تولید بیوسورفکتنت‌های رامنولیپید به منظور کاربرد در فرایند ازدیاد برداشت نفت

حسین امانی*+

بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

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

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

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

مقدمه

سورفکتنت‌ها یا مواد فعال سطحی گروه مهمی از ترکیب‌های شیمیایی صنعتی هستند که به طور گسترده در تمام بخش‌های صنایع نوین امروزی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱،۲]. سورفکتنت‌ها مولکول‌های آمفی پاتیک یا دوگانه دوستی هستند که با قرار گرفتن در سطح بین دو فاز منجر به کاهش کشش سطحی و بین سطحی و تشکیل میکروامولسیون‌های هیدروکربن در آب و یا آب در هیدروکربن می‌شوند. سورفکتنت‌ها بر روی سطح جذب می‌شوند یا در سطح آزاد سیال یا سطح تماس بین دو سیال تجمع می‌کنند. در سال‌های اخیر تلاش برای تهیه و مطالعه سورفکتنت‌های تولیدی از فراورده‌های طبیعی افزایش یافته است. این سورفکتنت‌ها چون به آسانی قابل تجزیه می‌باشند بیشتر مورد توجه هستند. به این ترتیب استفاده از فراورده‌های طبیعی تجدیدپذیر به‌جای

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: hosn1_amani@yahoo.com

انوع شیمیایی مرسوم شده است [۳]. گروهی از میکروب‌های موجود در طبیعت قادر به ترشح مواد برون سلولی می‌باشند که از این مواد می‌توان بیوسورفکتنت‌ها را نام برد. اگرچه بیشتر پژوهشگران بیوسورفکتنت را به عنوان متابولیت اولیه در نظر گرفته‌اند، اما برخی از آن‌ها نیز این ترکیب‌ها را متابولیت‌های ثانویه به حساب آورده‌اند [۴]. رامنولیپید[۱] تولید شده توسط باکتری *سودوموناس آرجینوزا* به‌عنوان یکی از مؤثرترین بیوسورفکتنت‌ها با قابلیت کاهش کشش سطحی تا ۲۵ mN/m شناخته می‌شود [۱۷-۵]. یک زمینه مهم برای استفاده از این بیو سورفکتنت‌ها، ازدیاد برداشت میکروبی نفت[۲] است. این ترکیب‌ها با کاهش کشش بین سطحی نفت و سنگ بستر، باعث کاهش نیروی مویینگی (که مانعی برای خروج نفت از خلال منافذ سنگ بستر است) می‌شوند. همچنین، نقش امولسیون کنندگی بیوسورفکتنت به جدا شدن نفت از سطح سنگ‌ها کمک می‌کند [۱۸].

سیلدتاک و *همکاران*[۳] [۱۹] چهار نوع رامنولیپید که توسط گونه *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2874 تولید می‌شد را شناسایی نمودند. رامنولیپید تولیدی آنها باعث ازدیاد برداشت نفت حدود ۲۰ ٪ در مغزه شد. *کاپلی* و *همکاران*[۴] [۲۰] توانستند رامنولیپید را از گونه *P. aeruginosa DSM 2659* تولید کنند. آنها با استفاده از رامنولیپید تولیدی کشش سطحی آب را به کمتر از ۳۰ mN/m رساندند و با تزریق محلول رامنولیپید درون مغزه ۳۳٪ نفت باقی مانده را بازیافت نمودند. *هری* و *همکاران*[۵] [۲۱] نشان‌دادند که رامنولیپید سه برابر موقعی که آب به تنهایی به سنگ تزریق می‌شود، باعث جدایی نفت از سنگ می‌شود. یکی از موفق ترین تلاش‌های میدانی ازدیاد برداشت میکروبی نفت در مخازن کربناته توسط *دتریچ* و *همکاران*[۶] [۲۲] صورت گرفت، میزان ۶۰٪ ازدیاد برداشت نفت در این تجربه گزارش شد. *دمین* و *همکاران*[۷] [۲۳] در دو مطالعه آزمایشگاهی و پایلوت نشان دادند که با تزریق بیوسورفکتنت در میدان نفتی دکینگ[۸] مقدار تولید نفت ۲۱ ٪ افزایش پیدا می‌کند. *داوشان* و *همکاران*[۹] [۲۴] با آزمایش روی مغزه نشان دادند با تزریق رامنولیپید، افزایش برداشت نفت در حدود ۱۶/۶ ٪ می‌شود. با توجه به این موردهای موفقیت آمیز و همچنین منابع نفتی فراوان کشور ما، به نظر می‌رسد پژوهش در زمینه تولید بیوسورفکتنت‌ها و تزریق آنها به مخازن یک نیاز است. در همین راستا، هدف از این پژوهش بررسی تولید رامنولیپید توسط گونه *Pseudomonas aeruginoas* NP2 جدا شده از مناطق آلوده نفتی ایران، به عنوان یک مدل بومی به‌منظور ازدیاد برداشت نفت می‌باشد.

بخش تجربی

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

محیط کشت و اجزای آن

پیش کشت

از محیط LB[۱۰] (شامل Yeast extract، تریپتون و NaCl به ترتیب ۵ ، ۱۰ و۱۰ گرم در لیتر) به عنوان پیش کشت برای تولید رامنولیپید استفاده شد.

ترکیب محیط کشت تولید رامنولیپید

برای تهیه محیط کشت [۲۵] ابتدا محلول A(g/L) شامل ۰/۰۵، $MgSO_4.7H_2O$؛ ۰/۱، KCl؛ ۱/۵، $NaNO_3$ و محلول B(g/L) شامل روغن آفتاب گردان (g/L)۲۵۰ و محلول C(g/L) شامل ۱۱، $NaH_2PO_4.2H_2O$؛ ۲۳، $Na_2HPO_4.2H_2O$ به‌صورت جداگانه اتوکلاو شدند و سپس محلول D(g/L) شامل ۲، Na-Citrat.$2H_2O$؛ ۰/۲۸، $FeCl_3.6H_2O$؛ ۱/۴، $ZnSO_4.6H_2O$؛ ۱/۲، $CoCl_2.5H_2O$؛ ۱/۲، $CuSO_4.5H_2O$؛ ۰/۸، $MnSO_4.H_2O$ به خاطر حساسیت به گرما با صافی ۰/۲۲ میکرونی استریل شد. در شرایط استریل محلول‌های A و C به نسبت مساوی با حجم‌های ۵۰mL با هم مخلوط شده و بعد از افزودن ۲۵g روغن آفتاب گردان به آن، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول D به آن افزوده می‌شد.

دستگاه کشش سطحی

کشش‌سطحی نمونه‌ها توسط دستگاه تنسیومتر (kruss k10T) به روش Du Nouy Ring Method اندازه‌گیری شد.

(۱) Rhamnolipid
(۲) Microbial enhanced oil recovery
(۳) Syldtak
(۴) Kappeli et al.
(۵) Hurrey et al.
(۶) Ditrich
(۷) Demin et al.
(۸) Daqing
(۹) Daoshan et al.
(۱۰) LB-Medium

جدول ۱ـ پارامترهای فیزیکی مغزه.

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

مغزه

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

دستگاه سیلاب‌زنی مغزه[۱]

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

آزمایش تولید رامنولیپید

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

تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل[۲] (CMC)

مقدار CMC به حلالیت سورفکتنت در فاز آبی بستگی داشته و به‌عنوان‌معیاری برای ارزیابی کارایی یک سورفکتنت استفاده می‌شود. غلظت بحرانی تشکیل میسل‌ها به غلظتی از سورفکتنت گفته می‌شود که در بالاتر از این مقدار میسل‌ها به طور مرتب تشکیل می‌شوند. در این غلظت سطح بین دو مایع به طور کامل با سورفکتنت پر شده و هچ فضایی بین دو مایع باقی نمی‌ماند. با افزایش میزان سورفکتنت میزان میسل تشکیل شده بیشتر می‌شود. قبل از رسیدن به میزان CMC کاهش کشش سطحی به مقدار زیادی با غلظت سورفکتنت افزایش می‌یابد. بعد از رسیدن به CMC کاهش کشش سطحی دیگر دیده نمی‌شود. هرچه این غلظت کمتر باشد آن بیوسورفکتنت کاراتر است. برای تعیین CMC کشش سطحی سوپرناتانت در غلظت‌های گوناگون اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری غلظت روغن آفتاب‌گردان

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

اندازه گیری زیست توده

به منظور جداسازی باکتری‌ها، کشت باکتری در دستگاه سانتریفوژ Multifuge1S-R,Heraeus درون لوله‌های ویژه‌ی از قبل وزن شده در g ×۱۲۰۸۶ و °C۴ سانتریفوژ شد. سوپرناتانت برای انجام کلیه آزمایش‌ها به منظور بررسی میزان تولید بیوسورفکتنت مورد استفاده قرار گرفت. رسوب باقیمانده یا زیست توده پس از سانتریفوژ، ۲ بار با آب نمک ۰/۹ ٪ شستشو داده شد. پس از آن زیست توده به مدت ۲۴ ساعت در گرما °C ۱۰۰ خشک و سپس توزین شد [۲۵].

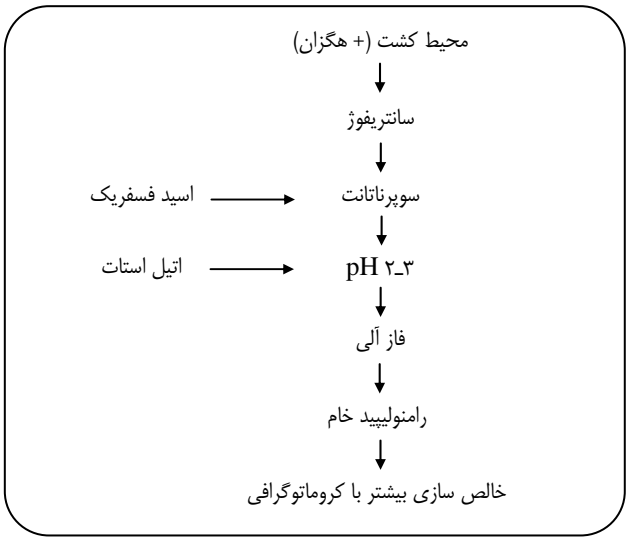
استخراج و خالص سازی رامنولیپید

به mL ۱ از نمونه گرفته شده محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر (H_3PO_4) و mL ۱/۲۵ اتیل استات اضافه می‌شد [۲۵، ۱۸، ۱۶، ۱۵]. مدت ۳۰ دقیقه در g ×۱۲۰۸۶ در °C۴ سانتریفیوژ شده و سپس فاز آلی آن جدا شد. برای اطمینان بیشتر از جداسازی، یک بار دیگر فاز آبی با mL ۱/۲۵ اتیل استات استخراج شد. بعد از تبخیر اتیل استات در دمای ۵۰ و rpm ۲۰۰۰ درون یک تبخیر کننده، رامنولیپید زرد رنگ ظاهر شد. خالص سازی بیشتر با استفاده از TLC[۳] یا کروماتوگرافی لایه نازک (5% 60 F254 plates) صورت گرفت. در این روش فاز متحرک شامل کلروفرم: متانول:استیک اسید (۲:۱۵:۶۵) بود که این فاز متحرک باعث جدایی ۴ نوع رامنولیپید می‌شد. بعد از این مرحله کاغذ

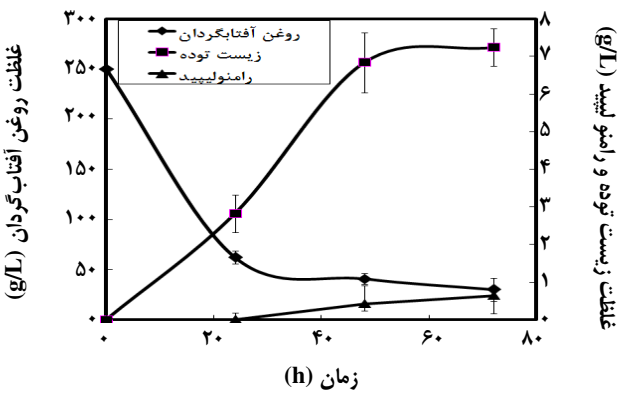
(۱) Core flooding system

(۲) Critical micelle concentration

(۳) Thin layer chromatography



شکل ۱ـ مراحل و روند استخراج رامنولیپید.



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

درون محلول سولفوریک اسید:اسیتیک اسید (۵۰:۱) آغشته شده و بعد از خشک شدن از آن عکس گرفته می‌شد. از استاندارد جنیل[۱] (United States, Saukkville) به عنوان شاهد استفاده شد [۲۵]. استاندارد جنیل شامل رامنولیپیدهای ۱و۲و۳و۴ می‌باشد که توسط *P. aeruginosa* تولید می‌شود. شکل ۱ مراحل و روند استخراج رامنولیپید را نشان می‌دهد. برای تعیین غلظت رامنولیپید از دستگاه HPLC[۲] (Agilent 1100 Series) استفاده شد. ستون استفاده شده در دستگاه C18 با قطر ۵ میکرومتر و شدت جریان تزریق ۰/۸ mL/min بود. درصورتی که از روغن آفتاب‌گردان برای منبع کربنی استفاده شود ابتدا باید به‌وسیله هگزان روغن باقی مانده در محیط کشت را جدا نموده و اندازه‌گیری نمود.

اندازه‌گیری غلظت رامنولیپید

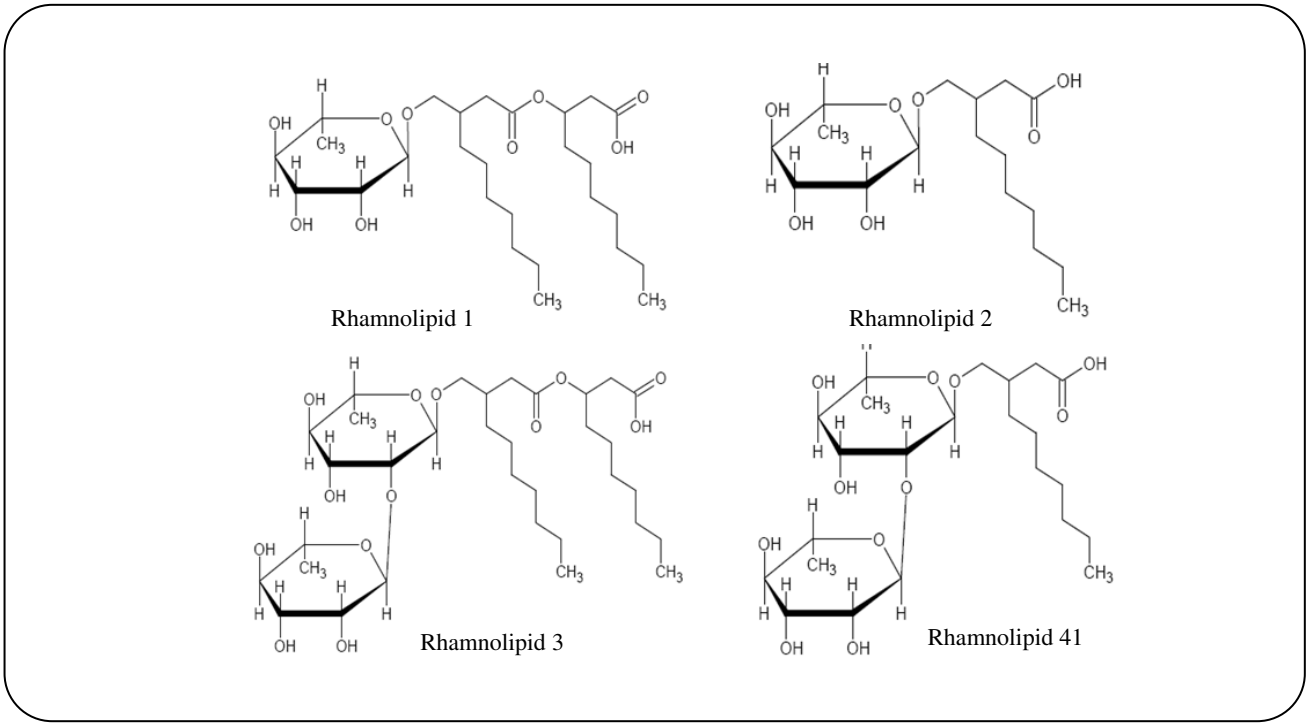
پس از استخراج رامنولیپید نیاز به اندازه گیری غلظت آن به وسیله دستگاه HPLC است. ابتدا باید دستگاه HPLC را برای تعیین غلظت رامنولیپید آماده نمود. برای این منظور ابتدا به آماده کردن محلول A (۴۰ میلی مولار ۴ ـ بروم فناکیل برمید در استونیتریل)[۳] و محلول B (۲۰ میلی مولار ۳ ـ اتیل آمونیوم در استونیتریل)[۴] و محلول C (مخلوط نمودن محلول A و B به نسبت مساوی) پرداخته شد. سپس به نمونه‌های رامنولیپید که از قبل استخراج و در ۳۶۰ میکرولیتر استونیتریل حل شده‌اند، ۴۰ میکرولیتر از محلول C اضافه می‌شد. همچنین از محلول ٪۹۵ آب مقطر و ٪۵ متانول به عنوان فاز متحرک در دستگاه استفاده می‌شد. از آنجایی که رامنولیپید۱ و رامنولیپید ۳ برای کالیبراسیون دستگاه HPLC نیاز است، جداسازی این دو ماده از همدیگر با دستگاه MPLC[۵] (BUCHI Control Unit C-620) صورت گرفت. ۵ mL از رامنولیپید به‌دست آمده از مرحله استخراج با اتیل استات درون دستگاه تزریق شد [۱۸،۲۵]. فاز متحرک به صورت پله‌ای یا با فاصله به ستون جداسازی (Lot-91108-10030-30) تزریق شد. محلول‌های خروجی در ظرف‌های شیشه‌ای (درون هرکدام به اندازه ۲۰ mL) برای تجزیه جمع‌آوری شد. برای این آزمایش ابتدا با ٪ ۱۰۰ کلروفرم به مدت ۵ دقیقه سپس با کلروفرم و متانول (۶۰ به ۴۰) به مدت ۴۵ دقیقه و در انتها ٪۱۰۰ متانول به مدت ۱۰ دقیقه تزریق‌ها انجام شد.

نتیجه‌ها و بحث

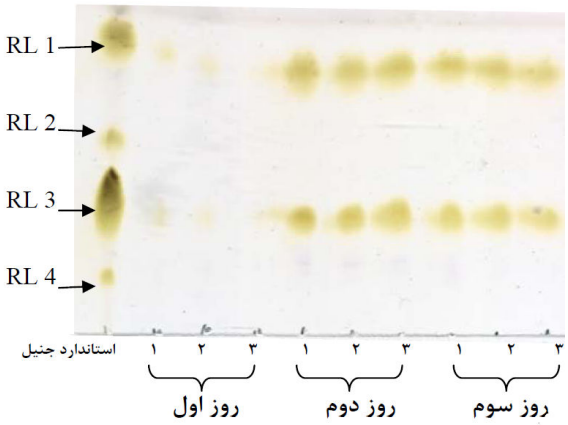
بررسی رشد باکتری Pseudomonas aeruginoas NP2 با منبع کربن روغن آفتاب گردان

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

(۱) Jenil
(۲) High performance liquid chromatography
(۳) 4-Bromphenacylbromid(C6H6Br2O) in acetonitril
(۴) Triethylammonium (C5H15N) in acetonitril
(۵) Medim performance liquid chromatography



شکل ۳ـ ساختمان چهار نوع رامنولیپید گوناگون تولید شده توسط باکتری *سودوموناس آرجینوزا* [۶].



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

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

تأیید تولید رامنولیپید به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

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

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

(۱) Müller et al.

(۲) Hörmann et al.

اندازه‌گیری غلظت و بررسی تولید رامنولیپید به‌وسیله HPLC

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

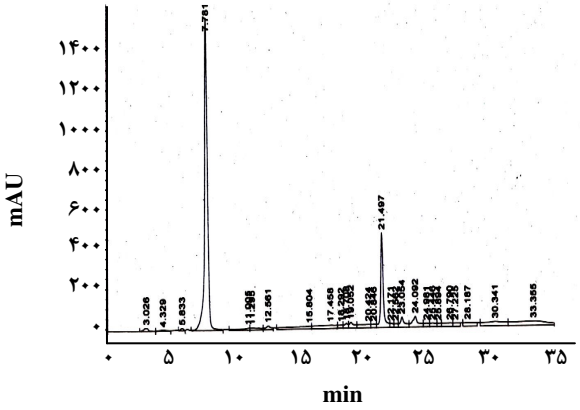
جداسازی رامنولیپید ۱و۳ از یکدیگر با دستگاه MPLC

از آنجایی که رامنولیپید نوع ۱ و رامنولیپید نوع ۳ برای کالیبراسیون دستگاه HPLC نیاز است جداسازی این دو ماده از یکدیگر با دستگاه MPLC صورت گرفت. ۵ mL از رامنولیپید به دست آمده از مرحله استخراج با اتیل استات و سپس فاز متحرک به صورت گرادیانی به دستگاه تزریق شد. همچنین برای اثبات جداسازی از روش کار با TLC استفاده شد. نتیجه‌ها در شکل ۸ نمایش داده شده است. همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود رامنولیپید ۱و۳ به طور کامل از هم جدا شده است. برای جمع آوری رامنولیپید ۱ ظروف شیشه ای شماره ۳۷ تا ۴۷ و همچنین برای به دست آوردن رامنولیپید ۳ ظرف‌های شیشه‌ای شماره ۱۰۰ تا ۵۹ با هم مخلوط شدند. پس از تبخیر حلال رامنولیپید ۱و۳ به صورت خالص به دست آمد.

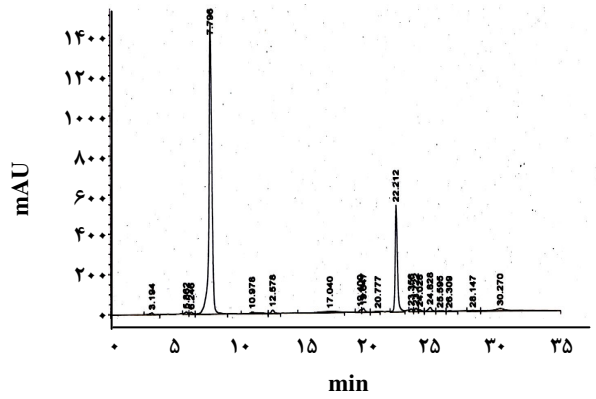
همچنین برای اطمینان از جداسازی، دوباره از دو محلول به دست آمده آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد. نتیجه‌ها در شکل ۹ نشان داده شده است. این شکل بیانگر موفقیت‌آمیز بودن عمل جداسازی می‌باشد.

نتیجه‌های آزمایش کشش سطحی و بین سطحی

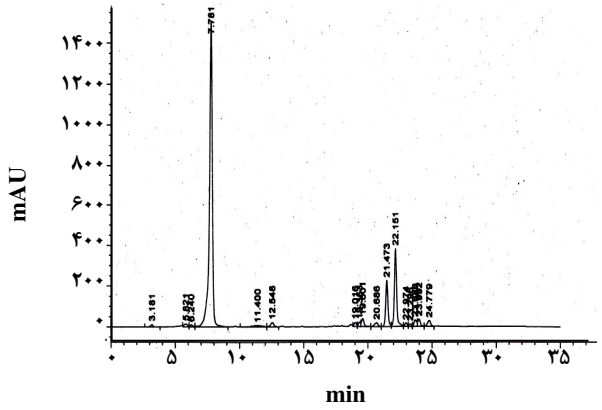
نتیجه‌ها نشان می دهد برای بیوسورفکتنت خالص به‌دست آمده در این پژوهش، کمترین مقدار غلظت بیوسورفکتنت که بعد از آن دیگر کشش سطحی و بین سطحی تغییر نمی‌کند، برابر ۱۲۰mg/L می‌باشد یا به عبارت دیگر کشش سطحی از ۶۸ mN/m به ۲۶ mN/m و بین سطحی از ۳۸ mN/m به ۲ mN/m در غلظت CMC می‌رسد. شکل ۱۰ روند کاهش کشش سطحی و بین سطحی رامنولیپید تولید شده را نشان می‌دهد. از آنجایی که کاهش کشش سطحی و بین سطحی یکی از عامل‌های بسیار مهم



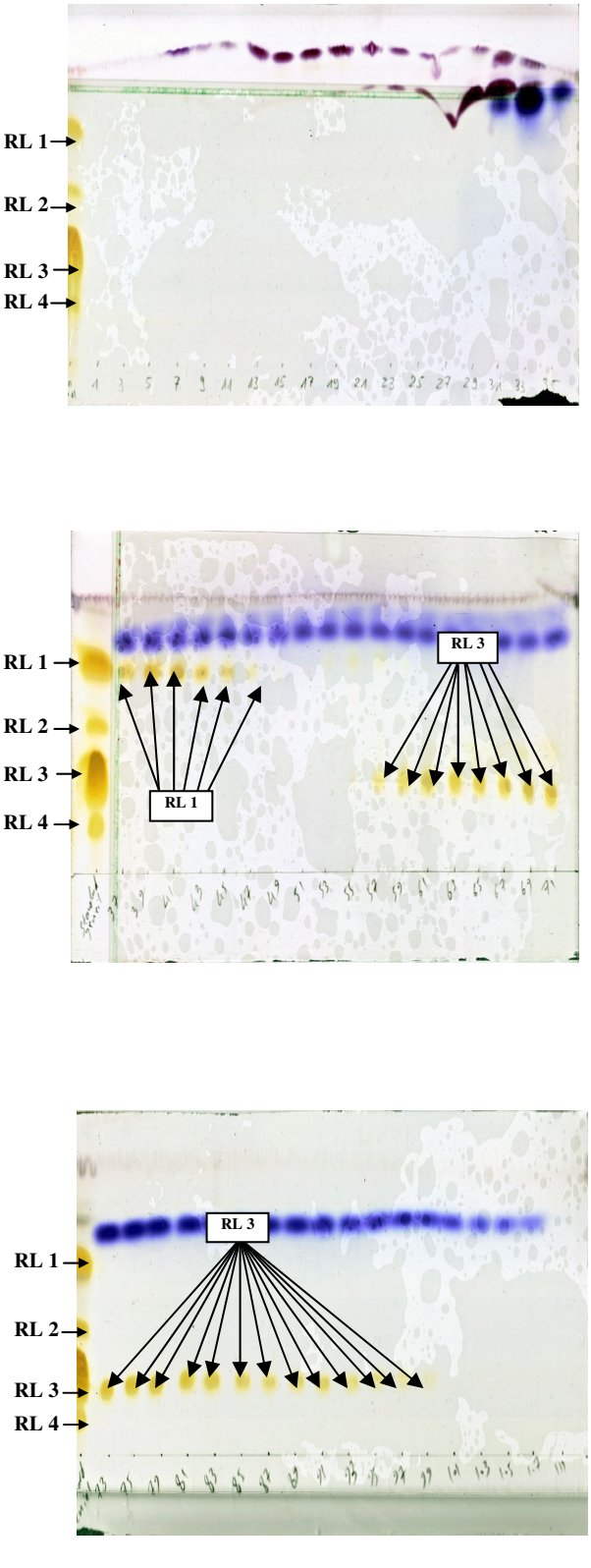
شکل ۵ ـ نمونه‌ای از نتیجه‌های دستگاه HPLC در مورد تزریق رامنولیپید ۳ به تنهایی.



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



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



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

در فرایند ازدیاد برداشت نفت می‌باشد، نتیجه‌های به‌دست آمده از این آزمایش نشان دهنده کارا بودن رامنولیپید تولید شده در این پژوهش در کاهش کشش سطحی و بین سطحی است. سویه‌های مولد رامنولیپید که توسط پژوهشگران دیگر جداسازی شده اند توانسته بودند کشش سطحی محیط رشد را از ۶۹ mN/m تا ۲۵-۳۰ mN/m کاهش دهند [۱۸و۱۶و۱۵]. بنابراین نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش قابل مقایسه با نتیجه‌های پژوهش‌های قبلی می‌باشد.

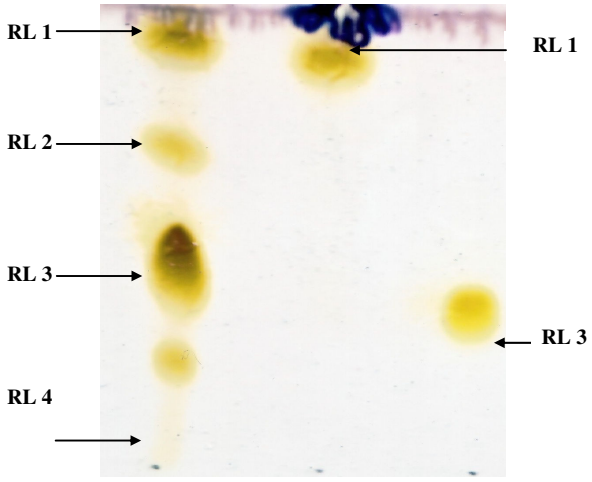
بررسی آزمایش ازدیاد برداشت نفت در مغزه

این آزمایش‌ها شامل بررسی اثر رامنولیپید در غلظت CMC یعنی در ۱۲۰ mg/L، بر روی ازدیاد برداشت نفت می‌باشد که در ابتدا سیلاب‌زنی با آب وسپس با محلول رامنولیپید تولید شده می‌باشد. در تمام آزمایش‌ها مدل به صورت افقی قرار گرفت. بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با آب و بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با محلول بیوسورفکتنت در این آزمایش‌ها بررسی، اندازه گیری و تحلیل شدند. برای انجام آزمایش‌های سیلاب‌زنی مغزه، ابتدا مغزه با آب اشباع شد و در مرحله بعد، تخلیه با نفت خام تا رسیدن به هنگامی که هیچگونه آبی بیرون نیاید ادامه یافت. سپس آزمایش سیلاب‌زنی با آب نمک ۱٪ و سپس سیلاب‌زنی با محلول رامنولیپید تا بازیافت نهایی نفت انجام شد. دلیل استفاده از نفت خام و آب نمک، نزدیکی به ویژگی‌های سیال‌های واقعی مخزن می‌باشد. در همه آزمایش‌ها، شدت جریان ۱۰ میلی لیتر در ساعت بود. در تمام آزمایش‌های سیلاب‌زنی مغزه پس از مرحله تخلیه اشباع آب همزاد ۲۸٪ و در نتیجه اشباع نفت اولیه ۷۲٪ به‌دست آمد. بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با آب، ۶۱٫۸٪ به‌دست آمد. سپس سیلاب‌زنی با محلول‌های بیوسورفکتنت انجام شد. در این آزمایش بازیافت نهایی سیلاب‌زنی با رامنولیپید، ۶۸٫۵۶ ٪ به‌دست آمد یا به عبارت دیگر سرانجام ۶٫۷۶ ٪ برای رامنولیپید ازدیاد برداشت ثالثیه نفت به‌دست آمد. نتیجه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

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

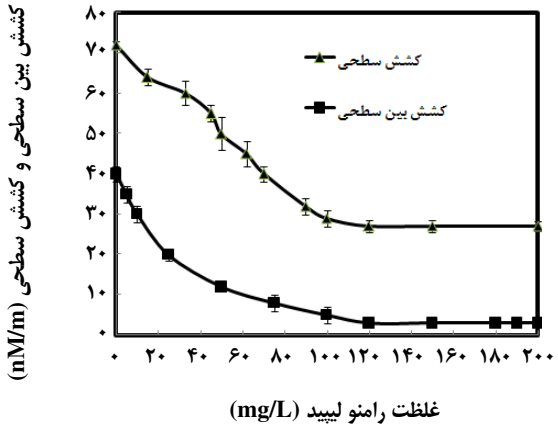
جدول ۲ـ تاثیر سیلاب‌زنی با آب و بیوسورفکتنت روی ازدیاد برداشت نفت.

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



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

شکل ۹ـ اثبات جداسازی رامنولیپید ۱و۳ از دو نمونه مخلوط شده (شماره ۳۷ تا ۴۷ و شماره ۱۰۰ تا ۵۹) در ظروف شیشه‌ای با استفاده از TLC.



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

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

نتیجه‌گیری

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

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

این نتیجه‌ها با نتیجه‌های پژوهشگران دیگر سازگاری دارد. بیشترین میزان رامنولیپید تولید شده در محیط روغن آفتاب گردان برابر ۰٫۸ g/L در راکتور زیستی به دست آمد. البته برای افزایش تولید می‌توان از راکتورهای زیستی بزرگتر استفاده نمود. برای اثبات تولید رامنولیپید، آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک همراه با شاهد و استاندارد انجام شد. همچنین برای اثبات و بررسی بیشتر تولید این ماده در دستگاه HPLC با توجه به زمان خروجی پیک‌ها و مقایسه پیک‌ها با پیک‌های استاندارد جنیل، تولید رامنولیپید ۱و ۳ اثبات شد. جداسازی رامنولیپید نوع ۱ و رامنولیپید نوع ۳ از همدیگر با دستگاه MPLC صورت گرفت. نتیجه‌های TLC نشان داد رامنولیپیدهای ۱و۳ به طور کامل از هم جدا شده است که از این موضوع می‌توان در صنایع دارویی استفاده نمود. آزمایش‌های ازدیاد برداشت نفت نشان داد رامنولیپید تولیدی این پژوهش باعث ۶٫۷۶ ٪ ازدیاد برداشت نفت می‌شود. این افزایش برداشت نفت می‌تواند ناشی از تاثیر رامنولیپید تولید شده روی کشش بین سطحی باشد. به هر حال در پایان باید به این نکته توجه داشت که فناوری استخراج نفت و کاربرد بیوسورفکتنت‌ها در صنایع و به ویژه صنعت نفت، نه تنها فناوری امروز بلکه نیاز فرداست. کشور ما نیز می‌تواند با دست یابی به فناوری استخراج و کاربرد بیوسورفکتنت‌ها، یکی از مدعیان اصلی این صنعت در دنیا بوده و از این راه درآمدهای ارزی زیادی به‌دست آورد.

قدردانی

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۳۰

مراجع

[1] Sen R., Biotechnology in Petroleum Recovery: The Microbial EOR, *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**, p. 714 (2008).

[2] Carrillo P.G., Mardaraz C., Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M., Isolation and Selection of Biosurfactant-Producing Bacteria, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2**, p.82 (1996).

[3] Sim L.,Ward O., Li Z.Y., Production and Characterization of a Biosurfactant Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **19**, p. 232 (1997).

[4] Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Haditirto S., Isolation of Biosurfactant Pproducing Bacteria, Product Characterization and Evaluation, *Biotechnology*, **2**, p. 315(1991).

[5] Rashedi H.R., Mazaheri Assadi M., Jamshidi E., Bonakdarpour B., Optimization of the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* HR Isolated from An Iranian Southern Oil Well, *Iran. Chem. Chem. Eng.,* **25** (1), p. 25 (2006).

[۶] رمضانی ر.، مظاهری اسدی م.، آذین م.، تولید رامنولیپید توسط باکتری *سودوموناس ائروجینوزا* از ملاس چغندر قند تیمار شده، *نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم*، (۳) **۹**، ص. ۵۲۴ (۱۳۹۰).

[۷] ربیعی ف.، مظاهری اسدی م.، آذین م.، تولید رامنولیپید با *سودوموناس آئروجینوزا* در محیط کشت حاوی آب پنیر تیمار شده، *نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم*، (۴) **۸**، ص. ۳۰۳ (۱۳۸۷).

[8] Singh A., Hamme J.D., Ward O.P., Surfactants in Microbiology and Biotechnology: Part 2. Application Aspects, *Biotechnology Advances*, **25**, p. 99 (2007).

[9] Desai J. D, Banat I. M., Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *Microbio. Mol. Biol*., **61**, p. 47 (1997).

[10] Paolo C., Paola C., Method of Producing Surfactin with the Use of Mutant of *Bacillus subtilis*, *USP 5,227,29*4, (1993).

[11] Joshi S., BharuchaC., Jha S., Yadav S., Nerurka A., Desai A.J., Biosurfactant Production Using Molasses and Whey under Thermophilic Conditions, *Bioresource Technology*, **99**, p. 195 (2008).

[۱۲] راشدی ح.، جمشیدی ا.، مظاهری اسدی م.، بنکدار پور ب.، بررسی تولید رامنولیپید توسط میکروارگانیسم *سودوموناس آرجینوزا* جدا شده از مخازن نفتی، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، (۱) **۲۵**، ص. ۱۷ (۱۳۸۵).

[۱۳] امینی ف.، صمدی ن.، هرانده م.، نقدی م.، شریفان ان.، بررسی شرایط تولید رامنولیپید حاصل از سویه‌های مختلف *سودوموناس آرجینوزا*، *نشریه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، **۱**، ص. ۳۳ (۱۳۸۸).

[14] Liu C., Tang Y., Shuler P.J., Engineering Rhamnolipid Biosurfactants as Agents for Microbial Enhanced Oil Recovery, *SPE* , No: 106048 (2007).

[15] Müller M.M., Hörmann B., Syldatk C., Hausmann R., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a Model for Rhamnolipid Production in Bioreactor Systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **87**, p. 167 (2010).

[16] Hörmann B., Müller M.M., Syldatk C., Hausmann R., Rhamnolipid Production by *Burkholderia Plantarii* DSM 9509, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.,* **112** , p. 674 (2010).

[17] Banat I.M., Sarnarah N., Biosurfactant Production and Use in Oil Tank, Clean- Up, *world J. Microbial. Biotechnol*., **7**, p.80 (1991).

[۱۸] امانی ح.، بررسی فرایند ازدیاد برداشت میکروبی نفت با بیوسورفکتنت ها، پایان نامه دکتری، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، (۱۳۸۹).

[19] Syldatk C., Lang S., Wagner F., Wray V., Witte L., Chemical and Physical Characterization of Four Interfacial-Active Rhamnolipids from *Pseudomonas* Spec. DSM 2874 Grown on n-Alkanes, *Z Naturforsch*, **40** , p.51 (1985).

[20] Kaeppeli O., Wuremlos L., Zurich S.D., Production of Rhanmolipids, *USP 4628030,* (1986).

[21] Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F., Surfactant-Enhanced Remediation of Contaminated Soil, *Engineering Geology*, **60**, p.371 (2001).

[22] Ditrich F.L., Brown F.G., Zhou Z.H., Microbial EOR Technology Advancement: Case Studies of Successful Projects, *SPE*, No: 36746, (1996).

[23] Demin W., Jiecheng C., Qun L., Lizhong L., Changjiu Z., Jichun, H., An alkaline Biosurfactant Polymer Flooding Pilots in Daqing Oil Field, *SPE* , No:57304.(1999).

[24] Daoshan L., Shouliang L., Yi L., Demin W., The Effect of Biosurfactant on the Interfacial Tension and Adsorption Loss of Surfactant in ASP Flooding, *Colloids and Surfaces A,* **244** , p. 53 (2004).

[25] Carlo G., Dieter W., Reinhardt R., Johannes M., *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Use in a Process for the Biotechnological Preparation of L-Rhamnose, *USP 5658793*, (1997).