

جداسازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از رسوبات آلوده به نفت پالایشگاه نفت آبادان

هدی سباتی^۱، حسین معتمدی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۵

چکیده

بیودمولسیفایرها به عنوان ترکیبات جایگزین دمولسیفایرهای شیمیایی و سازگار با محیط زیست مطرح هستند. هدف از تحقیق حاضر دستیابی به باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر است. برای این منظور، جدایه‌های مولد بیودمولسیفایر با استفاده از محیط پایه نمکی حاوی پارافین مایع از رسوبات نفتی جداسازی و پس از غربالگری جدایه‌های برتر، شرایط رشد بهینه آن‌ها و اثر نوع منبع کربن بر تولید بیودمولسیفایر بررسی و تعیین هویت گردیدند. *Alcaligenes sp. strain HS20* با ۷۱/۴۳ درصد و *Alcaligenes sp. strain HS22* با ۸۵/۷۱ درصد شکست امولسیون جدایه‌های برتر بودند. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد جدایه HS20 ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۷ و سدیم نیترات و برای جدایه HS22 ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۷ و آمونیوم نیترات بود. بیودمولسیفایر جدایه HS20 خارج سلولی و جدایه HS22 در دو موقعیت خارج سلول و متصل به سلول حضور دارد. بر اساس این نتایج ارزیابی عملکرد بیودمولسیفایرهای تولیدی در امولسیون‌های نامطلوب آب در نفت خام در مقیاس صنعتی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: امولسیون آب در نفت، بیودمولسیفایر، جداسازی زیستی، شکست امولسیون

مقدمه

بیودمولسیفایرها گروه متنوعی از ترکیبات فعال سطحی بوده که توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها به ویژه باکتری‌ها تولید می‌شوند. این مولکول‌ها به علت دو قطبی بودن ترجیحاً تمایل دارند در سطح بین مایعات با درجه قطبیت و باندهای هیدروژنی مختلف مانند آب/نفت قرار بگیرند (Huang et al., 2013). یکی از ویژگی‌های مشخصه بیودمولسیفایرها عدم تعادل شاخصه چربی دو سستی-آب دو سستی در اجزای تشکیل دهنده آن است به طوری که وقتی خاصیت آب دو سستی و چربی دو سستی دارای توازن خوب باشد ماده به عنوان امولسیون کننده اثرات کافی از خود نشان می‌دهد در حالی که اگر این توازن وجود نداشته باشد و هیچ کدام از بخش‌های آب دوست و آب گریز ماده در فاز میانی یک امولسیون حاکم نباشند آن ماده به عنوان شکننده امولسیون عمل می‌کند (Kronberg et al., 2014; Gadhav, 2014; Kontogeorgis & Kiil, 2016). این مولکول‌ها قادرند با قرار گرفتن در حد فاصل سیالات غیرامتزاج پذیر، موجب کاهش کشش سطحی و بین سطحی در حد

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* (نویسنده مسئول: motamedih@scu.ac.ir, hhmotamedi@yahoo.com)

فاصل و تسهیل شکست امولسیون می‌شوند (e Silva et al., 2017). به طور معمول هیدروکربن‌های هیدروفوب به عنوان سوبسترا برای تولید بیودمولسیفایر توسط باکتری‌ها مصرف می‌شوند. بدیهی است که عملکرد بیولوژیکی ترکیبات فعال سطحی به ترکیبات هیدروکربنی وابسته است. کربوهیدرات‌ها کمتر به عنوان منبع کربن و انرژی برای تولید بیودمولسیفایر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Amirabadi et al., 2013; Hou et al., 2014). مطالعات گذشته نیز نشان داده است که عمده باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از محیط‌هایی جدا شدند که به ترکیبات هیدروکربنی و نفتی آلوده هستند و به نظر می‌رسد که تولید این ترکیبات یکی از مکانیسم‌های بقای آن‌ها در این محیط‌ها است و به آن‌ها کمک می‌کند که بتوانند از ترکیبات هیدروفوب موجود در این محیط‌های آلوده استفاده کنند (Liu et al., 2011; Huang et al., 2010). بیودمولسیفایرها بر اساس ساختار شیمیایی و منشأ میکروبی، به دو گروه اصلی شامل بیودمولسیفایرهای متصل به سطح سلول (عمدتاً از جنس اسیدهای چرب) و بیودمولسیفایرهای خارج سلولی (عمدتاً از جنس استوئین، پلی‌ساکاریدها، گلیکولیپیدها، فسفولیپیدها، گلیکوپروتئین‌ها و رامنولیپیدها) تقسیم می‌شوند. این ترکیبات با داشتن مزایایی چون امکان تولید از منابع تجدیدپذیر و ارزان قیمت، سازگاری بیشتر با محیط زیست، سمیت کمتر و قابلیت تجزیه زیستی بالاتر، نسبت به دمولسیفایرهای شیمیایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. بیودمولسیفایرها در صنایع مختلف نساجی، فلزی، غذایی، بهداشتی-آرایشی و به خصوص صنایع نفتی و حفاری به عنوان عوامل شکننده و حذف کننده امولسیون‌های نامطلوب به کار می‌روند (Li et al., 2012; Huang et al., 2012). بزرگ‌ترین بخش بازار مصرف بیودمولسیفایرها به صنعت نفت اختصاص دارد. این ترکیبات برای استحصال نفتی با کمیت و کیفیت بیشتر، حذف لجن نفتی و بهبود تصفیه پساب‌های حاصله از استخراج نفت خام مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sad et al., 2015, Atta et al., 2014). هدف از این پژوهش، جداسازی، شناسایی و تعیین ویژگی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از رسوبات نفتی پالایشگاه نفت است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

رسوبات نفتی مخازن ذخیره‌سازی و خطوط انتقال نفت پالایشگاه نفت آبادان (با مختصات جغرافیایی 30° شمالی و 48° شرقی) واقع در استان خوزستان از عمق ۲ سانتی‌متری با استفاده از تیغه‌ی استریل جمع‌آوری و درون شیشه‌هایی استریل ریخته شد و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. از ۴ نقطه متفاوت دو سری نمونه تهیه شد.

جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده بیودمولسیفایر

به منظور جداسازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از محیط کشت پایه نمکی تعدیل یافته (MMSM: Modified Mineral Salt Medium) همراه چهار درصد پارافین مایع به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده شد. این محیط (pH

7.2) حاوی ترکیبات: (گرم بر لیتر) ۴ گرم آمونیوم نیترات، ۴ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۶ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۲ گرم منیزیم سولفات هفت آبه و ۱ میلی لیتر محلول عناصر معدنی کم مقدار است. محلول عناصر معدنی کم مقدار (pH 7) حاوی ترکیبات: (گرم بر لیتر) ۱ گرم کلسیم کلرید دو آبه، ۱ گرم سولفات آهن (II) هفت آبه و ۱/۴ گرم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید است. میزان ۱ گرم از نمونه‌های رسوب درون این محیط جهت غنی‌سازی اولیه تلقیح شد و بر روی شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۷ روز، ۱ میلی لیتر از محیط برداشته شد و به محیط MMSM جدید انتقال یافت. این عمل تا ۲ پاساژ ادامه یافت تا اینکه کدورت به دست آمده ناشی از رشد باکتری‌ها باشد و آلودگی ترکیبات دیگر در نمونه کاهش یابد. از پاساژ نهایی میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت MMSM آگار منتقل گردید. پس از رشد، باکتری‌ها به صورت تک کلنی جداسازی و به محیط MMSM آگار جدید انتقال یافتند. محیط MMSM آگار از افزودن ۲۰ گرم آگار بیولوژیک و یک درصد پارافین مایع به عنوان منبع انرژی و کربن به محیط مذکور فوق تهیه شد (Huang *et al.*, 2009).

تست‌های غربالگری

۱) سنجش فعالیت همولیتیک:

برای انجام این سنجش باکتری‌های جدا شده در مراحل قبل در محیط کشت بلاد آگار (مرک، آلمان) کشت داده شده و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. همولیز که به صورت هاله نمایان می‌شود، نشان‌دهنده مثبت بودن فعالیت همولیتیک است و باکتری که فعالیت همولیتیک مثبت دارد، می‌تواند مولد بیودمولسیفایر باشد (Thavasi *et al.*, 2011).

۲) گسترش نفت خام:

بدین منظور ابتدا سویه‌ها درون محیط کشت مولر هینتون براث (بیولایف، ایتالیا) تلقیح شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت و رشد سویه‌ها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی برداشته شد. ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک پلیت (قطر ~۸۰ میلی‌متر) ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آن افزوده گردید که به صورت یک لایه نازک یکپارچه بر روی سطح آب مقطر قرار گرفت. در ادامه ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت براث جدایه بر روی سطح نفت ریخته شد. تشکیل ناحیه شفاف در لایه نفتی نشان‌دهنده حضور بیودمولسیفایر در محیط است. در این تست آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. نتایج به صورت منفی (بدون هاله) و مثبت (ایجاد هاله) گزارش شد (Thavasi *et al.*, 2011).

۳) انهدام قطره:

در این تست ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی رشد یافته در محیط کشت مولر هینتون براث (۲۴ ساعت، ۳۵ درجه سانتی‌گراد) بر روی یک قطره حاوی ۱۰ میکرولیتر نفت خام بر روی یک لام تمیز قرار داده شد. پس از گذشت یک دقیقه قطر قطره ایجاد شده در سطح نفت خام بررسی گردید. در صورتی که قطر قطره ایجاد شده حداقل یک میلی‌متر از قطر قطره آب مقطر استریل (کنترل منفی) بیشتر بود تولید بیودمولسیفایر توسط میکروارگانیسم به صورت مثبت گزارش می‌شود در غیر این صورت نتیجه منفی خواهد بود (Thavasi *et al.*, 2011).

سنجش هیدروفوبیسیتة سلولی

ابتدا سوسپانسیون باکتریایی در بافر نمکی فسفات که واجد ترکیبات: (گرم بر لیتر) ۸ گرم نمک طعام، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۶۱ گرم فسفات دی سدیک، ۰/۱۹ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات است تهیه شد. سپس به مدت ۳ دقیقه همزنی شدید انجام گرفت و میزان جذب اولیه توسط دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. سپس ۲ میلی‌لیتر نفت سفید به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. پس از گذشت زمان انکوباسیون، مخلوط بعد از ۲ دقیقه همزنی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. نتایج به صورت اختلاف درصد جذب فاز آبی پس از تیمار و جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی به جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر سنجیده شد (Huang *et al.*, 2009).

آزمون شکست امولسیون

دو میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط مولر هینتون براث به درون لوله آزمایش مدرج ۱۰ میلی‌لیتری که حاوی ۵ میلی‌لیتر امولسیون بود اضافه شد و به منظور اختلاط کامل این لوله به صورت دستی هم زده شد. سپس این لوله به صورت ساکن در حمام آبی 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 کارگذاری لوله در حمام آب ثبت گردید. در تمامی تست‌های دمولسیفیکاسیون لوله کنترل که حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت بدون تلقیح و ۵ میلی‌لیتر امولسیون است در کنار سایر لوله‌ها استفاده شد. با جای‌گذاری نتایج بدست آمده در معادله (۱) درصد شکست امولسیون توسط باکتری محاسبه گردید. امولسیون مورد بررسی در این سنجش از اختلاط آب مقطر استریل و نفت به نسبت ۱:۱ (حجمی/حجمی) و با افزودن ۱/۶۷ درصد (حجمی/حجمی) سورفاکتانت غیر یونی اسپان ۸۰ آماده شد و نوع آن توسط تست حلالیت رنگ مورد تایید قرار گرفت (Huang *et al.*, 2010). امولسیون حاصله میزان تفکیک کمتر از ۱۰ درصد را در طی ۲۴ ساعت نشان داد.

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

تعیین موقعیت بیودمولسیفایر

برای تعیین موقعیت بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه‌ها فعالیت شکست امولسیون سوسپانسیون سلولی و مایع رویی بدون سلول هر یک از جدایه‌ها در تست‌های شکست امولسیون مجزا در امولسیون آب در نفت سفید مورد ارزیابی قرار گرفت (Huang *et al.*, 2010).

شناسایی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر

با استفاده از آزمون‌هایی مانند رنگ آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، آزمون KOH، آزمایش اکسیداز و کاتالاز و بررسی مورفولوژیک کلنی شناسایی اولیه باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر انجام گرفت. در ادامه شناسایی مولکولی باکتری‌ها با تکثیر قسمتی از ژن *16S rRNA* توسط پرایمرهای ذکر شده در جدول (۱) صورت گرفت (Weisburg *et al.*, 1991).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی باکتری‌ها

توالی	طول	نوع پرایمر
5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	۳۷ باز	پرایمر رفت (fD1)
5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'	۳۳ باز	پرایمر برگشت (rD1)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR: Polymerase Chain Reaction) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت نهایی ۰/۴ پیکومول، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲X (Mastermix 2X) (Amplicon، دانمارک) و ۹/۵ میکرولیتر آب میلی کیو (MiliQ water) استریل انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۲۵ چرخه شامل واسرشت شدن (۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه)، اتصال (۵۵ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه و گسترش (۷۲ درجه سانتی گراد، ۱۲۰ ثانیه) و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی ۳ میکرولیتر رنگ سایبرگرین الکتروفورز گردید. پس از تایید مشاهده باند ۱۵۰۰ جفت بازی، محصول PCR به منظور تعیین توالی ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در نرم افزار ویرایش زیستی (Bioedit) بررسی و همولوژی آن‌ها با سایر باکتری‌ها مقایسه گردید (Chen, 2002). برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار MEGA7 استفاده شد که این کار با روش Neighbor-joining انجام گرفت و رابطه فیلوژنی آن‌ها بررسی شد (Saitou & Nei, 1987; Felsenstein, 1985; Tamura *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2016).

بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری

به منظور انتخاب دما، pH و منبع نیتروژن مناسب جهت رشد باکتری‌های منتخب، منحنی رشد این باکتری‌ها ابتدا در سه دمای 35°C ، 40°C و 45°C در محیط اختصاصی MMSM حاوی پارافین مایع ۴ درصد از طریق روش اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۵۵ نانومتر رسم شد و پس از انتخاب مناسب‌ترین دمای رشد، با ثابت نگه‌داشتن دما، pH مناسب رشد نیز تعیین شد. برای تعیین pH مناسب رشد، سه pH ۶، ۷ و ۸ انتخاب شد. انتخاب مقادیر دما و pH برای بهینه‌سازی براساس بازه دما و pH موجود در محل نمونه‌گیری صورت گرفت. پس از انتخاب مناسب‌ترین pH رشد، با ثابت نگه‌داشتن دما و pH در حالت بهینه برای هر جدایه، بهینه‌سازی منبع نیتروژنی صورت گرفت. به منظور بهینه‌سازی منبع نیتروژن جدایه‌های منتخب در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط MMSM دارای ۴ درصد پارافین مایع با هر کدام از منابع مختلف نیتروژن شامل ۴ گرم در لیتر آمونیوم نیترات، ۸/۸۴ گرم در لیتر سدیم نیترات یا ۳ گرم در لیتر اوره کشت داده شدند. مقادیر به کار برده شده از هر منبع نیتروژنی بر حسب اکی‌والان نیتروژن در آمونیوم نیترات (کنترل) محاسبه گردید. از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند به میزان ۱ درصد حجم محیط کشت به MMSM حاوی ۴ درصد پارافین مایع تلقیح شد و در شیکر انکوباتور در دور ۱۵۰ rpm به منظور هوادهی، گرماگذاری شد. بعد از آن هر ۲ ساعت میزان جذب باکتری در طول موج ۶۵۵ نانومتر خوانده شد و در طی ۲۴ ساعت منحنی رشد باکتری توسط برنامه اکسل رسم شد (Sabati & Motamedi, 2018).

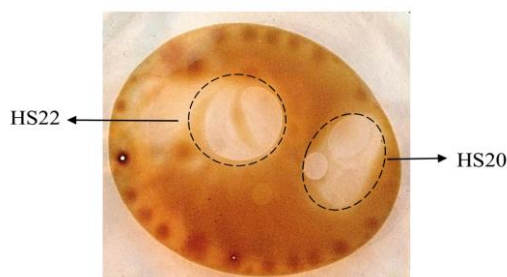
بررسی تأثیر نوع منبع کربنی بر رشد و شکست امولسیون

به منظور بررسی تأثیر منابع کربنی هیدروفیل و هیدروفوب بر رشد و عملکرد شکست امولسیون توسط سویه‌ها رشد و شکست امولسیون جدایه‌های منتخب در سه حالت مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در حالت اول جدایه‌ها در محیط MMSM حاوی ۴ درصد پارافین مایع (v/v) به عنوان منبع کربن هیدروفوب و ۰/۱۴ درصد نیترات آمونیوم (w/v) به عنوان منبع نیتروژن کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در حالت دوم جدایه‌ها در محیط مولر هینتون برات کشت داده شدند. محیط کشت مولر هینتون برات که حاوی مجموعه‌ای از منابع کربنی هیدروفیل است و به منظور بررسی تأثیر حضور مجموعه منابع کربنی هیدروفیل در رشد و عملکرد جدایه‌های شکننده امولسیون مورد استفاده قرار گرفت. در حالت سوم ابتدا جدایه‌ها در محیط MMSM حاوی ۴ درصد پارافین مایع و ۰/۱۴ درصد نیترات آمونیوم کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت جدایه‌های رشد کرده به محیط مولر هینتون برات منتقل شدند و مجدداً این جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در هر سه حالت رشد جدایه‌ها از طریق مقایسه کدورت محیط تلقیح یافته با شاهد بررسی گردید و عملکرد شکست امولسیون توسط

جدایه‌های رشد کرده به وسیله آزمون سنجش شکست امولسیون در امولسیون آب در نفت سفید مورد ارزیابی قرار گرفت (Sabati & Motamedi, 2018).

نتایج و بحث

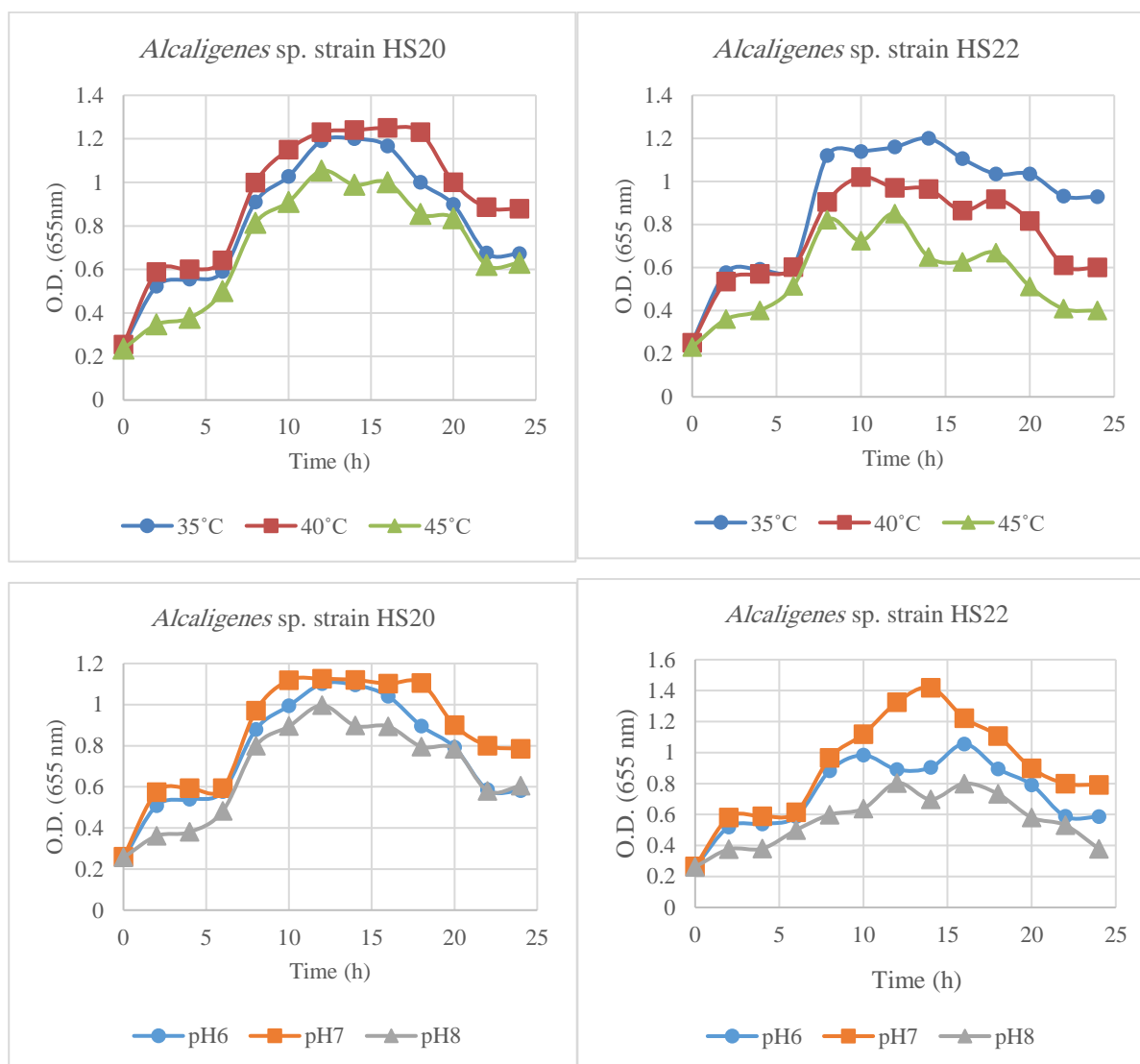
۶ جدایه باکتریایی تولید کننده بیوادمولسیفایر از رسوبات نفتی مخازن ذخیره سازی نفت خام پالایشگاه جداسازی گردید. از مجموع جدایه‌ها، ۵ جدایه در تست همولیز فعالیت همولیتیکی را نشان دادند. در تست انهدام قطره جدایه HS22 بهترین شکل قطره را ایجاد کرد و در تست گسترش نفت دو جدایه HS20 و HS22 ناحیه شفاف را در سطح لایه نفت خام ایجاد کردند (شکل ۱). بر اساس این سه تست ۲ جدایه HS20 و HS22 به عنوان جدایه‌های مولد بیوادمولسیفایر برای مراحل بعدی غربالگری انتخاب شدند.

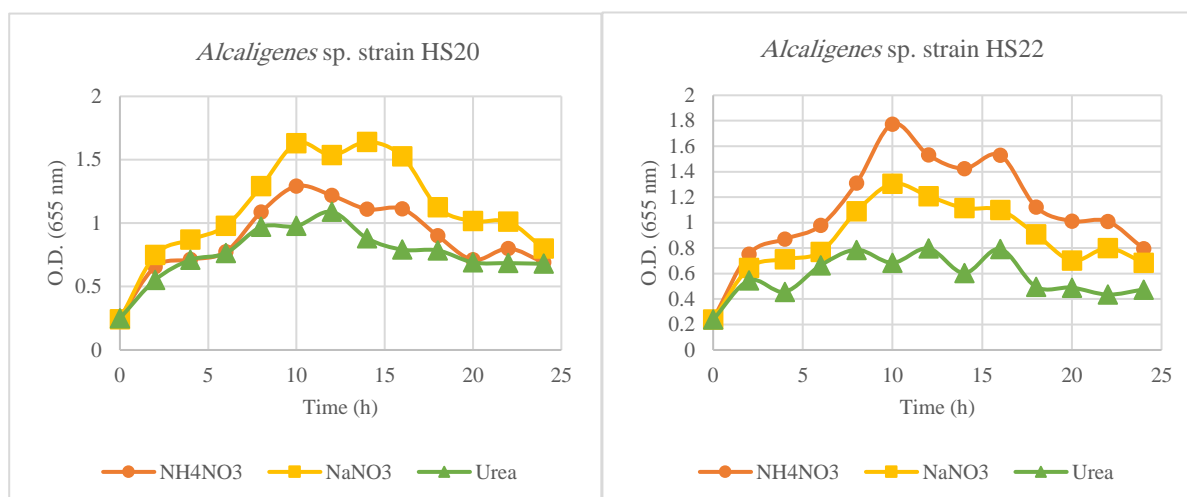


شکل ۱: ناحیه شفاف ایجاد شده در تست گسترش نفت توسط دو جدایه HS22 و HS20

جدایه HS20 که از نمونه رسوب مخازن ذخیره سازی نفت خام جداسازی شد، یک کوکوباسیل گرم منفی با تست اکسیداز، کاتالاز و اسنات مثبت است. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد این جدایه به ترتیب ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۷ و سدیم نترات است (شکل ۲). حداکثر درصد شکست امولسیون این جدایه در امولسیون آب در نفت خام ۴۸ ساعت بعد از تلقیح جدایه به امولسیون ۴۸/۵۷ درصد گزارش شد. جدایه HS22 که نیز از نمونه رسوب مخازن ذخیره سازی نفت خام به دست آمد، یک باکتری باسیل گرم منفی با تست اکسیداز، کاتالاز و اسنات مثبت است. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد جدایه HS22 به ترتیب ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۷ و آمونیوم نترات است (شکل ۲). حداکثر درصد شکست امولسیون توسط این جدایه در امولسیون آب در نفت خام ۴۸ ساعت بعد از تلقیح جدایه به امولسیون ۴۵/۷۱ درصد گزارش شد. میزان شکست صورت گرفته در امولسیون‌های آب در نفت سفید و آب در نفت خام توسط این دو جدایه در مقایسه با لوله شاهد در جدول (۲) و شکل (۳) نشان داده شده است. کلنی هر دو جدایه دایره‌ای، محدب، سفید بدون پیگمانت، نرم و با حاشیه‌ای صاف و کامل بود. پس از شناسایی مولکولی و تعیین توالی ژن *16S rRNA* مشخص گردید که هر دو جدایه به جنس *Alcaligenes* تعلق دارند. جدایه‌های یاد شد با عناوین *Alcaligenes* sp. strain HS20 و *Alcaligenes* sp. strain HS22 شناسایی شدند و سپس به ترتیب با شماره‌های دسترسی MF871631 و MF871632 در پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI: National Center for

Biotechnology Information) ثبت شدند. نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر با استفاده از پرایمرهای $rD1$ و $fD1$ در شکل (۴) نشان داده شده است. نتایج حاصل از بلاست نوکلئوتیدی دو سویه نشان داد که سویه HS20 با طول توالی ۱۳۳۱ جفت باز و سویه HS22 با طول توالی ۹۹۲ جفت باز به سویه‌های جنس *آلکالیژنز* ثبت شده در بانک ژن تشابه ۱۰۰ درصد دارند. بررسی ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های HS20 و HS22 با سویه‌های باکتریایی ثبت شده در پایگاه NCBI و ترسیم درخت فیلوژنتیکی آن‌ها نشان داد که سویه‌های مذکور از نظر تاکسونومی به عنوان سویه‌ای از *Alcaligenes* طبقه بندی می‌شوند (شکل ۵).

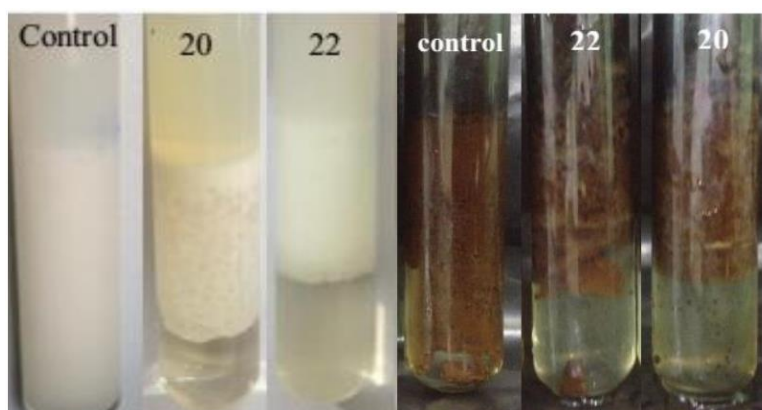




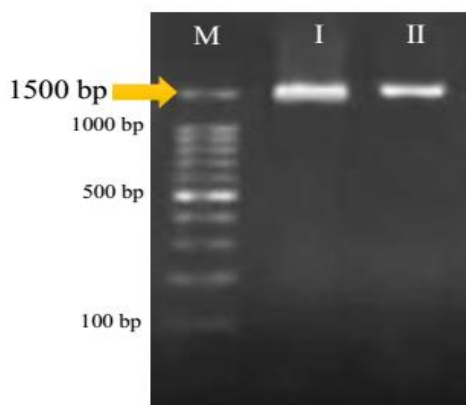
شکل ۲: منحنی رشد سویه‌های HS20 (سمت راست) و HS22 (سمت چپ) در الف) دماهای مختلف (35°C , 40°C , 45°C) - ب) شرایط pH متفاوت (۶، ۷، ۸) - ج) حضور منابع نیتروژن آمونیوم نیترات، سدیم نیترات و اوره. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد سویه HS20 به ترتیب ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۷ و سدیم نیترات است. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد جدایه HS22 به ترتیب ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۷ و آمونیوم نیترات است.

جدول ۲: میزان فعالیت شکست امولسیون و هیدروفوبیسیته سطح سلولی جدایه‌های منتخب

HS22	HS20	پارامتر اندازه‌گیری/سویه
۸۵/۷۱	۷۱/۴۳	حداکثر درصد شکست امولسیون آب در نفت سفید
۵۰	۹۲/۸۶	درصد شکست امولسیون آب در نفت سفید توسط مایع رویی
۵۰	۳۴/۲۸	درصد شکست امولسیون آب در نفت سفید توسط سوسپانسیون سلولی
۴۵/۷۱	۴۸/۵۷	درصد شکست امولسیون آب در نفت خام توسط محیط کشت تلقیح یافته
۷۲/۲۴	۷۲/۹۹	درصد هیدروفوبیسیته سلولی

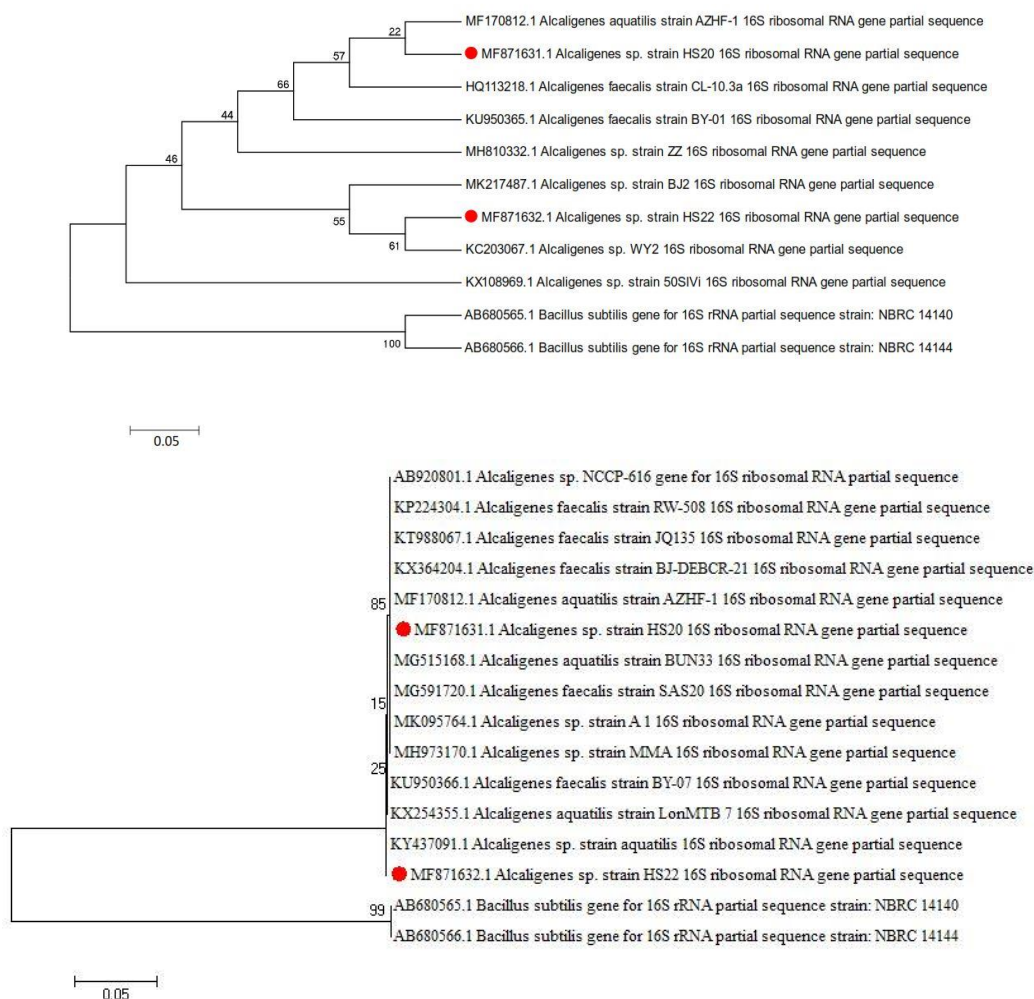


شکل ۳: میزان شکست امولسیون آب در نفت سفید (سمت چپ تصویر) و آب در نفت خام (سمت راست تصویر) توسط دوسویه HS20 و HS22 در مقایسه با لوله شاهد در آزمون شکست امولسیون. حداکثر شکست امولسیون توسط دو سویه HS20 و HS22 به ترتیب ۷۱/۴۳ و ۸۵/۷۱ درصد در امولسیون آب در نفت سفید، ۴۸/۵۷ و ۴۵/۷۱ درصد در امولسیون آب در نفت خام حاصل شد.



شکل ۴: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویه‌های باکتریایی HS20 و HS22. (M) DNA نشانگر، (I) سویه HS20 و (II)

سویه HS22



شکل ۵: درخت فیلوژنی، براساس آنالیز توالی ژن *16S rRNA* با استفاده از روش Neighbor-Joining بر طبق فواصل تکاملی ایزوله‌های مورد مطالعه (مشخص شده با دایره) و توالی‌های مرجع در GenBank رسم شد. اعداد نشان داده شده در کنار گره‌ها بیانگر شاخص اعتبارسنجی (Bootstrap) است. باکتری (*Bacillus subtilis* (AB680565.1, AB680566)) عنوان گروه بیرونی (Outgroup) استفاده شد. نوار مقیاس بیانگر جایگزینی یک نوکلئوتید در ۵۰۰ نوکلئوتید است.

به منظور بررسی تاثیر منابع کربنی بر رشد و عملکرد شکست امولسیون، رشد و شکست امولسیون جدایه‌های منتخب در سه حالت مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی به ترتیب در جدول (۳) آمده است. در ارزیابی صورت گرفته مشخص گردید که سویه‌های منتخب شکننده امولسیون قادرند در حضور پارافین مایع (به عنوان منبع کربنی هیدروفوب) و در محیط مولر هینتون براث که حاوی مجموعه‌ای از منابع کربنی هیدروفیل است رشد کنند (شکل ۸).

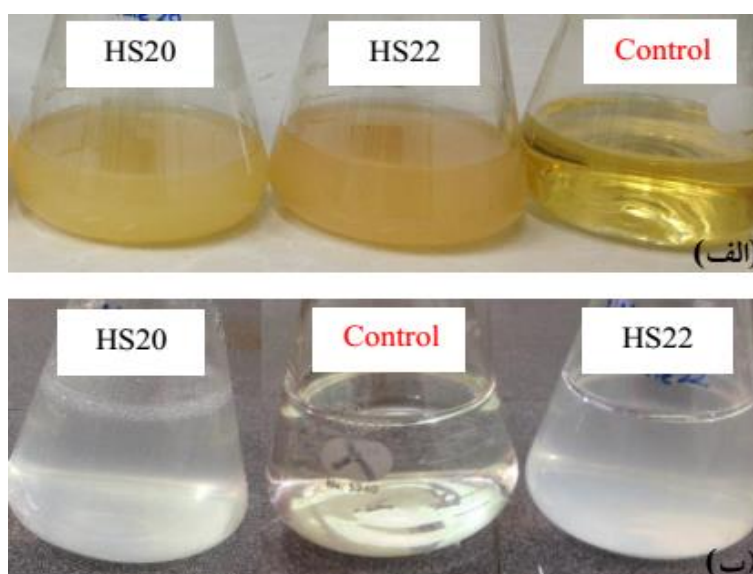
این سویه‌ها برخلاف فعالیت شکست امولسیون مناسبی که در حضور منابع کربنی هیدروفیل نشان دادند در حضور پارافین مایع به تنهایی فعالیت شکست امولسیون نشان ندادند. استفاده از هر دو نوع منبع کربنی برای سویه‌های HS20 و HS22 موجب بهبود عملکرد شکست امولسیون توسط آن‌ها گردید و درصد شکست امولسیون آن‌ها را به میزان ۱۰ درصد افزایش داد.

جدول ۳: متوسط درصد دمولسیفیکاسیون جدایه‌های منتخب در حضور و عدم حضور منبع کربنی هیدروفوب پس از ۲۴

ساعت

حالت سوم		حالت دوم		حالت اول		سویه
درصد شکست امولسیون*	رشد	درصد شکست امولسیون*	رشد	درصد شکست امولسیون*	رشد	
۶۰/۸۵±۵	+	۵۸/۱۴±۲	+	-	+	HS20
۷۰/۱۴±۳	+	۶۲/۵۷±۲	+	-	+	HS22

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



شکل ۸: رشد سویه‌های HS20 و HS22 در الف) محیط مولر هینتون براث و ب) محیط نمکی حاوی پارافین مایع

بررسی‌های صورت گرفته در این پژوهش نشان داد که بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه HS20 ترکیبی خارج سلولی است چرا که میزان فعالیت شکست امولسیون در حالت کاربرد مایع رویی محیط تلقیح یافته باکتری بیش از حالات دیگر است در حالی که بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه HS22 بیودمولسیفایری است که در دو موقعیت خارج سلول و متصل به سلول حضور دارد.

اکثر باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر مورد بررسی در مطالعات گذشته از محیط‌هایی جداسازی شده‌اند که به منابع هیدروکربنی آلوده بودند چرا که این باکتری‌ها عمدتاً قادرند از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند. به عنوان مثال سویه شکننده امولسیون *Alcaligenes sp. S-KJ-1* مورد بررسی در مطالعه هانگ و همکاران از طریق غربال‌گری خاک‌های آلوده به نفت جداسازی گشت (Huang et al., 2009). سویه شکننده امولسیون *Ochrobactrum anthropi* strain RIPI5-1 مورد بررسی در مطالعه محبعلی و همکاران از طریق غربال‌گری نفت، پساب و خاک‌های آلوده به نفت و روغن صنایع غذایی حاصل شد (Mohebbali et al., 2012). در این پژوهش نیز به منظور به دست آوردن سویه‌هایی که توانایی شکست امولسیون را داشته باشند از رسوبات آلوده به نفت مخازن ذخیره سازی نفت خام پالایشگاه نفت نمونه‌گیری انجام شد. انتخاب این نقطه جهت نمونه‌گیری به دلیل وجود محرک محیطی مناسب (آلودگی بستر نمونه‌گیری به نفت خام) بود. عملکرد شکست امولسیون سویه‌های باکتریایی بدست آمده از طریق آزمون شکست امولسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون شکست امولسیون صورت گرفته در مراحل ابتدایی، بر روی امولسیون آب در نفت سفید و در مراحل نهایی به منظور کاربرد صنعتی سویه‌ها بر روی امولسیون آب در نفت خام انجام شد. نتایج آزمون شکست امولسیون همان‌طور که در جدول (۲) بیان شده است از قابلیت خوب این سویه‌ها در شکست امولسیون آب در نفت سفید حکایت می‌کند به گونه‌ای که حداکثر درصد شکست امولسیون سویه‌های HS20 و HS22 به ترتیب ۷۱/۴۳ و ۸۵/۷۱ درصد گزارش شد. بر این اساس سویه‌های منتخب فعالیت شکست امولسیون قابل قبولی را در مقایسه با سویه‌های باکتریایی شکننده امولسیون مورد بررسی در مطالعات پیشین دارند. به عنوان مثال در مطالعه هانگ و همکاران (۲۰۰۹) درصد شکست امولسیون تقریباً ۸۵ درصدی را برای شکست امولسیون آب در نفت توسط جدایه‌ی *Alcaligenes sp. S-KJ-1* گزارش شد (Huang et al., 2009). لین و همکاران درصد شکست امولسیون جدایه *Deitzia sp. S-SJ-1* برای امولسیون آب در نفت را ۸۸/۳ درصد گزارش دادند (Liu et al., 2009). بر خلاف عملکرد خوب سویه‌های منتخب در شکست امولسیون آب در نفت سفید این سویه‌ها عملکرد شکست امولسیون متوسطی را در شکست امولسیون آب در نفت خام نشان دادند (جدول ۲). عملکرد متوسط آن‌ها در شکست امولسیون آب در نفت خام به صورت ذیل قابل تفسیر است: در این پژوهش امولسیون آب در نفت خام از نفت خامی تهیه شد که از چاه نفتی استخراج شده و هنوز وارد عملیات پالایش نشده است ولی آب‌گیری آن در عملیات بالادستی انجام شده است. بدیهی است که این نفت خام پالایش شده حاوی ترکیبات امولسیون‌کننده طبیعی همچون رزین و آسفالتن است که موجب پایداری بیشتر امولسیون تهیه شده می‌شوند. پیچیدگی ساختار نفت خام در مقایسه با نفت سفید یکی از دلایل عملکرد متوسط سویه‌های منتخب در امولسیون آب در نفت خام است. لذا در مطالعاتی که هدف جداسازی باکتری‌های شکننده امولسیون باشد به منظور جلوگیری از حذف باکتری‌هایی که ممکن است دارای پتانسیل شکست امولسیون باشند، نخست بهتر است فعالیت شکست امولسیون آن‌ها در امولسیون‌هایی از آب-نفت سفید ارزیابی شود. نتایج

پژوهش حاضر موید این مطلب است. در مطالعه لین و همکاران نتایج مشابهی با نتیجه پژوهش حاضر گزارش شده است (Liu *et al.*, 2011).

به لحاظ موقعیت، بیودمولسیفایرها به دو گروه خارج سلولی و متصل به سلول تقسیم می‌شوند (Huang *et al.*, 2012). 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 خالص‌سازی 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 (Huang *et al.*, 2010). در بررسی موقعیت بیودمولسیفایرهای تولیدی توسط سویه‌های HS20 و HS22 مشخص شد که بیودمولسیفایر خارج سلولی سویه‌ی HS20 زمانی که به صورت تنها و جدا از سایر محتویات سلول به کار می‌رود عملکرد شکست امولسیون بسیار خوبی را نمایش می‌دهد و نتیجه شکست امولسیون مایع رویی این جدایه مؤید این مطلب است (جدول ۲). به نظر می‌رسد جدا کردن این بیودمولسیفایر از سایر عوامل سلولی موجب برداشتن اثر مهاری عوامل سلولی و بهبود عملکرد آن می‌شود. لذا در صنعت و کاربرد عملی تزریق خالص این بیودمولسیفایر پیشنهاد می‌شود. بیودمولسیفایر سویه‌ی HS22 هم به صورت خارج سلولی و هم به صورت متصل به سلول است. بهترین عملکرد شکست امولسیون این سویه زمانی حاصل می‌شود که سلول‌های کامل به کار برده شود که این امر به همراه نتایج تست شکست امولسیون ذکر شده در جدول (۲) مؤید دو موقعیتی بودن این بیودمولسیفایر است. لذا در کاربرد عملی تزریق سلول‌های کامل این جدایه به امولسیون پیشنهاد می‌شود. تاکنون تعداد کمی از بیودمولسیفایرهای خارج سلولی گزارش شده است و در بیشتر مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه مانند مطالعات هو و همکاران (Hou *et al.*, 2014) و یان و همکاران (Yan *et al.*, 2012) بر روی عوامل متصل به سلول کار کردند و در تعداد کمی از مطالعات مانند مطالعه لی و همکاران بر روی بیودمولسیفایرهای خارج سلولی کار کردند (Li *et al.*, 2012).

بررسی‌ها نشان داده است که شرایط رشدی مانند دما و pH و شرایط تغذیه‌ای به ویژه نوع منبع کربنی بر رشد، عملکرد شکست امولسیون باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر و نوع بیودمولسیفایر تولیدی توسط آن‌ها موثر است که هر کدام به تفکیک مورد بررسی قرار می‌گیرد. مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه نشان داده است که بیوسنتز ترکیبات بیودمولسیفایر در حضور منابع کربنی هیدروفوب در مقایسه با منابع کربنی هیدروفیل غالب‌تر است (Kiran *et al.*, 2014) و عمده باکتری‌های شکننده امولسیون قادرند از منابع کربنی هیدروفوب مانند نفت خام، تترادکان، هگزادکان و نفت سفید به عنوان منبع کربن استفاده کنند (Liu *et al.*, 2011). از طرفی نوع منبع کربنی بر فعالیت شکست امولسیون باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر نیز موثر است به گونه‌ای که در تولید ترکیبات بیودمولسیفایر هر دو نوع منبع کربنی هیدروفیل و هیدروفوب مشاهده می‌شود.

نتایج حاصل از بررسی تاثیر منابع کربنی بر رشد و عملکرد شکست امولسیون در این پژوهش با نتایج مطالعات پیشین در این زمینه مطابقت دارد. به عنوان مثال مطالعه لی و همکاران نشان داد که پارافین مایع موجود در محیط به عنوان منبع کربنی به صورت یک محرک در تولید بیودمولسیفایر عمل می‌کند و حضور آن برای تولید بیودمولسیفایر الزامی است (Li et al., 2012). مطالعه هو و همکاران نشان داد که جدایه باکتریایی *Bacillus cereus* LH-6 بهترین فعالیت شکست امولسیون خود را در حضور پارافین مایع نشان می‌دهد که این امر از سازش و مواجه طولانی مدت این باکتری با این منبع حکایت می‌کند. از طرفی پارافین مایع مجموعه‌ای از آلکان‌های کوتاه زنجیر بوده که برای این باکتری که قادر است نفت خام را مصرف کند یکی از منابع کربنی رایج قابل استفاده است. این مطالعه نشان داد که استفاده از ترکیبی از منابع کربنی و نیتروژنی به طرز قابل توجهی عملکرد شکست امولسیون را بهبود می‌بخشد (Hou et al., 2014). مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه نشان داده است که نوع منبع کربنی علاوه بر تأثیر بر عملکرد شکست امولسیون باکتری‌های شکننده امولسیون بر نوع بیودمولسیفایر تولیدی توسط آنها نیز تاثیر می‌گذارد به گونه‌ای که بیودمولسیفایرهای متصل به سلول عمدتاً در حضور منابع کربنی هیدروفوب همچون نفت خام، روغن‌های سرخ کردنی، پارافین مایع و نفت سفید تولید می‌شوند که این امر نشان می‌دهد که منابع کربنی هیدروفوب می‌تواند به عنوان محرکی برای تولید این ترکیبات باشد (Hou et al., 2014; Liu et al., 2011).

از آنجایی که بیودمولسیفایرها محصولاتی با ارزشی برای کاربردهای صنعتی به ویژه در صنعت نفت هستند تعیین شرایط بهینه برای عملکرد آنها و رشد باکتری‌های مولدشان به لحاظ اقتصادی اهمیت دارد (Luna et al., 2015). در مطالعات لی و همکاران و لیو و همکاران گزارش شده است که تولید و نوع بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه‌های باکتریایی به شرایط رشد باکتری بستگی دارد بنابراین بهینه سازی شرایط رشد و شرایط تغذیه ای باکتری‌های شکننده امولسیون یکی از فاکتورهای کلیدی در بهبود عملکرد شکست امولسیون توسط آنهاست که باید مورد بررسی قرار گیرد (Li et al., 2000; Liu et al., 2010). در این پژوهش به منظور بهبود فعالیت شکست امولسیون توسط سویه‌های HS20 و HS22 برای آنها بهینه سازی دما، pH و منبع نیتروژنی صورت گرفت. نتایج بهینه‌سازی دما و pH برای آنها نشان می‌دهد که هر دو سویه در دماهای تعیین شده برای بهینه‌سازی (یعنی دماهای ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و مقادیر pH تعیین شده برای بهینه‌سازی (یعنی مقادیر pH ۶، ۷ و ۸) قادر به رشد هستند اما براساس پیک منحنی‌های رسم شده دمای بهینه و pH بهینه سویه HS22 ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ و دما و pH بهینه‌ی سویه HS20 ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ تعیین گردید. انتخاب دماها و مقادیر pH بهینه‌سازی براساس میانگین دما و pH در محیط جداسازی انجام شد. نتایج بهینه‌سازی دما و pH در مطالعه حاضر در تطابق با بسیاری از مطالعات پیشین است. به عنوان مثال در مطالعه لیو و همکاران دمای بهینه برای رشد و عملکرد شکننده امولسیون سویه *Alcaligenes* sp. S-KJ-1 ۳۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Liu et al., 2010). در مطالعه امیرآبادی و همکاران دمای بهینه برای رشد و عملکرد سویه مولد بیودمولسیفایر *Paenibacillus alvei* ARN63 ۳۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Amirabadi et al., 2013).

در زمینه بهینه‌سازی pH مطالعه لیو و همکاران نشان داد که pH بهینه سویه *Alcaligenes* sp. S-KJ-1 تقریباً ۹/۵ است (Liu *et al.*, 2010) که با نتایج بهینه‌سازی pH در پژوهش حاضر در تضاد است. این سویه باکتریایی از خاک‌های آلوده به نفت و ترکیبات هیدروکربنی جداسازی شده است و ممکن است یکی از دلایل رشد و عملکرد بهتر آن در pH قلیایی، قلیایی بودن بستری است که باکتری از آن جداسازی شده است. این امر با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد چرا که میانگین دما و pH بستری که باکتری از آن جداسازی شده است به ترتیب ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۷ است. در مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهد بیشتر سویه‌های باکتریایی از جمله *Paenibacillus alvei* ARN63 (Amirabadi *et al.*, 2013)، *Microbacterium* sp. (Salehizadeh *et al.*, 2013) و *Bacillus cereus* LH-6 (Hou *et al.*, 2014) pH خنثی را برای رشد و فعالیت شکست امولسیون ترجیح می‌دهند. در زمینه بهینه‌سازی منبع نیتروژن برای رشد و شکست امولسیون باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر مطالعات بسیاری صورت گرفته است. به عنوان مثال مطالعه لیو و همکاران نشان داد که منبع نیتروژن بهینه برای رشد و شکست امولسیون سویه *Alcaligenes* sp. S-KJ-1 را آمونیوم سترات گزارش داد. این مطالعه نشان داد که نیتروژن آمونیومی و نیتراتی هر دو اثری یکسان بر رشد و فعالیت تعلیق شکنی دارند و میان استفاده از هر یک از آنها جهت بهینه‌سازی تفاوت شاخصی وجود ندارد (Liu *et al.*, 2010). براین اساس در پژوهش حاضر از آمونیوم نیترات به عنوان منبع نیتروژن کنترل استفاده شد و دو منبع نیتروژنی نیترات سدیم و اوره مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. انتخاب منابع نیتروژنی براساس منابع در دسترس موجود در آزمایشگاه صورت گرفت. انتخاب اوره به عنوان منبع نیتروژن با هدف امکان استفاده از اوره صنعتی در مرحله کاربرد صنعتی جدایه‌های برتر صورت گرفت. در این پژوهش منبع نیتروژن بهینه رشد سایر سویه‌های منتخب به ترتیب برای سویه ی HS22 آمونیوم نیترات و برای سویه ی HS20 سدیم نیترات گزارش شد. در مطالعه هوو و همکاران نشان داده شده است که میان بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری به لحاظ دما، pH، منبع کربن و منبع نیتروژن و فعالیت شکست امولسیون سویه *Bacillus cereus* LH-6 ارتباط مثبتی وجود دارد به گونه‌ای که بهینه‌سازی این شرایط موجب بهبود عملکرد شکست امولسیون توسط این سویه می‌شود. این مطالعه شرایط بهینه رشد و عملکرد این سویه را دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۷ و ترکیبی از منابع کربنی و نیتروژنی گزارش می‌دهد (Hou *et al.*, 2014).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های جداسازی شده دارای قابلیت قابل توجهی در شکست امولسیون هستند و در نتیجه پتانسیل بالایی در تولید ترکیبات بیودمولسیفایر و حذف امولسیون‌های نامطلوب آب در نفت دارند. از طرفی این سویه‌ها می‌توانند به منظور پاکسازی آلودگی‌های محیطی ناشی از پساب‌های نفتی و نیز در صنایع بیودمولسیفایر سازی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین پژوهانه (شماره SCU.SB98.673) و پالایشگاه نفت آبادان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

منابع

- Amirabadi, S.Sh., Jahanmiri, A., Rahimpour, M.R., Nia, B.R., Darvishi, P. and Niazi, A. (2013) Investigation of *Paenibacillus alvei* ARN63 ability for biodemulsifier production: medium optimization to break heavy crude oil emulsion. *Colloids Surf B Biointerfaces* 109:244-252.
- Atta, A.M., Allohedan, H.A., El-Mahdy, G.A. (2014) Dewatering of petroleum crude oil emulsions using modified Schiff base polymeric surfactants. *J Pet Sci Eng* 122: 719-728.
- Chen, B.Y. PCR cloning protocols. 2nd edition. New York: Humana Press; 2002:196-235.
- E Silva, F. C. P. R., Roque, B. A. C., e Silva, N. M. P. R., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A. and Sarubbo, L. A. (2017) Yeasts and bacterial biosurfactants as demulsifiers for petroleum derivative in seawater emulsions. *AMB Express* 7(1): 202.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Gadhve, A. (2014) Determination of hydrophilic-lipophilic balance value. *IJSR* 3(4):573-75.
- Hou, N., Feng, F., Shi, Y., Cao, H., Li, Ch., Cao, Zh. and Cheng, Y. (2014) Characterization of the extracellular biodemulsifiers secreted by *Bacillus cereus* LH-6 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimizing the cultivation conditions. *Environ Sci Pollut Res Int* 21(17): 10386-10398.
- Huang, X.F., Guan, W., Liu, J., Lu, L.J., Xu, J.C. and Zhou, Q. (2010) Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria. *Bioresour Technol* 101(1): 317-323.
- Huang, X.F., Li, M.X., Lu, L.J., Yang, S. and Liu, J. (2012) Relationship of cell-wall bound fatty acids and the demulsification efficiency of demulsifying bacteria *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 cultured with vegetable oils. *Bioresour Technol* 104:530-536.
- Huang, X.F., Liu, J., Lu, L.J., Wen, Y., Xu, J.C., Yang, D.H. and Zhou, Q. (2009) Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresour Technol* 100(3):1358-1365.
- Huang, X.F., Peng, K., Feng, Y., Liu, J. and 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. *Bioresour Technol* 139: 257-264.
- Kiran, G.S., Nishanth, L.A., Priyadarshini, S., Anitha, K. and Selvin, J. (2014) Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardioopsis* sp. MSA13A. *BMC Biotechnol* 14(1):1-10.
- Kontogeorgis, G.M. and Kiil, S. (2016) Emulsions. Pp.269-282. In: Introduction to applied colloid and surface chemistry, 1st edition. John Wiley & Sons. Chichester, UK.
- Kronberg, B, Holmberg, K. and Lindman, B. (2014) Emulsions and emulsifiers. Pp.431-445. In: Surface chemistry of surfactants and polymers. 1st edition. John Wiley & Sons. Chichester, UK.

- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874.
- Li, Gh. Zhang, X. and Huang, W. (2000) Characteristics of degrading microorganism distribution in polluted soil with petroleum hydrocarbons. *Huan Jing Ke Xue* 21(4): 61-64.
- Li, X., Li, A., Liu, Ch., Yang, J., Ma, F., Hou, N., Xu, Y. and Ren, N. (2012) Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition. *Process Biochem* 47(4):626-634.
- Liu, J., Huang, X.F., Lu, L.J., Xu, J.C., Wen, Y., Yang, D.H. and Zhou, Q. (2009) Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp. S-JS-1. *Bioresour Technol* 100(24):6481-6487.
- Liu, J., Huang, X.F., Lu, L.J., Xu, J.C., Wen, Y., Yang, D.H. and Zhou, Q. (2010) Optimization of biodemulsifier production from *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in breaking crude oil emulsion. *J Hazard Mater* 183(1-3):466-473.
- Liu, J., Peng, K., Huang, X., Lu, L., Cheng, H., Yang, D., Zhou, Q. and Deng, H. (2011) Application of waste frying oils in the biosynthesis of biodemulsifier by a demulsifying strain *Alcaligenes* sp. S-XJ-1. *J Environ Sci* 3(6):1020-1026.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Jara, A.M.A.T., Brasileiro, P.P.F. and Sarubbo, L.A. (2015) Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 480: 413-418.
- Mohebbi, G., Kaytash, A. and Etemadi, N. (2012) Efficient breaking of water/oil emulsions by a newly isolated de-emulsifying bacterium, *Ochrobactrum anthropi* strain RIPI5-1. *Colloids Surf B Biointerfaces* 98:120-128.
- Sabati, H. and Motamedi, H. (2018) Ecofriendly demulsification of water in oil emulsions by an efficient biodemulsifier producing bacterium isolated from oil contaminated environment. *Biotechnol Lett* 40(7): 1037-1048.
- Sad, C.M.S., Santana, Í.L., Morigaki, M.K., Medeiros, E.F., Castro, E.V.R., Santos, M.F.P. and Filgueiras, P.R. (2015) New methodology for heavy oil desalination. *Fuel* 150: 705-710.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Salehizadeh, H., Ranjbar, A. and Kennedy, K. (2013) Demulsification capabilities of a *Microbacterium* species for breaking water in crude oil emulsions. *Afr J Biotechnol* 12(16):2019-2026.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11030-11035.
- Thavasi, R., Sharma, S. and Jayalakshmi, S. (2011) Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *J Pet Environ Biotechnol* 1:1-6.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173(2):697-703.
- Yan, P., Lu, M., Yan, Q., Zhang, H., Zhang, Z., Chen, R. (2012) Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. *Bioresour Technol* 116:24-28.

Isolation of biodemulsifier producing bacteria from petroleum-contaminated deposits of Abadan Oil Refinery

H. Sabati¹, H. Motamedi^{1, 2*}

Received: 2017.09.22

Accepted: 2019.05.26

Abstract

Biodemulsifiers as environmental friendly compounds are alternatives for chemical demulsifiers. The aim of this study was to achieve biodemulsifier producing bacteria. For this purpose, biodemulsifier producing bacteria were isolated from deposits in oil reservoirs in petroleum refinery through enrichment in saline-based enrichment medium with liquid paraffin and following screening and identifying of selected isolates, their optimum growth condition and the effect of carbon source on biodemulsifier production were assessed. As a result, HS20 and HS22 isolates with 71.43 and 85.71 percentage demulsification of water in kerosene were identified as *Alcaligenes* sp. strain HS20 and *Alcaligenes* sp. strain HS22, respectively. Optimum temperature, pH and nitrogen source for HS20 were as 40°C, 7 and NaNO₃ and for HS22 were 35°C, 7 and NH₄NO₃. The HS20 biodemulsifier was extracellular while in case of HS22 was in both extracellular and cell attached forms. The results of this study showed that these isolates have appropriate biodemulsifier production and emulsion breaking. Therefore, evaluation of their potential to improve the breakdown of undesirable water in crude oil emulsions at industrial scale is proposed.

Keywords: Biodemulsifier, Biological separation, Water in oil emulsion, Emulsion breaking

1- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2-Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*(Corresponding author: motamedih@scu.ac.ir, hhmotamedi@yahoo.com)