Journal of Microbial World
Volume 13, No. 2, July 2020

Original Article

Lubrication and oil recovery by biosurfactant produced by *Acinetobacter johnsonii* ABR6

Elham Akbari[1], Keivan Beheshti-Maal[2], Behnam Rasekh[3], Zarindokht Emami- Karvani[4], Meisam Omidi[5]

[1]Ph.D, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. [2]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. [3]Assistant Professor, Microbiology and Biotechnology Research Group, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran. [4]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. [5]Assistant Professor, Medical Nanotechnology and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Solid and semi-solid wastes are produced as oil sludge at different stages of crude oil refining. Accumulation of oil waste in the refinery reduces the efficiency of oil refining and its release causes environmental pollution. The purpose of this study is to lubricate crude oil in pipelines and recycle oil using a biosurfactant produced by an indigenous strain.
Materials and Methods: The biosurfactant-producing isolates were obtained from petroleum reservoir in Isfahan Oil Refinery, Isfahan, Iran. Screening was performed by oil displacement method. Also the surface tension was measured by tensiometer. Biosurfactant chemical structure was identified by using chemical analysis. Oil recovery from the sludge was measured under controlled condition. The effect of biosurfactant lubrication was investigated on crude oil in the pipelines in vitro. The stability of biosurfactant in different environmental conditions was also determined.
Results: The best biosurfactant-producing bacterium was identified as *Acinetobacter johnsonii* ABR6, and its 16S-rDNA genomic sequence was deposited in GenBank under the accession number of MK100470. Chemical analysis of TLC and FTIR confirmed that the produced biosurfactant was lipopeptide. The biosurfactant obtained from this bacterium recovered 50% of crude oil from petroleum sludge and also reduced transportation speed from 64 to 35 seconds. This biosurfactant had high stability in 5% w/v NaCl, pH range of 8 to 10, temperature of 60 °C and autoclave conditions.
Conclusion: The results of this study showed that the biosurfactant produced by the native strain of *Acinetobacter Johnson* ABR6, in addition to operating in extreme conditions, also has the ability to recover oil and increase the transfer rate of crude oil in pipelines. Therefore, the use of this biosurfactant can be considered as an asset in the petroleum industry.

Keywords: *Acinetobacter johnsonii,* Biosurfactant**,** Crude oil lubrication.

Correspondence to: Keivan Beheshti-Maal

Tel: +98 3137420136

E-mail: beheshtimaal@iaufala.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(2): 154-164.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزهم شماره دوم (پیاپی ۴۳) تابستان ۱۳۹۹
صفحات ۱۶۴-۱۵۴

Original Article

روان سازی و بازیافت نفت خام توسط بیوسورفاکتانت تولید شده از *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6

الهام اکبری[۱]، کیوان بهشتی مآل[۲]*، بهنام راسخ[۳]، زرین دخت امامی کرونی[۴]، میثم امیدی[۵]

[۱]دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، [۲]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، [۳]استادیار،گروه پژوهش میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، [۴]استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، [۵]استادیار، گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پسماند های جامد و نیمه جامد به عنوان لجن نفتی در مراحل مختلف پالایش نفت خام تولید می شود. تجمع پسماند نفتی در پالایشگاه منجر به کاهش کارایی پالایش نفت و رهاسازی آن موجب آلودگی های زیست محیطی می شود. هدف از انجام این تحقیق روان سازی نفت خام در خطوط لوله و بازیافت نفت با استفاده از بیوسورفاکتانت تولید شده توسط یک سویه ی بومی می باشد.

مواد و روش ها: جدایه های مولد بیوسورفاکتانت از مخازن نفت پالایشگاه اصفهان جداسازی شدند و غربال گری آن توسط آزمون گسترش نفت انجام شد. همچنین کشش سطحی با استفاده دستگاه تنسیومتر اندازه گیری شد. ساختار شیمیایی بیوسورفاکتانت با استفاده از آنالیزهای شیمیایی شناسایی شد. بازیافت نفت از لجن نفتی در شرایط ثابت اندازه گیری شد. تاثیر روان سازی بیوسورفاکتانت بر روی نفت خام در خطوط لوله در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی گردید. همچنین پایداری بیوسورفاکتانت در شرایط محیطی مختلف اندازه گیری شد.

یافته ها: بهترین باکتری تولید کننده ی بیوسورفاکتانت به عنوان *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 شناسایی شد و توالی ژنومی 16S rDNA آن در بانک ژن با شماره ی دسترسی MK 100470 ثبت شد. آنالیز های شیمیایی اثبات کرد که بیوسورفاکتانت تولید شده لیپوپپتیدی است. به وسیله ی بیوسورفاکتانت حاصل از این باکتری ۵۰ درصد نفت خام از لجن نفتی بازیافت شد و همچنین سرعت انتقال نفت خام در خطوط لوله از ۶۴ ثانیه به ۳۵ ثانیه کاهش یافت. همچنین این بیوسورفاکتانت پایداری بالایی در ۵٪ w/v نمک، گستره ۸ pH تا ۱۰ و دمای ۶۰ درجه سلسیوس و شرایط اتوکلاوو را داشت.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که بیوسورفاکتانت تولید شده توسط سویه ی بومی *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 علاوه بر فعالیت در شرایط افراطی، قابلیت بازیافت نفت و افزایش سرعت انتقال نفت خام در خطوط لوله را نیز دارد. بنابراین استفاده از بیوسورفاکتانت حاصل در صنایع نفت توصیه می شود.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر جانسونی*، بیوسورفاکتانت، روان سازی نفت خام.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۹

*) آدرس برای مکاتبه: فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۳۱۳۷۴۲۰۱۳۶ پست الکترونیک: beheshtimaal@iaufala.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

مقدمه

لجن نفتی از مخلوط پیچیده ای از هیدروکربن های نفتی، رسوبات و فلزات سنگین و آب تشکیل شده است که در فرایند اکتشاف و توسعه ی مناطق نفتی و همچنین در پالایشگاه نفت به وجود آمده است (۱). لجن نفتی به عنوان پسماند پرخطر دسته بندی می شود و منبع آلودگی عظیمی برای خاک، هوا و آب های زیر زمینی است. همچنین به دلیل عظیم بودن حجم، سخت بودن تیمار و خطرات بالقوه زیست محیطی، به عنوان مشکل بزرگ صنایع نفت و پتروشیمی قلمداد می شود (۲). بازیافت نفت از لجن نفتی بهترین گزینه ی مطلوب برای حفظ محیط زیست از لجن نفتی است. همچنین به صنایع نفت در استفاده ی مجدد از منابع نفت و بازیافت نفت و انرژی کمک می کند. علاوه بر این بازیافت لجن نفتی می تواند میزان دفع زباله های خطرناک خارج از منطقه ی صنعتی را کاهش دهد و موجب کاهش آلودگی و کاهش استفاده از منابع انرژی غیر تجدید پذیر گردد (۳). علاوه بر مشکل یاد شده، در مخازن و خطوط انتقال نفت، مشکل جابجایی نفت خام غلیظ نیز وجود دارد. اضافه کردن بیوسورفاکتانت موجب آسان شدن حذف نفت خام غلیظ می شود. همچنین حرکت نفت خام سنگین به مخزن اصلی نیاز به زمان زیادی دارد و پمپاژ چنین ماده ی غلیظی نیاز به انرژی زیادی دارد (۴). راهبرد اصلی حل این مشکلات، استفاده از بیوسورفاکتانت است که منجر به کاهش دادن فشار بین نفت و فاز آبی شده و در ادامه منجر به کاهش غلظت نفت و افزایش بیرون کشیدن نفت خام سنگین می شود (۵). بیوسورفاکتانت ها، سورفاکتانت های تولیدی توسط باکتری ها، مخمر ها و قارچ ها هستند. تمام بیوسورفاکتانت ها مولکول هایی دوگانه دوست هستند. آن ها از دو بخش شامل یک قسمت آب دوست و یک قسمت آب گریز یا یک گروه غیر قطبی تشکیل شده اند (۶). گروه های آب دوست شامل مونو، الیگو یا پلی ساکارید و پپتید یا پروتین هستند و گروه های آب گریز شامل اسیدهای چرب اشباع، غیر اشباع و اسید های چرب هیدروکسیل هستند (۷). لیپوپپتیدها یکی از گروه های مهم بیوسورفاکتانت ها هستند که از گروه متنوعی از پپتیدهای متصل به زنجیره ی اسیدهای چرب مختلف تشکیل شده اند. لیپوپپتیدها بیوسورفاکتانت های ترشحی خارج سلولی هستند که عمدتا از گونه های *باسیلوس* و *اسینتوباکتر* تولید می شوند. ساختار دوگانه دوست بیوسورفاکتانت منجر به افزایش سطح آب گریز و مواد نا محلول در آب و افزایش دسترسی زیستی آب در ترکیبات آلی می شود. فعالیت سطحی، این مواد را به امولسیون کنندگان عالی و کف زا تبدیل کرده است که کاربردهای وسیع در صنایع مختلف به ویژه صنعت نفت دارند (۸). بیوسورفاکتانت ها در مقایسه با سورفاکتانت های شیمیایی مزایای زیادی مانند، زیست تجزیه پذیر بودن، سمیت و ویژگی های کف زایی مناسب را دارند (۹). همچنین در شرایط دشوار مثل دمای بالا، pH بالا و نمک بالا به خوبی فعالیت دارند و می توانند توسط پسماندهای صنعتی تولید شوند (۱۰). حذف نکردن یا تجمع لجن نفتی تولید شده در صنایع نفت خطر بسیار بزرگی برای محیط زیست می باشد. از طرفی حجم انبوه آن در کف مخازن نگهداری نفت، حجم و کارایی مخازن را کم کرده و مشکلات بیشتری ایجاد می کند. استفاده از روش های شیمیایی در حذف آن، مشکل آلودگی محیط زیستی را بیشتر خواهد کرد. از طرفی به دلیل سمی بودن ترکیبات موجود در لجن نفتی، جمع آوری آن نیز برای کارگران خطرناک می باشد. هدف از این پژوهش، روان سازی لجن نفتی و همچنین بازیافت نفت از لجن نفتی با استفاده از بیوسورفاکتانت حاصل از باکتری های بومی مخازن بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری و جداسازی: نمونه گیری از آب آزاد موجود در مخازن نفت پالایشگاه اصفهان در سه نوبت متوالی به میزان ۵۰۰ میلی لیتر در آذر ماه سال ۱۳۹۶ انجام شد. نمونه ها در ظروف استریل ریخته و سریعا به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور کشت جدایه ها از محیط کشت Buschnel Hass Broth واجد ترکیبات: $MgSO_4$ ۲/۰ g/L، $CaCl_2$ ۲/۰ g/L، K_2HPO_4 ۱ g/L، KH_2PO_4 ۱ g/L، ۱

NH_4NO_3، ۵/۰ g/L $FeCl_2$ و ۵ میلی لیتر نفت خام معادل ۰/۵ درصد حجمی به حجمی (V/V) بود. این محیط در pH ۷ تنظیم شده سپس با برداشت ۱۰۰ میکرو لیتر از مایع این ارلن ها روی محیط کشت Buschnel Hass Agar کشت داده شد و پلیت ها به مدت ۵-۱ روز در گرمخانه ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری گردید (۷).

ب) غربال گری باکتری های جداسازی شده: به منظور تهیه ی روماند، مقدار ۱ میلی لیتر از محیط کشت Buschnel Hass Broth در میکروتیوب ۱/۵ ml ریخته شد و در سانتریفیوژ (Sigma) با دور g ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس روماند به منظور سنجش میزان تولید بیوسورفاکتانت ارزیابی شد (۸).

۱- آزمون گسترش نفت: به منظور غربال گری تولید بیوسورفاکتانت، باکتری ها در محیط Buschnel Hass Broth به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه ی سلسیوس با سرعت ۱۱۰ rpm هوادهی شدند. پس از این مدت آزمون گسترش نفت انجام شد. بدین منظور ۴۰ میلی لیتر آب مقطر در یک پلیت ۱۰ سانتی متر تمیز ریخته شد سپس ۱۰ میکرولیتر نفت خام روی آب مقطر ریخته تا لایه ی نازکی در سطح پلیت تشکیل شود سپس ۱۰ میکرولیتر روماند میکروبی به آرامی روی پلیت ریخته شد. در صورت وجود بیوسورفاکتانت هاله ی شفافی در مرکز تشکیل می شد و نفت به اطراف گسترش می یافت (۹).

۲- اندازه گیری شاخص امولسیفیکاسیون (کمی): به منظور بررسی فعالیت امولسیفیکاسیون بیوسورفاکتانت، باکتری ها در محیط Buschnel Hass Broth به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۱۰ rpm هوادهی شدند. پس از این مدت آزمون اندازه گیری آمیزندگی (امولسیفیکاسیون) انجام شد. به این منظور ۲ میلی لیتر نفت خام را به ۲ میلی لیتر روماند اضافه کرده و پس از ۲دقیقه مخلوط کردن، به مدت ۲۴ ساعت در جای ثابت قرار داده شد (به عنوان کنترل مثبت ۲ میلی لیتر نفت خام و ۲ میلی لیتر توین ۸۰ اضافه شده و به عنوان کنترل منفی ۲ میلی لیتر آب مقطر به ۲ میلی لیتر نفت خام اضافه گردید) و میزان آمیزندگی به صورت زیر محاسبه گردید (۹).

$E_{24\%}$ = ارتفاع ستون آمیزندگی/ارتفاع کل×۱۰۰

۳- اندازه گیری کشش سطحی: محیط کشت Buschnel Hass Broth در pH ۷ ساخته شد و اتوکلاو گردید سپس ml ۰/۵ از غلظت نیم مک فارلند در شرایط آسپتیک به محیط کشت تلقیح گردید و در انکوباتورشیکر دار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت هوادهی rpm ۱۰۰ هوادهی شد. پس از طی ۳ روز انکوباسیون ml ۳۰ از محیط کشت در سرعت rpm ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و کشش سطحی مایع روماند با دستگاه تنسیومتر (Switzerland, KRUESS KLOT K9) اندازه گیری شد. همچنین کشش سطحی آب مقطر به عنوان نمونه ی کنترل اندازه گیری شد. اعداد به صورت mN/m (میلی نیوتن بر متر) گزارش شدند (۹).

ج) آنالیز شیمیایی بیوسورفاکتانت:

۱- کروماتوگرافی لایه ی نازک (TLC): برای انجام کروماتوگرافی لایه ی نازک (Thin Layer Chromatography=TLC) کاغذ سیلیکا ۶۰ به ابعاد ۵×۱۵ سانتی متر چیده شد. ۰/۱ میلی گرم بیوسورفاکتانت خشک شده در ۱۰ میکرولیتر اتانول ۹۰ درصد حل شده و ۵ میکرولیتر نمونه با فاصله ی ۱ سانتی متر از لبه ی کاغذ نقطه گذاری شد. سیستم حلال که به عنوان فاز متحرک استفاده شد شامل کلروفرم، متانول، استیک اسید با نسبت v/v/v ۲/۱۵/۶۵ انتخاب شد. برای رنگ آمیزی، پاشش محلول حاوی ۰/۱۵ اورسینول و ۸/۲ میلی لیتر اسید سولفوریک ۶۰ درصد در ۴۲ میلی لیتر آب مقطر روی کاغذ انجام شد و پس از خشک شدن در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، نقاط به جا مانده بررسی شد (۱۰).

۲- طیف سنجی مادون قرمز (FTIR): برای به دست آوردن طیف مادون قرمز ۱۰ میلی گرم از بیوسورفاکتانت خشک شده به همراه ۲۰ میلی گرم از پتاسیم بروماید خالص مخلوط گردید و با فشار زیاد در درون قالب مخصوص به صورت یک قرص نازک در آورده شد و سپس در دستگاه (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy= FTIR) قرار

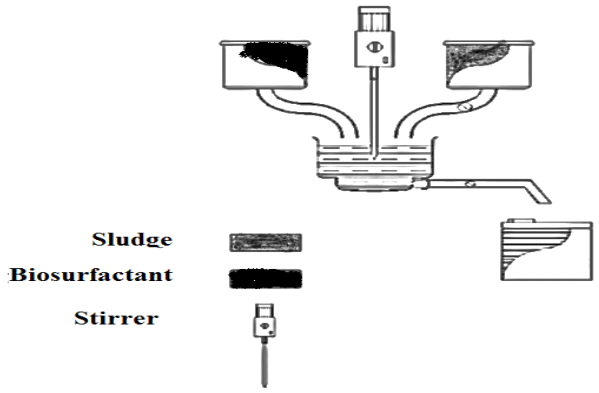
داده شد و عدد موجی آن از طول موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰).

د) بازیافت نفت خام با استفاده از بیوسورفاکتانت: به منظور بازیافت نفت خام از لجن نفتی در شرایط آزمایشگاهی، آزمون زیر مطابق با روش لیما و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. ابتدا ۴۰ گرم از لجن نفتی به دست آمده از انتهای مخازن ذخیره سازی نفت خام پالایشگاه خارک بوشهر اتوکلاوو گردید و سپس ۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شده به آن اضافه گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت تولید بیوسورفاکتانت پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون تلقیح شد. کنترل مثبت با اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر توین ۸۰ تهیه شد و کنترل منفی بدون اضافه کردن سورفاکتانت شیمیایی و بیوسورفاکتانت تهیه شد. پس از ۵ روز انکوباسیون در دمای محیط و هوادهی ۱۰۰ rpm، نفت در لجن نفتی امولسیفای گردید. سپس امولسیون با افزودن یک میلی لیتر محلول منیزیم نیترات شکسته شد. بدین ترتیب با جداشدن فاز آبی میزان نفت بازیافت شده اندازه گیری شد (۱۱).

ه) بررسی روان سازی بیوسورفاکتانت بر روی نفت خام: ابتدا جدایه ی مولد در محیط کشت تولید بیوسورفاکتانت در دمای محیط و سرعت هوادهی ۱۰۰ rpm کشت داده شد. پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون به منظور اطمینان از حضور بیوسورفاکتانت آزمون گسترش نفت و شاخص امولسیفیکاسیون انجام شد. خطوط لوله ای در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد (شکل ۱) که مقداری نفت خام در مخزن فوق به همراه بیوسورفکتانت ناخالص موجود در محیط کشت در نسبت یک پنجم به عنوان نسبت بهینه اضافه شد. اختلاط در دور ۴۰ rpm انجام شد. سپس خروجی از سیستم از مجرای ۴۰ سانتی متری با زاویه ۶۵ درجه عبور داده شد. زمان عبور از مجرا قبل و پس از اختلاط ثبت شد.

و) بررسی پایداری بیوسورفاکتانت در شرایط مختلف: پایداری بیوسورفاکتانت در شرایط نمکی، pH و دمایی مختلف اندازه گیری شدند. به این منظور جدایه در محیط کشت تولید بیوسورفاکتانت به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت هوادهی ۱۰۰ rpm انکوبه شد. پس از طی زمان انکوباسیون به ۲ میلی لیتر روماند حاصل، ۲ میلی لیتر از غلظت های مختلف نمک به میزان ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد اضافه شد. ۲ میلی لیتر از محلول با گستره های مختلف pH (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲) تهیه شده با اسید کلریدریک یک نرمال و سود یک نرمال، اضافه شد و شاخص امولسیفیکاسیون پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری گردید. به منظور پایداری حرارتی بیوسورفاکتانت به مدت ۱ساعت در دماهای مختلف ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه ی سیلسیوس نگهداری و شاخص امولسیفیکاسیون پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری گردید (۱۱).

ز) شناسایی مولکولی: به منظور شناسایی جدایه های برتر مولد بیوسورفاکتانت با استفاده از Colony PCR بر روی ژن 16S rDNA انجام شد. بدین منظور از دو پرایمر عمومی FD-1 (5′AGAGTTTGATCCTGGCTC3′) و RP-2 (3′ACGGCTACACGACTT5′) و برنامه ی استفاده شده مطابق با روش تحقیق قبلی(۱۲) انجام شد. پس از مشاهده ی نتیجه بر روی ژل نمونه برای تعیین توالی به شرکت (Microsynth, Switzerland) ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم افزار FinchTV-4 بررسی شد و شباهت هر توالی با استفاده از نرم افزار BLASTN با تمامی توالی های ژنی موجود در بانک جهانی ژن، GenBank، موجود در پایگاه ملی بیوتکنولوژی (NCBI) مقایسه شد (۱۳ و ۱۴).



شکل ۱: دستگاه روان سازی نفت خام یا لجن نفتی با استفاده از بیوسورفکتانت (۱۱).

یافته ها

الف) جداسازی و غربال گری جدایه های مولد بیوسورفاکتانت: با کشت نمونه های مختلف آب مخزن به دست آمده از پالایشگاه نفت اصفهان بر روی محیط کشت Buschnel Hass، ۳۰ جدایه ی باکتری به دست آمد که ۱۱ جدایه قادر به تولید بیوسورفاکتانت بودند. پس از انجام روش های غربال گری اختصاصی تولید بیوسورفاکتانت که شامل آزمون گسترش نفت و اندازه گیری شاخص امولسیفیکاسیون بودند جدایه ی w5 با کاهش کشش سطحی از ۷۰ به ۳۵ mN/m، آزمون گسترش نفت ۹ سانتی متر و شاخص امولسیفیکاسیون ۱۰۰ درصد به عنوان بهترین تولید کننده شناخته شد و به منظور آزمون های بعدی انتخاب شد.

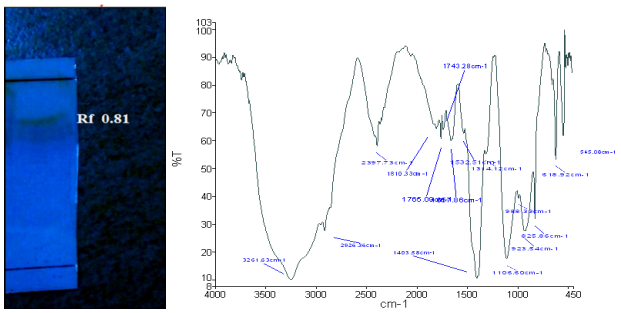
ب) آنالیز شیمیایی بیوسورفاکتانت: به منظور شناسایی و آنالیز ساختمانی بیوسورفاکتانت استخراج شده از جدایه ی w5 کروماتوگرافی لایه ی نازک و طیف FTIR در طول موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ انجام شدند. بر روی کاغذ سیلیکاژل یک جزء با RF= ۰/۸۱ مشاهده شد (شکل ۲). نتایج حاصل از FTIR در شکل یاد شده نشان داده شده است. پیک جذبی در محدوده ی ۳۲۶۱ گروه OH را نشان می دهد. همچنین پیک جذبی در محدوده ی ۲۸۵۳ نشان دهنده ی گروه COOH در کربوکسیلیک اسید می باشد. پیک جذبی در محدوده ی ۱۷۴۱ نشان دهنده ی گروه RCONHR است که حضور آمینواسیدها را نشان می دهد. پیک جذبی در محدوده ی عدد موجی ۲۹۲۱ نمایانگر کشش گروه CH است و در گروه آلکان ها مشاهده می شود. پیک جذبی در محدوده ی عدد موجی ۲۴۳۳ نشان دهنده پیوند گروه p-H در فسفین است. پیک جذبی در محدوده ی ۱۰۹۶ نشان دهنده ی کشش C-N در پیوند پپتیدی می باشد. همچنین پیک جذبی در محدوده ی عدد موجی ۸۹۴ نشان دهنده ی نشان دهنده ی =CH است و گروه آلکن را نشان می دهد. پیک جذبی ۵۴۰ وجود گروه S-S در پیوند دی سولفیدی در آمینواسیدها را اثبات می کند (۱۴). پیک جذبی در ۶۱۸ نشان دهنده ی پیوند =C–H است که وجود آلکن ها را اثبات می کند. با توجه به آنالیز پیوندهای زیر و اثبات وجود آمینواسید، بیوسورفاکتانت حاصل از جدایه ی w5 لیپوپپتید می باشد.

ج) بازیافت نفت خام با استفاده از بیوسورفاکتانت: با تیمار لجن نفتی به وسیله بیوسورفاکتانت حاصل از جدایه ی w5 در شرایط آزمایشگاهی، ۵۰ درصد نفت خام بازیافت شد. در نمونه ی کنترل مثبت ۷۵ درصد نفت خام از لجن نفتی بازیافت شد. اما در نمونه ی کنترل منفی تنها ۳ درصد از نفت خام بازیافت شد.

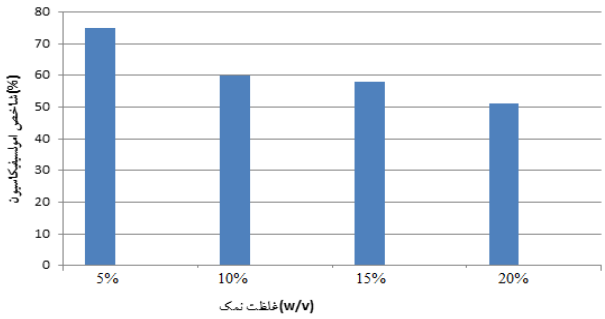
د) بررسی روان سازی بیوسورفاکتانت بر روی نفت خام: نتایج بررسی اثر روان سازی بیوسورفاکتانت بر روی نفت خام در خطوط لوله در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که زمان عبور نفت از مجرا قبل از اختلاط با بیوسورفکتانت ۶۴ ثانیه می باشد. اما پس از اختلاط با بیوسورفاکتانت تولید شده زمان به ۳۵ ثانیه کاهش یافت.

ه) بررسی پایداری بیوسورفاکتانت:

۱- پایداری بیوسورفاکتانت در شرایط نمکی مختلف: همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است در غلظت های نمکی ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد w/v سدیم کلراید، شاخص



شکل ۲: کروماتوگرام FTIR بیوسورفاکتانت جدایه ی w5.



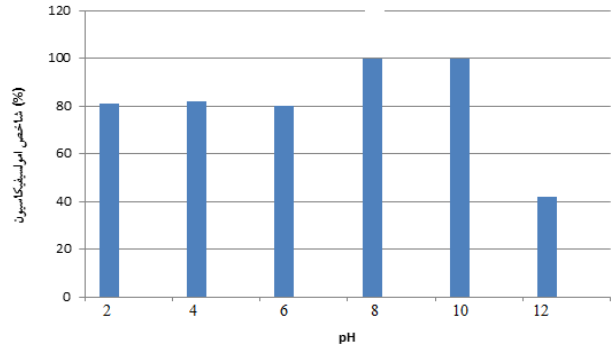
نمودار ۱: پایداری بیوسورفاکتانت جدایه ی w5 در غلظت های مختلف نمک.

امولسیفیکاسیون به ترتیب ۷۵، ۶۰، ۵۸ و ۵۱ درصد اندازه گیری شد. این نتایج پایداری بیوسورفاکتانت حاصل از جدایه ی w5 در غلظت های مختلف نمک را نشان می دهد. اما بیشترین میزان شاخص امولسیفیکاسیون در ۵ درصد نمک به میزان ۷۵ درصد بود.

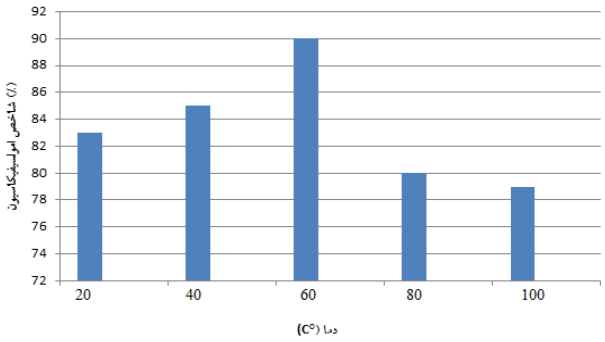
۲- پایداری بیوسورفاکتانت در گستره های مختلف pH: در گستره های pH ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰و ۱۲، شاخص امولسیفیکاسیون به ترتیب ۸۱، ۸۰، ۸۲، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۴۲ درصد اندازه گیری گردید (نمودار ۲). این مساله نشان دهنده ی پایداری بیوسورفاکتانت حاصل از جدایه ی w5 در دامنه های مختلف pH می باشد. اما بیشترین میزان شاخص امولسیفیکاسیون در pH ۸ و ۱۰ به میزان ۱۰۰ درصد اندازه گیری شد.

۳- پایداری بیوسورفاکتانت در دماهای مختلف: در دماهای ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه ی سلسیوس، شاخص امولسیفیکاسیون به ترتیب ۸۳، ۸۵، ۹۰، ۸۰ و ۷۹ درصد اندازه گیری گردید (نمودار ۳). این مساله نشان دهنده ی پایداری بیوسورفاکتانت حاصل از جدایه ی w5 در دماهای مختلف می باشد. اما بیشترین میزان شاخص امولسیفیکاسیون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به میزان ۹۰ درصد اندازه گیری شد.

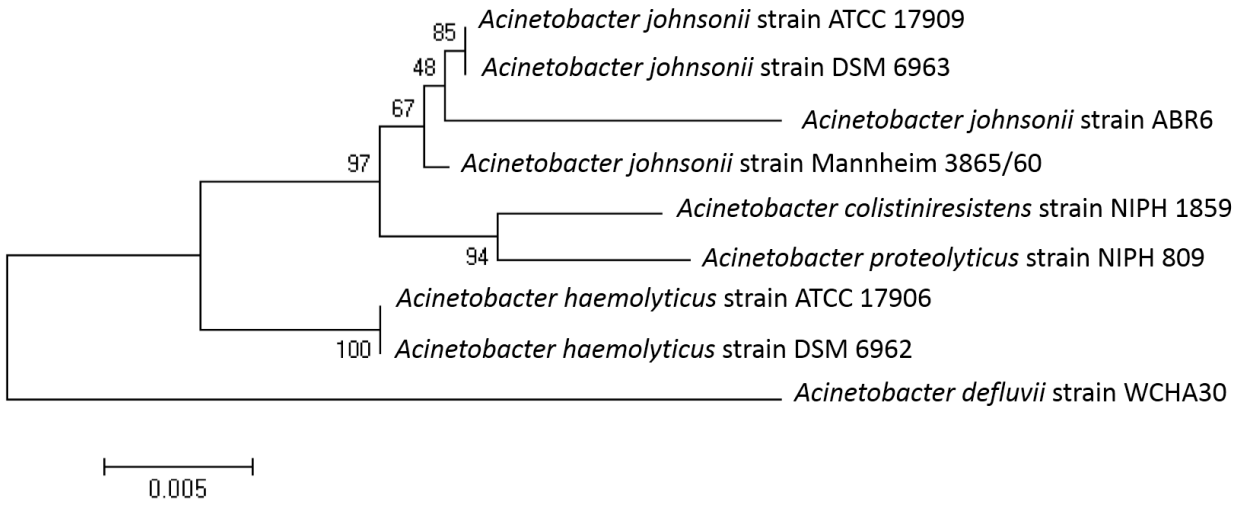
و) شناسایی مولکولی جدایه ی مولد بیوسورفاکتانت: نتایج حاصل از توالی یابی ژن 16S rRNA و بررسی شباهت هر توالی با استفاده از نرم افزار BLASTN با تمامی توالی های ژنی موجود در بانک جهانی ژن موجود در پایگاه ملی بیوتکنولوژی، NCBI مقایسه شد. در نتیجه جدایه ی w5، *اسینتوباکتر جانسونی* شناخته شد و به عنوان یک سویه ی جدید به نام *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 نام گذاری شد و با



نمودار ۲: پایداری بیوسورفاکتانت جدایه ی w5 در گستره های مختلف pH.



نمودار ۳: پایداری بیوسورفاکتانت جدایه ی w5 در دماهای مختلف.



شکل ۳: درخت فیلوژنی *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 رسم شده به وسیله ی روش Neighbor –Joining و ضریب Boot Strap صد.

شماره ی دسترسی MK100470 در بانک جهانی به ثبت رسید. درخت فیلوژنی جدایه ی W5 رسم شده به وسیله ی نرم افزار Mega6 در شکل ۳ آورده شده است.

بحث

فرآیندهای بالا دستی و پایین دستی در صنایع پالایش نفت می توانند میزان بالایی پسماند نفتی تولید کنند. لجن نفتی یک پسماند نفتی با ویسکوزیته ی بالا است که در صورت رهاسازی در محیط زیست مشکلات زیست محیطی فراوانی را به همراه دارد. میکروارگانیسم های بسیاری قادر به تولید بیوسورفاکتانت هستند که با استفاده از بیوسورفاکتانت آن ها می توان به بازیافت نفت از لجن نفتی و کاهش آلودگی پرداخت. در این تحقیق ۳۰ جدایه از نمونه ی آب مخزن پالایشگاه اصفهان جداسازی شدند که ۱۱ جدایه مولد بیوسورفاکتانت بودند. اما جدایه برتر تولید کننده ی بیوسورفاکتانت پس از تعیین هویت مولکولی به عنوان *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 نام گذاری شد. در تحقیقات مختلف از روش های متفاوتی برای غربال گری ارگانیسم های مولد بیوسورفاکتانت استفاده شده است اما متداول ترین آن ها روش گسترش نفت است که روشی ساده، کم هزینه و سریع می باشد. از این رو در تحقیق حاضر نیز از این روش استفاده گردید. در این تحقیق کاهش کشش سطحی توسط *اسینتوباکتر جانسونی* ۳۷ mN/m بود. الششتاوی (El-sheshtawy) و همکاران (۲۰۱۴) نیز موفق به جداسازی سویه ای شدند که توانایی کاهشش کشش سطحی ۳۵ mN/m را داشت (۹ و ۱۰). الوارز (Alvarez) و همکاران (۲۰۱۵) کاهش کشش سطحی توسط *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* به میزان ۵/۲۸ mN/m را گزارش کردند (۸). پاتواری (Patowary) و همکاران (۲۰۱۶) کاهش کشش سطحی توسط *سودوموناس آئروژینوزا* PG1 را به میزان ۲۹ mN/m گزارش کردند (۱۷). نتیجه ی حاصل از این تحقیق با میزان کاهش کشش سطحی پیشنهاد شده توسط الششتاوی (El-sheshtawy) و همکاران (۲۰۱۴) هم خوانی داشت (۹ و ۱۰). بررسی شاخص امولسیفیکاسیون نیز میزان تولید بیوسورفاکتانت را به صورت کمی نشان می دهد که این میزان در *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 به میزان ۹۲ درصد اندازه گیری شد. نتایج حاصل از آنالیز های شیمیایی (TLC و FTIR) نشان داد که بیوسورفاکتانت حاصل از *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6، لیپوپپتید است. در نتیجه ی تیمار لجن نفتی با بیوسورفاکتانت حاصل از *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 در شرایط آزمایشگاهی ۵۰ درصد نفت خام بازیافت شد و در نمونه ی کنترل مثبت ۷۵ درصد از نفت خام بازیافت شد. با این حال استفاده از سورفاکتانت های شیمیایی در مقیاس بالا به هیچ وجه مقرون به صرفه نیست و به دلیل عدم تجزیه ی زیستی و سمی بودن برای جانداران مشکلات زیست محیطی نیز به همراه دارد. ژائو (Zhao) و همکاران (۲۰۱۴) نیز با استفاده از بیوسورفاکتانت رامنولیپید حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* SG به بررسی بازیافت لجن نفتی پرداختند. آن ها از لجن نفتی به دست آمده از صنایع نفتی شمال غرب چین استفاده کردند و میزان بازیافت نفت از لجن نفتی را ۵۳ درصد اندازه گیری کردند (۱۶). لای (Lai) و همکاران (۲۰۰۹) نیز با استفاده از بیوسورفاکتانت حاصل از *باسیلوس سوبتیلیس* به بررسی بازیافت نفت از لجن نفتی پرداختند و میزان بازیافت نفت را ۶۳ درصد اندازه گیری کردند (۱۶). سایکیا (Saikia) و همکاران (۲۰۱۲) نیز با استفاده از بیوسورفاکتانت رامنولیپید حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* RS29 به بررسی بازیافت لجن نفتی پرداختند. آن ها از لجن نفتی به دست آمده از صنایع نفتی هند استفاده کردند و میزان بازیافت نفت را وقتی که از محیط کشت کامل باکتری و روماند استفاده کردند به ترتیب ۸۵ و ۵۵ درصد گزارش کردند (۱۷). لیما (Lima) و همکاران (۲۰۱۱) نیز با استفاده از روماند حاصل از محیط کشت از *سودوموناس آئروژینوزا* LBBMA مولد بیوسورفاکتانت، ۹۵ درصد از لجن نفتی به دست آمده از صنایع نفتی برزیل را بازیافت کردند (۱۸).در تحقیق حاضر با استفاده از خطوط لوله ی طراحی شده در آزمایشگاه میزان روان سازی نفت خام به تنهایی و به صورت مخلوط با بیوسورفاکتانت بررسی شد. زمان عبور نفت خام از خطوط لوله ی طراحی شده ۶۴ ثانیه اندازه

گیری شد. اما مخلوط بیوسورفاکتانت حاصل از *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 منجر به تسریع انتقال نفت خام در خطوط لوله از ۶۴ ثانیه به ۳۵ ثانیه شد. امانی (Amani) و کریمی نژاد (Kariminezhad) در سال ۲۰۱۶ با استفاده از بیوسورفاکتانت امولسان تولید شده توسط *اسینتوباکترکالکواستیکوس* PTCC 1813 حذف نفت خام در خطوط لوله ی استیل ضد زنگ را ارزیابی کردند (۱۹). آن ها گزارش کردند که لوله ها به صورت موفقیت آمیزی در دمای اتاق پاکسازی شدند. بررسی پایداری بیوسورفاکتانت حاصل از *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 در غلظت های مختلف نمک نشان داد که این بیوسورفاکتانت در غلظت های مختلف نمک فعالیت داشته به صورتی که حتی در ۵ درصد نمک شاخص امولسیفیکاسیون آن ۷۵ درصد اندازه گیری شده است. خادم الحسینی (Khademolhosseini) و همکاران (۲۰۱۹) بیشترین میزان فعالیت بیوسورفاکتانت تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* BS3 را در ۱۰ درصد نمک گزارش کردند اما در غلظت های بالاتر هم به میزان اندکی فعالیت داشته است (۲۱). بررسی پایداری در گستره های مختلف pH نشان داد که بیوسورفاکتانت حاصل از *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 در محدوده ی وسیع pH از ۲ تا ۱۲ دارای فعالیت است به این صورت که در pH ۲ شاخص امولسیفیکاسیون آن ۸۱ درصد بود. اما بهترین pH برای فعالیت آن ۸ و ۱۰ pH بود که شاخص امولسیفیکاسیون آن ۱۰۰ درصد اندازه گیری گردید. معافی (Mouafi) و همکاران (۲۰۱۶) میزان فعالیت بیوسورفاکتانت تولید شده توسط *باسیلوس برویس* در گستره های مختلف pH از اسیدی تا قلیایی را بررسی کردند. محققین یاد شده بیشترین میزان فعالیت بیوسورفاکتانت را در گستره pH ۴ تا ۹ گزارش کردند (۲۱). خادم الحسینی و همکاران (۲۰۱۹) پایداری بیوسورفاکتانت را در pHهای ۳ تا ۱۰ بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که پایداری در محدوده pH قلیایی بیشتر است (۲۰). دیپیکیا (Deepikia) و همکاران (۲۰۱۴) بیشترین میزان فعالیت بیوسورفاکتانت حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* BS3 را در گستره pH ۶ تا ۱۲ گزارش کردند (۲۲). در این تحقیق بررسی پایداری در دماهای مختلف نشان داد که بیوسورفاکتانت حاصل از *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 در محدوده ی دمایی وسیعی از ۲۰ تا ۱۰۰ درجه سلسیوس دارای فعالیت است و حتی بیشترین میزان فعالیت آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با ۹۰ درصد شاخص امولسیفیکاسیون اندازه گیری گردید. پایداری بالای این بیوسورفاکتانت به دماهای بالا، pH اسیدی و قلیایی و شرایط نمکی کاربرد آن را در صنایع نفت افزایش می دهد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از بیوسورفاکتانت یک باکتری بومی به نام *اسینتوباکتر جانسونی* ABR6 می توان ۵۰ درصد نفت خام موجود در لجن نفتی را بازیافت کرد و به این ترتیب می توان موجب کاهش رهاسازی و آلودگی زیست محیطی ناشی از لجن نفتی شد. مخلوط بیوسورفاکتانت این باکتری به همراه نفت خام منجر به تسریع انتقال نفت خام در خطوط لوله از ۶۴ ثانیه به ۳۵ ثانیه در شرایط آزمایشگاهی گردید. بنابراین جدایه ی باکتریایی مطالعه ی حاضر می تواند کاندید مناسبی برای تولید بیوسورفاکتانت لیپوپپتیدی در مصارف صنعتی با ویژگی های پایداری به دماهای بالا، pH اسیدی و قلیایی و شرایط نمکی باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این تحقیق از پژوهشگاه صنعت نفت تهران و معاونت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به دلیل حمایت های معنوی کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Singh A, Singh B, Ward O. Potential applications of bioprocess technology in petroleum industry. Biodeg. 2012; 23,865–880.

2. Araújo S, Silva-Portela B, Lima, DC. A biosurfactant protein derived from a metagenomic library with activity in oil degradation. Sci Rep. 2020; 10, 1340.

3. Bendaha M, Mebrek S, Naimi M. Isolation and comparison of rhamnolipids production in *Pseudomonas aeruginosa* P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V. Inter Biodet Biodeg,2012; 1–7444.

4. Banat IM and et al. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. fmicb, 2014; 5 697. 12

5. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G and et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microb Biotech.2010; 87:427-444.

6. Fenibo E, Ijimo G, Selvarjan R, Chiekere C, Microbial Surfactants: The Next Generation Multifunctional Biomolecules for Applications in the Petroleum Industry and Its Associated Environmental Remediation. Microb. 2019; 7(11): 581.

7. Ghorbannezhad H, Moghimi H, Dastgheib M. Biodegradation of high-molecular-weight aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Aspergillus calidoustus*, J of Micro.World.2018. 10: 4,346-359. [In Persian]

8. Alvarez VM, Jurelevicius D, Marques JM, Souza PM and et al. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. Coll Surf B Biointerf.2015; 136:14-21.

9. EI-Sheshtawy HS, Doheim M Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. Egyp J Petr.2014; 23:1-6..

10. El-Sheshtawy HS, Aiad I, Osman ME, Abo-ELnasr AA, Kobisy AS. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. Egyp J Petr.2015; 24:155–162.

11. Gudiña EJ, Fernandes EC, Rodrigues AI, Teixeira JA and et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. Front Microb. 2015; 59:1-7..

12. He C, Dong W, Li J, Li Y, Huang C, Ma Y. Characterization of rhamnolipid biosurfactants produced by recombinant *Pseudomonas aeruginosa* strain DAB with removal of crude oil. Biotech Lett.2017; 39:1381-1388.

13. Akbari E, Beheshti-Maal K, Nayeri H. Production and optimization of alkaline lipase by a novel psychrotolerant and halotolerant strain *Planomicrobium okeanokoites* ABN-IAUF-2 isolated from Persian Gulf. Inter Jl Med Res & Heal Scie.2016; 5:139–148.

14. Akbari E, Beheshti-Maal K, Nayeri H. A novel halo-alkalo-tolerant bacterium, *Marinobacter alkaliphilus* ABN-IAUF-1, isolated from Persian Gulf suitable for alkaline lipase production. IJEST.2018; 15:1767-1776.

15. Jafari A, Raheb J, Bardania H and et al. Isolation, cloning and expression of rhamnolipid operon from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 in logarithmic phase in *E. coli* BL21. Ame J lif Scie.2015; 2:22-30.

16. Lai C-C, Huang Y-C, Wei Y-H, Chang J-S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. J Hazard Mater. 2009;167:609–614.

17. Saikia RR, Deka S, Deka M, Banat IM. Isolation of biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. Annal. Microb.2012; 62:753–763.

18. Lima TMS, Fonseca AF, Leão BA, Mounteer AH et al. Oil recovery from fuel oil storage tank sludge using biosurfactants. J Bio. Biodeg. 2011; 2:1-5.

19. Amani H and Kariminezhad H. Study on emulsification of crude oil in water using emulsan biosurfactant for pipeline transportation. Pet. Sci. Tech. 2016; 34,216–222

20. Mouafi F, Elsoud M, et al Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. biotech. Report.2016; 7: 1092

21. Khademolhosseini R, Jafari A, Mosavi S, and et al. Physicochemical characterization and optimization of glycolipid biosurfactant production by a native strain of *Pseudomonas aeruginosa* HAK01 and its performance evaluation for the MEOR process. RSC Adv., 2019; 9, 7932-7947

22. Deepika, K.V., B.A. Kumar, S. Gnanender and P.V. Bramhachari, *Pseudomonas aeruginosa* KVD1 an efficient biosurfactant producing bacteria isolated from Krishna Delta Mangrove Sediments. Res. J. Environ. Sci.,2014, 8: 134-141

23. Ghorbannezhad H, Moghimi H, Dastgheib M. Biodegradation of high-molecular-weight aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Aspergillus calidoustus*, J of Micro.World.2018; 10: 4,346-359.[In Persian]