مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره هفتم، صفحه ۸-۱

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های دارای توانایی شکست زیستی آسفالتین

فرشته نادری[۱]،آرمان شفیعی فسقندیس[۲]، محمدرضا حسین پور[۳]، مریم اسدی[۴]

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، گروه شیمی
۲- شرکت ملی پالایش و پخش فراورده های نفتی ایران، مدیریت پژوهش و فناوری
۳- دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف
۴- دانشکده مهندسی شیمی، دانشکده فنی، دانشگاه تهران

نویسنده مسؤول: دکتر فرشته نادری. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران.
Fnaderi2@yahoo.com

دریافت: ۸۹/۱۰/۸ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: نفت سنگین دارای ویسکوزیته بالا و حاوی مقادیر زیادی از آسفالتین‌ها، رزین‌ها، نیتروژن، گوگرد،ترکیبات آروماتیک و فلزات مختلف است. روش‌های مورد استفاده برای بهبود خواص نفت سنگین شامل روش‌های شیمیایی، حرارتی و مکانیکی می‌باشند که دارای هزینه‌های بالا و انتخاب پذیری پائین هستند. روش زیستی عمل‌آوری نفت سنگین به لحاظ اقتصادی و انتخاب پذیری بر دیگر روش‌ها مزیت دارد و حتی می‌توان روش زیستی را به عنوان یک روش مکمل برای روش‌های پیشین مورد استفاده قرار داد. هدف از این مطالعه جداسازی میکروارگانیسم‌های با قابلیت حذف مواد هیدروکربنی از واحد تصفیه پساب پالایشگاه تهران و سازگار نمودن آنها با محیط کشت حاوی آسفالتین به عنوان تنها منبع کربن می باشد.

روش بررسی: در این مقاله میکروارگانیسم‌های مناسب جهت عمل‌آوری نفت سنگین جداسازی، خالص سازی و شناسایی شدند. بدین منظور خاک آلوده به مواد نفتی از حوضچه تصفیه پساب پالایشگاه تهران به عنوان منبع جداسازی میکروارگانیسم‌های دارای قابلیت استفاده از مواد هیدروکربنی مورد استفاده قرار گرفت. پس از تطبیق میکروارگانیسم‌های فعال با آسفالتین، این میکروارگانیسم‌ها به روش رقیق سازی و کشت خطی جداسازی و خالص سازی شدند.

یافته ها: گونه‌های خالص سازی شده سپس به وسیله آنالیز ترادف**16s rRNA** شناسایی گردیدند. با تطبیق توالی ژنوم میکروارگانیسم‌های یافته شده با پایگاده داده **NBCI** سه گونه باکتری تحت نام‌های ***Bacillus Sp.*** **PBCC13** ، ***Brevibacillus sp.*** **PBCC14** و ***Serratia sp.*** **PBCC12** شناسایی شدند. این میکروارگانیسم‌ها را می‌توان جهت شکست زیستی نفت سنگین و آسفالتین و رفع مشکلات صنعت نفت مورد استفاده قرار داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد میکروارگانیسم‌های خانواده *باسیلوس*، *بروی باسیلوس* و *سراشیا* را می‌توان بصورت کشت مخلوط جهت عمل‌آوری نفت سنگین چه در محل و چه خارج از محل بکار برد. فرایند زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های شناسایی شده در این تحقیق می‌تواند روشی نوین جهت رفع مشکلات صنعت نفت کشور باشد.

واژه‌های کلیدی: آسفالتین، نفت خام سنگین، شکست زیستی، خالص سازی میکروارگانیسم.

www.SID.ir

مقدمه

نفت سنگین دارای ویسکوزیته بالا و حاوی مقادیر زیادی از آسفالتین‌ها، رزین‌ها، نیتروژن، گوگرد، ترکیبات آروماتیک و فلزات مختلف است که به طور مشخص فلزات آن نیکل و وانادیم می‌باشند. این مشخصات مشکلات بسیاری را در فراوری نفت خام و فرآیندهای پائین دستی آن بوجود می‌آورند. به علت وجود مقادیر بسیاری از این نوع نفت در مخازن نفت دنیا، اهمیت بهبود و عمل‌آوری آنها بیشتر روشن می‌شود. روش‌هایی که تا کنون برای بهبود خواص نفت سنگین بکار گرفته شده‌اند دارای هزینه‌های بالا و انتخاب پذیری پائین هستند. روش‌های زیستی به لحاظ اقتصادی و انتخاب پذیری دارای مزیت‌هایی می‌باشند و همچنین می‌توان این روش‌ها را به عنوان یک روش مکمل برای روش‌های پیشین مورد استفاده قرار داد (۱-۴).

میزان نفت سنگین موجود در دنیا هفت برابر نفت قابل پالایش تخمین زده شده است. بیشترین نفت سنگین دنیا در چاه نفت اورینوکو در کشور ونزوئلا وجود دارد. دیگر منابع بزرگ نفت سنگین در آلبرتای کانادا، سیبری روسیه و مایای مکزیک است. به علت اینکه نفت قابل بازیابی در حال تمام شدن است علاقه برای بهره برداری از نفت سنگین در حال افزایش است. به علت ویسکوزیته بالای این نوع نفت، در حال حاضر حلال‌هایی به نفت سنگین افزوده می‌شود تا قابلیت انتقال در خط لوله را داشته باشد. قیمت بالای این حلال‌ها باعث شده است تا دانشمندان به دنبال روش‌های جدیدی برای کاهش ویسکوزیته باشند. فرآیندهای شکست نفت سنگین انرژی بر بوده و قیمت تمام شده زیادی دارند. همچنین انتخاب پذیری پائین و مشکلات محیط زیستی که در اثر این فرآیندها ایجاد می‌شود از دیگر معایب این روش‌ها است (۴-۷).

مولکول‌های در محدوده وزن بین ۱۵۰۰- ۲۰۰۰ در دسته نفت سنگین قرار می‌گیرند و بیشتر این مولکول‌ها دارای یک قسمت آروماتیک (بدنه اصلی) و یک قسمت آلیفاتیک (شاخه) هستند (۸). اتم‌های نیتروژن، گوگرد و اکسیژن مهمترین اتمهای همراه آروماتیک‌ها هستند. نفت خام بر اساس حلالیت به ۴ دسته تقسیم می‌شود : ترکیبات اشباع (فقط شاخه‌دارها) ، آروماتیک‌ها (قسمت زنجیره اصلی بهمراه شاخه)، رزین‌ها (با نسبت زنجیره اصلی به شاخه بیشتر) و آسفالتین‌ها (ترکیباتی با زنجیره اصلی بلند و شاخه‌های کم). درصد آسفالتین موجود در نفت سنگین بیشترین اثر را بر روی مشخصات نفت از جمله ویسکوزیته و دیگر خواص نامطلوب نفت از جمله قابلیت پلیمری شدن، امولسیون شدن و کک سازی دارد. از این رو روش‌های مختلفی جهت کاهش ویسکوزیته نفت سنگین و جلوگیری از ایجاد رسوب در نفت سنگین ابداع شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند.

روش شیمیایی مهم‌ترین روش در این زمینه برای عمل‌آوری آسفالتین است زیرا می‌توان از آن در چاه و همچنین در تاسیسات تولیدی استفاده کرد. روش‌های عمل‌آوری شیمیایی را می‌توان به سه دسته اصلی تقسیم بندی کرد: عمل‌آوری با حلال، دترجنت‌های آسفالتین و اصلاح کننده‌ها. برای تمام روش‌های شیمیایی ایمنی زیست محیطی و در معرض خطر قرار گرفتن اشخاص باید ملاحظه و بررسی شود. این موضوع باعث ایجاد محدودیت‌هایی در زمینه مواد شیمیایی مورد استفاده در این زمینه شده و یکی از عیوب این روش بشمار می‌رود.

عمل‌آوری مکانیکی برای حذف رسوبات آسفالتینی در خط لوله، لوله تولید نفت و لوله‌های جریان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش شامل خراش دهنده‌های میله‌ای شکل، خراش دهنده‌های خط لوله، خراش دهنده‌های لوله‌های جریان، خراش دهنده‌های پیستونی شناور آزاد و پیگ زنی خط لوله می‌باشد. مزایای روش مکانیکی شامل: پاک سازی مطمئن و حداقل آسیب ممکن می‌باشد. لیکن روش مکانیکی هزینه‌بر بوده، بکار گیری آن نیاز به زمان دارد و خطر جاگذاری تجهیزات در چاه وجود دارد.

عمل‌آوری حرارتی شامل تزریق نفت داغ، گرم کننده‌های پایین حفرات و استفاده از مواد شیمیایی روان کننده حرارتی می‌باشد. استفاده وسیع از محصولات نفتی منجر به آلودگی تقریباً تمام بخش‌های محیط زیست شده است. تخریب زیستی هیدروکربن‌ها بوسیله جمعیت‌های میکروبی طبیعی مهمترین فرآیند برای تصفیه آلودگی‌های زیست محیطی هیدروکربنی می‌باشد. مکانیسم‌های این موضوع بصورت گسترده بررسی و مرور شده‌اند(۹و۱۰).

هدف از این مطالعه جداسازی میکروارگانیسم‌های با قابلیت حذف مواد هیدروکربنی از واحد تصفیه پساب پالایشگاه تهران و سازگار نمودن آنها با محیط کشت حاوی آسفالتین به عنوان تنها منبع کربن می باشد.

www.SID.ir
Archive of SID

روش بررسی

در این پروژه آسفالتین از پژوهشگاه صنعت نفت تهیه شد. روش تهیه آسفالتین از نفت سنگین بشرح زیر است: آسفالتین از نمونه نفت خام بوسیله ترسیب با هپتان نرمال به نسبت ۵۰ به ۱ (هپتان نرمال به نمونه) استخراج می‌شود. نمونه به مدت ۱۸ ساعت در همزن مغناطیسی قرار داده شده و سپس بوسیله کاغذ فیلتر واتمن شماره ۴۲ فیلتر می‌شود. آسفالتین رسوب یافته از کاغذ صافی به کپسول پورسلین انتقال داده شده و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد برای ۱۲ ساعت خشک می‌گردد. در پایان در دمای اتاق در محفظه استریل برای کارهای بعدی نگهداری می‌شود(۱۱و۱۲).

محیط کشت: محیط کشت بر اساس استاندارد ایزو ۹۴۳۹ (۱۱) بصورت جدول ۱ تهیه شد.

جدول ۱. مواد مورد استفاده برای تهیه محیط کشت و میزان آنها در ۱ لیتر

ردیف	میزان در ۱ لیتر	ماده
۱	۰/ ۰۸۵g	KH_2PO_4
۲	۰/۲۱ g	K_2HPO_4
۳	۰/۳۳g	$Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$
۴	۰/۰۰۵ g	NH_4Cl
۵	۰/۰۲۲۵g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
۶	۰/۰۲۷۵g	$CaCl_2$
۷	traces	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$
۸	۱ lit; pH ۷/۴	Distilled water
۹	۵ g	asphaltenes

تطبیق و غنی سازی میکروارگانیسم‌ها: بر اساس شرایط تخریب آسفالتین در مخازن نفتی (شرایط بی‌هوازی) و یا عمل‌آوری در خارج از چاه در بیوراکتور (شرایط هوازی یا بی‌هوازی) نمونه‌گذاری به گونه‌ای صورت گرفت تا بتوان میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت رشد در محیط‌های هوازی و بی‌هوازی را جداسازی نمود. با توجه به امکان آلودگی و ایجاد خطاهای آزمایشگاهی از ۳ نمونه در هر یک از شرایط استفاده شد. میکروارگانیسم‌ها از خاک آلوده به مواد نفتی بوسیله سرم فیزیولوژیک بصورت ۹ گرم در لیتر NaCl بعلاوه ۰/۱ میلی لیتر توین ۸۰ جداسازی شدند. بدین صورت که ابتدا ۱۰ گرم خاک آلوده در ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. سپس از مایع رویی مخلوط جهت لقاح محیط کشت استفاده شد.

در مورد نمونه‌های هوازی از ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت در ارلن ۵۰۰ میلی لیتری استفاده شد و در مورد نمونه‌های بی هوازی از ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری استفاده گردید.

ابتدا محیط کشت فاقد آسفالتین در بالن ژوژه ۱ لیتری تهیه شد و سپس در ارلن‌ها ریخته شده و بدلیل عدم حلالیت آسفالتین در آب مقطر، آسفالتین بر اساس ۵ گرم در لیتر برای هر ارلن وزن شده و به آن اضافه شد. پس از استریلیزاسیون، نمونه‌ها با ۱۰ میلی لیتر از مایع رویی مخلوط سرم فیزیولوژیک و خاک آلوده تلقیح شدند و در شیکر انکوباتور در ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ روز قرار داده شدند. در این مرحله میکروارگانیسم‌هایی که قابلیت رشد بر روی آسفالتین را داشتند در محیط کشت زنده خواهند ماند. پس از ۶۰ روز تطبیق میکروارگانیسم‌ها، نمونه‌گذاری مشابهی انجام شد با این تفاوت که در این مرحله لقاح با استفاده از محیط کشت تطبیق یافته صورت گرفت. نمونه‌های جدید به مدت ۹۰ روز در شیکر انکوباتور در ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسم‌های دارای قابلیت رشد بر روی آسفالتین: برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها محیط کشت نوترینت آگار تهیه شد. از ارلن‌های نمونه گذاری شده ارلن‌هایی را که دارای کدورت بیشتری بودند انتخاب کرده و از آنها بر روی محیط کشت جامد در شرایط استریل کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها گرماگذاری شده و پس از ۲۴ ساعت از تک کلونی‌های تشکیل شده اسلنت تهیه شد. اسلنت‌ها به عنوان منبع تهیه کشت‌های بعدی و مطالعات میکروسکوپی در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

رنگ آمیزی گرم و مطالعات میکروسکوپی: برای تعیین نوع میکروارگانیسم‌های جداسازی و خالص سازی شده، اولین قدم

www.SID.ir
Archive of SID

شناختن میکروارگانیسم‌ها از نظر مورفولوژی و بررسی گرم است، بدین منظور از رنگ آمیزی گرم استفاده شد(۱۳).

خالص سازی ژنوم میکروارگانیسم‌های خالص سازی شده: در ابتدا یک لوپ از تک کلونی باکتری در ۵۶۷ میکرولیتر از محلول TE (۱۰ میلی لیتر بافر ۱مولار Tris – HCl با pH برابر ۸+ ۲ میلی لیتر محلول نیم مولار EDTA که به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شده است) سوسپانسیون شد. سپس ۳ میکرولیتر از هریک از آنزیم‌های لیزوزیم و پروتئیناز K (۱۰میلی گرم در میلی لیتر) و۳۰ میکرولیتر محلول ۱ درصد سدیم دودسیل سولفات به سوسپانسیون ابتدایی اضافه گردید. پس از مخلوط کردن شدید سوسپانسیون به میزان کافی، محلول آماده شده به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه گرما گذاری شد. در مرحله بعد میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۵ مولار نمک طعام به سوسپانسیون اضافه گردید. در این مرحله ۸۰ میکرولیتر محلول ۲ درصدی بافر CTAB (۱۰۰میلی لیتر از Tris-HCl ۱مولار با pH برابر۸ ، ۲۸۰ میلی لیتر سدیم ۵ مولار ، ۴۰ میلی لیتر EDTA نیم مولار و ۲۰ گرم CTAB با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰۰۰ سی سی رسانده شده است) به سوسپانسیون اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه گرما گذاری گردید. سپس هم حجم سوسپانسیون (۷۸۰ میکرولیتر) از محلول ۲۴:۱ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به سوسپانسیون آماده شده اضافه گردید و به مدت بیست دقیقه توسط دستگاه سانتریفیوژ با دور g ۱۴۰۰۰ رسوب گذاری انجام شد. در این مرحله یک محلول دو فازی ظاهر می‌شود. محلول رویی را به طوری که با محلول زیری آمیخته نگردد در یک ویال جدید ریخته و به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر ۳ میکرولیتر RNase (۲ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرما گذاری گردید. مجدداً هم حجم سوسپانسیون از محلول ۲۴:۱ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به سوسپانسیون آماده شده اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه سانتریفیوژ با سرعت rpm ۱۴۰۰۰ رسوب گذاری انجام شد. در این مرحله مجدداً یک محلول دو فازی ظاهر می‌شود. محلول رویی را به طوری که با محلول زیری آمیخته نگردد در یک ویال جدید ریخته و حدود ۷۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سلسیوس) به آن اضافه شد. سپس محلول آماده شده به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه سانتریفیوژ باسرعت rpm ۱۴۰۰۰ رسوب گذاری گردید. در این مرحله رسوب سفید رنگی ظاهر می‌شود که همان ژنوم میکروارگانیسم مورد نظر است. جهت حذف ناخالصی، به رسوب سفید رنگ ۵۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۱۴۰۰۰ رسوب گذاری گردید. سپس محلول رویی خارج شد و به میزان ۳۰ میکرولیتر آب دوبارتقطیر به رسوب افزوده گردید و برای آزمایشات بعدی نگهداری شد.

روش ازدیاد ژن تخلیص شده توسط واکنش PCR: جهت انجام واکنش PCR از ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (Taq Polymerase)، ۳ میکرولیتر دی کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۱۰ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای پیش رو و پس رو، ۲ میکرولیتر دزوکسی دی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)، یک میکرولیتر از ژنوم الگو و ۸۱ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استفاده شد. واکنش PCR توسط دستگاه گرادیانت بایوراد طی چهار مرحله مطابق روش زیر انجام گردید:

مرحله یک : ۱سیکل، در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دو: ۳۰سیکل، شامل سه بخش : الف) بخش یک : در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه. ب) بخش دو : در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه.

ج) بخش سه : در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه. مرحله سه: در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه. مرحله چهار: در دمای ۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ثانیه.

الکتروفورز ژل آگارز: الکتروفورز نمونه‌های DNA با استفاده از ژل آگارز ۱٪ صورت پذیرفت. ابتدا ۰/۵ گرم پودر آگارز در ۵۰ سی سی بافر TBE ۰/۵ X با استفاده از ماکروویو کاملاً حل شد و بعد از اینکه به اندازه کافی سرد شد بر روی tray ریخته شد. بعد از بستن ژل، شانه بیرون آورده شد و ژل در داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE ۰/۵X قرار گرفت. جهت نمونه گذاری، ۲میکرولیتر از ژنوم تخلیص شده با ۶ میکرولیتر از رنگ مخلوط شد و در داخل چاهک‌های ژل ریخته شد و الکتروفورز به منبع برق با ولتاژ ۱۰۰ الی ۱۴۰ ولت متصل گردید. پس از نمونه گذاری، ژل آگارز بمدت ۱۰ دقیقه درون محلول رنگ اتیدیوم بروماید به غلظت تقریبی ۰/۵µg/ml قرار داده شد. سپس ژل به کمک آب مقطر

www.SID.ir
Archive of SID

رنگ زدایی شد و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن مشاهده گردید و عکس تهیه شد.

ازدیاد ژنوم باکتری از طریق واکنش PCR: ازدیاد ژنوم تخلیص شده میکروارگانیسم‌های خالص سازی شده از طریق دو پرایمر جهانی 16srDNA با توالی‌های (5-AGG AGG TGA TCC AAC CGC-3) 1541R و (5- AAG AGT TTG ATC ATG GCT-3)F انجام شد و پس از مشاهده باند بر روی ژل آگارز جهت تعیین سکانس (توالی یابی) به شرکت ژن فناوران ارسال گردید.

توالی یابی و آنالیز فیلوژنتیک: توالی‌های کامل (در حدود ۱۴۰۰ نوکلئوتید) ابتدا در پایگاه داده GenBank در NCBI به آدرس http://www.ncbi.nlm.nih.gov ثبت شدند. توالی‌هایی که کمتر از ۳٪ تفاوت داشتند از یک فیلو تایپ بوده‌اند.

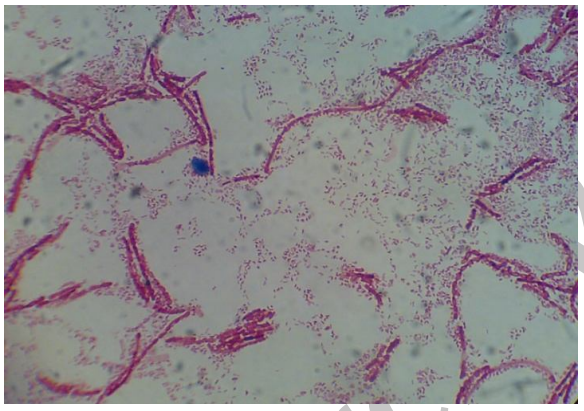
رشد باکتری‌ها در حضور و عدم حضور آسفالتین: تعداد ۶ ارلن ۱۰۰ میلی لیتری که در ۳ عدد از آنها محیط کشت به همراه آسفالتین (۵ گرم در لیتر) و درون ۳ عدد دیگر محیط کشت بدون منبع کربن (آسفالتین) ریخته شد. ارلن‌ها اتوکلاو شده و سپس از هر سه نوع باکتری جداسازی شده در شرایط استریل درون ارلن‌ها تلقیح شد. از هر باکتری یک تلقیح در ارلن حاوی آسفالتین و یک تلقیح در ارلن فاقد آسفالتین انجام شد. هدف از این کار اطمینان از مصرف آسفالتین به عنوان تنها منبع کربن توسط میکروارگانیسم‌های جداسازی شده می‌باشد. ارلن‌ها به مدت ۶۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند.

یافته‌ها

بررسی رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط هوازی و بی هوازی: پس از دوره ۹۰ روزه نمونه گذاری میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت حاوی آسفالتین و بررسی کدورت محلول نتایج نشان داد که در نمونه هوازی کدورت افزایش یافته و رنگ محیط کشت از بی‌رنگ به خاکستری تغییر رنگ داده است که نشان دهنده رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت حاوی آسفالتین می‌باشد. همچنین در مورد نمونه بی‌هوازی میزان افزایش کدورت و تغییر رنگ در مقایسه با نمونه هوازی بسیار محدود بوده و نشان از توانایی محدود میکروارگانیسم‌های بی هوازی برای رشد بر روی آسفالتین می‌باشد.

نتایج مطالعات میکروسکوپی: با توجه به مطالعات میکروسکوپی و رنگ آمیزی گرم می‌توان نتیجه گیری کرد که رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط بی‌هوازی بسیار محدود بوده و از مخلوط میکروبی در شرایط بی‌هوازی، میکروبی جداسازی و خالص سازی نشده است. همچنین میکروب‌های رشد یافته متعلق به خانواده باسیل‌ها بوده‌اند.

نتایج رنگ آمیزی گرم نشان داد که میکروارگانیسم‌های جداسازی شده گرم منفی هستند که با نتایج تحقیقات دیگر سازگار است (۱۱). همچنین رشد حول دانه‌های آسفالتین در کشت خطی نشان‌دهنده تمایل میکروارگانیسم‌ها در استفاده از آسفالتین است.



شکل ۱. تصویر رنگ آمیزی گرم میکروارگانیسم‌های جداسازی شده

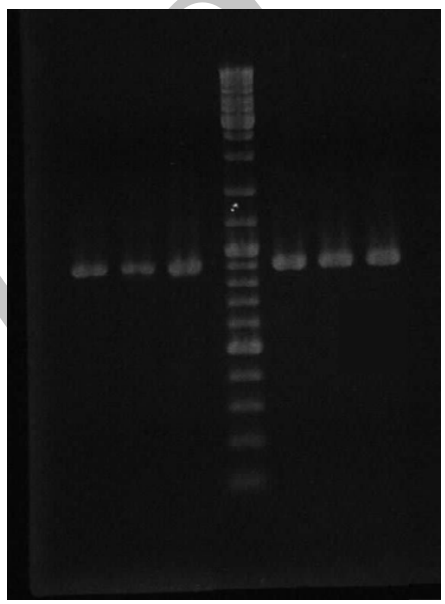
رشد باکتری‌ها در حضور و عدم حضور آسفالتین: تعداد ۳ ارلن حاوی آسفالتین و ۳ ارلن فاقد آسفالتین به مدت ۶۰ روز با شرایط یکسان درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از این مدت، تلقیحی از ارلن‌های فاقد آسفالتین به محیط کشت نوترینت آگار در شرایط استریل انجام شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه گرماگذاری شدند ولی هیچ اثری از رشد مشاهده نگردید. این بررسی نشان دهنده عدم رشد باکتری‌ها در عدم حضور آسفالتین بوده و از استفاده میکروب‌های

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی شده از آسفالتین به عنوان تنها منبع کربن و انرژی اطمینان حاصل شد.

تاییـــد انجـــام صـــحیح واکـــنش PCR: ژل آگـارز پـس از نمونـه گـذاری ژنـوم خـالص سـازی شـده مـورد رنـگ آمیـزی قرار گرفـت و سـپس توسـط دسـتگاه ژل داکیومنتیشـن از آن تصویر تهیه شد (شکل ۲). تصویر نشان می‌دهد که هـیچ گونـه ناخالصی در نمونه‌های ژنـوم وجـود نـدارد و تاییـدی بـر انجـام صحیح واکنش PCR می‌باشد.



شکل ۲. تصویر ژل آگارز نمونه ژنوم خالص سازی شده ۳ میکروارگانیسم خالص سازی شده (۲ مرتبه نمونه گذاری جهت تایید صحت کارانجام شده است)

شناسایی میکروارگانیسم‌های جداسازی شده و خالص سازی شده: با تطبیق توالی ژنوم‌های حاصل از آنالیز ترادف 16s rRNA در مورد ۳ گونه میکروارگانیسم خالص سازی شده با پایگاه دادهGenBank در NCBI بر اساس نتایج تطابق ۱۰۰٪ یک گونه باسیلوس تحت نام *Bacillus sp.* PBCC 13، یک گونه بروی باسیلوس تحت نام *Brevibaillus sp.* PBCC 14 و یک گونه سراشیا تحت نام *Serattia sp.* PBCC12 از خاک آلوده جداسازی شده‌اند.

بحث

میکروارگانیسم‌های بسیاری شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرهـا بـا توانـایی تخریـب هیـدروکربن‌هـا شناسـایی شـده‌انـد. میکروارگانیســمهـــای بـــی‌هـــوازی از مخـــازن نفتـــی و میکروارگانیسمهایی هوازی از اکوسیسـتم‌هـای آلـوده بـه مـواد هیدروکربنی جداسازی شده‌اند. روش‌های مولکولی برای تعیـین باکتری‌های تخریب کننده هیدروکربن‌ها، ندرتاً در بررسـی‌هـای زیست محیطی بکار گرفته شده‌انـد. همچنـین بررسـی زیسـت تخریـب پـذیری هیـدروکربن‌هـا همیشـه بوسـیله روش‌هـای شیمیایی امکان پذیر نیست (۱۴ و ۱۵).

به هر حال ساختار مولکـولی پیچیـده آسـفالتین آن را در برابـر تخریب زیستی مقاوم کرده و موجب تجمع آن در اکـو سیسـتم شده است. گـزارش شـده اسـت کـه میکروارگانیسـم‌هـایی کـه در معـرض آسـفالتین در طـی دوره طـولانی مـدت قـرار داده شده‌اند توانایی تجزیه این ترکیب را دارند (۱۱).

از تحقیقات انجام گرفتـه در ایـن زمینـه مـی‌تـوان بـه تخریـب زیستی آسفالتین بوسیله کنسرسیوم میکروبی جداسازی شده از نمونه‌های خاک و رسوبات آلوده با هیدروکربن‌ها اشاره کرد (۱۶ و ۱۷). از دیگر کارهـای انجـام گرفتـه در ایـن زمینـه تخریـب زیسـتی ایـن ترکیبـات بـا اسـتفاده از کنسرسـیوم میکروبـی جداسـازی شـده از نفـت خـام مـی‌باشـد. در ایـن تحقیـق میکروارگانیسم‌ها با شرایط سخت محیط‌هـای بـا غلظـت بـالای آسفالتین تطبیق یافته‌اند و اثرات فاکتورهـای محیطـی بـر روی رشد آنها در این تحقیق مشخص شده است. میکروارگانیسم‌های جداسازی شـده متعلـق بـه گونـه‌هـای *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Brevibacillus* و *Staphylococcus* بوده‌انـد کـه برای تخریب دیگر هیدروکربن‌ها نیز گزارش شده‌اند (۱۰).

در تحقیق دیگری برهمکنش مابین میکروارگانیسم‌های انتخـابی و نفت خام سـنگین کـه در آن میکروارگانیسـم‌هـا طـی شـرایط کنترل شده به سیستم معرفی شده‌اند بررسی شده است. این بـر همکنش‌ها از طریق یک سری پیچیده از واکنش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی انجـام مـی‌شـود (۱۸). بررسـی‌هـای گسـترده ایـن واکنش‌ها نشان داده است که چنین واکنش‌هایی تصادفی نبـوده و با واکنش‌های مرتبط با تخریب زیسـتی نفـت تفـاوت دارنـد و می‌توان مسیر آنها را بوسیله مارکرهای شیمیایی مشخصـه یـابی کرد. تبدیل زیستی نفت خام سنگین وابسته به گستره ترکیبـات قطبی حاوی نیتروژن، گـوگرد، اکسـیژن و فلـزات انـدک مقـدار می‌باشد. اثر کلی واکـنش‌هـای بیوشـیمیایی القـا شـده در ایـن

www.SID.ir
Archive of SID

تحقیق کاهش نیتروژن (۲۴-۴۰٪)، گوگرد، اکسیژن و فلزات اندک مقدار می‌باشد. همچنین گستره جدیدی از هیدروکربن‌ها نیز بوجود آمدند (۱۸).

همچنین غربالگری میکروارگانیسم‌های هوازی جداسازی شده در یک تحقیق در اندونزی منجر به جمع آوری ۳۳ گونه میکروارگانیسم شد (۹). در این تحقیق حداقل ۲۱ باکتری و ۴ مخمر بوسیله روش‌های فنوتیپ و مولکولی شناسایی شدند. گونه‌های باکتریایی متعلق به خانواده گوردونیا، *بروی باکتریوم*، *آورو باکتریوم*، *دی اتزیا* و بورخولدریا و مایکوباکتریوم بودند. تمام گونه‌ها در محیط مایع سنتزی به همراه نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی کشت داده شدند. پس از تلقیح، ترکیب دقیق شیمیایی نفت باقیمانده بوسیله روش‌های گراویمتری و گاز کروماتوگرافی بررسی شد. در همین تحقیق ۱۳ پارامتر برای بررسی توانایی تخریب زیستی برای گونه‌ها تعریف و محاسبه شد. ماکزیمم تخریب برای هیدروکربن‌های اشباع (آلکان‌های نرمال و ایزو و ایزوپرنیودها) مشاهده شد در حالیکه تخریب هیدروکربن‌های آروماتیک کمتر بوده و وابسته به ساختار مولکولی ترکیبات می‌باشد (۹). در این تحقیق با هدف عمل‌آوری نفت سنگین به روش زیستی سه گونه میکروارگانیسم گرم منفی متعلق به خانواده‌های *باسیلوس*، *بروی باسیلوس* و *سراشیا* پس از تطبیق با محیط کشت حاوی آسفالتین جداسازی، خالص سازی و شناسایی شدند. رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت حاوی آسفالتین به عنوان تنها منبع کربن و انرژی تاییدی بر قابلیت میکروارگانیسم‌ها در شکست زیستی آسفالتین می‌باشد. همچنین آزمایشات نشان داد که میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت هوازی نسبت به محیط کشت بی‌هوازی رشد بیشتری داشته‌اند، بنابراین می‌توان برای عمل‌آوری نفت سنگین از روش خارج محل در بیوراکتور استفاده نمود. تصویر ژل آگاروز نشان دهنده صحت واکنش PCR می‌باشد و قابلیت میکروارگانیسم‌های شناسایی شده در این تحقیق در استفاده از مواد هیدروکربنی در تحقیقات گذشته تایید شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که میکروارگانیسم‌های جدا شده متعلق به خانواده‌های *باسیلوس*، *بروی باسیلوس* و *سراشیا* می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها را می‌توان به عنوان کاتالیست زیستی در عمل‌آوری و شکست زیستی آسفالتین چه بصورت عمل‌آوری در محل و چه بصورت عمل‌آوری خارج از محل و در بیراکتور مورد استفاده قرار داد. امید است این روش راه حلی مناسب جهت رفع مشکلات متعدد صنعت نفت کشور در ارتباط با نفت سنگین و آسفالتین باشد.

References

1- Hunt JM. *Petroleum Geochemistry and Geology*.2nd ed, W.H. Freeman, in NY, Oxford; 1979.
2- Martinez AR. *Report of working group on definitions*. 1984; 1xvii-1xviii. In: R. F. Meyer, J. C. Wynn, and J.C. Olson, eds. *The Future of Heavy Crude and Tar Sands*. Second International Conference, McGraw-Hill, New York, NY, USA.
3- Petersen, NF, Hickey PJ. *California Plio-Miocene oils: Evidence of early generation.*In: RF. Meyer, eds. Exploration for Heavy Crude Oiland Natural Bitumen. Am. Assoc. Petrol. Geol: USA. 1987; pp: 351-359.
4- Roadifer RE. *Size distribution of the world's largestknown oil and tar accumulations*. In: R. F. Meyer, eds. Exploration for Heavy Crude Oil and Bitumen. Am. Assoc. Petrol. Geol: USA. 1987; pp: 3-23.
5- Wu W, Chen J. *Characteristics of Chineseheavy crudes.* J.Pet. Sci. Eng. 1999; 22: 25-30.
6- Yaghi BM, Al-Bemani A. *Heavy crude oilviscosity reduction for pipeline transportation.* Energy Sources. 2002; 24: 93-102.
7- Leon V. *Composition and structure of heavy oils.* J.CODICID. 2000; 2: 34-43.
8- Wang JX, Buckley JS. *Asphaltene Stability in Crude Oil and Aromatic Solvents- The Influence of Oil Composition.* Energy & Fuels. 2003; 17:1445-1451.
9- FrédéricChaillan, Anne Le Flèche, Edith Bury, YhuiPhantavong, Patrick Grimont, Alain Saliot, Jean Oudot. *Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms*. Research in Microbiology. 2004; 155:587–595.
10- Atlas RM. *Petroleum Microbiology*. Macmillan Co. New York; 1984; pp: 153-159.
11- Pineda-Flores Gabriel, Boll-Argüello Gisela, Lira GaleanaCarlos, Mesta Ana Mar´ıa- Howard. *A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source*. Biodegradation.2004; 15:145–151.
12- Rogel E, Ovalles C, Moir M. *Determination of asphaltenes (heptane insolubles) in crude petroleum and petroleum products.* Energy Fuels. 2009; 23 (9): pp: 4515–4521.
13- Beveridge TJ. *Use of the Gram stain in microbiology*. Biotech Histochem. 2001; 76 (3): 111–118.
14- Chang YJ, Stephen JR, Richter AP, Venosa AD, Bruggemann J, Macnaughton SJ, et al. *Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: Effect of profiling method.* J. Microbiol. Methods. 2000; 40:19–31.
15- Magot M, Ollivier B, Patel BKC. *Microbiology of petroleum reservoirs*. Anton. Leeuw.Int. J.G. 2000; 77:103–116.

Archive of SID

www.SID.ir

16- Thouand G, Bauda P, Oudot J, Kirsch G, Sutton C &Vidalie JF. *Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula*. Can. J. Microbiol. 1999; (45): 106–115.
17- Venkateswaran K, Hoaki T, Kato M & Maruyama T. *Microbial degradation of resins fractionated from arabian light crude oil.* Can. J. Microbiol. 1995; (41): 418–424.
18- Premuzic ET, Zhou WM. *Bioconversion Reactions in Asphaltenes and Heavy Crude Oils*. Energy & Fuels.1999; (13):297-304.
19- Yuhong L, Ansong G, Haiping H. *The influence of biodegradation on resins and asphaltenes in the Liaohe Basin*. Journal of Oeganic Geochemistry. 2009; (40):312-320.

Archive of SID

www.SID.ir