بهینه‌سازی زیست پالایی نفت خام توسط باکتری *Alcanivorax dieselolei* در محیط آبی با استفاده از روش تاگوچی

طاهره عبدلی[۱]، غلامحسین ابراهیمی‌پور[۱] و محسن شهریاری مقدم[*۲]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۴

چکیده

وارد شدن نفت و پساب‌های نفتی به دریاها آسیب‌های جدی به حیات آبزیان وارد می‌کند. علاوه بر آن این ترکیبات در بافت‌های بدن آبزیان تجمع یافته و سلامت انسان‌ها را تهدید می کنند، در نتیجه توسعه روش‌های کارآمد جهت تصفیه این مواد حائز اهمیت است. در این پژوهش برای ارزیابی کارایی فرآیند پاکسازی زیستی، از رسوبات و آب مناطق مختلف در سواحل خلیج فارس در مجاورت شهر بندر عباس نمونه‌برداری و پس از غنی‌سازی، کارآمدترین باکتری تجزیه کننده نفت خام جداسازی، خالص و توسط روش‌های مولکولی (۱۶ S rDNA) و بیوشیمیایی شناسایی شد. به منظور تعیین شرایط بهینه تجزیه‌زیستی نفت خام توسط سویه جداسازی شده فاکتورهای pH، دما، تعداد باکتری تلقیح شده، غلظت NH_4Cl و K_2HPO_4 با استفاده از طراحی آزمایش به روش تاگوچی با آرایه ($L_{16}(4^5)$ پنج فاکتور هر کدام در چهار سطح) بهینه‌سازی شدند. سویه خالص شده در این مطالعه TA1 نام‌گذاری و بر اساس آنالیز مولکولی ۹۹٪ به *Alcanivorax dieselolei* شباهت نشان داد. از میان فاکتورهای بهینه شده pH و دما تاثیر گذارترین فاکتورها در تجزیه زیستی نفت خام بودند. pH=۹، دما = ۳۵ °C، NH_4Cl (۱ g/L)، K_2HPO_4 (۰/۲۵ g/L) و ۰/۱= مایه تلقیح (OD_{600nm}) به عنوان شرایط بهینه در نظر گرفته شد. تحت این شرایط بیش از ۸۰٪ نفت خام تجزیه گردید. با توجه به توان بالای سویه خالص شده در تجزیه نفت خام و تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی، نتایج این مطالعه می تواند در زیست‌پالایی مناطق آلوده به ترکیبات نفتی در منطقه استفاده شود.

کلمات کلیدی: خلیج فارس، تاگوچی، *Alcanivorax dieselolei*، زیست‌پالایی، پساب‌های نفتی

مقدمه

کشور ایران دارای مناطق وسیع نفت‌خیز و ۲۲۵۰ km خط ساحلی در طول خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد. عمده مشکلات زیست محیطی که در سواحل جنوبی ایران وجود دارد مرتبط با صنایع نفت و گاز و همچنین ترافیک سنگین نفت کش‌ها می‌باشد [۱]. وارد شدن ترکیبات نفتی به محیط‌زیست به صورت مداوم توسط اکتشاف،

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی Mohsen.shahriari@uoz.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

تولید، تصفیه، حمل و نقل و ذخیره‌سازی روی می‌دهد و حیات ارگانیسم‌ها را تهدید می‌کند [۲]. علاوه بر آنکه اکوسیستم دریایی از ترکیبات سمی که در نفت وجود دارد تاثیر می‌پذیرد، این ترکیبات در بافت‌های آبزیان انباشته شده و سلامت انسان‌ها را تهدید می‌کنند [۳]. استفاده از روش‌های فیزیکی از قبیل بوم‌ها، اسکیمرها و جاذب‌ها برای کنترل لکه‌های نفتی در دریا عملاً بالای ۱۰ تا ۱۵٪ کارایی ندارند. همچنین استفاده از سورفکتانت‌های شیمیایی به دلیل اثرات سمی بر روی ارگانیسم‌ها، دارای اثرات مخرب زیست‌محیطی می‌باشند. در مقایسه با این روش‌ها زیست‌پالایی از کارایی بالاتر و هزینه های کمتر برخوردار می‌باشد، در عین حال آلودگی ثانویه ایجاد نمی‌کند [۴ و ۵]. زیست‌پالایی فرآیندی بسیار پیچیده است و موفقیت آن وابسته به وجود میکروارگانیسم‌های کارآمد در شرایط محیطی مناسب است. باکتری‌ها شاخص‌ترین عوامل تجزیه هیدروکربن‌ها در محیط هستند. جنس‌های مختلفی از باکتری‌ها قادر به تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند که از آنها می‌توان به *Acinetobacter sp.* [۶]، *Rhodococcus sp.* [۷]، *Geobacillus sp.* [۸] *Mycobacterium sp.* [۹] و *Pseudomonas sp.* [۱۰] اشاره کرد. همچنین تاکنون سویه‌های مختلفی با قابلیت تجزیه ترکیبات نفتی از خلیج‌فارس جداسازی و شناسایی شده است که از آنها می‌توان به *Alcaligenes denitrificans* [۱۱]، *Pseudomonas aeruginosa* [۱۲]، *Alcanivorax dieselolei* [۱۳]، *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*، *Pseudidiomarina sediminum* و *Marinobacter sp.* [۱۴ و ۱۵] اشاره نمود. پراکنش باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن در محیط وابسته به وجود هیدروکربن‌ها می‌باشد، به عبارت دیگر محیط‌هایی که تحت تاثیر آلودگی‌های مزمن نفتی هستند، دارای تعداد بیشتر باکتری‌های تجزیه کننده نسبت به دیگر مناطق می‌باشند [۱۶] و در این مناطق احتمالاً بتوان سویه‌هایی با توان بالای تجزیه ترکیبات نفتی را جداسازی نمود. با توجه به آنکه سویه‌های باکتریایی که در خلیج فارس وجود دارند به صورت مداوم در معرض ترکیبات نفتی به صورت طبیعی (نشت نفت به صورت طبیعی از چشمه های موجود در بستر خلیج فارس) و مصنوعی (ریزش‌های نفتی و آلاینده‌های پالایشگاهی) هستند، احتمال خالص‌سازی سویه‌هایی با کارایی بالا در این مناطق بالا است. در مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی عوامل محیطی و بیولوژیکی مانند شوری، نوع نفت خام، گونه میکروبی، میزان مواد مغذی، pH محیط، میزان اکسیژن و غیره نقش مهمی در تجزیه زیستی دارند [۲ و ۱۷]. روش‌های سنتی تعیین شرایط بهینه مانند روش یک فاکتور در هر زمان، نیازمند صرف وقت و هزینه بالا هستند. همچنین این روش‌ها در مورد تاثیر همزمان عوامل بر یکدیگر اطلاعاتی به ما نمی‌دهند. معمولا تعداد آزمایش‌ها برای طراحی کامل به حدی زیاد است که از نظر اقتصادی امکان بررسی همه آنها وجود ندارد. لذا نیاز به نوعی طراحی آزمایش است که به صورت هوشمندانه و با کمک روش‌های آماری تعدادی از آزمایش‌های طراحی کامل حذف گردد، یا به عبارت دیگر برای دستیابی به نتیجه دلخواه تنها کسری از کل آزمایش‌ها انجام گیرد. راه حل علمی برای انجام این کار استفاده از طراحی آزمایش کسری است. با استفاده از روش‌های آماری مانند روش تاگوچی می‌توان فاکتورهای مختلف را به صورت همزمان مطالعه و داده‌های کمی قابل ملاحظه‌ای را با انجام آزمایش‌های کمتر به دست آوریم [۱۴]. با توجه به آنکه لازمه رسیدن به کارایی بالا در تجزیه‌زیستی جداسازی باکتری‌های کارآمد و همچنین تعیین شرایط بهینه عملکرد آنها می‌باشد در این پژوهش پس از غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام در خلیج فارس (سواحل شهر بندرعباس) کارآمدترین باکتری تجزیه کننده نفت خام جداسازی، خالص و توسط روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی شناسایی شد. همچنین به منظور تعیین شرایط بهنیه تجزیه نفت خام توسط

Archive of SID

www.SID.ir

سویه خالص شده از روش تاگوچی استفاده شد.

روش کار

جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام

شن و ماسه ساحلی به همراه آب دریا از قسمت‌های مختلف سواحل شهر بندرعباس به صورت تصادفی در بطری‌های استریل نمونه‌برداری و تا زمان انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ °C نگه‌داری شد. در آزمایشگاه در حدود ۵ g از رسوبات نمونه‌برداری شده به ارلن شیار دار ۲۵۰ cc حاوی ۵۰ cc محیط کشت پایه نمکی (mineral salts medium) (MSM) به همراه ۱٪ نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی اضافه گردید. ارلن‌ها سپس در شیکر انکوباتور (دمای ۳۵ °C، ۱۴۰ rpm) گرماگذاری شدند. محیط کشت پایه نمکی حاوی ۰/۵ g دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۱ g کلرید آمونیم، ۰/۰۱ g سولفات آهن و همچنین ۱ cc محلول عناصر میکرو در cc ۱۰۰۰ آب دریا (۳٪) بود. محلول عناصر میکرو شامل ۷۰ mg کلرید روی، ۱۰۰ mg کلرید منگنز، ۲۰۰ mg کلرید کبالت، ۱۰۰ mg کلرید نیکل، ۲۰ mg کلرید مس II ، ۵۰ mg مولیبدات سدیم، ۲۶ mg سلنیت سدیم، ۱۰ mg وانادات سدیم، ۳۰ mg ولفرامات سدیم، ۱ cc اسید کلریدریک ۲۵٪ و ۱۰۰۰ cc آب مقطر بود [۱۸]. محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ min اتوکلاو شدند. پس از رشد باکتری‌ها در محیط پایه معدنی مجدد مقداری از محیط کشت برداشته و به ارلن حاوی محیط کشت پایه معدنی جدیدی مشابه ترکیب ذکر شده در بالا اضافه و این فرآیند چندین مرتبه تکرار شد (مرحله غنی‌سازی ۳ ماه طول کشید). در پایان مرحله غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام، ۱۰۰ µl از محیط کشت برداشته و بر روی پلیت‌های حاوی نوترینت آگار (ساخته شده با آب دریای ۳٪) پس از تهیه رقت‌های سریال جداسازی و خالص شدند. سویه‌های جداسازی شده مجدد به ارلن‌های حاوی محیط کشت پایه معدنی به همراه نفت خام (۱٪) به عنوان تنها منبع کربن تلقیح و از میان آنها سویه‌ای که کارایی بالاتری را نشان داد جهت تعیین شرایط بهینه تجزیه نفت خام انتخاب گردید.

شناسایی سویه جداسازی شده

سویه جداسازی شده با استفاده از تست‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد. تست‌های بیوشیمیایی از قبیل اکسیداز، کاتالاز، نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون، تولید بیوسورفکتانت، هیدرولیز قندها، رشد در شرایط غلظت‌های مختلف نمک انجام گرفت. شناسایی مولکولی سویه خالص شده با استفاده از تعیین توالی ۱۶ S rDNA انجام گرفت. در ابتدا سویه خالص شده در محیط نوترینت آگار کشت داده شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت high pure PCR product محصول شرکت Roche آلمان صورت گرفت. به منظور تعیین غلظت DNA و نیز بررسی میزان خلوص آن، جذب DNA در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ µm اندازه‌گیری شد. به منظور تکثیر توالی ۱۶ S rDNA از پرایمرهای 27F: 5- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3 و 1510R : 5-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3 و دستگاه Primus 25 advanced®thermocycler استفاده شد [۱۹]. محصول PCR توسط شرکت تکاپوزیست توالی یابی شد. پس از تعیین توالی‌ها، با استفاده از BLAST در پایگاه اطلاعاتی http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST جستجوهای همولوژی انجام شد.

تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی نفت خام با استفاده از مخلوط باکتریایی غنی‌سازی شده

به منظور تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه جداسازی شده، از طراحی آزمایش به روش تاگوچی با آرایه ($L_{16}(4^5)$ (۵ فاکتور در چهار سطح) استفاده گردید. مقادیر مختلف و فاکتورهای مورد نظر برای تعیین شرایط بهینه (pH، دما، تعداد باکتری تلقیح شده، غلظت NH_4Cl و K_2HPO_4) و همچنین آرایش ارتوگنال طراحی آزمایش در جداول ۱ و ۲ آورده شده‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ فاکتورهای انتخاب شده جهت تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه TA1.

فاکتور	سطح			
pH	۷	۸	۹	۱۰
دما (°C)	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵
مقدار باکتری تلقیح شده (OD_{600nm})	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲	۰/۴
NH_4Cl (g/L)	۰/۵	۱	۲	۴
K_2HPO_4 (g/L)	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲

جدول ۲ تیمارهای مختلف آزمایش شده جهت تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی نفت خام براساس روش تاگوچی $L_{16}(4^5)$.

شماره تیمار	NH_4Cl	K_2HPO_4	دما (°C)	pH	تراکم مایه تلقیح (OD_{600nm})
۱	۰/۵	۰/۲۵	۲۰	۷	۰/۰۵
۲	۱	۰/۵	۲۵	۸	۰/۰۵
۳	۲	۱	۳۰	۹	۰/۰۵
۴	۴	۲	۳۵	۱۰	۰/۰۵
۵	۴	۱	۲۵	۷	۰/۱۰
۶	۲	۲	۲۰	۸	۰/۱۰
۷	۱	۰/۲۵	۳۵	۹	۰/۱۰
۸	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۰	۰/۱۰
۹	۱	۲	۳۰	۷	۰/۲۰
۱۰	۰/۵	۱	۳۵	۸	۰/۲۰
۱۱	۴	۰/۵	۲۰	۹	۰/۲۰
۱۲	۲	۰/۲۵	۲۵	۱۰	۰/۲۰
۱۳	۲	۰/۵	۳۵	۷	۰/۴۰
۱۴	۴	۰/۲۵	۳۰	۸	۰/۴۰
۱۵	۰/۵	۲	۲۵	۹	۰/۴۰
۱۶	۱	۱	۲۰	۱۰	۰/۴۰

کلیه آزمایش‌ها در ارلن‌های استریل cc ۲۵۰ در دور شیکر rpm ۱۴۰ انجام شدند. جهت رسیدن به تعداد باکتری مورد نظر در هر تیمار، باکتری خالص شده ابتدا در محیط کشت آگار مغذی تکثیر و پس از سانتریفیوژ محیط کشت توسط سانترفیوژ یخچال‌دار (g ۹۵۰۰)، رسوب حاصل جهت تلقیح ارلن‌های حاوی cc ۵۰ محیط MSM به همراه ۱٪ نفت خام استفاده گردید. pH محیط‌های کشت هر hr ۱۲ توسط کاغذ pH (با دقت ۰/۵) سنجیده و با استفاده از NaOH و HCl نرمال تظیم شد. پس از گذشت ۵ روز میزان مصرف نفت خام در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری و داده‌ها وارد نرم افزار شدند، سپس آزمایشی با شرایط پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار گذاشته و میزان کارآمدی شرایط پیشنهاد شده توسط نرم افزار بررسی شد. پس از انتخاب تیمار بهینه (مقایسه میزان تجزیه زیستی نفت خام بین تیمار پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار و تیمارهای مختلف گذاشته شده (جدول ۲) منحنی رشد سلولی در محیط پایه معدنی به همراه ۱٪ نفت خام با اندازه‌گیری روزانه رشد باکتری (با استفاده از روش رقت سریال) رسم شد. همچنین میزان تجزیه زیستی به صورت روزانه اندازه‌گیری و منحنی آن رسم گردید. تمامی آزمایش ها با ۳ تکرار به همراه تیمار شاهد بدون تلقیح باکتری انجام شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج و سنجش نفت خام باقی مانده در محیط‌های کشت

جهت اندازه‌گیری مقدار نفت خام باقی مانده در محیط کشت از روش شهریاری مقدم و همکاران [۱۵] استفاده شد. ابتدا pH محیط کشت با استفاده از HCl به پایین‌تر از ۲ رسانده شد. سپس استخراج نفت باقی مانده از محیط کشت توسط cc ۲۵ حلال هگزان نرمال در داخل قیف جداکننده انجام و این فرآیند دوبار تکرار گردید. در پایان دو استخراج با هم مخلوط و حلال پرانده و در پایان توسط وزن سنجی، میزان نفت باقی مانده اندازه‌گیری شد.

آنالیزهای آماری

از نرم‌افزار Statistica 8.0 برای طراحی آزمایش تاگوچی استفاده شد. جهت شناسایی فاکتورهای تاثیرگذار بر میزان تجزیه زیستی نفت خام از factorial ANOVA of the design module استفاده شد.

نتایج و بحث

در مطالعه حاضر سه سویه باکتری پس از غنی‌سازی باکتری‌ها در محیط پایه معدنی به همراه نفت خام از خلیج فارس (سواحل شهر بندر عباس) جداسازی و خالص شدند. پس از مطالعه توانایی مصرف نفت خام توسط سویه‌های خالص شده، سویه‌ای که TA1 نام‌گذاری شد قادر به تجزیه زیستی نفت خام به صورت خالص بود. سویه TA1 توسط تست‌های مولکولی، مورفولوژیک و بیوشیمیایی شناسایی شد. سویه TA1 و بر اساس آنالیز مولکولی ۹۹٪ به *Alcanivorax dieselolei* شباهت نشان داد (شماره دستیابی KF452284.1). نتایج تست‌های بیوشیمیایی انجام شده در جدول ۳ آورده شده است. هان و همکاران [۲۰] بیان کردند همولوژی بین ۹۳٪ تا کمتر از ۹۷٪ نشان‌دهنده گونه و یا جنس جدید، بین ۹۷٪ تا کمتر از ۹۹٪ مطابق شناسایی در سطح جنس و بالاتر از ۹۹٪ بیان کننده شناسایی در سطح گونه می‌باشد. با توجه به مطالب ذکر شده سویه TA1، سویه‌ای از گونه *Alcanivorax dieselolei* می‌باشد.

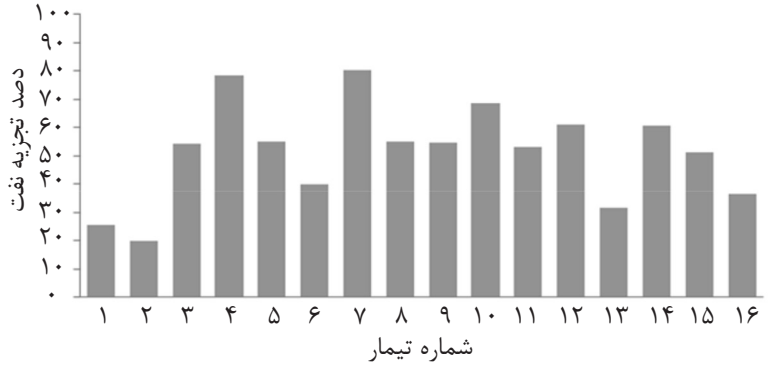
جنس Alcanivorax اولین بار در سال ۱۹۹۸ توسط یاکیمو و همکاران [۲۱] از دریا جداسازی و توصیف گردید. تا کنون گونه های مختلفی از این جنس شناسایی و توصیف شده است که از آنها می‌توانیم به *A. balearicus* [۲۲]، *A. hongdengensis* [۲۳]، *A. pacificus* [۲۴] اشاره کنیم. گونه *A. dieselolei* که در مطالعه حاضر نیز جداسازی شده است، اولین بار توسط لیو و همکاران [۲۵] گزارش شده است. این محققان باکتری *A.dieselolei* را از آب‌های آلوده به نفت دریای بوهایی در سواحل شرقی اقیانوس آرام جداسازی نمودند. مطالعات متعددی نشان داده که گونه‌های متعلق به جنس Alcanivorax به صورت موثری قادر به تجزیه هیدروکربن ای نفتی می‌باشند [۲۶]. سویه جداسازی شده در مطالعه حاضر نیز به صورت قابل ملاحظه‌ای قادر به تجزیه ترکیبات نفتی بود، که تایید کننده نتایج این محققین است. میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه TA1 در تیمارهای مختلف در شکل ۱ آورده شده است. در طول انجام تیمارهای مختلف آزمایش تاگوچی، بیشترین میزان تجزیه زیستی نفت خام در تیمار شماره ۷ و کمترین میزان مصرف نفت خام در تیمار شماره ۲ به‌دست آمد. نتایج آزمون ANOVA بر اساس میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه TA1 در جدول ۴ آورده شده است. به طور کلی تمامی فاکتورهای آزمایش شده به غیر از غلظت NH_4Cl تاثیر معنی‌داری ($p<0.05$) بر میزان تجزیه زیستی نشان دادند. از میان فاکتورهای انتخاب شده بر اساس میزان اندازه اثر به‌دست آمده، pH و دما تاثیرگذارترین فاکتورها در تجزیه زیستی نفت خام بودند (شکل ۲). جهت تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده نمود. استفاده از طراحی آزمایش توسط طرح فاکتوریل کامل امکان هر گونه ترکیب ممکن بین فاکتورهای موجود و همچنین بررسی تداخلات آنها را امکان‌پذیر می‌نماید، با این وجود اگر تعداد فاکتورهای مورد مطالعه زیاد باشند، انجام آزمایش‌ها بسیار زمان بر و پیچیده خواهد شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ خصوصیات مورفولوژی و فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه TA1.

سویه TA1	نام آزمایش
مورفولوژی سلول	کوکو باسیل
گرم	–
اسپور	–
کپسول	–
حرکت	+
رشد در غلظت های مختلف ٪NaCl	٪۱۵–۰
pH	۱۱–۶
رشد در دما (°C)	
۳۵ °C	+
٤٥ °C	+
٥٥ °C	–
کاتالاز	+
اکسیداز	+
حرکت	+
دنیتریفیکاسیون	+
نیتریفیکاسیون	-
رشد در شرایط بی هوازی	+
مصرف گلوکز	+
مصرف ساکاروز	–
مصرف لاکتوز	–
مصرف سیترات	+
هیدرولیز نشاسته	–
هیدرولیز ژلاتین	+
تولید بیوسورفاکتانت	+

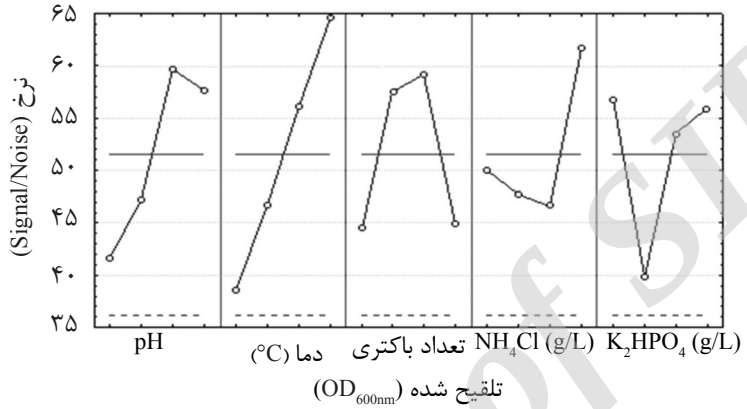


شکل ۱ درصد تجزیه نفت خام توسط سویه TA1 در تیمارهای مختلف.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴ نتایج آزمون ANOVA براساس میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه TA1.

فاکتور	Sum of Squares	p-value	F
pH	۲۶۵۵/۴۶	۰/۰۲۱	۳/۷۲۵۴
دما (°C)	۴۵۹۳/۹۲	۰/۰۰۱	۶/۴۴۴۹
تعداد باکتری تلقیح شده (OD_{600nm})	۲۲۶۳/۲۲	۰/۰۳۷	۳/۱۷۳۷
NH_4Cl (g/L)	۱۷۴۵/۹۹	۰/۰۸۱	۲/۴۴۹۴
K_2HPO_4 (g/L)	۲۲۶۱/۱۵	۰/۰۳۷	۳/۱۷۲۲

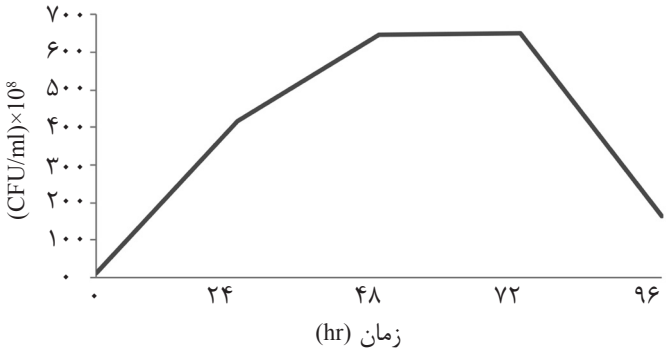


شکل ۲ نمودار تاثیر سطوح مختلف فاکتورهای موثر بر تجزیه نفت توسط سویه TA1.

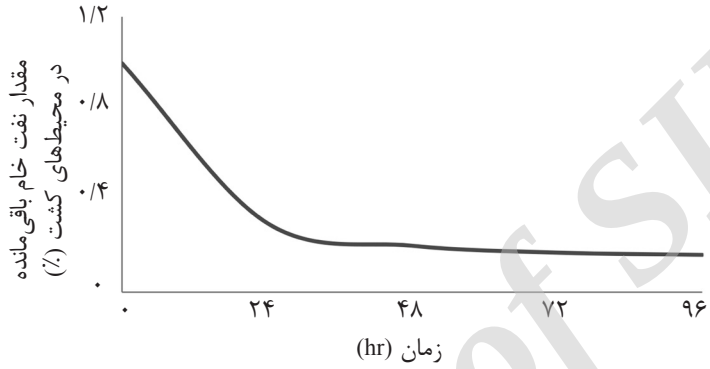
به عنوان مثال اگر در مطالعه حاضر جهت تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی نفت خام از این روش استفاده می‌شد، با توجه به انتخاب پنج فاکتور هر کدام در چهار سطح ۱۰۲۴ (4^5) آزمایش می‌بایست انجام می گردید، اما با استفاده از آرایه ارتوگنال (طراحی آزمایش به روش تاگوچی) تنها نیاز به انجام ۱۶ آزمایش برای تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی توسط سویه TA1 بود. استفاده از روش تاگوچی در زمینه‌های مختلفی تا کنون به کار رفته است، مانند تعیین شرایط بهینه تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه در فرآیند تخمیر [۲۷]، تجزیه فاضلاب‌هایی با آلودگی های فنلی [۲۸] و همچنین تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی برخی از ترکیبات PAHs [۲۹ و ۳۰]. در مطالعه حاضر نیز از روش تاگوچی جهت تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی توسط سویه TA1 استفاده شد. پس از انجام آنالیزهای آماری شرایط بهینه تجزیه زیستی نفت خام به صورت زیر تعیین گردید. pH= ۹، ۳۵ °C = دما، ۴ g/L) NH_4Cl، (۰/۲۵ g/L K_2HPO_4 و ۰/۲ = مایه تلقیح (OD_{600nm}). تحت این شرایط ۶۳/۶۸٪ نفت خام تجزیه شد. با توجه به آنکه میزان تجزیه زیستی در تیمار شماره ۷ آزمایش تاگوچی نسبت به شرایط بهینه پیشنهاد شده بیشتر بود، این شرایط به عنوان شرایط بهینه در نظر گرفته شد. شرایط تیمار ۷ به این صورت بود: pH = ۹، ۳۵ °C = دما، (۱ g/L NH_4Cl، (۰/۲۵ g/L K_2HPO_4 و ۰/۱ = مایه تلقیح (OD_{600nm}). تحت این شرایط بیش از ۸۰٪ نفت خام تجزیه گردید. نتایج منحنی رشد و میزان تجزیه زیستی نفت خام در شرایط بهینه (شرایط تیمار ۷) در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است. دما با تاثیر بر خواص فیزیکی، ترکیب شیمیایی نفت، تاثیر بر میزان متابولیسم و ترکیب جمعیتی باکتری‌ها بر میزان تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها تاثیرگذار است [۳۱]. در مطالعه حاضر سویه TA1 بهترین عملکرد در تجزیه زیستی را در دمای ۳۵ °C نشان داد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳ منحنی رشد سویه TA1 در محیط پایه معدنی به همراه نفت خام در شرایط بهینه.



شکل ۴ میزان تجزیه نفت خام توسط سویه TA1 در محیط پایه معدنی به همراه نفت خام در شرایط بهینه.

در دماهای پایین ویسکوزیته نفت افزایش یافته، حلالیت آلکان ها در آب کاهش و در نتیجه از میزان تجزیه زیستی کاسته می‌شود. در دماهای بالا (۳۰ °C تا ۴۰ °C) بر میزان تجزیه زیستی به میزان قابل توجه ای افزایش می‌یابد. اگرچه در بالای این دما به دلایل افزایش سمیت هیدروکربن‌ها از میزان تجزیه‌زیستی کاسته می‌شود [۳۲]. از دیگر عوامل موثر در تجزیه زیستی، pH محیط است، در محیط‌های دریایی pH اغلب ثابت و تا حدی قلیایی است. pH محیط منجر به تغییر فراوانی باکتری‌ها، فعالیت‌های آنزیمی و همچنین میزان حلالیت مواد غذایی می‌شود [۳۳]. بر اساس نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر سویه باکتریایی TA1 در محیط پایه نمکی روزانه حدود ۳-۲ واحد pH محیط را کاهش می‌داد. این کاهش pH احتمالا به دلیل تولید متابولیت‌های حد واسط یا بیوسورفاکتانت آنیونی است. البته لازم به‌ذکر است که تغییرات pH مشاهده شده در محیط آزمایشگاهی می‌باشد و در محیط‌های دریایی آلوده به نفت، نسبت مقدار نفت خام آلاینده به حجم آب محیط بسیار پایین است و تولید ترکیبات اسیدی میکروارگانیسم‌ها تاثیری بر pH محیط ندارد. خاک‌ها و رسوبات نیز به علت داشتن خاصیت تعویض یونی، به محیط خاصیت بافری می‌دهند و مانع از تغییرات شدید pH می‌گردند. سویه TA1 ایزوله شده در این پژوهش قادر است در دامنه وسیعی از تغییرات pH ۷ تا ۱۰ نفت خام را تجزیه کند، در این مطالعه pH=۹ به عنوان pH بهینه درنظر گرفته شد، که بیانگر فعالیت بیشتر باکتری در pHهای قلیایی است، نتایج مشابهی نیز در مطالعه تجزیه‌زیستی نفت خام توسط باکتری Halomonas sp. جداسازی شده از سواحل قشم گزارش شده است [۱۹]. نتایج گزارش شده توسط زکی و همکاران نیز نشان داده است در pHهای کمی قلیایی باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها کارایی بالاتری دارند [۳۴]. مواد مغذی نقش کلیدی در زیست‌پالایی مناطق آلوده به ترکیبات هیدروکربنی ایفا می‌کنند. در مناطق دریایی کمبود مواد مغذی معمولا به دلیل

Archive of SID
www.SID.ir

کمبود در غلظت ترکیبات نیتروژنه و فسفاته روی می دهد. نکته قابل توجه در انجام زیست‌پالایی این است که به چه میزان از مواد مغذی استفاده کنیم، بدون آنکه مسبب ایجاد آلودگی‌های ثانویه در محیط زیست شویم [۵]. باکتری‌های مختلف در غلظت‌های مختلف منبع نیتروژن و فسفات دارای عملکرد بهینه خود می‌باشند و تعیین کمترین غلظتی از مواد مغذی که در آن باکتری دارای بهترین کارایی می‌باشد حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر مقادیر NH_4Cl ۰/۱ g و K_2HPO_4 ۰/۰۲۴ g حداقل مقدار لازم جهت تجزیه زیستی کارآمد ۱٪ نفت خام تعیین گردید. تحت این شرایط با صرف هزینه و آسیب‌های زیست محیطی کمتر، قادر به زیست‌پالایی ترکیبات نفتی خواهیم بود. علاوه بر شرایط محیطی، تعداد باکتری تلقیح شده نیز نقش مهمی در تجزیه زیستی ایفا می کنند. نتایج مطالعه تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی توسط سویه TA1 نشان داد، تعداد باکتری تلقیح شده به محیط‌های کشت تاثیر معنی‌داری بر روند تجزیه زیستی داشته است. تلقیح زیستی از روش‌های معمول زیست‌پالایی است که منجر به افزایش نرخ تجزیه زیستی در محیط می‌شود [۳۵ و ۳۶]. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد غلظت مایه تلقیح نیز دارای مقدار بهینه‌ای می‌باشد به گونه‌ای که تلقیح کم و یا زیاد باکتری اثرات مثبتی در افزایش میزان تجزیه زیستی نفت خام نشان نمی دهد. تلقیح میکروارگانیسم‌ها به محیط جهت زیست‌پالایی مناطق آلوده پیچیدگی‌های خاص خود را دارد. مطالعات نشان داده است که تجزیه زیستی با ارگانیسم‌های بومی نسبت به تلقیح باکتری‌های جدید کارایی بالاتری داشته و از نظر اقتصادی نیز به صرفه‌تر است [۳۷]. به طور کلی نقش اضافه کردن باکتری‌ها به محیط وابسته به شرایط محیطی و توانایی سویه‌های معرفی شده در تجزیه زیستی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر یک سویه باکترایی (TA1) که بر اساس آنالیزهای مولکولی بیش‌ترین شباهت را به *Alcanivorax dieselolei* نشان داد جداسازی شد. به طور کلی تمامی فاکتورهای آزمایش شده به غیر از غلظت NH_4Cl تاثیر معنی‌داری ($p<0.05$) بر میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه TA1 نشان دادند. از میان فاکتورهای انتخاب شده براساس میزان اندازه تاثیر، pH و دما تاثیر گذارترین فاکتورها در تجزیه‌زیستی نفت خام بودند. بهینه‌سازی تجزیه‌زیستی نفت خام توسط این سویه به با موفقیت تعیین و pH = ۹، ۳۵ °C = دما، NH_4Cl (۱ g/L)، K_2HPO_4 (۰/۲۵ g/L) و ۰/۱ = مایه تلقیح (OD_{600nm}) به عنوان مقادیر بهینه در نظر گرفته شدند. تحت این شرایط بیش از ۸۰٪ نفت خام تجزیه گردید. با توجه به توان بالای سویه خالص شده در تجزیه نفت خام و تعیین شرایط بهینه تجزیه زیستی، نتایج این مطالعه می‌تواند در زیست‌پالایی مناطق آلوده به ترکیبات نفتی در منطقه استفاده شود.

مراجع

[1]. Pak A. and Farajzadeh M., "*Iran's integrated coastal management plan: Persian Gulf, Oman Sea, and southern Caspian Sea coastlines*", Ocean & Coastal Management., Vol. 50, No. 9, pp. 754-773, 2007.

[2]. Liu Y., Hu X. and Liu H., "*Industrial-scale culturing of the crude oil-degrading marine Acinetobacter sp. strain HC8-3S*",International Biodeterioration & Biodegradation., Vol. 107, pp. 56-61, 2016.

[3]. Pasumarthi R., Chandrasekaran S. and Mutnuri S., "*Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa and Escherichia fergusonii isolated from the Goan coast*", Marine Pollution Bulletin., Vol. 76, No. 1, pp. 276-282,

Archive of SID
www.SID.ir

2013.

[4]. Thavasi R., Jayalakshmi S. and Banat I. M., "*Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of Bacillus megaterium, Corynebacterium kutscheri and Pseudomonas aeruginosa*", Bioresource Technology., Vol. 102, No. 2, pp. 772-778, 2011.

[5]. Bao M. T., Wang L. N., Sun P. Y., Cao L. X., Zou J. and Li Y. M., "*Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment*", Marine Pollution Bulletin., Vol. 64, No. ,6, pp. 1177-1185, 2012.

[6]. Zhang G., Chen T., Chang S., Zhang W., Wu X., Wu M., Wang Y., Long H., Chen X., Wang Y. and Liu G., "*Complete genome sequence of Acinetobacter sp. TTH0-4, a cold-active crude oil degrading strain isolated from Qinghai-Tibet Plateau*", Journal of Biotechnology., Vol. 226, pp. 54-55, 2016.

[7]. Song X., Xu Y., Li G., Zhang Y., Huang T. and Hu Z., "*Isolation, characterization of Rhodococcus sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons*", Marine Pollution Bulletin., Vol. 62, No. 10, pp. 2122-2128, 2011.

[8]. Zheng C., He J., Wang Y., Wang M. and Huang Z., "*Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic Geobacillus pallidus strains*", Bioresource Technology., Vol. 102, No. 19, pp. 9155-9161, 2011.

[9]. Kweon S. J., Sutherland O., Kim J. B., Jones H. L., Burback R. C., Graves B. L., Psurny S. W., E., and Cerniglia C. E., "*Dynamic response of Mycobacterium vanbaalenii PYR-1 to BP Deepwater Horizon crude oil*", Applied and Environmental Microbiology., Vol. 81, No. 13, pp. 4263-76, 2015.

[10]. El Mahdi A. M., Aziz H. A., Amr S. S., El-Gendy N. S. and Nassar H. N., "*Isolation and characterization of Pseudomonas sp. NAF1 and its application in biodegradation of crude oil*", Environmental Earth Sciences., Vol. 75, No. 5, pp. 1-11, 2016.

[۱۱]. شاه علیان ف.، صفاهیه ع.، سلامات ن.، موجودی ف. و زارع دوست م. "بررسی نقش باکتری‌های جداشده از رسوبات خلیج فارس در حذف بیولوژیکی آلاینده‌های نفتی (آنتراسن)"، علوم و مهندسی محیط زیست، دوره ۱، شماره ۴، صفحات ۱۷-۱۱، ۱۳۹۳.

[۱۲]. صفاهیه ع.، موجودی ف. و ذوالقرنین ح .، "ارزیابی و مقایسه توانایی باکتری‌های سودوموناس بومی منطقهٔ خورموسی در حذف ترکیبات آروماتیک حلقوی. محیط‌شناسی"، دوره ۳۷، شمارهٔ ۵۸، صفحات ۱۵۸-۱۴۹، ۱۳۹۰.

[۱۳]. برومندی ن. ، محمودی م. م.، مولا د.، رضائیان ع. ع. و بوستانی م. "بررسی تجزیه زیستی نفت خام توسط آلکانی وراکس دیزلولی: سویه جداسازی شده از رسوبات منطقه ساحلی خلیج فارس"، مجله دنیای میکروب‌ها، دوره ۱۹، شماره ۲، صفحات ۱۶۱ - ۱۴۸، ۱۳۹۳.

[14]. Shahriari Moghadam M., Ebrahimipour G., Abtahi B., Ghassempour A. and Hashtroudi M.S., "*Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments*", Journal of Environmental Health Science and Engineering., Vol. 12, No. 1, pp. 1-9, 2014.

[15]. Shahriari Moghadam M., Ebrahimipour G., Abtahi B., Khazaei N. and Karbasi N., "*Statistical optimization of crude oil biodegradation by Marinobacter sp. isolated from Qeshm Island, Iran*", Iranian Journal of Biotechnology., Vol. 12, No. 1, pp. 35-41, 2014.

[16]. Reis I., Almeida C. M., Magalhães C. M., Cochofel J., Guedes P., Basto M. C., Bordalo A. A., and Mucha A. P., "*Bioremediation potential of microorganisms from a sandy beach affected by a major oil spill*", Environmental

Archive of SID

www.SID.ir

Science and Pollution Research., Vol. 21, No. 5, pp. 3634-3645, 2014.

[17]. Satyanarayana T., Johri B. N., Prakash A. and Prakash A., "*Microorganisms in environmental management: microbes and environment*", Springer Science & Business Media., 2012.

[18]. Schlegel H. G., "*Allgemeine mikrobiologie*", Auflage, Georg Thieme Verlag, 1992.

[19]. Sadeghi Haddad Zavareh M., Ebrahimipour G., Sahahriari Moghadam M., Fakhari J. and Abdoli T., "*Bioremediation of Crude Oil Using Bacterium from the Coastal Sediments of Kish Island, Iran*", Iranian Journal of Public Health., Vol. 45, No. 5, pp. 670-679. 2016.

[20]. Han X. Y., "*Bacterial identification based on 16S ribosomal RNA gene sequence analysis, in: Y.W. Tang, AND C. W. Stratton*", Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Springer, pp. 323-326, 2006.

[21]. Yakimov M. M., Golyshin P. N., Lang S., Moore E. R., Abraham W. R., Lünsdorf H. and Timmis K. N., "*Alcanivorax borkumensis gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium*", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology., Vol. 48, No. 2, pp. 339-348, 1998.

[22]. Rivas R., García-Fraile P., Peix A., Mateos P. F., Martínez-Molina E. and Velazquez E., "*Alcanivorax balearicus sp. nov., isolated from Lake Martel*", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 57, No. 6, pp. 1331-1335, 2007.

[23]. Wu Y., Lai Q., Zhou Z., Qiao N., Liu C. and Shao Z., "*Alcanivorax hongdengensis sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant*", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 59, No. 6, pp. 1474-1479, 2009.

[24]. Lai Q., Wang L., Liu Y., Fu Y., Zhong H., Wang B., Chen L., Wang J., Sun F. and Shao Z., "*Alcanivorax pacificus sp. nov., isolated from a deep-sea pyrene-degrading consortium*", International journal of systematic and evolutionary microbiology., Vol. 61, No. 6, pp. 1370-1374, 2011.

[25]. Liu C. and Shao Z., "*Alcanivorax dieselolei sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment*", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology., Vol. 55, No. 3, pp. 1181-1186, 2005.

[26]. Liu Y. C., Li L. Z., Wu Y., Tian W., Zhang L. P., Xu L., Shen Q. R. and Shen B., "*Isolation of an alkane-degrading Alcanivorax sp. strain 2B5 and cloning of the alkB gene*", Bioresource Technology, Vol. 101, No. 1, pp. 310-316, 2010.

[27]. Lee M. T., Chen W. C. and Chou C. C., "*Medium improvement by orthogonal array designs for cholesterol oxidase production by Rhodococcus equi No. 23*", Process Biochemistry., Vol. 32, No. 8, pp. 697–703, 1997.

[28]. Hsien T. Y. and Lin Y. H., "*Biodegradation of phenolic wastewater in a fixed biofilm reactor*", Biochemical Engineering Journal., Vol. 27, No. 2, pp. 95-103, 2005.

[29]. Chen J., Wong M. H., Wong Y. S. and Tam N. F. Y., "*Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by Sphingomonas sp., a bacterial strain isolated from mangrove sediment*", Marine Pollution Bulletin., Vol. 57, No. 6, pp. 695-702, 2008.

[30]. Chen J. L., Au K. C., Wong Y. S. and Tam N. F. Y., "*Using orthogonal design to determine optimal conditions*

Archive of SID

www.SID.ir

for biodegradation of phenanthrene in mangrove sediment slurry", Journal of Hazardous Materials., Vol. 176, No. 1, pp. 666-671, 2010.

[31]. Atlas R. M., "*Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. An environmental perspective*", Microbiological Reviwes., Vol. 45, No. 1, pp. 180-209, 1981.

[32]. Rahman K. S., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P. and Banat I. M., "*Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium*", Bioresource Technology., Vol. 85, No. 3, pp. 257-261, 2002.

[33]. Lin C., Gan L. and Chen Z. L., "*Biodegradation of naphthalene by strain Bacillus fusiformis (BFN)*", Journal of Hazardous Materials., Vol. 182, No. 1, pp. 771-777, 2010.

[34]. Zaki M. S., Authman M. M. and Abbas H. H., "*Bioremediation of petroleum contaminants in aquatic environments (review article)*", Life Science Journal., Vol. 12, No. 5, pp. 127-139 (2015).

[35]. Atlas R. M. and Bartha R., "*Hydrocarbon biodegradation and oil-spill bioremediation*", Advances in Microbial Ecology., Vol. 12, pp. 287-338, 1992.

[36]. Vogel T. M., "*Bioaugmentation as a soil bioremediation approach*", Current Opinion in Biotechnology., Vol. 7, No. 3, pp. 311-316, 1996.

[37]. Saponaro S., Bonomo L., Petruzzelli G. and Romele L., "*Barbafieri, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) slurry phase bioremediation of a manufacturing gas plant (MGP) site aged soil*", Water Air and Soil Pollution., Vol. 135, No. 1-4, pp. 219-236, 2002.

Archive of SID

www.SID.ir