

بررسی پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام به روش زیستی با استفاده از بیوسورفکتانت رامنولپید

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 به دلیل گستره وسیعی از کاربردهایشان بسیار مورد توجه صنایع مختلف قرار گرفته‌اند. در این مقاله تولید بیوسورفکتانت رامنولپید 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 $API=33$ به‌صورت مصنوعی آلوده گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که حداکثر میزان تولید رامنولپید $4/3$ g/l است. ساختار رامنولپید توسط آنالیزهای TLC و FTIR مورد بررسی و تایید قرار گرفت. بررسی خواص و ویژگی‌های رامنولپید تولید شده نشان داد که این مواد دارای پتانسیل بالایی در کاهش کشش سطحی بیوسورفکتانت است، به طوری که توانست کشش سطحی آب را از 69 به $26/8$ mN/m کاهش دهد. همچنین این ماده در اختلاط با NaCl تا غلظت 15% پایداری مطلوبی را از خود نشان داد. نتایج نهایی نشان داد که بیوسورفکتانت تولیدی می‌تواند $75/17\%$ از نفت خام موجود در خاک را حذف کند، درحالی‌که بیشترین بازده حذف نفت خام از خاک توسط سورفکتانت شیمیایی SDS $76/92\%$ به‌دست آمد. با توجه به موفقیت‌آمیز بودن نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان بیوسورفکتانت رامنولپید تولید شده را به‌عنوان جایگزین سورفکتانت‌های شیمیایی در صنایع مختلف پیشنهاد داد.

کلمات کلیدی: بیوسورفکتانت، نفت خام، رامنولپید، پاک‌سازی زیستی، کشش سطحی

مقدمه

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].

یکی از مشکلات محیط زیست ریزش نفت خام به دلیل نشتی مخازن، برخورد کانتینرها و نشتی لوله‌های انتقال در خاک و آب است. این موضوع باعث

*مسئول مکاتبات

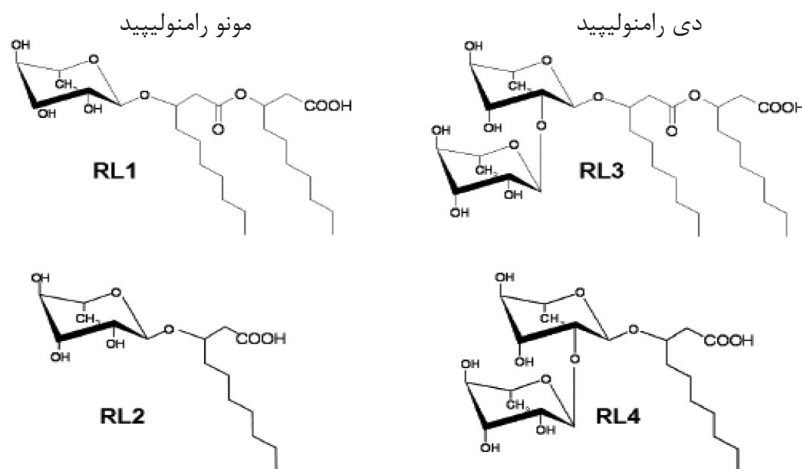
آدرس الکترونیکی

hamani@nit.ac.ir
شناسه دیجیتال: (DOI: 10.22078/pr.2018.3356.2541)

RL1 یک مونو رامنولیپید با یک واحد رامنوز است در حالی که RL3 شامل دو واحد رامنوز و به عنوان دی رامنولیپید شناخته می شود. علاوه بر این RL2 و RL4 توسط باکتری *P.aeruginosa* در مقادیر بسیار کم تولید می شود. این رامنولیپیدها تنها شامل یک β -hydroxy-fatty acid هستند [۵]. شکل ۱ ساختار ۴ نوع رامنولیپید تولید شده را نشان می دهد. بیوسورفکتانت های 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 به دست آوردند. کم ترین مقدار کشش سطحی و بین سطحی به ترتیب ۲۹ mN/m و ۰/۲۵ mN/m بود [۷]. رودریگز و همکاران با استفاده از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس^۳ که یک باکتری پروبیوتیک است، بیوسورفکتانت تولید کردند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از ملاس چغندر قند به عنوان منبع کربن باکتری، بازده تولید را به میزان ۱/۵ برابر افزایش می دهد و باعث کاهش ۷۰ الی ۸۰٪ در هزینه تولید می شود [۲].

امروزه تولید و مصرف این مواد بیولوژیک به دلیل سازگاری زیستی به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است [۲]. این مواد به طور گسترده در صنعت کشاورزی، آرایشی و بهداشتی، غذا، داروسازی، نفتی و زیست محیطی استفاده می شوند [۳]. مهم ترین ویژگی بیوسورفکتانت ها نسبت به سورفکتانت های شیمیایی سمیت پایین، زیست تخریب پذیری، فعالیت سطحی بالا، عملکرد بهتر در شرایط سخت (pH بالا، محیط های نمکی و دماهای بالا)، غلظت بحرانی میسل^۱ (CMC) پایین، در دسترس بودن مواد اولیه جهت تولید و کنترل آلودگی های زیست محیطی است [۴]. بیوسورفکتانت های تولیدی از باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، رامنولیپیدها^۲ نام دارند. رامنولیپیدها، گلیکولیپیدهای آنیونی شامل L- رامنوز و اسید چرب β - هیدروکسی هستند که بخش آبدوست رامنوز به وسیله اتصال گلیکوزیدی به دنباله اسید چرب لیپیدی متصل است. رامنولیپیدها به صورت ترکیبی از انواع مختلف تولید می شوند. رامنولیپیدهای اصلی باکتری

Paeruginosa رامنولیپید نوع ۱ (-*L-rhamno*) RL1، *(syl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate)* و رامنولیپید نوع ۳ (-*L-rhamnosyl-L-rhamno*) RL3، *(syl-3-hydroxydecanoyl 3-hydroxydecanoate)* است.



شکل ۱ ساختار ۴ نوع رامنولیپید (RL1-4) تولید شده توسط *Paeruginosa* [۸]

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

با استفاده از بیوسورفکتانت رامنولیپید از باکتری *P.aeruginosa PTCC 1340* به عنوان 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^۱ به عنوان پیش کشت برای تولید رامنولیپید استفاده شد. ۱۰۰ cc از این ماده در یک ارلن ۵۰۰ cc آماده گردید و سپس جهت استریل کردن به مدت ۲۰ min و در دمای ۱۲۱ °C 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 به مدت ۲۴ hr در دمای ۳۷ °C و ۱۵۰ rpm 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 به عنوان منبع کربنی استفاده گردید. بدیهی است استفاده از منبع کربن ارزان قیمت و ضایعات از نظر اقتصادی به صرفه و قابل قبول تر است، ولی با توجه به اینکه روغن آفتاب‌گردان راحت‌تر توسط باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد از این ماده کربنی استفاده شد [۱۳].

البحری و همکاران با استفاده از باکتری باسیلوس سابتیلیس ۱ و منبع کربن ضایعات خرما توانستند هزینه تولید بیوسورفکتانت را تا حدی کاهش دهند و بیشترین بازده تولید ۳ g/L 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 به عبارتی 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 و یا بالعکس تغییر دهند. از سوی دیگر با افزایش غلظت بیوسورفکتانت، تعداد میسل‌ها در محلول شست و شو افزایش یافته و قدرت حلالیت بالا می‌رود. به عبارتی هر چه غلظت مونومر افزایش یابد، کشش سطحی در آب کاهش می‌یابد [۱۱ و ۱۲]. هدف این مقاله بررسی پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام به روش زیستی

جدول ۱ ترکیبات محیط کشت اصلی جهت تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید

محلول ۴		محلول ۳		محلول ۲		محلول ۱	
غلظت (g/l)	ترکیب	غلظت (g/l)	ترکیب	غلظت (g/l)	ترکیب	غلظت (g/l)	ترکیب
۲	C ₇ H ₅ NaO ₇ .2H ₂ O	۲۳	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	۱۲۰	روغن آفتاب‌گردان	۰/۰۵	MgSO ₄ .7H ₂ O
۰/۲۸	FeCl ₃ .6H ₂ O	۱۱	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	-	-	۰/۱	KCl
۱/۴	ZnSO ₄ .6H ₂ O	-	-	-	-	۱/۵	NaNO ₃
۱/۲	CoCl ₂ .5H ₂ O	-	-	-	-	-	-
۱/۲	CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	-	-	-	-
۰/۸	MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	-	-	-	-

1. Lysogeny Broth

سوپرناتانت، بیومس در ته لوله‌ها دو بار با نمک ۰/۹٪ شست‌شو داده می‌شود. پس از آن فلکون‌های حاوی زیست توده در دمای ۱۰۰°C و به مدت ۲۴ hr در انکوباتور خشک شده و توزین می‌گردند. در نهایت با اختلاف در وزن‌ها مقدار زیست توده به دست می‌آید.

روش انجام آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)^۱

برای اثبات تولید رامنولیپید از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا کاغذ TLC (کد ۱۰۵۵۴۴ مرک) آماده گردید. سپس با سمپلر ۵ µL چند قطره از بیوسورفکتانت را برداشته و روی کاغذ TLC نقطه‌گذاری می‌شود. در نهایت کاغذ TLC به صورت عمود وارد فاز متحرک شامل کلروفرم: متانول: استیک اسید با نسبت حجمی (۲:۱۵:۶۵) قرار داده می‌شود. هنگامی که 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 خشک شدن در دمای ۱۵۰°C لکه‌های زرد رنگ مربوط به رامنولیپید روی آن ظاهر می‌شوند. برای محاسبه فاکتور تاخیر (Rf)^۲

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 کشش سطحی

کشش سطحی 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^۳ (TENSOR 27) استفاده گردید.

در این پژوهش ابتدا محلول‌های ۱، ۲، ۳ و طبق جدول ۱ به صورت جداگانه اتوکلاو می‌شوند. محلول ۴ به دلیل حساسیت به گرما به وسیله 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، ۵۵ cc محلول ۴ به آن اضافه می‌شود. محلول شماره ۴ به دلیل 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 عمدتاً 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 به مدت 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 به مدت ۲۰ min سانتریفیوژ (universal 320) می‌شود. فاز آبی جدا شده و به ازای ۱ cc از آن ۱۰ µlit H₃PO₄ اضافه می‌شود تا به pH حدود ۲-۳ برسد. سپس به نسبت ۱/۲۵ اتیل استات با فاز آبی ترکیب شده و به مدت 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 به مدت ۲۰ min سانتریفیوژ می‌شوند. پس از سانتریفیوژ و تخلیه

1. Thin Layer Chromatography

2. Retardation Factor

3. Fourier-transform Infrared Spectroscopy

می‌گیرد. محلول شستشو شامل آب به همراه یک سورفکتانت یا بیوسورفکتانت است. سورفکتانت شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش SDS^۳ است که میزان عملکرد آن به صورت مجزا در فرآیند پاک‌سازی خاک آلوده نفتی با بیوسورفکتانت رامنولپید تولیدی مقایسه گردید. برای این منظور سورفکتانت SDS با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۳، ۰/۳۵ و ۰/۵ g/L بوده است. سوپرناتانت رامنولپید نیز در غلظت‌های مختلف ۰/۲۶۲۵، ۰/۵۲۵، ۱/۰۵ و ۲/۱ g/L تهیه شدند. ۱۰ cc از هر کدام از محلول شستشو به نمونه‌های حاوی خاک آلوده شده نفتی اضافه شد. سپس هر کدام به مدت ۲ hr روی همزن مغناطیسی قرار گرفته و در نهایت به مدت ۲۴ hr 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 به وسیله سرنگ برداشته و به یک بشر دیگر منتقل و روی آن پوشانده شد. سپس ۴۰ cc نرمال هگزان به درون بشر اضافه شد و به مدت ۱۰ min روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. محلول شستشو و نرمال هگزان به خوبی ترکیب می‌شوند و نرمال هگزان مقدار نفت موجود در محلول شستشو را در خود حل می‌کند. پس از ۱۰ min، 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 ۲۹۷ nm اندازه‌گیری شد تا با داشتن منحنی کالیبراسیون، غلظت نفت موجود در محلول شستشو به دست آید.

تعیین شاخص امولسیون‌سازی نفت خام (E24)

برای بررسی توانایی امولسیون‌سازی، ابتدا ۴ cc از محلول بیوسورفکتانت تولید شده در غلظت CMC به لوله مدرج حاوی ۴ cc از نفت خام افزوده می‌شود. سپس به مدت ۳ min به شدت مخلوط شده و پس از گذشت ۲۴ hr، 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 مجدداً بعد از ۱۵ روز فاکتور E24 اندازه‌گیری شد. برای کنترل آزمایش مخلوط محیط کشت بدون میکروارگانیزم و نفت خام به عنوان محلول شاهد اضافه شد.

روش انجام آزمایش کنارزنی نفت خام^۱ از روی آب

ابتدا ۲۵ cc آب مقطر درون پلیت ریخته می‌شود سپس ۲ cc نفت خام به آن اضافه می‌گردد. پس از ۲ min هنگامی که لایه یکنواخت نفت روی آب تشکیل شد ۰/۵ min از محلول سوپرناتانت حاوی رامنولپید 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 ۸۰°C قرار گرفت تا تمام رطوبت آن خارج و خاک کاملاً خشک شود. در ۴ بشر مختلف ۵ gr خاک با ۱ cc نفت خام آلوده شد. نفت خام انتخابی از پایانه نفتی دریای شمال با API^۲ برابر ۳۳ تهیه گردید. نمونه‌های آلوده شده به مدت ۲۴ hr در فضای باز قرار می‌گیرد تا ترکیبات به خوبی جذب خاک شود.

تهیه محلول شستشو

شستشوی خاک توسط محلول شستشو صورت

1. Oil Spreading

2. American Petroleum Institute

3. Sodium Dodecyl Sulfate

آنالیز خاک

خام از رابطه ۲ استفاده می‌شود.

$$\text{مقدار نفت باقی مانده بعد از شستشو} - \text{مقدار نفت اولیه} = \text{درصد حذف نفت خام} \times 100$$

$$\frac{\text{مقدار کل نفت اولیه}}{\text{مقدار کل نفت اولیه}} \quad (2)$$

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 به ترتیب ۴/۳ و ۱۱/۴۹ g/l به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که روغن آفتاب‌گردان توسط باکتری به خوبی 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 به دست آمده می‌توان گفت تولید رامنولیپید وابسته به رشد باکتری است.

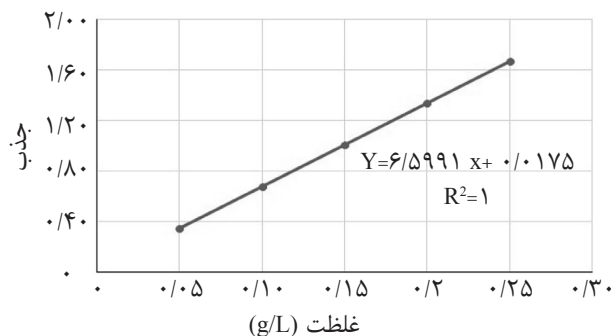
تایید تولید رامنولیپید با استفاده از آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

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 به جای می‌گذارند. نتایج این آزمایش در شکل ۴ نشان داده شده است. مقدار فاکتورهای تاخیر در این آزمایش ۰/۸۳ و ۰/۳۸ به دست آمد.

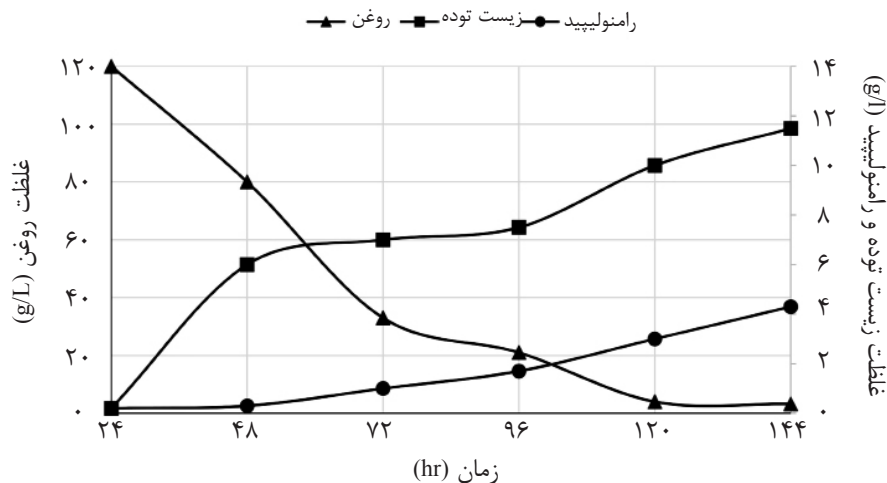
پس از جدا کردن محلول شستشو در مرحله اول فرآیند شستشو، شن و ماسه در ته بشر باقی می‌ماند. این بار آنالیز خاک برای بررسی مقدار نفت باقی مانده در شن و ماسه صورت می‌گیرد. مشابه آنالیز محلول شستشو، ۴۰ cc نرمال هگزان به خاک تزریق کرده و پس از ۱۰ min قرار گرفتن روی همزن مغناطیسی، نرمال هگزان مقدار نفت باقی مانده 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 به وسیله منحنی کالیبراسیون مقدار نفت موجود در شن و ماسه اندازه‌گیری شود. برای به دست 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 به وسیله سورفکتانت شیمیایی و زیستی

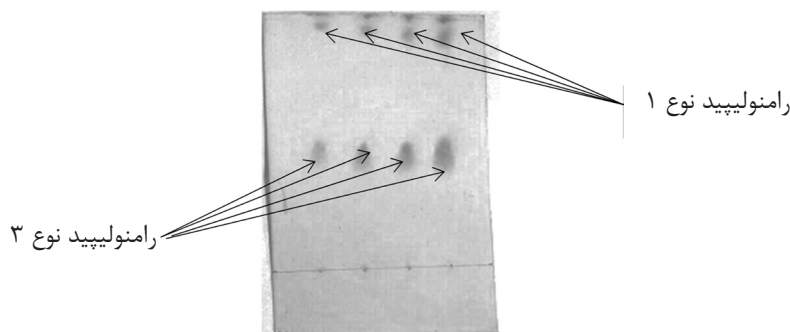
جذب نمونه‌های حاصل از دو آنالیز محلول شست و شو و آنالیز خاک برای بیوسورفکتانت رامنولیپید و سورفکتانت شیمیایی توسط دستگاه طیف‌سنجی نوری ثبت شد. با داشتن معادله خط منحنی کالیبراسیون غلظت نفت در نمونه‌ها محاسبه می‌شود. برای به دست آوردن درصد حذف نفت



شکل ۲ نمودار کالیبراسیون نفت رقیق شده در نرمال هگزان



شکل ۳ منحنی رشد باکتری



شکل ۴ آنالیز TLC بیوسورفکتانت رامنولیپید

$1127/28 \text{ cm}^{-1}$ 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 کشش سطحی سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت رامنولیپید تولید شده

ابتدا غلظت‌های مختلفی از رامنولیپید (سوپرناتانت) تهیه گردید کشش سطحی آنها اندازه‌گیری شد. شکل ۶ تاثیر غلظت‌های مختلف رامنولیپید را روی کشش سطحی نمایش می‌دهد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که کشش سطحی محلول رامنولیپید (سوپرناتانت) از ۶۹ به mN/m ۲۶/۸ می‌رسد. با توجه به نمودار کم‌ترین غلظت بیوسورفکتانت که پس از آن تغییری در کشش سطحی مشاهده نشد، 525 mg/L (CMC) به دست آمد.

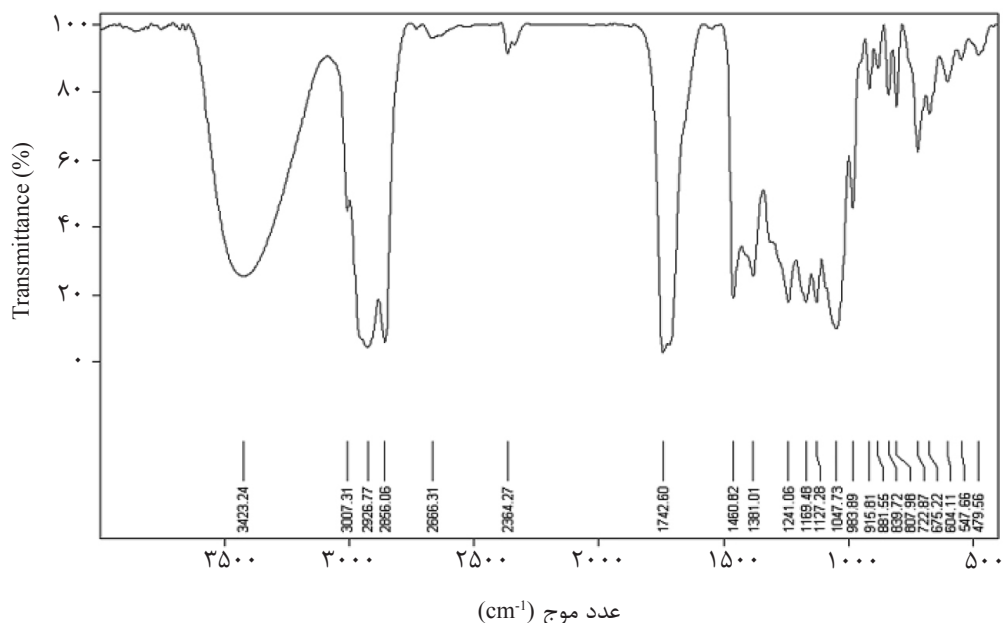
مقایسه این اعداد با فاکتورهای تاخیر نمونه استاندارد در جدول ۲ نشان می‌دهد که اعداد به دست آمده مربوط به رامنولیپیدهای نوع ۱ و ۳ است [۱۴]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که باکتری *Paeruginosa* توانایی تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید نوع ۱ و ۳ را دارد.

بررسی تولید رامنولیپید با استفاده از طیف‌سنجی FTIR

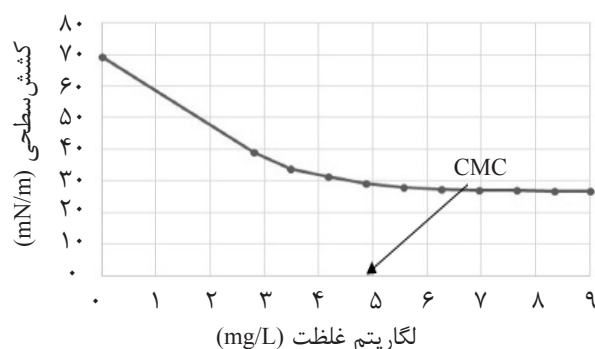
نتایج مربوط به آنالیز FTIR بیوسورفکتانت رامنولیپید در شکل ۵ نشان داده شده است. که جذب‌های موجود در $2856/06$ و $2926/77 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-H به ترتیب در CH_2 و CH_3 است. پیک پهن موجود در $3423/24 \text{ cm}^{-1}$ ناشی از پیوند O-H گروه هیدروکسیل و جذب موجود در $1742/60$ و $1460/82 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده پیوند C=O و C=C است. همچنین پیوندهای مربوط به O-C-O در

جدول ۲ فاکتور تاخیر برای رامنولیپیدهای مختلف [۱۴]

نوع رامنولیپید	فاکتور تاخیر (R_p) رامنولیپید استاندارد	فاکتور تاخیر (R_p) 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 کشش سطحی بر حسب غلظت محلول سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت رامنولیپید

کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهم‌ترین مشخصه تولید بیوسورفکتانت است. کشش سطحی سویه‌های مولد بیوسورفکتانت که توسط پژوهشگران ارائه شد توانست کشش سطحی را از ۷۲ به ۳۰ mN/m کاهش دهد. همچنین در پژوهشی دیگر کشش سطحی بیوسورفکتانت رامنولیپید از ۵۳ به ۲۹ mN/m رسید [۱۵]. همچنین تغییرات

کاهش کشش سطحی نسبت به غلظت‌های مختلف نمک NaCl در محلول رامنولیپید بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت‌های NaCl از ۰.۲ تا ۱.۵٪ وزنی در محلول رامنولیپید، کشش سطحی تغییر محسوسی نداشته و همچنان پایداری خود را حفظ می‌کند.

بررسی قابلیت امولسیون‌کنندگی بیوسورفکتانت تولید شده به روش 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 همچنین 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 باقی‌ماند. 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

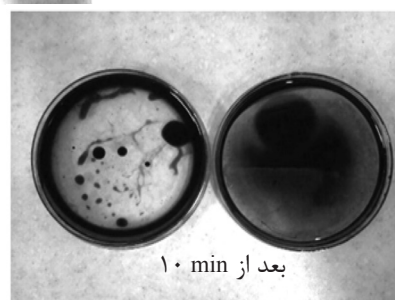
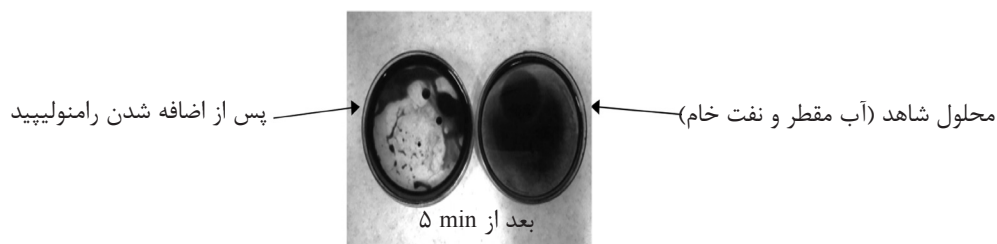
۶۲٪ شاخص امولسیون‌سازی، نتیجه خوبی را از خود به نمایش گذاشتند.

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

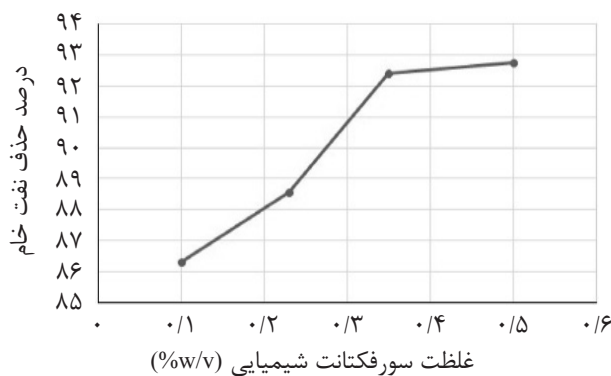
در این آزمایش مشاهده شد که پس از اضافه کردن سوپرناتانت حاوی رامنولیپید، نفت خام شروع به کنار رفتن از روی آب می‌کند. شکل ۷ نتایج را پس از ۵، ۱۰ min و همچنین ۲۴ hr را نشان می‌دهد. بنابراین با توجه به این ویژگی می‌توان گفت رامنولیپید تولید شده دارای توانایی خوبی برای کنار زدن نفت خام از روی آب است که می‌تواند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



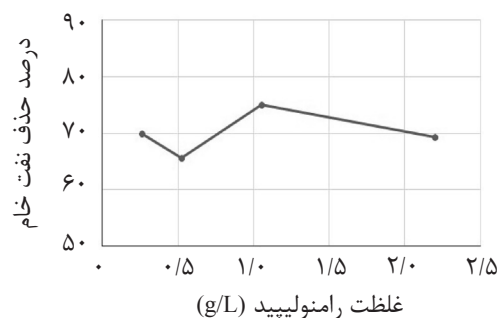
شکل ۸ نمودار درصد حذف نفت خام برحسب غلظت سورفکتانت SDS

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 دشیپند و همکاران نیز با انجام بررسی‌ها نشان دادند که شوینده‌های آنیونی به دلیل ایجاد نیروی دافعه سر آبدوست سورفکتانت و سطح ذرات خاک، کمتر جذب خاک می‌شوند، از این‌رو برای شست و شوی خاک مناسب‌ترند [۱۷]. نتایج به دست 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، کشش سطحی 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.

با توجه به دو مکانیزم تحرک و حلالیت که به ترتیب در غلظت‌های پایین و بالای CMC اتفاق می‌افتد. با مشاهده نتایج به دست 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 این حال 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

نتیجه گیری

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 k-۹۵-۲۰) 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.

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 بررسی‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که بیوسورفکتانت تولیدی دارای پتانسیل خوبی در کاهش کشش سطحی از ۶۹ mN/m به ۲۶/۸ mN/m است و پایداری خوبی را در کاهش کشش سطحی نشان می‌دهد. حداکثر پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام توسط سوپرناتانت رامنولیپید ۷۵/۱۷٪ به‌دست آمد و تولید

مراجع

- [۱]. امانی ح.، "تولید بیوسورفکتانت‌های 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., Syltatk 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., Syltatk 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. Microbiol.*, 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 phenomena*", 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.