

به نام خدا

## روشهای نوین در حذف آلودگی های ترکیبات نفتی از محیط با میکروارگانیزم های

### خالص سازی شده

### (نمونه موردی استان تهران)

طاهره محمودی آلاشتی، دانشجوی کارشناسی ارشد نانوشیمی، مسئول آموزش شهروندی سازمان مدیریت پسماند رباط کریم و بهارستان

پیام سیف الهی، دکترای معماری و شهرسازی، مدیرعامل سازمان مدیریت پسماند رباط کریم و بهارستان

جلال اقبالی راد، کاردانی حسابداری، معاون اداری و مالی سازمان مدیریت پسماند رباط کریم و بهارستان

مسئول مکاتبات: طاهره محمودی آلاشتی

#### چکیده:

آلودگی نفتی یکی از خطرات جدی تهدیدکننده محیط زیست و موجودات زنده است که حل این معضل زیست محیطی به طرق گوناگون از دیرباز مورد توجه پژوهشگران علوم زیستی بوده است. مبارزه با آلودگی های نفتی از زمان پیدایش این ماده، بخشی از پژوهش های علمی را به خود اختصاص داده که در گذشته به مراتب کمتر و امروزه به طور روز افزون، توجه متخصصان و کارشناسان را به خود جلب کرده است. استفاده از میکروارگانیزم ها روشی است که با عنوان پاکسازی زیستی یا تجزیه زیستی در اکثر کشورهای پیشرفته مورد استفاده قرار می گیرد.

در این مقاله ۴ نوع نمونه، شامل خاک اطراف پالایشگاه تهران، فاضلاب فرایندی پالایشگاه تهران، فاضلاب بهداشتی پالایشگاه تهران و خاک اطراف محل تخلیه بنزین و گازوئیل در یک پمپ بنزین برداشت گردید. طبق اهداف تعیین شده برای این مطالعه از هیچ روش آماری برای نمونه برداری استفاده نشد و تنها از محل های آلوده به نفت خام، که احتمال می رفت حاوی میکروارگانیزم های نفت خوار باشند، نمونه برداری بعمل آمد.

## ۱- مقدمه

نفت خام با بیش از ۳۴۰ فراورده یکی از اصلی ترین منابع انرژی و نیروی محرکه اقتصادی جهانی است، ایران ۹ درصد از کل مخازن نفت جهان را در اختیار دارد. نفت خام، کمپلکس پیچیده ای از مخلوط صدها نوع ترکیب مختلف شامل هیدروکربنها، نیتروژن، گوگرد و وانادیوم است که قسمت هیدروکربنی شامل ترکیبات آروماتیک، آلیفاتیک و آسفالتن است. آلودگی های نفتی تقریباً یک پیامد اجتناب ناپذیر از افزایش سریع جمعیت و مصرف انرژی است که بر پایه تکنولوژی نفت قرار دارد. طی سالهای گذشته تمام توجه کارشناسان به آلودگی های نفتی اقیانوس ها ناشی از تصادف نفت کش ها معطوف شده بود که بزرگترین آن در سال ۱۹۶۷ در آبهای انگلستان رخ داد.

در سال ۱۹۷۵ در کارولینای جنوبی از یک مخزن نفت خام در حدود هزار گالن نفت به آب دریا نشت کرد. همچنین در سال ۱۹۹۱ بیش از ۵ تن نفت خام در آبهای خلیج فارس ریخته شد که سبب نابودی گیاهان و اکوسیستم های ساحلی خلیج فارس شد. خلیج فارس به دلیل تردد کشتی های نفت کش، حفر چاه های متعدد و استخراج نفت در آن، سالانه حدود ۱۶۰ هزار تن نفت و مواد نفتی را در خود جای می دهد و به عنوان یکی از آلوده ترین دریاهای جهان شناخته می شود. به طور کلی وقایعی که به برخی از آنها اشاره شد، سبب شد تا توجه بیشتری به ساخت و ابداع روشهای مختلف معطوف شود تا بتوان با آلودگی های دریاها و نواحی ساحلی مقابله کرد [1].

روشهای متعددی برای حذف آلودگی های نفتی در محیط زیست ارایه شده که مهمترین آنها عبارتند از:

۱- جمع آوری دستی آلودگی های نفتی از سطح آب

۲- محصور کردن آلودگی های نفتی به وسیله وسایل فیزیکی

۳- استفاده از موادی مانند پر و کاه که ذرات نفت را جذب می کند

۴- آتش زدن

۵- استفاده از حلال های دو قطبی

۶- پاکسازی زیستی یا تجزیه زیستی و یا Bioremediation

## ۲- پاکسازی یا تجزیه زیستی

۲۵ درصد از نفت رها شده در آب از طریق تبخیر از بین می رود و بقیه به وسیله عمل اکسایش نوری و اکسایش میکروارگانیزم

ها شکسته می‌شود که به این عمل تجزیه زیستی گفته می‌شود. حضور میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدراتهای کربن در آب دریا و خاکها سبب شده که تجزیه به عنوان یکی از موثرترین روشهای حذف آلودگی های نفتی معرفی شود و کاربرد سیستم‌های بیولوژیک برای نابود کردن یا کم کردن غلظت مواد سمی نظیر هیدروکربورهای نفتی را تسریع می‌کند. این عمل در حضور اکسیژن و مواد غذایی به خصوص نیتروژن و فسفر تسریع می‌شود.

انواع روش های فوق در کشورهای صنعتی نظیر آمریکا، ژاپن، آلمان، انگلستان، کره جنوبی و روسیه به طور معمول استفاده می‌شود و در سایر کشورهای به خصوص حوزه خلیج فارس در مرحله تحقیقاتی است. از محدودیت های این روش ها می توان به محدودیت در تعیین میزان شوری، دما، PH و نوع ترکیبات نفتی اشاره کرد. سودوموناسها تنها باکتری هایی هستند که قادر به تجزیه هیدروکربورهای شاخه ای هستند، اصولاً میکروارگانیسم ها با کمک ۳ فراورده اصلی زیر قادر به تجزیه هیدروکربورهای نفتی می باشند:

۱- **آنزیمها:** آنزیمهای مونواکسیژناز و دی اکسیژناز مهمترین آنزیمها موثر در تجزیه هیدروکربورهای نفتی بوده و فراورده‌های حاصل از فعالیت این آنزیمها، الکلهای هستند، بنابراین با سنجش میزان الکل ها می توان پی به مقدار تجزیه هیدروکربورهای نفتی برد.

۲- **بیوسورفکتانتها:** مواد بیولوژیک دارای گروه های آب دوست و آب گریز در سطح سلول هستند و به وسیله تعداد زیادی از میکروارگانیسم ها تولید می شوند. براساس ساختار شیمیایی به گروههای گلیکولیپیدی، فسفولیپیدها، اسیدهای چرب و لیپولی ساکاریدها طبقه بندی می شوند. بیوسورفکتانتها به وسیله امولسیونه کردن و آزاد کردن هیدروکربورهای جذب شده به مواد آلی خاک، سبب افزایش غلظت آبی ترکیبات هیدروفوبیک شده و باعث افزایش سرعت انتقال جرم می شود و به این وسیله به تسریع تجزیه زیستی کمک می کنند. از بیوسورفکتانتها برای پاکسازی تانکهای ذخیره نفت، تصفیه فاضلاب های نفتی و تجزیه زیستی آلودگی های نفتی در مناطق خشکی و دریایی استفاده می شود.

۳- **اسیدها و حلالها:** بسیاری از میکروارگانیسمها قادرند با استفاده از هیدروکربورها به عنوان منبع کربن و انرژی، اسیدها و حلال های مختلف نظیر استن، اتر، بنزن و اسید اگزالوستیک تولید کنند که باعث حل شدن هیدروکربورهای نفتی می شود. هیچ میکروارگانیسمی به تنهایی قادر به تجزیه کامل هیدروکربورهای نفتی به  $CO_2$  و آب به عنوان محلول نهایی نیست.

اصولاً از قارچها در محیط خاکی و از باکتری ها در محیط آبی بیشتر استفاده می شود. امروزه با کمک مهندسی ژنتیک چندین پلاسمید را درون باکتری ها به خصوص جنس سودوموناس قرار داده اند تا بتوانند چندین مشتق نفتی را به طور همزمان تجزیه کنند. محققان کانادایی چهارپلاسمید PHG-2، PPK2033، PKT230، PAC25 را درون سودوموناس پوتیدا قرار داده و سویه ای از مهندسی ژنتیک شده را تولید کرده اند که قادر است به طور همزمان نفتالین، پارافین، بنزن و آسفالتن را تجزیه کند [3,4].

سودوموناس پوتیدا توانایی تجزیه هیدروکربورهای حلقوی معطر را دارد. سویه ای از TOL پلاسمید است. این پلاسمید را در جهت افزایش قدرت تجزیه کنندگی ترکیبات هالوژن دار حلقوی معطر از طریق کونژگاسیون (لقاح) B13 از سودوموناس پوتیدا به سویه TOL تغییر داده اند.

باکتری قادر است تری کلرواتال را به دی اکسید کربن و محصولات غیر قابل تبخیر تجزیه کند و این عمل به کمک آنزیم تولوئن مونواکسیژناز انجام می شود.

میکروبیولوژیست نقش دائمی و مهمی در صنایع میکروبی بر عهده دارد. او میکروبهای مورد نیاز را انتخاب کرده و محیط کشت مناسب و شرایط مساعد ( تهویه ، بهم زدن محیط ، PH و درجه حرارت) را تعیین می نماید. او با انجام فرایند در لوله آزمایش و ارلن ، طرح را در سطح کارخانه پیاده می کند، همواره روش آزمایشگاهی در سطح وسیع نتیجه مطلوب نمی دهد لذا تنظیم مجدد برای متناسب کردن آن برای کاربرد تجارتي ضرورت دارد. در سرتاسر فرایند آماده کردن مواد غذایی نظارت جهت حفظ کیفیت فرآورده ضرورت دارد. کاربرد صنعتی میکروبیولوژی شامل میکروارگانیسرها در مقیاس بزرگ ، سنتز انواع مواد شیمیایی می باشد.

### ۳- کشت میکروارگانیسرها در مقیاس بزرگ

در صنعت میکروارگانیسرها را در مقیاس بزرگ پرورش می دهند. مخمر نانوايي در شیرینی پزی و تهیه انواع نانها جهت خمیر مورد استفاده قرار می گیرد. کشاورزان دانه های گیاهان تیره نخود را جهت ایجاد گرهمهای ریشه ای به باکتری ریزیبوم آغشته می کنند. تهیه مایه میکروبی جهت تهیه کره و انواع پنیرها در صنایع شیری لازم است.

به علاوه مخمرها و کپکها به عنوان غذا یا جهت تهیه غذا مورد استفاده قرار می گیرند. و باکتریهای بیماریزا در مقیاس وسیعی برای تهیه واکسنها به منظور ایجاد ایمنی در انسان و حیوانات کشت داده می شوند.

### ۴- مخمر نانوايي

مخمر نان سويه ای از قارچ ساکارومايسس سروريزه است که قدرت تولید گاز و مزه مطبوع دارد. ابتدا باید کشت خالصی از مخمر را در آزمایشگاه تهیه کرده و بعد آن را در مقیاس بزرگ تهیه نموده و سرانجام آن را در بشکه های بزرگ وارد سازند. در جریان این مراحل توجه زیادی باید بکار رود تا از بروز آلودگی جلوگیری شود. مخمرها را با سانتریفوگاسیون و شستشو از محیط جدا ساخته و آن را با نشاسته مخلوط کرده و سپس تحت فشار را به صورت کیک درمی آورند. کیک مخمری را در شرایط سرما نگه می دارند تا از فساد آن توسط میکروبهای دیگر ممانعت به عمل آید. مخمرها را می توان تا ۱۰ درصد رطوبت خشک کرد. در این حالت مخمرها ماهها سالم باقی می مانند.

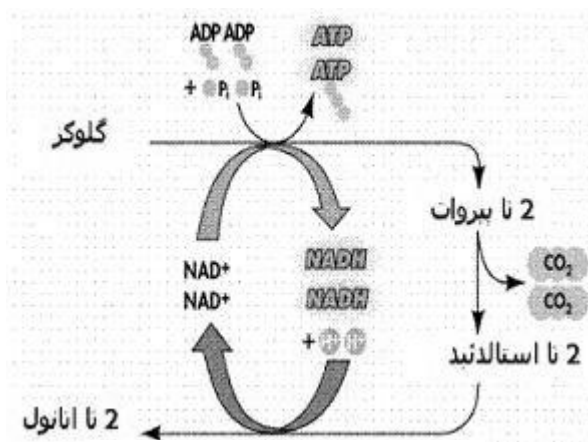
### ۴- تهیه میکروارگانیسرها جهت استفاده پزشکی

عامل ایمنی زایی که آن را واکسن می نامند عبارت است از: سوسپانسیون غلیظ میکروبی ضعیف شده یا کشته شده. در این کار سويه هایی از میکروبهها انتخاب می شوند که قدرت ایمنی زایی بیشتری داشته باشند. واکسنها را تحت شرایط کاملا کنترل شده

تهیه می‌کنند. واکسنهای باکتریایی را از کشت میکروبیها در آگار بدست می‌آورند. سلولهای سطح آگار غذایی را با محلول سرم فیزیولوژیک شستشو داده، باکتریها را با سانتریفوگاسیون جدا کرده و آنها را در سرم فیزیولوژیک در تراکم استاندارد (مثلا یک بلیون سلول در هر میلی لیتر) وارد می‌سازند. بسیاری از واکسنها را با حرارت ۶۰ - ۵۵ درجه به مدت ۶۰ - ۳۰ دقیقه یا پرتو فرابنفش ، فرمالدئید و فنل کشته یا غیر فعال می‌سازند. فرآورده نهایی را از نظر محتوا و ماده ایمنی‌زا و قدرت ایمنی‌زایی و خالص بودن مورد سنجش قرار می‌دهند و در مورد واکسن کشته شده، سترونی آن نیز باید تأیید گردد. آنگاه آنها را در لوله‌های کوچک ریخته و تا زمان مصرف در درجه حرارت پایین نگهداری می‌کنند. گاهی مواد شیمیایی نگهدارنده برای متوقف کردن رشد میکروارگانیسمهای آلوده کننده اضافه می‌کنند. باید اضافه کرد که امروزه در مورد برخی از بیماریها واکسنهای نو ترکیب تهیه شده است.

## ۵- تخمیر الکلی

این واکنش فرمول کلی تخمیر الکلی توسط مخمر است. که در شکل یک نشان داده شده است.

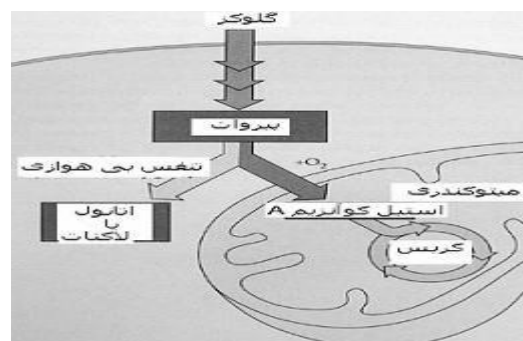


این فرمول نشان می‌دهد که قند ماده اولیه بوده و فرایند بی‌هوازی است. اتانول و دی‌اکسید کربن به مقدار زیاد (تا ۹۰ درصد) متراکم می‌شود و معمولاً مقادیر کمی از سایر فراردها نیز تشکیل می‌شود. مخمرها عادی قادرند گلوکز ، فروکتوز ، ساکارز و مالتوز را تخمیر کنند. پلی ساکاریدهایی مانند نشاسته و سلولز را نمی‌توان بوسیله مخمرها تخمیر کرد. ابتدا بایستی

آنها را به قندهای ساده تجزیه کرده، سپس تحت تاثیر مخمرها قرار داد. در صنعت از مخمرها بدین گونه استفاده‌های زیادی می‌شود. تولید حلالهای صنعتی تخمیر استون- بوتانول یکی از چندین فرایند میکروبیولوژیک مهم و در تهیه حلالها می‌باشد. علاوه بر بوتانول و استون ، اتانول ، دی‌اکسیدکربن ، هیدروژن و مقدار کمی اسید استیک و اسید بوتیریک تولید می‌شود. استون را در تهیه مواد منفجره ، استات سلولز و چسبها بکار می‌برند. در کشور آمریکا ماده خام اولیه ، ملاس و ذرت است. ملاس سترون یا مالت ذرت پخته شده را در بشکه‌هایی با باکتری کلستریدیوم استوبوتیلیکوم مخلوط می‌کنند. تخمیر در شرایط بی‌هوازی در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد بعد از ۷۲ - ۴۸ ساعت پایان می‌یابد. دی‌اکسید کربن و هیدروژن متصاعد شده را که شامل ۶۰ درصد هیدرات کربن تخمیر پذیر می‌باشد برای مصارف صنعتی جمع آوری می‌کنند. حلالهای خنثی ، بوتانول ، استون و اتانول را با تقطیر بخشی بدست می‌آورند.

## ۶- تخمیر کپکی

کپکها انواع اسیده‌های آلی را با اکسیده کردن گلوکز یا سایر مواد نظیر اسید گلوکونیک ، اسید اگزالیک و اسید سیتریک تولید می‌کنند. اسید گلوکونیک از گونه‌های معینی از قارچها به نام آسپرژیلوس نیگرا ، تهیه می‌شوند و گلوکونات کلسیم به عنوان دارو برای کودکان و زنان باردار استفاده می‌شود. اسید گالیک از تانن یا اسید تانیک بوسیله آسپرژیلوس نیگرا تهیه می‌شود که در صنایع تهیه رنگ و جوهر مصرف می‌شود. در شکل ۲ مراحل تخمیر کپکی نشان داده شده است.



شکل ۲: مراحل تخمیر کپکی

## ۷- تهیه آنزیمها

چند نوع آنزیم میکروبی جهت مصارف صنعتی تهیه می‌شود. آمیلاز ، انورتاز ، پروتئیناز و پکتیناز. بطور کلی میکروارگانیسم را تحت شرایط مناسب جهت تهیه آنزیم پرورش می‌دهند و آنگاه آنزیم را عصاره گیری کرده و با راسب کردن خالص می‌سازند. به عنوان مثال آنزیم آمیلاز را با فرایند خاصی از گونه‌های آسپرژیلوس و گونه‌های باسیلوس بدست می‌آورند.

آمیلاز را برای هیدرولیز نشاسته به دکسترین یا قندهای دیگر یا هر دو تهیه چسبها، در صنایع نساجی، شفاف کردن آب میوه‌ها بکار می‌برند. آنزیم پروتئیناز آسپرژیلوس و باسیلوس، پروتئینها را هیدرولیز کرده و در گوشت نرم کن، صنایع چرم سازی بکار برده می‌شود. علاوه بر موارد فوق باکتریها و کپکها در تهیه موادی نظیر دکسترین و هورمونهای مانند جیبرلین (هورمون گیاهی) و استروئیدها نقش مهم به عهده دارند.

#### ۸- دستگاه‌هایی که برای حذف آلودگی های نفتی به کار برده می شوند

۱- اسکیم دزمی ۲۵۰: این دستگاه ساخت کشور دانمارک و سال ساخت آن ۱۹۹۶ می باشد. کاربرد آن جمع آوری لکه های نفتی از سطح آب در مقیاس وسیع می باشد.

۲- هدر دزمی ۲۵۰: این دستگاه ساخت کشور دانمارک و سال ساخت آن ۱۹۹۶ می باشد. کاربرد آن جمع آوری لکه های نفتی از سطح آب در مقیاس وسیع می باشد.

۳- اسکیم ولوسپ ۲۵۰: این دستگاه ساخت کشور سوئد و سال ساخت آن ۱۹۹۴ می باشد. کاربرد آن جمع آوری لکه های نفتی از سطح آب در مقیاس کوچک و داخل حوضچه می باشد.

۴- هدر ولوسپ: این دستگاه ساخت کشور سوئد و سال ساخت آن ۱۹۹۴ می باشد. کاربرد آن جمع آوری لکه های نفتی از سطح آب در مقیاس کوچک و داخل حوضچه می باشد

۵- روبوم ۱۱۰: بوم متشکل از سه قسمت ۱۱۰ متری می باشد. کاربرد آن مهار لکه های نفتی از سطح آب در مقیاس بزرگ و بیرون از حوضچه بندر می باشد.

#### ۹- نتیجه گیری:

مبارزه با آلودگی های نفتی از زمان پیدایش این ماده، بخشی از پژوهش های علمی را به خود اختصاص داده که در گذشته به مراتب کمتر و امروزه به طور روز افزون، توجه متخصصان و کارشناسان را به خود جلب کرده است.

نفت خام با بیش از ۳۴۰ فراورده یکی از اصلی ترین منابع انرژی و نیروی محرکه اقتصادی جهانی است و ایران ۹ درصد از کل مخازن نفت جهان را در اختیار دارد. نفت خام، کمپلکس پیچیده ای از مخلوط صدها نوع ترکیب مختلف شامل هیدروکربنها، نیتروژن، گوگرد و وانادیوم است که قسمت هیدروکربنی شامل ترکیبات آروماتیک، آلیفاتیک و آسفالتن است. آلودگی های نفتی تقریباً یک پیامد اجتناب ناپذیر از افزایش سریع جمعیت و مصرف انرژی است که بر پایه تکنولوژی نفت قرار دارد. طی سالهای گذشته تمام توجه کارشناسان به آلودگی های نفتی اقیانوس ها ناشی از تصادف نفت کش ها معطوف شده بود که بزرگترین آن در سال ۱۹۶۷ در آبهای انگلستان رخ داد.

میکروارگانسیم هائی که در این نمونه ها قادر به مصرف نفت خام بعنوان تنها منبع کربن خود بودند در محیطی که حاوی مواد مغذی اصلی و منبع نیتروژن بود و نفت خام بعنوان تنها منبع کربن آن در نظر گرفته شده بود، جداسازی شدند. پس از جداسازی، این میکروارگانسیم ها به کمک روش کشت خطی، خالص سازی شده و نرخ مصرف نفت خام در آن ها اندازه گیری شد.

در این مقاله ۱۴ نوع باکتری از نمونه ها جدا شد و نتیجه مطالعات نشان داد که یک باکتری به نام A-14، بیشترین میزان حذف را دارا می باشد (۹۱٪). به کمک روش طراحی آزمایش ها (تاگوچی) بهترین شرایط رشد A-14 تعیین و مشخص گردید

که این باکتری پس از بهینه سازی قادر به حذف بیش از ۹۶٪ نفت خام شناور بر روی سطح آب می باشد. شرایط بهینه رشد در این مطالعه عبارت بودند از:  $\text{PH} = 7$ ، دما ۳۰ درجه سانتی گراد، غلظت نیتروژن برابر با ۱ گرم در لیتر، غلظت نفت خام موجود در محیط ۱٪ و نهایتاً زمان ماند ۵ روز. باکتری A-14 پس از انجام آزمایشهای مورد نیاز به عنوان سودوموناس آئروژنوزا شناسائی گردید. در انتهای کار نیز ضرایب بیوسینتیک تعیین شد. در این مطالعه میزان Kd برابر  $0.107 \text{ d}^{-1}$ ،  $\gamma$  برابر با  $0.882 \text{ Mg/l}$ ، K برابر  $9.39 \text{ d}^{-1}$  و در نهایت KS برابر  $169.3 \text{ Mg/l.d}$  محاسبه گردید.

مطالعه فوق نسبت به تحقیقات مشابه قبلی دارای چند برتری بود: اول آن که تجزیه نفت خام شناور بر روی آب با غلظت بالا، که کمتر محققى به این امر پرداخته، دوم استفاده از میکروارگانیسم هائی که سالیان دراز در محیط طبیعی خود با غلظت های بالائی از ترکیبات نفتی در تماس بوده اند و نیازی به گذراندن مرحله سازگاری ندارند و سوم استفاده از طراحی آزمایش ها به روش تاگوچی در بهینه سازی تجزیه ترکیبات نفتی توسط A-14 جدا شده از محیط.

در میان راهکارهای ارایه شده با نتایج هر چه بهتر و سریعتر، استفاده از میکروارگانیسم ها روشی است که با عنوان پاکسازی زیستی یا تجزیه زیستی در اکثر کشورهای پیشرفته مورد استفاده قرار می گیرد.

## منابع:

[1]- ماهنامه نفت پارس،

[2]- پایان نامه امیر طلایی خوزانی مربوط به حفظ محیط زیست، واحد پژوهش آلودگی محیط در پژوهشگاه صنعت

[3]-Caperlli,S.M.,Busalmen,j.p.,(2001), "Hydrocarbon Bioremediation of A Mineral-Base Contaminated Waste From Crude Oil By Indigenous Bacteria ,International Bioremediation & Biodegradation ,47,233-238 .

[4]-Ainajafis,Rahimpour,f(2008),bioremediation of oil Contaminated Refiery ,Wastewater International Conference On fvironment.

[5]-Thomas,J.M.,Ward,C.H.,Raymond,R.l.,Wilson,J.T.,Loehr,R.C.) 1992),Bioremediation