بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم وفناوری‌های نوین

گروه بیوتکنولوژی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی شیمی

گرایش زیست‌فناوری

بررسی حذف آلودگی‌های نفتی از خاک‌های آلوده به روش زیستی

استادان راهنما:

دکتر داوود بی‌ریا

دکتر مسعود بهشتی

پژوهشگر:

راضیه برین

آذر ماه ۱۳۹۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این
پایان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم وفناوری‌های نوین

گروه بیوتکنولوژی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی شیمی گرایش زیست فناوری خانم راضیه برین تحت عنوان

بررسی حذف آلودگی‌های نفتی از خاک‌های آلوده به روش زیستی

در تاریخ ۱۳۹۱/۰۹/۲۸ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر داوود بی‌ریا	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر مسعود بهشتی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۳- استاد داور داخل گروه	دکتر اعظم جیحانی‌پور	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۴- استاد داور خارج از گروه	دکتر حمید زیلویی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا

امضای مدیر گروه

چکیده

آلودگی‌های ایجاد شده توسط هیدروکربن‌های نفتی در محیط‌های خاکی و آبی، پدیده رایجی است که مشکلات عمده‌ای برای محیط زیست و اجتماع ایجاد می‌کنند. برای اجرای زیست پالایی خاک‌های آلوده نفتی به عنوان یکی از روش‌های موثر و به صرفه، به میکروارگانیسم‌هایی با توانایی بالا برای تولید بیوسورفکتانت و نیز تجزیه زیستی ترکیبات نفتی نیاز است. بدین منظور نمونه‌های خاک آلوده به نفت از پالایشگاه اصفهان برای جداسازی میکروارگانیسم‌های مناسب تهیه گردید.هجده گونه باکتری از این نمونه‌ها جداسازی شد و قابلیت تولید بیوسورفکتانت این گونه‌ها و تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفت سفید(کروسین) در محیط مایع و در شرایط کشت خالص باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعه تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها از آنالیز GC (کروماتوگرافی گازی) استفاده شد و قابلیت تولید بیوسورفکتانت آن‌ها با اندازه گیری کشش سطحی و شاخص امولسیفیکاسیون انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که همگی این سویه‌ها مولد بیوسورفکتانت و قادر به مصرف هیدروکربن‌های نفت سفید به عنوان منبع کربن و انرژی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده از میان سویه‌های جداشده، شش سویه به نام‌های B و S و E و H و L و N که توانایی بالایی در تخریب زیستی سریع نفت سفید و کاهش کشش سطحی داشتند، به عنوان سویه‌های مناسب برای ادامه آزمایشات انتخاب شدند. در مرحله بعد شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب انجام شد و نتایج نشان داد که این سویه‌ها از نوع سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سابتیلیس می‌باشند. سپس در بخش طراحی آزمایشات جهت فرآیند زیست پالایی خاک آلوده به نفت خام در بیوراکتور دوغابی (که با توجه به مزایای این بیوراکتور نسبت به سایرین و با توجه به امکانات موجود، این نوع بیوراکتور برای انجام آزمایشات در نظر گرفته شد)، اثر دور همزن، زمان ماند، مقدار تلقیح و محتوی جامد بر درصد کاهش میزان کل هیدروکربن‌های نفتی موجود در بیوراکتور، توسط روش طراحی عاملی جزئی و کامل با نرم افزار Minitab بررسی گشت. نتایج نشان داد به غیر از پارامتر محتوی جامد سایر عامل‌ها مهم می باشند و مخلوط این سویه‌ها قابلیت بالایی در تصفیه زیستی خاک و کاهش میزان کل هیدروکربن‌های نفتی تا ۸۱٪ را در طی مدت ۷ روز دارند و بنابراین می توان از آن‌ها برای زیست پالایی خاک‌های آلوده نفتی در محیط زیست استفاده نمود.

کلمات کلیدی: زیست پالایی، فاز دوغابی، خاک‌های آلوده نفتی، تجزیه زیستی، عامل زیست فعال سطحی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- آلودگی ۶

۱-۲-۱- انواع آلودگی‌ها ۷

۱-۲-۱-۱- آلودگی‌های زیستی ۷

۱-۲-۱-۲- آلودگی‌های فیزیکی ۷

۱-۲-۱-۳- آلودگی‌های شیمیایی ۸

۱-۲-۱-۳-۱- آلودگی‌های غیر آلی ۸

۱-۲-۱-۳-۲- آلودگی‌های آلی ۸

۱-۲-۱-۳-۳- آلودگی‌های نفتی ۹

۱-۲-۱-۳-۳-۱- ترکیبات موجود در فاضلاب‌های آلوده به ترکیبات نفتی ۹

۱-۳- روش‌های پاکسازی محیط‌های آلوده ۱۰

۱-۳-۱- روش زیستی ۱۲

۱-۳-۱-۱- مزایای روش زیستی ۱۲

۱-۳-۱-۲- معایب روش زیستی ۱۳

۱-۴- مفاهیم تصفیه زیستی ۱۴

۱-۴-۱- زیست پالایی ۱۴

۱-۴-۱-۱- تضعیف زیستی ۱۴

۱-۴-۱-۲- تحریک زیستی ۱۴

۱-۴-۱-۳- ازدیاد زیستی ۱۵

۱-۴-۲- تجزیه زیستی ۱۵

۱-۴-۳- کومتابولیسم ۱۶

۱-۴-۴- کموتاکسی ۱۶

۱-۵-میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی ۱۷

۱-۶- مکانیزم‌های تجزیه اجزای نفت خام ۲۰

عنوان **صفحه**

۱-۶-۱- آنزیم‌ها ۲۰
۱-۶-۲- بیوسورفکتانت‌ها ۲۱
۱-۶-۳- اسیدها و حلال‌ها ۲۱
۱-۷- تخریب زیستی هیدروکربن‌ها ۲۱
۱-۷-۱- تخریب زیستی آلکان‌های خطی ۲۳
۱-۷-۱-۱- مسیرهای متابولیکی تخریب هوازی آلکان‌ها ۲۳
۱-۷-۱-۲- تخریب زیستی آلکان‌های شاخه‌دار ۲۴
۱-۷-۱-۳- تخریب زیستی آلکان‌های حلقوی ۲۵
۱-۷-۲- تخریب زیستی آروماتیک‌ها ۲۵
۱-۷-۳- تخریب زیستی آسفالتین‌ها ۲۷
۱-۸- فاکتورهای موثر بر حذف زیستی هیدروکربن‌ها ۲۸
۱-۸-۱- فاکتورهای شیمیایی موثر بر حذف زیستی هیدروکربن‌ها ۲۸
۱-۸-۱-۱- ساختار شیمیایی نفت یا هیدروکربن‌ها ۲۸
۱-۸-۱-۲- حالت فیزیکی هیدروکربن‌های نفتی ۳۱
۱-۸-۱-۳- غلظت نفت و هیدروکربن‌ها ۳۲
۱-۸-۲- فاکتورهای محیطی موثر بر حذف زیستی هیدروکربن‌ها ۳۲
۱-۸-۲-۱- دما ۳۲
۱-۸-۲-۲- ترکیبات مغذی و تقویت کننده‌ها ۳۵
۱-۸-۲-۳- اکسیژن ۳۷
۱-۸-۲-۴- شوری ۳۹
۱-۸-۲-۵- فشار ۳۹
۱-۸-۲-۶- رطوبت ۴۰
۱-۸-۲-۷- اسیدیته ۴۰
۱-۸-۳-فاکتورهای زیستی موثر در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها ۴۱
۱-۸-۳-۱- سازش ۴۲
۱-۸-۳-۲- بیوسورفکتانت ۴۳
۱-۹- بذر افشانی ۴۴

عنوان **صفحه**

۱-۱۰- محل‌های مناسب جهت جداسازی میکروارگانیسم‌های نفتی ۴۵

فصل دوم : انواع بیوراکتورهای مورد استفاده برای حذف آلودگی‌های نفتی از خاک‌های آلوده

۲-۱- معرفی ۴۸

۲-۲- بیوراکتورهای دوغابی ۵۱

۲-۳- بیوراکتوردرامی ۵۵

۲-۴- بیوراکتور فاز جامد ۵۹

۲-۵- بیوراکتورهای غلتان بافل‌دار ۶۱

۲-۶- ترکیب زیست پالایی فاز جامد و دوغابی برای خاک‌های آلوده به دیزل ۶۳

۲-۷- بیوراکتور هوا بالابر ۶۵

۲-۸- راکتور بی‌هوازی بافل‌دار ۶۸

۲-۹- بررسی نقش شکل راکتور در زیست پالایی خاک در شرایط دوغابی ۶۹

۲-۱۰- بیوراکتور دو فاز مایع ۷۱

فصل سوم : مواد و روش‌ها

۳-۱- وسایل و مواد مورد استفاده ۷۶

۳-۱-۱- دستگاه‌های مورد استفاده ۷۶

۳-۱-۲- نفت خام مورد استفاده در آزمایش‌ها ۷۷

۳-۱-۳- مواد شیمیایی مورد استفاده ۷۷

۳-۱-۴- منبع مورد استفاده برای جداسازی سویه‌ها ۷۷

۳-۲- محیط‌های کشت ۷۷

۳-۲-۱- محیط کشت‌های مورد استفاده ۸۰

۳-۳- جداسازی میکروارگانیسم‌ها ۸۰

۳-۴- خالص سازی میکروارگانیسم‌ها ۸۰

۳ -۵- تهیه اسلنت ۸۱

۳-۶- افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های موجود ۸۱

۳-۷- تعیین محدوده‌های رشد سویه‌های مناسب برای تهیه مجموعه میکروبی ۸۲

۳-۸- شناسایی میکروارگانیسم‌ها ۸۲

عنوان **صفحه**

۳-۸-۱- شناسایی بیوشیمیایی ۸۲
۳-۸-۲- شناسایی مولکولی ۸۳
۳-۸-۲-۱- استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن ۸۳
۳-۸-۲-۲- تعیین ناخالصی در DNA ۸۳
۳-۸-۲-۳- واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) ۸۳
۳-۸-۲-۴- محلول TBE ۸۵
۳-۸-۲-۵- طرز تهیه ژل آگارز ۸۵
۳-۸-۲-۶- الکتروفورز محصول بر روی ژل آگارز ۸۶
۳-۸-۲-۷- مارکر DNA ۸۶
۳-۸-۲-۸- تعیین غلظت DNA استخراج شده ۸۶
۳-۸-۲-۹- بررسی محصول PCR ۸۶
۳-۹- انتخاب سویه‌های مناسب ۸۶
۳-۱۰- روش‌های سنجش ترکیبات فعال سطحی ۸۷
۳-۱۰-۱- تولید بیوسورفکتانت ۸۷
۳-۱۰-۲- تست پراکنش نفت ۸۷
۳-۱۰-۳- اندازه‌گیری کشش سطحی ۸۸
۳-۱۰-۴- اندازه‌گیری فعالیت امولسیون کنندگی ۸۸
۳-۱۱- روش‌های اندازه‌گیری غلظت ترکیبات نفتی ۸۹
۳-۱۱-۱- جذب سنجی(اسپکتروفتومتری) ۸۹
۳-۱۱-۲- کروماتوگرافی گازی ۸۹
۳-۱۱-۳- وزن سنجی(گراویمتری) ۹۰
۳-۱۲- تجزیه زیستی ترکیبات نفتی ۹۱
۳-۱۲-۱- استخراج ترکیبات نفتی ۹۱
۳-۱۲-۲- تعیین غلظت ترکیبات نفتی در نمونه‌ها ۹۱
۳-۱۲-۳- تعیین پیک نرمال آلکان‌ها ۹۲
۳-۱۳- آماده‌سازی خاک ۹۲
۳-۱۴- تهیه چیدمان مناسب آزمایشگاهی جهت آزمایشات زیست پالایی خاک آلوده ۹۲

عنوان **صفحه**

۳-۱۵- طراحی آزمایشات ۹۳

۳-۱۶- تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده نفتی ۹۶

۳-۱۶-۱- تعیین میزان کل هیدروکربن‌های نفتی(TPH) ۹۷

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

۴-۱- جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسم‌ها ۹۹

۴-۲- شناسایی میکروارگانیسم‌ها ۱۰۰

۴-۲-۱- شناسایی بیوشیمیایی ۱۰۰

۴-۲-۲- شناسایی مولکولی ۱۰۱

۴-۳- بررسی تولید بیوسورفکتانت توسط تست پراکنش نفت ۱۰۲

۴-۴- اندازه‌گیری کشش سطحی ۱۰۳

۴-۵- اندازه‌گیری شاخص امولسیفیکاسیون ۱۰۳

۴-۶- طیف‌های گاز کروماتوگرافی استاندارد نرمال آلکان‌های منتخب ۱۰۴

۴-۷- تجزیه زیستی هیدروکربن‌های موجود در نفت سفید ۱۰۶

۴-۸- انتخاب سویه‌های مناسب برای تهیه مجموعه میکروبی جهت فرآیند زیست پالایی ۱۱۰

۴-۹- تعیین محدوده‌های رشد سویه‌های مناسب ۱۱۱

۴-۱۰- تعیین مش بندی خاک ۱۱۱

۴-۱۱- طراحی آزمایشات ۱۱۲

۴-۱۲- تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده نفتی ۱۱۳

۴-۱۳- تحلیل نتایج حاصل از طراحی عاملی جزئی نیمه ۱۱۴

۴ -۱۴-تبدیل طراحی جزئی به طراحی عاملی کامل و تحلیل نتایج حاصل ۱۲۲

۴-۱۵- توصیف سیستم با مدل رگرسیونی ۱۲۴

نتیجه گیری ۱۳۰

پیشنهادات ۱۳۱

منابع و مآخذ ۱۳۲

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱- ۱: استفاده از شناور (سد مکانیکی) برای رفع آلودگی‌های نفتی از آب ۱۱

شکل ۱-۳ : مسیرهای متابولیکی تخریب آلکان‌های خطی. اکسیداسیون انتهایی، انتهایی دو سویه و ما قبل از انتها ۲۴

شکل ۱-۴ : دو مسیر متناوب تجزیه هوازی ترکیبات آروماتیک ۲۶

شکل ۱-۵ : نمایش پیوندهای بین ملکولی آسفالتین که امکان شکسته شدن و تخریب زیستی ملکول در آن‌ها وجود دارد ۲۷

شکل ۲-۱ : اشکال متداول بیوراکتورهای دوغابی ۴۹

شکل ۲-۲ : بیوراکتور حالت جامد a) راکتور بستر ثابت b) راکتور درام چرخنده ۵۰

شکل ۲-۳ : بیوراکتور دوغابی با به کار بردن راکتور تانک همزن‌دار ناپیوسته هوادهی شده ۵۱

شکل ۲-۴ : شکل شماتیک تاسیسات بیوراکتور دوغابی ۵۲

شکل ۲-۵ : بیوراکتور درامی ۵۸

شکل ۲-۶ : بیوراکتور درامی ۵۸

شکل ۲-۷ : بیوراکتور فاز جامد آزمایشگاهی ۶۰

شکل ۲-۸ : شکل بندی تیغه‌های نصب شده در بیوراکتور فاز جامد ۶۱

شکل ۲-۹ : شماتیک بیوراکتور غلتان بافل‌دار ۶۲

شکل ۲-۱۰ : شماتیک بیوراکتور خاک تثبیت شده برای کشت جمعیت میکروبی در خاک ۶۶

شکل ۲-۱۱: شماتیک بیوراکتور هوا بالابر سلول تثبیت شده به کار رفته برای آزمایشات ناپیوسته و پیوسته ۶۷

شکل ۲-۱۲ : بیوراکتور بی‌هوازی بافل‌دار ۶۹

شکل ۲-۱۳ : بیوراکتور تانک همزن‌دار غیر مرسوم دوغابی ۷۰

شکل ۲-۱۴ : مکانیسم‌های زیستی و فیزیکوشیمیایی TLPB ۷۲

شکل ۳-۱ : نمونه‌های خاک آلوده به نفت پالایشگاه اصفهان ۸۰

شکل ۳-۲ : بیوراکتورها در جارتست ۹۷

شکل ۳-۳ : استخراج هیدروکربن‌های نفتی با استفاده از سوکسله ۹۸

شکل ۴-۱ : تصویر میکروسکوپی برخی باکتری‌های خالص جداسازی شده با بزرگنمایی ۱۰۰۰ ..... ۱۰۰

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۲ : تست پراکنش نفت در مورد سویه L(۱۳) ۱۰۳

شکل ۴-۳ : نمودار کشش سطحی و شاخص امولسیفیکاسیون بر حسب سویه‌ها ۱۰۴

شکل ۴-۵ : کروماتوگراف پنتا دکان ۱۰۵

شکل ۴-۶ : کروماتوگراف نمونه شاهد ۱۰۶

شکل ۴-۷ : کروماتوگراف نمونه B(۱) ۱۰۷

شکل ۴-۸ : کروماتوگراف نمونه۲(A) ۱۰۷

شکل ۴-۹ : کروماتوگراف نمونه ۳(S) ۱۰۸

شکل ۴-۱۰ : کروماتوگراف نمونه ۵(D) ۱۰۸

شکل ۴-۱۱ : کروماتوگراف نمونه ۷(F) ۱۰۹

شکل ۴-۱۲ : کروماتوگراف نمونه ۹(H) ۱۰۹

شکل ۴-۱۳ : نمودار درصد حذف نرمال دکان وپنتا دکان توسط سویه‌های جدا شده ۱۱۰

شکل ۴-۱۴ : نمودار نیم نرمال اثرها، درصد کاهش میزان کل هیدروکربن‌های نفتی بر اساس اثر استاندارد مطلق ۱۱۵

شکل ۴-۱۵ : نمودار احتمال نرمال طراحی عاملی جزئی ۱۱۷

شکل ۴-۱۶ : نمودار مانده‌ها در مقابل مقادیر برازیده طراحی عاملی جزئی ۱۱۷

.شکل ۴-۱۷ : نمودار مانده بر حسب ترتیب انجام آزمایشات طراحی عاملی جزئی ۱۱۸

شکل ۴-۱۸ : نمودار اثر اصلی عامل‌ها ۱۱۹

شکل ۴-۱۹ : نمودار اثر برهم‌کنش‌های عامل‌ها ۱۱۹

شکل ۴-۲۰ : نمودار احتمال نرمال طراحی عاملی کامل ۱۲۳

شکل ۴-۲۱ : نمودار مانده‌ها در مقابل مقادیر برازیده طراحی عاملی کامل ۱۲۳

شکل ۴-۲۲ : نمودار باقیمانده بر حسب ترتیب انجام آزمایشات طراحی عاملی کامل ۱۲۴

شکل ۴-۲۳ : درصد کاهش میزان کل هیدروکربن‌های نفتی بر حسب دور همزن و زمان ماند در مقدار تلقیح ثابت ۱۲۷

شکل ۴-۲۴ : درصد کاهش میزان کل هیدروکربن‌های نفتی بر حسب دور همزن و مقدار تلقیح در زمان ماند ثابت ۱۲۸

شکل ۴-۲۵ : درصد کاهش میزان کل هیدروکربن‌های نفتی بر حسب زمان ماند و مقدار تلقیح در دور همزن ثابت ۱۲۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱ : پرایمرهای تشخیص توالی ۱۶S rRNA برای سویه‌های جدا شده ۸۴

جدول ۳-۲ : مخلوط PCR مورد استفاده برای تکثیر DNA باکتری ۸۴

جدول ۳-۳ : برنامه زمانی واکنش PCR ۸۵

جدول ۳-۴ : عوامل انتخاب شده برای طراحی آزمایشات و سطوح آن‌ها ۹۵

جدول ۳-۵ : آزمایشات طراحی شده توسط نرم افزار Minitab ۹۶

جدول ۴-۱ : نتایج تست‌های بیوشیمیایی سویه‌ها ۱۰۱

جدول ۴-۲ : نتایج حاصل از تست 16S rDNA ۱۰۲

جدول ۴-۳ : محدوده‌های رشد سویه‌های مناسب ۱۱۱

جدول ۴-۴ : درصد ذرات موجود در خاک با اندازه‌های متفاوت ۱۱۲

جدول ۴-۵ : عوامل انتخاب شده برای طراحی آزمایشات و سطوح آن‌ها ۱۱۲

جدول ۴-۶ : آزمایشات طراحی شده توسط نرم افزار Minitab ۱۱۳

جدول ۴-۷ : درصد کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی در هر بیوراکتور پس از اتمام زمان ماند ۱۱۴

جدول ۴-۸ : نتایج تحلیل واریانس داده‌های حاصل از آزمایش‌های طراحی شده به روش عاملی جزئی ۱۱۶

جدول ۴-۹ : نتایج تحلیل واریانس داده‌های حاصل از آزمایش‌های طراحی شده به روش عاملی کامل ۱۲۲

جدول ۴-۱۰ : نتایج حاصل از نقاط مرکزی ۱۲۴

جدول ۴-۱۱ : نتایج تحلیل واریانس داده‌های حاصل از آزمایش‌های طراحی شده به روش عاملی کامل با داشتن نقطه مرکزی ۱۲۵

فهرست اختصارات

GC	کروماتوگرافی گازی
BTEX	بنزن، تلوئن، اتیل بنزن و زایلن
PCB	پنتا کلرو بی فنیل
PDA (Potato dextrose agar)	آگار دکستروز سیب زمینی
SB (Slurry bioreactor)	بیوراکتور دوغابی
PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbon)	هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای
TPH (Total petroleum hydrocarbon)	هیدروکربن‌های کلی نفت
PCP (Pentachloro phenol)	پنتا کلرو فنل
SOPB (Solid phase bioreactor)	بیوراکتور فاز جامد
ISBR (Immobilized bioreactor)	بیو راکتور تثبیت شده
PCB(Polychlorobiphenyl)	پلی کلرو بی فنیل
ABR (Anaerohic baffle reactor)	راکتور بافل دار بی هواز
USTR (Unconventional stirred tank reactor)	راکتور تانک همزن‌دار غیر مرسوم
TLPB (Two-liquid-phase bioreactor)	بیوراکتور دو فاز مایع
NAPL (Non –aqueous–phase liquid)	مایع فاز غیر آبی
PCR (Polymerase chain reaction)	واکنش زنجیره پلیمراز
TBE (Tris-borate-EDTA)	تریس بورات اتیلن دی آمین تترا استیک اسید
Rotating drum bioreactor (RDB)	بیوراکتور درام چرخنده

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- مقدمه

پیشرفت علوم و تکنولوژی در طی انقلاب صنعتی توانایی بشر را در بهره‌برداری از منابع طبیعی افزایش داده است هر چند که این امر اختلالات بی سابقه‌ای در چرخه‌های طبیعی ایجاد نموده است[۱]. امروزه بیش از ۷۰۰۰ نوع مواد شیمیایی آلی بطور عمومی مصرف می‌شوند، که از این میزان تنها اثرات تعداد کمی از آن‌ها بر سلامت بشر و محیط زیست مورد آزمایش و سنجش قرار گرفته است. هیدروکربن‌های نفتی یک دسته از این آلاینده‌های خطرناک محیط هستند که بر اساس فعالیت‌های مختلف در محیط زیست تجمع می‌یابند[۲]. سالانه بیش از دو میلیون تن نفت در جهان تولید می‌شوند که در حدود ۱۰ درصد از آن در اثر حوادث مختلف از قبیل شکستن خطوط انتقال و یا نشت از تانک‌های ذخیره وارد محیط زیست می‌شوند. برابر گزارش‌های 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 می‌کرد و هر سال ۳۰۰۰۰ تانک نشت کننده به این تعداد افزوده می‌شود. بیش از نیمی از این تانک‌ها برای ذخیره هیدروکربن‌های نفتی به کار می‌روند. هیدروکربن‌های نفتی اغلب سمی هستند و دفع و یا تخلیه آن‌ها به محیط زیست مشکلات زیادی را به وجود می‌آورد. 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[۳]. مجموعه موادی از قبیل هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک، آلکان‌های زنجیره بلند و آلکان‌های حلقوی اشباع عمده آلودگی‌های خاک می‌باشند[۴]. در کشورهای صنعتی و نیمه صنعتی به جز تانک‌های نشت کننده زیرزمینی، منابع اصلی آلودگی به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، واکنش‌های احتراقی هستند. از آنجا که ضریب اکتانول – آب ترکیبات هیدروکربنی آروماتیک چند حلقه‌ای، بالا و حلالیت آن‌ها در آب کم است، در رسوبات تجمع می‌کنند به طوری که خاک و یا رسوبات ممکن است به عنوان محل ذخیره این ترکیبات ذکر شوند. بسیاری از ترکیبات چند حلقه‌ای موجود در نفت خام مانند نفتالین و فنانترین در حشره کش ها، قارچ کش‌ها، پاک کننده‌ها و رنگ‌ها نیز وجود دارند. اغلب این ترکیبات دارای اثرات نامطلوب سمی، موتاژن و یا سرطان‌زایی هستند. ترکیبات نفتی در بسیاری از نمونه‌های محیطی از قبیل هوا، خاک، رسوبات، آب، گیاهان و مواد غذایی یافت می‌شوند. نشت هیدروکربن‌های نفتی از تانک‌های ذخیره زمینی و همچنین فعالیت‌های مختلف دریایی، انتقال مواد نفتی، دفع فاضلاب، قایقرانی و غیره از سایر منابع آلوده کننده به هیدرو کربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در محیط هستند[۲]. از هر ۳۷۸۵ لیتر نشتی هیدروکربن‌های نفتی، ۴۹ لیتر آن وارد آب‌های زیر زمینی شده و مابقی درون خاک باقی می‌ماند[۵]. نشت ترکیبات نفتی تحت تاثیر نیروهای موئینگی و ثقلی منجر به حرکت عمودی در خاک‌های غیر اشباع شده و خلل و فرج خاک را پر می‌کند. در صورت زیاد بودن مقدار نشتی، فاز مایع به سطح آب رسیده و از آنجا به همراه جریان آب‌های زیر زمینی حرکت کرده و به دلیل دانسیته کمتر نسبت به آب در سطح آب شناور باقی می‌ماند[۲]. بزرگترین حجم زائدات تولیدی در صنایع نفت و گاز، فاضلاب‌های آلوده به ترکیبات نفتی می باشد. این فاضلاب‌ها در طی فرآیندهای تولید و پالایش نفت و گاز و همچنین در هنگام حمل نقل مواد نفتی و یا در حوادث مختلف در مناطق ساحلی و دریایی تولید می‌گردند. تخلیه این گونه فاضلاب‌ها به آب بخصوص در مناطق کم عمق و همچنین آلوده شدن خاک به این گونه ترکیبات پیامدهای زیست محیطی زیادی را به دنبال دارد[۶]. تا کنون روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای حذف آلودگی‌های هیدروکربنی از آب‌ها و خاک‌های آلوده به کار گرفته شده است. به هر حال هزینه اغلب این روش‌ها بالاست و بسیاری از روش‌ها برای کاربرد عملیاتی با مشکل مواجه‌اند. از مزایای متابولیسم میکروبی می‌توان به ارزان بودن، سهولت کاربرد آن و راندمان مناسب آن اشاره نمود. بنابراین هنوز مطالعه روش‌های زیستی برای تجزیه هیدروکربن‌ها در خاک و گسترش تکنولوژی‌های کم

هزینه و عملیاتی بر این اساس مورد توجه قرار می‌گیرد[۴]. تصفیه زیستی خاک عبارت است از استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تبدیل مواد آلی آلوده کننده به ترکیبات کم خطر که این ترکیبات در مرحله بعد وارد چرخه‌های طبیعی می‌شوند. شدت تصفیه به ۱)ترکیب و غلظت آلودگی، ۲) جمعیت میکروب‌های مناسب، ۳) اسیدیته، اکسیژن، و مواد مغذی محیط، ۴) ساختار و خواص فیزیکو شیمیایی خاک، ۵)تاریخچه آلودگی و ۶) دما، رطوبت، و شوری محیط وابسته است. فرآیند تصفیه خاک‌های آلوده بطور طبیعی و بدون دخالت انسان نیز اتفاق می‌افتد ولی عموما بدلیل محدودیت در یک یا چند عامل از عوامل فوق سرعت آن اندک است. در عملیات آلودگی زدائی زیستی عوامل محدود کننده بهینه سازی شده و فرآیندهای زیستی تسریع می‌شوند [۷]. بهینه سازی به روش‌های مختلف از جمله افزودن ترکیبات شیمیایی، تنظیم رطوبت، هوادهی، افزودن میکروب-های آلودگی زدا، و یا کمپوست کردن خاک با افزودن پسماندهای کشاورزی و دامی صورت می‌پذیرد. این عملیات ممکن است با یا بدون جابجا کردن خاک انجام گیرد. از جمله اولین کسانی که پتانسیل میکروارگانیسم-ها در استفاده از منابع نفتی به عنوان منبع کربن را مورد توجه قرار دادند می‌توان به زوبل[1] و همکارانش در سال ۱۹۴۶ اشاره کرد. آن‌ها عملکرد میکروارگانیسم‌ها روی هیدروکربن‌ها را مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که میکروارگانیسم‌ها قادرند از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی در طبیعت استفاده کنند که میزان مصرف هیدروکربن‌ها به اجزاء تشکیل دهنده نفت، شرایط محیطی و تجمع میکروبی بسیار وابسته است. مطالعات کلاسیک زوبل پس از ۱۲ سال با غرق شدن تانکر عظیمی در کانال انگلیس به طور جدی‌تری ادامه یافت و توجه بسیاری از مجامع علمی را به خود جلب کرد[۱]. از آن به بعد بسیاری از محققین در گوشه و کنار جهان به تحقیق و بررسی حذف زیستی آلودگی‌های نفتی پرداخته‌اند و نشان داده‌اند که گونه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها دارای قدرت تجزیه کنندگی هیدروکربن‌ها می‌باشند. مثلا فریچ و هافریشتر[2] به تعداد قابل ملاحظه‌ای از باکتری‌ها اشاره کرده است که قادرند از هیدروکربن‌های نفتی استفاده کنند[۸]. این باکتری‌ها از نظر توان بیوشیمیایی متنوع بوده و در تعداد زیادی از محیط‌های آبی و خشکی شامل آب‌های شور دریا، رسوبات دریایی، آب‌های شیرین و رسوبات آن، سطوح رویی و زیرین خاک، آب‌های زیرزمینی و لجن‌های صنعتی و شهری یافت می‌شوند. با توجه به موارد فوق و حوادث دهه‌های اخیر از قبیل حادثه اکسون والدز[3] در سواحل آلاسکا، آلودگی‌های بوجود آمده در تگزاس، ایسلند، سواحل انگلستان و فاجعه بزرگ زیست محیطی

1 Zobell
2 Fritsche and Hofrichter
3 Exxon Valdez

خلیج فارس توجه بیشتری به حذف زیستی آلودگی‌های نفتی معطوف گردیده و استفاده از میکروب‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی به یکی از روش‌های اولیه و مهم در حذف آلودگی‌های نفتی از محیط‌های مختلف تبدیل شده است[۹] رسوبات نفتی سیالات هیدروکربنی عموماً شامل آسفالتین‌ها، ترکیبات واکسی و هیدروکربن‌ها هستند که با آسیب زدن به تجهیزات، افزایش هزینه نگهداری،کاهش ظرفیت انتقال و یا حتی انسداد کامل خطوط لوله سالانه میلیاردها دلار در سراسر دنیا خسارت وارد می‌کنند[۱۰]. از اوائل دهه ۹۰ میلادی روش‌های زیستی به عنوان یکی از راه‌های مقابله با پدیده رسوبات سنگین در، کنار روش‌های مکانیکی، حرارتی و شیمیایی قرار گرفتند[۱۰و۱۱]. زیست پالایی خاک یعنی کاربرد میکروارگانیسم‌ها برای پاکسازی خاک‌های آلوده از تقریبا ۱۰ تا ۱۵ سال پیش به طور جدی مورد توجه قرار گرفته‌است هر چند اولین مطالعات در مورد متابولیسم هیدروکربن‌ها (نفتالین، آنتراسین و غیره) به کمی قبل از دهه ۳۰ توسط تاوسن[۱] در سال ۱۹۲۷ بر می-گردد. اولین تاکید کامل روی میکروبیولوژی خاک در قبل از دهه ۶۰ توسط مارتین الکساندر[۲] در کتاب میکروبیولوژی خاک آمده‌است. بوور[۳] و همکاران ۱۹۸۱ ، وگل و مک کارتی[۴] ۱۹۸۵ و کوئنسن[۵] و همکاران ۱۹۸۸ و بسیاری دیگر در این مورد مطالعه نمودند. سالونن[۶] و دیگران در ۱۹۸۴ بر روی خاک آلوده شده با فنل-های پلی کلرینه، الدنیوس[۷] در سال ۱۹۸۹ بر خاک آلوده شده با کلروبنزن ها، برانسباخ و راینکه[۸] در ۱۹۹۳ بر خاک آلوده شده با کلرو بنزوات‌ها، میتلینگ و کارلسون[۹] در ۱۹۹۶ بر خاک آلوده شده با ترکیبات فنل‌های پلی کلرینه، پیپکه[۱۰] در ۱۹۹۷ برای رفع آلودگی کلرو و متیل آروماتیک‌ها، الفانتروسی[۱۱] در ۱۹۹۷ بر آلودگی ۳-کلرو بنزوات، ونک[۱۲] در ۱۹۹۸ بر دوغاب خاکی و رفع آلودگی آترازین، کاستنر[۱۳] در ۱۹۹۸ بر خاک و پلی آروماتیک هیدروکربن کار کردند[۱۲]. گری[۱۴] و همکاران در سال۱۹۹۴ ، وودهیل و جیجر[۱۵] در ۱۹۹۴،

1 Tausson
2 Alexander
3 Bouwer
4 Vogel and MacCarty
5 Quensen
6 Salonen
7 Oldenhuis
8 Brunsbach and Reineke
9 Miethling and Karlson
10 Pipke
11 El Fantroussi
12 Wenk
13 Kastner
14 Gray
15 Woodhull and Jerger

کریستودلس و کوتسوپیر[1] در ۱۹۹۸ و رادرفورد[2] و همکاران در سال ۱۹۹۸ براین مسئله تاکید داشتند که مخلوطی از خاک در آب در نسبت‌های گوناگون نرخ تصفیه را به وسیله حداکثر نمودن تماس بین میکروارگانیسم‌ها، هیدروکربن‌ها، مواد مغذی و اکسیژن افزایش می‌دهد. در بیوراکتورهای دوغابی (دو فازی) افزایش رطوبت خاک منجر به افزایش میزان زیادی آلودگی محلول و به تبع آن افزایش قابلیت تجزیه زیستی می‌شود[۱۳]. طراحی‌های زیادی برای زیست تخریب پذیری دوغابی خاک‌های آلوده وجود دارد. وو و پارک[3] در سال ۱۹۹۹ و فراری[4] در ۱۹۹۶ در گزارش‌هایی جداگانه نشان دادند که تصفیه زیستی دوغابی حذف نفت سریع‌تر از تصفیه زیستی فاز جامد است[۱۴]. دمای پایین وکمبود مواد مغذی در دسترس باکتری‌ها به عنوان عوامل محدود کننده تخریب پذیری میکروبی هیدروکربن‌های نفت در خاک‌های آلوده به حساب می‌آیند. اگرچه زیست تخریب پذیری هیدروکربن‌های نفتی در دمای پایین حتی در $1/1^0C$- گزارش شده است[۱۵]. زیست تخریب پذیری هیدروکربن را در5^0C-۴ گزارش نمودند ولی فاز تاخیر طولانی بوده است و نرخ تخریب در این دماها پایین می‌باشد[۱۶]. تحقیقات حاکی از کارائی میکروب‌های اکسترموفیل در حذف آلودگی‌های نفتی خاک است. از طرفی در مناطق سردسیر کانادا نیز وجود میکروب‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها گزارش شده است[۱۷]. سابقه آلودگی خاک بر سرعت تصفیه زیستی تاثیر دو گانه‌ای دارد از طرفی جذب تدریجی هیدروکربن‌ها توسط ذرات خاک سرعت مزبور را کاهش داده و ازطرف دیگر سازگاری تدریجی جمعیت میکروبی می‌تواند سرعت تجزیه را افزایش دهد[۱۸]. منبع تامین مواد مغذی بر رشد میکروب‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی موثر است و کودهای آلی در مقایسه با کودهای معدنی مناسبترند. استفاده از فضولات مرغ در این رابطه سرعت تصفیه را به دو برابر افزایش داده است[۱۹]. اختلاط خاک با ضایعات کشاورزی نیز تصفیه زیستی آلودگی‌های نفتی را تسریع نموده است[۲۰]. همچنین تاثیر مثبت افزودن سورفکتانت بر سرعت تجزیه آلیفاتیک‌ها در خاک آلوده به نفت خام گزارش شده است[۲۱]. عملیات تصفیه زیستی، آلکان‌های آلوده کننده خاک حوضچه‌های لجن نفت یک پالایشگاه را طی چهار ده ماه به میزان ۷۵-۱۰۰٪ حذف نموده است[۲۲]. نمونه‌های خاک آلوده شده به مواد نفتی از چند نقطه جهان جمع‌آوری شده و روش‌های مختلف تصفیه زیستی بر آن‌ها اعمال شده است. طی سه ماه تمام برش‌های نفتی به میزان ۷۲ الی ۷۵٪ حذف شده‌اند[۲۳]. درشرایط آزمایشگاهی طی ۷۲ روز با اعمال تیمارهای

1 Christodoulatos and Koutsospyros
2 Rutherford
3 Woo and Park
4 Ferrari

مناسب ۴۰٪ از آلودگی نفتی طولانی مدت خاک برطرف شده است[۲۴]. دریک آزمایش دیگر خاک آلوده به انواع نفت خام باغلظت کل ۲۶-۷۷ گرم بر کیلوگرم خاک مورد تصفیه زیستی قرار گرفته و طی ۵۳ روز اول ۳۸-۵۳٪ کل هیدروکربن‌ها حذف شده و طی ۱۵۶ روز بعد این رقم به ۶۶ الی ۸۱٪ رسیده است[۲۵]. میکروب‌ها عموما برش‌های سبک را سریع‌تر از برش‌های سنگین مصرف می‌کنند. در این رابطه در یک آزمایش، لجن تانک‌های نفت خام به میزان ده درصد به خاک افزوده شده و با اضافه کردن میکروب، سورفکتانت، و منابع نیتروژن و فسفر، مورد تصفیه زیستی قرار گرفته که طی ۵۶ روز برش nC_8-nC_{11} به میزان ۱۰۰٪، nC_{12}-nC_{21} به میزان ۸۳-۹۸٪، nC_{22}-nC_{31} به میزان ۸۰-۸۵٪، و nC_{32}-nC_{40} به میزان ۵۷-۸۳٪ تجزیه شده‌اند[۲۶].

با توجه به این که کشور ما از جمله کشورهای بزرگ تولید کننده نفت بوده و صنایع مرتبط با صنعت نفت در آن توسعه یافته است با مشکلات ناشی از آلودگی‌های نفتی مواجه هستیم. توسعه روش‌های عملیاتی و سازگار با محیط زیست که از لحاظ اقتصادی هم هزینه‌های کمتری را در برداشته باشد برای حل این مشکل همواره مورد توجه بوده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های مبتنی بر مهندسی بیوتکنولوژی اشاره کرد که در آن‌ها آلودگی‌های نفتی بوسیله میکروارگانیسم‌های مناسب از ذرات خاک جدا شده و شسته می‌شوند و یا به وسیله همان میکروارگانیسم‌ها تجزیه می‌گردند. واضح است که برای رسیدن به این هدف ابتدا باید میکروارگانیسم مناسب شناسایی و زیست فعال سطحی تولیدی آن برای تعیین میزان کارایی در شناورسازی مواد نفتی از سطح ذرات خاک مورد بررسی قرار گیرد. در پژوهش حاضر سعی بر آن است که چنین میکروارگانیسمی شناسایی شده و زیست فعال سطحی تولیدی آن و نیز قابلیت آن در تجزیه ترکیبات نفتی مورد بررسی قرار گیرد.

۱-۲- آلودگی

آلودگی را می‌توان به عنوان یک تغییر نا مطلوب در خواص فیزیکی و زیستی هوا، آب یا زمین تعریف کرد که باعث به خطر انداختن سلامت، بقاء و فعالیت‌های انسان و سایر موجودات زنده می‌شود. بر پایه این تعریف، آلودگی لزوماً شامل خسارات فیزیکی نمی‌باشد، بلکه ایجاد وقفه در استفاده انسان، خود آلودگی می‌باشد [۲۷].آلوده کننده‌ها (آلاینده‌ها) معمولاً در اثر فعالیت‌های انسانی پدید می‌آیند و از همراهان دائمی جوامع پیشرفته بشری که تکنولوژی مدرن را در خدمت دارند، می‌باشند. از طرف دیگر افزایش جمعیت، درآمد سرانه، پیشرفت تکنولوژی و بالا بودن استاندارد در زندگی از عوامل مهم افزایش چشمگیر و روز افزون آلاینده‌ها به