

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

* مریم دارابی

* سید محمد حیدریان**

* منصور جهانگیری

* مهناز مظاهری اسدی

چکیده

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

* دانشگاه سمنان، دانشکده‌ی مهندسی شیمی، نفت و گاز گروه مهندسی شیمی

** تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی

mheydarian@yahoo.com

۴۴ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

میکروبی بومی با قابلیت مصرف ته مانده ی برج تقطیر در خلأ به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. بر اساس نتایج این تحقیق، با افزایش زمان هموژناسیون، مقدار کمتری از ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی حل می شود، و اندازه ی ذرات آن افزایش پیدا می یابد. به منظور سنجش اثر هموژناسیون بر رشد میکروبی از اندازه گیری غلظت پروتئین در طول فرمانتاسیون استفاده شد. با توجه به نتایج حاصل، هموژناسیون تأثیر معناداری روی افزایش رشد میکروبی نداشت.

واژه های کلیدی: ته مانده ی برج تقطیر در خلأ، پراکنندگی مکانیکی، رشد میکروبی، فرمانتور حبابدار.

تأثیر پراکندگی بر تجزیه‌ی میکروبی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی.....۴۵

مقدمه

در پالایشگاه، نفت خام بعد از عملیات نمک زدایی، وارد برج تقطیر اتمسفریک شده، و به تعدادی فرآورده های اصلی و میانی تبدیل می شود. باقیمانده های سنگین تر این برج، به برج تقطیر در خلأ وارد می شوند. سنگین ترین برش حاصل از برج تقطیر در خلأ، ته مانده ی برج تقطیر در خلأ^۱ نامیده می شود. ته مانده ی برج تقطیر در خلأ شامل مقادیر زیاد آسفالتن ها و رزین ها و هم چنین درصد بالای اتم های ناهمگون از جمله سولفور، نیتروژن و برخی عناصر فلزی است (۶). باقیمانده های سنگین نفتی، شامل ترکیبات با جرم مولکولی بالا هستند، و به دلیل حلالیت کم شان در آب و انرژی های رزونانسی بالای ساختارهایشان، به کندی و با بازدهی کم سبک سازی می شوند (۱۱). روش های مختلفی به منظور افزایش دسترسی زیستی این ترکیبات به کار برده می شود. در بسیاری از موارد حلال های آلی برای بهبود حلالیتشان به کار برده می شود، اما این حلالها سمی هستند و دوستدار محیط زیست نیستند. روش جایگزین دیگر برای افزایش دسترسی زیستی این ترکیبات، اضافه کردن سورفکتانت ها در غلظت بالای غلظت بحرانی میسل شان است؛ همچنین افزایش دما به منظور افزایش حلالیت و نرخ انتقال جرم این ترکیبات در محلول های آبی به کار برده می شود. در نهایت، پراکندگی می تواند به عنوان روش دیگری برای کاهش محدودیت های انتقال جرم با افزایش سطح تماس بین این ترکیبات و میکروارگانیسم ها به کار رود (۷). علیرغم افزایش اطلاعات درباره تجزیه ی میکروبی نفت خام، مطالعه ی فعالیت میکروارگانیسم ها روی باقیمانده های سنگین نفتی از جمله ته مانده ی برج تقطیر در خلأ توجه کمتری را به خود جلب کرده است. قبلاً مناسب ترین باکتری های بومی مؤثر بر سبک سازی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ پالایشگاه تهران شناسایی شده اند (۱۰)؛ همچنین برخی از پارامترهای عملیاتی مؤثر (دما، نرخ هوادهی، میزان تلقیح و pH) بر سبک سازی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ بررسی شده اند (۵). در مطالعه ی حاضر به بررسی اثر افزایش سطح تماس ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در فاز آبی به وسیله ی پراکندگی مکانیکی، روی رشد یک مخلوط میکروبی، بومی پالایشگاه نفت تهران،

1 Vacuum Residue (VR)

۴۶ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

پرداخته می شود. به این منظور در ابتدا، تأثیر زمان هموژناسیون بر انحلال ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در فاز آبی و اندازه ی ذرات آن پرداخته می شود. سپس به بررسی تأثیر هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی، بر رشد میکروبی پرداخته می شود.

مواد و روش ها

محیط کشت و میکروارگانسیم مورد استفاده

محیط کشت حاوی نمک های معدنی^۱ با اضافه کردن ترکیبات زیر به یک لیتر آب مقطر تهیه شد:

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

هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط آبی

به منظور پراکنده کردن ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط آبی از هموژنایزر Heidolph مدل Diaphragm 900 استفاده شد. ابتدا یک لیتر محیط کشت حاوی نمک های معدنی یا آب مقطر (با توجه به شرایط آزمایش) حاوی ۵۰ گرم ته مانده ی برج تقطیر در خلأ را تا دمای ۶۵-۶۰ درجه سانتیگراد پیش گرم کرده، سپس با استفاده از هموژنایزر با سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه، ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در فاز آبی پراکنده شد. در طول هموژناسیون نیز بشر حاوی فاز آبی و ته مانده ی برج تقطیر در خلأ روی هیتر با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داشت.

به منظور بررسی اثر زمان هموژناسیون بر اندازه ذرات و حل شدن ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک های معدنی، سه نمونه با زمان های هموژناسیون ۱۵، ۲۵ و ۴۰ دقیقه، مطابق روش فوق آماده شد. به منظور بررسی اثر زمان هموژناسیون بر اندازه ذرات

1 Mineral Salts Medium (MSM)

تأثیر پراکندگی بر تجزیه‌ی میکروبی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی.....۴۷

و حل شدن ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در آب مقطر، دو نمونه با زمان های هموزناسیون ۲۵ و ۴۰ دقیقه آماده شد. هر یک از نمونه ها با دو تکرار تهیه شد.

پیش کشت

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

فرآیند فرمانتاسیون

فرمانتور ۳ لیتری با حجم کاری ۲ لیتر حاوی محیط کشت دارای نمک های معدنی و ۵ درصد وزنی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. سپس ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت با استفاده از هموزنایزر با سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، تحت شرایط استریل، پراکنده شد. تلقیح به فرمانتور به میزان ۱۰ درصد حجمی با استفاده از پیش کشت آماده شده مطابق بند ۲-۳ صورت پذیرفت. فرمانتور دیگری هم با همین شرایط بدون ایجاد پراکندگی آماده شد. هر نمونه با دو بار تکرار انجام شد. فرآیند فرمانتاسیون به مدت حدوداً ۳۱۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با نرخ هوادهی $1 \text{ v.v.m} / 0.75$ انجام شد.

آنالیزها

بعد از هموزناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در فاز آبی، با استفاده از میکروسکوپ Olympus PX60 و کامپیوتر مجهز به نرم افزار آنالیز تصاویر aquinto AG تصاویری از امولسیون ایجاد شده گرفته شد، و درصد مساحت ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط آبی به دست آمد؛ سپس متوسط اندازه‌ی ذرات ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ محاسبه

1 air volume/ culture volume/minute

۴۸ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

شد. نمونه گیری از فرماتورها به صورت روزانه انجام شد. رشد مخلوط میکروبی با اندازه گیری غلظت پروتئین با استفاده از روش لاری بهسازی شده تعیین شد.

نتایج و بحث

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

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

زمان هموژناسیون (دقیقه)			نمونه ها پارامترها
۴۰	۲۵	۱۵	
$1/2 \pm 0/13$	$1/2 \pm 0/11$	$2/6 \pm 0/16$	درصد مساحت ته مانده ی برج تقطیر در خلأ
$17/56 \pm 1/6$	$15/3 \pm 0/9$	$14/18 \pm 1$	اندازه متوسط ذرات (μm)

همان طور که از نتایج پیداست، با افزایش زمان اندازه ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ هم در داخل فاز آبی افزایش می یابد. نتیجه ی حاصل می تواند به این دلیل باشد که انحلال پذیری نمک ها با افزایش زمان هموژناسیون در فاز آبی بیشتر می شود، بنابراین محلول قطبی تر می شود، در این صورت ترکیبات غیر قطبی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ بیشتر با هم تجمع پیدا کرده و اندازه ذرات ته مانده ی برج تقطیر در خلأ هم در داخل محلول افزایش پیدا می کند (۹ و ۴). از آنجایی که هدف از پراکندگی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت، افزایش دسترسی میکروارگانسیم ها به ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت می باشد، بنابراین با توجه به نتایج، زمان کمتر هموژناسیون یعنی ۱۵ دقیقه به این منظور انتخاب شد. با توجه به مشاهدات چشمی در زمان های کمتر (۱۰ دقیقه و ۵ دقیقه) پراکندگی مؤثر ته مانده ی

تأثیر پراکندگی بر تجزیه‌ی میکروبی ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی..... ۴۹

برج تقطیر در خلأ در فاز آبی صورت نگرفت.

به منظور اطمینان از تأثیر منفی افزایش زمان هموژناسیون و انحلال بیشتر نمک‌ها بر حل شدن ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک های معدنی مطابق روش گفته شده در بند ۲-۲، نمونه هایی در غیاب نمک‌های معدنی آماده شد. با مقایسه نتایج حاصل از آزمایش های با زمان های مشابه (جدول ۲) مشخص می‌شود در حضور نمک‌ها، میزان کمتری از ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در داخل فاز آبی پراکنده می‌شود، و اندازه ذرات آن افزایش می‌یابد.

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

اندازه متوسط ذرات ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ (µm)		درصد مساحت ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ		پارامترها
۴۰	۲۵	۴۰	۲۵	زمان(دقیقه) شرایط هموژناسیون
۱۷/۵۶±۱/۶	۱۵/۳±۰/۹	۱/۲±۰/۱۳	۱/۲±۰/۱۱	هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک های معدنی
۹±۰/۹۳	۱۱/۷۳±۱	۴/۸±۰/۱۲	۴±۰/۱۴	هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در آب مقطر

نتیجه‌ی حاصل می‌تواند به این دلیل باشد که در حالتی که در فاز آبی نمک داریم، به علت حضور نمک‌های قطبی در داخل محلول از انحلال پذیری ته مانده ی برج تقطیر در خلأ کم شده و این ترکیبات نفتی با هم تجمع پیدا می‌کنند و قطر ذرات نسبت به حالتی که نمک نداریم افزایش می‌یابد (۹و۴). همچنین (جدول ۲) مویید این است که در حالت عدم حضورنمکها با افزایش زمان هموژناسیون اندازه ذرت کوچکتر شده است، که این نتیجه برعکس زمان حضورنمکها می‌باشد.

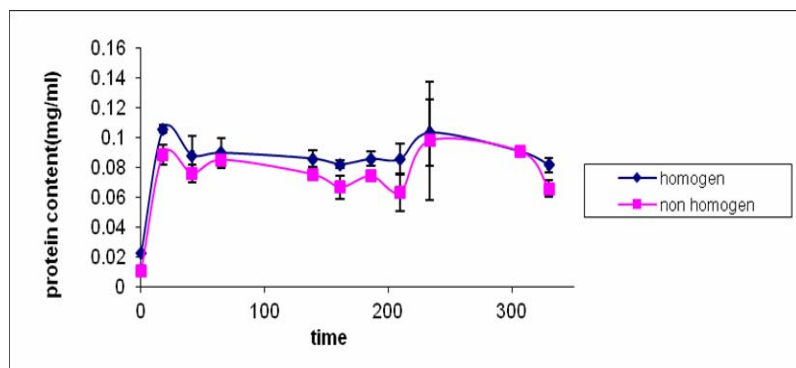
۵۰ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

تأثیر هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت حاوی نمک‌های

معدنی بر رشد میکروبی

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان پروتئین محیط کشت در دو حالت هموژن و غیر

هموژن در شکل ۱ نشان داده شده است.



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

همانطور که در شکل مشاهده می شود، هماهنگی قابل توجهی بین عملکرد نمونه‌ها وجود دارد. میزان پروتئین در روز اول به حداکثر رسیده و سپس کمی کاهش یافته و یا با تغییرات کم همراه بوده است. میزان پروتئین در روز یازدهم مجدداً افزایش پیدا کرده است و در پی آن مجدداً کاهش می یابد. منحنی رشد میکروبی استاندارد، دارای یک پیک است. اما در اینجا احتمالاً به دلیل آن که میکروارگانیسم مورد استفاده در فرمانتاسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلأ به صورت مخلوطی از چند گونه میکروبی است و از طرفی چون محیط کشت مصرفی نیز آمیخته ای از هیدروکربن های مختلف است، در نتیجه نمودار رشد میکروبی دارای چندین پیک می شود. هر کدام از این پیک ها می تواند مربوط به استفاده یک گونه میکروبی از ته مانده ی برج تقطیر در خلأ و یا یک ترکیب در حال مصرف از میان ترکیبات موجود در ته مانده ی برج تقطیر در خلأ شود (۳).

با توجه به شکل ۱ و تداخل خطوط نشانگر خطا به نظر می رسد ، رشد میکروبی در دو حالت استفاده از هموژنایزر و عدم استفاده از آن تفاوت معناداری با هم ندارند. هموژن سازی

تأثیر پراکندگی بر تجزیه‌ی میکروبی ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی..... ۵۱

موجب اختلاط دو فاز آبی و آلی می‌شود. افزایش سطح تماس و کاهش سایز ذرات در اثر هموزن سازی افزایش انتقال جرم را به همراه خواهد داشت. ازاین رو دسترسی هیدروکربن‌های لازم برای رشد میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌یابد (۲). اما از سوی دیگر به دلیل بهبود انتقال جرم و افزایش نرخ حلالیت ترکیبات موجود در فاز آلی در محیط کشت آبی در اثر هموژناسیون، احتمال تجمع مواد سمی برای میکروارگانیسم‌ها در حالت هموزن بیشتر است. مقدار کم هیدروکربن قابل دسترس در حالت غیر هموزن به دلیل محدودیت انتقال جرم، رشد را محدود می‌کند، اما از سوی دیگر اثرات سمی حداقل است (۸). در اینجا احتمالاً مجموع اثرات بهبود انتقال جرم و تجمع مواد سمی بیشتر برای میکروارگانیسم‌ها در اثر هموژناسیون ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی، به گونه‌ای بوده که تغییر معناداری در رشد میکروبی نمونه‌ی هموزن نسبت به نمونه‌ی غیر هموزن ایجاد نکرده است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری درصد مساحت ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ پراکنده شده در محیط کشت حاوی نمک‌های معدنی، مشخص می‌شود افزایش زمان هموژناسیون باعث کاهش میزان ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ پراکنده شده در محیط کشت حاوی نمک‌های معدنی و افزایش قطر ذرات آن شد. نتیجه‌ی حاصل می‌تواند به این دلیل باشد که انحلال پذیری نمک‌ها با افزایش زمان هموژناسیون در فاز آبی بیشتر می‌شود، بنابراین محلول قطبی‌تر می‌شود، در این صورت ترکیبات غیر قطبی ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ بیشتر با هم تجمع پیدا کرده و اندازه ذرات ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ هم در داخل محلول افزایش پیدا می‌کند. بنابراین زمان کمتر هموژناسیون (۱۵ دقیقه) به منظور افزایش دسترسی ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت استفاده شد.

به منظور بررسی اثر استفاده از هموژناسیون بر رشد میکروبی، از مقایسه فرآیند همراه با هموژناسیون ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت شامل ۰.۵٪ ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ اولیه، با فرآیند مشابه فاقد هموژناسیون استفاده شد. با توجه به نمودار رشد میکروارگانیسم‌ها، به نظر می‌رسد رشد میکروبی در دو حالت استفاده از هموژنایزر و عدم

۵۲ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

استفاده از آن تفاوت معناداری با هم ندارند، که این بدان معناست که احتمالاً مجموع اثرات بهبود انتقال جرم و تجمع مواد سمی بیشتر برای میکروارگانیسم ها در اثر هموژناسیون ته مانده ی برج تقطیر در خلاء در محیط کشت آبی، به گونه ای بوده که تغییر معناداری در رشد میکروبی نمونه ی هموژن نسبت به نمونه ی غیر هموژن ایجاد نکرده است.

منابع

- 1- Berekaa, M., Steinbuchel, A. (2000). "Microbial Degradation of the Multiply Branched." *Applied and Environmental Microbiology*. 10, 4462–4467.
- 2- Bernardez, L.A. (2008). "Dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from a non-aqueous phase liquid into a surfactant solution using a rotating disk apparatus." *Colloids Surf.* 320: 175–182.
- 3- Duhalt R. V., Ramirez R. Q. (2004). *Petroleum biotechnology (Developments and perspectives)*, first edition., Elsevier Science.
- 4- Greenwood, Norman N.; Earnshaw, Alan. (1997). *Chemistry of the Element*, second edition., Butterworth-Heinemann, Oxford.
- 5- Mohammadi, S., Heydarian, S. M., Mazaheri Assadi, M., Jahangiri, M. (2011). "Vacuum Residue biodegradation using bubble column fermentor." *Petroleum Science and Technology*. In press.
- 6- Morawski, I; Mosio-Mosiewski, J. (2006). "Effects of parameters in Ni–Mo catalysed hydrocracking of vacuum residue on composition and quality of obtained products." *Fuel Processing Technology*. 87, 659–669.
- 7- Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J. L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J. (2011). "Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media." *Chemosphere*. 83, 29–33.
- 8- Sikkema, J., Bont, J., Poolman, B. (1995). "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons." *Microbiological reviews*. 2: 201-222.
- 9- Steven S. R., and William H. T. (1981). "Solubility behavior of three aromatic hydrocarbons in distilled water and Natural Seawater7." the US. Environmental Protection Agency.
- 10- Tabatabaee, M., Mazaheri Assadi, M.,_Heydarian, S. M.,

تأثیر پراکندگی بر تجزیه‌ی میکروبی ته مانده‌ی برج تقطیر در خلأ در محیط کشت آبی..... ۵۳

Akhavan Sepahi, A. (2011). "Soil microbial degradation of vacuum residue." *Petroleum Science and Technology*. In press.

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