



حذف فلزات سنگین نیکل، کروم و کادمیوم از خاک آلوده به نفت خام با استفاده از بیوسورفکتانت رامنولپید

نیره خلقی^۱، حسین امانی^{۲*}، شکوفه ملک محمودی^۳، علیرضا امیری^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، آستادیار، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، ^۲ دانشجوی دکتری، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، ^۳ استادیار، پژوهشکده نانو فناوری، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل.

چکیده

سابقه و هدف: نفت خام حاوی مقادیر بالایی از فلزات سنگین است که در صورت ریزش در خاک موجب آلودگی خاک می‌شوند. هدف از این مطالعه، بررسی عملکرد بیوسورفکتانت رامنولپید در حذف فلزات سنگین نیکل، کروم و کادمیوم از خاک آلوده به نفت خام است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق مقطعی-توصیفی ابتدا بیوسورفکتانت رامنولپید از باکتری *Sordomonas* آئروجینوسا تولید و سپس با آزمون‌های TLC و FTIR اثبات شد. در مرحله بعدی ابتدا خاک ماسه‌ای با ابعاد ۲ میلی‌متر با نفت خام (API=۳۲/۸۳) و ویسکوزیته ۶/۲۱ cp درون یک بشر آلوده شد. خاک آلوده به نفت خام درون فالكون‌های حاوی محلول شستشو شامل بیوسورفکتانت رامنولپید (نسبت ۱:۱۰) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط مختلف دمایی، غلظت و pH شستشو داده شد. محلول حاوی فلزات سنگین برای رهائش فلزات به شکل یون، هضم اسیدی گردید. میزان حذف فلزات سنگین توسط بیوسورفکتانت رامنولپید با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میزان حذف فلزات سنگین از خاک آلوده در شرایط بهینه ۲۵ °C، غلظت ۰/۸ g/l و میزان pH ۱۱ برای نیکل، کروم و کادمیوم به ترتیب برابر با ۴۳/۰۵٪، ۳۴/۷۳٪ و ۵۲/۸۱٪ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: شستشوی خاک به وسیله بیوسورفکتانت تولید شده در این تحقیق منجر به حذف فلزات سنگین بدون آثار مخرب سورفکتانت‌های شیمیایی می‌شود و خطرات محیط زیستی را کاهش می‌دهد. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان استفاده از بیوسورفکتانت‌ها را برای حذف فلزات سنگین حاصل از نفت خام به صنایع پیشنهاد نمود.

واژگان کلیدی: بیوسورفکتانت، رامنولپید، خاک آلوده، حذف فلزات سنگین.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۷

(* آدرس برای مکاتبه: بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی

پست الکترونیک: hamani@nit.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۸۳۶۲۴۲۴۰



مقدمه

فلزات سنگین با ایجاد کمپلکس و یا تبادل یونی توسط بیوسورفکتانت‌ها حذف می‌شوند (۹).

مکانیسم حذف فلزات سنگین توسط بیوسورفکتانت‌ها بدین صورت است که در مرحله‌ی اول بیوسورفکتانت به سطح خاک جذب می‌شود و با فلزات ایجاد کمپلکس می‌نماید سپس در مرحله‌ی دوم فلزات سنگین توسط محلول شستشو از خاک جدا شده و وارد محلول می‌شوند. در مرحله‌ی سوم فلزات سنگین توسط جاذبه‌ی الکترواستاتیک درون میسل‌ها به دام می‌افتند و می‌توانند به راحتی توسط ترسیب و یا با استفاده غشا جداسازی شوند (شکل ۱). بیوسورفکتانت‌های آنیونی با برقراری پیوندهای یونی، یک کمپلکس غیر یونی با فلزات سنگین تشکیل می‌دهند. از آنجایی که پیوند بین فلزات سنگین و مولکول‌های بیوسورفکتانت قوی‌تر از پیوندهای بین فلزات سنگین و خاک هستند، کمپلکس فلز-بیوسورفکتانت از سطح خاک جدا می‌شود (۱۰).

تجزیه‌پذیری زیستی، سمیت پایین و فعالیت مناسب سطحی بیوسورفکتانت‌ها را به گزینه‌ی مناسبی برای حذف فلزات سنگین از خاک و رسوبات تبدیل نموده است. داس (Das) و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که رامنولیبیدها می‌توانند در حضور کاتیون‌های آب و خاک، با فلزات سنگین مانند کادمیوم و سرب تشکیل کمپلکس بدهند و آن‌ها را به خوبی حذف کنند (۱۱). هدایتی (Hidayati) و همکاران در سال ۲۰۱۴ به منظور حذف فلزات سنگین از رسوب به کمک بیوسورفکتانت‌ها، از آزمون‌های شستشوی ناپیوسته استفاده کردند. آن‌ها از بیوسورفکتانت تولید شده از *اسیتوباکتر* و



شکل ۱: مکانیسم حذف فلزات سنگین از خاک توسط بیوسورفکتانت (۱۰).

تبدیل شدن موجودات ما قبل تاریخ به نفت در اثر فشار و دمای بالای لایه‌های زیرین زمین، موجب ورود فلزات سنگین موجود در بدن این جانوران به درون نفت خام شده است. نفت خام ممکن است به هنگام استخراج، طی حمل به پالایشگاه، ترکیب‌های لوله‌های انتقال نفت، تصادف تانکرها، نشت مخازن سطحی و ... خاک‌های سطحی اطراف را آلوده سازد. خاک بستر رشد گیاهان و منبع اصلی زنجیره‌ی غذایی جانوری و انسانی است، آلودگی خاک به نفت خام باعث خطرات جدی برای انسان‌ها و جانوران می‌گردد (۱).

تاکنون روش‌های مختلفی همچون تخریب حرارتی، تثبیت خاک، گیاه پالایی، خاک شویی، استفاده از مواد شیمیایی مانند سورفکتانت‌ها برای حذف آلودگی‌های نفتی به کار گرفته شده است. سورفکتانت‌ها مولکول‌های آمفی‌پاتیک یا دوگانه‌دوستی هستند که از یک قسمت غیرقطبی آب‌گریز متصل به یک قسمت آب‌دوست که می‌تواند قطبی یا یونی باشد تشکیل شده‌اند. به دلیل این ماهیت دوگانه‌دوست، تمایل به جذب شدن به سطح دارند. آن‌ها کشش سطحی بین آب و هیدروکربن‌ها را کاهش می‌دهند و با تشکیل میکرومولسیون، هیدروکربن‌ها را از محلول جدا می‌کنند. اخیراً تمایل به جایگزینی ترکیبات شیمیایی با ترکیبات دوست‌دار محیط زیست منجر به استفاده از بیوسورفکتانت‌ها به جای سورفکتانت‌های شیمیایی شده است (۲ و ۳). بیوسورفکتانت‌ها مواد فعال سطحی هستند که به روش زیستی و توسط باکتری، قارچ یا مخمرها به عنوان ترکیبات خارج سلولی تولید می‌شوند و جایگزین مناسبی برای سورفکتانت‌های شیمیایی می‌باشند. همان‌طور که گفته شد، فلزات سنگین در اثر ریزش نفت خام می‌توانند خاک را آلوده نمایند. فلزاتی همچون کروم، کادمیوم، جیوه و سرب می‌توانند اکوسیستم و سلامتی انسان را از طریق زنجیره‌ی غذایی یا تماس مستقیم با خاک و آب آلوده، تهدید کنند (۴ و ۵). مطالعات بسیاری در ارتباط با حذف فلزات سنگین به وسیله‌ی بیوسورفکتانت‌ها گزارش شده است (۶-۸). فلزات سنگین عموماً به شکل رسوب و یا یون به سطح خاک جذب می‌شوند.

مواد و روش‌ها

(الف) سویه میکروبی: باکتری مورد نظر در این مطالعه سودوموناس آئروجینوسا PTCC 1340 بود که از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شد.

(ب) محیط پیش کشت: از محیط لاکتوز برات (Merck آلمان) به مقدار ۲۵ g/l به عنوان پیش کشت استفاده شد. ۱۰۰ ml از این ماده در یک ارلن ۵۰۰ ml، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C درون اتوکلاو قرار داده شد. پس از خنک شدن یک لوپ باکتری به آن افزوده شد و مدت ۲۴ ساعت درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ °C و ۱۵۰ rpm قرار داده شد.

(ج) محیط کشت اصلی: محیط کشت اصلی استفاده شده، شامل مواد مغذی، عناصر و فلزات مورد نیاز برای رشد باکتری است که با استفاده از ترکیبات مختلف قابل تامین است. نیتروژن مورد نیاز از نمک NaNO_3 محیط تامین گردید (جدول ۱) (۱۶). ۵ درصد حجمی از محیط پیش کشت در شرایط استریل به ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اصلی، تلقیح شده و در ۳۷ °C و ۱۵۰ rpm به مدت ۷ روز درون شیکر انکوباتور قرار گرفت. برای جلوگیری از وقوع واکنش میلارد (Millard) به هنگام استریل نمودن محلول محیط کشت، گلوکز به صورت جداگانه اتوکلاو شد.

(د) استخراج رامنولیپید: استخراج با حلال اتیل استات برای بازیابی اولیه بیوسورفکتانت از محیط کشت صورت گرفت. استخراج در pH بین ۲-۳ انجام شد که رامنولیپید در این محدوده pH در حلال‌های آلی محلول است. ابتدا نمونه گرفته شده از محیط کشت به نسبت حجمی برابر با اتیل استات

جدول ۱: ترکیبات اصلی محیط کشت مورد استفاده.

| غلظت (g/l) | نام ترکیب | غلظت (g/l) | نام ترکیب |
|------------|---|------------|--|
| ۴ | Glucose | ۰/۰۵ | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| ۲۳ | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | ۰/۱ | KCl |
| ۱۱ | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | ۱/۵ | NaNO_3 |
| ۰/۲۸ | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | ۲ | $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
| ۱/۲ | $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | ۱/۴ | $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ |
| ۰/۸ | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | ۱/۲ | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ |

سودوموناس پوتیدا/ برای بررسی حذف فلزات سنگین سرب، مس و روی استفاده کردند. در مطالعه آن‌ها بیشترین حذف سرب به میزان ۱۴٪ مربوط به /سینتوباکتر و سپس سودوموناس پوتیدا/ داری بیشترین حذف برای روی و مس به ترتیب به ۶۵٪ و ۲٪ به دست آمد. آن‌ها گزارش نمودند که بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند به عنوان یک عامل شستشو در حذف فلزات سنگین از رسوبات استفاده گردند (۱۲).

اوروم (Urum) و پکدمیر (Pekdemir) در سال ۲۰۰۴، اثر پاک‌کنندگی محلول مایع بیوسورفکتانت‌ها در پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام را با بیوسورفکتانت‌هایی مانند استین، لسیتین، رامنولیپید، ساپونین و تانین مطالعه کردند. نتایج نشان داد که بیوسورفکتانت‌ها قادرند مقدار قابل ملاحظه‌ای از نفت خام را از خاک آلوده حذف نمایند. به طوری که برای رامنولیپید و SDS تا ۸۰٪ و لسیتین تا ۴۲٪ حذف آلودگی اندازه گیری شد (۱۳). همچنین مولیگان (Mulligan) و ونگ (Wang) در سال ۲۰۰۴ در مطالعه تصفیه خاک آلوده به فلزات سنگین به کمک فوم رامنولیپید، توانستند کادمیوم را تا ۷۳٪ و نیکل را تا ۶۸٪ از خاک آلوده حذف کنند (۶).

ون (Wen) و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی تخریب رامنولیپید در خاک‌های آلوده به روی و کادمیم دریافتند که این ترکیبات می‌توانند تا زمان افزایش نیافتن فیتواکسترکشن (Phytoextraction) فلزات در خاک باقی بمانند (۱۴).

با توجه به مطالعات پیشین و موفقیت آمیز بودن عملکرد بیوسورفکتانت‌ها در حذف فلزات سنگین و آلودگی‌های نفتی از خاک، و همچنین نفت‌خیز بودن کشور ایران و احتمال ریزش نفت خام و نفوذ آن به خاک، انجام تحقیق در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. به دلیل بالا بودن حجم آلودگی‌ها بهتر است این پاک‌کننده‌ها فاقد سمیت و تجزیه پذیر باشند (۱۵).

هدف از این مطالعه، استفاده از بیوسورفکتانت رامنولیپید به عنوان یک شوینده‌ی زیست تخریب‌پذیر و فاقد سمیت که توانایی بالایی در حذف فلزات سنگین از خاک آلوده به عنوان یک مدل بومی بود.

ترکیب گردیده و با سرعت ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس فاز آلی جدا شده و در تبخیر کننده خلا (TAT-Rdij) با دمای ۵۰ °C، اتیل استات محلول در آن تبخیر شد و در نهایت رامنولپید زرد رنگ ظاهر شد. اثبات تولید رامنولپید توسط آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. برای این منظور، ابتدا کاغذ TLC (کد ۱۰۵۵۵۴ مرک) آماده گردید. سپس با سمپلر ۵μl، چند قطره از بیوسورفکتنت با کلروفورم رقیق شده، روی کاغذ TLC قرار گرفته و شماره گذاری شد. در نهایت کاغذ TLC به صورت عمودی وارد فاز متحرک شامل کلروفورم، متانول و استیک اسید با نسبت حجمی (۶۵:۱۵:۲) شد. هنگامی که فاز متحرک به انتهای کاغذ TLC رسید، کاغذ از فاز متحرک خارج شده و درون محلول آشکار ساز شامل انسالدید، اسید سولفوریک، استیک اسید (۱:۲:۵۰) شناور گردید. پس از ۱۰ دقیقه کاغذ از محلول خارج شد و پس از خشک شدن در دمای ۱۵۰ °C، لکه‌های زرد رنگ مربوط به رامنولپید که بر اساس میزان آب گریزی‌شان جدا شدند روی کاغذ ظاهر شد. برای محاسبه‌ی فاکتور تأخیر R_f از رابطه (۱) استفاده شد (۱۷).

(و) شستشوی خاک آلوده به نفت توسط بیوسورفکتنت رامنولپید: در این مطالعه میزان مشخصی از محیط کشت در روز هفتم سانتریفیوژ شده و رومانند حاوی محصول رامنولپید به عنوان محلول شستشو استفاده گردید. آزمایش‌های شستشو به صورت ناپیوسته و درون لوله‌های فالكون حاوی ۳ گرم خاک آلوده و ۳۰ میلی‌لیتر محلول شستشو انجام گردید. همه‌ی نمونه‌ها برای برقراری تماس کامل بین خاک و محلول شستشو، درون شیکر انکوباتور در ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و سپس تاثیر عوامل مختلف از جمله دما، pH و غلظت رامنولپید روی حذف فلزات سنگین از خاک آلوده، مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

(ز) تعیین غلظت اولیه فلزات سنگین در خاک آلوده به نفت خام: برای اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین در نمونه مجهول از روش هضم اسیدی استفاده شد که در این روش، فلزات سنگین از خاک آلوده به محلول اسیدی منتقل می‌شود و غلظت فلزات سنگین در مایع شفاف به دست آمده توسط دستگاه جذب اتمی (Shimadzu 6300 AA) قابل اندازه‌گیری است. در این مطالعه به منظور استخراج فلزات سنگین از خاک آلوده به نفت خام از تیزاب سلطانی استفاده شد. ۱ گرم از خاک آلوده به همراه ۲۰ میلی‌لیتر از تیزاب (۱:۳) هیدروکلریک اسید و نیتریک اسید) در بشر ریخته شد و مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سپس در ۱۱۰ °C درون حمام پارافین روی هیتر قرار گرفت. محلول شروع به جوشیدن نموده و تا زمانی که محلول شفاف حاصل شد روی هیتر باقی ماند. سپس محلول شفاف را که به نصف حجم اولیه رسیده بود، به کمک کاغذ صافی صاف شده و درون بالون با افزودن آب مقطر به حجم می‌رسد. محلول آماده‌ی اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین با دستگاه اسپکتروفتومتری جذب اتمی گردید (۱۹).

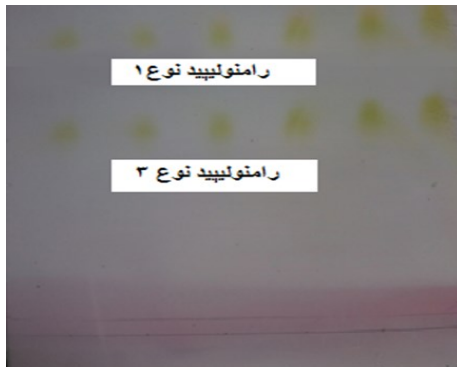
$$R_f = \frac{\text{فاصله طی شده توسط ماده مورد نظر}}{\text{فاصله طی شده توسط حلال}} \quad \text{رابطه (۱)}$$

(ه) ویژگی‌های خاک و نفت: خاک مورد استفاده در این مطالعه خاک ماسه‌ای با مش ۲۰، از آزمایشگاه ژئوتکنیک لرنه‌ای دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل تهیه شد. خاک ابتدا با آب دیونیزه شستشو داده شده و سپس درون هیتر خشک شد. هم‌چنین نفت خام مورد استفاده در این مطالعه از واحد تحقیقاتی پالایشگاه دانشگاه تهران ایران تهیه شد. ویژگی‌های نفت خام در جدول ۲ آورده شده است. برای انجام آزمایش‌ها میزان ۵۰۰ گرم از خاک با ۱۶۷ گرم از نفت خام آلوده شد.

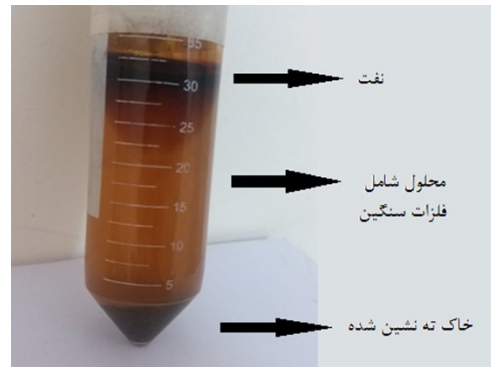
جدول ۲: ویژگی‌های نفت خام.

| | |
|---------------------------|---------|
| S.G | ۰/۸۱۱ |
| API.G | ۳۲/۸۳ |
| R.V.P | ۵۱ Kpa |
| T.A.N (total acid number) | ۰/۲۱ |
| VISCOSITY @ 25 °C | ۶/۲۱ cp |

(ح) استخراج فلزات سنگین از محلول شستشو: نمونه‌ی خاک آلوده، پس از شستشو توسط محلول بیوسورفکتنت در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌گردید. پس از سانتریفیوژ، ۳ فاز تشکیل شد. شامل خاک در قسمت انتهایی، محلول رومانند حاوی فلزات سنگین حذف شده در قسمت



شکل ۲: آنالیز TLC رامنولیبید.



شکل ۳: نمونه حاوی خاک و محلول پس از اتمام شستشو.

غلظت فلزات سنگین موجود در نمونه‌ها از رابطه ۲ محاسبه می‌گردد (۱). بازده حذف فلزات سنگین نیز از رابطه ۳ محاسبه گردید.

(۲) غلظت فلز در محلول شستشو (mg/l) = غلظت اندازه گیری شده فلز توسط دستگاه (mg/l) × $\frac{\text{حجم نهایی محلول هضم شده ml}}{\text{حجم نمونه اولیه ml}}$

(۳) بازده حذف فلزات سنگین = $\frac{\text{غلظت فلزات سنگین در محلول شست و شو}}{\text{غلظت فلزات سنگین در اولیه خاک آلوده}} \times 100$

یافته‌ها

الف) آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): برای اثبات تولید رامنولیبید آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک انجام گردید. نتایج این آنالیز در شکل ۳ نشان داده شده است. مقدار فاکتور تأخیر به دست آمده برای این آنالیز برابر با ۰/۳۲ و ۰/۶۶ بود. در ضمن در جدول ۳ فاکتورهای تأخیر نمونه استاندارد نشان داده شده است.

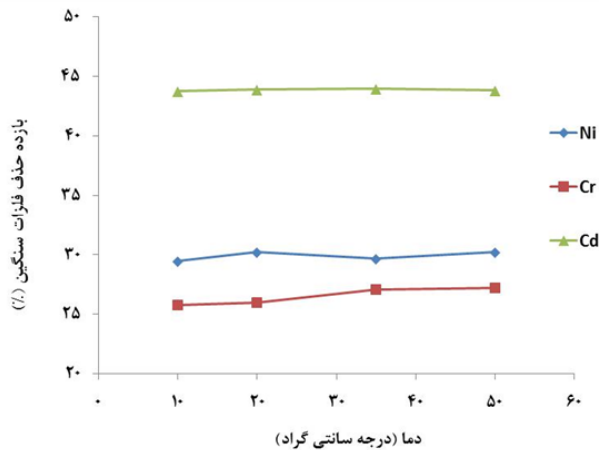
ب) بررسی اثر غلظت رامنولیبید در حذف فلزات سنگین نیکل، کروم و کادمیوم از خاک آلوده به نفت خام: از آنجایی که بیوسورفکتنت رامنولیبید دارای غلظت بحرانی تشکیل میسل برابر ۰/۲ g/l می‌باشد، از این رو محلول رامنولیبید با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ به خاک آلوده به نفت خام افزوده شد و در میزان pH ۶/۵ درون لوله‌های فالدون به مدت ۲۴ ساعت و ۲۵ °C درون شیکر انکوباتور با ۱۵۰ rpm شستشو داده شد. سپس غلظت فلزات نیکل، کروم و کادمیوم در فاز میانی اندازه‌گیری شد.

میانی و لایه‌ای از نفت که به وسیله مکانیسم تحرک از خاک جدا شده و به دلیل چگالی کم‌تر در قسمت بالایی قرار گرفته است (شکل ۲).

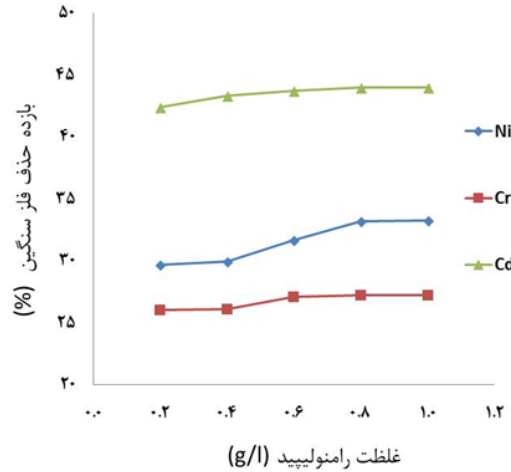
نمونه‌ها از فاز میانی گرفته شده و برای رهاسازی فلزات سنگین به دام افتاده درون میسل‌های بیوسورفکتنت، هضم اسیدی می‌شدند. به منظور آنالیز فلزات سنگین در محلول شستشو روش هضم اسیدی مطابق استاندارد US-EPA 3010A صورت گرفت (۲۰). در این روش مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از فاز میانی برداشته شد و با ۰/۴۵ ml از اسید نیتریک مخلوط شد. محلول حاصل روی هیتر با دمای ۹۵-۹۰ °C قرار گرفت تا حجم آن به یک سوم کاهش یابد. پس از خنک شدن مجدداً ۰/۴۵ ml اسید نیتریک به آن اضافه شده و بر روی هیتر قرار گرفت. این امر تا شفاف شدن کامل محلول ادامه یافت سپس ۰/۴۵ ml اسید هیدروکلریک رقیق شده با آب (به نسبت ۱:۱) به آن افزوده و ۱۵ دقیقه روی هیتر قرار داده شد. محلول شفاف با کاغذ صافی فیلتر شده و به وسیله آب مقطر به حجم ۲۵ ml رسید. در این حالت محلول آماده‌ی اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی می‌گردد. در نهایت

جدول ۳: فاکتور تأخیر رامنولیبیدهای مختلف (۲۱).

| نوع رامنولیبید | فاکتور تأخیر (Rf) |
|----------------|-------------------|
| RL1 | ۰/۶۵ |
| RL2 | ۰/۴۸ |
| RL3 | ۰/۳۱ |
| RL4 | ۰/۱۴ |



شکل ۵: بازده حذف فلزات سنگین بر حسب تغییرات دما.



شکل ۴: بازده حذف فلزات سنگین بر حسب تغییرات غلظت رامنولیپید.

همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود میزان حذف فلزات نیکل، کروم و کادمیوم با افزایش غلظت رامنولیپید، افزایش می‌یابد و غلظت بهینه‌ی حذف فلزات سنگین نیز غلظت ۰/۸ g/l می‌باشد.

بررسی اثر دمای شستشو در حذف فلزات سنگین نیکل، کروم و کادمیوم از خاک آلوده به نفت خام: میزان حذف فلزات نیکل، کروم و کادمیوم ثابت ۰/۸ g/l رامنولیپید و دمای ثابت ۲۵ °C برای مقادیر pHهای برابر با ۳، ۷، ۹ و ۱۱ مورد بررسی قرار گرفت. پس از آنالیز غلظت فلزات سنگین، الگوی حذف فلزات برای هر سه فلز نیکل، کروم و کادمیوم به طور مشابه تکرار شد. مشاهده شد که با افزایش pH و قلیایی شدن محلول شستشو میزان حذف فلزات افزایش یافت. همان طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، بیشترین میزان بازده برای حذف فلزات نیکل، کروم و کادمیوم در بالاترین مقدار pH، به ترتیب برابر با ۴۳/۰۵٪، ۳۴/۷۳٪ و ۵۲/۸۱٪ بود.

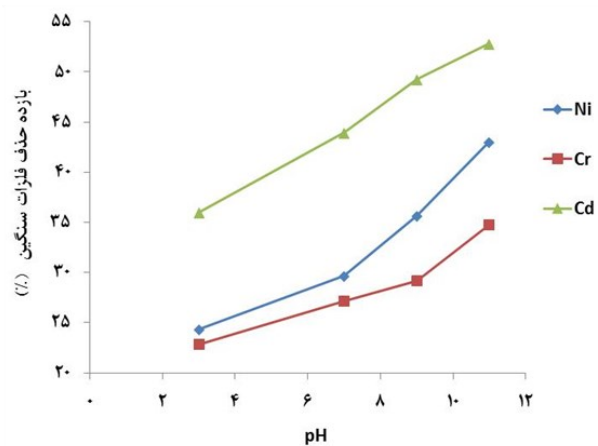
بحث

با توجه به شکل ۳ و مقایسه‌ی فاکتورهای تاخیر بدست آمده با اعداد نمونه‌ی استاندارد در جدول ۳ مشخص شد که بیوسورفکتنت‌های تولید شده مربوط به رامنولیپید نوع ۱ و ۳ می‌باشند. نتایج یادشده با یافته‌های سایر محققین سازگاری دارد (۲۲). بنابراین تولید رامنولیپید در این تحقیق تایید می‌گردد. پس از تایید تولید رامنولیپید توسط آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک اثر تغییرات غلظت، دما و pH بر بازده حذف فلزات سنگین توسط بیوسورفکتنت رامنولیپید مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی اثر غلظت، همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد با افزایش غلظت رامنولیپید در محلول شستشو، میزان حذف فلزات نیکل، کروم و کادمیوم از خاک نسبت به

همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود میزان حذف فلزات نیکل، کروم و کادمیوم با افزایش غلظت رامنولیپید، افزایش می‌یابد و غلظت بهینه‌ی حذف فلزات سنگین نیز غلظت ۰/۸ g/l می‌باشد.

بررسی اثر دمای شستشو در حذف فلزات سنگین نیکل، کروم و کادمیوم از خاک آلوده به نفت خام: میزان حذف فلزات نیکل، کروم و کادمیوم ثابت ۰/۸ g/l رامنولیپید، در میزان pH ۶/۵ برای دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. شستشو در دماهای ۱۰ °C، ۲۰ °C، ۳۵ °C و ۵۰ °C درون شیکر انکوباتور انجام شد. نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است. بررسی نتایج حاصل از آنالیز فلزات سنگین نشان می‌دهد که بازده حذف فلزات سنگین، با افزایش دما افزایش اندکی افزایش می‌یابد.

د) بررسی اثر pH در حذف فلزات سنگین نیکل، کروم و



شکل ۶: بازده حذف فلزات سنگین بر حسب تغییرات pH.

می‌یابد. تغییرات در فرایند حذف فلزات تحت تاثیر دامنه های مختلف pH به دلیل تغییر در ساختار رامنولیبید می‌باشد. چمپیون (Champion) و همکاران نیز مشاهده نمودند که در محیط اسیدی مولکول‌های رامنولیبید دارای اندازه‌های بزرگ‌تر بوده و این اندازه در گستره های pH بازی کوچک‌تر می‌گردد و ذرات رامنولیبید میسل‌ها را تشکیل می‌دهند.

میکروگرافی (Micrography) مولکول‌های رامنولیبید به وضوح نشان می‌دهد که مورفولوژی رامنولیبید تابعی از pH است. رامنولیبیدها در محلول ساختارهای متفاوتی هم‌چون صفحه‌ای لاملا (lamella)، کروی، استوانه‌ای، مکعبی و میسلی تشکیل می‌دهند. با افزایش pH ساختارهای صفحه‌ای مولکول‌های رامنولیبید، مرتباً کاهش یافته و ساختارهای کره‌ای افزایش می‌یابند. با ادامه‌ی فرایند افزایش pH مورفولوژی از ساختارهای کروی بزرگ به ساختارهای کروی کوچک تبدیل می‌شود. سرانجام در گستره pH بالاتر از ۸، ساختارهای کروی به ساختارهای میسلی تغییر می‌کنند. ساختارهای مختلف با تجمع مونومرهای رامنولیبید شکل می‌گیرند. این ساختارها به نسبت قطر موثر گروه‌های قطبی آب دوست به قطر موثر گروه‌های آب‌گریز بستگی دارند. اگر این نسبت به ۱ نزدیک باشد مونومرها ساختار صفحه‌ای تشکیل می‌دهند. با افزایش این نسبت، ساختار صفحه‌ای انحنا می‌یابد و ساختاری کره‌ای را شکل می‌دهد. چنانچه این نسبت هم‌چنان افزایش یابد، میسل‌ها شکل می‌گیرند. با افزایش pH و انتقال بار بین گروه‌های قطبی، بار منفی گروه‌های آب‌دوست رامنولیبید (تراکم بار یونی گروه‌های کربوکسیل)، افزایش یافته و گروه‌هایی با قطر سر بزرگ‌تر را شکل می‌دهد. بنابراین مقدار نسبت گفته شده از ۱ بیشتر خواهد شد و این امر فرایند تغییر مورفولوژی رامنولیبیدها را تشریح می‌کند. فلزات سنگین معمولاً درون حفره‌های بسیار ریز و غیرقابل تحرک خاک قرار دارند. هرچه اندازه مولکول‌های رامنولیبید کاهش یابد، به نفع حذف فلزات است زیرا رامنولیبید می‌تواند بسیار آسان‌تر به ذرات خاک نفوذ کرده و به فلزات سنگین دسترسی یابد. همچنین با افزایش pH جذب رامنولیبید به سطح خاک کاهش می‌یابد بنابراین تحرک

حالت اولیه به ترتیب به مقدار ۰/۱۲٪، ۰/۴/۵٪ و ۰/۳/۸٪ افزایش می‌یابد، زیرا مولکول‌های بیشتری از رامنولیبید برای شرکت در فرایند شستشو در دسترس هستند. چن (Chen) و همکاران نیز در مطالعه خود مشابه این روند افزایشی را برای حذف فلزات سنگین در اثر افزایش غلظت رامنولیبید گزارش کرده‌اند (۱).

همچنین در شکل ۴ مشاهده می‌گردد بازده حذف فلز کادمیوم بیش از دو فلز نیکل و کروم مشاهده شد. این امر ناشی از ضعیف‌تر بودن پیوند بین کادمیوم و ذرات خاک نسبت به پیوندهای نیکل و کروم می‌باشد. پیوند کادمیوم با خاک از نوع تبادل‌ی است. پیوند تبادل‌ی، ارتباط ضعیف و سست فلزات سنگین با خاک است و کوچک‌ترین تغییر در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، احتمال شکسته شدن این پیوند را افزایش می‌دهد. کادمیوم عنصری است که پتانسیل محلول شدن و متحرک شدن در خاک را دارد و وجود لیگاندهای آلی سبب تسریع در این امر می‌شود. با توجه به شکل ۴ می‌توان گفت کروم نسبت به نیکل و کادمیوم قابلیت تحرک کم‌تری دارد (۲۳). پیوند کروم و نیکل با خاک قوی‌تر بوده و برای حذف از خاک به مکانیسم مخصوص مانند تشکیل کمپلکس و یا ترکیب با موادی هم‌چون اکسی‌هیدروکسیدهای آهن و منگنز نیاز دارند (۲۴). در مطالعه اثر دما، بررسی نتایج حاصل از آنالیز فلزات سنگین نشان می‌دهد که بازده حذف فلزات سنگین، با افزایش دما اندکی افزایش می‌یابد. افزایش دما موجب کاهش نیروی پیوستگی و چسبندگی و کاهش ویسکوزیته نفت خام شده و با افزایش تحرک آن، امکان برخورد بین نفت و مولکول‌های رامنولیبید را افزایش می‌دهد. با این حال همان‌طور که در شکل ۵ قابل مشاهده است نرخ حذف فلزات سنگین از خاک آلوده به نفت خام، در دماهای بیش از ۲۵ °C تقریباً ثابت است.

اوروم (Urum) و همکاران نیز در مطالعه خود برای حذف نفت از خاک آلوده مشاهده نمودند که میزان حذف نفت توسط بیوسورفکتانت در دماهای بیش از ۲۰ °C تا ۵۰ °C تقریباً ثابت بود (۲۵). در مطالعه‌ی اثر pH بر حذف فلزات سنگین از خاک آلوده، همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود با افزایش pH محلول، بازده حذف فلزات سنگین از خاک آلوده نیز افزایش

شستشو داده شد. بازده شستشو به غلظت رامنولپید، دما و pH اولیه‌ی محلول شستشو وابسته است. به طور کلی، ۰/۴۳/۰۵٪، ۰/۸/۰/۳۴/۷۳٪ و ۰/۵۲/۸۱٪ از نیکل، کروم و کادمیوم در غلظت ۰/۸ رامنولپید و pH برابر ۱۱ پس از ۲۴ ساعت شستشو در دمای محیط حذف گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که شستشوی خاک به وسیله‌ی بیوسورفکتنت منجر به حذف فلزات سنگین بدون آثار مخرب سورفکتنت‌های شیمیایی می‌شود و خطرات محیط زیستی را کاهش می‌دهد. بر اساس نتایج اولیه این تحقیق می‌توان استفاده از مواد طبیعی مانند بیوسورفکتنت‌ها را برای حذف فلزات سنگین حاصل از نفت خام به صنایع پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از حمایت دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل به دلیل در اختیار قرار دادن اعتبار پژوهشی شماره BNUT/۹۷/۳۷۰۳۴۲ اعلام می‌دارند.

رامنولپید افزایش یافته و قابلیت بیشتری برای حذف فلزات خواهد داشت. با توجه به شکل ۶ میزان حذف فلز کادمیوم از دو فلز نیکل و کروم بیشتر مشاهده می‌شود. فلز کادمیوم با ایجاد پیوند یونی با گروه‌های کربوکسیل یونیزه شده ایجاد کمپلکس می‌نماید. این امر موجب تثبیت ساختار کروی رامنولپید خواهد شد. بنابراین بازده حذف فلز کادمیوم افزایش خواهد یافت.

با توجه به موفقیت آمیز بودن نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد که استفاده از بیوسورفکتنت‌ها در پاک‌سازی خاک‌های آلوده و فلزات سنگین روشی نوین و دوست دار محیط زیست است اما بالا بودن هزینه‌های تولید نسبت به مواد شیمیایی مشابه از چالش‌های پیش روی این روش می‌باشد. بنابراین تولید ارزان این مواد سبز می‌تواند مد نظر تحقیقات آینده باشد.

نتیجه گیری

خاک آلوده به نفت خام به وسیله‌ی بیوسورفکتنت رامنولپید

References

1. Chen W, Qu Y, Xu Z, He F, Chen Z, Huang S. Heavy metal (Cu, Cd, Pb, Cr) washing from river sediment using biosurfactant rhamnolipid. *Environ Sci Pollut Res*. 2017; 24(19): 16344-16350.
2. Henkel M, Geissler M, Weggenmann F, Hausmann R. Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnol J*. 2017; 12(7): 1-10.
3. Aghajani M, Rahimpour A, Amani H, Taherzadeh M. Rhamnolipid as new bio-agent for cleaning of ultrafiltration membrane fouled by whey. *Eng Life Sci*. 2018; 18(5): 272-280.
4. Mao X, Jiang R, Xiao W, Yu J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. *J Hazard Mater*. 2015; 285: 419-435.
5. Das P, Mukherjee S, Sen R. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids Surf B*. 2009; 71(2): 183-186.
6. Mulligan CN, Wang S. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. *Eng Geol*. 2006; 85(1-2): 75-81.

7. Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv.* 2007; 25(1): 99-121.
8. Hazra C, Kundu D, Chaudhari A. Biosurfactant-assisted bioaugmentation in bioremediation. *Microorganisms in Environmental Management*: Springer; 2012. p. 631-664.
9. Swarnkar V, Agrawal N, Tomar R. Sorption of chromate and arsenate by surfactant modified erionite (E-SMZ). *J Dispersion Sci Technol.* 2012; 33(6): 919-927.
10. Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J Biosci Bioeng.* 2002; 94(3): 187-201.
11. Das AJ, Lal S, Kumar R, Verma C. Bacterial biosurfactants can be an ecofriendly and advanced technology for remediation of heavy metals and co-contaminated soil. *Int J Environ Sci Technol.* 2017; 14: 1343-1354.
12. Hidayati N, Surtiningsih T, Matuzahroh N. Removal of heavy metals Pb, Zn and Cu from sludge waste of paper industries using biosurfactant. *J Bioremed Biodeg.* 2014; 5(7): 1-3.
13. Urum K, Pekdemir T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere.* 2004; 57(9): 1139-1150.
14. Wen J, Stacey SP, McLaughlin MJ, Kirby JK. Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. *Soil Bio Biochem.* 2009; 41(10): 2214-2221.
15. Rahman PK, Gakpe E. Production, characterisation and applications of biosurfactants :Review. *Biotechnol.* 2008; 7(2): 360-370.
16. Schmidberger A, Henkel M, Hausmann R, Schwartz T. Expression of genes involved in rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a bioreactor cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97: 5779-5791.
17. Lan G, Fan Q, Liu Y, Chen C, Li G, Yin X. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochem Eng J.* 2015; 101: 44-54.
18. Zhai X, Li Z, Huang B, Luo N, Huang M, Zhang Q. Remediation of multiple heavy metal-contaminated soil through the combination of soil washing and in situ immobilization. *Sci Total Environ.* 2018; 635: 92-99.
19. Alsaleh KA, Meuser H, Usman AR, Al-Wabel MI, Al-Farraj AS. A comparison of two digestion methods for assessing heavy metals level in urban soils influenced by mining and industrial activities. *J Environ Manage.* 2018; 206: 731-739.

20. Kissler MI. Digestion of solid matrices Part 1: Digestion with aqua regia report of evaluation study. *Time (min)*. 2005; 2: 250.
21. Hošková M, Schreiberová O, Ježdík R, Chudoba J, Masák J, Sigler K. Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. *Bioresour Technol*. 2013; 130: 510-516.
22. Lan G, Fan Q, Liu Y, Chen C, Li G, Liu Y, Yin X. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochem Eng J*. 2015; 101: 44-54.
23. Champion JT, Gilkey JC, Lamparski H, Retterer J, Miller RM. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium, and octadecane. *J Colloid Interface Sci*. 1995; 170(2): 569-574.
24. Dahrazma B, Mulligan CN. Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration. *Chemosphere*. 2007; 69(5): 705-711.
25. Urum K, Pekdemir T, Çopur M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. *J Colloid interface Sci*. 2004; 276(2): 456-464.



The removal of heavy metals (Ni, Cr, Cd) from soil contamination with crude oil using rhamnolipid biosurfactant

Nayyereh Kholghi¹, Hossein Amani², Shokoufeh Malek Mahmoodi³, Alireza Amiri⁴

¹M.Sc. student, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran. ²Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran. ³Ph.D. student, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran. ⁴Assistant Professor, Nanotechnology Research Institute, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Crude oil contains significant amounts of heavy metals which could lead to soil contamination. The aim of this study is to evaluate the function of rhamnolipid biosurfactant in the removal of heavy metals (nickel, chromium, and cadmium) from soil contaminated with crude oil.

Materials & Methods: In the cross-sectional descriptive study, rhamnolipid biosurfactant was firstly produced from *Pseudomonas aeruginosa* PTCC1340 and then confirmed through TLC and FTIR experiments. In the next step, sandy soil was sieved at 2 mm and placed in a beaker for contamination with crude oil (API: 32.83, Viscosity: 6.21cp). The contaminated soil was washed with rhamnolipid solution (1:10 ratio) for 24 h in falcon tubes under different conditions such as temperature, pH and concentration. Subsequently, the solution containing the heavy metals was acid digested to release the metals in the form of ion. Finally, the amount of the heavy metals removed by rhamnolipid biosurfactant was measured using atomic absorption spectrophotometer.

Results: The removal amount of heavy metals from soil contamination at an optimum condition (temperature: 25 °C, concentration: 0.8 g/l and pH 11) to nickel, chromium, and cadmium was 43.05%, 34.73%, and 52.81%, respectively.

Conclusion: Washing the soil with produced biosurfactant gives rise to the removal of heavy metals without having detrimental effects of the chemical surfactants and subsequently reduces the environmental hazards. In accordance with the outcomes of the research, the method is highly suggested to industries to eliminate the heavy metals from crude oil using biosurfactants.

Keywords: Biosurfactant, Rhamnolipid, Contaminated soil, Heavy metals removal.

Correspondence to: Hossein Amani

Tel: +98 9183624240

E-mail: hamani@nit.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 12(1): 62-72.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.