

معرفی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت

و سنجش عملکرد آنها در جداسازی آب از نفت

هدی سباتی^۱ و حسین معتمدی^{۱و۲*}

^۱ ایران، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، مرکز تحقیقاتی بیوتکنولوژی و علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

بیودمولسیفایرها گروهی از ترکیبات بیوسورفاکتانت با توانایی شکست امولسیون هستند که مهم‌ترین کاربردشان در جداسازی آب از نفت خام است. این ترکیبات با توجه به زیست‌سازگاری جایگزین خوبی برای دمولسیفایرهای شیمیایی هستند. هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر و سنجش عملکرد آنها در شکست امولسیون‌های آب از نفت می‌باشد. بدین منظور پس از نمونه برداری، جداسازی اولیه در محیط کشت پایه نمکی، غنی‌سازی در محیط کشت مولر هیتتون برات و خالص‌سازی با تکنیک کشت پی‌درپی در محیط کشت مولر هیتتون آگار انجام شد. تولید بیوسورفاکتانت توسط جدایه‌ها از طریق روش‌های کیفی مانند بررسی فعالیت همولیتیک، آزمون انهدام قطره، آزمون گسترش نفت و سنجش هیدروفوبیسیتة سلولی براساس اندازه‌گیری چسبندگی میکروبی به هیدروکربن‌ها ارزیابی گردید. ماهیت بیودمولسیفایری این ترکیبات و موقعیت آنها در سلول از طریق بررسی میزان شکست امولسیون‌های آب در نفت سفید در آزمون دمولسیفیکاسیون بررسی شد. جدایه‌های مولد بیودمولسیفایر براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و آنزیمی و نیز رنگ‌آمیزی به عنوان *Staphylococcus*, *Bacillus* sp. HS9، *Bacillus* sp. HS10، *Bacillus* sp. HS11، *Bacillus* sp. HS12 شناسایی شدند. میزان دمولسیفیکاسیون این جدایه‌ها در شکست امولسیون آب در نفت سفید به ترتیب 25 ± 3 ، $28/57 \pm 5$ ، $27/14 \pm 1$ و $51/57 \pm 1$ درصد گزارش شد. از میان جدایه‌ها، جدایه‌ی *Bacillus* sp. HS12 بیشترین درصد دمولسیفیکاسیون را نشان داد. با توجه به توانایی دمولسیفیکاسیون این جدایه‌ها، پیشنهاد می‌شود با هدف کاربردی شدن جدایه‌ها از جمله افزایش استحصال نفت و حذف امولسیون‌های نامطلوب نفتی در صنایع بالادستی، توانایی امولسیون زدایی جدایه‌ها در نفت خام و شرایط عملکردی کارخانجات نمک زدایی بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: بیودمولسیفایر، دمولسیفیکاسیون، خاک‌های آلوده، باکتری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۱۳۳۳۳۱۰۴۵، پست الکترونیکی: motamedih@scu.ac.ir

مقدمه

استخراجی می‌کاهند و فرآیند پالایش نفت خام را دچار مشکل می‌کنند؛ چرا که آب موجود در این امولسیون‌ها علاوه بر افزایش هزینه‌های پمپاژ و ذخیره نفت، می‌تواند باعث ایجاد آسیب به تجهیزات و تاسیسات پالایشگاه، کاهش ظرفیت مخازن و انسداد خطوط انتقال شود؛ در نتیجه باید میزان آب در نفت خام استخراجی کاهش یابد و

امولسیون‌های نفتی سیستم‌هایی کلونیدی متشکل از دو مایع امتزاج‌ناپذیر نفت و آب هستند که در مراحل مختلف حفاری، اکتشاف، ازدیاد برداشت، انتقال و فرآوری نفت خام ایجاد می‌شوند. این نوع امولسیون‌ها به ویژه امولسیون‌هایی که از پراکنش آب در نفت ایجاد می‌شوند امولسیون‌های نامطلوبی هستند که از ارزش نفت خام

بیوتکنولوژی، می‌توان به تولید صنعتی بیودمولسیفایر دست یافت (۱۷). هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از خاک‌های آلوده به نفت و سنجش عملکرد آن‌ها در جداسازی آب از نفت است.

مواد و روشها

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری در فصل پاییز و از پنج نقطه از خاک‌های آلوده به نفت پالایشگاه نفت آبادان (۳۰/۳۴۹۸۳) درجه شرقی و ۴۸/۲۷۷۹۸ (درجه شمالی) صورت گرفت. از هر کدام از نقاط یک نمونه خاک به میزان ۵۰۰ گرم در ظرف شیشه‌ای درپوش‌دار استریل ریخته شد و سریعاً به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی منتقل گردید و نمونه‌ها تا زمان جداسازی باکتری‌ها در فضایی تاریک در آزمایشگاه نگه‌داری شدند. به منظور هوادهی مناسب درب آن‌ها بصورت نیمه باز گذاشته شد.

جداسازی، غربال‌گری و غنی‌سازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر: به منظور جداسازی باکتری ده گرم از هر نمونه خاک به ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد و این نمونه‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۵۰ شیک شدند. سپس این ارلن‌ها به مدت یک ساعت روی میزکار آزمایشگاه ثابت نگه داشته شدند تا ذرات درشت خاک در آن‌ها ته‌نشین شود. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی هر ارلن به ارلن جدیدی حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت پایه معدنی اصلاح شده (MMSM = Modified Mineral Salt Medium) پیشنهاد شده توسط هووانگ و همکاران (۲۰۰۹)، اضافه گردید. محتویات این محیط کشت (pH ۷/۲) عبارتند از: (گرم بر لیتر) چهار گرم آمونیوم نترات، چهار گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، شش گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۲ گرم منیزیم سولفات هفت آبه و یک میلی لیتر محلول عناصر معدنی کم مقدار است. محلول عناصر معدنی کم مقدار (pH ۷) حاوی ترکیبات: (گرم بر لیتر) یک گرم

جداسازی آب از نفت می‌تواند موجب ایجاد ارزش افزوده شود (۱۳،۱۵). روش‌های جداسازی آب و نفت به طور کلی به سه دسته شیمیایی، فیزیکی - الکتریکی و زیستی تقسیم بندی می‌شوند. روش‌های یادشده ممکن است بتهنایی، بصورت همزمان و یا متوالی به کار روند. آلودگی زیست محیطی ایجاد شده توسط فرآورده های نفتی از جمله دمولسیفایرهای شیمیایی در حین انتقال، استفاده نامناسب و نشت در صنعت امروز باعث شده است که استفاده از روش زیستی در جداسازی آب از نفت توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۱،۲،۴). نخستین بار فعالیت دمولسیفیکاسیون میکروارگانیسم‌ها در سال ۱۹۸۰ میلادی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات صورت گرفته نشان داد که این توانایی در میکروارگانیسم‌ها به دلیل تولید ترکیبات فعال سطحی و یا ترکیباتی است که خصوصیات سطح سلول‌ها را تعیین می‌کند. براین اساس بیودمولسیفایرها به دو گروه تقسیم می‌شوند؛ دسته اول ترکیباتی هستند که جزئی از ساختار میکروارگانیسم می‌باشند و با افزایش هیدروفوبیسیته سطحی سلول به تفکیک دو فاز آب و نفت در یک امولسیون نفتی کمک می‌کنند تا امولسیون شکسته شود. دسته دوم، ترکیباتی هستند که به صورت یک متابولیت به خارج از سلول ترشح می‌شوند و عمدتاً از جنس استوئین، پلی‌ساکاریدها، گلیکولپیدها، فسفولپیدها، گلیکوپروتئین‌ها و رامنولپیدها هستند (۸،۱۲). بیودمولسیفایرها در مقایسه با دمولسیفایرهای شیمیایی در تعلیق شکنی کارآمدترند، آلودگی محیطی ایجاد نمی‌کنند، از منابع ارزان و تجدیدپذیر همچون ضایعات کشاورزی و صنعتی قابل تولید هستند و در شرایط افراطی (دما، pH، نمک) به خوبی عمل می‌کنند. از طرفی زیست‌سازگاری آن‌ها با محیط باعث شده است که این ترکیبات گزینه‌های خوبی برای شکست امولسیون‌ها به ویژه امولسیون‌های نفتی باشند. با جداسازی سوبیه‌های مناسب و بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، متابولیسمی و بهره‌برداری از سوبسترای خام ارزان قیمت با کمک

کوچک)، دو مثبت (هاله متوسط) و سه مثبت (هاله بزرگ) گزارش شد (۲۲).

روش همولیز: یکی از روش‌های اولیه برای بررسی تولید بیوسورفاکتانت، بررسی لیز گلوبول‌های قرمز خون است. همولیز ایجاد شده اطراف کلنی نشان‌دهنده توانایی باکتری در تولید بیوسورفاکتانت می‌باشد. به منظور بررسی همولیز در جدایه‌ها کشت خالصی از آنها بر روی محیط کشت آگار خون دار حاوی ۱۰-۵ درصد خون گوسفند تهیه گردید و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرما‌گذاری شد. وجود همولیز آلفا و بتا در اطراف کلنی باکتری به عنوان فعالیت همولیتیک مثبت در نظر گرفته شد (۲۲).

روش انهدام قطره: در روش انهدام قطره (Drop collapse assay) ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت مولر هیتون برات تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرما‌گذاری شدند. پس از رشد جدایه‌ها، صد میکرولیتر از نفت خام استریل در چاهک‌های پلیت‌الایزا ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای محیط ثابت نگه داشته شد تا سطحی یکنواخت از نفت خام در چاهک‌های آن ایجاد شود. سپس ده میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی هر جدایه روی نفت خام موجود در چاهک ریخته شد. پس از گذشت یک دقیقه شکل قطره ایجاد شده در سطح نفت خام بررسی گردید. از آب مقطر استریل به عنوان شاهد استفاده شد. در صورت وجود بیوسورفاکتانت در سوسپانسیون میکروبی، قطره بحالت مسطح و در غیر این صورت قطره کاملاً گرد خواهد بود. نتایج بصورت یک مثبت (قطره کمی متمایل)، دو مثبت (قطره خیلی متمایل) و سه مثبت (قطره کاملاً پهن) گزارش شد (۲۲).

سنجش هیدروفوبیسته سلولی براساس اندازه‌گیری چسبندگی میکروبی به هیدروکربن‌ها (MATH= Microbial adhesion to hydrocarbons): جهت تهیه توده سلولی سه میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در

کلسیم کلرید دو آبه، یک گرم سولفات آهن (II) هفت آبه و ۱/۴ گرم اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید است. چهار درصد پارافین مایع به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در این محیط کشت استفاده شد (۱۱). محیط جامد با افزودن دو درصد آگار و یک درصد پارافین مایع به محیط کشت برات تهیه شد. به منظور غنی‌سازی، باکتری‌های جداسازی شده به محیط کشت مولر هیتون برات منتقل و پس از ۲۴ ساعت گرما‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد جهت خالص‌سازی به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار انتقال داده شدند. جدایه‌های خالص‌سازی شده با استفاده از آزمون‌های شیمیایی، آنزیمی و نیز رنگ‌آمیزی، مطابق راهنمای شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌های Bergey، مورد شناسایی قرار گرفتند (۵).

سنجش کیفی تولید ترکیبات بیوسورفاکتانت در جدایه‌ها: با توجه به اینکه بیودمولسیفایرها زیرگروهی از ترکیبات فعال سطحی در ارتباط با سطح سلول هستند، از روش‌های کیفی سنجش تولید ترکیبات بیوسورفاکتانت و اندازه‌گیری فعالیت سطحی سلول برای سنجش آنها استفاده گردید. این روش‌ها عبارتند از (۷):

روش گسترش نفت: در تکنیک گسترش نفت (Oil spreading assay)، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به یک پتری دیش هشت سانتی‌متری اضافه شد و سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آب افزوده شد که به صورت لایه نازکی در سطح آب قرار گرفت. ده میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط مولر هیتون برات با سمپلر برداشته و به سطح نفت اضافه شد. پخش لکه نفتی و ظهور ناحیه شفاف در محل افزودن سوسپانسیون باکتریایی مؤید تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری است. قطر هاله ایجاد شده بیانگر میزان بیوسورفاکتانت تولیدی است. در این آزمون آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. نتایج بصورت منفی (بدون هاله)، یک مثبت (هاله

مخلوط به مدت پنج دقیقه با حداکثر شدت سونیکه گردید (۷). به منظور تعیین نوع امولسیون تهیه شده از آزمون حالیت رنگ استفاده شد. در این آزمون از محلول رنگی یک درصد سافرانین (محلول در آب) و محلول رنگی یک درصد سودان (III) (محلول در نفت سفید) استفاده گردید. بدین صورت که از هر کدام از محلول‌ها به میزان یک میلی‌لیتر به نه میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده از آب و نفت سفید اضافه شد. پراکنش یکنواخت هر کدام از محلول‌های رنگی در امولسیون، فاز پیوسته آن را تعیین می‌کند (۲۱).

برای انجام آزمون دمولسیفیکاسیون، دو میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت مولر هینتون برات به درون لوله آزمایش مدرج ده میلی‌لیتری که حاوی پنج میلی‌لیتر امولسیون آب در نفت سفید بود اضافه شد و به منظور اختلاط کامل این لوله به صورت دستی ۲۰۰ بار سر و ته گردید. سپس این لوله به صورت ساکن در حمام آب گرم با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تغییرات حجم فاز نفتی (در بالای لوله)، فاز آبی (در عمق لوله) و فاز امولسیون (میان این دو) بعد از ۴۸ ساعت از قراردادن لوله در حمام آب ثبت گردید. در تمامی آزمون‌های دمولسیفیکاسیون لوله کنترل یک که حاوی هفت میلی‌لیتر امولسیون و لوله کنترل دو که حاوی دو میلی‌لیتر محیط کشت بدون تلقیح و پنج میلی‌لیتر امولسیون است در کنار سایر لوله‌ها استفاده شد. با جای‌گذاری نتایج بدست آمده در فرمول (۱) درصد شکست امولسیون توسط باکتری محاسبه گردید. براساس نتایج حاصل از این آزمون، جدایه برتر انتخاب شد (۱۱).

محاسبه درصد دمولسیفیکاسیون طبق فرمول ذیل انجام گردید:

$$1 - \left(\frac{\text{حجم امولسیون باقی مانده}}{\text{حجم اولیه امولسیون} + \text{حجم محیط کشت افزوده}} \right) \times 100 = \text{درصد شکست امولسیون (درصد دمولسیفیکاسیون)}$$

محیط کشت مولر هینتون برات، سانتریفیوژ گردید. پس از دو بار شست و شو با بافر نمکی فسفات (PBS = Phosphate buffer saline) جذب اولیه رسوب سلولی حاصل با افزودن بافر PBS در طول موج ۴۹۰ نانومتر بر روی ۰/۸-۱ تنظیم شد. سه میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل با سه میلی‌لیتر از نفت سفید مخلوط و به مدت سه دقیقه با دور ۱۸۰۰ rpm ورتکس گردید. این سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه بر روی میز کار آزمایشگاه ثابت نگه داشته شد. پس از آن دوفاز در لوله تشکیل گردید؛ فاز نفتی در بالای لوله و فاز آبی در پایین لوله که سوسپانسیون سلولی در آن قرار می‌گیرد. از سوسپانسیون سلولی در پایین لوله با سمپلر برداشته شد و جذب نهایی آن در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. هیدروفوبیسیته سلولی باکتری با توجه به جذب اولیه و نهایی براساس فرمول ذیل محاسبه شد (۱۰، ۱۱):

$$\text{MATH} = \left[1 - \frac{\text{OD490 نهایی}}{\text{OD490 اولیه}} \right] \times 100$$

تشخیص باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر و تعیین موقعیت بیودمولسیفایر تولیدی: تشخیص باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از سایر باکتری‌ها براساس آزمون دمولسیفیکاسیون (Demulsification test) صورت گرفت. به منظور انجام این آزمون امولسیون‌هایی از آب در نفت سفید تهیه شد. برای این منظور، آب مقطر استریل و نفت سفید به میزان ۱:۱ (حجمی/حجمی) در یک شیشه در پوش دار استریل مخلوط و به آن ۱/۶۷ درصد (حجمی/حجمی) سورفاکتانت غیر یونی سوربیتان مونوآلئات یا اسپان ۸۰ (Span 80) اضافه گردید. این مخلوط به مدت سه دقیقه به صورت دستی هم زده شد. به منظور هم‌وزنیزه کردن مخلوط و تهیه امولسیون، این

بیش از ۲۰ درصد باشد. در صورتی که درصد دمولسیفیکاسیون مایع رویی بدون سلول این باکتری‌ها بیش از ۲۰ درصد باشد بیودمولسیفایر تولیدی توسط آنها خارج سلولی است و در صورتی که درصد دمولسیفیکاسیون سوسپانسیون سلولی آنها بیش از ۲۰ درصد باشد بیودمولسیفایر تولیدی متصل به سلول است. در صورتی که درصد دمولسیفیکاسیون در هر دو حالت بیش از ۲۰ درصد باشد بیودمولسیفایر تولیدی هم خارج سلولی و هم متصل به سلول است (۱۰).

نتایج

در این پژوهش از نمونه‌های خاک‌های آلوده به نفت پالایشگاه نفت آبادان پس از کشت در محیط پایه نمکی اصلاح شده (MMSM)، غنی‌سازی با محیط کشت مولر هیتتون برات و خالص‌سازی با تکنیک کشت پی در پی در محیط کشت مولر هیتتون آگار چهار جدایه باکتریایی جدا گردید. جهت شناسایی جدایه‌های به دست آمده، تست‌های اولیه بیوشیمیایی و بررسی مورفولوژیک کلنی برای آن‌ها انجام شد. در جدول‌های ۱ و ۲ به ترتیب نتایج رنگ آمیزی، تست پتاسیم هیدروکسید (۳٪)، کاتالاز، اکسیداز و بررسی مورفولوژی کلنی جدایه‌ها آورده شده است.

برای تعیین موقعیت بیودمولسیفایرهای تولیدی توسط جدایه‌ها، عملکرد شکست امولسیون سوسپانسیون سلولی و مایع رویی بدون سلول هر یک از جدایه‌ها در آزمون‌های دمولسیفیکاسیون مجزایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا سه میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مولر هیتتون برات جهت تهیه رسوب سلولی به مدت هشت دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاصل ننگه داشته شد. به منظور شست و شو به میزان سه میلی‌لیتر آب مقطر استریل به رسوب سلولی حاصل اضافه گردید و لوله به آرامی تکان داده شد تا شست و شو به خوبی انجام شود. سپس بار دیگر محتوای لوله به مدت هشت دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد. این شست و شو دو بار تکرار شد. به رسوب سلولی تهیه شده به میزان سه میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هیتتون برات استریل اضافه شد. فعالیت شکست امولسیون این سوسپانسیون سلولی تهیه شده و مایع رویی بدون سلول حاصل از سانتریفیوژ در آزمون‌های دمولسیفیکاسیون مجزایی بر روی امولسیون آب در نفت سفید مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه باکتری‌هایی به عنوان باکتری‌های تعلیق شکن در نظر گرفته می‌شوند که درصد دمولسیفیکاسیون آنها برای امولسیون آب در نفت سفید

جدول ۱- نتایج آزمون‌های اولیه بیوشیمیایی

ردیف	شماره جدایه	گرم	اسپور	کاتالاز	اکسیداز	پتاسیم هیدروکسید (۳٪)	شکل
۱	HS9	+	دارد	+	-	-	باسیل
۲	HS10	+	ندارد	+	-	-	کوکسی
۳	HS11	+	دارد	+	+	-	باسیل
۴	HS12	+	دارد	+	+	-	باسیل

جدول ۲- نتایج بررسی مورفولوژی کلنی

ردیف	شماره جدایه	اندازه کلنی	شکل کلنی	کناره کلنی	سطح کلنی	رنگ کلنی	ارتفاع کلنی
۱	HS9	متوسط	ریزوتید	ناصاف	خشن	زرد دارای پیگمان	نوک دار
۲	HS10	کوچک	دایره ای	کامل	نرم	زرد کم رنگ بدون پیگمان	محدب
۳	HS11	کوچک	ریزوتید	ناصاف	خشن	کرم و دارای پیگمان	نوک دار
۴	HS12	متوسط	دایره ای	کامل	نرم	سفید بدون پیگمان	محدب

دارد و در آزمون‌های انهدام قطره و گسترش نفت عملکرد قوی از خود نشان می‌دهد در حالی‌که جدایه HS12 قدرت چسبندگی به هیدروکربن کمتری نسبت به جدایه HS10 دارد ولی در آزمون‌های گسترش نفت و انهدام قطره قویتر از HS10 عمل می‌کند. این نشان‌دهنده تفاوت در ماهیت و مقدار بیومولسیفایرهای تولید شده توسط این جدایه-هاست که بر شاخص‌های عملکردی آنها تأثیرگذار است.

تولید ترکیبات بیوسورفاکتانت توسط جدایه‌ها از طریق روش‌های کیفی مانند بررسی فعالیت همولیتیک، آزمون انهدام قطره، آزمون گسترش نفت و سنجش هیدروفوبیسیته سلولی براساس اندازه‌گیری چسبندگی میکروبی به هیدروکربن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۳). همانطور که از نتایج جدول سه مشخص می‌شود جدایه HS10 بیشترین توانایی چسبندگی به هیدروکربن‌ها را

جدول ۳- نتایج سنجش کیفی تولید بیوسورفاکتانت

ردیف	شماره جدایه	گسترش نفت	همولیز	انهدام قطره	MATH (%)*
۱	HS9	-	-	-	۶۴/۴۳±۰
۲	HS10	++	آلفا	+	۷۳/۷۶±۱
۳	HS11	++	-	-	۶۲/۲۲±۰
۴	HS12	+++	آلفا	++	۶۷/۸۲±۴

* نتایج به صورت متوسط داده‌های حاصل در دو سری سنجش ± انحراف معیار گزارش شد.

(III) در امولسیون آب در نفت سفید نشان می‌دهد که فاز پیوسته این امولسیون نفت و امولسیون مورد بررسی یک امولسیون آب در نفت است. عدم یکنواختی و حالت گلبولی پراکنش محلول رنگی سافرانین در این امولسیون موبد این مطلب است (شکل ۱(ب)).

نتایج بررسی ماهیت و موقعیت بیومولسیفایر تولیدی توسط جدایه‌ها در جدول چهار آورده شده است. در تمامی آزمون‌های دمولسیفیکاسیون لوله‌های کنترل در کنار سایر لوله‌ها استفاده شد. (شکل ۱(الف)). در بررسی نوع امولسیون پراکنش یکنواخت محلول رنگی سودان

جدول ۴- نتایج سنجش دمولسیفیکاسیون امولسیون آب در نفت سفید و تعیین موقعیت بیومولسیفایر

ردیف	شماره جدایه	درصد دمولسیفیکاسیون کشت باکتری حاوی سلول و مایع رویی	درصد دمولسیفیکاسیون سوسپانسیون سلولی	درصد دمولسیفیکاسیون مایع رویی بدون سلول	موقعیت بیومولسیفایر
۱	HS9	۲۵±۳	۱۶/۷۵	۳۵/۱۴	خارج سلولی
۲	HS10	۲۸/۵۷±۵	۲۶/۴۵	۱۴/۴۴	متصل به سلول
۳	HS11	۲۷/۱۴±۱	۱۱/۱۱	۳۱/۸۹	خارج سلولی
۴	HS12	۵۱/۵۷±۱	۴۸/۸۹	۴۹/۶۵	خارج سلولی و متصل به سلول

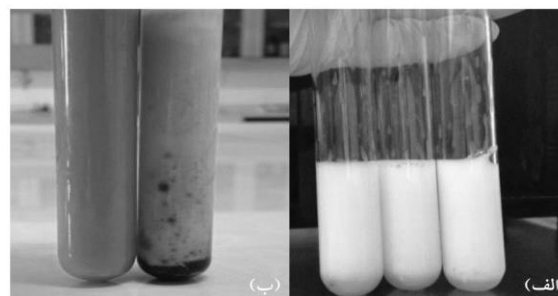
* نتایج به صورت متوسط داده‌های حاصل در دو سری سنجش دمولسیفیکاسیون ± انحراف معیار گزارش شد.

۵۷/۱±۵۱ درصد گزارش شد. از این میان، جدایه ی HS12 بیشترین درصد دمولسیفیکاسیون را داشت. عملکرد دمولسیفیکاسیون این جدایه در شکست امولسیون آب در نفت سفید در شکل ۲ نشان داده شده است.

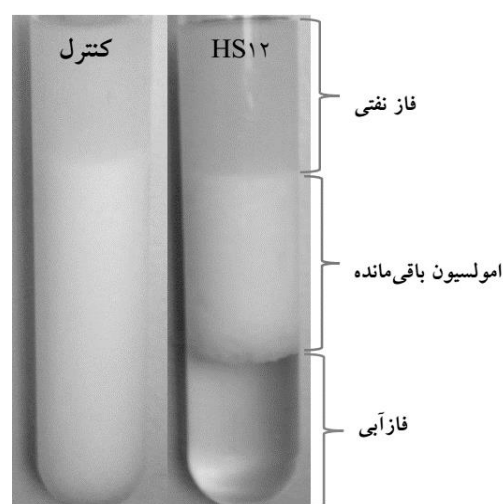
جدایه‌های مولد بیومولسیفایر به عنوان *Bacillus sp.* HS9، *Bacillus sp.* HS11، *Staphylococcus sp.* HS10، *Bacillus sp.* HS12 شناسایی شدند. میزان دمولسیفیکاسیون این جدایه‌ها در شکست امولسیون آب در نفت سفید به ترتیب ۲۵±۳، ۲۸/۵۷±۵، ۲۷/۱۴±۱ و

مقاوم و کارآمد در شرایط افراطی و نامناسب محیطی به دلیل شرایط سخت آب و هوایی منطقه. براساس گزارشات موجود، تاکنون مطالعات بسیار کمی به منظور غربالگری باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر در جنوب کشور صورت گرفته است و همین امر شانس یافتن سویه‌های بومی جدید را افزایش می‌دهد. در مطالعات دیگری که به همین منظور انجام شده است نیز مکان‌های مشابهی برای غربالگری مولد بیودمولسیفایر انتخاب شده است. هوو و همکاران (۲۰۱۴) و کوتینهو و همکاران (۲۰۱۳) غربالگری باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر را با نمونه‌گیری از خاک‌های آلوده به نفت انجام دادند (۶۸). محبعلی و همکاران (۲۰۱۲) از نفت، پساب و خاک‌های آلوده به نفت و امولسیون‌های نفتی میادین نفتی و پساب و خاک‌های آلوده به روغن صنایع غذایی نمونه‌گیری انجام دادند (۱۸). لیو و همکاران (۲۰۱۰) از خاک‌های آلوده به نفت برای غربالگری باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر استفاده کردند (۱۷). هووانگ و همکاران (۲۰۰۹) از لجن نفتی، درین و خاک‌های آلوده به نفت نمونه‌گیری انجام دادند (۱۱).

در این پژوهش با استفاده از کشت نمونه‌های خاک در محیط پایه نمکی اصلاح شده که تنها منبع کربن و انرژی آن پارافین مایع بود، چهار جدایه باکتریایی به دست آمد. عملکرد دمولسیفیکاسیون این جدایه‌ها بر روی امولسیون آب در نفت سفید مورد ارزیابی قرار گرفت و براین اساس جدایه HS12 که بیشترین فعالیت دمولسیفیکاسیون را نشان داد به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. مطالعات پیشین انجام شده در زمینه دمولسیفیکاسیون زیستی نشان می‌دهد که عمده‌ی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از جمله *Alcaligenes sp.* (۱۱)، *Microbacterium sp.* (۱۹)، *Bacillus cereus* (۸)، *Bacillus mojavensis* (۹) و *Pseudomonas aeruginosa* (۲۳) از محیط‌هایی جدا شدند که به منابع هیدروکربنی آلوده هستند. این امر نشان دهنده آن است که میان فعالیت دمولسیفیکاسیون سویه‌های باکتریایی مولد



شکل ۱- (الف) امولسیون آب در نفت سفید (کنترل یک (لوله های سمت راست و چپ) و کنترل دو (لوله وسط))، (ب) پراکنش محلول رنگی سافرانین (سمت راست) و سودان (III) (سمت چپ) در امولسیون آب در نفت سفید



شکل ۲- عملکرد دمولسیفیکاسیون جدایه برتر در شکست امولسیون آب در نفت سفید

بحث

در این پژوهش به منظور به دست آوردن جدایه‌هایی که توانایی تولید بیودمولسیفایر داشته باشند از خاک‌های آلوده به نفت پالایشگاه نفت آبادان نمونه‌گیری انجام شد. انتخاب این نقاط جهت نمونه‌گیری به دلایل متعددی صورت گرفت که مهم‌ترین این دلایل عبارتند از: وجود تحریک محیطی مناسب برای تولید ترکیبات بیودمولسیفایر توسط باکتری‌ها مانند آلودگی بستر به نفت خام و عوامل هیدروکربنی، ارزیابی پتانسیل باکتری‌های موجود در این محیط‌ها در دمولسیفیکاسیون و امکان یافتن گونه‌هایی

گسترش نفت و انهدام قطره است. این آزمون‌ها براساس تولید ماده بیوسورفاکتانت و نحوه قرارگیری آن در فاز میانی دو فاز آب و نفتی (هیدروکربنی) عمل می‌کنند. اندازه هاله ایجاد شده در آزمون گسترش نفت و قطر قطره ایجاد شده در آزمون انهدام قطره با میزان تولید بیوسورفاکتانت و عملکرد آن رابطه‌ای مستقیم دارد (۲۲) به گونه‌ای که جدایه برتر در مطالعه حاضر بیشترین اندازه هاله و قطر قطره را در تست‌های گسترش نفت و انهدام قطره در مقایسه با سایر جدایه‌ها نشان داد. شائب و همکاران از همولیز گلبول‌های قرمز، آزمون‌های گسترش نفت و انهدام قطره برای سنجش تولید ترکیبات بیوسورفاکتانت استفاده کردند (۲۰). هووانگ و همکاران غربال‌گری باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر را با استفاده از آزمون‌های سنجش فعالیت همولایتیک، گسترش نفت و انهدام قطره انجام دادند. این مطالعه گزارش می‌دهد که در سنجش و غربال‌گری باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر این آزمون‌ها به تنهایی کافی نیستند و نمی‌توانند جایگزین آزمون دمولسیفیکاسیون شوند چرا که فعالیت سطحی بالای یک ترکیب بیوسورفاکتانت ضرورتاً به معنای یک عملکرد دمولسیفیکاسیون خوب نیست. در این مطالعه گزارش شده است که برخی از جدایه‌های مولد بیودمولسیفایر جدا شده از نمونه‌های محیطی علی‌رغم اینکه از فعالیت سطحی بالایی برخوردار هستند فعالیت دمولسیفیکاسیون خوبی را نشان نمی‌دهند و برعکس. به همین دلیل این آزمون‌ها به تنهایی برای سنجش تولید بیودمولسیفایر کافی نیستند و به صورت آزمون‌هایی کمکی در کنار آزمون اصلی دمولسیفیکاسیون قابل استفاده هستند (۱۱).

یکی دیگر از تکنیک‌های سنجش فعالیت سلول، سنجش هیدروفوبیسیته سلولی براساس MATH یا پتانسیل اتصال سلول‌ها به ترکیبات هیدروکربنی است. این آزمون برای سنجش عملکرد دمولسیفیکاسیون سویه‌های مولد بیودمولسیفایر به ویژه آن دسته از سویه‌هایی که بیودمولسیفایر متصل به سلول تولید می‌کنند اهمیت دارد

بیودمولسیفایر و منابعی که از آن نمونه‌گیری می‌شوند ارتباط خاصی وجود دارد. وجود این ارتباط در بسیاری از مطالعات پیشین تاکید شده است. به عنوان مثال در مطالعه هووانگ و همکاران مقایسه میان منابع نمونه‌گیری سویه‌های مولد بیودمولسیفایر نشان داد که تمامی سویه‌های باکتریایی که در دمولسیفیکاسیون کارآمد بودند از نواحی آلوده به نفت جداسازی شدند (۱۱). این نتایج نشان دهنده این است که باکتری‌های جدا شده از نواحی آلوده به منابع هیدروکربنی همچون نفت دارای پتانسیل خوبی برای تولید ترکیبات بیودمولسیفایر و انجام فعالیت دمولسیفیکاسیون هستند و در صورتی که هدف دستیابی به اینگونه باکتری‌ها باشد، این نواحی آلوده برای نمونه‌گیری ترجیح داده می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر نیز این امر را تایید می‌کند و نشان می‌دهد که سویه‌های مولد بیودمولسیفایر جدا شده از بسترهای آلوده به منابع هیدروکربنی (مانند خاک‌های آلوده به نفت) دارای قابلیت مناسبی برای تولید بیودمولسیفایر هستند و توانایی سازگاری آنها با شرایط نامساعد محیطی بستر، آنها را گزینه‌های ایده‌آلی جهت تولید بیودمولسیفایرهای کارآمد می‌سازد.

با توجه به اینکه بیودمولسیفایرها گروهی از ترکیبات بیوسورفاکتانت با قابلیت شکست امولسیون هستند می‌توان از آزمون‌های سنجش تولید ترکیبات بیوسورفاکتانت برای بررسی تولید آنها استفاده کرد (۷،۱۱). بدین منظور در این پژوهش سنجش کیفی تولید بیوسورفاکتانت با استفاده از آزمون‌های سنجش فعالیت سطحی سلول‌ها صورت گرفت که این آزمون‌ها شامل سنجش فعالیت همولایتیک، آزمون گسترش نفت، آزمون انهدام قطره و سنجش هیدروفوبیسیته سلولی براساس MATH می‌باشند. بررسی فعالیت همولایتیک جدایه‌ها از طریق کشت آن‌ها بر روی پلیت‌های آگار خون‌دار صورت گرفت. همولیز آلفای سویه HS12 تولید بیوسورفاکتانت توسط این جدایه را تایید می‌کند. روش‌های دیگری که برای بررسی تولید بیوسورفاکتانت در این پژوهش استفاده گردید تست‌های

sp. HS10 بیودمولسیفایری متصل به سلول تولید می‌کند. بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه *Bacillus* sp. HS12 هم متصل به سلول هم خارج سلولی است. بر طبق نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر جدایه‌هایی که بیودمولسیفایر متصل به سلول تولید می‌کنند بهترین عملکرد شکست امولسیون خود را زمانی نشان می‌دهند که به صورت سلول تنها به امولسیون تزریق شوند. این نتیجه مشابه نتایج مطالعات پیشین در این زمینه است. بیشتر باکتری‌های مولد بیودمولسیفایری که در مطالعات هو و همکاران (۱۵)، یان و همکاران (۲۳)، هووانگ و همکاران (۱۱) و لیو و همکاران (۱۶) جداسازی شده‌اند با استفاده از تزریق سلول به امولسیون عمل دمولسیفیکاسیون را انجام می‌دهند چرا که بیودمولسیفایرهای تولیدی آنها متصل به سلول است. موقعیت یک بیودمولسیفایر سختی استخراج و خالص کردن آن را تعیین می‌کند که به نوبه‌ی خود بر آنالیز بیشتر آن بیودمولسیفایر و هزینه تولید آن موثر است. براین اساس بیودمولسیفایرهایی که متصل به سلول هستند در مقایسه با بیودمولسیفایرهای خارج سلولی دارای استخراج و خالص سازی سخت‌تر و پرهزینه‌تری می‌باشند. هووانگ و همکاران گزارش دادند که بیودمولسیفایرهای کارآمد (با درصد دمولسیفیکاسیون بالای ۹۰ درصد) را می‌توان در هر دو موقعیت خارج سلولی و متصل به سلول یافت (۱۰). بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه *Bacillus* sp. HS12 هم به صورت خارج سلولی و هم به صورت متصل به سلول است. بهترین عملکرد شکست امولسیون توسط این جدایه زمانی حاصل می‌شود که سلول‌های کامل به کار برده شود. این دو موقعیتی بودن سهولت کاربرد عملی این بیودمولسیفایر را دو چندان و کم هزینه می‌سازد چرا که این بیودمولسیفایر بدون نیاز به استخراج بیودمولسیفایر یا تفکیک سلول‌های باکتریایی از مایع رویی از طریق تزریق سلول‌های کامل به امولسیون بهترین عملکرد خود را به اجرا می‌گذارد.

چرا که حضور بیودمولسیفایرها در دیواره سلولی باکتری‌ها می‌تواند یکی از دلایل هیدروفوبیسیته بالای آنها باشند. بر طبق نتایج سنجش MATH جدایه‌ها در این پژوهش این استنتاج می‌شود که میان هیدروفوبیسیته سلولی و عملکرد دمولسیفیکاسیون رابطه‌ای وجود دارد چرا که جدایه‌های مولد بیودمولسیفایر میزان هیدروفوبیسیته بالایی را نشان دادند به گونه‌ای که میزان MATH سویه‌ی HS12 $67/82 \pm 4$ درصد گزارش شد. نتیجه بدست آمده در این زمینه در مطالعه حاضر در توافق با نتایج مطالعات پیشین است. به عنوان مثال لی و همکاران گزارش دادند که میان هیدروفوبیسیته سلولی و عملکرد دمولسیفیکاسیون آنها رابطه‌ای مستقیم خطی وجود دارد. این رابطه به صورت ذیل قابل توجیه است: در محیط‌هایی که به منابع هیدروکربنی مانند نفت خام آلوده هستند تنوع میکروبی موجود در محیط به دلیل انتخاب طبیعی که طبیعت انجام می‌دهد کاهش می‌یابد و فقط سویه‌هایی که بتوانند از این منابع هیدروکربنی استفاده کنند می‌توانند در این محیط‌ها بقا داشته باشند و غالب شوند. این سویه‌ها برای این که بتوانند از این منابع کربنی استفاده کنند و استفاده از این منابع برای آنها تسهیل شود به دو صورت عمل می‌کنند: یا عوامل فعال سطحی دوگانه همچون بیودمولسیفایرها را تولید می‌کنند یا تمایل خود را برای فاز هیدروکربنی با تغییر هیدروفوبیسیته سلولی افزایش می‌دهند (۱۴). از طرفی حضور خود عوامل بیودمولسیفایر متصل به سلول در دیواره سلولی موجب افزایش هیدروفوبیسیته سلولی می‌شود که به دنبال آن توانایی اتصال سویه به عوامل هیدروکربنی بیشتر خواهد بود. این امر موجب تسهیل استفاده از عوامل هیدروکربنی توسط سویه می‌شود (۸،۹). به لحاظ موقعیت، بیودمولسیفایرها به دو گروه خارج سلولی و متصل به سلول تقسیم می‌شوند (۱۱). براساس نتایج بدست آمده در این بررسی مشخص شد که دو جدایه‌ی *Bacillus* sp. HS9 و *Bacillus* sp. HS11 بیودمولسیفایرهایی خارج سلولی و جدایه *Staphylococcus*

نتیجه گیری

نامطلوب ایجاد شده در طی مراحل مختلف فرآوری نفت و تولید بیوادمولسیفایر کارآمد امیدوار بود. بررسی بیشتر خصوصیات جدایه‌ها و جستجو برای جدایه‌های بومی جدید می‌تواند نقشی حیاتی در به کارگیری سویه‌های بومی کشور در صنعت نفت داشته باشد.

قردانی

نگارندگان لازم می‌دانند مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین گرنت پژوهشی (SCU.SB98.673) و واحد پژوهش پالایشگاه نفت آبادان به لحاظ همکاری در اجرای این پژوهش اعلام نمایند.

منابع

- ۱- محسن زاده، ف. ظفری، د. م. و نوری صفا ب. ۱۳۹۵. سازش پذیری برخی از گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma*) به آلودگی نفتی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۹ (۳): ۳۲۱-۳۳۰.
- ۲- نریمانی، س. بازگیر، ع. و میرزایی نجفقلی، ح. ۱۳۹۶. بررسی فاکتورهای مؤثر بر بقاء و فعالیت باکتریهای تجزیه‌کننده نفت در فرآیند زیست‌پالایی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۳۰ (۱): ۸۵-۹۳.
- 3- Amirabadi, SSh. Jahanmiri, A. Rahimpour, MR. Nia, BR. Darvishi, P. Niazi, A. 2013. Investigation of *Paenibacillus alvei* ARN63 ability for biodemulsifier production: medium optimization to break heavy crude oil emulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 109: 244-252.
- 4- Atta, AM. Allohedan, HA. El-Mahdy, GA. 2014. Dewatering of petroleum crude oil emulsions using modified Schiff base polymeric surfactants. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 122:719-728.
- 5- Bergey, DH. Krieg, NR. Holt, JG. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., Springer-Verlag, New York.
- 6- Coutinho, JOP. Silva, MPS. Moraes, PM. Monteiro, S. Barcelos, JCC. Siqueira, EP. et al. 2013. Demulsifying properties of extracellular products and cells of *Pseudomonas aeruginosa* MSJ isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*. 128: 646-654.
- 7- Hassanshahian, M. 2014. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Marine Pollution Bulletin*. 86 (1): 361-366.
- 8- Hou, N. Feng, F. Shi, Y. Cao, H. Li, Ch. Cao, Zh. et al. 2014. Characterization of the extracellular biodemulsifiers secreted by *Bacillus cereus* LH-6 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimizing the cultivation conditions. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(17):10386-10398.
- 9- Hou, N. Li, D. Ma, F. Zhang, J. Xu, Y. Wang, J. et al. 2014. Effective biodemulsifier components secreted by *Bacillus mojavensis* XH-1 and analysis of the demulsification process. *Biodegradation*. 25 (4): 529-541.
- 10- Huang, XF. Guan, W. Liu, J. Lu, LJ. Xu, JC. Zhou, Q. 2010. Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria. *Bioresource Technology*. 101 (1): 317-323.
- 11- Huang, XF. Liu, J. Lu, LJ. Wen, Y. Xu, JC. Yang, DH. et al. 2009. Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresource Technology*. 100 (3): 1358-1365.
- 12- Huang, XF. Peng, K. Feng, Y. Liu, J. Lu, L. 2013. Separation and characterization of

- effective demulsifying substances from surface of *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in water-in-kerosene emulsion. *Bioresource Technology*. 139: 257-264.
- 13- Issaka, SA. Nour, AH. Yunus, RM. 2015. Review on the fundamental aspects of petroleum oil emulsions and techniques of demulsification. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. 6 (2) :1-15.
- 14- Li, GH. Zhang, X. Huang, W. 2000. Characteristics of degrading microorganism distribution in polluted soil with petroleum hydrocarbons. *Huanjing Kexue*. 21 (4): 61-64.
- 15- Lim JS, Wong SF, Law MC, Samyudia Y, Dol SS. 2015. A review on the effects of emulsions on flow behaviours and common factors affecting the stability of emulsions. *Journal of Applied Sciences*. 15 (2) :167-172.
- 16- Liu, J. Huang, XF. Lu, LJ. Xu, JC. Wen, Y. Yang, DH. et al. 2009. Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp. S-JS-1. *Bioresource Technology*. 100 (24): 6481-6487.
- 17- Liu, J. Huang, XF. Lu, LJ. Xu, JC. Wen, Y. Yang, DH. et al. 2010. Optimization of biodemulsifier production from *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in breaking crude oil emulsion. *Journal of Hazardous Materials*. 183 (1-3): 466-473.
- 18- Mohebali, G. Kaytash, A. Etemadi, N. 2012. Efficient breaking of water/oil emulsions by a newly isolated de-emulsifying bacterium, *Ochrobactrum anthropi* strain RIPI5-1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 98:120-128.
- 19- Salehizadeh, H. Ranjbar, A. Kennedy, K. 2013. Demulsification capabilities of a Microbacterium species for breaking water in crude oil emulsions. *African Journal of Biotechnology*. 12 (16): 2019-2026.
- 20- Shoeb, E. Ahmed, N. Akhter, J. Badar, U. Siddiqui, K. Ansari, FA. et al. 2015. Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from the Arabian Sea coast of Karachi. *Turkish Journal of Biology*. 2015; 39: 210-216.
- 21- Teku, RL. Mylangam, CK. Kolapalli, VRM. 2016. Formulation of capsaicin loaded emulgels using natural gum and oils for topical delivery. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5 (1): 1017-1034.
- 22- Thavasi, R. Sharma, S. Jayalakshmi, S. 2011. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. 1:1-6.
- 23- Yan, P. Lu, M. Yang, Q. Zhang, H. Zhang, Z. Chen, R. 2012. Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. *Bioresource Technology*. 116: 24-28.

Introducing biodemulsifier producing bacteria isolated from oil contaminated soils and measuring their performance in separating water from oil

Sabati H.¹ and Motamedi H.^{1,2*}

¹ Dept of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. of Iran

² Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. of Iran

Abstract

Biodemulsifiers are a group of biosurfactants with emulsion breaking ability and their most important application is separation of water from crude oil. These compounds can be a good substitute for chemical demulsifiers, due to their biocompatibility. The aim of this study was to isolate biodemulsifier producing bacteria and evaluate their performance in demulsifying water in oil emulsions. For this purpose, after sampling, bacterial isolation was made in modified mineral salt medium and purified on Mueller-Hinton agar. The production of biosurfactant was evaluated through hemolytic activity assay, drop collapse test, oil spreading test and cell hydrophobicity measurements based on microbial adhesion to hydrocarbons. The biodemulsifier activity of these compounds and their position in the cells were investigated by examining the demulsification ratio of water in kerosene emulsions in demulsification tests. Based on staining and biochemical and enzymatic tests, these isolates were identified as *Bacillus* sp. HS9, *Staphylococcus* sp. HS10, *Bacillus* sp. HS11, *Bacillus* sp. HS12. The demulsification activity of these isolates in breaking water in kerosene emulsions were 25 ± 3 , 28.5 ± 5 , 27.14 ± 1 , 51.57 ± 1 percent, respectively. Among these isolates, *Bacillus* sp. HS12 with 51.57 ± 1 percentage of demulsification activity was selected as the preferred isolate. With regard to demulsification potential of these isolates, it is suggested that their performance be evaluated in crude petroleum and desalting units conditions in order to be applied in enhanced oil recovery and breaking undesirable emulsions in upstream facilities.

Key words: Biodemulsifier, Demulsification, Contaminated soils, bacteria.