

## جداسازی و بررسی تجزیه زیستی آسفالتین توسط *Bacillus weihenstephanensis* بومی مخازن نفتی ایران

ملیحه هنرمند کاشی<sup>۱</sup>، میترا السادات طباطبائی\*<sup>۲</sup>، نازیلا ارباب سلیمانی<sup>۳</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

\*مسئول مکاتبات: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران، آدرس الکترونیکی: mitra\_tabatabaee@yahoo.com

محل انجام تحقیق: مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲

### چکیده

به علت اتمام منابع نفتی سبک در دسترس، در حال حاضر بیشترین تمرکز به سمت استفاده از منابع نفتی سنگین است که نفت‌های سنگین غلظت بالایی از آسفالتین را دارند و به دلیل اینکه آسفالتین‌ها مشکلاتی در عمل بازیافت، جداسازی و تخلیص و بهبود ایجاد می‌کنند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. نمونه‌گیری از نفت خام سکوه‌های نفتی منطقه‌ی لاوان در جنوب ایران انجام گرفت. مراحل جداسازی، غنی‌سازی و تخلیص باکتری‌ها در محیط کشت معدنی استریل ISO 9439 انجام گرفت. به منظور بررسی تجزیه زیستی آسفالتین، آزمون‌های گراویته و اسپکتروسکوپی FT-IR انجام گرفت. با هدف تعیین میزان تجزیه‌کنندگی باکتری انتخاب شده دو دمای ترموفیل و مزوفیل در نظر گرفته شد. نهایتاً باکتری انتخاب شده از میان ایزوله‌های جداسازی شده دارای بیشترین میزان تجزیه زیستی آسفالتین در فواصل ۲، ۲۰ و ۵۰ روز در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود. باکتری هدف با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مربوطه و شناسایی ۱۶S rRNA با شباهت ۹۹٪ باکتری *Bacillus weihenstephanensis* سویه DSM11821 داشت. با توجه به یافته‌های حاصل از FT-IR می‌توان دریافت که بیشترین میزان تجزیه توسط باکتری‌ها بر روی گروه های CH آروماتیک و آلیفاتیکو گروه های OH موجود در ساختمان آسفالتین و توانایی بالای آن‌ها در استفاده از این ترکیبات بود.

**واژه‌های کلیدی:** تجزیه زیستی، آسفالتین، نفت خام سبک، نفت خام سنگین، *Bacillus weihenstephanensis*

### مقدمه

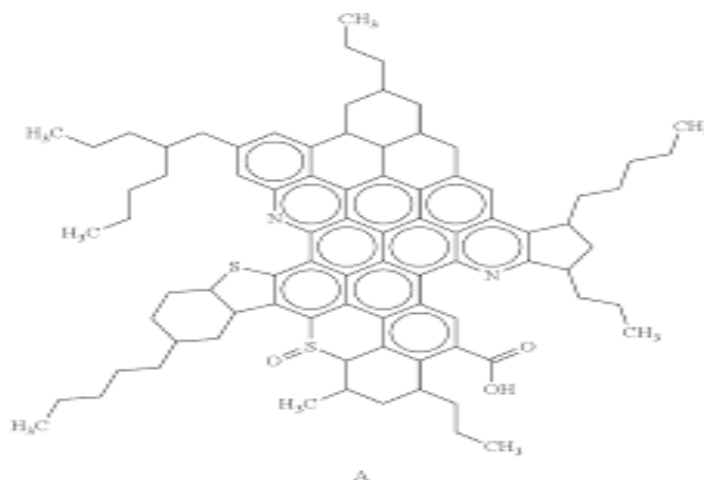
رزین‌های قطبی با وزن مولکولی بالا و آسفالتین رادارند (-۶) (۲). آسفالتین‌ها مشکلاتی را به سبب طبیعت فلوکولاسیون و ویسکوزیته‌شان به وجود می‌آورند و تأثیرات زیان‌باری را در بازیافت، تولید و تخلیص نفت خام ایجاد می‌کنند (۷-۹). به علت اینکه آسفالتین‌ها خاصیت چسبندگی دارند، در مکان‌های متخلخل روی سطوح چاه‌های نفتی و روی لوله‌های استخراج و انتقال نفت قرار می‌گیرند و مانع از عبور نفت از این مکان‌ها می‌شوند و هزینه‌های مربوط به تصفیه و

نفت مخلوط پیچیده از هیدروکربن‌ها و دیگر ترکیبات آلی به‌ویژه مجموعه‌ای از عناصر وانادیوم و نیکل می‌باشد (۱). به علت اتمام منابع نفتی سبک در دسترس، در حال حاضر بیشترین تمرکز به سمت استفاده از منابع نفتی سنگین است منابع نفتی سنگین بیش از ۷ برابر منابع نفتی خام سبک تخمین زده می‌شود. نفت‌های سنگین غلظت بالایی از فلزات (نیکل، وانادیوم)، گوگرد، نیتروژن، پارافین،

سویه باکتریاییگاریسیلا پترولاریا (Garciaellapetrolearia) سویه TERIG02 مورد بررسی قرار گرفت (۳). توسلی و همکاران ۲۵ گونه از نمونه‌های نفت و خاک آلوده از میدان‌های نفتی درود در جنوب ایران جدا کردند که آن‌ها قادر بودند ۴۶-۴۰ درصد از آسفالتین به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند (۱۷). جهرمی و همکارانشان توانایی تجزیه زیستی آسفالتین را در ۴ مجموعه میکروبی‌ای در لجن و خاک‌های آلوده‌شده به نفت مورد بررسی قرار دادند. بهترین مجموعه ۵۱/۵ درصد از آسفالتین را تجزیه کردند (۱۸).

میکروارگانیسم‌هایی وجود دارند که قادرند در محیط‌هایی با غلظت بالای آسفالتین سازگار شده و رشد کنند. هدف از این کار به دست آوردن باکتری توانا از نمونه‌های نفت خام برای استفاده از آسفالتین به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی است و کاربردهای صنعتی باکتری به‌منظور حذف آسفالتین با درصد بالا بود.

پالایش نفت را افزایش می‌دهند. ساختار مولکولی آسفالتین‌ها پیچیده می‌باشد (شکل ۱)، در نتیجه باعث پایداری و استقامت آن‌ها در برابر تجزیه زیستی می‌شود و تجمعات و توده‌هایی از آن‌ها را در زیست‌بوم ایجاد می‌کند (۱۰، ۱۱). Connan در سال ۱۹۸۴ مشاهده کرد که بعضی میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در محیط‌های کشتی که آسفالتین به‌عنوان تنها منبع کربن است، زنده بمانند. مگوت و همکاران در سال ۲۰۰۰ پیشنهاد کردند که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در نفت‌های خام رشد کنند. آزمایش‌های تجزیه زیستی توسط آنتون در سال ۲۰۰۰ نشان داد که ژئوماکرومولکول‌ها می‌توانند طی تجزیه زیستی بی‌هوازی تجزیه شوند (۱۲-۱۵). در سال ۲۰۰۹، مولینا و همکاران قادر به جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از مخلوط میکروبی خاک‌های آلوده به نفت شدند (۱۶). در مطالعه‌ای که توسط لاوانیا انجام شد، کاهش ویسکوزیته نفت خام Jodhpur با تجزیه زیستی آسفالت با استفاده از یک



شکل ۱. ساختار مولکولی آسفالتین.

هیپتان) در نظر گرفته شد. به مدت ۱۸ ساعت با برهم زدن از طریق جاذبه مغناطیسی با یکدیگر کاملاً مخلوط شدند. سپس مخلوط با کاغذ صافی واتمن (Whatman) شماره ۴۲ فیلتر شد و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و در دمای اتاق برای مصارف بعدی نگهداری شد.

## مواد و روش‌ها

### استخراج آسفالتین از نمونه نفت خام

برای رسوب آسفالتین و جدا کردن آن از سایر هیدروکربن‌ها از حلال n-هیپتان (ساخت شرکت Merck آلمان) استفاده شد. برای این منظور نسبت ۵:۱ (نمونه/n-

غنی شده با گلوکز و سپس غنی سازی مجدد با ۲ بار تکرار از محیط کشت غنی شده با عصاره مخمر استفاده شد. نمونه ها به محیط جامد ISO 9439 انتقال داده شدند و در دو دمای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت به ترتیب در دمای اتاق و انکوباتور گرما گذاری شدند. این کار به منظور بررسی سازگاری دمایی نمونه ها انجام شد و در مجموع ۶ باکتری جداسازی و بهترین نمونه انتخاب شد.

### تجزیه زیستی آسفالتین

به منظور بررسی تجزیه زیستی آسفالتین، نمونه ها بعد از ۲، ۲۰ و ۵۰ روز در دو دمای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی گراد بررسی شدند. در ابتدا آسفالتین از محیط های کشت با کاغذ صافی جدا شد. سپس از حلال تولوئن برای آسفالتینی که روی کاغذ صافی ها باقی مانده بود استفاده شد. بعد از تبخیر تولوئن، وزن آسفالتین بعد از تجزیه به دست آمد و درصد تجزیه آسفالتین به صورت زیر محاسبه شد:

$$100 \times \text{میزان آسفالتین قبل از تجزیه} - \text{میزان آسفالتین بعد از تجزیه}$$

میزان آسفالتین قبل از تجزیه

### شناسایی باکتری های جدا شده

شناسایی برای ۶ نمونه جداسازی شده و از جمله نمونه انتخاب شده صورت گرفت. شناسایی باکتری های جدا شده در سه مرحله شناسایی مورفولوژیکی، آزمون های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی انجام شد. آزمون های بیوشیمیایی انجام شده عبارت بودند از آزمون های کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول، سولفید هیدروژن، بررسی حرکت، متیل رد، Voges-Proskauer، سیترات، احیاء نیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، TSI (Triple sugar Iron Agar) و حساسیت به پنی سیلین. به منظور شناسایی قطعی سویه باکتریایی از روش شناسایی ژنتیکی Gene Neighbor joining و بلاست در منابع ژنتیکی Gene bank استفاده شد. جهت تکثیر ناحیه rDNA ۱۶S از پرایمرهای یونیورسال با توالی های زیر استفاده شد:



### جداسازی باکتری از نمونه های نفت خام

برای کشت نمونه ها از محیط کشت معدنی استریل ISO 9439 استفاده شد. این محیط کشت شامل مواد معدنی زیر بود:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ۰/۸۵ گرم،  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ۰/۲۱ گرم،  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ۰/۳۳ گرم،  $\text{NH}_4\text{CL}$  ۰/۰۵ گرم،  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ۰/۲۲۵ گرم،  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ۰/۰۲۷۵ گرم و  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ۰/۰۲۵ گرم. مقادیر ذکر شده بر اساس گرم در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر است. ۰/۰۵٪ از پودر آسفالتین استخراج شده به محیط کشت اضافه و pH آن حدود  $7.0 \pm 0.2$  تنظیم شد. به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد با سرعت ۲۰۰ rpm گرما گذاری شدند. کشت اول نمونه ها با ۵ بار تکرار در محیط کشت ISO 9439 جهت جداسازی باکتری های توانا در تجزیه زیستی آسفالتین انجام شد. به منظور افزایش بار میکروبی و سهولت در جداسازی و تخلیص، از محیط کشت

### روش های آنالیزی

#### ۱- آزمون گراویمت

برای اندازه گیری و تخمین زیست توده نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد برای ۱ ساعت قرار داده شدند. بدین ترتیب وزن رسوب سلولی به دست آمد که رشد ارگانیسم ها از طریق وزن خشک سلولی شان محاسبه شد.

#### ۲- اسپکتروسکوپی FT-IR (Fourier Transformed Infrared)

از طیف نمای FT-IR برای مقایسه ساختار آسفالتین قبل و بعد از تجزیه استفاده شد. برای انجام FT-IR نمونه ها روی دیسک های KBr (ساخت شرکت Merck آلمان) قرار داده شدند. اسپکتروسکوپی و تفکیک و تجزیه نمونه ها، در محدوده ی بالای  $4\text{cm}^{-1}$  و در دامنه ی بین  $400\text{cm}^{-1}$  تا  $4000\text{cm}^{-1}$  به دست آمد.

برنامه دمایی و زمانی پرایمرها طبق جدول ۱ انجام شد.

جدول ۱- برنامه دمایی و زمانی پرایمرها.

۹۵°C	۵ دقیقه	۱ چرخه
۹۵°C	۱ دقیقه	۳۰ چرخه
۵۵°C	۱ دقیقه	
۷۲°C	۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	
۷۲°C	۱۰ دقیقه	۱ چرخه

توالی یابی و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، باکتر مورد نظر *Bacillus weihenstephanensis* سویه SM 11821 با درصد تشابه ۹۹ درصد بود.

### نتایج به دست آمده از آزمایش تجزیه زیستی آسفالتی

میزان آسفالتین در زمان‌ها و دمای مختلف جدول ۳ نشان داده شده است. جدول ۴ درصد تجزیه آسفالتین توسط باکتری‌ها نشان داده شده است.

### میزان بیومس

جدول ۵ میزان بیومس یا زیست توده در مدت زمان‌ها ۲۰، ۵۰ و روز در دو دمای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. طبق نتایج بالاترین میزان بیومس بعد از روز گرماگذاری مشاهده شد که می‌توان نتیجه گرفت باکتری بیشترین میزان رشد را در محیط کشت مدت زمان ۴۸ ساعت دارا بود.

### نتایج

#### نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی

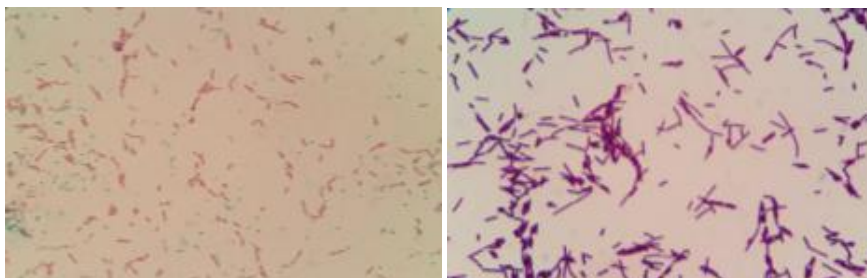
کلنی باکتری انتخاب شده دارای حاشیه‌ای دندان‌شکل، رنگ کرمی و با اندازه‌ی تقریبی ۸ میلی‌متر بود. مرکز کلنی دارای مقداری برآمدگی بود (شکل ۲). میکروسکوپی باکتری به صورت باسیل مشاهده شد (شکل ۳). این باکتری حاوی اسپور (سبز رنگ) بود که در شکل ۴ نشان داده شده است.

#### نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های مولکولی

جدول ۲ مجموعه آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده به همراه نتایج نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از



شکل ۲- کلنی باکتری در محیط کشت نوترینت آگار.



شکل ۳- رنگ آمیزی گرم و شکل میکروسکوپی باکتریشکل ۴- رنگ آمیزی مالاخیت گرین و اسپورهای باکتری

جدول ۲- مجموعه آزمون های بیوشیمیایی انجام شده.

ردیف	آزمون	نتایج
۱	کاتالاز	+
۲	اکسیداز	-
۳	تولید اندول	-
۴	تولید سولفید هیدروژن	-
۵	حرکت	+
۶	متیل رد	+
۷	VP	-
۸	سیترات	-
۹	احیاء نیترات	-
۱۰	TSI	A/A
۱۱	هیدرولیز نشاسته	+
۱۲	هیدرولیز کارژین	+
۱۳	حساسیت به پنی سیلین	مقاوم

جدول ۳- میزان آسفالتین در محیط کشت در زمان و دمای مختلف.

دمای (°C)	میزان آسفالتین در زمان صفر	میزان آسفالتین در کشت ۲ روزه	میزان آسفالتین در کشت ۲۰ روزه	میزان آسفالتین در کشت ۵۰ روزه
۲۵	۰/۰۵	۰/۰۳۳۹	۰/۰۲۶۰	۰/۰۲۲۰
۴۵	۰/۰۵	۰/۰۱۷	۰/۰۱۵۵	۰/۰۱۴۵

جدول ۴- درصد تجزیه آسفالتین در زمان و دمای مختلف.

دمای (°C)	درصد تجزیه آسفالتین کشت ۲ روزه	درصد تجزیه آسفالتین کشت ۲۰ روزه	درصد تجزیه آسفالتین کشت ۵۰ روزه
۲۵	۳۳/۲	۴۸	۵۶
۴۵	۶۶	۶۹	۷۱

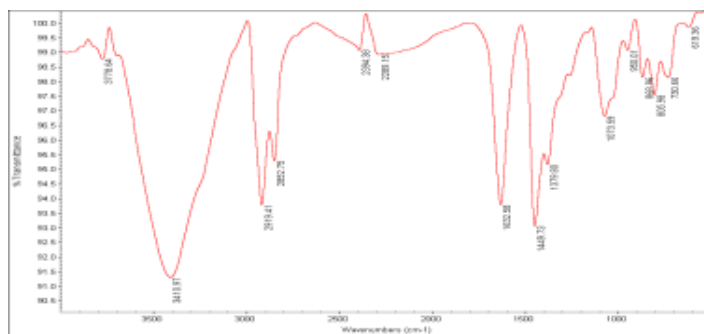
جدول ۵- میزان بیومس در زمان و دمای مختلف.

دمای درجه سانتیگراد	میزان بیومس کشت ۲ روزه	میزان بیومس کشت ۲۰ روزه	میزان بیومس کشت ۵۰ روزه
۲۵	۰/۰۳۶۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱
۴۵	۰/۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

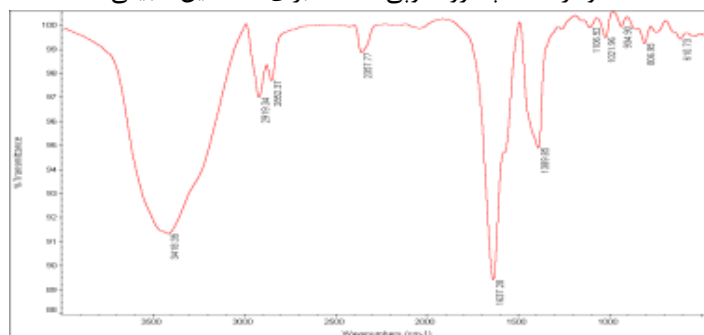
### نتایج حاصل از اسپکتروسکوپی FT-IR

برای مقایسه ساختار آسفالتین قبل و بعد از تجزیه از اسپکتروسکوپی FT-IR استفاده شد. نمودار ۱ مربوط به FT-IR آسفالتین قبل از اضافه کردن به محیط کشت و تجزیه

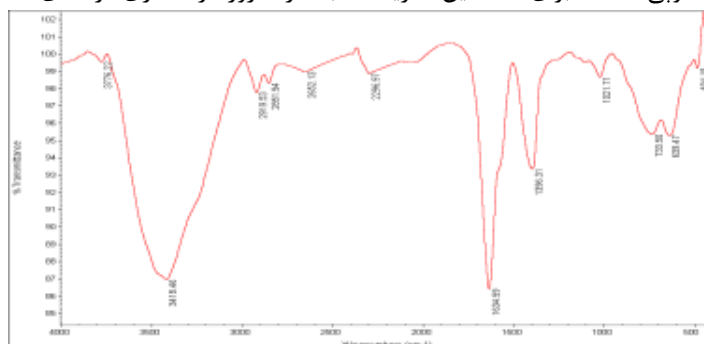
آن توسط باکتری‌ها را نشان می‌دهد. نمودارهای ۲ تا ۷ مربوط به اسپکتروسکوپی FT-IR باکتری بعد از ۲، ۲۰ و ۵۰ روز در دو دمای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.



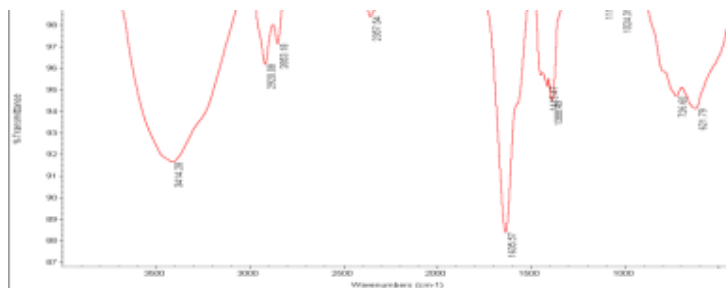
نمودار ۱- اسپکتروسکوپی FT-IR برای آسفالتین طبیعی.



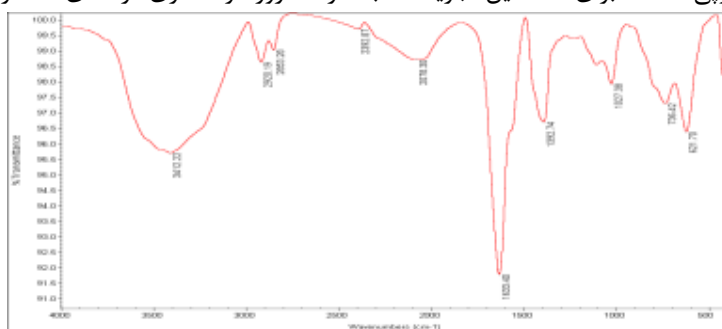
نمودار ۲- اسپکتروسکوپی FT-IR برای آسفالتین تجزیه شده بعد از ۲ روز گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.



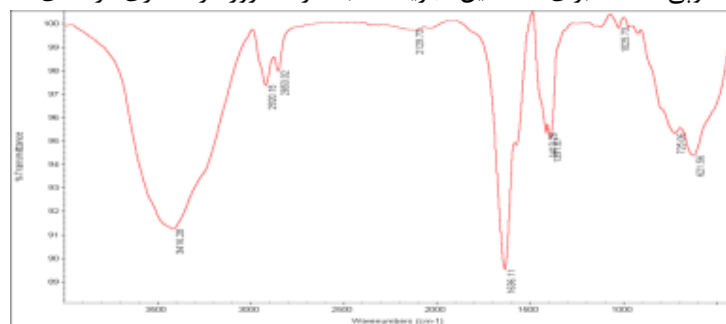
نمودار ۳- اسپکتروسکوپی FT-IR برای آسفالتین تجزیه شده بعد از ۲ روز گرماگذاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد.



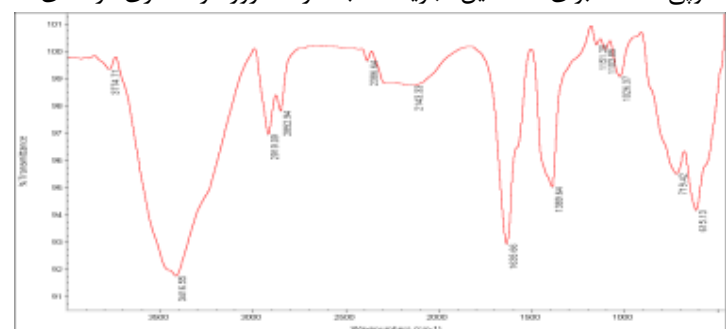
نمودار ۴- اسپکتروسکوپی FT-IR برای آسفالتین تجزیه شده بعد از ۲۰ روز گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد



نمودار ۵- اسپکتروسکوپی FT-IR برای آسفالتین تجزیه شده بعد از ۲۰ روز گرماگذاری در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد



نمودار ۶- اسپکتروسکوپی FT-IR برای آسفالتین تجزیه شده بعد از ۵۰ روز گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد



نمودار ۷- اسپکتروسکوپی FT-IR برای آسفالتین تجزیه شده بعد از ۵۰ روز گرماگذاری در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد

فاز پایدار مجموعه میکروبی غنی شده بعد از ۱۰ مشاهده شد (۱۱). توسلی و همکاران جد میکروارگانیسمها را به مدت ۲ ماه در دمای ۲۸

### بحث

مطالعه‌ای که توسط Pineda-Flores انجام شد، رشد مجموعه میکروبی در کاسوی آگار طی ۴۰ هفته ارزیابی شد.

استافیلوکوکوس هومینیس بود و گونه‌های مجموعه ۴ شامل باسیلوس سرئوس و لیزینی باسیلوس فوزیفورمیس بودند. در شرایط shaking در مدت ۲ ماه در ۴۰ درجه سانتی‌گراد میزان تجزیه ۴ مجموعه میکروبی به این صورت گزارش شد: مجموعه ۱: ۵۱/۵ درصد، مجموعه ۲: ۴۳٪، مجموعه ۳: ۲۱/۵ درصد، مجموعه ۴: ۳۳/۵ درصد و در شرایط static و پایدار میزان تجزیه به این صورت بود: مجموعه ۱: ۳۲٪، مجموعه ۲: ۲۷٪، مجموعه ۳: ۱۵٪، مجموعه ۴: ۲۴٪ (۱۸).

در مطالعه‌ایکه توسط لوانیاری گارسیالا پترولاریا (*Garciaellapetrolearia*) سویه TERIG02 انجام شد، کاهش ویسکوزیته نفت خام Jodhpur هنگامی که آسفالت همراه با ملاس به‌عنوان منبع کربن استفاده شد ۴۲٪ بود درحالی‌که هنگام استفاده از آسفالت به‌عنوان تنها منبع کربن، ویسکوزیته فقط ۳۷٪ کاهش پیدا کرد (۳).

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه با سپری شدن زمان میزان تجزیه نیز بیشتر شد، اما برخلاف گزارش‌های دیگر بیشترین میزان تجزیه زیستی طی ۲ روز اول اتفاق افتاده بود. باکتری بیشترین میزان تجزیه را در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۲، ۲۰ و ۵۰ روز از زمان گرماگذاری داشت و این نشان‌دهنده‌ی توانایی بالای این باکتری در تجزیه و استفاده از آسفالتین به‌عنوان منبع کربن و انرژی در دماهای بالا است که با توجه به مطالعات انجام شده و درصدهای تجزیه آسفالتین می‌توان گفت که تاکنون هیچ باکتری که بتواند ۵۶ درصد آسفالتین را در مدت‌زمان ۵۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تجزیه نماید و همچنین هیچ باکتری که بتواند در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف ۲۰، ۲ و ۵۰ روز این میزان آسفالتین را تجزیه نماید، جداسازی و شناسایی نشده است. این باکتری بهترین نمونه برای تجزیه زیستی آسفالتین در دماهای مختلف می‌باشد که قادر است از آسفالتین به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده کند و می‌تواند برای حذف آسفالتین در کاربردهای صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. با مقایسه نمودار به‌دست‌آمده از FT-IR آسفالتین طبیعی و با توجه به پیک اول نمودار در محدوده‌ی  $3400\text{ cm}^{-1}$  مربوط به فرکانس ارتعاشی OH می‌باشد که نتایج FT-IR در مدت‌زمان‌های مختلف و دماهای ۲۵ و ۴۵ درجه

سانتی‌گراد، در ۲۰۰ rpm در  $\text{pH} = 7/4$  در محیط حاوی  $5\text{ L}^{-1}$  آسفالتینانجام دادند (۱۷). جهرمی و همکاران جداسازی نمونه‌ها را در محیط کشت مایع که شامل  $\text{K}_2\text{HPO}_4\ 2.7\text{ g/L}$ ،  $\text{KH}_2\text{PO}_4\ 13.9\text{ g/L}$ ،  $\text{NaNO}_3\ 1\text{ g/L}$ ،  $\text{NaCl}\ 1\text{ g/L}$ ،  $\text{yeast extract}\ 0.5\text{ g/L}$ ،  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\ 10\%(\text{w/v})$ ،  $\text{MgSO}_4\ 2.5\%(\text{w/v})$ ،  $\text{g/L}$ ، انجام دادند. نمونه‌ها در شرایط shaking به مدت یک هفته در ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در ۱۲۰ rpm گرماگذاری شده بودند (۱۸).

در مطالعه حاضر، جداسازی نمونه‌های باکتریایی در دو دمای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد در  $\text{pH}: 7 \pm 0/2$  انجام شد که کدورت قابل‌توجهی در ارلن‌ها پس از ۲ روز مشاهده شد که پس از مراحل غنی‌سازی به مدت ۱ هفته کلنی‌های باکتری‌ها در محیط کشت جامد ملاحظه شد. غلظت ابتدایی آسفالتین  $1\text{ g L}^{-1}$  انتخاب و برخلاف کارهای مشابهی که قبلاً انجام شده بود طی مراحل جداسازی از هیچ منبع کربن و انرژی مثل گلوکز و یا عصاره مخمر استفاده نشد و تنها منبع کربن موجود در محیط کشت آسفالتین موجود در محیط کشت بود. گلوکز و عصاره مخمر تنها برای غنی‌سازی باکتری‌ها و رشد بیشتر آن‌ها به محیط کشت در مراحل بعدی اضافه‌شده بودند. شرایطی که در انجام آزمایش‌ها استفاده شد برای سازگار کردن باکتری‌ها و شرایطی مشابه شرایط موجود در چاه نفت بود (دمای بالا).

توسلی و همکاران ۵ میکروارگانیزم را جداسازی و شناسایی کردند که شامل گونه‌های سودوموناس TMU2-5، باسیلوس لنتوس TMU5-2، باسیلوس لیکنی فورمیس TMU1-1، باسیلوس سرئوس TMU8-2 و باسیلوس فیرموس TMU6-2 بودند. این باکتری‌ها ۴۰-۴۶٪ از آسفالتین را تجزیه کردند، اما در بین آن‌ها باسیلوس لنتوس TMU5-2 تواناترین گونه برای تجزیه آسفالتین بود (۱۷). جهرمی و همکاران توانایی تجزیه زیستی آسفالتین را در ۴ مجموعه میکروبی در لجن و خاک‌های آلوده‌شده به نفت موردبررسی قرار دادند. گونه‌های مجموعه ۱ شامل سودوموناس آئروجینوزا و سودوموناس فلئورسنسیبوس. مجموعه ۲ شامل گونه‌های سیتروباکتر آمالوناتیکوس و انتروباکتر کلوآسهبوس. مجموعه ۳ فقط شامل گونه‌ی



همین دلیل حلالیت هیدروکربن‌های آروماتیک بسیار مهم می‌باشد. در این مطالعه آسفالتین توسط باکتری‌ها تجزیه شده و باکتری‌ها قادر بودند از آن به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که باکتری بیشترین توانایی را در تجزیه و معدنی کردن آسفالتین داشت و *Bacillus weihenstephanensis* سویه DSM 11821 جدا شده از نمونه نفت خام می‌تواند برای کاربردهای صنعتی به‌منظور حذف آسفالتین با درصد بالا و دمای بالا و دمای محیطی بکار گرفته شود. به‌طور کلی بیشترین میزان تجزیه توسط باکتری‌ها بر روی گروه‌های CH آروماتیک و آلیفاتیکو گروه‌های OH موجود در ساختمان آسفالتین و توانایی بالای آن‌ها در استفاده از این ترکیبات بود. در مطالعه حاضر باکتری‌ها توانسته بودند روی تمام بخش‌های آسفالتین تأثیرگذار باشند.

#### تقدیر و تشکر

این تحقیق در مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شده است و از حمایت‌های تحقیقاتی این مرکز مراتب سپاس را داریم.

سانتی‌گراد به این صورت بود که با گذشت زمان باکتری روی گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختمان آسفالتین اثر گذاشته و میزان آن را در آسفالتین کاهش داده است. پیک بعدی در محدوده  $3000-2800 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن گروه‌های CH آروماتیک و آلیفاتیک می‌باشد و با مقایسه‌ی FT-IR نمونه در مدت‌زمان‌های مختلف می‌توان نشان داد که این باکتری توانایی بالایی برای استفاده از این ترکیبات را دارد و این گروه‌ها به تدریج از ساختمان آسفالتین حذف شدند. محدوده‌ی  $1800-1600 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند های دوگانه آلکنی  $C=C$  ترکیبات آروماتیک موجود در ساختمان آسفالتین است که تغییر چندانی در نمودار آن‌ها دیده نشد. محدوده‌ی بین  $1600-1400 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به اتصالات  $C-O$ ،  $C-N$ ،  $C-S$  در ساختمان آسفالتین می‌باشد. با مشاهده و مقایسه نتایج حاصل از FT-IR به دست آمده نتیجه می‌شود که بخشی از این اتصالات آمینی نیز توسط باکتری مورد استفاده قرار گرفته است و میزان آن در آسفالتین کاهش یافته است.

به طور کلی تجزیه‌ی زیستی آسفالتین فرآیند مفید و سودمندی است زیرا بسیاری از هیدروکربن‌های نفت سمی هستند و هنگامی که مواد شیمیایی محلول در آب بیش‌تر می‌شوند، تأثیرات زیان باری روی ارگانیسم‌ها دارند و به

#### منابع مورد استفاده

1. Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 503-549.
2. Creek, J. L., 2005. Freedom of action in the state of asphaltene: Escape from conventional wisdom. *Energy & fuels*, 19: 1212-1224.
3. 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: 15-24.
4. Luo, P., Gu, Y., 2007. Effects of asphaltene content on the heavy oil viscosity at different temperatures. *Fuel* 86: 1069-1078.
5. Morales, M., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R., Le Borgne, S., 2010. Application of microorganisms to the processing and upgrading of crude oil and fractions. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, ed. K. Timmis, pp. 2767-2785.
6. Trejo, F., Centeno, G., Ancheyta, J., 2004. Precipitation, fractionation and characterization of asphaltene from heavy and light crude oils. *Fuel* 83: 2169-2175.
7. Buenrostro-Gonzalez, E., Andersen, S. I., Garcia-Martinez, J., Lira-Galeana, C., 2002. Solubility/molecular structure relationships of asphaltene in polar and nonpolar media. *Energy & Fuels* 16: 732-741.

8. Chianelli, R. R., Siadati, M., Mehta, A., Pople, J., Ortega, L. C., Chiang, L. Y., 2007. Self-assembly of asphaltene aggregates: Synchrotron, simulation and chemical modeling techniques applied to problems in the structure and reactivity of asphaltenes. In *Asphaltenes, Heavy Oils, and Petroleomics*, pp. 375-400.
9. Watkinson, P., 2004. A study of asphaltene solubility and precipitation. *Fuel* 83: 1881-1887.
10. Guiliano, M., Boukir, A., Doumenq, P., Mille, G., Crampon, C., Badens, E., Charbit, G., 2000. Supercritical fluid extraction of BAL 150 crude oil asphaltenes. *Energy & Fuels* 14: 89-94.
11. Pineda-Flores, G., Boll-Argüello, G., Lira-Galeana, C., Mesta-Howard, A., 2004. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation* 15: 145-151.
12. Connan, J., 1984. Biodegradation of crude oils in reservoirs, Brooks J., Welte DH, *Advances in Petroleum Geochemistry* Vol. 1, Academic Press, London, pp. 299-335.
13. Magot, M., Ollivier, B., Patel, B. K., 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 103-116.
14. Jenisch-Anton, A., Adam, P., Michaelis, W., Connan, J., Herrmann, D., Rohmer, M., Albrecht, P., 2000. Molecular evidence for biodegradation of geomacromolecules. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64: 3525-3537.
15. Kim, S., Stanford, L. A., Rodgers, R. P., Marshall, A. G., Walters, C. C., Qian, K., Wenger, L. M., Mankiewicz, P., 2005. Microbial alteration of the acidic and neutral polar NSO compounds revealed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Organic Geochemistry* 36: 1117-1134.
16. Molina, M. C., González, N., Bautista, L. F., Sanz, R., Simarro, R., Sánchez, I., Sanz, J. L., 2009. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation* 20: 789-800.
17. Tavassoli, T., Mousavi, S., Shojaosadati, S., Salehizadeh, H., 2012. Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. *Fuel* 93: 142-148.
18. Jahromi, H., Fazelipour, M., Ayatollahi, S., Niazi, A., 2014. Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. *Fuel* 117: 230-235.