مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران

دوره ششم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۲، صفحات ۴۴۳ تا ۴۵۴

بهینه سازی تجزیه زیستی مازوت توسط میکروارگانیسم های بومی به روش تاگوچی

علیرضا چکشیان خراسانی[۱*]، منصور مشرقی[۲]، سهیلا یغمایی[۳]

دریافت: ۹۱/۰۴/۲۸ پذیرش: ۹۱/۰۷/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: *بهینه سازی تجزیه زیستی مازوت بوسیله متغیرهای مختلف یکی از کاربردهای مهندسی زیستی در صنایع نفت است. هدف از این مطالعه تعیین کمیت های بهینه برای بالا بردن بازده تجزیه زیستی مازوت توسط میکروارگانیسمهای بومی بوده است.*

روش بررسی: *به منظور بهینه سازی تجزیه مازوت، هفت متغیر میزان تلقیح میکروبی، pH اولیه، فعال سطحی، گلوکز، منبع فسفر، منبع نیتروژن و نمک دریایی هر یک با چهار سطح و متغیر نوع میکروارگانیسم با دو سطح برای طراحی آزمایش به روش تاگوچی در نظر گرفته شدند که با استفاده از آنها ۳۲ آزمایش طراحی گردید.*

یافته ها: *نتایج بدست آمده نشان دادند مخلوط میکروبی، تلقیح میکروبی به میزان۰/۰۱۶ OD۶۰۰ ، pH ۸/۳، توئین۸۰ با غلظت g/L ۲، گلوکز با غلظت g/L ۴، فسفات با غلظت g/L ۵، آمونیوم با غلظت g/L ۹ و نمک دریایی با غلظت g/L ۰/۵ شرایط بهینه فرایند تجزیه زیستی مازوت محسوب میشوند.*

نتیجه گیری: *سطح بهینه هر متغیر الزاما بیشترین و یا کمترین سطح متغیر نبوده است. براساس تحلیل واریانس نتایج، منبع فسفر با ۱۵/۸٪ و pH با ۱۴/۸٪ بیشترین اثر را در میان متغیرها داشته اند؛ هرچند در کل، عامل خطا با ۳۱/۶٪ بیشترین تاثیرگذاری را داشته است. میزان تلقیح میکروبی در بهینه کردن تجزیه مازوت با ۰/۶۳٪ کمترین اثر را داشته است.*

واژگان کلیدی: بهینه سازی، تجزیه میکروبی، مازوت، شرایط بهینه، روش تاگوچی

۱- **(نویسنده مسئول)**: کارشناس ارشد مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران
alireza.chackoshian@gmail.com

۲- دکترای میکروبیولوژی، دانشیار گروه تحقیقات سلولی و مولکولی پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- دکترای مهندسی شیمی، استاد دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

مقدمه

درک عوامل و شرایط تاثیرگذار برای تعیین راهبردهای اساسی به منظور طراحی سامانه های زیستی دارای اهمیت خاصی است (۱). فرایند بهینه سازی سیستم‌های زیستی می‌تواند منجر به افزایش راندمان زیستی گردد. روش‌های گوناگونی جهت بهینه سازی این سیستم‌ها موجود است. آزمایش طراحی شده آزمونی است که در آن تغییرات هدف‌داری در متغیرهای ورودی فرایند اعمال می‌گردد و معمولا برای شناسایی عوامل مهم و موثر بر روی یک فرایند و بهینه سازی مدل تجربی فرایند استفاده می‌شود (۲). از سال ۱۹۸۰ روش تاگوچی، در صنایع الکترونیک و اخیرا نیز در مطالعات زیستی کاربردهای فراوانی یافته است و به عنوان یک روش کنترل کیفیت به منظور بهینه سازی فرایند آزمایش‌های مهندسی، بکار گرفته شده است. ابزار کلیدی این روش برای طراحی آزمایش‌ها، طراحی با روش‌های آماری است. در روش تاگوچی آزمایش‌ها برای دست‌یابی به اهداف، تعیین شرایط عملیاتی بهینه، بررسی میزان تاثیر هر یک از عوامل بر روی پاسخ و تخمین پاسخ تحت شرایط بهینه تجزیه و تحلیل می‌شوند. ابزار مورد استفاده تاگوچی جهت تحلیل نتایج حاصل از آزمایش‌ها، روش تحلیل نسبت سیگنال به نویز (S/N) است که عبارت‌اند از نسبت عوامل ثابت عملیاتی به عوامل اغتشاش که غیر قابل کنترل هستند. در روش تاگوچی از ابزار قدرتمند دیگری به نام تحلیل واریانس (ANOVA) نیز برای تحلیل نتایج استفاده می‌شود (۳). برای تجزیه مواد مختلف، روش‌های زیستی به عنوان روش‌های موثر و مقرون به صرفه توصیه شده است. مزیت این روش نسبت به سایر روش‌های فیزیکی و شیمیایی، سادگی فرایند و هزینه کمتر آن است (۷-۴). آنچه که تجزیه زیستی را به یک فرایند بسیار مهم بدل می‌نماید، استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی هر منطقه است (۸). عوامل متعددی بر روی میزان تجزیه زیستی ترکیبات نفتی تاثیر می‌گذارند. از جمله این عوامل می‌توان به عواملی مانند اکسیژن، میکروارگانیسم ها، نیتروژن، فسفر، دما و pH اشاره کرد که می‌توان با بهینه سازی آنها به روش تاگوچی به بیشترین بازده فرایندی دست یافت (۴و۹). با توجه به اندک بودن مطالعات مربوط به تجزیه زیستی مازوت، تاکنون در زمینه بهینه سازی فرایند تجزیه زیستی مازوت گزارشی ارائه نشده است که این عامل خود نشان‌دهنده اهمیت بهینه سازی این فرایند است؛ از طرفی نبود نتایج در این زمینه سبب شده تا این گزارش به عنوان اولین مطالعه در زمینه بهینه سازی تجزیه زیستی مازوت نتواند به طور مشخص نتایج بدست آمده در این مطالعه را با نتایج دیگر مقایسه نماید. امید است این مطالعه باعث افزایش مطالعات در زمینه تجزیه زیستی مازوت شود تا بتوان با بررسی‌های دقیق‌تر و استناد به نتایج بیشتر، با بکارگیری کمیت‌های بهینه تجزیه مازوت را بهبود بخشید.

هدف این مطالعه بهینه سازی متغیرهای تاثیرگذار بر فرایند تجزیه زیستی مازوت با استفاده از روش تاگوچی بوده است. برای رسیدن به این هدف، از منابع طبیعی آلوده به ترکیبات نفتی نمونه برداری گردید. طی آزمایش‌های مختلف میکروارگانیسم‌های توانمند بومی جداسازی و شناسایی شدند و تاثیر تجزیه‌کنندگی آنها بر روی مازوت در شرایط مختلف و با بکارگیری روش تاگوچی بررسی و متغیرهای بهینه انتخاب شدند.

مواد و روش ها

مواد

ماده اصلی استفاده شده در این پژوهش مازوت است که از شرکت توزیع و پخش فرآورده‌های نفتی ایران با نام تجاری نفت کوره ۳۸۰ تهیه شده است. کلروفرم با خلوص ۹۹/۶٪ برای استخراج و رقیق‌سازی مازوت از شرکت شیمی پژوهش آسیا تهیه شده است. کلسیم کلرید ($CaCl_2$)، آمونیوم سولفات ($(NH_4)_2SO_4$))، آهن (II) سولفات.۷آبه ($FeSO_4.7H_2O$)، منیزیم سولفات.۷آبه ($MgSO_4.7H_2O$)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) و پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) برای تهیه محیط معدنی از شرکت مرک آلمان خریداری شده است. همچنین فعال سطحی مصرف شده، توئین ۸۰ است که به همراه گلوکز، نمک دریا از شرکت مرک آلمان تهیه گردیده است.

میکروارگانیسم

میکروارگانیسم های استفاده شده در این مطالعه باکتریهای NO4 (*Enterobacter cloacae* BBRC10061) و NO3 جدا شده از خاک آلوده به فاضلابهای نفتی و گازوئیل

شرکت اتوبوسرانی واقع در شهر مشهد و باکتری های NG2 و PG1 جداشده از خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد بوده‌اند.

طراحی آزمایش ها با روش تاگوچی

بهینه سازی شرایط و عوامل موثر در این مطالعه با استفاده از روش طراحی آزمایش تاگوچی انجام گرفته است. برای بکارگیری روش تاگوچی از ۸ متغیر استفاده شده که شامل

جدول ۱: عوامل مورد بررسی در بهینه‌سازی به همراه سطوح

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
مخلوط باکتری **(NO4, NO3, NG2, PG1)**	۰ (OD$_{600}$)	۰/۰۴ (OD$_{600}$)	–	–
باکتری NO4	۰/۰۰۸ (OD$_{600}$)	۰/۰۱۶ (OD$_{600}$)	۰/۰۳۲ (OD$_{600}$)	۰/۰۴ (OD$_{600}$)
pH	۵/۸	۶/۸	۷/۳	۸/۳
توئین ۸۰	۰ g/L	۱ g/L	۲ g/L	۴ g/L
گلوکز	۰ g/L	۱ g/L	۲ g/L	۴ g/L
فسفات (KH_2PO_4 وK_2HPO_4)	۱ g/L	۳ g/L	۵ g/L	۹ g/L
آمونیوم سولفات	۱ g/L	۳ g/L	۵ g/L	۹ g/L
نمک دریایی	۰ g/L	۰/۵ g/L	۱ g/L	۲ g/L

تعداد آزمایش‌های طراحی شده ۳۲ (L_{32}) بوده که براساس کمترین تداخل بین متغیرها و سطوح آنها طراحی شده و در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۲: آزمایش‌های طراحی شده (L۳۲) با روش تاگوچی برای بهینه‌سازی تجزیه زیستی مازوت و نتایج حاصل از آن

شماره آزمایش	عوامل مورد بررسی در بهینه‌سازی تجزیه زیستی مازوت								درصد تجزیه مازوت		S/N
	مخلوط باکتری (NO4, NO3, NG2, PG1)	باکتری NO4	pH	توئین ۸۰	گلوکز	فسفات (K_2HPO_4 وKH_2PO_4)	آمونیوم سولفات	نمک دریایی	نتیجه ۱	نتیجه ۲	
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲۷/۷	۲۶/۵	۲۸/۶
۲	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۱۹/۲	۱۸/۴	۲۵/۴
۳	۱	۱	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۴۱	۳۹/۳	۳۲
۴	۱	۱	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴۳/۳	۴۱/۵	۳۲/۵
۵	۱	۲	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۴۸/۸	۴۶/۸	۳۳/۵
۶	۱	۲	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۳۸/۹	۳۷/۳	۳۱/۶
۷	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴	۲۲/۸	۲۱/۹	۲۶/۹
۸	۱	۲	۴	۱	۲	۳	۴	۱	۴۶/۲	۴۴/۳	۳۳/۱

ادامه جدول ۲: آزمایش‌های طراحی شده (L۳۲) با روش تاگوچی برای بهینه‌سازی تجزیه زیستی مازوت و نتایج حاصل از آن

شماره آزمایش	عوامل مورد بررسی در بهینه‌سازی تجزیه زیستی مازوت								درصد تجزیه مازوت		S/N
	مخلوط باکتری (NO4, NO3, NG2, PG1)	باکتری NO4	pH	توئین ۸۰	گلوکز	فسفات (K_2HPO_4 و KH_2PO_4)	آمونیوم سولفات	نمک دریایی	نتیجه ۱	نتیجه ۲	
۹	۱	۳	۱	۳	۲	۴	۳	۱	۲۵/۴	۲۴/۴	۲۷/۹
۱۰	۱	۳	۲	۴	۳	۱	۴	۲	۴۰/۳	۳۸/۶	۳۱/۹
۱۱	۱	۳	۳	۱	۴	۲	۱	۳	۴۰/۲	۳۸/۶	۳۱/۹
۱۲	۱	۳	۴	۲	۱	۳	۲	۴	۴۴/۹	۴۳/۱	۳۲/۸
۱۳	۱	۴	۱	۴	۲	۳	۱	۳	۲۲/۸	۲۱/۹	۲۶/۹
۱۴	۱	۴	۲	۱	۳	۴	۲	۴	۲۵/۲	۲۴/۲	۲۷/۸
۱۵	۱	۴	۳	۲	۴	۱	۳	۱	۴۲	۴۰/۳	۳۲/۲
۱۶	۱	۴	۴	۳	۱	۲	۴	۲	۶۲/۷	۶۰/۲	۳۵/۷
۱۷	۲	۱	۱	۲	۴	۲	۴	۳	۳۷	۳۵/۵	۳۱/۱
۱۸	۲	۱	۲	۳	۱	۳	۱	۴	۴۵/۳	۴۳/۵	۳۲/۹
۱۹	۲	۱	۳	۴	۲	۴	۲	۱	۴۱/۸	۴۰/۲	۳۲/۲
۲۰	۲	۱	۴	۱	۳	۱	۳	۲	۵۷	۵۴/۷	۳۴/۹
۲۱	۲	۲	۱	۳	۴	۳	۲	۲	۴۴/۵	۴۲/۷	۳۲/۷
۲۲	۲	۲	۲	۴	۱	۴	۳	۳	۴۲/۳	۴۰/۶	۳۲/۳
۲۳	۲	۲	۳	۱	۲	۱	۴	۴	۵۳/۳	۵۱/۲	۳۴/۳
۲۴	۲	۲	۴	۲	۳	۲	۱	۱	۳۳/۱	۳۱/۸	۳۰/۲
۲۵	۲	۳	۱	۴	۳	۲	۲	۱	۳۶/۳	۳۴/۹	۳۱
۲۶	۲	۳	۲	۱	۴	۳	۳	۲	۵۵	۵۲/۸	۳۴/۶
۲۷	۲	۳	۳	۲	۱	۴	۴	۳	۳۶/۶	۳۵/۱	۳۱
۲۸	۲	۳	۴	۳	۲	۱	۱	۴	۳۵/۸	۳۴/۴	۳۰/۹
۲۹	۲	۴	۱	۱	۱	۲	۲	۳	۲۱/۱	۲۰/۳	۲۶/۳
۳۰	۲	۴	۲	۲	۲	۳	۳	۴	۷۹/۳	۷۶/۱	۳۷/۸
۳۱	۲	۴	۳	۳	۳	۴	۴	۱	۴۸/۴	۴۶/۵	۳۳/۵
۳۲	۲	۴	۴	۴	۴	۱	۱	۲	۳۸/۶	۳۷/۱	۳۱/۵

۷ متغیر ۴ سطحی و ۱ متغیر ۲ سطحی بوده‌اند. جدول ۱ متغیرهای تعیین شده به همراه سطوح آنها را نشان می‌دهد.

با توجه به آزمایش‌های طراحی شده، محیط های معدنی اولیه تشکیل شده از ترکیب ۰/۱ g $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱ g $CaCl_2$ و ۰/۰۱ g $FeSO_4.7H_2O$ در ۱ L آب مقطر که در زیست واکنشگاه‌های لوله‌ای (لوله‌های پایه‌دار سانتریفیوژ) با حجم ۵۰ mL توزیع شده‌اند. سپس محیط های معدنی اولیه براساس جدول ۲ تکمیل شدند و با افزودن ۲۰۰۰ ppm (۰/۱ g در ۵۰ mL) مازوت به زیست واکنشگاه، محیط ها توسط اتوکلاو استریل شدند. شاهدها برای آزمایش ها شامل تمام اجزا به جز مازوت است. میکروارگانیسم های مورد نظر در شرایط کاملا استریل به زیست واکنشگاه ها تلقیح شدند. در تمام آزمایش ها، شیکرانکوباتور به مدت ۶ روز در دمای ۳۳ ^{O}C و دور ۱۶۰ rpm راه‌اندازی شد. آزمایش‌ها با دوبار تکرار انجام شده‌اند.

سنجش دستگاهی

برای سنجش میزان مازوت مانند نفت خام، گازوئیل و ترکیبات نفتی دیگر از روش کدورت‌سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل S2000 UV/VIS ساخت شرکت WPA استفاده شد. به هر زیست واکنشگاه ۳ mL کلروفرم اضافه و آنقدر زیست واکنشگاه هم زده می‌شود تا کل مازوت در کلروفرم حل شود. پس از حل شدن کامل مازوت، فاز آلی شامل مازوت و کلروفرم در زیر قرار گرفته و محیط معدنی در بخش بالایی زیست واکنشگاه قرار می‌گیرد. بخش معدنی که عاری از مازوت و ترکیبات آلی حاصل از تجزیه مازوت است را خالی کرده و فاز آلی جداسازی می‌شود. اکنون با نمونه‌گیری از فاز آلی و رقیق‌سازی نمونه تا حد امکان با حلال کلروفرم و خواندن جذب آن در طول موج λ=۴۵۰ nm (در این طول موج مازوت بیشترین جذب را داشته است) در مقابل شاهد با دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نمونه اصلی بدست می‌آید. غلظت مازوت نمونه اصلی نیز بر اساس نمودار استاندارد غلظت-جذب مازوت حاصل می‌شود (۱۰). برای سنجش میزان میکروارگانیسم‌های موجود از زیست واکنشگاه مورد نظر، نمونه گیری کرده و جذب نمونه در طول موج λ= 600 nm در مقابل شاهد خوانده شد و عدد نشان داده شده توسط اسپکتروفتومتر به عنوان دانسیته نوری (OD_{600})، که همان میزان جذب نور توسط باکتری‌ها است، ثبت گردید (۱۱). شاهد و نمونه تلقیح شده برای هر آزمایش از یک محیط کشت میکروبی یکسان تهیه گردیده است. از طرفی برای رسم نمودار استاندارد میکروبی جهت بررسی رشد میکروبی، از همان محیط کشت میکروبی نمونه‌های شاهد و تلقیح شده سوسپانسیون‌های میکروبی آماده گردید تا بتوان مقایسه دقیقی در میزان تغییرات میکروبی انجام داد.

سنجش آماری برای روش تاگوچی

برای تحلیل و سنجش دقیق تر نتایج آزمایش‌های طراحی شده با روش تاگوچی از یک تابع پاسخ تبدیل یافته که به صورت نسبت علامت هر اثر (S) به اثرات ناشی از خطا (N) تعریف می‌گردد، استفاده می‌شود. مزیت استفاده از این پاسخ جدید در تحلیل‌های آماری، نسبت به پاسخ اولیه، مقایسه بزرگی اثرات ناشی از هر عامل اصلی با اثرات ناشی از عوامل خطا در اندازه‌گیری است؛ که در نتیجه باعث برداشت دقیق‌تری از تاثیر واقعی عوامل بر سامانه می شود (۲). نحوه محاسبه نسبت S/N از معادله ۱ پیروی می‌کند.

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

در این معادله y_n پاسخ بدست آمده از آزمایش و n تعداد تکرار آزمایش است. برای استفاده از این روش باید n بزرگتر از ۱ باشد. با توجه به دوبار تکرار بودن آزمایش‌ها در این پژوهش از این روش استفاده شده است. پس از محاسبه S/N برای نتایج حاصل از ۳۲ آزمایش از تحلیل واریانس (ANOVA) استفاده شد. تمام محاسبات براساس نرم افزار Qualitek4 انجام شده است.

یافته ها

آزمایش‌های طراحی شده با روش تاگوچی شامل ۳۲ آزمایش بوده که برای هر کدام دو نتیجه بدست آمده که حاصل دوبار تکرار آزمایش‌ها است. جدول ۲ نتایج حاصل از فرایند تجزیه زیستی مازوت در مدت ۶ روز را نشان می‌دهد که با استفاده از آنها نسبت‌های S/N برای هر آزمایش محاسبه شده است.

با استفاده از مقادیر S/N میزان S/N اصلی برای سطوح کمیت های مورد مطالعه محاسبه شد. این مقادیر در جدول ۳ آورده شده است. هرچه میزان S/N بدست آمده برای یک سطح بزرگ تر باشد، آن سطح بهینه تر است. همچنین جدول ۳ نشان می دهد که از میان سطوح کدام یک به عنوان سطح بهینه انتخاب شده و مقادیر بهینه برای تجزیه مازوت نیز ارائه شده است.

جدول ۳: میزان S/N اصلی برای هر سطح از کمیت ها و مقادیر بهینه برای تجزیه زیستی مازوت

عامل	میزان S/N اصلی				مقدار بهینه
	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴	
مخلوط باکتری (NO4, NO3, NG2, PG1)	۳۰/۷	۳۲/۴	-	-	۰/۰۴ OD_{600}
باکتری NO4	۳۱/۳	۳۱/۹	۳۱/۵	۳۱/۵	۰/۰۱۶ OD_{600}
pH	۲۹/۸	۳۱/۸	۳۱/۸	۳۲/۷	۸/۳
توئین ۸۰	۳۱/۵	۳۱/۸	۳۲/۲	۳۰/۷	۲ g/L
گلوکز	۳۰/۹	۳۱/۱	۳۱/۹	۳۲/۳	۴ g/L
فسفات (K_2HPO_4 و KH_2PO_4)	۳۲	۲۹/۹	۳۲/۹	۳۱/۴	۵ g/L
آمونیوم سولفات	۳۰/۹	۳۰	۳۲/۳	۳۲/۹	۹ g/L
نمک دریایی	۳۱/۱	۳۲/۶	۳۰/۴	۳۲	۰/۵ g/L

در بهینه سازی تجزیه مازوت استفاده از مخلوط میکروبی بهتر از استفاده از باکتری خالص بوده است. میزان تلقیح باکتری NO4 به مقدار ۰/۰۱۶ OD_{600} بهترین نتیجه را در برداشته است؛ هر چند تفاوت چندانی در نتایج حاصل از میزان تلقیح وجود نداشته است و می‌توان گفت تغییر در مقدار تلقیح اولیه باکتری NO4 سبب تغییر بازده تجزیه مازوت نمی شود. تجزیه زیستی مازوت در pH ۸/۳ بهترین نتیجه را داشته که نشان می دهد میکروارگانیسم های استفاده شده در شرایط قلیایی بهتر می توانند فعالیت کنند. استفاده از توئین ۸۰ به عنوان فعال سطحی و امولسیون کننده مازوت در محیط آبی با غلظت ۲ g/L بهترین بازده را داشته است. هرچه میزان منبع کمکی کربن در محیط بیشتر شده نتایج حاصل از تجزیه مازوت نیز بهتر شده است و این بدین معنا است که گلوکز در بیشترین غلظت (۴ g/L) فرایند را بهینه کرده است. استفاده از منبع فسفر با غلظت ۵ g/L و منبع نیتروژن با غلظت ۹ g/L رشد میکروبی و در نهایت تجزیه مازوت را بهینه کرده است. نمک دریا به عنوان منبعی مناسب حاوی عناصر لازم برای رشد میکروبی استفاده شد که نتایج نشان دادند میزان ۰/۵ g/L از این نمک در مقایسه با مقادیر دیگر می‌تواند سبب رشد میکروبی بیشتری شود که حاصل آن بالا رفتن میزان تجزیه مازوت در محیط بوده است.

تحلیل واریانس نتایج حاصل از آزمایش‌های طراحی شده با روش تاگوچی برای تمام داده‌های سیگنال به نویز (S/N)

جدول ۴: نتایج تحلیل واریانس برای داده‌های حاصل از آزمایش‌های طراحی شده با روش تاگوچی

عامل	درجه آزادی (f)	مجموع مربعات (S)	واریانس (V)	نسبت واریانس (F)	درصد تاثیرگذاری ٪
مخلوط باکتری (NO4, NO3, NG2, PG1)	۱	۲۲/۶۸۰۷۱	۲۲/۶۸۰۷۱	۲/۶۰۲۳۵۹	۹/۱۴۳۰۱۳
باکتری NO4	۳	۱/۵۵۱۶۲۳	۰/۵۱۷۲۰۸	۰/۰۵۹۳۴۴	۰/۶۲۵۴۸۸
pH	۳	۳۶/۶۴۱۷۱	۱۲/۲۱۳۹	۱/۴۰۱۴۰۹	۱۴/۷۷۰۹۵
توئین ۸۰	۳	۹/۶۰۳۳۶۶	۳/۲۰۱۱۲۲	۰/۳۶۷۲۹۳	۳/۸۷۱۲۹۴
گلوکز	۳	۱۰/۸۷۲۶۶	۳/۶۲۴۲۱۹	۰/۴۱۵۸۳۹	۴/۳۸۲۹۶۸
فسفات (K_2HPO_4 و KH_2PO_4)	۳	۳۹/۲۹	۱۳/۰۹۶۶۷	۱/۵۰۲۶۹۷	۱۵/۸۳۸۵۲
آمونیوم سولفات	۳	۲۷/۳۲۹۷	۹/۱۰۹۹	۱/۰۴۵۲۵۹	۱۱/۰۱۷۱۱
نمک دریایی	۳	۲۱/۶۵۷۲۹	۷/۲۱۹۰۹۸	۰/۸۲۸۳۱۱	۸/۷۳۰۴۵۴
خطای آزمایش	۹	۷۸/۴۳۸۹۹	۸/۷۱۵۴۴۴	۱	۳۱/۶۲۰۲۱
مجموع	۳۱	۲۴۸/۰۶۶	۸۰/۳۷۸۲۷	۹/۲۲۲۵۱	۱۰۰

انجام شده است. نتایج تحلیل واریانس در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴ نشان می‌دهد تاثیرگذارترین عوامل پس از ۶ روز منبع فسفر و pH محیط است. حضور باکتری NO4 به تنهایی کمترین تاثیر را داشته است ولی در کنار سه باکتری دیگر تجزیه مازوت را بهتر انجام داده است. منبع نیتروژن نیز اهمیت بیشتری نسبت به نمک دریایی، فعال سطحی و گلوکز داشته است. عامل خطا نیز بیشترین تاثیر را بر نتایج اعمال کرده است. پس از گذشت ۶ روز تاثیر منبع کمکی کربن بسیار کمتر از دیگر عوامل بوده که نشان می‌دهد اتکای باکتری برای تامین عنصر کربن بیشتر به هیدروکربن‌های مازوت بوده است تا گلوکز که این موضوع از نظر بالا رفتن بازده سامانه تجزیه مازوت بسیار ارزشمند است.

بحث

معمولا در سامانه‌های زیست درمانی و تجزیه زیستی یک ماده، مخلوط میکروبی موثرتر از کشت خالص عمل کرده است. بهبود تجزیه زیستی هیدروکربن‌های موجود در خاک آلوده به گازوئیل با اضافه کردن مخلوط میکروبی (۱۲)، استفاده از ترکیب دو باکتری مختلف برای تجزیه PAH (۱۳) و تعیین مخلوط باکتریایی به عنوان سطح بهینه برای تجزیه نفت خام (۱۰) نشان‌دهنده تاثیرگذاری مخلوط میکروبی به جای کشت خالص است. با توجه به روش تاگوچی تجزیه مازوت نیز با مخلوط باکتریایی بهتر از کشت خالص انجام گرفته است. از آنجایی‌که باکتری‌های جدا شده برای تجزیه مازوت از منابع مشابه گزینش شده‌اند؛ مخلوط باکتریایی توانسته است تجزیه مازوت را بهبود ببخشد. میزان اولیه میکروارگانیسم در سامانه‌های زیستی می‌تواند بسیار تاثیرگذار باشد؛ هر چند در این مطالعه به دلیل رشد سریع و افزایش زیست توده تاثیر اولیه کاهش یافته ولی برای فرایندی با زمان کوتاه می‌تواند موثرتر باشد. در گوگردزدایی از نفت خام سنگین میزان تلقیح میکروارگانیسم تاثیرگذار بوده است (۱۴). سازگاری و رشد باکتری‌ها معمولا در pH خنثی دارای بیشترین بازده است. از طرفی باکتری‌های استفاده شده (NO4, NO3, NG2, PG1) برای تجزیه مازوت محیط قلیایی (pH=۸/۳) را به محیط اسیدی و خنثی ترجیح داده اند. بهینه سازی شرایط تصفیه زیستی فاضلاب با روش تاگوچی نشان داده که این سامانه در شرایط بهینه با pH ۸ بهترین عملکرد را داشته است (۲). تجزیه نفت سنگین توسط *Enterobacter cloacae* در pH برابر با ۷ بیشترین بازده را در برداشته است (۱۱). بنابراین

نوع میکروارگانیسم و فرایند تعیین‌کننده میزان pH بهینه است. حضور فعال سطحی به عنوان امولسیون کننده هیدروکربن‌های نفتی سبب در دسترس قرار گرفتن مازوت برای تجزیه زیستی شده و شروع فرایند را ساده‌تر کرده است؛ هر چند با گذشت زمان و سازگاری میکروبی با محیط، تولید زیست فعال سطحی توسط میکروارگانیسم آغاز شده و تاثیر حضور فعال سطحی کم رنگ می‌شود. افزایش میزان فعال سطحی نیز می‌تواند سبب کاهش بازده شود؛ زیرا حضور فعال سطحی نقش راه‌انداز سامانه را داشته و میزان بیش از حد آن احتمال بازدارندگی میکروبی را تشدید خواهد کرد. توئین ۸۰ در تجزیه نفت خام به عنوان بهترین فعال سطحی عمل کرده است (۱۰). تجزیه نفت خام توسط *Klebsiella oxytoca* در حضور توئین ۸۰ افزایش یافته است (۱۵)؛ هر چند اضافه شدن توئین ۸۰ اثر محسوسی در تجزیه TBT توسط *Enterobacter cloacae* نداشته است (۱۶). تجزیه نفت خام سنگین توسط *Enterobacter cloacae* با اضافه کردن توئین ۸۰ (۱ g/L) کاهش یافته و فعال سطحی به عنوان ممانعت کننده عمل کرده ولی در حضور زیست فعال سطحی افزایش یافته است (۱۱). تجزیه تری کلرو اتیلن در غیاب فعال سطحی به دلیل تحریک میکروارگانیسم به تولید زیست فعال سطحی مناسب، بیشتر از زمانی است که فعال سطحی در محیط وجود داشته است (۱۷). بنابراین بسته به نوع هیدروکربن‌ها و باکتری، فعال سطحی می‌تواند موثر و یا مانع باشد. در سامانه‌های تجزیه هیدروکربن‌ها بدلیل نامحلول بودن این مولکول‌ها در آب، دسترسی میکروارگانیسم‌ها به این مواد برای تامین نیاز غذایی (منبع کربن) سخت است؛ به همین علت وجود منبع کربنی کمکی مانند گلوکز که بسیار راحت و سریع قابل مصرف است رشد میکروبی و در نتیجه فعالیت زیستی در راستای تجزیه مازوت را افزایش داده است. رشد باکتری *Pseudomonas putida* در حضور گلوکز و فنل بسیار بیشتر است تا در محیط کشت شامل گلوکز و فنل به تنهایی ولی به دلیل مصرف همزمان هر دو، سرعت تجزیه فنل و گلوکز کمی کاهش می‌یابد. لیکن وجود گلوکز باعث افزایش تجزیه کلروفنل می‌شود (۱۸). تجزیه ۴-کلروفنل در حضور مقادیر مختلف گلوکز انجام شده و هرچه غلظت گلوکز بیشتر بوده میزان مصرف آن و درصد تجزیه نیز بیشتر شده است (۱۹). در تجزیه نفت خام، پیروات به دلیل هضم راحت‌تر بهتر از گلوکز عمل کرده است (۱۰). در نتیجه منابع کربنی راحت هضم و کوچک مولکول در بالا بردن بازده تجزیه هیدروکربن‌ها موثرند. فسفر در زیست درمانی میکروبی نقش مثبت داشته و در این مطالعه نیز تجزیه مازوت را سرعت بخشیده است؛ هر چند این عنصر از عناصر اصلی سازنده ساختمان میکروارگانیسم‌ها به شمار می‌آید ولی مقدار بیش از حد آن می‌تواند تاثیر منفی و بازدارنده داشته باشد. در تجزیه نفت توسط سویه‌های مایکوباکتریوم هرچه غلظت منبع فسفر بیشتر شده، بازده نیز افزایش یافته است (۲۰). بنابراین افزایش فسفات، سرعت تجزیه را افزایش می‌دهد ولی میزان آن باید کنترل شده باشد. نیتروژن نیز مانند فسفر از موثرترین عناصر مصرفی در فرایند تجزیه زیستی است که سرعت فرایند و رشد میکروبی را افزایش داده است. تجزیه زیستی مازوت تحت تاثیر یون آمونیوم افزایش یافته و منابع دیگری نیز مانند نیترات می‌توانند فرایند تجزیه را افزایش دهند. در بهینه سازی تجزیه نفت خام آمونیوم سولفات به عنوان بهترین منبع نیتروژن تعیین شده و نیترات باعث کاهش pH و مهار فعالیت میکروبی شده است (۱۰). هرچه غلظت منبع نیتروژن در تجزیه نفت توسط سویه‌های مایکوباکتریوم بیشتر شده، بازده نیز افزایش یافته است (۲۰). افزودن نیترات و آمونیوم در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک تسریع کننده‌اند و میزان آمونیوم اضافه شده بسیار بیشتر از نیترات مصرف شده است (۲۱). بهینه سازی شرایط تصفیه زیستی فاضلاب با روش تاگوچی نشان داده آمونیوم کلرید به عنوان بهترین منبع نیتروژن بوده است (۲). بنابراین افزودن منابع نیتروژنی بسیار موثر است و منابع آمونیاکی از سایر منابع نیتروژنی عملکرد بهتری دارند. حضور بعضی از عناصر و یون‌ها مانع فعالیت میکروبی شده ولی بعضی دیگر رشد میکروبی را افزایش می‌دهد. نمک دریایی در غلظت‌های پایین تجزیه مازوت را بیشتر از غلظت‌های بالا افزایش می‌دهد. هرچه غلظت نمک NaCl در محیط کمتر شده میزان رشد باکتری و تصفیه پساب بیشتر شده است (۲۲). افزایش شوری مانع تجزیه و رشد *Enterobacter cloacae* شده است (۱۱)؛ در حالی‌که *Enterobacter cloacae* جدا شده از آب‌های آلوده به نفت و زغال سنگ در هند به عنوان باکتری

نمک دوست توانسته در محیط با شوری بالا PAHها را تجزیه نماید (۲۳و۲۴). بنابراین نوع میکروارگانیسم و مواد مورد نیاز برای رشد میکروبی تعیین‌کننده نوع و میزان نمک مورد استفاده است.

نتیجه گیری

تجزیه مازوت توسط میکروارگانیسم های بومی شهر مشهد با روش تاگوچی بهینه سازی شد. از بین عوامل بررسی شده فسفات با غلظت ۵ g/L بیشترین تاثیر و میزان تلقیح اولیه میکروبی نیز کمترین تاثیر را بر تجزیه مازوت داشته است؛ هرچند در کل اثرگذاری خطا از همه بیشتر بوده است. کشت مخلوط باکتری های بومی جدا شده نسبت به باکتری NO4 در pH برابر با ۸/۳ عملکرد بهتری از خود نشان داده اند و موثرتر بوده اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه با عنوان «تجزیه زیستی مازوت با استفاده از میکروارگانیسم های بومی» در مقطع کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه صنعتی شریف به تاریخ ۱۳۹۰/۵/۱۲ است که با حمایت پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است. نویسندگان این مقاله بدین وسیله از ریاست محترم پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت از این پایان‌نامه تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1. Sharma SL, Pant A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine Rhodococcus. Biodegradation. 2000;11(5):289–94.
2. Jaafarzadeh Haghighifard N, Mehrabani Ardekani MM, Nabizadeh R, Yazdanbakhsh AR. Optimization of moving bed biofilm reactor using Taguchi method. Iranian Journal of Health and Environment. 2009;2(1):1-15 (in Persian).
3. Roy RK. A Primer on the Taguchi Method. New York: VNR; 1990.
4. Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1990;54(3):305-15.
5. Vieira PA, Vieira RB, França FP, Cardoso VL. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. Journal of Hazardous Materials. 2007;140(1-2):52-59.
6. Ewies JB, Ergas SJ, Chang DPV, Schroeder ED. Bioremediation principles. Mc Grow-Hill; 1998.
7. Juhasz AL, Nadiu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration and Biodegradation. 2000;45(1-2):57-88.
8. Pala D, Freier D. Bioremediation of clay soils impacted by petroleum. Engenharia Temica. 2002;10:29-32.
9. Xu R, Obbard JP. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments. Journal of Environment Quality. 2003;32:1234-43.
10. Hasanshahian M, Hasanshahian O, Emtiazi G. Optimization of crude oil biodegradation by Acinetobacter, Calcoacticus BS and Pseudomonas aeroginosa AS isolated from the Persian Gulf. Petroleum Research. 2010;63(20):72-82 (in Persian).
11. Darvishi P, Mowla D, Ayatollahi S, Niazi A. Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an efficient strain, ERCPPI-1. Desalination and Water Treatment. 2011;28(1-3):46–54.
12. Rahman KSM, Banat IM, Thahira J, Thayumanavan T, Lakshmanaperumalsamy P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. Bioresource Technology. 2002;81(1):25-32.
13. Hedlund BP, Geiselbrecht AD, Bair TJ, Staley JT. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, Neptunomonas naphthovorans gen. nov., sp. nov. Applied and Environmental Microbiology. 1999;65(1):251–59.
14. Torkamani S, Shayegan J, Yaghmaei S, Alemzadeh I. Study of the first isolated fungus capable of heavy crude oil biodesulfurization. Industrial and Engineering Chemistry Research. 2008;47(19):7476–82.
15. Chamkha M, Trabelsi Y, Mnif S, Sayadi S. Isolation and characterization of Klebsiella oxytoca strain degrading crude oil from a tunisian off-shore oil field. Journal of Basic Microbiology. 2011;51(6):580–89.
16. Sakultantimetha A, Keenan HE, Beattie TK, Bangkedphol S, Cavoura O. Effects of organic nutrients and growth factors on biostimulation of tributyltin removal by sediment microorganisms and Enterobacter cloacae. Applied Microbiology and Biotechnology. 2011;90(1):353–60.
17. Kim JO. Removal of trichloroethylene in presence and absence of surfactant. Water, Air, and Soil Pollution. 1998;108(1-2):189–201.
18. Tarighian A, Hill G, Headley J, Pedras S. Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose. Clean Technologies and Environmental Policy. 2003;5(1):61–65.
19. Lee C-Y, Lee Y-P. Degradation of 4-chlorophenol by enriched mixed cultures utilizing phenol and glucose as added growth substrate. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2007;23(3):383–91.
20. Abolhasani A, Ebrahimipour G. Biodegradation of crude oil by two isolated Mycobacterium strains from the Persian Gulf. Journal of Environmental Studies. 2009;51:1-10 (in Persian).
21. Ko I, Kim K-W, Lee C-H, Lee K-P. Effect of scale-up and seasonal variation on biokinetics in the enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2007;12(5):531-41.
22. Dan NP, Visvanathan C, Basu B. Comparative evaluation of yeast and bacterial treatment of high salinity wastewater based on biokinetic coefficients.

Bioresource Technology. 2003;87(1):51–56.

23. Arulazhagan P, Vasudevan N, Yeom IT. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. International Journal of Environment Science and Technology. 2010;7(4):639-52.
24. Arulazhagan P, Vasudevan N. Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. Marine Pollution Bulletin. 2009;58(2):256–62.

Iran. J. Health & Environ., 2014, Vol. 6, No. 4

Optimization of Mazut Biocracking by Native Microorganisms Using Taguchi Method

Alireza Chackoshian Khorasani*[1], Mansour Mashreghi[2], Soheila Yaghmaei[1]

[1]Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

[2]Cell and Molecular Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 18 July 2012 ; Accepted: 15 October 2012

ABSTRACT

Background and Objectives: Optimization of mazut biocracking with different variables is one of the bioengineering applications in petroleum industry. The purpose of this study was to optimize biocracking of mazut by native microorganisms.

Materials and Methods: To optimize mazut cracking, using Taguchi method we run 32 experiments using seven factors including amount of microbial inoculation, initial pH, surfactant, glucose, phosphor source, nitrogen source and sea salt; each of them with four levels and factor of microorganism type with two levels for design of experiment using that 32 experiments were designed by them.

Results: Results showed that microbial mixture, 0.016 OD600 microbial inoculations, pH 8.3, Tween80 concentration of 2 g/L, glucose concentration of 4 g/L, phosphate concentration of 5 g/L, ammonium concentration of 9 g/L and sea salt concentration of 0.5 g/L were optimized conditions for biocracking of mazut process.

Conclusion: Optimized level for each factor was not essentially inevitably the highest or the lowest level. Based on the analysis of variance, phosphor source with 15.8% and pH with 14.8% had the highest effect among other factors; however overally, error factor with 31.6% had the highest influence. Amount of microbial inoculation with 0.63% had the lowest effect on optimizing biocracking of mazut.

Key words: Optimization; Microbial cracking; Mazut; Optimized conditions; Taguchi method.

***Corresponding Author:** *alireza.chackoshian@gmail.com*
Tel: *+98 511 8797660,* **Fax:** *+98 511 8795560,* **Mob:** *+98 935 366 6908*