یادداشت پژوهشی

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

مهدی حسن شاهیان[1*]، عذری حسن شاهیان[1] و گیتی امتیازی[2]
۱- دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
۲- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
Hasanshahi@gmail.com

پژوهش نفت
سال بیستم
شماره ۶۳
صفحه ۸۲-۷۲، ۱۳۸۹

چکیده

آلودگی نفتی در محیط‌های دریایی یک مساله جهانی است. سالانه مقادیر زیادی نفت وارد محیط‌های دریایی می‌شود. خلیج فارس به‌دلیل موقعیت استراتژیک خود محل عبور بیش از ٦٠ ٪ 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 *Pesudomonas* تعلق داشتند، برای ادامه تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. برای طراحی تاگوچی، ٦ عامل (دما، منبع نیتروژن، سورفکتانت، غلظت نفت، منبع کربن اضافی و باکتری تجزیه کننده) در نظر گرفته شد که ٥ عامل آن دارای ٣ سطح و عامل دما دارای ٢ سطح بود که برای آن آزمایش L18 طراحی شد. نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های تاگوچی نشان داد که دما تاثیری در تجزیه ندارد و تجزیه زیستی می‌تواند در دامنه دمایی ۳۰-۳۷ °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 به‌کار رفته، tween 80 موجب اثر بیشتری در تجزیه می‌شود. با افزایش غلظت نفت از ١ به ٤ ٪ 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 BS *A. calcoaceticus*، اثر یکسانی در تجزیه نفت دارند و هر دو سطح به مراتب بالاتر از AS *P. aeruginosa* می‌باشند. مجموع توزیع از کلیه عوامل برابر با ۹۵/۳٪ می‌باشد که ٤/٧٪ باقیمانده را می‌توان به خطای آزمایش‌ها نسبت داد. در نهایت کارایی طراحی تاگوچی انجام شده برابر ٧٧ ٪ می‌باشد. با به‌کارگیری سویه‌های به‌دست 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 به‌هم 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 خلیج‌فارس ۵۷/۱ ٪ آلودگی نفتی مربوط به حمل و نقل کشتی‌ها و ۲۲/٤٪ مربوط به بهره‌برداری از دریا است. گسترش روزافزون حمل و نقل دریایی نفت، خطر آلودگی دریا و نیز حوادث نفتکش‌ها را بیشتر کرده است. خلیج‌فارس به خاطر موقعیت استراتژیک خود محل عبور بیش از ٦۰ ٪ نفت خام موردنیاز 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، به‌طوری‌که آن‌ها به تجزیه زیستی عمقی‌تر بخش‌های نفت به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها امکان می‌دهند [٤-۲]. تجزیه زیستی مشتقات نفتی در محیط‌های آلوده موثرتر، قوی‌تر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر از روش‌های فیزیکو 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[1] ترکیبات آلی وابسته به غلظت ترکیبات است، به‌طوری‌که غلظت‌های بالایی از هیدروکربن‌ها به‌وسیله 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 تاثیر می‌گذارند. از جمله این عوامل می‌توان به عوامل طبیعی، اکسیژن، موجودات زنده، نیتروژن، فسفر، دما و pH اشاره کرد [۵].

درک عوامل تاثیرگذار بر میزان تجزیه زیستی برای تعیین راهبردهای اساسی به‌منظور طراحی سیستم‌های زیست سالم‌سازی[2] و بهبود جمعیت میکروبی[3] دارای اهمیت خاصی است [٦]. 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 به‌دست آید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

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 cm ۱۲-۱ سطح ساحل با استفاده از چاقوی استریل به‌دست آمد. نمونه‌های آب دریا از عمق cm ۱۵ 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 شنل‌هاس[4] (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 $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2$، ۱ گرم NH_4NO_3 و دو قطره از $FeCl_3$ ٦۰٪ و pH محیط نیز برابر ۷ می‌باشد. ۱٪ نفت خام سبک ایران به‌عنوان 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	٤/۷	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)	۱/٦۵	غلظت فسفر (ppm)	۱۸
غلظت پتاسیم (ppm)	۱۰۰	pH	٦/۲
غلظت فسفر (ppm)	۱۷		
درصد نیتروژن	۰/۰۱۱		
درصد کربن آلی	۰/۱۱		
درصد اشباع پذیری	۲٤/۵		
pH	۷/٤		
هدایت الکتریکی (ds/m)	٦/۵		

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 ٤ 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 میکروسکپی، 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 UniP1: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' و UniP2:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3 انجام شد.

برنامه PCR برای تکثیر ژن بدین صورت بود:

دمای دناتوراسیون ۹٤ °C به مدت یک دقیقه، دمای 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 ٤۰۰ 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 BS *A.calcoaceticus* و AS *P. aeruginosa* با روش آماری تاگوچی مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. برای طراحی تاگوچی، ٦ 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

و آزمایش L18 توسط نرم‌افزار طراحی شد. جدول۳، 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 ٦۰۰ نانومتر انجام شد.

۲- حذف نفت با استخراج نفت باقیمانده در لوله آزمایش با DCM[1] و خواندن جذب نوری آن در ٤۲۰ 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 وپنج سویه باکتریایی تجزیه کننده نفت خام از شن‌های ساحلی و آب خلیج فارس در مناطق ذکر شده 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 16S rDNA، 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.

جدول۲- عوامل انتخاب شده برای طرح تاگوچی و سطوح آن‌ها

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
دما	۳۰ °C	۳۷ °C	-
منبع نیتروژن	$(NH_4)_2SO_4$	پپتون	KNO_3
سورفکتانت	بدون سورفکتانت	توین ۸۰	تریتون X-100
غلظت نفت	٪۱	٪۲/۵	٪٤
نوع باکتری تجزیه کننده	*A. calcoaceticus* BS	*P. aeruginosa* AS	کشت مخلوط (BS+AS)
منبع کربن کمکی	بدون منبع کربن کمکی	گلوکز	پیروات

1.Dichloromethane

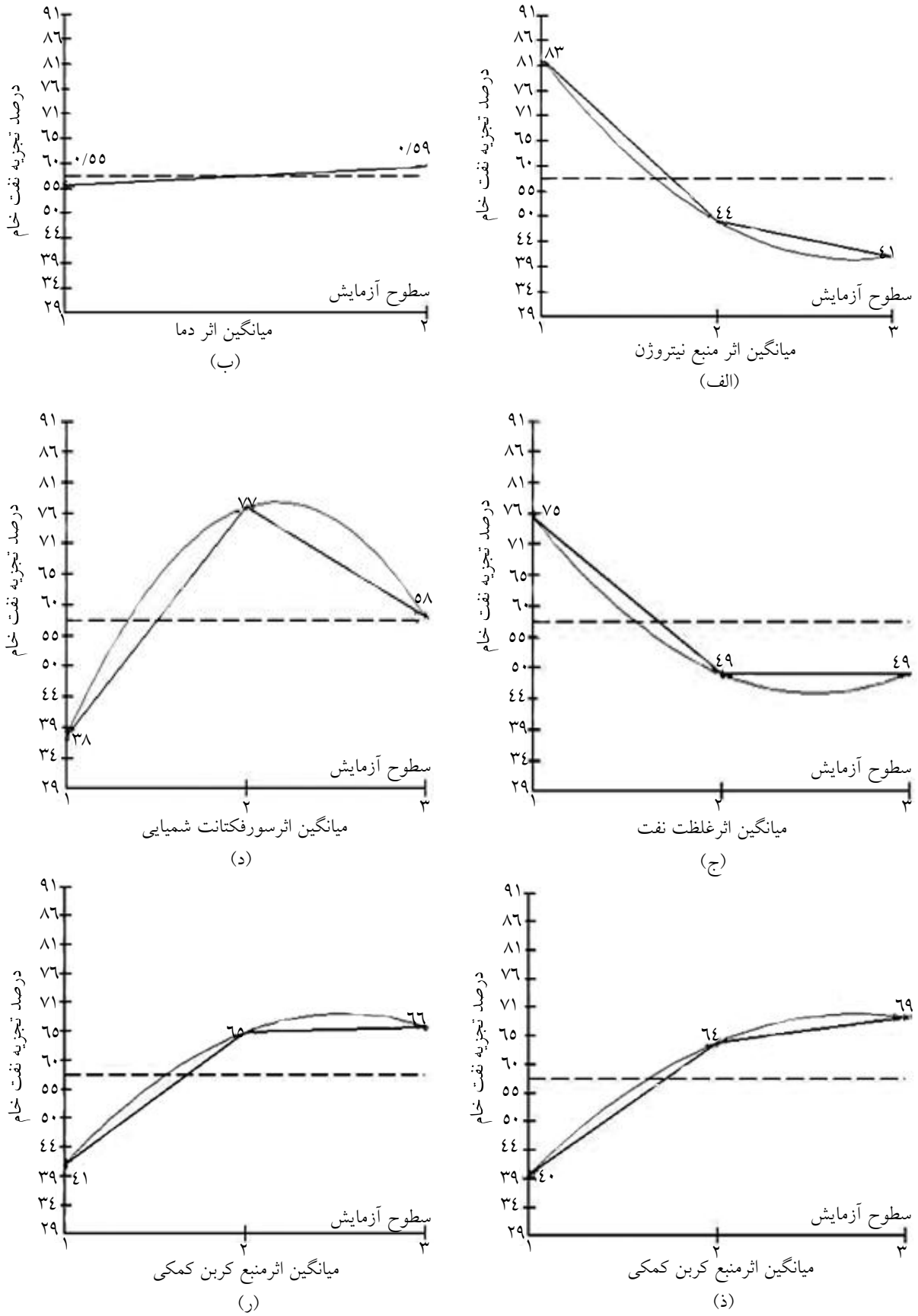
جدول۳- شرایط به‌کار رفته در هر آزمایش تاگوچی

شماره آزمایش	دما (°C)	منبع کربن	منبع نیتروژن	سورفکتانت	غلظت نفت (٪)	نوع باکتری تجزیه کننده
۱	۳۰	بدون	$(NH_4)_2SO_4$	بدون	۱	BS
۲	۳۰	بدون	پپتون	Tween 80	۲/۵	AS
۳	۳۰	بدون	KNO_3	Triton X-100	٤	AS+BS
٤	۳۰	گلوکز	$(NH_4)_2SO_4$	بدون	۲/۵	AS
۵	۳۰	گلوکز	پپتون	Tween 80	٤	BS+AS
٦	۳۰	گلوکز	KNO_3	Triton X-100	۱	BS
۷	۳۰	پیروات	$(NH_4)_2SO_4$	Tween 80	۱	BS+AS
۸	۳۰	پیروات	پپتون	Triton X-100	۲/۵	BS
۹	۳۰	پیروات	KNO_3	بدون	٤	AS
۱۰	۳۷	بدون	$(NH_4)_2SO_4$	Triton X-100	٤	AS
۱۱	۳۷	بدون	پپتون	بدون	۱	BS+AS
۱۲	۳۷	بدون	KNO_3	Tween 80	۲/۵	BS
۱۳	۳۷	گلوکز	$(NH_4)_2SO_4$	Tween 80	٤	BS
۱٤	۳۷	گلوکز	پپتون	Triton X-100	۱	AS
۱۵	۳۷	گلوکز	KNO_3	بدون	۲/۵	BS + AS
۱٦	۳۷	پیروات	$(NH_4)_2SO_4$	Triton X-100	۲/۵	BS + AS
۱۷	۳۷	پیروات	پپتون	بدون	٤	BS
۱۸	۳۷	پیروات	KNO_3	Tween 80	۱	AS

پس از اتمام دوره انکوباسیون، درصد حذف نفت برای هر آزمایش محاسبه شد و نتایج به‌دست آمده در نرم‌افزار Qualitek4 وارد شد و محاسبات آماری و نمودارها به‌دست آمد. در قسمت‌های زیر اثر هر یک از عوامل به همراه نمودار مربوطه به‌طور جداگانه شرح داده شده است.

اثر دما

باکتری‌های به‌کار رفته در طراحی تاگوچی، باکتری‌های محیطی بوده که از محیط دریایی خلیج فارس و از مناطق جزیره خارک و جزیره هرمز جداسازی شده بودند. دمای آب در این منطقه بین ۳۷-۳۰ °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 نمی‌شود. به‌طوری‌که سطح ۱ (دمای ۳۰ °C) و سطح ۲ (دمای ۳۷ °C) به‌ترتیب دارای اثر ۵۵٪ و ۵۹٪ در حذف نفت شده‌اند که این اختلاف ٤ درصدی می‌تواند به خطای آزمایش نسبت داده شود که در جدول ۳ توسط نرم‌افزار محاسبه شده نادیده گرفته می‌شود. لذا تجزیه زیستی می‌تواند در دامنه دمایی ۳۷-۳۰ °C صورت پذیرد.



شکل۱- میانگین اثر عوامل به‌کار رفته در آزمایش‌های تاگوچی بر روی درصد تجزیه نفت خام همراه با سطوح آزمایش توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده

اثر منبع نیتروژن

ثابت شده است که مواد غذایی از جمله نیتروژن و فسفر در تجزیه زیستی تاثیر زیادی دارند، در اینجا اثر ۳ منبع نیتروژنی که به‌طور معمول در تصفیه زیستی استفاده می‌شوند، به‌کار 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 (پپتون) و سطح ۳ (KNO_3) به مراتب از سطح ۱ اثر کمتری داشته در حالی‌که درصد تاثیر پپتون به‌عنوان 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 آب گریزی 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 (شکل۱). با توجه به این شکل به‌طور 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 به‌دلیل خاصیت پخش مواد نفتی به‌وسیله سورفکتانت باشد. از دو سورفکتانت به‌کار 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 ٤٪، تجزیه به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. همان‌طور که در شکل۱ 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 ٤٪) 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 تواماً 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 (٦٦٪). سویه *A. calcoaceticus* BS دارای اثر ٦٥٪ در تجزیه نفت در مقایسه با سویه *P. aeruginosa* AS که اثر ٤١٪ دارد می‌باشد. نکته دیگری که در این شکل به چشم می‌خورد این است که اختلاف بین سطح ۲ و۳ بسیار ناچیز است (۱٪)، به‌طوری 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 پیروات به‌عنوان منبع کربن کمکی است، بالاترین تاثیر (٦٩٪) 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 پیروات به‌کار برده شدند. با توجه به نمودار سطح ۳ (پیروات) 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

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 کومتابولیسم است که باکتری به کمک منبع کربن موجود، نفت را آسان‌تر تجزیه می‌کند.

آنالیز واریانس[1] اثر کلیه عوامل

داده‌های حاصل از آنالیز واریانس از نتایج اثر کلیه عوامل به‌کار رفته در طراحی تاگوچی در جدول ٤ آمده است. همان‌طور که در این جدول نشان داده شده، عاملی که 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 جدول۵، اثرات سطوح هر عامل به‌طور جداگانه آمده و داده‌های این جدول در نمودارها ارائه شده است.

جدول٤- 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	۰/۱۰٤	۰/٤۹٦	۰/۱۰٦	۵
۲. منبع کربن اضافی	۲	۰/۵۷۸	۰/۲۸۹	۹/۸۲٤	۰/۵۱۹	۱۵/۲۲
۳. منبع نیتروژن	۲	۱/۱٦۸	۰/۵۸٤	۱۹/۸۵	۱/۱	۳۰/۰٦
٤. سورفکتانت	۲	۰/۹۱۹	۰/٤۵۹	۱۵/٦۲	۰/۸٦	۱۹/٤٤
۵. غلظت نفت	۲	۰/۵٦۲	۰/۲۸	۹/۵٤٦	۰/۵۰۲	۱٤/۷۵
٦. نوع باکتری تجزیه کننده	۲	۰/٤۷۸	۰/۲۳۹	۸/۳۸	۰/٤۲	۱۲/٤۸٦
خطای آزمایش	۲	۰/۱۱٤	۰/۰۳۵	۰/۲۹٦	۰/۰۵	۳/۰٤٤
مجموع	۱۳	٤	۲	٦۳/۷۷	۳/۵۵۷	۱۰۰

جدول۵- درصد تاثیر هر یک از سطوح عوامل در تجزیه نفت

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
۱. دما	۵۵/۳	۵۹/٤	-
۲. منبع کربن اضافی	۳۹/٦	٦۳/۳	٦۸/۵
۳. منبع نیتروژن	۸۲/۵	٤۸/۵	٤۱/۱
٤. سورفکتانت	۳۷/۵	۷٦/۷	۵۷/۹
۵. غلظت نفت	۷۵	٤۸/۵	٤۸/٦
٦. نوع باکتری تجزیه کننده	٤۱	٦۵	٦٦

1.ANOVA

جدول٦- شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار Qualitek4 برای تجزیه نفت

عامل	توضیح سطح	نوع سطح	درصد توزیع
۱. دما	۳۷	۲	٤
۲. منبع کربن اضافی	پیروات	۳	۱۲/۱
۳. منبع نیتروژن	$(NH_4)_2SO_4$	۱	۲۷/۷
٤. سورفکتانت	توین ۸۰	۲	۲۱/۳
۵. غلظت نفت	٪۱	۱	۱۹/٦
٦. نوع باکتری تجزیه کننده	کشت مخلوط BS+AS	۳	۱۰/٦

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 ٦ 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 ٤/۷٪ باقی‌مانده 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 به‌منظور 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 به‌صورت جداگانه و یا ترکیبی بر روی تجزیه نفت در محیط‌های دریایی بررسی کرده‌اند [١٤-١٢].

زکری[1] و چالال[2] اثر دما، شوری و غلظت نفت را روی تجزیه نفت توسط باکتری ترموفیل تجزیه کننده جداشده از سواحل امارات متحده عربی بررسی کردند [١٢]. آنها دامنه دمایی°C ۷۵-۳۵، شوری ۱۰-۰ ٪ و غلظت نفت ۱۰-۱٪ را به‌کار 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 به‌طور مشابه این نتیجه به‌دست آمد که با افزایش غلظت نفت، تجزیه زیستی کاهش می‌یابد [١٢].

میزان تجزیه زیستی نفت خام در محیط‌های طبیعی می‌تواند مکرر به‌وسیله در دسترس بودن مواد غذایی محدود شود. زیست سالم‌سازی محیط‌های آلوده معمولاً شامل افزودن نیتروژن و فسفر است. ماکارن[3] اثر دو منبع نیتروژنی (KNO_3 و NH_4Cl) را روی تجزیه نفت خام سبک عربی بررسی کرد [١٣]. 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 ($(NH_4)_2 SO_4$، KNO_3 و پپتون) روی تجزیه نفت سبک ایران مورد بررسی قرار گرفت که در این بین مشابه تحقیق ماکارن، منبع آمونیاکی اثر بالاتری نسبت به منبع نیتراتی بر روی تجزیه داشت و حتی اثر منبع نیتراتی کمتر از پپتون بود که احتمالا به‌دلیل 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. Makrarn

Coretix 9500 است. ونوسا[1] و هولدر[2] کارایی دو نوع سورفکتانت شیمیایی و JD2000 را روی تجزیه نفت خام در آب دریای مدیترانه مورد مطالعه قرار دادند [۱٤]. 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 (triton X-100 و tween 80) 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 میکروارگانیسم به‌صورت کشت خالص یا کشت مخلوط به نفت نیز موضوع تحقیق در برخی مقالات بوده‌است. اوکرن توگبا[3] و ازرونی[4] 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 *A. calcoaceticus* BS و *P. aeruginosa* AS 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.

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] Makrarn 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.