DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5

مقاله پژوهشی

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 زیست شناسی

[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 مولرهینتون براث و خالص-سازی با تکنیک کشت پی‌درپی در محیط کشت مولر هینتون آگار انجام شد. تولید 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 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 بیوشیمایی و آنزیمی و نیز رنگ‌آمیزی به عنوان *Bacillus* sp. HS9، *Staphylococcus* sp. HS10، *Bacillus* sp. HS11، *Bacillus* sp. HS12 شناسایی شدند. میزان دمولسیفیکاسیون این جدایه‌ها در شکست امولسیون آب در نفت سفید به ترتیب ۳±۲۵، ۵±۲۸/۵۷، ۱±۲۷/۱۴ و ۱±۵۱/۵۷ درصد گزارش شد. از میان جدایه‌ها، جدایه‌ی *Bacillus* sp. HS12 بیشترین درصد دمولسیفیکاسیون را نشان داد. با توجه به توانایی دمولسیفیکاسیون این جدایه‌ها، پیشنهاد می شود با هدف کاربردی شدن جدایه ها از جمله افزایش استحصال نفت و حذف امولسیون های نامطلوب نفتی در صنایع بالادستی، توانایی امولسیون زدایی جدایه ها در نفت خام و شرایط عملکردی کارخانجات نمک زدایی بررسی گردد.

واژه های کلیدی: بیودمولسیفایر، دمولسیفیکاسیون، خاک های آلوده، باکتری

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

مقدمه

امولسیون‌های نفتی سیستم‌هایی کلوئیدی متشکل از دو مایع امتزاج‌ناپذیر نفت وآب 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 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5

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 بتنهایی، 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. براین‌اساس 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 می شوند و عمدتاً از جنس استوئین، پلی‌ساکاریدها، گلیکولیپیدها، فسفولیپیدها، گلیکوپروتئین‌ها و رامنولیپیدها هستند(۸،۱۲). بیودمولسیفایرها در مقایسه با دمولسیفایرهای شیمیایی درتعلیق شکنی کارآمدترند، آلودگی محیطی ایجاد نمی-کنند، 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 زیست سازگاری آن‌ها با محیط باعث شده است که این ترکیبات گزینه‌های خوبی برای شکست امولسیون‌ها به ویژه امولسیون‌های نفتی باشند. با جداسازی سویه‌های مناسب و بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، متابولیسمی و بهره برداری از سوبسترای خام ارزان قیمت با کمک بیوتکنولوژی، می‌توان به تولید صنعتی بیودمولسیفایر دست یافت (۱۷). هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از خاک های آلوده به نفت و سنجش عملکرد آن‌ها در جداسازی آب از نفت است.

مواد و روشها

نمونه گیری: 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، غربال گری و غنی‌سازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر: به منظور جداسازی باکتری ده گرم از هرنمونه 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 ۱۵۰ rpm شیک شدند. سپس این ارلن‌ها به مدت یک ساعت روی میزکار آزمایشگاه ثابت نگه داشته شدند تا ذرات درشت خاک در آن‌ها ته نشین 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 نیترات، 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5
مقاله پژوهشی

کلسیم کلرید دو آبه، یک گرم سولفات آهن (II) هفت آبه و ۱/۴ گرم اتیلن دی آمین تترا 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 براث تهیه شد. به منظور غنی سازی، باکتری‌های جداسازی شده به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد جهت خالص‌سازی به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شدند. جدایه های خالص‌سازی شده با استفاده از آزمون های شیمیایی، آنزیمی و نیز رنگ آمیزی، مطابق راهنمای شناسایی و طبقه بندی باکتری‌های Bergey، مورد شناسایی قرار گرفتند (۵).

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

روش گسترش نفت: در تکنیک گسترش نفت (Oil spreading assay)، ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به یک پتری دیش هشت سانتی متری 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 هینتون براث 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 کوچک)، دو مثبت (هاله متوسط) و سه مثبت (هاله بزرگ) گزارش شد (۲۲).

روش همولیز: یکی از روش های اولیه برای بررسی تولید بیوسورفاکتانت، بررسی لیز گلبول های قرمز خون است. همولیز ایجاد شده اطراف کلنی نشان دهنده 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 سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری 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 هینتون براث تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از رشد جدایه ها، صد میکرولیتر از نفت خام استریل در چاهک‌های پلیت الایزا 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 هیدروفوبیسیته سلولی براساس اندازه‌گیری چسبندگی میکروبی به هیدروکربن‌ها (MATH= Microbial adhesion to hydrocarbons): جهت تهیه توده سلولی سه میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5
مقاله پژوهشی

محیط کشت مولر هینتون براث، سانتریفیوژ گردید. پس از دو بار شست و شو با بافرنمکی فسفاته (PBS= Phosphate buffer saline) جذب اولیه رسوب سلولی حاصل با افزودن بافر PBS در طول موج ۴۹۰ نانومتر بر روی ۱–۰/۸ تنظیم شد. سه میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل با سه میلی لیتر 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 می گیرد. 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):

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

تشخیص باکتری های 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 مونواولئات یا اسپان۸۰ (Span 80) اضافه گردید. این مخلوط به مدت سه دقیقه به صورت دستی هم زده شد. به منظور هموژنیزه کردن مخلوط و تهیه امولسیون، این مخلوط به مدت پنج دقیقه با حداکثر شدت سونیکه گردید (۷). به منظور تعیین نوع امولسیون تهیه شده از آزمون حلالیت 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 میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت مولر هینتون براث به درون لوله آزمایش مدرج ده میلی لیتری که حاوی پنج میلی لیتر 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 میلی لیتر محیط کشت بدون تلقیح و پنج میلی لیتر امولسیون است در کنار سایر لوله ها 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:

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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5
مقاله پژوهشی

برای تعیین موقعیت بیودمولسیفایرهای تولیدی توسط جدایه‌ها، عملکرد شکست امولسیون سوسپانسیون سلولی و مایع رویی بدون سلول هر یک از جدایه‌ها در آزمون های دمولسیفیکاسیون مجزایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا سه میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد در محیط کشت مولر هینتون براث جهت تهیه رسوب سلولی به مدت هشت دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاصل نگه داشته شد. به منظور شست وشو به میزان سه میلی لیتر آب مقطر استریل به رسوب سلولی حاصل اضافه گردید و لوله به آرامی تکان داده شد تا شست وشو به خوبی انجام شود. سپس بار دیگر محتوای لوله به مدت هشت دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد. این شست و شو دو بار تکرار شد. به رسوب سلولی تهیه شده به میزان سه میلی لیتر از محیط کشت مولر هینتون براث استریل اضافه شد. فعالیت شکست امولسیون این سوسپانسیون سلولی تهیه شده و مایع رویی بدون سلول حاصل از سانتریفیوژ در آزمون های دمولسیفیکاسیون مجزایی بر روی امولسیون آب در نفت سفید مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه باکتری‌هایی به عنوان باکتری-های تعلیق شکن در نظر گرفته می‌شوند که درصد دمولسیفیکاسیون آنها برای امولسیون آب در نفت سفید 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 هینتون براث و خالص سازی با تکنیک کشت پی در پی در محیط کشت مولر هینتون آگار چهار جدایه باکتریایی جدا گردید. جهت شناسایی جدایه های به‌دست آمده، تست-های 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.

جدول ۱- نتایج آزمون های 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	ریزوئید	ناصاف	خشن	زرد دارای پیگمان	نوک دار
۲	HS10	کوچک	دایره ای	کامل	نرم	زرد کم رنگ بدون پیگمان	محدب
۳	HS11	کوچک	ریزوئید	ناصاف	خشن	کرم و دارای پیگمان	نوک دار
۴	HS12	متوسط	دایره ای	کامل	نرم	سفید بدون پیگمان	محدب

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5
مقاله پژوهشی

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 می شود جدایه HS10 بیشترین توانایی چسبندگی به هیدروکربن ها را دارد و در آزمون های انهدام قطره و گسترش نفت عملکرد قوی از خود نشان می دهد 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 می کند. این نشان دهنده تفاوت در ماهیت و مقدار بیودمولسیفایر های تولید شده توسط این جدایه-هاست که بر شاخص های عملکردی آنها تاثرگذار است.

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 داده های حاصل در دو سری سنجش ± انحراف معیار گزارش شد.

نتایج بررسی ماهیت و موقعیت بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه‌ها در جدول چهار آورده شده است. در تمامی آزمون های دمولسیفیکاسیون لوله های کنترل در کنار سایر لوله ها استفاده شد. (شکل۱ (الف)). در بررسی نوع امولسیون پراکنش یکنواخت محلول رنگی سودان (III) در امولسیون آب در نفت سفید نشان می_دهد 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 موید این مطلب است (شکل۱(ب)).

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

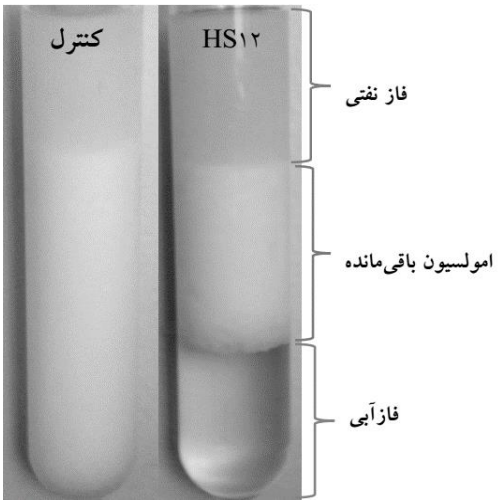
ردیف	شماره جدایه	درصد دمولسیفیکاسیون کشت باکتری حاوی سلول و مایع رویی	درصد دمولسیفیکاسیون سوسپانسیون سلولی	درصد دمولسیفیکاسیون مایع رویی بدون سلول	موقعیت بیودمولسیفایر
۱	HS9	۲۵±۳	۱۶/۷۵	۳۵/۱۴	خارج سلولی
۲	HS10	۲۸/۵۷±۵	۲۶/۴۵	۱۴/۴۴	متصل به سلول
۳	HS11	۲۷/۱۴±۱	۱۱/۱۱	۳۱/۸۹	خارج سلولی
۴	HS12	۵۱/۵۷±۱	۴۸/۸۹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

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

جدایه‌های مولد بیودمولسیفایر به عنوان *Bacillus* sp. HS9، *Staphylococcus* sp. HS10، *Bacillus* sp. HS11، *Bacillus* sp. HS12 شناسایی شدند. میزان دمولسیفیکاسیون این جدایه ها در شکست امولسیون آب در نفت سفید به ترتیب ۲۵±۳، ۲۸/۵۷±۵، ۲۷/۱۴±۱ و ۵۱/۱±۵۷ درصد گزارش شد. از این میان، جدایه ی *Bacillus sp.* HS12 بیشترین درصد دمولسیفیکاسیون را داشت. عملکرد دمولسیفیکاسیون این جدایه در شکست امولسیون آب در نفت سفید در شکل۲ نشان داده شده است.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5

شکل۱- (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) وسودان (III) (سمت چپ) در امولسیون آب در نفت سفید



شکل۲- 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 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 (۶،۸). 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 جدایه ها بر روی امولسیون آب در نفت سفید مورد ارزیابی قرار گرفت و براین‌اساس 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)، *Dietzia* sp.(۱۶)، *Paenibacillus alvei* (۳)، *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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5

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 سویه های 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 باکتری ها باشد، این نواحی آلوده برای نمونه‌گیری ترجیح داده می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر نیز این امر را تایید می کند و نشان می دهد که سویه های مولد بیودمولسیفایر جدا شده از بسترهای آلوده به منابع هیدروکربنی (مانند خاک های آلوده به نفت) دارای قابلیت مناسبی برای تولید بیودمولسیفایر هستند و توانایی سازگاری آنها با شرایط نامساعد محیطی بستر، آنها را گزینه های ایده آلی جهت تولید بیودمولسیفایرهای کارآمد می سازد.

با توجه به اینکه بیودمولسیفایرها گروهی از ترکیبات بیوسورفاکتانت با قابلیت شکست امولسیون هستند می توان از آزمون های سنجش تولید ترکیبات بیوسورفاکتانت برای بررسی تولید آن‌ها استفاده کرد (۷،۱۱). بدین منظور در این پژوهش سنجش کیفی تولید بیوسورفاکتانت با استفاده از آزمون های سنجش فعالیت سطحی سلول ها صورت گرفت که این آزمون ها شامل سنجش فعالیت همولیتیک، آزمون گسترش نفت، آزمون انهدام قطره و سنجش هیدروفوبیسیته سلولی براساس MATH می باشند. بررسی فعالیت همولیتیک جدایه‌ها از طریق کشت آن‌ها بر روی پلیت‌های آگار خون دار 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 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 جدایه ها نشان داد. شوئب و همکاران از همولیز گلبول های 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 جدایه های مولد بیودمولسیفایر جدا شده از نمونه‌های محیطی علی رغم 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 سلول ها 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5

چرا که حضور بیودمولسیفایرها در دیواره سلولی باکتری‌ها می تواند 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 ۶۷/۸۲±۴ 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 محیط ها 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 می دهند (۱۴). از طرفی حضور خود عوامل بیودمولسیفایر متصل به سلول در دیواره سلولی موجب افزایش هیدروفوبیسیته سلولی می-شود که به دنبال آن توانایی اتصال سویه به عوامل هیدروکربنی بیشتر خواهد بود. این امر موجب تسهیل استفاده از عوامل هیدروکربنی توسط سویه می شود (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* sp. HS10 بیودمولسیفایری متصل به سلول تولید می کند. بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه *Bacillus* sp. HS12 هم متصل به سلول هم خارج سلولی است. بر طبق نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر جدایه هایی 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 هوو 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 می باشند. هووانگ و همکاران گزارش دادند که بیودمولسیفایرهای کارآمد (با درصد دمولسیفیکاسیون بالای ۹۰ درصد) را می توان در هر دو موقعیت خارج سلولی و متصل به سلول یافت (۱۰). بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه‌ی *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 می شود که سلول‌های کامل به کار برده شود. این دو موقعیتی بودن سهولت کاربرد عملی این بیودمولسیفایر را دو چندان و کم هزینه می سازد چرا که این بیودمولسیفایر بدون نیاز به استخراج بیودمولسیفایر یا تفکیک سلول های باکتریایی از مایع رویی از طریق تزریق سلول‌های کامل به امولسیون بهترین عملکرد خود را به اجرا می گذارد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5

نتیجه گیری

در این پژوهش چهار جدایه باکتریایی با توانایی شکست امولسیون آب در نفت سفید از خاک های آلوده و شرایط محیطی نامناسب پالایشگاه نفت آبادان جداسازی و شناسایی شد که از میان آنها جدایه HS12 که بیشترین درصد دمولسیفیکاسیون را نشان داد به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. این جدایه براساس بررسی‌های مورفولوژی و آزمون‌های بیوشیمیایی اولیه به عنوان *Bacillus* sp. HS12 تشخیص داده شد. با توجه به پتانسیل باکتری منتخب در شکست امولسیون آب در نفت سفید و سازگاری و دوام آن در شرایط نامناسب محیطی پالایشگاه می‌توان به کاربرد بالقوه آن در دمولسیفیکاسیون صنعتی امولسیون‌های نامطلوب ایجاد شده در طی مراحل مختلف فرآوری نفت و تولید بیودمولسیفایر کارآمد امیدوار بود. بررسی بیشتر خصوصیات جدایه‌ها و جستجو برای جدایه‌های بومی جدید می تواند نقشی حیاتی در به کارگیری سویه‌های بومی کشور در صنعت نفت داشته باشد.

قدردانی

نگارندگان لازم می دانند 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 گونه های 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 تجزیه کننده نفت در فرآیند زیست پالایی. 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5

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.

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.7.5

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.