# بررسی بازیافت نفت خام از یک مخزن ذخیره‌سازی نفت خام با استفاده از بیوسورفکتانت رامنولیپید

حسین امانی؛ دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

## چکیده

در صنعت نفت مقدار زیادی پسماندهای جامد و نیمه‌جامد تولید می‌شود که به‌عنوان لجن‌های نفتی شناخته می‌شوند. این لجن‌ها در مراحل مختلف تولید و پالایش نفت در پایین مخازن تولید، می‌شوند. تجمع پسماندهای نفتی در صنعت نفت مسئلهٔ محیطی جدی را به‌وجود می آورد. هدف از این تحقیق ارزیابی روند دیگری برای از بین بردن لجن‌های نفتی، با استفاده از بیوسورفکتانت‌ها است. یکی از مهم‌ترین خواص بیوسورفکتانت‌ها کاهش کشش سطحی و تشکیل امولسیون‌های نفت/آب است. در این پژوهش بیوسورفکتانت رامنولیپید از باکتری پسیودوموناس آئروژینوسا[1] PTCC۱۵۷۰ تولید شد و با توجه به شناسایی و اندازه‌گیری غلظت رامنولیپید با HPLC وTLC مشاهده شد تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی رشد، شروع و تا فاز سکون ادامه می‌یابد. طی بررسی تولید رامنولیپید، مشخص شد که حداکثر میزان رامنولیپید تولید شده در محیط کشت حاوی روغن آفتاب گردان به‌عنوان تنها منبع کربن برابر با g/l ۰/۵ است. در انتهای این تحقیق، آزمایش بازیابی نفت خام از یک مخزن شبیه‌سازی شده نفت خام با استفاده از رامنولیپید تولید شده در غلظت CMC انجام شد. نتایج نشان داد در حدود ۷۰ درصد نفت خام با استفاده از این روش بازیافت می‌شود.

## مقدمه

گروهی از میکروارگانیسم‌های موجود در طبیعت قادر به ترشح مواد برون سلولی هستند که از جملهٔ این مواد به ترکیبات فعال‌کنندهٔ سطحی یا بیوسورفاکتانت‌ها می‌توان اشاره کرد. اهمیت بیوسورفاکتانت‌های بیولوژیك در مقایسه با انواع سنتزی در این است که از نظر نوع و خصوصیت نسبت به انواع سنتزی گستردگی بیش‌تری را دارند و همچنین از طریق بیولوژیك هم قابل تجزیه است. بدین‌صورت با استفاده از آن‌ها دیگر مشکل عدم تجزیه سورفاکتانت‌های سنتزی و آلودگی محیط زیست را نخواهیم داشت. از طرف دیگر با استفاده از منابع اولیه ارزان قیمت مانند ضایعات کارخانه‌های صنایع غذایی برای باکتری‌ها، قیمت تمام شده یا به‌عبارت دیگر هزینه‌های تولید بیوسورفکتانت‌ها را می‌توان کم کرد [۱]، [۲]، [۳]، [۴]، [۵]. بیوسورفاکتانت‌ها بین دوفاز مختلف که قطبیت متفاوتی دارند مثل، نفت / آب، هوا/ آب و یا آب/سطح جامد جمع می‌شوند. از آن‌جا که مقدار کمی از نفت در آب حل می‌شود، به‌دلیل قرارگرفتن بیوسورفکتانت‌ها بین دوفاز باعث کاهش کشش بین سطحی

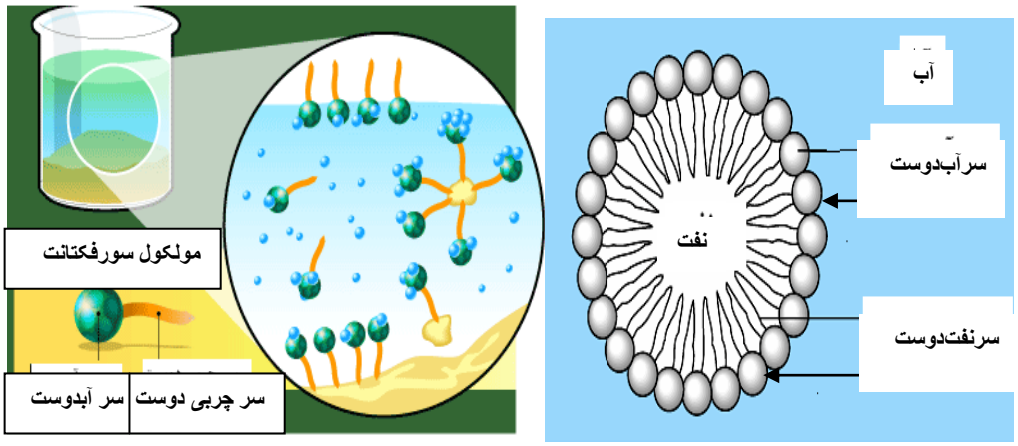
**واژه‌های کلیدی:** بیوسورفکتانت، رامنولیپید، امولسیون‌سازی، لجن‌های نفتی، تانک ذخیره
دریافت ۹۲/۵/۶ پذیرش ۹۲/۱۲/۱۲
**نویسنده مسئول** hamani@nit.ac.ir

[1]. *Pseudomonas aeruginosa*



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

نفت و آب شده و در نهایت امولسیون نفت در آب را تشکیل می‌دهد [۱]، [۲]. به‌همین دلیل لغت بیوامولسیفایر نیز اغلب برای توصیف بیوسورفکتانت‌ها به‌کار برده می‌شود. توانایی سورفکتانت‌ها در تمرکز میان سطوح از ویژگی‌های یک سر آب‌دوست و یک سر آب‌گریز[۱] آن‌ها گرفته می‌شود. این خاصیت بیوسورفکتانت‌ها باعث می‌شود که نفت خام از سطح سنگ یا فلز برداشته شده و در فاز آبی پراکنده شود [۱]، [ ۲] . به‌عنوان مثال در فرمولاسیون تمیز کننده‌ها، سورفکتانت‌ها را به‌کار می‌برند به‌طوری‌که چربی‌ها از سطوح برداشته شده و در فاز آبی پراکنده می‌شود. شکل ۱ نمایش ساده‌ای ازچگونگی حل شدن نفت (روغن) در آب را نشان می‌دهد.




**شکل ۱. نمایش ساده‌ای از چگونگی حل شدن چربی در آب**

در طول تولید و تصفیهٔ نفت خام، مقدار زیادی لجن‌های نفتی تولید می‌شود. این لجن‌ها آلاینده‌های محیطی هستند و در عین حال حجم مفیدی از مخزن ذخیره‌سازی را اشغال می‌کنند. لجن‌های نفتی و مواد زاید در تانک‌های نفتی رسوب، و مشکلاتی برای استخراج، انباشت، و انتقال نفت خام ایجاد می‌کنند. راه‌کارهای معمول رفع آلاینده‌های صنعت نفت کمبودهای زیادی دارد که از جمله به هزینهٔ زیاد و نیاز به تجهیزات خاص و کارکنان متخصص می‌توان اشاره کرد. دفن زمینی آلاینده‌ها نیز روندی طولانی است و می‌تواند منجر به آلودگی آب‌های زمینی شود. بنا بر این تانک‌های نفتی باید متناوباً به‌صورت مکانیکی تمیز شوند. این فرایند پرخطر، زمان بر و پر هزینه است [۶]، [۷]، [۸]، [۹]، [۱۰]. یکی از کاربردهای اصلی بیوسورفکتانت‌ها در صنایع نفتی است. از جمله این کاربردها می‌توان به پاک‌سازی تانک‌های ذخیره نفت خام، ازدیاد برداشت نفت از مخازن، تسهیل انتقال نفت در خطوط انتقال و کاربردهای زیست‌محیطی نظیر پاک‌سازی مناطق آلوده به نفت اشاره کرد. لجن‌های نفتی را با استفاده از بیوسورفکتانت‌ها و کاهش دادن ویسکوزیته و افزایش امولسیون‌سازی می‌توان از بین برد [۹]. این فرآیند، مکش لجن‌ها را تسهیل می‌بخشد زیرا امولسیون که اکنون ویسکوزیته کم‌تری دارد، راحت‌تر از قبل پمپ می‌شود. در فرایند صنعتی لجن‌زدایی، مخلوطی از بیوسورفکتانت، آب و نفت خام به داخل تانک تزریق می‌شود و آنقدر در داخل تانک به گردش در می‌آید که تمامی لجن‌ها تشکیل امولسیون دهند. فاز نفتی به خارج پمپ و به تانک‌های ذخیره کننده منتقل می‌شود و فاز آبی (بخش زاید) برای دفع شدن خارج می‌شود. شکل ۲ این مراحل را به‌صورت نمادین نشان می‌دهد.

۱. Amphipatic



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

**شکل ۲. مراحل پاک‌سازی مخازن ذخیره‌سازی نفت [۱۱] . الف) قبل از عملیات، نفت و پس‌ماندها در کف و روی دیوارهٔ مخزن ته‌نشین شده‌اند، ب) بیوسورفکتانت به‌صورت محلول به چرخش درمی‌آید و نفت خام به‌طور کامل امولسیون می‌شود، ج) در انتهای عملیات، امولسیون به‌صورت یک هیدروکربن شامل فاز بالایی و فاز آبی پائین‌تر جداسازی می‌شود، فاز آلی بازیابی می‌شود در حالی که فاز آبی پس از تخلیه در دستگاه‌های پالایش نفت مجدداً استفاده می‌شود**

امروزه استفاده از بیوسورفکتانت‌های برای پاک‌سازی لجن و رسوبات از مخازن نفتی مختلفی در دنیا گسترش فراوانی یهفته است. بیوسورفکتنت‌هایی که با باکتری‌هایی مانند *آسینتوباکتر*[۱] ، *باسیلوس سابتیلیس*[۲] و *سودومناس آرجینوزا*[۳] تولید می‌شوند، برای پاک‌سازی تانکرهای نفتی استفاده می‌شوند. بیوسورفکتانت امولسان از باکتری *آسینتوباکتر*، بیوسورفکتانت سورفکتین از باکتری *باسیلوس سابتیلس* و بیوسورفکتانت رامنولیپید از باکتری *سودومنای آرجینوزا* تولید می‌شوند [۲]، [۷]، [۹]، [۱۱]، [۱۲]، [۱۴].

گاتنیک[۴] و همکاران اولین گزارش مکتوب در مورد پاک‌سازی مخازن حمل و نقل و ذخیره‌سازی از طریق بیوامواسی‌فایرهای میکروبی را در سال ۱۹۸۱ پیشنهاد کردند [۱۳]. در سال ۱۹۹۱، بنت[۵] و همکاران [۱۴] به‌کارگیری بیوسورفکتانت‌ها برای پاک‌سازی مخازن ذخیره‌سازی نفت، را پیشنهاد کردند. کمپانی نفت کویت بیوسورفکتانت رامنولیپید را در عملیات پاک‌سازی استفاده کرد. بیوسورفکتانت رامنولیپید تولید شده به یک مخزن لجن نفتی، به‌همراه نفت خام تازه و آب افزوده شد و سپس به‌طور پیوسته به‌مدت ۵ روز در دمای محدود ۴۰-۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد گردانده شد. لجن نفتی به‌طور مؤثری از انتهای مخزن به سمت بالا حرکت کرد و به شکل امولسیون درآمد. این روش۹۱% از هیدروکربن‌های موجود در لجن را بازیابی کرد. این نتایج نشان می‌دهد که بیوسورفکتانت به‌دست آمده نه تنها از نظر درصد نفت پاک‌سازی شده با نمونه‌های شیمیایی به‌خوبی قادر به رقابت هستند، بلکه از نظر اقتصادی نیز در مقایسه با نمونه‌های شیمیایی کاملاً به‌صرفه و برترند. زیرا سورفاکتانت‌های شیمیایی با صرف هزینه‌های زیاد و عمدتاً از نفت خام که خود دارای ارزش اقتصادی است، به‌دست می‌آیند؛ حال آن‌که بیوسورفکتانت‌ها را به راحتی و حتی با استفاده از ضایعات صنایع دیگر به‌عنوان سوبسترای اولیه، می‌توان به‌دست آورد. از آن زمان، پژوهش‌ها و آزمایش‌های طولانی و دقیقی در طول سال‌ها انجام شد که نتیجه آن پیشرفت چشم‌گیر این روش در سال ۲۰۰۴، به‌وسیلهٔ شرکت ایتالیایی ایدرابل[۶] و کمپانی آمریکایی بیوسورفکتانت جنیل[۷] بود [۱۱] .

۱. Acinetobacter ۲. Bacillus subtilis ۳. Pseudomonas aeruginosa ۴. Gutnick ۵. Banat
۶. Idrabel Italia ۷. Jeneil



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

شرکت ایتالیایی با استفاده از بیوسورفکتانت‌ها در یک تانک $۶۵m^۳$ که $۹m^۳$ آن لجن نفتی بود در حدود ۹۰% لجن نفتی (معادل $۸ m^۳$) را از ته مخزن کاهش دادند. همچنین در تانکی $۱۶۰m^۳$ که $۵m^۳$ آن لجن نفتی بود در حدود ۹۴% لجن نفتی (معادل $۴/۷m^۳$) را از ته مخزن کاهش دادند [۱۱].

با توجه به موارد موفقیت‌آمیز مذکور و همچنین منابع نفتی فراوان کشور، به‌نظر می‌رسد انجام پژوهشی در زمینهٔ تولید بیوسورفکتانت‌ها و استفاده از آن‌ها برای پاک‌سازی مخازن ذخیرهٔ نفت خام یک نیاز ضروری است. در همین راستا، هدف از این تحقیق بررسی تولید رامنولیپید با باکتری پسیودوموناس آئروژینوسا PTCC۱۵۷۰ که جدا شده از مناطق آلودهٔ نفتی ایران است، به‌عنوان مدلی بومی به‌منظور پاک‌سازی مخازن نفتی است.

## مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی محیط کشت و رشد باکتری**

باکتری پسیودوموناس آئروژینوسا PTCC۱۵۷۰ از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران تهیه شد. *از محیط LB*[۱] (شامل *یست اکسترکت*[۲]*، تریپتون و NaCl* به‌ترتیب ۵ ، ۱۰ و ۱۰ گرم درلیتر) به‌عنوان پیش کشت برای تولید رامنولیپید استفاده شد. بعد از اتوکلاو کردن محیط پیش‌کشت ($۱۲۰^{\circ}C$ و به‌مدت ۲۰ دقیقه) و سرد شدهٔ آن، یک لوپ از باکتری به محیط پیش‌کشت اضافه شد و سپس در شیکرانکوباتور ($۳۷^{\circ}C$ و $۱۲۰rpm$) به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. برای تهیهٔ محیط کشت اصلی نیز [۱۵] ابتدا محلول A(g/l) شامل ۰/۰۵ $MgSO_۴ ,۷H_۲O$ ، $KCl$ ۰/۱، $NaNO_۳$ ۱/۵ و محلول B شامل روغن آفتاب‌گردان (g/l)۲۵۰ و محلول C(g/l) شامل $Na_۲HPO_۴ ,۲H_۲O$۱۱، $Na_۲H_۲PO_۴ ,۲H_۲ O$۲۳، به‌صورت جداگانه اتوکلاو می‌شوند و سپس محلول D(g/l) شامل $CoCl_۲ ,۵H_۲O$ ۱/۲، $CuSO_۴ ,۵H_۲O$ ۱/۲، $MnSO_۴ , H_۲O$ ۰/۸، $ZnSO_۴ ,H6_۲O$ ۱/۴، $FeCl_۳ , ۶H_۲O$ ۰/۲۸، Na-Citrat,$۲H_۲O$ ۲، به‌دلیل حساسیت به‌حرارت با فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی استریل می‌شود. در شرایط استریل محلول‌های A و C به‌نسبت مساوی با حجم‌های ۵۰ml با هم مخلوط شده و بعد از اضافه کردن ۲۵gروغن آفتاب‌گردان، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول D به آن افزوده می‌شود. ۵ میلی‌لیتر از باکتری رشده کرده در محیط کشت، LB (۵ درصد حجمی) به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید رامنولیپید موجود در ارلن ۱۰۰۰ سی‌سی در شرایط استریل اضافه شد و سپس در شیکرانکوباتور ($۳۷^{\circ}C$ و $۱۲۰rpm$) نمونه‌گیری‌ها در زمان‌های مختلف انجام شد. برای بررسی تکرارپذیری، تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

**اندازه‌گیری غلظت روغن آفتاب‌گردان**

تعیین مقدار غلظت روغن آفتاب‌گردان در محیط کشت به‌روش وزنی صورت گرفت. ۲ml فاز هگزان به ظروف از قبل وزن شده انتقال و پس از تبخیر هگزان، ظروف مورد نظر توزین شدند.

۱. LB-Medium ۲. *Yeast extract*



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

**اندازه‌گیری زیست توده(بیومس)**

به‌منظور جداسازی باکتری‌ها، کشت باکتری در دستگاه سانتریفوژ (مولتی‌فوژ هرئوس)[۱] درون لوله‌های مخصوص از قبل وزن شده، در ۱۲۰۸۶×g و ۴°C سانتریفوژ شد. سوپرناتانت برای انجام همهٔ آزمایش‌ها به‌منظور بررسی میزان تولید بیوسورفکتنت استفاده شد. رسوب باقی‌مانده یا زیست‌توده پس از سانتریفوژ، ۲ بار با آب نمک ۰/۹% شستشو داده شد. پس از آن زیست‌توده به‌مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۱۰۰°C خشك و سپس توزین شد [۱۵].

**استخراج، خالص‌سازی و تعیین غلظت رامنولیپید**

به ۱ml از نمونهٔ گرفته شده محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر ($H_3PO_4$) و ۱/۲۵ ml اتیل‌استات اضافه شد [۱۵]، [۱۶]. مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۸۶×g در۴°C سانتریفیوژ شده و سپس فاز آلی آن جدا شد. برای اطمینان بیش‌تر از جداسازی، یک بار دیگر فاز آبی با ۱/۲۵ ml اتیل‌استات استخراج شد. بعد از تبخیر اتیل‌استات در دمای ۵۰°C و ۲۰۰۰ rpm درون یک تبخیر کننده، رامنولیپید زرد رنگ ظاهر شد. خالص‌سازی بیش‌تر با استفاده از TLC[۲] یا کروماتوگرافی لایهٔ نازک (پلیت‌های[۳] ۶۰F۲۵۴ ۲۵%) انجام شد. در این روش فاز متحرک شامل کلروفرم: متانل:استیک اسید (۶۵:۱۵:۲) است که این فاز متحرک باعث جدایی ۴ نوع رامنولیپید می‌شود. بعد از این مرحله کاغذ را درون محلول اسید سولفوریک:اسیتیک اسید (۱:۵۰) آغشته کرده وبعد از خشک شدن از آن عکس گرفته شد. از استاندارد جنیل (سوک‌کویل، امریکا)[۴] به‌عنوان شاهد استفاده شد [ ۱۵]. استاندارد جنیل شامل رامنولیپیدهای ۱و۲ و ۳ و ۴ است که با پسیودوموناس آئروژینوسا تولید می‌شود. برای تعیین غلظت رامنولیپید از دستگاه HPLC[۵] (اجیلنت سری ۱۱۰۰)[۶] استفاده شد. ستون استفاده شده در دستگاه C۱۸ با قطر ۵ میکرومتر و دبی تزریق ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه است. برای اندازه‌گیری غلظت رامنولیپید، ابتدا باید دستگاه HPLC را آماده کرد. برای این منظور ابتدا محلول A (۴۰ میلی‌مولار ۴- بروم فناکیل برمید در استونیتریل[۷]) ، محلول B (۲۰ میلی‌مولار ۳ –اتیل‌آمونیوم در استونیتریل[۸]) و محلول C ( مخلوط کردن محلول A وB به‌نسبت مساوی) تهیه شد. در مرحلهٔ بعد به نمونه‌های رامنولیپید که از قبل استخراج و در ۳۶۰ میکرولیتر استونیتریل حل شده‌اند، ۴۰ میکرولیتر از محلول C اضافه می‌شود. هم‌چنین از محلول ۹۵% آب مقطر و ۵% متانل به‌عنوان فاز متحرک در دستگاه استفاده می‌شود.

**تعیین کشش سطحی و غلظت بحرانی تشکیل میسل[۹] (CMC)**

یکی از مهم‌ترین ویژگی ترکیبات فعال سطحی که در صنعت بررسی می‌شوند، قابلیت کاهش کشش سطحی است. این روش بر اساس تعیین نیروی لازم برای کشیدن حلقهٔ سیمی- پلاتینی از حد فاصل سیال مایع- هوا و یا

۱. Multifuge1S-R,Heraeus ۲. Thin Layer Chromatography ۳. plates ۴. United States, Saukkville
۵. High Performance Liquid Chromatography ۶. Agilent 1100 Series
۷. 4-Bromphenacylbromid (C6H6Br2O) in Acetonitril ۸. Triethylammonium (C5H15N) in Acetonitril
۹. Critical Micelle Concentration



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

حد فاصل دو سیال استوار است. کاربرد گستردهٔ این روش به‌دلیل دقت وسهولت استفاده است و این واقعیت که این شاخص نسبتاً سریع اندازه‌گیری می‌شود. سنجش کشش سطحی نمونه‌ها با دستگاه تنسیومتر[۱] به‌روش دونوی رینگ[۲] اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل (CMC) کشش‌سطحی سوپرناتانت در غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. غلظت بحرانی تشکیل میسل‌ها به غلظتی از سورفکتانت گفته می‌شود که در بیش‌تر از این مقدار میسل‌ها به‌طور مرتب تشکیل می‌شوند. قبل از رسیدن به‌میزان CMC کشش سطحی با غلظت سورفکتانت به‌مقدار زیادی کاهش می‌یابد. بعد از رسیدن به CMC کاهش کشش سطحی دیگر دیده نمی‌شود. هرچه این غلظت کم‌تر باشد آن بیوسورفکتنت کاراتر است. برای تعیین CMC کشش سطحی سوپرناتانت در غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد [۲]، [۱۷].

**تعیین قدرت کنار زنی نفت خام از روی آب[۳]**

ابتدا۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون پلیت ریخته می‌ریزیم سپس ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام (سکوی سلمان، چاه ۱۶و۳۴ =API) به آن افزوده می‌شود. بعد از مدت ۱ تا ۲ دقیقه که لایهٔ یک‌نواختی بر سطح آب تشکیل شد، ۱۰ میکرولیتر از رامنولیپید را در غلظت CMC به‌آن افزوده و قطر ناحیهٔ شفاف ایجاد شده در سطح لایهٔ نفتی را در مقایسه با شاهد (حجم یک‌سانی آب مقطر) بررسی می‌کنیم [۱۸]، [۱۹] . این آزمایش نشان‌دهندهٔ قوی و کارا بودن بیوسورفکتنت تولیدی است.

**تعیین شاخص امولسیون سازی[۴] نفت خام ($E_{۲۴}$)**

برای بررسی توانایی امولسیون‌سازی، ابتدا چهار میلی‌لیتر از محلول بیوسورفکتانت تولید شده در غلظت CMC به لولهٔ مدرج حـــاوی چهار میلی‌لیتر از نفت خام افزوده می‌شود سپس این لوله به‌مدت سه دقیقه به‌شدت مخلوط شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت مقدار $E_{۲۴}$، از تقسیم ارتفاع ناحیهٔ امولسیون شده شده بر ارتفاع کل دو سیال محاسبه می‌شود [۲]، [۵]. همچنین میزان پایداری حالت تعلیق اندازه‌گیری می‌شود. این پایداری هرچه بیش‌تر باشد بهتر است. در این تحقیق برای بررسی میزان پایداری مجدداً بعد از ۱۵ روز فاکتور $E_{۲۴}$ اندازه‌گیری شد. برای کنترل آزمایش‌ها، محیط کشت بدون میکرواورگانیسم به نفت خام فوق به‌عنوان محلول شاهد اضافه شد.

**تانکر شبیه‌سازی شده برای بررسی قدرت پاک‌کنندگی بیوسورفکتانت تولید شده**

برای بررسی تأثیر بیوسورفکتانت در پاک‌سازی نفت‌خام از تانک‌های ذخیره، لیوانی فلزی با قطر ۲۰cm و ارتفاع ۳۰ cm به‌طور کامل به نفت خام (سکوی سلمان، چاه ۱۶و۳۴ =API) آغشته می‌شود یا به‌عبارت دیگر شبیه‌سازی آزمایشگاهی می‌شود. سپس تانکر شبیه‌سازی شده به‌مدت ۱۰ ساعت برگردانده می‌شود تا هر مقدار که امکان دارد نفت خام آن به‌طور طبیعی تخلیه شود. بعد از این مدت، وزن لیوان به‌همراه نفت خام چسبیده به آن اندازه‌گیری می‌شود. از آن‌جاکه در کاربردهای صنعتی بیوسورفکتانت‌ها را معمولاً با استفاده از پمپ‌ها با سرعت

۱. kruss k10T ۲. Du Nouy Ring Method ۳. Oil Spreading ۴. Emulsion index



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

زیاد در مخزن می‌چرخانند بنا بر این در این تحقیق تانکر شبیه‌سازی شده را درون یک شیکر قرار می‌دهیم. در مرحلهٔ بعدی آزمایش، ابتدا مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول رامنولیپید با غلظت CMC به تانکر اضافه می‌کنیم سپس تانکر را درون یک شیکرانکوباتور (۲۵°C و ۵۰ rpm) به‌مدت ۲۴ ساعت قرار می‌دهیم. پس از این مدت، مواد درون تانکر را تخلیه و تانکر و محتویات آن را دو باره وزن می‌کنیم. اختلاف وزن اولیه و ثانویه تانکر برابر مقدار نفت خامی است که با بیوسورفکتانت تولیدی از تانکر خارج یا پاک‌سازی شده است.

## نتایج و بحث

### منحنی رشد و تأیید تولید رامنولیپید با کروماتوگرافی لایهٔ نازک (TLC )

پس از قرار دادن ارلن‌های حاوی محیط کشت و باکتری‌ها در شیکرانکوباتور، مقادیر رامنولیپید، روغن آفتاب‌گردان و زیست‌توده در زمان‌های مختلف رشد باکتری اندازه‌گیری شدند. روند تولید زیست‌توده، تولید بیوسورفکتانت و مصرف روغن در طی رشد باکتری در شکل ۳ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد حداکثر مقدار تولید رامنولیپید و زیست‌توده به‌ترتیب به مقدار ۰/۵ g/l و ۴ g/l رسید. همچنین این شکل نشان می‌دهد باکتری در چهار روز اول از رشد کمی برخوردار است و بعد از روز چهارم وارد فاز لگاریتمی رشد می‌شود. از این مشاهدات می‌توان نتیجه گرفت رشد باکتری در منحنی رشد خود تأخیر فاز دارد. همچنین این شکل نشان می‌دهد تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی رشد شروع شده و تا فاز سکون ادامه می‌یابد. این نتیجه با نتایج ذکر شده به‌وسیلهٔ دیگر محققان مانند مولر و همکارانش[۱] [ ۱۶]، هورمان و همکارانش[۲] [ ۱۷] و سیلدات[۳] و همکارانش سازگار است [۲۰]. این نتایج نشان‌دهندهٔ هماهنگ بودن نتایج حاصل از این تحقیق با پژوهش‌های محققان دیگر است. برای بررسی تکرارپذیری همهٔ آزمایش‌ها در ۶ ارلن به‌طور همزمان و در شرایط یک‌سان انجام شد. شکل ۴ ارلن‌های حاوی محیط کشت را پس از ۱۴۴ ساعت نشان می‌دهد. در این شکل دیده می‌شود که در حین تولید رامنولیپید کف نیز تولید می‌شود که از مشخصه‌های تولید بیوسورفکتانت‌ها است.

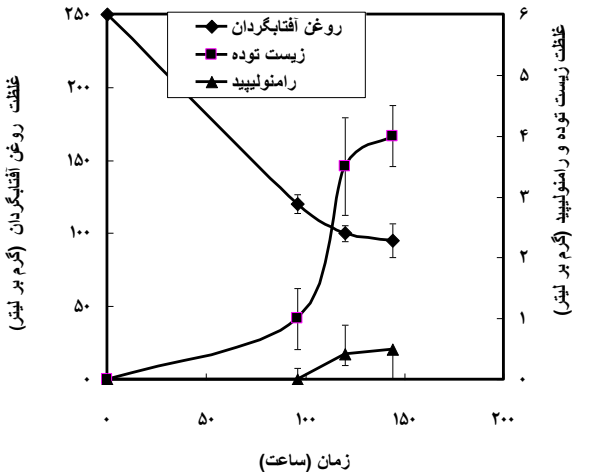
همچنین برای اثبات تولید رامنولیپید، آزمایش کروماتوگرافی لایهٔ نازک (TLC) انجام گرفت. از شاهد و استاندارد جنیل برای تشخیص رامنولیپید استفاده شد. استاندار جنیل دارای چهار نوع رامنولیپید مختلف شناخته شده است که با باکتری‌های سودوموناس آرجینوزا تولید می‌شوند [۲]، [۱۵]، [۱۶]، [۲۰]. نوع رامنولیپیدها بستگی به اتصال یک یا دو ملکول رامنوز به یک یا دوملکول بتایدروکسی کربوکسیلیک اسید دارد [۱۵]، [۱۶]، [۲۰]. نتایج آزمایش TLC در شکل ۵ نشان داده شده است. چنان‌که در شکل ۵ دیده می‌شود باکتری پسیودوموناس آئروژینوسا PTCC۱۵۷۰ توانسته است رامنولیپید نوع۱ و۳ را تولید کند. همچنین از این شکل مشخص است که در چهار روز اول اصلاً رامنولیپید تولید نشده است زیرا هیچ‌گونه رنگی در کاغذ TLC ظاهر نشده است. نتایج آزمایش TLC در تأیید شکل ۳ است و بیان‌گر صحیح بودن نتایج این تحقیق است. بنا بر این می‌توان نتیجه گرفت

۱. Müller et al. ۲. Hörmann et al. ۳. Syldatk et al.



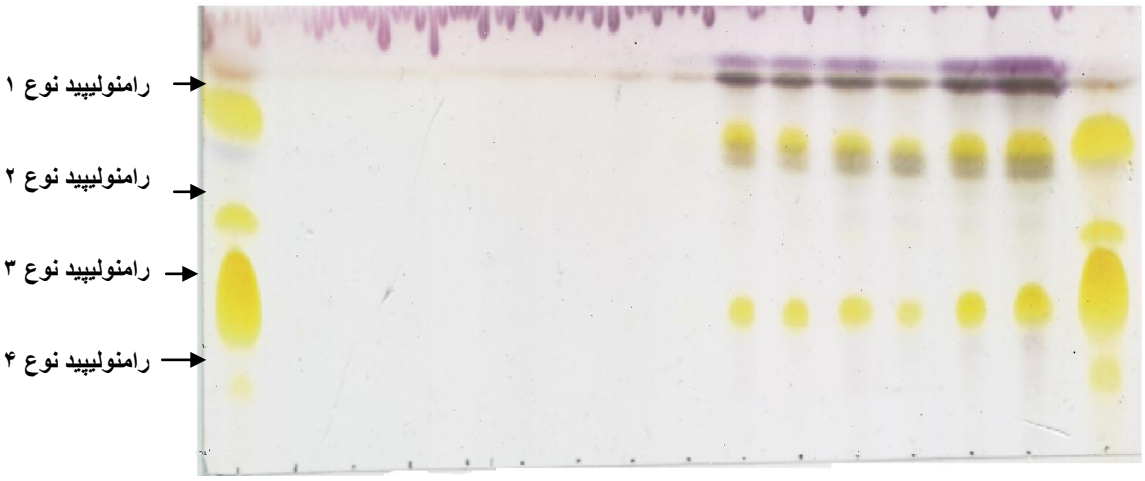
[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی رشد شروع و تا فاز سکون ادامه می‌یابد یا به‌عبارت دیگر تولید رامنولیپید وابسته به‌رشد باکتری نیست. این نتیجه با نمونه‌های ذکر شده به‌وسیلهٔ محققان دیگر سازگار است [۱۵]، [۱۶]، [۲۰]. شکل ۶ رامنولیپید خالص جمع‌آوری شده را که به‌صورت مایع زرد رنگ است درون یک بالن نشان می‌دهد.




**شکل ۳. منحنی رشد باکتری، مصرف روغن آفتابگردان و تولید رامنولیپید**

**شکل ۴. تولید رامنولیپید درون ارلن‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتری در یک شیکرانکوباتور (۳۷°C و ۱۲۰ rpm) در حین تولید رامنولیپید کف تولید می‌شود.**




**شکل ۵. نتایج کروماتوگرافی لایهٔ نازک برای رامنولیپید تولید شده در هر روز آزمایش دو بار تکرار شده است. چهار لکه سمت چپ و راست تصویر به‌عنوان شاهد از استاندارد جنیل به‌دست آمده است.**



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

**شکل ۶. نمونه‌ای از رامنولیپید تولید شده از این تحقیق**

**نتیجهٔ اندازه‌گیری کشش سطحی**

کاهش در اندازهٔ کشش سطحی محیط کشت نشان‌دهندهٔ تولید مواد دارای فعالیت سطحی با کشت‌های باکتریایی است. غلظت CMC رامنولیپید تولید برابر ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتربا استفاده از دستگاه اندازه‌گیری کشش سطحی به‌دست آمد. همچنین رامنولیپید تولید شده از این تحقیق توانست کشش سطحی آب را mN/m ۶۹ به mN/m ۲۶ در غلظت CMC برساند. براساس نتایج حاصل از پژوهش‌های قبلی بر روی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت، هر باکتری که قادر به کم‌کردن کشش سطحی تا مقادیر کم‌تر از ۴۰mN/m باشد می‌تواند به‌عنوان يك سويه مناسب برای تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شود. بنا بر این باکتری بومی ما و رامنولیپید حاصل از این تحقیق، قادر به کم کردن کشش سطحی تا مقادیر کم‌تر از mN/m ۴۰ است و می‌تواند کاندیدای مناسبی برای پژوهش‌های بعدی درنظر گرفته شوند. سویه‌های مولد رامنولیپید که محققان دیگر جداسازی کرده‌اند، کشش سطحی محیط رشد را از mN/m ۶۹ تا mN/m ۳۰-۲۵ کاهش دادند. بنا بر این نتایج به‌دست آمده از این تحقیق قابل مقایسه با نتایج تحقیقات قبلی است [۲]، [۱۷]، [ ۱۸]. این نتایج نشان‌دهندهٔ این موضوع است که کارایی رامنولیپید تولید شده از یک باکتری بومی ایرانی در حد و اندازه‌های نمونه خارجی خود است.

**بررسی قدرت بیوسورفکتانت تولیدی به‌روش اویل اسپریدینگ[۱]**

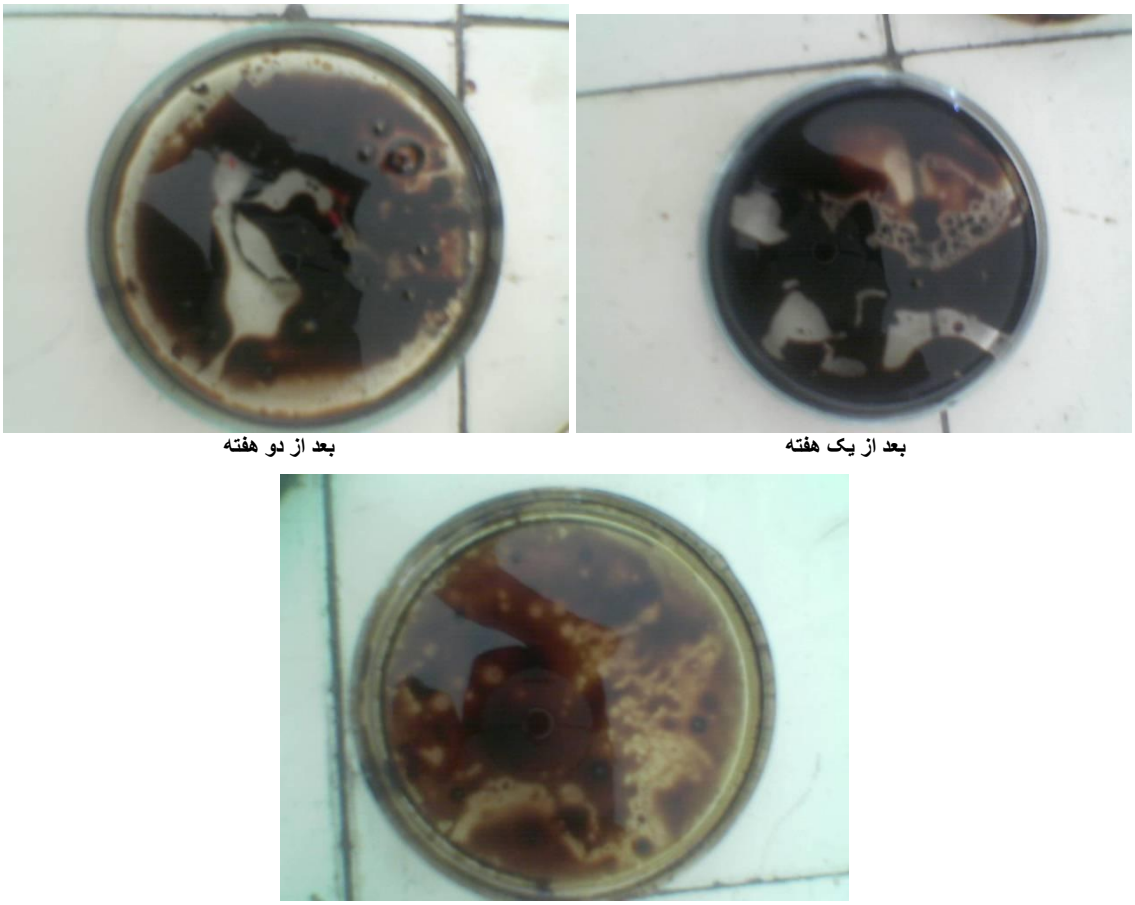
روش اویل اسپریدینگ به‌علت نیاز به حجم کم نمونه‌ها، سادگی و سرعت انجام و عدم نیاز به تجهیزات ویژه و پیچیده به‌صورت گسترده در تعیین قدرت و کارایی بیوسورفکتانت استفاده می‌شود. در این روش چنان‌که گفته شد ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام بر روی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده می‌شود و سپس ۱۰ میکرولیتر از رامنولیپید

۱. Oil Spreading



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

تولید شده در غلظت CMC به آن افزوده می‌شود و قطر ناحیهٔ شفاف ایجاد شده در سطح لکهٔ نفتی بررسی می‌شود. در این آزمایش مشاهده شد پس از اضافه شدن رامنولیپید تولید شده، نفت خام شروع به کنار رفتن از روی آب می‌کند و ناحیهٔ شفافی که به‌دلیل وجود آب زیر نفت است، ظاهر می‌شود. شکل ۷ ظرف آزمایش را بعد از ۷، ۱۴ و ۳۰ روز پس از شروع آزمایش نشان می‌دهد. چنان‌که در این شکل دیده می‌شود نفت خامی که در ابتدا به‌صورت فاز پیوسته و سیاه رنگ بود از هم گسیخته شده و ناحیهٔ شفاف زیر آن کاملاً قابل مشاهده است. این نتایج نشان‌دهندهٔ قدرتزیاد و مؤثر بودن رامنولیپید تولید شده در بلندمدت نیز است. بنا بر این می‌توان گفت رامنولیپید تولید شده دارای توانایی خوبی برای کنار زدن نفت خام از روی آب است و می‌تواند در کاربردهای صنعتی به‌کار گرفته شود. علت این پدیده را می‌توان به‌خواص بیوسورفکتانت‌ها ربط داد. این خاصیت ناشی از تمایل بیوسورفکتانت‌ها به قرار گرفتن بین دو فاز آب و نفت است. بیوسورفکتانت‌ها به‌علت این‌که یک سر قطبی و یک سر غیر قطبی دارد مانند پلی بین دو فاز عمل می‌کنند [۱]، [۲]، [۱۸]، [۱۹].



بعد از یک هفته

بعد از دو هفته

بعد از یک ماه

**شکل ۷. ایجاد لایهٔ نفتی بر روی سطح آب و تشکیل ناحیهٔ شفاف در سطح لایهٔ نفتی پس از افزودن رامنولیپید تولید شده با غلظت CMC**



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

**بررسی قابلیت امولسیون‌کنندگی بیوسورفکتانت تولید شده به‌روش $E_{24}$**

توانایی امولسیون‌کنندگی معیاری برای نشان دادن توانایی بیوسورفکتانت در امولسیون کردن هیدروکربن‌های مختلف است. در این تحقیق قابلیت امولسیون‌کنندگی در حضور نفت خام بررسی شد. معیار امولسیون‌کنندگی حفظ حداقل ۵۰% حجم امولسیون اولیه، ۲۴ ساعت پس از تشکیل است [۲]. یکی از فاکتورهای بسیار مهم در فرآیندهای صنعتی تعیین میزان پایداری حالت تعلیق است و این پایداری هر چه بیش‌تر باشد بهتر است. در این آزمایش شاخص تعلیق پس از ۲۴ ساعت و همچنین ۱۵ روز بعد از آن برای مادهٔ تولیدی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد بیوسورفکتانت این گونه باکتری، توانایی امولسیون کردن نفت خام تا ۸۰% را دارد و پایداری این حالت امولسیون تا ۱۵ روز پس از آزمایش باقی می‌ماند که نتایج خوبی است. این نتایج نشان می‌دهد که بیوسورفکتنت تولید شده با این باکتری می‌تواند پتانسیل خوبی برای پاک‌سازی نفت خام از تانکرها داشته باشد.

**بررسی پاک‌سازی نفت خام از تانکر شبیه‌سازی شده با رامنولیپید تولید شده**

برای این کار از محلول رامنولیپید با غلظت CMC برای آزمایش قدرت نفت‌زدایی آن، در یك تانکر شبیه‌سازی استفاده شد. به‌این منظور ابتدا ۵۰ ml محلول رامنولیپید با غلظت CMC به تانکر مورد نظر ریخته شده و سپس تانکر درون یک شیکرانکوباتور به‌مدت ۲۴ ساعت در $25^{\circ}C$ و ۵۰ rpm قرار گرفت. پس از خارج کردن محلول درون تانکر مشاهده شد کف و قسمت‌های پایینی دیوار جانبی تانکر که در تماس بیش‌تری با محلول بیوسورفکتانت بوده است به‌طور کامل از نفت خام پاک شده است. چنان‌که در شکل ۸ دیده می‌شود انتهای ظرف و نیمی از دیوارهٔ جانبی به‌طور کامل تمیز و براق شده است. می‌توان گفت نیمهٔ بالایی لیوان که خوب تمیز نشده است به‌دلیل این است که نفت خام چسبیده به قسمت‌های بالایی تانکر در اثر چرخش لیوان به خوبی قسمت پایینی با بیوسورفکتانت تماس پیدا نکرده است. نتایج محاسبات در جدول ۱ آورده شده است.

**جدول ۱. بازیافت نهایی نفت خام پس از استفاده از رامنولیپید تولید شده از این تحقیق**

| وزن لیوان فلزی خالی (گرم) | وزن لیوان بعد از آغشته شدن به نفت خام | وزن لیوان بعد از پاک سازی نفت خام توسط بیوسورفکتانت تولیدی | مقدار نفت پاک شده | درصد پاک شوندگی نفت خام توسط بیوسورفکتانت تولید شده |
|---|---|---|---|---|
| ۳۵۰ | ۳۷۰ | ۳۵۶ | ۱۴ | %۷۰ |

اگر بتوان طوری لیوان را چرخاند که کل دیواره جانبی آن در تماس با بیوسورفکتانت قرار بگیرد با اطمینان زیاد می‌توان گفت درصد پاک‌سازی نفت خام بیش‌تر از ۷۰% نیز می‌شود. مقایسهٔ نتایج تحقیق حاضر با با تحقیقات شرکت یدرابل ایتالیا[۱] حاکی از این است که کارایی رامنولیپید تولید شده از یک باکتری بومی ایرانی در حد و اندازه‌های نمونهٔ خارجی‌اش است. شرکت ایتالیایی با استفاده از بیوسورفکتانت‌ها در یک تانک $65m^3$ که $9m^3$ آن لجن نفتی بود در حدود ۹۰% لجن نفتی ($8m^3$) را کاهش دادند. همچنین در آزمایش دیگری در یک تانک $160m^3$ که $5m^3$ آن لجن نفتی بود در حدود ۹۴% لجن نفتی ($4/7m^3$) را کاهش دادند [۱۱]. از مشکلات استفاده از بیوسورفکتانت‌ها هزینهٔ زیاد تولید آن‌هاست اما باید به این توجه کرد که بیوسورفاکتانت‌ها را می‌توان

۱. Idrabel Italia



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

به‌راحتی و حتی با استفاده از پساب و ضایعات صنایع دیگر مانند صنایع قند و لبنیات به‌عنوان مادهٔ غذایی باکتری، به‌دست آورد. هم‌چنین لازم به ذکر است در استفاده‌های صنعتی مانند صنعت نفت، احتیاجی به تصفیه و خاص‌سازی رامنولیپید نیست و می‌توان رامنولیپید را بدون تصفیه کردن استفاده کرد. بنا بر این استفاده از بیوسورفکتانت‌ها توجیه اقتصادی نیز خواهد داشت.

نتایج این پژوهش نشان داد رامنولیپید تولیدشده با میکروارگانیسم بومی مانند پسیودوموناس آئروژینوسا PTCC۱۵۷۰ می‌تواند گزینهٔ خوبی برای حذف باقی‌مانده‌های نفتی در لوله‌های نفت یا تانک‌های نفتی باشد. فرایند مشابه این آزمایش می‌تواند برای پاک‌سازی هر تانک یا لوله آلوده به نفت و پاک‌سازی باقی‌مانده‌های هیدروکربنی استفاده شود.

**شکل ۸. عکس تانکر شبیه‌سازی شده (لیوان آهنی مخروطی ) آغشته به نفت پس از اضافه شدن محلول رامنولیپید تولید شده با غلظت CMC . تمیز شدن کف و دیوارهٔ جانبی ظرف کاملاً قابل مشاهده است**

## نتیجه‌گیری

در این تحقیق، از باکتری پسیودوموناس آئروژینوسا PTCC ۱۵۷۰ برای تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید استفاده شد تا پاک‌سازی نفت‌خام از مخازن ذخیره بررسی شود. در این پژوهش، تولید رامنولیپید با آنالیزهای TLC و HPLC اثبات شد. با توجه به شناسایی و اندازه‌گیری غلظت رامنولیپید با HPLC و TLC مشاهده شد تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی رشد شروع و تا فاز سکون ادامه می‌یابد. حداکثر مقدار تولید رامنولیپید به ۰/۵g/l رسید. رامنولیپید تولید شده توانست کشش سطحی آب را از ۶۹mN/m به ۲۶mN/m کاهش دهد و هم‌چنین نفت خام سکوی سلمان (API=۳۴) را تا ۸۰% امولسیون کند که نتایج نسبتاً خوبی است. در انتهای این تحقیق، آزمایش بازیابی نفت خام از یک مخزن شبیه‌سازی شده نفت خام با استفاده از رامنولیپید تولید شده در غلظت CMC انجام شد. نتایج نشان داد در حدود ۷۰% نفت خام با استفاده از این روش بازیافت می‌شود. بنا بر این، این نتایج نشان‌گر پتانسیل خوب پسیودوموناس آئروژینوسا PTCC ۱۵۷۰ برای تولید رامنولیپید و هم‌چنین



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

مؤثر بودن تکنیک استفاده شده برای پاک‌سازی مخازن نفت خام به‌عنوان مدلی بومی است. با توجه به موارد موفقیت‌آمیز ذکر شده و همچنین منابع نفتی فراوان کشور، به‌نظر می‌رسد انجام تحقیق در زمینهٔ تولید بیوسورفکتانت‌ها و استفاده از آن‌ها برای پاک‌سازی مخازن ذخیره نیازی ضروری است. به‌هر حال باید به این نکته توجه داشت که فناوری تولید بیوسورفکتانت‌ها و کاربرد آن‌ها در صنایع و به‌ویژه صنعت نفت، نیاز امروز و فرداست.

## منابع


1. R. Sen, "Biotechnology in petroleum recovery" The microbial EOR, Progress in Energy and Combustion Science, 34 (2008) 714-724.

۲. حسین امانی، *بررسی فرایند ازدیاد برداشت میکروبی نفت با بیوسورفکتنت‌ها*، پایان نامهٔ دکتری، دانشکده فنی دانشگاه تهران ( ۱۳۸۹).

۳. رضا رمضانی، مهناز مظاهری اسدی، مهرداد آذین، *تولید رامنولیپید توسط باکتری سودوموناس ائروجینوزا از ملاس چغندر قند تیمار شده*، نشریهٔ علوم دانشگاه تربیت معلم، جلد ۹، شمارهٔ ۳ (۱۳۹۰) ۵۲۴-۵۱۱.

٤. فاطمه ربیعی، مهناز مظاهری اسدی، مهرداد آذین، *تولید رامنولیپید با سودوموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی آب پنیر تیمار شده*، نشریهٔ علوم دانشگاه تربیت معلم، جلد ۸، شمارهٔ ۴ (۱۳۸۷) ۳۱۸-۳۰۳.

5. K. V. Pathak, H. Keharia, "Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (Ficus benghalensis) in microbially enhanced Oil recovery (MEOR)", Biotech., DOI 10.1007/s13205-013-0119-3

6. I. Lazar, S. Dobrota, A. Voicu, M. Stefanescu, L. Sandulescu, "Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields", J. Pet. Sci. Eng., 22 (1999) 151-160.

7. P. Yan, M. Luc, Q. Yang, H. Zhang, Z. Zhang, R. Chen, "Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*", Bioresource Technology, 116 (2012) 24-28.

8. A. P. Kuriakose, B. M. S. Kochu, "Bitumenous paints from refinery sludge", Surf. Coatings Technol, 1(2001) 132-138.

9. T. M. S Lima, A. F. Fonseca, B. A. Leão, A. H. Mounteer, "Oil Recovery from fuel oil storage tank sludge using biosurfactants", Journal of Bioremediation and Biodegradation, 12 (2011) 125-140.




[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]

10. A. Gorkovenko, D. Kaplan, "Bioengineering of emulsifier sturcture: emulsan analogs", Can. J. Microbiol, 43 (1997) 384-390.

11. Idrabel Italia S. r. l, "Environmental Technologies for Refineries, Idrabel Italia", Tank Cleaning Technology, WWW. Idrabel.it.

۱۲. احسان امیریان، *بررسی امکان تولید امولسان از میکروب‌های مخازن نفتی*، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (۱۳۸۳).

13. D. Gutnick, E. Rosenberg, "Cleaning oil contaminated vessels with α emulsans", US Patent 4, 276 (1981) 094.

14. I. M. Banat, N. Samarath, M. Murad, "Biosurfactant production and use in oil tank clean up", World J. Microbiol. Biotechnol, 7 (1991) 80-84..

15. G. Carlo, W. Dieter, R. Reinhardt, M. Johannes, *"Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-Rhamnose", *United States patent*, Patent No. 5658793 (1997).

16. M. M. Müller, B. Hörmann, C. Syldatk, R. Hausmann., *"Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems", Appl. Microbiol. Biotechnol., 87 (2010) 167-174.

17. B. Hörmann, M. M. Müller, C. Syldatk ,R. Hausmann, "Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509", Eur. J. Lipid Sci. Technol., 112 (2010) 674-680.

18. S. Nasr, M. R. Soudi, M. R. Mehrnia, M. H. Sarrafzadeh**,** "Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus spp*. isolated from petroleum contaminated soil", Iranian Journal of Microbiology, 1 (2009) 54-61.

19. N. H. Youssef, K. E. Duncan, D. P. Nagle, K. N. Savage, R. M. Knapp, M. J. McLnerney, "Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms", J.of Microbiol. Meth, 56 (2004) 339-347.

20. C. Syldatk, S. Lang, F. Wagner, V. Wray, L. Witte, "Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec., DSM 2874 grown on n-alkanes", *Z Naturforsch*, 40 (1985) 51-57.



[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-28 ]