تجزیه ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام توسط میکروارگانیسم های جدا شده از محیط

امیر رضا طلایی[۱] نعمت ا... جعفرزاده[۲] محمد رضا طلایی[۳] مسعود بهشتی[۳]

۱- مربی گروه مهندسی عمران و محیط زیست موسسه آموزش عالی جامی
۲- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکدهٔ بهداشت، گروه بهداشت محیط
۳- استادیار دانشگاه اصفهان، دانشکدهٔ مهندسی، گروه مهندسی شیمی

خلاصه

آلودگی های نفتی یکی از معضلات مهم در سرتاسر دنیا می باشد که محققین زیادی به بررسی روشهای مختلف حذف آن پرداخته اند. در این میان روشهای بیولوژیکی توسط محققین بیش از سایر روشها مورد توجه و بررسی قرار گرفته است. هدف از مطالعه حاضر یافتن میکروارگانیسمی از محیط های آلوده به ترکیبات نفتی بود که قادر به تجزیه بخش آروماتیک نفت خام باشد. برای یافتن این اینگونه میکروارگانیسم ها از نقاطی که برای مدتها به ترکیبات نفتی آلوده بودند نمونه برداری شد. در ادامه میکروارگانیسم های موجود در نمونه های برداشت شده که قادر به ادامه حیات در مجاورت نفت خام به عنوان تنها منبع کربن بودند جداسازی و در نهایت خالص سازی شدند. در این مطالعه ۱۴ میکروارگانیسم از نمونه ها جداسازی و خالص سازی گردید که همگی باکتری بودند. میکروارگانیسمهای خالص سازی شده برای تعیین میزان کارایی شان در تجزیه ترکیبات آروماتیک به کمک روش اسپکتروفتومتری و در نهایت جهت تعیین صحت آزمایش ها به کمک کاروماتوگرافی گازی مورد آزمایش قرار گرفتند. در این میان باکتریهایی که در این مطالعه A-۳ و A-۱۴ نامگذاری شدند به ترتیب با ۸۹ و ۸۶ درصد کاهش ترکیبات آروماتیک بیشترین کارائی را در تجزیه ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام دارا بودند. در نهایت با بررسی های میکروبیولوژی باکتری A-۱۴ به عنوان سودوموناس آئروژنوزا شناسایی گردید که برخی دیگر از محققین نیز در مطالعات خود موفق به جداسازی آن جهت تجزیه برخی برشهای ترکیبات نفتی شده بودند.

کلمات کلیدی: ترکیبات آروماتیک، نفت خام، تجزیه بیولوژیکی، سودوموناس آئروژنوزا، کشت خالص

Biodegradation of aromatic compounds in crude oil by isolated microorganisms from environment

A. R. Talaie[1] N. jafaarzahe[2] M. Talaie[3] M Beheshti[3]

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

Abstract:
Oil pollutions are one of the most important environmental problems in the world. Many researches have been studied oil degradation methods. Biological methods has been attracted more attention of the researchers than other methods. The main objective of this study was to find some microorganisms that could degrade aromatic components in the floating crude oil. In order to find these microorganisms, some samples were taken from areas contaminated by petroleum compounds. Microorganisms that could live with crude oil as sole carbon source were isolated. 14 microorganisms which were bacteria were isolated from these samples. The variations of aromatic compounds concentration were measured by gas chromatography methods. Two microorganisms that called A-3 and A-14 could remove more amounts of aromatic components, respectively about 89 and 86 percent. Also A-14 was identified as pseudomonas aerogenusa. Some other researchers had described the ability of this kind of bacteria for degrading oil compounds before.

Keywords: Aromatic Compounds, Crude Oil, Biodegradation, Pseudomonas Aerogenusa, Pure Culture.

۱- مقدمه

توسعه روز افزون استفاده از مواد شیمیایی در تولیدات صنعتی مقادیر زیادی ضایعات شیمیایی خطرناک تولید کرده است. این ترکیبات اغلب منجر به آلودگی محیط زیست می شوند [۷]. امروزه بیش از ۷۰۰۰۰ نوع مواد شیمیایی آلی بطور عمومی مصرف می شوند، که از این تعداد تنها اثرات کمی از آنها بر سلامت بشر و محیط زیست مورد آزمایش و سنجش قرار گرفته است [۸]. هیدروکربن های نفتی یک دسته از این آلاینده های خطرناک محیط هستند که بر اساس فعالیتهای مختلف در محیط زیست تجمع می یابند [۹]. آنها یکی از مهمترین آلاینده های محیط محسوب می شوند [۱۰]. سالانه بیش از دو میلیون تن نفت در جهان تولید می شود که در حدود ۱۰ درصد از آنها در اثر حوادث مختلف از قبیل شکستن خطوط انتقال و یا نشت از تانکهای ذخیره وارد محیط زیست می شوند [۱۱]. برابر گزارش های ارائه شده تا سال ۱۹۹۸ حدود ۷۵۰۰۰۰ تانک ذخیره زیر زمینی در ایالات متحده آمریکا وجود داشت که از این تعداد حدود ۳۰۰۰۰۰ تانک نشت می کرد و هر سال ۳۰۰۰۰ تانک نشت کننده به این تعداد افزوده می شود. بیش از نیمی از این تانک ها برای ذخیره هیدروکربن های نفتی به کار می روند. هیدروکربن های نفتی اغلب سمی هستند و دفع و یا تخلیه آنها به محیط زیست مشکلات زیادی را به وجود می آورد. این ترکیبات در قبال تجزیه زیستی مقاوم بوده و ممکن است به دلیل جابجایی و انتقال وارد آبها شوند و خطرات زیادی را برای محیط زیست به وجود آورند [۱۱]. یکی از اجزای ترکیبات نفتی، هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای هستند. در کشورهای صنعتی و نیمه صنعتی به جز تانکهای نشت کننده زیرزمینی، منابع اصلی آلودگی به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای واکنش های احتراقی هستند [۹]. از انجا که ضریب اکتانول – آب ترکیبات هیدرو کربنی آروماتیک چند حلقه ای بالا و حلالیت آنها در آب کم است در رسوبات تجمع می کنند به طوری که خاک و یا رسوبات ممکن است به عنوان محل ذخیره این ترکیبات ذکر شوند [۹ ، ۱۲]. بسیاری از ترکیبات چند حلقه ای موجود در نفت خام مانند نفتالین و فناترین در حشره کش ها، قارچ کش ها، پاک کننده ها و رنگ ها نیز وجود دارند. اغلب این ترکیبات دارای خواص نامطلوب سمی، موتاژن و یا سرطانزایی هستند [۱۳ ، ۱۴]. لذا بازیافت، تصفیه و دفع این مواد شیمیایی سمی اهمیت زیادی دارد. در دهه اخیر اصلاح زیستی از یک فناوری ناشناخته رشد کرد به طوری که در حال حاضر یکی از فناوری های اصلی برای رفع آلودگی به شمار می رود. توسعه روز افزون این روش مربوط به هزینه کمتر و کارائی بیشتر آن نسبت به سایر فناوری های موجود است [۱۵]. چون هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ترکیباتی با حلالیت پایین هستند قابلیت دسترسی زیستی به آن ها کم بوده، بنابر این نیاز به توسعه فرایند اصلاح زیستی مطرح می شود [۱۴]. هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای موجود درنفت خام بر روی سلامت انسان اثرات سمی دارند که این اثرات از طریق در معرض ماده آلوده قرار گرفتن (غبار آلوده، دود، مانند دوده سیگار و...)، خوردن غذای آلوده و یا از طریق تماس پوستی با محصولات نفتی جذب بدن می شوند [۱۲]. **محققین زیادی به بررسی نحوه حذف ترکیبات نفتی و آروماتیکی از محیط پرداخته اند. بطور مثال طلایی و همکاران در سال ۱۳۸۸ طی مطالعه ای موفق به جداسازی میکروارگانیسم هایی شدند که قادر بود حدوداً ۹۰ درصد نفت خام را در مدت زمان ۵ روز تجزیه نماید [۱۷]. همچنین آنها در مطالعات بعدی خود نیز موفق به، بکارگیری میکروارگانیسم های مذکور در تجزیه گازوئیل شدند [۱۶]. لی[1] و همکارانش [۵] در مطالعه ای بر روی تجزیه بیولوژیکی فاضلابهای تولیدی در مناطق نفت خیز 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 میکروارگانیسم ها لی توانست ۸۵٪ نفت خام موجود در این گونه پس آبها را در مدت زمان ۷ روز**

[1] Li

تجزیه نماید. تلز[1] 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[2] برای افزایش قابلیت میکروارگانیسم های موجود در لجن فعال برای تجزیه ترکیبات نفتی استفاده نمود. وی موفق شد در مدت زمان ۲۰ روز ۹۸٪ کل ترکیبات نفتی موجود در این پس آبها را تجزیه نماید [۱۸]. دیبل[3] و همکارش بارتا[4] 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 میکروارگانیسم های نفت خوار می باشد ولی نیتروژن و فسفر کافی را در اختیار ندارد[۱۹]. ویرا[5] و همکارانش نیز در مطالعه‌ای به مقایسه تجزیه بیولوژیک گازوئیل توسط دو دسته از میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک دریاچه ای که حاوی مقادیر زیادی از گازوئیل بود پرداختند. آنها موفق به حذف ۹۰٪ گازوئیل موجود در آب در مدت زمان ۴۰ روز شدند و در ادامه کار بهینه سازی شرایط رشد این میکروارگانیسم ها را نیز انجام دادند [۲۰].

هدف از انجام این مطالعه جداسازی میکروارگانیسمی می باشد که بدون نیاز به مرحلهٔ سازگار سازی قادر به تجزیهٔ ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام شناور بر روی آب باشند. بنابر این از مناطقی که میکروارگانیسم ها سالها در تماس با ترکیبات نفتی بوده اند نمونه برداری شد و میکروارگانیسمهای موجود در آن که قادر به استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن خود بودند جداسازی و خالص سازی گردید و بررسیهای مختلف شیمیایی و میکروبیولوژی بر روی آنها به منظور مشخص نمودن کارائی شان در تجزیه ترکیبات آروماتیک به انجام رسید. در نهایت میکروارگانیسمس که در این مطالعه بیشترین کارائی را در تجزیه ترکیبات آروماتیک دارا بود انتخاب و شناسایی گردید.

۲- مواد و روشها

۲-۱- نمونه برداری

در این مطالعه از چهار نقطه شامل: (۱) فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران، (۲) خاک آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تهران، (۳) فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران که مشخصاً به نفت خام هم آلوده بود، (۴) خاک اطراف محل تخلیه بنزین و گازوئیل در یک پمپ بنزین در شهر اهواز، نمونه برداری شد. **نمونه برداری خاک از عمق ۵ سانتیمتری صورت گرفت. مقدار نمونه برداشت شده از خاک حدوداً ۱۰۰ گرم و نمونه برداشت شده از فاضلاب یک لیتر بود.** تمام نمونه ها در ظروف شیشه ای استریل در کنار یخ تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شدند [۱].

۲-۲- جدا سازی میکروارگانیسم ها

میکروارگانیسم ها برای متابولیسم خود نیازمند عناصر مختلفی می باشند که به عناصر اصلی (منبع کربن، نیتروژن، فسفر و...)، عناصر فرعی (کلسیم، منیزیم و...) و عناصر جزئی "(روی، کروم و...) تقسیم

---
[1] Tellez
[2] Adaptation
[3] Dibble
[4] Bartha
[5] Vieira

بندی می گردند. در این مطالعه از ترکیبات زیر **در قالب یک محیط کشت** برای تامین مواد مغذی مورد نیاز رشد باکتریها استفاده گردید. **محیط کشت زیر با فرمولاسیون ذکر شده در این مطالعه "محیط کشت معدنی" نامیده شد.** کلیه این مواد در آب مقطر دوبار تقطیر حل گردیدند. ۰/۱ گرم در لیتر $MgSO_4$، ۰/۵ گرم در لیتر KH_2PO_4، ۰/۰۱ 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 اضافه شد و pH نمونه به کمک محلول هیدروکسید سدیم بر روی ۷/۲ تنظیم گشت [۱].

در ۵ ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت معدنی ریخته و یک میلی لیتر نفت خام به عنوان تنها منبع کربن به هر ارلن مایر اضافه گردید. یک میلی لیتر از هر نمونهٔ فاضلاب به صورت جداگانه در ارلن مایرها ریخته شد و ارلن مایر در یک شیکر انکوباتور با سرعت هوادهی ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت.

نمونه های خاک **نیز** پس از مخلوط شدن با یکدیگر و انحلال ۵ گرم از آن در ۱۰۰ میلی لیتر آب و قرار گرفتن بر روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، برای مدت زمان ۱۰ دقیقه در یک مکان آرام جهت ته نشین شدن ذرات درشت خاک قرار گرفت. پس از مدت زمان ذکر شده ۱ میلی لیتر از مایع زلال رویی به ارلن مایر۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی استریل انتقال یافت و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

مطالعات میکروسکوپی که با کمک تهیه لام مرطوب از نمونه ها و با کمک یک میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر انجام پذیرفت رشد تعداد قابل توجهی از میکروارگانیسم ها را در ارلن مایرهای فوق نشان داد [۱].

۲-۳- خاص سازی میکروارگانیسم ها

برای خالص سازی میکروارگانیسم ها در این مطالعه از دو محیط کشت نوترینت آگار برای جداسازی باکتریها و محیط کشت PDA[1] برای جداسازی قارچها و مخمرها استفاده گردید [۱]. با کمک لوپ آزمایشگاهی و در شرایط استریل ۰/۱ میلی لیتر از محتوای ارلن مایرهای حاوی میکروارگانیسم های کشت داده شده در محیط کشت معدنی که در بخش ۲-۲ توضیح داده شد را به میحطهای جامد نوترینت آگار و PDA منتقل شد. محیط نوترینت آگار به مدت ۴۸ ساعت و محیط PDA به مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. **پس از گذشت مدت زمانهای ذکر شده پلیت های حاوی محیط کشت و میکروارگانیسم های رشد کرده بر روی آن از انکوباتور خارج و با کمک روش کشت خطی در محیط کشت نوترینت آگار و با پاساژهای متناوب خالص سازی میکروارگانیسم های رشد نموده بر روی محیطهای ذکر شده انجام شد [۳]. لازم به ذکر است که برای خالص سازی میکروارگانیسم ها، بایستی از تک کلنی های ایجاد شده در محیط کشت که با کمک کشت خطی ایجاد می گردند، میکروارگانیسمها برداشت شده (توسط لوپ آزمایشگاهی) و به محیط کشت نوترینت آگار جدید انتقال یابد. این عمل تا بدست آوردن کلنی های خالص ادامه می یابد.** در نهایت از میکروارگانیسم های خالص سازی شده اسلنت تهیه شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای نگهداری طولانی مدت میکروارگانیسم های خالص سازی شده هر ۴ ماه پس از فعال سازی مجدد به اسلنت جدید منتقل می شدند.

[1] Potatoes Dextrose Agar

۲-۴- بررسی کارائی میکروارگانیسمها در تجزیهٔ ترکیبات آروماتیک نفت خام

در ابتدا برای در دست داشتن میکروارگانیسم کافی از محیط کشت نوترینت براث استفاده گردید. مقدار اندکی از هر میکروارگانیسم موجود بر روی اسلنتها به ارلن مایرهایی ۲۵۰ میلی لیتری جداگانه حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت تونرینت براث تلقیح شد و به مدت ۲۰ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از این مدت زمان میکروارگانیسم کافی برای انجام ادامهٔ آزمایش ها تولید شد. ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی هر یک از این میکروارگانیسم ها به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی منتقل شد و نهایتاً به هرکدام از آنها ۱ میلی لیتر نفت خام اضافه شد. این ارلن مایر ها در یک شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجهٔ سانتیگراد برای مدت زمان ۱۵ روز قرار گرفتند [۱]. **جهت کسب نتایج دقیق تر به ازاء هر ارلن مایر حاوی محیط معدنی، نفت و میکروارگانیسم یک ارلن مایر شاهد با همان شرایط ولی بدون میکروارگانیسم در شیکر انکوباتور قرار گرفت.**

پس از پایان ۱۵ روز نفت خام باقی مانده در ارلن مایرها به کمک **اضافه نمودن ۲۵ میلی لیتر** تتراکلرید کربن به ارلن مایر ها **و قرار دادن آنها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه** استخراج گردید. **سپس جداسازی دو فاز تتراکلریدکربن حاوی نفت خام و محیط کشت معدنی به کمک قیف جداکننده (دکانتور) انجام پذیرفت. در نهایت فاز حلال جدا شده پس از سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه برای جداسازی میکروارگانیسم ها و مواد معلق و رقیق سازی به میزان ۱۰۰ برابر به کمک روش اسپکتروفتومتری و در طول موج ۲۵۴ نامومتر برای تعیین میزان مواد آروماتیک موجود در آن مورد بررسی قرار گرفت [۱]. در نهایت برای تعیین دقیق مقدار حذف کل ترکیبات نفتی (TPH) و در کنار آن ترکیبات آروماتیک از روش کروماتوگرافی گازی (GC) نیز برای برخی نمونه ها که توانایی بالایی از خود جهت حذف ترکیبات نفتی نشان داده بودند استفاده شد.**

۲-۵- بررسی تولید بیوسورفکتانتها

در این مرحله از آزمایش ها برای تعیین امکان تولید بیوسورفکتانتها از آزمونهای پراکندگی نفت[1] و آزمون شاخص امولسیون سازی (E24) طبق روشهای استاندارد ذکر شده توسط منابع مختلف استفاده گردید [۱، ۲]. **برای انجام این آزمونها ابتدا میکروارگانیسم ها به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی که نفت خام به عنوان تنها منبع کربن آنها در نظر گرفته شده است اضافه شد. سپس ارلن مایرها به مدت ۱۵ روز در شیکر انکوباتور قرار گرفته و پس از آن آزمون پراکندگی نفت بر روی آنها انجام شد. برای انجام آزمون پراکندگی نفت ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت موجود در ارلن مایرهای فوق بوسیله‌ی سمپلر برداشته شد. ۵۰ میلی لیتر آب مقطر در داخل یک پلیت بزرگ ریخته شد و سپس ۲۰ میلی لیتر نفت خام به سطح آن افزوده گردید. در ادامه نمونه‌ی برداشته شده از محیط کشت بر روی سطح نفت ریخته شد. پخش شدن محیط کشت بر روی سطح روغن معیاری از وجود ترکیبات فعال سطحی در محیط کشت است. برای این آزمون یک محیط شاهد با آب مقطر نیز در نظر گرفته شد (به جای ۱۰ میلی لیتر محیط کشت از آب مقطر استفاده شد) که با مقایسه نمونه محیط کشت و نمونه شاهد می توان به وجود سورفکتانت ها در محیط پی**

[1] Oil Spreading

برد [۱]. کلیه میکروارگانیسم های جدا شده در این آزمون موفق بودند، که این امر نشانه تولید بیوسورفکتانتها توسط کلیه میکروارگانیسم ها بود.

میکروارگانیسم هایی که در این آزمون موفق بودند در مرحله بعد مورد آزمایش تعیین شاخص امولسیون سازی قرار گرفتند. جهت انجام آزمون شاخص امولسیون سازی ۲ میلی لیتر از محتویات هر ارلن مایر در یک لوله آزمایش جداگانه، محتوی ۲ میلی لیتر نفت سفید ریخته شده و به مدت ۳ دقیقه تحت ورتکس[1] شدید قرار گرفت. سپس این لوله به مدت ۲۴ ساعت بی حرکت مانده و پس از آن ارتفاع لایه امولسیون به کل ارتفاع لوله محاسبه گردید و به عنوان شاخص امولسیون سازی گزارش شد [۱].

۲-۶- بررسی میکروارگانیسم ها

در این مطالعه از میکروسکوپ المپیوس[2] مدل CH40 با قابلیت ایجاد زمینه‌ی تاریک[3] و عکس برداری برای بررسی میکروارگانیسم های خالص سازی شده استفاده گردید. در این مطالعه پس از انجام آزمون گرم، میکروارگانیسم ها مورد بررسی مورفولوژی قرار گرفتند [۱]. در **نهایت با انجام آزمایش های ویژه که توسط آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان انجام پذیرفت نوع میکروارگانیسم مشخص گردید. آزمایش های انجام شده جهت شناسایی میکروارگانیسم عبارت بودند از آزمون کاتالاز، آزمون گرم، آزمون اکسیداز، آزمون امکان رشد در شرایط بی هوازی، تعیین مشخصات مرفولوژی کلنی های رشد کرده بر روی محیط کشت جامد، آزمون تولید پیگمان رنگی در دماهای بالا، آزمون قابلیت حل پیگمانهای رنگی تولید شده در آب، اسید استیک و کلرفرم، آزمون امکان تولید هیدروژن سولفید و بررسی رشد میکروارگانیسم در محیط کشت مایع (نوترینت براث)** [۳، ۱].

۲-۷- روشهای آزمایشگاهی

در این مطالعه برای سنجش ترکیبات آروماتیک از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۵۴ نانومتر استفاده شد که در برخی از کتب مرجع همچون کتاب روشهای استاندارد برای تعیین غلظت ترکیبات آروماتیک توصیه شده است [۱]. منحنی کالیبراسیون رسم شده در طول موج ۲۵۰ نانومتر $y = 0.2104x + 0.2204$ بود. سنجش میزان جذب با کمک یک دستگاه اسپکتروفتومتر JascoV-570 با طول موج قابل تنظیم ۱۹۰ الی ۲۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. همچنین برای تعیین pH از pH متر دیجیتال استفاده گردید.

پس از انجام آزمایش های تعیین کارائی میکروارگانیسم ها در حذف ترکیبات آروماتیک به روش اسپکتوفتومتری، یک نمونه از میکروارگانیسمی که بیشترین میزان حذف ترکیبات آروماتیک را دارا بود به همراه نمونه شاهد آن به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی جهت تعیین کل ترکیبات نفتی نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. برای انجام این بخش از آزمایش از یک دستگاه کارماتوگرافی گازی ساخت شرکت واریان[4] مجهز به یک ستون موئین[5] غیر قطبی CP SIL8 و آشکار ساز[6] FID[7] استفاده گشت. کل مدت زمان آزمایش بر روی ۳۰ دقیقه

---

[1] Vortex
[2] Olympus
[3] Dark Field
[4] Varian
[5] capillary
[6] Detector
[7] flame ionization detector

تنظیم گشت. دمای ستون برای ۳ دقیقه بر روی ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداشته شد و پس از آن دما با نرخ ۱۵ درجه بر دقیقه تا دمای ۳۰۰ درجه سانتیگراد افزایش یافت و برای ۵ دقیقه در این دما باقی ماند. بعد از آن مجدداً دما با نرخ ۱۵ درجه بر دقیقه تا رسیدن دما به ۳۲۵ درجه سانتیگراد افزایش یافت و تا پایان مدت زمان آزمایش در همان دما باقی ماند. گاز حامل[1] در این آزمایش نیتروژن بود. دمای اینجکتور[2] و آشکار ساز به ترتیب ۳۲۵ درجه سانتیگراد و ۲۸۵ درجه سانتیگراد بود.

۳-نتایج و بحث

۳-۱- مشخصات میکروارگانیسم های خالص سازی شده

در این مطالعه ۱۴ میکروارگانیسم از منابع نمونه برداری شده بدست آمد که نتایج بررسیهای میکروسکوپی و آزمایش گرم بر روی آنها در جدول ۳-۱ نمایش داده شده است. همانطور که در جدول ۳-۱ مشخص است بیشتر میکروارگانیسم های خالص سازی شده گرم منفی بوده و تعداد میکروارگانیسم های گرم مثبتی که توانایی رشد در برابر نفت خام را داشته باشند در نمونه های گرفته شده به مراتب کمتر بود. کلیه میکروارگانیسم های جدا سازی شده پس از انجام مطالعات میکروسکوپی به عنوان باکتری شناسایی شدند. **با وجود انجام تحقیقات مختلفی بر روی کاربرد قارچها و مخمرها در تجزیه ترکیبات نفتی در این مطالعه** بر روی هیچکدام از محیطهای کشت مخمر و یا قارچی که توانایی رشد در برابر ترکیبات نفتی را داشته باشد رشد نکرد [۱]. همان طور که در این جدول مشخص است ۸ عدد از باکتری های بدست آمده میله ای و مابقی کروی بودند. برخی دیگر از محققین نیز موفق به جداسازی میکروارگانیسمهایی برای تجزیه ترکیبات آروماتیک شدند. بطور مثال رضایی و همکارانش در مطالعات خود موفق به جداسازی تعدادی میکروارگانیسم به کمک محیطهای کشت فوق الذکر گردیدند که توانایی تجزیه برخی از ترکیبات آروماتیک را داشتند [۴].

جدول ۳-۱ مشخصات باکتریهای بدست آمده در مطالعه

شماره	محل برداشت نمونه	نوع محیط کشت	شکل باکتری	رنگ کلنی	آزمون گرم
۱	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	PDA[3]	میله ای	زرد	-
۲	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	صورتی	+
۳	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	PDA	میله ای	سبز	-
۴	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	میله ای	قرمز کم رنگ	+
۵	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	قهوای باز	-
۶	نمونه خاک پالایشگاه تهران	محیط معدنی	کروی	سفید	-
۷	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	کروی	سبز فسفری	-
۸	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	PDA	کروی	نارنجی	-
۹	خاک پمپ بنزین	PDA	کروی	قهوای کم رنگ	+
۱۰	خاک پمپ بنزین	PDA	میله ای	قهوای با کلنی بزرگ	-
۱۱	فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	سفید	-
۱۲	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	سفید	-
۱۳	فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران	محیط معدنی	میله ای	زرد	+
۱۴	خاک پمپ بنزین	PDA	میله ای	قهوه ای پر رنگ	-

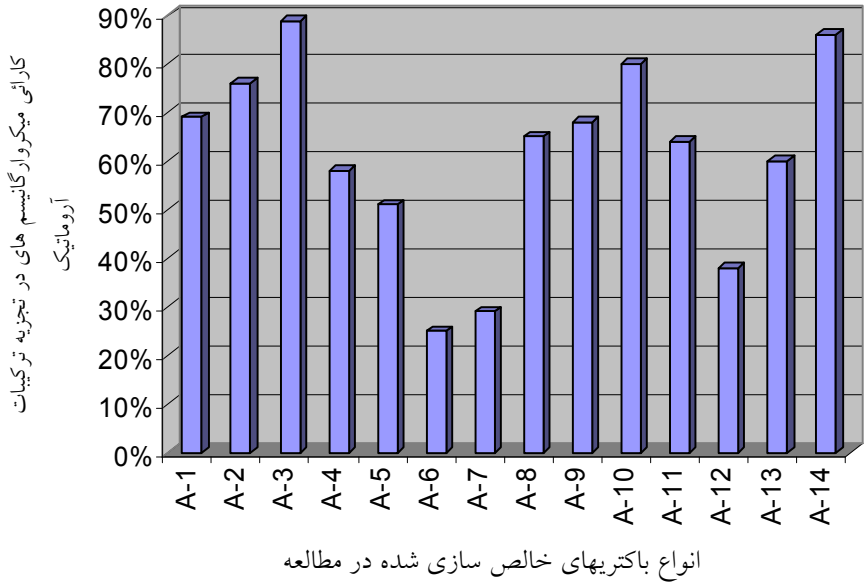
[1] Carrier Gas
[2] Injector
[3] Potato dextrose agar

۳-۲- تعیین کارائی میکروارگانیسم ها

نتایج تعیین کارائی باکتریها در نمودار شکل ۳-۱ نمایش داده شده است. همان طور که در این نمودار مشاهده می گردد باکتری A-۳ و A-۱۴ بیشترین کارائی را در تجزیه ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام دارا بود و این کارائی به ترتیب عبارت بود از ۸۹ و ۸۶ درصد. همان طور که نمودار شکل ۳-۱ مشخص است ۵ نمونهٔ دیگر از باکتریها قادر بودند بیش از ۶۰ درصد ترکیبات آروماتیک را تجزیه نمایند. راندمان تجزیهٔ ترکیبات آروماتیک توسط A-۳ و A-۱۴ تقریباً یکسان بود. **با توجه به بالا بودن نرخ تجزیه ترکیبات آروماتیک توسط میکروارگانیسم A-۱۴ این میکروارگانیسم برای شناسایی و بررسی های تکمیلی انتخاب گردید. باکتری A-۱۴ که دارای بیشترین توانایی در تجزیه بیولوژیک نفت خام بود از خاک جدا شده بود و یک باکتری میله ای و گرم منفی بود. تست اکسیداز و کاتالاز این باکتری نیز مثبت بود. این باکتری در شرایط بی هوازی قادر به رشد نبود. این امر نشانگر هوازی مطلق بودن این باکتریست. وسط کلنی های حاصل از رشد این میکروارگانیسم بر روی محیط نوترینت آگار کمی برآمده تر و اطراف آنها نامنظم بود. پس از گذشت سه روز از انکوباسیون کلنی های رشد کرده بر روی محیط نوترینت آگار پیگمانهای سبز رنگی را در اطراف کلنی ها تشکیل دادند. این پیگمان در اثر تماس با آب و اسید استیک از محیط کشت جامد شسته شد ولی کلرفرم تاثیری برروی این پیگمان نداشت. در اثر رشد این میکروارگانیسم در محیط نوترینت براث کدورتی یکنواخت در تمام محیط کشت ایجاد می گردید و تولید بوی مطبوعی می نمود. همچنین این میکروارگانیسم قادر به تولید هیدروژن سولفید نیز نبود.** مشخصات فوق مختص گونه سودوموناسها آئروژنوزا می باشد [۱].

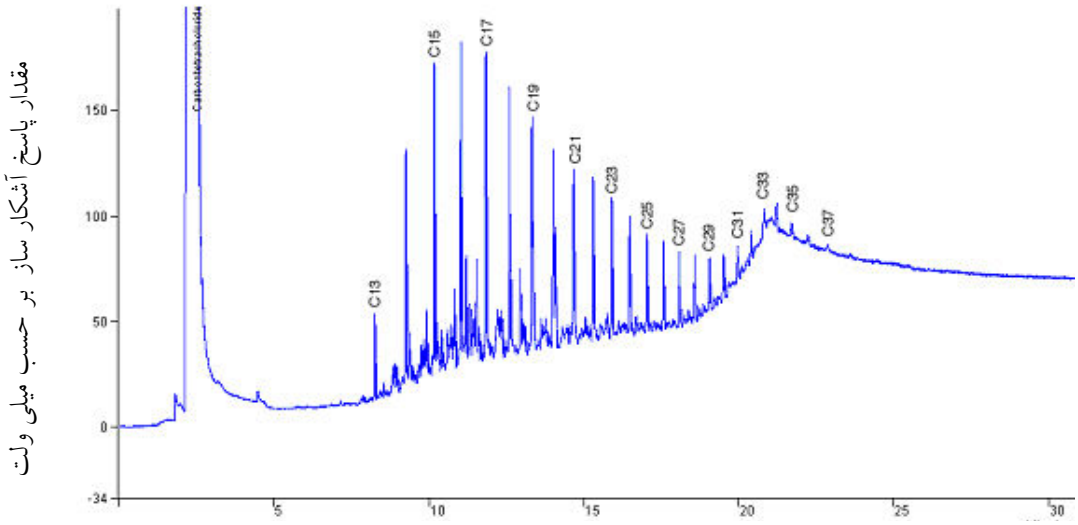
سودوموناس آئروژنوزا یکی از میکروارگانیسم های مهم در ایجاد عفونت های بیمارستانی است و می تواند منجر به مرگ بیماران نیز گردد. لیکن ممکن است این میکروارگانیسم به مرور زمان به دلیل قرار گیری در محیط متفاوت با بدن انسان و یا بیمارستان دچار تغییرات ژنتیکی زیادی شده باشد. لذا این امر می تواند در تحقیقات بعدی محققین جهت ادامه این تحقیق در نظر گرفته شود و با کمک تکنولوژی های نوین توالی ژنتیکی میکروارگانیسم جدا شده در این مطالعه بررسی و با سودوموناس آئروژنوزای ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی مقایسه گردد [۱].

تعداد زیادی از محققین موفق به جداسازی سودوموناس ائروژنوس برای تجزیهٔ برخی از ترکیبات نفتی شده اند. بطور مثال لی و همکاران این میکروارگانیسم را از آبهای خارج شده به همراه نفت خام از مخازن نفتی جدا نمودند. آنها با کمک این میکروارگانیسم ۸۰ درصد نفت خام محلول در آب را تجزیه نمودند [۵]. یکی از برتریهای این مطالعه نسبت به مطالعهٔ لی و همکارانش تجزیهٔ ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام شناور بر روی آب بود که کمتر محققی به این امر پرداخته است. **در مطالعات مشابه انجام پذیرفته، اغلب محققین به بررسی تجزیه بخش محلول شده نفت خام و یا قطرات کوچک نفتی موجود در فاضلابهای آلوده به نفت پرداخته اند لیکن در این مطالعه به بررسی تجزیه نفت خام شناور بر روی آب در غلظتهای بالا پرداخته شده است** [۱]. **لیانگ و همکارانش نیز در مطالعه خود به بررسی تجزیه ترکیبات نفتی با کمک سودوموناس آئروژنوزا پرداختند و در گزارشات خود امکان تجزیه ترکیبات نفتی را توسط این میکروارگانیسم تایید نمودند** [۶].



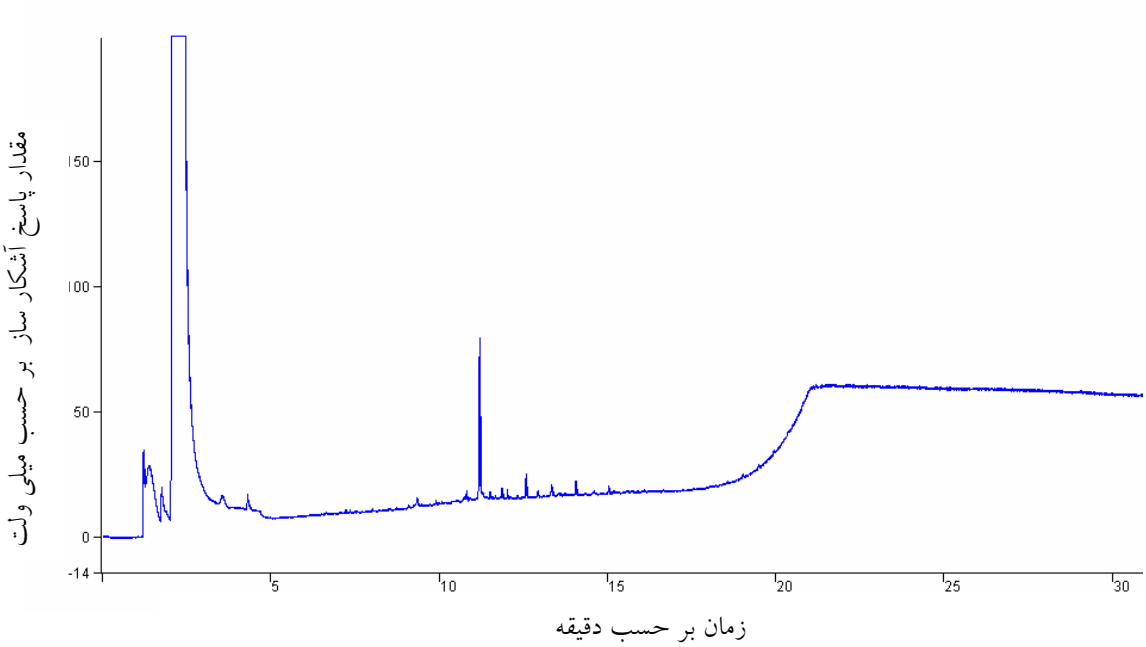
شکل ۳-۱ نمودار نتایج قابلیت باکتریها در تجزیه ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام شناور

در ادامهٔ مطالعه برای تعیین صحت آزمایش های انجام شده با روش اسپکتروفتومتری و همچنین تعیین تجزیه احتمالی سایر بخشهای نفت خام از دستگاه کارماتوگرافی گازی جهت مشخص نمودن کارائی میکروارگانیسم سودوموناس آئروژنوزا در تجزیهٔ کل ترکیبات نفتی (TPH) استفاده گردید زیرا بخشی از TPH را هیدروکربن ها آروماتیک تشکیل می دهند. نتایج این آزمایش در شکل ۳-۲ و ۳-۳ نمایش داده شده است. در شکل ۳-۲ نتیجهٔ آزمایش نمونهٔ شاهد و در شکل ۳-۳ نتیجهٔ نمونهٔ تجزیه شده با سودوموناس آئروژنوس نمایش داده شده است. **روش به کار گرفته شده در انجام آزمایش کروماتوگرافی گازی منجر به نمایش ملکولهای ۱۰ کربنه الی ۴۰ کربنه در نمونه ورودی می شد. بزرگترین و اولین پیک نمایش داده شده در شکل ۳-۲ حلال استفاده شده برای جدا سازی فاز آلی (تتراکلرید کربن) از محیط کشت می باشد و سایر پیک های ایجاد شده مربوط به بخشهای مختلف نفت خامی می باشد که در نمونه شاهد موجود بوده است. همان طور که مشخص است بسیاری از پیک های موجود در نمونه شاهد در شکل ۳-۳ کاملاً محو و یا بسیار کاهش یافته است. این امر نشان دهنده مصرف بخش عمده ای از نفت خام توسط سودوموناس آئروژنوزا می باشد. تلز و همکارانش نیز در مطالعه خود موفق به تجزیه ۹۸٪ نفت خام موجود در آبهای خروجی از چاههای نفت شدند که فقط حاوی بخش محلول شده نفت خام و قطرات کوچک نفتی بود. آنها از راکتور لجن فعال با یک دوره سازگار سازی ۱۰ روزه برای مطالعه خود استفاده نمودند. لیکن در مطالعه آنها از غلظت نفت ورودی کمتری به راکتور در مقایسه با مطالعه حاضر استفاده شده بود. همچنین در مطالعه حاضر نیازی به طی مرحله سازگارسازی نیز نیست که این خود یکی از برتریهای این مطالعه است.**



زمان بر حسب دقیقه

شکل۳-۲ نتیجهٔ ازمون کارماتوگرافی گازی در نمونهٔ شاهد



زمان بر حسب دقیقه

شکل۳-۳ نتیجهٔ ازمون کارماتوگرافی گازی در نمونهٔ تجزیه شده توسط سودوموناس آئروژنوزا

همانطور که در این شکلها مشخص است سودوموناس آئروژنوزا تقریباً قادر به مصرف کلیهٔ بخشهای نفت خام به عنوان منبع کربن خود بوده است و تجزیه نفت خام توسط این میکروارگانیسم محدود به طیف خاصی از ترکیبات نفتی موجود در نفت خام نمی گردد.

۳-۳- آزمون های تولید بیوسورفکتانت

میکروارگانیسم ها با تولید آنزیم هایی خاص باعث ایجاد قطرات بسیار ریزی از توده های بزرگ نفت می شوند. این آنزیم ها را اصطلاحاً بیوسورفکتانت می نامند. بیوسورفکتانتها باعث ایجاد سطح تماس بیشتر بین میکروارگانیسم ها و نفت شده باعث افزایش سرعت تجزیه ترکیبات نفتی می شوند. میزان کارائی بیوسورفکتانت تولیدی با کمک آزمایش های مختلفی از قبیل آزمون پراکندگی نفت و E24 مشخص می گردد [۱]. در این مطالعه از دو آزمون E24 و آزمون پراکندگی نفت برای تعیین امکان تولید بیوسورفکتانتها توسط میکروارگانیسمهای خالص سازی شده استفاده گردید. **آزمون پراکندگی نفت آزمونی کیفی بود که کلیه میکروارگانیسم های جدا شده در این مطالعه در آن موفق بودند. این امر نشانگر تولید مقادیر هرچند اندک توسط کلیه میکروارگانیسم ها بود. پس از آن کلیه میکروارگانیسم ها توسط آزمون کمی E24 برای تعیین شاخص امولسیون سازی تحت بررسی قرار گرفتند که نتایج آنها در جدول ۳-۲ نمایش داده شده است.** همانطور که از این جدول مشخص است باکتریهای A-۱۴ و A-۳ که بیشترین مقدار تجزیهٔ ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام را ارائه دادند تنها قادر به ۱۲ درصد تولید شاخص امولسیون سازی بودند **و باکتری A-۱۲ قادر به تولید بیشترین میزان شاخص امولسیون سازی (۳۶٪) بود.**

برخی از محققین همچون لیانگ و همکاران در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که وجود ترکیبات سورفکتانتی[1] برای شروع تجزیه ترکیبات نفتی لازم و ضروری است **و بعضاً اضافه نمودن سورفکتانت سنتزی برای شروع تجزیه بیولوژیکی لازم می گردد** [۶]. همان طور که از نتایج ارائه شده در جدول ۳-۲ مشخص است کلیه میکروارگانیسم های جدا شده در این تحقیق قادر به تولید بیوسورفکتانت بوده و برای شروع تجزیهٔ بیولوژیکی نیازی به اضافه نمودن سورفکتانتهای سنتزی به محیط کشت نبوده است که این امر نیز یکی دیگر از برتریهای این مطالعه **نسبت به سایر مطالعات قبلی** بوده است.

جدول ۳-۲ میزان شاخص امولسیون سازی میکروارگانیسم های مختلف در این مطالعه

نام باکتری	A-۱۴	A-۱۳	A-۱۲	A-۱۱	A-۱۰	A-۹	A-۸	A-۷	A-۶	A-۵	A-۴	A-۳	A-۲	A-۱
شاخص امولسیون سازی	٪۱۲	٪۲۸	٪۳۶	٪۴	٪۱۱	٪۲۴	٪۱۶	٪۲۰	٪۲۰	٪۱۲	٪۸	٪۱۶	٪۱۲	٪۱۶

۴- نتیجه گیری نهایی

در این مطالعه ۱۴ میکروارگانیسم که همگی توانایی تجزیه ترکیبات آروماتیک را داشتند از محیطهایی که برای سالها به ترکیبات نفتی آلوده بوده اند و میکروارگانیسم های موجود در آن با مصرف اینگونه ترکیبات سازگار شده اند جداسازی شد. در این مطالعه یافته های زیر بدست آمد:

- با وجود انجام تحقیقات زیاد در زمینه استفاده از قارچها و مخمرها در تجزیه ترکیبات نفتی، میکروارگانیسمهای جدا شده در این مطالعه همگی باکتری بودند و **احتمالاً** محیطهای کشت مورد استفاده برای جداسازی قارچها یا مخمرهای احتمالی موجود در نمونه های گرفته شده مناسب نبوده است **و یا**

[1] Surfactant

مخمرها و قارچهای موجود در نمونه ها توانایی لازم در زمینه استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن را نداشته اند.

- میکروارگانیسم A-۱۴ پس از مطالعات میکروب شناسی به عنوان سودوموناس آئروزنوزا شناسایی گردید **که محققین مختلف نیز موفق به جداسازی آن از سایر محیطهای آلوده و کاربرد آن در تجزیه برخی برشهای نفتی شده بودند. البته لازم به ذکر است که استفاده از کشت های خالص میکروارگانیسم ها در صنعت بعضاً مشکل بوده و نیازمند تحقیقات بیشتر در مقیاس های نیمه صنعتی و در نهایت صنعتی می باشد.**
- کلیهٔ میکروارگانیسمهای جدا شده در این مطالعه توانایی تولید بیوسورفکتانتها را داشته و می توانستند بدون نیاز به اضافه نمودن سورفکتانت سنتزی به محیط تجزیهٔ ترکیبات آروماتیک را شروع نمایند. این در حالی است که برخی از محققین اضافه نمودن ترکیبات سریع تجزیه شونده همچون گلسیرین و یا سورفکتانتهای سنتزی را برای شروع فرایند تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی لازم دانسته اند.
- با توجه به نتایج آزمایش های کروماتوگرافی گازی (GC)، سودومانس آئروژنوزای جدا شده در این مطالعه علاوه بر توانایی تجزیهٔ ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام، توانایی تجزیهٔ تقریباً کلیهٔ بخشهای نفت خام را نیز داشت.
- **استفاده از میکروارگانیسم های جدا شده در این مطالعه در تصفیه فاضلابهای آلوده به ترکیبات نفتی می تواند منجر به حذف مرحله سازگار سازی میکروارگانیسم ها در تصفیه خانه های صنعتی گردد. این امر در مرحله راه اندازی تصفیه خانه های صنایع نفتی اهمیت بسیاری می یابد و منجر به کاهش زمان مورد نیاز در به حداکثر رساندن راندمان تصفیه و جلوگیری از آلودگی محیط زیست می گردد.**

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از همکاری صمیمانه گروه مهندسی شیمی دانشگاه اصفهان و گروه مهندسی عمران و محیط زیست موسسه آموزش عالی جامی کمال تشکر را دارند.

منابع:

1- A.R.Talaie., Parametric Study of Petroleum Compounds Biodegradation Using Microorganisms, M.Sc Thesis of: Environmental Engineering, Scince and Research University Branch-Ahvaz, 2008.

2- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of Bacillus subtilis, J. of Indus. Microb. & Biotech., 1998; Vol. 20, p.48–52,.

3- Bisher, L., practical microbiology, firs publishes, Tehran university publication, 1992.

4-Rezaee kalantari, R., Evaluation of humus on the bioremediation of soil contaminated by oily hydrocarbons, Tarbiat modares Univ, 2003.

5- 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.

6- Liang, Z. G., Wu Yue-Ting, Qian Xing-Ping and Meng Qin, "Biodegradation of Crude by Pseudomonas Aeruginosa in the Presence of Rhamnolipids," journal of Zhejiang University Science, 2005; 6B(8), 725-730,

7- Rittman, B.E. and McCarty, P.L., Environmental Biotecnology principles and application, McGraw-HILL. Singapore, 2001.

8- Juhasz, A.L. and Naidu, R., Bioremedition of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000; 45: 57-88.

9- Dobler, R., Saner, M. and Bachofen, R., Population changes of soil microbial communities induced by hydrocarbon and heavy metal contamination, Bioremediation J., 2000; 4(1): 41-56

10- Ewies, J.B., Ergas, S.J., Chang, D.P.V. and Schroeder, E.D., Bioremediation principles. Mc Graw-Hill, 1998.

11- Reisinger, H.J., Johnstone, E.F. and Hubbard, P.,. Cost effectiveness and feasibility comparision of bioventing vs. conventional soil venting. 1994; 40-557. in: Hydrocarbon bioremediation, Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E. and miller, R.N., Lewis, USA.

12- Kastner, M.,. Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. 2000, 211-271. in: Biotechnology, vol.11b, Environmental processes, second edition, Rehm, H.-J., Reed, G., Wiley-Vch., Germany.

13- Samanta, S. K., Singh, O.V. and jain, R.K., Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. TRENDS in Biotechnology. 2002; 20(6): 243-248.

14- Cookson,J.T., Bioremediation engineering design and application, Mc Graw-Hill, New York, 1995.

15- Laor, Y., Storm, P.F. and Farmer, W.J., Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral-associated humic acid. Wat. Res, 1999; 33(7) 1719-1729.

16- Talaie. A.R., N. Jafaarzadeh., M. Talaie., M. Beheshty., Optimization of biodegradation of waste water contaminated floating diesel fuel by Taguchy method, Water & Waste water Journal, in press 2009.

17- Talaie. A.R., N. Jafaarzadeh., M. Talaie., M. Beheshty., Optimization of biodegradation of waste water contaminated floating crude oil by Taguchy method, Koomesh Journal, in press 2009.
18- Tellez, Gilbert T., N. Nirmalakhandan and 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, Advances in Environmental Research, 2002; 6, 455-470,.
19- Dibble J.T., Bartha R., Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge, Applied and environmental microbiology, 1979; p. 729-739.
20- Vieira P.A., Vieira R.B., Franc F.P. de, Cardoso V.L., Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline, Journal of Hazardous Materials, 2007; 140:52–59.