بهینه‌سازی حذف بیولوژیکی فاضلابهای حاوی گازوئیل شناور بر روی سطح آب به روش تاگوچی

امیررضا طلایی[۱] محمدرضا طلایی[۲] نعمت‌اله جعفرزاده حقیقی‌فر[۳]

(دریافت ۸۶/۱۲/٤ پذیرش ۸۸/۲/۱۳)

چکیده

در این مطالعه دو باکتری که توانایی تجزیه گازوئیل شناور بر روی سطح آب را داشتند، از گازوئیل عرضه شده در یک پمپ بنزین در شهر اصفهان جداسازی گردید. در بخشی از این مطالعه، باکتری‌های جدا شده که A_1 و A_2 نامیده شدند، برای بررسی توانای‌شان در تجزیه گازوئیل، در دو حالت کشت مخلوط و خالص به‌کار گرفته شدند. بررسی‌ها نشان داد که در هر دو حالت، باکتری‌ها قادر به حذف گازوئیل بوده و توانایی آنها در حذف گازوئیل در هر دو حالت کشت خالص و مخلوط تقریباً یکسان است. باکتری A_1 برای بررسی‌های بیشتر مورد آزمایش‌های مختلفی به‌منظور شناسایی قرار گرفت و مشخص شد این باکتری *سودوموناس آئروژنوزا* می‌باشد. شاخص امولسیون‌سازی باکتری‌ها هم در این مطالعه به‌کمک آزمون E_{24} بررسی گردید و مشخص نمود باکتری‌های خالص‌سازی شده تا حدی توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارا می‌باشند. شاخص امولسیون‌سازی A_1 و A_2 به‌ترتیب ۲۳ درصد و ۲۱ درصد بود. در نهایت برای افزایش کارایی باکتری‌ها به کمک روش تاگوچی شرایط بهینه رشد مشخص گردید. در فرایند بهینه‌سازی رشد، چهار پارامتر pH، غلظت منبع نیتروژن، غلظت گازوئیل و شوری موجود در محیط در نظر گرفته شد و بهترین میزان هر یک از آنها به ترتیب ۸، ۰/۵۵ گرم در لیتر، ۲ درصد و ۸ درصد تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: گازوئیل شناور، تجزیه بیولوژیک، تاگوچی، طراحی آزمایش‌ها، شرایط بهینه.

Optimizing Biodegradation of Floating Diesel Fuel Contaminated Wastewater Using the Taguchy Method

Amir Reza Talaie[1] *Mohammad Reza Talaie*[2] *Nematolah Jafarzadeh Haghighifar*[3]

(Received Feb. 23, 2008 Accepted May. 3, 2009)

Abstract

In this study, biodegradation of floating diesel fuel was investigated by using two gram negative strains designated as A_1 and A_2 which were isolated from a reservoir tank of a gas station in Isfahan. One of them was identified as pseudomonas aeruginosa. The percent removal of diesel fuel was evaluated for pure and mixture cultivations. The highest removal percent belomged to A_1, which was able to remove 88% of the floating diesel fuel. Also the evaluation of emulsification index (E24) of the cultivation mixture indicates that the microorganisms can produce a significant amount of biosurfactant. The emulsification index values for A_1 and A_2 were 23% and 21%, respectively. pH, nitrogen source concentration, fuel concentration, and salinity at three levels were investigated and the optimum values of these parameters were determined at 8, 0.55 g/lit, 2%, and 8%, respectively.

Keywords: Diesel Fuel, Biodegradation, Taguchy, Experimental Design, Optimization.

۱- کارشناس ارشد گروه مهندسی عمران و محیط زیست، موسسه آموزش عالی جامی دلیجان، و عضو هئیت علمی (نویسنده مسئول) ۴۲۲۵۶۷۸ (۰۸۶۶)
atalaie@jami.ac.ir
۲- استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه اصفهان
۳- دانشیار دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

1. M.Sc. and faculty member of Chemical Engineering Civil and Environmental Engineering Dept., Jami Institute of Technology, Delijan (Corresponding Author) (+98 866) 4225678
atalaie@jami.ac.ir
2. Assis. Prof. of Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, University of Isfahan
3. Assoc. Prof. of Environmental Health, Dept. of Public Health, Ahwaz University of Medical Sciences

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

ترکیبات نفتی در آب به دو صورت محلول و معلق و در غلظتهای مختلف موجود هستند [۱]. این ترکیبات ساختار پیچیده‌ای دارند و معمولاً در نفت خام و یا گاز طبیعی یافت می‌شوند. این مواد اصولاً دارای محدوده وسیعی از نقطه جوش، تعداد اتم کربن، خانواده‌های شیمیایی و ساختارهای مختلف ایزومری هستند. هیدروکربن‌های اصلی که در آبهای در تماس با ترکیبات نفتی مثل برخی پسابهای صنعتی، یافت می‌شوند، شامل الکان‌ها، الکن‌ها، ترکیبات آروماتیک، آروماتیک‌های چند حلقه‌ای و ترکیبات پیچیده هیدروکربنی حاوی اکسیژن، نیتروژن و سولفور می‌باشند [۲]. تقریباً ۹۰ درصد گروههای شناسایی شده در پسابهای آلوده به ترکیبات نفتی را ملکول‌های C_{10} الی C_{30} با زنجیره‌های مستقیم تشکیل می‌دهند [۳]. نرمال الکان‌ها با فرمول عمومی C_nH_{2n+2} که بیشترین غلظت ترکیبات نفتی موجود در پسابها را تشکیل می‌دهند، در محدوده C_{14} تا C_{18} می‌باشند که با افزایش تدریجی تعداد اتم کربن تا C_{30}، غلظت این ترکیبات در پسابها کاهش می‌یابد [۴]. تنها ۲۵درصد نرمال آلکان‌هایی که در پسابها وجود دارند دارای ملکول‌های سنگین بین C_{21} تا C_{34} هستند. دو عامل مهم ورود ترکیبات نفتی به محیط زیست، نشت و پخش شدن تصادفی آنها در هنگام اکتشاف، تولید، پالایش، حمل و نقل و نگهداری ترکیبات نفتی است. ورود فراورده‌های ناشی از نفت خام از طریق کشتی‌هایی که قادر به حمل بیش از هزاران تن فراورده‌های نفتی هستند، یکی از عوامل آلاینده دریاها و اقیانوسها به این‌گونه ترکیبات است که میزان آن نیز روز به روز افزایش می‌یابد [۵]. در این میان ورود برخی از ترکیبات ناشی از فراوری نفت خام مانند گازوئیل به آبها نیز مشکلات فراوانی را برای محیط زیست ایجاد نموده است. گازوئیل در ترمینال‌های توزیع سوخت و یا از طریق پساب پالایشگاهها و یا در هنگام حمل نقل دریایی و زمینی، می‌تواند به آبهای پذیرنده راه یابد. گازوئیل یک ترکیب پیچیده شامل پارافین‌ها، اولفین‌ها، هیدروکربن‌های آلیفاتیک و مقادیر اندکی از آروماتیک‌ها و ملکول‌های حاوی سولفور، نیتروژن و اکسیژن است [۶]. به‌طور معمول ترکیبات آروماتیک سمّی‌تر از ترکیبات آلیفاتیک با همان تعداد اتم کربن می‌باشند و در غلظتهای بالاتری نیز در آب یافت می‌شوند، زیرا حلالیت آروماتیک‌ها پنج برابر بیشتر از آلیفاتیک‌ها است [۷]. محققان به بررسی روشهای گوناگون تجزیه این ترکیبات در محیط‌های مختلف آبی و خاکی پرداخته‌اند و به نتایج مطلوبی نیز دست پیدا نموده‌اند. در این میان، روشهای فیزیکی مانند شناورسازی و روشهای شیمیایی مانند استفاده از سورفکتانت‌ها به‌طور معمول پرهزینه و دارای محدودیتهای فراوانی هستند. اما روشهای بیولوژیکی علاوه بر اینکه کم هزینه‌تر و مؤثرتر می‌باشند، سازگاری بیشتری نیز با محیط زیست دارند.

تحقیقات بسیاری بر روی تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی به انجام رسیده و نشان داده است که این روش کاملاً امکان‌پذیر بوده و می‌تواند یکی از اقتصادی‌ترین و مؤثرترین روشهای حذف ترکیبات نفتی از محیط‌های آبی باشد [۸-۱۴]. به‌طور مثال لی و همکاران[1] در مطالعه‌ای بر روی تجزیه بیولوژیک فاضلابهای آلوده به نفت خام توانستند تعدادی میکروارگانیسم را شناسایی نمایند که قادر به مصرف نفت خام به‌صورت محلول و یا به‌صورت قطرات ریز بودند. این میکروارگانیسم‌ها در pH برابر با ۷/۲ و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و یک درصد وزنی حجمی (W/V) از $(NH_4)_2SO_4$ به‌عنوان منبع نیتروژن بهترین نتیجه را در تجزیه ترکیبات نفتی کسب نمودند [۱۵]. تلز و همکاران[2] به بررسی یک سیستم لجن فعال در حذف نفت خام از فاضلابهای آلوده به نفت پرداخت. وی موفق به تجزیه ۹۲درصد کل ترکیبات نفتی (بر مبنای COD) در مرحله تصفیه بیولوژیکی و ۹۷درصد ترکیبات نفتی پس از ته‌نشینی و فیلتراسیون شد [۱]. دیبل[3] و بارتا[4] نیز در مطالعه خود دریافتند حضور نیتروژن و فسفر منجر به افزایش راندمان ترکیبات نفتی می‌گردد ولی حضور آهن به‌دلیل غلظت بالای آن در آب دریا تأثیری بر راندمان حذف ندارد [۱۶]. ویرا و همکاران[5] نیز در مطالعه‌ای به مقایسه تجزیه بیولوژیک گازوئیل توسط دو دسته از میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک دریاچه‌ای که حاوی مقادیر زیادی از گازوئیل بود، پرداختند. آنها در ادامه کار، بهینه‌سازی شرایط رشد این میکروارگانیسم‌ها را انجام دادند. در مطالعه مذکور در مدت زمان ۴۹ روز ۹۰ درصد گازوئیل موجود در محیط تجزیه شد [۶]. لیانگ و همکاران[6] نیز مطالعه‌ای را بر روی تجزیه بیولوژیک نفت خام توسط باکتری *سودوموناس آئروژنوزا*[7] انجام دادند. آنها به این نتیجه رسیدند که برای شروع تجزیه بیولوژیکی نفت خام، به مقادیر اندکی سورفکتانت و یا منابع کربن سریع تجزیه شونده، نیاز است [۱۷]. کریستوز و همکاران[8] نیز به بررسی تجزیه بیولوژیکی نفت خام به‌کمک باکتری‌های گرمادوست جدا شده از آتشفشان، پرداختند. آنها ۱۵۰ باکتری گرمادوست را از محیط، جدا سازی نمودند. ایشان اعتقاد داشتند که امکان تجزیه ترکیبات نفتی در باکتری‌ها به واسطه وجود یک ژن با نام alkJ امکان پذیر

[1] Li et al.
[2] Tellez et al.
[3] Dibble
[4] Bartha
[5] Vieira et al.
[6] Liang et al.
[7] *Pseudomona Aeruginosa*
[8] Christos et al.

Archive of SID
www.SID.ir

می‌گردد. به‌همین دلیل به‌کمک یک دستگاه PCR[1] که دستگاهی برای تعیین توالی ژنتیکی می‌باشد، کلیه باکتری‌ها برای شناسایی این ژن مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد باکتری‌های جدا شده که دارای این ژن خاص بودند، ۱۰ گونه بود. این ژن در گونه‌های *سودوموناس* که تجزیه کننده ترکیبات نفتی است، یافت می‌گردد. این گونه‌ها، توانایی حذف ترکیبات نفتی را در محدوده ۴۶ تا ۸۸ درصد دارا بودند [۱۸].

هدف از این تحقیق، بررسی کارایی حذف گازوئیل شناور در آب با کمک میکروارگانیسم‌های جداشده از گازوئیل عرضه شده در جایگاههای پخش سوخت بود. در این مطالعه، مقایسه‌ای میان دو گونه میکروارگانیسم جدا شده از منبع مذکور در دو حالت کشت خالص و کشت مخلوط به انجام رسید و در نهایت بهینه‌سازی شرایط حذف گازوئیل به‌روش تاگوچی[2] انجام پذیرفت. مطالعه حاضر دارای دو برجستگی مهم نسبت به تحقیقات قبلی است: یکی تجزیه گازوئیل شناور بر روی سطح آب و دوم استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که سالها در مخزن ذخیره پمپ بنزین در معرض غلظتهای بسیار زیادی از ترکیبات نفتی بوده‌اند.

۲- مواد و روشها

۲-۱- نمونه برداری

برای به‌دست آوردن میکروارگانیسم‌های احتمالی موجود در گازوئیل عرضه شده در پمپ بنزین، یک لیتر از گازوئیل در یک ظرف شیشه‌ای با دهانه بزرگ که قبلاً استریل شده بود، از پمپ بنزین خریداری شد و نهایتاً پس از بستن درب آن به‌سرعت و در کمتر از ۲۵ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-۲- جداسازی میکروارگانیسم

برای جداسازی میکروارگانیسم‌های احتمالی موجود در گازوئیل عرضه شده در جایگاههای توزیع سوخت، یک میلی لیتر از آن را در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت معدنی حاوی ۰/۱ گرم در لیتر $MgSO_4$، ۰/۵ گرم در لیتر KH_2PO_4، ۰/۱ گرم در لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۰۰۱ گرم در لیتر $FeSO_4$، ۱ گرم در لیتر $NaNO_3$، ۰/۵ گرم در لیتر K_2HPO_4 ریخته شد و pH نمونه به کمک محلول هیدروکسید سدیم بر روی ۷/۲ تنظیم گشت [۱۵ و ۱۷]. گازوئیل اضافه شده به ارلن مایر مذکور، به‌عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط معدنی بود. محیط فوق در یک شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با شدت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. پس از این مدت زمان، ۵ میلی‌لیتر از این محیط به یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری دیگر که محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی جدید با همان محتوای قبلی بود، منتقل شد. تنها تفاوت این دو مرحله در استفاده از گازوئیل استریل به‌عنوان تنها منبع کربن بود. جداسازی میکروارگانیسم‌ها از گازوئیل به‌کمک عبور آن از صافی میلی‌پور انجام شد. این ارلن مایر نیز مجدداً به‌مدت ۶ روز در همان شرایط قبل، انکوباسیون گشت.

۲-۳- خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها

خالص‌سازی میکروارگانیسم‌های جدا شده در این مطالعه به‌کمک کشت خطی و به‌روش زیر انجام گرفت [۲]. با کمک لوپ آزمایشگاهی، ۰/۱ میلی‌لیتر از میکروارگانیسم‌های رشد نموده در ارلن مایر حاوی محیط معدنی به یک پلیت استریل که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط معدنی جامد شده با کمک ۱۶ گرم در لیتر آگار-آگار بود، تلقیح شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر از گازوئیل، برای حذف میکروارگانیسم‌های احتمالی موجود در آن، از صافی میلی‌پور استریل عبور داده شد و ۱ میلی‌لیتر آن به‌عنوان منبع اصلی کربن بر روی سطح پلیت حاوی محیط معدنی جامد پخش گردید [۱۵]. پس از گذشت ۲۴ ساعت دو نوع کلنی بر روی محیط معدنی، رشد نمود. این کلنی‌ها با کمک لوپ آزمایشگاهی و در شرایط استریل به محیط‌های معدنی جامد جدید، انتقال داده شد. این عمل تا به‌دست آمدن یک کشت خالص از هر میکروارگانیسم ادامه یافت. در نهایت از هر کلنی، اسلنت تهیه کرده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای نگهداری طولانی مدت این اسلنت‌ها، هر ۴ ماه یک بار میکروارگانیسم‌های موجود بر روی آنها پس از مرحله فعال‌سازی به اسلنت‌های جدید منتقل می‌شد [۲]. برای فعال‌سازی، اسلنت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مورد انکوباسیون قرار گرفتند و پس از آن مقداری از میکروارگانیسم‌های موجود در آنها توسط لوپ آزمایشگاهی و در شرایط استریل به پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار-آگار آغشته به گازوئیل، انتقال یافت. این پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، فعال شده و آماده استفاده گردید [۲]. از میکروارگانیسم‌های رشد نموده بر روی پلیت‌ها برای تهیه اسلنت جدید استفاده شد.

۲-۴- مطالعات میکروسکوپی

در طول مدت مطالعه، بررسی‌های میکروسکوپی با تهیه لام مرطوب انجام پذیرفت و رنگ‌آمیزی گرم، به‌روش استاندارد انجام شد [۲]. مشاهده میکروارگانیسم‌ها، با استفاده از یک میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر و روغن امرسیون انجام شد و همچنین عکس‌برداری از میکروارگانیسم‌ها صورت گرفت.

[1] Polymerase Change Reaction
[2] Taguchi

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۵- سنجش کارایی میکروارگانیسم‌ها

برای سنجش کارایی میکروارگانیسم‌ها، مقداری از آنها از اسلنت‌های تهیه شده به دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری جداگانه که هریک حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث[1] بود، منتقل شد. این ارلن مایرها، به‌مدت ۲۰ ساعت در یک شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شدت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از گذشت این مدت مقداری از محیط مذکور برداشت شد و میکروارگانیسم‌ها با کمک سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در مدت زمان ۱۵ دقیقه از محیط کشت نوترینت براث جدا شدند. در نهایت با کمک ورتکس[2] با دور پایین میکروارگانیسم‌های جدا شده، در سرم فیزیولوژیک (۹ گرم در لیتر NaCl) معلق گردیدند. برای اینکه میکروارگانیسم‌ها با غلظتهای یکسان در آزمایش‌ها به‌کار روند، غلظت آنها به‌کمک روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد [۲]. یک میلی‌لیتر از هر یک از میکروارگانیسم‌های معلق در سرم فیزیولوژیک به دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی ذکر شده در بخش ۲-۲، اضافه شد. برای سنجش کارایی میکروارگانیسم‌ها در حالت کشت مخلوط، ۰/۵ میلی‌لیتر از هر یک از میکروارگانیسم‌ها به یک ارلن مایر دیگر که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی بود، اضافه گردید. به هر ارلن مایر، یک میلی‌لیتر گازوئیل استریل افزوده شد. هر سه ارلن مایر در یک شیکر انکوباتور با شدت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ روز قرار گرفتند. پس از این مدت، میزان گازوئیل باقی‌مانده در محیط، اندازه‌گیری شد [۲ و ۱۹].

۲-۶- آزمون شاخص امولسیون‌سازی (E24)

برای تعیین امکان تولید بیوسورفکتانت در محیط و تعیین کارایی آن از آزمون E24 استفاده شد. در این آزمون پس از کشت میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت معدنی به‌مدت ۷ روز، ۲ میلی‌لیتر از هر یک از محیط‌های کشت معدنی به چهار لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر گازوئیل اضافه شده و به‌مدت ۳ دقیقه تحت ورتکس شدید قرار گرفت. سپس لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در یک محیط ساکن قرار گرفتند. پس از این مدت، نسبت ارتفاع لایه امولسیون ایجاد شده به کل مایع موجود در لوله محاسبه شده و به‌عنوان شاخص امولسیون‌سازی گزارش گردید [۱۹].

۲-۷- تعیین شرایط بهینه

در تعیین شرایط بهینه از طراحی آزمایش‌ها استفاده گردید و از میان روشهای مختلف طراحی آزمایش‌ها، روش تاگوچی در این مطالعه، استفاده گردید. برای تعیین شرایط بهینه رشد میکروارگانیسم‌ها، چهار عامل در سه سطح مختلف در نظر گرفته شد. سطوح و عوامل در نظر گرفته شده در جدول ۱ نمایش داده شده است. به‌منظور طراحی آزمایش‌ها از نرم افزار Qualitek-4 استفاده گشت [۲]. حاصل طراحی آزمایش‌ها یک جدول با ۹ آزمایش بود (L_9) که ریز آزمایش های آن در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- فاکتورها و سطوح در نظر گرفته شده در طراحی آزمایش‌ها

شماره	فاکتور	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
۱	pH	۶	۷	۸
۲	غلظت منبع نیتروژن (g/l)	۰/۲۱	۰/۵۵	۰/۸۵
۳	غلظت گازوئیل (درصد)	۰/۵	۱	۲
۴	درصد شوری محیط	۴	۶	۸

جدول ۲- آزمایش‌های طراحی شده به روش تاگوچی

شماره آزمایش	pH	غلظت منبع نیتروژن بر حسب گرم بر لیتر	غلظت گازوئیل بر حسب درصد (w/v)	درصد شوری
۱	۶	۰/۲۱	۰/۵	۴
۲	۶	۰/۵۵	۱	۶
۳	۶	۰/۸۵	۲	۸
۴	۷	۰/۲۱	۱	۸
۵	۷	۰/۵۵	۲	۴
۶	۷	۰/۸۵	۰/۵	۶
۷	۸	۰/۲۱	۲	۶
۸	۸	۰/۵۵	۰/۵	۸
۹	۸	۰/۸۵	۱	۴

برای انجام آزمایش‌ها از ۹ ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط معدنی و ۲ میلی لیتر از میکروارگانیسم‌های شناور در سرم فیزیولوژیک استفاده گشت. برای افزایش شوری محلول از NaCl استفاده شد. در این مطالعه از ترکیب $NaNO_3$ به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده گردید. به تعداد هر ارلن مایر، یک نمونه شاهد با همان شرایط و بدون میکروارگانیسم، تهیه گردید. در نهایت کلیه ارلن مایرها در یک شیکر با شدت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۷ روز قرار گرفتند. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده، غلظت گازوئیل موجود در کلیه نمونه‌ها پس از استخراج

[1] Nutriant Broth
[2] Vortex

Archive of SID
www.SID.ir

توسط حلال تتراکلرید کربن توسط روشهای مختلف اسپکتوفتومتری مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج آزمایش‌ها به‌روش تاگوچی مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. در روش تاگوچی برای تحلیل آماری و دقیق‌تر نتایج، از یک تابع پاسخ تبدیل یافته که به‌صورت 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 دقیق تری از تأثیر واقعی عوامل بر سیستم خواهد شد [۲۰]. نحوه محاسبه نسبت S/N بسته به این که هدف، چه نوع بهینه‌سازی باشد، متفاوت خواهد بود. از آنجا که در این مطالعه پاسخ درنظر گرفته شده درصد حذف نفت خام است، و بنابراین هدف بیشینه‌سازی پاسخ می‌باشد، نسبت S/N به‌صورت رابطه ۱ محاسبه می‌گردد [۲۰]:

$$\frac{S}{N} = -10 \log \frac{(1/y_1^2 + 1/y_2^2 + \cdots + 1/y_n^2)}{n} \qquad (۱)$$

که در این رابطه :

y_n 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 است.

۲-۸- نحوه استخراج

برای استخراج گازوئیل باقی‌مانده در نمونه‌ها و سنجش میزان آن پس از تجزیه بیولوژیکی، از حلال تتراکلرید کربن استفاده گردید. به‌این منظور ۲۵ میلی‌لیتر تتراکلرید کربن به هر نمونه اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه با کمک مگنت در دور ۷۰۰ دور در دقیقه به‌شدت به‌هم زده شد. پس از این مدت دو فاز تتراکلرید کربن و محیط معدنی حاوی میکروارگانیسم، با کمک قیف جداکننده از یکدیگر جدا شدند و سرانجام برای حذف ذرات معلق موجود در آن که باعث ایجاد خطا در امر جذب سنجی می‌گردید از سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید [۲۱].

۲-۹- روشهای آنالیز

اندازه‌گیری میزان گازوئیل موجود در محیط، توسط سنجش میزان جذب در طول موج ۴۰۰ نانومتر از نمونه استخراج شده، انجام شد [۲۱]. منحنی کالیبراسیون رسم شده برای این منظور $y = 0.1219x$ (R^2=0.998) می‌باشد. کلیه نمونه‌ها برای جلوگیری از ایجاد کمپلکس و خطا ۱۰۰ بار رقیق شدند [۲ و ۱۹].

غلظت گازوئیل به‌کمک یک روش اسپکتروفتومتری دیگر در محدوده طول موج ۱۹۰ تا ۵۰۰ نانومتر نیز سنجش گردید. در این روش پس از استخراج گازوئیل از محیط کشت، سانتریفوژ نمونه و رقیق‌سازی، میزان جذب نمونه در طول موجهای بین ۱۹۰ تا ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سطح زیر منحنی ایجاد شده در قبل و بعد از فرایند بیولوژیکی نشان دهنده میزان حذف ترکیبات موجود در گازوئیل بود [۱۵].

برای سنجش غلظت میکروارگانیسم‌ها از روش جذب سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید [۲]. دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده در این مطالعه JascoV-570 با طول موج قابل تنظیم ۱۹۰ تا ۲۵۰۰ نانومتر بود.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میکروارگانیسم‌های جدا شده

در این مطالعه دو نوع میکروارگانیسم به‌دست آمد که قادر به استفاده از گازوئیل به‌عنوان تنها منبع کربن خود بودند. این میکروارگانیسم‌ها A_1 و A_2 نامگذاری شدند. کلنی‌های مربوط به گونه A_1 بر روی محیط نوترینت آگار، نارنجی رنگ و گونه A_2 سفید رنگ بود. مطالعات میکروسکوپی با کمک تهیه لام مرطوب، نشان از میکروارگانیسم‌هایی با تحرک بسیار بالا در نمونه A_1 و میکروارگانیسم‌هایی با تحرک بسیار کم در نمونه A_2 بود. رنگ‌آمیزی گرم مشخص کرد که هر دو میکروارگانیسم، گرم، منفی و از نوع باسیل هستند. نتایج آزمایش‌های شناسایی میکروارگانیسم نشان داد که A_1 *سودوموناس آئروژنوزا* بود. آزمایش‌های انجام شده و نتایج آن در جدول ۳ خلاصه شده است. *سودوموناس آئروژنوزا* قبلاً توسط برخی محققان به‌عنوان میکروارگانیسمی مناسب برای تولید بیوسورفکتانت معرفی شده بود و برخی دیگر از کشت خالص آن برای بررسی حذف ترکیبات نفتی استفاده نموده‌اند [۱۷].

میکروارگانیسم‌های جدا شده در این مطالعه احتمالاً مربوط به مخزن ذخیره سوخت پمپ بنزین بوده است که طی سالها با مصرف ترکیبات نفتی سازگار شده‌اند. میزان کاهش غلظت گازوئیل پس از تصفیه بیولوژیک با کمک دو گونه باکتری جدا شده و همچنین کشت مخلوط آنها در شکل ۱ نمایش داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشخص است درصد حذف گازوئیل در نمونه مخلوط ۸۵ درصد و در نمونه‌های A_1 و A_2 به‌ترتیب ۸۸ درصد و ۸۴ درصد در مدت زمان ۷ روز، pH برابر با ۷/۲، دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، غلظت گازوئیل ۰/۵ میلی‌لیتر در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر و غلظت میکربی ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر بود.

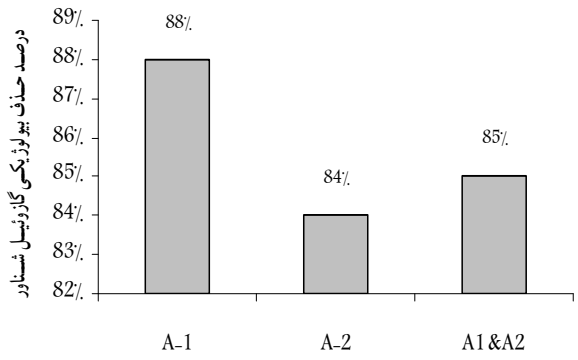
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- آزمایش‌های انجام شده برای شناسایی میکروارگانیسم A_1 [۲]

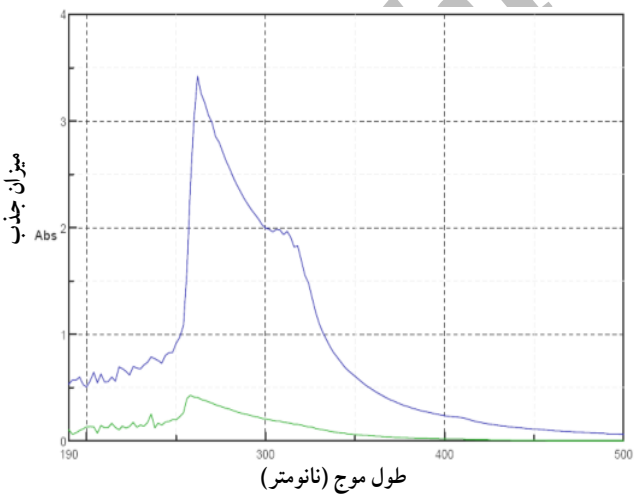
آزمایش های انجام شده	نتیجه آزمایش
شکل میکروارگانیسم	میکروارگانیسم A_1 پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی، یک باکتری میله ای (باسیل) تشخیص داده شد.
آزمون کاتالاز[1]	آزمون کاتالاز با استفاده از آب اکسیژنه انجام شد و میکروارگانیسم کاتالاز مثبت تشخیص داده شد.
آزمون اکسیداز[2]	آزمون اکسیداز به‌کمک دیسک‌های استاندارد انجام شد و میکروارگانیسم اکسیداز مثبت تشخیص داده شد.
آزمون گرم[3]	آزمون گرم بر طبق روش استاندارد انجام پذیرفت که نشان داد باکتری A_1 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 پیگمان‌های تولیدی در آب	پیگمان تولیدی در اثر تماس با آب از محیط کشت جامد نوترینت آگار شسته می‌شد، بنابراین قابل حل در آب بود.
آزمون حل شدن پیگمان‌های تولیدی در اسید استیک	پیگمان تولیدی در اثر تماس با اسید استیک از محیط جامد نوترینت آگار شسته می‌شد، بنابراین قابل حل در اسید استیک بود.
آزمون حل شدن پیگمان‌های تولیدی در کلروفرم	پیگمان تولیدی در اثر تماس با کلروفرم از محیط کشت جامد نوترینت آگار شسته نمی‌شد، بنابر این پیگمان تولیدی غیر قابل حل در کلروفرم بود.
قابلیت رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط آسپاراژین براث[4]	A_1 قادر به رشد در این محیط کشت بود.
قابلیت رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط استامید براث[5]	A_1 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 می‌نمود و کدورتی یکنواخت در تمامی سطح محیط کشت ایجاد می‌نمود.
مورفولوژی کلنی بر روی محیط جامد	پس از رشد A_1 بر روی محیط نوترینت آگار کلنی‌هایی تشکیل شد. وسط کلنی‌ها کمی برآمده تر از اطراف آن بود و حاشیه کلنی کاملاً نامنظم بود.

[1] Cattalos
[2] Oxidize
[3] Gram
[4] Asparagin Broth
[5] Acetamid Broth



شکل ۱- کارایی تجزیه گازوئیل توسط میکروارگانیسم‌های جدا شده در دو حالت کشت خالص و مخلوط

در شکل ۲، نتیجه طیف سنجی نمونه‌های تصفیه شده توسط مخلوطی از میکروارگانیسم‌های A_1 و A_2 نمایش داده شده است. منحنی شماره یک در شکل ۲ نشان دهنده میزان جذب نمونه قبل از تصفیه بیولوژیکی است و منحنی شماره دو، نشان دهنده میزان جذب پس از تصفیه بیولوژیکی است. با توجه به جذب هر طول موج توسط بخشی از ترکیبات آلی موجود در گازوئیل، کاهش شدید سطح زیر منحنی نشان دهنده تجزیه بخش زیادی از ترکیبات آلی موجو در گازوئیل توسط میکروارگانیسم‌های جدا شده در این مطالعه است. لی و همکارانش نیز با کمک این روش اسپکتوفتومتری موفق به تشخیص کاهش شدیدی در میزان آلودگی فاضلابهای آلوده به نفت خام پس از تصفیه به‌کمک میکروارگانیسم‌های خالص‌سازی شده، شدند [۱۵].



شکل ۲- مربوط به طیف سنجی در محدوده ۱۹۰ تا ۵۰۰ نانومتر قبل و بعد از تصفیه بیولوژیکی به‌کمک کشت مخلوطی از A_1 و A_2

Archive of SID
www.SID.ir

همان‌طور که مشخص است کارایی میکروارگانیسم‌ها در حذف گازوئیل شناور بر روی آب در هر دو حالت کشت مخلوط و خالص و همچنین در هر دو نوع میکروارگانیسم در حالت کشت خالص تقریباً مشابه بود. این میکروارگانیسم‌ها به‌راحتی و در مدت زمان کمتری نسبت به سایر تحقیقات مشابه، قادر به تجزیه گازوئیل شناور بر روی آب بودند. به‌طور مثال ویرا و همکاران[1] از یک دریاچه که فاضلابهای حاوی ترکیبات گازوئیل و بنزین به آن تخلیه می‌شد، دو دسته میکروارگانیسم که توانایی حذف ترکیبات نفتی را داشتند، جداسازی کردند. آنها در مدت زمان ۴۹ روز، حدوداً ۹۰ درصد گازوئیل و بنزین موجود در آب را تجزیه نمودند [۶]. لی و همکاران در مطالعه‌ای بر روی تجزیه بیولوژیک فاضلابهای تولیدی در مناطق نفت خیز، توانستند تعدادی میکروارگانیسم را شناسایی نمایند که قادر به مصرف نفت خام به‌صورت محلول و یا به‌صورت قطرات ریز بودند. لی در بررسی خود توانست ۸۰ درصد اکسیژن خواهی شیمیایی این فاضلابها را در مدت زمان ۷ روز کاهش دهد [۱۵]. تلز و همکاران 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 بودند، پرداختند. آنها در این بررسی توانستند ۹۸درصد کل هیدروکربن‌های نفتی را در مدت زمان ماند میکربی ۲۰ روز تجزیه نمایند [۱].

نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده در این مطالعه نسبت به مطالعات گذشته، برتری‌هایی را نشان می‌دهد که از آن جمله می‌توان به مدت زمان کوتاه‌تر برای حذف گازوئیل به‌عنوان بخشی از ترکیبات موجود در نفت خام و میزان حذف بیشتر و یا تقریباً برابر این ترکیب نفتی، اشاره کرد. همچنین در این مطالعه گازوئیل به‌صورت شناور بر روی سطح آب مورد تجزیه بیولوژیکی قرار گرفت که تحقیقات بسیار اندکی بر روی این موضوع به انجام رسیده است.

با توجه به تبدیل لایه گازوئیل شناور بر روی سطح آب در همان روزهای اول به قطرات بسیار ریز احتمال تولید بیوسورفکتانت‌ها، وجود داشت که با انجام آزمون E24 تولید مقادیر اندکی از این ترکیبات تائید شد. شاخص امولسیون سازی هر دو میکروارگانیسم به‌ترتیب ۲۳ و ۲۱ درصد محاسبه گردید. لیانگ[2] در مطالعه خود به این نتیجه رسید که حضور سورفکتانت‌ها و یا ترکیبات سریع تجزیه شونده مانند گلیسیرول برای شروع تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی لازم است ولی همان‌طور که در این مطالعه مشخص است به‌دلیل امکان تولید بیوسورفکتانت‌ها توسط دو میکروارگانیسم یاد شده نیازی به کاربرد سورفکتانت سنتزی و یا ترکیبات سریع تجزیه شونده، نبود [۱].

۳-۲- بهینه‌سازی تجزیه گازوئیل

در ادامه کار، میکروارگانیسم‌های جدا شده در حالت کشت مخلوط برای تعیین شرایط رشد بهینه مورد آزمایش قرار گرفتند. این آزمایش‌ها طبق جدول ۲ (جدول طراحی آزمایش‌ها) به انجام رسید. نتایج حاصل از این آزمایش‌ها در جدول ۴ نمایش داده شده است. کلیه این آزمایش‌ها برای بررسی دقیق‌تر دوبار تکرار گردیدند. نرخهای سیگنال به نویز حاصل از محاسبات آماری هر پاسخ در آزمایش‌های طراحی شده نیز در جدول ۴ نمایش داده شده است. در این جدول نرخ S/N توسط رابطه ۱ محاسبه و گزارش گردیده است. اعداد ۱، ۲ و ۳ موجود در جدول ۴ به‌ترتیب به معنای سطح اول، سطح دوم و سطح سوم غلظت پارامترهای درنظر گرفته شده، می‌باشد. این سطوح در جدول ۱ دقیقاً مشخص شده‌اند. لازم به‌ذکر است که واحد نرخ S/N ، دسیبل است [۲۰].

جدول ۴- جدول حاصل از طراحی آزمایش‌های صورت گرفته و نتایج آزمایش‌ها انجام شده

شماره آزمایش	فاکتور				درصد حذف گازوئیل		S/N (برحسب دسیبل)
	pH	سطوح مختلف غلظت منبع نیتروژن	سطوح مختلف غلظت منبع کربن	سطوح مختلف درصد شوری	آزمون اول (درصد)	آزمون دوم (درصد)	
۱	۱	۱	۱	۲	۲۹	۳۲	۲۹/۶۵۴
۲	۱	۲	۲	۳	۷۹	۸۳	۳۸/۱۶۱
۳	۱	۳	۳	۱	۴۶	۴۴	۳۴/۱۹۸
۴	۲	۱	۲	۱	۵۹	۶۰	۳۵/۴۸۹
۵	۲	۲	۳	۲	۷۹	۷۸	۳۷/۸۹۶
۶	۲	۳	۱	۳	۷۷	۷۸	۳۷/۷۸۵
۷	۳	۱	۳	۳	۴۹	۴۲	۳۳/۰۸۳
۸	۳	۲	۱	۱	۶۴	۶۹	۳۶/۴۳۸
۹	۳	۳	۲	۲	۵۷	۵۰	۳۴/۵۱۱

مقدار میانگین کل هر دو تکرار آزمایش‌ها برابر ۶۰ درصد محاسبه گردید. حداقل این پاسخها در آزمون اول ۲۹درصد و در آزمون دوم ۳۲درصد بود. حداکثر این پاسخها نیز در آزمون اول و دوم به ترتیب ۷۹ و ۸۳ درصد گزارش شد. دامنه در آزمون اول ۵۰ درصد و در آزمون دوم ۵۱ درصد محاسبه گردید. انحراف معیار نیز برای آزمون اول ۰/۱۷ و برای آزمون دوم ۰/۱۸۴ تعیین شد.

[1] Vieira et al.
[2] Liang

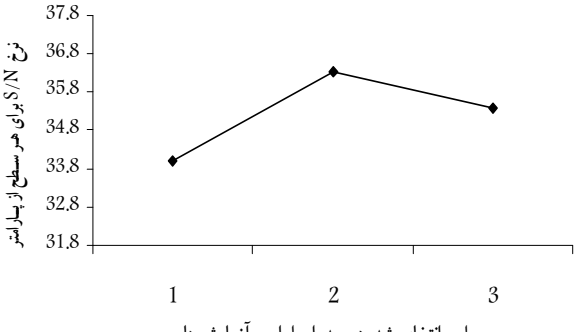
www.SID.ir
of SID

۳-۳- تأثیر عوامل محیطی بر کارایی و عملکرد حذف

میزان و نحوه تأثیر عوامل مختلف بر میزان کارایی و عملکرد حذف (به صورت نسبت S/N) برای هر یک از عوامل بررسی شد و نتایج زیر به‌دست آمد:

۳-۳-۱- تأثیر شوری

ورود و خروج بخشی از ترکیبات مورد نیاز سلول مانند یون‌های کلسیم، منیزیم، سدیم، پتاسیم، توسط پدیده انتشار در غشای سلولی صورت می‌پذیرد. بخشی از ترکیبات مذکور برای رشد سلول‌ها بسیار ضروری است. بنابراین افزایش و یا کاهش غلظت این یون‌ها در آب می‌تواند به نوبه خود منجر به تغییر غلظت شوری گردد که این امر نیز تأثیر مستقیمی بر روی توانایی جذب این ترکیبات توسط سلول دارد. از سوی دیگر افزایش بیش از حد شوری می‌تواند منجر به خروج آب از غشای سلولی به سبب پدیده اسمز گردیده و رشد سلول را مختل سازد. معمولاً فاضلابهای صنایع نفت و گاز که بعضاً حاوی برخی ترکیبات نفتی با غلظتهای بالا می‌باشند، شوری بالایی نیز دارند [۱۶ و ۱۷]. بنابراین لازم است میکروارگانیسم‌های به‌کار گرفته شده در تصفیه این گونه فاضلابها برای تحمل شوری بالا، مورد بررسی قرار گیرند. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، تفاوت چندانی در بین کارایی میکروارگانیسم در شوری ۷ و ۸ درصد یعنی سطح ۲ و ۳، مشاهده نمی‌شود. بنابراین میکروارگانیسم‌های به‌کار رفته در این مطالعه قادر به ادامه فعالیت خود در فاضلابهایی با شوری بالا (۸ درصد) نیز هستند، هر چند که در سطوح بالاتر از ۷ درصد، کارایی میکروارگانیسم طبق شکل ۳ تا حدودی کاسته می‌شود. باکتری‌های خالص‌سازی شده در این مطالعه از مخزن نگهداری گازوئیل یک پمپ بنزین جداسازی شده‌اند و برای مدتها با شرایط بد محیطی

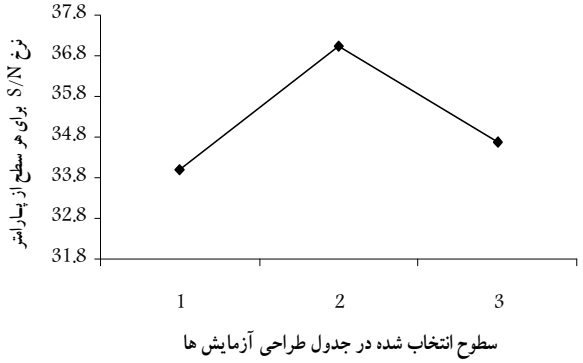


شکل ۳ - نمودار نرخ S/N محاسبه شده برای حذف گازوئیل شناور
سطوح درصد شوری: سطح ۱ برابر با ۴ درصد، سطح ۲ برابر با ۶ درصد و سطح ۳ برابر با ۸ درصد

همچون رطوبت کم و به واسطه آن شوری زیاد در اثر تبخیر این رطوبت کم و همچنین غلظت بالای ترکیبات نفتی سازگار شده‌اند. لذا طبیعی است که در شرایطی که سالیان سال به تحمل آن عادت نموده‌اند بهترین رشد را داشته باشند. بنابراین این میکروارگانیسم‌ها از نوع شوری دوست (هالوفیل) هستند. لی و همکارانش در مطالعه خود توانستند میکروارگانیسم‌هایی را از طبیعت جدا نمایند که تجزیه نفت خام را در شوری برابر با ۶ درصد نیز ادامه دهند [۱۵]. همان‌طور که مشخص است یکی دیگر از برتری‌های A_1 و A_2 امکان ادامه فعالیت مناسب در شوری ۷ درصد می‌باشد که بیش از سایر مطالعات مشابه است.

۳-۳-۲- تأثیر pH محیط

pH محیط یکی از عوامل مؤثر بر روی متابولیسم سلول‌ها و کارکرد آنزیم‌های آنها است. با توجه به شکل ۴، با افزایش pH از ۶ به ۷ (سطح ۱ به سطح ۲) نرخ پاسخ S/N به شدت افزایش می‌یابد. با ادامه افزایش pH از ۷ به ۸ (سطح ۲ به سطح ۳) مجدداً نرخ پاسخ S/N کاهش قابل توجهی می‌یابد. بنابراین بهترین رشد میکروارگانیسم در pH برابر با ۷ رخ می‌دهد. pH مناسب میکروارگانیسم‌ها در بیشتر مطالعات در محدوده خنثی است که با توجه به نزدیک بودن شرایط بهینه به‌دست آمده در این مطالعه به محدوده ۶/۵ تا ۷/۵ (شرایط بهینه عمومی) می‌توان به صحت این ادعا پی برد [۲۲]. pH مناسب در بیشتر مطالعات قبلی نیز برای میکروارگانیسم‌های مختلف در همین محدوده به‌دست آمده است [۱، ۱۵ و ۱۶].



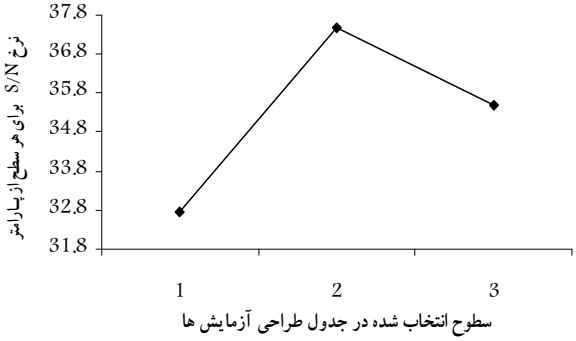
شکل ۴- نمودار نرخ S/N محاسبه شده برای حذف گازوئیل شناور
سطوح pH: سطح ۱ برابر ۶، سطح ۲ برابر با ۷ و سطح ۳ برابر با ۸

۳-۳-۳- تأثیر غلظت منبع نیتروژن

نیتروژن عنصری ضروری برای رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها به‌حساب می‌آید و یکی از اساسی‌ترین عناصر موجود در آنزیم‌ها است. در این مطالعه از سه غلظت مختلف نیتروژن که به‌کمک ترکیب $NaNO_3$ ایجاد می‌گردید، استفاده شد. همان‌طور که در

www.SID.ir

شکل۵ مشخص است در کمترین غلظت نیتروژن یعنی ۰/۲۱ گرم بر لیتر، کمترین میزان پاسخ مشاهده شده است. با افزایش این غلظت به ۰/۵۵ گرم بر لیتر بیشترین پاسخ محاسبه شده به‌دست آمد. مجدداً با افزایش این مقدار تا ۰/۸۵ گرم بر لیتر، میزان پاسخ کاهش یافت. این کاهش میزان پاسخ را می‌توان به سمیّت منبع نیتروژن به‌کار رفته در این مطالعه نسبت داد. بنابر این غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان غلظت بهینه، محاسبه شد. ویرا و همکارانش نیز در مطالعه خود غلظت بهینه نیتروژن را در تجزیه بیولوژیکی مخلوط گازوئیل و بنزین برابر با ۰/۵۵ میلی‌گرم در لیتر محاسبه نمودند [۶]. لی و همکارانش نیز در تحقیقات خود بهترین حذف اکسیژن خواهی شیمیایی ناشی از ترکیبات نفتی را به‌کمک اضافه نمودن یک درصد (W/V) از $(NH_4)_2SO_4$ به‌عنوان منبع نیتروژن به‌دست آوردند [۱۵].

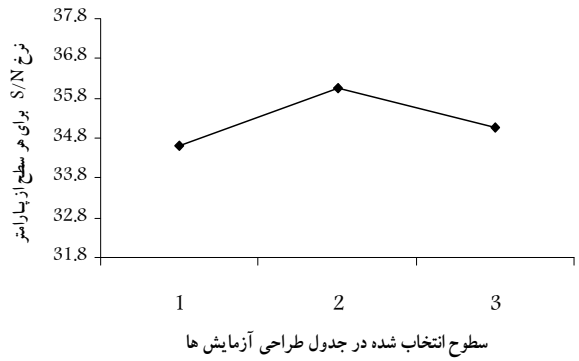


شکل ۵- نمودار نرخ S/N محاسبه شده برای حذف گازوئیل شناور سطوح غلظت نیتروژن: ۱) ۰/۲۱ گرم بر لیتر، ۲) ۰/۵۵ گرم بر لیتر و ۳) ۰/۸۵ گرم بر لیتر

۳-۳-۴- تأثیر غلظت منبع کربن

همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است سطح دوم غلظت کربن مورد استفاده در این مطالعه به‌عنوان بهترین میزان منبع کربن مشخص گردید. آزمون تعیین شاخص امولسیون سازی نیز نشان داد که هر دو گونه میکروارگانیسم جدا شده در این مطالعه قادر به تولید بیوسورفکتانت‌ها می‌باشند. به‌علت ناچیز بودن حلالیت گازوئیل در آب، میکروارگانیسم‌ها با تولید بیوسورفکتانت‌ها، گازوئیل شناور بر روی سطح آب را به قطرات کوچک تقسیم کرده که این امر باعث تولید سطح قابل دسترس بیشتری برای میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. بنابراین افزایش غلظت گازوئیل شناور تا حدی می‌تواند منجر به تشکیل قطرات بیشتر و سطح قابل دسترس بیشتر گردد.

همان‌طور که در بخش مشاهده می‌گردد، میزان ۱درصد



شکل ۶- نمودار نرخ S/N محاسبه شده برای حذف گازوئیل شناور سطوح درصد گازوئیل (منبع کربن): سطح ۱ برابر با ۰/۵ درصد سطح ۲ برابر با ۱ درصد سطح ۳ برابر با ۲ درصد

(حجمی/حجمی) گازوئیل بهترین پاسخ را در حذف این ترکیب ایجاد نمود. با افزایش این مقدار سمیّت برخی ترکیبات موجود در گازوئیل پدیدار شده و باعث کاهش میزان پاسخ شدند. همچنین بیوسورفکتانت تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها، محدود بوده و با افزایش غلظت گازوئیل شناور، افزایش میزان قطرات ریز تولیدی و به‌واسطه آن افزایش سطح پدیدار نمی‌گردد که این نیز یکی از دلایل کاهش میزان پاسخ میکروارگانیسم نسبت به افزایش غلظت گازوئیل است. ویرا در بررسی‌های خود تأثیر غلظت سوخت‌های فسیلی (بنزین و گازوئیل)، غلظت نیتروژن و نوع میکروارگانیسم را بر روی میزان تجزیه بیولوژیک میکروارگانیسم‌ها بررسی نمود. وی در مطالعات خود پارامتر غلظت گازوئیل را در سطحهای ۰/۵ درصد تا ۶ درصد آزمود و نهایتاً غلظت بهینه گازوئیل را ۴ درصد گزارش کرد [۶].

۳-۴- تحلیل واریانس نتایج و تعیین شرایط بهینه نسبی

داده‌ها توسط جدول ANOVA آنالیز آماری گردیدند. هدف از آنالیز ANOVA به‌دست آوردن نسبت واریانس هر فاکتور نسبت به واریانس کل بود [۲۰]. درجه آزادی[1] محاسبه شده برای هر فاکتور در این مطالعه ۲ بود و کل DOF برابر ۸ محاسبه گردید بنابراین DOF برای خطا صفر محاسبه شد. نهایتاً واریانس خطا توسط محاسبه مجموع مربع خطا و تقسیم آن بر درجه آزادی به‌دست آمد. نسبت F[2] از واریانس هر فاکتور نسبت به دوره خطا محاسبه می‌گردد. چون دوره خطا در این مطالعه برابر صفر محاسبه شده است بنابراین محاسبه F ratio غیر ممکن است. در جدول ۵ مقادیر ANOVA نمایش داده شده است. به این ترتیب شرایط بهینه در مطالعه به صورت زیر به‌دست آمد. pH برابر با ۷، بهترین غلظت

[1] Degree of Freedom (DOF)
[2] F Ratio

Archive of SID
www.SID.ir

منبع نیتروژن در بین غلظتهای مختلف در نظر گرفته شده در این مطالعه ۰/۵۵ گرم در لیتر، بهترین میزان گازوئیل شناور بر روی سطح آب برابر با ۱ درصد و در نهایت این میکروارگانیسم‌ها توانایی فعالیت در بهترین حالت خود را در شوری ۶ درصد دارا بودند.

در جدول ۵ تأثیر هر پارامتر انتخابی در محدوده انتخاب شده درج گردیده است. همان‌طور که دیده می‌شود، مؤثرترین پارامتر انتخابی نوع منبع نیتروژن با ۵۶ درصد تأثیر بوده است و بعد از آن pH راکتور با ۲۵درصد تأثیر در رتبه‌های بعدی قرار گرفته و درصد شوری و غلظت گازوئیل موجود در محیط به ترتیب با ۱۳ و ۵ درصد در رتبه‌های بعدی قرار دارند.

جدول ۵- (ANOVA) تأثیر عوامل مداخله کننده در کارایی حذف گازوئیل بر حسب درصد

فاکتورها	DOF	مجموع مربعات	واریانس	درصد تأثیر هر فاکتور
pH	۲	۱۵/۴۳۳	۷/۷۱۶	۲۵/۲۸۳
غلظت منبع نیتروژن	۲	۳۴/۲۲	۱۷/۱۱۱	۵۶/۰۶۶
درصد گازوئیل موجود	۲	۳/۲۱۷	۱/۶۰۸	۵/۲۷
درصد شوری	۲	۸/۱۶۶	۴/۰۸۳	۱۳/۳۷۸
کل	۸	۶۱/۰۳۹	----	۱۰۰

با توجه به نمودارهای تأثیر عوامل و نتایج جدول ANOVA می‌توان شرایط بهینه نسبی برای رسیدن به حداکثر رشد میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه بیشترین درصد حذف گازوئیل 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 باید در بالاترین سطح خود قرار گیرند تا بهترین پاسخ به‌دست آید.

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 ۶/۴۷۲ واحد نسبت به مقدار متوسط پاسخهای فعلی (حدود ۳۵) بهبود خواهد یافت و در نتیجه پاسخی معادل با ۴۱/۵۹۲ را به‌دست خواهد داد. با مقایسه این پاسخ پیش بینی شده با مقادیر پاسخهای به‌دست آمده در ستون آخر جدول ۳ می‌توان به بهبود پاسخ تحت شرایط بهینه پی برد.

جدول ۶- شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر رشد میکروارگانیسم‌ها

عوامل	مقدار بهینه	میزان پاسخ (بر حسب دسیبل)
pH	۷	۱/۹۳۷
غلظت منبع نیتروژن	۰/۵۵ میلی گرم در لیتر	۲/۳۷۹
درصد گازوئیل موجود	۱	۰/۹۳۴
درصد شوری	۶	۱/۲۲۳
سهم کل عوامل در بهبود پاسخ		۶/۴۷۲
متوسط پاسخ های فعلی در آزمایش‌های انجام شده		۳۵/۱۱۹
پاسخ پیش بینی شده در شرایط بهینه (S/N)		۴۱/۵۹۲

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه دو میکروارگانیسم که قادر به تجزیه گازوئیل بودند مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌گیری از مخزن ذخیره پمپ بنزینی در شهر اصفهان انجام شد. در ادامه، بهینه‌سازی شرایط رشد این میکروارگانیسم‌ها در حالت کشت مخلوط بررسی شد. از این مطالعه به‌طور خلاصه نتایج زیر حاصل گردید:

۱- میکروارگانیسم A_1 و A_2 در حالت کشت خالص، به‌ترتیب قادر به تجزیه ۸۸ و ۸۴ درصد گازوئیل شناور بر روی آب بودند. این میکروارگانیسم‌ها در حالت کشت مخلوط که غلظت اولیه تلقیح در آنها یکسان بود، قادر به ۸۵ درصد تجزیه گازوئیل بودند.

۲- میکروارگانیسم A_1 که قادر به حذف ۸۸ درصد گازوئیل شناور بر روی آب بود، برای شناسایی انتخاب گردید و با انجام آزمایش‌های لازم به‌عنوان یک باکتری به نام *سودوموناس آئروژنوزا* شناسایی شد. این میکروارگانیسم قبلاً به‌عنوان میکروارگانیسم مناسب برای تجزیه نفت خام و تولید بیوسورفکتانت توسط سایر محققان نیز معرفی شده بود. اما در این مطالعه از این میکروارگانیسم، برای اولین بار برای حذف گازوئیل استفاده شد [۱۷].

۳- هر دو میکروارگانیسم جدا شده در این مطالعه با کمک آزمون تعیین شاخص امولسیون سازی مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج این بررسی نشان داد هر دو گونه قادر به تولید بیوسورفکتانت هستند. شاخص امولسیون سازی A_1 و A_2 به ترتیب برابر با ۲۳ و ۲۱درصد محاسبه شد.

۴- شرایط بهینه در این مطالعه به‌این صورت تعیین شد: pH برابر با ۷، بهترین غلظت منبع نیتروژن در بین غلظتهای مختلف در نظر گرفته شده در این مطالعه ۰/۵۵ گرم در لیتر، بهترین میزان گازوئیل شناور بر روی سطح آب برابر با ۱ درصد و در نهایت اینکه این میکروارگانیسم‌ها توانایی فعالیت در بهترین حالت خود را در

Archive of SID
www.SID.ir

شوری ۶درصد دارا بودند. فاکتورهای در نظر گرفته شده در محدوده انتخابی در این مطالعه به‌ترتیب اهمیت عبارت بودند از: غلظت منبع نیتروژن، pH، درصد شوری و در نهایت درصد گازوئیل.

۵- تقدیر و تشکر

گروه مطالعات از گروه مهندسی شیمی دانشگاه اصفهان و مؤسسه آموزش عالی جامی که با کمکهای مادی و معنوی خود موجب انجام این مطالعه گردیدند، تشکر می‌نماید.

۶- مراجع

1- Tellez, G. T., Nirmalakhandan, N., and Gardea-Torresdey, J., L. (2002). "Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water." *Advances in Environmental Research*, *6* (4), 455-470.

2- Talaie, A.R. (2008). "Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms." M.Sc. Thesis of Environmental Engineering, Scince and Research University Branch-Ahvaz.

3- Capelle, F.H. (1993). *Ground-water microbiology and geochemistry*, John Wiley and Sons, Inc, N.Y.

4- Neff, J. M., Sauer, T.C., Macialek, N. (1992). "Composition, fate and effects of produ cedwater discharges to nearshore manne waters." *Environ. Sci. Res*., 46, 371-385.

5- Hua, J. (2006). "Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy." *Ocean Engineering,* 33 (2), 152-167.

6-Vieira, P.A., Vieira, R. B., Franc, F.P., and Cardoso, V.L. (2007). "Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline." *Journal of Hazardous Materials*, 140 (1-2), 52-59.

7- Tiburtius, E. R. L., Zamora, P. P., and Leal, E.S. (2004). "Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites." *Qu´ım. Nova*., 27, (3), 441-446.

8- Gogoi, B.K., Dutta, N. N., Goswami, P. and Krishna Mohan, T.R. (2003). "A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site." *Adv. Environ. Res*., 7, 767-782.

9- Townsend, G. T., Prince, R. C., and Suflita, J. M. (2004). "Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer." *FEMS Microbiol. Ecol*, 49 (1), 129-135.

10- Kaluarachchi, J. J., Cvetkovic, V., and Berglund, S. (2000). "Stochastic analysis of oxygen- and nitrate-based biodegradation of hydrocarbons in aquifers." *J. Cont. Hydrol.*, 41, 335-365.

11- Bielicka, K., Kaczorek, E., Olszanowski, A., and Voelkel, A. (2002). "Examination of biodegradation of hydrocarbons in emulsified systems." *Poblish J. Environ*. *Stud.*, 11 (1), 11-16.

12- Diaz, M. P., Grigson, S. J. W., Peppiatt, C.J., and Burgess, J.G. (2000). "Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments." *Mar. Biotech.*, 2 (6), 522-532.

13- Lakha, S. S., Miller, M., Campbell, R.G., Elahimanesh, K. S. P., Hart, M.M., and Trevors, J.T. (2005). "Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges."*J. Microbiol*. *Method*, 63 (1), 1-19.

14- Grishchenkov, V.G. Townsend, R.T. Mcdonald, T.J. Autenrieth, R.L. Bonner, J.S., and Boronin, A.M. (2000). "Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions."*Process Biochem*., 35 (9), 889-896.

15- Li, Q., Congbao, K., and Changkai Z. (2005). "Wastewater Produced from an oilfield and Continuous Treatment with and Oil-Degrading Bacterium." *Process Biochemistry*, 40 (2), 873-877.

16- Dibble, J.T., and Bartha, R. (1979). "Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge." *Applied and Environmental Microbiology*, 37 (4) 729-739.

17- Liang, Z. G., Wu Y. T., Qian X. P., and Meng, Q. (2005). "Biodegradation of crude by *Pseudomonas Aeruginosa* in the presence of rhamnolipids," *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(8), 725-730.

Archive of SID
www.SID.ir

18- Meintanis, C., Kalliopi, I. C., Konstantinos- Kormas, A., and Amalia D. K., (2006). "Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a Volcano Island." *Biodegradation*,17(2), 3-9.

19- Kabiri, K. (2008). "Biodegradation of petroleum pollutant from soil." M.Sc Thesis of Biotechnology, Esfehan University.

20- Daneshvar, N., Khataee, A.R., Rasoulifard, M., and Pourhassan, M. (2007). "Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method." *Journal of Hazardous Materials,* 143 (1-2), 214-219.

21- Urum, k., Pekdemir, T., and Copur M. (2004). "Surfactants treatment of crude oil contaminated soils." *Journal of Colloid and Interface Science*, 276 (2), 456-464.

22- Tchobanoglous, G., and Burton, F. (2003). *Wastewater engineering treatment and reuse*, 4thEd., McGraw Hill, Metcalf and Eddy Inc., New York.

Archive of SID

www.SID.ir