

تولید امولسیون پایدار هیدروکربن سنگین در آب با استفاده از امولسیون کننده سویه باکتریایی *Bacillus licheniformis*

صبا پژوهان^۱، افشین فرح بخش^{*۱} و سید محمدمهدی دستغیب^۲

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی و محیط زیست پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۹

چکیده

در سال‌های اخیر یکی از پیشرفت‌های مهم در زمینه انتقال ترکیبات نفتی و ایجاد فرمولاسیون‌های قیری استفاده از امولسیون‌ها می‌باشد. انتخاب امولسیون کننده نقش تعیین کننده‌ای در تشکیل امولسیون و پایداری آن دارد. امولسیون کننده‌های زیستی جایگزین و یا مکمل مناسبی برای امولسیون کننده‌های شیمیایی بوده و علاوه بر زیست تخریب پذیری بهتر، آلودگی زیست محیطی کمتری دارند. در این مقاله، سویه باکتریایی بومی *Bacillus licheniformis* در محیط کشت بهینه و شرایط مناسب رشد داده شد و طی فرآیند چند مرحله ای امولسیون کننده زیستی جداسازی گردید. با به کارگیری نسبت‌های مختلف امولسیون کننده زیستی و امولسیون کننده شیمیایی Stabiram4582 و اجرای دقیق فرآیند امولسیون سازی به روش روتور- استاتور، امولسیون‌های مختلفی با نسبت‌های مختلف هیدروکربن سنگین و امولسیون کننده در آب ساخته شدند. مطابق مدل طراحی آزمایش تاگوجی آزمایش‌های کاهش ویسکوزیته و پایداری امولسیون انجام شد و توانایی این امولسیون کننده زیستی در ایجاد یک امولسیون پایدار هیدروکربن در آب به اثبات رسید و شرایط تولید امولسیون بهینه سازی شد. در شرایط بهینه (۶۰٪ هیدروکربن سنگین، ۱/۳۲٪ امولسیون کننده، ۹۰٪ امولسیون کننده زیستی و ۱۰٪ امولسیون کننده شیمیایی و همچنین ۴۵ °C دما) میزان ویسکوزیته نمونه هیدروکربن سنگین تا ۹۸٪ کاهش یافت و تا ۹۶ hr پایدار ماند. کاربرد این امولسیون می‌تواند در ایجاد قیر امولسیون و یا در انتقال نفت خام سنگین، فرآورده‌هایی همچون مازوت یا سوخت کوره، مصرف انرژی در خطوط لوله را به مقدار قابل توجهی کاهش دهد.

کلمات کلیدی: امولسیون کننده زیستی، امولسیون هیدروکربن سنگین در آب، کاهش ویسکوزیته، پایداری، سویه باکتریایی

مقدمه

با افزایش تقاضای انرژی در جهان و کاهش نفت‌های سبک متداول، نفت‌های خام سنگین به‌عنوان منبع هیدروکربن برای استفاده در آینده مورد توجه هستند [۱]. با توجه به وضعیت مخازن نفت خام سراسر جهان به مرور زمان با کاهش تولید نفت خام سبک، تولید نفت خام سنگین افزایش می‌یابد [۲]. پیش‌بینی می‌شود که نفت‌های سنگین منبع اولیه انرژی فسیلی جهان در آینده نزدیک خواهند شد که این امر با افزایش قیمت نفت‌ها همراه خواهد بود. ذخایر نفت سنگین از جمله قیر و نفت‌های فوق سنگین، نشان‌دهنده بخش قابل توجهی از ذخایر شناخته شده کل هستند [۳]. نفت‌های سنگین مقدار زیادی هیدروکربن‌هایی با وزن مولکولی بالا و سطح بالای از هترواتم‌ها شامل سولفور، نیتروژن، اکسیژن و فلزات دارند. نفت سنگین و قیر با استفاده از ویسکوزیته بالا و درجه API پایین‌شان مشخص می‌شوند [۱]. با توجه به چگالی نفت خام و شاخص گرانش موسسه نفت آمریکا (API) می‌توان نفت‌ها را به سه نوع طبقه‌بندی نمود: نفت سبک و نیمه سبک ($API < 20$)، نفت سنگین ($20 < API < 30$) و نفت فوق سنگین ($API < 30$) [۴]. اگر چه نفت سنگین در بیش از نیمی از منابع قابل استحصال نفت جهان نشان داده شده است، تقاضا برای نفت سنگین و فوق سنگین به‌خاطر ویسکوزیته بالا و پیچیدگی ترکیب آن که تولید، انتقال و پالایش آن را سخت و پرهزینه می‌سازد، کم است. کاهش پیوسته تولید نفت معمولی با توجه به بهره‌برداری و مصرف بیش از حد آن، در آینده نزدیک استفاده از منابع نفت سنگین در تولید سوخت و مواد پتروشیمی بسیار ضروری ساخته است [۵]. چندین روش برای انتقال نفت سنگین مطرح شده است که شامل: پیش گرمایش نفت خام و گرمایش متعاقب خط لوله، رقیق‌سازی با نفت‌های خام سبک‌تر، بهینه‌سازی جزئی و تزریق غلاف آب اطراف نفت

خام ویسکوز می‌گردد [۱، ۳ و ۴]. هر یک از روش‌ها مشکلات اقتصادی، اجرایی و محاسباتی دارد [۱]. فن‌آوری مطلوب دیگر در خطوط لوله، انتقال نفت خام ویسکوز به شکل امولسیون‌های تغلیط شده روغن در آب (O/W) (امولسیون آب در نفت شامل قطرات آب در فاز پیوسته نفت، امولسیون نفت در آب شامل قطرات نفت در فاز پیوسته آب و امولسیون چندگانه، قطرات ریز معلق در قطرات بزرگ‌تر معلق در فاز پیوسته است) است [۶]. جریان نفت ویسکوز در شکل امولسیون‌های نفت در آب یک مسیر جذاب برای انتقال هیدرولیکی نفت سنگین است، زیرا امولسیون‌سازی با ایجاد قطرات نفت در فاز پیوسته آبی می‌تواند میزان ویسکوزیته را به حدود ۵۰-۲۰۰ cP کاهش دهد که آن را می‌توان به راحتی پمپ نمود. علاوه بر این تکنولوژی امولسیون می‌تواند در حذف رسوب نفتی که به‌طور موثر با روش‌های سنتی مانند به‌کار بردن حرارت و رقیق‌سازی برطرف نشده‌اند، کارایی داشته باشد [۷]. امولسیون شامل سه فاز است: فاز داخلی یا ناپیوسته قطرات که به‌طور ریز تقسیم شده است. فاز خارجی یا پیوسته ماتریسی است که قطرات را در حال تعلیق نگه داشته است. فاز حد واسط یا اینتر فاز شامل یک امولسیفایر یا پایدارکننده است که فاز پیوسته و ناپیوسته را متصل به یکدیگر نگه می‌دارد و از بهم چسبیدن قطرات به یکدیگر و لخته شدنشان جلوگیری می‌نماید و لذا امولسیون را پایدار نگه می‌دارد [۸]. مهم‌ترین بخش امولسیون امولسیفایر است که معمولاً آنقدر گران‌قیمت است که اثر اقتصادی زیادی بر فرآیند امولسیون‌سازی دارد [۹]. امولسیفایرها طبقه‌ای از سورفکتانت‌ها هستند که پراکندگی فاز پراکنده در فاز پیوسته را پایدار می‌کنند. بیوامولسیفایرها مولکول‌های دارای دو سر آب دوست و روغن دوست بوده، توسط میکروارگانیزم‌ها تولید می‌گردند و جذب سوسترهای نامحلول را برای میکرووب‌ها تسهیل می‌بخشند [۱۰].

جریان آشفته تا حد زیادی شکسته می‌شوند. در آسیاب‌های کلوئیدی تنش‌های برشی نیز در جریان آرام می‌تواند شکست قطره را منجر گردند. به این ترتیب شعاع متوسط قطرات زیر $1 \mu\text{m}$ در آسیاب‌های کلوئیدی به دست می‌آید [۱۴]. با توجه به توانایی این روش در تولید انواع امولسیون‌های نفتی در این مقاله، تولید امولسیون هیدروکربن سنگین در آب با استفاده از امولسیون‌کننده زیستی حاصل از سویه باکتریایی بومی *Bacillus licheniformis* به روش روتور-استاتور به انجام رسیده و میزان کاهش ویسکوزیته و پایداری امولسیون تولید شده بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد

در این مقاله مازوت (cP ۲۵۲۰) به‌عنوان هیدروکربن سنگین استفاده شد، سویه باکتریایی-*Bacillus li-cheniformis* (ACO4) از پژوهشگاه صنعت نفت ایران تهیه شد. گلوکز، اوره، نیترات سدیم، کلرید سدیم، پتاسیم هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سولفات آهن (۷ آب)، سولفات منیزیم (۷ آب) از شرکت مرک آلمان و امولسیون‌کننده شیمیایی با نام تجاری Stabiram4582 از شرکت CECA فرانسه خریداری گردید. در این مقاله دستگاه‌های انکوباتور همزن دار (فن‌آوران سهند آذر 1210D)، دستگاه ویسکومتر (VISCO ELITE FUNGILAB S.A)، پلنت تولید امولسیون (France)، میکروسکوپ (Nikon-ECLIPSE E100)، سانتریفوژ (HERMLE Labortechnik GmbH)، اتوکلاو مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌ها

تولید محیط کشت بهینه

برای تهیه محیط کشت بهینه [۹] رشد سویه باکتریایی، محلول الف شامل: گلوکز $1/5 \text{ g/L}$ ، اوره $0/5$ ، نیترات سدیم (۴)، کلرید سدیم

بیوامولسیفایرها اخیراً توسط جامعه صنعتی به‌عنوان گزینه‌های طبیعی و مورد اعتماد برای جایگزینی سورفکتانت‌های مصنوعی تجاری به‌خاطر خصوصیات ذاتی خود از جمله سمیت پایین‌تر، زیست تخریب‌پذیری بالاتر، ظرفیت کف‌کنندگی بالاتر، فعالیت بیشتر در دماهای بالا، تحمل سطح pH و شوری خیلی بالا مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۱]. بیوامولسیفایرها علاوه بر فرآیندهای زیست‌پالایی در صنعت نفت می‌توانند برای افزایش بازیافت نفت از چاه‌ها، کاهش ویسکوزیته نفت سنگین، تمیز کردن مخازن ذخیره نفت، افزایش جریان در خطوط لوله و ثبات امولسیون‌های روغن/آب استفاده شوند [۵]. مثلاً *Acinetobacter venetianus* سویه RAG-1 [۱۲]، آلسان نیز یک امولسیون‌کننده زیستی آنیونی متشکل از هتروپلی ساکارید و پروتئین است که توسط *A. radioresistens* سویه 53-KA تولید می‌شود، از سایر امولسیون‌کننده‌های زیستی شناخته شده می‌توان بیودیسپرسانت را نام برد که یک امولسیون‌کننده خارج سلولی بوده که به‌وسیله *A. calcoaceticus* سویه A2 تولید می‌گردد [۱۳].

امولسیفایرهای شیمیایی اغلب سمی هستند و خود منبع اضافی آلودگی می‌باشند [۵]. امولسیون می‌تواند در سیستم‌های فشار بالا، غشایی، اولتراسونیک، روتور-استاتور و دیسکی تولید شود. تفاوت این روش‌ها در توان عملیاتی و به‌طور فزاینده‌ای درجه استرس روی محصول در طول فرآیند امولسیون‌سازی است [۱۴]. روتور-استاتور شامل یک روتور که به‌صورت متحدالمرکز داخل استاتور با دو یا بیش از دو تیغه قرار می‌گیرد و یک استاتور با شکاف‌های عمودی یا کج می‌شود. همان‌طور که روتور می‌چرخد، تولید فشار کمی نموده که مایع را به درون و خارج از تجهیزات کشیده، در نتیجه چرخش و امولسیون‌سازی می‌نماید [۱۵]. قطرات فاز پراکنده با نیروهای اینرسی و برشی در

آبی که در درون آسیاب کلونیدی در حال سیر کولاسیون با دور rpm ۵۰۰۰ است، اضافه می‌گردد. پس از ۵ ثانیه اختلاط کامل دو فاز، امولسیون تولید شده بلافاصله درون حمام یخ قرار گرفته تا به دمای °C ۳۷ برسد. با مقایسه ویسکوزیته امولسیون و هیدروکربن خام سنگین و کاهش ویسکوزیته تشکیل امولسیون هیدروکربن سنگین در آب اثبات خواهد شد.

پایداری امولسیون نفت سنگین در آب

برای بررسی پایداری امولسیون، cc ۱۰۰ از امولسیون تشکیل شده در یک استوانه مدرج ریخته، درب آن را بسته و ۲۴ hr در دمای اتاق قرار داده ارتفاع آب جدا شده در زیر استوانه اندازه‌گیری می‌گردد. پایداری امولسیون از رابطه (۱) محاسبه می‌شود:

$$(1) \quad \frac{\text{آب جدا شده}}{\text{ارتفاع کل}} \times 100 = \text{پایداری}$$

طراحی آزمایش

در این مقاله با توجه به تعداد فاکتورهای انتخابی و سطوح مورد آزمایش و تعداد زیاد آزمایش‌ها برای بهینه‌سازی و ساده نمودن روش‌های تحلیل و آنالیز نتایج با حفظ کیفیت نسبی آنالیز مدل تاگوچی با استفاده از نرم‌افزار 4-Qualitek به‌عنوان مدل مناسب‌تر انتخاب و به‌کار گرفته شد. با توجه به آزمایش‌های اولیه برای تعیین شرایط بهینه اثر سه فاکتور موثر (غلظت هیدروکربن سنگین، غلظت امولسیون‌کننده زیستی و دما) در سه سطح مختلف (جدول ۱) مطابق آرایه متعامد L9 در کاهش ویسکوزیته امولسیون و در نهایت اثبات شکل‌گیری امولسیون، بررسی گردید. برای محاسبه کردن اثر خطا، تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شده و نتایج ثبت گردید. نتایج توسط روش‌های نسبت Signal-to-noise (S/N) و واریانس ANOVA آنالیز آماری می‌شود. برای بررسی پراکندگی نتایج از تابع مربع انحراف استاندارد از روابط (۲) و (۳) استفاده شده است [۱۰]:

$$(2) \quad S/N = -10 \log(\text{msd})$$

$$(3) \quad \text{MSD} = [(y_1)^2 + (y_2)^2 + \dots + (y_n)^2] / n = [\text{Avg.}(y_i)^2] = Y_{\text{exp}}^2$$

(۰/۱)، پتاسیم هیدروژن فسفات (۱/۸)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (۱/۲) در آب مقطر حل شده و در اتوکلاو در دمای °C ۱۲۱ به مدت ۱۵ min استریل گردید. ترکیب سولفات آهن (۷ آبه) (۰/۰۱)، سولفات منیزیم (۷ آبه) (۰/۲) به دلیل اینکه ممکن است بر اثر حرارت با سایر اجزای محیط کشت تشکیل رسوب دهند، در داخل آب مقطر استریل سرد حل و فیلتر می‌گردند (محلول ب). سپس محلول الف و ب با یکدیگر مخلوط می‌شوند.

تولید امولسیون‌کننده زیستی

سویه ACO4 در cc ۵۰۰ محیط کشت بهینه در دمای °C ۳۰ و دور rpm ۱۸۰ به مدت ۴۸ hr در انکوباتور همزن‌دار انکوبه شده است. نمونه پس از عملیات استریل شدن توسط اتوکلاو (دمای °C ۱۲۱ و مدت ۱۵ min)، در دمای °C ۴ با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ min سانتریفوژ می‌شود. رسوبات حاصل جمع‌آوری و مایع بالایی پس از انجام مجدد مراحل اتوکلاو و سانتریفوژ به‌عنوان محلول حاوی امولسیون‌کننده زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

استخراج امولسیون‌کننده زیستی

مایع بالایی به نسبت ۱ به ۳ با الکل ۹۸٪ مخلوط شده و به مدت ۲۴ hr در یخچال در دمای °C ۴ قرار می‌گیرد و سپس در دمای °C ۴ با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ می‌شود. ماده جامد سفید رنگ باقی‌مانده در انتهای لوله، امولسیون‌کننده زیستی خام است که هر g ماده جامد در cc ۸ آب مقطر برای استفاده در مراحل بعدی حل شده است.

تولید امولسیون هیدروکربن سنگین در آب

برای تولید g ۵۰۰ امولسیون هیدروکربن سنگین در آب، هیدروکربن سنگین با دمای °C ۶۰ و به نسبت‌های ۶۰، ۶۵ و ۷۰٪ به فاز آب حاوی آب و ۱/۳۲٪ مخلوط امولسیون‌کننده‌های زیستی و شیمیایی (با نسبت‌های ۷۰، ۸۰ و ۹۰٪ امولسیون‌کننده زیستی) با دمای °C ۵۰ اضافه شده [۹] و با استفاده از سیستم روتور-استاتور با یکدیگر مخلوط می‌شوند. فاز نفتی به آرامی به فاز

جدول ۱ فاکتورهای موثر در تشکیل امولسیون O/W و سطوح آنها

فاکتور موثر	سطح		
	۲۵	۳۵	۴۵
دما (°C)	۲۵	۳۵	۴۵
نسبت هیدروکربن به آب (%)	۶۰	۶۵	۷۰
نسبت امولسیون‌کننده زیستی به شیمیایی (%)	۷۰	۸۰	۹۰

و پایداری امولسیون هیدروکربن سنگین در آب از جمله درصد هیدروکربن سنگین، دما و درصد امولسیون‌کننده زیستی مورد استفاده قرار گرفت. امولسیون هیدروکربن سنگین در آب (شکل ۳ ب) با توجه به طراحی آزمایش تولید گردید و نتایج ویسکوزیته آزمایش‌ها در جدول ۲ آورده شده است. تمام تصاویر میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر هستند. با داشتن نتایج مناسب برای ویسکوزیته امولسیون‌های تهیه شده مطابق مدل تاگوچی نسبت به آنالیز آن اقدام گردید. نتایج آورده شده در جدول ۲ توسط مدل تاگوچی مورد آنالیز قرار گرفت. واریانس ANOVA نتایج آزمایش‌ها در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که در جدول آنالیز ANOVA نشان داده شده است درصد هیدروکربن سنگین بیشترین اثر را بر کاهش ویسکوزیته دارد، پس از آن دما و سپس درصد بیوامولسیفایر دارای بیشترین اثر هستند.

پایداری

نتایج حاصل از پایداری امولسیون در مدت ۴ روز در جدول ۴ نشان داده شده است. پایداری امولسیون‌ها هر ۲۴ hr اندازه‌گیری شده و با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید. نتایج حاصل نشان‌دهنده پایداری بالای امولسیون حاصل از امولسیون‌کننده زیستی *Bacillus licheniformis* است.

S/N میزان خطا، n تعداد آزمایشات، y_i نتایج هر آزمایش و Y_{exp} پاسخ نرم‌افزار در شرایط بهینه هستند.

با توجه به اینکه هدف از تشکیل امولسیون کاهش ویسکوزیته است در نتیجه در این پروژه نوع محاسبه و آنالیز "کوچک‌تر بهتر" انتخاب شده است.

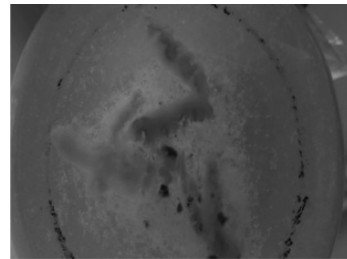
نتایج و بحث

تولید امولسیون‌کننده زیستی و تشکیل امولسیون هیدروکربن سنگین در آب

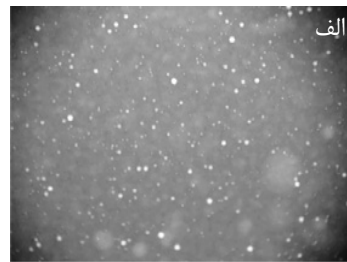
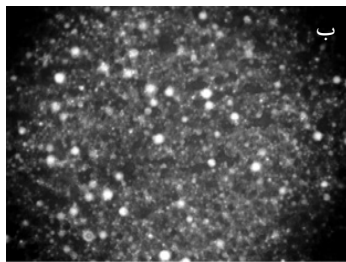
سویه باکتریایی گرم مثبت، میله‌ای شکل، بی‌هوازی و اسپوردار *Bacillus licheniformis* در محیط کشت بهینه به خوبی رشد نمود. شکل ۱ تصویر میکروسکوپی سویه باکتریایی و شکل ۲ رشد سویه و تولید امولسیون‌کننده زیستی ناخالص را نشان می‌دهد. ماده امولسیون‌کننده استفاده شده در تمام مراحل فرآیند امولسیون‌سازی، از ترکیب امولسیون‌کننده زیستی تولید شده توسط سویه باکتریایی و امولسیون‌کننده شیمیایی *Stabiram4582* تشکیل شده است. استفاده از امولسیون‌کننده شیمیایی باعث کاهش قابل توجه ویسکوزیته می‌گردد ولی استفاده از امولسیون‌کننده زیستی برای ایجاد پایداری بیشتر امولسیون ضروری است. در این مقاله طراحی آزمایش به روش تاگوچی برای بررسی اثر فاکتورهای موثر در تولید



شکل ۲ تصویر امولسیون کننده زیستی خام



شکل ۱ تصویر میکروسکوپی سویه باکتریایی Bacillus licheniformis



شکل ۳ الف) تصویر میکروسکوپی هیدروکربن سنگین و ب) تصویر میکروسکوپی امولسیون هیدروکربن سنگین در آب

جدول ۲ نتایج ویسکوزیته آزمایشات حاصل از طراحی به روش تاگوچی

شماره آزمایش	پارامترها و سطوح			ویسکوزیته (cP)		
	T (°C)	O (%)	B.E (%)			
۱	۱	۱	۱	۱۰۲	۱۰۵	۱۰۸
۲	۱	۲	۲	۱۹۰	۲۱۰	۲۱۱
۳	۱	۳	۳	۳۹۷	۳۸۰	۳۸۸
۴	۲	۱	۲	۸۰	۸۵	۸۸
۵	۲	۲	۳	۱۲۰	۱۲۳/۵	۱۲۸
۶	۲	۳	۱	۶۲۵	۶۱۸	۶۱۹
۷	۳	۱	۳	۵۰	۵۸	۶۲
۸	۳	۲	۱	۱۱۵	۱۱۲	۱۰۹
۹	۳	۳	۲	۶۲۵	۶۱۸	۶۱۹
هیدروکربن سنگین	۱	-	-	۲۵۲۰	۲۵۲۰	۲۵۲۰
آب	۱	-	-	۰/۸۹	۰/۹	۰/۸۹

جدول ۳ آنالیز واریانس ANOVA

Factor	DOF	Sum of Sqrs.	Variance	F-Raito	Pure Sum	Percent [%]
A Temperature [°C]	۲	۱۷/۷۸۶	۸/۸۹۳	۳/۰۸۵	۱۲/۰۲۱	۲/۹۴۷
B Oil [wt-%]	۲	۳۶۸/۲۵۲	۱۸۴/۱۲۶	۶۳/۸۷۷	۳۶۲/۴۸۷	۸۸/۸۸۳
C B/E [wt-%]	۲	۱۶/۰۱۷	۸/۰۰۸	۲/۷۷۸	۱۰/۲۵۲	۲/۵۱۳
Other/ Error	۲	۵/۷۶۴	۲/۸۸۲	-	-	۵/۶۵۷
Total	۸	۴۰۷/۸۲۱	-	-	-	٪۱۰۰/۰۰

جدول ۴ نتایج حاصل از پایداری امولسیون هیدروکربن سنگین در آب

آزمایش‌ها	پایداری امولسیون			
	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم
۱	۸۹/۶۵	۷۶/۷۳	۵۰/۹	۴۵
۲	۱۰۰	۹۴/۰۶	۹۴/۰۶	۹۴/۰۶
۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۴	۱۰۰	۹۷/۳	۹۳/۰۲	۹۳/۲
۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۶	۱۰۰	۹۴/۸۲	۹۳/۵۲	۸۷/۰۷
۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۸	۶۱/۲۲	۴۸/۲۹	۲۵/۷۷	۹۳/۰۲
۹	۹۵/۵۴	۹۵/۵۴	۹۴/۰۶	۹۳/۰۲

نتیجه‌گیری

جدول ۳ نشان داد که غلظت هیدروکربن سنگین با ۸۸/۸۸٪ بیشترین تاثیر را دارد با توجه به اینکه غلظت هیدروکربن بالاتر از آب است این نتیجه دور از ذهن نیست و پس از آن دما با ۲/۹۴٪، و سپس غلظت امولسیون‌کننده زیستی با ۲/۵۱٪ بیشترین اثر را دارند. کاهش ویسکوزیته، شاخص اصلی شرایط بهینه در این مطالعه است. شرایط بهینه حاصل از طراحی تاگوچی در جدول ۵ آورده شده است.

تشکیل امولسیون هیدروکربن سنگین در آب باعث کاهش ویسکوزیته هیدروکربن سنگین و افزایش بهره‌وری فرآیند انتقال در خطوط لوله می‌گردد. مهم‌ترین بخش در یک امولسیون، امولسیفایر است که معمولاً گران‌قیمت است و در اقتصادی شدن فرآیند امولسیون‌زایی اثر می‌گذارد. بیوامولسیفایرها اخیراً توسط جامعه صنعتی به‌عنوان گزینه‌های طبیعی و مورد اعتماد برای جایگزینی سورفکتانت‌های مصنوعی تجاری به‌خاطر خصوصیات ذاتی خود از جمله سمیت پایین‌تر، زیست‌تخریب‌پذیری بالاتر، ظرفیت کف‌کنندگی بالاتر، فعالیت بالاتر در دماها، سطح pH و شوری خیلی بالا، جذب شده‌اند. در این مقاله از طراحی آزمایش به‌روش تاگوچی برای بررسی اثر فاکتورهای دما، غلظت هیدروکربن، غلظت امولسیون‌کننده زیستی نسبت به شیمیایی استفاده شده است. نتایج ویسکوزیته حاصل از تاگوچی در جدول ۲ آورده شده است. برای آنالیز نتایج تاگوچی از واریانس ANOVA می‌گردد. ANOVA با درصد مشارکت هر یک از فاکتورها در ارتباط است (جدول ۳). دما، غلظت هیدروکربن سنگین و غلظت امولسیون‌کننده زیستی سه فاکتور موثر در کاهش ویسکوزیته امولسیون هستند اما آنالیز واریانس در

جدول ۵ شرایط بهینه در طراحی آزمایش به‌روش تاگوچی

سهم	سطح	شرح سطح	فاکتور/ ستون
۱/۹۴۴	۳	۴۵	(A) T
۶/۸۷۴	۱	۶۰	(B) O
۱/۸۸۶	۳	۹۰	(C) B
جمع سهم همه فاکتورها ۱۰/۶۱۳..... معدل بالای عملکرد فعلی ۴۴/۸۰۲..... نتیجه پیش بینی شده در شرایط بهینه ۳۴/۱۸۸.....			

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان و نیز از حمایت مالی شرکت خطوط لوله و مخابرات نفت ایران قدردانی می‌نمایند.

مراجع

- [1]. Abdurahman N. H., Rosli.Y. M, Azhari N. H. and Hayder B. A., "Pipeline transportation of viscous crudes as concentrated oil-in-water emulsions," Journal of Petroleum Science and Engineering, Vol. 90–91, pp 139–144, 2012.
- [2]. Ancheyta J., Rana S. M., "Future technology in heavy oil processing," Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).
- [3]. Abdurahman N. H., Azhari N. H. and Yunus Y. M., "Formulation and evaluation of water-continuous emulsion of heavy crude oil prepared for pipeline transportation," International Journal of Engineering Science and Innovative Technology (IJESIT), Vol. 2, Issue 5, 2013.
- [4]. Lu H., Xueqian Guan H., Wang B., Huang Z. and Surfact Deterg J., "CO₂-switchable oil/water emulsion for pipeline transport of heavy oil," Journal of Surfactants and Detergents, Vol. 18, Issue 5, pp. 773–782, 2015.
- [5]. Farahbakhsh . A, Taghizadeh. M, Yakhchali. B, Movagharnjad.K, Zamani. H, "Production of a New Emulsifier Material for the Formation Heavy Hydrocarbon/Water Emulsion," International Journal of Industrial Chemistry, Vol. 2, No. 1, 2011.
- [6]. Ashrafzadeh S. N., Motaee E. and Hoshyargar V., "Emulsification of heavy crude oil in water by natural surfactants, Journal of Petroleum Science and Engineering," Vol. 86–87, pp. 137–143, 2012.
- [7]. Santos R. G., Loh W., Bannwart A. C. and Trevisan O. V., "An overview of heavy oil properties and its recovery and transportation methods", Brazilian Journal of Chemical Engineering," Vol. 31, No. 03, pp. 571 - 590, 2014.
- [8]. Udonne J. D., "Chemical treatment of emulsion problem in crude oil production," Journal of Petroleum and Gas Engineering Vol. 3, Issue 7, pp. 135-141, 2012.
- [9]. Hoshyagar V., Marjani A., Fadaei F. Shirazian, "Prediction of flow behavior of crude oil-in-water emulsion through the pipe by using rheological properties," Oriental Journal of Chemistry, Vol. 28, No. 1, pp. 109-113 ,2012.
- [10]. Maniyar J., Doshi D., Bhuyan S. and Mujumdar S., "Bioemulsifier production by streptomyces sp. S22 isolated from garden soil," Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 49, pp. 293-297, 2011.
- [11]. Trindade J., Freire M., F. Amaral P., Coelho M., Coutinho J. and Marrucho I., "Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*," Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Vol. 324, pp. 149-164, 2008.
- [12]. Bach H. and Gutnick D. L., "Potential application of bioemulsifiers in the oil industry," Elsevier B. V., studies in surface science and catalysis, R. Vasquezduhalt and R. Quintero-Ramirez (Eds), Vol. 151, pp. 233-281, 2004.
- [13]. Greene A. C., Patel B. K. and Sheehy A. J., "Deferribacter thermophilus gen. nov., sp.nov., a novel thermophilic manganese-and iron-reducing bacteria," International Journal of Systematic and Evolutionary, Vol. 47. No. 2, pp. 505-509, 1997.
- [14]. Urban K., Wagner G., Schaffner D., Röglin D. and Ulrich J., "Rotor-stator and disc systems for emulsification processes," WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Chem. Eng. Technol, Vol. 29, No. 1, 2006.
- [15]. Sookhan N., Basri M., Basyaruddin M. A. R., Raja Noor A. R., Bakar S. and Zaharin I., "Preparation of emulsions by rotor–stator homogenizer and ultrasonic cavitation for the cosmeceutical industry," J. Cosmet. Sci., Vol. 63, pp.333–344, 2012.



Petroleum Research

Petroleum Research 2019(April-May), Vol. 29, No. 104, 54-60

DOI: 10.22078/pr.2018.3013.2399

Formation Stable Heavy Hydrocarbon/ Water Emulsion by Bioemulsifiers Produced by *Bacillus Licheniformis*

Saba Pajouhan¹, Afshin Farahbakhsh^{1*} and Seyed Mohammad Mehdi Dastgheib²

1. Chemical engineering departement, Quchan Branch, Islamic Azad University, , Iran

2. Environment and Biotechnology Department, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran

afshin.farahbakhsh@gmail.com

DOI: 10.22078/pr.2018.3013.2399

Received: October/02/2018

Accepted: August/04/2018

INTRODUCTION

With the combination of an increase in world energy demand and the decline of conventional oils, heavy crude oils have been presented as a relevant hydrocarbon resource for use in the future [1]. The decrease in worldwide conventional oil reserves and the increase in global fuel demand have driven continuous innovation in the petroleum industry and have spurred the development of new production and transportation technologies for heavy oils. In addition, forecasts report that heavy oils will be the world's primary fossil energy resource in the near future. This predicted reliance on heavy oils is accompanied by a predicted increase in the market value of these oils [2]. Although the heavy oil represented at least half of the recoverable oil resources of the world, demand for heavy and extra heavy oil has been marginal because

of its high viscosity and composition complexity which make it difficult and expensive to produce, transport and refine [3]. Different methods have been used to resolve this problem such as dilution with alcohols and light crudes, heating, upgrading, core annulus flow, and forming oil/water (O/W) emulsions stabilized by surfactants [1,2]. Another favorable pipeline technique is the transport of viscous crudes as concentrated oil-in-water (O/W) emulsions [4]. The flow of viscous oil in the form of oil-in-water emulsions is an attractive route for the hydraulic transport of heavy oils because emulsification can reduce viscosity to values of 50-200 cP. Furthermore, emulsion technology can improve residual oil removal from mature fields which are not as efficiently recovered by traditional methods that apply heat or diluents [5].

Emulsion consists of two phases: the internal or

discontinuous phase of finely divided droplets and External or continuous phase. The external or continuous phase is the matrix which keeps droplets in suspension. The interphase consists of an emulsifier or stabilizer, which keeps the emulsion stable, binding the internal and external phase together and preventing droplets from approaching each other and coalescing [6]. The most important part of an emulsion is the emulsifier which is usually expensive enough to affect the economy of emulsification process [7]. Moreover, emulsifiers are a subclass of surfactants which stabilize dispersions. Bioemulsifiers are amphipathic molecules secreted by microorganisms to facilitate uptake of insoluble substrates [8]. Bioemulsifiers have been recently attracting the industrial community as natural and promising candidates for the replacement of synthetic commercial surfactants due to their intrinsic properties such as lower toxicity, higher biodegradability, higher foaming capacity, and higher activity at extreme temperatures, pH levels and salinity [9]. Moreover, emulsions can be produced in high pressure systems, membrane systems, ultrasonic systems, rotor-stator systems, and disc systems. A further differentiation into continuous and discontinuous processes can be undertaken. In the different processes, different break-up mechanisms are responsible for the droplet disruption [10]. The rotor-stator assembly consists of a rotor housed concentrically inside the stator with two or more blades and a stator with either vertical or slanted slots. As the rotor rotates, it generates a lower pressure to draw the liquid in and out of the assembly, resulting in circulation and emulsification [11]. In this paper, heavy oil in water emulsion which has been

produced by using raw bioemulsifier and reducing viscosity and stability has been considered by us.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

The crude oil sample used in this study was Mazut (2520 cP). Moreover, strain *Bacillus Licheniformis* (ACO4) as seen in Fig. 1 was provided by the Research Institute of Petroleum Industry (RIPI). These strains were the halothermotolerant gram-positive spore-forming rodshaped bacterium, isolated from petroleum reservoirs in Iran, and identified by phenotypic characterization and 16S rRNA analysis. Medium composed of K_2HPO_4 , NaCl, $NaNO_3$, glucose, urea, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ all chemicals used in this study were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The Stabiram emulsifier was prepared from CECA Company (France).

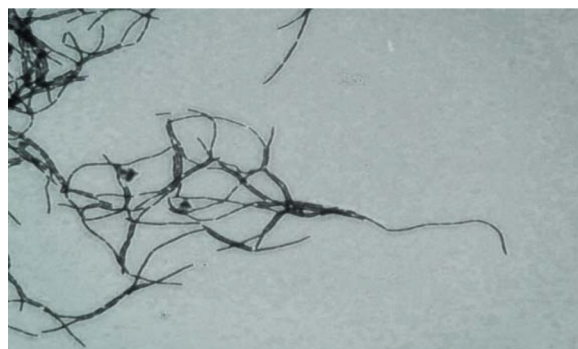


Figure 1: Microscopic Image of the Bacterial Strain *Bacillus licheniformis*.

METHODS

MEDIA AND CULTURING CONDITIONS

The culture was prepared in 1L flasks containing 500 mL of a medium composed of $1.8 \text{ g L}^{-1} K_2HPO_4$, $1.2 \text{ g L}^{-1} KH_2PO_4$, $0.1 \text{ g L}^{-1} NaCl$, $4 \text{ g L}^{-1} NaNO_3$, 1.5 g L^{-1} glucose, 0.05 g L^{-1} urea, $0.01 \text{ g L}^{-1} FeSO_4 \cdot 7H_2O$, and $0.2 \text{ g L}^{-1} MgSO_4 \cdot 7H_2O$. K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, $NaNO_3$, glucose, and urea were autoclaved at $121 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min (solution A).

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were prepared separately in sterile water (solution B) and mixed with solution A. For preparation of the solid medium, agar with an initial concentration of 20 g.L^{-1} was added to the liquid medium [3]. The culture was incubated at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ for 72 h with shaking at 180 rpm [3].

BIOEMULSIFIER PREPARATION

The raw bioemulsifier (Fig. 2) was extracted from bacterial culture by the method of Farahbakhsh et al. The cells were disrupted at $121 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min, and centrifuged at 10000 rpm and $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. Then a crude bioemulsifier preparation was obtained to remove the cells. Three volumes of cold ethanol were added to the supernatant and kept at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ overnight. Also, crude bioemulsifier precipitate was collected after centrifugation at 13,000 g for 20 min and was washed with distilled water.



Figure 2: Raw bioemulsifier.

FORMATION OF HEAVY OIL-IN-WATER EMULSION

In the emulsification process, 500 gr of heavy hydrocarbon emulsions in water which was produced with mixing of the heavy oil sample were heated to $65 \text{ }^\circ\text{C}$ with continuous stirring by 60%, 65%. In addition, 70% ratio of it in aqueous solution were prepared by dispersing emulsifier mixture (bioemulsifier+Stabiram=1.32%) in

distilled water at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ [3] and were mixed with a rotor-stator system. Then the heavy oil was added to aqueous phase and mixed with colloid mills stirring at 5000 rpm for 5 seconds. To ensure maximum stability of the emulsion during transportation, the bond between water and oil was reinforced by exposing the mixture to a cold shock of ice bath to reach $37 \text{ }^\circ\text{C}$. The viscosity of emulsions was measured by a Brook Field DV-II+Pro. Also, a decrease in emulsion viscosity was an indicator of the formation of the oil-in-water emulsion.

STABILITY OF HEAVY OIL EMULSION IN WATER

100 cc of the emulsion is closed in a graduated cylinder, and then closed for 24 hours at room temperature. Afterwards, the height of the separated water under the cylinder is measured. Then the stability of the emulsion is calculated by Eq. 1:

$$\text{Stability} = \frac{\text{Separated Water}}{\text{Total Height}} \times 100 \quad (1)$$

TESTING DESIGN

In this paper, the most suitable model was selected based on the number of selected factors, the tested levels and the large number of experiments to optimizing and simplifying analysis of the results while maintaining the relative quality of the Taguchi model analysis and Qualitek-4 software was used.

To calculate the effect of the error, all the experiments were performed with three repetitions, and the results were recorded. Results are analyzed by Signal-to-Noise (S/N) and ANOVA analysis methods. To evaluate the distribution of the results, the standard deviation function of the formulas 2 and 3 is used (as seen

in Eqs. 2 and 3):

$$S / N = 10 \log(msd) \quad (2)$$

$$MSD = [(y_1)^2 + (y_2)^2 + \dots + (y_n)^2] / n = [Avg.(y_i)^2] = Y_{exp}^2 \quad (3)$$

S/N is error rate, n is number of tests, y_i is results of each experiment, and Y_{exp} is response of the software in optimal conditions. Due to the fact that the purpose of emulsion formation is to reduce viscosity, the result of this project is the type of calculation and analysis "Smaller better". Moreover, the effective factors in the formation of O/W emulsion and their levels are summarized in Table 1.

Table 1: Effective factors in the formation of O/W emulsion and their levels

Effective factor	level		
	temperature	25	35
Raito of O/W(%)	60	65	70
Raito of BE/E (%)	70	80	90

RESULTS AND DISCUSSION

THE PRODUCTION OF BIO-EMULSION AND THE FORMATION OF HEAVY HYDROCARBON IN WATER EMULSIONS

The shape of the microscopic (1) bacterial strain and the shape (2) indicate the growth of the strain and the production of gross emulsifier. The use of chemical emulsion reduces viscosity significantly, but the use of emulsifying agents is essential for increasing the stability of emulsion. Microscopic image of heavy hydrocarbon is shown in Fig. 3a; in addition, the heavy hydrocarbon in water emulsion (Fig. 3b) was produced according to the design test, and the results of the viscosity of the experiments are presented in Table 2. All images are magnified 100 times.

The results are presented in Table 2 which have been analyzed by the Taguchi model based on ANOVA ANALYSIS.

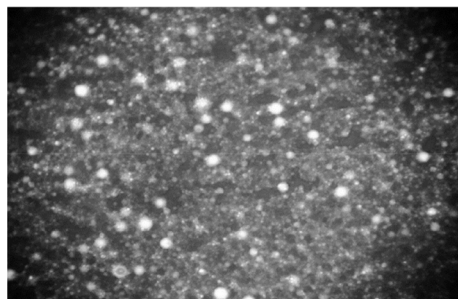


Figure 3a: Microscopic Image of Heavy Hydrocarbon.



Figure 3 b: Microscopic Image of Heavy Hydrocarbon in Water Emulsion.

Table 2: Viscosity results of experiments from Taguchi design.

Test No	Factor and level			Viscosity (cP)B.E (%)O (%)		
	T (°C)	O (%)	T (%)			
1	1	1	1	102	105	108
2	1	2	2	190	210	211
3	1	3	3	397	380	318
4	2	1	2	80	85	88
5	2	2	3	120	123.5	128
6	2	3	1	625	618	619
7	3	1	3	50	58	62
8	3	2	1	115	112	109
9	3	3	2	625	618	619
Heavy oil	1	-	-	2520	2520	2520
water	1	-	-	0.89	0.9	0.89

Moreover, the results of the experiments are presented in Table 3.

As shown in the ANOVA Table, the percentage of heavy hydrocarbons has the greatest effect on viscosity reduction. Afterwards, temperature and then the percentage of bioemulsifier have the greatest effect.

STABILITY

The results of the emulsion stability for 4 days are shown in Table 4. In addition, the stability of the emulsions was measured every 24 hours and calculated using Eq. 1.

The results show the high stability of emulsion which has been produced by *Bacillus licheniformis* strains.

Table 3: Analysis of ANOVA variance.

Factor	DOF	Sum of Squares	Variance	F-ratio	Pure Sum	[%] Percent
A Temperature [°C]	2	17.876	8.893	3.085	12.021	2.947
B Oil [wt.%]	2	368.252	184.126	63.877	362.487	88.883
C B/E [wt.%]	2	16.017	8.008	2.778	10.252	2.513
Other/Error	2	5.764	2.882	-	-	5.657
Total	8	407.821	-	-	-	%100

Table 4: Results of the stability of heavy hydrocarbon in water emulsion.

tests	Emulsion stability			
	Frist day	Second day	Third day	Forth day
1	89.65	76.73	50.9	45
2	100	94.06	94.06	94.06
3	100	100	100	100
4	100	97.03	93.02	93.02
5	100	100	100	100
6	100	94.82	93.52	87.07
7	100	100	100	100
8	61.22	48.29	25.77	93.02
9	95.54	95.54	94.06	93.02

CONCLUSIONS

In this paper, Taguchi experimental design has been used to investigate the effect of temperature, hydrocarbon concentration, chemical emulsifier concentration and chemical properties. The viscosity results from Taguchi are presented in Table 2. The ANOVA variance for analysis of Taguchi results is associated with the participation rate of each of the factors (Table 3). Temperature, heavy hydrocarbon concentration and bio-emulsifying concentration are three effective factors in reducing the viscosity of the emulsion, but analysis of variance in Table 3 showed that heavy hydrocarbon concentration is 88.88%, as the concentration of hydrocarbons is higher than water. This result is not far from the mind, and then the temperature is 2.94%, and then the emulsifier has the highest effect (2.51%). The reduction of viscosity is the main indicator of optimal conditions in this study. The optimal conditions for the Taguchi design are given in Table 5.

The optimum conditions have been predicted by

the Taguchi method correspond to the emulsion produced in the seventh experiment (Table 4). The results show that in this case the heavy hydrocarbon viscosity decreases from 2520cP to 62 cP. The stability results of this emulsion are shown in Table 4 that this emulsion is completely stable over a period of 4 days. Moreover, the results of this study show that the emulsifying composition of this bacterial strain and chemical emulsifier Stabiram 4582 has a high stability in addition to good results in reducing viscosity. Due to the high ability of this bacterial strain in the production of stable emulsions, the high purity of this emulsifier and the identification of its structure, the stability of this emulsion has been evaluated in pilot pipelines and used for salt water as a continuous phase of the effect of different salts and acidity levels of water. The optimum conditions have been predicted by the Taguchi method correspond to the emulsion produced in the seventh experiment (Table 4).

Table 5: Optimal conditions for Taguchi test design.

column/factor	Level Description	Level	Contribution
(A) T	45	3	1.944
(B) O	60	1	6.874
(C) B	90	3	1.886
Total Contribution From All Factors.....			10.613
Current Grand Average of Performance.....			-44.802
Expected Result At Optimum Condition.....			-34.188

REFERENCES

- [1]. Abdurahman N. H., Rosli.Y. M, Azhari N. H. and Hayder B. A., "*Pipeline transportation of viscous crudes as concentrated oil-in-water emulsions,*" Journal of Petroleum Science and Engineering, Vol. 90–91, pp 139–144, 2012.
- [3]. Abdurahman N. H., Azhari N. H. and Yunus Y. M., "*Formulation and evaluation of water-continuous emulsion of heavy crude oil prepared for pipeline transportation,*" International Journal of Engineering Science and Innovative Technology (IJESIT), Vol. 2, Issue 5, 2013.
- [5]. Farahbakhsh . A, Taghizadeh. M, Yakhchali. B, Movagharnejad.K, Zamani. H, "*Production of a New Emulsifier Material for the Formation Heavy Hydrocarbon/Water Emulsion,*" International Journal of Industrial Chemistry , Int. J. Ind. Chem., Vol. 2, No. 1, 2011.
- [6]. Ashrafizadeh S. N., Motae E. and Hoshyargar V., "*Emulsification of heavy crude oil in water by natural surfactants,* Journal of Petroleum Science and Engineering," Vol. 86–87, pp. 137–143, 2012.
- [7]. Santos R. G., Loh W., Bannwart A. C. and Trevisan O. V., "*An overview of heavy oil properties and its recovery and transportation methods,* Brazilian Journal of Chemical Engineering," Vol. 31, No. 03, pp. 571 - 590, 2014.
- [8]. Udonne J. D., "*Chemical treatment of emulsion problem in crude oil production,*" Journal of Petroleum and Gas Engineering Vol. 3, Issue 7, pp. 135-141, 2012.
- [9]. Hoshyagar V., Marjani A., Fadaei F. Shirazian, "*Prediction of flow behavior of crude oil-in-water emulsion through the pipe by using rheological properties,*" Oriental Journal of Chemistry, Vol. 28, No. 1, pp. 109-113 ,2012.
- [10]. Maniyar J., Doshi D., Bhuyan S. and Mujumdar S., "*Bioemulsifier production by streptomyces sp. S22 isolated from garden soil,*" Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 49, pp. 293-297, 2011.
- [11]. Trindade J., Freire M., F. Amaral P., Coelho M., Coutinho J. and Marrucho I., "*Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by Yarrowia lipolytica,*" Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng.Vol. 324, pp. 149-164, 2008.
- [12]. Bach H. and Gutnick D. L., "*Potential application of bioemulsifiers in the oil industry,*" Elsevier B. V., studies in surface science and catalysis, R. Vasquezduhalt and R. Quintero-Ramirez (Eds), Vol. 151, pp. 233-281, 2004.
- [13]. Greene A. C., Patel B. K. and Sheehy A. J., "*Deferribacter thermophilus gen. nov., sp.nov., a novel thermophilic manganese-and iron-reducing bacteria,*" International Journal of Systematic and Evolutionary, Vol. 47. No. 2, pp. 505-509, 1997.