# بررسی پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام به‌روش زیستی با استفاده از بیوسورفکتانت رامنولیپید

**شکوفه ملک محمودی[۱]، حسین امانی[۱*]، سید مرتضی حسینی[۱] و حسن کریمی نژاد[۲]**

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، ایران

۲- گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۴

**چکیده**

امروزه بیوسورفکتانت‌ها به‌دلیل گستره وسیعی از کاربردهایشان بسیار مورد توجه صنایع مختلف قرار گرفته‌اند. در این مقاله تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید از باکتری *Pseudomonas aeruginosa PTCC 1340* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیوسورفکتانت‌ها با استفاده از منبع کربن روغن آفتاب‌گردان برای پاک‌سازی خاک آلوده نفتی مورد بررسی قرار گرفت. برای این هدف، نمونه خاک توسط نفت خام با API=۳۳ به‌صورت مصنوعی آلوده گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که حداکثر میزان تولید رامنولیپید ۴/۳ g/l است. ساختار رامنولیپید توسط آنالیزهای TLC و FTIR مورد بررسی و تایید قرار گرفت. بررسی خواص و ویژگی‌های رامنولیپید تولید شده نشان داد که این مواد دارای پتانسیل بالایی در کاهش کشش‌سطحی بیوسورفکتانت است، به‌طوری‌که توانست کشش‌سطحی آب را از ۶۹ به ۲۶/۸ mN/m کاهش دهد. همچنین این ماده در اختلاط با NaCl تا غلظت ۱۵٪ پایداری مطلوبی را از خود نشان داد. نتایج نهایی نشان داد که بیوسورفکتانت تولیدی می‌تواند ۷۵/۱۷٪ از نفت خام موجود در خاک را حذف کند، درحالی‌که بیشترین بازده حذف نفت خام از خاک توسط سورفکتانت شیمیایی SDS ۷۶/۹۲٪ به‌دست آمد. با توجه به موفقیت‌آمیز بودن نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان بیوسورفکتانت رامنولیپید تولید شده را به‌عنوان جایگزین سورفکتانت‌های شیمیایی در صنایع مختلف پیشنهاد داد.

**کلمات کلیدی: بیوسورفکتانت، نفت خام، رامنولیپید، پاک‌سازی زیستی، کشش‌سطحی**

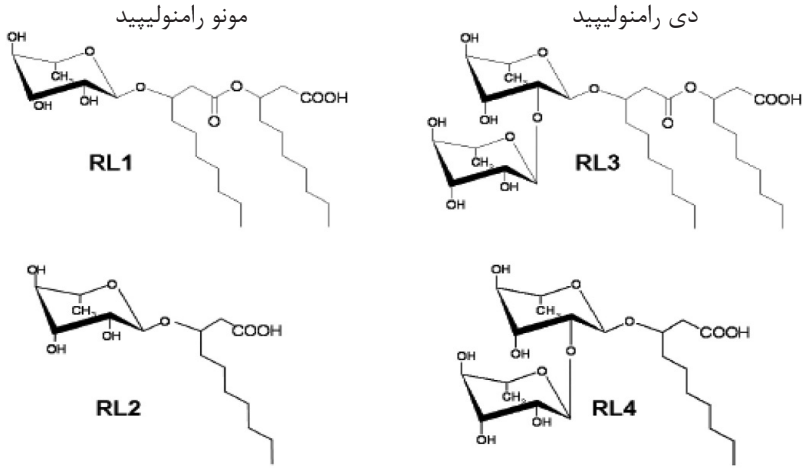
## مقدمه

یکی از مشکلات محیط زیست ریزش نفت خام به‌دلیل نشتی مخازن، برخورد کانتینرها و نشتی لوله‌های انتقال در خاک و آب است. این موضوع باعث مشکلات عدیده‌ای برای انسان‌ها و محیط زیست شده است. سورفکتانت‌های شیمیایی با توجه به کاربردهای وسیع در صنایع نوین امروزی، به منظور پاک‌سازی محیط زیست از نفت خام نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیوسورفکتانت‌ها، ترکیبات فعال سطحی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌هایی مثل باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها هستند [۱].

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی: hamani@nit.ac.ir
شناسه دیجیتال: (DOI: 10.22078/pr.2018.3356.2541)

امروزه تولید و مصرف این مواد بیولوژیک به‌دلیل سازگاری زیستی به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است [۲]. این مواد به‌طور گسترده در صنعت کشاورزی، آرایشی و بهداشتی، غذا، داروسازی، نفتی و زیست‌محیطی استفاده می‌شوند [۳]. مهم‌ترین ویژگی بیوسورفکتانت‌ها نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی سمیت پایین، زیست تخریب‌پذیری، فعالیت سطحی بالا، عملکرد بهتر در شرایط سخت (pH بالا، محیط‌های نمکی و دماهای بالا)، غلظت بحرانی میسل[1] (CMC) پایین، در دسترس بودن مواد اولیه جهت تولید و کنترل آلودگی‌های زیست محیطی است [۴]. بیوسورفکتانت‌های تولیدی از باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، رامنولیپیدها[2] نام دارند. رامنولیپیدها، گلیکولیپیدهای آنیونی شامل L- رامنوز و اسید چرب β- هیدروکسی هستند که بخش آبدوست رامنوز به‌وسیله اتصال گلیکوزیدی به دنباله اسید چرب لیپیدی متصل است. رامنولیپیدها به‌صورت ترکیبی از انواع مختلف تولید می‌شوند. رامنولیپیدهای اصلی باکتری *P.aeruginosa* رامنولیپید نوع۱ *(RL1, L-rhamno-syl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate)* و رامنولیپید نوع ۳ *(RL3,L-rhamnosyl-L-rhamno-syl-3-hydroxydecanoyl 3-hydroxydecanoate)* است.

RL1 یک مونو رامنولیپید با یک واحد رامنوز است درحالی‌که RL3 شامل دو واحد رامنوز و به‌عنوان دی رامنولیپید شناخته می‌شود. علاوه‌بر این RL2 و RL4 توسط باکتری *P.aeruginosa* در مقادیر بسیار کم تولید می‌شود. این رامنولیپیدها تنها شامل یک *hydroxy-fatty acidβ* هستند [۵]. شکل ۱ ساختار ۴ نوع رامنولیپید تولید شده را نشان می‌دهد. بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی تولید شده توسط *P.aeruginosa* اولین بار مورد توجه قرار گرفتند [۶]. گوارا سانتوس و همکاران بیوسورفکتانت رامنولیپید را از باکتری *P.aeruginosa* در محیط کشت پیوسته با منبع کربنی گلوکز به‌دست آوردند. کم‌ترین مقدار کشش‌سطحی و بین سطحی به‌ترتیب ۲۹ mN/m و ۰/۲۵ mN/m بود [۷]. رودریگز و همکاران با استفاده از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس[3] که یک باکتری پروبیوتیک است، بیوسورفکتانت تولید کردند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از ملاس چغندر قند به‌عنوان منبع کربن باکتری، بازده تولید را به‌میزان ۱/۵ برابر افزایش می‌دهد و باعث کاهش ۷۰ الی ۸۰٪ در هزینه تولید می‌شود [۲].




**شکل ۱** ساختار ۴ نوع رامنولیپید (RL1-4) تولید شده توسط *P.aeruginosa* [۱]

1. Critical Micelle Concentration
2. Rhamnolipid
3. Lactococcus Lactis

البحری و همکاران با استفاده از باکتری باسیلوس سابتیلیس۱ و منبع کربن ضایعات خرما توانستند هزینه تولید بیوسورفکتانت را تا حدی کاهش دهند و بیشترین بازده تولید g/L ۳ بود [۸]. غلظت بحرانی میسل (CMC) به غلظتی از بیوسورفکتانت گفته می‌شود که در آن مونومرهای تشکیل شده به شکل توده‌های بزرگی با هسته آبگریز و سطح خارجی آبدوست در می‌آیند و میسل‌ها را تشکیل می‌دهند [۹]. عملکرد بیوسورفکتانت‌ها در محلول‌های آبی بر دو مکانیزم استوار است، در غلظت کمتر از CMC پدیده تحرک و در غلظت‌های بالای CMC پدیده حلالیت رخ می‌دهد [۱۰]. مونومرها در سطوح مشترک تجمع پیدا می‌کنند و به‌عبارتی ترشوندگی سیستم را افزایش می‌دهند، از این‌رو با ایجاد آشفتگی و تلاطم باعث به حرکت درآوردن ذرات چربی یا هیدروکربن می‌شوند. در واقع مواد فعال‌کننده سطحی می‌توانند با توجه به نوع جهت‌گیری آن‌ها نسبت به سطح، ترشوندگی خاک را از نفت- تر به آب- تر ویا بالعکس تغییر دهند. از سوی دیگر با افزایش غلظت بیوسورفکتانت، تعداد میسل‌ها در محلول شست و شو افزایش یافته و قدرت حلالیت بالا می‌رود. به‌عبارتی هر چه غلظت مونومر افزایش یابد، کشش‌سطحی در آب کاهش می‌یابد [۱۱ و ۱۲]. هدف این مقاله بررسی پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام به‌روش زیستی با استفاده از بیوسورفکتانت رامنولیپید از باکتری *P.aeruginosa PTCC 1340* به‌عنوان یک مدل جهت رسیدن به دانش فنی بومی است.

## روش کار

### کشت باکتری

ابتدا باکتری *P.aeruginosa PTCC 1340* از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شده است. از محیط کشت LB [1] به‌عنوان پیش کشت برای تولید رامنولیپید استفاده شد. cc ۱۰۰ از این ماده در یک ارلن cc ۵۰۰ آماده گردید و سپس جهت استریل کردن به‌مدت min ۲۰ و در دمای °C ۱۲۱ درون اتوکلاو قرار داده شد. در نهایت در شرایط استریل یک لوپ از باکتری را از کشت جامد برداشته و به محیط پیش کشت تلقیح شد. محلول حاصل به‌مدت hr ۲۴ در دمای °C ۳۷ و rpm ۱۵۰ در شیکر انکوباتور قرار داده شد. برای تهیه محیط کشت اصلی، ترکیبات مختلف محیط کشت طبق جدول ۱ تهیه شده است. در این تحقیق از روغن آفتاب‌گردان به‌عنوان منبع کربنی استفاده گردید. بدیهی است استفاده از منبع کربن ارزان قیمت و ضایعات از نظر اقتصادی به صرفه و قابل قبول‌تر است، ولی با توجه به اینکه روغن آفتاب‌گردان راحت‌تر توسط باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد از این ماده کربنی استفاده شد [۱۳].

**جدول ۱** ترکیبات محیط کشت اصلی جهت تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید

| محلول ۱ | | محلول ۲ | | محلول ۳ | | محلول ۴ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ترکیب | غلظت (g/l) | ترکیب | غلظت (g/l) | ترکیب | غلظت (g/l) | ترکیب | غلظت (g/l) |
| $MgSO_4.7H_2O$ | ۰/۰۵ | روغن آفتاب‌گردان | ۱۲۰ | $NaH_2PO_4.2H_2O$ | ۲۳ | $C_7H_5NaO_7.2H_2O$ | ۲ |
| KCl | ۰/۱ | – | – | $Na_2HPO_4.2H_2O$ | ۱۱ | $FeCl_3.6H_2O$ | ۰/۲۸ |
| $NaNO_3$ | ۱/۵ | – | – | – | – | $ZnSO_4.6H_2O$ | ۱/۴ |
| – | – | – | – | – | – | $CoCl_2.5H_2O$ | ۱/۲ |
| – | – | – | – | – | – | $CuSO_4.5H_2O$ | ۱/۲ |
| – | – | – | – | – | – | $MnSO_4.H_2O$ | ۰/۸ |

1. Lysogency Broth

در این پژوهش ابتدا محلول‌های ۱، ۲ و ۳ طبق جدول ۱ به‌صورت جداگانه اتوکلاو می‌شوند. محلول ۴ به‌دلیل حساسیت به گرما به‌وسیله فیلتر ۰/۲۲ µm استریل می‌شوند. در شرایط استریل محلول‌های ۱ و ۳ به نسبت‌های مساوی با حجم‌های ۲۵۰ cc با هم مخلوط شده و پس از افزودن روغن اتوکلاو شده، cc ۱ محلول ۴ به آن اضافه می‌شود. محلول شماره ۴ به‌دلیل حساسیت گرمایی با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ µm استریل می‌شود. روش‌های مختلفی برای سترون یا استریل کردن وجود دارد که فیلتراسیون یکی از این روش‌ها است که عمدتا برای مواد بیولوژیک یا موادی که به حرارت حساس هستند مورد استفاده قرار می‌گیرد. در نهایت ۱۰٪ حجمی از محیط پیش کشت در شرایط استریل به محیط کشت اصلی اضافه کرده و به‌مدت ۷۲ hr در دمای ۳۷°C و با سرعت ۱۵۰ rpm درون شیکر انکوباتور (Mehr Tajhiz) قرار داده می‌شود.

**جداسازی و استخراج بیوسورفکتانت رامنولیپید**

پس از نمونه‌گیری از محیط کشت، به نسبت‌های حجمی برابر از محیط کشت اصلی و نرمال هگزان را ترکیب کرده و با سرعت ۴۶۰۰ rpm به‌مدت ۲۰ min سانتریفیوژ (universal 320) می‌شود. فاز آبی جدا شده و به‌ازای ۱ cc از آن ۱۰ µlit $H_3PO_4$ اضافه می‌شود تا به pH حدود ۳-۲ برسد. سپس به نسبت ۱/۲۵ اتیل استات با فاز آبی ترکیب شده و به‌مدت ۲۰ min با سرعت ۴۶۰۰ rpm سانتریفیوژ می‌شود. در نهایت فاز آلی جدا شده و در تبخیرکننده با دمای ۵۰ °C و سرعت ۲۰۰۰ rpm اتیل استات محلول در آن تبخیر می‌شود و مایع زرد رنگ رامنولیپید در ظرف باقی می‌ماند.

**روش اندازه‌گیری زیست توده ( بیومس)**

برای اندازه‌گیری بیومس، ابتدا محیط کشت باکتری درون فالکون‌هایی که از قبل وزن شده‌اند قرار می‌گیرند و با سرعت ۴۶۰۰ rpm به‌مدت ۲۰ min سانتریفیوژ می‌شوند. پس از سانتریفیوژ و تخلیه سوپرناتانت، بیو مس در ته لوله‌ها دو بار با نمک ۰/۹٪ شست‌شو داده می‌شود. پس از آن فلکون‌های حاوی زیست توده در دمای ۱۰۰°C و به‌مدت ۲۴ hr در انکوباتور خشک شده و توزین می‌گردند. در نهایت با اختلاف در وزن‌ها مقدار زیست توده به‌دست می‌آید.

**روش انجام آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)[1]**

برای اثبات تولید رامنولیپید از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا کاغذ TLC (کد۱۰۵۵۵۴ مرک) آماده گردید. سپس با سمپلر ۵ µL چند قطره از بیوسورفکتانت را برداشته و روی کاغذ TLC نقطه‌گذاری می‌شود. در نهایت کاغذ TLC به‌صورت عمود وارد فاز متحرک شامل کلروفرم : متانول: استیک اسید با نسبت حجمی (۲:۱۵:۶۵) قرار داده می‌شود. هنگامی‌که فاز متحرک به انتهای کاغذ TLC رسید، از فاز متحرک خارج شده و درون محلول آشکارساز شامل سولفوریک اسید: استیک اسید با نسبت حجمی (۵۰:۱) قرار داده می‌شوند . پس از ۱۰ min کاغذ را از محلول خارج کرده و بعد از خشک‌شدن در دمای ۱۵۰°C لکه‌های زرد رنگ مربوط به رامنولیپید روی آن ظاهر می‌شوند. برای محاسبه فاکتور تاخیر (Rf)[2] از رابطه ۱ استفاده می‌شود [۸].

$$R_f = \frac{\text{فاصله طی شده توسط ماده مورد نظر}}{\text{فاصله طی شده توسط حلال}} \quad (1)$$

**اندازه‌گیری کشش‌سطحی**

کشش‌سطحی محلول سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت رامنولیپید با غلظت‌های مختلف توسط دستگاه تنسیومتر (ksv sigma 700) اندازه‌گیری شده است.

**روش تعیین ساختار رامنولیپید تولید شده**

برای بررسی ساختار رامنولیپیدهای تولید شده از دستگاه FTIR[3] (TENSOR 27) استفاده گردید.

1. Thin Layer Chromatography
2. Retardation Factor
3. Fourier-transform Infrared Spectroscopy

**تعیین شاخص امولسیون‌سازی نفت خام (E24)**

برای بررسی توانایی امولسیون‌سازی، ابتدا cc ۴ از محلول بیوسورفکتانت تولید شده در غلظت CMC به لوله مدرج حاوی cc ۴ از نفت خام افزوده می‌شود. سپس به‌مدت min ۳ به شدت مخلوط شده و پس از گذشت hr ۲۴، مقدار E24، از تقسیم ناحیه امولسیون شده بر ارتفاع کل دو سیال محاسبه می‌شود. همچنین میزان پایداری حالت تعلیق نیز اندازه‌گیری می‌شود. این پایداری هر چه بیشتر باشد بهتر است. در این تحقیق برای بررسی میزان پایداری مجددا بعد از ۱۵ روز فاکتور E24 اندازه‌گیری شد. برای کنترل آزمایش مخلوط محیط کشت بدون میکروارگانیسم و نفت خام به‌عنوان محلول شاهد اضافه شد.

**روش انجام آزمایش کنارزنی نفت خام[1] از روی آب**

ابتدا cc ۲۵ آب مقطر درون پلیت ریخته می‌شود سپس cc ۲ نفت خام به آن اضافه می‌گردد. پس از min ۲ هنگامی‌که لایه یکنواخت نفت روی آب تشکیل شد min ۰/۵ از محلول سوپرناتانت حاوی رامنولیپید به پلیت افزوده می‌شود. پس از زمان‌های مشخص قدرت کنار زنی بیوسورفکتانت نسبت به ماده شاهد (آب مقطر) بررسی می‌گردد.

**آلودگی مصنوعی خاک**

نمونه خاک انتخاب شده را برای حذف آلودگی و ناخالصی با آب مقطر شستشو داده و درون آون با دمای °C ۸۰ قرار گرفت تا تمام رطوبت آن خارج و خاک کاملا خشک شود. در ۴ بشر مختلف gr ۵ خاک با cc ۱ نفت خام آلوده شد. نفت خام انتخابی از پایانه نفتی دریای شمال با API [2] برابر ۳۳ تهیه گردید. نمونه‌های آلوده شده به‌مدت hr ۲۴ در فضای باز قرار می‌گیرد تا ترکیبات به خوبی جذب خاک شود.

**تهیه محلول شستشو**

شستشوی خاک توسط محلول شستشو صورت می‌گیرد. محلول شستشو شامل آب به‌همراه یک سورفکتانت یا بیوسورفکتانت است. سورفکتانت شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش SDS [3] است که میزان عملکرد آن به‌صورت مجزا در فرآیند پاک‌سازی خاک آلوده نفتی با بیوسورفکتانت رامنولیپید تولیدی مقایسه گردید. برای این منظور سورفکتانت SDS با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۳، ۰/۳۵ و g/L ۰/۵ بوده است. سوپرناتانت رامنولیپید نیز در غلظت‌های مختلف ۰/۲۶۲۵، ۰/۵۲۵، ۱/۰۵ و g/L ۲/۱ تهیه شدند. cc ۱۰ از هر کدام از محلول شست‌شو به نمونه‌های حاوی خاک آلوده شده نفتی اضافه شد. سپس هر کدام به‌مدت hr ۲ روی همزن مغناطیسی قرار گرفته و در نهایت به‌مدت hr ۲۴ در یک جای ساکن قرار می‌گیرد. پس از یک شبانه‌روز، فازهای مختلف از هم تفکیک می‌شوند، به این صورت که فاز نفت روی محلول شستشو و شن و ماسه تمیز شده کف بشر ته نشین می‌شوند.

**آنالیز محلول شستشو**

پس از انجام فرآیند شستشو، محلول شستشوی جدا شده روی شن و ماسه به‌وسیله سرنگ برداشته و به یک بشر دیگر منتقل و روی آن پوشانده شد. سپس cc ۴۰ نرمال هگزان به درون بشر اضافه شد و به‌مدت min ۱۰ روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. محلول شستشو و نرمال هگزان به‌خوبی ترکیب می‌شوند و نرمال هگزان مقدار نفت موجود در محلول شست‌شو را در خود حل می‌کند. پس از min ۱۰، محلول حاصل دوفازی شده و نرمال هگزان حاوی نفت در فاز بالای محلول شستشو قرار می‌گیرد. در نهایت فاز بالا را با سرنگ برداشته و جذب آن را با دستگاه اسپکتروفوتومتر (uv2100 یونیکو آمریکا) در طول موج nm ۲۹۷ اندازه‌گیری شد تا با داشتن منحنی کالیبراسیون، غلظت نفت موجود در محلول شستشو به‌دست آید.

1. Oil Spreading
2. American Petroleum Institute
3. Sodium Dodecyl Sulfate

**آنالیز خاک**

پس از جدا کردن محلول شستشو در مرحله اول فرآیند شستشو، شن و ماسه در ته بشر باقی‌می‌ماند. این بار آنالیز خاک برای بررسی مقدار نفت باقی‌مانده در شن و ماسه صورت می‌گیرد. مشابه آنالیز محلول شستشو، ۴۰ cc نرمال هگزان به خاک تزریق کرده و پس از ۱۰ min قرار گرفتن روی همزن مغناطیسی، نرمال هگزان مقدار نفت باقی‌مانده در شن و ماسه را در خود حل می‌کند و در فاز بالا قرار می‌گیرد سپس فاز بالا را برداشته و در طول موج ۲۹۷ nm جذب آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری می‌شود تا به‌وسیله منحنی کالیبراسیون مقدار نفت موجود در شن و ماسه اندازه‌گیری شود. برای به‌دست آوردن منحنی کالیبراسیون ابتدا غلظت‌های مختلفی از نفت خام در نرمال هگزان تهیه و بعد از آن جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۹۷ nm اندازه‌گیری شد. شکل ۲ نمودار کالیبراسیون نفت خام را در نرمال هگزان نشان می‌دهد.

**محاسبه درصد حذف نفت خام از خاک به‌وسیله سورفکتانت شیمیایی و زیستی**

جذب نمونه‌های حاصل از دو آنالیز محلول شست و شو و آنالیز خاک برای بیوسورفکتانت رامنولیپید و سورفکتانت شیمیایی توسط دستگاه طیف‌سنجی نوری ثبت شد. با داشتن معادله خط منحنی کالیبراسیون غلظت نفت در نمونه‌ها محاسبه می‌شود. برای به‌دست آوردن درصد حذف نفت خام از رابطه ۲ استفاده می‌شود.

$$\text{درصد حذف نفت خام} = \frac{\text{مقدار نفت باقی‌مانده بعد از شستشو} - \text{مقدار نفت اولیه}}{\text{مقدار کل نفت اولیه}} \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

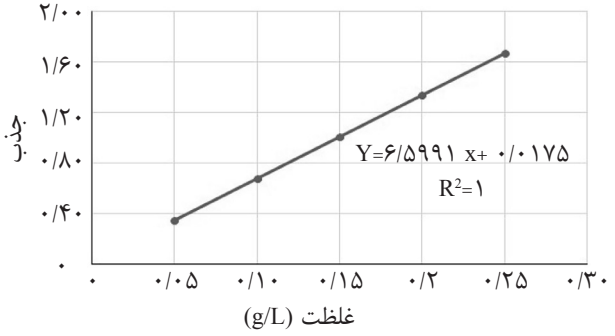
## نتایج و بحث

**بررسی منحنی تولید رامنولیپید**

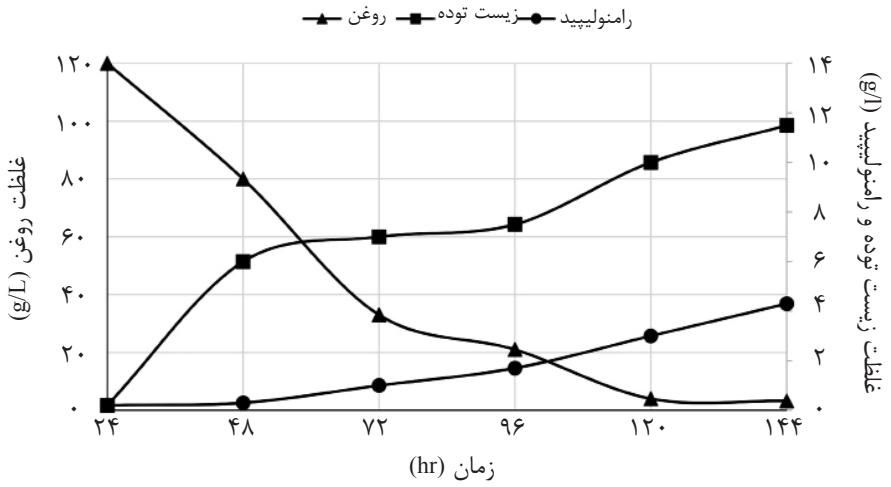
پس از یک هفته از قرارگیری محیط کشت در شیکر انکوباتور و نمونه‌گیری روزانه از آن بیشترین مقدار تولید رامنولیپید و زیست توده به‌ترتیب ۴/۳ و ۱۱/۴۹ g/l به‌دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که روغن آفتاب‌گردان توسط باکتری به‌خوبی مصرف شد و از ۱۲۰ به ۳/۲ g/l رسید. با توجه به شکل ۳، تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید تا ۷۲ hr بسیار ناچیز بوده و پس از ۹۶ hr تولید آن افزایش یافته است. همچنین با توجه به منحنی به‌دست آمده می‌توان گفت تولید رامنولیپید وابسته به رشد باکتری است.

**تایید تولید رامنولیپید با استفاده از آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)**

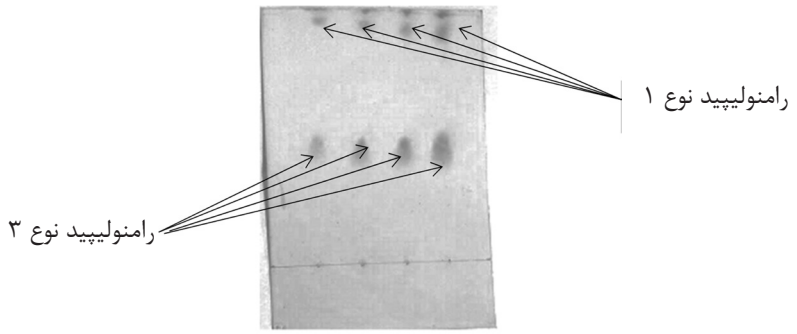
کروماتوگرافی لایه نازک یکی از آنالیزهای شناسایی اجزای یک ترکیب است. در این پژوهش مشاهده گردید که با قرار گرفتن کاغذ TLC در بشر، فاز متحرک شروع به حرکت می‌کند و روی کاغذ نقاط زرد رنگ را به‌جای می‌گذارند. نتایج این آزمایش در شکل ۴ نشان داده شده است. مقدار فاکتورهای تاخیر در این آزمایش ۰/۸۳ و ۰/۳۸ به‌دست آمد.




**شکل ۲** نمودار کالیبراسیون نفت رقیق شده در نرمال هگزان




**شکل ۳** منحنی رشد باکتری




**شکل ۴** آنالیز TLC بیوسورفکتانت رامنولیپید

مقایسه این اعداد با فاکتورهای تاخیر نمونه استاندارد در جدول ۲ نشان می‌دهد که اعداد به‌دست آمده مربوط به رامنولیپیدهای نوع ۱ و ۳ است [۱۴]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که باکتری *P.aeruginosa* توانایی تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید نوع ۱ و ۳ را دارد.

**بررسی تولید رامنولیپید با استفاده ازطیف‌سنجی FTIR**

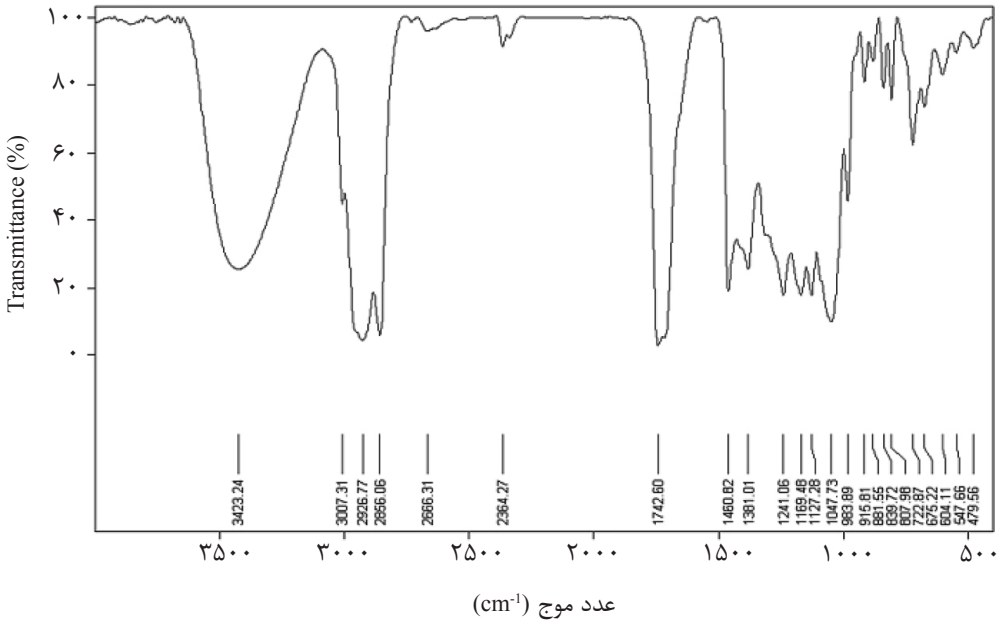
نتایج مربوط به آنالیز FTIR بیوسورفکتانت رامنولیپید در شکل ۵ نشان داده شده است. که جذب‌های موجود در ۲۸۵۶/۰۶ و $cm^{-1}$ ۲۹۲۶/۷۷ مربوط به پیوند C-H به‌ترتیب در $CH_2$ و $CH_3$ است. پیک پهن موجود در $cm^{-1}$ ۳۴۲۳/۲۴ ناشی از پیوند O-H گروه هیدروکسیل و جذب موجود در ۱۷۴۲/۶۰ و $cm^{-1}$ ۱۴۶۰/۸۲ نشان‌دهنده پیوند C=O و C=C است. همچنین پیوندهای مربوط به O-C-O در $cm^{-1}$ ۱۱۲۷/۲۸ جذب نشان داده‌اند. تمامی پیوندها مطابق با ساختار رامنولیپید استاندارد است. با توجه به تایید نتایج TLC و FTIR می‌توان گفت که رامنولیپید در این تحقیق تولید شده است.

**اندازه‌گیری کشش‌سطحی سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت رامنولیپید تولید شده**

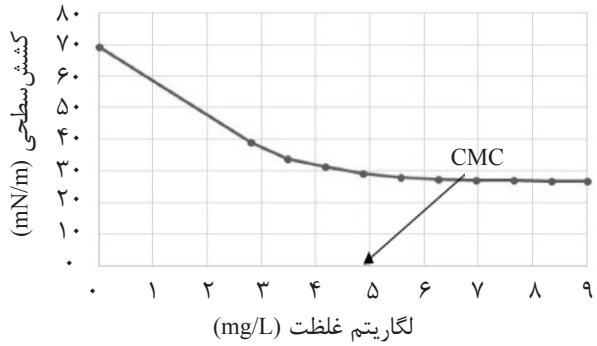
ابتدا غلظت‌های مختلفی از رامنولیپید (سوپرناتانت) تهیه گردید کشش‌سطحی آنها اندازه‌گیری شد. شکل ۶ تاثیر غلظت‌های مختلف رامنولیپید را روی کشش‌سطحی نمایش می‌دهد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که کشش‌سطحی محلول رامنولیپید (سوپرناتانت) از ۶۹ به mN/m ۲۶/۸ می‌رسد. با توجه به نمودار کم‌ترین غلظت بیوسورفکتانت که پس از آن تغییری در کشش‌سطحی مشاهده نشد، mg/L ۵۲۵ (CMC) به‌دست آمد.

**جدول ۲** فاکتور تاخیر برای رامنولیپیدهای مختلف [۱۴]

| نوع رامنولیپید | فاکتور تاخیر ($R_f$) رامنولیپید استاندارد | فاکتور تاخیر ($R_f$) رامنولیپید تولید شده در این تحقیق |
|---|---|---|
| RL1 | ۰/۶۵ | ۰/۸۳ |
| RL2 | ۰/۴۸ | - |
| RL3 | ۰/۳۱ | ۰/۳۸ |
| RL4 | ۰/۱۴ | - |




**شکل ۵** طیف جذبی آنالیز FTIR بیوسورفکتانت رامنولیپید از باکتری *PTCC 1340 P.aeruginosa*




**شکل ۶** نمودار کشش‌سطحی برحسب غلظت محلول سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت رامنولیپید

کاهش کشش‌سطحی محیط رشد، مهم‌ترین مشخصه تولید بیوسورفکتانت است. کشش‌سطحی سویه‌های مولد بیوسورفکتانت که توسط پژوهشگران ارائه شد توانست کشش‌سطحی را از ۷۲ به ۳۰ mN/m کاهش دهد. همچنین در پژوهشی دیگر کشش‌سطحی بیوسورفکتانت رامنولیپید از ۵۳ به ۲۹ mN/m رسید [۱۵]. همچنین تغییرات کشش‌سطحی نسبت به غلظت‌های مختلف نمک NaCl در محلول رامنولیپید بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت‌های NaCl از ۲٪ تا ۱۵٪ وزنی در محلول رامنولیپید، کشش‌سطحی تغییر محسوسی نداشته و همچنان پایداری خود را حفظ می‌کند.

**بررسی قابلیت امولسیون‌کنندگی بیوسورفکتانت تولید شده به‌روش E24**

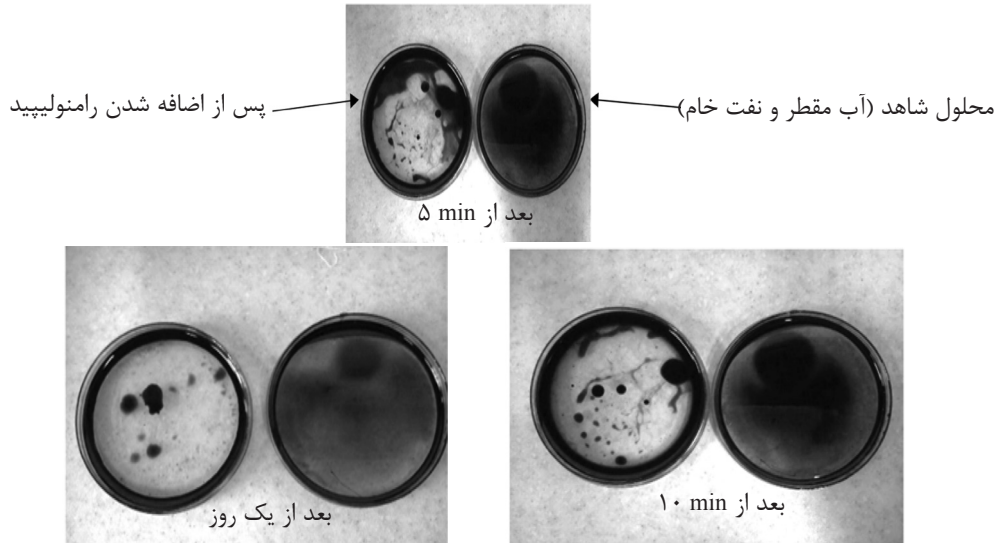
توانایی امولسیون‌کنندگی معیاری برای نشان دادن توانای بیوسورفکتانت در امولسیون‌سازی هیدروکربن‌های مختلف است. در این پروژه امولسیون‌کنندگی در حضور نفت خام که مجموعه‌ای از هیدروکربن‌ها است، بررسی شد. معیار امولسیون‌کنندگی حفظ پایداری در مدت زمان ۲۴ hr پس از تشکیل است. یکی از فاکتورهای بسیار مهم در فرآیندهای صنعتی تعیین میزان پایداری در حالت تعلیق است و این پایداری هر چه بیشتر باشد بهتر است. در این آزمایش، شاخص تعلیق برای رامنولیپید تولیدی پس از ۲۴ hr و همچین ۱۵ روز پس از آن اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سوپرناتانت تولیدی توانایی خوبی برای امولسیون‌سازی نفت خام دارد و پایداری این حالت امولسیون تا ۱۵ روز پس از آزمایش باقی‌می‌ماند. با توجه به نتایج می‌توان پیش‌بینی نمود که این بیوسورفکتانت پتانسیل خوبی برای پاک‌سازی نفت خام دارد. در این آزمایش از دو نمونه محیط کشت و سوپرناتانت باکتری استفاده شده است. با مشاهده و مقایسه آزمایش می‌توان به این نتیجه رسید که سوپرناتانت باکتری با ایجاد ۵۶٪ شاخص امولسیون‌سازی و محیط کشت حاوی باکتری با ۶۲٪ شاخص امولسیون‌سازی، نتیجه خوبی را از خود به نمایش گذاشتند.

**بررسی قدرت کنارزنی نفت خام از روی آب توسط بیوسورفکتانت (Oil Spreading)**

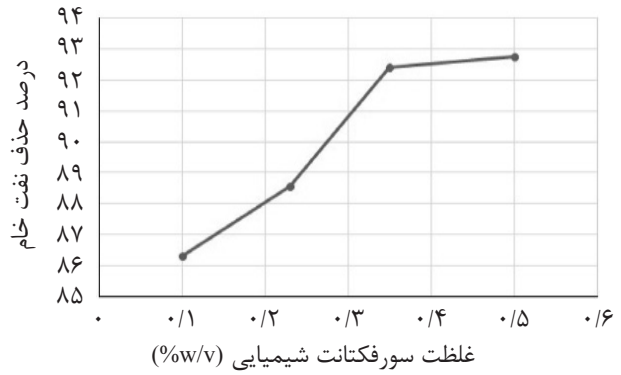
در این آزمایش مشاهده شد که پس از اضافه کردن سوپرناتانت حاوی رامنولیپید، نفت خام شروع به کنار رفتن از روی آب می‌کند. شکل ۷ نتایج را پس از ۵، min ۱۰ و همچنین hr ۲۴ را نشان می‌دهد. بنابراین با توجه به این ویژگی می‌توان گفت رامنولیپید تولید شده دارای توانایی خوبی برای کنار زدن نفت خام از روی آب است که می‌تواند در کاربردهای صنعتی مانند ازدیادبرداشت نفت مورد استفاده قرار گیرد.

**بررسی پاک‌سازی نفت خام از خاک با استفاده از سورفکتانت SDS**

۴ غلظت مختلف (CMC)، ۰/۱، ۰/۲۳، ۰/۳۵ و ۰/۵٪ وزنی به حجمی از سورفکتانت SDS مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به جذب خوانده شده از دستگاه طیف‌سنج نوری و با استفاده از معادله خط منحنی کالیبراسیون، غلظت نفت در نمونه‌ها به‌دست آمد. با توجه به شکل ۸ بیشترین مقدار حذف نفت خام ۹۲/۷۶٪ است.




**شکل ۷** ایجاد لایه نفتی روی آب و تشکیل ناحیه شفاف روی لایه نفتی پس از افزودن سوپرناتانت حاوی رامنولیپید

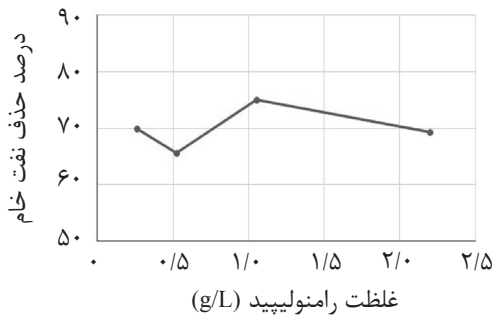



**شکل ۸** نمودار درصد حذف نفت خام برحسب غلظت سورفکتانت SDS

با توجه به دو مکانیزم تحرک و حلالیت که به‌ترتیب در غلظت‌های پایین و بالای CMC اتفاق می‌افتد. با مشاهده نتایج به‌دست آمده از آنالیز SDS می‌توان گفت که هر دو مکانیزم در عملکرد این سورفکتانت به منظور جداسازی و حذف نفت خام به یک اندازه تاثیر داشتند، با این‌حال مکانیزم حلالیت در سورفکتانت SDS تاثیر بیشتری در جداسازی و حذف نفت خام از خاک را دارد.

**بررسی پاک‌سازی نفت خام از خاک توسط بیوسورفکتانت رامنولیپید**

شکل ۹ درصد حذف نفت خام را توسط رامنولیپید نشان می‌دهد.




**شکل ۹** نمودار درصد حذف نفت خام از خاک برحسب غلظت‌های رامنولیپید

همچنین مشاهده می‌شود که بیشترین حذف نفت خام ۷۵٪ بود که در غلظت ۱/۰۵ g/L حاصل شد. اوروم و همکاران نیز با بررسی بیوسورفکتانت رامنولیپید در حذف نفت خام از خاک در یک راکتور همزن دار هوادهی شده به بازدهی حدود ۸۰٪ رسیدند [۱۶]. سایر پژوهشگران همچون دشپند و همکاران نیز با انجام بررسی‌ها نشان دادند که شوینده‌های آنیونی به‌دلیل ایجاد نیروی دافعه سر آبدوست سورفکتانت و سطح ذرات خاک، کمتر جذب خاک می‌شوند، از این‌رو برای شست و شوی خاک مناسب‌ترند [۱۷]. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که حذف نفت خام از خاک توسط بیوسورفکتانت رامنولیپید توسط دو مکانیزم جدا از هم تحرک و انحلال است. در غلظت‌های پایین CMC مونومرها در سطح آلاینده/ خاک و خاک/ آب تجمع پیدا می‌کنند و با افزایش غلظت مونومرها، کشش‌سطحی کاهش یافته و پدیده تحرک رخ می‌دهد. پدیده انحلال نیز در بالای غلظت CMC اتفاق افتاده است، حلالیت باعث انتقال ذرات آلاینده به داخل بخش آب گریز میسل‌های بیوسورفکتانت شده و از این طریق قدرت حلالیت با افزایش تعداد میسل‌ها افزایش یافته است. با توجه به پتانسیل بالای رامنولیپید برای پاک‌سازی نفت از خاک، زیستی بودن این سورفکتانت و توانایی تولید از منابع ارزان قیمت، می‌توان این بیوسورفکتانت را در صنایع مختلف برای کاربردهای زیست‌محیطی پیشنهاد داد.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه با توجه به اهمیت تولید بیوسورفکتانت‌ها و استفاده‌های زیاد آنها در صنایع مختلف، تولید رامنولیپید به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیوسورفکتانت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از باکتری *P.aeruginosa* PTCC 1340 برای تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید به‌عنوان یک مدل بومی جهت رسیدن به دانش فنی آن استفاده شد. نتایج و بررسی های حاصل از این تحقیق نشان داد که بیوسورفکتانت تولیدی دارای پتانسیل خوبی در کاهش کشش‌سطحی از ۶۹ mN/m به ۲۶/۸ mN/m است و پایداری خوبی را در کاهش کشش‌سطحی نشان می‌دهد. حداکثر پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام توسط سوپرناتانت رامنولیپید ۷۵/۱۷٪ به‌دست آمد و تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید با آزمایش‌های TLC و FTIR مورد تایید قرار گرفت. نتایج این تحقیق می‌تواند در زمینه تولید بیوسورفکتانت و پاک‌سازی نفت خام مورد توجه محققین و صنایع قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از شرکت ملی پالایش و پخش فرآورده‌های نفتی ایران به‌خاطر حمایت مالی این پروژه (قرارداد شماره ۰۲۰-۹۵-k) تشکر و قدردانی ویژه می‌شود. همچنین مراتب قدردانی خود را از حمایت دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل به‌دلیل اعتبار پژوهشی شمار BNUT/۳۷۰۳۴۲/۹۶ اعلام می‌دارند.

## مراجع

[۱]. امانی ح.، *"تولید بیوسورفکتنت های رامنولیپید به منظور کاربرد در فرآیند ازدیاد برداشت نفت ،"* نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، دوره ۳۲، شماره ۱، صفحات ۸۳-۷۳، ۱۳۹۲.

[2]. Rodrigues L., Moldes A., Teixeira J. and Oliveira R., *"Kinetic study of fermentative biosurfactant production by lactobacillus strains",* Biochemical Engineering Journal, Vol. 28, No. 2, pp. 109-116, 2006.

[3]. Muller M. M., Hormann B., Syldatk C. and Hausmann R., *"Pseudomonas aeruginosa PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems",* Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 87, No. 1, pp. 167-174, 2010.

[4]. Mulligan C. N., Sharma S. K. and Mudhoo A., *"Biosurfactants:research trend and applications",* 1st ed., CRC Press, 2014.

[5]. Amani H., Muller M. M., Syldatk C. and Hausmann R., *"Production of microbial rhamnolipid by pseudomonas aeruginosa MM1011 for ex situ enhanced oil recovery",* Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 170, No. 5, pp. 1080-1093, 2013.

[6]. Gonzalez R. and Gracida J., *"Rhamnolipids Production from Renewable Sources and their Application in Surfactant-Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons Present in a Crude-Contaminated Soil",* SciFed Journal of Fermentation & Microbial Technology, 2018.

[7]. Guerra-Santos L., Kappeli O. and Fiechtes A., *"Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source",* Appl. Environ, Microbial, Vol. 48, No. 2, pp. 301-305, 1984.

[8]. Al Bahri M., Calvo L., Gilarranz M. A. and Rodriguez J., *"Activated carbon from grape seeds upon chemical activation with phosphoric acid: Application to the adsorption of diuron from water",* Chemical Engineering Journal, Vol. 203, pp. 348-353.

[9]. Rosen M. J. and Kunjappu J. T., *"Surfactant and interfacial phanomena",* 4th ed., A John Wiley and Sons Inc., 2012.

[10]. Ceschia E., Switchable surfactants for soil remediation, MSc. Thesis. 2011.

[11]. Chu W. and Chan K. H., "*The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics*," Science of The Total Environment*,* Vol. 307, No. 1, pp. 83-92, 2013.

[12]. Uzoigwe C., J. Ennis C., K. S. M. and Rahman P., *"Production of Biosurfactants using Eco-friendly Microorganisms",* Environmental Sustainability, 2015.

[13]. Helmi W., Sarinah B., Murni H., Ahmad Firdaus B. L., Arbakaria B. A. and Oi-Ming L., *"Production of Rhamnolipids by Locally Isolated Pseudomonas aeruginosa using Sunflower Oil as Carbon Source",* Vol. 5, No. 1, pp. 1-6, 2017.

[14]. Lan G., Fan Q., Liu Y., Chen CH., Li G., Liu Y. and Yin X., *"Rhamnolipid production from waste cooking oil using pseudomonas SWP-4",* Biochemical Engineering Journal*,* Vol. 101, pp. 44-54, 2015.

[15]. Zulfigar A. R., Muhammad S.Kh., Zafar M. Kh. and Asma R., *"Production of biosurfactant using different hydrocarbons by pseudomonas aeruginosa EBN-8 mutant",* Journal of Biosciences Zeitschrift für Naturforschung C, Vol. 61, No. 2, 2006.

[16]. Urum K., Pekdemir T. and Gopur M., *"Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions",* Vol. 81, No. 3, pp. 203-209, 2003.

[17]. Deshpandia S., Shiaua B. J., Wadea D., Sabatinia D. A. and Harwellb J. H., *"Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing",* Water Research, Vol. 33, No. 3, pp. 351-360, 1999.

**Petroleum Research**

Petroleum Research 2019 (June-July), Vol. 29, No. 105, 41-43

**DOI: 10.22078/pr.2018.2937.2374**

# Investigation of Bio clean-up of Crude oil-contaminated Soil using Rhamnolipid Biosurfactant

**Shokoufeh Malek Mahmoodi[1], Hossein Amani[1]*, Seyed Morteza Hosseini[1] and Hasan Kariminezhad[2]**

1. Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Iran

2. Department of physics, Faculty of Basic Sciences, Babol Noshirvani University of Technology, Iran

**hamani@nit.ac.ir**

**DOI: 10.22078/pr.2018.3356.2541**

Received: May/10/2018 Accepted: November/25/2018

## INTRODUCTION

Today, the production and consumption of biological materials has increased considerably due to biocompatibility [1]. These materials are widely used in the agricultural, cosmetic, food, pharmaceutical, oil and environmental industries [2]. The most important characteristic of biosurfactants is low toxicity, biodegradability, high surface activity, better performance in hard conditions (high pH, saline, and high temperatures), low concentrations of CMC, availability of raw materials Production and control of environmental pollution [3]. Rhamnolipid biosurfactant is produced from *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and used to remove oil contamination soil [4]. The purpose of this paper is to investigate the purification of soil contaminated with crude oil by using the rhamnolipid biosurfactant from *P. aeruginosa PTCC 1340*.

## MATERIALS AND METHODS

### BACTERIA CULTURING

*P.aeruginosa* PTCC 1340 was prepared from the Persian type culture collection. LB[1] medium was used as a pre-culture for the production of rhamnolipid. In addition, 100 ml of LB was autoclaved for 20 minutes at 121 °C. After inoculation into the pre-culture medium, the solution was placed in a shaker incubator for 24 hours at 37 °C and 150 rpm. In this study, solutions 1, 2, and 3 are separately autoclaved according to Table 1. The solution 4 is sterilized due to the sensitivity to heat by 0.22-micron syringe filter [5].

Solutions 1 and 3 are mixed equally, and then sunflower oil are added to them at sterile condition. Finally, 1 ml of solution 4 is added to flask.

1. Lysogeny Broth

## EXTRACTION OF RHAMNOLIPID BIO-SURFACTANT

Equal volume of Normal hexane and culture medium was combined to be centrifuged at a rate of 4600 rpm for 20 minutes.

The aqueous phase is separated, and $H_3PO_4$ is added to reach the pH values which are equal to 2 to 3. Then, it is combined in a ratio of 1.25 with ethyl acetate and centrifuged for 20 minutes at 4600 rpm. Finally, the organic phase is separated and evaporated in an evaporator at a temperature of 50 and rate of 2000 rpm, ethyl acetate evaporated, and the yellow liquid of the rhamnolipid remained.

## METHOD OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY ANALYSIS

Thin layer chromatography (TLC) was used to prove the rhamnolipid production. The sample of biosurfactant was spotted on TLC. Finally, the TLC entered the moving phase including chloroform: methanol: acetic acid, with a volume ratio (2:15:65). When the moving phase reaches the end of the TLC paper, it is removed from the moving phase and placed in the detector solution containing sulfuric acid: acetic acid, with a volume ratio (50: 1). After 10 minutes, it was removed and dryed at 150 °C. Finally, the yellow rhamnolipid appeared on the paper. Equation 1 is used to calculate the delay factor (Rf) [1].

$$Rf = \frac{\textbf{distance of desired item}}{\textbf{distance of solvent}} \quad (1)$$

**Table 1:** Culture media for rhamnolipid production.

| Solution 4 | | Solution 3 | | Solution 2 | | Solution 1 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentration(g/l) | compound | Concentration(g/l) | com-pound | Concentration(g/l) | com-pound | Concentration(g/l) | compound |
| 2 | $C_7H_5NaO_7$ .$2H_2O$ | 23 | $NaH_2PO_4$· $2H_2O$ | 120 | Sunflow-er oil | 0.05 | $MgSO_4$ .$7H_2O$ |
| 0.28 | $FeCl_3$ .$6H_2O$ | 11 | $Na_2HPO_4$· $2H_2O$ | - | - | 0.1 | KCl |
| 1.4 | $ZnSO_4$ .$6H_2O$ | - | - | - | - | 1.5 | $NaNO_3$ |
| 1.2 | $CoCl_2$ .$5H_2O$ | - | - | - | - | - | - |
| 1.2 | $CuSO_4$ .$5H_2O$ | - | - | - | - | - | - |
| 0.8 | $MnSO_4$· $H_2O$ | - | - | - | - | - | - |

## CRUDE OIL REMOVAL FROM THE SOIL BY PRODUCED RHAMNOLIPID

Oil removal was recorded by spectroscopy. The concentration of oil in the samples calculated with the calibration curve and Equation 2 was used to obtain the percentage of removal of crude oil.

$$\textit{oil removal percentage} = \frac{\textbf{initial oil} - \textbf{amount of oil remaing}}{\textit{intial oil}} * \mathbf{100} \quad (2)$$

1. Retention Factor

## RESULTS AND DISCUSSION

The highest amount of rhamnolipid was obtained 11.49 g/l after 144 h. The result of the TLC is shown in Fig. 1. According to Figure 1, *P.aeruginosa* has the ability to produce rhamnolipid biosurfactant types 1 and 3. The result showed that the Maximum purification of crude oil contaminated soil was achieved by 75.17% Rhamnolipid solution.

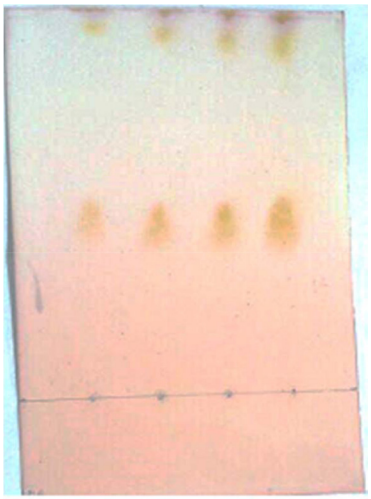


**Figure 1:** TLC analysis.

In addition, the results showed that Rhamnolipid supernatant eliminated 75.17% of the crude oil in the soil, while the highest removal efficiency of the crude oil from the soil was 76.92% by SDS surfactant. According to the successfull results, it can be suggested that the produced rhamnolipid biosurfactant can be used as an alternative to chemical surfactants in various industries.

## CONCLUSIONS

In this study, by considering the importance of producing biosurfactants and their high utilization in different industries, the production of rhamnolipid as one of the most important biosurfactants was studied. The production of rhamnolipid biosurfactant was confirmed by TLC tests. According to our results, rhamnolipid eliminated 75.17% of the crude oil in the soil. Therefore, we can propose that the produced rhamnolipid can be used as an alternative to chemical surfactants in various industries. Finally, the results of this research can be considered by researchers and industry in the field of crude oil removal from contaminated soil.

## REFERENCES

[2]. Rodrigues L., Moldes A., Teixeira J. and Oliveira R., *"Kinetic study of fermentative biosurfactant production by lactobacillus strains",* Biochemical Engineering Journal, Vol. 28, No. 2, pp. 109-116, 2006.

[3]. Muller M. M., Hormann B., Syldatk C. and Hausmann R., *"Pseudomonas aeruginosa PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems",* Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 87, No. 1, pp. 167-174, 2010.

[4]. Mulligan C. N., Sharma S. K. and Mudhoo A., *"Biosurfactants:research trend and applications",* 1th ed., CRC press, 2014.

[5]. Amani H., Muller M. M., Syldatk C. and Hausmann R., *"Production of microbial rhamnolipid by pseudomonas aeruginosa MM1011 for ex situ enhanced oil recovery",* Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 170, No. 5, pp. 1080-1093, 2013.

[13]. Helmi W., Sarinah B., Murni H., Ahmad Firdaus B. L., Arbakaria B. A. and Oi-Ming L., *"Production of Rhamnolipids by Locally Isolated Pseudomonas aeruginosa using Sunflower Oil as Carbon Source",* Vol. 5, No. 1, pp. 1-6, 2017.