

تولید بیوسورفکتنت‌های رامنولپید به منظور کاربرد در فرایند ازدیاد برداشت نفت

حسین امانی*⁺

بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

چکیده: در این پژوهش، بیوسورفکتنت‌های رامنولپید به عنوان عامل‌های ازدیاد برداشت میکروبی نفت مد نظر قرار می‌گیرد. از ویژگی‌های مهم بیوسورفکتنت‌ها می‌توان کاهش کشش سطحی، امولسیون‌کنندگی نفت، سازگاری با محیط، تجزیه پذیری، پایدار بودن در مقابل دما و شوری را نام برد. در این پژوهش تولید رامنولپید از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 صورت گرفت و با توجه به شناسایی و اندازه‌گیری غلظت رامنولپید توسط HPLC و TLC دیده شد تولید رامنولپید در فاز لگاریتمی رشد شروع و تا فاز سکون ادامه می‌یابد. در طی بررسی تولید رامنولپید، مشخص شد که بیشترین میزان رامنولپید تولید شده در محیط کشت دارای روغن آفتاب گردان به عنوان تنها منبع کربن برابر با ۰/۸ گرم بر لیتر است. سرانجام، آزمایش‌های ازدیاد برداشت نفت با رامنولپید تولید شده در غلظت CMC آنها انجام شد. آزمایش‌های سیلاب‌زنی مغزه شامل سیلاب‌زنی مغزه اشباع از نفت خام با آب نمک ۱٪ تا بازیافت نهایی و سپس تزریق محلول‌های بیوسورفکتنت تا بازیافت نهایی انجام شد. برای این کار، مغزه با شدت جریان ۱۰ میلی لیتر بر ساعت، تا بازیافت نهایی، با آب سیلاب‌زنی شد. بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با آب، ۶۱/۸٪ به دست آمد. سپس سیلاب‌زنی با محلول بیوسورفکتنت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با رامنولپید، ۶۸/۵۶٪ به دست آمد یا به عبارت دیگر در نهایت ۶/۷۶٪ برای رامنولپید ازدیاد برداشت نفت در مغزه به دست آمد.

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

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

مقدمه

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

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 می‌گیرند [۱،۲]. سورفکتنت‌ها مولکول‌های آمفی 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 آب و یا آب

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: hosn1_amani@yahoo.com

و همچنین منابع نفتی فراوان کشور ما، به نظر می‌رسد پژوهش 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 aeruginosa* NP2 جدا شده از مناطق آلوده نفتی ایران، به عنوان یک مدل بومی به منظور ازدیاد برداشت نفت می‌باشد.

بخش تجربی

باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا تهیه شد.

محیط کشت و اجزای آن

پیش کشت

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

ترکیب محیط کشت تولید رامنولیپید

برای تهیه محیط کشت [۲۵] ابتدا محلول A(g/L) شامل $0.05 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ؛ 0.1 KCl ؛ 0.5 NaNO_3 و محلول B(g/L) شامل روغن آفتاب گردان (g/L) ۲۵۰ و محلول C(g/L) شامل $11 \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ؛ $23 \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ به صورت جداگانه اتوکلاو شدند و سپس محلول D(g/L) شامل $2 \text{ Na-Citrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ؛ $0.28 \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ؛ $1.4 \text{ ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ؛ $1.2 \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ؛ $1.2 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ؛ $0.8 \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ به خاطر حساسیت به گرما با صافی $0.22 \mu\text{m}$ میکرونی استریل شد. در شرایط استریل محلول‌های A و C به نسبت مساوی با حجم‌های ۵۰ mL با هم مخلوط شده و بعد از افزودن ۲۵g روغن آفتاب گردان به آن، ۰/۱ میلی لیتر از محلول D به آن افزوده می‌شد.

دستگاه کشت سطحی

کشت سطحی نمونه‌ها توسط دستگاه تنسومتر (kruss k10T) به روش Du Nouy Ring Method اندازه‌گیری شد.

نوع شیمیایی مرسوم شده است [۳]. گروهی از میکروبی‌های موجود در طبیعت قادر به ترشح مواد برون سلولی می‌باشند که از این مواد می‌توان بیوسورفکتنت‌ها را نام برد. اگرچه بیشتر پژوهشگران بیوسورفکتنت را به عنوان متابولیت اولیه در نظر گرفته‌اند، اما برخی از آن‌ها نیز این ترکیب‌ها را متابولیت‌های ثانویه به حساب آورده‌اند [۴]. رامنولیپید^(۱) تولید شده توسط باکتری *Sudomonas Arjini* به عنوان یکی از مؤثرترین بیوسورفکتنت‌ها با قابلیت کاهش کشش سطحی تا 25 mN/m شناخته می‌شود [۱۷-۵]. یک زمینه مهم برای استفاده از این بیوسورفکتنت‌ها، ازدیاد برداشت میکروبی نفت^(۲) است. این ترکیب‌ها با کاهش کشش بین سطحی نفت و سنگ بستر، باعث کاهش نیروی موینگی (که مانعی برای خروج نفت از خلال منافذ سنگ بستر است) می‌شوند. همچنین، نقش امولسیون کنندگی بیوسورفکتنت به جدا شدن نفت از سطح سنگ‌ها کمک می‌کند [۱۸].

Silydtak و همکاران^(۳) [۱۹] چهار نوع رامنولیپید که توسط گونه *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2874 را شناسایی نمودند. رامنولیپید تولیدی آنها باعث ازدیاد برداشت نفت حدود ۲۰٪ در مغزه شد. کاپلی و همکاران^(۴) [۲۰] توانستند رامنولیپید را از گونه *P. aeruginosa* DSM 2659 تولید کنند. آنها با استفاده از رامنولیپید تولیدی کشش سطحی آب را به کمتر از 30 mN/m رساندند 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 تهایی به سنگ تزریق می‌شود، باعث جدایی نفت از سنگ می‌شود. یکی از موفق‌ترین تلاش‌های میدانی ازدیاد برداشت میکروبی نفت در مخازن کربناته توسط *Ditrich* و همکاران^(۶) [۲۲] صورت گرفت، میزان ۶۰٪ ازدیاد برداشت نفت در این تجربه گزارش شد. دمین و همکاران^(۷) [۲۳] در دو مطالعه آزمایشگاهی و پایلوت نشان دادند که با تزریق بیوسورفکتنت در میدان نفتی دکینگ^(۸) مقدار تولید نفت ۲۱٪ افزایش پیدا می‌کند. *Daoshan* و همکاران^(۹) [۲۴] با آزمایش روی مغزه نشان دادند با تزریق رامنولیپید، افزایش برداشت نفت در حدود ۱۶/۶٪ می‌شود. با توجه به این موردهای موفقیت آمیز

(۱) Rhamnolipid

(۲) Microbial enhanced oil recovery

(۳) Silydtak

(۴) Kappeli et al.

(۵) Hurrey et al.

(۶) Ditrich

(۷) Demin et al.

(۸) Daqing

(۹) Daoshan et al.

(۱۰) LB-Medium

جدول ۱- پارامترهای فیزیکی مغزه.

جنس مغزه	ترشوندگی	قطر (mm)	ارتفاع (mm)	وزن (g)	تخلخل مؤثر (%)	حجم حفره‌ها (mL)	تراوایی (mDarcy)
ماسه سنگ	آب- تر	۳۷٫۵	۷۷٫۳	۱۸۳٫۲۱	۱۷٫۳۷	۱۴٫۴۵	۶۵

مغزه

با غلظت سورفکتانت افزایش می‌یابد. بعد از رسیدن به CMC کاهش کشش سطحی دیگر دیده نمی‌شود. هرچه این غلظت کمتر باشد آن بیوسورفکتانت کارا تر است. برای تعیین CMC کشش سطحی سوپرناتانت در غلظت‌های گوناگون اندازه‌گیری شد.

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

اندازه گیری غلظت روغن آفتاب‌گردان

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

اندازه گیری زیست توده

به منظور جداسازی باکتری‌ها، کشت باکتری در دستگاه سانتریفیوژ Multifuge 1S-R, Heraeus درون لوله‌های ویژه‌ی از قبل وزن شده در $120.86 \times g$ و $4^\circ C$ سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برای انجام کلیه آزمایش‌ها به منظور بررسی میزان تولید بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت. رسوب باقیمانده یا زیست توده پس از سانتریفیوژ، ۲ بار با آب نمک ۰٫۹٪ شستشو داده شد. پس از آن زیست توده به مدت ۲۴ ساعت در گرما $100^\circ C$ خشک و سپس توزین شد [۲۵].

استخراج و خالص سازی رامنولیبید

به ۱ mL از نمونه گرفته شده محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر (H_3PO_4) و ۱٫۲۵ mL اتیل استات اضافه می‌شد [۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۵]. مدت ۳۰ دقیقه در $120.86 \times g$ در $4^\circ C$ سانتریفیوژ شده و سپس 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 $50^\circ C$ و 2000 rpm درون یک تبخیر کننده، رامنولیبید زرد رنگ ظاهر شد. خالص سازی بیشتر با استفاده از TLC^(۳) یا کروماتوگرافی لایه نازک (5% 60 F254 plates) صورت گرفت. در این روش فاز متحرک شامل کلروفرم: متانول:استیک اسید (۲:۱۵:۶۵) بود که این فاز متحرک باعث جدایی ۴ نوع رامنولیبید می‌شد. بعد از این مرحله کاغذ

دستگاه سیلاب‌زنی مغزه^(۱)

دستگاه DB Robinson آزمایش‌های گوناگونی همچون تزریق آب و گاز را در مغزه امکان‌پذیر می‌کند. 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 اندازه‌گیری بازده تزریق را امکان‌پذیر می‌نماید.

آزمایش تولید رامنولیبید

۵ میلی‌لیتر از کشت باکتری رسیده در محیط LB (۵ درصد حجمی) به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید رامنولیبید موجود در ارلن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری در شرایط استریل افزوده شد و سپس در شیکرانکوباتور ($37^\circ C$ و 120 rpm) نمونه‌گیری‌ها در زمان‌های گوناگون انجام شد. برای بررسی تکرار پذیری، تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل^(۲) (CMC)

مقدار CMC به حلالیت سورفکتانت در فاز آبی بستگی داشته و به‌عنوان معیاری برای ارزیابی کارایی یک سورفکتانت استفاده می‌شود. غلظت بحرانی تشکیل میسل‌ها به غلظتی از سورفکتانت گفته می‌شود که در بالاتر از این مقدار میسل‌ها به‌طور مرتب تشکیل می‌شوند. در این غلظت سطح بین دو مایع به‌طور کامل با سورفکتانت پر شده و هیچ فضایی بین دو مایع باقی نمی‌ماند. با افزایش میزان سورفکتانت میزان میسل تشکیل شده بیشتر می‌شود. قبل از رسیدن به میزان CMC کاهش کشش سطحی به مقدار زیادی

(۱) Core flooding system

(۲) Critical micelle concentration

(۳) Thin layer chromatography

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

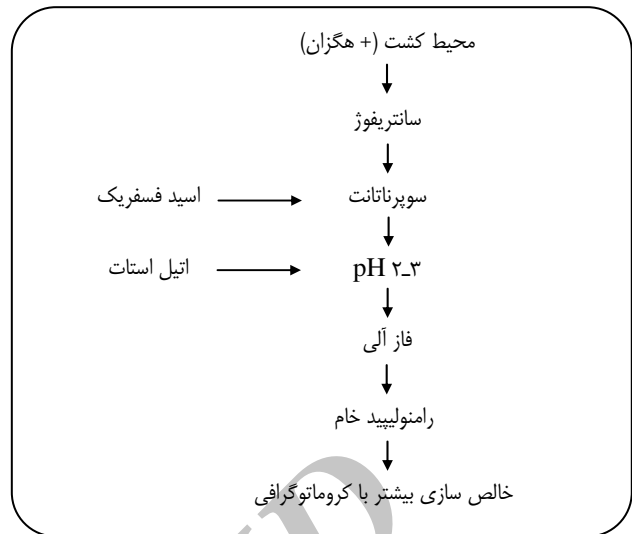
اندازه گیری غلظت رامنولیپید

پس 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 ۴ - بروم فناکیل برمید در استونیتریل)^(۳) و محلول B (۲۰ میلی مولار ۳ - اتیل آمونیوم در استونیتریل)^(۴) و محلول C (مخلوط نمودن محلول A و B به نسبت مساوی) پرداخته شد. سپس به نمونه های رامنولیپید که از قبل استخراج و در ۳۶۰ میکرولیتر استونیتریل حل شده اند، ۴۰ میکرولیتر از محلول C اضافه می شد. همچنین از محلول ۹۵٪ آب مقطر و ۵٪ متانول به عنوان فاز متحرک در دستگاه استفاده می شد. از آنجایی که رامنولیپید ۱ و رامنولیپید ۳ برای کالیبراسیون دستگاه HPLC نیاز است، جداسازی این دو ماده از همدیگر با دستگاه MPLC^(۵) (BUCHI Control Unit C-620) صورت گرفت. ۵ mL از رامنولیپید به دست آمده از مرحله استخراج با اتیل استات درون دستگاه تزریق شد [۱۸،۲۵]. فاز متحرک به صورت پله ای یا با فاصله به ستون جداسازی (Lot-91108-10030-30) تزریق شد. محلول های خروجی در ظرف های شیشه ای (درون هر کدام به اندازه ۲۰ mL) برای تجزیه جمع آوری شد. برای این آزمایش ابتدا با ۱۰۰٪ کلروفورم به مدت ۵ دقیقه سپس با کلروفورم و متانول (۶۰ به ۴۰) به مدت ۴۵ دقیقه و در انتها ۱۰۰٪ متانول به مدت ۱۰ دقیقه تزریق ها انجام شد.

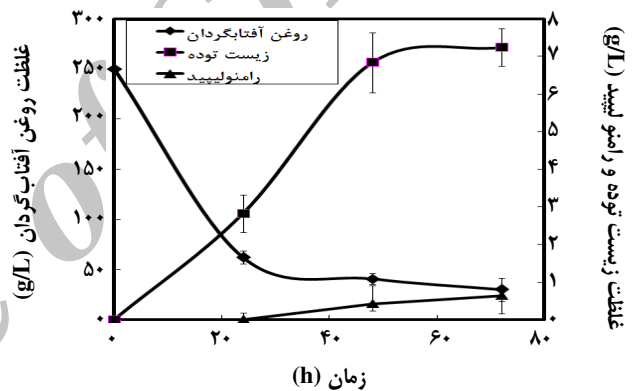
نتیجه ها و بحث

بررسی رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 با منبع کربن روغن آفتاب گردان

مقدارهای رامنولیپید، روغن آفتاب گردان و زیست توده در زمان های 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 می دهد تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی رشد شروع شده و تا فاز سکون ادامه می یابد.



شکل ۱- مراحل و روند استخراج رامنولیپید.



شکل ۲- منحنی رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 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^(۱) (United States, Saukville) به عنوان شاهد استفاده شد [۲۵]. استاندارد جنیل شامل رامنولیپیدهای ۱ و ۲ و ۳ 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 HPLC^(۲) (Agilent 1100 Series) استفاده شد. ستون استفاده شده در دستگاه C18 با قطر ۵ میکرومتر و شدت جریان تزریق ۰.۸ mL/min بود. در صورتی که از روغن آفتاب گردان

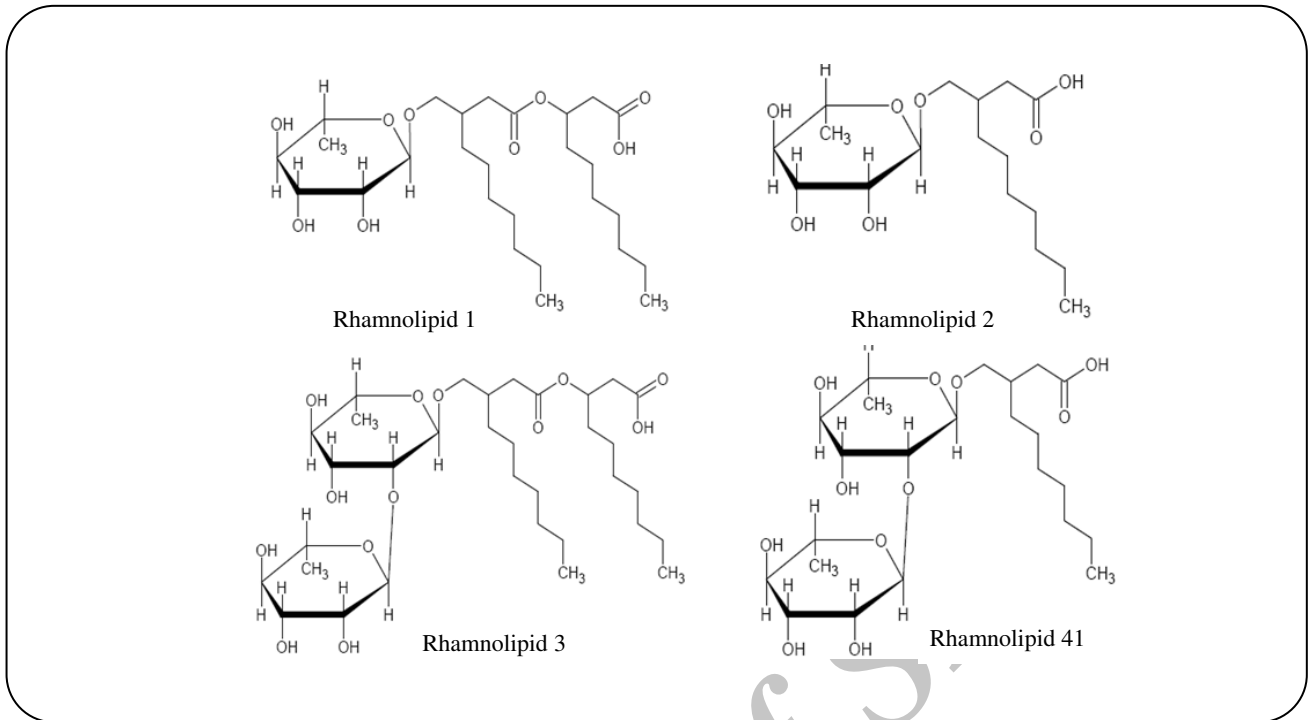
(۱) Jenil

(۲) High performance liquid chromatography

(۳) 4-Bromphenacylbromid(C6H6Br2O) in acetonitril

(۴) Triethylammonium (C5H15N) in acetonitril

(۵) Medim performance liquid chromatography

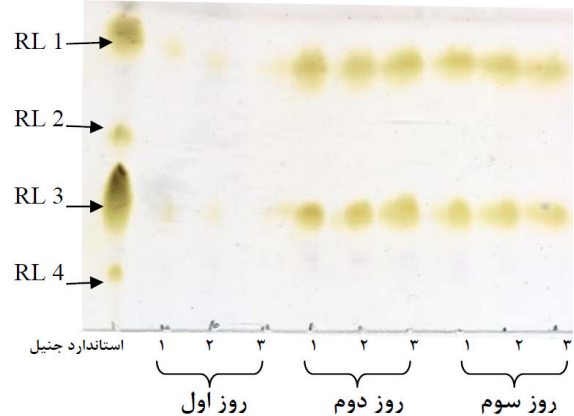


شکل ۳- ساختمان چهار نوع رامنولپید گوناگون تولید شده توسط باکتری *Sudomonas aeruginosa* [۶].

تأیید تولید رامنولپید به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

بعد از استخراج رامنولپید به وسیله اتیل استات برای اثبات تولید آن، ابتدا به بررسی تولید آن به وسیله آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک پرداخته شد. از شاهد و استاندارد جنیل برای تشخیص رامنولپید استفاده شد. استاندارد جنیل دارای چهار نوع رامنولپید گوناگون شناخته شده می‌باشد که توسط باکتری‌های *Sudomonas aeruginosa* تولید می‌شوند. در شکل ۳ انواع رامنولپیدهای شناخته شده نشان داده شده است [۶].

نتیجه‌های آزمایش TLC در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 توانسته است رامنولپید ۱ و ۳ را تولید کند. همچنین از این شکل مشخص است که در روز اول رامنولپید 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 این پژوهش می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تولید رامنولپید در فاز لگاریتمی رشد شروع و تا فاز سکون ادامه می‌یابد. این نتیجه با نتیجه‌های دیگر پژوهشگران سازگار است [۱۶، ۱۹ و ۱۵].

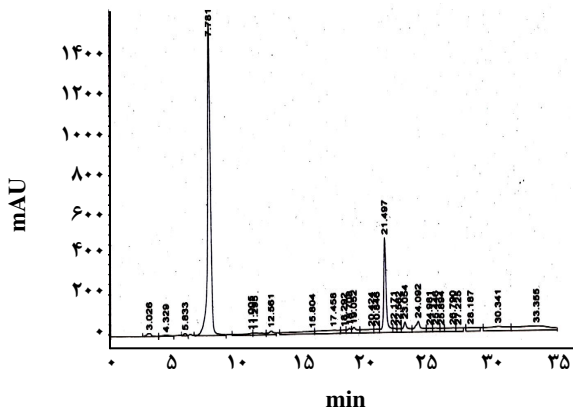


شکل ۴- نتیجه‌های کروماتوگرافی لایه نازک برای رامنولپید تولید شده. چهار لکه سمت چپ به عنوان شاهد از استاندارد جنیل به دست آمده است.

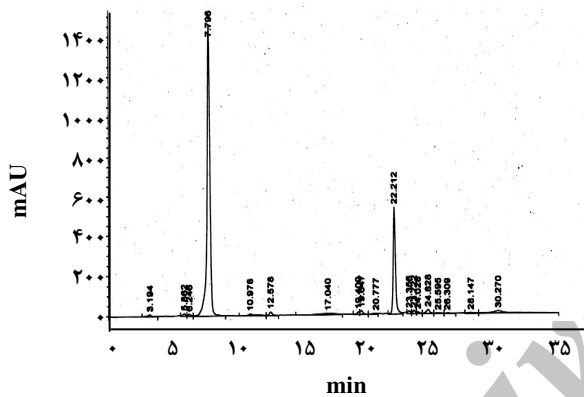
این نتیجه با نتیجه‌های دیگر پژوهشگران مانند مولر و همکاران^(۱) [۱۵] و هورمان و همکاران^(۲) [۱۶] و سیلدتاک و همکاران سازگار است [۱۹]. این مشاهده‌ها نشان دهنده‌ی معتبر بودن نتیجه‌های این پژوهش می‌باشد. برای بررسی تکرارپذیری، کلیه آزمایش‌ها در سه ارلن به طور همزمان و در شرایط یکسان انجام شد.

(۱) Müller et al.

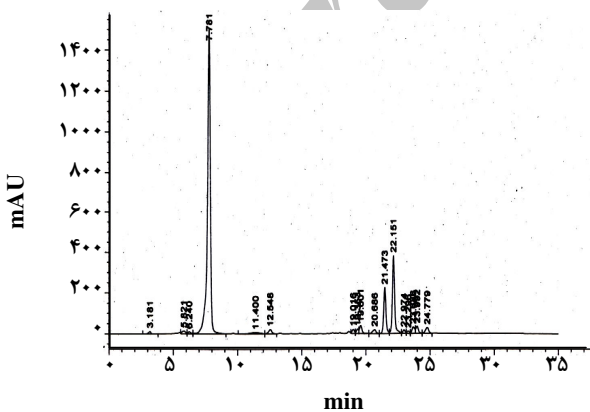
(۲) Hörmann et al.



شکل ۵ - نمونه‌ای از نتیجه‌های دستگاه HPLC در مورد تزریق رامنولیپید ۳ به تنهایی.



شکل ۶ - نمونه‌ای از نتیجه‌های دستگاه HPLC در مورد تزریق رامنولیپید ۱ به تنهایی.



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

اندازه‌گیری غلظت و بررسی تولید رامنولیپید به وسیله HPLC

برای اندازه‌گیری غلظت رامنولیپید ابتدا باید دستگاه را کالیبره نمود. شکل‌های ۵ و ۶ نمونه‌ای از نتیجه‌ها 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 aeruginosa* 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 می‌شود و هم غلظت اندازه‌گیری می‌شود.

جداسازی رامنولیپید ۱ و ۳ 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 ۵ mL از رامنولیپید MPLC با دستگاه صورت گرفت. 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. همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود رامنولیپید ۱ و ۳ به طور کامل از هم جدا شده است. برای جمع آوری رامنولیپید ۱ ظروف شیشه‌ای شماره ۳۷ تا ۴۷ و همچنین برای به دست آوردن رامنولیپید ۳ ظرف‌های شیشه‌ای شماره ۱۰۰ تا ۵۹ با هم مخلوط شدند. پس از تبخیر حلال رامنولیپید ۱ و ۳ 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 می‌باشد.

نتیجه‌های آزمایش کشش سطحی و بین سطحی

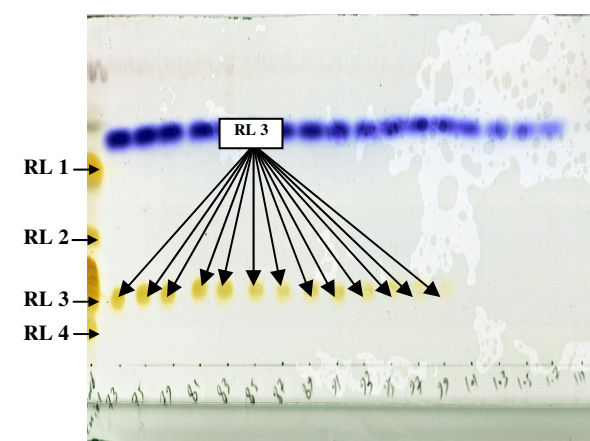
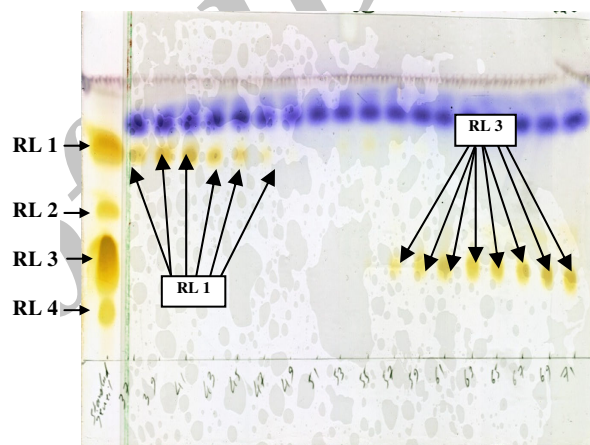
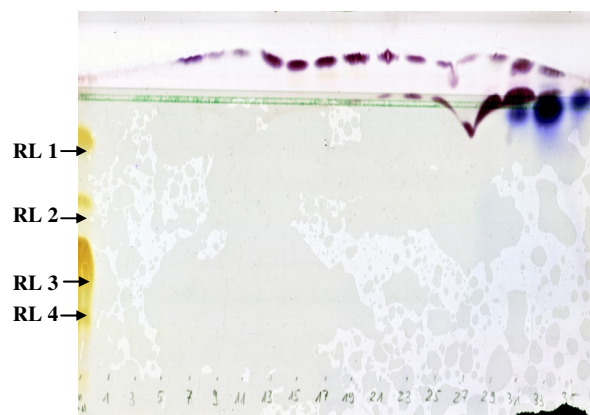
نتیجه‌ها نشان می‌دهد برای بیوسورفکتانت خالص به دست آمده در این پژوهش، کمترین مقدار غلظت بیوسورفکتانت که بعد از آن دیگر کشش سطحی و بین سطحی تغییر نمی‌کند، برابر 120 mg/L می‌باشد یا به عبارت دیگر کشش سطحی از 68 mN/m به 26 mN/m و بین سطحی از 38 mN/m به 2 mN/m در غلظت CMC می‌رسد. شکل ۱۰ روند کاهش کشش سطحی و بین سطحی رامنولیپید تولید شده را نشان می‌دهد. از آنجایی که کاهش کشش سطحی و بین سطحی یکی از عوامل بسیار مهم

در فرایند ازدیاد برداشت نفت می‌باشد، نتیجه‌های به‌دست آمده از این آزمایش نشان دهنده کارا بودن رامنولیبید تولید شده در این پژوهش در کاهش کشش سطحی و بین سطحی است. سویه‌های مولد رامنولیبید که توسط پژوهشگران دیگر جداسازی شده اند توانسته بودند کشش سطحی محیط رشد را از 69 mN/m تا $25-30 \text{ mN/m}$ کاهش دهند [۱۵ و ۱۶ و ۱۸]. بنابراین نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش قابل مقایسه با نتیجه‌های پژوهش‌های قبلی می‌باشد.

بررسی آزمایش ازدیاد برداشت نفت در مغزه

این آزمایش‌ها شامل بررسی اثر رامنولیبید در غلظت CMC یعنی در 120 mg/L ، بر روی ازدیاد برداشت نفت می‌باشد که در ابتدا سیلاب‌زنی با آب و سپس با محلول رامنولیبید تولید شده می‌باشد. در تمام آزمایش‌ها مدل به صورت افقی قرار گرفت. بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با آب و بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با محلول بیوسورفکتانت در این آزمایش‌ها بررسی، اندازه‌گیری و تحلیل شدند. برای انجام آزمایش‌های 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. سپس آزمایش سیلاب‌زنی با آب نمک 1% و سپس سیلاب‌زنی با محلول رامنولیبید 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 10 میلی لیتر در ساعت بود. در تمام آزمایش‌های سیلاب‌زنی مغزه پس از مرحله تخلیه اشباع آب همزاد 28% و در نتیجه اشباع نفت اولیه 72% به‌دست آمد. بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با آب، $61/8\%$ به‌دست آمد. سپس سیلاب‌زنی با محلول‌های بیوسورفکتانت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با رامنولیبید، $68/56\%$ به‌دست آمد یا به عبارت دیگر سرانجام $67/6\%$ برای رامنولیبید ازدیاد برداشت ثالثیه نفت به‌دست آمد. نتیجه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

ازدیاد برداشت نفت را می‌توان به افزایش عدد موینگی ربط داد زیرا به تله افتادن نفت در حفره‌های سنگ مخزن با استفاده از نیروهای ویسکوز و نیروهای موینگی کنترل می‌شود. عدد موینگی به‌صورت نسبت نیروهای ویسکوز به نیروهای موینگی تعریف می‌شود ($N_c = \mu v / \delta$) که در این معادله μ و v به ترتیب سرعت و ویسکوزیته سیال جابه‌جا کننده، δ کشش بین سطحی آب و نفت می‌باشد [۱۸]. این معادله نشان می‌دهد

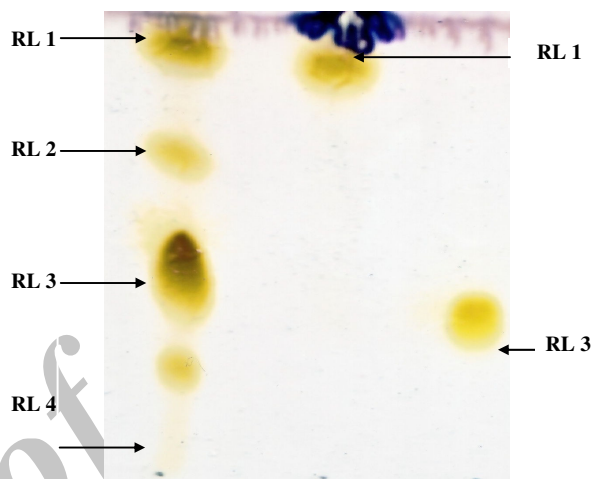


شکل ۸ - اثبات جداسازی رامنولیبید ۳۱ از نمونه‌های جمع شده در ظروف شیشه‌ای با استفاده از TLC.

جدول ۲- تاثیر سیلابزنی با آب و بیوسورفکتنت روی ازدیاد برداشت نفت.

نفت در جا mL	سیلابزنی با آب			سیلابزنی با بیوسورفکتنت بعد از سیلابزنی با آب		
	بازیافت نفت		نفت باقیمانده mL	بازیافت نفت		
	mL	نفت در جا %		mL	نفت در جا %	کل %
۶۵	۴۰٫۱۷	۶۱٫۸	۲۴٫۸۳	۴٫۴	۶٫۷۶	۶۸٫۵۶

که عدد موینگی با کاهش کشش بین سطحی افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد وجود رامنولیپید تولید شده به مقدار چشمگیری موجب کاهش کشش بین سطحی آب و نفت می‌شود و منجر به افزایش عددموینگی و در نهایت افزایش برداشت نفت می‌شود. نتیجه‌گیری کلی از این قسمت این است که بیوسورفکتنت تولید شده از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 دارای پتانسیل خوبی در کاهش کشش سطحی و بین سطحی است. رامنولیپید تولید شده باعث ازدیاد برداشت ثالثیه نفت ۶٫۷۶٪ در مغزه شد. برای افزایش بازده ازدیاد برداشت نفت می‌توان از روش‌های کمکی مانند تزریق بیوسورفکتنت به همراه پلیمر و یا تزریق مخلوطی از بیوسورفکتنت‌ها و سورفکتنت‌های شیمیایی نیز استفاده نمود.



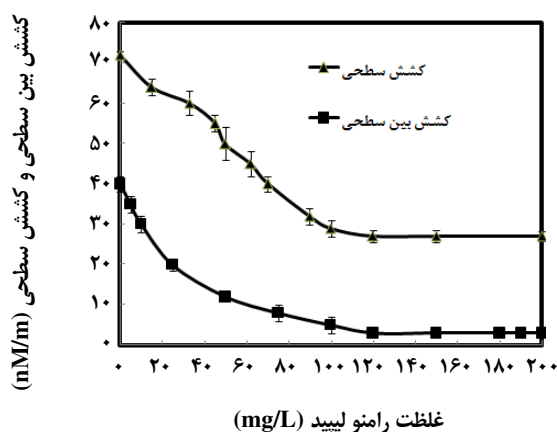
۱	۲	۳
استاندارد جنیل	مخلوط ۳۷ تا ۴۷	مخلوط ۱۰۰ تا ۵۹

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان دهنده موفقیت‌آمیز بودن تأثیر بیوسورفکتنت تولید شده از یک باکتری بومی ایرانی در ازدیاد برداشت نفت می‌باشد. در این پژوهش تولید رامنولیپید به کمک کشت ناپیوسته به روش متداول آزمایشگاهی بررسی شد و پس از خالص‌سازی آنها، آزمایش‌های ازدیاد برداشت نفت انجام پذیرفت. کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهم‌ترین و اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتنت محسوب می‌شود. سویه‌های مولد بیوسورفکتنت که توسط پژوهشگران دیگر جداسازی شده‌اند توانسته بودند کشش سطحی محیط رشد را از ۶۹ mN/m تا ۲۵-۳۰ mN/m کاهش دهند درحالی که رامنولیپید تولید شده توسط سویه‌های مورد بررسی در این پژوهش کشش سطحی آب از ۷۰ mN/m به حدود ۲۶ mN/m رسید که نتیجه‌های به دست آمده قابل مقایسه با نتیجه‌های پژوهش‌های قبلی می‌باشد.

بررسی رشد *Pseudomonas aeruginosa* NP2 در ارلن با اندازه‌گیری غلظت رامنولیپید توسط HPLC و TLC نشان داد که تولید رامنولیپید در فاز لگاریتمی شروع و تا فاز سکون ادامه می‌یابد.

شکل ۹- اثبات جداسازی رامنولیپید ۱ و ۳ از دو نمونه مخلوط شده (شماره ۳۷ تا ۴۷ و شماره ۱۰۰ تا ۵۹) در ظروف شیشه‌ای با استفاده از TLC.



شکل ۱۰- نمودار تغییرهای کشش سطحی و بین سطحی بر حسب غلظت رامنولیپید تولید شده.

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

قدردانی

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 می‌نماید. 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 آفتاب گردان برابر 0.8 g/L در راکتور زیستی به دست آمد. البته برای افزایش تولید می‌توان 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 ۱ و ۳ اثبات شد. جداسازی رامنولیپید نوع ۱ و رامنولیپید نوع ۳ از همدیگر با دستگاه MPLC صورت گرفت. نتیجه‌های TLC نشان داد رامنولیپیدهای ۱ و ۳ به طور کامل از هم جدا شده است که از این موضوع می‌توان در صنایع دارویی استفاده نمود. آزمایش‌های ازدیاد برداشت نفت نشان داد رامنولیپید تولیدی این پژوهش باعث 6.76% ازدیاد برداشت نفت می‌شود. این افزایش برداشت نفت می‌تواند ناشی از تاثیر رامنولیپید تولید شده روی کشش بین سطحی باشد. به هر حال در پایان باید به این نکته توجه داشت که فناوری استخراج نفت و کاربرد بیوسورفکتانت‌ها

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 Producing 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).
- [6] رضانی ر، مظاهری اسدی م، آذین م، تولید رامنولیپید توسط باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* از ملاس چغندر قند تیمار شده، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، (۳) ۹، ص. ۵۲۴ (۱۳۹۰).
- [7] 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).

- [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., Bharucha C., 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 میکروارگانیزم *سودوموناس آرچینوزا* 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 آرچینوزا*، *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 بیوسورفکتانت 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] Kaeppli O., Wuremlos L., Zurich S.D., Production of Rhamnolipids, *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).

- [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** , p. 53 (2004).
- [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).

Archive of SID