

# بررسی پارامترهای مؤثر بر ارتقا برش نفت کوره با استفاده از میکروارگانیزم‌های سودوموناس آيروژینوس و رودوکوکوس اريتروپلیس جدا شده از لجن نفتی

نعمت اله نجفی و فرشاد رحیم‌پور\*

آزمایشگاه تحقیقاتی فرآیندهای بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۸

## چکیده

در این مطالعه قابلیت باکتری‌های مفید جدا شده از لجن مخازن نفت پالایشگاه کرمانشاه و تأثیر شرایط محیط کشت جهت اصلاح نفت کوره مورد بررسی قرار گرفت. جهت جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیزم‌ها از محیط‌های کشت مایع و جامد استفاده گردید و طی مراحل مختلف میزان جمعیت میکروبی افزایش پیدا نمود. باکتری‌های فوق شامل میکروارگانیزم‌های سودوموناس آيروژینوس و رودوکوکوس اريتروپلیس هستند. در انجام آزمایش‌ها، متغیرهای انتخابی شامل پارامترهای pH، دما، زمان، غلظت نفت کوره و غلظت میکروارگانیزم‌ها بوده و هریک از متغیرها در سطوح مختلف براساس شرایط استفاده گردید. همچنین، تأثیر مواد فعال سطحی بر اصلاح نفت کوره مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده بهترین شرایط حذف ترکیبات گوگردی و تبدیل به برش‌های سبک‌تر در pH= ۶/۵، دمای °C ۴۰، غلظت ۴٪ حجمی نفت کوره، میزان ۲٪ حجمی محیط کشت حاوی دو میکروارگانیزم و زمان ۳ روز، همراه با اضافه نمودن مواد فعال سطحی شیمیایی حاصل گردیده است. در پایان آنالیز، ترکیبات نمونه حاصل در بهترین شرایط آزمایش با روش SARA مشخص گردید. میزان گوگرد کل و دانسیته در نمونه اولیه به‌ترتیب ۲۵۴۰۰ ppm و ۰/۹۴۲۸ kg/L و در نمونه نهایی برابر با ۹۴۰۰ ppm و ۰/۹۰۹۶ kg/L است، که در مقایسه با نتایج نمونه اصلی میزان تبدیل نفت کوره به نفت گاز برابر با ۲۹/۳٪ و کاهش گوگرد کل بیش از ۶۰٪ را نشان می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** نفت کوره، سودوموناس آيروژینوس، رودوکوکوس اريتروپلیس، ارتقا برش، SARA

\*مسئول مکاتبات

آدرس الکترونیکی f\_rahimpour@razi.ac.ir

شناسه دیجیتال: (DOI: 10.22078/pr.2021.4260.2926)

## مقدمه

سوخت‌های فسیلی همچنان نقش مهمی در تأمین انرژی جهانی بر عهده دارند به طوری که پیش‌بینی می‌شود نیاز کلی تا سال ۲۰۲۵ به ۱۲۳ میلیون بشکه در روز افزایش یابد. در نتیجه، نیاز به توسعه روش‌هایی که توانایی تبدیل برش‌های سنگین نفت خام به محصولات مطلوب را داشته باشند، بیش از پیش احساس می‌شود. روش‌های فیزیکی و شیمیایی زیادی برای بهبود کیفیت محصولات نفتی وجود دارد. روش‌های موجود هزینه‌بر بوده و در برخی موارد دارای بازدهی مناسب نیستند. همچنین، محدودیت‌های محیط‌زیستی و تکنیکی مانع از به‌کارگیری برخی از این روش‌ها می‌شوند [۱]. در مقایسه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی - حرارتی موجود، فرآیندهای زیستی عموماً دوستدار محیط زیست بوده و دارای انتخاب‌پذیری بالایی هستند [۲]. استفاده از میکروارگانیسم یا آنزیم‌ها دارای مزایای زیادی از جمله فشار و درجه حرارت پایین، عدم نیاز به هیدروژن، سادگی بالقوه فرآیند، هزینه‌های شیمیایی کم و حداقل تجهیزات و سرمایه‌گذاری در مقایسه با عملیات پالایشگاهی است [۳].

زیست‌فن‌آوری با استفاده از توانایی ویژه میکروارگانیسم‌ها برای حذف آلاینده‌های ناشی از برش‌های نفتی، ازدیاد برداشت مخازن، گوگردزدائی و نیتروژن زدائی، حذف فلزات سنگین از نفت، تبدیل باقی‌مانده‌های نفتی به متان و ... به‌کار گرفته شده است [۴]. کاربری موفقیت‌آمیز بیوتکنولوژی در فرآیندهای نفتی بر مبنای توسعه زیست‌کاتالیست‌های میکروبی که قابلیت تطابق با سوبستراهای هیدروکربنی مختلف را دارا باشند و بتوانند واکنش‌های تبدیلی و زیست‌پالائی را در مقیاس صنعتی انجام دهند، استوار است. این قابلیت به خواص شیمیایی و فیزیکی سوبسترا و در دسترس بودن آنها برای میکروارگانیسم بستگی دارد که تماس میکروارگانیسم با سوبسترای هیدروکربنی و تبدیل و انتقال آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

حضور ترکیبات سنگین موجب افزایش ویسکوزیته و چگالی برش‌های نفتی می‌گردد. به همین دلیل، ارتقا و تبدیل این ترکیبات و دیگر ترکیبات آروماتیکی موجود در برش‌های نفتی سنگین توسط روش‌های زیستی برای به حداکثر رساندن تولید برش‌های سبک‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند [۵]. میکروارگانیسم‌ها از دو طریق موجب ارتقا برش‌های سنگین نفتی می‌شوند: الف) شکستن مولکول‌های سنگین و کاهش وزن مولکولی متوسط برش و ب) ایجاد محصولات جانبی متابولیسم میکروبی مانند مواد بیولوژیکی فعال سطحی، اسیدها و بازها که موجب کاهش قابل توجه ویسکوزیته برش‌های نفتی می‌گردد [۶].

شکستن پیوند کربن- گوگرد در مولکول‌های حلقوی غیرهمگن حاوی اتم‌های گوگرد یکی از روش‌های کاهش ویسکوزیته است. نفت حاوی ترکیبات گوگرددار زیادی مانند دی‌بنزوتوفن و مشتقات آلکیل‌دار آن و نیز دیگر ترکیبات آروماتیک حاوی گوگرد است که گوگردزدائی آنها توسط روش‌های متداول مشکل است. تا ۴۰٪ ترکیبات گوگردی در برش‌های سنگین به فرم آلکیل سولفید است و شکست انتخابگرانه پیوند کربن- گوگرد این مولکول‌ها با استفاده از میکروارگانیسم‌ها موجب کاهش وزن مولکولی و ویسکوزیته برش می‌گردد. میکروارگانیسم مطلوب برای این منظور نایستی هیدروکربن را به‌عنوان منبع کربن استفاده کند زیرا از ارزش حرارتی سوخت کاسته می‌شود، به‌علاوه باید پایدار بوده و انتخاب‌پذیر باشد [۷]. وان هامه و همکارانش باکتری‌های *sp. strain JVHI Rhodococcus* را جدا نمودند که با استفاده از بیس- (۳- پنتا فلوروفیل پروپیل) سولفید، که نمونه آروماتیک‌های مقاوم به تجزیه توسط میکروارگانیسم‌ها است، به‌عنوان سوبسترا قادر به شکستن پیوند کربن- گوگرد در زنجیره آلکیل هستند. ایشان نشان دادند که این باکتری قابلیت کاهش ویسکوزیته ناشی از شکستن پیوند کربن- گوگرد مولکول‌های آسفالتین بدون

با غلظت اولیه ۲۵ g/L را حذف نمودند [۱۵]. ایشان نشان دادند که این باکتری‌ها عمدتاً از گوگرد برای رشد استفاده نمودند و میزان حذف کربن، هیدروژن و نیتروژن نسبت به نمونه شاهد کمتر بوده است. همچنین، گروه‌های آلکین بیشترین حذف را داشته‌اند. لاوانیا و همکاران با استفاده از گونه Moorella sp. در دمای °C ۷۰ با توجه به حذف ۵۶٪ آروماتیک‌ها، ویسکوزیته نفت خام را به میزان ۷۵ تا ۹۸٪ کاهش دادند [۱۶]. غلامی و همکاران با استفاده از کنسرسیوم میکروبی متشکل از Serratia sp., Raoultella sp. و Ochrobactrum sp. میزان رزین‌ها در نفت سنگین را ۳۷/۳٪ کاهش دادند و به‌صورت هم‌زمان، ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک به‌میزان ۸۶/۶ و ۶/۷٪ افزایش پیدا کردند [۱۷]. تعدادی از باکتری‌های آب‌گریز مانند Achromobacter، Leptothrix، Thiobacillus sp و spirillum pseudomonas، توانایی تبدیل نفت‌های سنگین به‌سبک، افزایش مقدار هیدروکربن‌های اشباع و کاهش میزان گوگرد، نیتروژن و ترکیبات فلزی را دارند. نتایج استفاده از میکروارگانیسم‌های ذکر شده نشان‌دهنده تبدیل بیولوژیکی ۵۰ تا ۶۰٪ هیدروکربن‌های سنگین در دمای °C ۳۷ و pH = ۷ و مدت زمان دو روز است [۱۸]. برای مولکول‌های هیدروکربن سنگین دو مکانیسم برای دسترسی این مواد توسط میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد شده است: الف) کاهش تنش سطحی با تماس مستقیم سلول‌ها با هیدروکربن و ب) تسهیل تماس سلول‌ها با هیدروکربن امولوسیونی شده توسط مواد فعال سطحی زیستی [۱۹]. حجم زیاد هیدروکربن‌های سنگین می‌تواند یک چالش برای انتقال این مولکول‌ها به سلول‌های میکروبی باشد. برای رفع این مشکل می‌توان از مواد فعال سطحی استفاده نمود. مواد فعال سطحی مولکول‌های آمفیپاتیک با دو قسمت آب‌گریز و آب‌دوست هستند. آنها از طریق تجمع در سطح مشترک دو فاز، توانایی کاهش کشش سطحی بین مایعات غیرقابل امتزاج

کاهش تعداد کربن سوبسترا را دارا است [۱۷]. ال‌سید محمد و همکاران نشان دادند باکتری Rhodococcus sp. strain S111 قادر است از طریق مکانیسم 4S پیوند کربن-گوگرد ترکیبات تئوفنیک را شکسته و ویسکوزیته نفت را کاهش دهد [۸]. همچنین، بهاتیا و شارما گزارش کرده‌اند که باکتری گرمادوست Klebsiella sp. 13T قادر به حذف گوگرد درون مولکولی هیدروکربن بدون تجزیه ساختار آن است [۹]. بلدی و همکاران با استفاده از سویه‌های مخمر Rhodosporidium toruloides دی بنزوتئوفن و دیگر ترکیبات تئوفن را از هیدروکربن‌های نفتی حذف نمودند [۱۰]. چن و همکاران با استفاده از توده سلولی باکتری Gordonia sp. SC-10 در مدت پنج روز ۸۱/۴۳٪ گوگرد موجود در یک نفت مدل حاوی ۱۷۴ mg/L دی‌بنزوتئوفن را از طریق مکانیسم شکستن پیوند کربن-گوگرد حذف نمودند [۱۱]. رانسون و ریواس نشان دادند برخی گونه‌های باکتری Alcaligenes xylosoxidans در دمای °C ۳۰ تا ۵۰ و pH بین ۸ تا ۹ قادرند به‌صورت انتخابگر و مکانیسم‌هوازی از طریق شکستن پیوند کربن-گوگرد ترکیبات دی‌بنزوتئوفن را بدون از بین بردن ساختار کربنی گوگردزدائی نمایند [۱۲]. بهاتیا و شارما با استفاده از باکتری Pantoea agglomerans دی بنزوتئوفن را با بازده ۹۰٪ به ۲-هیدروکس دی فنیل تبدیل نمودند. مسیر پیشنهاد شده برای این تبدیل مسیر 4S است. همچنین، باکتری تطابق یافته بین ۲۶ تا ۷۱٪ گوگرد برش‌های مختلف نفتی را با شکستن پیوند کربن-گوگرد حذف نمود [۱۳]. طباطبائی و مظاهری اسدی با استفاده از باکتری Bacillus cereus برش باقی‌مانده برج تقطیر خلأ را ارتقا دادند [۱۴]. براساس نتایج به‌دست آمده در این کار در طی سه هفته در ۱۵۰ rpm و دمای °C ۳۰، آلکان‌های اشباع به‌میزان ۲۲/۱، آروماتیک‌ها ۳۰/۳٪ و آسفالتین‌ها و رزین‌ها ۶۵/۵٪ کاهش یافته‌اند. شاه‌ابراهیمی و همکاران با استفاده از مخلوط باکتری‌های Staphylococcus saprophyticus sp و Bacillus cereus sp ۴۶/۴۱٪ آسفالتین نفت خام

نفت کوره پالایشگاه کرمانشاه به ترکیبات با ارزش تر از طریق کاهش دانسیته و گوگردزدائی، با استفاده از میکروارگانیسیم های بومی جدا شده از لجن نفتی پالایشگاه است. میکروارگانیسیم های جدا شده شناسائی گردیده و تأثیر متغیرهای عملیاتی دما، زمان، pH، غلظت نفت کوره و غلظت میکروارگانیسیم و مواد فعال سطحی ها بر میزان کاهش دانسیته و گوگرد کل برش نفتی بررسی شده و مقادیر بهینه پارامترها تعیین شده است.

### مواد و روش ها و تجهیزات

#### مواد

مواد شیمیایی و محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید. کلیه مواد به همان صورت خریداری شده مورد استفاده قرار گرفته اند. آب دو بار تقطیر در کلیه آزمایش ها به کار گرفته شد. نفت کوره از پالایشگاه کرمانشاه تهیه شد. دانسیته اولیه نمونه برابر  $942/8 \text{ kg/m}^3$  و گوگرد کل آن  $25400 \text{ ppm}$  است.

#### جداسازی باکتری

جهت جداسازی میکروارگانیسیم از لجن مخازن انبار نفت کوره پالایشگاه کرمانشاه استفاده گردید. محیط کشت استفاده شده شامل مواد گلیسرول  $(10 \text{ g/L})$ ،  $(2/44 \text{ g/L}) \text{KH}_2\text{PO}_4$ ،  $(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ ،  $(10/48 \text{ g/L}) \text{Ca-}$ ،  $(2 \text{ g/L}) \text{NH}_4\text{Cl}$ ،  $(0/5 \text{ g/L}) \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ،  $(0/001 \text{ g/L}) \text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ،  $(0/005 \text{ g/L}) \text{FeCl}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ ،  $(0/003 \text{ g/L}) \text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ترکیب محیط کشت جامد دقیقاً شبیه محیط کشت مایع است ولی به میزان  $10 \text{ g/L}$  اگر به محیط افزوده شده است. pH محیط برابر ۷ تنظیم شده است. ابتدا  $5 \text{ mL}$  از لجن را به  $95 \text{ mL}$  محلول محیط کشت اضافه نموده و در دمای  $35^\circ \text{C}$  و دور  $150 \text{ rpm}$  به مدت چهار روز در ارلن مایر کشت داده می شود تا کدورت سیستم افزایش و رنگ آن تغییر کند.  $10 \text{ mL}$  از محیط کشت به محیط جدید با ترکیب مشابه انتقال یافته که فقط در آن مقداری از گلیسرول

و افزایش حلالیت و تحرک ترکیبات آلی آب گریز یا نامحلول را دارند [۶]. آنها براساس توانایی شان برای کاهش تنش سطحی، افزایش حلالیت، قدرت شویندگی، توانایی مرطوب کردن و ظرفیت کف سازی مورد استفاده قرار می گیرند [۲۰]. برخی از بیومولکول ها توانایی تولید مواد فعال سطحی زیستی را دارند. مواد فعال سطحی زیستی از مزایایی نظیر سازگاری با طبیعت، قابلیت تجزیه پذیری به صورت طبیعی، سمیت پایین، عملکرد اختصاصی، فعالیت بالا تحت شرایط سخت دما، فشار و اسمولالیه بالا و نیز کف کنندگی زیاد برخوردار هستند که با ترکیب آنها با مواد فعال سطحی می توان به نتایج بهتری دست یافت. نفت کوره یک فرآورده بازیافتی و شاخه ای است و یکی از بیشترین برش های تولیدی پالایشگاه است. از طرفی، با توجه به قیمت جهانی نفت کوره، هر چه میزان تولید آن کمتر شود سوددهی پالایشگاه افزایش می یابد. امروزه یکی از پراهمیت ترین واحدهای هر پالایشگاه، واحدهای غلظت شکن است که برش های سنگین را در اثر حرارت به اجزاء سبک و نفت کوره نیمه سنگین تبدیل می کند. نفت کوره شامل مقادیری از باقی مانده ای تقطیر نفت خام حاصل از کراکینگ حرارتی است، نفت کوره معمولاً فرآورده تقطیر شده بین  $180^\circ \text{C}$  تا  $380^\circ \text{C}$  است و عمدتاً از هیدروکربن هایی با زنجیره های طولانی به خصوص آلکان ها، آلکان های حلقوی و آروماتیک ها تشکیل شده است و حاوی ترکیبات گوگردی، اکسیژنه و فلزات نیز است. ویسکوزیته سینماتیک آن در  $180^\circ \text{C}$  بالاتر از  $10$  است، نقطه اشتعال آن بالای  $50^\circ \text{C}$  است و دانسیته آن بیشتر از  $0/9$  است. با توجه به اینکه تبدیل برش های سنگین به برش های سبک تر و گوگردزدائی آنها در فرآیندهای متداول پالایشگاهی نیازمند استفاده از دما و فشار زیاد است، حذف این مراحل با استفاده از فرآیندهای میکروبی که توانایی ارتقا برش های سنگین را دارا باشند، اهمیت زیادی دارد. هدف کلی این تحقیق بهبود خواص و ارتقاء

۵ min در  $94^{\circ}\text{C}$ ،  $35^{\circ}\text{C}$  چرخه شامل سرشت‌زدائی در  $94^{\circ}\text{C}$ ،  $35^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ min، اتصال در  $55^{\circ}\text{C}$  برای ۱ min، طویل شدن رشته در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ min و گسترش نهایی واکنش در  $72^{\circ}\text{C}$  درجه به مدت ۵ min انجام گرفت. محصول به دست آمده خالص‌سازی شده و توالی آن مشخص گردید.

#### واکنش گوگردزدائی و شکست مولکولی

برای انجام آزمایش‌های گوگردزدائی و شکست مولکولی نفت کوره از ارلن‌مایرهای ۲۵۰ mL حاوی ۵۰ mL محیط کشت استفاده شد. در ابتدا جهت تهیه محیط کشت حاوی میکروارگانیسم، نمونه‌های نگهداری شده به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت با ترکیب ذکر شده اضافه شده و تا هنگامی که دانسیته نوری در ۶۰۰ nm محلول برابر ۴ شود گرماگذاری می‌گردد. ارلن‌مایرها در شیکرانکوباتور در pH و دماهای مشخص و میزان مشخص از نفت کوره و میکروارگانیسم گرماگذاری شده و پس از گذشت زمان لازم، محلول از سلول جدا شده و آزمایش‌های مربوط به میزان گوگرد و وزن مخصوص روی آنها انجام شده است. جهت بررسی تأثیر مواد فعال‌سطحی محیط کشت مشابه آزمایش‌های گوگردزدائی و شکست مولکولی و با حضور مواد فعال‌سطحی انجام گردیده است. از سدیم دودسیل سولفات (SDS) و اتیل‌دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) به‌میزان ۰/۰۵ g در هر ۵۰ mL محیط کشت به‌عنوان مواد فعال‌سطحی استفاده شده است. هر آزمایش ۳ بار تکرار شده است و مقدار میانگین گزارش شده است.

#### اندازه‌گیری ترکیبات نفت کوره

برای تفکیک نفت کوره سنگین به ترکیبات اشباع، آروماتیک، رزین و آسفالتین (SARA) و اندازه‌گیری آنها از روش SARA (استاندارد 09 – 01 – 2002 ASTM) استفاده می‌گردد [۲۳]. در این روش، ۱۰ g از نمونه نفتی با نرمال هپتان مخلوط شده و آسفالتین آنها جدا و رسوب می‌گردد. میزان آسفالتین با اندازه‌گیری وزن رسوب مشخص می‌گردد.

با نفت کوره جایگزین شده است. این انتقال به محیط جدید تا جایگزینی کامل گلیسرول با نفت کوره طی پنج مرحله انجام می‌گیرد. سپس، محلول حاوی میکروارگانیسم کشت داده شده به‌صورت سریالی با محلول استریل نمکی (۰/۹٪ سدیم کلراید) رقیق شده و به محیط جامد انتقال داده شده و طی شش مرحله متوالی به روش کشت خطی در  $35^{\circ}\text{C}$  و هر مرحله به مدت ۶ روز کشت داده می‌شود تا باکتری تک کلونی به دست آید. سپس باکتری‌های جدا شده محیط جامد به محیط مایع انتقال داده شده و طی دو مرحله در محیط کشت مایع رشد نموده و محیط کشت حاصل جهت انتقال به محیط‌های جدید حاوی ۰/۲۵٪ گلیسرول در فریزر نگهداری می‌شود.

#### بررسی رشد باکتری‌ها

برای بررسی رشد باکتری‌ها، میزان رشد توده میکروبی نمونه‌های تیمار شده از طریق بررسی کدورت نمونه‌ها ارزیابی گردید. به این منظور، میزان جذب نوری نمونه‌ها طی مدت ۵ روز از طریق بررسی کدورت حاصل از رشد باکتری‌ها، توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری گردید.

#### تعیین هویت میکروارگانیسم‌ها

خصوصیات اولیه میکروارگانیسم با تعیین مشخصه کلونی، مشاهده میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی گرم [۲۱] صورت گرفت. DNA کل توسط روش Marmur استخراج گردید [۲۲]. واکنش‌های PCR با استفاده از پرایمرهای [50-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3] 1492R و [50-GGTTACCTTGTTACGACTT-3] 27F و با استفاده از آنالیزور توالی ABI 3730/ 3730 xl DNA انجام گرفت (Applied Biosystems Inc., Korea). این آزمایش با استفاده از ۵۰  $\mu\text{L}$  مخلوط واکنش حاوی ۱  $\mu\text{L}$  عصاره DNA به‌عنوان قالب با هر پرایمر با غلظت ۵ mM، کلرید منیزیم ۰/۲۵ mM و dNTPs با غلظت ۲ mM، به‌همراه ۱/۵ واحد Taq پلیمریز و بافر صورت گرفت. پس از سرشت‌زدائی اولیه به مدت

دو نوع باکتری شناسائی و جدا گردید. توالی 16SrDNA به ترتیب تشابه ۹۸/۶٪ و ۹۹٪ با *Pseudo-monas aeruginosa* (به شماره دسترسی ATCC9027 بانک ژنتیک (NCBI و *Rhodococcus erythropolis* (به شماره دسترسی GU570564 بانک ژنتیک (NCBI نشان می‌دهند. سودوموناس‌ها یکی از مهم‌ترین جنس‌های موجود در خانواده سودوموناسه محسوب می‌شوند. باکتری‌های موجود در این جنس همگی میله‌ای شکل، مستقیم یا کمی منحنی، گرم منفی غیر اسید فست و بدون اسپور هستند. این باکتری‌ها به شدت هوازی بوده و از مولکول اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده می‌کنند. رودوکوکوس نوعی از باکتری‌های گرم مثبت هوازی هستند که شامل دو دسته میکوباکتریوم و کورین باکتری است و در طیف وسیعی از محیط‌ها از جمله خاک، آب و سلول‌های یوکاریوتی رشد می‌کنند. باکتری‌های رودوکوکوس به دلیل توانایی در تجزیه مواد پروتوپلاسمی سلولی طیف گسترده‌ای از ترکیبات و تولید استروئیدهای فعال زیستی، آکریلامید و اسید اکریلیک و دخالت آنها در گوگردزدائی سوخت‌های فسیلی مهم هستند. رودوکوکوس‌ها دارای خاصیت آب‌گریزی زیاد هستند که این خاصیت حلالیت آنها را در محیط‌های آلی تسهیل می‌کنند. همچنین، مقاومت بالائی نسبت به محیط‌های آلی از خود نشان می‌دهند [۲۵]. سودوموناس‌ها دارای خاصیت آب‌گریزی کمتری نسبت به رودوکوکوس‌ها دارند ولی مقاومت خوبی در محیط‌های آلی از خود نشان می‌دهند [۲۶]. با توجه به منحنی رشد میکروارگانیسم‌ها **شکل ۱** مشاهده می‌گردد حداکثر رشد میکروارگانیسم‌ها در روزهای سوم تا پنجم اتفاق می‌افتد.

#### تأثیر زمان

برای بررسی تأثیر زمان واکنش بر کاهش دانسیته و کاهش گوگرد کل نمونه‌های نفت کوره از ۲ mL محیط کشت حاوی میکروارگانیسم در pH=۷، دمای ۳۰ °C و میزان ۱۰ mL نفت کوره استفاده گردید.

برش باقی‌مانده را تا حد امکان از هپتان جدا کرده و وزن آن اندازه‌گیری می‌شود. ۲ g از برش باقی‌مانده را به یک ستون کروماتوگرافی پر شده از سیلیکای فعال شده که با نرمال هپتان اشباع شده اضافه نموده و به ترتیب با ۱۰۰ mL نرمال هپتان (مربوط به قسمت برش اشباع)، ۱۰۰ mL تولوئن (مربوط به آروماتیک‌ها)، ۱۰۰ mL محلول متانول-تولوئن (به نسبت ۵۰:۵۰) (مربوط به ترکیبات قطبی/رزین‌ها)، ۱۰۰ mL کلروفورم (مربوط به ترکیبات قطبی/رزین‌ها)، و ۱۰۰ mL استونیتریل (مربوط به ترکیبات قطبی/رزین‌ها) در ستون جداسازی می‌گردد. حجم‌های خروجی از ستون به صورت جداگانه جمع‌آوری شده و سه برش آخر با هم مخلوط می‌گردد. برش‌ها تحت خلأ عریان‌سازی شده تا حلال آن تبخیر شود و وزن می‌گردد. محتوی ترکیبات اشباع، آروماتیک‌ها، و رزین‌ها با توجه به درصد وزنی باقی‌مانده برش‌ها نسبت به وزن کل نمونه محاسبه می‌گردد.

#### اندازه‌گیری میزان گوگرد کل

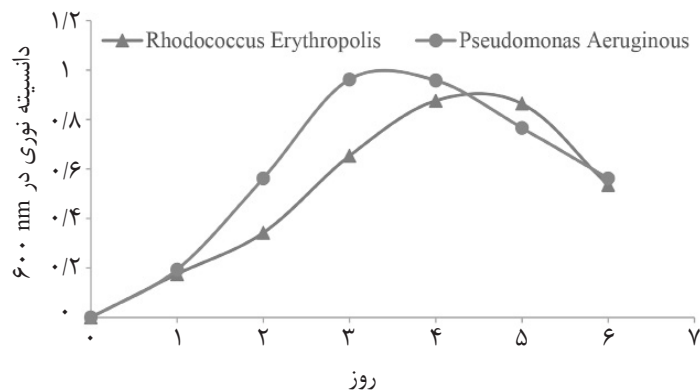
جهت اندازه‌گیری میزان گوگرد کل در نفت کوره از دستگاه آنالیز گوگرد توسط تابش اشعه ایکس (X-ray fluorescence SLFA-60 Horiba, Japan) استفاده گردید. دستگاه آنالیزور گوگرد کل براساس استاندارد ASTM D4294 میزان گوگرد در برش‌های نفتی را آنالیز و براساس ppm گزارش می‌نماید [۲۴].

#### بحث و نتایج

##### شناسایی نمونه باکتری‌های

ابتدا میکروارگانیسم‌ها از نمونه اصلی به محیط‌های انتخابی، که شامل بلاد آگار-شکلات آگار-EMB آگار-محیط مایع تیوگلی کولات است، طبق روش استاندارد انتقال داده می‌شود. برای تعیین هویت یک کلنی را برداشته و بعد از پاساژ در محیط‌های انتخابی پلیت به مدت ۱۸-۲۴ h در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده تا ارگانیسم مورد نظر رشد نماید. سپس جهت تشخیص براساس استاندارد اقدام می‌گردد.

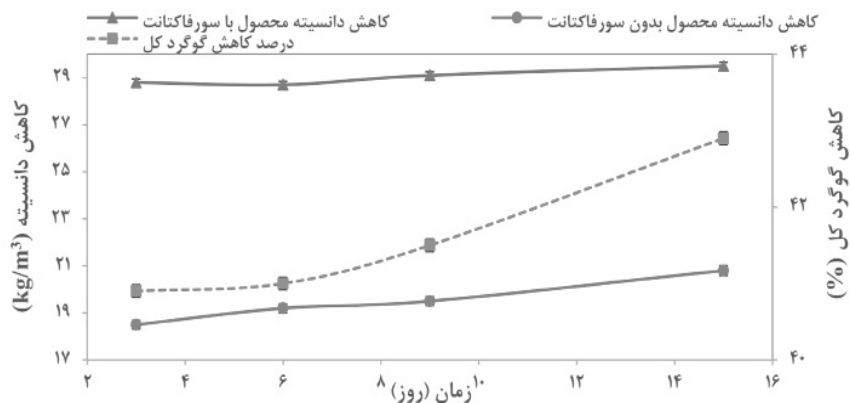




شکل ۱ منحنی رشد زمانی میکروارگانیسم‌ها

میکروارگانیسم‌ها برای دسترسی به هیدروکربن‌ها و سایر ترکیبات آب‌گریز تولید مواد فعال سطحی زیستی است. میکروارگانیسم‌ها انواع مختلفی از ترکیبات فعال سطحی با وزن مولکولی کم یا زیاد را تولید می‌کنند. نرخ تولید مواد فعال سطحی زیستی تابعی از نوع سوپسترا و شرایط شیمیایی و فیزیکی محیط کشت مانند pH و دما است. باکتری‌های سودوموناس آیروژینوس و رودوکوکوس اریتروپلیس قبل از افزودن مواد فعال سطحی شیمیایی به خوبی در محیط حاوی نفت کوره رشد می‌نمایند. همچنین، کف تشکیل شده در محیط کشت قبل از افزودن مواد فعال سطحی شیمیایی نشان‌دهنده تولید مواد فعال سطحی زیستی است. به‌علاوه با توجه به تولید مواد واسطه در فرآیند گوگردزدائی، این امکان وجود دارد که مواد فعال سطحی زیستی تولید شده خروج این مواد از داخل سلول را تسهیل نموده و از میزان بازدارندگی آن بکاهد [۲۸]. با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود که مواد فعال سطحی زیستی تولید شده موجب دسترسی میکروارگانیسم‌ها به هیدروکربن شده و منجر به کاهش دانسیته نفت کوره و نیز کاهش گوگرد کل می‌گردد. میزان نهایی دانسیته محصول پس از پانزده روز در شرایط ذکر شده از  $922 \text{ g/cm}^3$  در حالت بدون مواد فعال سطحی به  $913/4 \text{ g/cm}^3$  در حالت با مواد فعال سطحی کاهش می‌یابد و گوگرد کل نیز به  $145.3 \text{ ppm}$  کاهش می‌یابد.

نتایج به‌دست آمده در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه نتایج به‌دست آمده مشاهده می‌گردد بعد از سه روز میزان تأثیر میکروارگانیسم در کاهش دانسیته بسیار ناچیز است. همچنین، درصد کاهش گوگرد کل نیز افزایش حدود دو درصدی را نشان می‌دهد. دلیل این امر می‌تواند، به‌دست آمدن حداکثر سرعت رشد میکروارگانیسم‌ها در روزهای سوم و چهارم باشد. براساس تست کدورت، حداکثر رشد میکروارگانیسم‌ها در روزهای سوم و چهارم اتفاق می‌افتد و پس از آن، میزان جمعیت میکروبی کاهش می‌یابد. بنابراین، زمان انجام آزمایش‌ها سه روز در نظر گرفته می‌شود. چالش اساسی بکارگیری فرآیندهای بر مبنای آنزیم، فعالیت بیولوژیکی آنزیم‌ها در محیط آلی با ویسکوزیته بالا است. با توجه به اینکه نفت کوره ترکیب آب‌گریزی بوده و از آب سبک‌تر است، لذا تمایل دارد همواره روی سطح آب قرار گیرد. معمولاً هیدروکربن‌هایی که دارای زنجیره بیشتر از ۳۶ کربن هستند دارای ویسکوزیته بالا و تنش سطحی زیاد هستند. این موضوع باعث خارج شدن هیدروکربن‌ها از جریان سیال و محدودیت انتقال جرم و در نتیجه، کاهش در دسترس بودن آن به‌عنوان سوپسترا خواهد شد [۲۷]. با افزودن مواد فعال سطحی تنش سطحی بین نفت کوره و محیط کشت کاهش یافته و حلالیت نفت در آب افزایش می‌یابد. در نتیجه میزان بازدهی سیستم در این حالت افزایش نسبی را نشان می‌دهد. یکی از راه‌های مورد استفاده



شکل ۲ تغییرات کاهش دانسیته و درصد گوگرد کل با زمان کشت در محیط کشت در دمای °C ۳۰، pH= ۷، ۲ mL میکروارگانیزم و میزان ۱۰ mL نفت کوره

فعال سطحی زیستی جذب آنها به سطح مشترک، نسبت به مواد فعال سطحی زیستی، افزایش یافته و موجب کاهش تنش سطحی بین دو فاز می‌گردند [۳۱]. همان‌گونه که از نتایج مشاهده می‌شود، با افزودن مواد فعال سطحی به محیط کشت بازده میکروارگانیزم برای کاهش دانسیته برش نفتی و درصد گوگرد کل افزایش می‌یابد، که به دلیل تقویت همکاری مخلوط مواد فعال سطحی و مواد فعال سطحی زیستی و انعطاف‌پذیری بیشتر برای پردازش مواد آلی است. سدیم دودسیل سولفات یکی از رایج‌ترین مواد فعال سطحی است. این ماده یک ترکیب شیمیایی امولسیون‌کننده، پُف‌دهنده، تسریع‌کننده انحلال، و با خاصیت کف‌کنندگی است که از آن در صنایع شویندگی یا مواد غذایی استفاده می‌شود و ماده فعال‌کننده سطحی آنیونی در تولید شامپو است. استفاده از مواد فعال سطحی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با مواد فعال سطحی به تنهایی، انرژی سطحی را افزایش می‌دهد. افزودن سدیم دودسیل سولفات و EDTA، در مقادیر کم، به محیط کشت موجب القا بیشتر ترشح ترکیب فعال می‌گردد. این امر موجب بهبود عملکرد مواد فعال سطحی زیستی تولید شده توسط افزایش سوپسترا محلول در آب و یا حل شدن لایه‌های غیرقطبی هیدروکربن در محیط کشت می‌گردد. همچنین، EDTA می‌تواند به‌صورت بالقوه به تشکیل

تأثیر مواد فعال سطحی بر میزان دسترسی میکروارگانیزم‌ها به ترکیبات آلی را می‌توان با سه مکانسیم اصلی توضیح داد: پخش مواد آلی در فاز غیرآبی که موجب افزایش سطح تماس در اثر کاهش تنش سطحی بین دو فاز آبی و آلی می‌گردد و حلالیت مؤثر هیدروکربن‌ها را در حضور مایسل‌های تشکیل شده افزایش می‌دهد و میکروارگانیزم‌ها هیدروکربن‌ها را از طریق هسته مایسل‌ها دریافت می‌کنند. در مکانسیم دوم، دیگر مواد فعال سطحی موجب افزایش نرخ انتقال جرم مواد آلی به فاز آبی می‌گردند و آنها را در دسترس میکروارگانیزم‌ها قرار می‌دهند. در مکانسیم سوم، افزودن مواد فعال سطحی موجب تغییر آب‌گریزی میکروارگانیزم شده و تماس بین میکروارگانیزم و هیدروکربن را افزایش می‌دهد. گونه *Pseudomonas aeruginosa* فعال سطحی زیستی رهامونولیپید (*Rhodococcus erythropo-*) [۲۹] و گونه *lipids* قادر به تولید مواد فعال سطحی زیستی ترهالوز دیمایکولیپید (*trehalose dimycolipids*) هستند [۳۰].

مخلوط مواد فعال سطحی - مواد فعال سطحی زیستی خواص سطحی مناسب‌تری نسبت به مواد فعال سطحی زیستی به تنهایی از خود نشان می‌دهد. در مخلوط مواد فعال سطحی - مواد



۶/۵ بوده که یکی از دلایل آن این است که بیشتر باکتری‌ها در pH حدود خنثی بهتر رشد می‌کنند. اگر محیط زیاد اسیدی و یا قلیایی باشد باکتری‌ها ابتدا رشد و سپس حیات خود را از دست می‌دهند در حالی که قارچ‌ها در محیط‌های اسیدی مقاومت بیشتری دارند. pH بهینه برای رشد این باکتری بین ۶/۷ تا ۷/۲ است [۳۳ و ۳۴]. در این مطالعه تنظیم pH از ۴/۵ تا ۸/۵ باعث نتیجه‌ای نزدیک به ۱/۱۳ برابر سرعت تقلیل بیولوژیکی نفت کوره شده است.

#### تأثیر دما

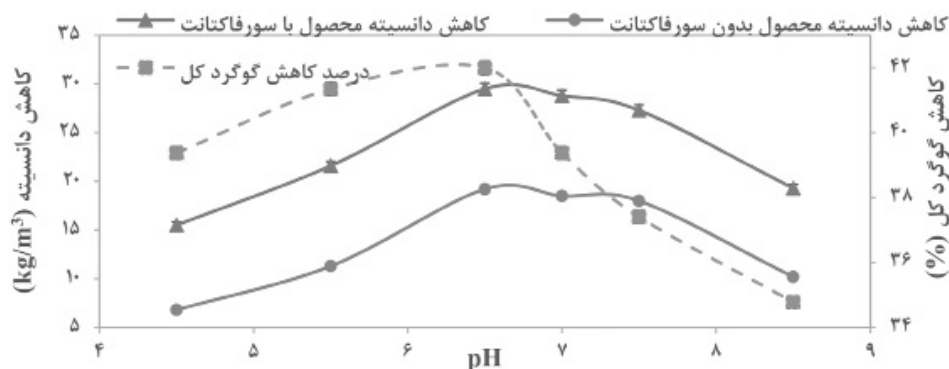
برای بررسی تأثیر دما بر کاهش دانسیته و کاهش گوگرد کل نمونه‌های نفت کوره از ۲ mL محیط کشت حاوی میکروارگانیسم در زمان ۳ روز،  $pH = 6/5$  و میزان ۱۰ mL نفت کوره استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان نهایی دانسیته محصول در دمای  $40^{\circ}C$  در شرایط ذکر شده از  $923 \text{ g/cm}^3$  در حالت بدون مواد فعال سطحی به  $912/7 \text{ g/cm}^3$  در حالت با مواد فعال سطحی کاهش می‌یابد و گوگرد کل نیز به  $15240 \text{ ppm}$  کاهش می‌یابد. دما از دو روش متفاوت بر میکروارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارد: با افزایش دما تا یک حد مشخص واکنش‌های آنزیمی و شیمیایی درون سلول با سرعت بیشتری انجام شده و رشد سریع‌تر می‌شود.

کمپلکس‌هایی با یون‌های فلزی کمک کرده و آنها را در دسترس میکروارگانیسم قرار دهد [۳۲].

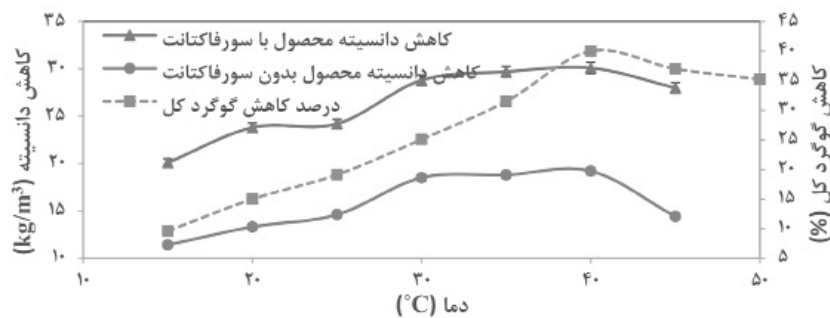
#### تأثیر pH

برای بررسی تأثیر pH بر کاهش دانسیته و کاهش گوگرد کل نمونه‌های نفت کوره از ۲ mL محیط کشت حاوی میکروارگانیسم در زمان ۳ روز، دمای  $30^{\circ}C$  و میزان ۱۰ mL نفت کوره استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده در شکل ۳ نشان داده شده است. میزان نهایی دانسیته محصول در pH برابر ۶/۵ در شرایط ذکر شده از  $923 \text{ g/cm}^3$  در حالت بدون مواد فعال سطحی به  $913/2 \text{ g/cm}^3$  در حالت با مواد فعال سطحی کاهش می‌یابد و گوگرد کل نیز به  $14732 \text{ ppm}$  کاهش می‌یابد.

یکی از عوامل مؤثر بر فرآیندهای زیستی، pH محیط است. طبق بررسی‌های انجام شده و همچنین، شرایط عملیاتی در بسیاری از فرآیندهای زیستی می‌توان نتیجه گرفت که بهترین pH محیط، همان شرایط خنثی pH برابر ۷ تا ۸ است. معمولاً باکتری‌ها و قارچ‌ها در pH نزدیک به خنثی رشد می‌کنند. افزایش pH از مقدار خنثی باعث افت قابل توجه تجزیه هیدروکربن‌ها شده و در بعضی مواقع، pH اسیدی باعث توقف تجزیه بیولوژیکی نیز می‌گردد. با توجه به نتایج، بهترین pH که باعث بیشترین کاهش ویسکوزیته گردیده است برابر با



شکل ۳ وابستگی کاهش دانسیته و درصد کاهش گوگرد کل به pH محیط کشت در دمای  $30^{\circ}C$ ، مدت زمان سه روز، ۲ mL میکروارگانیسم و میزان ۱۰ mL نفت کوره



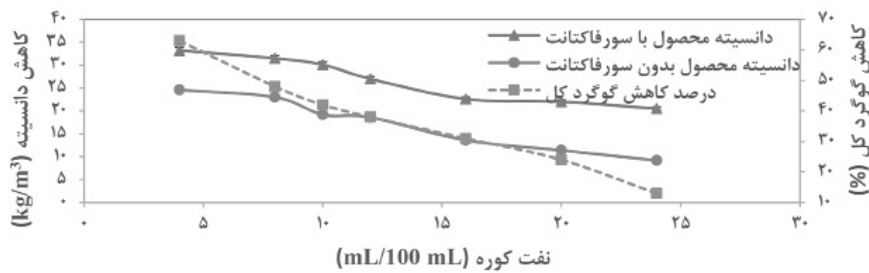
شکل ۴ وابستگی کاهش دانسیته و درصد گوگرد کل به دمای محیط کشت در pH=۶/۵، مدت زمان سه روز، ۲ mL میکروارگانیسم و میزان ۱۰ mL نفت کوره

می‌توان بهترین و مؤثرترین شرایط جهت حداکثر کاهش میزان ویسکوزیته را تعیین نمود. نمودار نتایج نشان می‌دهد که در دمای ۴۰ °C بهترین نتیجه حاصل گردیده است [۳۳ و ۳۴].

#### تأثیر ترکیب و غلظت هیدروکربن‌های نفتی (غلظت نفت کوره)

جهت بررسی تأثیر غلظت هیدروکربن بر شکست مولکولی مقادیر مختلف نفت کوره به ارلن مایر حاوی محیط کشت افزوده شده و pH آن را برابر ۶/۵ تنظیم نموده. میزان میکروارگانیسم در تمام نمونه‌ها برابر ۲ mL است. همچنین دمای واکنش برابر ۴۰ °C تنظیم شده است. زمان انجام واکنش ۳ روز در نظر گرفته شده است. نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است. بیشترین میزان نهایی دانسیته محصول در شرایط ذکر شده از ۹۱۸/۲ kg/m<sup>3</sup> در حالت بدون مواد فعال سطحی به ۹۰۹/۶ kg/m<sup>3</sup> در حالت با مواد فعال سطحی کاهش می‌یابد و گوگرد کل نیز به ۹۴۰۰ ppm کاهش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد با افزایش میزان نفت کوره نمونه‌ها راندمان اثر میکروارگانیسم‌ها کاهش یافته که به علت‌های مختلف از جمله میزان مقاومت میکروارگانیسم در حضور هیدروکربن، نرخ انتقال جرم ترکیبات آلی بین فاز هیدروکربن و فاز آب، انتقال مؤثر اکسیژن بین دو فاز می‌توان اشاره نمود [۳۵]. اکسیژن یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر و مورد نیاز شکست پیوندهای درون مولکولی هیدروکربن‌ها توسط میکروارگانیسم است.

ولی پس از آن افزایش دما باعث از بین رفتن ساختار میکروارگانیسم و تخریب سلولی شده و فعالیت سلول به شدت کاهش می‌یابد. دمای بهینه رشد، بیانگر حالتی است که تمام و یا اغلب اجزای سلولی در بالاترین میزان سرعت فعالیت می‌کنند. معمولاً بهترین محدوده دما بین ۲۰ تا ۴۰ °C قرار دارد. دما همچنین بر روی خواص فیزیکی هیدروکربن‌ها اثرگذار می‌باشد. در دمای کم، ویسکوزیته هیدروکربن‌ها افزایش می‌یابد و در نتیجه حلالیت و پخش هیدروکربن‌ها در آب کمتر شده و هیدروکربن کمتری در تماس با میکروارگانیسم‌ها است، که باعث کاهش شروع حذف بیولوژیکی می‌شود. در نتیجه میزان هیدروکربن‌های متابولیز شده توسط میکروارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد. همچنین، اجزای سبک نفت که دارای فراریت کمتری هستند به مدت طولانی در محلول باقی‌مانده و بدلیل سمیت فعالیت میکروبی را کاهش می‌دهند. مراحل اولیه در شکست پیوندهای درون مولکولی هیدروکربن‌های نفتی از طریق اکسیداسیون صورت می‌گیرد و در نتیجه نیازمند به اکسیژن مولکولی است. از آنجا که دما میزان حلالیت اکسیژن و هوا را تغییر می‌دهد، به‌طور مستقیم بر روی شکست پیوندهای درون مولکولی هیدروکربن‌ها تأثیر می‌گذارد. سرعت‌های واکنش حذف و شکست مولکولی با کاهش دما کاهش می‌یابد [۳۵]. سودوموناس آیروژینوزا باسیل گرم منفی است و توانایی رشد درجه حرارت‌های بین ۵ تا ۴۲ °C را دارد. با توجه به نمودارهای پاسخ



شکل ۵ نتایج کاهش دانسیته و درصد کاهش گوگرد کل براساس میزان نفت کوره در دمای °C ۴۰، pH=۶/۵، مدت زمان سه روز و حجم میکروارگانیسم اضافه شده ۲ mL

گردید. نتایج به‌دست آمده در شکل ۶ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد با افزایش میزان میکروارگانیسم میزان کاهش دانسیته، افزایش بسیار کمی را نشان می‌دهد و کاهش گوگرد کل نیز تغییر اندکی (کمتر از سه درصد) دارد که می‌تواند به‌علت کمبود میزان مواد مغذی در نمونه جهت رشد میکروارگانیسم‌ها باشد. با توجه به نتایج حاصل شده بهترین شرایط در دمای °C ۴۰، pH=۶/۵، مدت زمان سه روز و میزان ۴ mL نفت کوره و حجم ۲ mL از میکروارگانیسم‌ها به‌دست می‌آید. در این شرایط، دانسیته برش به‌میزان ۰.۳۴٪ و گوگرد کل نیز به‌میزان ۰.۶۰٪ کاهش می‌یابند. بیشترین میزان نهایی دانسیته محصول در شرایط ذکر شده از  $9.07/8 \text{ kg/m}^3$  در حالت بدون مواد فعال سطحی به  $9.07/8 \text{ kg/m}^3$  در حالت با مواد فعال سطحی کاهش می‌یابد و گوگرد کل نیز به ۹۴۰۰ ppm کاهش می‌یابد.

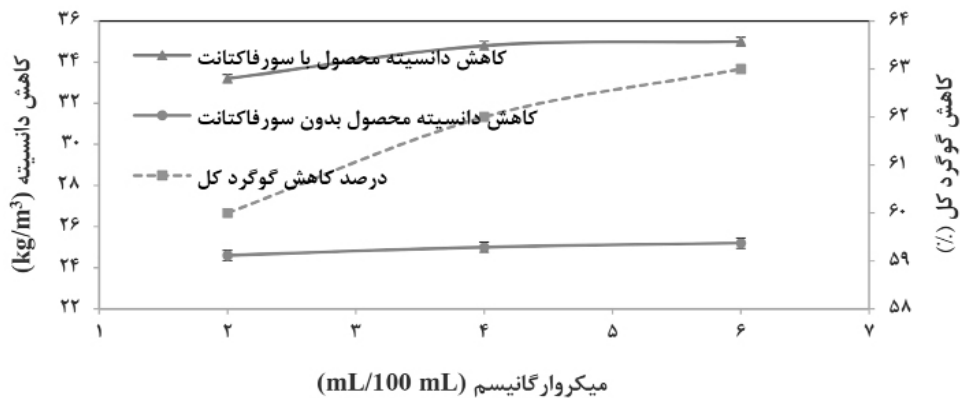
#### ترکیب برش نفت کوره

نتایج تست SARA برش اولیه نفت کوره و نمونه اصلاح شده در شرایط بهینه در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که از نتایج مشاهده می‌شود میزان ترکیبات آروماتیک کاهش و ترکیبات آلیفاتیک افزایش یافته‌اند. با کاهش درصد آروماتیک‌ها دانسیته کاهش می‌یابد. در حقیقت، شکستن پیوند کربن-گوگرد در مولکول‌های حلقوی غیرهمگن حاوی اتم‌های گوگرد موجب کاهش ویسکوزیته می‌گردد [۳۷ و ۳۸].

باکتری‌ها به منظور شروع حمله به هیدروکربن‌ها از اکسیژن در شرایط هوازی استفاده می‌کنند. با توجه به این که دانسیته هیدروکربن‌ها از آب کمتر است، در سطح مخلوط قرار گرفته و دسترسی میکروارگانیسم‌ها به اکسیژن کاهش می‌یابد. بنابراین، میزان تأثیر آنها بر ترکیبات نفتی کاهش می‌یابد. همچنین، افزودن هیدروکربن‌ها به محیط آبی باعث افزایش نسبت کربن به نیتروژن و یا نسبت کربن به مجموع فسفر و نیتروژن می‌گردد زیرا هیدروکربن‌ها دارای غلظت بسیار کم ترکیبات معدنی هستند و کمبود نیتروژن و فسفر عامل محدودکننده واکنش‌های شکست پیوند درون مولکولی می‌شود [۳۶]. وارد کردن مقادیر زیادی از منابع آلی کربن باعث ایجاد یک نقصان مواد مغذی غیرآلی سودمند شده و باعث محدود شدن مقدار کاهش بیولوژیکی می‌شود. همان‌گونه که از نتایج مشاهده می‌گردد با افزایش SDS و EDTA به محلول‌ها میزان کاهش دانسیته بیشتر می‌شود. افزایش میزان ترکیبات مذکور در غلظت‌های بالا نفت کوره تأثیر بیشتری دارد، زیرا این ترکیبات باعث افزایش دسترسی میکروارگانیسم‌ها به ترکیبات نفتی می‌گردد.

#### تأثیر جمعیت میکروبی

برای بررسی تأثیر میزان میکروارگانیسم بر کاهش دانسیته و کاهش گوگرد کل نمونه‌های نفت کوره از مقادیر مختلف میکروارگانیسم در زمان ۳ روز، pH=۶/۵، دمای °C ۴۰ و میزان ۴ mL نفت کوره استفاده



شکل ۶ وابستگی کاهش دانسیته و درصد گوگرد کل به میزان میکروارگانیزمها در محیط کشت در دمای  $40^{\circ}\text{C}$ ،  $\text{pH}=6/5$  مدت زمان سه روز و میزان ۴ mL نفت کوره

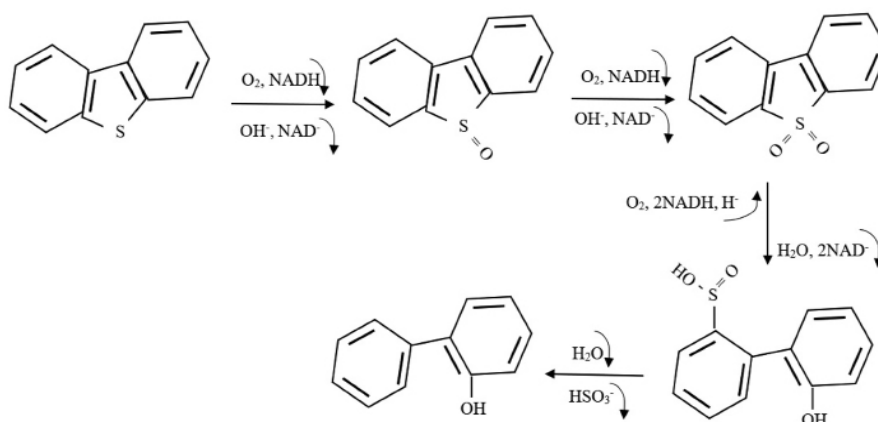
جدول ۱ نتایج تست SARA برش اولیه نفت کوره و نمونه اصلاح شده

نمونه اصلاح شده	نفت کوره اولیه		
۰/۹۰۹۶	۰/۹۴۲۸		دانسیته در $60^{\circ}\text{F}$ ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
<۰/۰۲۵	۰/۰۲۵		رسوبات و آب (درصد حجمی)
درصد تغییر	آنالیز SARA		ترکیبات
۱۰/۲۷	۷۵/۲۴	۶۸/۲۳	اشباع (وزنی %)
-۳۰/۶۶	۱۷/۴۸	۲۵/۲۱	آروماتیک (وزنی %)
-۵/۷۶	۴/۴۲	۴/۶۹	رزین (وزنی %)
-۱۶/۹۷	۱/۳۷	۱/۶۵	آسفالتین (وزنی %)
	۱/۴۹	۰/۱۸	دیگر ترکیبات (وزنی %)
ترکیبات فاز اشباع			
-۷۸/۵۵	۳۱/۹۶	۱۷/۹	پارافینها (وزنی %)
-۱۵/۱۴	۱۵/۲۹	۱۳/۲۸	ایزوپارافینها (وزنی %)
-۲۰۰	۱/۴۷	۰/۴۹	آروماتیکها (وزنی %)
-۱۲۸/۲۷	۴۱/۶۶	۱۸/۲۵	نفتنها (وزنی %)
۲۴/۳۱	۱۵/۶۶	۲۰/۶۹	اولفینها (وزنی %)
---	۰	۰	اکسیژنیتها (وزنی %)
۴۲/۶۶	۸/۸۳	۱۵/۴	نامشخص (وزنی %)
ترکیبات فاز آروماتیک			
---	۰	۰	پارافینها (وزنی %)
-۴۶۹/۰۳	۶/۴۳	۱/۱۳	ایزوپارافینها (وزنی %)
۷/۳۱	۸۰/۳۹	۸۶/۷۳	آروماتیکها (وزنی %)
۴۹/۱۴	۱/۱۸	۲/۳۲	نفتنها (وزنی %)
۱۱/۰۱	۱/۹۴	۲/۱۸	اولفینها (وزنی %)
---	۰	۰	اکسیژنیتها (وزنی %)
-۳۱/۶۸	۱۰/۰۶	۷/۶۴	نامشخص (وزنی %)

به‌عنوان کوفاکتور بر روی فعالیت گوگردزدائی رودوکوکوس و سودوموناس از طریق مسیر 4S توسط سوسا و همکاران مورد بررسی قرار گرفته است [۳۹] و [۴۰]. ایشان نشان دادند که سویه‌های رودوکوکوس و سودوموناس قادر به استفاده از ترکیبات مختلفی از جمله تیوفن‌ها، سولفیدها، دی‌سولفیدها، مرکاپتان‌ها، سولفواکسیدها و سولفون‌ها به‌عنوان منبع گوگرد هستند.

میکروارگانیسم‌ها همچنین قادر به حذف گوگرد موجود در زنجیره خطی بین بخش‌های آروماتیک بزرگ‌تر یا آلیفانیک بزرگ‌تر هستند [۴۱]. سودوموناس آئروژینوزا و رودوکوکوس اریتروپلیس دارای مکانیسم‌های هیدروکسیله کردن برای تجزیه ترکیبات آروماتیک به‌صورت ارتو می‌باشد. کاهش وزن مولکول از طریق تقسیم زنجیره‌های آلیفاتیک یا حلقه‌های آروماتیک از مولکول اصلی به‌خوبی در نتایج آزمایش مشاهده می‌گردد [۷]. مکانیسم‌های شکست حلقه ترکیبات آروماتیک به‌وسیله سودوموناس‌ها با دو روش ارتو و متا انجام می‌پذیرد [۳۴ و ۴۲] و استفاده از مخلوط باکتری موجب افزایش اصلاح برش نفتی و حذف انواع ترکیبات گوگرد موجود در برش می‌گردد.

مکانیسم مطرح 4S شامل چهار ترکیب واسطه گوگرد است. در این مکانیسم، اکسیداسیون گوگرد همراه با شکستن پیوند گوگرد-کربن به‌صورت متوالی صورت می‌گیرد و گوگرد بدون برهم زدن ساختار هیدروکربن از آن خارج می‌شود. این مسیر شامل چهار مرحله واکنش آنزیمی است که در شکل ۷ نشان داده شده است. آنزیم‌ها به قسمت حاوی گوگرد حمله کرده و به‌صورت انتخاب‌گر گوگرد را از هیدروکربن خارج می‌کند. واکنش کامل گوگردزدائی زیستی از هیدروکربن‌ها در مسیر 4S را می‌توان به سه مرحله تقسیم نمود: (۱) فعال‌سازی شکست حلقه حاوی گوگرد با اکسیداسیون گوگرد، (۲) تشکیل سولفونات آروماتیک ناشی از شکست حلقه حاوی گوگرد، و (۳) خارج‌سازی گروه سولفونات. ترکیبات آروماتیک حاوی گوگرد ابتدا توسط دو واکنش متوالی اکسید شده و تبدیل به فرم سولفون متناظر این ترکیبات شده و سپس این ترکیبات میانی هیدروکسیله شده و پیوند گوگرد-کربن شکسته می‌شود. در نتیجه اسید سولفونیک متناظر تشکیل می‌گردد و اتم گوگرد توسط یک واکنش هیدرولیز اسیدسازی شده تبدیل به محصول گوگردگیری شده می‌شود. اثر NADH



شکل ۷ مکانیسم 4S برای شکستن پیوند کربن-گوگرد در مولکول‌های حلقوی حاوی گوگرد [۳۹]

## نتیجه‌گیری

سی درصدی نفت کوره به نفت گاز مشاهده می‌گردد. همچنین، گوگرد کل به‌میزان بیش از ۶۰٪ کاهش یافته است. با توجه به اینکه در حال حاضر میزان تولید نفت کوره پالایشگاه حدود ۴۰٪ کل محصولات است و با توجه به قیمت‌های جهانی نفت کوره و نفت گاز تبدیل فوق از لحاظ اقتصادی بسیار مقرون به‌صرفه است. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک گزینه برای ارتقا برش‌های سنگین نفتی و تبدیل آنها به برش‌های سبک‌تر، با استفاده از مکانیزم شکست مولکول‌های سنگین به مولکول‌های کوچک‌تر و حذف اتم‌های غیرهمگن از آنها بدون کاهش ارزش حرارتی آنها مورد توجه قرار گیرد.

در این تحقیق، ارتقا برش نفت کوره با استفاده از میکروارگانیسم‌های سودوموناس آيروژینوس و رودوکوکوس اريتروپلیس و تأثیر پارامترهای عملیاتی بر این فرآیند مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به نتایج به‌دست آمده، بیشترین میزان کاهش دانسیته نفت کوره در دمای °C ۴۰، pH= ۶/۵، مدت زمان سه روز و حجم میکروارگانیسم اضافه شده ۲ mL، چهار درصد حجمی نفت کوره و با حضور SDS و EDTA حاصل گردیده است. میزان دانسیته در شرایط مذکور برابر با ۰/۹۰۹۶ kg/L است که با توجه به دانسیته نفت کوره پالایشگاه کرمانشاه ۰/۹۴۲۸ kg/L و دانسیته نفت گاز پالایشگاه مذکور که معادل ۰/۸۳۲ kg/L است، تبدیل حدود

## مراجع

- [1]. Speight J G (2013) Refining heavy oil and extra-heavy oil, in: Delmon B, Yates JT, and Centi G (Eds.), Heavy and Extra-Heavy Oil Upgrading Technologies, Elsevier, 164: 1–14.
- [2]. Kilbane J J (2006) Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels, Journal Current Opinion in Biotechnology, 17: 305–314.
- [3]. Ayala M, Vazquez-Duhalt R, Morales M, Le Borgne S, (2016) Application of microorganisms to the processing and upgrading of crude oil and fractions, In Lee S. (Eds.) Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, 1-36.
- [4]. Bachmann R, Johnson A, Edyvean R, (2014) Biotechnology in the petroleum industry: an overview, International biodeterioration and biodegradation, 86: 225–237.
- [5]. Chapman J, Ismail A E, Dinu C Z, (2018) Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks, Catalysts, 8, 6: Article 238. doi:10.3390/catal8060238.
- [6]. Wang W, Shao Z, (2013) Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation, Frontiers in Microbiology, 4: Article 116. doi:10.3389/fmicb.2013.00116.
- [7]. Van Hamme J D, Fedorak P M, Foght J M, Gray M R, Dettman H D, (2004) Use of a novel fluorinated organosulfur compound to isolate bacteria capable of carbon-sulfur bond cleavage, Applied and Environmental Microbiology, 70, 3:1487–1493.
- [8]. Mohammad M E S., Al-Yacoub Z H, Vedakumar J V (2015) Biocatalytic desulfurization of thiophenic compounds and crude oil by newly isolated bacteria, Frontiers in Microbiology, 6: Article 112.
- [9]. Bhatia S, Sharma D K (2012) Thermophilic desulfurization of dibenzothiophene and different petroleum oils by Klebsiella sp. 13T, Environmental Science and Pollution Research, 19: 3491–3497.
- [10]. Baldi F, Pepi M, Fava F, (2003) Growth of rhodosporidium toruloides strain DBVPG 6662 on dibenzothiophene crystals and rimulsion, Applied and Environmental Microbiology, 69, 8:4689-4696.
- [11]. Chen Sh, Sun Sh, Zhao Ch, Liu Q, Zang M, (2019) Biodesulfurization of model oil using growing cells of Gordonia sp. SC-10, Petroleum Science and Technology, 37, 8: 907-912.
- [12]. Ranson I, Rivas CM, (2002) Biodesulfurization of hydrocarbons, Patent U.S. 6808919 B2.
- [13]. Bhatia S, Sharma DK, (2010) Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain Pantoea agglomerans D23W3, Biochemical Engineering Journal, 50: 104-109.
- [14]. Tabatabaee MS, Mazaheri Assadi M, (2013) Vacuum distillation residue upgrading by an indigenous Bacillus cereus, Journal of Environmental Health Sciences and Engineering, 11: Article 18.
- [15]. Shahebrahimi Y, Fazlali A, Motamedi H, Kord S, Mohammadi AH, (2020) Effect of Various Isolated Microbial Consortiums on the Biodegradation Process of Precipitated Asphaltenes from Crude Oil, ACS Omega, 5, 7:3131–3143.



- [16]. Lavania M, Cheema S, Lal B (2015) Potential of viscosity reducing thermophilic anaerobic bacterial consortium TERIB#90 in upgrading heavy oil, *Fuel*, 144: 349–357.
- [17]. Ghollami M, Roayaei M, Ghavipanjeh F, Rasekh B (2013) Bioconversion of Heavy Hydrocarbon Cuts Containing High Amounts of Resins by Microbial Consortia, *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*, 4, 2: Article 139.
- [18]. Banoth S, Kaannoju B, Nunavath H, Branath C H, pasha Ch (2013) Biotransformation and biocracking of long chain fatty acids and Hydrocarbons, *Technology spectrum*, 6, 1: 83-89.
- [19]. Wentzel A, Ellingsen T E, Kotlar H-K, Zotchev SB, Throne-Holst M (2007) Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes, *Applied Microbiol Biotechnology*, 76: 1209–1221.
- [20]. Fariq A, Yasmin A (2020) Production, characterization and bioactivities of biosurfactants from newly isolated strictly halophilic bacteria, *Process Biochemistry*, 98: 1-10.
- [21]. Claus D (1992) A standardized gram staining procedure, *World J Microbiology Biotechnol*, 8: 451–452.
- [22]. Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J Molecular Biology*, 3: 208–218.
- [23]. ASTM D4124-09 (2018) Standard Test Method for Separation of Asphalt into Four Fractions, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [24]. ASTM D4294-16e1 (2016) Standard Test Method for Sulfur in Petroleum and Petroleum Products by Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [25]. Maass D, Todescato D, Moritz Vladimir Oliveira DEJ, Oliveira D, Ulson de Souza AA, Guelli Souza SMA, (2015) Desulfurization and denitrogenation of heavy gas oil by *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38: 1447–1453.
- [26]. Bouchez-Naitali M, Abbad-Andalousi S, Warzywoda M, Monot F (2004) Relation between bacterial strain resistance to solvents and biodesulfurization activity in organic medium, *Applied Microbiology and biotechnology*, 65, 4: 440-445.
- [27]. Amini F, Samadi N, Harande M, Naghdi M, Sharifan A (2009) Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* strains, *Iranian Journal of Nutrition Science Food Technology*, 4, 1: 33-38.
- [28]. Ismail W, Al-Rowaihi I S, Al-Humam A A, Hamza R Y, El-Nayal AM, Bououdina M (2013) Characterization of allopeptide biosurfactant produced by a crude oil-emulsifying *Bacillus* sp., *International biodeterioration & biodegradation*, 84: 168–178.
- [29]. Chong H, Li Q (2017) Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies, *Microbial Cell Factories*, 16: Article 137.
- [30]. Uchida Y, Misawa S, Nakahara T, Tabuchi T (2014) Factors Affecting the Production of Succinoyl Trehalose Lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 Grown on n-Alkanes, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 3: 765-769.
- [31]. Chen M L, Penfold J, Thomas R K, Smyth T J P, Perfumo A, Marchant R, Banat I M, Stevenson P, Parry A, Tucker I, Grillo I (2010) Mixing behavior of the biosurfactant, rhamnolipid, with a conventional anionic surfactant, Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate, *Langmuir*, 26, 23: 17958–17968.
- [32]. Nurfarahin A H, Mohamed M S, Phang L Y (2018) Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production—An Overview, *Molecules*, 23, 5: Article 1049.
- [33]. Pallcronic N J, Genus I (1984) *Pseudomonas mogula*, In: Krieg, N. R., Holt J. G., (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, I: 141-199.
- [34]. Collier L, Balows A, Sussman M, (1998) *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, Oxford University Press Inc., 245-1138.
- [35]. Abin-Fuentes A, Leung J, Mohamed M, Wang D, Prather K (2014) Rate-limiting step analysis of the microbial desulfurization of dibenzothiophene in a model oil system, *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 5: 876–84.
- [36]. Nurfarahin A H, Mohamed M S, Phang L Y (2018) Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production—An Overview, *Molecules*, 23, 5: 1049.
- [37]. Ma Y L, Lu W, Wan L L, Luo N (2015) Elucidation of fluoranthene degradative characteristics in a newly isolated *Achromobacter xylosoxidans* DN002, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 175: 1294-1305.
- [38]. Varjani S J (2017) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresource Technology*, 223: 277–286.
- [39]. Sousa J P M., Ferreira P, Neves R P P, Ramos M J, Fernandes P A (2020) The bacterial 4S pathway – an economical alternative for crude oil desulphurization that reduces CO<sub>2</sub> emissions, *Green Chemistry*, 22: 7604-7621.
- [40]. Martínez I, Santos V E, García-Ochoa F (2017) Metabolic kinetic model for dibenzothiophene desulfurization through 4S pathway using intracellular compound concentrations, *Biochemical Engineering Journal*, 117: 89-96.
- [41]. Pineda-Flores G, Boll-Arguello G, Lira-Galeana C, Mešta-Howard AM (2004) A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltene as a carbon and energy source, *Biodegradation*, 15, 3: 145–151.
- [42]. Lory S, Tai P C (1985) Biochemical and genetic aspects of *Pseudomonas aeruginosa* of *pseudomonas aeruginosa* virulence, Part of the Current Topics in Microbiology and Immunology book series, 118: 53-89.