

پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی

عنوان طرح:

تبدیل مولکولهای آلی سنگین نفت به مولکولهای سبکتر با استفاده از

بیومولکولها و نانو ذرات مغناطیسی

کد طرح: ۵۵ - ۲۱۸۱

گزارش نهایی

محل اجرا: پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی

گروه پژوهشی: فیزیک

تاریخ اختتام طرح:

دی ماه ۱۳۹۴

مشخصات مسئول و همکاران طرح:

سمت در طرح	تخصص	رشته تحصیلی	نام و نام خانوادگی
مجری	دکتری	بیوفیزیک	جلیل بدراقی
مجری	کارشناسی ارشد	بیوفیزیک	الهه پورفخرایی
همکار	دکتری	بیوفیزیک	اقدس بنایی
همکار	دکتری	بیوشیمی	محبوبه نظری
همکار	کارشناسی ارشد	بیوفیزیک	فاطمه ممشلی
همکار	کارشناسی ارشد	بیوفیزیک	صبورا اشکوریان
همکار	کارشناسی	شیمی	فاطمه نظری

Archive of SID

چکیده:

تقاضای جهانی برای نفت و فرآورده های آن و کاهش تولید طبیعی از مخازن نفت سبک توجه به نفت سنگین و بهره برداری از آن را به شدت افزایش داده است. در ایران با وجود ذخایر فراوان نفت سنگین و وجود باقیمانده های سنگین نفتی در ستون تقطیر پالایشگاه ها، مطالعات و تحقیقات کاربردی گسترده و چشمگیری در مورد شکست مولکولی نفت سنگین گزارش نشده است. از مشکلات نفت سنگین بالا بودن گرانیوی آن به خاطر حضور مولکولهای سنگین است، که سبب می شود استخراج، حمل و نقل و تولید فرآورده های نفتی با ارزش از آن به سختی امکان پذیر باشد. در این پروژه جداسازی بیومولکولها از گونه هایی که در طبیعت واکنش های شکست مولکولهای نفتی را کاتالیز می کنند صورت گرفت و نانوذرات اکسید آهن که در شکست این ترکیبات موثرند، سنتز شدند. سپس اثرات بیومولکولها و نانوذرات بر ترکیبات سنگین آلی مورد آزمایش و آنالیز گاز کروماتوگرافی قرار گرفت و در نهایت برای کاربردی کردن نتایج، نفت سنگین تحت واکنش با کنسرسیون قرار گرفته و به کمک دستگاه گاز کروماتوگرافی و تست SARA مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. نتایج آنالیزی میزان موفقیت بیومولکولها، نانوذرات و کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات را تعیین نمود. بیومولکولها، نانوذرات و کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات به ترتیب بهترین شکست را در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و $PH=5$ ، دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و $PH=5$ و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و $PH=5$ را نشان دادند. میزان موفقیت نانوذرات در این شرایط محیطی کمتر از بیومولکولها مشاهده گردید.

امید است نتایج این طرح در حوزه بهره برداری بهتر از نفت سنگین و باقیمانده ستون تقطیر راه گشا باشد و سبب بهبود درآمدی و رشد اقتصادی در این حوزه گردد.

کلمات کلیدی: نفت سنگین، بیومولکولها، نانوذرات اکسید آهن، شکست کاتالیستی، کاهش گرانیوی.

فهرست مطالب:

۹	فصل اول: مقدمه
۹	۱-۱) اهداف طرح و دلایل انجام آن
۱۰	۱-۲) موارد مصرف محصول طرح یا کاربردهای آن
۱۲	۱-۳) میزان نیاز کشور
۱۴	فصل دوم: تاریخچه و سوابق اجرای طرح در ایران و جهان
۱۴	۲-۱) سوابق استفاده از روش های زیستی در ارتقاء کیفیت نفت خام سنگین
۱۵	۲-۱-۱) استفاده از بیومولکول ها در ازدیاد برداشت نفت خام
۱۶	۲-۱-۲) استفاده از روش های زیستی برای تجزیه آسفالتن
۱۹	۲-۱-۳) گوگردزدایی با استفاده از روش های زیستی
۱۹	۲-۱-۴) نیتروژن زدایی با استفاده از روش های زیستی
۱۹	۲-۱-۵) فلززدایی با استفاده از روش های زیستی
۲۰	۲-۱-۶) آروماتیک زدایی با استفاده از روش های زیستی
۲۰	۲-۲) استفاده از نانوکاتالیست ها در صنعت نفت
۲۱	۲-۲-۱) نانوذرات در میدانهای نفتی
۲۲	۲-۲-۲) نانوذرات مغناطیسی و جداسازی نفت در محیطهای آبی
۲۳	۲-۳) سنتز نانوذرات اکسید آهن
۲۳	۲-۳-۱) همرسوبی
۲۴	۲-۳-۲) تجزیه گرمایی
۲۵	۲-۳-۳) میکروامولسیون
۲۶	۲-۳-۴) سنتز هیدروترمال
۲۷	۲-۳-۵) سنتز آواشیمی
۳۰	فصل سوم: شرح تخصصی

۳-۱) نفت خام ۳۰

- ۳۰ (۳-۱-۱) پارافین ها:
- ۳۰ (۳-۱-۲) نفتن ها:
- ۳۰ (۳-۱-۳) آروماتیک ها:
- ۳۱ (۳-۱-۴) رزین ها-آسفالتین ها:
- ۳۲ (۳-۲) نفت سنگین
- ۳۵ (۳-۲-۱) تولید نفت از مخازن نفت سنگین
- ۳۶ (۳-۳) کاربرد نانوذرات در شکست مولکولهای آلی سنگین
- ۳۸ (۳-۴) کاربرد بیومولکولها در شکست مولکولهای آلی سنگین
- ۴۰ (۳-۴-۱) شکست ترکیبات آلی توسط قارچ ها
- ۴۳ (۳-۴-۲) تولید آنزیم های لیگنینولایتیک طی تجزیه هیدروکربن های چند حلقه ای
- ۴۴ (۳-۴-۳) دسترسی زیستی هیدروکربن های چند حلقه ای
- ۴۸ فصل چهارم: شرح آزمایش ها و کارهای اجرایی
- ۴۸ (۴-۱) مواد، دستگاه ها و تجهیزات
- ۴۸ (۴-۱-۱) مواد شیمیایی مورد استفاده
- ۵۲ (۴-۱-۲) دستگاه ها و تجهیزات مورد استفاده
- ۵۴ (۴-۲) شناسایی و تعیین بهترین گونه ها
- ۵۴ (۴-۳) جمع آوری نمونه های قارچ
- ۵۵ (۴-۴) بررسی و آماده سازی قارچها جهت واکنش با ترکیبات سنگین نفت
- ۵۵ (۴-۵) اثر قارچ های بومی بر شکست ترکیبات سنگین نفت
- ۵۵ (۴-۶) آنالیز گاز کروماتوگرافی
- ۵۶ (۴-۶-۱) آماده سازی نمونه ها جهت گاز کروماتوگرافی
- ۵۶ (۴-۷) شناسایی گونه بومی قارچ منتخب
- ۵۷ (۴-۷-۱) طراحی پرایمر
- ۵۷ (۴-۷-۲) استخراج ماده ژنتیکی و الکتروفورز
- ۵۸ (۴-۷-۳) واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

- ۵۹ تعیین توالی ژن ناحیه ITS و تعیین گونه قارچ (۴-۷-۴)
- ۶۰ سنتز نانوذرات (۴-۸)
- ۶۰ سنتز نانوذرات Fe_3O_4 (۴-۸-۱)
- ۶۰ سنتز نانوذرات $\delta-Fe_2O_3$ (۴-۸-۲)
- ۶۱ تهیه کشت خالص از قارچ منتخب (۴-۹)
- ۶۱ جداسازی بیومولکولها (۴-۱۰)
- ۶۱ کشت نمونه های قارچ تعیین شده در محیط فاقد ترکیبات آلی سنگین و در حضور ترکیبات آلی سنگین (۴-۱۰-۱)
- ۶۱ بیومولکولهای داخل سلولی (۴-۱۰-۲)
- ۶۳ بیومولکولهای خارج سلولی (۴-۱۱)
- ۶۴ آنالیز تجزیه ترکیبات سنگین نفتی (۴-۱۱-۱)
- ۶۴ بررسی برنامه های دمایی دستگاه گاز کروماتوگرافی (۴-۱۱-۱)
- ۶۷ بر هم کنش نانوذرات با مولکولهای سنگین نفت در pH های مختلف (۴-۱۲)
- ۶۸ بر هم کنش بیومولکول ها با مولکولهای سنگین نفت در pH های مختلف (۴-۱۳)
- ۶۸ بر هم کنش نانوذرات با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف (۴-۱۴)
- ۶۸ بر هم کنش بیومولکولها با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف (۴-۱۵)
- ۷۰ آنالیز SARA (۴-۱۵)
- ۷۲ فصل پنجم: نتیجه گیری (۵-۱)
- ۷۲ جمع آوری نمونه های قارچ (۵-۲)
- ۷۲ بررسی و آماده سازی قارچها جهت واکنش با ترکیبات سنگین نفت (۵-۳)
- ۷۳ اثر قارچ های بومی بر شکست ترکیبات سنگین نفت (۵-۴)
- ۷۴ آماده سازی نمونه ها جهت گاز کروماتوگرافی (۵-۵)
- ۷۴ نتایج حاصل از دستگاه گاز کروماتوگرافی و انتخاب بهترین قارچ (۵-۶)
- ۷۹ شناسایی گونه بومی قارچ منتخب (۵-۶-۱)
- ۷۹ استخراج ماده زنتیکی و الکتروفورز (۵-۶-۲)
- ۷۹ واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) (۵-۶-۳)
- ۸۰ تعیین توالی ژن ناحیه ITS و تعیین گونه قارچ (۵-۶-۳)

- ۸۱ (۵-۷) سنتز نانوذرات
- ۸۱ (۵-۷-۱) سنتز نانوذرات Fe_3O_4
- ۸۲ (۵-۷-۲) سنتز نانوذرات $\delta-Fe_2O_3$
- ۸۲ (۵-۸) تهیه کشت خالص از قارچ منتخب
- ۸۳ (۵-۹) جداسازی بیومولکولها
- ۸۳ (۵-۹-۱) کشت نمونه های قارچ تعیین شده در محیط فاقد ترکیبات آلی سنگین و در حضور ترکیبات آلی سنگین
- ۸۴ (۵-۹-۲) بیومولکولهای داخل سلولی
- ۸۴ (۵-۹-۳) بیومولکولهای خارج سلولی
- ۸۵ (۵-۱۰) بررسی برنامه های دمایی دستگاه گاز کروماتوگرافی
- ۸۵ (۵-۱۰-۱) آلکان ها و گزینه انتخابی هگزادکان
- ۸۵ (۵-۱۰-۲) آلکن ها و گزینه انتخابی اسکوالن
- ۸۶ (۵-۱۰-۳) آروماتیک ها و گزینه انتخابی آنتراسن
- ۸۷ (۵-۱۰-۴) رزین ها - آسفالتین ها و گزینه انتخابی دی بنزوفوران
- ۸۷ (۵-۱۱) بر هم کنش نانوذرات با مولکولهای سنگین نفت در pH های مختلف
- ۹۰ (۵-۱۲) بر هم کنش بیومولکول ها با مولکولهای سنگین نفت در pH های مختلف
- ۹۲ (۵-۱۳) بر هم کنش نانوذرات با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف
- ۹۴ (۵-۱۴) بر هم کنش بیومولکولها با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف
- ۱۰۳ منابع:

فصل اول: کلیات تحقیق

Archive of SID

فصل اول: کلیات تحقیق

۱-۱) اهداف طرح و دلایل انجام آن

هدف این طرح تبدیل مولکولهای آلی سنگین نفت به مولکولهای سبکتر با استفاده از بیومولکولها و نانو ذرات مغناطیسی است. نفت خام از مهم ترین منابع انرژی در دنیاست. نفت به عنوان ماده خام در صنایع بسیاری به کار می رود؛ در صنعت پالایش نفت خام و پتروشیمی، نفت خام از طریق فرآیندهای تکنولوژیک مختلف به محصولات مصرفی نظیر بنزین، روغن ها، روغن های پارافینی، روان سازها، آسفالت، نفت سوختی داخلی، وازلین و پلیمرها پالایش می شود. محصولات مشتق از نفت در بسیاری از فرآیندهای شیمیایی دیگر نیز بکار می روند.

سنگین بودن نفت و داشتن محتوای دارای وزن مولکولی بالا و ویسکوزیته زیاد از معضلات صنعت نفت است. ایران دارای مخازن نفت سنگین بسیار است که شناخته شده ترین میداین نفت سنگین ایران شامل کوه موند، زاغه، پایدار، پایدار غرب، سروش، پارس شمالی، فردوس، سوسنگرد، رامشیر، حوضه رسوبی زاگرس همانند شادگان، اهواز، منصوری، چشمه خوش و بوشهر است. بخش عمده نفت سنگین ایران در کوه موند با ابعاد مخزن 16×90 کیلومتر در 70 کیلومتری جنوب شرقی بوشهر واقع شده است. افزایش کیفیت نفت خام سنگین در حفظ سرمایه های ملی بسیار مؤثر است. در همین راستا و به امید یافتن مناسب ترین روش برای کاهش گرانبوی نفت سنگین، محققان پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی بر آن شده اند که تحقیقات کاربردی و جامعی در این زمینه انجام دهند و قدم کوچکی در مسیر پیشرفت روزافزون کشور عزیزمان بردارند. با توجه به میزان بالای ذخایر نفت سنگین ایران و نیاز به استفاده از این میداین نفتی انتظار می رود که تحقیق در این زمینه در اولویت بالایی قرار گیرد. این طرح برای اولین بار در سطح کشور انجام می پذیرد و نتایج آن می تواند کاربردهای فراوانی در به کارگیری بهینه نفت سنگین، افزایش میزان درآمد حاصل از فروش نفت سبک تر، تولید فرآورده های ثانویه با کیفیت بالاتر، شکست باقیمانده های سنگین نفتی و حل معضلات زیست محیطی ناشی از آلودگیهای نفتی داشته باشد.

ذخایر نفت سنگین در دنیا شش تریلیون بشکه تخمین زده می شود که تقریباً دو برابر میزان ذخایر نفت معمولی است، ولی با توجه به حجم عظیم میزان ذخایر نفت سنگین، به کارگیری نفت سنگین به سادگی نفت سبک صورت نمی گیرد. چرا که مخازن نفت سنگین به خاطر دارا بودن ویسکوزیته بالا با مشکلات فراوانی در حین برداشت و انتقال روبه رو می شوند. امروزه در دنیا برداشت از مخازن نفت سنگین در کشورهای توسعه یافته به

طور چشمگیری رو به افزایش است. به طوری که برآوردها نشان می دهد، تولید نفت سنگین کانادا در آینده نزدیک از مرز ۱/۲ میلیون بشکه در روز می گذرد، در کشور ونزوئلا طبق برنامه ریزی انجام شده، شرکتهای نفتی قصد دارند تولید را به ششصد هزار بشکه در روز برسانند. دولت چین نیز قصد دارد در آینده نزدیک میزان تولید نفت سنگین را به صد و پنجاه هزار بشکه در روز برساند. این در حالی است که در کشور ایران با توجه به ذخایر قابل ملاحظه نفت سنگین، مطالعات و تحقیقات کاربردی گسترده و چشمگیری در مورد نفت سنگین انجام پذیرفته است. با توجه به میزان بالای ذخایر نفت سنگین ایران و نیاز به استفاده از این میادین نفتی انتظار می رود که تحقیق در این زمینه در اولویت بالایی قرار گیرد. مسئولین همواره به دنبال یافتن راهی برای بهره برداری بیشتر از منابع نفت سنگین و تولید فرآورده های نفتی با توجیه اقتصادی می باشند، زیرا روش هایی که تا به امروز به کار گرفته شده اند مقرون به صرفه نبوده اند.

در همین راستا و به امید یافتن مناسب ترین روش برای کاهش گرانروی نفت سنگین، استفاده از نانو ساختارها و مولکولهای زیستی بسیار کم هزینه بوده و در مقیاس مولکولی با شکست زنجیره های هیدروکربنی به کاهش میزان گرانروی کمک می کنند. از سوی دیگر مواد زیستی آلودگیهای ثانویه استفاده از ترکیبات شیمیایی را در پی نخواهند داشت.

۱-۲) موارد مصرف محصول طرح یا کاربردهای آن

هدف این پژوهش شکست ترکیبات سنگین نفت و سبک تر نمودن آنها است که کاربردهای بسیاری را می تواند داشته باشد.

کاربرد اول در این راستا بهره برداری بیشتر از مخازن نفت سنگین است. مصرف مواد نفتی ایران هر سال حدود ۷ درصد افزایش می یابد و از سوی دیگر میزان تولید سالیانه مخازن رو به کاهش است. با توجه به کاهش نرخ تولید و افزایش مصرف تا سال ۲۰۲۰ میلادی صادرات نفتی ایران به صفر میل می کند. برای پویایی حداقلی اقتصاد انرژی از یک سو و کاهش منابع نفت سبک قابل استحصال، افزایش تقاضای نفت و لزوم به روزرسانی نرخ تولید تعهدات نفتی ایران در OPEC از سوی دیگر، تولید و برداشت نفت از مخازن سنگین و فوق سنگین بسیار ضروری به نظر می آید. ایران دارای مخازن نفت سنگین بسیار است، دوران تولید بی دردسر و راحت نفت سبک به سر آمده است و در آینده، نه تنها لازم است که به سوی توسعه فن آوری افزایش بهره وری مخازن در حال اتمام نفت سبک گام برداشته شود، بلکه باید به توسعه فن آوری هایی که تولید از مخازن عظیم نفت سنگین و حتی ماسه های قیری را میسر می سازد، همت گماشت.

کاربرد دوم در این زمینه افزایش میزان درآمد حاصل از فروش نفت است. با توجه به خبر دنیای صنعت در ۳۰ مهر سال ۹۱ نفت سبک ایران ۱۱۱ دلار و نفت سنگین در محدوده ۱۰۸ دلار در بازار جهانی مورد معامله قرار می گیرد. هر روز میلیونها بشکه نفت سنگین با این تفاوت قیمت صادر می شود. هر سال با تبدیل نفت سنگین صادراتی به نفت سبک و صدور آن می توان میلیاردها دلار افزایش درآمد داشت. با توجه به نیاز بشریت به نفت و کاهش ذخایر این ماده با ارزش همواره تقاضا برای نفت وجود خواهد داشت.

کاربرد سوم با سبک شدن نفت، تولید فرآورده های ثانویه مانند بنزین نیز کیفیت بالاتری یافته و با فروش مشتقات سبک تر نفت درآمد بسیار بیشتری حاصل می گردد. یکی از مهمترین اهداف پالایشگاه ها افزایش تولید محصولات سبک تر است. تولید نفت کوره و مازوت در ستون تقطیر از مشکلات در حوزه پالایش نفت است. بدین طریق از یک سو حفظ سرمایه های ملی و جلوگیری از خام فروشی که از سیاست های کلان حکومت جمهوری اسلامی ایران است تحقق می یابد، و از سوی دیگر به کار گیری سوخت با کیفیت، سبب پیشگیری از آلودگی های آلاینده ها می گردد که از معضلات مهم حال حاضر در کشور است.

کاربرد چهارم شکست ترکیبات سنگین در رسوبات نفتی است. از مهمترین مشکلاتی که در ذخیره سازی نفت وجود دارد، تجمع رسوبات نفتی در تانک های ذخیره نفت است. زمانی که مواد زاید و لجن های نفتی در تانکها رسوب می کند، سبب کاهش ظرفیت عملیاتی مخزن، تسریع در خوردگی کف مخازن، ایجاد مشکل در عمل بازرسی فنی کف مخازن، احتمال ایجاد اختلال در حرکت سقف شناور، انسداد اتصالات مخازن و به تله افتادن هیدروکربن های ارزشمند در میان رسوبات می شود. بنابراین تانکهای نفتی می بایست به طور مستمر و متناوب تمیز شوند که این پروسه، پرخطر، زمان بر و پرهزینه است. نتایج این پروژه با توجه به سنگین بودن مولکولها در رسوبات نفتی و کمک به شکست این ترکیبات سنگین نیز دستاوردی قابل توجه است. از سوی دیگر بازیابی نفت از رسوبات نفتی خود، امری مهم در جلوگیری از هدر رفتن نفت موجود در رسوبات است.

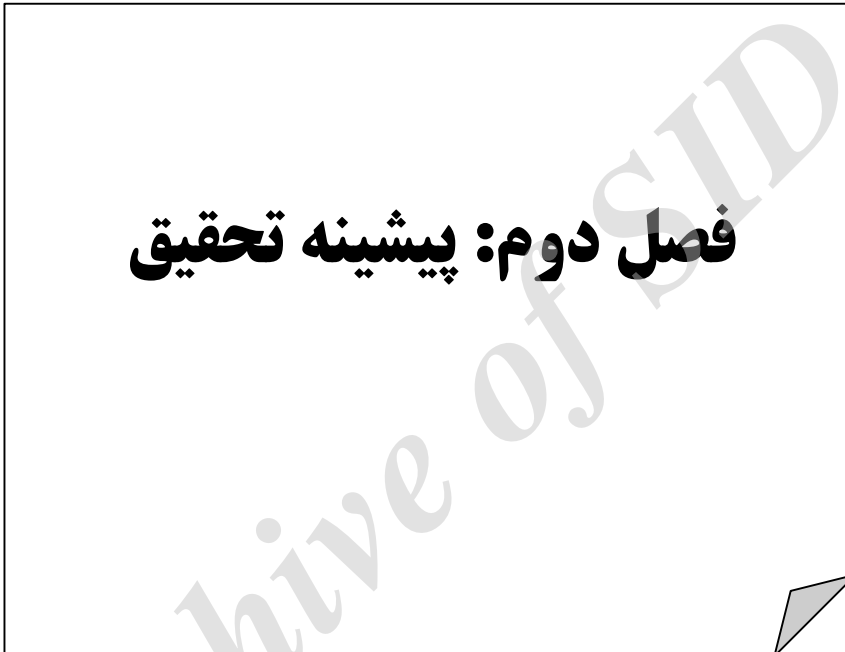
کاربرد پنجم حل معضلات زیست محیطی ناشی از آلودگیهای نفتی می باشد. امروزه روش های زیستی و نانو ساختارها به عنوان روشی موثر و کم هزینه در مقایسه با سایر روش ها به سرعت در کشورهای توسعه یافته در حال رشد است. از مهمترین کاربردهای این روش ها حذف آلودگیهای زیست محیطی است. آلودگیهایی که هر روزه با پیشرفت صنعت و تکنولوژی به محیط زیست تحمیل می شوند، هزینه های اجتناب ناپذیر به دنبال دارد. استفاده از ترکیبات شیمیایی در جهت حذف آلودگیهای زیستی علاوه بر هزینه های موجود، گاه شروع آلودگیهای جدیدی است که در نتیجه ورود ترکیبات شیمیایی به محیط زیست ایجاد می شوند.

از مشتریان و متقاضیان نتایج این پروژه شرکت ملی نفت ایران، صنایع پالایش و پتروشیمی، کلیه موسسات علمی و پژوهشی مرتبط با مخازن نفت سنگین، شرکت های فعال در زمینه تولید فرآورده های حاصل از نفت و سازمان محیط زیست می باشند.

۳-۱) میزان نیاز کشور

طرح حاضر برای دو گروه از ترکیبات آلی سنگین شامل باقیمانده سنگین در پالایشگاه و نفت خام سنگین ایران کاربردی است. در ایران ۹ پالایشگاه با ظرفیت های متفاوت وجود دارد که اگر میزان نفت خام مورد پالایش را به طور متوسط ۱۵۰۰۰۰ بشکه در نظر گرفته شود و با فرضی خوشبینانه میزان ۱۰٪ آن فرآورده سنگین باشد، میزان باقیمانده سنگین هر پالایشگاه ۱۵۰۰۰ بشکه در روز و در مجموع برای تمام پالایشگاه ها ۱۳۵۰۰۰ بشکه در روز خواهد بود. کاهش تولید باقیمانده های سنگین ستون تقطیر نفت خام از اولویت های مهم پالایشگاه هاست. تولید نفت سنگین در ایران افزایش یافته است، نفت سنگین ارزان تر از نفت سبک در بازارهای بین المللی به فروش می رسد و تولید فرآورده های نفتی سبکتر و با ارزشتر مانند بنزین از آن کمتر است. این در حالی است که می توان با سرمایه گذاری در این خصوص با تولید نفت سبکتر و یا فرآورده های نفتی با کیفیت سود کلانی برای کشور به دست می آورد که با حجم صادرات بالای نفت و فرآورده های آن طی سالها سود قابل توجهی را نصیب ملت ایران خواهد کرد. لذا پژوهش در زمینه شکست مولکولهای سنگین و سبک تر کردن آنها در نفت خام امری اجتناب ناپذیر است که نیاز به سرمایه گذاریهای کلان و جدیت فراوان دارد.

فصل دوم: پیشینه تحقیق



فصل دوم: تاریخچه و سوابق اجرای طرح در ایران و جهان

۲-۱) سوابق استفاده از روش های زیستی در ارتقاء کیفیت نفت خام سنگین

همه فعالیت هایی است که تولید و انتقال مواد را ساده تر کند و با ایجاد تغییرات سبب افزایش کیفی نفت شود، هدف ارتقاء کیفیت نفت سنگین هستند. واکنش های مختلف که بتوانند ویژگی های فیزیکی نفت خام را تغییر دهند و ویسکوزیته آن را بهبود بخشند شامل موارد ذیل هستند:

۱) شکستن یک پیوند درونی مولکول های آسفالتن برای کاهش میانگین وزن مولکولی

۲) اکسید کردن حلقه آروماتیک یک مولکول بزرگ برای تغییر میان کنش ها با سایر مولکول ها و القاء بازآرایی تجمعات برای رها سازی مولکول های به دام افتاده کوچک تر

۳) کلاته کردن فلزات موجود در تجمعات آسفالتن

۴) شکستن دو مولکول رزین یا مولکول های آروماتیک و تشکیل مولکولهای دارای وزن های مولکولی کمتر

۵) شکستن زنجیره های آلیفاتیک بزرگ [۱]

در سالهای اخیر بیومولکولها به عنوان گزینه ای کاربردی و دارای صرفه اقتصادی در جهت ارتقا کیفیت نفت خام مطرح هستند. ارتقاء کیفیت زیستی نفت های خام سنگین شامل ارتقاء کیفیت آسفالتن، بهبود ترکیب و فعالیت های مختلف دیگر است که عمدتاً در فرآوری پایین دست یاری رسان هستند. جدول ۱-۲ جزئیات بخش هایی را که در آنها فرآیندهای زیستی می توانند به ارتقاء کیفیت نفت خام و مولکول های هدفمند کمک کنند، ارائه کرده است [۱].

بهبود کیفیت شامل حذف گوگرد، نیتروژن و فلزات، تجزیه حلقه آروماتیک و هیدروژناسیون است. پس از تجزیه آسفالتن، ترکیبات نیتروژن، اکسیژن و گوگرد باید کاهش یابند تا کیفیت نفت خام سنگین ارتقاء یابد. این آلاینده ها نه تنها از طریق احتراق نفت در آلودگی محیط زیست بلکه در فرآوری نفت خام نیز از طریق مسمومیت کاتالیست نقش دارند. فرض بر این است که این مولکول ها مسئول افزایش ویسکوزیته هستند. حذف انتخابی آلاینده ها از نفت خام درحالیکه ارزش سوختی حفظ شود یک چالش تکنیکی دشوار است. فرآیندهای زیستی ممکن است در این زمینه بسیار مؤثر باشند. مثال های بسیاری در مورد ارتقاء کیفیت ترکیبات نفت خام از طریق روش های

زیستی در دسترس هستند؛ در حقیقت، برخی از این روش ها ممکن است برای نفت خام سنگین قابل کاربرد باشند [۱].

۱-۱-۲) استفاده از بیومولکول ها در ازدیاد برداشت نفت خام

شرکت مولتی بیوتک^۱ که یکی از زیرمجموعه شرکت ژئوداین تکنولوژی^۲ می باشد، بیوسورفاکتانت ها را به منظور کاربرد در افزایش برداشت و استخراج نفت خام به صورت صنعتی درآورده است. هیز^۳ و همکارانش نشان دادند، زمانی که نفت خام سنگین ونزوئلا با بیوسورفاکتانت ها تیمار شود، ویسکوزیته آن از cp ۲۰۰۰۰ به cp ۱۰۰ کاهش می یابد. بنابراین بعد از این تیمار، بخش سنگین نفت را می توان در خطوط لوله نفت به سهولت تا ۲۶۰۰۰ مایل پمپ کرد؛ در صورتی که تیمار با سورفاکتانت های شیمیایی ناموفق بوده است. بنت^۴ و همکارانش، استفاده از بیوسورفاکتانت را برای لجن زدایی^۵ یک تانک ذخیره نفت خام شرکت نفت کویت نشان دادند. این گروه موفق شدند ۹۰ درصد نفت محبوس در لجن را با استفاده از یک بیوسورفاکتانت مناسب، بازیابی نمایند.

در جدول ۱-۲ ضمن معرفی برخی مولکول های آلی سنگین مسئول در ایجاد برخی مشکلات صنعت نفت نحوه استفاده از بیوتکنولوژی در ارتقاء کیفیت نفت خام سنگین نشان داده شده است.

جدول ۱-۲: بیوتکنولوژی در ارتقاء کیفیت نفت خام سنگین

مشکل	مولکول های مسئول	چگونه میکروب ها این ویژگی را بهبود می بخشند؟
ویسکوزیته	آسفالتن رزین ها	۱. برش یک پیوند داخلی مولکول های آسفالتن ۲. تغییر یک حلقه آروماتیک از یک مولکول بزرگ از طریق اکسیداسیون ۳. القاء مولکول های دارای میانگین وزن مولکولی پایین تر ۴. رها کردن رزین های شبیه مولکول های کوچک
خوردگی کاتالیست، آلودگی زیست محیطی	۱. ترکیبات NSO در ساختار آسفالتن و در ماتریکس نفت خام ۲. فلزات به صورت نمک، پتروپورفرین ها و سایر کمپلکس ها در آسفالتن	۱. حذف انتخابی ترکیبات NSO بدون اثر بر ارزش سوختی ۲. تجزیه متالوپورفرین ها ۳. دپلمیریزاسیون مولکول های آسفالتن
تشکیل دوده و ویژگی های احتراقی	آروماتیک ها	میکروب ها های کاتالیز کننده برش هیدروکربن ها و هتروسایکل های مختلف

¹ Multi-biotech

² Geodyne Technology

³ Hayes

⁴ Banat

⁵ desludging

		ضعیف محصولات
محلول کردن و تجزیه	آسفالتن ها، موم	رسوب
جزء خارج سلولی یا کل سلول به عنوان دی امولسیفایر	مولکول های دوگانه دوست نفت، بخصوص جزء رزینی، شامل نفتتیک اسید	امولسیون های O/W نامطلوب

۲-۱-۲) استفاده از روش های زیستی برای تجزیه آسفالتن

تصور بر این است که مولکول های آسفالتن و میان کنش های آنها، که ساختاری پیوسته را در کل نفت تشکیل می دهند، مسئول ویسکوزیته نفت خام سنگین هستند [۲-۴]. شکستن آسفالتن ها به مولکول های کوچک تر و برش یک پیوند آلیفاتیک داخلی (سولفیدها، استرها و اترها) یک مولکول آسفالتن می تواند به کاهش ویسکوزیته منجر شوند [۵]. این مولکول های بزرگ برای تغییر و تبدیل زیستی مشکل ساز هستند و انتقال جرم مولکول های هدف به بیوکاتالیست و همچنین از عرض غشای سلول سرعت تغییر و تبدیل را محدود می کند [۶]. علاوه بر آن، این مولکول ها بسیار هیدروفوب هستند، بنابراین محدودیت انتقال جرم در واکنش های آبی انتظار می رود [۷]. علی رغم این دشواری ها، شواهدی در مقالات برای تغییر و تبدیل باکتریائی این سوبستراهای پیچیده دارای وزن مولکولی بالا وجود دارد. این محتمل است چون این ترکیبات حاوی کربن، هیدروژن، گوگرد، نیتروژن و اکسیژن هستند، که عناصر ضروری برای رشد همه جانداران می باشند. اخیراً، پیندا-فلورس^۶ و همکاران مصرف آسفالتن ها را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی توسط یک کانسورتیوم جدا شده از نفت خام مایا گزارش کردند. این سویه های جدا شده به نامهای *Bacillus*، *Corynebacterium* sp.، *sp.*، *Brevibacillus* sp. و *Staphylococcus* sp. شناسایی شدند. رشد کنسرسیوم میکروبی با استفاده از آسفالتن ها به عنوان تنها منبع کربن (۸۰۰ میکرومول دی اکسید کربن در ۱۳ روز) تا حد معنی داری بالاتر از نمونه های حاوی فقط کنسرسیوم میکروبی (۲۰۰ میکرومول دی اکسید کربن) یا فقط آسفالتن (۳۰۰ میکرومول دی اکسید کربن) بود [۸]. فراری^۷ و همکاران تخریب زیستی مؤثر یک گروه از هیدروکربن های مقاوم به تخریب زیستی (ترکیبات آروماتیک، رزین ها و آسفالتن ها) را با استفاده از میکروارگانیسم هایی که ظرفیت متابولیک بالاتری داشتند، گزارش کردند [۹]. پندریس^۸ هفت باکتری گرم منفی و هوازی تجزیه کننده آسفالتن را از طریق یک تکنیک غنی سازی جداسازی کرد. جنس های غالب این سویه های جدا شده *Pseudomonas*،

⁶ Pineda-Flores

⁷ Ferrari

⁸ Pendrys

Flavobacterium و *Flavimonas Alcaligenes Acinetobacter* بودند. یک کشت مخلوط ترجیحاً اجزاء اشباع و آروماتیک نفتن آسفالت سمند-۲۰^۹ را تجزیه و آسفالتن را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی نیز مصرف کردند [۱۰]. رونتانی^{۱۰} و همکاران تجزیه جزء آسفالتینیک نفت خام آستارت^{۱۱} را، که به صورت جزئی توسط یک جمعیت مخلوط از باکتری های دریائی با هیدروکربن های اشباع به عنوان کمک سوسترا تجزیه شده بودند، مورد بررسی قرار دادند [۱۱]. روخاس-آولیزاپا^{۱۲} و همکاران تجزیه اجزاء آروماتیک و آسفالتینیک را توسط *Serratia liquifasciens* و *Bacillus sp.* گزارش کردند [۱۲]. گزارش هایی در مورد تخریب زیستی جزء آسفالتینیک نفت خام توسط باکتری های مخلوط وجود دارد.

برخی تحقیقات در مورد ارتقاء کیفیت نفت خام سنگین از میکروارگانسیم های اکستروموفیلی استفاده کردند که می توانند از طریق شکست انتخابی ساختارهای مولکولی در پیوندهای کربن-کربن آلی، کربن-گوگرد و سایر جایگاه های هترواتم (شامل نیتروژن، اکسیژن و عناصر کمیاب نفت) درجه پایین را گوگردزدایی، نیتروژن زدایی و فلززدایی کنند. این گزارش ها کاهش معنی داری را در محتوای آسفالتن نفت خام با کاهش ویسکوزیته نشان داده اند. فرض بر این است که میکروب ها و قارچ ها مولکول آسفالتن را دی پلیمریزه و مولکول های کوچک را آزاد می کنند [۱۲-۱۸]. تحقیقات همچنین نشان می دهند که افزودن سوسترهای کومتابولیک می تواند تجزیه آسفالتن را مساعد کند، بخصوص اگر ترکیبات مشابه نظیر آلکان ها، آلکیل بایفنیل ها، پروپان و متان افزوده شوند. از سوی دیگر افزودن ترکیباتی نظیر سوکسینات و سالیسیلات تخریب زیستی هیدروکربن های دارای ساختار مولکولی پیچیده نظیر فلئوئورانتن و بنزوپیرن را مساعد می کند [۱۹]. اخیراً، وان هام^{۱۳} و همکاران باکتری هایی را جداسازی کردند که قادر بود پیوندهای نزدیک به انتهای کربن-گوگرد درون زنجیره آلکیل را با استفاده از یک ترکیب اورگانوسولفات فلئوئورینه جدید، بیس-۳-پنتاfluorophenylpropyl-sulfide^{۱۴}، به عنوان یک سوسترا تجزیه کنند. این ممکن است نه تنها به گوگردزدایی نفت خام سنگین کمک کند بلکه موجب کاهش ویسکوزیته نیز بشود چنانکه این باکتری ها می توانند پیوندهای کربن-گوگرد^{۱۵} آلکیل یک مولکول آسفالتن را بدون کاهش مقدار کربن سوسترا تجزیه کنند [۲۰]. شواهد مختلف آزمایشگاهی نشان می دهند که آنزیم ها می توانند مولکول های آسفالتن را تغییر دهند. کلروپراکسیداز قارچ *Caldariomyces fumago* می تواند

⁹ cement-20

¹⁰ Rontani

¹¹ Asthart

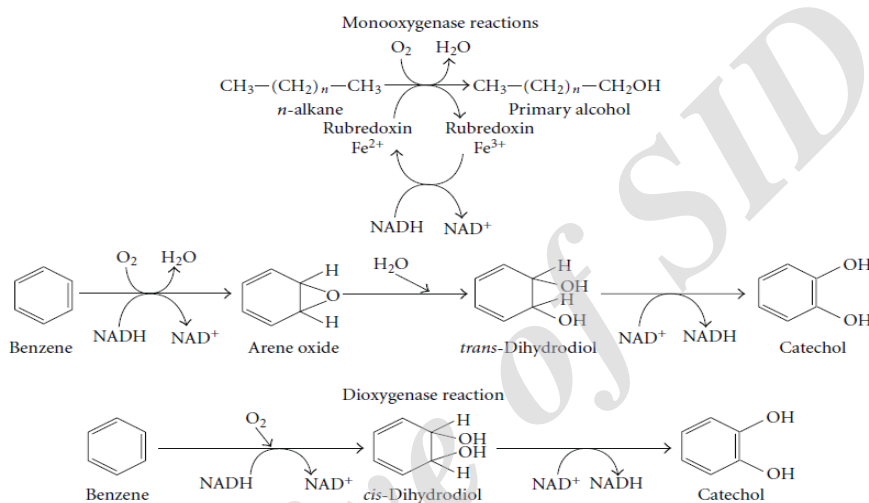
¹² Rojas-Avelizapa

¹³ Van Hamme

¹⁴ bis3-pentafluorophenylpropyl-sulfide

¹⁵ C-S

پتروپورفرین ها و آسفالتن ها را تجزیه کند و به حذف نیکل و وانادیوم از مولکول های آسفالتن منجر شود (مانند مورد پورفرین های سنتتیک نیکل و وانادیوم) [۲۱]. تحقیقات امکان پذیری اکسیداسیون بیوکاتالیتیک جزء آسفالتن نفت های سنگین توسط سیتوکروم C تغییر یافته از نظر شیمیائی را نیز نشان می دهند. ترکیبات اکسیژنه دارای گوگرد و کربن محصولات اصلی حاصل از واکنش بیوکاتالیتیک با سیتوکروم تغییر یافته هستند. ظرفیت سیتوکروم در کاتالیز واکنش های شبه پراکسیدازی بر روی تیوفن ها و سولفیدهای آلی نیز به خوبی روشن شده است [۲۲-۲۵]. آنزیم های منواکسیژناز و دی اکسیژناز نیز در فرآیند شکست زیستی از طریق افزودن گروه هیدروکسیل بسیار موفق بوده اند. شکل ۱-۲ این مکانیسم را نشان می دهد.



شکل ۱-۲: مکانیسم عمل اکسیژناز در شکست ترکیبات نفتی

مزیت استفاده از بیومولکولها نسبت به باکتریها به دلیل عملکرد اختصاصی، امکان بازیابی مجدد و دوستدار محیط زیست بودن آنهاست که همین دلایل سبب شده در کشورهای توسعه یافته آنزیمها و بیوکاتالیزها را جایگزین استفاده از میکروارگانیسم ها نمایند، زیرا حضور میکروارگانیسم ها در طبیعت می تواند در درازمدت سبب آلودگی های زیستی شود و موادی که از متابولیست ثانویه آنها ایجاد میشود سبب آلودگیهای غیرقابل کنترل گردد.

تحقیقاتی در مورد تجزیه و تغییر آسفالتن در ماتریکس نفت خام سنگین وجود دارد. با این وجود، مقالات در دسترس پیشنهاد می دهند که امکان کراکینگ آسفالتن ها از طریق یک فرآیند زیستی وجود دارد. مشکل انتقال جرم این نوع مولکول های بزرگ را برای تغییر و تبدیل شاید بتوان از طریق امولسیفیکاسیون و افزایش ناحیه

تماس حد فاصل بهبود بخشید. البته، امولسیفیکاسیون ارزش کمی در غلبه بر سد انتقال به درون سلول های زیستی دارد مگر اینکه مکانیسم های جذب مناسبی در دسترس باشند [۲۶].

۳-۱-۲) گوگردزدایی با استفاده از روش های زیستی

نفت خام سنگین و قیر ۳ تا ۶٪ گوگرد دارند، که باید قبل از اینکه به عنوان ماده خام پالایشگاه قابل پذیرش شوند، حذف گردند. همچنانکه مقررات برای گوگرد در سوخت ها سخت گیرانه تر می شوند، روش های گوگردزدایی موجود برای «گوگردزدایی عمیق»، که سوخت هایی با گوگرد کم تولید می کند، کافی نمی باشند. بنابراین رویکردهای با پایه زیستی جایگزین های جذاب و نوآورانه ای هستند چون بطور انتخابی دی بنزوتیوفن^{۱۶} های آلکیله (مقاوم در برابر هیدروگوگردزدایی) را تحت شرایط واکنشی کمتر سخت به صورتی انرژی بر گوگردزدایی می کنند. چندین میکروارگانیسم یافت شده اند که دی بنزوتیوفن، نماینده ترکیبات آلی گوگردی در نفت خام، را گوگردزدایی می کنند و ترکیب فاقد گوگرد، ۲-هیدروکسی بایفنیل، را تشکیل می دهند. این میکروارگانیسم ها به عنوان بیوکاتالیست در گوگردزدایی میکروبی نفت خام نویدبخش هستند چون بدون جذب محتوای کربن، فقط گوگرد را از ترکیبات هتروسایکلیک، که در برابر گوگردزدایی شیمیائی معمول مقاوم هستند، حذف می کنند [۲۷-۲۹].

۴-۱-۲) نیتروژن زدایی با استفاده از روش های زیستی

نیتروژن، مانند گوگرد، در باران اسیدی و آلودگی جوی نقش دارد و در هتروسیکلو هایی نظیر کوئینولین ها و کربازول ها وجود دارد. ترکیبات حاوی نیتروژن، مهارکننده کاتالیست پالایشگاه هستند. این مهارکنندگی احتمالاً از طریق اتصال به جایگاه اسید کاتالیست صورت می گیرد. انتظار می رود محصولات میکروبی حاصل از تجزیه این ترکیبات، تمایل کمتری برای جایگاه های فعال کاتالیست داشته باشند. بنابراین، تغییر و تبدیل میکروبی و آنزیماتیک هتروآروماتیک های نیتروژن در کاهش مهار کاتالیست پالایشگاه نیز مفید خواهد بود [۲۷, ۳۰].

۵-۱-۲) فلززدایی با استفاده از روش های زیستی

نفت خام دارای فلزات به شکل نمک ها، پتروپورفرین ها و سایر کمپلکس ها در آسفالتن هاست. حذف فلزات به دام افتاده در پتروپورفرین ها و کمپلکس ها بیشتر مشکل ساز است چون پورفرین ها در ساختار آسفالتنی بسیار پیچیده قرار گرفته اند. در میان ترکیبات اورگانوفلزی، ترکیبات حاوی وانادیوم و نیکل بیشترین هستند و تقریباً منحصراً در اجزاء رزینی و آسفالتنی نفت خام وجود دارند. حضور فلزات در نفت خام دو مشکل بزرگ

¹⁶ Dibenzothiophene (DBT)

در صنعت ایجاد می کند. احتراق این سوخت ها به تشکیل خاکستر با غلظت های بالای اکسید فلزات منجر می شود که به تشکیل پسماندهای نامطلوب منتهی می گردد. وقتی نفت خام پالایش می شود، فلزات با جزء باقیمانده^{۱۷} باقی می ماند و همچنانکه سایر اجزاء بخار می شوند تغلیظ می گردند. جزء باقیمانده اغلب در معرض کراکینگ کاتالیتیک، یک فرآیند گرمایی برای تجزیه مولکول های بزرگ در نفت باقیمانده به مولکول های کوچک تر که دارای نقطه جوش کمتر هستند، قرار می گیرند. طی کراکینگ گرمایی، فلزات در رسوب نفت بر روی کاتالیست های کراکینگ، منجر به مسمومیت کاتالیست و کاهش انتخاب گری و فعالیت آنها می شوند [۳۱].

۶-۱-۲) آروماتیک زدایی با استفاده از روش های زیستی

هیدروکربن های آروماتیک اثرات شدیدی بر تولید و فرآوری نفت خام دارند و احتراق سوخت های غنی از هیدروکربن های آروماتیک در تشکیل دوده و ویژگی های احتراقی ضعیف نقش دارد. آروماتیک ها معمولاً طی ارتقاء کیفیت معمول از طریق هیدروژناسیون کاتالیتیک در دما و فشار بالا برای اشباع کردن و شکست حلقه های آروماتیک می شکنند. برخلاف کاتالیز شیمیایی، آروماتیک زدایی زیستی باید اختصاصیت بالای سوبسترای داشته باشد و در دما و فشار محیط روی دهد. یک گروه تحقیقاتی در دانشگاه آلبرتا کانادا یک جایگزین زیستی پیشنهاد کرده است که از بیوکاتالیست های کل سلول و واکنش های دوفازی (نفت-آب) برای اکسید کردن اختصاصی سوبستراهایی که یک یا چند حلقه آروماتیک دارند در نفت خام یا اجزاء محصول تقطیر میانی پیشنهاد کرده اند. شکستن آنزیمی حلقه بدون کاهش کربن ترکیبات قطبی محلول در فاز آبی تولید خواهد کرد. این ترکیبات برای هیدروژناسیون شیمیایی تحت شرایط ملایم بازیابی می شوند تا آلکیل آروماتیک های دارای ویژگی های احتراقی بهتر در مقایسه با ترکیبات والد تولید شوند. این روش شکست زیستی حلقه آروماتیک نام گرفته است [۱].

۲-۲) استفاده از نانوکاتالیست ها در صنعت نفت

در پالایش نفت خام، چهار فرآیند اصلی وجود دارد که از نانوکاتالیست ها استفاده می کنند: تشکیل مجدد نفتا، کراکینگ، هیدروکراکینگ و تیمار با آب^{۱۸}. به علت حجم مواد خامی که فرآوری می شوند، تفکیک محصول و کاتالیست مسئله مهمی است. بنابراین در پالایش نفت خام، نانوکاتالیست ها معمولاً بر روی یک بستر دارای ناحیه سطحی زیاد قرار می گیرند که می تواند به عنوان یک حامل برای نانوکاتالیست ها عمل کند یا کمی

¹⁷ residual

¹⁸ Hydrotreating

عملکرد کاتالایزیک داشته باشد. تشکیل مجدد نفتا توسط کاتالیست $Pt-Al_2O_3$ سبب تجاری شدن این نانوکاتالیست شد [۳۲].

زمینه دیگر برای نانوکاتالیز در بخش انرژی، کاتالیست «تیمار با آب» است که برای ایجاد مواد خام تقریباً فاقد گوگرد برای کاتالیست تشکیل مجدد نفتا مورد نیاز است.

کراکینگ کاتالایزیک مستلزم استفاده از ذرات کاتالیست بود؛ البته، با معرفی کراکینگ کاتالایزیک بستر سیال^{۱۹} کُره کاتالیست به مقیاس نانو رسید و کاتالیست های امروزی کریستال های زئولیت محصور در مواد آمورف سیلیکا-آلومینا، کاتالیست را وارد محدوده اندازه نانو کردند. معرفی هیدروکراکینگ، استفاده از نانوکاتالیست ها را گسترش داد: یا نانوذرات فلزی وارد زئولیت می شوند یا نیکل-کبالت-مولیبدنا یا اکسید تنگستن در یک بستر آلومینا وجود دارد [۳۳].

فوکویاما و همکاران از نانوکاتالیست ها برای هیدروکراکینگ نفت های سنگین و تصحیح فرآیند روش هیدروکراکینگ نفت های سنگین استفاده کرده اند. همچنین ماستون و دین کاتالیست های آهن نانوفاز جدیدی را برای کاربردهای هیدروکراکینگ توسعه داده اند. در این کاتالیست ها پیوند کربن - کربن توسط اکسیدهای آهن هیدراته نانو کریستالی، شکسته می شوند و در طی آزمایشاتی که همراه با مدل پیشنهادی انجام می شود، فعالیت و انتخاب کنندگی بالایی از خود نشان می دهند [۳۳].

۱-۲-۲) نانوذرات در میدانهای نفتی

جریان آب در مخازن نفتی شباهت زیادی به رفتار آن در رودخانه دارد، در مناطقی که عرض عبور آن کم می شود، سرعت آن افزایش یافته و در نواحی که عرض عبور آن زیاد می شود، سرعت آن کاهش می یابد. هنگامی که آب به مخزن تزریق می شود، فشار اضافه شده توسط آن باعث جریان آب از نقطه تزریق به سمت مخزن استخراج خواهد شد. این آب در مسیر خود از میان حفره هایی که به صورت تونلهایی بین نقطه تزریق آب و مخزن نفتی قرار دارد عبور خواهد کرد، در ضمن عبور آب از این حفره ها و تونلها، به سرعت آن اضافه شده و شتاب می گیرد. روش جدید ارائه شده به منظور افزایش نرخ استخراج بر پایه اضافه کردن ذراتی است که ابعاد آنها در مقایسه با حفره های موجود در مخازن نفتی بسیار کوچکتر است، در نتیجه زمانی که جریان آب به همراه این ذرات به دهانه یک تونل می رسد، جریان آب شتابی بیشتر از ذرات گرفته و در نتیجه ذرات را پشت سر گذاشته و باعث تجمع آنها می شود تا در نهایت این ذرات باعث بسته شدن آن تونل خواهند شد. بسته شدن یک تونل باعث می شود جریان آب از مسیرهای دیگری عبور کند که در برخی از آنها نفت وجود دارد، در

¹⁹ Fluid catalytic cracking (FCC)

نتیجه این نفت جا مانده از مخزن استخراج خواهد شد. نتیجه این کار استخراج بیشتر نفت از مخزن و در نتیجه سودآوری بیشتر شرکتهای استخراج کننده نفت خواهد بود. ذراتی که به طور معمول در این روش مورد استفاده قرار می گیرند قطری در حدود ۱۰۰ نانومتر دارند.

محققان نروژی و چینی نانوذرات مختلف با اشکال و ابعاد مختلفی را به منظور ارزیابی عملکردشان مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که نانوذراتی که به شکل ریسمانهای پلیمری هستند بهترین عملکرد را در بستن حفره ها در صخره های نفتی دارند، در واقع آنها می توانند در کنار یکدیگر جمع شده و ساختار یکپارچه ای را ایجاد کنند. با این حال نانوذرات جامد مانند سیلیکا بازدهی کمتری خواهند داشت. این ایده متعلق به دو محقق چینی به نامهای بو پنگ و یوان لی است. دانشگاه برگن نروژ و دانشگاه نفت پکن بیش از یک دهه است که به همکاری با یکدیگر می پردازند و این همکاری در درک و طراحی استفاده از ذرات معلق در آب هم وجود داشته است. تحقیقات تجربی و میدانی چینی ها بیانگر دو نکته قابل توجه است، اول اینکه استفاده از نانوذرات باعث افزایش استخراج نفت شده و ثانیا دریچه ای که توسط نانوذرات برای حفره ها ایجاد می شود با تزریق دوباره آب با فشار قابل برطرف شدن می باشد. آرن اسکارج سرپرست تیم تحقیقاتی دانشگاه برگن در این باره می گوید چینی ها اولین افرادی بوده اند که از نانوذرات در میدانهای نفتی استفاده کرده اند. به طور کلی تحقیقات نشان می دهند که برای ازدیاد برداشت از مخازن نفتی این روش راهگشا است، اما هنوز سؤالهای بدون جواب زیادی درباره چگونگی و چرایی کارکرد این روش باقی مانده است. در ابتدا این سوال وجود داشت که آیا استفاده از نانوذرات در مخازن نفتی که در دریا قرار دارند هم امکان پذیر است یاخیر، زیرا چینی ها تست های خود را در آب رودخانه و مخازن نفتی که در خشکی قرار دارند انجام داده بودند. با این حال آزمایشهای انجام گرفته در برگن نروژ که بر روی صخره های نفتی دریای شمال انجام شد، نشان داد که استفاده از نانوذرات در آب دریا هم امکان پذیر بوده و با این روش می توان ۲۰ درصد و یا حتی تا ۵۰ درصد از نفت باقی مانده در مخازن را استخراج کرد.

۲-۲-۲) نانوذرات مغناطیسی و جداسازی نفت در محیطهای آبی

از نانوذرات مغناطیسی در دانشگاه MIT برای جداسازی نفت در محیطهای آبی استفاده شد. نانوذرات مغناطیسی با انحلال در فاز نفتی در رویارویی با نیروی مغناطیسی قابل کنترل می شوند. با اعمال نیروی مغناطیسی امکان جداسازی نفت از محیط آبی به خوبی امکانپذیر است. معلق کردن نانوذرات مغناطیسی در نفت، آن را به مایع مغناطیسی به نام فروفلوئید تبدیل می کند. در روش های قبلی از پمپاژ مخلوط آب و

فروفلوئید از طریق کانال های حاوی آهن ربا در بخش خروجی استفاده می شد که آب از یک قسمت، خارج و فروفلوئید نیز از بخش دیگری خارج می شد، اما این روش تنها در صورتی مؤثر است که غلظت فروفلوئید از قبل مشخص شده و در طول عملیات نیز ثابت باقی بماند. محققان دو تغییر در روش های موجود ایجاد کردند و به جای قرار دادن آهن ربا خارج از جریان، آنها را در آب غوطه ور کردند و به جای حالت موازی جریان، آن را در حالت عمود قرار دادند؛ بدلیل اینکه میدان مغناطیسی آهن ربای استوانه ای مورد استفاده محققان در بخش لبه ها قوی تر است، نفت بیشتر به سمت قطب های آهن ربا هدایت می شود [۷۲].

۲-۳) سنتز نانوذرات اکسید آهن

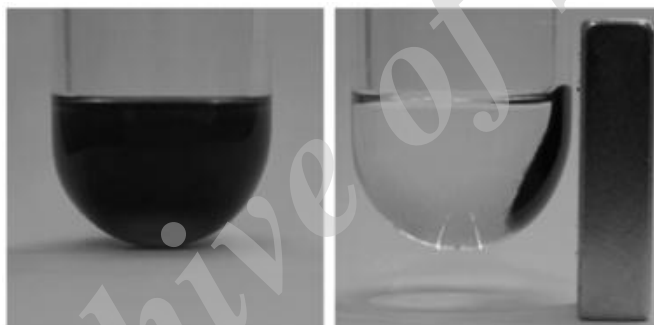
در دهه های گذشته، تحقیقات بسیاری در مورد سنتز نانوذرات اکسید آهن صورت گرفته است، و گزارش های بسیاری رویکردهای مؤثر سنتز را برای تولید نانوذرات اکسید آهن کنترل شده از نظر شکل، پایداری، سازگاری زیستی و همگن بودن تشریح کرده اند. معمول ترین روش ها شامل همرسوبی، تجزیه گرمایی، سنتز هیدروترمال، میکروامولسیون، سنتز آواشیمیائی و مسیر سنتز آواشیمیائی همگی می توانند در راستای سنتز نانوذرات اکسید آهن دارای کیفیت بالا هدایت شوند. علاوه بر آن، این نانوذرات می توانند با روش های دیگری نظیر سنتز الکتروشیمیائی، تکنیک های پیرولیز لیزر، سنتز توسط میکروارگانسیم ها یا باکتری ها (بخصوص باکتری های مگنتوتاکتیک و باکتری های احیاء کننده آهن) و غیره نیز تولید شوند [۳۶-۳۴].

۱-۳-۲) همرسوبی

معمول ترین روش برای بدست آوردن Fe_3O_4 یا $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ همرسوبی است. این روش شامل مخلوط کردن یون های فریک و فروس با نسبت مولی ۱ به ۲ در یک محلول بسیار قلیائی در دمای اتاق یا در دمای بالاتر می باشد. اندازه و شکل نانوذرات اکسید آهن به نوع نمک بکار رفته (نظیر کلریدها، سولفات ها، نیترات ها، پرکلرات ها و غیره)، نسبت یون های فریک و فروس، دمای واکنش، مقدار pH، قدرت یونی محیط ها و سایر پارامترهای واکنش (مثل سرعت استیر، سرعت ریخته شدن محلول قلیائی) بستگی دارد [۳۷].

این روش بر ویژگی های فیزیکی و شیمیائی ذرات اکسید آهن نانو تأثیر خواهد گذاشت. بطورکلی، مقادیر مغناطیسی اشباع (MS) موجود در مواد دارای ساختار نانو در مقایسه با فاز توده معمولاً کمتر هستند، البته مشروط بر اینکه هیچ تغییری در پیکربندی یونی صورت نگیرد [۳۸]. مقدار آزمایشی مغناطیسی اشباع در نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی گزارش شده است که بین $30\text{--}80\text{ emu g}^{-1}$ است که کمتر از مقدار مغناطیس توده است.

البته، این روش ذراتی با توزیع اندازه وسیع تولید می کند، که گاهی اوقات به گزینش ثانویه اندازه نیاز دارد. توزیع وسیع اندازه نانوذره به دامنه وسیع دماهای بلوکه کننده بستگی دارد، و بنابراین رفتار مغناطیسی غیر ایده آل برای بسیاری از کاربردها منجر می شود. کنگ و همکاران سنتز نانوذرات Fe_3O_4 یکنواخت و با توزیع باریک اندازه (قطر نانوذرات $11/3 \pm 1/5$ nm) را از طریق همرسوبی بدون سورفکتانت ها گزارش کردند، واکنش در محلول آبی با نسبت مولی $Fe^{II}/Fe^{III} = 0.5$ و $pH = 11-12$ ، و سپس سوسپانسیون های کولوئیدال مگنتیت مستقیماً از طریق هوادهی سوسپانسیون های کولوئیدال $\gamma-Fe_2O_3$ اکسید می شوند. برخلاف آن، اخیراً بسیاری از مقالات مسیرهای مؤثر به دست آوردن نانوذرات، سورفکتانت هایی نظیر دکستران یا پلی وینیل الکل (PVA) می تواند به محیط های واکنش اضافه شود، یا ذرات می توانند در مرحله بعدی پوشش داده شوند [۳۹، ۴۰]. سورفکتانت ها به عنوان عوامل حفاظتی برای کنترل اندازه ذرات و پایدار کردن پراکندگی های کولوئیدال عمل می کنند. عیب این روش سنتز محلول آبی این است که مقدار بالای pH مخلوط واکنش باید در مراحل سنتز و تخلیص تنظیم شود، و این فرآیند در تولید نانوذرات یکنواخت موفقیت کمی داشته است.



شکل ۲-۲: رسوب نانوذرات توسط نیروی مغناطیسی

۲-۳-۲ تجزیه گرمایی

روش تجزیه گرمایی می تواند منجر به تولید نانوذرات اکسید آهن دارای اندازه یکنواخت و با کیفیت بالا شود، که معمولاً به دماهای نسبتاً بالاتر و عملیات پیچیده تری نیاز دارد.

زنگ و سان یک رویکرد کلی برای سنتز نانوذرات مگنتیت دارای اندازه یکنواخت را بر پایه واکنش $Fe(acac)_3^{20}$ در فنیل اتر در حضور الکل، اولئیک اسید و اولئیل آمین در دمای بالا گزارش کرده اند [۴۱]. با استفاده از نانوذرات مگنتیت کوچک تر به عنوان هسته، نانوذرات مگنتیت بزرگ تر دارای اندازه یکنواخت تا ۲۰ نانومتر قطر می توانند سنتز شوند و در حلال غیرقطبی با روش رشد با واسطه هسته پراکنده گردند. این فرآیند به گزینش اندازه نیاز

²⁰ acetylacetonate

ندارد و برای تولید انبوه بکار می رود. تجمعات نانوذرات Fe_3O_4 سنتز شده می توانند به راحتی به نانوذرات γ - Fe_2O_3 از طریق قرارگرفتن در دمای بالا (۲۵۰ درجه سانتی گراد) و اکسیژن به مدت ۲ ساعت، تبدیل شوند.

هیون و همکاران سنتز نانوذرات آهن با اندازه یکنواخت و بسیار کریستالی را بدون فرآیند گزینش اندازه از طریق تجزیه گرمایی آهن پنتاکربونیل در حضور اولئیک اسید در ۱۰۰ درجه سانتی گراد گزارش کردند. نانوذرات آهن حاصله از طریق اکسیداسیون با استفاده از تری متیل آمین اکسید به عنوان یک اکسیدانت خفیف به γ - Fe_2O_3 غیرکریستالی با اندازه یکنواخت تبدیل شدند. گرچه روش تجزیه گرمایی فواید بسیاری در تولید ذرات با اندازه یکنواخت با توزیع باریک اندازه دارد، اما این عیب بزرگ را نیز دارد که نانوذرات حاصل معمولاً فقط در حلال های غیرقطبی حل می شوند [۴۱، ۴۲].

۳-۳-۲) میکرومولسیون

میکرومولسیون یک پراکنش پایدار از نظر ترمودینامیک دو فاز غیرقابل امتزاج (آب و روغن) در حضور سورفکتانت است، مولکول های سورفکتانت ممکن است یک تک لایه در حدفاصل بین روغن و آب تشکیل دهند، درحالیکه دم های هیدروفوب مولکول های سورفکتانت در فاز روغن حل می شوند و گروه های سر هیدروفیل در فاز آبی حل می شوند. انواع مختلف ساختارهای خودتجمع یافته می توانند شکل بگیرند، از میسل های کروی و استوانه ای (معکوس) تا فازهای لاملی و میکرومولسیون های به هم پیوسته، که ممکن است همراه با فازهای غالب روغن یا آبی وجود داشته باشند [۴۳]. در این حالت، میکرومولسیون و مسیر میسل های معکوس می توانند برای به دست آوردن نانوذرات اکسید آهن با شکل و اندازه کنترل شده به کار روند.

به خصوص، میکرومولسیون های آب در روغن (w/o) از طریق نانوقطره های فاز آبی، که با تجمع مولکول های سورفکتانت در یک فاز روغنی پیوسته پراکنده می شوند، تولید می گردند. ویدال و همکاران سنتز نانوذرات ماگنیت با اندازه یکنواخت را با روش میکرومولسیون تک ظرف گزارش کرده اند [۴۴]. علاوه بر آن، نتایج نشان دادند که اولئیل آمین به عنوان عامل رسوب دهنده و پوشش دهنده عمل می کند. البته، سیکلوهاگزیل آمین فقط به عنوان عامل رسوب دهنده عمل می کند و از تجمع ذرات جلوگیری نمی کند. چین و یاکوب سنتز نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (کوچک تر از ۱۰ نانومتر) را از طریق w/o میکرومولسیون گزارش کردند، علاوه بر آن ذرات تولید شده با تکنیک میکرومولسیون اندازه کوچک تر و مغناطیس پذیری اشباع بالاتری داشتند [۴۵]. البته، علی رغم حضور سورفکتانت ها، تجمع نانوذرات تولید شده معمولاً به چند فرآیند شستشو و تیمارهای دیگر برای پایدار سازی نیاز دارد.

۴-۳-۲) سنتز هیدروترمال

نانوذرات اکسید آهن با اندازه و شکل کنترل شده به علت ارتباط قوی بین این پارامترها و ویژگی های مغناطیسی اهمیت تکنولوژیک زیادی دارند. روش های میکرومولسیون و تجزیه گرمایی معمولاً به فرآیندهای پیچیده و دماهای نسبتاً بالایی نیاز دارند. سنتز هیدروترمال، به عنوان یک جایگزین، شامل تکنولوژی های شیمیایی تر کریستالیزه کردن مواد در یک ظرف در بسته از محلول آبی با دمای بالا (معمولاً از ۱۳۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد) در فشار بخار بالا (معمولاً از ۰/۳ تا ۴ مگاپاسکال) است. این تکنیک برای رشد ذرات کریستالی تکی فاقد ناجابجایی به کار رفته است، و دانه های تشکیل شده در این فرآیند می توانند بلورینگی بهتری در مقایسه با سایر فرآیندها داشته باشند، بنابراین در سنتز هیدروترمال احتمال بدست آوردن نانوذرات اکسید آهن بسیار کریستالی وجود دارد.

برخی محققان سنتز نانوذرات اکسید آهن را با روش هیدروترمال گزارش کرده اند [۴۶-۴۹]. دو روش اصلی استفاده یا عدم استفاده از سورفکتانت های خاص وجود دارد. وانگ و همکاران یک فرآیند هیدروترمال تک مرحله ای برای آماده کردن نانوپودرهای Fe_3O_4 بسیار کریستالی بدون استفاده از سورفکتانت ها را گزارش کرده اند. پودر Fe_3O_4 در مقیاس نانو (۴۰ نانومتر) که در ۱۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت به دست آمد، مغناطیس پذیری اشباع $85/8 \text{ emu.g}^{-1}$ داشت که کمی کمتر از مقدار مربوط به Fe_3O_4 توده (92 emu.g^{-1}) است. دانه های Fe_3O_4 که به خوبی در شرایط هیدروترمال مناسب کریستالیزه شده اند احتمالاً مسئول افزایش مغناطیس پذیری اشباع در Fe_3O_4 در اندازه نانو هستند [۵۰]. ژنگ و همکاران یک مسیر هیدروترمال برای آماده کردن نانوذرات Fe_3O_4 با قطر تقریباً ۲۷ نانومتر در حضور سورفکتانت سدیم بیس (۲-اتیل هگزیل) سولفوسوکسینات^۱ را گزارش کردند [۵۱].

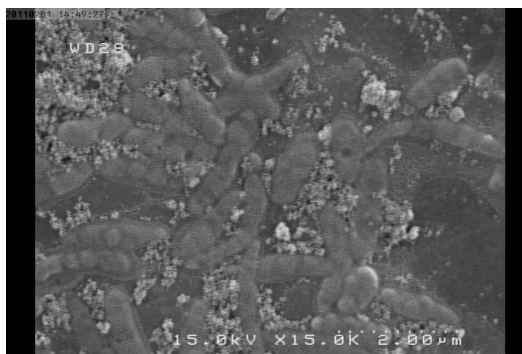
علاوه بر آن، تیمار هیدروترمال یکی از روش های موفق رشد دادن کریستال ها برای نانوذرات اکسید آهن است. اخیراً، داو و همکاران گزارش کرده اند که ذرات مگنتیت با میانگین اندازه ۳۹ نانومتر و اندازه یکنواخت با روش همرسوبی در ۷۰ درجه سانتی گراد از یون های Fe^{2+} فروس و Fe^{3+} فریک با یک محلول $N(CH_3)_4OH$ و پس از آن تیمار هیدروترمال در ۲۵۰ درجه سانتی گراد سنتز شده اند. نانوذرات مگنتیت قبل از مرحله هیدروترمال میانگین اندازه ۱۲ نانومتر داشتند و وقتی در معرض هوا قرار می گیرند اکسید می شوند [۵۲]. علاوه بر آن، سنتز هیدروترمال به تولید نانوساختارهای اکسید آهن غیرمعمول نظیر نانومکعب های اکسید آهن، کره های توخالی اکسید آهن و غیره منجر می شود [۵۳، ۵۴].

۵-۳-۲) سنتز آواشیمی

روش آواشیمی، به عنوان یک جایگزین رقابتی، منحصراً برای تولید مواد جدید با ویژگی های غیرمعمول کاربرد وسیعی دارد. اثرات شیمیائی امواج ماوراء صوت از فعال سازی آکوستیک یعنی تشکیل، رشد و فروپاشی انفجاری حباب ها در مایع ناشی می شود. فروپاشی انفجاری حباب یک نقطه داغ موضعی از طریق تراکم آدیاباتیک یا تشکیل موج شوک در فاز گازی حباب در حال فروپاشی به وجود می آورد. شرایط تشکیل شده در این نقاط داغ به صورت آزمایشگاهی با دماهای گذرای 5000 K ، فشار 1800 atm تعیین شده اند. این شرایط برای تشکیل فاز جدید مفید بوده و آگلومراسیون را از بین می برند، که نانوذرات با اندازه بسیار یکنواخت تولید می کند.

این روش برای سنتز نانوکامپوزیت های مختلف به کار رفته و مؤثر بودن آن با موفقیت در ساخت نانوذرات اکسید آهن اثبات شده است [۵۵]. مثلاً، نانوذرات مگنتیت می توانند به سهولت از طریق سونیکاسیون استات آهن II در آب در اتمسفر آرگون سنتز شوند. ویجیا کومار و همکاران یک مسیر سنتتیک آواشیمیائی برای تولید پودر اکسید آهن در اندازه نانو خالص با اندازه تقریباً 10 nm نانومتر گزارش کردند. نانوذرات اکسید آهن تولید شده سوپرپارامغناطیسی هستند و مغناطیس پذیری آنها در دمای اتاق بسیار کم است [۵۶]. پیکاس و همکاران یک روش سنتتیک آواشیمیائی برای تولید اکسید آهن نانوسکپیک آمورف از طریق سونولیز $\text{Fe}(\text{acac})_3$ در آرگون با مقدار کمی آب اضافه شده را توصیف کردند [۵۷].

پنج روش سنتتیک مذکور مزایا و معایبی در تولید نانوذرات اکسید آهن دارند. از نظر کنترل اندازه و مورفولوژی نانوذرات اکسید آهن، تجزیه گرمایی و مسیر سنتتیک گرمایی روش های بهتری هستند. برای تولید نانوذرات اکسید آهن محلول در آب و زیست سازگار، همرسوبی اغلب بکار می رود، اما این روش کنترل کمی بر روی اندازه ذره، توزیع وسیعی در اندازه و تجمع ذرات دارد. به عنوان یک جایگزین رقابتی از نظر زمان، مسیر آواشیمیائی نیز می تواند برای سنتز نانوذرات اکسید آهن با ویژگی مغناطیسی غیرمعمول بکار رود. علاوه بر آن، باید توجه کرد که برخی مسیرهای سنتز شیمیائی سبز و مسیرهای سنتز زیستی نیز برای اهداف حفاظت محیط زیست گزارش شده است. بارد و همکاران گزارش کردند که باکتری *Actinobacter sp.* می تواند ماغمیت را تحت شرایط واکنش با پیش سازهای فریک کلرید سنتز کنند [۳۵]. علاوه بر آن، نانوذرات ماغمیت طبق انتظار ویژگی های سوپرپارامغناطیسی را نشان دادند. بنابراین، به عنوان جایگزین رقابتی از نظر حفاظت محیط زیست و دوستدار طبیعت، شیمی سبز و روش های زیستی نظیر سنتز باکتریائی نانوذرات اکسید آهن پیشرفت های مهمی هستند [۵۸].



شکل ۳-۲: تجمع باکتری ها و تولید نانوذرات

در ایران نیز تولید نانوذرات اکسید آهن از روش های گوناگون صورت گرفته است. سنتز نانوذرات مغناطیسی در مقیاس آزمایشگاهی در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی شهیدبهشتی با موفقیت انجام گرفته و ثبت پتنت داخلی انجام شده است. سنتز اکسید آهن در مقیاس نانو به روش هیدروترمال و همرسوبی صورت گرفت. این پروژه با تصویب شورای بررسی نهایی طرحهای جهاددانشگاهی اجراء و با موفقیت به اتمام رسیده است و نتایج حاصل در مرکز اسناد صنعتی کشور به شماره: ۳۸۷۱۲۱۳۶۵ و مورخ: ۱۳۸۸/۲/۶ ثبت گردیده است و همچنین طرح توسط شورای بررسی نهایی جهاددانشگاهی اعلام اختتام گردیده است.

فصل سوم: شرح تخصصی

Archive of SID

فصل سوم: شرح تخصصی

۳-۱) نفت خام

نفت خام مخلوطی از هزاران ترکیب مختلف است ولی عموماً چهار گروه ترکیبات عمده در نفت خام وجود دارند که شامل پارافین، نفتن ها، آروماتیک ها و رزین ها - آسفالتین ها می باشند. در مجموع پارافین ها و نفتن ها هیدروکربن های اشباع شده هستند، به طوریکه هیدروژن کافی برای اشباع کردن ظرفیت الکترونی اتم های کربن دارند. هیدروکربن های آروماتیک از نظر هیدروژن غیر اشباع هستند.

۳-۱-۱) پارافین ها^{۲۲}:

اولین نوع عمده نفت خام، پارافین ها هستند که آلکان ها نیز نامیده می شوند. فرمول کلی پارافین ها C_nH_{2n+2} می باشد. ساده ترین و سبک ترین مولکول سری پارافین ها، متان با فرمول CH_4 است. پارافین های با کمتر از پنج اتم کربن، در فشار و حرارت عادی به شکل گازی هستند. علاوه بر متان، دیگر پارافین های گازی عبارتند از اتان، پروپان و بوتان. برای سادگی اینها گاهی اوقات C_1 تا C_4 نیز نامیده می شوند. از C_5 تا C_{15} پارافین ها در حرارت و فشار عادی مایع هستند. هیدروکربن های با بیشتر از ۱۵ اتم کربن، به شدت گرانبه و یا ویسکوز هستند و حالت واکس های جامد را به خود می گیرند.

۳-۱-۲) نفتن ها^{۲۳}:

دومین هیدروکربن عمده در نفت خام، نفتن ها هستند که گاهی اوقات سیکلو آلکان نیز نامیده می شوند. فرمول عمومی نفتن ها C_nH_{2n} است. مانند پارافین ها، نفتن ها نیز هیدروکربن های اشباع شده هستند، ولی نفتن ها دارای ساختمان مولکولی حاقوی بسته می باشند. نفتن ها از حداقل ۳ تا بیش از ۳۰ اتم کربن را در حلقه هایشان قرار داده اند.

۳-۱-۳) آروماتیک ها^{۲۴}:

سومین گروه اصلی ترکیبات هیدروکربنی موجود در نفت های خام، آروماتیک ها هستند. برخلاف نفتن ها و پارافین ها، آروماتیک ها نسبت به هیدروژن غیر اشباع هستند. ساختمان آنها بر پایه یک حلقه شش اتم کربنی است که با توجه به ساده ترین عضو این خانواده یعنی بنزن (C_6H_6) حلقه بنزنی نامیده می شود. در بنزن، تنها اتم

²² paraffins

²³ Naphthenes

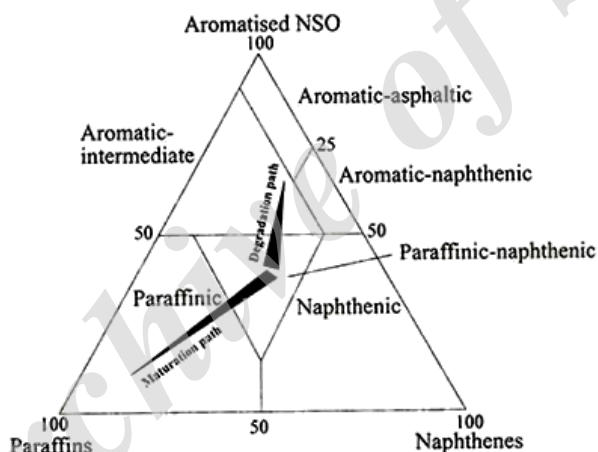
²⁴ aromatics

اتصال یافته به حلقه کربن هیدروژن است. گروه عمده آروماتیک ها از جانشین شدن مولکول های پارافینی به جای اتم هیدروژن در حلقه بزنی بدست می آیند. هیدروکربن های آروماتیک در فشار و حرارت عادی مایع هستند. آنها در نفت سبک نسبتاً به مقدار کمتری وجود دارند، ولی در نفت های سنگین فراوانند.

۴-۱-۳) رزین ها^{۲۵}-آسفالتین ها^{۲۶}:

چهارمین گروه مهم ترکیبات نفت های خام، رزین ها و آسفالتین ها می باشند. رزین ها و آسفالتین ها ترکیبات پیچیده ای هستند. این هیدروکربن های ناخالص، اغلب به ترکیبات NSO معروفند زیرا حاوی اتم های گوگرد، اکسیژن و نیتروژن می باشند که بعضی از آن ها جانشین کربن حلقه آروماتیک ها می شوند. ترکیبات NSO بالاترین وزن مولکولی را دارند و سنگین ترین اجزای تشکیل دهنده نفت های خام می باشند.

نمودارهای متنوعی برای طبقه بندی نفت های خام پیشنهاد شده است. شکل ۳-۱ دیاگرام مثلی ارائه شده توسط تیسوت و ولته برای طبقه بندی نفت های خام را نشان می دهد. این نمودار بر پایه فراوانی پارافین ها، نفتن ها و آروماتیک ها با ترکیبات NSO می باشد.



شکل ۳-۱: دیاگرام مثلی برای طبقه بندی نفت های خام

ترکیبات غیرهیدروکربنی شامل ترکیبات گوگردی (۰/۰۱-۰/۸٪)، عمدتاً سولفید هیدروژن (H_2S)، مرکاپتان ها (ترکیبات حاوی گروه $-SH$)، سولفیدها و دی سولفیدها، تیوفن ها، و همچنین بنزوتیوفن ها و نفتوتیوفن ها است که در اجزاء نفت غالب هستند [۵۹] (جدول ۳-۱).

²⁵ Resins

²⁶ Asphaltenes

جدول ۱-۳: اجزا نفت خام

% وزنی در اجزاء SARA مربوط به C ₂₀ ⁺					% وزن	
گوگرد	اکسیژن	نیتروژن	هیدروژن	کربن		
۴/۸	۱/۷	۱/۳	۷/۵	۸۳/۸	۱۴/۱	آسفالتن ها
۴/۳	۲/۰	۱/۵	۸/۹	۸۲/۸	۳۷/۳	رزین ها
۴/۰	۱/۱	< ۰/۳	۱۰	۸۴/۳	۳۷/۲	مواد آروماتیک
< ۰/۱	< ۰/۲	< ۰/۳	۱۳	۸۶/۶	۱۱/۴	مواد اشباع

۲-۳) نفت سنگین

نفت سنگین به نفت خامی اطلاق می شود که به راحتی جریان پیدا نمی کند. علت استفاده از واژه «سنگین» برای این نوع نفت، بالا بودن چگالی آنها در مقایسه با نفت سبک است. اکثر کشورهای جهان، وزن مخصوص نفت خام را برحسب درجه API که یک درجه بندی آمریکائی است، محاسبه می کنند. بر این مبنا نفت با API ۱۰ الی ۲۰ درجه را نفت سنگین، نفت با API ۲۰ الی ۳۰ درجه را نفت متوسط و نفت با API بیش از ۳۰ درجه را نفت سبک می نامند. نفت سنگین نسبت به نفت سبک از مطلوبیت کمتری برخوردار است، زیرا نمی توان به همان آسانی آن را به بنزین و یا سایر فرآورده ها تبدیل کرد و نیز پس از فرآوری و پالایش آن مقادیر پسماند زیادتری بر جای می ماند. استحصال و پالایش نفت خام سنگین پیچیده تر و پرهزینه تر است و به همین دلیل قیمت آن کمتر از نفت خام سبک است و مشتریان کمتری دارد. شکل ۱ تفاوت میزان گرانروی را نفت سنگین و سبک نشان می دهد.



شکل ۲-۳: تفاوت گرانروی در نفت سنگین و سبک

نفت های خام سنگین (قیر) دانسیته نزدیک یا حتی بیش از آب دارند. آنها معمولاً بسیار ویسکوز هستند، با درجه غلظت از محدوده ملاس های سنگین تا یک جامد در دمای اتاق وجود دارند. آنها دارای غلظت های بالایی از آسفالتن، رزین ها، هترواتم های حاوی نیتروژن و گوگرد و چندین فلز، به خصوص نیکل و وانادیوم

هستند. نفت های خام سنگین به عنوان نفت های خام غیرمعمول شناخته می شوند چون نمی توانند از طریق روش های معمول تولید شوند، انتقال یابند یا پالایش شوند [۶۰-۶۳]. ویژگی های فیزیکوشیمیائی نفت خام سنگین مشکلات عملیاتی بزرگی را در تولید و فرآوری پایین دست نفت خام سنگین ایجاد می کند. جدول ۲-۳ جزئیات مقایسه ای ویژگی های یک نفت خام سنگین معمول و نفت خام سبک را ارائه می کند [۱].

جدول (۲-۳): مقایسه بین ویژگی های نفت خام سبک و سنگین

ویژگی ها	نفت خام سبک (فورمال ونزوئلا)	نفت خام سنگین (موریچال ونزوئلا)
درجه API	۲۲/۹۰	۸/۵۰
گوگرد (wt %)	۱/۱۳	۳/۹۶
نیترژن (wt %)	۰/۲۲	۰/۷۳
آسفالتن (wt %)	۲/۰۰	۱۰/۲۰
وانادیوم (ppm)	۴۹/۰۰	۴۸۸/۰۰
نیکل (ppm)	۱۱/۰۰	۱۰۵/۰۰
ویسکوزیته		
۵۰ درجه سانتی گراد	۷/۴۰	۱۴۲۵۷/۰۰
۶۰ درجه سانتی گراد	۵/۹۰	۵۵۳۳/۰۰

بازدهی هر نفت خام به عملیات پالایش نفت خام مرتبط می شود که مبتنی بر این اصل ساده است که هر قدر نفت سبک تر باشد، فرآورده های سبک تر بیشتری از آنها قابل استحصال بوده و هر چه نفت خام سنگین تر باشد درصد فرآورده های سنگین استحصالی از آن بیشتر خواهد بود. از آنجا که به طور معمول ارزش فرآورده های نفتی سبک تر، گران تر از فرآورده های نفتی سنگین تر می باشد بنابراین خود به خود ارزش نفت خام سبک بیشتر از نفت های خام سنگین ارزیابی می شود.

از طرفی، ذخایر وسیع نفت خام سنگین در بسیاری از نقاط جهان وجود دارد. در حقیقت، تخمین زده می شود این ذخایر هفت برابر ذخایر باقیمانده نفت خام معمول باشند. بزرگترین ذخایر نفت خام سنگین در کمربند نفتی اورینوکو ونزوئلا قرار دارد. سایر ذخایر مهم در ماسه های نفتی اتاباسکا^{۲۷} در آلبرتای کانادا، ماسه های نفتی

اولنیک^{۲۸} در سیبری روسیه و نفت خام سنگین مایا در مکزیک هستند. شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه ذخایر نفت خام معمول در حال اتمام هستند، بنابراین توجه زیادی به مصرف این منابع وسیع نفت های غیرمعمول در تولید سوخت های پالایش شده و محصولات پتروشیمی از طریق ارتقاء کیفیت آن می شود [۶۴، ۶۵].

نفت سنگین نسبت به نفت سبک از مطلوبیت کمتری برخوردار است، زیرا نمی توان به همان آسانی آن را به بنزین و یا سایر فرآورده ها تبدیل کرد و نیز پس از فرآوری و پالایش آن مقادیر پسماند بیشتری بر جای می ماند. استحصال و پالایش نفت خام سنگین پیچیده تر و پرهزینه تر است و به همین دلیل قیمت آن کمتر از نفت خام سبک است و مشتریان کمتری دارد. بنابراین یافتن راهکارهای تبدیل مولکولهای آلی سنگین نفت به مولکولهای سبکتر مورد توجه محققین قرار گرفته است.

نفت خام سنگین می تواند به عنوان مولکول های پیوسته با وزن های مولکولی ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ در نظر گرفته شود. بیشتر مولکول ها یک بخش آروماتیک (بدنه) و یک بخش آلیفاتیک (انشعاب) دارند [۱]. هترواتم هایی نظیر نیتروژن، گوگرد و اکسیژن بیشتر با آروماتیک ها در ارتباط هستند. تصور بر این است که جزء آسفالتن و میان کنش های بین مولکولی آن مسئول ویژگی های نامطلوب نفت نظیر ویسکوزیته بالا و تمایل به تشکیل امولسیون، پلیمرها و کک است.

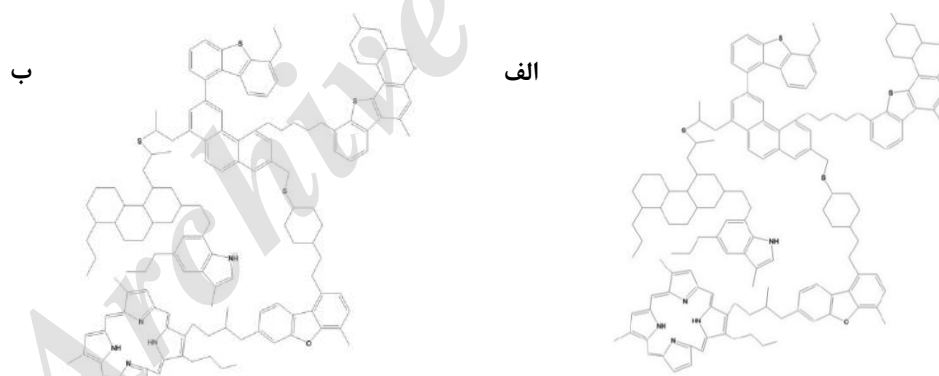
آسفالتن ها از نظر عملیاتی به عنوان بخشی از نفت خام که در n-آلکان ها نامحلول است اما در تولوئن محلول است، تعریف می شود. برعکس، رزین ها در n-آلکان ها محلول هستند اما به اندازه کافی قطبی هستند تا در ستون هیدروکسی آپاتیت نگه داشته شوند. موم ها مولکول های پارافینی بلند زنجیره هستند که معمولاً اگر بیش از ۴۰ اتم کربن داشته باشند، مشکلات عملیاتی ایجاد می کنند. آسفالتن ها سنگین ترین جزء موجود در نفت خام هستند. آسفالتن، جزئی که دارای بیشترین وزن مولکولی در نفت خام است، یک جامد بی شکل تیره می باشد که غنی از هترواتم ها^{۲۹} و فلزاتی مانند آهن، نیکل و وانادیوم است. دو دیدگاه در مورد ساختار مولکولی آسفالتن وجود دارد. طبق اولین دیدگاه، آسفالتن یک هسته آروماتیک چند حلقه ای بزرگ دارد، با زنجیره های آلیفاتیک متصل در حاشیه (شکل ۳-۳ الف). در دیدگاه دوم آسفالتن چند هسته چند حلقه ای کوچک تر دارد که از طریق پل های آلیفاتیک (سولفیدها، استرها و غیره) به یکدیگر متصل شده اند (شکل ۳-۳ ب). دیدگاه دوم در میان محققان بیشتر پذیرفته شده است چنانکه این ساختار مسئول بیشتر ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مولکول آسفالتن است [۶۶، ۶۷]. می توان تجمعاتی از سه یا بیشتر آسفالتن را با مولکول های رزین یا آروماتیک

²⁸ Olenik Oil Sands

²⁹ NSO

به دام افتاده در درون آن در نظر گرفت. آسفالتن هایی که عمدتاً طبیعی یا فرآوری نشده هستند از چند منطقه آروماتیک متصل به یکدیگر از طریق پیوندهای آلیفاتیک به جای یک مرکز آروماتیک بزرگ با انشعاب های آلیفاتیک تشکیل شده اند. آنها ویژگی مهم فولد شدن را دارند که انرژی میان کنش با سایر مولکول ها را به حداقل می رساند. آنها همچنین مناطق آروماتیک دارای پل های فلزی را در تجمعات حفظ می کنند.

نفت های خام سنگین میان کنش های مولکولی خاص دارند که بیشتر میان کنش های وان در والس را شامل می شود که برای مولکول های کوچک کم است اما برای آسفالتن ها بزرگ است. این نیروها مولکول های آسفالتن را به خوبی در کنار هم نگه می دارند. در دماهای کمتر از ۶۰ درجه سانتی گراد این تماس های نزدیک معمول تر هستند و به افزایش ویسکوزیته نفت خام منجر می شوند. سایر میان کنش های مولکولی مسئول این افزایش ویسکوزیته در جایگاه های رادیکال آزاد هستند، که با ساختارهای آروماتیک چند حلقه ای متراکم با الکترون های جفت نشده بسیار واکنش پذیر ارتباط دارند. این جایگاه ها در کمپلکس شدن فلزات، واکنش های بین مولکولی و درون مولکولی، بازآرایی های مولکولی و پیوند هیدروژنی دخیل هستند. اثرات ترکیبی عملکردهای مذکور نقش های مهمی در رفتار نفت خام در مخازن و همچنین رفتار آنها در فرآوری بالادست و پایین دست دارند [۱].



شکل (۳-۳): دو دیدگاه مختلف در مورد ساختار مولکول آسفالتن؛ الف) دیدگاه اول: یک هسته آروماتیک چند حلقه ای بزرگ با زنجیره های آلیفاتیک متصل در حاشیه؛ ب) دیدگاه دوم: چند هسته چند حلقه ای کوچکتر متصل به یکدیگر از طریق پل های آلیفاتیک

۱-۲-۳) تولید نفت از مخازن نفت سنگین

بزرگترین مخازن نفت سنگین دنیا در شمال ونزوئلا قرار دارد. اما به طور کلی بیش از سی کشور دارای مخازن نفت سنگین هستند. بالا بودن گرانی و چگالی نسبی و همچنین داشتن ترکیبات مولکولی سنگین تر این نوع از

نفت خام، مهمترین خواص فیزیکی هستند که بین نفت سنگین و سبک تمایز ایجاد می کنند. نفت فوق سنگین ونزوئلا دارای گرانیروی بیش از ده هزار سانتی پواز و درجه API برابر با ۱۰ است. معمولاً، برای انتقال این نوع از نفت خام در فواصل معین با خط لوله، از رقیق کننده هایی استفاده می شود که باعث سهولت در جریان سیال می شوند [۱۶].

تقاضای روزافزون جهانی برای نفت و فرآورده های آن و کاهش تولید طبیعی از مخازن نفت سبک و در نهایت افزایش قیمت نفت در چند سال اخیر باعث توجه روزافزون به روش های تولید از مخازن نفت سنگین و بسیار سنگین شده است. به طوری که برآوردها نشان می دهد تولید نفت سنگین کانادا در آینده نزدیک از مرز ۱/۲ میلیون بشکه در روز بگذرد. در کشور ونزوئلا طبق برنامه ریزی انجام شده، شرکت های نفتی قصد دارند میزان تولید نفت سنگین را به ۶۰۰۰۰۰ بشکه در روز برسانند. دولت چین قصد دارد در آینده نزدیک تولید از میادین نفت سنگین خود را به ۱۵۰۰۰۰۰ بشکه در روز برساند [۱۷].

در نقاط مختلف جهان به خصوص در کشورهای کانادا، آمریکا، ونزوئلا، ایران، مکزیک، روسیه و در بعضی از کشورهای تولید کننده نفت در خاورمیانه منابع عظیمی از نفت های سنگین و بسیار سنگین وجود دارد. به طور کلی میزان کلی منابع نفت به شکل نفت سنگین و قیر طبیعی در جهان حدود ۶ تریلیون بشکه نفت درجا تخمین زده می شود که سه برابر ذخایر نفت معمولی جهان است. همچنین مطابق مطالعات انجام گرفته، مجموع ذخایر نفت سنگین و بسیار سنگین ایران حدود ۸۵ میلیارد بشکه برآورد شده است. با وجود حجم زیاد ذخایر نفت سنگین و قیر طبیعی، تولید از این منابع انرژی به سادگی برداشت از ذخایر متداول نفت خام نبوده و با استفاده از تکنولوژی های متداول به آسانی قابل بهره برداری نمی باشند. گرانیروی بالا و وجود درصد بالایی از ترکیبات آسفالتین و رزین در این هیدروکربن ها باعث بروز مشکلاتی در مراحل استخراج، انتقال و فرآوری نفت سنگین می شود. برداشت اولیه در تعداد کمی از مخازن نفت سنگین و قیر که دارای شرایط بهتری هستند، حداکثر به ۶٪ نفت در جا می رسد. بنابراین استفاده از روش های شکست مولکولهای سنگین نفت ضروری به نظر می رسد [۱۶].

۳-۳ کاربرد نانوذرات در شکست مولکولهای آلی سنگین

با گذر از میکرو ذرات به نانوذرات، تغییر برخی از خواص فیزیکی مشاهده می شود که دو مورد مهم از آنها عبارتند از: افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم و ورود اندازه ذره به قلمرو اثرات کوانتومی.

افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ی ذره رخ می دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم های واقع در سطح ذره به رفتار اتم های درونی می شود. این پدیده بر خصوصیات ذره در حالت انزوا و بر تعاملات آن با دیگر مواد اثر می گذارد. افزایش سطح، واکنش پذیری نانوذرات را به شدت افزایش می دهد. یکی از خصوصیات بارز نانوذرات در شکست کاتالیستی مولکولهای سنگین است. از مهمترین منابع حاوی مولکولهای سنگین، نفت سنگین است که پژوهش در این زمینه با توجه به نفت خیز بودن ایران از اهمیت شایانی برخوردار است.

برای نانوذرات تعاریف متعددی ارائه شده است اما به طور خاص نانو ذرات دارای قطری بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر (استاندارد ۱۲۰۹۸) می باشند. به عبارتی آنها در حوزه ای مابین اثرات کوانتومی اتمها، مولکولها و خواص مواد توده ای قرار می گیرند. مواد مختلف در این مقیاس از خود خواص متفاوت و جالبی را بروز می دهند. توانایی ساخت و کنترل ساختار نانو ذرات به دانشمندان و مهندسين امکان می دهد خواص حاصله را تغییر داده و بتوانند خواص مطلوب را در مواد طراحی کنند. موارد فوق العاده گسترده ای وجود دارند که اندازه فیزیکی ذره می تواند خواص بهبود یافته ی مفیدی را به وجود آورد. مثلاً اندازه کوچک ذرات امکان صیقل دهی ظریف تر سطوح را فراهم می کند. نانوذرات به قدری کوچک هستند که می توان گفت بی نظمی چندانی در آنها وجود نداشته و لذا فلزات پر قدرت و بسیار سخت را می توان از آنها تولید کرد. مساحت سطحی بالای آنها نیز سبب تولید کاتالیزور و مواد پر انرژی می گردد.

نانوذرات مورد استفاده در واحدهای شکست مولکولی، عموماً مواد جامد مانند زئولیتها، هیدروسیلیکات آلومینیوم، بوکسیت و سیلیکا-آلومینا می باشد. علاوه بر آن به دلیل اینکه از فلزات فعال پلاتین (Pt) و رنیوم (Re) روی پایه های آلومینا و زئولیت نیز استفاده می شود، می توان به نانوذرات Pt-Re کاتالیستی اشاره کرد. از دیگر کاتالیست های مورد استفاده مخلوط سیلیکا-آلومینا یا سیلیکا-مگنزی (اکسید منیزیم) می باشد که از نانوکاتالیست های سیلیکا و مگنزی ساخته شده اند. در فرایند هیدروکراکینگ از کاتالیست های آلومینا، زئولیتها و پلاتین استفاده می شود و در کاتالیست های مربوطه اگر از نانومواد کاتالیستی استفاده شود نتیجه بهتری حاصل می شود. انواع جدیدی از ترکیبات با استفاده از فلزات فعال پلاتین، نیکل، مولیبدن و کبالت می توانند تولید شوند که در این زمینه می توان به اختراع کاتالیست پلاتین- نیکل - مولیبدن روی پایه زئولیتی اشاره کرد. فرآیندهای کراکینگ و هیدروکراکینگ کاتالیستی از جمله روش های ارتقای کیفیت نفت خام سنگین است که استفاده از نانوذرات در این زمینه نتایج خوبی را در برداشته است.

۴-۳) کاربرد بیومولکولها در شکست مولکولهای آلی سنگین

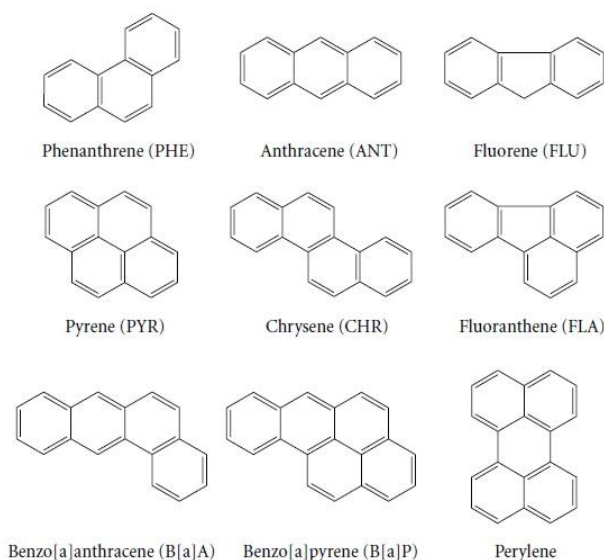
بیومولکول مولکولی است که توسط یک ارگانیزم یا سامانه زنده ساخته می شود، و شامل درشت مولکولهایی مانند پروتئین ها ، پلی ساکاریدها ، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک و نیز مولکولهای کوچک مانند اجزای شرکت کننده در سوخت و ساز سلولی اعم از متابولیت های اولیه و متابولیت های ثانویه و نیز محصولات ساخته شده طبیعی می باشد. در واقع این ترکیبات موادی با منشا زیستی هستند. بسیاری از قارچ ها و میکروب ها با تولید طیف وسیعی از بیومولکولها به حیات خود ادامه می دهند. بیومولکولها توانایی کاتالیز واکنش های مختلف را دارند. قارچ ها به دلیل پاسخ به استرس های محیطی با القا ترکیبات به محیط کشت خود توانایی ترشح انواع بیومولکولها را دارند.

یکی از روشهای نوین شکست مولکولهای سنگین استفاده از بیومولکولها می باشد. کشورهای توسعه یافته به علت هزینه پایین و جلوگیری از آلودگیهای زیست محیطی به استفاده از بیومولکولها روی آورده اند. مهمترین بیومولکولها در شکست مولکولهای سنگین آنزیم ها می باشند. آنزیمها کاتالیزورهای حیاتی هستند و تنها با حضورشان و بدون مصرف در پروسه، فرآیند شیمیایی را سرعت بخشیده و پس از کامل شدن واکنش، مجدداً آزاد شده و آماده شروع واکنش دیگری می گردند. بطور کلی آنها می توانند پیوسته فعال باشند، آنزیمها در مقایسه با کاتالیزتهای غیرآلی می توانند عملکردهای ویژه ای داشته باشند و ترکیبات معینی را تجزیه کنند.

یکی از مهمترین و موفق ترین گروه های بیومولکولی در شکست ترکیبات آلی نفت آنزیم های لیگنینولایتیک هستند که به دلیل تولید خارج سلولی و گستره سوبسترای وسیع از سایر گروه های آنزیمی موفق تر بوده اند. قارچ های فاسد کننده چوب با ترشح آنزیم های لیگنینولایتیک در مقایسه با میکروب ها ارگانیزمهایی مؤثرتری در شکست هیدروکربن های پلی آروماتیک^{۳۰} هستند [۶۸-۷۲]. آنها می توانند برخلاف باکتری ها و قارچ های خاک هیدروکربن های پلی آروماتیک دارای چند حلقه آروماتیک فشرده را معدنی کنند. آنها همچنین می توانند این ترکیبات را به تنهایی و هم در مخلوط های پیچیده متابولیزه کنند [۷۳-۷۵]. مخلوط هیدروکربن های پلی آروماتیک و کرئوزوت^{۳۱}، به عنوان محافظت کننده قارچ کش چوب می باشد. البته، بسیاری از قارچ ها شامل بازیدیومیست های پوسیدگی سفید و قارچ های تجزیه کننده ، این تیمار را تحمل می کنند و در چوب تیمار شده با کرئوزوت رشد می کنند. همچنین نشان داده شده است که این قارچ ها هیدروکربن های پلی آروماتیک را در خاک آلوده سم زدایی می کنند [۷۶-۸۳]. برخی از هیدروکربن های پلی آروماتیک در شکل ۴-۳ نشان داده شده است.

³⁰ PAH(poly aromatic hydrocarbons)

³¹ creosote



شکل ۴-۳: برخی از هیدروکربن های پلی آروماتیک

اولین تحقیقات در مورد پتانسیل قارچ های لیگنینولایتیک برای استفاده در تجزیه زیستی هیدروکربن های پلی آروماتیک به سال ۱۹۸۵ می رسد، وقتی بامپس و همکاران گزارش کردند که بازیدیومیست پوسیدگی سفید *Phanerochaete chrysosporium* به صورت جزئی بنزو[a]پیرن را به دی اکسید کربن تجزیه کرد [۸۴]. بعدها برای جنس های *Phanerochaete* [۶۸, ۷۴]، *Trametes* [۶۹]، *Bjerkandera* [۸۵]، *Coriolus* [۸۶]، *Nematoloma* [۸۷]، *Irpex* [۸۸] و *Pleurotus* [۷۵, ۸۰, ۸۲, ۸۵, ۸۹-۹۴] نیز گزارش شد. محققان مختلف توانایی این قارچ ها را در تجزیه ترکیبات آلی با سیستم لیگنینولایتیک خارج سلولی مرتبط دانسته اند، که شامل لیگنین پراکسیداز^{۳۲}، منگنز پراکسیداز^{۳۳}، ورستایل پراکسیداز^{۳۴} و لاکاز^{۳۵} است [۶۹, ۹۵-۹۷]. لاکازها و پراکسیدازهای قارچی در تجزیه لیگنین و سم زدایی ترکیبات زنبیوتیک از طریق تجزیه جزئی یا معدنی کردن کامل نقش داشته اند [۸۸]. عمل کاتالایتیک این بیومولکولها متابولیت های قطبی تر و محلول در آب، نظیر کینون ها را تولید می کند که توسط باکتری های بومی موجود در خاک و رسوبات تجزیه می شوند [۷۶]. در خاک، متابولیت های کینونی به عنوان سوبسترا برای جمعیت های میکروبی عمل می کنند و به دی اکسید کربن تبدیل می شوند. آنها همچنین ممکن است تحت پلیمریزاسیون قرار گرفته و بخشی از هوموس خاک گردند [۷۹]. چندین مکانیسم آنزیمی تجزیه هیدروکربن های پلی آروماتیک توسط این قارچ ها مورد بررسی قرار گرفته اند:

³² Lignin peroxidase (LiP)

³³ Manganese peroxidase (MnP)

³⁴ Versatile peroxidase

³⁵ Laccase

الف) لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز مستقیماً اکسیداسیون تک الکترونی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را با پتانسیل یونیزاسیون 7.55 eV (IP) کاتالیز می کنند و کینون تولید می کنند [۹۸-۱۰۰]، که می تواند از طریق ادغام حلقه بیشتر متابولیزه شود [۱۰۱].

ب) لاکاز اکسیداسیون تک الکترونی هیدروکربن های پلی آروماتیک را کاتالیز می کند، مثلاً آنتراسن و بنزو آلفا پیرن، که راندمان شان در حضور واسطه هایی نظیر HBT^{36} یا ABTS^{37} افزایش می یابد [۱۰۲, ۱۰۳].

ج) برخی ترکیبات هیدروکربن های پلی آروماتیک حاوی تا شش حلقه از طریق واکنش های لیپید پراکسیداسیون وابسته به منگنز پراکسیداز در خارج و درون سلول قابل تجزیه هستند [۷۴, ۷۷].

د) اعتقاد بر این است که فعالیت سیتوکروم P-450 مونواکسیژناز درون سلولی و پس از آن هیدروکسیلاسیون هیدروکربن های پلی آروماتیک سه، چهار و پنج حلقه ای کاتالیز شده توسط اپوکسید هیدرولاز را متابولیزه می کنند [۷۵, ۸۹, ۹۰, ۹۴, ۱۰۴, ۱۰۵].

در موجوداتی که از سیستم سیتوکروم P-450 استفاده می کنند، محصول ترانس-دی هیدرودیول نمی تواند به عنوان منبع انرژی بکار رود، اگرچه که متابولیسم بیشتر ممکن است روی دهد. به طور مثال در قارچ های پوسیدگی سفید، نظیر *Phanerochaete chrysosporium* و *Trametes versicolor*، معدنی شدن هیدروکربن های پلی آروماتیک روی می دهد، که نشان دهنده تجزیه کامل این ترکیبات می باشد [۱۰۶]. در حال حاضر، شواهد قاطع و جامعی وجود دارد مبنی بر اینکه آنزیم های لیگنینولایتیک در تجزیه ترکیبات آلی سنگین توسط این قارچ ها نقش دارند. مقالات مختلفی توانایی قارچ های پوسیدگی سفید را در تجزیه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مختلف نشان داده اند (جدول ۳-۳).

در مطالعات مختلف، کینون ها به عنوان محصولات اصلی در تجزیه ترکیبات آلی توسط قارچ ها شناسایی شده اند (جدول ۳-۳) [۷۳, ۱۰۱, ۱۰۷]. مثلاً، پیرن توسط *P. ostreatus* غالباً به پیرن-۴،۵-دی هیدرودیول، آنتراسن به ۱-آنتراسن، ۲-دی هیدرودیول و ۹، ۱۰-آنتراکینون، فلوئورن به ۹-فلوئورنول و ۹-فلوئورنون و دی بنزوتیوفن به سولفوکسید و سولفون متابولیزه می شوند [۷۵].

۱-۴-۳) شکست ترکیبات آلی توسط قارچ ها

شکست برخی از ترکیبات آلی توسط قارچ ها در ادامه آورده شده است که توانایی بالای این ارگانسیم ها را در پیشبرد این واکنش ها به خوبی نشان می دهد.

³⁶ hydroxybenzotriazole

³⁷ azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid

۱-۱-۳-۴) شکست ترکیب آلی فنانترن

متابولیسم فنانترن توسط *P. chrysosporium* و *P. ostreatus* بیش از بقیه مورد بررسی قرار گرفته است [۷۵، ۸۹، ۹۰]. در تحقیقی اولیه ساترلند و همکاران تجزیه فنانترن توسط *P. chrysosporium* را مورد بررسی قرار دادند [۱۰۴]؛ فنانترن-ترانس-۹، ۱۰-دی هیدرودیول، فنانترن-ترانس-۳، ۴-دی هیدرودیول، ۹-فنانترویل، ۳-فنانترویل، ۴-فنانترویل و ۹-فنانترویل-D-گلوکوپیرانوزید کانجوگه به عنوان متابولیت شناسایی شدند. از آنجا که لیپاز در محیط کشت تشخیص داده نشد، محققان دخالت فعالیت مونواکسیژنازی و اپوکسید هیدورلازی را در اکسیداسیون و هیدراسیون فنانترن توسط این قارچ پیشنهاد دادند [۱۰۴]. داوال و همکاران نشان دادند که ایزوله های *P. chrysosporium* وقتی در محیط های دارای نیتروژن کم و یا زیاد رشد داده شدند، موجب ناپدید شدن فنانترن شدند. علاوه بر آن، فعالیت های لیپاز و منگنز پراکسیداز در هیچ یک از کشت های انکوبه شده در حضور فنانترن تشخیص داده نشد [۱۰۸].

جدول ۳-۳: گونه های تجزیه کننده ترکیبات آلی

PAH	Fungus	Metabolites	Enzymes
PHE	<i>P. chrysosporium</i> (WRF)	PHE- <i>trans</i> -9,10-dihydrodiol; PHE- <i>trans</i> -3,4-dihydrodiol; 9-phenantrol, 3-phenanthrol; 4-phenanthrol; 9-phenanthryl-D-glucopyranoside	Monooxygenase; epoxide hydrolase
		CO ₂	ND
ANT	<i>P. sordida</i> (WRF)	PHE-9,10-quinone; 2,2'-diphenic acid	ND
	<i>P. ostreatus</i> (WRF)	PHE- <i>trans</i> -9,10-dihydrodiol	Cytochrome P-450; MnP
	<i>T. versicolor</i> (WRF)	ND	MnP
	<i>Agrocybe</i> sp. (WRF)	PHE- <i>trans</i> -9,10-dihydrodiol	Cytochrome P-450; epoxide hydrolase
	<i>Ganoderma lucidum</i> (WRF)	ND	ND
	<i>Agrocybe</i> sp. (WRF)	9,10-anthraquinone	ND
	<i>B. adusta</i> (WRF)	9,10-anthraquinone	ND
FLU	<i>P. ostreatus</i> (WRF)	9,10-anthraquinone	MnP; LAC
	<i>I. lacteus</i> (WRF)	9,10-anthraquinone	ND
	<i>Trametes versicolor</i>	9,10-anthraquinone	ND
	<i>Coriolopsis polyzona</i> (WRF)	9,10-anthraquinone	ND
	<i>P. chrysosporium</i> (WRF)	9,10-anthraquinone; phthalic acid; CO ₂	LiP; MnP
	<i>Stropharia coronilla</i> (LDF)	ND	MnP
	<i>T. trogii</i> (WRF)	9,10-anthraquinone	LAC
PYR	<i>Agrocybe</i> sp. (WRF)	9-fluorenoil; 9-fluorenone	ND
	<i>B. adusta</i> (WRF)	ND	ND
	<i>P. ostreatus</i> (WRF)	ND	ND
FLA	<i>I. lacteus</i> (WRF)	Quinonic metabolites	MnP; Mn-inhibited peroxidase
	<i>P. ostreatus</i> (WRF)	PYR-4,5-dihydrodiol	LAC
	<i>Ganoderma lucidum</i> (WRF)	PYR-4,5-dihydrodiol; phthalic acid	LAC, VP
	<i>Ganoderma lucidum</i> (WRF)	ND	LAC
	<i>P. sordida</i> (WRF)	ND	MnP

B[a]A	<i>P. laevis</i> (WRF)	Quinone metabolite	ND
	<i>P. chrysosporium</i> (WRF)	Quinone metabolite	ND
	<i>I. lacteus</i> (WRF)	B[a]A-7,12-dione; phthalic acid, 1,2-naphthalenedicarboxylic acid; 2-hydroxymethyl benzoic acid; mono- and di-methyl esters of phthalic acid; 1-tetralone; 1,4-naphthalenedione; 1,4-naphthalenediol; 1,2,3,4-tetrahydro-1-hydroxynaphthalene	ND
B[a]P	<i>P. chrysosporium</i>	Quinone metabolite; CO ₂	LiP; MnP
	<i>Bjerkandera</i> sp. (WRF)	Quinone metabolite	ND
	<i>P. ostreatus</i> (WRF)	Quinone metabolite	ND
	<i>Stropharia coronilla</i> (LDF)	Quinone metabolite; CO ₂	LiP; MnP
	<i>Stropharia rugosoannulata</i> (LDF)	CO ₂	MnP

سانگ متوجه شد که قارچ *P. chrysosporium* فنانترن و فنانترن-9، 10-کینون را در موقعیت های C-9 و C-10 شان اکسید کرد و یک محصول واپاشی حلقه دی فنیک اسید³⁸ را تولید کرد [109]. تشکیل این ترکیب از فنانترن در محیط های کشت دارای نیتروژن کم (لیگنینولایتیک) در مقایسه با کشت های دارای نیتروژن زیاد بیشتر بود. محققان پیشنهاد کردند که در این واکنش ها آنزیم های لیگنینولایتیک و غیرلیگنینولایتیک هر دو حضور دارند و توسط سیتوکروم P-450 میکروزومی آغاز نمی شود [110].

قارچ پوسیدگی سفید دیگری که مورد مطالعه قرار گرفته است، *P. ostreatus*، وقتی در محیط کشت غنی بازیدیومیست ها رشد داده شد، 94% از فنانترن افزوده شده به محیط را متابولیزه کرد؛ 3% را به دی اکسید کربن معدنی کرد.

قارچ پوسیدگی سفید دیگری، *T. versicolor*، تقریباً 66% و 75% از فنانترن افزوده شده را در کشت های شیک شونده و ایستا حذف کرد. تجزیه فنانترن در pH 6 حداکثر بود و دمای بهینه 30 درجه سانتی گراد بود. قارچ پوسیدگی سفیدی که از تایلند جداسازی شده بود، تقریباً 99% از فنانترن محیط را متابولیزه کرد [111].

۲-۱-۳) شکست ترکیب آلی آنتراسن

آنتراسن یک هیدروکربن پلی آروماتیک سه حلقه ای است. *Agrocybe* sp. تقریباً 92% آنتراسن محیط را حذف کرد [111]؛ بسیاری از قارچ های پوسیدگی سفید آنتراسن را به آنتراکینون اکسید می کنند. هامل و همکاران نشان دادند که اکسیداسیون آنتراسن توسط *P. chrysosporium* به آنتراکینون سریع بود. هر دو ترکیب توسط قارچ تجزیه شدند و یک متابولیت حاصل از واپاشی حلقه مانند فتالیک اسید حاصل کردند. تولید فتالات از آنتراکینون فقط در شرایط لیگنینولایتیک روی می دهد. این نتایج پیشنهاد می دهند که مسیر اصلی برای تجزیه احتمالاً توسط آنزیم های متابولیسم لیگنینولایتیک میانجی گری می شود [101].

۳-۱-۴-۳) شکست ترکیب آلی پیرن

قارچ *I. lacteus* بیشتر پیرن چهار حلقه ای افزوده شده را متابولیزه کرد؛ تقریباً ۵۰٪ پیرن به متابولیت های قطبی تبدیل شد و از یک فاز آبی کشت بازیابی شد [۱۰۹]. در محیط غنی بازیدیومیست ها تجزیه پیرن کامل بود، یک مشتق فناترن و فتالیک اسید به عنوان واسطه تشکیل شدند. فتالیک اسید می تواند در متابولیسم پایه نقش داشته باشد [۹۲].

درباره شکست بسیاری از ترکیبات آلی توسط بیومولکولهای قارچی مقالات متعددی وجود دارد که با توجه به هدف این طرح که شکست ترکیبات آلی سنگین است برخی از آنها به صورت مختصر ذکر شد. به طور کلی ماهیت محصولات تشکیل شده طی تجزیه آلاینده در گونه های مختلف قارچ های پوسیدگی سفید متفاوت است (جدول ۱-۱). گروه های مختلف بیومولکولها همگی توسط قارچ های پوسیدگی سفید تولید می شوند، اگرچه که مجموعه اختصاصی آنها بسیار متنوع است. بدون تردید، تنوع پذیری در بیومولکولهای ترشخی نتیجه گونه های مختلف پوسیدگی سفید و تفاوت در رشد و پاسخ های تولید بیومولکولهای قارچ های مختلف به محیط های کشت مختلف است. الگوهای آنزیمی لیگنینولایتیک معمول قارچ های پوسیدگی سفید در کشت های مایع متفاوت است [۶۸]. دخالت سیتوکروم P450 درون سلولی در تجزیه هیدروکربن های آروماتیک فقط تا حدی برای تجزیه فناترن نشان داده شد [۷۴, ۱۰۴, ۱۱۰, ۱۱۲]. در بسیاری دیگر از موارد، تجزیه هیدروکربن ها به فعالیت گروه های لیگنینولایتیک خارج سلولی منسوب شده است [۷۲, ۹۱, ۹۲, ۱۰۱, ۱۱۳]. انتقال هیدروکربن ها به درون سلول قارچی می تواند از طریق حلالیت این ترکیبات محدود شود. مشخص شده است که حلالیت هیدروکربن های پلی آروماتیک در محلول های آبی بسیار کم است که فناترن به دلیل محلولیت نسبتاً کم تا حدی می تواند به درون سلول قارچی نفوذ کند، که در آنجا در دسترس سیتوکروم P450 قرار می گیرد. البته، ترکیباتی که کمتر محلول هستند نمی توانند به سلول قارچی نفوذ کنند و باید در ابتدا توسط بیومولکولهای خارج سلولی متابولیزه شوند. لذا انتخاب بیومولکولهای خارج سلولی به عنوان گروه های موفق در شکست ترکیبات آلی دور از ذهن نیست. بیومولکولهای خارج سلولی به طور معمول شکست ترکیبات آلی را به ترکیبات سبک تر انجام می دهند.

۳-۱-۴-۲) تولید آنزیم های لیگنینولایتیک طی تجزیه هیدروکربن های چند حلقه ای

چندین تحقیق نشان داده اند که قارچ های پوسیدگی سفید مختلفی می توانند تا حدی هیدروکربن های چند حلقه ای را معدنی کنند و مشخص شد که شکست ترکیبات آلی با تولید لاکاز و منگنز پراکسیداز مرتبط است [۱۱۴]. دخالت این آنزیم ها به صورت مکرر در تجزیه زیستی هیدروکربن های چند حلقه ای روشن شده است [۷۷, ۹۵, ۱۰۲, ۱۰۳].

از مهمترین آنزیم ها در شکست ترکیبات آلی سنگین آنزیم لاکاز می باشد که توسط بسیاری از گونه های قارچی پوسیدگی چوب ترشح می شود. لاکازها به علت ویژگیهای منحصر به فرد خود، عملکرد گسترده ای در برابر سوبستراهای مختلف دارند. اختصاصیت کم سوبسترا، از مهمترین ویژگیهایی است که باعث می شود این آنزیم بصورت بالقوه برای کاربردهای بیوتکنولوژیک مفید باشد. لاکازها برخلاف پراکسیدازها، به افزودن یا سنتز یک کوفاکتور دارای وزن مولکولی کم نظیر هیدروژن پراکسید نیاز ندارد، چون کوسوبسترای آن - اکسیژن - معمولاً در محیط وجود دارد. بیشتر لاکازها آنزیم های خارج سلولی هستند، که باعث می شود روند تخلیص بهتر باشد. بیان قابل القای آنزیم در بیشتر گونه های قارچی نیز در قابلیت کاربرد لاکاز در فرآیندهای بیوتکنولوژیک نقش دارد. آنها اکسیدازهای چند مسی هستند که شکست ترکیبات آروماتیک و غیرآروماتیک را با احیای اکسیژن مولکولی به آب کاتالیز می کنند.

فعالیت لاکاز نیز در تجزیه هیدروکربن های چند حلقه ای توسط قارچ های پوسیدگی سفید نشان داده شده است [۱۰۳]. فعالیت بالا و نسبتاً پایدار لاکاز طی تجزیه آنتراسن در قارچ *T. trogii* مشاهده شده است [۱۱۵]. البته، هان^{۳۹} و همکاران نشان دادند که تولید لاکاز توسط *T. versicolor* با اضافه کردن فنانترون افزایش یافت [۱۱۶]. افزودن سولفات مس، سیتریک اسید، گالیک اسید، تارتاریک اسید، وراتریل الکل، گایاکول و ABTS تجزیه هیدروکربن های چند حلقه ای را افزایش داد [۱۱۷].

پزنیاکوا^{۴۰} و همکاران نشان دادند که فعالیت های دو آنزیم لیگنینولایتیک، لاکاز و پراکسیداز همه کاره و مشتقات آنها و محصولات تجزیه ای آنها در شرایط کشت نیمه شناور در محیط غنی بازیدیومیست ها القاء شدند. لاکاز بیشتر در ۷-۱۰ روز اول تولید شد، درحالیکه تولید پراکسیدازها، چندین روز پس از کشت آغاز شد. تفاوت در زمان تولید برای این آنزیم ها پیشنهاد می دهد که لاکاز می تواند در اولین مراحل تجزیه ترکیبات آلی نقش داشته باشد [۹۳].

۳-۴-۳) دسترسی زیستی هیدروکربن های چند حلقه ای

همانطور که گفته شد حلالیت هیدروکربن های چند حلقه ای در محلول های آبی بسیار کم است. دسترسی زیستی آن ها ممکن است فاکتور محدود کننده برای حمله قارچی و میکروبی باشد [۱۱۸]. در شرایط آزمایشگاهی، افزودن یک دترجنت حلالیت هیدروکربن های چند حلقه ای را افزایش می دهد و امکان تعیین مکرر سوبسترا و محصولات را فراهم می کند. برای افزایش دسترسی آنزیم ها و سلول های لیگنینولایتیک به سوبستراها، سورفکتانت های غیرآنیونی نظیر توئین-۲۰ و توئین-۸۰ معمولاً بکار می روند [۱۱۹]. مشخص شده است که اثر

³⁹ Han

⁴⁰ Pozdnyakova

تحریک کننده سورفکتانت ها تنها به علت افزایش دسترسی زیستی به ترکیبات آلی می باشد، این نشان می دهد که اکسیداسیون این ترکیبات توسط آنزیم های لیگنینولایتیک خارج سلولی با دسترسی زیستی کم ترکیب محدود می شود [۱۱۹].

گزارش های کمی در مورد تولید ترکیب امولسیفای کننده طی تجزیه هیدروکربن های چند حلقه ای توسط قارچ های لیگنینولایتیک وجود دارد. سانگ^{۴۱} نشان داد که وقتی *P. chrysosporium* به صورت شیک رشد داده شد، احتمالاً به علت تولید یک بیوسورفکتانت کمی کف تشکیل شد. او پیشنهاد کرد که این سورفکتانت مسئول محلول شدن پیرن در محیط آبی می باشد [۱۲۰].

تولید یک عامل امولسیفای کننده طی تجزیه برخی از هیدروکربن های چند حلقه ای توسط قارچ پوسیدگی سفید *P. ostreatus* نیز یافت شد [۱۲۱]. فعالیت امولسیفای کننده رابطه معکوس با حلالیت آبی ترکیبات مورد استفاده دارد.

سه عملکرد مختلف محتمل برای عامل امولسیفای کننده پیشنهاد شده است:

(الف) این عامل می تواند برای افزایش حلالیت ترکیبات هیدروفوب ضروری باشد.

(ب) می تواند در اکسیداسیون ترکیبات هیدروفوب کاتالیز شده توسط آنزیم های لیگنینولایتیک نقش داشته باشد [۱۲۱].

(ج) می تواند اثر مثبتی بر تولید آنزیم های لیگنینولایتیک خارج سلولی در کشت به عنوان القا کننده داشته باشد. اثر مثبت عوامل امولسیفای کننده توسط جاگر^{۴۲} و همکاران تشریح شد [۱۲۲].

محققان افزایشی را در تولید لیپاز توسط *P. chrysosporium* در حضور برخی دترجنت ها (توئین-۸۰، توئین-۲۰) نشان دادند [۱۲۲]. بیوسورفکتانت های رامنولپید فعالیت لیپاز و منگنز پراکسیداز را در *P. chrysosporium* و فعالیت لیپاز و لاکاز را در *Penicillium simplicissimum* افزایش داد [۱۲۳].

بطور خلاصه براساس آنچه در بالا گفته شد باید توجه نمود که مطالعات اصلی بر روی شکست انواع ترکیبات آلی در شرایط مختلف محیط کشت ها و pH مختلف و شرایط لیگنینولایتیک و غیرلیگنینولایتیک مورد بررسی قرار می گیرند. شرایط یکسان قارچ های مختلف و همچنین شرایط مختلف یک قارچ می تواند مکانیسم های شکست ترکیبات آلی و دخالت گروه های مختلف بیومولکولها را روشن سازد [۹۱، ۹۲].

در نهایت دو گروه بیومولکولی باید مورد بررسی قرار بگیرند: بیومولکولهای داخل سلولی و بیومولکولهای خارج سلولی. حضور ژن های مرتبط با سیتوکروم P-450 به عنوان بیومولکول داخل سلولی در قارچ های پوسیدگی

⁴¹ Song

⁴² Jager

سفید به عنوان گروهی توانمند در شکست ترکیبات آلی به دی اکسید کربن معرفی شده است. نتایج تحقیقات اخیر پیشنهاد می دهند که حمله اولیه به ترکیبات آلی توسط بیومولکولهای خارج سلولی کاتالیز می شود. با توجه به هدف طرح که سبک نمودن ترکیبات آلی سنگین است و تجزیه کامل این ترکیبات هدف غایی نیست، از بیومولکولهای خارج سلولی به عنوان مولکولهای زیستی موفق در شکست ترکیبات آلی سنگین استفاده می شود [۹۱، ۹۲].

امروزه استفاده از این روش های نوین در کشورهای توسعه یافته سبب کاهش گرانی در نفت سنگین گردیده است و در نتیجه هزینه های ناشی از استخراج و حمل و نقل کاهش یافته است. این نکته را نباید از نظر دور داشت که با تداوم استخراج منابع نفت سبک، در آینده، تنها ترکیبات سنگین بر جای خواهد ماند و مهم تر آنکه وابستگی اقتصاد کشور ایران به نفت اعم از سبک و یا سنگین برای سالهای زیاد ادامه خواهد داشت. بنابراین همواره باید تلاش در جهت کسب دانش لازم برای بالاتر بردن توسعه و شناخت فناوریهای نوین استفاده از نفت سنگین و کاهش گرانی آن، به صورت پیگیر و مستمر ادامه یابد.

فصل چهارم: روش اجرای تحقیق

Archive of SID

فصل چهارم: روش اجرای تحقیق

۱-۴) مواد، دستگاه ها و تجهیزات

۱-۱-۴) مواد شیمیایی مورد استفاده

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل موارد ذیل هستند:

- نفت سنگین شناسنامه دار: با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مشخص از پژوهشگاه صنعت نفت تهیه گردید.
- پرایمرهای ITS1 و ITS4: سنتز در شرکت متابیون آلمان
- کیت استخراج DNA از کمپانی ایترون کره جنوبی، RNase، لیزوزیم، آگارز ۰/۸٪، مواد شیمیایی دیگر با درجه خلوص بالا، بافرهای مختلف،
- آگارز ۰/۸٪: ۰/۳۲ g آگارز (INTERCHIM) در ۴۰ ml بافر TAE حل شد.
- محیط کشت SDA با ترکیب: پپتون میکروبیولوژی (۱۰/۰ g/lit)، دکستروز (۴۰/۰ g/lit)، آگار (۱۵/۰ g/lit) و pH نهایی ۵/۶ در ۲۵ درجه سانتی گراد. از شرکت HiMedia خریداری شد.
- محیط کشت مایع SDB با ترکیب: پپتون گوشت (۵/۰ g/lit)، پپتون کازئین (۵/۰ g/lit)، D (+) - گلوکز (۲۰/۰ g/lit). از شرکت Merck خریداری شد.
- سرم فیزیولوژی: ۸/۵ g نمک NaCl در ۱۰۰۰ ml آب مقطر حل شد.
- بافر الکتروفورز (TAE): Tris base (۲۴ g/lit)، آب دیونیزه (۷۵۰ ml)، استیک اسید (۵۷/۱ ml)، EDTA (۰/۵ M، ۱۰۰ ml، pH ۸)
- EDTA (۰/۵ M): ۱۸۶/۱ g EDTA در ۸۰۰ ml آب مقطر حل شد. با استفاده از مگنت و بر روی استیرر به شدت مختلط شد. به تدریج هیدروکسید سدیم اضافه شد تا pH به ۸ برسد. در این مرحله EDTA بطور کامل حل می شود و محلول شفافی تشکیل می شود.
- سولفات آهن ۷ آبه (Merck Company)
- کلرید آهن ۶ آبه (Merck Company)
- آمونیاک (Merck Company)
- اسیدکلریدریک (Merck Company)

- تری کلرو استیک اسید (Sigma Company)
- تریس (Cinnagen Company)
- پرسولفات آمونیوم (Sigma Company)
- ایزوبوتانول (Merck Company)
- آکریلامید (Cinnagen Company)
- بیس آکریلامید (Cinnagen Company)
- متانول (Merck Company)
- استیک اسید (Merck Company)
- کوماسی بریلیانت بلو (Sigma Company)
- کلرید سدیم (Merck Company)
- فنول (BDH Company)
- لاکتیک اسید (Sigma Company)
- گلیسرول (Merck Company)
- متیلن بلو (Merck Company)
- TEMED (Merck Company)
- هگزادکان (Sigma Company)
- اسکوالن (Sigma Company)
- آنتراسن (Sigma Company)
- دی بنزوفوران (Sigma Company)
- n-هگزان (Merck)
- اسید استیک (Merck)
- استات سدیم (Merck)
- متانول (Merck)
- بافر استات سدیم ۰/۲ مولار در pH ۳
- بافر استات سدیم ۰/۲ مولار در pH ۵
- بافر استات سدیم ۰/۲ مولار در pH ۷
- بافر استات سدیم ۰/۲ مولار در pH ۹

۱-۱-۱) طرز تهیه بافرهای مورد نیاز

استوک آکریلامید ۳۰٪:

- آکریلامید : ۲۹ گرم
- بیس آکریلامید: ۱ گرم

با آب مقطر حجم نهایی به ۱۰۰ ml می رسد.

استوک بافر ژل جدا کننده:

- SDS: ۰/۴ g
- تریس : ۱۸/۲ g

مواد ذکر شده را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ ml حل نموده و pH به ۸/۸ رسانده شد. این محلول در دمای ۴ درجه ماه ها قابل استفاده می باشد.

استوک بافر ژل تراکم کننده:

- SDS: ۰/۱ g
- تریس : ۱/۵۲ g

مواد ذکر شده را در ۲۳ ml آب مقطر حل نموده و pH را به ۶/۸ رسانده شد. این محلول در دمای ۴ درجه ماه ها قابل استفاده می باشد.

محلول استوک آمونیوم پر سولفات:

آمونیوم پر سولفات (۰/۲ g) در ۲ ml آب مقطر حل شد. این محلول باید به صورت تازه مصرف شود .

بافر تانک ۵x:

- SDS: ۲/۵ g
- تریس : ۷/۶ g
- گلايسين : ۳۶ g

مواد ذکر شده با آب مقطر به حجم 500 ml رسانده شد و برای مصرف به میزان 5 برابر رقیق شد.

استوک Sample بافر:

- SDS: 0.92 g
- تریس: 0.3 g
- گلیسرول: 4.0 g
- برومو فنول بلو: 0.1% (w/v)
- بتا - مرکاپتو اتانول: 2.0 ml

مواد ذکر شده با آب مقطر به حجم 20 ml حل و pH روی 6.8 تنظیم شد.

محلول رنگ آمیزی:

- کماسی بلو R-250: 0.5 g
- متانول: 200 ml
- استیک اسید: 50 ml

ابتدا رنگ را در متانول حل نموده و سپس اسید استیک اضافه کرده و با آب مقطر به حجم 250 ml رسانده شد. سپس با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید و در ظرف تیره نگهداری شد.

محلول رنگ بر:

- متانول: 300 ml
- استیک اسید: 100 ml

با آب مقطر حجم نهایی به 100 ml رسانده شد.

رنگ آمیزی کاتن بلو:

- متیلن بلو (کاتن بلو): 50 mg
- کریستال فنول: 25 g
- لاکتیک اسید: 25 g
- گلیسرول: 50 g

• آب مقطر: 100 ml

تمام مواد را از طریق حرارت کاملاً حل نموده و در آخر متیلن بلو به آن اضافه می شود. کاملاً مخلوط کرده تا ذرات رنگ حل شوند.

۲-۱-۴) دستگاه ها و تجهیزات مورد استفاده

دستگاه ها و تجهیزات مورد استفاده شامل موارد ذیل هستند:

- ترازوی دیجیتالی (0.0001 g)(Shimadzu AEU-Z10، ژاپن)
- اسپکتروفتومتر (WPA مدل lightwave S2000 UV/visible spectrophotometer)
- یخچال ۴ درجه سانتی گراد Vestfrost
- فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد SAMSUNG مدل SFR-A15NFA
- فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد WiseCryo
- اتوکلاو (Wise Clave مدل MAC-47)
- شیکر انکوباتور (LabTech، کره جنوبی)
- سیستم هوادهی به نمونه ها
- دستگاه گاز کروماتوگرافی (Shimadzu مدل GC-15A)
- الکتروفورز (BIO RAD، مدل PowerPac™ Basic)
- دستگاه PCR (CORBETT RESEARCH مدل CG1-960، استرالیا)
- سمپلر (SOCOREX مدل ACURA 825)
- میکروسانتریفوژ (SIGMA مدل 1-14)
- هود شیمیائی (ایران)
- Heater Block مدل NF 47001 شرکت ندای فان
- دستگاه ژل داگ (DOC-208-XD)
- دستگاه الکتروفورز عمودی جهت SDS-page (BIO RAD، مدل PowerPac™ Basic)
- پرستیک پمپ
- هات پلیت مگنت
- بورت

- هاون چینی جهت پودر کردن نانوذرات
- بن ماری
- هاون چینی جهت پودر کردن نانوذرات
- قیف جدا کننده
- دستگاه FESEM (کمپانی هیتاچی)
- دستگاه TEM (کمپانی هیتاچی)
- سانتریفیوژ یخچالدار (کمپانی اپندورف)



شکل ۱-۲: دستگاه SEM



شکل ۲-۲: دستگاه TEM

۲-۴) شناسایی و تعیین بهترین گونه ها

قارچها به عنوان موجودات بسیار توانا در زمینه شکست ترکیبات آلی سنگین معرفی شده اند. برتری قارچها به باکتریها تولید آنزیم های خارج سلولی است. قارچها با تولید بیومولکولها با توانایی شکست سوبستراهای مختلف نفتی می توانند در تبدیل مولکولهای سنگین نفت به مولکولهای سبک تر موثر باشند. از مهمترین این قارچها قارچ های عامل پوسیدگی سفید هستند که با تولید و ترشح آنزیم های خارج سلولی شکننده سوبستراهای نفتی در این زمینه بسیار توانمند هستند. ساختمان بدن این نوع قارچ ها از ۹۰ درصد آب و ۱۰ درصد ماده خشک تشکیل شده است. قارچهای پوسیدگی سفید از کربن موجود در ترکیبات دیواره چوبی مانند سلولز، همی سلولز و لیگنین استفاده می کنند. این قارچها همچنین هیدروژن مورد نیاز خود را برای تولید انرژی از ترکیبات آلی چوب تهیه می کنند. پوسیدگی سفید معمولاً شامل تخریب سلولز، همی سلولز و لیگنین است که اغلب توسط بازیدیومیستها و به ندرت آسکومیستها رخ می دهد. تخریب کربوهیدراتها و لیگنین توسط قارچهای عامل پوسیدگی سفید در طی مراحل پوسیدگی به صورت همزمان و غیر منظم رخ می دهد. این قارچها در محیط بسیار مقاوم هستند. بیومولکولهایی که این قارچها تولید می کنند در شرایط دمایی و pH مختلف فعالیت خود را حفظ می کنند. این آنزیم ها با توجه به شباهت ساختاری سوبستراهای خود توانایی شکست ترکیبات نفتی را دارند. در این طرح سعی بر شناسایی گونه های قارچی بومی شکننده ترکیبات سنگین نفت و استخراج بیومولکولهای فعال در این زمینه است.

۳-۴) جمع آوری نمونه های قارچ

همانطور که گفته شد در این طرح قارچ های عامل پوسیدگی سفید به عنوان هدف در نظر گرفته شدند. از خصوصیات بارز این نوع قارچها رشد بر چوب های در حال فساد است. بر اساس شناخت مورفولوژی اولیه گونه های بومی از جنگل های استان گلستان جمع آوری و به محل آزمایشگاه منتقل شدند. پنج گونه قارچی به عنوان گونه های بومی منتخب در نظر گرفته شدند.

۴-۴) بررسی و آماده سازی قارچها جهت واکنش با ترکیبات سنگین نفت

بدین منظور در آزمایشگاه ابتدا از بافت اولیه قارچ ها قطعات کوچک بریده شده و با سرم فیزیولوژی استریل شست و شو انجام شد. در ادامه نمونه ها بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار^{۴۳} انتقال داده شده و سپس نمونه ها در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از رشد، نمونه ها از انکوباتور خارج و برای نگهداری تا استفاده بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد به یخچال انتقال داده شدند. به منظور تازه ماندن نمونه ها هر ماه یک بار واکنش شدند.

۴-۵) اثر قارچ های بومی بر شکست ترکیبات سنگین نفت

با توجه به هدف این طرح که شکست ترکیبات سنگین نفت است، نفت سنگین شناسنامه دار (با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مشخص) از پژوهشگاه نفت تهیه گردید. محیط کشت مایع سابورو دکستروز براث^{۴۴} تهیه شد و در ۶ ارلن مختلف به میزان ۷۰ میلی لیتر تقسیم شد، سپس به میزان ۱۰ میلی لیتر نفت سنگین به هر ارلن اضافه گردید. در نهایت ارلن های حاوی محیط کشت و نفت سنگین در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. از محیط کشت جامد در محیط های مایع تلقیح شد و یکی از ارلن ها به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. نمونه شاهد حاوی تمامی اجزای واکنش به جز عامل مورد آزمایش می باشد. تمامی نمونه ها در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد که دمای بهینه رشد این نوع قارچها است و rpm ۱۲۰ قرار داده شدند. نمونه ها هوادهی شدند و روند فعالیت آنزیمی قارچ ها مورد بررسی قرار گرفت. پس از مدت زمان ۶۰ روز نمونه ها مورد سنجش دستگاه گاز کروماتوگرافی قرار گرفتند.

۴-۶) آنالیز گاز کروماتوگرافی

جهت بررسی شکست ترکیبات آلی سنگین توسط گونه های قارچی متفاوت از دستگاه گاز کروماتوگرافی^{۴۵} (GC) استفاده شد. کروماتوگرافی گازی یکی از روش های کروماتوگرافی است که برای بررسی و جداسازی مواد آلی بدون تجزیه شدن آنها، بکار می رود. در کروماتوگرافی گازی، فاز گازی یک فاز بی اثر (برای مثال هلیوم، نیتروژن، آرگون و دی اکسید کربن) است. فاز ساکن یک جسم جامد جاذب و یا لایه نازکی از یک مایع غیر فرار است که به دیواره داخلی ستون یا به صورت پوششی روی سطح گلوله های شیشه ای یا فلزی

⁴³ Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

⁴⁴ Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

⁴⁵ Gas Chromatography (GC)

قرار داده شده است. در کروماتوگرافی گازی، جداسازی اجزاء یک مخلوط متناسب با میزان توزیع اجزاء تشکیل دهنده مخلوط بین فاز متحرک گازی و فاز ساکن جامد یا مایع صورت می گیرد. در این روش گاز حامل مخلوط را درون ستون حرکت می دهند و بین دو فاز در حالت تعادل (گاز-مایع) اجزاء تشکیل دهنده مخلوط توزیع می شوند. بنابراین فاز متحرک اجزاء تشکیل دهنده نمونه را به طرف بیرون ستون حرکت می دهد و هر مولکولی که با ارتباط سست تر جذب ستون شده است، زودتر و جزئی که قدرت جذب بیشتری با ستون دارد، دیرتر از ستون خارج می شوند. بنابراین، اجزاء مخلوط از یکدیگر جدا می شوند. کروماتوگرافی گازی برای جداسازی و شناسایی اجزاء تشکیل دهنده و تجزیه کمی آنها کاربرد دارد.

۱-۶-۴) آماده سازی نمونه ها جهت گاز کروماتوگرافی

یکی از بهترین روش ها برای جداسازی ترکیبات نفتی استفاده از حلالهای آلی است. در این طرح برای جداسازی ترکیبات نفتی از سه حلال n - هگزان، دی کلرومتان و کلروفرم استفاده شد. به طور کلی هر یک از این حلالها گروه های خاصی از نفت را جدا می کنند. n-هگزان برای جداسازی ترکیبات سبک، دی کلرومتان برای جداسازی ترکیبات متوسط و کلروفرم باقی ترکیبات را جدا می کند. به هر کدام از ارلن ها ۳۰ میلی لیتر n-هگزان اضافه شد و پس از مخلوط کردن به کمک قیف جداکننده (دکانتور) دو فاز تشکیل و فاز هگزان جدا شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی در سنجش ترکیبات سبک نفت کاربرد دارد و هگزان نیز قادر به جداسازی ترکیبات سبک نفت است. هگزان حاصل از نمونه های قارچ های بومی و نمونه شاهد آماده سازی شد و مورد سنجش قرار گرفت. برای بررسی دقیق تر پس از سه بار تکرار نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت.

۷-۴) شناسایی گونه بومی قارچ منتخب

در این مرحله گونه های مختلف قارچ که در واکنش با مولکولهای سنگین دارای بهترین عملکرد بودند، به منظور شناسایی در نظر گرفته شدند. ابتدا شناسایی مورفولوژی به کمک کلید شناسایی قارچ صورت گرفت. کلیدها، صفات قارچها را به شیوه ای دسته بندی می کنند که شناسایی مؤثر ارگانسیم ها را امکانپذیر می سازد. نظام شناسایی ایده آل باید حاوی کمترین خصوصیات لازم برای تشخیص صحیح باشد. گروه ها براساس وجود (+) یا نبود (-) یک ویژگی تشخیصی به زیر گروه هایی تقسیم می شوند. تداوم این روند، محقق را قادر می سازد که با ویژگی های مختلف، شناسایی را انجام دهند. در ابتدای این روند، ارگانسیم ها ممکن است براساس ویژگی هایی که شباهت های ژنتیکی را منعکس نمی سازند، گروه بندی شوند. از ویژگی های مهم در شناسایی قارچها

شکل ظاهری قارچ، رنگ آن، حالت کلاهک، شکل منافذ و... می باشد. برای اطمینان بیشتر استخراج ماده ژنتیکی و شناسایی مولکولی گونه مورد نظر انجام شد.

۱-۷-۴) طراحی پرایمر

در قارچها توالی حفاظت شده ای وجود دارد که مانند ناحیه 16S rRNA در باکتری هاست. این ناحیه ITS⁴⁶ نامیده می شود. برای شناسایی این ناحیه به کمک منابع موجود پرایمرهای ITS1 و ITS4 طراحی و برای سنتز به شرکت متابیون آلمان سفارش داده شد.

۲-۷-۴) استخراج ماده ژنتیکی و الکتروفورز

استخراج ماده ژنتیک به کمک کیت استخراج DNA از کمپانی ایترون کره جنوبی از نمونه قارچی انجام گرفت. در ابتدا نمونه های قارچی به کمک ازت مایع فریز شدند تا دیواره سلولی آنها شکننده شود. به کمک بافرهای مختلف و آنزیم لیزوزیم شکست دیواره انجام شد و برای جلوگیری از آلودگی RNA از RNase استفاده شد. مراحل استخراج پس از پودر کردن قارچ توسط ازت مایع به صورت زیر انجام شد.

- ۱۰۰ میلی گرم از پودر قارچ وزن شد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر MP و ۳ میکرولیتر لیزوزیم اضافه و ورتکس شد.
- ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد.
- افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر MG و ۱۰ میکرولیتر بافر Proteinase K و ۵ میکرولیتر RNase A و ورتکس انجام شد.
- ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد.
- ۲۵۰ میکرولیتر بافر MB و سپس اتانول ۸۰٪ اضافه و مخلوط شد.
- ۷۵۰ میکرولیتر از مخلوط را به ستون اضافه کرده و با افزودن ۷۰۰ میکرولیتر بافر MW در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع دور ریخته شده و دوباره در همان شرایط سانتریفیوژ شد تا نمونه خشک شود.
- پس از انتقال ستون به میکروتیوپ جدید با ۵۰ میکرولیتر بافر ME و ۱ دقیقه انکوبه در دمای اتاق در دور ۱۳۰۰۰ و زمان ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد.

⁴⁶ internal transcribed spacer (ITS)

پس از انجام مراحل استخراج بر اساس پروتکل کیت، برای حصول اطمینان از استخراج، نمونه ها الکتروفورز شدند. برای تست نمونه ها با الکتروفورز، ژل آگارز ۰/۸٪ تهیه شد. برای ساخت ژل و انجام الکتروفورز از بافر TAE استفاده شد. ولتاژ دستگاه ۱۰۰ ولت و زمان ۱ ساعت در نظر گرفته شد. در نهایت به کمک دستگاه ژل داک ژل مشاهده گردید.

۳-۷-۴) واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)^{۴۷}

به مجموعه واکنش های زنجیره ای اطلاق می شود که در آن یک آنزیم پلی مرز، یک ردیف نوکلئوتید هدف را به کمک پرایمرهای طراحی شده تکثیر می کند. از کاربردهای این روش شناسایی مولکولی ارگانسیم های بومی است که شناخته شده نیستند. در این طرح از این روش جهت توالی یابی ژن مورد نظر استفاده شد.

شرایط PCR به کمک مقالات شناسایی قارچ ها و دمای T_m نمونه ها برنامه ریزی و برای به دست آوردن بهترین دمای اتصال پرایمرها از واکنش زنجیره ای پلیمراز با شیب دمایی استفاده شد. بهترین دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد.

حجم مخلوط واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد و مقدار واکنشگرها و شرایط PCR طبق جداول ۱ تا ۳ در نظر گرفته شد.

جدول ۱-۴: مواد لازم برای انجام واکنش PCR

Component	volume
Forward Primer	۱ μl
Reverse Primer	۱ μl
PCR master mix	۱۲/۵ μl
DNA sample	۳ μl
Deionized water	۷/۵ μl

⁴⁷ Polymerase chain reaction (PCR)

جدول ۲-۴: توالی پرایمر ها

نام پرایمر	توالی پرایمر
ITS1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'
ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'

جدول ۳-۴: مراحل انجام واکنش PCR

Stage	Time	Temperature	Repeats
Initial denaturation	۴ min	۹۴ °C	
Three-step cycling			۳۵
Denaturation	۴۵ sec	۹۴ °C	
Annealing	۴۵ sec	۵۵ °C	
Extension	۱ min	۷۲ °C	
Final Extension	۷ min	۷۲ °C	
Storage	∞	۴ °C	

در نهایت نتایج حاصل از واکنش PCR توسط دستگاه الکتروفورز بررسی شد. برای اطلاع از اندازه ژن هدف گونه منتخب از DNA Ladder 1kb شرکت فرمتاس به عنوان مارکر اندازه استفاده شد.

بهینه سازی واکنش PCR با غلظت و حجم مناسب صورت گرفت و نمونه مورد نظر برای تعیین توالی به کشور کره جنوبی ارسال گردید.

۴-۷-۴) تعیین توالی ژن ناحیه ITS و تعیین گونه قارچ

با توجه به نتایج گاز کروماتوگرافی به عنوان شاخص شکست ترکیبات نفتی سنگین گونه ۵ با بهترین نتایج شکست انتخاب شد و پس از انجام واکنش PCR جهت تعیین توالی به کمپانی ماکروژن^{۴۸} کره جنوبی فرستاده شد.

۸-۴) سنتز نانوذرات

در این طرح از روش هم‌رسوبی جهت سنتز نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن استفاده شد. علت انتخاب این روش هزینه پایین، زمان کم مورد نیاز و میزان زیاد تولید نانوذرات به نسبت مواد اولیه می باشد.

۸-۴-۱) سنتز نانوذرات Fe_3O_4

مقادیر ۱۹/۲ گرم سولفات آهن ۷ آبه و ۳۷/۳۰ گرم کلرید آهن ۶ آبه در ۱۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر، در بشر ۵ لیتری ریخته شده و بر روی هیتر استیرر دار با مگنت ۵ سانتی متری به سرعت حل شدند. تا ۱۵۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۰۴۶ مولار نسبت به سولفات آهن و ۰/۰۹۲ مولار نسبت به کلرید آهن تهیه شود. در ادامه ابتدا pH محلول اندازه گیری شد (۱/۸۳). سپس جهت جلوگیری از زیاد شدن زمان واکنش، به کمک دو بورت که در کنار هم چیده شده بودند، افزایش آمونیاک ۴ مولار به آرامی انجام شد. همچنین برای جلوگیری از اتصال قطرات افزوده شده در اثر کند بودن شدت هم خوردن واکنش، بورت ها طوری تنظیم شدند که قطرات هر دو بورت در مرکز دوران مگنت وارد شوند و همچنین قطرات به صورت متوالی چکیده شوند.

با افزایش حدود ۷۵۰ میلی لیتر آمونیاک ۴ مولار در مدت ۳ ساعت pH مخلوط واکنش به ۱۰/۲۵ رسید. واکنش متوقف شد و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق بهم زده شد. در ادامه در مدت زمان ۵۵ دقیقه با افزایش ۱۸۵ میلی لیتر اسید کلریدریک به کمک دو بورت، pH مخلوط واکنش به ۳ رسید. نانوذرات تولید شده به کمک آهنربا ته نشین و چندین بار با آب مقطر شستشو شدند تا به pH خنثی برسد و در نهایت رسوبات حاصل از این واکنش به مدت یک شب در آون با دمای ۱۰۰ درجه خشک شد.

۸-۴-۲) سنتز نانوذرات $\delta-Fe_2O_3$

تمام مراحل مانند سنتز نانوذرات Fe_3O_4 انجام شد و در ادامه مخلوطی که به pH ۳ رسیده شد به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. در ادامه جهت تبدیل محصولات سنتز شده به نانوذرات گاما اکسید آهن، مخلوط واکنش به کمک کمپرسور هوا و در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت هوادهی شد. در نهایت چندین بار با آب مقطر شستشو شد تا به pH خنثی برسد. در نهایت رسوبات ته نشین شده به مدت یک شب در آون با دمای ۱۰۰ درجه خشک شد.

۹-۴) تهیه کشت خالص از قارچ منتخب

برای ایجاد کشت خالص از قارچ مورد نظر از سرم فیزیولوژی حاوی ۱/۰٪ توپین ۸۰٪ استفاده شد. از دو محیط نوترینت آگار و SDA برای کشت استفاده شد. ۳۰۰ µl از قارچ روی دو محیط کشت داده شد. با توجه به موکئیدی بودن کلنی باکتریایی در محیط نوترینت آگار هیچ آلودگی باکتریایی دیده نشد. جهت اطمینان از عدم رشد باکتری ها در محیط SDA از کلرامفنیکل (یک آنتی بیوتیک باکتریواستاتیک است که از طریق پیوند برگشت ناپذیر با ریبوزوم باکتری ها بیوسنتز پروتئین را مهار می کند) استفاده شد.

۱۰-۴) جداسازی بیومولکولها

کشت نمونه های قارچ تعیین شده در محیط فاقد ترکیبات آلی سنگین و در حضور ترکیبات آلی سنگین با توجه به پایداری بیشتر بیومولکولهای خارج سلولی و القای تولید آنها توسط قارچ در محیط کشت مناسب با افزودن القا کننده که در این آزمایش از سوبسترای نهایی (نفت خام سنگین) استفاده شد، میزان تولید و تعداد بیومولکولها با توجه به شدت و تعداد باندها در SDS-PAGE^{۴۹} بررسی شد.

از دو ارلن ۵۰۰ میلی لیتری جهت کشت نمونه قارچی استفاده شد. نمونه ۱ حاوی محیط کشت SDB و قارچ مورد مطالعه و نمونه ۲ حاوی محیط کشت SDB و قارچ مورد مطالعه و نفت سنگین به نسبت ۱ به ۱۰ به حجم کل بود. نمونه ها به مدت ۷ روز در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و دور ۱۲۰ rpm قرار داده شدند.

۱-۱۰-۴) بیومولکولهای داخل سلولی

به دلیل وجود دیواره سلولی سخت جدا کردن بیومولکولهای داخل سلولی بسیار دشوار تر است. برای شکست دیواره از لیزوزیم و بافرهای گوناگون استفاده شد. در ابتدا قارچ مورد نظر تحت ازت مایع قرار گرفت و پودر یکنواختی از آن تهیه شد. جهت شکست دیواره سلولی قارچ از آنزیم لیزوزیم استفاده شد. ورتکس کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. نمونه با روش TCA^{۵۰} مانند بیومولکولهای خارج سلولی رسوب داده شد و برای بررسی سایز و انجام SDS-PAGE به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

⁴⁹ Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

⁵⁰ Trichloroacetic acid (TCA)

1-1-1-1) آماده سازی ژل در روش SDS-PAGE

شیشه های سیستم الکتروفورز عمودی را به خوبی تمیز کرده و پس از اتصال ژل پایین در آن توسط سرنگ تزریق شد. با توجه به اندازه بیومولکولهای جداسازی شده ژل ۱۲٪ برای این پژوهش انتخاب شد. ژل پایین طبق جدول زیر آماده شد.

جدول ۴-۴: آماده سازی ژل پایین در روش SDS-PAGE

Separating Gel 12%	
۱/۸ ml	آب مقطر
۲ ml	آکریلامید ۳۰٪
۱/۲۵ ml	بافر جداکننده
۷۰ μl	پرسولفات آمونیوم ۱۰٪
۷ μl	TEMED ⁵¹

برای این منظور اجزای ژل به جز TEMED در یک بشر ریخته شد و در انتها TEMED اضافه می شود. آکریلامید به عنوان یک مونومر نوروکسین است که وقتی در آب حل می شود پلیمر می گردد که این فرآیند در حضور رادیکالهای آزاد به سرعت اتفاق می افتد. در این واکنش رادیکالهای آزاد توسط آمونیوم پرسولفات ایجاد می شود که TEMED با انتقال الکترون این واکنش را کاتالیز می کند. از محلول ایزوبوتانول برای صاف کردن سطح ژل پایین استفاده شد.

ژل بالا برای متراکم کردن نمونه ها مورد استفاده قرار می گیرد در این طرح ژل ۵٪ به کار برده شد. طبق جدول زیر ژل بالا تهیه شد.

جدول ۴-۵: آماده سازی ژل بالا در روش SDS-PAGE

Stacking Gel 5%	
۱ ml	آب مقطر
۲۸۰ μl	آکریلامید ۳۰٪
۴۳۰ μl	بافر متراکم کننده
۷۰ μl	پرسولفات آمونیوم ۱۰٪
۷ μl	TEMED

⁵¹ Tetramethylethylenediamine (TEMED)

پس از ۲۰ دقیقه از تزریق ژل پایین، ژل بالا تزریق شده و شانه برای ایجاد چاهک در آن قرار داده شد. نمونه ها به میزان $30 \mu\text{l}$ با $6 \mu\text{l}$ از بافر نمونه ترکیب شده و به چاهک تزریق شد. ولتاژ روی 150 ولت تنظیم شد (شکل ۱-۴) و پس از $1/5$ ساعت ژل در محلول و روی شیکر با دور آرام قرار گرفت.



شکل ۱-۴: سیستم SDS-PAGE

ژل پس از یک ساعت در محلول رنگ بر قرار داده شد و پس از یک شب و سه بار تعویض محلول رنگ بر مورد آنالیز قرار گرفت.

۲-۱۰-۴) بیومولکولهای خارج سلولی

جهت جداسازی بیومولکولهای خارج سلولی نمونه های کشت داده شده از سانتریفیوژ با دور 4000 به مدت 15 دقیقه استفاده شد. مایع رویی جهت جداسازی بیومولکولهای خارج سلولی و رسوب حاصل جهت جداسازی بیومولکولهای داخل سلولی در ظرف های مجزا به یخچال منتقل شد.

از روش رسوبدهی تری کلرواستیک اسید (TCA) برای رسوب بیومولکولهای موجود در مایع رویی هر دو نمونه استفاده شد. 500 گرم TCA در 350 میلی لیتر آب مقطر حل شد. محلول استوک TCA در فریزر 20^- درجه سانتیگراد قرار داده شد. نمونه های پروتئینی به نسبت 4 به 1 با استوک TCA مخلوط شدند. به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد انکوبه شدند و در دور 14000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب ها استون سرد (که به صورت شانه در فریزر 20^- درجه سانتیگراد قرار داده شد) اضافه گردید. در دور 14000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. این کار 3 بار تکرار شد. سپس برای تغلیظ بیشتر نمونه ها از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی (شکل ۲-۴) با استفاده از بافر نمک در شیب غلظت مناسب استفاده شد. نمونه ها در دمای 95 درجه به مدت 10 دقیقه قرار گرفت تا برای SDS-PAGE آماده گردد.



شکل ۲-۴: ستون کروماتوگرافی

۱۱-۴) آنالیز تجزیه ترکیبات سنگین نفتی

با توجه به اهمیت کاهش حضور ترکیبات سنگین در نفت خام، ترکیباتی با وزن مولکولی مختلف که در رده بندی ترکیبات سنگین نفت قرار می گیرند، انتخاب شدند. در این پژوهش از هر چهار گروه اصلی نفت یک ترکیب انتخاب و آزمایشات در شرایط مختلف محیطی بر روی آنها صورت گرفت. جهت ارزیابی نتایج پروژه دو روش گاز کروماتوگرافی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در نظر گرفته شده بود. از آنجا که اساس دستگاه گاز کروماتوگرافی بر نقطه جوش مواد استوار است و بیشتر مواد سنگین موجود در نفت دارای نقطه جوش بالایی هستند، تست کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای آن دسته از ترکیباتی در نظر گرفته شده که دارای پیک مناسبی در دستگاه گاز کروماتوگرافی نباشند. با توجه به موجود بودن دستگاه گاز کروماتوگرافی در پژوهشکده علوم پایه کاربردی، تست های مکرری بر اجزای سنگین نفت صورت گرفت. در نهایت با تغییر شرایط آنالیزی و تغییر در برنامه دستگاه گاز کروماتوگرافی و استفاده از حلال های مختلف شناسایی پیک مواد مورد نظر برای هر چهار ترکیب با موفقیت انجام شد. در تمام آنالیزها از دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده گردید.

جهت آنالیز هر چهار ترکیب غلظت های مختلف از آنها آماده شد و مورد سنجش با دستگاه گاز کروماتوگرافی قرار گرفت. غلظتی که بهترین شناسایی در آن صورت گرفت، به عنوان مرجعی برای آماده سازی نمونه ها در تمامی آزمایشات در نظر گرفته شد.

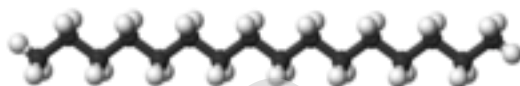
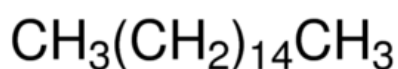
۱-۱۱-۴) بررسی برنامه های دمایی دستگاه گاز کروماتوگرافی

در این طرح از دستگاه گاز کروماتوگرافی کمپانی شیمادزو مدل 15A با ستون Rtx-5MS استفاده شد. با توجه به قابلیت های ستون مورد استفاده، از برنامه های دمایی مختلف استفاده شد. نقطه جوش بالای مواد و توجه به عدم آسیب به ستون و دستگاه سبب گردید که برنامه های دمایی مختلف بارها تکرار شوند تا در نهایت برنامه دمایی منتخب برای شناسایی هر چهار ترکیب به دست آمد.

دمای تزریق و شناساگر ۳۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. دمای ستون از ۸۰ درجه سانتیگراد شروع شد و با رمپ ۱۰ درجه بر دقیقه به ۲۶۵ درجه سانتیگراد رسید و به مدت ۱۰ دقیقه در آن دما قرار داده شد.

۱-۱-۱) آلکان ها و گزینه انتخابی هگزادکان^{۵۲}

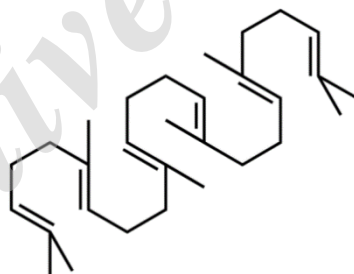
هگزادکان یک آلکان خطی است با وزن مولکولی ۲۲۶/۴۴ گرم بر مول، نقطه جوش ۲۸۶ درجه سانتیگراد و نقطه ذوب ۱۸ درجه سانتیگراد (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۴: ساختار مولکول هگزادکان

۱-۱-۲) آلکن ها و گزینه انتخابی اسکوالن^{۵۳}

اسکوالن^{۵۴} به عنوان ترکیب آلکنی موجود در نفت مورد استفاده قرار گرفت. با وزن مولکولی ۴۱۰/۷۲ گرم بر مول، نقطه جوش ۲۸۵ درجه سانتی گراد، نقطه ذوب ۷۵- درجه سانتی گراد (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴: ساختار مولکولی اسکوالن

نمونه اسکوالن با تنظیم دستگاه با شرایط منتخب در زمان نزدیک به دقیقه ۱۳ (محور افقی کروماتوگرام) خارج و در تمامی مراحل آزمایش این زمان تکرار شد.

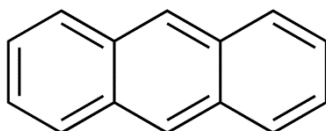
⁵² Hexadecan

⁵³ Squalene

⁵⁴ 2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene

۳-۱-۱۱-۴) آروماتیک ها و گزینه انتخابی آنتراسن^{۵۵}

آنتراسن که پارافنتالن نیز نامیده می شود، یک هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای است که از سه حلقه بنزنی تشکیل شده است و در لیست ترکیبات آلاینده آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا (EPA)^{۵۶} قرار دارد. وزن مولکولی ۱۷۸/۲۳ گرم بر مول، نقطه جوش ۳۴۰ درجه سانتی گراد، نقطه ذوب ۲۱۰-۲۱۵ درجه سانتی گراد (شکل ۴-۵).

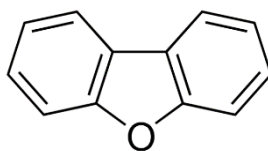


شکل ۴-۵: ساختار مولکولی آنتراسن

مولکول آنتراسن با نقطه جوش ۳۴۰ درجه یکی از گزینه هایی بود که انتظار می رفت نیاز به آنالیز کروکاتوگرافی مایع با کارایی بالا داشته باشد. این مولکول به علت ساختار حلقوی خود به خوبی در HPLC قابل شناسایی است، ولی دستگاه گاز کروماتوگرافی توانست این ماده را در دقیقه حدود ۱۶ پس از بارها تکرار تست تغییر غلظت شناسایی کند و نیاز به استفاده از دستگاه HPLC برای شناسایی را حل کرد. به دلیل موجود بودن دستگاه گاز کروماتوگرافی در محل اجرای پروژه و امکان تکرارهای مکرر برای دستیابی به بهترین شناسایی دستگاه هدف برای انجام تست های متوالی گاز کروماتوگرافی انتخاب گردید.

۴-۱-۱۱-۴) رزین ها - آسفالتین ها و گزینه انتخابی دی بنزوفوران^{۵۷}

دی بنزوفوران دارای وزن مولکولی ۱۶۸/۱۹ گرم بر مول، نقطه جوش ۱۵۴-۱۵۵ درجه سانتی گراد، نقطه ذوب ۸۰-۸۲ درجه سانتی گراد می باشد (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۶: ساختار مولکولی دی بنزوفوران

⁵⁵ Anthracene

⁵⁶ US Environmental Protection Agency

⁵⁷ Dibenzofuran

۱۱-۴) بر هم کنش نانوذرات با مولکولهای سنگین نفت در pH های مختلف

برای بررسی اثر pH بر عملکرد نانوذرات از محیط های اسیدی تا قلیایی استفاده گردید. بافر استات ۰/۲ مولار در pH های مختلف ۳، ۵، ۷ و ۹ تهیه گردید. نانوذرات مگنتیت با غلظت ۱٪ در بافر سدیم استات ۰/۲ مولار با شرایط اسیدی و قلیایی مختلف آماده شدند. تمام نانوذرات در شرایط یکسان در دستگاه اولتراسونیک به مدت ۱۵ دقیقه سونیکه شدند و به صورت سوسپانسیون پایدار درآمدند. برای آماده سازی نمونه ها از متانول به عنوان حلال استفاده گردید. غلظت های مناسب هر چهار ترکیب در حلال متانول به صورت یکنواخت آماده و در نهایت به بافر حاوی نانوذرات اضافه شد. نمونه شاهد محتوی بافر سدیم استات ۰/۲ مولار با شرایط مختلف و غلظت مشابه نمونه مورد مطالعه از هر چهار ترکیب بدون افزودن نانوذرات مگنتیت بود. نمونه شاهد حاوی تمام مواد و شرایط مورد مطالعه به جز عاملی است که اثر آن مورد بررسی است. نمونه های شاهد و مورد مطالعه در دمای محیط به مدت ۷۲ ساعت متوالی روی شیکر قرار گرفتند. برای استخراج نمونه ها ابتدا حلال هگزان به فالكون های حاوی نمونه ها اضافه و سپس به شدت به هم زده شد تا تمام ترکیبات آلی از فاز آبی جدا شوند و بر اساس انحلال پذیری بیشتر در ترکیبات آلی وارد فاز آلی شوند. نمونه ها به کمک قیف جدا کننده، پس از زمانی اندک به صورت دو فاز متمایز مشاهده شدند و فاز آلی برای آنالیز گاز کروماتوگرافی جدا گردید.



شکل ۷-۴: آماده سازی نمونه ها

در تمامی مراحل آزمایشات میزان شکست ترکیبات با محاسبه اختلاف ناحیه زیر سطح پیک در نمونه مورد مطالعه و نمونه شاهد در مقایسه با نمونه شاهد مقایسه شد و بر اساس درصد محاسبه گردید، در تمام نمودارها عدد ۱ نشانه ۱۰۰٪ شکست است و عدد صفر عدم موفقیت طرح را نشان می دهد.

۱۲-۴) بر هم کنش بیومولکول ها با مولکولهای سنگین نفت در pH های مختلف

بر اساس نتایج حاصل در فاز اول طرح، از میان پنج گونه قارچی مورد مطالعه قارچ ۵ پس از بررسی توانمندی گونه ها در شکست ترکیبات آلی بر نفت سنگین انتخاب شد که پس از شناسایی مورفولوژیک و مولکولی و استفاده از بانک ژنی گونه آن *Daedaleopsis confragosa* معرفی گردید. این قارچ از گروه بازیدیومیست های تولید کننده آنزیم های لیگنولایتیک می باشد. در مرحله بعد با بررسی روشهای افزایش تولید بیومولکولها در قارچ میزان کافی از این بیوکاتالیست ها استخراج و خالص سازی گردید. در این بخش از طرح میزان پایداری و فعالیت بیومولکولها در شرایط مختلف اسیدی تا قلیایی بررسی گردید. نمونه های مورد مطالعه شامل بافر استات ۰/۲ مولار در pH های مختلف به همراه بیومولکولها با نسبت ۱ به ۱ و هر کدام از چهار گروه ماده انتخابی با غلظت مناسب در حلال متانول بود. نمونه شاهد نیز آماده شد که فاقد بیومولکولها بود. نمونه های واکنش و شاهد به مدت ۷۲ ساعت در شرایط محیط بر روی شیکر قرار گرفتند. برای استخراج نمونه ها ابتدا حلال هگزان به فالكون های حاوی نمونه اضافه و سپس به شدت به هم زده شد تا تمام ترکیبات آلی از فاز آبی جدا شوند و بر اساس انحلال پذیری بیشتر در ترکیبات آلی وارد فاز آلی شوند. نمونه ها به کمک قیف جدا کننده، پس از زمانی اندک به صورت دو فاز متمایز مشاهده شدند و فاز آلی برای آنالیز گاز کروماتوگرافی جدا گردید.

۱۳-۴) بر هم کنش نانوذرات با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف

با توجه به هدف طرح که کاربرد همزمان نانوذرات و بیومولکولها است و برای کاربرد بهتر طرح و در نظر گرفتن رفتار نانوذرات و بیومولکولها، pH ۵ به عنوان بهترین شرایط در نظر گرفته شد. برای بررسی تأثیر دما، شرایط دمایی ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ در نظر گرفته شد. نمونه های حاوی بافر استات، نانوذرات با شرایط مشابه مرحله قبل و هرکدام از چهار گروه آماده شد و در هر مرحله در دمای مشخص به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. استخراج نمونه ها مانند مرحله قبل انجام شد.

۱۴-۴) بر هم کنش بیومولکولها با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف

جهت بررسی اثر بیومولکولها از pH ۵ مشابه نانوذرات استفاده شد تا نتایج قابل بررسی باشند. برای بررسی تأثیر دما، شرایط دمایی ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ در نظر گرفته شد. نمونه های حاوی بافر استات، بیومولکولها و هرکدام از چهار گروه با شرایط مشابه مرحله قبل آماده شد و در هر مرحله در دمای مشخص به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. استخراج نمونه ها مانند مرحله بررسی pH های مختلف انجام شد.

۱۵-۴) انتخاب کنسرسیوم مناسب نانوذرات و بیومولکولها و بررسی اثر آن کنسرسیوم بر شکست

مولکولهای سنگین در pH های مختلف

پس از آنالیز نتایج مراحل قبل بیومولکولها و نانوذرات با بیشترین میزان شکست انتخاب شدند و به صورت کنسرسیوم در جهت شکست ترکیبات آلی سنگین نفتی مورد آزمایش قرار گرفتند.

کنسرسیوم بیومولکولها و نانوذرات به نسبت ۱ به ۱ آماده شد و نانوذرات قبل از افزوده شدن به بیومولکولها به خوبی سونیکه شدند. جهت انجام تست های نهایی و مقایسه با نتایج مراحل قبل، مخلوط واکنش شامل بافر استات ۰/۲ مولار در pH های مختلف به همراه کنسرسیوم نانوذرات و بیومولکولها به نسبت ۱ به ۲ و از هر کدام از چهار گروه ماده انتخابی با غلظت مشابه مراحل قبل در حلال متانول آماده شد. نمونه شاهد فاقد کنسرسیوم نانوذرات و بیومولکولها بود. نمونه های واکنش و شاهد به مدت ۷۲ ساعت در شرایط محیط بر روی شیکر قرار گرفتند. برای استخراج نمونه ها ابتدا حلال هگزان به فالكون های حاوی نمونه اضافه و سپس به شدت به هم زده شد تا تمام ترکیبات آلی از فاز آبی جدا شوند و بر اساس انحلال پذیری بیشتر در ترکیبات آلی وارد فاز آلی شوند. نمونه ها به کمک قیف جدا کننده، پس از زمانی اندک به صورت دو فاز متمایز مشاهده شدند و فاز آلی برای آنالیز گاز کروماتوگرافی جدا گردید.

۱۶-۴) بر هم کنش کنسرسیوم نانوذرات و بیومولکولها با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف

پس از آنالیز مرحله قبل و بررسی شرایط اسیدی تا قلیایی و با توجه به نتایج حاصل از آنالیز گاز کروماتوگرافی ۵ pH به عنوان بهترین شرایط pH در نظر گرفته شد. برای بررسی تأثیر دما، شرایط دمایی ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ در مانند مراحل قبل در نظر گرفته شد تا نتایج قابل مقایسه باشند. نمونه های حاوی بافر استات، کنسرسیوم نانوذرات و بیومولکولها با شرایط مشابه مرحله قبل و هر کدام از چهار گروه آماده شد و در هر مرحله در دمای مشخص به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. استخراج نمونه ها مانند مرحله قبل توسط حلال آلی نرمال هگزان انجام شد.

۱۷-۴) بررسی اثر کنسرسیوم بر تبدیل مولکولهای آلی سنگین به سبک تر در نفت سنگین

در مرحله آخر کنسرسیوم نانوذرات و بیومولکولها تحت بهترین شرایط محیطی که پس از آنالیز گاز کروماتوگرافی و مقایسه کروماتوگرام ها ۵ pH و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انتخاب شد، برای فعالیت با نفت سنگین واکنش داده

شدند. نفت سنگین با $API= ۱۸,۵$ و درصد بالای ترکیبات آلی سنگین از پژوهشگاه صنعت نفت تهیه گردید و جهت بررسی اثر کنسرسیون نانوذرات و بیومولکولها بر شکست ساختار نفت سنگین به نسبت ۱ به ۱۰ به مخلوط واکنش که حاوی بافر استات و کنسرسیون نانوذرات و بیومولکولها اضافه گردید. نمونه شاهد و کنسرسیون، تحت بهترین شرایط محیطی برای فعالیت با نفت سنگین واکنش داده شدند. محصول حاصل از این واکنش نیز تحت آنالیز دستگاه گاز کروماتوگرافی و تست SARA قرارگرفت تا مقادیر saturates, asphaltenes, resins, aromatics پس از واکنش مشخص شود. با مقایسه مقادیر حاصله، میزان تبدیل نفت سنگین به نفت سبک تر تعیین می گردد.

۱۸-۴) آنالیز $SARA^{58}$:

آنالیز SARA نمونه نفت خام را به اجزاء ترکیبات اشباع، آروماتیک، رزین و آسفالتن از طریق عمل حلال های n-آلکانی، تولوئن و دی کلرومتان و میان کنش نفت خام با یک فاز ثابت تفکیک می کند. آنالیز سارا با رسوب آسفالتن ها در حلال های n-آلکانی نظیر پنتان یا هپتان آغاز می شود. سپس، نفت خامی که جزء آسفالتنی آن جدا شده است از طریق روش های کروماتوگرافی و با کمک فازهای ثابت مختلف و حلال های با قطبیت متفاوت تفکیک می گردد. حلال استفاده شده از طریق تبخیر از هر یک از اجزاء شسته شده جدا می شود و آنالیز سارا با تعیین وزن اجزاء تفکیک شده تکمیل می گردد [۱۲۴].

⁵⁸ Saturate, Aromatic, Resin and Asphaltene (SARA)

فصل پنجم:

یافته های تحقیق و نتیجه گیری

فصل پنجم: یافته های تحقیق و نتیجه گیری

۵-۱) جمع آوری نمونه های قارچ

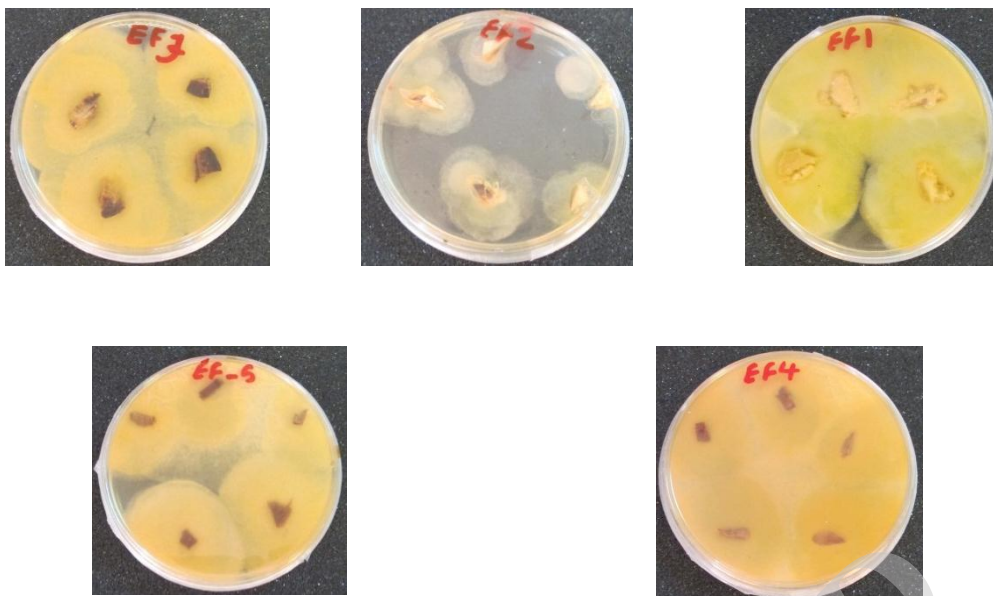
همانطور که در بخش ؟ گفته شد، نمونه های قارچی از جنگل های چهل چای و مرکوه مینودشت در استان گلستان جمع آوری و به آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی در پژوهشکده علوم پایه کاربردی منتقل شدند. در شکل ۵-۱ نمونه های جمع آوری شده قابل مشاهده است.



شکل ۵-۱: نمونه های قارچ جمع آوری شده از جنگل های استان گلستان

۵-۲) بررسی و آماده سازی قارچها جهت واکنش با ترکیبات سنگین نفت

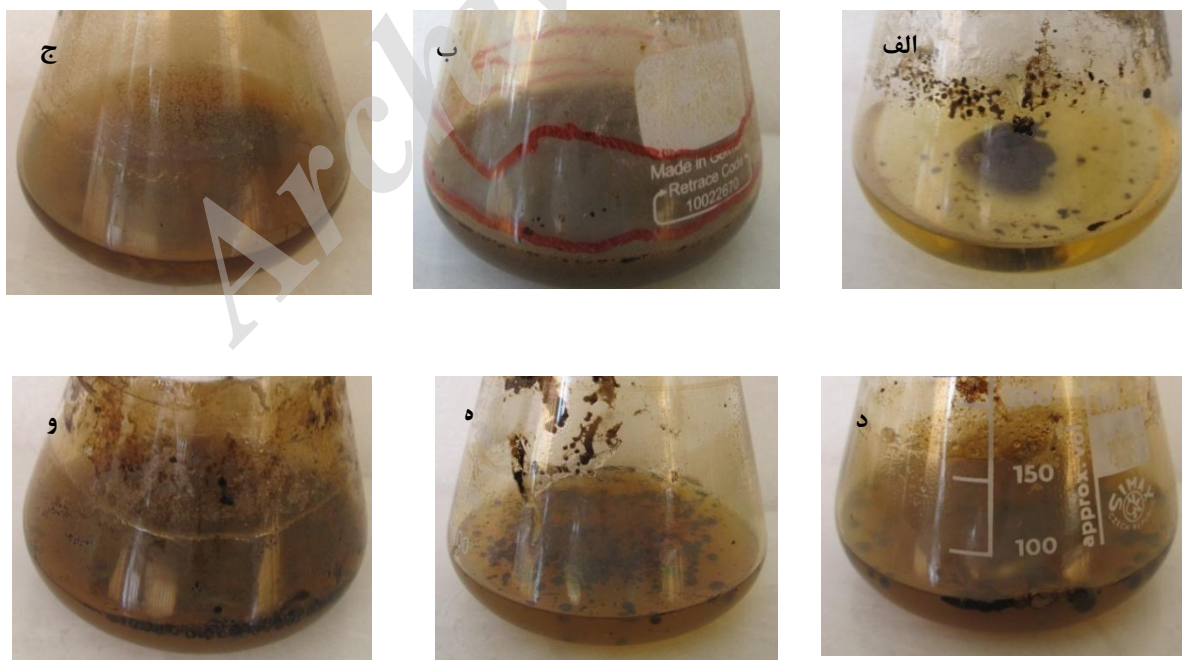
در شکل ۵-۲ کشت بر روی محیط جامد SDA مشاهده می شود. در اطراف قطعات قارچها رشد میسلیوم ها صورت گرفت و عدم آلودگی محیط کشت توسط باکتری ها بررسی شد.



شکل ۲-۵: کشت اولیه نمونه های قارچی در محیط جامد (SDA)

۳-۵) اثر قارچ های بومی بر شکست ترکیبات سنگین نفت

پس از ۶۰ روز از مقایسه نمونه شاهد با نمونه های مورد آزمایش تأثیر قارچ ها بر نفت سنگین به خوبی مشهود بود. قارچ ها توانسته بودند به کمک بیومولکولهای ترشحي ایجاد میکروامولسیون نفت-آب کرده و سطح دسترسی نفت با بیومولکولها را افزایش دهند. بیومولکولها با اثر بر پیوند های موجود در ساختار نفت سنگین سبب شکست در ساختار آن می گردند و در نهایت مولکولهای سبک تر ایجاد می شوند.



شکل ۳-۵: تأثیر بیومولکولها بر ساختار نفت سنگین- به ترتیب الف نمونه شاهد و ب، ج، د، ه، و قارچ های مورد مطالعه

همانطور که در شکل (۳-۵) قابل مشاهده است، در نمونه شاهد، نفت در محیط کشت کاملاً به صورت توده شده است زیرا نیروهای هیدروفوبی موجود در ساختار مولکولهای نفت سبب چسبیدن مولکولهای نفت به یکدیگر و ایجاد یک توده منسجم شده است. حال آنکه در هیچ کدام از نمونه های مورد آزمایش این حالت مشاهده نمی شود و امولسیون نفت در محیط کشت در تمام نمونه ها ایجاد شده است. علت این امر وجود بیومولکولهایی است که توسط قارچ ساخته شده و در محیط کشت ترشح شده است. این بیومولکولها با اثر بر سویستراهای نفتی سبب روان شدن آنها می شوند. میزان این اثر با توجه به نوع و عملکرد قارچ تا حدی متفاوت است. برای یافتن بهترین عملکرد بیومولکولهای تولیدی از روش های آنالیزی استفاده شد. یکی از بهترین روش های آنالیزی در این زمینه استفاده از روش گاز کروماتوگرافی است.

۵-۴ آماده سازی نمونه ها جهت گاز کروماتوگرافی

جهت انجام کروماتوگرافی گازی در ابتدا نمونه ها توسط حلال استخراج گردیدند. شکل ۴-۵ آماده سازی نمونه ها را با روش استخراج حلال نشان می دهد.

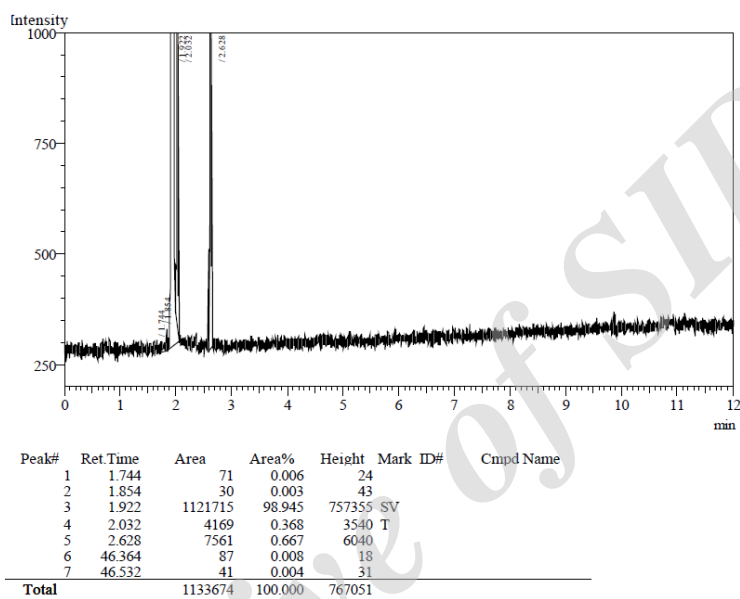


شکل ۴-۵: آماده سازی نمونه با روش استخراج حلال، دو فازی شدن پس از افزودن n-هگزان

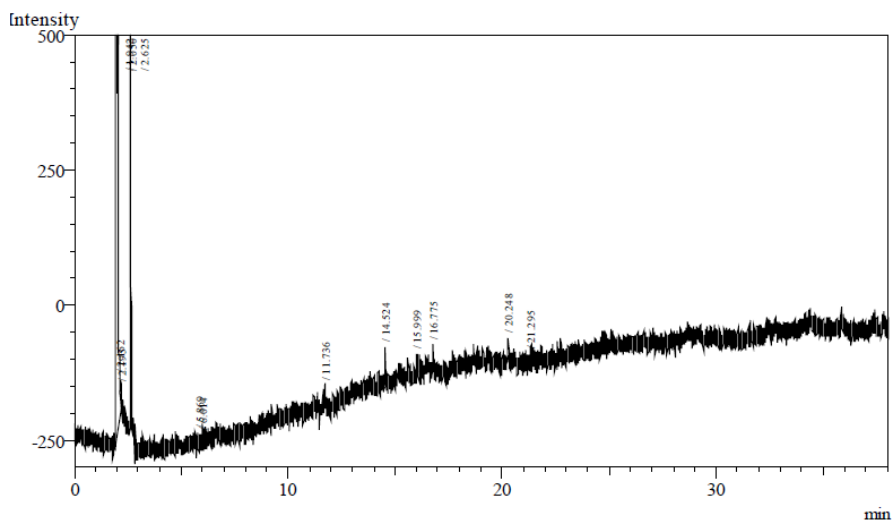
۵-۵ نتایج حاصل از دستگاه گاز کروماتوگرافی و انتخاب بهترین قارچ

کروماتوگرام نمونه شاهد در شکل (۵-۵) نشان داده شده است. در نمونه شاهد همانطور که در کروماتوگرام دیده می شود، تعداد بسیار کمی ماده شناسایی شده است. نفت اولیه مورد استفاده در این آزمایش نفت سنگین بوده است که در اثر قرار گرفتن در محیط کشت و فشار نیروهای هیدروفوبی ترکیبات سنگین تری حاصل شده است که قابل حل در حلال n-هگزان نبوده اند.

در نمونه های قارچی (کروماتوگرام های نشان داده شده در شکل های ۶-۵ تا ۹-۵) در مقایسه با نمونه شاهد، ترکیبات بیشتری شناسایی شده است. بیومولکولهایی که قارچ ها تولید کرده اند سبب شکست مولکولهای بیشتری شده است. بیومولکولها با کاهش نیروهای هیدروفوبی و تشکیل امولسیون نفت در آب توانسته اند که مانع ایجاد ترکیبات سنگین تر شده و با عمل بر روی سوبستراهای نفتی سبب شکست ترکیبات سنگین شوند. از بین گونه های مورد آنالیز نمونه قارچی شماره ۵ (شکل ۹-۵) موفق تر عمل کرده و به عنوان قارچ منتخب جهت جداسازی بیومولکولها در نظر گرفته شد.

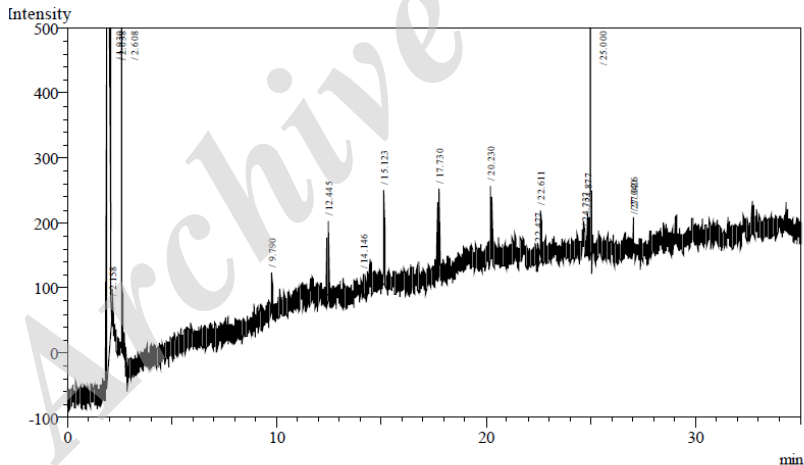


شکل ۵-۵: کروماتوگرام نمونه شاهد



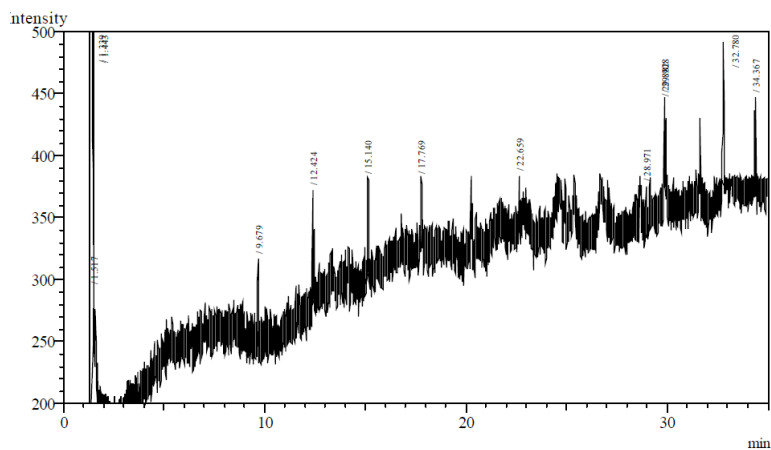
Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Height	Mark	ID#	Cmpd Name
1	1.942	3286578	97.746	1365564	S		
2	2.050	35712	1.062	33034	T		
3	2.162	8	0.000	17	T		
4	2.195	25	0.001	26	TV		
5	2.625	39178	1.165	32847			
6	5.869	113	0.003	24			
7	6.014	43	0.001	25			
8	11.736	119	0.004	39			
9	14.524	199	0.006	72			
10	15.999	59	0.002	31			
11	16.775	121	0.004	46			
12	20.248	78	0.002	39			
13	21.295	132	0.004	27			
Total		3362365	100.000	1431791			

شکل ۶-۵: کروماتوگرام نمونه ۱



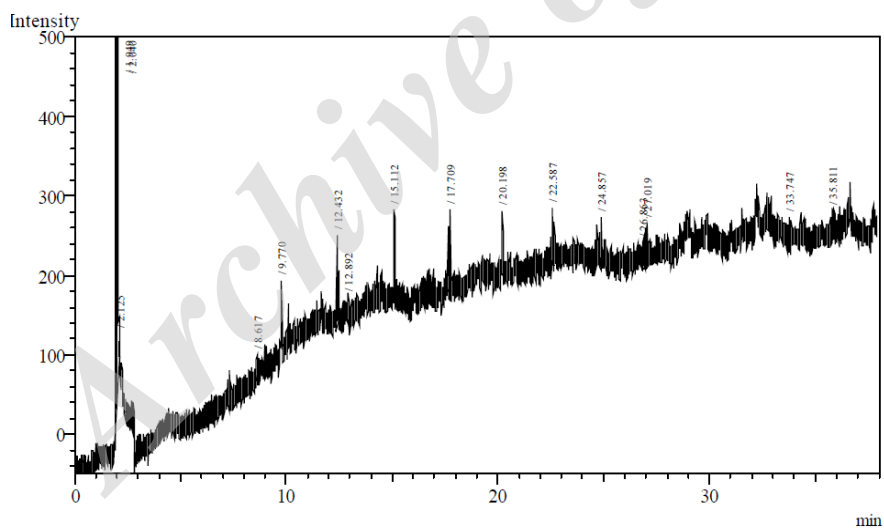
Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Height	Mark	ID#	Cmpd Name
1	1.930	3500272	98.308	1346678	S		
2	2.038	38735	1.088	33602	T		
3	2.158	18	0.000	16	T		
4	2.608	18741	0.526	15597			
5	9.790	142	0.004	59			
6	12.445	288	0.008	111			
7	14.146	110	0.003	30			
8	15.123	416	0.012	137			
9	17.730	322	0.009	125			
10	20.230	338	0.009	106			
11	22.477	92	0.003	22			
12	22.611	249	0.007	77	V		
13	24.737	31	0.001	28			
14	24.877	192	0.005	60			
15	25.000	504	0.014	1036			
16	27.026	30	0.001	43			
17	27.040	47	0.001	42	V		
Total		3560527	100.000	1397769			

شکل ۷-۵: کروماتوگرام نمونه ۲



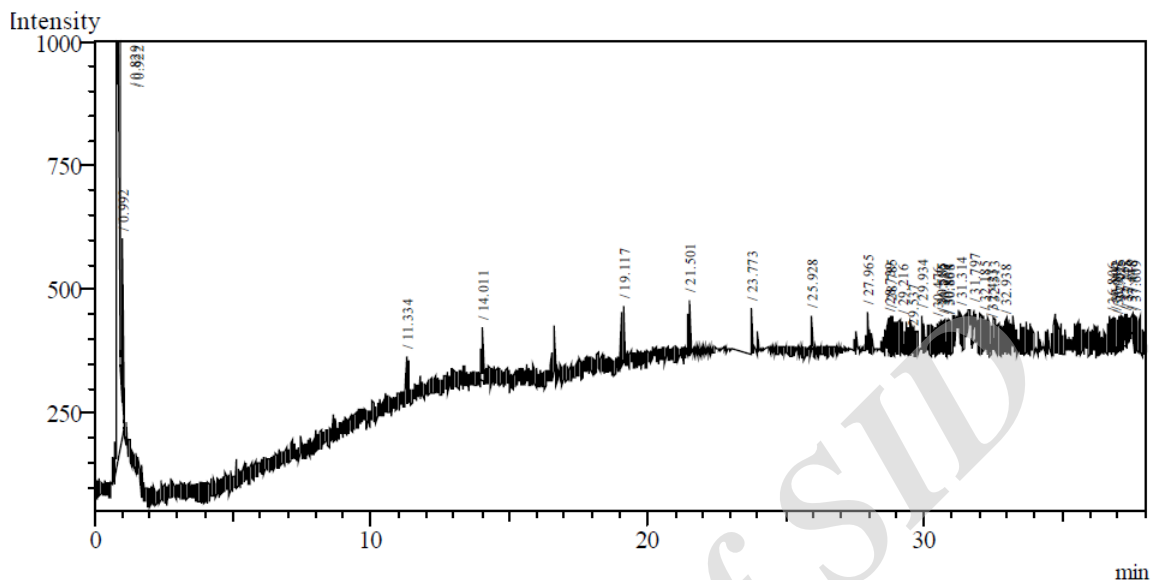
Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Height	Mark	ID#	Cmpd Name
1	1.339	2964507	99.100	1346735	S		
2	1.443	25462	0.851	22300	T		
3	1.517	16	0.001	18	T		
4	9.679	87	0.003	64			
5	12.424	187	0.006	87			
6	15.140	198	0.007	78			
7	17.769	108	0.004	52			
8	22.659	69	0.002	31			
9	28.971	81	0.003	32			
10	29.882	46	0.002	55			
11	29.908	148	0.005	65	V		
12	32.780	352	0.012	111			
13	34.367	166	0.006	66			
Total		2991427	100.000	1369694			

شکل ۸-۵: کروماتوگرام نمونه ۳



Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Height	Mark	ID#	Cmpd Name
1	1.949	3329015	98.966	1235796			
2	2.040	32683	0.972	25954	SV		
3	2.125	3	0.000	11	T		
4	8.617	2	0.000	23			
5	9.770	189	0.006	79			
6	12.432	312	0.009	112			
7	12.892	112	0.003	18			
8	15.112	322	0.010	110			
9	17.709	232	0.007	89			
10	20.198	239	0.007	78			
11	22.887	189	0.006	67			
12	24.857	141	0.004	55			
13	26.863	115	0.003	30			
14	27.019	195	0.006	54			
15	33.747	43	0.001	34			
16	35.811	10	0.000	28			
Total		3363802	100.000	1262538			

شکل ۸-۵: کروماتوگرام نمونه ۴



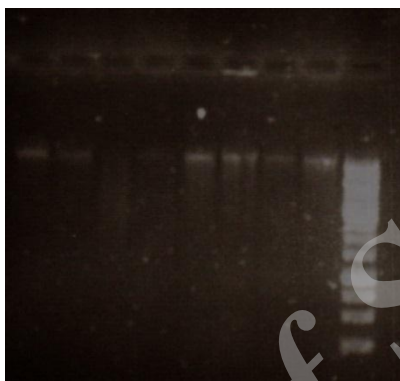
Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Height	Mark	ID#	Cmpd Name
1	0.829	3286194	98.648	1227996	SV		
2	0.922	39425	1.183	39843	T		
3	0.992	520	0.016	256	T		
4	11.334	182	0.005	84			
5	14.011	308	0.009	106			
6	19.117	351	0.011	108			
7	21.501	209	0.006	93			
8	23.773	220	0.007	84			
9	25.928	142	0.004	63			
10	27.965	169	0.005	70			
11	28.739	113	0.003	57	V		
12	28.785	121	0.004	59	V		
13	29.216	110	0.003	47	V		
14	29.537	129	0.004	22	V		
15	29.934	196	0.006	66			
16	30.476	142	0.004	55			
17	30.585	168	0.005	55	V		
18	30.719	110	0.003	43	V		
19	30.804	112	0.003	47	V		
20	30.868	124	0.004	56	V		
21	31.314	147	0.004	49			
22	31.797	267	0.008	64			
23	32.185	156	0.005	47			
24	32.423	102	0.003	46	V		
25	32.513	132	0.004	54	V		
26	32.938	103	0.003	55	V		
27	36.806	145	0.004	49	V		
28	36.892	116	0.003	56			
29	36.956	197	0.006	55			
30	37.025	220	0.007	62	V		
31	37.245	201	0.006	50	V		
32	37.326	145	0.004	54			
33	37.448	115	0.003	33	V		
34	37.609	154	0.005	52			
Total		3331245	100.000	1269936			

شکل ۹-۵: کروماتوگرام نمونه ۵

۵-۶) شناسایی گونه بومی قارچ منتخب

۵-۶-۱) استخراج ماده ژنتیکی و الکتروفورز

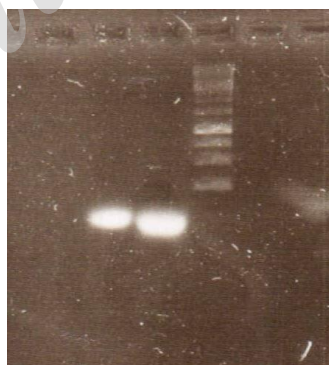
پس از انجام مراحل استخراج بر اساس پروتکل کیت، برای حصول اطمینان از استخراج، نمونه ها الکتروفورز شدند. شکل ۵-۱۰ محتویات ژنومی استخراج شده را نشان می دهد.



شکل ۵-۱۰: محتویات ژنومی استخراج شده قارچ ها

۵-۶-۲) واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

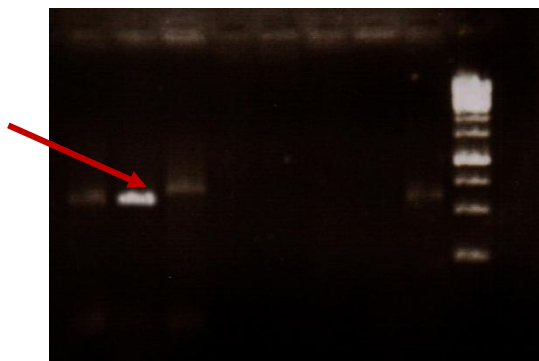
قبل از انجام PCR برای حصول اطمینان از خلوص پرایمرها، تست آنها به کمک الکتروفورز صورت گرفت (شکل ۵-۱۱).



شکل ۵-۱۱: تست پرایمرها توسط الکتروفورز

در نهایت نتایج حاصل از واکنش PCR توسط دستگاه الکتروفورز بررسی شد. همانطور که در شکل ۵-۱۲ قابل مشاهده است، قطعه ۶۰۷ جفت بازی مربوط به ناحیه ITS قارچ مورد نظر می باشد که برای تعیین توالی در نظر گرفته شد.

ژن هدف (607 bp)



شکل ۱۲-۵: نتایج PCR

۳-۶-۵) تعیین توالی ژن ناحیه ITS و تعیین گونه قارچ

نتایج تعیین توالی ژن ناحیه ITS با آنالیز BLASTn در پایگاه Genebank و به کمک The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) به صورت ذیل است (شکل ۱۳-۵).

بیشترین شباهت با ۹۹٪ همانندی با گونه قارچ *Daedaleopsis confragosa* از گروه بازیدیومیست ها به دست آمد.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Daedaleopsis confragosa voucher CFMR:DLL2011-047 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	1099	1099	100%	0.0	99%	KJ140570.1
Uncultured fungus clone CMH365 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	1099	1099	100%	0.0	99%	KF800456.1
Daedaleopsis confragosa isolate X-78 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	1099	1099	100%	0.0	99%	KC176348.1
Daedaleopsis confragosa isolate X-49 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	1099	1099	100%	0.0	99%	KC176338.1
Daedaleopsis confragosa genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain 4	1099	1099	100%	0.0	99%	FR866551.1
Uncultured fungus clone S100 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed	1099	1099	100%	0.0	99%	FJ820588.1
Daedaleopsis confragosa strain dd08088 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	1099	1099	100%	0.0	99%	FJ810177.1
Daedaleopsis confragosa voucher CFMR:DLL2011-066 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	1096	1096	100%	0.0	99%	KJ140587.1
Lenzites betulinus strain xsd08133 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	1090	1090	100%	0.0	99%	FJ481044.1
Lenzites betulinus strain dd08100 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	1086	1086	100%	0.0	99%	FJ810183.1
Fungal endophyte voucher EFOMIA 14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	1083	1083	100%	0.0	99%	HQ335306.1
Daedaleopsis confragosa strain BRFM 1143 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, con	1081	1081	98%	0.0	99%	JX082375.1
Daedaleopsis confragosa genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain Dc8	1079	1079	99%	0.0	99%	HG973500.1
Daedaleopsis confragosa genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain Dc6	1079	1079	98%	0.0	99%	HG973498.1
Daedaleopsis confragosa strain CIRM-BRFM 948 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and i	1077	1077	98%	0.0	99%	GU731549.1
Daedaleopsis confragosa strain BRFM 1145 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, con	1066	1066	97%	0.0	99%	JX082376.1
Daedaleopsis confragosa strain BRFM 1131 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, con	1061	1061	97%	0.0	99%	JX082373.1
Daedaleopsis confragosa strain BRFM 1130 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, con	1051	1051	97%	0.0	99%	JX082372.1

شکل ۱۳-۵: نتایج BLAST

۵-۷) سنتز نانوذرات

۵-۷-۱) سنتز نانوذرات Fe_3O_4

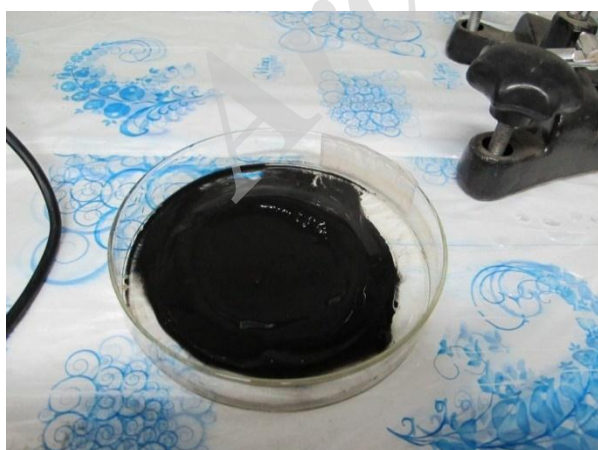
براساس مراحل ذکر شده در بخش ۱-۸-۴، نانوذرات Fe_3O_4 سنتز شدند. شکل های ۱۴-۵ تا ۱۷-۵ مراحل مختلف سنتز را نشان می دهد. برای آنالیز سایز از دستگاه های SEM^{59} و TEM^{60} استفاده شد. نتایج به صورت زیر به دست آمد.



شکل ۱۵-۵: تشکیل نانوذرات



شکل ۱۴-۵: محلول اولیه واکنش سنتز نانوذرات



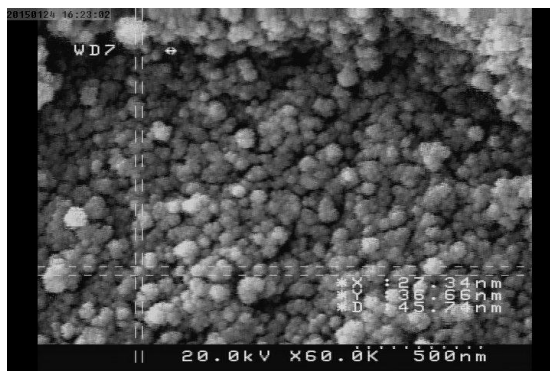
شکل ۱۷-۵: نانوذرات سنتز شده



شکل ۱۶-۵: جدا کردن نانوذرات سنتز شده با مگنت

⁵⁹ scanning electron microscope

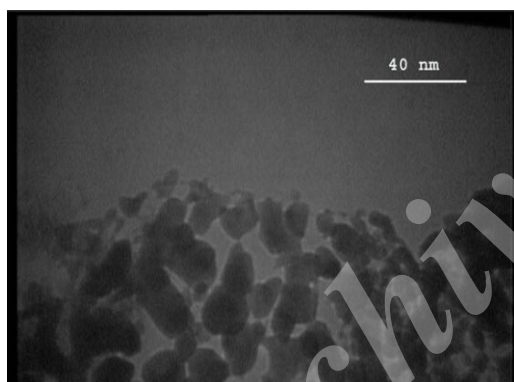
⁶⁰ transmission electron microscope



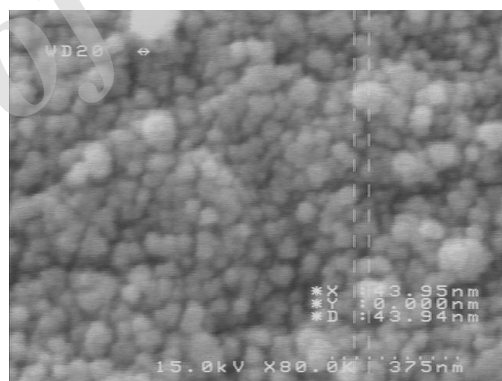
شکل ۱۸-۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات اکسید آهن

۲-۷-۵) سنتز نانوذرات $\delta\text{-Fe}_2\text{O}_3$

براساس مراحل ذکر شده در بخش ۲-۸-۴، نانوذرات $\delta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ سنتز شدند. برای آنالیز سایز از دستگاه های SEM و TEM استفاده شد. نتایج به صورت زیر به دست آمد (شکل های ۱۹-۵ و ۲۰-۵).



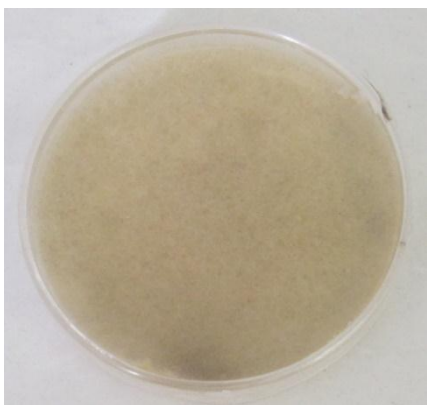
شکل ۲۰-۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری



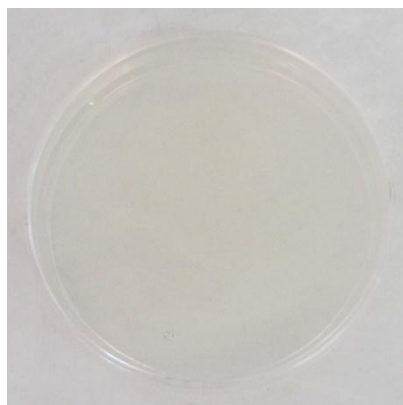
شکل ۱۹-۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گاما نانوذرات اکسید آهن

۸-۵) تهیه کشت خالص از قارچ منتخب

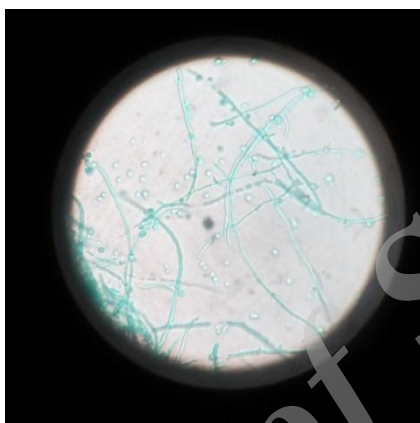
برای بررسی های قارچ شناسی از رنگ آمیزی متیلن کاتن بلو استفاده شد. با توجه به مشاهده تنها یک نوع هیف در لام رنگ آمیزی شده تهیه کشت خالص تایید شد.



شکل ۲۲-۵: پلیت SDA رشد قارچ



شکل ۲۱-۵: پلیت نوترینت آگار



شکل ۲۳-۵: تهیه کشت خالص

در این نوع رنگ آمیزی اسید لاکتیک به داخل هیف نفوذ کرده و موجب حفظ پیکره قارچ می شود. فنل سلولهای زنده را غیرفعال می کند. رنگ داخل ساختار قارچ نفوذ کرده و گلیسرول آن را ثابت کرده و احتمال رسوب رنگ را کاهش می دهد.

۵-۹) جداسازی بیومولکولها

۱-۹-۵) کشت نمونه های قارچ تعیین شده در محیط فاقد ترکیبات آلی سنگین و در حضور ترکیبات آلی

سنگین

میزان جرم بیومولکولهای جدا شده در نمونه فاقد القا کننده کمتر از نمونه دارای القا کننده بود. در شکل های ۲۴-۵ و ۲۵-۵ تفاوت مقدار در دو نمونه به خوبی مشهود است.



شکل ۲۴-۵: بیومولکولهای استخراج شده از محیط کشت فاقد القا کننده
 شکل ۲۵-۵: بیومولکولهای استخراج شده از محیط کشت دارای القا کننده

۲-۹-۵) بیومولکولهای داخل سلولی

شکل ۲۶-۵ ژل حاصل از استخراج بیومولکول های داخل سلولی را در حضور القاء کننده برای تحریک ترشح بیومولکول ها توسط قارچ نشان می دهد.

۳-۹-۵) بیومولکولهای خارج سلولی

نتایج حاصل از روش SDS- PAGE در شکل ۲۷-۵ قابل مشاهده است.



شکل ۲۶-۵: ژل حاصل از استخراج بیومولکولهای داخل سلولی - شکل ۲۷-۵: از سمت راست نمونه اول مارکر، نمونه دوم ردیف سمت راست مارکر و ردیف سمت چپ بیومولکولهای داخل بیومولکولهای خارج سلولی بدون القا کننده و نمونه سوم سلولی بیومولکولهای خارج سلولی همراه القا کننده

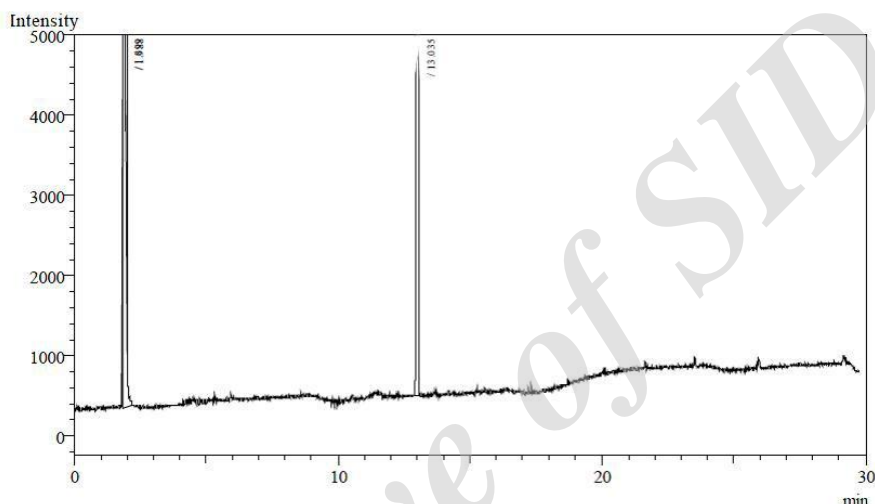
همانطور که در شکل دیده می شود در محیط حاوی القا کننده (در این طرح از نفت سنگین شناسنامه دار استفاده شد) بیومولکولهای بیشتری شناسایی شدند و باند مرتبط با بیومولکولهای مؤثر در شکست ترکیبات آلی شارپ تر

شده است. این نشان می دهد که قارچ تحت استرس های محیطی بیومولکولهای بیشتری ترشح می کند و از همین خصوصیت برای استخراج بیشتر این بیومولکولها استفاده شد.

۵-۱۰) بررسی برنامه های دمایی دستگاه گاز کروماتوگرافی

۵-۱۰-۱) آلکان ها و گزینه انتخابی هگزادکان

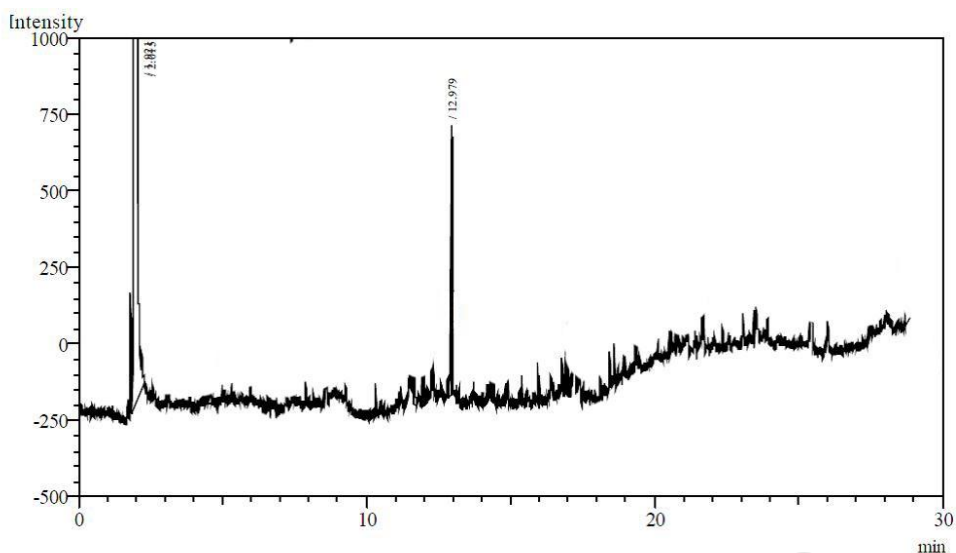
کروماتوگرام حاصل از نمونه هگزادکان در شکل ۵-۲۸ نشان داده شده است. با برنامه منتخب نمونه در حدود دقیقه ۱۳ (محور افقی کروماتوگرام) در ستون شناسایی شد. در سایر نمونه ها نیز همین زمان تایید گردید.



شکل ۵-۲۸: کروماتوگرام هگزادکان

۵-۱۰-۲) آلکن ها و گزینه انتخابی اسکوالن

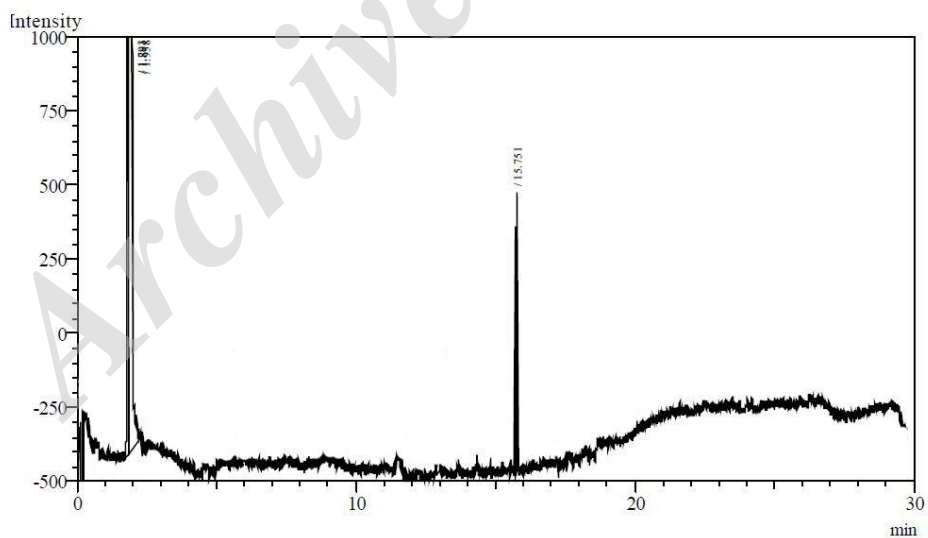
کروماتوگرام حاصل از اسکوالن در شکل ۵-۲۹ نشان داده شده است. با برنامه منتخب نمونه در حدود دقیقه ۱۳ (محور افقی کروماتوگرام) در ستون شناسایی شد.



شکل ۲۹-۵: کروماتوگرام اسکوالن

۳-۱۰-۵) آروماتیک ها و گزینه انتخابی آنتراسن

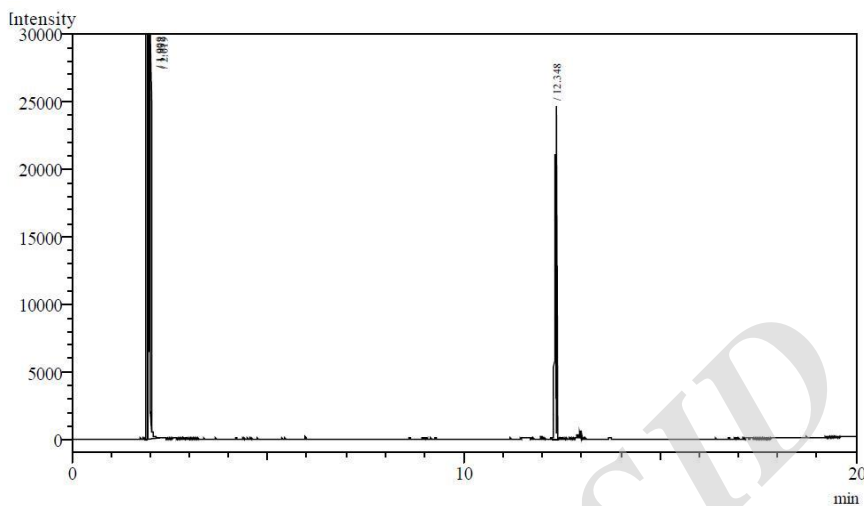
نمونه اسکوالن با تنظیم دستگاه با شرایط منتخب در زمان نزدیک به دقیقه ۱۳ (محور افقی کروماتوگرام) خارج و در تمامی مراحل آزمایش این زمان تکرار شد (شکل ۳۰-۵).



شکل ۳۰-۵: کروماتوگرام آنتراسن

۴-۱۰-۵) رزین ها - آسفالتین ها و گزینه انتخابی دی بنزوفوران

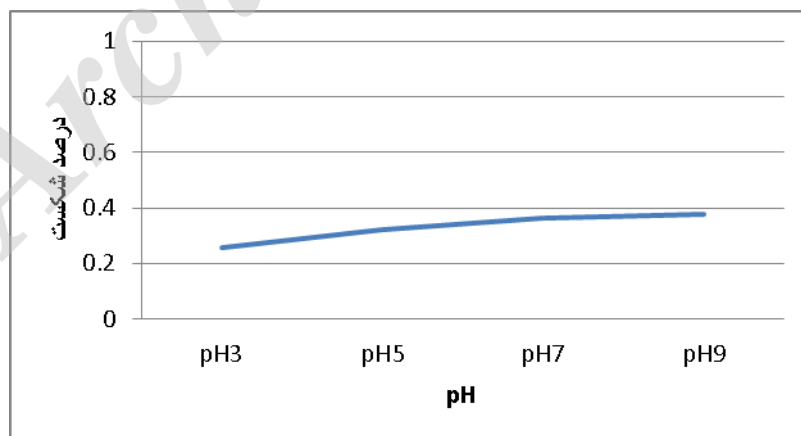
دی بنزوفوران در حدود دقیقه ۱۲,۵ در دستگاه گاز کروماتوگرافی شناسایی شد (شکل ۳۱-۵).



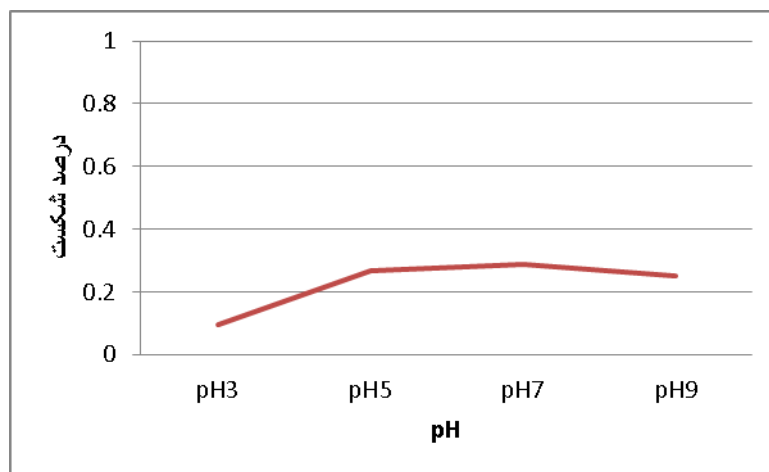
شکل ۳۱-۵: کروماتوگرام دی بنزوفوران

۱۱-۵) بر هم کنش نانوذرات با مولکولهای سنگین نفت در pH های مختلف

شکل های ۳۲-۵ تا ۳۵-۵ نمودار شکست مولکول های سنگین نفتی انتخابی را در pH های مختلف نشان می دهد.



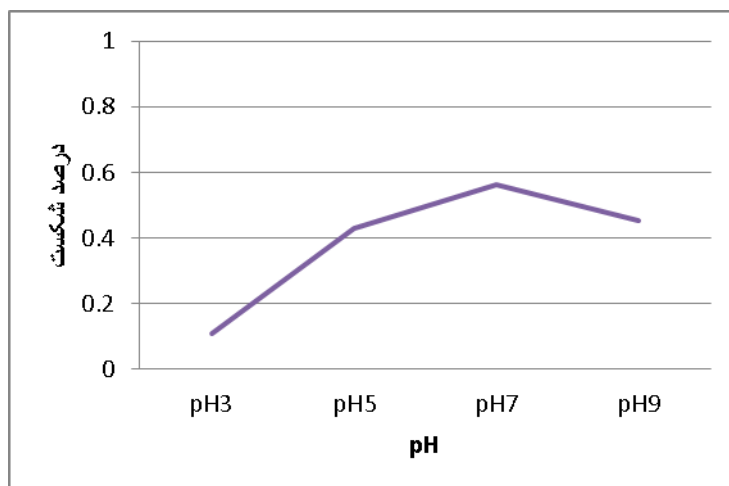
شکل ۳۲-۵: نمودار شکست هگزادکان در حضور نانوذرات در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).



شکل ۳۳-۵: نمودار شکست اسکوالن در حضور نانوذرات در pHهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).

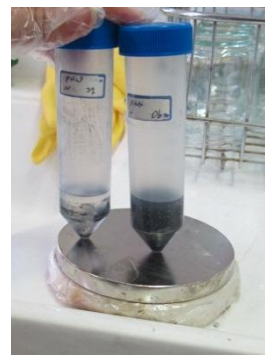


شکل ۳۴-۵: نمودار شکست آنتراسن در حضور نانوذرات در pHهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).



شکل ۳۵-۵: نمودار شکست دی بنزوفوران در حضور نانوذرات در pHهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)

در تمامی مراحل آزمایش تمایل بیشتر نانوذرات به محیط های آلی در شرایط قلیایی مشاهده شد. در شکل ۳۶-۵ تفاوت تمایل نانوذرات به محیط های آلی و آبی مقایسه شده است. نمونه های نانوذرات موجود در شرایط قلیایی به آهن ربا با سرعت بیشتری جذب می شدند.

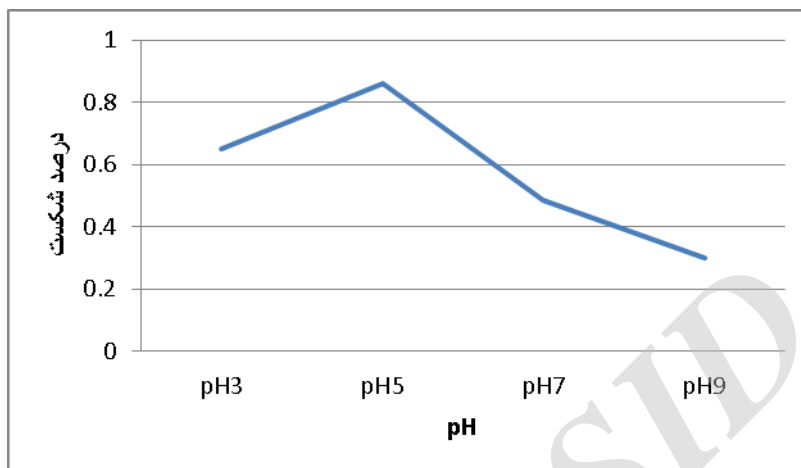


شکل ۳۶-۵: تفاوت رفتاری نانوذرات در شرایط اسیدی و قلیایی: شکل راست تفاوت میزان جذب به آهن ربا را نشان می دهد در نمونه اسیدی جذب در مدت زمان بیشتری انجام گرفت. درحالیکه در نمونه قلیایی جذب بسیار سریعتر رخ داد. در شکل سمت چپ قابل مشاهده است که تمایل نانوذرات به محیط آبی در شرایط اسیدی بیشتر از شرایط قلیایی است. در تمامی فالكون ها فاز رویی حلال آلی و فاز زیری بافر می باشد.

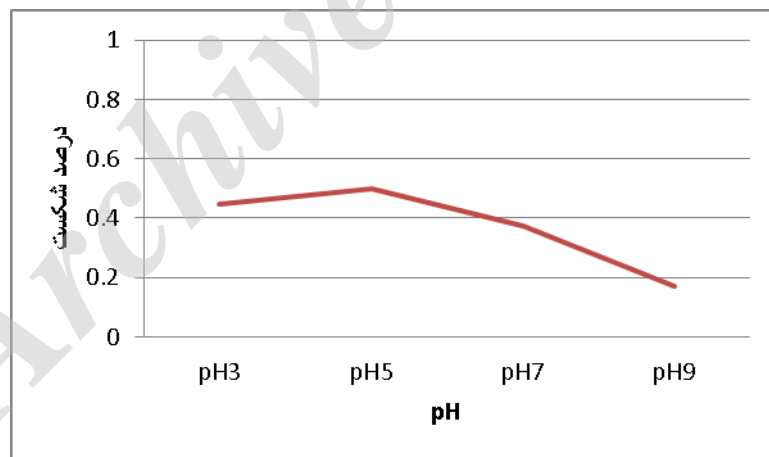
با توجه به نتایج به دست آمده در این بخش از طرح PH های ۵ و ۷ محیط مناسبتری برای شکست ترکیبات آلی سنگین توسط نانوذرات بودند.

۵-۱۲) بر هم کنش بیومولکولها با مولکولهای سنگین نفت در pH های مختلف

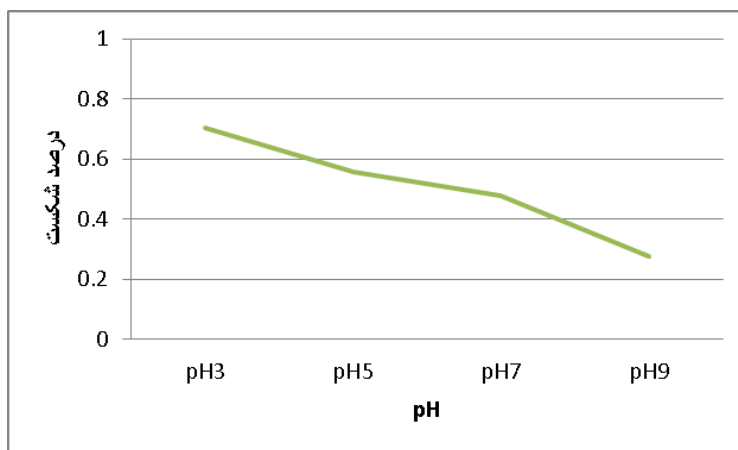
شکل های ۵-۳۷ تا ۵-۴۰ نمودار شکست مولکول های سنگین نفتی را در حضور بیومولکول ها در pH های مختلف نشان می دهد.



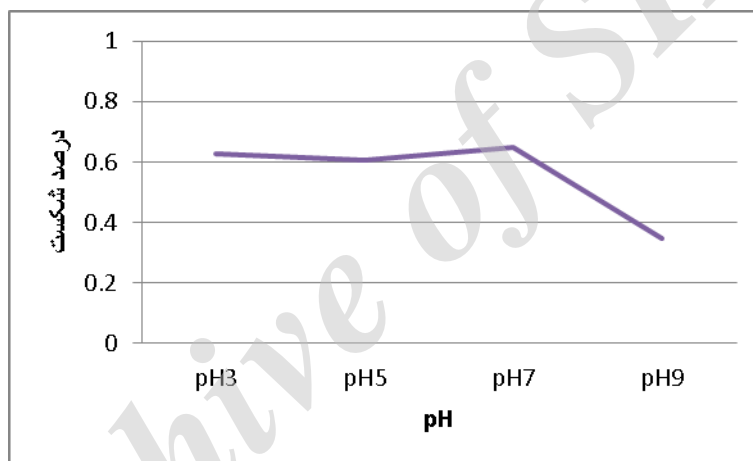
شکل ۵-۳۷: نمودار شکست هگزادکان در حضور بیومولکولها در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).



شکل ۵-۳۸: نمودار شکست اسکوالن در حضور بیومولکولها در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).



شکل ۳۹-۵: نمودار شکست آنتراسن در حضور بیومولکولها در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).

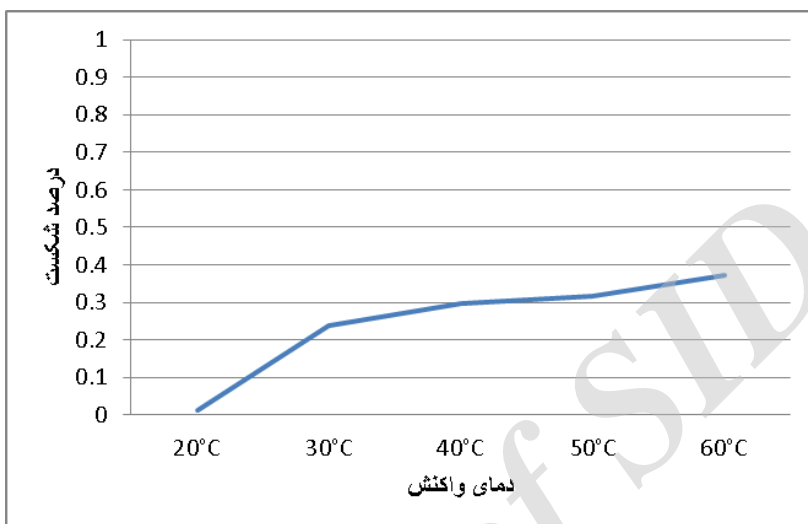


شکل ۴۰-۵: نمودار شکست دی بنزوفوران در حضور بیومولکولها در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).

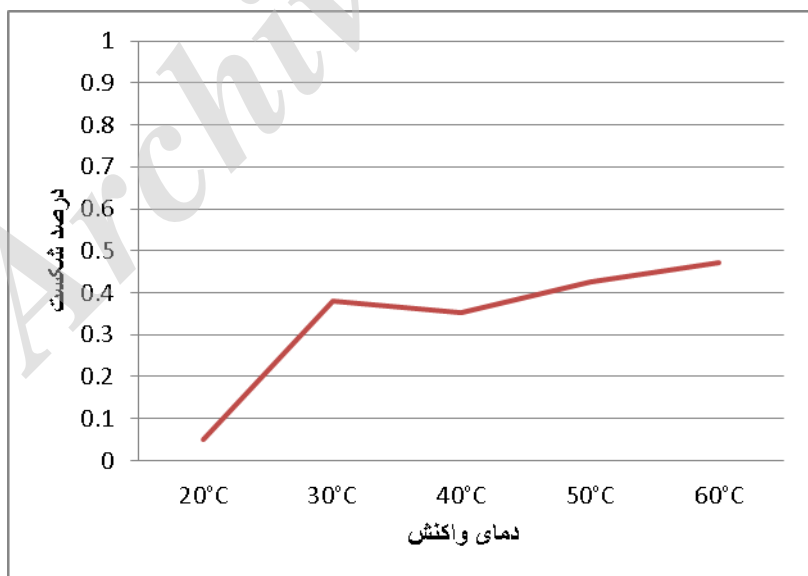
بر اساس نتایج به دست آمده که در نمودارها قابل مشاهده است فعالیت بیومولکولها در محیط های اسیدی بهتر است. pH مناسب فعالیت بیومولکولها ۳ و ۵ است. با آنالیز نمودارهای هر دو بخش بررسی اثر pH در حضور نانوذرات و بیومولکولها ۵ pH به عنوان بهترین محیط برای تست مرحله بررسی اثر دما در شکست ترکیبات آلی سنگین انتخاب شد.

۱۳-۵) بر هم کنش نانوذرات با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف

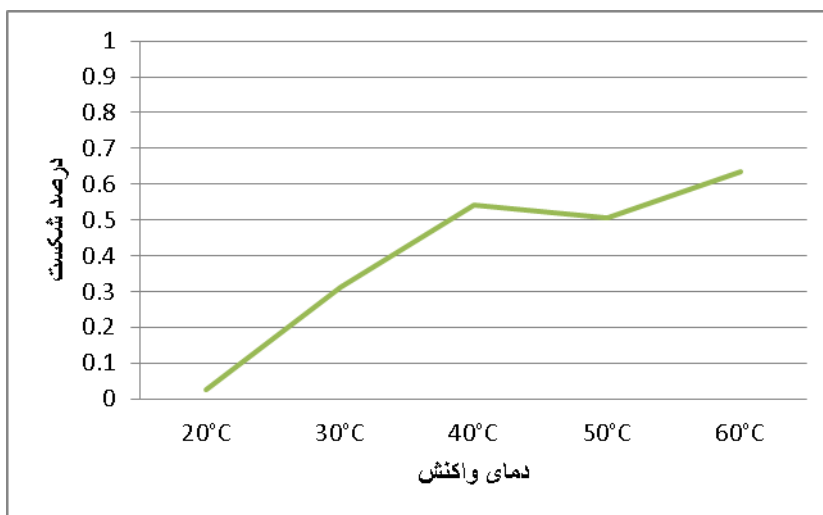
شکل های ۵-۴۱ تا ۵-۴۴ نمودار شکست مولکول های سنگین نفتی را در حضور نانوذرات در دماهای مختلف نشان می دهد. براساس نتایج حاصل از مرحله قبل، ۵ pH در این بررسی برای همه مولکول ها و همه دماها بکار رفت.



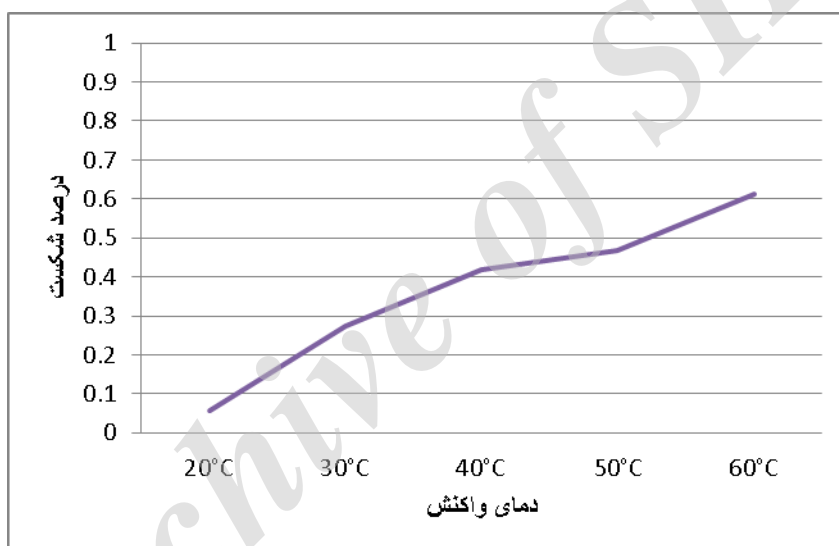
شکل ۵-۴۱: نمودار شکست هگزادکان در حضور نانوذرات در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)



شکل ۵-۴۲: نمودار شکست اسکوالن در حضور نانوذرات در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)



شکل ۴۳-۵: نمودار شکست آنتراسن در حضور نانوذرات در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).

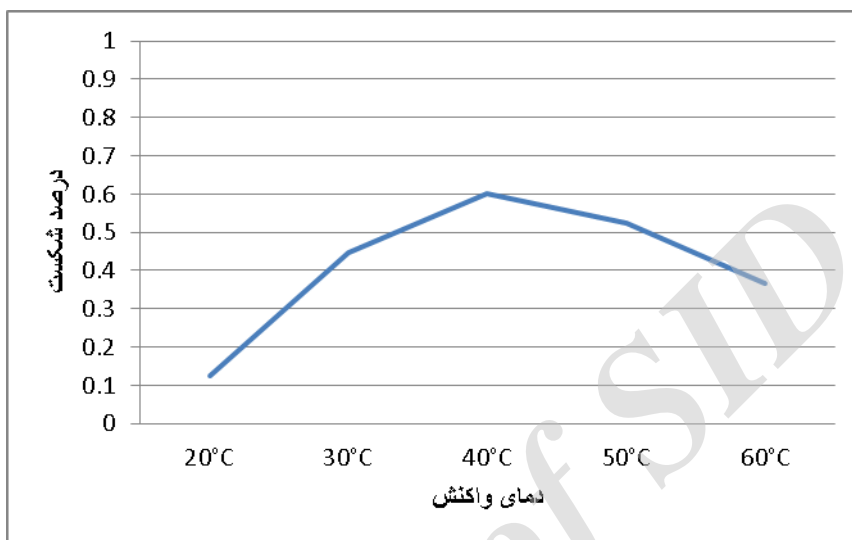


شکل ۴۴-۵: نمودار شکست دی بنزوفوران در حضور نانوذرات در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).

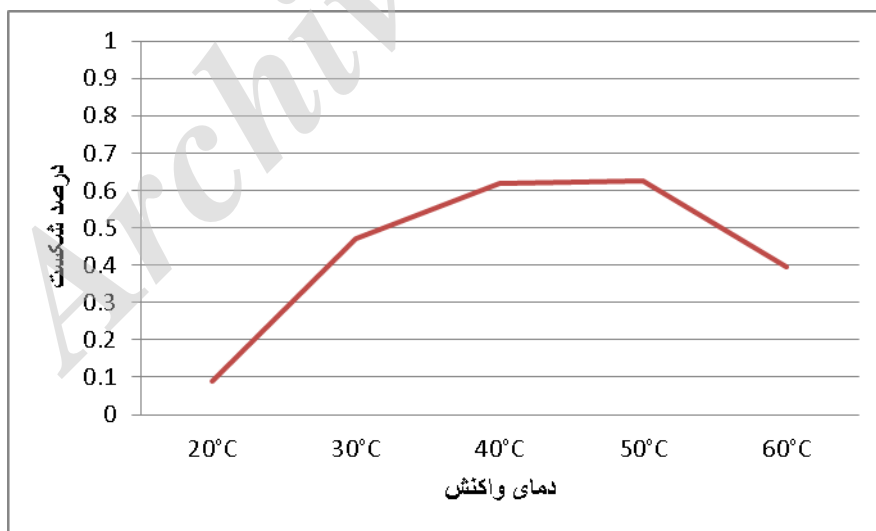
بر اساس نتایج به دست آمده در آزمایشات دمایی نانوذرات، در بیشتر نمونه ها افزایش دما، افزایش شکست را نشان داد. با توجه به اینکه دما سبب افزایش جنبش مولکولی در نانوذرات می شود، سبب افزایش تحرکات در دنیای مولکولی شده و واکنش پذیری نانوذرات را افزایش می دهد. همانطور که در نمودارهای حاصله مشخص شده است، در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد بالاترین میزان شکست مشاهده شده است. استفاده از نانوذرات به عنوان روشی نوین، پایدار و با صرفه اقتصادی در این حوزه مطرح است. امید است کاربرد همزمان نانوذرات و بیومولکولها سبب هم افزایی فعالیت و افزایش میزان شکست گردد.

۵-۱۴) بر هم کنش بیومولکولها با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف

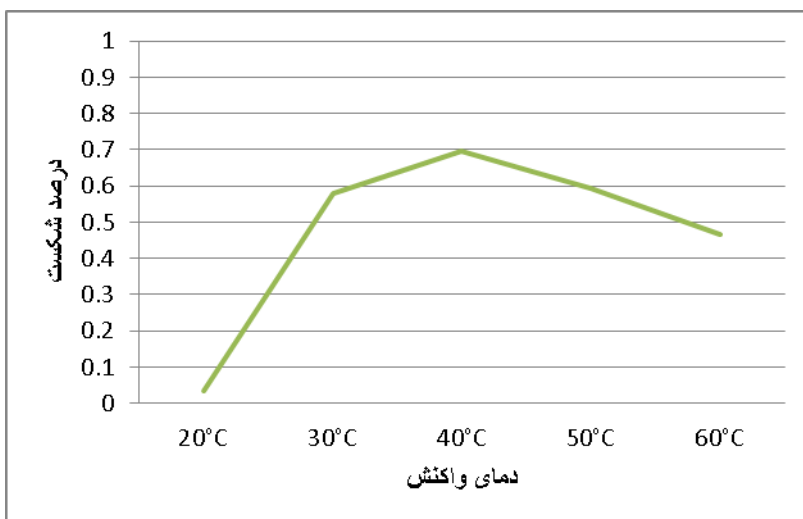
شکل های ۵-۴۵ تا ۵-۴۸ نمودار شکست مولکول های سنگین نفتی را در حضور بیومولکول ها در دماهای مختلف نشان می دهد. براساس نتایج حاصل از مرحله قبل، ۵ pH در این بررسی برای همه مولکول ها و همه دماها بکار رفت.



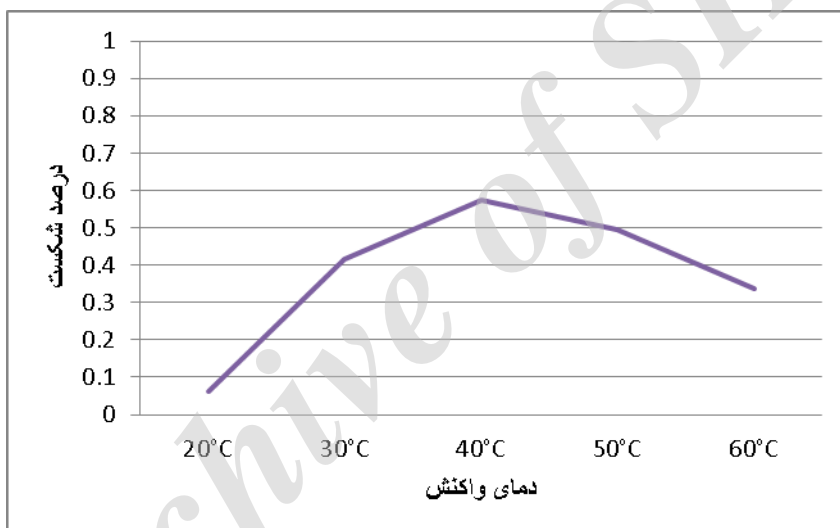
شکل ۵-۴۵: نمودار شکست هگزادکان در حضور بیومولکولها در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)



شکل ۵-۴۶: نمودار شکست اسکوالن در حضور بیومولکولها در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)



شکل ۴۷-۵: نمودار شکست آنتراسن در حضور بیومولکولها در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)



شکل ۴۸-۵: نمودار شکست دی بنزوفوران در حضور بیومولکولها در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)

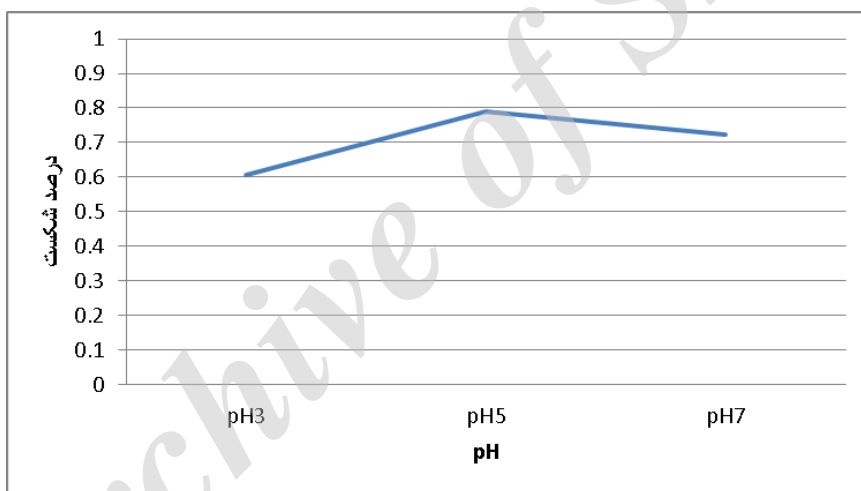
بر اساس نتایج به دست آمده در آزمایشات دمایی بیومولکولها، پایداری مناسبی دیده شد. در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد فعالیت بالایی دیده نشد و این دما برای فعالیت بهینه بیومولکولها پایین است. در حالیکه با افزایش دما تا ۴۰ درجه سانتیگراد میزان فعالیت بیومولکولها و در نتیجه میزان شکست افزایش یافت. در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در بیشتر نمونه ها شکست بیشتری دیده شد ولی با توجه به افزایش دما تا ۶۰ درجه سانتیگراد پایداری قابل قبولی در فعالیت بیومولکولها دیده شد. این پایداری می تواند امید بخش کاربرد صنعتی این ترکیبات باشد.

۵-۱۵) انتخاب کنسرسیوم مناسب نانوذرات و بیومولکولها و بررسی اثر آن کنسرسیوم بر شکست

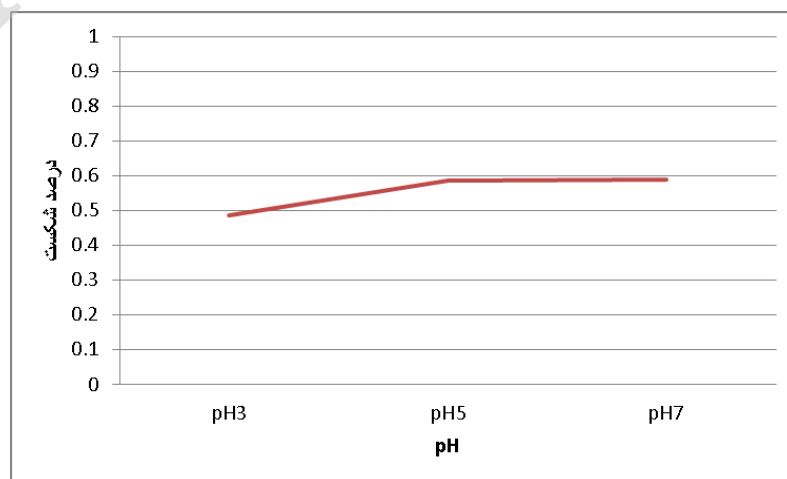
مولکولهای سنگین در pH های مختلف

پس از آنالیز نتایج مراحل قبل بیومولکولهای لیگنینولایتیک و نانوذرات مگنتیت به عنوان گزینه های منتخب در آزمایشات بعدی به کار گرفته شدند و با توجه به کاهش شکست کاتالستی بیومولکولها و نانوذرات در شرایط قلیایی، شرایط اسیدی تا خنثی جهت بررسی میزان شکست توسط کنسرسیوم نانوذرات و بیومولکولها مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از کروماتوگرام درصد شکست چهار مولکول منتخب در این طرح در pH مختلف در نمودارهای زیر را نشان می دهد.

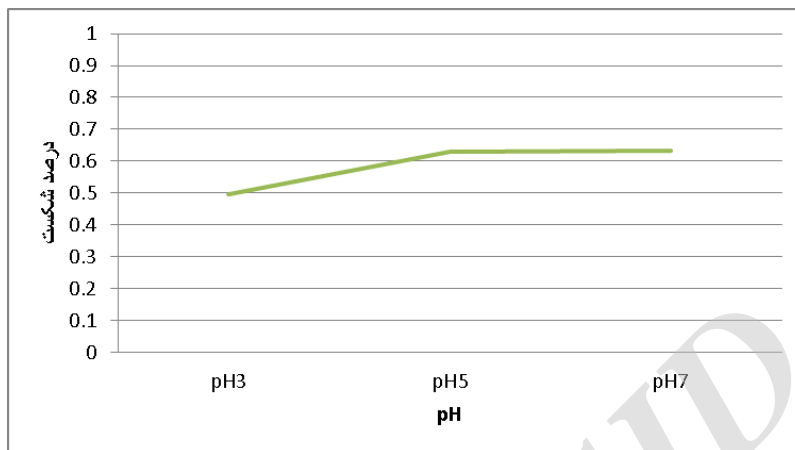
شکل های ۵-۴۹ تا ۵-۵۲ نمودار شکست مولکول های سنگین نفتی را در حضور کنسرسیوم بیومولکولها و نانوذرات در pH های مختلف نشان می دهد.



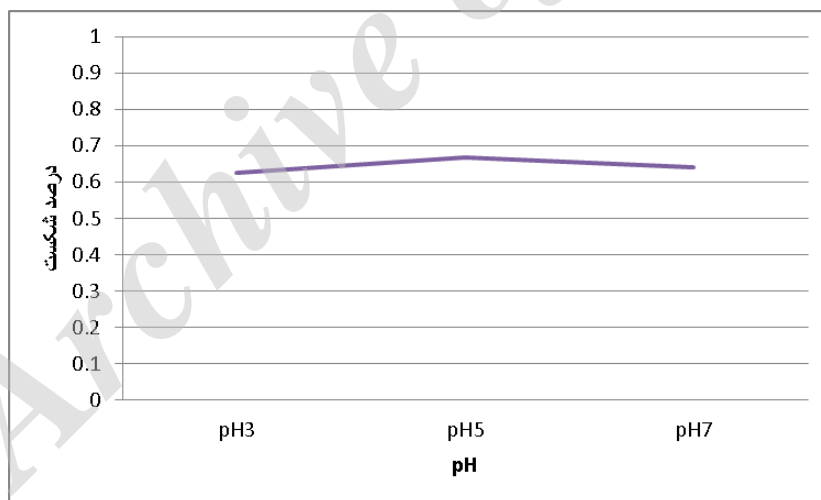
شکل ۵-۴۹: نمودار شکست هگزادکان در حضور کنسرسیوم بیومولکولها و نانوذرات در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).



شکل ۵-۵۰: نمودار شکست اسکوالن در حضور کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).



شکل ۵-۵۱: نمودار شکست آنتراسن در حضور کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).



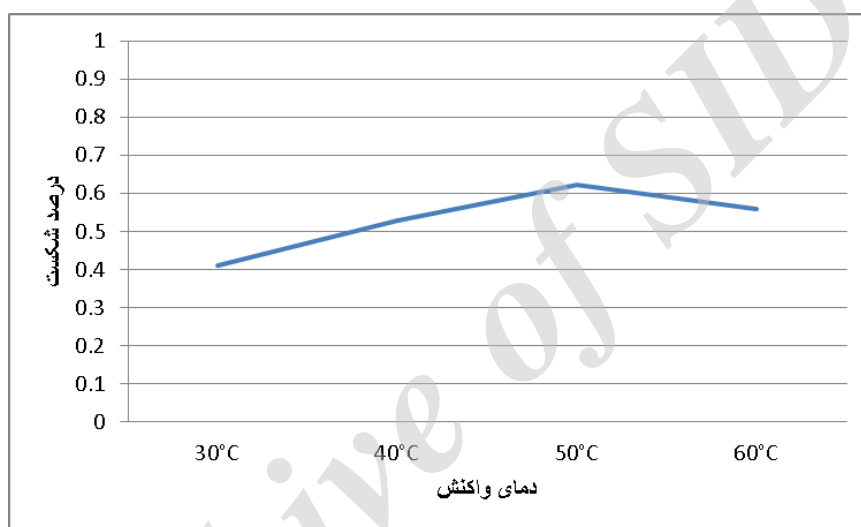
شکل ۵-۵۲: نمودار شکست دی بنزوفوران در حضور کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات در pH های مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است).

بر اساس نتایج به دست آمده که در نمودارها قابل مشاهده است فعالیت کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات در محیط های کمتر اسیدی و نزدیک به خنثی بهتر است. با آنالیز نمودارهای شکست چهار ترکیب تغییر واکنش

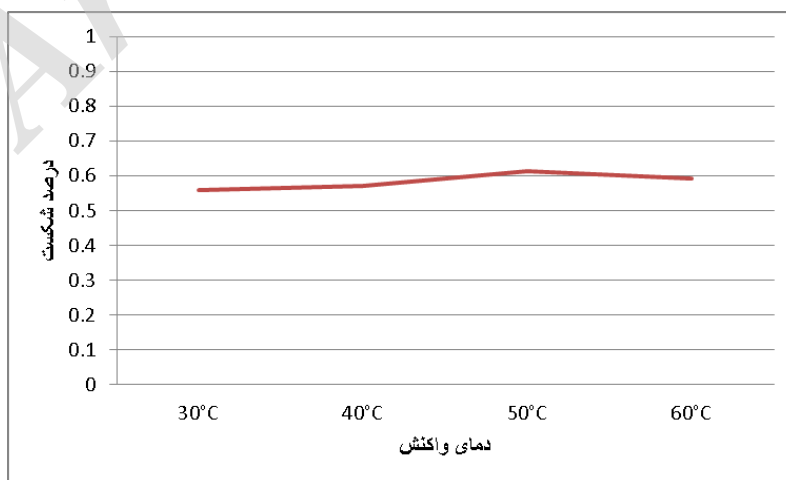
پذیری بیومولکولها در شرایط نزدیک به خنثی مشاهده شد. نانوذرات در افزایش واکنش پذیری بیومولکولها تفاوت معناداری نشان ندادند.

۱۶-۵) بر هم کنش کنسرسیوم نانوذرات و بیومولکولها با مولکولهای سنگین نفت در دماهای مختلف

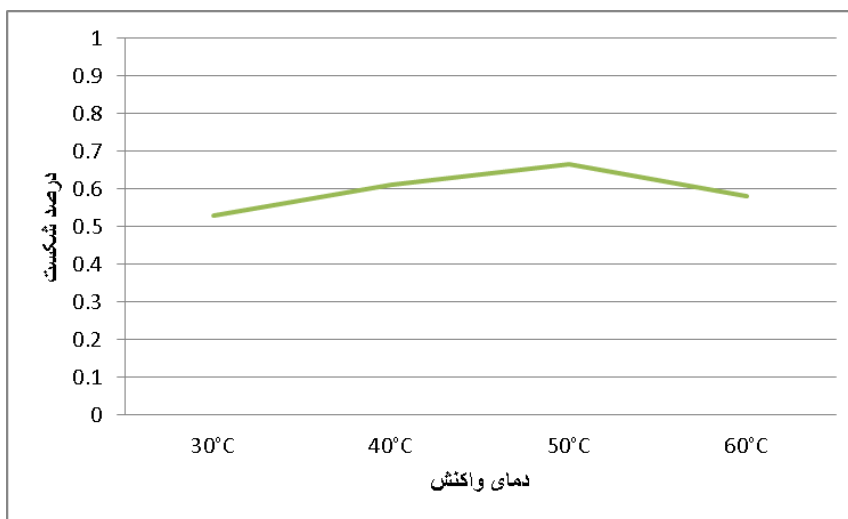
شکل های ۵-۵۳ تا ۵-۵۰ نمودار شکست مولکول های سنگین نفتی را در حضور بیومولکول ها در دماهای مختلف نشان می دهد. براساس نتایج حاصل از مرحله قبل، ۵ pH جهت بیشترین بازده فعالیت کنسرسیوم بیومولکولها و نانوذرات در نظر گرفته شد و به عنوان شرایط بهینه pH در این آزمایشات در همه دماها به صورت ثابت برای بررسی تغییرات دمایی در نظر گرفته شد.



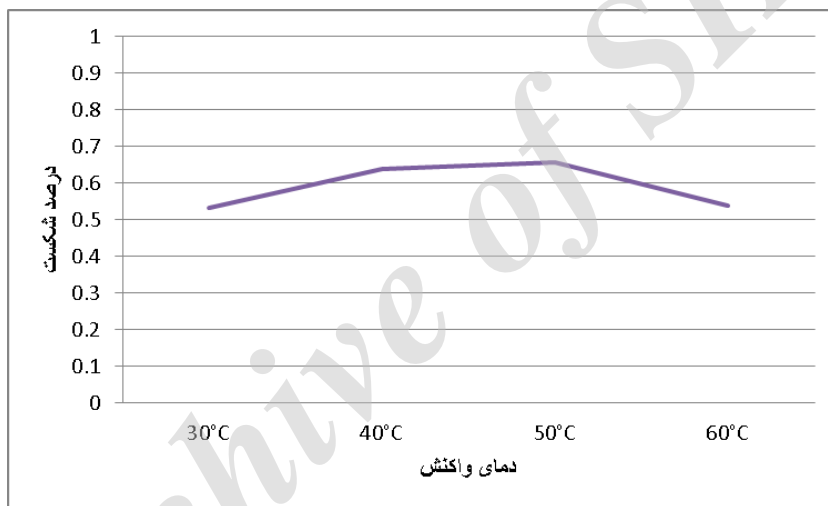
شکل ۵-۴۵: نمودار شکست هگزادکان در حضور کنسرسیوم بیومولکولها و نانوذرات در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)



شکل ۵-۴۶: نمودار شکست اسکوالن در حضور کنسرسیوم بیومولکولها و نانوذرات در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)



شکل ۴۷-۵: نمودار شکست آنتراسن در حضور کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)



شکل ۴۸-۵: نمودار شکست دی بنزوفوران در حضور کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات در دماهای مختلف (در محور عمودی عدد یک نشانه شکست ۱۰۰٪ است و عدد صفر نشانه عدم شکست است.)

بر اساس نتایج به دست آمده در آزمایشات دمایی کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات، افزایش پایداری دمایی بیشتری در بیومولکولها مشاهده گردید و دمای بهینه فعالیت آنها ۵۰ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد. همانند دمای پایین در زمان حضور بیومولکولها به تنهایی، در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد فعالیت بالایی دیده نشد و این دما برای فعالیت بهینه کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات پایین است. در حالیکه با افزایش دما تا ۵۰ درجه سانتیگراد میزان فعالیت کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات و در نتیجه میزان شکست افزایش یافت. در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در بیشتر نمونه ها شکست بیشتری دیده شد ولی با توجه به افزایش دما تا ۶۰ درجه سانتیگراد میزان افت واکنش پذیری کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات کمتر از زمان استفاده از بیومولکولها بود. نانوذرات به

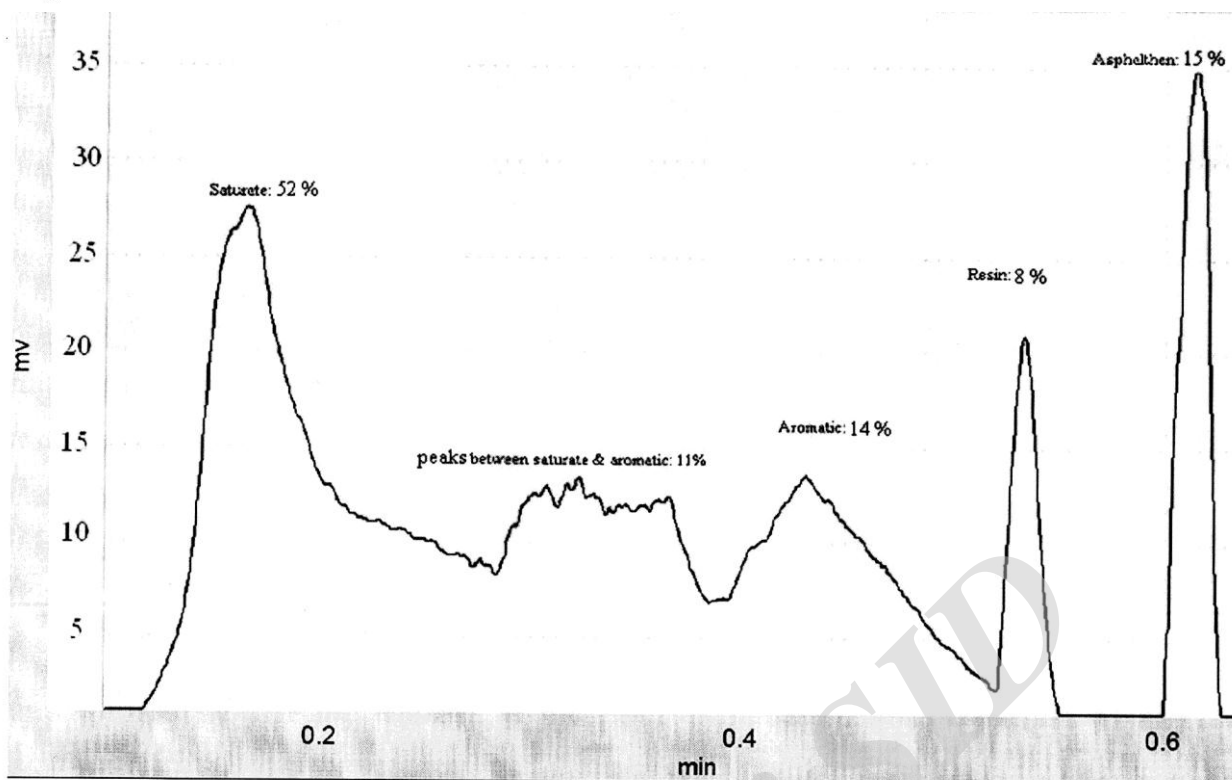
تنهایی تقریباً با افزایش دما شکست بیشتری را نشان دادند که در مجموع نسبت به بیومولکولها به تنهایی بسیار پایین تر بود. در حالیکه در شرایط به کار گیری کنسرسیون بیومولکولها و نانوذرات افزایش دما سبب اثر بر ساختار بیومولکولها گردید و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد شکست کمی کاهش یافت و میزان فعالیت نانوذرات در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد تا حد کمی توانست کاهش فعالیت بیومولکولها را جبران نماید و در مجموع نانوذرات با حضور در کنار بیومولکولها توانستند پایداری بیشتری در سیستم ایجاد کنند ولی افزایش میزان شکست کمتر از حد انتظار مشاهده گردید.

۱۷-۵) بررسی اثر کنسرسیون بر تبدیل مولکولهای آلی سنگین به سبک تر در نفت سنگین

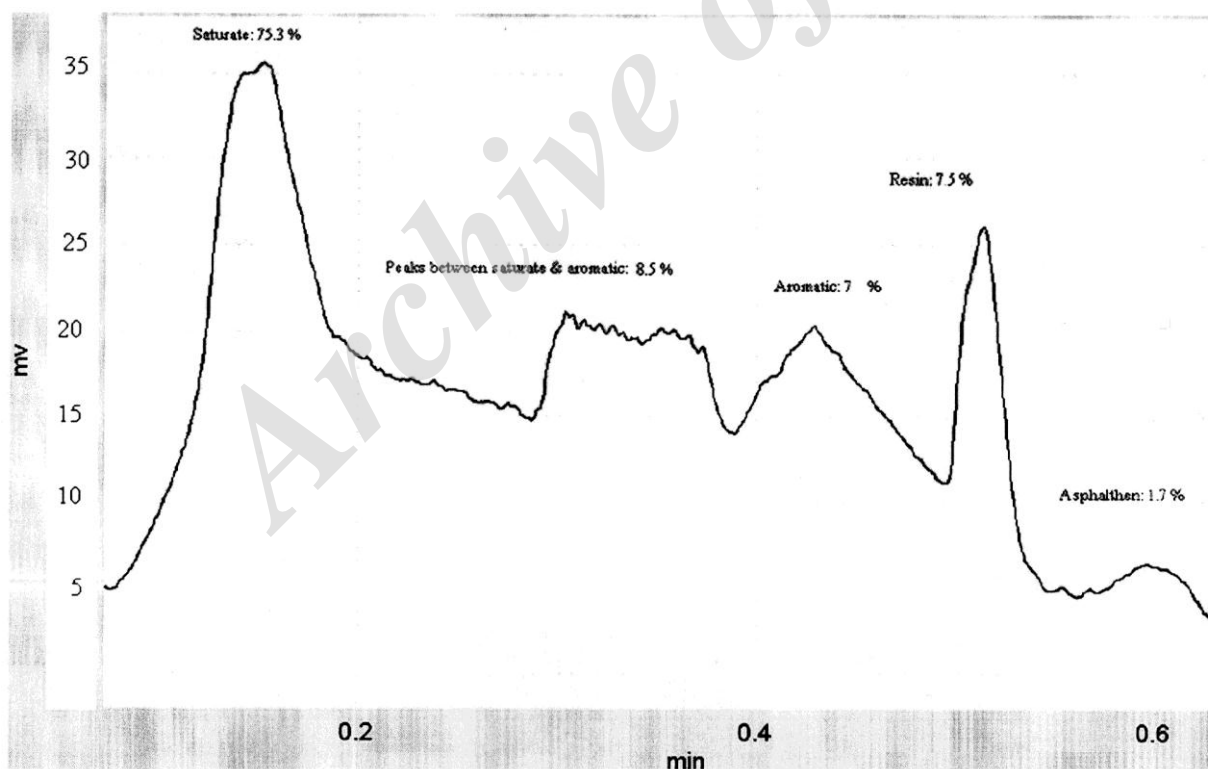
برای بررسی میزان شکست ترکیبات سنگین از تست SARA استفاده شد. تست SARA جهت اندازه گیری میزان آسفالتن، رزین، آروماتیک ها و هیدروکربن های اشباع می باشد. نمونه حاوی کنسرسیون نانوذرات و بیومولکولها، نفت سنگین و بافر به عنوان محیط واکنش و نمونه شاهد که شامل تمام اجزای آزمایش به جز کنسرسیون نانوذرات و بیومولکولها بود آماده شد و به مدت ۵ روز در دمای بهینه ۵۰ درجه سانتیگراد در pH در شیکر انکوباتور قرار گرفت. برای جدا کردن تمام ترکیبات نفتی از حلال کلروفرم استفاده شد. با استفاده از دکانتور فاز کلروفرم که حاوی ترکیبات نفتی بود استخراج شد و جهت انجام آنالیز SARA به پژوهشگاه صنعت نفت ارسال گردید.

نتایج آنالیز SARA شکست مولکولهای سنگین و به خصوص گروه آسفالتن را تایید نمود. در نمودارهای زیر نتایج آنالیز SARA قابل مشاهده است.

در هر نمودار پنج پیک به صورت مشخص وجود دارد که از چپ به راست شامل پیک اول سبک ترین ترکیبات نفتی در هیدروکربن های اشباع، پیک دوم ترکیبات بین هیدروکربن های اشباع و آروماتیک ها، پیک سوم گروه آروماتیک ها، پیک چهارم رزین ها و پیک پنجم میزان آسفالتن را نشان می دهد.



شکل ۴۹-۵: کروماتوگرام تست SARA در نمونه شاهد



شکل ۵۰-۵: کروماتوگرام تست SARA در حضور کنسرسيوم بيومولكولها و نانوذرات

همانطور که در نتایج تست SARA کاملاً مشهود است، در نمونه تحت آزمایش میزان آسفالتن ها به شدت کاهش یافته است و میزان هیدروکربن های اشباع افزایش یافته است که نشان از موفقیت اثر کنسرسیون نانوذرات و بیومولکولها بر شکست مولکولهای آلی سنگین دارد.

نتیجه گیری و پیشنهادات:

Archive of SID

۱. Leon, V. and M. Kumar, *Biological upgrading of heavy crude oil*. Biotechnology and bioprocess engineering, 2005. **10**(6): p. 471-481.
۲. Artok, L., et al., *Structure and reactivity of petroleum-derived asphaltene*. Energy & Fuels, 1999. **13**(2): p. 287-296.
۳. Strausz, O.P., et al., *Structural features of Boscan and Duri asphaltenes*. Energy & Fuels, 1999. **13**(2): p. 228-247.
۴. Strausz, O.P., T.W. Mojelsky, and E.M. Lown, *The molecular structure of asphaltene: an unfolding story*. Fuel, 1992. **71**(12): p. 1355-1363.
۵. Peng, P.a., et al., *Molecular structure of Athabasca asphaltene: sulfide, ether, and ester linkages*. Energy & Fuels, 1997. **11**(6): p. 1171-1187.
۶. Bressler, D.C. and M.R. Gray, *Transport and reaction processes in bioremediation of organic contaminants. 1. Review of bacterial degradation and transport*. International Journal of Chemical Reactor Engineering, 2003. **1**(۱)
۷. Gray, R.M., *Upgrading petroleum residues and heavy oils*. 1994: CRC press.
۸. Pineda-Flores, G., et al., *A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source*. Biodegradation, 2004. **15**(3): p. 145-151.
۹. Ferrari, M., C. Albornoz, and E. Neirotti, *[Biodegradability in soil of residual hydrocarbons in petroleum tank bottoms]*. Revista Argentina de microbiologia, 1993. **26**(4): p. 157-170.
۱۰. Pendrys, J.P., *Biodegradation of asphalt cement-20 by aerobic bacteria*. Applied and environmental microbiology, 1989. **55**(6): p. 1357-1362.
۱۱. Rontani, J., et al., *Analytical study of Asthart crude oil asphaltenes biodegradation*. Chemosphere, 1985. **14**(9): p. 1413-1422.
۱۲. Premuzic, E.T., M.L.M. Bohenek, and W. Zhou, *Bioconversion reactions in asphaltenes and heavy crude oils*. Energy & fuels, 1999. **13**(2): p. 297-304.
۱۳. Premuzic, E., M. Lin, and B. Manowitz, *The significance of chemical markers in the bioprocessing of fossil fuels*. Fuel processing technology, 1994. **40**(2): p. 227-239.
۱۴. Lin, M.S., et al. *Biochemical processing of heavy oils and residuum*. in *Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. 1996. Springer.
۱۵. Premuzic, E.T. and M.S. Lin, *Induced biochemical conversions of heavy crude oils*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 1999. **22**(1): p. 171-180.
۱۶. Premuzic, E., et al., *The use of chemical markers in the evaluation of crude oil bioconversion products, technology, and economic analysis*. Fuel processing technology, 1997. **52**(1): p. 207-223.
۱۷. Premuzic, E.T. and M. Lin, *Biochemically enhanced oil recovery and oil treatment*. 1994, Google Patents.
۱۸. Premuzic, E., et al., *Chemical markers of induced microbial transformations in crude oils*. Developments in Petroleum Science, 1993. **39**: p. 37-54.
۱۹. Kanaly, R.A. and S. Harayama, *Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(8): p. 2059-2067.
۲۰. Van Hamme, J.D., et al., *Use of a novel fluorinated organosulfur compound to isolate bacteria capable of carbon-sulfur bond cleavage*. Applied and environmental microbiology, 2004. **70**(3): p. ۱۴۹۳-۱۴۸۷.
۲۱. Fedorak, P.M., et al., *Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes*. Enzyme and microbial technology, 1993. **15**(5): p. 429-437.
۲۲. Mogolloñ, L., et al., *Biocatalytic removal of nickel and vanadium from petroporphyrins and asphaltenes*. Applied biochemistry and biotechnology, 1998. **70**(1): p. 765-777.
۲۳. Tinoco, R. and R. Vazquez-Duhalt, *Chemical modification of cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Enzyme and microbial technology, 1998. **22**(1): p. 8-12.
۲۴. García-Arellano, H., E. Buenrostro-Gonzalez, and R. Vazquez-Duhalt, *Biocatalytic transformation of petroporphyrins by chemical modified cytochrome c*. Biotechnology and bioengineering, 2004. **85** (۷)p. 790-798.
۲۵. García-Arellano, H., et al., *High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c*. Bioconjugate chemistry, 2002. **13**(6): p. 1336-1344.

۲۶. Wernéus, H. and S. Ståhl, *Biotechnological applications for surface-engineered bacteria*. Biotechnology and applied biochemistry, 2004. **40**(3): p. 209-228.
۲۷. Van Hamme, J.D., A. Singh, and O.P. Ward, *Recent advances in petroleum microbiology*. Microbiology and molecular biology reviews, 2003. **67**(4): p. 503-549.
۲۸. Gray, K.A., G.T. Mrachko, and C.H. Squires, *Biodesulfurization of fossil fuels*. Current opinion in microbiology, 2003. **6**(3): p. 229-235.
۲۹. Monticello, D.J., *Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates*. Current Opinion in Biotechnology, 2000. **11**(6): p. 540-546.
۳۰. Le Borgne, S. and R. Quintero, *Biotechnological processes for the refining of petroleum*. Fuel Processing Technology, 2003. **81**(2): p. 155-169.
۳۱. Vazquez-Duhalt, R., et al., *Will biochemical catalysis impact the petroleum refining industry?* Energy & fuels, 2002. **16**(5): p. 1239-1250.
۳۲. Moniz, E.J. and J. García-Martínez, *Nanotechnology for the energy challenge*. 2010: John Wiley & Sons.
۳۳. Sadeghbeigi, R., *Fluid catalytic cracking handbook: An expert guide to the practical operation, design, and optimization of FCC units*. 2012: Elsevier.
۳۴. Bomati-Miguel, O., et al., *Calorimetric study of maghemite nanoparticles synthesized by laser-induced pyrolysis*. Chemistry of Materials, 2008. **20**(2): p. 591-598.
۳۵. Bharde, A.A., et al., *Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles*. Langmuir, 2008. **24**(11): p. 5787-5794.
۳۶. Roh, Y., et al., *Extracellular synthesis of magnetite and metal-substituted magnetite nanoparticles*. Journal of nanoscience and nanotechnology, 2006. **6**(11): p. 3517-3520.
۳۷. Wei, W., et al., *Preparation and characterization of magnetite Fe₃O₄ nanopowders*. Rare Metal Materials and Engineering, 2007. **36**: p. 238-243.
۳۸. Binh, V.T., et al., *Nanotips and nanomagnetism*. Applied surface science, 1998. **130**: p. 803-814.
۳۹. Novakova, A., et al., *Magnetic properties of polymer nanocomposites containing iron oxide nanoparticles*. Journal of magnetism and magnetic materials, 2003. **258**: p. 354-357.
۴۰. Lee, J., T. Isobe, and M. Senna, *Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via in-situ precipitation*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1996. **109**: p. 121-127.
۴۱. Sun, S. and H. Zeng, *Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(28): p. 8204-8205.
۴۲. Rockenberger, J., E.C. Scher, and A.P. Alivisatos, *A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal oxides*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(49): p. 11595-11596.
۴۳. Solans, C., et al., *Nano-emulsions*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2005. **10**(3): p. 102-110.
۴۴. Vidal-Vidal, J., J. Rivas, and M. Lopez-Quintela, *Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **288**(1): p. 44-51.
۴۵. Chin, A.B. and I.I. Yaacob, *Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure*. Journal of materials processing technology, 2007. **191**(1): p. 235-237.
۴۶. Hu, X., J.C. Yu, and J. Gong, *Fast production of self-assembled hierarchical α -Fe₂O₃ nanoarchitectures*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(30): p. 11180-11185.
۴۷. Giri, S., et al., *Magnetic properties of α -Fe₂O₃ nanoparticle synthesized by a new hydrothermal method*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. **285**(1): p. 296-302.
۴۸. Jing, Z. and S. Wu, *Synthesis and characterization of monodisperse hematite nanoparticles modified by surfactants via hydrothermal approach*. Materials Letters, 2004. **58**(27): p. 3637-3640.
۴۹. Liu, X., et al., *Hydrothermal synthesis and characterization of α -FeOOH and α -Fe₂O₃ uniform nanocrystallines*. Journal of alloys and compounds, 2007. **433**(1): p. 216-220.
۵۰. Wang, J., et al., *One-step hydrothermal process to prepare highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles with improved magnetic properties*. Materials Research Bulletin, 2003. **38**(7): (p. 1113-1118.
۵۱. Zheng, Y.-h., et al., *Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles*. Materials Research Bulletin, 2006. **41**(3): p. 525-529.

- ۵۲ Daou, T., et al., *Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles*. Chemistry of Materials, 2006. **18**(18): p. 4399-4404.
- ۵۳ Wang, S.-B., Y.-L. Min, and S.-H. Yu, *Synthesis and magnetic properties of uniform hematite nanocubes*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(9): p. 3551-3554.
- ۵۴ Titirici, M.-M., M. Antonietti, and A. Thomas, *A generalized synthesis of metal oxide hollow spheres using a hydrothermal approach*. Chemistry of Materials, 2006. **18**(16): p. 3808-3812.
- ۵۵ Bang, J.H. and K.S. Suslick, *Sonochemical synthesis of nanosized hollow hematite*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(8): p. 2242-2243.
- ۵۶ Vijayakumar, R., et al., *Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe₃O₄ particles*. Materials Science and Engineering: A, 2000. **286**(1): p. 101-105.
- ۵۷ Pinkas, J., et al., *Sonochemical synthesis of amorphous nanoscopic iron (III) oxide from Fe(acac)₃*. Ultrasonics sonochemistry, 2008. **15**(3): p. 257-264.
- ۵۸ Wu, W., Q. He, and C. Jiang, *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies*. ChemInform, 2009. **40**(24): p. i.
- ۵۹ Gateau, P., et al., *Heavy oil dilution*. Oil & gas science and technology, 2004. **59**(5): p. 503-509.
- ۶۰ Hunt, M., *Petroleum geochemistry and geology*. 1979: WH Freeman and Company.
- ۶۱ Martinez, A. *Report of working group on definitions*. pp. Ixvii-Ixviii. in *The Future of Heavy Crude and Tar Sands, Second International Conference, McGraw-Hill, New York, NY, USA*. 1984.
- ۶۲ Peterson, N. and P. Hickey, *California Plio-Miocene oils: Evidence of early generation*. 1987.
- ۶۳ Roadifer, R., *Size Distributions of the World's Largest Known Oil and Tar Accumulations: Section I. Regional Resources*. 1987.
- ۶۴ Wu, W. and J. Chen, *Characteristics of Chinese heavy crudes*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 1999. **22**(1): p. 25-30.
- ۶۵ Yaghi, B.M. and A. Al-Bemani, *Heavy crude oil viscosity reduction for pipeline transportation*. Energy sources, 2002. **24**(2): p. 93-102.
- ۶۶ Payzant, J., E. Lown, and O. Strausz, *Structural units of Athabasca asphaltene: the aromatics with a linear carbon framework*. Energy & fuels, 1991. **5**(3): p. 445-453.
- ۶۷ Groenzin, H. and O.C. Mullins, *Molecular size and structure of asphaltenes from various sources*. Energy & Fuels, 2000. **14**(3): p. 677-684.
- ۶۸ Bogan, B.W. and R.T. Lamar, *Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of Phanerochaete laevis HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(5): p. 1597-1603.
- ۶۹ Collins, P.J. and A.D. Dobson, *Oxidation of fluorene and phenanthrene by Mn (II) dependent peroxidase activity in whole cultures of Trametes (Coriolus) versicolor*. Biotechnology Letters, 1996. **18**(7): p. 801-804.
- ۷۰ Sack, U., et al., *Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(10): p. 3919-3925.
- ۷۱ Steffen, K., A. Hatakka, and M. Hofrichter, *Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi*. Applied microbiology and biotechnology, 2002. **60**:(۲-۱)p. 212-217.
- ۷۲ Steffen, K.T., A. Hatakka, and M. Hofrichter, *Degradation of benzo [a] pyrene by the litter-decomposing basidiomycete Stropharia coronilla: role of manganese peroxidase*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(7): p. 3957-39۶۴
- ۷۳ Field, J.A., et al., *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi*. Applied and environmental microbiology, 1992. **58**(7): p. 2219-2226.
- ۷۴ Bogan, B.W. and R.T. Lamar, *One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(7): p. 2631-2635.
- ۷۵ Bezalel, L., et al., *Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(7): p. 2554-2559.
- ۷۶ Brodkorb, T.S. and R.L. Legge, *Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(9): p. 3117-3121.

۷۷. Moen, M.A. and K.E. Hammel, *Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of Phanerochaete chrysosporium is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(6): p. 1956-1961.
۷۸. Bogan, B.W., et al., *Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(7): p. 2381-2386.
۷۹. May, R., P. Schröder, and H. Sandermann, *Ex-situ process for treating PAH-contaminated soil with Phanerochaete chrysosporium*. Environmental science & technology, 1997. **31**(9): p. ۲۶۲۶-۲۶۳۳ .
۸۰. Lang, E., F. Nerud, and F. Zadrazil, *Production of ligninolytic enzymes by Pleurotus sp. and Dichomitus squalens in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms*. FEMS microbiology letters, 1998. **167**(2): p. 239-244.
۸۱. Eggen, T., *Application of fungal substrate from commercial mushroom production—Pleurotus ostreatus—for bioremediation of creosote contaminated soil*. International biodeterioration & biodegradation, 1999. **44**(2): p. 117-126.
۸۲. Baldrian, P., et al., *Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Pleurotus ostreatus in soil*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(6): p. 2471-2478.
۸۳. Pozdnyakova, N.N., et al., *Production of ligninolytic enzymes by white-rot fungi during bioremediation of oil-contaminated soil*, in *Soil Enzymology*. 2011, Springer. p. 363-377.
۸۴. Bumpus, J.A., et al., *Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus*. Science : (۴۷۰۶)۲۲۸ . ۱۹۸۵ , p. 1434-1436.
۸۵. Pointing, S., *Feasibility of bioremediation by white-rot fungi*. Applied microbiology and biotechnology, 2001. **57**(1-2): p. 20-33.
۸۶. Cho, S.-J., et al., *Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase of Coriolus hirsutus*. Biotechnology letters, 2002. **24**(16): p. 1337-1340.
۸۷. Hofrichter, M., et al., *Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from Nematoloma frowardii*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(2): p . ۴۰۴-۳۹۹
۸۸. Baborová, P., et al. *Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus Irpex lacteus, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme*. Research in Microbiology 2006 [cited 157 3]; 248-253.[
۸۹. Bezalel, L ., et al., *Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus Pleurotus ostreatus*. Applied and environmental microbiology, 1996. **62**(7): p. 2547-2553.
۹۰. Bezalel, L., Y. Hadar, and C.E. Cerniglia, *Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus Pleurotus ostreatus*. Applied and environmental microbiology, 1996. **62**(1): p. 292-295.
۹۱. Nikiforova, S., et al., *Chrysene bioconversion by the white rot fungus Pleurotus ostreatus D1*. Microbiology, 2010. **79**(4): p. 456-460.
۹۲. Pozdnyakova ,N.N., et al., *Influence of cultivation conditions on pyrene degradation by the fungus Pleurotus ostreatus D1*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010. **26**(2): p. 205-211.
۹۳. Pozdnyakova, N., S. Nikiforova, and O. Turkovskaya, *Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus Pleurotus ostreatus D1*. Open Life Sciences, 2010. **5**(1): p. 83-94.
۹۴. Bezalel, L., Y. Hadar, and C.E. Cerniglia, *Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(7): p. 2495-2501.
۹۵. Bogan, B.W., R.T. Lamar, and K.E. Hammel, *Fluorene Oxidation In Vivo by Phanerochaete chrysosporium and In Vitro during Manganese Peroxidase-Dependent Lipid Peroxidation*. Applied and environmental microbiology, 1996. **62**(5): p. 1788-1792.
۹۶. Sack, U., M. Hofrichter, and W. Fritsche, *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of Nematoloma frowardii*. FEMS microbiology letters, 1997. **152**(2): p. 227-234.
۹۷. Kim, M.-S., et al., *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by selected white-rot fungi and the influence of lignin peroxidase*. Journal of microbiology and biotechnology, 1998. **8**(2): p. 129-133.

- ۹۸ Hammel, K.E., B. Kalyanaraman, and T.K. Kirk, *Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo [p]-dioxins by Phanerochaete chrysosporium ligninase*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(36): p. 16948-16952.
- ۹۹ Field, J.A., et al., *The tolerance of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase to miscible solvents and the in vitro oxidation of anthracene in solvent: water mixtures*. Enzyme and Microbial Technology, 1996. **18**(4): p. 300-308.
- ۱۰۰ Vazquez-Duhalt, R., D.W. Westlake, and P.M. Fedorak, *Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents*. Applied and environmental microbiology, 1994. **60**(2): p. 459-466.
- ۱۰۱ Hammel, K.E., B. Green, and W.Z. Gai, *Ring fission of anthracene by a eukaryote*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(23): p. 10605-10608.
- ۱۰۲ Johannes, C., A. Majcherczyk, and A. Hüttermann, *Degradation of anthracene by laccase of Trametes versicolor in the presence of different mediator compounds*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996. **46**(3): p. 313-317.
- ۱۰۳ Collins, P.J., et al., *Oxidation of Anthracene and Benzo [a] pyrene by Laccases from Trametes versicolor*. Applied and environmental microbiology, 1996. **62**(12): p. 4563-4567.
- ۱۰۴ Sutherland, J.B., et al., *Metabolism of phenanthrene by Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. **57**(11): p. 3310-3316.
- ۱۰۵ Masaphy, S., et al., *Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo (a) pyrene hydroxylation in the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. FEMS microbiology letters, 1996. **135**(1): p. 51-55.
- ۱۰۶ Pickard, M.A., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by Coriopsis gallica UAMH 8260 laccase*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(9): p. 3805-3809.
- ۱۰۷ Haemmerli, S.D., et al., *Oxidation of benzo (a) pyrene by extracellular ligninases of Phanerochaete chrysosporium. Veratryl alcohol and stability of ligninase*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(15): p. 6900-6903.
- ۱۰۸ Dhawale, S.W., S.S. Dhawale, and D. Dean-Ross, *Degradation of phenanthrene by Phanerochaete chrysosporium occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(9): p. 3000-3006.
- ۱۰۹ Song, H.-G., *Biodegradation of aromatic hydrocarbons by several white-rot fungi*. Journal of Microbiology, 1997. **35**(1): p. 66-71.
- ۱۱۰ Hammel, K.E., et al., *Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology **58**(7), p. 1832-1838.
- ۱۱۱ Chupungars, K., P. Rerngsamran, and S. Thaniyavarn, *Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by Agrocybe sp. CU-43 and its fluorene transformation*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(1): p. 93-99.
- ۱۱۲ Ning, D., et al., *Novel evidence of cytochrome P450-catalyzed oxidation of phenanthrene in Phanerochaete chrysosporium under ligninolytic conditions*. Biodegradation, 2010. **21**(6): p. 889-901.
- ۱۱۳ Cajthaml, T., et al., *Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz [a] anthracene by a ligninolytic fungus*. Chemosphere, 2006. **64**(4): p. 560-564.
- ۱۱۴ Gramss, G., et al., *Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes*. Mycological Research, 1999. **103**(08): p. 1009-1018.
- ۱۱۵ Levin, L., A. Viale, and A. Forchiassin, *Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete Trametes trogii*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003. **52**(1): p. 1-5.
- ۱۱۶ Han, M.-J., H.-T. Choi, and H.-G. Song, *Degradation of phenanthrene by Trametes versicolor and its laccase*. JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-, 2004. **42**(2): p. 94-98.
- ۱۱۷ Ting, W., et al., *Biodegradation of phenanthrene and pyrene by Ganoderma lucidum*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011. **65**(1): p. 238-242.
- ۱۱۸ Pozdnyakova, N.N., *Involvement of the ligninolytic system of white-rot and litter-decomposing fungi in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Biotechnology research international, 2012. **2012**.

۱۱۹. Kotterman, M.J., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus Bjerkandera sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants*. Biotechnology and bioengineering : (۲)۵۷ . ۱۹۹۸ ,p. 220-227.
۱۲۰. Song, H.-G., *Comparison of pyrene biodegradation by white rot fungi*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1999. **15**(6): p. 669-672.
۱۲۱. Nikiforova, S.V., N.N. Pozdnyakova, and O.V. Turkovskaya, *Emulsifying agent production during PAHs degradation by the white rot fungus Pleurotus ostreatus D1*. Current microbiology, 2009. **58**(6): p. 554-558.
۱۲۲. Jäger, A., S. Croan, and T.K. Kirk, *Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 1985. **50**(5): p. 1274-1278.
۱۲۳. Wang, R., et al., *Effect of rhamnolipid on the enzyme production of two species of lignin-degrading fungi*. Journal of Hunan University Natural Sciences : (۱۰)۳۵ . ۲۰۰۸ ,p. 70-74.
۱۲۴. Meléndez, L.V., et al., *Prediction of the SARA analysis of Colombian crude oils using ATR–FTIR spectroscopy and chemometric methods*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2012. **90**: p. 56-60.

Archive of SID

Abstract:

World demand for oil and its products and the decrease in oil production from light crude oil reservoirs has increased the trend to heavy crude oil and its consumption. Although there are abundant heavy crude oil reservoirs in Iran and by considering the heavy crude oil distillates in refineries distillation column, there haven't been reported any extensive and remarkable research on molecular degradation of heavy crude oil. The main problem about heavy crude oil is its high viscosity due to the presence of heavy molecules which causes difficulties in extraction and transportation of the crude oil and production of oil products. In this project, biomolecules were isolated from species in nature that catalyze the degradation of oil molecules and iron oxide nanoparticles effective in degrading these compounds were synthesized. Then the effect of biomolecules and nanoparticles on organic heavy compounds were tested and analyzed via gas chromatography and at last in order to make the results applicable, the reaction between heavy crude oil and the consortium of biomolecules and iron oxide nanoparticles were evaluated by gas chromatography and SARA analysis. The analysis results determined the biomolecules, nanoparticles, and their consortium effectiveness. The biomolecules, nanoparticles, and their consortium showed the best degradation results at 40 °C and pH 5, 60 °C and pH 5, and 50 °C and pH 5, respectively. The nanoparticles' effectiveness in these conditions were less than the biomolecules.

Hope that this project's results would be helpful in more production rate of heavy crude oil and distillates and consequently aid in more income and economic growth in this field.

Keywords: heavy crude oil, Biomolecules, Iron oxide nanoparticles, Catalytic degradation, Viscosity reduction.