ارزیابی باکتری‌های *باسیلوس سابتیلیس*، *اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس* و *سودوموناس* در جداسازی نامیزه آب ـ نفت

وحیدرضا قدیریان، سید عباس شجاع‌الساداتی*+، سمیره هاشمی نجف آبادی

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۱۴ ـ ۱۴۱۱۵

چکیده: تولید نامیزه آب ـ نفت یکی از مشکلات عمده در صنعت نفت محسوب می‌شود. در سال‌های اخیر، روش‌های زیستی توجه زیادی را در جداسازی نامیزه آب و نفت به خود جلب کرده اند. در این پژوهش، سه سویه باکتریایی باسیلوس سابتیلیس، اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس و سودوموناس برای جداسازی نامیزه به‌کار گرفته شدند. مایع های فوقانی به دست آمده از تخمیر این باکتری‌ها توانایی زیادی در نامیزه‌زدایی از خود نشان دادند و توانستند در مدت ۱۴۴ ساعت به ترتیب ۹۵٪ و ۹۰٪ و ۸۶٪ از نامیزه نفت در آب را جداسازی نمایند. توده‌های سلولی این باکتری‌ها نیز توانستند در مدت ۱۴۴ ساعت به ترتیب ۷۶٪ و ۷۰٪ و ۶۵٪ از نامیزه را جداسازی نمایند. سپس از روش بس برای تعیین آب گریزی نسبی سویه‌ها استفاده شد. نتیجه‌های این بررسی نشان می‌دهد که آب گریزی سویه‌های باسیلوس سابتیلیس، اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس و سودوموناس به ترتیب ۰/۷ و ۰/۳ و ۰/۱۷ است. این دو آزمایش نشان دادند که برای نامیزه‌های نفت ـ آب، سویه باسیلوس سابتیلیس سویه مناسب‌تری محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: نامیزه‌زدای زیستی، نامیزه آب ـ نفت خام، باسیلوس سابتیلیس، اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس، سودوموناس.

KEY WORDS: *Bio-deemulsifier, Water–crude oil emulsion, Bacillus subtilis, Acinetobacter calcoaceticus, Pseudomonas.*

مقدمه

با افزایش روز افزون نیاز به منابع زیر زمینی نظیر نفت و گاز، استخراج آنها نیز افزایش یافته است. استخراج نفت و گاز به همراه استخراج آب می‌باشد. این آب را آب همراه می‌نامند که جداسازی آن از نفت، یکی از اولین مرحله‌ها برای انتقال و فرآوری نفت خام محسوب می‌شود. وقتی هیدرو کربن‌ها استخراج می شوند، در واقع به شکل مخلوطی از یک سیال استخراجی به سطح آورده می‌شوند. ترکیب این سیال استخراجی به این بستگی دارد که نفت خام استخراج شود یا گاز طبیعی و به طور کلی شامل مخلوطی است از هیدروکربن‌های گازی و هیدروکربن‌های مایع، آب همراه، ذره‌های محلول یا معلق، مواد جامد استخراجی مثل شن، گل و لای، سیالات تزریقی و افزودنی‌هایی که ممکن است در اثر فعالیت‌های تولید و اکتشاف، در ترکیب قرار گرفته باشند.

در حال حاضر، روزانه ۲۱۰ میلیون بشکه آب همراه تولید می‌شود که این مقدار به تقریب ۳ برابر نفت تولید شده است. در چاه‌های جدید (با عمر کم) ممکن است مقدار تولید آب همراه کم باشد،

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: shoja_sa@modares.ac.ir

اما در چاه‌های با عمر بالا کـه مقـدار زیـادی مـواد هیـدروکربنی از آنها برداشت شـده اسـت، حتـی ممکـن اسـت بـه ازای تولیـد هر بشکه نفت، ۱۰۰ بشکه آب همراه تولید شود.

نامیزه‌های آب و نفت در مراحل گونـاگون حفـاری، اکتشـاف، تولید، بهره‌برداری، ازدیاد برداشت، انتقال و فراینـد در مکـان‌هـای گوناگون مثل مخازن هیدروکربنی، دهانه چاه‌های نفت، تأسیسات سطحی، سامانه‌های انتقال و پالایشگاه‌هـا ایجـاد مـی‌شـوند [۱]. از سوی دیگر شستشوی مخزن‌های انتقـال نفـت خـام و مخـازن ذخیره نفت خام نیز منجر به ایجاد نامیزه می‌شود [۲].

از آنجا که بیشتر فرایندهای پالایشگاهی چنان طراحی شده‌اند که محتوای آب در نفت خام ورودی باید کمتر از ۰/۵ درصد باشـد، بنـابراین نفـت همـراه بـا آب از ارزش کمتـری برخـوردار بـوده و به کاربردن آن در صنعت ممکن است پیامدهای جبران ناپـذیری را در پی داشته باشـد. در نتیجـه، جداسـازی آب از نفـت مـی‌توانـد موجب ایجـاد ارزش افـزوده شـود. نـامیزه آب و نفـت مـی‌توانـد در خطـوط انتقـال و دسـتگاه‌هـای فراینـدی، ماننـد راکتورهـا، پمـپ‌هـا و مخـزن‌هـا ایجـاد خـوردگی و رسـوب‌زایـی نمـوده و خطوط لوله موجود در کوره‌ها را تخریب نمایـد. بـه همـین دلیـل استانداردهای جهانی در این زمینـه توصـیه مـی‌کننـد کـه میـزان محتـوای آب و ذره‌هـای معلـق جامـد (BS&W) در نفـت خـام، قبل از انتقال توسط خطـوط لولـه بـه کمتـر از ۰/۵ تـا ۲ در صـد کاهش یابد [۴ ، ۳]. حضور آب به همـراه نفـت، موجـب افـزایش نشت کک در فرایندهای بهبود نفت و سـایر فراینـدهای شکسـت می‌شود. به هر حال جداسازی آب و نفـت از یکـدیگر اولـین گـام در استفاده از نفت و آب همراه است.

روش‌های جداسازی آب و نفت را به‌طور کلی می‌توان به سه دسته شـیمیایی، فیزیکـی و الکتریکـی تقسـیم بنـدی کـرد. اگـر چـه این تقسیم‌بندی چندان دقیق نیست، اما می‌تواند در تقسیم‌بنـدی کلـی استفاده شود. روش‌های یاد شده ممکن است به تنهایی، به‌صورت همزمان و یا متوالی به کار روند.

یکی دیگر از روش‌هایی که به نظر می‌رسد قابلیت توسعه داشته باشد، روش زیستی است. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که به علت ویژگی‌های سلول‌ها و ریزسازواره‌های موجود در نامیزه، می‌توان از آنها به‌طور مستقیم برای جداسازی نامیزه‌ها استفاده کرد و درنتیجه در هزینه‌های دستگاهی و حمل و نقل نامیزه به‌واحدهای فرایندی، صرفه جویی کرد [۵]. از سوی دیگر میزان سرمایه لازم و مصرف انرژی در فرایندهای زیستی برای جداسازی آب و نفت، در مقایسه با سایر فرایندهای متداول کمتر است [۶].

ریزسازواره‌ها می‌توانند به عنوان عوامل نامیزه‌زدا عمل کنند. سطح سلولی و مواد فعال سطحی تولیدی از سلول‌های باکتریایی، در ناپایدار سازی نامیزه‌های نفت در آب و آب در نفت مؤثر هستند. از این سلول‌ها می‌توان برای شکست نامیزه‌های صنعتی تولید شده، در فرایند ازدیاد برداشت نفت خام که به طور معمول به‌صورت آب در نفت (w/o) هستند و یا برای ناپایدار سازی نامیزه‌های نفت در آب (o/w) تولیدی در فـرآوری شن قیری استفاده کرد [۹–۷].

پژوهش‌های اولیه به منظور جداسازی نامیزه آب و نفت، با استفاده از سویه *نوکاردیاآمارا*(۱) توسط *کایرن*(۲) و *همکاران* در سال ۱۹۸۲ میلادی انجام شد. پژوهش‌های مشابهی توسط *کوساریک*(۳) و *همکاران* در سال ۱۹۸۷ میلادی با استفاده از سویه *تورولوپسیس بمبیکل*(۴) انجام شد. این پژوهش‌ها، نقطه شروع بررسی‌ها بر روی جداسازی نامیزه آب ـ نفت با استفاده از ریزسازواره‌ها محسوب می‌شوند. نتیجه‌های این پژوهش‌ها نشان دادند که دیواره سلولی و مایع فوقانی به دست آمده از تخمیر، در جداسازی نامیزه مؤثر هستند. پژوهش‌های تکمیلی توسط *ون اس*(۵) و *همکاران* در سال ۱۹۹۲ میلادی به‌منظور بررسی توانایی دیواره سلولی در جداسازی نامیزه، با اندازه‌گیری آب‌گریزی دیواره سلولی انجام شد. به هر حال بررسی سایر سویه‌ها و انتخاب سویه بهینه ضروری به‌نظر می‌رسد.

هدف از این پژوهش، بررسی اثر مایع فوقانی به دست آمده از تخمیر و توده سلولی باکتری‌های *باسیلوس سابتیلیس* و *اسینتوباکترکالکواسیتیکوس* و *سودوموناس* بر جداسازی نامیزه آب – نفت، تعیین میزان آب گریزی سویه‌ها و مقایسه نتیجه‌های به دست آمده از آنها برای یافتن سویه بهینه است.

بخش تجربی

مواد شیمیایی

اسپن ۸۰ و توین ۸۰ از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.

(۱) *Nocardia amarae*

(۲) Cairns

(۳) Kosaric

(۴) *Bombicola torulopsis*

(۵) Van Os

جدول ۱ـ ویژگی‌های باکتری *باسیلوس سابتیلیس*.

PTTC NO	1023
Name	*Bacillus subtillis*
Other collection number	ATCC 6633
Information	Production of subtilin; U.S pharmacopeia 20th. Rev.p 878-879,1980
Culture condition	30ºC
Supplied as	Freeze-dried
Risk group	1

جدول ۲ـ ویژگی‌های باکتری *اسینتوباکترکالکواسیتیکوس*.

PTTC NO	1318
Name	*Acinetobacter calcoaceticus*
Other collection number	NCIMB 10694, ATCC 23055
information	Type strain
Culture condition	30ºC
Supplied as	Freeze-dried
Risk group	1

ریزسازواره ها

سویه‌های استاندارد *باسیلوس سابتیلیس* و *اسینتوباکترکالکواسیتیکوس* از مجموعه ریزسازواره های سازمان پژوهش‌های علمی ـ صنعتی خریداری شدند. اطلاعات مربوط به این دو سویه در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است. سویه *سودوموناس* نیز در دانشگاه تربیت مدرس جدا سازی شده بود. در این پژوهش برای نگهداری باکتری، سوسپانسیون غلیظی از باکتری رشد کرده در محیط کشت BHI حاوی ۱۰٪ گلیسرول، در ظروف کوچک سترون شده تقسیم شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند. در هر مرحله از آزمایش، ظروف حاوی باکتری از فریزر خارج شده و پس از ذوب شدن مایع درون ظرف، با فیلدوپلاتین سترون بر روی محیط کشت جامد کشت داده شد.

روش‌ها

تهیهٔ محیط کشت

برای ساخت محیط کشت پیچیده نوترینت براث، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (مرک، آلمان) عمل شد. ۲٫۳ گرم از پودر این محیط کشت در ۱۰۰ میلی لیتر آب به کمک گرما حل شده و پس از سترون‌سازی با اتوکلاو، برای کشت ریزسازواره مورد استفاده قرار گرفت.

آماده سازی محیط تخمیر و تولید تودهٔ زیستی

به منظور مقایسهٔ سرعت جداسازی آب و نفت در فازهای متفاوت رشد، ابتدا باکتری بر روی پلیت کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به روی اسلنت منتقل شدند. اسلنت‌ها در داخل گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از رشد، باکتری‌های *باسیلوس سابتیلیس* و *اسینتوباکترکالکواسیتیکوس* و *سودوموناس* به محیط آبی نوترینت براث منتقل شدند. پس از انجام تلقیح، ارلن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند.

تهیه نامیزه

نفت خام استفاده شده، از چاه شماره ۲۹۰ در منطقه سروک بنگستان تهیه شده و دمای آن در هنگام نمونه‌برداری ۱۱۵٫۲ °F گزارش شد.

برای تهیه محلول نفت خام و اسپن، ۰٫۸ گرم از اسپن۸۰ در ۱۰۰ میلی لیتر نفت خام ریخته شده و به مدت ۱ دقیقه به هم زده شد. برای تهیه محلول ذخیره آب و توین ۸۰، به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، ۰٫۱ گرم توین ۸۰ اضافه شده و به مدت یک دقیقه به هم زده شد. محلول‌های به‌دست آمده، در ارلن نگهداری شده و پیش از هر بار استفاده، ظرف حاوی محلول به مدت یک دقیقه به خوبی به هم زده شد. محلول‌های تازه هر ۴ تا ۶ هفته یک بار تهیه شدند.

به منظور ساخت نامیزه، نامیزه آب ـ نفت خام (۳۰:۷۰) انتخاب شد. برای تهیه این نامیزه، ۳۵ میلی‌لیتر از محلول آب و توین ۸۰ در یک ارلن ریخته شده و ۱۵ میلی لیتر از محلول نفت خام و اسپن۸۰ به آن اضافه شد. مخلوط موجود در ارلن توسط هموژنایزر و به مدت ۵ دقیقه یکنواخت شد.

بررسی اثر محیط کشت بر جداسازی نامیزه

به منظور بررسی اثر محیط کشت بر میزان جداسازی، محیط کشت سترون به نامیزه افزوده شد و سپس به وسیله‌ی دستگاه چرخاننده لوله به مدت ۱ دقیقه و با بیشترین سرعت به‌هم زده شد. نامیزه به‌دست آمده در استوانه‌های مدرج ریخته شد.

جداسازی تودهٔ زیستی از محیط تخمیر

محیط‌های کشت در داخل لوله‌های سترون و در بستهٔ سانتریفوژ قرار گرفته و با سرعت ۶۰۰۰ xg به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپ روماند سانتریفوژ توسط میکروپیپت با سر سترون برداشته شده و به منظور بررسی اثر آن در جداسازی نامیزه آب و نفت به کار برده شد.

بررسی اثر مایع فوقانی بر جداسازی نامیزه

به منظور بررسی اثر مایع فوقانی بر میزان جداسازی، مایع فوقانی از کشت باکتریایی جدا شده و در شرایط آزمایشگاهی، با نامیزه مجاور شد. مخلوط توسط دستگاه چرخاننده لوله به مدت ۱ دقیقه و با بیشترین سرعت به‌هم زده شد. نامیزه به‌دست آمده در استوانه‌های مدرج وارد شده و میزان افزایش در سرعت جداسازی توسط مایع فوقانی بررسی شد.

بررسی اثر سلول‌ها بر جداسازی نامیزه

بررسی اثر سلول‌ها بر میزان جداسازی، توسط افزودن سلول‌ها به نامیزه انجام شد. بدین‌منظور نمونه باکتریایی پس از پایان تخمیر، سانتریفیوژ و توده سلولی از مایع فوقانی جدا شد. توده سلولی به ۵۰ میلی لیتر نامیزه اضافه شده و سپس توسط دستگاه چرخاننده لوله به مدت ۱ دقیقه و با بیشترین سرعت به‌هم زده شد. نامیزه به‌دست آمده در استوانه‌های مدرج ریخته شد.

تهیه نمونه شاهد

به منظور بررسی چگونگی جداسازی فازها بدون اثر عامل‌های زیستی، از نمونه کنترل استفاده شد. برای تهیه نمونه کنترل، ۵۰ میلی لیتر از نامیزه یکنواخت شده در مرحله قبل در استوانه‌های مدرج ریخته شد. برای کاهش خطای آزمایش، آزمایش‌ها دو بار تکرار شده و مقدارهای متوسط در نمودارها گزارش شدند.

مقایسه آب گریزی سویه‌ها

ویژگی‌های سطحی دیواره سلولی تا حد زیادی بیانگر برهمکنش سلول با محیط اطراف هستند و در تبادل مواد غذایی و مواد دفعی، رشد، تقسیم سلولی، مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی و تنش‌های مکانیکی، شیمیایی، حرارت و اسمزی ریزسازواره نقش مهمی دارند. یکی از ویژگی‌های دیواره سلولی، میزان آب گریزی آن است [۱۰].

آزمایش‌های بسیاری نشان داده‌اند که آب‌گریزی دیواره سلولی نقش بسیار مهمی در توانایی باکتری‌ها در زمینه جداسازی آب و نفت دارد. به منظور مقایسه قابلیت باکتری‌ها، روش‌های بسیاری برای اندازه‌گیری آب گریزی نسبی پیشنهاد شده است. از آنها می‌توان به روش‌های چسبندگی باکتری‌ها به هیدروکربن‌ها، کروماتوگرافی برهمکنش‌های آب‌گریز، رسوب در حضور محلول‌های نمکی متفاوت، چسبندگی به صافی‌های سلولزی و زاویه تماس اشاره کرد [۱۱]. هر یک از این روش‌ها فایده‌ها و برتری‌ها و محدودیت‌های ویژه خود را دارد. آب گریزی نسبی گزارش شده در مقاله‌ها، پراکندگی بسیار گسترده‌ای دارد که هم به روش به کار رفته و هم به نوع ریزسازواره بستگی دارد. سایر برهمکنش‌ها همانند بار سطحی و ساختار باکتری نیز بر چسبندگی آن تأثیر می‌گذارد [۱۲].

سویه‌های *باسیلوس سابتیلیس*، *اسینتوباکتر* و *سودوموناس* برای جداسازی آب و نفت مناسب به نظر آمدند. از روش چسبندگی باکتری به هیدروکربن یا روش بس (مس)[۱] به منظور مقایسه این سویه‌ها استفاده شد.

روش چسبندگی باکتری به هیدروکربن

روش بس یک روش ساده برای غربال‌گری سریع سویه‌های باکتریایی بر اساس آب گریزی نسبی آن‌ها است. این شیوه بر اساس افراز نمودن سلول‌ها بر مبنای ویژگی سطح آب گریز در فصل مشترک سامانه دوفازی آب ـ هیدروکربن بعد از به‌هم‌زدن اندک، بنیان نهاده شده است. حجم و نسبت فازها و غلظت باکتری در این روش باید طوری انتخاب شود که فاز هیدروکربنی اضافه بار پیدا نکند. این روش ابتدا توسط *روزنبرگ* پیشنهاد شد. روش مورد نظر توسط *ون درمای* به‌کار گرفته شد. سلول‌ها در محیط نمک‌های معدنی کشت داده شده و در مرحله سکون برداشت شده و دو بار توسط بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با pH = ۷ شسته شدند و پس از هر بار شستشو، سانتریفیوژ شده و دوباره در بافر معلق شدند. سپس OD نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد (A_0). پس از آن ۱۵۰ میکرولیتر هگزادکان به ۳ میلی‌لیتر از محلول باکتری معلق اضافه شده و سامانه دو فازی ایجاد شده دو بار به مدت ۳۰ ثانیه و با فاصله زمانی ۵ ثانیه به شدت به‌هم زده شد. پس از ۱۰ دقیقه سکون، دو فاز آب و هگزادکان به طور کامل از هم جدا شدند.

(۱) BATH (MATH)

جدول۳- محیط کشت نمک‌های معدنی برای کشت باکتری‌ها در آزمایش بس.

ماده	غلظت (گرم در لیتر)
KH_2PO_4	۱/۹۳
K_2HPO_4	۷/۹۳
NH_4Cl	۰/۷۵
$MgSO_4$	۰/۰۵
محلول عناصر کم مقدار	۱ میلی‌لیتر (۱۴ میلی‌گرم $ZnCl_2$ ، ۱۲ میلی‌گرم $CoCl_2$، ۱۲ میلی‌گرم $Na_2MO_4.2H_2O$، ۱/۹ گرم $CuSO_4$، ۵ میلی‌گرم H_3BO_4 ، ۳۵ میلی‌لیتر HCl در یک لیتر)

سویه‌های آب‌گریز موجود در فاز آبی به قطره‌های هیدروکربنی چسبیده، به همراه آنها در زمان جداسازی فازها بالا رفته و یک لایه خامه‌ای رنگ تشکیل دادند. این لایه از سلول‌های هیدروکربنی با پوشش سلولی تشکیل شده است. درصد سلول‌هایی که به فاز هیدروکربنی می‌چسبند، به عنوان مقیاسی برای اندازه‌گیری آب گریزی سلولی به حساب می‌آید و می‌توان آن را به سادگی توسط میزان کاهش در OD فاز آبی محاسبه کرد. بنابراین OD دوباره اندازه‌گیری شد (A). درصد سلول‌های موجود در قسمت هگزادکان، بیانگر آب گریزی است و با رابطه $(1-A/A_0)*100$ به‌دست می‌آید که معیاری برای آب‌گریزی می‌باشد [۱۱].

روش تهیه محیط معدنی

باکتری‌ها در محیط معدنی جدول ۳ کشت داده شدند. از اتانول به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده شد، زیرا کمترین تأثیر را بر دیواره سلولی دارد (اتانول بدون بار است و ضریب اکتانول ـ آب آن پایین است). دمای گرما گذاری ۳۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شده و سلول‌ها پس از گذشت ۴۰ ساعت گرماگذاری برداشت شدند.

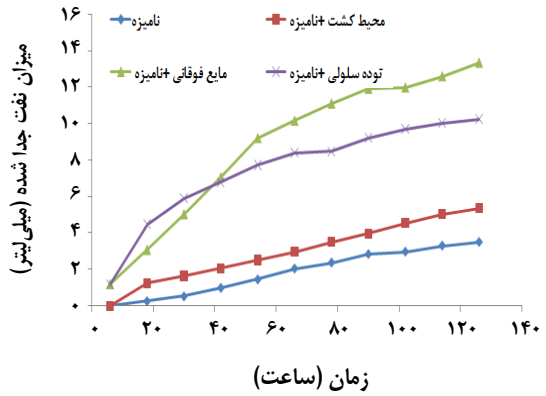
روش تهیه بافر فسفات

محلول‌های ۰/۱ مولار از سدیم فسفات مونوبازیک ومحلول ۰/۱ مولار از سدیم فسفات دی بازیک درست شد و ۳۹ میلی‌لیتر از محلول فسفات مونوبازیک با ۶۱ میلی‌لیتر از محلول فسفات دی بازیک مخلوط شده و با استفاده از آب مقطر، حجم نهایی به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده و pH نهایی توسط یک دستگاه pH متر حساس تنظیم شد [۱۳].

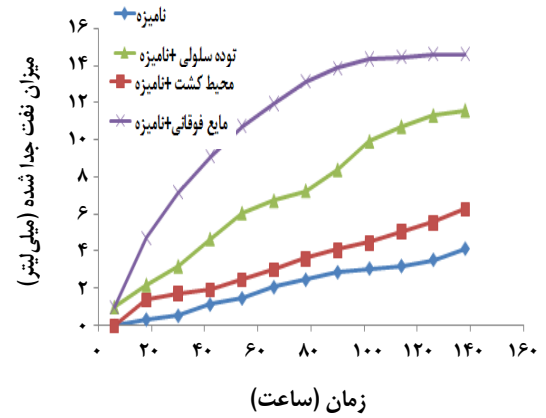
نتیجه‌ها و بحث

نتیجه‌های اندازه‌گیری میزان جدا شدن فازها در زمان‌های متوالی در ۶ روز، برای سویه‌های *اسینتوباکتر*، *باسیلوس سابتیلیس* و *سودوموناس* در شکل‌های ۱ تا ۳ آورده شده است. در مدت ۱۴۴ ساعت، توده سلولی سویه‌های *باسیلوس سابتیلیس* و *اسینتوباکترکالکواسیتیکوس* و *سودوموناس* به ترتیب ۷۶٪ و ۷۰٪ و ۶۵٪ از نامیزه را جداسازی می‌کنند. در مدت ۱۴۴ ساعت، مایع فوقانی به‌دست آمده از تخمیر *باسیلوس سابتیلیس* و *اسینتوباکترکالکواسیتیکوس* و *سودوموناس* به ترتیب ۹۵٪ و ۹۰٪ و ۸۶٪ از نامیزه را جداسازی می‌کنند. با بررسی و مقایسه این نمودارها مشخص می‌شود که افزودن محیط کشت سترون تأثیر چندانی در جداسازی نامیزه نداشت، به‌طوری که در مدت زمان ۱۴۴ ساعت، به تقریب ۴۰٪ از نامیزه توسط محیط کشت جداسازی شد. همچنین ۲۵٪ از نامیزه‌های شاهد در این زمان جداسازی شدند، در حالی که افزودن سویه‌های باکتریایی توانستند در افزایش سرعت جداسازی مؤثر باشند. به طوری که پس از ۱۴۴ ساعت، مایع فوقانی به دست آمده از تخمیر سویه‌های *اسینتوباکتر* و *باسیلوس سابتیلیس* و *سودوموناس* توانستند به‌ترتیب ۹۰٪ و ۹۵٪ و ۸۶٪ از نامیزه‌ها را جدا کنند. در ۴۸ ساعت اول، توده سلولی قابلیت بیشتری نسبت به مایع فوقانی به دست آمده از تخمیر از خود نشان داد ولی به تدریج این قابلیت کاهش یافت.

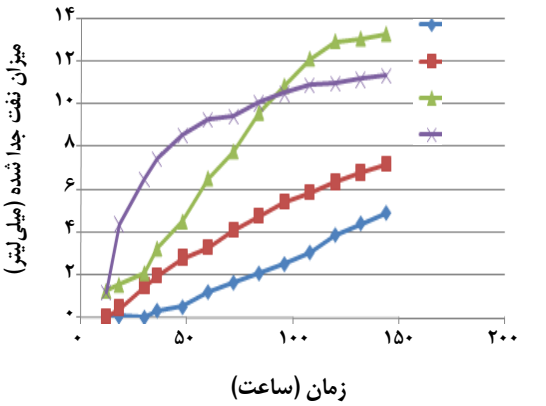
نتیجه‌های به دست آمده از آزمایش بس در شکل ۴ آورده شده‌اند. با توجه به این نتیجه‌ها، سویه *باسیلوس سابتیلیس* دارای بیشترین آب‌گریزی (در حدود ۰/۷) بوده و سویه مناسب‌تری برای نامیزه‌زدایی به‌نظر می‌آید. آب‌گریزی سویه *اسینتوباکتر* و *سودوموناس* به ترتیب در حدود ۰/۳ و ۰/۱۷ اندازه‌گیری شد.



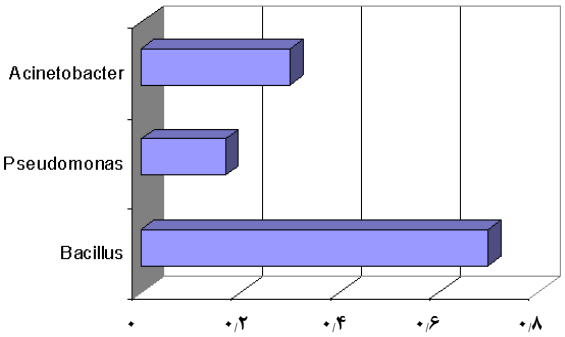
شکل ۱ـ اثر مایع فوقانی محیط تخمیر شده و توده‌های سلولی *اسینتوباکتر* بر میزان جدا شدن فازها (میزان نفت جدا شده برحسب زمان).



شکل ۲ـ اثر مایع فوقانی محیط تخمیر شده و توده‌های سلولی *باسیلوس سابتیلیس* بر میزان جدا شدن فازها (میزان نفت جدا شده برحسب زمان).



شکل ۳ـ اثر مایع فوقانی محیط تخمیر شده و توده‌های سلولی سودوموناس بر میزان جدا شدن فازها (میزان نفت جدا شده برحسب زمان).



شکل ۴ـ نتیجه‌های آزمایش بس برای سه سویه باکتریایی.

نتیجه‌گیری

بررسی سویه‌های *باسیلوس سابتیلیس* و *اسینتوباکترکالکواسیتیکوس* و *سودوموناس* نشان می‌دهد که این سویه‌ها توانایی زیادی در جداسازی نامیزه آب و نفت دارند. اگر چه در باکتری‌های *اسینتوباکتر* و *سودوموناس* در ساعت‌های اولیه توانایی توده سلولی در جداسازی بیشتر است، اما بعد از گذشت زمان مناسب و اشباع شدن دیواره سلولی، توانایی توده سلولی کاهش می یابد. به طوری که قابلیت مایع فوقانی به دست آمده از تخمیر در جداسازی بیش از توانایی توده سلولی می‌شود. با توجه به این موردها، قابلیت و توانایی *باسیلوس سابتیلیس* بیش از *اسینتوباکترکالکواسیتیکوس* و *سودوموناس* است. در مجموع، *باسیلوس سابتیلیس* نسبت به *اسینتوباکتر کالکواسیتیکوس* و *سودوموناس*، سویه مناسب‌تری برای جداسازی نامیزه آب ـ نفت محسوب می‌شود.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۴/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۱۱

مراجع

[1] Langevin D., Pateau S., Henaut I., Argillier J.F., Crude Oil Emulsion Properties and Their Application to Heavy Oil Transportation, *Oil and Gas Science and Technology*, **59**, p. 511 (2004).

[2] Nishimakl F., Takahashi N., Tsuchida T., Watanabe K., Hino S., Microorganisms, Demulsifiers and Process for Breaking an Emulsion, *United States Patent*, 5989892 (1999).

[3] Nadarajah N., Singh A., Ward O.P., De-Emulsification of Petroleum Oil Emulsions by a Mixed Bacterial Culture, *Process Biochemistry*, **37**, p. 1135 (2002).

[4] Nadarajah N., Singh A., Ward O.P., Evaluation of Mixed Bacterial Culture for De-Emulsification of Water-in Petroluem Oil Emulsions, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, p. 435 (2002).

[5] Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P., Recent Advances in Petroleum Microbiology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**, p. 503 (2003).

[6] Kim K.Y., Lee J.J., De-Emulsification of Petroleum Emulsion using *Nocardia amarae*, *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*, **13**, p. 209 (1998).

[7] Das M., Characterization of De-Emulsification Capabilities of a *Micrococcus* sp, *Biores. Technology*, **79**, p. 15 (2001).

[8] Kosaric N., Biosurfactant in Industry, *Pure and Applied Chemistry*, **64**, p. 1731 (1992).

[9] Beckman J.W., Method of Breaking Emulsions, *United States Patent*, 1753641 (1930).

[10] Schar P., Ubbink J., The Cell Wall Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations, *Biophysical Journal*, **85**, p. 4076 (2003).

[11] Balebona M.C., Morinigo M.A., Borrego J.J., Hydrophobicity and Adhesion to Fish Cells and Mucus of Vibrio Strains Isolated from Infected Fish, *International Microbiology*, **4**, p. 21 (2001).

[12] Loredana S., Anthony K.C., Gray M.R., Stabilization of Oil-Water Emulsions by Hydrophobic Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **10**, p. 6333 (2004).

[13] Mohan C., "Buffers: A Guide for Preparation Use of Buffers in Biological Systems", Calbiochem (2003).