تولید بیوسورفکتنتهای رامنولیپید به منظور کاربرد در فرایند ازدیاد برداشت نفت

حسین امانی ** بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

چکیده: در این پژوهش، بیوسورفکتنتهای رامنولیپید به عنوان کاهش کشش سطحی، امولسیون کنندگی نفت، قرار می گیرد. از ویژگیهای مهم بیوسورفکتنتها می توان کاهش کشش سطحی، امولسیون کنندگی نفت، سازگاری با محیط، تجزیه پذیری، پایدار بودن در مقابل دما و شوری را نام برد. در این پژوهش تولید رامنولیپید از باکتری Pseudomonas aeruginosa NP2 صورت گرفت و با توجه به شناسایی و اندازه گیری غلظت رامنولیپید توسط HPLC و The می باید. در فاز لگاریتمی رشاد شروع و تا فاز سکون ادامه می باید. در طی بررسی تولید رامنولیپید، مشخص شد که بیشترین میزان رامنولیپید تولید شده در محیط کشت دارای روغین آفتیاب گردان به عنوان تنها منبع گربن برابر با ۸۰ گرم بر لیتر است. سرانجام، آزمایشهای از دیاد برداشت نفت با رامنولیپید تولید شده در غلظت CMC آنها انجام شد. آزمایش های سیلابزنی مغزه شامل از دیاد برداشت نفت نها بی بیوسورفکتنت نهایی، بیوسورفکتنت نهایی، بیوسورفکتنت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلابزنی با رامنولیپید، در این آزمایش بازیافت نهایی سیلابزنی با رامنولیپید، ۱۹۸۶ بهدست آمد. سپس سیلابزنی با محلول بیوسورفکتنت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلابزنی با رامنولیپید، ۱۹۸۶ بهدست آمد. با معلول بیوسورفکتنت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلابزنی با رامنولیپید، ۱۹۸۶ بهدست آمد. یا بیوسورفکتنت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلابزنی با رامنولیپید، ۱۹۸۶ بهدست آمد. یا بیوسورفکتنت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلابزنی با رامنولیپید، ۱۹۸۶ بهدست آمد. یا

واژههای کلیدی: بیوسورفکتنت، رامنولیپید، فرمانتاسیون، کشش سطحی، ازدیاد برداشت میکروبی نفت.

KEY WORDS: Biosurfactant, Rhamnolipid, Fermentation, Surface tension, Microbial Enhanced oil recovery.

مقدمه

سورفکتنتها یا مواد فعال سطحی گروه مهمی از ترکیبهای شیمیایی صنعتی هستند که به طور گسترده در تمام بخشهای صنایع نوین امروزی مورد استفاده قرار می گیرند [۱٬۲]. سورفکتنتها مولکولهای اَمفی پاتیک یا دوگانه دوستی هستند که با قرار گرفتن در سطح بین دو فاز منجر به کاهش کشش سطحی و بین سطحی و تشکیل میکروامولسیونهای هیدروکربن در اَب و یا اَب

در هیدروکربن می شوند. سورفکتنتها بر روی سطح جذب می شوند یا در سطح آزاد سیال یا سطح تماس بین دو سیال تجمع می کنند. در سالهای اخیر تلاش برای تهیه و مطالعه سورفکتنتهای تولیدی از فراوردههای طبیعی افزایش یافته است. این سورفکتنتها چون به آسانی قابل تجزیه می باشند بیشتر مورد توجه هستند. به این ترتیب استفاده از فراوردههای طبیعی تجدید پذیر به جای

+E-mail: hosn1_amani@yahoo.com

*عهده دار مكاتبات

انوع شیمیایی مرسوم شده است [۳]. گروهـی از میکـروبهای موجود در طبیعت قادر به ترشح مواد برون سلولی میباشند که از این مواد میتوان بیوسـورفکتنتها را نـام بـرد. اگرچه بیشـتر پژوهشـگران بیوسـورفکتنت را بـه عنـوان متابولیـت اولیـه در نظـر گرفتـهانـد، امـا برخـی از آنهـا نیـز ایـن ترکیـبهـا را متابولیتهای ثانویه به حساب آوردهاند [۴]. رامنولیپید^(۱) تولید شده توسط باکتری سودوموناس آرجینوزا بهعنـوان یکـی از مؤثرترین بیوسورفکتنتها با قابلیت کاهش کشـش سـطحی تـا ۳۸ mN/m شناخته میشود [۷۱–۵]. یک زمینـه مهـم بـرای اسـتفاده از ایـن بیو سورفکتنتها، ازدیاد برداشت میکروبی نفت^(۱) است. این ترکیـبهـا با کاهش کشش بین سطحی نفت و سنگ بستر، باعث کاهش نیـروی مویینگی (که مانعی برای خروج نفت از خلال منافذ سنگ بستر اسـت) مـیشـوند. همچنـین، نقـش امولسـیون کننـدگی بیوسـورفکتنت مـیشـوند. همچنـین، نقـش امولسـیون کننـدگی بیوسـورفکتنت به جدا شدن نفت از سطح سنگها کمک می کند [۱۸].

سیلدتاک و همکاران ^(۳) [۱۹] چهار نوع رامنولیپید که توسط گونه Pseudomonas aeruginosa DSM 2874 توليد ميے شد را شناسایی نمودند. رامنولیپید تولیدی آنها باعث ازدیاد برداشت نفت حدود ۲۰٪ در مغزه شد. *کایلی و همکاران* ۲۰] توانستند رامنوليييد را از گونه P. aeruginosa DSM 2659 توليد كنند. أنها با استفاده از رامنوليپيد توليدي كشش سطحي أب را به كمتر از ۳۰ mN/m برساندند و با تزریق محلول رامنولیپید درون مغزه ۳۳٪ نفت باقی مانده را بازیافت نمودند. هری و همکاران ^(۵) [۲۱] نشان دادند که رامنولیپید سه برابر موقعی که آب به تنهایی به سنگ تزریق می شود، باعث جدایی نفت از سنگ میشود. یکی از موفق ترین تـ الاشهای میدانی ازدیاد برداشت میکروبی نفت در مخازن کربناته توسط دتریچ و همکاران (۶) [۲۲] صورت گرفت، میزان ٪۶۰ ازدیاد برداشت نفت در این تجربه گزارش شد. *دمین* و همکاران $^{(Y)}$ [۲۳] در دو مطالعه آزمایشگاهی و پایلوت نشان دادند که با تزریق بیوسـورفکتنت در میـدان نفتـی دکینـگ ^(۸) مقـدار تولیـد نفـت ۲۱ ٪ افزایش پیدا می کند. *داوشان* و همکاران ^(۹) [۲۴] با آزمایش روی مغزه نشان دادند با تزریق رامنولیپید، افزایش برداشت نفت در حدود ۱۶/۶ ٪ می شود. با توجه به این موردهای موفقیت آمیـز

و همچنین منابع نفتی فراوان کشور ما، به نظر میرسد پروهش در زمینه تولید بیوسورفکتنتها و تزریق آنها به مخازن یک نیاز است. در همین راستا، هدف از این پژوهش بررسی تولید رامنولیپید توسط گونه Pseudomonas aeruginoas NP2 جدا شده از مناطق آلوده نفتی ایران، به عنوان یک مدل بومی بهمنظور ازدیاد برداشت نفت می باشد.

بخش تجربي

باکتری Pseudomonas aeruginoas NP2 از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا تهیه شد.

محیط کشت و اجزای آن

پیش کشت

از محیط LB (شامل Yeast extract، تریپتون و NaCl از محیط ۱۰، ۵ و ۱۰ گرم در لیتر) به عنوان پیش کشت برای تولید رامنولیپید استفاده شد.

تركيب محيط كشت توليد رامنوليپيد

برای تهیه محیط کشت [۲۵] ابتدا محلول (A(g/L) برای تهیه محیط کشت [۲۵] ابتدا محلول (R(g/L) بره NaNO $_{\rm f}$ ،۱/۵ ${}^{\rm f}$ KCl ،۰/۱ ${}^{\rm f}$ MgSO $_{\rm f}$.۷H $_{\rm f}$ O ،۰/۰۵ و محلول (MgSO $_{\rm f}$.۷H $_{\rm f}$ O ،۲ $_{\rm f}$ O , ${}^{\rm f}$ C(g/L) شامل روغن آفتاب گردان (${}^{\rm f}$ C(g/L) و محلول (${}^{\rm f}$ C(g/L) به صورت جداگانه اتو کلاو شدند و سپس محلول (${}^{\rm f}$ C(g/L) شامل اتو کلاو شدند و سپس محلول (${}^{\rm f}$ C(g/L) شامل ${}^{\rm f}$ C(g/L) ${}^{\rm f}$ C(g

دستگاه کشش سطحی

کشش سطحی نمونهها توسط دستگاه تنسیومتر (kruss k10T) به روش Du Nouy Ring Method اندازه گیری شد.

- (۶) Ditrich
 - (v) Demin et al.
 - (A) Daqing
 - (4) Daoshan et al.
 - (1.) LB-Medium

- (1) Rhamnolipid
- (Y) Microbial enhanced oil recovery
- (٣) Syldtak
- (۴) Kappeli et al.
- (۵) Hurrey et al.

74

جدول ۱_ پارامترهای فیزیکی مغزه.

جنس مغزه	ترشوندگی	قطر (mm)	ارتفاع (mm)	وزن (g)	حجم حفرهها (mL) تخلخل موثر (%)		تراوایی (mDarcy)
ماسه سنگ	آب– تر	۳۷٫۵	٧٧,٣	۱۸۳٫۲۱	۱۷٫۳۷	۱۴/۴۵	۶۵

جدول ۱ ویژگیهای فیزیکی مغزه استفاده شده در ازدیاد برداشت نفت را شامل تراوایی، تخلخل مؤثر و حجم حفرههای مغزه نشان می دهد. این مغزه از آزمایشگاه نفت دانشگاه تهران

دستگاه سیلابزنی مغزه^(۱)

دستگاه DB Robinson آزمایشهای گوناگونی همچون تزریق آب و گاز را در مغزه امکان پذیر می کند. مغزه با اندازههای مشخص استوانهای شکل در این دستگاه تحت عملیات سیلابزنی قرار گرفت. سیالهای خروجی از مغزه پس از جداسازی در استوانههای مدرج جمعآوری شدند. میزان سیالهای تولیدی اندازه گیری بازده تزریق را امکانپذیر مینماید.

آزمایش تولید رامنولیپید

۵ میلی لیتر از کشت باکتری رشده کرده در محیط LB (۵ درصد حجمی) به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت تولید رامنولیپید موجود در ارلن ۱۰۰۰ میلیلیتری در شرایط استریل افـزوده شــد و سیس در شیکرانکوباتور (C° ۳۷ و ۱۲۰ rpm نمونه گیریها در زمانهای گوناگون انجام شد. برای بررسی تکرار پذیری، تمامی آزمایشها سه بار تکرار شد.

تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل^(۲)

مقدار CMC به حلالیت سورفکتنت در فاز آبی بستگی داشته و به عنوان معیاری برای ارزیابی کارایی یک سورفکتنت استفاده می شود. غلظت بحرانی تشکیل میسلها به غلظتی از سورفکتنت گفته میشود که در بالاتر از این مقدار میسل ها به طور مرتب تشکیل می شوند. در این غلظت سطح بین دو مایع به طور کامل با سورفکتنت پر شده و هچ فضایی بین دو مایع باقی نمیماند. با افزایش میـزان سورفکتنت میزان میسل تشکیل شده بیشتر می شود. قبل از رسیدن به میزان CMC کاهش کشش سطحی بـه مقـدار زیادی

(*) Thin layer chromatography

جنس مغزه	ترشوندگی	قطر (mm)	موثر (%) وزن (g) ارتفاع (mm)		تخلخل موثر (%)	حجم حفرهها (mL)	تراوایی (mDarcy)
ماسه سنگ	آب– تر	۳۷٫۵	۷۷٫۳	١٨٣/٢١	۱۷٫۳۷	۱۴٫۴۵	۶۵

اندازه گیری غلظت روغن آفتابگردان

تعیین مقدار غلظت روغن آفتاب گردان در محیط کشت بهروش وزنی صورت گرفت. ۲mL فاز هگزان به ظرفهای از قبل وزن شده انتقال یافت و پس از تبخیر هگزان، ظروف موردنظر توزین شدند.

با غلظت سورفكتنت افزايش مي يابد. بعد از رسيدن به CMC کاهش کشش سطحی دیگر دیده نمی شود. هرچه این غلظت

کمتر باشد آن بیوسورفکتنت کاراتر است. برای تعیین CMC

کشش سطحی سوپرناتانت در غلظتهای گوناگون اندازه گیری شد.

اندازه گیری زیست توده

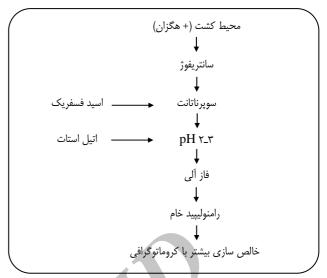
به منظور جداسازی باکتریها، کشت باکتری در دستگاه سانتریفوژ Multifuge 1S-R,Heraeus درون لولــهـای ویـــژهی از قبــل وزن شده در g ×۱۲۰۸۶ و ۴°C سانتریفوژ شد. سـوپرناتانت بـرای إنجام كليه أزمايشها به منظور بررسي ميزان توليد بيوسورفكتنت مورد استفاده قرار گرفت. رسوب باقیمانده یا زیست توده پس از سانتریفوژ، ۲ بار با آب نمک ۰٫۹ ٪ شستشو داده شـد. یـس از آن زیست تـوده به مدت ۲۴ ساعت در گرما ۲۰۰ خشک و سیس توزین شد [۲۵].

استخراج و خالص سازي رامنوليپيد

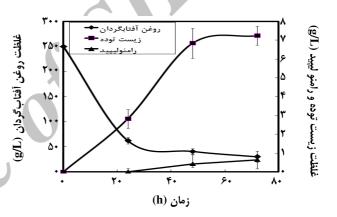
به ۱ mL از نمونه گرفته شده محیط کشت، ۱۰ میکرولیتـر (H_rPO_t) و H_rPO اتيل استات اضافه مـیشـد [۲۵، ۱۸، ۱۶، ۱۵]. مدت ۳۰ دقیقه در $\mathbf{g} \times \mathbf{V}$ ۱۲۰۸ در $\mathbf{f}^{\circ}\mathbf{C}$ سانتریفیوژ شـده و سـپس فاز آلی آن جدا شد. برای اطمینان بیشتر از جداسازی، یک بار دیگر فاز آبی با ۱٬۲۵ mL اتیل استات استخراج شد. بعد از تبخیر اتیل استات در دمای ۵۰ و ۲۰۰۰ rpm درون یک تبخیر کننده، رامنولیپید زرد رنگ ظاهر شد. خالص سازی بیشتر با استفاده از ^(۳)TLC یا کروماتوگرافی لایه نازک (F254 plates) یا کروماتوگرافی صورت گرفت. در این روش فاز متحرک شامل کلروفره: متانول:استیک اسید (۲:۱۵:۶۵) بود که این فاز متحرک باعث جـدایی ۴ نـوع رامنولیپیـد مـیشـد. بعـد از ایـن مرحلـه کاغـذ

⁽¹⁾ Core flooding system

⁽Y) Critical micelle concentration



شکل ۱_ مراحل و روند استخراج رامنولیپید.



شکل ۲_ منحنی رشد باکتری Pseudomonas aeruginoas NP2 منحنی رشد باکتری مصرف روغن آفتاب گردان و تولید رامنولیپید.

درون محلول سولفوریک اسید:اسیتیک اسید (۵۰:۱) آغشته شده و بعد از خشک شدن از آن عکس گرفته می شد. از استاندارد جنیل (United States, Saukkville) به عنوان شاهد استفاده شد [۲۵]. استاندارد جنیل شامل رامنولیپیدهای ۱و۲و۳و۴ می باشد که توسط P. aeruginosa تولید می شود. شکل ۱ مراحل و روند استخراج رامنولیپید را نشان می دهد. برای تعیین غلظت رامنولیپید از دستگاه (Agilent 1100 Series) استفاده شد. ستون استفاده شده در دستگاه (N) با قطر (N) میکرومتر و شدت جریان تزریق (N) سازی در درصورتی که از روغین آفتاب گردان

- (F) Triethylammonium (C5H15N) in acetonitril
- (a) Medim performance liquid chromatography

برای منبع کربنی استفاده شود ابتدا باید بهوسیله هگزان روغن باقی مانده در محیط کشت را جدا نموده و اندازه گیری نمود.

اندازه گيري غلظت رامنوليپيد

یس از استخراج رامنولیپید نیاز به اندازه گیری غلظت آن به وسیله دستگاه HPLC است. ابتدا باید دستگاه HPLC را برای تعیین غلظت رامنولیپید آماده نمود. برای این منظور ابتدا به آماده کردن محلول A (۴۰ میلی مولار * _ بروم فناکیل برمید در استونیتریل) $^{(7)}$ و محلول B (۲۰ میلی مولار $^{(7)}$ ـ اتیل اَمونیوم در استونیتریل) $^{(7)}$ و محلول C (مخلوط نمودن محلول A و B به نسبت مساوی) پرداخته شد. سپس به نمونههای رامنولیپید که از قبل استخراج و در ۳۶۰ میکرولیتر استونیتریل حل شدهاند، ۴۰ میکرولیتر از محلول C اضافه می شد. همچنین از محلول ۱۹۵٪ آب مقطر و ۵٪ متانول به عنوان فاز متحرک در دستگاه استفاده میشد. از آنجایی که رامنولیپید۱ و رامنولیپید ۳ برای کالیبراسیون دستگاه HPLC نیاز است، جداسازی این دو ماده از همدیگر با دستگاه BUCHI Control Unit C-620) صورت گرفت. ۵ mL از رامنولیپید بهدست آمده از مرحله استخراج با اتیل استات درون دستگاه تزریق شد [۱۸٬۲۵]. فاز متحرک به صورت پلهای یا با فاصله به ستون جداسازی (Lot-91108-10030-30) تزریق شد. محلول های خروجی در ظرفهای شیشهای (درون هرکدام به اندازه ۲۰ mL) برای تجزیه جمع آوری شد. برای این آزمایش ابتدا با ٪ ۱۰۰ کلروفرم به مدت ۵ دقیقه سیس با کلروفیرم و متانول (۶۰ به ۴۰) به میدت ۴۵ دقیقه و در انتها ٪۱۰۰ متانول به مدت ۱۰ دقیقه تزریقها انجام شد.

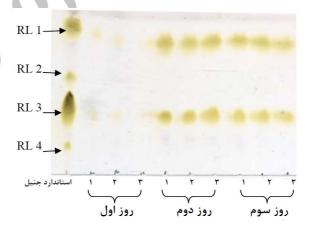
نتيجهها و بحث

بررسی رشد باکتری Pseudomonas aeruginoas NP2 با منبع کربن روغن آفتاب گردان

مقدارهای رامنولیپید، روغین آفتاب گردان و زیست توده در زمانهای گوناگون رشد اندازه گیری شدند. روند تولید زیست توده، تولید بیوسورفکتنت و مصرف روغن در طی رشد باکتری در شکل ۲ نشان داده شده است. این شکل نشان میدهد تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی رشد شروع شده و تا فاز سکون ادامه مییابد.

- (1) Jenil
- (Y) High performance liquid chromatography
- (*) 4-Bromphenacylbromid(C6H6Br2O) in acetonitril

شکل ۳_ساختمان چهار نوع رامنولیپید گوناگون تولید شده توسط باکتری سودومناس آرجینوزا [۶].



شکل ۴ نتیجههای کروماتوگرافی لایه نازک برای رامنولیپید تولید شده. چهار لکه سمت چپ به عنوان شاهد از استاندارد جنیل به دست آمده است.

این نتیجه با نتیجههای دیگر پژوهشگران مانند مولر و همکاران (۱) [۱۵] و هورمان و همکاران (۲) [۱۵] و سیلتاک و همکاران سازگار است [۱۹]. این مشاهدهها نشان دهنده ی معتبر بودن نتیجههای این پژوهش میباشد. برای بررسی تکرارپذیری، کلیه آزمایشها در سه ارلن به طور همزمان و در شرایط یکسان انجام شد.

تأیید تولید رامنولیبید به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

بعد از استخراج رامنولیپید بهوسیله اتیل استات برای اثبات تولید آن، ابتدا به بررسی تولید آن بهوسیله آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک پرداخته شد. از شاهد و استاندارد جنیل برای تشخیص رامنولیپید استفاده شد. استاندار جنیل دارای چهار نوع رامنولیپید گوناگون شاخته شده میباشد که توسط باکتریهای سودوموناس آرجینوز تولید میشوند. در شکل ۳ انواع رامنولیپیدهای شناخته شده نشان داده شده است[۶].

نتیجههای آزمایش TLC در شکل ۴ نشان داده شده است. همان گونه که در ایان شکل دیده میشود باکتری همان گونه که در ایان شکل دیده میشود باکتری Pseudomonas aeruginoas NP2 توانسته است رامنولیپید ۱و۳ را تولید کند. همچنین از این شکل مشخص است که در روز اول رامنولیپید بسیار کمی تولید شده است زیرا رنگ بسیار کم رنگی در کاغذ TLC ظاهر شده است. نتیجههای آزمایش TLC در تأیید شکل ۳ میباشد و بیانگر درست بودن نتیجههای ایان پژوهش میباشد. بنابراین میتوان نتیجه گرفت تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی رشد شروع و تا فاز سکون ادامه مییابد. ایان نتیجه با نتیجههای دیگر پژوهشگران سازگار است [۱۹، ۱۶ و ۱۵].

(1) Müller et al. (Y) Hörmann et al.

علمي ــ پژوهشي

اندازه گیری غلظت و بررسی تولید رامنولیپید بهوسیله HPLC

برای اندازه گیری غلظت رامنولیپید ابتدا باید دستگاه را کالیبره نمود. شکلهای ۵ و ۶ نمونهای از نتیجها در مورد تزریق رامنولیپید ۱ و ۳ به طور جداگانه در دستگاه HPLC و شکل ۷ نمونهای از تزریق رامنولیپید تولید شده توسط باکتری Pseudomonas aeruginoas NP2 استفاده شده در این پژوهش پس از استخراج میباشد. بنابراین استفاده از دستگاه HPLC این برتری را دارد که با توجه به زمان خروجی پیکها و مقایسه آنها، هم وجود رامنولیپید ۱ و ۳ اثبات می شود و هم غلظت اندازه گیری می شود

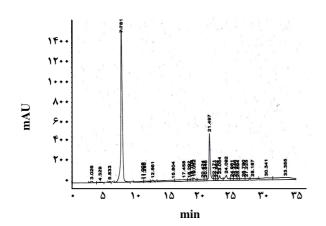
جداسازی رامنولیپید او۳ از یکدیگر با دستگاه MPLC

از آنجایی که رامنولیپید نوع ۱ و رامنولیپید نوع ۳ برای کالیبراسیون دستگاه HPLC نیاز است جداسازی این دو ماده از یکدیگر با دستگاه MPLC صورت گرفت. شد ۵ از رامنولیپید به دست آمده از مرحله استخراج با اتیل استات و سپس فاز متحرک به صورت گرادیانی به دستگاه تزریق شد. همچنین برای اثبات جداسازی از روش کار با TLC استفاده شد. نتیجهها در شکل ۸ نمایش داده شده است. همان گونه که در این شکل دیده می شود رامنولیپید ۱و۳ به طور کامل از هم جدا شده است. برای جمع آوری رامنولیپید ۱ ظروف شیشه ای شماره ۳۷ تا ۴۷ برای به دست آوردن رامنولیپید ۳ ظرفهای شیشهای شماره ۲۷ تا ۵۹ با هم مخلوط شدند. پس از تبخیر حلال شماره ۱۵ به صورت خالص به دست آمد.

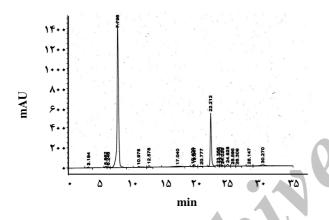
همچنین برای اطمینان از جداسازی، دوباره از دو محلول به دست آمده آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد. نتیجهها در شکل ۹ نشان داده شده است. این شکل بیانگر موفقیت آمیز بودن عمل جداسازی می باشد.

نتیجههای آزمایش کشش سطحی و بین سطحی

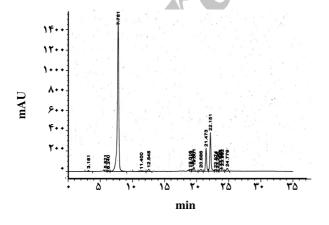
نتیجهها نشان می دهد برای بیوسورفکتنت خالص بهدست آمده در این پژوهش، کمترین مقدار غلظت بیوسورفکتنت که بعد از آن دیگر کشش سطحی و بـین سطحی تغییر نمـی کنـد، برابـر ۸۲۰mg/L میباشد یا به عبارت دیگر کشش سطحی از ۸۲۰mg/L ۲ mN/m بـه ۳۸ m/m میرسد. شکل ۱۰ روند کاهش کشش سطحی در غلظت CMC میرسد. شکل ۱۰ روند کاهش کشش سطحی و بین سطحی رامنولیپید تولید شده را نشان میدهد. از آنجایی که کاهش کشش سطحی و بین سطحی یکی از عاملهای بسیار مهـم



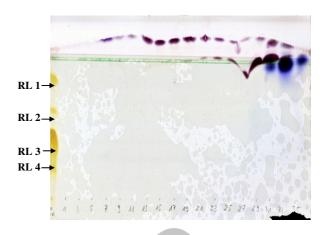
شکل ۵ ـ نمونهای از نتیجـههای دسـتگاه HPLC در مـورد تزریـق رامنولیپید ۳ به تنهایی.

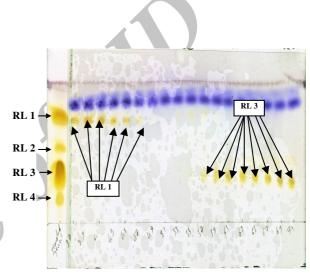


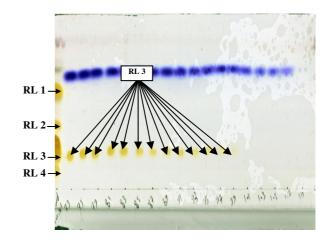
شکل ۶ ـ نمونهای از نتیجـههـای دسـتگاه HPLC در مـورد تزریـق رامنولیپید ۱ به تنهایی.



شکل ۷ ـ نمونهای از نتیجههای دستگاه HPLC در مورد تزریق رامنولیپید تولید شده در این پژوهش.







شکل ۸ _ اثبات جداسازی رامنولیپید ۱و۳ از نمونههای جمع شده در ظروف شیشه ای با استفاده از TLC.

در فرایند ازدیاد برداشت نفت می باشد، نتیجههای بهدست آمده از این آزمایش نشان دهنده کارا بودن رامنولیپید تولید شده در این پژوهش در کاهش کشش سطحی و بین سطحی است. سویههای مولد رامنولیپید که توسط پژوهشگران دیگر جداسازی شده اند توانسته بودند کشش سطحی محیط رشد را از MN/m ۲۹ ساسطحی محیط رشد را از mN/m تا سطحی محیط رشد را از بنابراین نتیجههای به دست آمده از این پژوهش قابل مقایسه با نتیجههای پژوهشهای قبلی می باشد.

بررسی آزمایش ازدیاد برداشت نفت در مغزه

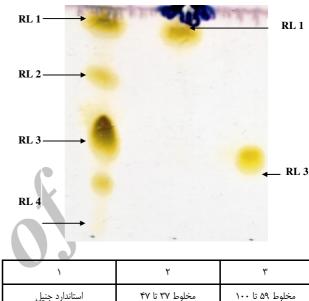
این آزمایشها شامل بررسی اثر رامنولیپید در غلظت CMC یعنی در ۱۲۰ mg/L، بر روی از دیاد برداشت نفت می باشد که در ابتدا سیلابزنی با آب وسیس با محلول رامنولیپید تولید شده می باشد. در تمام آزمایش ها مدل به صورت افقی قرار گرفت. بازیافت نهایی سیلابزنی با آب و بازیافت نهایی سیلابزنی با محلول بیوسورفکتنت در این آزمایشها بررسی، اندازه گیری و تحلیل شدند. برای انجام آزمایش های سیلابزنی مغزه، ابتدا مغزه با آب اشباع شد و در مرحله بعد، تخلیه با نفت خام تا رسیدن به هنگامی که هیچگونه آبی بیرون نیاید ادامه یافت. سیس آزمایش سیلابزنی با آب نمک ۱٪ و سیس سیلابزنی با محلول رامنولیپید تا بازیافت نهایی نفت انجام شد. دلیل استفاده از نفت خام و آب نمک، نزدیکی به ویژگیهای سیالهای واقعی مخزن میباشد. در همه آزمایشها، شدت جریان ۱۰ میلی لیتر در ساعت بـود. در تمام أزمایشهای سیلابزنی مغزه پس از مرحله تخلیه اشباع آب همزاد ۲۸٪ و در نتیجه اشباع نفت اولیه ۷۲٪ بهدست آمد. بازیافت نهایی سیلابزنی با آب، ۴۱٫۸٪ بهدست آمد. سپس سیلابزنی با محلولهای بیوسورفکتنت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلابزنی با رامنولیپید، ۶۸٬۵۶ ٪ بهدست آمد یا به عبارت دیگر سرانجام ۶۸۶ ٪ برای رامنولیپید ازدیاد برداشت ثالثیه نفت بهدست آمد. نتیجهها در جدول ۲ نشان داده شده است.

ازدیاد برداشت نفت را می توان به افزایش عدد مویینگی ربط داد زیرا به تله افتادن نفت در حفره های سنگ مخزن با استفاده از نیروهای ویسکوز و نیروهای مویینگی کنترل می شود. عدد مویینگی به صورت نسبت نیروهای ویسکوز به نیروهای مویینگی تعریف می شود ($N_c = \mu \, v \, / \delta$) که دراین معادله $\nu \, e$ به ترتیب سرعت و ویسکوزیته سیال جابه جا کننده ، $\delta \, e$ کشش بین سطحی آب ونفت می باشد [۱۸]. این معادله نشان می دهد

علمي ـ پژوهشي

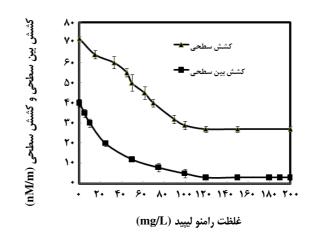
ازدیاد برداشت نفت.	ر بروسو، فكتنت ، وي	. ۱۱ آن ۱۰ آن	حدما ۲ تاثیر ب
اردناد درست س	, ta, cure, aman	سار کہ رہے کا رہے ہ	حدول ا ـ ت ت ت

	نفت در جا		نی با آب	سيلابز	سیلابزنی با بیوسورفکتنت بعد از سیلابزنی با اَب			
mL	no I	بازيافت نفت		I : 1 :	بازيافت نفت			
	mL	mL	نفت در جا %	mL نفت باقیمانده	mL	نفت در جا %	کل %	
	۶۵	۴۰/۱۷	۶۱,۸	۲۴ _/ ۸۳	۴٫۴	8 ₁ V8	8A,08	



استاندارد جنيل

شکل ۹_ اثبات جداسازی جداسازی رامنولیپید ۱و۳ از دو نمونه مخلوط شده (شماره ۳۷ تا ۴۷ و شـماره ۱۰۰ تـا ۵۹) در ظـروف شیشـهای با استفاده از TLC.



شکل ۱۰_ نمودار تغییرهای کشش سطحی و بین سطحی بــر حســب غلظت رامنوليپيد توليد شده.

که عدد مویینگی با کاهش کشش بین سطحی افزایش می یابد. به نظر می رسد وجود رامنولیپید تولید شده به مقدار چشمگیری موجب کاهش کشش بین سطحی آب و نفت می شود و منجر بـه افزایش عددمویینگی و در نهایت افزایش برداشت نفت می شود. نتیجه گیری کلی از این قسمت این است که بیوسورفکتنت تولید شده از باکتری Pseudomonas aeruginoas NP2 دارای پتانسیل خوبی دركاهش كشش سطحي و بين سطحي است. رامنوليييد تولید شده باعث ازدیاد برداشت ثالثیه نفت ۴/۷۶٪ در مغزه شد. برای افزایش بازده ازدیاد برداشت نفت می توان از روشهای کمکی مانند تزریق بیوسورفکتنت به همراه پلیمر و یا تزریق مخلوطی از بیوسورفکتنتها و سورفکتنتهای شیمیایی نیز استفاده نمود.

این پژوهش نشان دهنده موفقیتاًمیز بودن تأثیر بیوسورفکتنت تولید شده از یک باکتری بومی ایرانی در ازدیاد برداشت نفت می باشد. در این پژوهش تولید رامنولیپید به کمک کشت ناپیوسته به روش متداول ازماشگاهی بررسی شد و پس از خالصسازی انها، آزمایشهای ازدیاد برداشت نفت انجام پذیرفت. کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهمترین و اصلی ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتنت محسوب می شود. سویههای مولد بیوسورفکتنت که توسط پژوهشگران دیگر جداسازی شدهاند توانسته بودند کشش سطحی محیط رشد را از ۶۹ mN/m تا ۲۵–۳۰ کاهش دهند درحالی که رامنولیپید تولید شده توسط سویههای مورد بررسی در این یژوهش کشش سطحی آب از ۷۰ mN/m به حدود mN/m رسید که نتیجههای به دست آمده قابل مقایسه با نتیجههای پژوهشهای قبلی میباشد.

بررسی رشد Pseudomonas aeruginoas NP2 در ارلن با اندازه گیری غلظت رامنولیپید توسط HPLC و TLC نشان داد که تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی شروع و تا فاز سکون ادامه می یابد.

در صنایع و به ویژه صنعت نفت، نه تنها فناوری امروز بلکه نیاز فرداست. کشور ما نیز می تواند با دست یابی به فناوری استخراج و کاربرد بیوسورفکتنتها، یکی از مدعیان اصلی این صنعت در دنیا بوده و از این راه درآمدهای ارزی زیادی بهدست آورد.

قدرداني

نویسنده این مقاله از شرکت مهندسی و توسعه نفت به خاطر تأمین هزینهها و حمایتهای مادی این پروژه (موضوع قرارداد شماره ۵۵۳ م ت ن) تشکر و قدردانی می نماید. همچنین از جناب آقای پرفسور کریستوف سیلدتاک، جناب آقای دکتر رادولف هازمن و جناب آقای مهندس مارکوس مولر از دانشگاه صنعتی کارلسروهه آلمان به خاطر در اختیار قرار دادن کلیه امکانات آزمایشگاهی آن دانشگاه و راهنماییهایی ارزنده تشکر و قدردانی ویژه مینمایم.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶٬۱۲ ؟ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱٬۳۰

این نتیجهها با نتیجههای پژوهشگران دیگر سازگاری دارد. بیشترین میزان رامنولیپید تولید شده در محیط روغن اَفتاب گردان برابر ۰٫۸ g/L در راکتور زیستی به دست آمد. البته برای افزایش تولید می توان از راکتورهای زیستی بزرگتر استفاده نمود. برای اثبات تولید رامنولیپید، آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک همراه با شاهد و استاندارد انجام شد. همچنین برای اثبات و بررسی بیشتر تولید این ماده در دستگاه HPLC با توجه به زمان خروجی پیکها و مقایسه پیکها با پیکهای استاندارد جنیل، تولید رامنولیپید ۱و ۳ اثبات شد. جداسازی رامنولیپید نوع ۱ و رامنولیپید نوع ۳ از همدیگر با دستگاه MPLC صورت گرفت. نتیجههای TLC نشان داد رامنولیبیدهای ۱و۳ به طور کامل از هم جدا شده است که از این موضوع می توان در صنایع دارویی استفاده نمود. آزمایشهای ازدیاد برداشت نفت نشان داد رامنولیپید تولیدی این پژوهش باعث ۶٬۷۶ ٪ ازدیاد برداشت نفت می شود. این افزایش برداشت نفت می تواند ناشی از تاثیر رامنولیپید تولید شده روی کشش بین سطحی باشد. به هر حال در پایان باید به این نکته توجه داست که فناوری استخراج نفت و کاربرد بیوسورفکتنتها

مراجع

- [1] Sen R., Biotechnology in Petroleum Recovery: The Microbial EOR, *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**, p. 714 (2008).
- [2] Carrillo P.G., Mardaraz C., Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M., Isolation and Selection of Biosurfactant-Producing Bacteria, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2**, p.82 (1996).
- [3] Sim L., Ward O., Li Z.Y., Production and Characterization of a Biosurfactant Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, p. 232 (1997).
- [4] Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Haditirto S., Isolation of Biosurfactant Pproducing Bacteria, Product Characterization and Evaluation, *Biotechnology*, **2**, p. 315(1991).
- [5] Rashedi H.R., Mazaheri Assadi M., Jamshidi E., Bonakdarpour B., Optimization of the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* HR Isolated from An Iranian Southern Oil Well, *Iran. Chem. Chem. Eng.*, 25 (1), p. 25 (2006).
- [۶] رمضانی ر.، مظاهری اسدی م.، آذین م.، تولید رامنولیپید توسط باکتری سودوموناس ائروجینوزا از ملاس چغندر قند تیمار شده، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، (۳) ۹، ص. ۵۲۴ (۱۳۹۰).
- [۷] ربیعی ف.، مظاهری اسدی م.، آذین م.، تولید رامنولیپید با سودوموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی آب پنیر تیمار شده، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، (۴) ۸، ص. ۳۰۳ (۱۳۸۷).

علمي ـ پژوهشي

- [8] Singh A., Hamme J.D., Ward O.P., Surfactants in Microbiology and Biotechnology: Part 2. Application Aspects, *Biotechnology Advances*, 25, p. 99 (2007).
- [9] Desai J. D, Banat I. M., Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *Microbio. Mol. Biol.*, 61, p. 47 (1997).
- [10] Paolo C., Paola C., Method of Producing Surfactin with the Use of Mutant of *Bacillus subtilis*, *USP* 5,227,294, (1993).
- [11] Joshi S., BharuchaC., Jha S., Yadav S., Nerurka A., Desai A.J., Biosurfactant Production Using Molasses and Whey under Thermophilic Conditions, *Bioresource Technology*, **99**, p. 195 (2008).
- [۱۲] راشدی ح.، جمشیدی ا.، مظاهری اسدی م.، بنکدار پور ب.، بررسی تولید رامنولیپید توسط میکروارگانیسم سودوموناس آرجینوزا جدا شده از مخازن نفتی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۱) ۲۵، ص. ۱۷ (۱۳۸۵).
- [۱۳] امینی ف، صمدی ن، هرانده م، نقدی م، شریفان ان، بررسی شرایط تولید رامنولیپید حاصل از سویههای مختلف سودوموناس آرجینوزا، نشریه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱، ص. ۳۳ (۱۳۸۸).
- [14] Liu C., Tang Y., Shuler P.J., Engineering Rhamnolipid Biosurfactants as Agents for Microbial Enhanced Oil Recovery, *SPE*, No: 106048 (2007).
- [15] Müller M.M., Hörmann B., Syldatk C., Hausmann R., Pseudomonas aeruginosa PAO1 as a Model for Rhamnolipid Production in Bioreactor Systems, Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, p. 167 (2010).
- [16] Hörmann B., Müller M.M., Syldatk C., Hausmann R., Rhamnolipid Production by *Burkholderia Plantarii* DSM 9509, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, p. 674 (2010).
- [17] Banat I.M., Sarnarah N., Biosurfactant Production and Use in Oil Tank, Clean-Up, world J. *Microbial. Biotechnol.*, 7, p.80 (1991).
- [۱۸] امانی ح.، بررسی فرایند ازدیاد برداشت میکروبی نفت با بیوسورفکتنت ها، پایان نامه دکتری، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، (۱۳۸۹).
- [19] Syldatk C., Lang S., Wagner F., Wray V., Witte L., Chemical and Physical Characterization of Four Interfacial-Active Rhamnolipids from *Pseudomonas* Spec. DSM 2874 Grown on n-Alkanes, *Z Naturforsch*, **40**, p.51 (1985).
- [20] Kaeppeli O., Wuremlos L., Zurich S.D., Production of Rhanmolipids, USP 4628030, (1986).
- [21] Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F., Surfactant-Enhanced Remediation of Contaminated Soil, *Engineering Geology*, **60**, p.371 (2001).
- [22] Ditrich F.L., Brown F.G., Zhou Z.H., Microbial EOR Technology Advancement: Case Studies of Successful Projects, *SPE*, No: 36746, (1996).
- [23] Demin W., Jiecheng C., Qun L., Lizhong L., Changjiu Z., Jichun, H., An alkaline Biosurfactant Polymer Flooding Pilots in Daqing Oil Field, *SPE*, No:57304.(1999).

p. 53 (2004).

- [24] Daoshan L., Shouliang L., Yi L., Demin W., The Effect of Biosurfactant on the Interfacial Tension and Adsorption Loss of Surfactant in ASP Flooding, *Colloids and Surfaces A*, **244**,
- [25] Carlo G., Dieter W., Reinhardt R., Johannes M., *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Use in a Process for the Biotechnological Preparation of L-Rhamnose, *USP* 5658793, (1997).

