و حتی ازدیاد برداشت میکروبی نفت مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

نتایج این تحقیق مستخرج از طرح پژوهشی با حمایت مادی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Campbell, C. J., Laherre`re, J. H., 1998. The end of cheap oil.Sci American 278: 78-84.
2. Vazquez-Duhalt, R., Torres, E., Valderrama, B., Borgne, S. L., 2002. Will biochemical catalysis impact the petroleum refining industry? Energy Fuels 16: 1239-1250.
3. Gray, M.R., 1994. Upgrading petroleum residues and heavy oils. New York, NY.
4. Kirkwood, K.M., Foght, J. M., Gray, M.R., 2004. Petrol biotech, developments and perspectives (1Thed), Elsevier B.V 151(4):113-144.
5. Tabatabaee, M. S., Mazaheri Assadi, M., 2013. Vacuum distillation residue upgrading by an indigenous *Bacillus cereus*. J Environ Health Sci Eng 11:18-25.
6. Gary, J.H., Handwerk, G.E., 1984. Petroleum refining technology and economics (2nd edition). Marcel Dekker, Inc. ISBN0-8247-7150-8.
7. Hsueh, Y. H., Somers, E. B., Lereclus, D., Ghelardi, E., Wong, A. C. L., 2007.Bio-surfactant production and surface translocation are regulated by PlcR in *Bacillus cereus* ATCC 14579 under low-nutrient conditions.Appl Environ Microbiol 73(22): 7225–7231.
8. Hurst, C.J., Sims, R.C., Sims, J.L., Sorensen, D.L., Mclean, J.E., Huling, S., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation as afunction of oxygen tension in contaminated soil.Proceedings of the 10th Annual Conference On Hazardous Waste Research.U.S
9. Ishaq, M., Ahmad, M., Naeem, M., Shakirullah, M., Khan, M.,2007. Desulfurization of crude oil distillates with *Pseudomonas putida*. J Chillian Chem Soci 52(4): 1299-1301.
10. Kilbane, J.J.R., 1990. Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds. Source Conserv Recycl 3: 69-81.

11. Margesin, R., Schinner, F., 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpinesoils. Appl Environ Microb 63(7): 2660-2664.
12. Shahidi Rizi, M., Akhavan Sepahi, A., Tabatabaee, M. S., 2012. Crude oil biodegradation by a soil indigenous bacillus sp. Isolated from Lavan Island. J Bioremediation 16(4): 218-224.
13. Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An Environmental perspective. Microb Rev 45:180-209.
14. Han, X., MacKinnon, M. D., Martin, J. W., 2009. Estimating the in situ biodegradation of naphthenic acids in oil sands process waters by HPLC/HRMS.Chemosphere76(1):63-70.
15. Mishra, S., Jyo, T. J., Kuhad, R. C., Lal, B., 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. Appl Environ Microb 67(4):1675–1681.
16. Atlas, R.M., 1975.Effect of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation.Appl Microb 30(3):396-403.
17. Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Garrett, K. K., George, G. N., Pickering, I. J., 1999. Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction:Analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. Appl Environ Microb 65(1):181–188.
18. Hwanga, G., Parkb, S. R., Leea, C.H., Ahna, I.S., Yoonb, Y.J., Mhin, B. J., 2009. Influence of naphthalene biodegradation on the adhesion of Pseudomonas putida NCIB 9816-4 to a naphthalene-contaminated soil. J Hazard Mat 172:491–493.
19. Phillips, U. A., Traxler, W. R., 1963. Microbial degradation of asphalt. Appl Microb 11: 235-238.
20. Pendrys, J. P., 1989. Biodegradation of asphalt cement-20 by aerobic bacteria. Appl Environ Microb 55(6): 1357-1362.
21. Ilori, M.O., Amund, D.I., 2000. Degradation of anthracene by bacteria isolated from oil polluted tropical soils. Z Naturforsch 55: 890–897.
22. Sood, N., Lal, B., 2008. Isolation and characterization of a potential paraffin-wax degrading thermophilic bacterial strain Geobacillus kaustophilus TERI NSM for application in oil wells with paraffin deposition problems. Chemosphere 70:1445–1451.
23. Balogun, S.A., Fagade, O.E., 2008. Screening for surface-active agent producing bacteria from diesel oil polluted tropical soil. World Appl Sci J 3 (6): 930-933.
24. Techaoei, S., Leelapornpisid, P., Santiarwarn, D., Lumyong, S., 2007. Preliminary screening of biosurfactant producing microorganisms isolated from hot spring and garages in Northern Thailand. Kmitl Sci Tech J 7:15-25.
25. Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenburg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell hydrophobicity.FEMS Microb Letter 9: 29-33.
26. Krepsky, N., Da Silva, F.S., Fontana L.F.,MAC, C., 2007. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. Braz J Biol 67(1): 117-124.
27. ASTM D4124-01, 2002. Standard test method for separation of asphalt into four fractions. Annual Book ASTM Standard,ASTM, Philadelphia.
28. Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele J. P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl Microb Biotech 45:156-164.
29. Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microb Mol Biol Rev 67(4):503–549.
30. Krepsky, N., Da Silva, F.S., Fontana L.F., MAC, C., 2007. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. Braz J Biol 67(1): 117-124.
31. Mariano,A. P., Bonotto,D. M., Angelis,D. F., Pirôllo,M. P. S., Contiero, J., 2008. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. Braz J Microb 39(1):1517.
32. Siddique, T., Okeke, B. C., Arshad M., Frankenberger, W. T., 2002. Temperature and pH effects on biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in water and a soil slurry.J Agri Food Chem50 (18):5070–5075.
33. Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J. P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl Microb Biotech 45:156-164.
34. Harwood, C. S., Gibson, J., 1988. Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris.* Appl Environ Microb 54(3):712-717.
35. Johnsen, A. R., Schmidt, S., Hybholt, T. K., Henriksen, S., Jacobsen, C. S., Andersen, O., 2007. Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by mycobacteria. Appl Environ Microb 73(5):1474–1480.
36. Fabien M., 1998. Biodegradation of paraffin wax, athesis submitted to the faculty of graduate studies and research in partial fulfilment of the

requirements of the degree of master of engineering, department of chemical engineering Mcgill University, Montréal
37. Tabatabaee, M. S., 2015.Ecofriendly, candle precursor (Paraffin wax) production by Iranian indigenous bacterium to reduce the indoor health risks. J Paramed Sci6(3):54-59.
38. Pineda-Flores, G., Boll-Argüello, G., Lira-Galeana, C., Mesta-Howard, A. M., 2004. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. Biodegradation 15:145-151.
39. Tavassoli, T., Mousavi, S., Shojaosadati, S., Salehizadeh, H., 2012. Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. Fuel 93:142-148.
40. Jahromi, H., Fazaelipoor, M., Ayatollahi, S., Niazi, A., 2014. Asphaltenes biodegradation under shaking and static condition. Fuel 117: 230-235.
41. Lavania, M., Cheema, S., Sarma, P. M., Mandal, A. K., Lal, B., 2012. Biodegradation of asphalt by *Garciaella petrolearia* TERIG02 for viscosity reduction of heavy oil. Biodegradation 23:15-25.