

یادداشت پژوهشی

بهینه‌سازی تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری‌های *Acinetobacter calcoacticus* BS و *Pseudomonas aeruginosa* AS جداسازی شده از خلیج فارس

پژوهش نفت

سال بیستم
شماره ۶۳
صفحه ۷۲-۸۲، ۱۳۸۹

مهدی حسن شاهیان^{۱*}، عذری حسن شاهیان^۱ و گیتی امتیازی^۲
 ۱- دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
 ۲- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
 Hasanshahi@gmail.com

چکیده

آلودگی نفتی در محیط‌های دریایی یک مساله جهانی است. سالانه مقادیر زیادی نفت وارد محیط‌های دریایی می‌شود. خلیج فارس به دلیل موقعیت استراتژیک خود محل عبور بیش از ۶۰٪ نفت خام مورد نیاز جهان است که لقب آلوده‌ترین دریای جهان را به خود اختصاص داده است. برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام از شن‌های ساحلی و آب آلوده به نفت در خلیج فارس نمونه‌برداری انجام شد. سپس باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام با کشت در محیط اختصاصی مورد غربالگری قرار گرفتند. سویه‌هایی که رشد و حذف نفت بالاتری داشتند انتخاب و با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. این سویه‌ها که به جنس‌های *Acinetobacter* و *Pseudomonas* تعلق داشتند، برای ادامه تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. برای طراحی تاگوچی، ۶ عامل (دما، منبع نیتروژن، سورفکتانت، غلظت نفت، منبع کربن اضافی و باکتری تجزیه کننده) در نظر گرفته شد که ۵ عامل آن دارای ۳ سطح و عامل دما دارای ۲ سطح بود که برای آن آزمایش L18 طراحی شد. نتایج به دست آمده از آزمایش‌های تاگوچی نشان داد که دما تاثیری در تجزیه ندارد و تجزیه زیستی می‌تواند در دامنه دمایی ۳۷-۳۰°C صورت پذیرد.

منبع نیتروژنی $(NH_4)_2SO_4$ بهترین منبع نیتروژنی می‌باشد. تجزیه در حضور سورفکتانت نسبت به عدم حضور آن با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد و از دو سورفکتانت به کار رفته، tween 80 موجب اثر بیشتری در تجزیه می‌شود. با افزایش غلظت نفت از ۱ به ۴٪ تجزیه به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. با حضور منبع کربن دیگری همراه با نفت تجزیه سرعت بیشتری می‌یابد. کشت مخلوط هر دو سویه AS و BS و سویه *A. calcoacticus* BS، اثر یکسانی در تجزیه نفت دارند و هر دو سطح به مراتب بالاتر از *P. aeruginosa* AS می‌باشند. مجموع توزیع از کلیه عوامل برابر با ۹۵/۳٪ می‌باشد که ۴/۷٪ باقیمانده را می‌توان به خطای آزمایش‌ها نسبت داد. در نهایت کارایی طراحی تاگوچی انجام شده برابر ۷۷٪ می‌باشد. با به‌کارگیری سویه‌های به دست آمده در این تحقیق و همچنین نتایج حاصل از شرایط بهینه در آزمایش‌های تاگوچی و امکان سنجی کارایی این سویه‌ها در آب شور، می‌توان در سطح میدانی، آلودگی‌های نفتی ایجاد شده در خلیج فارس را به نحو مطلوبی برطرف کرد.

واژه‌های کلیدی: زیست سالم‌سازی، نفت خام، آلودگی نفتی، بهینه‌سازی، باکتری تجزیه کننده

مقدمه

نفت خام یکی از مهمترین منابع طبیعی است که سوخت فسیلی عمده منابع صنعتی و ماده اولیه مورد نیاز صنایع پتروشیمی را تأمین می‌کند. آلودگی مزمن محیط با نفت موجب به هم ریختگی اکولوژیکی شده و مانع از استفاده پایدار آن توسط بشر می‌شود. هیدروکربن‌های نفتی آلاینده‌های اصلی محیط‌های دریایی هستند. خلیج فارس از متنوع‌ترین اکوسیستم‌های جهان است. در آب‌های منطقه خلیج فارس ۵۷/۱٪ آلودگی نفتی مربوط به حمل و نقل کشتی‌ها و ۲۲/۴٪ مربوط به بهره‌برداری از دریا است. گسترش روزافزون حمل و نقل دریایی نفت، خطر آلودگی دریا و نیز حوادث نفتکش‌ها را بیشتر کرده است. خلیج فارس به خاطر موقعیت استراتژیک خود محل عبور بیش از ۶۰٪ نفت خام مورد نیاز جهان می‌باشد [۱]. روش‌های مرسوم جلوگیری از نشت نفت، عمدتاً سوزاندن فیزیکی است. در حذف نشت نفت، روش‌های زیستی دارای مزایایی نسبت به درمان‌های فیزیکی و شیمیایی هستند، به طوری که آن‌ها به تجزیه زیستی عمقی‌تر بخش‌های نفت به وسیله میکروارگانیسم‌ها امکان می‌دهند [۲-۴]. تجزیه زیستی مشتقات نفتی در محیط‌های آلوده موثرتر، قوی‌تر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر از روش‌های فیزیکی و شیمیایی است. میزان تجزیه زیستی وابسته به غلظت آلاینده، طول زنجیره آلکان‌ها، بیوسورفکتانت و نوع میکروارگانیسم می‌باشد. ترکیبات اشباع نفت خام و به‌ویژه آلکان‌های با طول زنجیره متوسط سریع‌تر تجزیه می‌شوند. میزان تجزیه و معدنی شدن ترکیبات آلی وابسته به غلظت ترکیبات است، به طوری که غلظت‌های بالایی از هیدروکربن‌ها به وسیله محدود کردن مواد غذایی و اکسیژن یا از طریق اثرات سمی ایجاد شده توسط هیدروکربن‌های فرار، از تجزیه زیستی ممانعت می‌کنند. عوامل متعددی بر روی میزان تجزیه زیستی نفت خام در محیط‌های دریایی تأثیر می‌گذارند. از جمله این عوامل می‌توان به عوامل طبیعی، اکسیژن، موجودات زنده، نیتروژن، فسفر، دما و pH اشاره کرد [۵]. درک عوامل تأثیرگذار بر میزان تجزیه زیستی برای تعیین راهبردهای اساسی به منظور طراحی سیستم‌های زیست سالم‌سازی^۲ و بهبود جمعیت میکروبی^۳ دارای اهمیت

خاصی است [۶]. دامنه وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها می‌توانند نفت خام را متابولیزه کنند، اما در این بین باکتری‌های تجزیه کننده از اهمیت بیشتری برخوردارند و می‌توانند دامنه وسیع‌تری از ترکیبات نفتی را تجزیه نمایند [۷]. هدف از این تحقیق بررسی برخی عوامل محیطی بر روی میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه‌های بومی دریایی جداسازی شده از خلیج فارس می‌باشد. علاوه بر این، هدف بر این است که شرایط بهینه برای تجزیه زیستی نفت در خلیج فارس به کمک سویه‌های بومی به دست آید.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام، شن‌های ساحلی و نمونه‌های آب دریا از مناطق مختلف خلیج فارس شامل جزیره هرمز، اسکله شهید باهنر، اسکله شهید رجایی، پالایشگاه نفت بندرعباس، جزیره سیری و جزیره خارک جمع‌آوری شدند. نمونه‌های شن از عمق ۱۲-۱۱ cm سطح ساحل با استفاده از چاقوی استریل به دست آمد. نمونه‌های آب دریا از عمق ۱۵ cm در بطری‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های شن و آب جمع‌آوری شده با فرستادن نمونه‌ها به آزمایش مکانیک خاک تعیین شدند. این اطلاعات در جدول ۱ آمده است.

جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام

از محیط سنتزی پایه نمکی بو شنل هاس^۴ (BHMS) برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام استفاده شد. محیط BHMS حاوی ترکیبات زیر است (گرم بر لیتر): ۱ گرم KH_2PO_4 ، ۱ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۲ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۲ گرم $CaCl_2$ ، ۱ گرم NH_4NO_3 و دو قطره از ۶۰٪ $FeCl_3$ و pH محیط نیز برابر ۷ می‌باشد. ۱٪ نفت خام سبک ایران به عنوان تنها منبع کربن و انرژی نیز در این محیط استفاده شد [۸].

1. Mineralization
2. Bioremediation
3. Bioaugmentation
4. Bushnell Hass Mineral Salt

جدول ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های شن‌های ساحلی و آب جمع‌آوری شده از خلیج فارس

مشخصات نمونه شن‌های ساحلی		مشخصات نمونه آب	
نوع بافت	شنی	دما	۳۲ °C
درصد شن	۹۱/۸	شوری (گرم بر لیتر)	۱۵
درصد سیلت	۴/۷	هدایت الکتریکی (ds/m)	۱۰
درصد رس	۳/۵	چگالی (Kg m ⁻³)	۱۰۲۰
درصد رطوبت	۱۱/۸	اکسیژن محلول (ppm O ₂ Lit ⁻¹)	۱۰۰
درصد تخلخل	۳۷/۷	غلظت نیترات (ppm)	۲۷
چگالی توده (کیلوگرم بر مترمکعب)	۱/۶۵	غلظت فسفر (ppm)	۱۸
غلظت پتاسیم (ppm)	۱۰۰	pH	۶/۲
غلظت فسفر (ppm)	۱۷		
درصد نیتروژن	۰/۰۱۱		
درصد کربن آلی	۰/۱۱		
درصد اشیاع پذیری	۲۴/۵		
pH	۷/۴		
هدایت الکتریکی (ds/m)	۶/۵		

اتصال پرایمرها ۵۵ °C به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ بود. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز ۱٪ بارگذاری شد و سپس باند bp ۴۰۰ از ژل آگاروز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد. هومولوژی توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم‌افزار BLAST (آنلاین) مورد بررسی قرار گرفت و قرابت بالاتر از ۹۸٪ به‌عنوان جنس و گونه باکتری مجهول لحاظ شد [۹].

طرح تاگوچی برای بهینه‌سازی تجزیه زیستی نفت خام
تجزیه نفت خام توسط سویه‌های *A. calcoaceticus* BS و *P. aeruginosa* AS با روش آماری تاگوچی مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. برای طراحی تاگوچی، ۶ عامل (دما، منبع نیتروژن، سورفکتانت، غلظت نفت، منبع کربن اضافی و باکتری تجزیه کننده) در نظر گرفته شد که ۵ عامل آن دارای ۳ سطح و عامل دما دارای ۲ سطح بود. جدول ۲، عوامل و سطوح آنها را نشان می‌دهد. عوامل ذکر شده در جدول ۲، در نرم‌افزار Qualitek4 وارد شد

۱۸ نمونه شن و ۱۲ نمونه آب برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده مورد استفاده قرار گرفتند. برای جداسازی، ابتدا یک گرم نمونه شن و یک میلی‌لیتر از نمونه‌های آب به ارلن‌های دارای ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط BHMS اضافه شد و به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ °C، روی شیکر با دور RPM ۱۸۰، انکوبه شد. سپس ۵ میلی‌لیتر از مایع محیط، به محیط جدید BHMS منتقل شد و پس از ۴ بار واکشت کلنی باکتری‌ها روی محیط BHMS حاوی آگار، خالص سازی شد.

شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده

با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی همچون رنگ آمیزی گرم، آزمایش هوازی و بی‌هوازی بودن، تولید اسپور و کپسول، شکل میکروسکوپی، حرکت، آزمایش اکسیداز و کاتالاز، شناسایی اولیه باکتری‌های تجزیه کننده صورت گرفت و در ادامه شناسایی مولکولی با تکثیر قسمتی از ژن 16S rDNA توسط پرایمرهای 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' و UniP1 و 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' انجام شد.

برنامه PCR برای تکثیر ژن بدین صورت بود:
دمای دناتوراسیون ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، دمای

جداسازی شدند. در بین آنها دو سویه که رشد و حذف نفت بالاتری را نشان می‌دادند، برای مطالعات بعدی و طراحی تاگوچی انتخاب و مورد شناسایی قرار گرفتند. سویه AS که از نمونه آب جزیره هرمز جداسازی شد، یک باکتری میله‌ای گرم منفی متحرک با رشد هوازی و عدم قابلیت رشد تحت شرایط بی‌هوازی، اکسیداز و کاتالاز مثبت، هیدرولیز ژلاتین مثبت و قادر به تولید اسید از قندهایی همچون گلوکز، فروکتوز و زایلوز و عدم تولید اسید از قندهای مالتوز، لاکتوز و سوربیتول بود که در جنس *Pseudomonas* قرار گرفت. سویه BS که از نمونه شن‌های ساحلی جزیره خارک به دست آمد، یک باکتری کوکوباسیل گرم منفی غیر متحرک، شدیداً هوازی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی که قادر به تولید اسید از گلوکز بود و در جنس *Acinetobacter* قرار گرفت. پس از شناسایی مولکولی و تعیین توالی قسمتی از ژن *tDNA 16S*، مشخص شد که سویه AS مربوط به جنس و گونه *P. aeruginosa* و سویه BS به جنس و گونه *A. calcoaceticus* تعلق دارد. شماره دستیابی سویه AS در پایگاه EMBL، FM957532 و سویه BS، FM881902 می‌باشد.

بهینه‌سازی تجزیه نفت با روش تاگوچی

عوامل متعددی می‌توانند بر روی تجزیه زیستی نفت تاثیر داشته باشند. به منظور به‌دست آوردن بهترین شرایطی که می‌تواند موجب تجزیه بالاتری از نفت باشد، یک آزمایش آماری تاگوچی با ۵ عامل ۳ سطحی و یک عامل ۲ سطحی طراحی و آزمایش L18 با ۱۸ آزمایش مختلف انجام شد.

جدول ۲- عوامل انتخاب شده برای طرح تاگوچی و سطوح آنها

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
دما	۳۰ °C	۳۷ °C	-
منبع نیتروژن	(NH ₄) ₂ SO ₄	پپتون	KNO ₃
سورفکتانت	بدون سورفکتانت	توین ۸۰	تریون X-100
غلظت نفت	۱٪	۲/۵٪	۴٪
نوع باکتری تجزیه کننده	<i>A. calcoaceticus</i> BS	<i>P. aeruginosa</i> AS	کشت مخلوط (BS+AS)
منبع کربن کمکی	بدون منبع کربن کمکی	گلوکز	پیرووات

1. Dichloromethane

و آزمایش L18 توسط نرم‌افزار طراحی شد. جدول ۳، شرایط به‌کار رفته در هر آزمایش تاگوچی را نشان می‌دهد [۱۰].
آزمایش‌های تاگوچی درون لوله آزمایش (با حجم ۱۰ سی‌سی) بدون همزدن انجام شد. لوله‌ها به مدت ۳ هفته در شرایط ذکر شده در جدول ۳، به صورت افقی گرمخانه گذاری و پس از گذشت دوره انکوباسیون، دو پارامتر مورد سنجش قرار گرفت:

۱- رشد باکتری که با خواندن جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر انجام شد.

۲- حذف نفت با استخراج نفت باقیمانده در لوله آزمایش با DCM^۱ و خواندن جذب نوری آن در ۴۲۰ نانومتر محاسبه شد.

هر آزمایش تاگوچی دارای ۳ تکرار همراه با ۲ شاهد بود: الف) شاهد کدورت: این شاهد برای محاسبه کدورت باکتری تلقیح شده در ابتدای آزمایش به‌کار رفت و دارای همه ترکیبات به‌جز نفت بود.

ب) شاهد حذف نفت: این شاهد برای محاسبه از دست رفتن غیر زیستی نفت در طول دوره انکوباسیون به‌کار رفت و واجد همه ترکیبات بود ولی باکتری به آن تلقیح نشد [۱۱].

نتایج

جداسازی، شناسایی و خصوصیات باکتری‌های تجزیه کننده

نفت خام

بیست و پنج سویه باکتریایی تجزیه کننده نفت خام از شن‌های ساحلی و آب خلیج فارس در مناطق ذکر شده

جدول ۳- شرایط به کار رفته در هر آزمایش تاگوچی

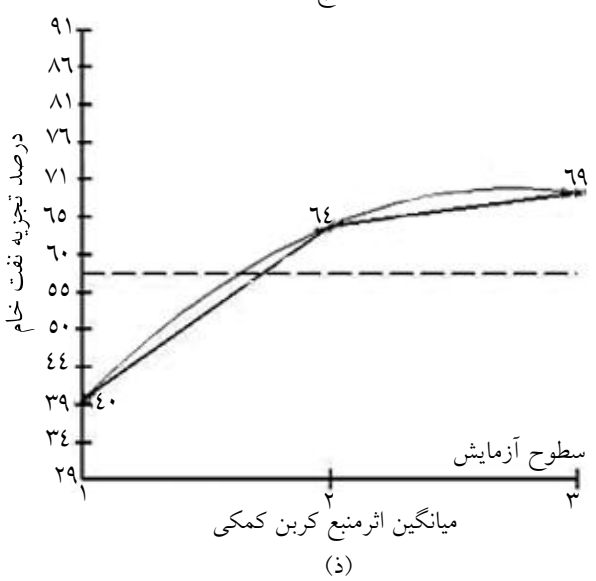
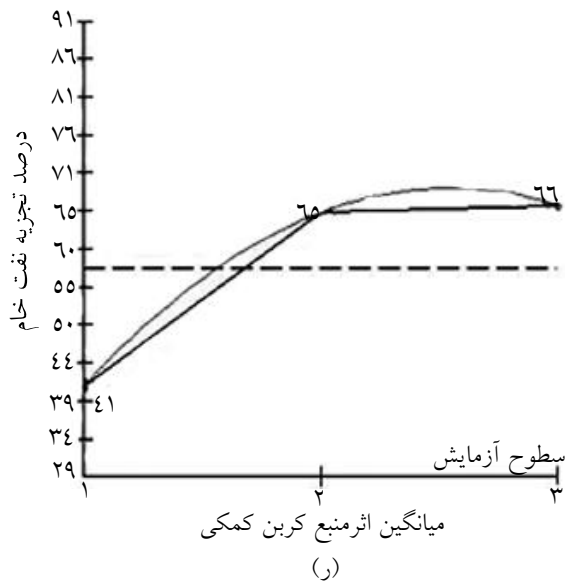
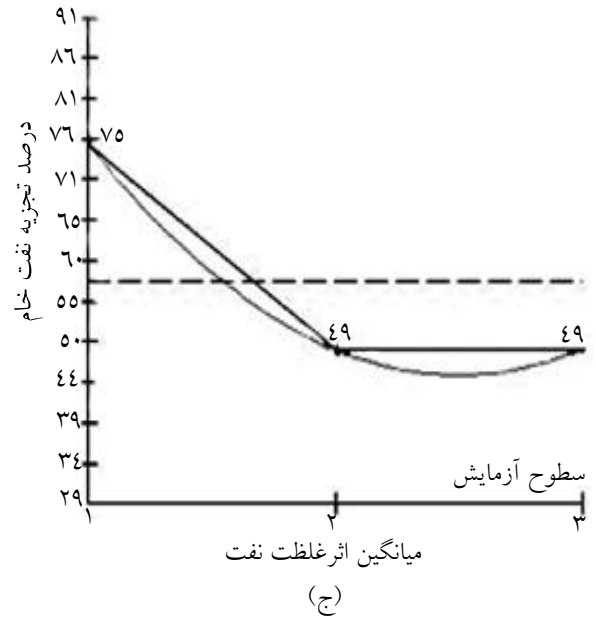
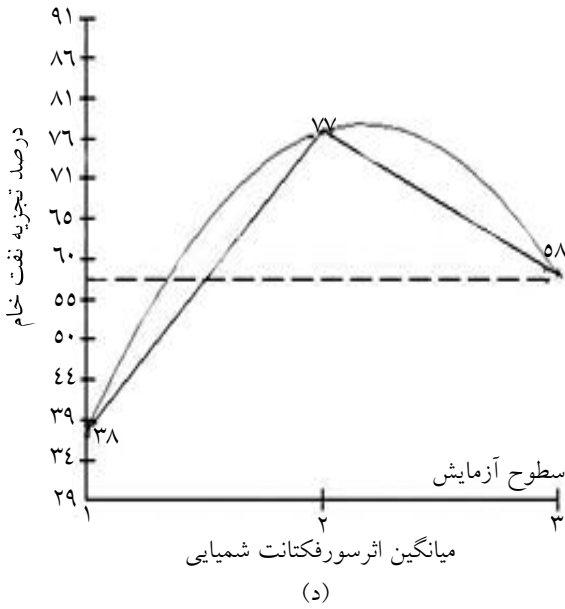
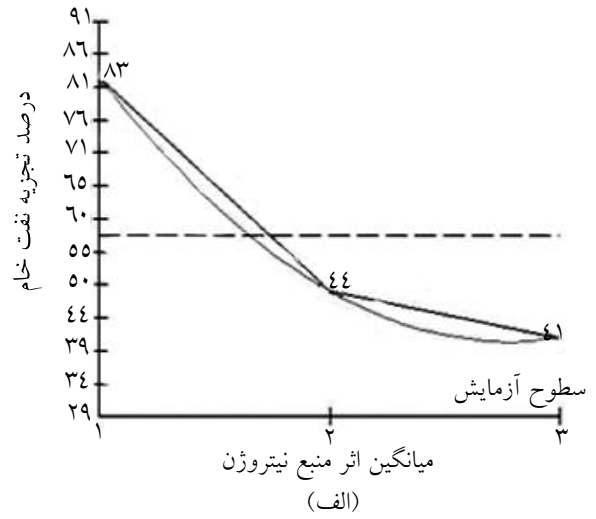
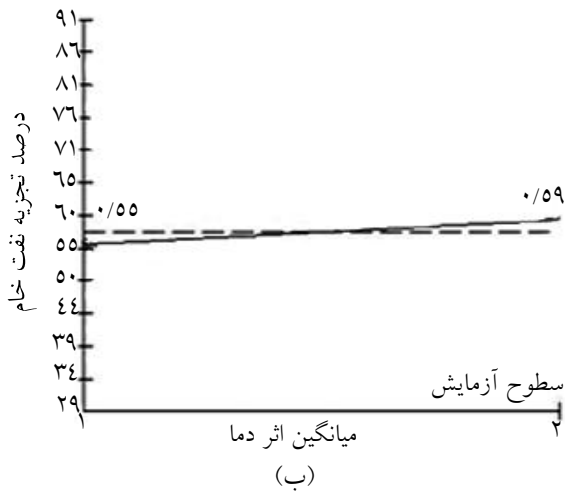
شماره آزمایش	دما (°C)	منبع کربن	منبع نیتروژن	سورفکتانت	غلظت نفت (%)	نوع باکتری تجزیه کننده
۱	۳۰	بدون	(NH ₄) ₂ SO ₄	بدون	۱	BS
۲	۳۰	بدون	پپتون	Tween 80	۲/۵	AS
۳	۳۰	بدون	KNO ₃	Triton X-100	۴	AS+BS
۴	۳۰	گلوکز	(NH ₄) ₂ SO ₄	بدون	۲/۵	AS
۵	۳۰	گلوکز	پپتون	Tween 80	۴	BS+AS
۶	۳۰	گلوکز	KNO ₃	Triton X-100	۱	BS
۷	۳۰	پیرووات	(NH ₄) ₂ SO ₄	Tween 80	۱	BS+AS
۸	۳۰	پیرووات	پپتون	Triton X-100	۲/۵	BS
۹	۳۰	پیرووات	KNO ₃	بدون	۴	AS
۱۰	۳۷	بدون	(NH ₄) ₂ SO ₄	Triton X-100	۴	AS
۱۱	۳۷	بدون	پپتون	بدون	۱	BS+AS
۱۲	۳۷	بدون	KNO ₃	Tween 80	۲/۵	BS
۱۳	۳۷	گلوکز	(NH ₄) ₂ SO ₄	Tween 80	۴	BS
۱۴	۳۷	گلوکز	پپتون	Triton X-100	۱	AS
۱۵	۳۷	گلوکز	KNO ₃	بدون	۲/۵	BS + AS
۱۶	۳۷	پیرووات	(NH ₄) ₂ SO ₄	Triton X-100	۲/۵	BS + AS
۱۷	۳۷	پیرووات	پپتون	بدون	۴	BS
۱۸	۳۷	پیرووات	KNO ₃	Tween 80	۱	AS

آب در این منطقه بین ۳۰-۳۷°C در طی فصول مختلف سال متغیر است. نتیجه اثر دما بر روی تجزیه زیستی در شکل ۱ آمده است. همانطور که در این شکل مشخص است، اختلاف زیادی بین دو سطح دما در تجزیه نفت دیده نمی شود. به طوری که سطح ۱ (دمای ۳۰°C) و سطح ۲ (دمای ۳۷°C) به ترتیب دارای اثر ۵۵٪ و ۵۹٪ در حذف نفت شده اند که این اختلاف ۴ درصدی می تواند به خطای آزمایش نسبت داده شود که در جدول ۳ توسط نرم افزار محاسبه شده نادیده گرفته می شود. لذا تجزیه زیستی می تواند در دامنه دمایی ۳۰-۳۷°C صورت پذیرد.

پس از اتمام دوره انکوباسیون، درصد حذف نفت برای هر آزمایش محاسبه شد و نتایج به دست آمده در نرم افزار Qualitek4 وارد شد و محاسبات آماری و نمودارها به دست آمد. در قسمت های زیر اثر هر یک از عوامل به همراه نمودار مربوطه به طور جداگانه شرح داده شده است.

اثر دما

باکتری های به کار رفته در طراحی تاگوچی، باکتری های محیطی بوده که از محیط دریایی خلیج فارس و از مناطق جزیره خارک و جزیره هرمز جداسازی شده بودند. دمای



شکل ۱- میانگین اثر عوامل به کار رفته در آزمایش‌های تاگوجی بر روی درصد تجزیه نفت خام همراه با سطوح آزمایش توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده

اثر منبع نیتروژن

کاهش یافت. همان‌طور که در شکل ۱ آمده است، بالاترین حالت تجزیه نفت در غلظت ۱٪ صورت می‌گیرد. هر چند در غلظت‌های بالاتر نیز تجزیه صورت گرفته است. نکته جالب توجه دیگر این است که در سطح ۲ (غلظت ۲/۵٪) و سطح ۳ (غلظت ۴٪) تجزیه یکسانی رخ داده است.

اثر نوع سویه و باکتری تجزیه کننده

از دو سویه *A. calcoaceticus* BS و *P. aeruginosa* AS برای طراحی تاگوچی استفاده شد. در یک سطح نیز از این دو سویه توأم جهت بررسی اثر کشت مخلوط استفاده گردید. نتیجه اثر نوع سویه و باکتری تجزیه کننده در شکل ۱ آمده است. با توجه به این شکل، سطح ۳ (کشت مخلوط) بالاترین اثر را در تجزیه نفت دارد (۶۶٪). سویه *A. calcoaceticus* BS دارای اثر ۶۵٪ در تجزیه نفت در مقایسه با سویه *P. aeruginosa* AS که اثر ۴۱٪ دارد می‌باشد. نکته دیگری که در این شکل به چشم می‌خورد این است که اختلاف بین سطح ۲ و ۳ بسیار ناچیز است (۱٪)، به طوری که خطای آزمایش در نظر گرفته می‌شود. یعنی کشت مخلوط و سویه *A. calcoaceticus* BS اثر یکسانی در تجزیه نفت دارند و هر دو سطح به مراتب بالاتر از *P. aeruginosa* AS می‌باشند.

اثر افزودن منبع کربن کمکی

اثر منبع کربن کمکی علاوه بر نفت بر روی تجزیه نیز دیده می‌شود (شکل ۱). با توجه به شکل، سطح ۳ که اضافه کردن پیرووات به عنوان منبع کربن کمکی است، بالاترین تاثیر (۶۹٪) را روی تجزیه نفت دارد و در سطح ۱ که هیچ منبع کربن کمکی در محیط کشت وجود ندارد، کمترین اثر را دارد (۳۹٪). این نتایج دلالت بر این دارد که افزودن یک منبع کربن علاوه بر نفت که برای باکتری قابل استفاده باشد می‌تواند تجزیه زیستی نفت را افزایش دهد. در اینجا دو نوع منبع کربن کمکی در سطوح ۲ و ۳، شامل گلوکز و پیرووات به کار برده شدند. با توجه به نمودار سطح ۳ (پیرووات) اثر آن از سطح ۲ (گلوکز) بیشتر است. وجود منبع کربن کمکی باعث می‌شود که باکتری ابتدا از این منبع کربنی استفاده کرده و در نتیجه بیوماس سلولی افزایش یابد

ثابت شده است که مواد غذایی از جمله نیتروژن و فسفر در تجزیه زیستی تاثیر زیادی دارند، در اینجا اثر ۳ منبع نیتروژنی که به طور معمول در تصفیه زیستی استفاده می‌شوند، به کار برده شد. نتایج اثر منبع نیتروژن در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که این شکل نشان می‌دهد، سطح ۱ منبع نیتروژن، بالاترین تاثیر را در حذف نفت داشته و با حضور منبع نیتروژن $(NH_4)_2SO_4$ بیش از ۸۳٪ نفت تجزیه شده است. سطح ۲ (پیتون) و سطح ۳ (KNO_3) به مراتب از سطح ۱ اثر کمتری داشته در حالی که درصد تاثیر پیتون به عنوان منبع نیتروژن بالاتر از KNO_3 بوده است. در هر سطح نیتروژنی تجزیه زیستی اتفاق افتاده است، اما منبع نیتروژنی $(NH_4)_2SO_4$ بهترین منبع نیتروژنی می‌باشد.

اثر سورفکتانت شیمیایی

سورفکتانت‌ها با پخش کردن فاز نفتی به درون فاز آبی می‌توانند در تجزیه نفت نقش بسزایی داشته باشند، زیرا عموماً ترکیبات نفتی از خاصیت آب‌گریزی بالایی برخوردار هستند. انتخاب نوع سورفکتانت شیمیایی برای بهینه‌سازی تجزیه نفت امر مهمی است، زیرا برخی از سورفکتانت‌ها علاوه بر خاصیت پراکنش فاز نفتی اثر سمی نیز داشته و ممکن است موجب مهار رشد میکروارگانیسم‌ها شوند. در اینجا اثر ۲ سورفکتانت شیمیایی *tween 80* و *triton X-100* در مقایسه با حالتی که هیچ سورفکتانتی اضافه نشده بود، بررسی شد (شکل ۱). با توجه به این شکل به طور واضح مشاهده می‌شود که در غیاب سورفکتانت (سطح ۱) تجزیه در پایین‌ترین حد خود (۳۸٪) قرار دارد و هر دو سطح ۲ و ۳ که حضور سورفکتانت است بالاتر از عدم حضور سورفکتانت می‌باشد. این موضوع می‌تواند به دستیابی بیشتر باکتری به ترکیبات نفتی به دلیل خاصیت پخش مواد نفتی به وسیله سورفکتانت باشد. از دو سورفکتانت به کار رفته، *tween 80* موجب اثر بیشتری (۷۷٪) در تجزیه نفت در مقایسه با *triton X-100* (۵۸٪) می‌شود.

اثر غلظت نفت

با افزایش غلظت نفت از ۱ به ۴٪، تجزیه به طور قابل توجهی

بیشترین تاثیر را در کارایی حذف نفت داشته است، منبع نیتروژن می‌باشد و کمترین اثر مربوط به دمای گرمخانه گذاری می‌باشد. منبع کربن اضافی و غلظت نفت اثرات مشابهی در کارایی تجزیه داشته‌اند اما اثر هر دوی آنها کمتر از درصد تاثیر منبع نیتروژن بوده است.

اثرات سطوح عوامل در کارایی تجزیه نفت

در تاثیر نهایی یک عامل، میزان تاثیرگذاری هر یک از سطوح در مقابل خطای آزمایش بسیار مهم است. در جدول ۵، اثرات سطوح هر عامل به‌طور جداگانه آمده و داده‌های این جدول در نمودارها ارائه شده است.

و پس از اتمام این منبع کربن کمکی، باکتری با توده سلولی بالایی به تجزیه نفت می‌پردازد و این امر موجب می‌شود که توانایی تحمل سمیت نفت افزایش یافته و درصد تجزیه در مقایسه با حالت عدم وجود منبع کربنی کمکی افزایش یابد. احتمال دیگر در افزایش میزان تجزیه نفت در حضور منبع کربن کمکی، فرایند کومتابولیسیم است که باکتری به کمک منبع کربن موجود، نفت را آسان‌تر تجزیه می‌کند.

آنالیز واریانس^۱ اثر کلیه عوامل

داده‌های حاصل از آنالیز واریانس از نتایج اثر کلیه عوامل به‌کار رفته در طراحی تاگوچی در جدول ۴ آمده است. همان‌طور که در این جدول نشان داده شده، عاملی که

جدول ۴- آنالیز واریانس و درصد تاثیر عوامل به‌کار رفته در طراحی تاگوچی برای بهینه‌سازی تجزیه نفت

عامل	درجه آزادی (DOF)	مجموع مربعات (SS)	واریانس (V)	نسبت F	مجموع خالص مربعات (SS')	تاثیر عامل (%)
۱. دما	۱	۰/۱۸۲	۰/۱۰۴	۰/۴۹۶	۰/۱۰۶	۵
۲. منبع کربن اضافی	۲	۰/۵۷۸	۰/۲۸۹	۹/۸۲۴	۰/۵۱۹	۱۵/۲۲
۳. منبع نیتروژن	۲	۱/۱۶۸	۰/۵۸۴	۱۹/۸۵	۱/۱	۳۰/۰۶
۴. سورفکتانت	۲	۰/۹۱۹	۰/۴۵۹	۱۵/۶۲	۰/۸۶	۱۹/۴۴
۵. غلظت نفت	۲	۰/۵۶۲	۰/۲۸	۹/۵۴۶	۰/۵۰۲	۱۴/۷۵
۶. نوع باکتری تجزیه کننده	۲	۰/۴۷۸	۰/۲۳۹	۸/۳۸	۰/۴۲	۱۲/۴۸۶
خطای آزمایش	۲	۰/۱۱۴	۰/۰۳۵	۰/۲۹۶	۰/۰۵	۳/۰۴۴
مجموع	۱۳	۴	۲	۶۳/۷۷	۳/۵۵۷	۱۰۰

جدول ۵- درصد تاثیر هر یک از سطوح عوامل در تجزیه نفت

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
۱. دما	۵۵/۳	۵۹/۴	-
۲. منبع کربن اضافی	۳۹/۶	۶۳/۳	۶۸/۵
۳. منبع نیتروژن	۸۲/۵	۴۸/۵	۴۱/۱
۴. سورفکتانت	۳۷/۵	۷۶/۷	۵۷/۹
۵. غلظت نفت	۷۵	۴۸/۵	۴۸/۶
۶. نوع باکتری تجزیه کننده	۴۱	۶۵	۶۶

جدول ۶- شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم افزار Qualitek4 برای تجزیه نفت

عامل	توضیح سطح	نوع سطح	درصد توزیع
۱. دما	۳۷	۲	۴
۲. منبع کربن اضافی	پیرووات	۳	۱۲/۱
۳. منبع نیتروژن	(NH ₄) ₂ SO ₄	۱	۲۷/۷
۴. سورفکتانت	توین ۸۰	۲	۲۱/۳
۵. غلظت نفت	٪۱	۱	۱۹/۶
۶. نوع باکتری تجزیه کننده	کشت مخلوط BS+AS	۳	۱۰/۶

شرایط بهینه برای تجزیه نفت

در مجموع با آنالیز نتایج کلیه عوامل و همچنین میان کنش بین آنها، روش تاگوچی شرایط بهینه مندرج در جدول ۶ را برای انجام تجزیه زیستی نفت پیشنهاد می‌کند. نکته‌ای که باید ذکر شود این است که مجموع درصد توزیع از کلیه عوامل برابر با ۹۵/۳ می‌باشد که ۴/۷٪ باقی مانده را می‌توان به عوامل دیگری که مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند و یا به خطای آزمایش‌ها نسبت داد. در نهایت کارایی طراحی تاگوچی انجام شده برابر ۷۷٪ می‌باشد، بدین معنا که سطح اطمینان به شرایط بهینه پیشنهاد شده ۷۷٪ است.

نتیجه‌گیری

شرایط متعددی می‌توانند بر روی تجزیه نفت در محیط‌های دریایی تاثیرگذار باشند. در این تحقیق برخی از مهمترین شرایط انتخاب و آزمایش تاگوچی به منظور بررسی اثرات هر یک از این عوامل بر روی تجزیه نفت طراحی شد. شرایط انتخاب شده شامل: دما، منبع نیتروژن، سورفکتانت، غلظت نفت، باکتری تجزیه کننده و منبع کربن اضافی بود. محققین متعددی اثر هر یک از این شرایط را به صورت جداگانه و یا ترکیبی بر روی تجزیه نفت در محیط‌های دریایی بررسی کرده‌اند [۱۴-۱۲].

زکری^۱ و چالال^۲ اثر دما، شوری و غلظت نفت را روی تجزیه نفت توسط باکتری ترموفیل تجزیه کننده جداشده از سواحل امارات متحده عربی بررسی کردند [۱۲]. آنها دامنه دمایی ۳۵-۷۵ °C، شوری ۰-۱۰٪ و غلظت نفت ۱۰-۱٪ را به کار بردند. این محققین دریافتند که با افزایش دما میزان تجزیه توسط سویه‌های ترموفیل افزایش می‌یابد،

اما در غلظت‌های بالای نفت میزان تجزیه کاهش می‌یابد. در تحقیق حاضر مشخص شد که دمای ۳۰°C تا ۳۷ °C اثر چندانی روی تجزیه نفت ندارند. تفاوت تحقیق حاضر با تحقیق زکری و چالال در این است که در تحقیق حاضر سویه‌های مزوفیل تجزیه کننده نفت بررسی شد، اما به طور مشابه این نتیجه به دست آمد که با افزایش غلظت نفت، تجزیه زیستی کاهش می‌یابد [۱۲].

میزان تجزیه زیستی نفت خام در محیط‌های طبیعی می‌تواند مکرر به وسیله در دسترس بودن مواد غذایی محدود شود. زیست سالم‌سازی محیط‌های آلوده معمولاً شامل افزودن نیتروژن و فسفر است. ماکران^۳ اثر دو منبع نیتروژنی (KNO₃ و NH₄Cl) را روی تجزیه نفت خام سبک عربی بررسی کرد [۱۳]. او به این نتیجه رسید که منبع نیتروژنی آمونیاکی برای تجزیه بهتر از منبع نیتراتی می‌باشد زیرا منبع نیتراتی باعث کاهش pH می‌شود که تجزیه را مهار می‌کند. در تحقیق حاضر اثر سه منبع نیتروژنی ((NH₄)₂ SO₄، KNO₃ و پیتون) روی تجزیه نفت سبک ایران مورد بررسی قرار گرفت که در این بین مشابه تحقیق ماکران، منبع آمونیاکی اثر بالاتری نسبت به منبع نیتراتی بر روی تجزیه داشت و حتی اثر منبع نیتراتی کمتر از پیتون بود که احتمالاً به دلیل تغییر دادن pH محیط کشت و مهار تجزیه می‌باشد.

اثر سورفکتانت‌های شیمیایی متعددی بر روی امولسیونه کردن نفت و افزایش تجزیه آن در مقالات گزارش شده

1. Zekri
2. Chaalal
3. Makram

بوده است. اوکرن توگبا^۲ و ازرونی^۴ تاثیر کشت منفرد و مخلوط جدا شده از رودخانه و پساب پالایشگاه در نیجریه را روی تجزیه زیستی نفت خام بررسی کردند [۱۵]. آنها مشاهده کردند که کشت منفرد اثر بهتری بر روی تجزیه نفت نسبت به کشت مخلوط دارد. در این تحقیق نیز اثر کشت منفرد و مخلوط باکتری *P. aeruginosa* AS و *A. calcoaceticus* BS بر روی تجزیه نفت بررسی شد و مشاهده شد که کشت منفرد *A. calcoaceticus* BS اثر بهتری از کشت مخلوط دارد که با نتایج اوکرن توگبا و ازرونی همخوانی دارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی این دانشگاه قدردانی می‌شود.

Coretix 9500 است. ونوسا^۱ و هولدر^۲ کارایی دو نوع سورفکتانت شیمیایی و JD2000 را روی تجزیه نفت خام در آب دریای مدیترانه مورد مطالعه قرار دادند [۱۴]. آنها دریافتند که حضور سورفکتانت شیمیایی، تجزیه زیستی نفت در آب دریا را افزایش می‌دهد هر چند اثر سورفکتانت Coretix 9500 بیش از JD2000 بود. در تحقیق حاضر اثر دو سورفکتانت شیمیایی (tween 80 و triton X-100) روی تجزیه نفت بررسی شد. نتایج نشان داد که tween 80 موثرتر از triton X-100 برای کاربرد تجزیه زیستی است. هر چند عدم وجود سورفکتانت موجب کاهش تجزیه نسبت به وجود هر یک از سورفکتانت‌ها می‌شد. اثر پایین‌تر triton X-100 نسبت به tween 80 را می‌توان به ایجاد میسل‌های کمتر نسبت به tween 80 عنوان کرد. افزودن نوع میکروارگانیزم به صورت کشت خالص یا کشت مخلوط به نفت نیز موضوع تحقیق در برخی مقالات

منابع

- [1] Hassanshahian M., Emtiazi G., Kermanshahi R. & Cappello S., "Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea", Soil Sediment Contam, Vol. 19, No. 3, pp. 277-291, 2010.
- [2] Ijah U.J.J., "Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil", Waste Manage. Vol. 18, pp. 293-299, 1998.
- [3] Luis Y., Mara E., Corbella M., Turie"gano U.K., Antonio P. & Fernando R., "Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing", FEMS Microbiol Ecol., Vol. 32, pp. 69-75, 2000.
- [4] Vinas M., Grifoll M., Sabate J. & Solanas A., "Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities", J Ind Microbiol., Vol. 28, pp 252 – 260, 2002.
- [5] Xu R. & Obbard J.P., "Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments", J Environ Qual. Vol. 32, pp. 1234-1243, 2003.
- [6] Sharma S. L. & Pant A., "Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine Rhodococcus" sp, Biodegrad., Vol. 11, pp. 289-294, 2001.
- [7] Subarna R., Dipak H., Debabrata B., Dipa B. & Ranajit K., "Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal

1. Venosa
2. Holder
3. Okerentugba
4. Ezeronye

waters of Sunderban Biosphere Reserve”, World J Microb Biot., Vol. 18, pp. 575–581, 2002.

[8] Hasanshahian M. & Emtiazi G., “*Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation*”, Int. Biodeterior. Biodegrad., Vol. 62, pp. 170-178, 2008.

[9] Holt S.G., Kriey N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. & Williams S.T., “*Bergy’s Manual of Determinative for Bacteriology*”, Williams and Wilkins., New York., 1998.

[10] Venkata S., Sirisha K., Sreenivasa R. & Sarma P.N., “*Bioslurry phase remediation of chlorpyrifos contaminated soil*”, Process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental(DOE) methodology. Ecotox Environ Saef., Vol. 68, pp. 252–262, 2007.

[11] Muratova A. Y. & Turkovskaya V., “*Degradation of petroleum oils by a selected microbial association*”, Appl Biochem Microbiol., Vol. 37, pp. 155–159. 2001.

[12] Zekri A. & Chaalal O., “*Effect of Temperature on Biodegradation of Crude Oil*”, Energy Sources. Vol. 27, pp. 233–244, 2005.

[13] Makram T., “*Suidan effects of nitrogen source on crude oil biodegradation*”, J Ind Microbiol., Vol. 13, pp. 279-286, 1994.

[14] Venosa A.D. & Holder E.L., “*Biodegradability of dispersed crude oil at two different temperatures*”, Mar Pollut Bull. Vol. 54, pp. 545–553, 2007.

[15] Okerentugba P.O. & Ezeronye O.U., “*Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria*”, Afr J Biotechnol., Vol. 2 No. 9, pp. 288-292, 2003.