

## بررسی عوامل موثر بر تولید و عملکرد امولسیون شکن زیستی تولید شده از سویه اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس

ندا اکبری<sup>1</sup>، داود بی ریا<sup>1\*</sup>، مسعود بهشتی<sup>2</sup>

<sup>1</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>2</sup> گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: 94/3/2 پذیرش: 94/10/1

### چکیده

نفت استخراج شده در اکثر حوزه‌های نفتی حاوی مقادیری آب نمک به شکل امولسیون است. امولسیون - شکنی شیمیایی، متداول ترین روش برای شکست امولسیون‌های آب نمک در نفت است. در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های زیستی توجه زیادی را در شکست امولسیون به خود جلب کرده‌اند. در این پژوهش سویه اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس به منظور شکست امولسیون به کار گرفته شده است. مایع رویی محیط تخمیر این باکتری توانایی بالایی در شکست امولسیون آب در نفت نشان داده است و برای افزایش عملکرد امولسیون شکن تولید شده، شرایط بهینه‌ی محیط کشت شامل pH، دما و نسبت کربن به نیتروژن با استفاده از روش سطح پاسخ تعیین شد. ماکزیمم میزان شکست امولسیون تحت شرایط بهینه pH برابر 5، دمای 35°C و نسبت کربن به نیتروژن 10 حدود 95% حاصل شد. نتایج نشان داد که این سویه توانایی بالایی در تولید مواد زیست فعال سطحی موثر در شکست امولسیون‌های پایدار نفتی دارد.

**کلمات کلیدی:** امولسیون، کشت سطحی، بهینه‌سازی، امولسیون شکن

### مقدمه

امولسیون آب و نفت در مراحل گوناگون حفاری، اکتشاف، ازدیاد برداشت، انتقال و فرایند در مکان‌های گوناگون مثل دهانه‌های چاه نفت، سامانه‌های انتقال و پالایشگاه‌ها ایجاد می‌شوند. از سوی دیگر شست‌وشوی مخازن انتقال نفت خام و مخازن ذخیره‌ی نفت خام نیز منجر به ایجاد امولسیون آب - نفت می‌شود (همینگسن و همکاران 2005). از آن جا که بیش تر فرایندهای پالایشگاهی چنان طراحی شده‌اند که محتوی

\* d.biria@ast.ui.ac.ir

آب در نفت خام ورودی باید کم‌تر از 0/5 درصد باشد، بنابراین نفت همراه با آب از ارزش کم‌تری برخوردار بوده و به‌کاربردن آن در صنعت ممکن است پیامدهای جبران‌ناپذیری را در پی داشته باشد. در نتیجه، جداسازی آب از نفت می‌تواند موجب ایجاد ارزش افزوده شود. حضور آب در نفت خام معایب دیگری نیز دارد به‌عنوان مثال آب موجود در نفت علاوه بر افزایش هزینه‌ی حمل و نقل، می‌تواند باعث خوردگی و شکست راکتورها، خطوط لوله و تجهیزات فرایندی گردد. در نتیجه باید میزان آب در نفت خام تنظیم شود (ناداراجاه و همکاران 2002). روش‌های جداسازی آب و نفت را به‌طور کلی می‌توان به سه دسته شیمیایی، فیزیکی و الکتریکی، زیستی تقسیم‌بندی نمود. روش‌های یادشده ممکن است به تنهایی، به‌صورت همزمان و یا متوالی به‌کار روند. در سال‌های اخیر به‌دلیل آلودگی‌های ناشی از استفاده از امولسیون‌شکن‌های شیمیایی، استفاده از روش‌های زیستی در جداسازی آب از نفت توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (کوئینهو و همکاران 2013؛ ناداراجاه و همکاران 2002). در سال 1980 میلادی مشخص گردید که تعدادی از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به‌عنوان عامل امولسیون‌شکن عمل کنند. مطالعات بعدی نشان دادند که این توانایی به‌علت مواد فعال سطحی تولیدشده توسط میکروارگانیسم بوده و یا وابسته به خصوصیات سطح سلول است. بنابراین از این سلول‌ها می‌توان برای شکست امولسیون‌های صنعتی تولید شده استفاده کرد (هوانگ و همکاران 2013).

اوایل دهه 80 میلادی کوپر<sup>1</sup> و همکارانش نشان دادند که سطح سلول باکتریایی می‌تواند به‌عنوان امولسیون‌شکن در امولسیون آب - نفت سفید عمل کند. به‌دنبال آن کایرنز<sup>2</sup> و همکارانش در سال 1981 برای امولسیون‌شکنی امولسیون آب در نفت از سویه نوکاردیو امارایی<sup>3</sup> استفاده کردند (کایرنز و همکاران 1982). تا سال 2002 توانایی امولسیون‌شکنی محیط‌کشت خالص باکتری‌های متعلق به گونه‌های نوکاردیو، میکروکوکوس<sup>4</sup>، مایکوباکتریوم<sup>5</sup> و کورینه باکتریوم مورد مطالعه قرار گرفت. از آن‌جا که سترون‌سازی فرمانتور و محیط کشت به‌منظور کاربرد تجاری امولسیون‌شکن‌های زیستی دارای هزینه‌های عملیاتی بالا است، فعالیت امولسیون‌شکنی محیط کشت مخلوطی از باکتری‌های ممکن است باعث مقرون به‌صرفه‌شدن این فرایند شود. با توجه به این مطلب ناداراجاه<sup>6</sup> و همکارانش توانایی امولسیون‌شکنی محیط‌کشت مخلوطی از باکتری‌ها (اسینتوباکترکالکواستیکوس<sup>7</sup>، اسینتوباکتررادیریزستنس<sup>8</sup>، سودوموناس‌تروجینوسا<sup>9</sup>، سودوموناس کربوکسی‌دوهیدروژنا<sup>10</sup>، اسفینگوباکتریوم‌تالوفیلیوم<sup>11</sup>، کینگلا-

<sup>1</sup> Cooper

<sup>2</sup> Cairns

<sup>3</sup> Nocardio Amarae

<sup>4</sup> Micrococous

<sup>5</sup> Mycobacterium

<sup>6</sup> Nadarajah

<sup>7</sup> Acinetobacter calcoaceticus

<sup>8</sup> A. radioresistans

<sup>9</sup> Pseudomonas aeruginosa

<sup>10</sup> Pseudomonas carboxydohydrogena

<sup>11</sup> Sphingobacterium thalophilum

دنیتریفیکنت<sup>1</sup>، *آلکالیجنس لاتوس*<sup>2</sup> و *رودوکوکوس گلوبرولو*<sup>3</sup> به منظور شکستن امولسیون پایدار نفت سفید- سفید-آب به کار گرفتند. آن‌ها نتیجه گرفتند که محیط کشت مخلوط باکتری‌های جدا شده از منطقه‌ی آلوده به فرآورده‌های نفتی به‌طور موثری امولسیون‌های مختلف نفت در آب را می‌شکند، به‌گونه‌ای که سرعت امولسیون‌شکنی آن را می‌توان 44 درصد بر ساعت بیان کرد. ماکزیمم امولسیون‌شکنی 96 درصد بوده که در مدت 24 ساعت حاصل می‌گردد. (ناداراجاه و همکاران 2002). به منظور تجاری‌سازی یک امولسیون‌شکن زیستی باید مطالعات زیادی روی تنوع میکروبی و پراکندگی آن‌ها در محیط زیست - جهت بهبود بازده غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده امولسیون‌شکن، بهینه‌سازی محیط کشت و انتخاب منابع کربنی ارزان- قیمت انجام شود (امیرآبادی و همکاران 2013). هدف از این پژوهش بهینه‌کردن عوامل محیطی در جهت افزایش تولید و پارامترهای موثر افزایش بازدهی عملکرد امولسیون‌زدا تولیدی توسط سویه اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

سویه اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس با مشخصات موجود در جدول 1 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد.

جدول 1. ویژگی‌های اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس

1318	شماره PTCC
ATCC 23055 NCIMB 10694	شماره در سایر مجموعه‌ها
اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس	نام
نوع سویه	اطلاعات
30°C	شرایط کشت
لیوفلیزه	شرایط نگهداری
1	گروه خطر

### محیط کشت تخمیر

میکروارگانسیم مذکور در 100 ml محیط نویرینت برات که شامل 5 g/Lit پپتون و 3 g/Lit عصاره گوشت به‌منظور غنی‌سازی تلقیح گردید. بعد از غنی‌سازی به مدت 17 ساعت، 10ml برات تخمیر شده به 100 ml محیط نمک‌های معدنی که شامل 4% نفت سفید به‌عنوان منبع کربن است انتقال داده شد. ترکیب محیط نمک‌های مطابق جدول 2 به همراه 1 ml از عناصر معدنی کم مقدار طبق جدول 3 می‌باشد.

<sup>1</sup> *Kingella denitrificans*

<sup>2</sup> *Alcaligenes latus*

<sup>3</sup> *Rhodococcus globerulu*



### جدول 2. ترکیب محیط کشت نمک‌های معدنی

غلظت (g/Lit)	نام ترکیب
0/2	
6	
4	
4	

### جدول 3. ترکیب درصد محیط عناصر کم مقدار<sup>1</sup>

غلظت (g/Lit)	نام ترکیب
1	
1	
1/4	EDTA

### تهیه امولسیون مدل

در روش تجربی که برای تهیه امولسیون مدل به کار برده می‌شود، محلول آبی شامل  $0/1 \frac{w}{v}\%$  توپین 80 و محلول نفتی شامل،  $1/9 \frac{w}{v}\%$  اسپن 80 تهیه شد. سپس 120 mL محلول آبی به آرامی و با سرعت حدود  $\frac{ml}{s}$  1 در هموژنایزر با دور 9500 rpm در مدت 5 دقیقه به 80 ml محلول نفتی اضافه شد (ون و همکاران 2010؛ هوانگ و همکاران 2011؛ هوانگ و همکاران 2009؛ لیو و همکاران 2009).

### آزمون لوله

به منظور تعیین میزان شکست امولسیون در هر مرحله، 1 ml از نمونه حاوی امولسیون شکن به 9 ml امولسیون مدل در یک لوله‌ی مدرج اضافه شد و برای اطمینان از مخلوط شدن، به مدت 1 دقیقه ورتکس می‌گردد. سپس مخلوط حاصل بدون حرکت و به صورت ثابت در حمام آب با دمای  $30^\circ\text{C}$  قرار داده می‌شود. در پایان فرآیند شکست، درصد شکست امولسیون به صورت زیر قابل محاسبه است (لیو و همکاران 2011؛ هوانگ و همکاران 2012).

$$\text{درصد شکست} = \left( 1 - \frac{\text{حجم امولسیون باقیمانده}}{\text{حجم امولسیون اولیه} + \text{حجم نمونه اضافه شده}} \right) * 100 \quad (1)$$

### اثر زمان رشد

با توجه به این‌که خاصیت امولسیون‌شکنی این سویه مربوط به ماده‌ی خارج سلولی تولید شده در محیط تخمیر است، به منظور بررسی توانایی شکست امولسیون در سنین مختلف، 500 ml محیط نمک‌های معدنی

<sup>1</sup>Trace element solution

تهیه گردید. هر روز 1 ml از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ محیط تخمیر با دور 12000rpm به مدت 20min به 9 ml امولسیون مدل اضافه و مخلوط حاصل به مدت 1 دقیقه ورتکس گردید و میزان شکست امولسیون مدل در مدت 6 روز بررسی گردید.

### اثر منبع کربن، نیتروژن و غلظت نمک

برای مطالعه‌ی اثر منبع کربن روی تولید امولسیون شکن، سویه *اسینتوباکتر/کالکواسیتیکوس* در محیط نمک-های معدنی تکمیل شده با 4%  $V/V$  منابع کربنی (روغن بادم تلخ، نفت سفید، پارافین، گلوکز) رشد داده شد. در مطالعه‌ی اثر نیتروژن 4%  $V/V$ ، نفت سفید به عنوان منبع کربن استفاده شد در حالی که نیترات آمونیوم، سولفات آمونیوم و کنجاله‌ی سویا هر کدام به طور جداگانه و در همان غلظت  $4\text{ g/L}$  به محیط اضافه شد. به منظور بررسی اثر غلظت نمک بر تولید امولسیون شکن در محیط کشت نمک‌های معدنی که شامل نفت سفید و نیترات آمونیوم به ترتیب به عنوان منبع کربن و نیتروژن است به ترتیب مقادیرهای مختلف 5، 10، 15 و 20 گرم نمک اضافه شد و سپس درصد شکست امولسیون مدل با استفاده از مایع رویی محیط کشت بعد از 24 ساعت از رشد میکروارگانیسم اندازه‌گیری شد.

### نتایج و بحث

نتایج اندازه‌گیری زمان رشد بر میزان شکست امولسیون در شکل 1 آورده شده است. همان طور که در شکل 1 دیده می‌شود، رشد بیش از 24 ساعت تاثیر چندانی بر روی میزان شکست امولسیون نداشته است و حداکثر میزان شکست با اضافه کردن مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ کشت 24 ساعته حاصل می‌شود.

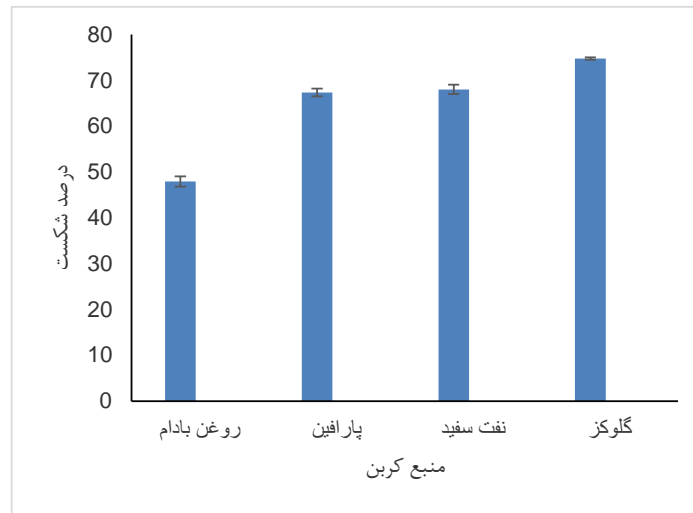


شکل 1. اثر سن بر درصد شکست امولسیون

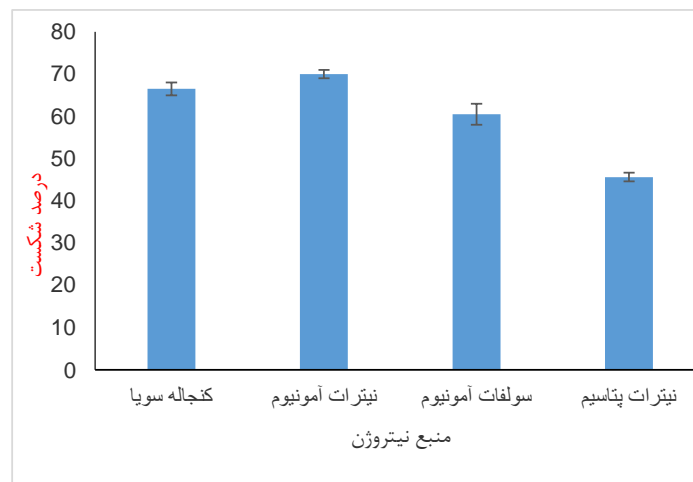
### اثر منابع کربن، نیتروژن و غلظت نمک

همان گونه که در شکل 2 دیده می‌شود، بهترین منبع برای تولید امولسیون شکن مربوط به گلوکز است و امولسیون شکن تولیدی در منابع کربن و پارافین بعد از گلوکز بیشترین درصد شکست را به خود اختصاص

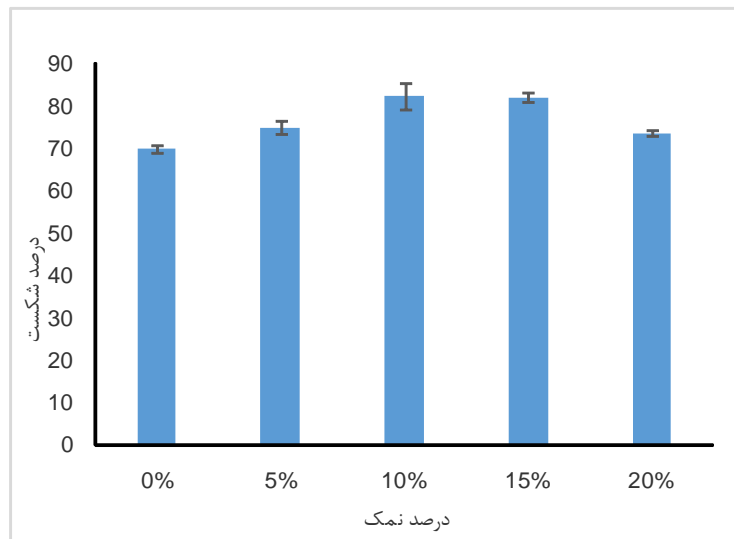
داده است. از طرفی با توجه به شکل 3 می‌توان گفت نیترات آمونیوم در بین سه منبع نیتروژن مورد استفاده با داشتن 70% جداسازی فازهای امولسیون بهترین عملکرد را داشته است. با مقایسه‌ی میزان شکست امولسیون توسط مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف نمک می‌توان به این نتیجه رسید که حضور نمک در محیط کشت باعث تولید بیش‌تر امولسیون‌زدا و افزایش عملکرد مایع رویی آن می‌شود و افزایش غلظت نمک بیش از 15% باعث کاهش عملکرد و میزان شکست امولسیون می‌گردد.



شکل 2. اثر منابع کربنی بر درصد شکست امولسیون



شکل 3. اثر منابع نیتروژن بر درصد شکست امولسیون



شکل 4. اثر نمک بر درصد شکست امولسیون

### طراحی آزمایش و بهینه‌سازی

ترکیبات و شرایط محیط کشت روی رشد سلول و تجمع محصولات متابولیکی موثر است. روش سطح پاسخ ترکیبی از روش‌های آماری و ریاضی مفید برای آنالیز اثرهای چند متغیر مستقل روی پاسخ سیستم بدون نیاز به یک رابطه‌ی از پیش تعیین شده بین تابع هدف و متغیرها است (نجفی و همکاران 2010). در این راستا ترکیب محیط کشت و شرایط رشد با کمک روش سطح پاسخ و نرم‌افزار مینی تب<sup>1</sup> بهینه‌سازی شدند. در روش باکس بنکن اثرات اصلی و برهمکنش بین عوامل همزمان مورد بررسی قرار گرفته می‌شود و نرم‌افزار با تحلیل آماری، اهمیت هر یک و مقدار بهینه عوامل را مشخص می‌کند. روش باکس بنکن طراحی سه سطحی برای برازیدن رویه‌های پاسخ می‌باشد که همه‌ی نقاط آن بر روی کره‌ای به شعاع  $\sqrt{2}$  واقع شده است و به دلیل شمار اجزای مورد نیاز و چرخش پذیر بودن برای بهینه‌سازی بسیار مناسب است (مونتگومری 1997). برای رسیدن به بهترین میزان شکست امولسیون با توجه به آزمایش‌های قبلی و بررسی تأثیرات منابع کربن، نیتروژن و غلظت نمک بر تولید امولسیون شکن و همچنین مطالعات قبلی عوامل موثر بر فعالیت امولسیون شکن‌ها، طراحی آزمایش‌ها به منظور بررسی تأثیرات اصلی و متقابل سه عامل دما، pH و نسبت کربن به نیتروژن بر حالت بهینه‌ی تولید عامل امولسیون شکن صورت گرفته است (امیرآبادی و همکاران 2013). محدوده نسبت منبع کربن به نیتروژن با توجه به عملکرد سایر گونه‌های دیگر از باکتری-های نفت خوار مشخص شد (برین و همکاران 2014). جدول 4 محدوده‌ی این تغییرات را نشان می‌دهد. برای بررسی عوامل نامبرده در جدول 4 در میزان شکست امولسیون، به غیر از سه عامل مورد بررسی مابقی شرایط مطابق بخش تولید امولسیون شکن تکرار شد.

<sup>1</sup> Minitab



جدول 4. عوامل مورد بررسی و سطوح آنها برای بهینه‌سازی تولید امولسیون شکن توسط روش باکس بنکن

عامل	سطح پائین (-1)	مرکزی (0)	سطح بالا (+1)
pH	5	7	9
دما	25	35	45
	5	10	15

### نتایج بهینه‌سازی

فاکتورهای موثر بر تولید امولسیون شکن زیستی به‌طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما در تعداد کمی از این مطالعات از ابزار آماری برای طراحی آزمایش‌ها استفاده شده است. در این پژوهش از روش سطح پاسخ برای طراحی آزمایش‌ها و رسیدن به بهترین میزان شکست استفاده شد. با توجه به ماهیت پیچیده فرایندهای زیستی، پیش‌بینی اثرات پارامترها با توجه به این که ممکن است این پارامترها دارای برهم کنش باشند دشوار است. بنابراین روش سطح پاسخ مدلی تجربی برای مدل‌سازی میزان شکست امولسیون با استفاده از پارامترهای عملیاتی نظیر دما، pH و C/N ارائه می‌کند. مینی تب 16 یک مدل درجه‌ی دوم برای مدل‌سازی میزان شکست امولسیون، به‌صورت زیر پیشنهاد می‌کند:

$$37.7386 + 7.84173 \times A + 9.37073 \times B - 41.239 \times C + 1.75696 \times B^2 - 0.10338 \times A^2 + 0.268792 \times AC - 0.177083 \times AB + 0.42725 \times BC \quad (1)$$

که در رابطه‌ی (1) A، B و C به ترتیب مربوط به دما، نیتروژن/کربن و pH است. همان‌طور که آنالیز واریانس مدل پیشنهادی در جدول 5 نشان می‌دهد، مقدار P-value مدل 0/000 (P < 0/01) به‌دست آمده است، که نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن رابطه با سطح اطمینان بالا است. مقدار P-value تمامی فاکتورها کم‌تر از 0/01 است و این بدین معنی است که تمامی فاکتورها دارای اهمیت بوده و باید تأثیر آنها را در نظر گرفت.

جدول 5. آنالیز واریانس برای مدل به‌دست آمده از روش باکس بنکن

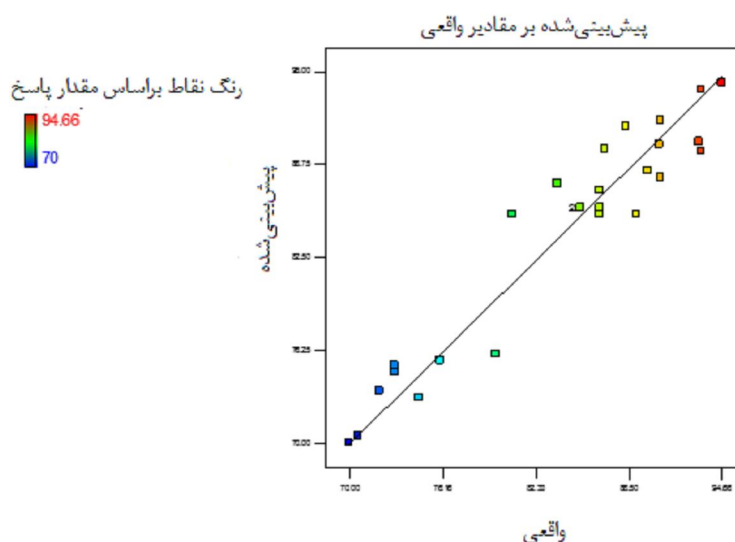
P-value	F-value	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	
0/000	16/32	142/514	9	1282/62	مدل
0/000	31/55	275/521	1	0/04	A
0/000	38/47	335/972	1	37/63	B
0/000	38/58	336/919	1	214	C
0/000	32/09	280/260	3	585/88	مجموع
0/000	46/96	410/066	1	181/65	A <sup>2</sup>
0/000	25/06	216/862	1	190/62	B <sup>2</sup>
0/000	31/94	278/911	1	213/60	C <sup>2</sup>
0/000	99/16	148/354	3	445/06	برهم کنش



0/000	30/78	268/787	1	268/79	AB
0/004	11/35	99/084	1	30/24	AC
0/001	16/72	146/034	1	146/03	BC
		8/732	16	139/72	باقیمانده

### ادامه جدول 5. آنالیز واریانس برای مدل به دست آمده از روش باکس بنکن

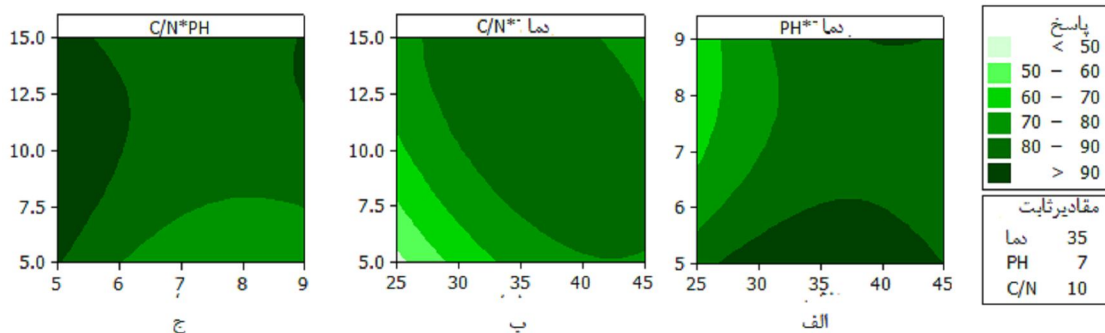
نمودار مقادیر پیش‌بینی شده براساس مقادیر اندازه‌گیری شده برای درصد شکست امولسیون در شکل 5 نشان می‌دهد که مقادیر واقعی به خط مستقیم نزدیک هستند و این نشان می‌دهد مقادیر واقعی به مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل نزدیک هستند ( $R^2=90/18$ ).



شکل 5. مقادیر پیش‌بینی شده براساس مقادیر واقعی

تولید امولسیون شکن به دما، pH و  $C/N$  وابسته است. بهینه‌ی تولید امولسیون شکن در محدوده‌ی خاصی که باکتری بیش‌ترین فعالیت را دارد اتفاق می‌افتد. دمای بهینه‌ی هر نوع باکتری، محدوده‌ی دمایی است که باکتری در آن بیش‌ترین بازدهی و عملکرد را دارد و و این نشان می‌دهد وابستگی به دما یک مشخصه‌ی فرایندهای تولید ماده‌ی فعال سطحی نظیر امولسیون شکن است. افزایش دما نه تنها باعث افزایش سرعت واکنش‌های شیمیایی می‌شود، بلکه متابولیسم میکروبی را نیز سرعت می‌بخشد. شکل 7 (الف) نشان‌دهنده‌ی اثر دما و pH محیط رشد سویه بر روی میزان شکست امولسیون در نسبت  $C/N$  ثابت 10 است. همان‌طور که در شکل مشخص است، pH محیط کشت اثر قابل توجهی بر روی میزان شکست امولسیون داشته و با کاهش pH میزان شکست به صورت چشمگیری افزایش یافته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ماکزیمم شکست در pH های اسیدی و حدود 5 به دست می‌آید. دما یکی از پارامترهای مهمی است که فرایندهای زیستی را کنترل می‌کند. نتایج در مطالعه‌ی حاضر آشکار می‌کند میزان شکست به وسیله‌ی

اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس دمای  $35^{\circ}\text{C}$  به حداکثر خود می‌رسد. این دما به‌عنوان دمای بهینه مورد انتظار است زیرا باکتری مذکور مزوفیل است. با کاهش دما و افزایش pH محیط رشد سویه، میزان شکست امولسیون نیز به شدت کاهش می‌یابد. محیط کشت برای باکتری، در اصل مخلوطی از ترکیبات شیمیایی لازم برای تامین کلیه عناصر مورد نیاز برای تولید سلول و انرژی کافی برای بیوسنتز و نگهداری آن است. حداکثر تولید امولسیون شکن به میزان دسترسی میکروارگانیسم به سوبسترا نظیر منبع کربن، نیتروژن و ... وابسته است. نسبت  $C/N$  یکی از پارامترهای مهم در تولید ماده‌ی فعال سطحی است. شکل 6 (ب) اثر نسبت  $C/N$  و دما روی میزان شکست امولسیون در pH ثابت 7 را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل 7 (ب) دیده می‌شود در نسبت‌های  $C/N$  پایین، برای افزایش میزان شکست امولسیون لازم است دما افزایش یابد. اثر مشترک pH و  $C/N$  در شکل 6 (پ) در دمای ثابت  $35^{\circ}\text{C}$  نشان داده شده است. با توجه به شکل 7 (پ) در نسبت‌های پایین  $C/N$  محدوده‌ی تغییر ناچیز است و با افزایش  $C/N$  محدوده‌ی تغییرات pH برای رسیدن به میزان شکست بالا، تا pH برابر 6 قابل افزایش است.



شکل 6. رسم دو بعدی درصد شکست امولسیون در مقابل متغیرها

### نتیجه‌گیری

در بررسی امولسیون‌شکنی سویه اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس مشخص شد توانایی امولسیون‌شکنی این سویه مربوط به ماده‌ی خارج سلولی است. تولید امولسیون شکن به صورت متابولیت خارج سلولی از منظر تجاری و صنعتی جذاب‌تر است؛ زیرا خالص‌سازی و بازیابی محصولات راحت‌تر است. در بین تحقیقات گزارش شده در زمینه تولید امولسیون شکن زیستی، تنها دو گونه باسیلوس مجاونسیس و باسیلوس سابتلیس دارای محصول خارج سلولی با خاصیت امولسیون‌شکنی گزارش شده‌اند (جنیانی و همکاران 1994 و لی و همکاران 2012). در حالی‌که خاصیت امولسیون‌شکنی گزارش شده توسط لیو و همکاران در سال 2009 مربوط به سایر سویه‌ها نظیر آلکالیجنس، دایتزیا مربوط به سطح سلول بوده است. از طرفی مدت زمان تولید امولسیون شکن حدود 24 ساعت بوده که در مقایسه با سویه آلکالیجنس که حدود 10 روز طول می‌کشد زمان کوتاهی است (هوانگ و همکاران 2013). بهترین منابع کربن و نیتروژن برای تولید امولسیون شکن توسط این سویه

به ترتیب گلوکز و نیترات آمونیوم گزارش شدند. میزان 95% درصدی شکست امولسیون تحت شرایط بهینه pH=5 دمای 35°C و نسبت کربن به نیتروژن 10 و حضور غلظت 10% نمک، و مقایسه با عملکرد 81% سویه آلکالیجنس می‌توان نتیجه گرفت این سویه پتانسیل خوبی را برای کاربرد در صنعت نفت و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از امولسیون‌شکن‌های شیمیایی دارد.

### قدردانی

در پایان این مقاله از حمایت‌های مالی و معنوی شرکت ملی پالایش و پخش فرآورده‌های نفتی ایران کمال تشکر را داشته و بدین وسیله از همکاری صادقانه و خالصانه این عزیزان تقدیر می‌گردد.

### منابع

1. Amirabadi, S.Sh., Jahanmiri, A., Rahimpour, M.R., Rafie nia, B., Darvishi, P. and Niazi, A. Investigation of *Paenibacillus alvei* ARN63 ability for biodemulsifier production: Medium optimization to break heavy crude oil emulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 109, 2013, 244–252.
2. Barin R., Talebi M., Biria D., Beheshti M. Fast bioremediation of petroleum-contaminated soils by a consortium of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, vol. 11, 2014, pp.1701–1710
3. Cairns, W. L., Cooper, D. G., Zajic, J. E. and Wood, J. M. “Characterization of *Nocardia amarae* as a Potent Biological Coalescing Agent of Water-Oil Emulsions Characterization of *Nocardia amarae* as a Potent Biological Coalescing Agent of Water-Oil Emulsions,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 43, 1982, no. 2, pp. 362–366.
4. Coutinho, J. O. P., Silva, M. P. S., Moraes, P. M., Monteiro, a S., Barcelos, J. C. C., Siqueira, E. P. and Santos, V. L. “Demulsifying properties of extracellular products and cells of *Pseudomonas aeruginosa* MSJ isolated from petroleum-contaminated soil,” *Bioresour. Technol.*, vol. 128, 2013, pp. 646–654.
5. Hemmingsen, P. V., Silset, A., Hannisdal, A. and Sjöblom, J. “Emulsions of heavy crude oils. I: Influence of viscosity, temperature, and dilution,” *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 26, 2005, no. 5, pp. 615–627.
6. Huang, X. F., Li, M. X., Lu, L. J., Yang, S. and Liu, J. “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.*, vol. 104, 2012, pp. 530–6.
7. Huang, X., Peng, K., Feng, Y., Liu, J. and Lu, L. “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.*, vol.139, 2013, pp. 257–64, Jul.
8. Huang, X. F., Liu, J., Lu, L. J., Wen, Y., Xu, J C., Yang, D. H. and Zhou, Q. “Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes sp.*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, 2009, no. 3, pp. 1358–65.
9. K. L. Janiyani, H. J. Purohit, R. Shanker, and P. Khanna, “De-emulsification of oil-in-water emulsions by *Bacillus subtilis*,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 10, 1994, no. 4, pp. 452–456.
10. Liu, J., Huang, X. F., Lu, L. J., Xu, J. C., Wen, Y., Yang, D. H. and Zhou, Q. “Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of



- biodemulsifier by *Dietzia sp. S-JS-1.*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, 2009, no. 24, pp. 6481–7.
11. Liu, J., Lu, L., Huang, X., Shang, J., Li, M., Xu, J. and Deng, H. “Relationship between surface physicochemical properties and its demulsifying ability of an alkaliphilic strain of *Alcaligenes sp. S-XJ-1.*,” *Process Biochem.*, vol. 46, 2011, no. 7, pp. 1456–1461.
12. Najafi, A. R., Rahimpour, M. R., Jahanmiri, A. H., Roostaazad, R., Arabian, D. and Ghobadi, Z. “Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology,” *Chem. Eng. J.*, vol. 2010, 163, no. 3, pp. 188–194.
13. Nadarajah, N., Singh, A. and Ward, O. P. “Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, 2002, no. 5, pp. 435–440.
14. Wen, Y., Cheng, H., Lu, L. J., Liu, J., Feng, Y., Guan, W., Zhou, Q. and Huang, X. F. “Analysis of biological demulsification process of water-in-oil emulsion by *Alcaligenes sp. S-XJ-1.*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, 2010, no. 21, pp. 8315–22.
15. X. Li, A. Li, C. Liu, J. Yang, F. Ma, N. Hou, Y. Xu, and N. Ren, “Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition,” *Process Biochem.*, vol. 47, 2012, no. 4, pp. 626–634.