Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۱۱، شماره ۱ (پیاپی ۳۳)، پائیز ۱۳۸۸

بهینه‌سازی تجزیه بیولوژیکی نفت خام توسط میکروارگانیسم‌های خالص‌سازی شده به روش طراحی آزمایش‌ها

امیررضا طلایی [۱*](M.Sc)، نعمتا... جعفرزاده [۲](Ph.D)، محمدرضا طلایی [۳](Ph.D)، مسعود بهشتی [۳](Ph.D)

۱- موسسه آموزش عالی جامی، گروه مهندسی عمران و محیط زیست

۲- دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت محیط

۳- دانشگاه اصفهان، گروه مهندسی شیمی

چکیده

مقدمه: حضور ترکیبات نفتی در محیط زیست منجر به مشکلات فراوانی از جمله ایجاد سمیت شدید، جلوگیری از تبادل اکسیژن در محیط‌های آبی، مرگ و میر موجودات آب‌زی و... می‌گردد. در همین راستا مطالعه حاضر به بررسی چگونگی حذف نفت خام شناور بر روی آب به کمک میکروارگانیسم های خاص پرداخته است.

مواد و روش‌ها: در اولین گام از مطالعه برای جداسازی میکروارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات نفتی از نمونه‌های خاک و آب آلوده به نفت، از روش کشت خطی استفاده شد. پس از جداسازی میکروارگانیسم ها، فرایند بهینه سازی تجزیه نفت خام توسط آنها با کمک طراحی آزمایش‌ها و به روش تاگوچی انجام پذیرفت. ۵ فاکتور در ۳ سطح مختلف برای تعیین شرایط بهینه مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌های بهینه سازی دو بار تکرار گردیدند و در نهایت پس از تحلیل آماری شرایط بهینه محاسبه گشت.

یافته‌ها: در این مطالعه ۱۴ نوع میکروارگانیسم از محیط جداسازی و در نهایت خالص سازی شد. در میان این میکروارگانیسم‌ها که همگی باکتری بودند میکروارگانیسمی که A-۱۴ نامگذاری شد بیشترین میزان تجزیه ترکیبات نفتی (۸۹٪) را ایجاد کرد. آزمون تعیین شاخص امولسیون سازی (E24) نشان داد که همه میکروارگانیسم‌های جدا شده در این مطالعه قادر به تولید بیوسورفکتانت بودند.

نتیجه‌گیری: پس از انجام فرایند بهینه سازی شرایط بهینه رشد باکتریA-۱۴ به این صورت تعیین شد: دما ۳۰ درجه سانتیگراد، pH برابر با ۷، درصد نفت موجود در محیط برابر با ۳ درصد، غلظت نیتروژن ۱ گرم بر لیتر و نهایتاً زمان ماند ۵ روز. در شرایط بهینه میزان راندمان حذف ترکیبات نفتی بیش از ۹۳ درصد افزایش یافت. در این مطالعه نفت خام بصورت شناور و با مدت زمانی کمتر از سایر تحقیقات مشابه تجزیه گشت.

واژه‌های کلیدی: نفت خام شناور، تجزیه بیولوژیکی، روش تاگوچی، طراحی آزمایش‌ها

مقدمه

نشت و پخش شدن تصادفی ترکیبات نفتی دو عامل مهم ورود ترکیبات نفتی در هنگام اکتشاف، تولید، پالایش، حمل و نقل و نگهداری ترکیبات نفتی می‌باشند. ورود فرآورده‌های ناشی از نفت خام از طریق کشتی‌هایی که قادر به حمل بیش از هزاران تن فرآورده‌های نفتی می‌باشند یکی از عوامل آلاینده دریاها و اقیانوس‌ها به این‌گونه ترکیبات است که میزان آن نیز روز به روز افزایش می‌یابد [۱]. بخش‌های مختلف نفت‌خام نیز می‌تواند به طرق متفاوت وارد محیط زیست گردد.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۳۱۶۱۰۳۴ نمابر: ۰۸۶-۶۴۲۲۵۶۷۸

Email: atalaie@jami.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۶/۲۸

www.SID.ir

Archive of SID

گازوئیل، بنزین، نفت سفید، نفت کوره و... به طور گسترده‌ای در زندگی امروزی بشر مورد استفاده قرار می‌گیرند و رها شدن تصادفی و یا نشت آن‌ها منجر به آلودگی آب و خاک شده و مشکلات فراوانی را برای محیط زیست ایجاد می‌نماید. سوخت‌های متداول که از مشتقات نفت خام می‌باشند ترکیبی پیچیده شامل پارافین‌ها، الفین‌ها، هیدروکربن‌های آروماتیک، هیدروکربن‌های آلیفاتیک و مقادیر اندکی از ملکول‌های حاوی سولفور، نیتروژن و اکسیژن می‌باشد [۲]. بطور معمول ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام سمی‌تر از ترکیبات آلیفاتیک با همان تعداد اتم کربن می‌باشند و در غلظت‌های بالاتری نیز در آب یافت می‌شوند که این امر به دلیل پنج برابر بالاتر بودن حلالیت آروماتیک‌ها در مقایسه با آلیفاتیک‌ها می‌باشد [۳]. روش‌های گوناگون برای حذف این ترکیبات در محیط‌های آبی پیشنهاد شده است. روش‌های فیزیکی مانند شناورسازی و یا روش‌های شیمیایی مانند استفاده از سورفکتانت‌ها که بطور معمول پرهزینه و دارای محدودیت‌های فراوانی هستند. تحقیق بر روی تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی نشان داده است که این روش کاملاً امکان‌پذیر بوده و می‌تواند یکی از اقتصادی‌ترین و موثرترین روش‌های حذف ترکیبات نفتی از محیط‌های آبی می‌باشد [۱۰-۴]. در این زمینه مطالعات مشابهی نیز به انجام رسیده است. بطور مثال لی و همکارانش [۱۱] در مطالعه‌ای بر روی تجزیه بیولوژیک فاضلاب‌های تولیدی در مناطق نفت‌خیز توانستند تعدادی میکروارگانیسم را شناسایی نمایند که قادر به مصرف نفت خام به صورت محلول در آب و یا به صورت قطرات ریز بودند. با کمک این میکروارگانیسم‌ها لی توانست ۸۵ درصد نفت خام موجود در این‌گونه پس آب‌ها را در مدت زمان ۷ روز تجزیه نماید. تلز و همکارانش به بررسی یک سیستم لجن فعال در حذف کل ترکیبات هیدروکربنی (TPH) از آب‌های شور خارج شده از چاه‌های نفت که در حد اشباع حاوی نفت خام به صورت محلول و قطرات ریز بودند پرداختند. تلز از روش سازگارسازی برای افزایش قابلیت میکروارگانیسم‌های موجود در لجن فعال برای تجزیه ترکیبات نفتی استفاده نمود. وی موفق شد در مدت زمان ۲۰ روز ۹۸ درصد کل ترکیبات نفتی موجود در این پس‌آب‌ها را تجزیه نماید [۱۲]. دیبل و همکارش بارتا [۱۳] نیز در مطالعه خود به بررسی تاثیر حضور نیتروژن، فسفر و آهن در حذف ترکیبات نفتی در آب دریا پرداختند. آن‌ها دریافتند آب دریا حاوی مقادیر مورد نیاز آهن برای رشد میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار می‌باشد ولی نیتروژن و فسفر کافی را در اختیار ندارد. ویرا و همکارانش [۲] نیز در مطالعه‌هایی به مقایسه تجزیه بیولوژیک گازوئیل توسط دو دسته از میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک دریاچه‌ای که حاوی مقادیر زیادی از گازوئیل بود پرداختند. آن‌ها موفق به حذف ۹۰ درصد گازوئیل موجود در آب در مدت زمان ۴۰ روز شدند و در ادامه کار بهینه‌سازی شرایط رشد این میکروارگانیسم‌ها را نیز انجام دادند. طلایی و همکارانش نیز در مطالعات قبلی خود موفق به جداسازی میکروارگانیسمی شدند که قادر به تجزیه گازوئیل بود. آن‌ها در مطالعه خود به بهینه‌سازی تجزیه گازوئیل نیز پرداختند و شرایط بهینه را برای این میکروارگانیسم با کمک روش تاگوچی مشخص نمودند [۱۴].

کارائی میکروارگانیسم‌ها به عوامل گوناگونی هم‌چون دما، pH، زمان‌ماند، میزان شوری محیط، غلظت مواد مغذی، نوع میکروارگانیسم به کار گرفته شده، شرایط محیطی که میکروارگانیسم‌ها قبلاً در آن قرار داشتند و... بستگی دارد. بنابراین تعیین شرایط بهینه رشد میکروارگانیسم‌ها برای به حداکثر رساندن تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد. روش‌های گوناگونی برای تعیین شرایط بهینه رشد توسط محققین مختلف به کار گرفته شده است. در بیش‌تر مقالاتی که اثر پارامترهای مختلف بر نرخ حذف ترکیبات نفتی و تعیین شرایط بهینه صورت گرفته، از روش آماری "یک عامل در یک زمان" استفاده شده است. در این روش یکی از عوامل تغییر داده می‌شود، در حالی‌که سایر عوامل ثابت است. سپس برای هر عامل که نشان‌گر یک متغیر است، بهترین مقدار (که پاسخ در آن بهینه است) تعیین می‌شود. این کار برای عوامل دیگر نیز تکرار می‌شود. در صورتی که

www.SID.ir

Archive of SID

بین متغیرها اثر متقابل وجود داشته باشد، احتمال دست‌یابی به شرایط بهینه، با استفاده از این روش بسیار کم است. از طرف دیگر به دلیل این که آزمایش‌ها باید به ترتیب و بطور متوالی انجام شود، زمان کل مورد نیاز و هزینه انجام آزمایش‌ها زیاد می‌شود روش دیگر استفاده از تکنیک طراحی آزمایش‌ها به روش "کسری از فاکتوریل" می‌باشد که توسط تعداد کمی از محققین به کار گرفته شده است. طراحی آزمایش‌ها برای هر وضعیتی که به فاکتورهای بسیاری وابسته باشد کاربرد دارد و یک تکنیک منطقی است که به فرد اجازه انتخاب بهترین حالت را بین حالت‌های دیگر می‌دهد و در همه صنایع و در هر جایی که محصولات و فرایند وجود داشته باشد، کاربرد دارد. در روش طراحی آزمایش‌ها که روش آماری نیز خوانده می‌شود (زیرا مبنای کاملا آماری دارد) تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین متغیرها انتخاب شده و پس از انجام آزمایش‌ها با ارزیابی آماری پاسخ‌های به‌دست آمده، بهترین شرایط که ممکن است در بین حالت‌های آزمایش شده نیز موجود نباشد، تعیین می‌شود. اگر مطالعه اولیه در تعیین متغیرها و روابط متقابل بین آن‌ها به‌دقت صورت گرفته باشد، پاسخ به‌دست آمده بهترین پاسخ است [۲۰].

مطالعه حاضر دارای چند برجستگی مهم نسبت به تحقیقات قبلی می‌باشد. یکی تجزیه بیولوژیکی نفت خام شناور بر روی سطح آب است که محققین کمی به این موضوع پرداخته‌اند، دوم استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که سال‌ها در معرض غلظت‌های بسیار زیادی از ترکیبات نفتی بوده‌اند و سوم استفاده از روش طراحی آزمایش‌ها برای بهینه‌سازی تجزیه ترکیبات نفتی هدف اصلی از این تحقیق بررسی شرایط بهینه تجزیه بیولوژیکی نفت خام به کمک روش طراحی آزمایش‌ها می‌باشد. در این بررسی از میان روش‌های مختلف طراحی آزمایش‌ها روش تاگوچی انتخاب گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها. در نخستین گام از انجام این مطالعه از ۴ منطقه آلوده به ترکیبات نفتی نمونه‌برداری شد. این مناطق عبارت بودند از خاک آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران، فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران، فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران و خاک اطراف مخزن تخلیه بنزین و گازوئیل در یک پمپ بنزین در شهر اهواز برای جداسازی میکروارگانیسم‌های احتمالی موجود در این نمونه‌ها از محیط کشت معدنی عمومی که به‌صورت زیر تهیه می‌شد و به عنوان تنها منبع کربن یک میلی‌لیتر نفت خام به آن اضافه می‌شد استفاده گردید:

۰/۱گرم در لیتر $MgSO_4$ ، ۰/۵گرم در لیتر KH_2PO_4، ۰/۰۱گرم در لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۰۰۱گرم در لیتر $FeSO_4$، ۱گرم در لیتر $NaNO_3$ ، ۰/۵گرم در لیتر K_2HPO_4 و pH نمونه به کمک محلول هیدروکسیدسدیم بر روی ۷/۲ تنظیم شد. از یک میلی‌لیتر نفت خام در این محیط کشت به عنوان تنها منبع کربن استفاده گردید [۲۰].

برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از نمونه‌های خاک یک گرم از هر نمونه خاک و برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از نمونه‌های فاضلاب یک میلی‌لیتر از آن‌ها را بطور جداگانه در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط معدنی فوق ریخته و آن‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در یک شیکر انکوباتور با شدت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت یک میلی‌لیتر از محتویات ارلن مایرهای ذکر شده را مجدداً به ارلن‌مایرهایی با همان شرایط ذکر شده انتقال داده و برای ۲۴ ساعت دیگر در شیکر انکوباتور با همان مشخصات قبلی نگهداری شد. پس از دو مرحله کشت میکروارگانیسم‌ها در محیط معدنی با استفاده از روش کشت خطی میکروارگانیسم‌های جدا شده بر روی محیط کشت جامد (نوترینت آگار و PDA) خالص‌سازی شدند و در نهایت از هر میکروارگانیسم اسلنت تهیه شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۰،۱۱]. برای نگهداری طولانی مدت هر ۴ ماه یک بار میکروارگانیسم‌های موجود بر روی اسلنت‌ها به اسلنت‌های جدید منتقل شدند. بر روی کلیه

www.SID.ir

Archive of SID

میکروارگانیسم‌ها آزمایش گرم طبق روش استاندارد انجام پذیرفت [۲۰].

افزایش تعداد میکروارگانیسم‌ها. برای در اختیار داشتن میکروارگانیسم کافی در این مطالعه از کشت آن‌ها در محیط نوترینت براث استفاده گردید. میکروارگانیسم‌ها پس از تلقیح به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث در یک شیکر انکوباتور با شدت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت قرار گرفت. در پایان این مدت میکروارگانیسم‌ها به کمک سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه از محیط نوترینت براث جدا شده و نهایتاً در سرم فیزیولوژیک معلق گردیدند. با کمک روش اسپکتروفتومتری (تعین میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر) از غلظت‌های یکسان میکروارگانیسم‌ها در تمامی آزمایش‌ها استفاده شد [۲۰].

تعیین کارائی میکروارگانیسم‌ها. در این مرحله برای انتخاب بهترین میکروارگانیسم در تجزیه نفت خام از محیط معدنی استفاده شد. میکروارگانیسم‌ها با غلظت یکسان به ارلن مایرهایی ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی تلقیح شدند. سپس یک میلی‌لیتر نفت خام به عنوان تنها منبع کربن به ارلن مایرها اضافه شد. ارلن مایرها به مدت ۱۰ روز در یک شیکرانکوباتور با شدت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مدت میزان نفت باقی مانده در ارلن مایرها اندازه‌گیری شد. میکروارگانیسمی که بیش‌ترین میزان تجزیه ترکیبات نفتی را دارا بود برای مرحله بهینه‌سازی انتخاب شد. با توجه به اهمیت وجود بیوسورفکتانت‌ها در تجزیه ترکیبات نفتی آزمون تعیین شاخص امولسیون‌سازی برای کلیه میکروارگانیسم‌ها انجام شد. در این آزمون از ۲ میلی‌لیتر نفت سفید و ۲ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی حاوی میکروارگانیسم‌ها که به مدت ۱۵ روز در شیکر انکوباتور قرار داشت استفاد شده و در یک لوله آزمایش ریخته شد. لوله ۳ دقیقه تحت ورتکس شدید قرار گرفت و ۲۴ ساعت به حال خود رها شد. پس از این مدت نسبت امولسیون تشکیل شده به کل محتویات لوله محاسبه شد و به عنوان شاخص امولسیون‌سازی مشخص گردید [۲۰].

طراحی آزمایش‌ها. از میان روش‌های مختلف طراحی آزمایش‌ها در این مطالعه روش تاگوچی انتخاب شد. برای بررسی تاثیر عوامل و تعیین شرایط بهینه رشد میکروارگانیسم‌ها پنج عامل در سه سطح مختلف در نظر گرفته شد. جدول ۱ مقادیر هر یک از این عوامل را با نمادگذاری در سه سطح ۲،۱ و ۳ نشان می‌دهد. سطوح مورد نظر با توجه به محدوده عملیاتی متداول آن‌ها که در منابع مختلف ذکر گردیده، انتخاب شد. به منظور طراحی آزمایش‌ها از نرم‌افزار Qualitek-4 (Nutek Inc) استفاده گردید. آزمایش‌های طراحی شده به صورت یک جدول با ۱۸ آزمایش (L_{18}) در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۱. فاکتورها و سطوح در نظر گرفته شده در طراحی آزمایش‌ها جهت بهینه سازی نرخ تجزیه

شماره	فاکتور	سطح۱	سطح ۲	سطح ۳
۱	دما	۲۰°c	۳۰°c	۴۰°c
۲	pH	۶	۷	۸
۳	غلظت نفت اولیه	٪۰/۵	٪۳	٪۶
۴	زمان ماند	۵ Day	۱۰ Day	۱۵ Day
۵	غلظت نیتروژن	۰/۲	۱	۲

برای انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی ۱۸ ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی که به صورت زیر تهیه شد استفاده گشت:

۰/۱گرم در لیتر $MgSO_4$، ۰/۵گرم در لیتر KH_2PO_4، ۰/۰۱گرم در لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۰۰۱گرم در لیتر $FeSO_4$ و ۰/۵ گرم در لیتر K_2HPO_4. این محیط کشت فاقد منبع کربن و نیتروژن بود [۲۰]. در این بررسی طبق جدول شماره ۴ از مقادیر مناسب $NaNO_3$ به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد. هم‌چنین از مقادیر مشخصی از نفت خام (جدول ۴) نیز به عنوان تنها منبع کربن استفاده گردید. مقدار یک میلی‌لیتر از میکروارگانیسم‌های معلق شده در سرم فیزیولوژیک به کلیه ارلن مایرها اضافه گردید. هم‌چنین ۱۸ ارلن مایر نیز با همان

www.SID.ir

Archive of SID

شرایط، ولی بدون میکروارگانیسم به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. کلیه ارلن مایرها طبق جدول طراحی آزمایش‌ها (جدول ۴) در سه شیکرانکوباتور با شدت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه و دماهای ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و طبق برنامه، در زمان‌های مشخص شده، در جدول طراحی آزمایش‌ها (۵،۱۰ و ۱۵ روز) به همراه نمونه‌های شاهد مربوطه از شیکرانکوباتور خارج شده و میزان نفت خام باقی مانده در آن‌ها مورد سنجش قرار گرفت. کلیه آزمایش‌های طراحی شده در این مطالعه دوبار تکرار گردید.

جدول۲. آزمایش‌های انجام شده جهت شناسایی میکروارگانیسم A-۱۴ [۲۰]

آزمایش های انجام شده	نتیجه آزمایش
شکل میکروارگانیسم	میکروارگانیسم A-۱۴ پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی، یک باکتری میله ای (باسیل) تشخیص داده شد.
آزمون کاتالاز	آزمون کاتالاز با استفاده از آب اکسیژنه و به روش استاندارد انجام شد و میکروارگانیسم کاتالاز مثبت تشخیص داده شد.
آزمون اکسیداز	آزمون اکسیداز به کمک دیسکهای استاندارد انجام شد و میکروارگانیسم اکسیداز مثبت تشخیص داده شد.
آزمون گرم	آزمون گرم بر طبق روش استاندارد انجام پذیرفت که نشان داد باکتری A-۱۴ از نوع گرم منفی بود.
آزمون رشد میکروارگانیسم در شرایط بی هوازی	این باکتری در شرایط بی هوازی قادر به رشد نبود. این امر نشان دهنده هوازی مطلق بودن باکتری بود.
آزمون تولید سولفید هیدروژن (H_2S)	این باکتری قادر به تولید سولفید هیدروژن نبود.
تولید پیگمانهای رنگی	این باکتری در دمای بالا (۴۰ درجه سیلسیوس) در محیط جامد نوترینت آگار پس از ۳ روز قادر به تولید پیگمانهای سبز رنگ بود.
آزمون حل شدن پیگمانها ی تولیدی در آب	پیگمان تولیدی در اثر تماس با آب از محیط کشت جامد نوترینت آگار شسته می شد، بنابر این قابل حل در آب بود.
آزمون حل شدن پیگمانها ی تولیدی در اسید استیک	پیگمان تولیدی در اثر تماس با اسید استیک از محیط جامد نوترینت آگار شسته می شد، بنابر این قابل حل در اسید استیک بود.
آزمون حل شدن پیگمانها ی تولیدی در کلروفرم	پیگمان تولیدی در اثر تماس با کلروفرم از محیط کشت جامد نوترینت آگار شسته نمی شد، بنابر این پیگمان تولیدی غیر قابل حل در کلروفرم بود.
قابلیت رشد میکروارگانیسم ها در محیط سپاراژین براث	A-۱۴ قادر به رشد در این محیط کشت بود.
قابلیت رشد میکروارگانیسم ها در محیط استامید براث	A-۱۴ قادر به رشد در این محیط کشت بود.
تولید بو و شکل رشد میکروارگانیسم در محیط مایع نوترینت براث	باکتری پس از رشد در محیط نوترینت براث تولید بویی مطبوع می نمود و کدورتی یکنواخت در تمامی سطح محیط کشت ایجاد می نمود.
مورفولوژی کلنی بر روی محیط جامد	پس از رشد A-۱۴ بر روی محیط نوترینت آگار کلنی هایی تشکیل شد. وسط کلنی ها کمی برآمده تر از اطراف آن بود و حاشیه کلنی کاملاً نامنظم بود.

جدول ۳. کارائی میکروارگانیسم‌های مختلف جدا شده در تجزیه بیولوژیک نفت خام

نام	A-۱	A-۲	A-۳	A-۴	A-۵	A-۶	A-۷	A-۸	A-۹	A-۱۰	A-۱۱	A-۱۲	A-۱۳	A-۱۴
آزمایش گرم	–	+	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–
E24	٪۱۶	٪۱۲	٪۱۶	٪۸	٪۱۲	٪۲۰	٪۲۰	٪۱۶	٪۲۴	٪۱۶	٪۴	٪۳۶	٪۲۸	٪۱۲
کارائی	٪۶۷	٪۷۵	٪۸۴	٪۵۲	٪۶۰	٪۳۳	٪۴۳	٪۸۲	٪۸۰	٪۷۲	٪۷۵	٪۴۴	٪۶۲	٪۸۹

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از آزمایش‌های طراحی شده به روش تاگوچی مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. در روش تاگوچی برای تحلیل آماری و دقیق‌تر نتایج، از یک تابع پاسخ تبدیل یافته که به صورت نسبت علامت هر اثر (S) به اثرات ناشی از خطا (N) تعریف می‌گردد استفاده می‌شود. مزیت استفاده از این پاسخ جدید در تحلیل آماری، نسبت به شکل اولیه پاسخ، مقایسه بزرگی اثرات ناشی از هر عامل اصلی با اثرات ناشی

از عوامل خطا و اغتشاش در اندازه‌گیری است، که در نتیجه منجر به برداشت دقیق‌تری از تاثیر واقعی عوامل بر سیستم خواهد شد [۱۹،۱۸]. نحوه محاسبه نسبت S/N بسته به این که هدف چه نوع بهینه‌سازی باشد، متفاوت خواهد بود. از آنجا که در این مطالعه پاسخ در نظر گرفته شده درصد حذف نفت خام است، و بنابراین هدف بیشینه‌سازی پاسخ می‌باشد، نسبت S/N به صورت معادله (۱) محاسبه می‌گردد [۱۹،۱۸].

$$\frac{S}{N} = -10 \quad \log \frac{(1/y_1^{\,2} + 1/y_2^{\,2} + \Lambda \; + 1/y_n^{\,2})}{n}$$

در این معادله مقدار پاسخ اندازه‌گیری شده برای هر آزمایش در هر آزمون، و n تعداد تکرار آزمایش‌ها (در این‌جا برابر با ۲) می‌باشد. هدف جدید در مسئله، بیشینه‌سازی این پاسخ می‌باشد.

روش‌های اندازه‌گیری. در این مطالعه برای سنجش ترکیبات نفتی باقی مانده در نمونه‌ها از حلال تتراکلرید کربن استفاده گردید. پس از حل شدن نفت باقی مانده در حلال و هم‌چنین جداسازی و صاف‌سازی آن میزان نفت به کمک روش جذب سنجی در طول موج ۴۰۰ نانومتر تعیین شد [۲۰]. این طول موج قبلاً با کمک پنج نمونه استاندارد کالیبره شده بود. معادله حاصل از برازش در مرحله کالیبراسیون $y= 0.1219x$ $(R^2= 0.998)$ بود. برای سنجش میزان pH از دستگاه pH متر دیجیتال ساخت کارخانه jasco استفاده شد. هم‌چنین برای سنجش جذب در طول موج ۴۰۰ نانومتر از یک دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت کارخانه Jasco مدل-V 570ساخت کشور ژاپن با محدوده قابل تنظیم۱۹۰ الی ۲۵۰۰ نانومتر استفاده گشت.

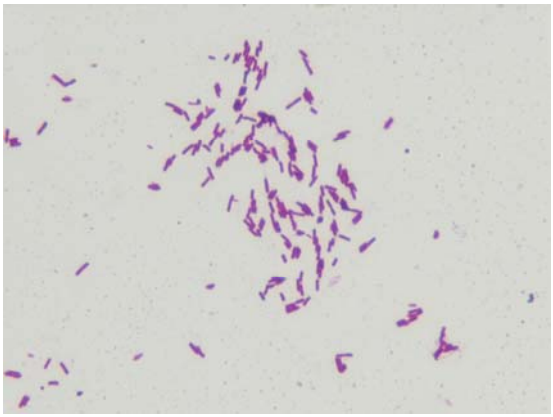
نتایج و بحث

میکروارگانیسم‌های جدا شده. در این مطالعه ۱۴ میکروارگانیسم از نمونه‌ها جداسازی و خالص‌سازی گردید. این نمونه‌ها A-۱ الیA-۱۴ نام‌گذاری گردیدند. در مرحله اول از این مطالعه تعیین کارائی میکروارگانیسم‌ها انجام شد که نتایج آن در جدول ۳ نمایش داده شده است. همان‌طور که در جدول ۳ مشخص است کلیه میکروارگانیسم‌ها از نوع باکتری بوده و ۱۰ نوع از آن‌ها گرم منفی و ۴ نوع دیگر گرم مثبت می‌باشند. A-۱۴ با بیش از ۸۹ درصد تجزیه ترکیبات نفتی شناور در ۱۰ روز، بیش‌ترین کارائی را در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها از خود نشان داد. بنابراین از A-۱۴ در کلیه مراحل بعدی این مطالعه استفاده شد.

در جدول ۳ هم‌چنین نتایج حاصل از آزمایش تعیین شاخص امولسیون‌سازی (E24) نمایش داده شده است. همان‌طور که مشخص است نمونه A-۱۲ بیش‌ترین میزان شاخص امولسیون‌سازی را ارائه نموده است. در حالی‌که A-۱۴ با بیش‌ترین میزان تجزیه ترکیبات نفتی تنها دارای ۱۲ درصد شاخص امولسیون‌سازی می‌باشد. تولید بیوسورفکتانت‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها سبب افزایش این شاخص می‌گردد. لیانگ و همکارانش در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که وجود بیوسورفکتانت‌ها برای شروع تجزیه بیولوژیک نفت خام ضروری است. با توجه به تولید بیوسورفکتانت توسط کلیه میکروارگانیسم‌های جدا شده در این مطالعه نیازی به اضافه نمودن سورفکتانت سنتزی وجود نداشت. مطالعات میکروسکوپی مختلف بر روی A-۱۴ نشان‌دهنده یک باکتری میله‌ای و گرم منفی بود. در شکل ۱ تصویر باکتری A-۱۴ نمایش داده شده است. میکروارگانیسم A-۱۴ جهت شناسایی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی دانشگاه اصفهان مورد بررسی قرار گرفت و به عنوان سودوموناس آئروژنوزا شناسایی گردید. در جدول ۲ آزمایش‌های انجام شده برای شناسایی میکروارانیسم A-۱۴ و نتایج آن را نمایش داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. تصویر باکتری میله‌ای و گرم منفی A-۱۴

بهینه‌سازی تجزیه نفت خام. در این بخش از مطالعه بهینه‌سازی تجزیه نفت خام توسط میکروارگانیسم A-۱۴ انجام شد. بدین منظور یکی از روش‌های طراحی آزمایش‌ها به نام روش تاگوچی مورد استفاده قرار گرفت. جدول ۴ آزمایش‌های طراحی شده و نتایج آن را نمایش می‌دهد. این آزمایش‌ها برای اطمینان بیش‌تر دوبار تکرار شدند. همان‌طور که مشاهده می‌نمایید آزمایش شماره ۱۴ این جدول بیش‌ترین پاسخ را نشان می‌دهد که بطور متوسط در دوبار تکرار ۹۳ درصد حذف ترکیبات نفتی را در پی داشته است. با مقایسه این نتیجه با نتیجه ارائه شده در جدول ۳ می‌توان به افزایش نسبی بازده در اثر بهینه‌سازی پی برد. از نتایج جدول ۴ برای تحلیل آماری و تعیین شرایط بهینه رشد استفاده شد.

تاثیر عوامل بر سیستم. میزان و نحوه تاثیر عوامل مختلف بر پاسخ تبدیل یافته سیستم (به صورت نسبت S/N) برای هر یک از عوامل در اینجا تحلیل شده است. لازم به تاکید است کلیه نتایج به‌دست آمده در محدوده سطوح در نظر گرفته شده صادق است.

جدول ۴: جدول آزمایشهای طراحی شده (به روش تاگوچی) و نتایج حاصل از اندازه گیری حذف نفت خام

شماره آزمایش	عوامل					درصد حذف نفت خام		S/N (دسیبل)	انحراف معیار
	غلظت نیتروژن	زمان ماند	درصد نفت اولیه	pH	دما	درصد حذف در آزمون اول	درصد حذف در آزمون دوم		
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲۹	۳۲	۲۹/۶۵۴	۲/۱۲
۲	۲	۲	۲	۱	۲	۷۹	۸۳	۳۸/۱۶۱	۲/۸۳
۳	۳	۳	۳	۱	۳	۴۶	۴۴	۳۳/۰۵۷	۱/۴۱
۴	۲	۱	۲	۲	۱	۵۹	۶۰	۳۵/۴۸۹	۰/۷۱
۵	۳	۲	۳	۲	۲	۷۹	۷۸	۳۷/۸۹۶	۰/۷۱
۶	۱	۳	۱	۲	۳	۷۷	۷۸	۳۷/۷۸۵	۰/۷۱
۷	۳	۲	۱	۳	۱	۴۹	۵۰	۳۳/۸۹	۰/۷۱
۸	۱	۳	۲	۳	۲	۶۴	۶۵	۳۶/۱۹	۰/۷۱
۹	۲	۱	۳	۳	۳	۵۷	۵۵	۳۴/۹۵۹	۱/۴۱
۱۰	۲	۳	۳	۱	۱	۶۴	۶۴	۳۶/۱۲۳	۰
۱۱	۳	۱	۱	۱	۲	۶۲	۶۳	۳۵/۹۱۶	۰/۷۱
۱۲	۱	۲	۲	۱	۳	۵۴	۵۵	۳۴/۷۲۶	۰/۷۱
۱۳	۱	۲	۳	۲	۱	۴۹	۴۷	۳۳/۶۱۹	۱/۴۱
۱۴	۲	۳	۱	۲	۲	۹۲	۹۴	۳۹/۳۸۶	۱/۴۱
۱۵	۳	۱	۲	۲	۳	۴۷	۴۸	۳۳/۵۳۲	۰/۷۱
۱۶	۳	۳	۲	۳	۱	۳۶	۳۷	۳۱/۲۴۳	۰/۷۱
۱۷	۱	۱	۳	۳	۲	۴۴	۴۲	۳۲/۶۶۲	۱/۴۱
۱۸	۲	۲	۱	۳	۳	۶۳	۶۴	۳۶/۰۵۴	۱/۱۲

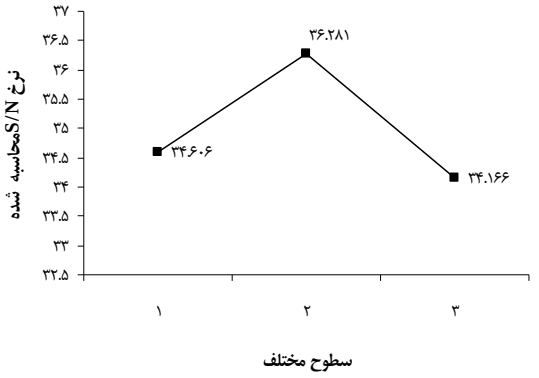
www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر دمای محیط: درجه حرارت یکی از مهم‌ترین پارامترهای موثر بر حیات میکروب‌هاست. رشد میکروبی در حرارت‌های مختلف از زیر درجه یخ زدن تا بیش از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد وجود دارد.

در این مطالعه با توجه به محل جداسازی میکروارگانیسم‌ها و هم‌چنین مطالعات قبلی در این زمینه سه دمای ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان سطوح مختلف دمایی انتخاب شد. این دماها در محدوده دمایی میکروارگانیسم‌های مزوفیل می‌باشند. نتایج تحلیل تاگوچی نشان داد که دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محدوده دمای بهینه قرار دارد. لی و همکارانش در مطالعه خود برای تعیین دمای بهینه در حذف نفت خام موجود در آب‌های خارج شده به همراه نفت از چاه دماهای ما بین ۲۵ الی ۵۵ درجه سانتی‌گراد را به کار گرفتند و بهترین نتیجه را در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد کسب کردند [۱۱]. دیبل و همکارش بارتا نیز مطالعه‌ای برروی تاثیر غلظت مواد مغذی بر روی تجزیه نفت خام انجام دادند. آن‌ها در مطالعه خود از دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد استفاده نمودند و نتایج موفقیت‌آمیزی نیز داشتند [۱۳]. برخی دیگر از محققین نیز در محدوده دمایی ۲۱ الی ۲۳ درجه سانتی‌گراد به نتایج موفقیت‌آمیزی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دست یافته‌اند [۱۲]. دمای بهینه در مطالعات گوناگون با توجه به نوع میکروارگانیسم مورد استفاده، شرایط محیطی و نوع نفت خام مصرفی متفاوت بوده است. در شکل ۲ نرخ S/N برای سطوح مختلف دما نمایش داده شده است. همان‌طور که مشخص است افزایش دما از ۲۰ درجه به ۳۰ درجه موجب افزایش نرخ S/N شده است ولی با افزایش دما تا ۴۰ درجه مقدار نرخ S/N کاهش نشان می‌دهد که این امر می‌تواند به دلیل افزایش حلالیت برخی ترکیبات سمی مانند ترکیبات آروماتیک در آب با افزایش دما باشد [۲۰].

تاثیر pH محیط. بطور کلی تصفیه بیولوژیکی فاضلاب در pH خنثی انجام می‌پذیرد. pH بهینه برای رشد میکروارگانیسم‌ها حدود ۷ است، هر چند که بعضی باکتری‌ها ممکن است اجباراً اسید دوست بوده و در pH زیر ۲ نیز به خوبی رشد کنند. pH فعالیت آنزیم‌های میکروبی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، بر یونیزاسیون مواد شیمیایی اثر کرده و لذا در انتقال مواد غذایی و مواد شیمیایی سمی به درون سلول نقش دارد. با توجه به مطالب ذکر شده و هم‌چنین بررسی مطالعات قبلی pHهای ۶، ۷ و ۸ به عنوان سطوح مختلف مورد بررسی pH، در نظر گرفته شد. پس از انجام محاسبات آماری لازم pH بهینه برابر با ۷ تعیین گردید. لی در بررسی‌های خود برای تجزیه بیولوژیک نفت خام از pH برابر با ۷/۲ استفاده نمود [۱۱]. بیش‌تر محققین دیگر نیز تحقیقات خود را در این زمینه در محدوده pH برابر با ۷ الی ۷/۵ انجام داده‌اند [۲۱،۱۳،۱۲].



شکل ۲:نمودار نرخ S/N برای سطوح مختلف دما. سطوح دما: (۱): ۲۰ درجه سانتیگراد (۲): ۳۰ درجه سانتیگراد (۳): ۴۰ درجه سانتیگراد

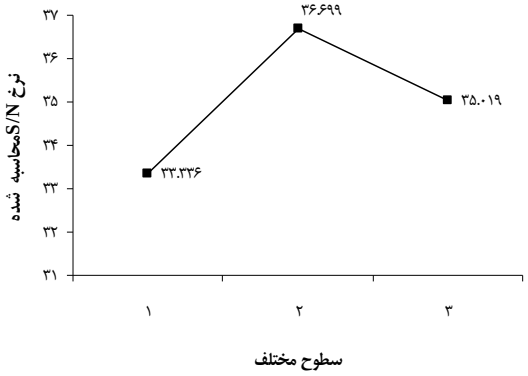
همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است افزایش pH از ۶ به ۷ منجر به افزایش نرخ S/N شده است ولی با افزایش بیش‌تر آن از ۷ به ۸ این نرخ مجدداً کاهش پیدا کرده است. بنابراین این میکروارگانیسم در حالت خنثی بهترین شرایط رشدش فراهم می‌گردد.

تاثیر غلظت نفت اولیه. ارتباط بین میزان رشد ویژه و غلظت سوبسترا برای اولین بار توسط مونود شناخته و فرمول‌بندی شد [۱۵]. در کاربرد نفت خام به عنوان منبع کربن میکروارگانیسم‌ها به ۳ شکل نفت را مصرف می‌کنند. ۱- توده‌های بزرگ نفت خام ۲- قطرات بسیار کوچکی که در اثر

www.SID.ir

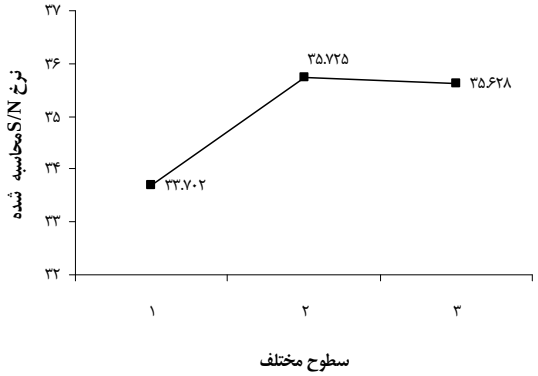
Archive of SID

تولید بیوسورفکتانت‌ها ایجاد می‌گردد و نفت خام که به صورت محلول در آب وجود دارد [۱۶].



شکل ۳: نمودار نرخ S/N برای سطوح مختلف pH
سطوح pH: (۱): ۶ (۲): ۷ (۳): ۸

با توجه به ایجاد توده بزرگی از نفت در هنگام ورود آن به محیط‌های آبی افزایش غلظت نفت قانوناً می‌بایست منجر به کاهش دسترسی باکتری‌ها به نفت گردد و در نتیجه نرخ تجزیه بیولوژیکی بر واحد جرم نفت موجود در آب کاهش یابد. اما در این پژوهش با توجه به نمودار ارائه شده در شکل ۴ از سطح ۱ (۰/۵ درصد نفت) به سطح ۲ (۳ درصد نفت) افزایش نرخ تجزیه بر واحد جرم نفت مشاهده گردیده است. این مسئله را می‌توان بر اساس میزان بیوسورفکتانت تولیدی توجیه نمود. در غلظت‌های بالاتر تولید بیوسورفکتانت نیز افزایش یافته و منجر به کاهش قطر قطرات تشکیل شده و در نتیجه افزایش دسترسی باکتری‌ها به نفت می‌گردد. بنابراین نرخ تجزیه افزایش می‌یابد. با این وجود مشاهده می‌گردد با تغییر از سطح ۲ (۳ درصد نفت) به سطح ۳ (۶ درصد نفت) کاهش نه چندان چشم‌گیری در میزان تجزیه مشاهده نمی‌گردد. این امر می‌تواند به دلیل ورود ترکیبات آروماتیک و سمی موجود در نفت خام باشد. ترکیبات آروماتیک به دلیل حلالیت بالا در آب نسبت به سایر ترکیبات دیگر موجود در نفت خام می‌توانند به شدت سمیت ایجاد کرده و مانع رشد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نفت خام گردند [۳]. با افزایش میزان نفت، میزان این مواد محلول در آب نیز افزایش می‌یابد. از آن‌جا که این مواد عموماً باعث کاهش فعالیت باکتری‌ها می‌گردند افزایش بیش‌تر غلظت نفت باعث کاهش نرخ تجزیه می‌شود. در بیش‌تر مطالعات گذشته از میکروارگانیسم‌ها برای تصفیه فاضلاب‌هایی که تا سرحد اشباع حاوی ترکیبات نفتی بودند استفاده شده بود [۲۰]. اما در این مطالعه محققین موفق به تجزیه بیولوژیکی نفت خام شناور بر روی سطح آب (غیر محلول) با غلظت بسیار بالا شدند که این موضوع یکی از برتری‌های این مطالعه نسبت به سایر تحقیقات مشابه بود.



شکل ۴:نمودار نرخ S/N برای سطوح مختلف غلظت نفت خام موجود در محیط. سطوح مختلف غلظت نفت خام: (۱): ۰/۵ درصد (۲): ۳ درصد (۳): ۶ درصد

تاثیر زمان‌ماند: منظور از زمان‌ماند می‌تواند مدت زمان‌ماند هیدرولیکی و یا میکروبی باشد. با توجه به این‌که در این مطالعه از سیستم بسته در مقیاس آزمایشگاهی استفاده گردید زمان‌ماند میکروبی و هیدرولیکی با یک‌دیگر برابر شدند. در این مطالعه با توجه به نتایج مطالعات قبلی زمان‌های ماند ۵، ۱۰ و ۱۵ روز به عنوان سطوح مختلف زمان‌ماند انتخاب گردید. در این مطالعه پس از انجام محاسبات آماری بهترین زمان‌ماند برابر با ۵ روز تعیین گردید. تلز و همکارانش نیز در مطالعه خود زمان‌های ماند ۰/۵ الی ۴۰ روز را برای تجزیه ترکیبات نفتی در یک راکتور لجن فعال انتخاب کردند. آن‌ها زمان ۲۰ روز را به عنوان زمان ماند بهینه گزارش کردند [۱۲]. ویرا و همکارانش نیز موفق شدند فاضلاب‌های حاوی

www.SID.ir

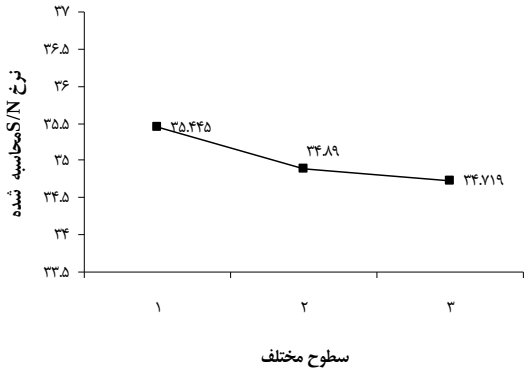
Archive of SID

گازوئیل را در مدت زمان ۴۰ روز تا حد قابل قبولی (۹۰ درصد) مورد تصفیه بیولوژیکی قرار دهند [۲]. لی و همکارانش نیز در مدت زمان ۷ روز ۸۰ درصد نفت خامی که تا حد اشباع در پس آب چاه‌های نفت وجود داشت را تجزیه نمودند.

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که ۱۴-A پس از بهینه‌سازی در مدت زمانی کم‌تر از میکروارگانیسم‌های بکارگرفته شده توسط سایر محققین موفق به کاهش بخش بیش‌تری از ترکیبات نفتی شناور بر روی سطح آب شد.

همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است که با افزایش زمان‌ماند از ۵ روز به ۱۵ روز میزان نرخ S/N کاهش می‌یابد. این امر نشان‌دهنده تجزیه بخش زیادی از ترکیبات نفتی در ۵ روز اول می‌باشد که تجزیه‌پذیری بیولوژیکی بیش‌تری دارند. با افزایش زمان‌ماند میزان تجزیه مداوماً کندتر و کندتر شده و این امر منجر به کاهش محسوس نرخ S/N با گذشت زمان شده است. کاهش سرعت حذف نفت خام به مرور زمان می‌تواند در اثر تجزیه بخش قابل تجزیه بیولوژیکی و باقی ماندن ترکیبات بسیار سنگین نفت خام هم‌چون اسفالتن‌ها باشد. این ترکیبات در برابر تجزیه بیولوژیکی بسیار مقاوم‌تر از سایر ترکیبات نفتی بوده و افزایش مقدار نسبی آن در اثر مصرف سایر بخش‌های نفت خام توسط میکروارگانیسم‌ها می‌تواند منجر به کندی شدید حذف نفت خام باقی مانده توسط میکروارگانیسم‌ها گردد.

تاثیر غلظت نیتروژن. نیتروژن برای حیات ضروری بوده و یکی از عناصر موجود در پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلوئیک در سلول‌های میکروبی، حیوانی و گیاهی است. جالب است که گاز نیتروژن فراوان‌ترین گاز موجود در جو است ولی باز هم این ماده مغذی در محیط‌های مختلف می‌تواند محدودیت رشد ایجاد کند. در این مطالعه از $NaNO_3$ به عنوان منبع نیتروژن استفاده گردید و سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در لیتر آن به عنوان سطوح مختلف غلظت نیتروژن مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام محاسبات بهترین سطح غلظت نیتروژن یک گرم در لیتر به‌دست آمد. محققین مختلفی به بررسی منابع مختلف نیتروژن و غلظت‌های بهینه آن پرداخته‌اند. بطور مثال دیبل و همکارش بارتا در مطالعه خود از نسبت کربن به نیتروژن ۶۰/۱ استفاده کردند [۱۳]. لی در تحقیقات خود بهترین حذف اکسیژن‌خواهی شیمیایی (COD) ناشی از ترکیبات نفتی را به کمک اضافه نمودن یک درصد (W/V) از $(NH_4)_2SO_4$ به عنوان منبع نیتروژن به‌دست آورد [۱۱].



شکل ۵:نمودار نرخ S/N برای سطوح مختلف زمان ماند. سطوح مختلف زمان ماند: (۱): ۵ روز (۲): ۱۰ روز (۳): ۱۵ روز

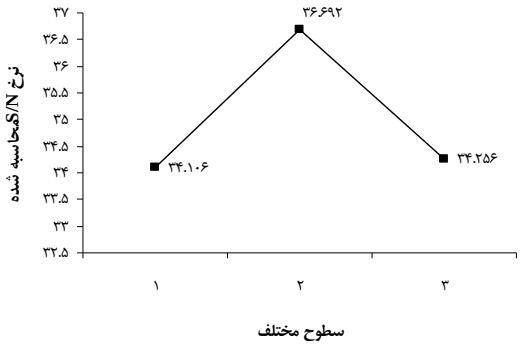
شکل ۶ نشان‌گر تغییرات نرخ S/N در برابر تغییرات غلظت نیتروژن می‌باشد. همان‌طور که مشخص است با افزایش غلظت نیتروژن از ۰/۵ گرم در لیتر به ۱ گرم در لیتر نرخ S/N افزایش می‌یابد ولی با افزایش مجدد غلظت نیتروژن به ۲ گرم در لیتر این نرخ مجدداً کاهش می‌یابد. کاهش نرخ S/N در اثر افزایش غلظت نیتروژن به ۲ گرم در لیتر می‌تواند در اثر ایجاد سمیت ناشی از منبع نیتروژن به کار گرفته شده ($NaNO_3$) باشد [۲۰].

تحلیل واریانس نتایج. جدول ۵ تحلیل واریانس (ANOVA) نتایج را نشان می‌دهد. از آن‌جا که هر پنج عامل در این تحقیق، سه سطحی در نظر گرفته شده‌اند، میزان درجه آزادی برای مقایسه مقادیر پاسخ در سه سطح از هر عامل برابر با دو می‌باشد. در بین پارامترهای آماری مختلف در این جدول، ستون آخر در سمت راست که معرف درصد تاثیر هر عامل بر پاسخ می‌باشد، مفهوم ملموس‌تری دارد. این پارامتر از

www.SID.ir

Archive of SID

روی سایر پارامترهای آماری در این جدول محاسبه شده است [۱۹]. درصد تاثیر عوامل مختلف بر تجزیه بیولوژیک نفت خام در محدوده سطوح در نظر گرفته شده نشان می‌دهد که همه عوامل به‌جز زمان ماند کم و بیش دارای اهمیت نسبی برای تاثیر بر پاسخ می‌باشند. همان‌طور که مشخص است موثرترین عوامل، به ترتیب pH محیط، غلظت منبع نیتروژن، غلظت نفت خام و دما می‌باشد.



شکل ۶:نمودار نرخ S/N برای سطوح مختلف غلظت نیتروژن. سطوح مختلف غلظت نیتروژن: (۱): ۰/۵ میلی گرم بر لیتر (۲): ۱ میلی گرم بر لیتر (۳): ۲ میلی گرم بر لیتر

به دلیل انتخاب گسترده زمان‌ماند در محدوده ۵ الی ۱۵ روز و هم‌چنین تجزیه بیولوژیک بخش اعظمی از نفت در همان روزهای اولیه (۵ روز اول) افزایش زمان ماند پس از ۵ روز منجر به تجزیه ناچیزی از نفت خام خواهد شد. بنابراین پارامتر زمان ماند در محاسبات بی‌تاثیر اعلام شده است. لیکن این محدوده می‌تواند در مطالعات آینده جهت تعیین دقیق‌تر تاثیر زمان ماند بسیار محدودتر (کم‌تر از ۵ روز) در نظر گرفته شود و دستاویزی جهت مطالعه سایر محققین باشد. بخشی از خطای نمایش داده شده در این جدول به خطاهای آزمایشگاهی مربوط بوده که با تکرار آزمایش‌ها، محققین سعی نموده‌اند این بخش از خطا را به حداقل ممکن برسانند و بخشی دیگر از آن مربوط به انتخاب نادرست سطوح عوامل در نظر گرفته شده مانند دما، زمان‌ماند و... می‌باشد. هم‌چنین ممکن است بخشی از خطا مربوط به عوامل دیگری که در این مطالعه موثر بوده (عامل محدودکننده بوده) ولی در نظر گرفته نشده‌اند مربوط باشد، مانند غلظت ترکیبات فسفر، سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، آهن و غیره.

شرایط بهینه نسبی با توجه به نمودارهای تاثیر عوامل و نتایج جدول ANOVA می‌توان شرایط بهینه نسبی برای رسیدن به حداکثر رشد میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه بیش‌ترین درصد حذف نفت خام را نسبت به دو سطح دیگر هر عامل به‌دست آورد. جدول ۶ شرایط بهینه نسبی تعیین شده در روش تاگوچی را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود تمام عوامل بایستی در بالاترین سطح خود قرار گیرند تا بهترین پاسخ به‌دست آید. به بیان دیگر شرایط بهینه عوامل در محدوده سطوح انتخاب شده عبارتست از: دما برابر با ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۷، درصد نفت موجود ۳ درصد، زمان ماند ۵ روز و در نهایت غلظت منبع نیتروژن ۱ گرم بر لیتر.

جدول ۵. جدول ANOVA تاثیر عوامل مداخله کننده در تجزیه نفت خام شناور

فاکتورها	DOF	مجموع مربعات (S)	واریانس (V)	F-Ratio (F)	Pure sum (S`)	درصد تاثیر هر فاکتور P(%)
pH	۲	۳۳/۹۲	۱۶/۹۶	۷/۴۷۶	۲۹/۳۸۳	۲۷/۳۶۳
دما	۲	۱۴/۹۴۵	۷/۴۷۲	۳/۲۹۴	۱۰/۴۰۸	۹/۶۹۲
زمان ماند	۲	۱/۷۲۴	۰/۸۶۲	۰/۳۸	۰	۰
غلظت نفت خام	۲	۱۵/۶۱۷	۷/۸۰۸	۳/۴۴۲	۱۱/۰۸	۱۰/۳۱۸
غلظت نیتروژن	۲	۲۵/۲۹۷	۱۲/۶۴۸	۵/۵۷۵	۲۰/۷۶	۱۹/۳۳۲
Other/error	۷	۱۵/۸۷۸	۲/۲۶۸	----	----	۳۳/۲۹۵
کل	۱۷	۱۰۷/۳۸۴	----	----	----	٪۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

در این جدول هم‌چنین میزان سهم مقدار بهینه هر یک از عوامل در بهبود پاسخ تبدیل یافته (S/N) در ستون آخر نشان داده شده است. در صورت اعمال شرایط بهینه مقدار پاسخ تبدیل یافته، بیش از ۵/۷ واحد نسبت به مقدار متوسط پاسخ‌های فعلی (حدود ۳۵) بهبود خواهد یافت و در نتیجه پاسخی معادل با ۴۰/۷۶۷ را به‌دست خواهد داد. مقایسه این پاسخ پیش‌بینی شده با مقادیر پاسخ‌های به‌دست آمده در ستون آخر جدول ۳، می‌توان به بهبود پاسخ تحت شرایط بهینه پی برد.

در این مطالعه با کمک یک میکروارگانیسم که A-۱۴ نام‌گذاری شد نفت خام در محیط آبی تجزیه شد و در نهایت شرایط بهینه برای به‌دست آوردن بیش‌ترین تجزیه بیولوژیکی از طریق طراحی آزمایش‌ها به روش تاگوچی محاسبه گردید.

جدول ۶. شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر رشد میکروارگانیسم‌ها

پارامترهای مطالعه شده	میزان بهینه محاسبه شده	نرخ S/N در شرایط بهینه (برحسب دسیبل)
دما	۳۰ درجه سانتیگراد	۱/۲۶۳
pH	۷	۱/۶۸
درصد نفت موجود	۳ درصد	۰/۷۰۶
زمان ماند	۵ روز	۰/۴۶۲
غلظت نیتروژن	۱ گرم بر لیتر	۱/۶۷۴
سهم کل عوامل در بهبود پاسخ	-	۵/۷۴۹
متوسط پاسخ های فعلی در آزمایش های انجام شده	-	۳۵/۰۱۸
پاسخ پیش بینی شده در شرایط بهینه (S/N)	-	۴۰/۷۶۷

نتیجه گیری

در این مطالعه نتایج زیر حاصل شد:

- برخی میکروارگانیسم‌ها در طبیعت به دلیل در تماس بودن مداوم با ترکیبات نفتی بدون طی دوره سازگارسازی قادر به تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند.

- از میان ۱۴ میکروارگانیسم جدا شده در این مطالعه میکروارگانیسمی که A-۱۴ نام گرفت، بیش‌ترین میزان حذف ترکیبات نفتی را ایجاد نمود که این میزان قبل از بهینه‌سازی برابر با ۸۹ درصد بود. انجام آزمایش‌های میکروبیولوژی جهت شناسایی A-۱۴ نشان داد این میکروارگانیسم سودوموناس آئروژنوزا می‌باشد.

- کلیه میکروارگانیسم‌های جدا شده در این مطالعه قادر به ایجاد ترکیبات زیست فعال سطحی (بیوسورفکتانت) بودند و برای شروع فرایند تجزیه بیولوژیکی نیازی به اضافه نمودن سورفکتانت سنتزی به محیط نبود.

- بهینه‌سازی تجزیه نفت خام به کمک A-۱۴ با طراحی آزمایش‌ها به روش تاگوچی انجام شد که نتیجه آن به شرح زیر بود:

دما: ۳۰ درجه سانتیگراد، pH: ۷ درصد نفت موجود در محیط: ۳ درصد، غلظت نیتروژن ۱ گرم بر لیتر و نهایتاً زمان ماند ۵ روز. در شرایط بهینه نرخ S/N حذف ترکیبات نفتی ۵/۷ واحد افزایش یافت که با توجه به متوسط پاسخ‌های فعلی در آزمایشات انجام شده نرخ S/N در شرایط بهینه برابر با ۴۰/۷ خواهد بود.

تشکر و قدردانی

با کمال تشکر از گروه مهندسی شیمی دانشگاه اصفهان و هم‌چنین موسسه آموزش عالی جامی که با کمک‌های مادی و معنوی خود موجبات انجام این مطالعه را فراهم نمودند.

منابع

[1] Hua J, Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy. Ocean Eng 2006; 33: 152-167.

[2] Vieira PA, Vieira RB, de Franc FP. and Cardoso VL. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. J Hazard Mate 2007; 140: 52-59.

[3] Tiburtius ER, Zamora PP, Leal ES. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. Qu´ım Nova 2004; 27: 1-16.

[4] Gogoi BK, Dutta NN, Goswami P, Krishna Mohan TR. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. Adv Environ Res 2003; 7: 767-782.

[5] Townsend GT, Prince RC. and Suflita JM. Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas

www.SID.ir

Archive of SID

condensate by bacteria from an anoxic aquifer. FEMS Microbiol Ecol 2004; 49: 129-135.

[6] Kaluarachchi JJ, Cvetkovic V, Berglund S. Stochastic analysis of oxygen- and nitrate-based biodegradation of hydrocarbons in aquifers. J Cont Hydrol 2000; 41: 335-65.

[7] Bielicka K, Kaczorek E, Olszanowski A, Voelkel A. Examination of biodegradation of hydrocarbons in emulsified systems. Poblish J Environ Stud 2002; 11: 11-16.

[8] Piedad Diaz M, Grigson SJ, Peppiatt CJ. and Burgess JG. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. Mar Biotechnol 2000; 2: 522-532.

[9] Saleh-Lakha S, Miller M, Campbell RG, Schneider K, Elahimanesh P, Hart MM. and Trevors JT. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. J Microbiol Methods 2005; 63: 1-19.

[10] Grishchenkov VG, Townsend RT, McDonald TJ, Autenrieth RL, Bonner JS, Boronin AM. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions Process Biochem 2000; 35: 889-96.

[11] Li, Qingxin, Congbao Kang, changkai Zhang. Waste water Produced from an Oilfield and Continuous Treatment with and Oil-Degrading Bacterium. Process Biochemistry 2005; 40: 873-877.

[12] Tellez, Gilbert T, Nirmalakhandan N, Jorge L. Gardea-Torresdey. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water performance Evaluation of an Active Sludge System for Removing Petroleum Hydrocarbons from Oilfield Produced water. Adv Env Res 2002; 6: 455-470.

[13] Dibble JT. and Bartha R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl environ microbial. 1979; 37: 729-739.

[14] Mulkins-Phillips GJ. and Stewart JE. Effect of Four Dispersants on Biodegradation and Growth of Bacteria on Crude Oil. Appl Microbiol 1974; 28: 547-552.

[15] Metcalf and Eddy, Inc. “Waste Water Engineering: Treatment, Disposal and Reuse. McGraw-Hill, New York, 1991.

[16] Choi HD, Hori K, Tnji Y, Unno H. Microbiol degradation kinetics of solid alkane dissolved in nondegradable oil phase. Biochem Eng J 1999; 3: 71-78.

[17] Zhang GL, Wu YT, Qian XP. and Meng Q. Biodegradation of crude oil by pseudomonas aeruginosa in the presence of rahmnolipids. J Zhejiang Univ Sci B 2005; 6: 725-730.

[18] Roy RK. A Primer on the Taguchi Method, Van Nostrand Reinhold (VNR) publisher, New York, 1990.

[19] Daneshvar N, Khataee AR, Rasoulifard M. and Pourhassan M. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method. Journal of Hazardous Materials 2007; 143: 214-219. (Persian)

[20] Talaie AR. Parametric Study of Petroleum Compounds Biodegradation Using Microorganisms. M.Sc Thesis of: Environmental Engineering, Scince and Research University Branch-Ahvaz. 2008. (Persian)

[21] Talaie AR. Optimization of biodegradation of waste water contaminated floating diesel fuel by Taguchy method. Accepted in Water & Waste water Journal. 2009. (Persian)

www.SID.ir

Archive of SID

Optimization of floating crude oil biodegradation by isolated microorganisms via experimental design method

Amir Reza Talaie (M.sc)[*1], Nematollah Jafaarzahe (Ph.D)[2], Mohammad Reza Talaie (Ph.D)[3], Masoud Beheshti (Ph.D)[3]

1- Dept. of Civil & Environmental Engineering, Jami Institute of Technology, delijan, Iran
2- Dept. of Environmental Health, Jondishopor University Medical Sciences, Ahwaz, Iran
3- Dept. of Chemical Engineering, Esfehan University, Esfehan, Iran

(Received: 2 May 2009 Accepted: 8 Sep 2009)

Introduction: Releasing crude oil in environment tends to some problems such as toxic effects, preventing oxygen exchange with aquatic environment, killing lived creatures in water and etc. Due to these problems, the biodegradation of floating crude oil by isolated microorganisms from environment contaminated by crude oil was studied .

Material and Methods: in the first step of this study, by liner culture, microorganisms isolated from soil and waste water contaminated by oil. After isolation of microorganisms, the optimization of biodegradation process was performed by using Tagochi method. The tests were performed twice. Five factors in three various levels used in this optimization. These experiments perform duplicate and finally process by tagochi method for determination of optimum condition .

Results and discussion: In this study 14 strains of microorganisms were isolated and purified form environment. All microorganisms were identified as bacteria. Among of those, the microorganism called A-14 had the best removal percentage of floating crude oil (about 89%). The emulsification test (E24) indicated that all isolated microorganisms in this study could produce biosurfactant. The optimum condition was obtained for pH equal 7, the volume percentage of crude oil in water equal 3, nitrogen concentration equal 1 mg/l and hydraulic retention time (HRT) equal 5 days. In the optimum condition the removal percent of crude oil was 93%. In this study crude oil with higher concentration was degraded in the time less than other similar previous researches.

Key words: floating crude oil, biodegradation, tagochi method, experimental design.

* Corresponding author: Fax: +98 86 64225678; Tel: +98 9173161034
atalaie@jami.ac.ir

www.SID.ir