

## تعیین پارامترهای سینتیکی تجزیه نفت خام با استفاده از باکتری سودوموناس آئروژنوزا

امیررضا طلائی خوزانی<sup>۱</sup>، نعمت ا... جعفرزاده حقیقی فرد<sup>۲</sup>، محمدرضا طلائی خوزانی<sup>۳</sup>، مسعود بهشتی<sup>۴</sup>

نویسنده مسئول: استان مرکزی، دلیجان، خیابان دانشگاه، موسسه آموزش عالی جامی [atalaie@jami.ac.ir](mailto:atalaie@jami.ac.ir)

پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۳

دریافت: ۸۸/۰۹/۳۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** ورود ترکیبات نفتی به محیط زیست در کلیه مراحل استخراج، حمل و نقل، نگه داری و... در صنایع نفت امکان پذیر است. بدین سبب محققین فراوانی بر روی حذف ترکیبات نفتی در محیط به روش های گوناگون فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی مطالعه نموده اند. از جمله روش های مورد استفاده در حذف ترکیبات نفتی از محیط، روش های بیولوژیکی می باشد که به دلیل سادگی و اقتصادی بودن معمولا بیش از سایر روش ها مورد مطالعه قرار گرفته اند. هدف از انجام این تحقیق تعیین ضرایب بیوسینتیک فرآیند حذف نفت توسط میکروارگانیسم جدا شده در تحقیقات قبلی از سویه سودوموناس آئروژنوزا بر اساس معادله مونود بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه پارامترهای سینتیکی فرایند حذف بیولوژیکی نفت توسط میکروارگانیسمی از سویه سودوموناس آئروژنوزا که قبلا در تحقیقات منتشر شده از خاک پمپ بنزین جداسازی شده بود و برای تجزیه ترکیبات نفتی مورد استفاده قرار گرفته بود، تعیین گردید. میکروارگانیسم ها در این مطالعه در محیط کشت مایع که حاوی نفت خام به عنوان تنها منبع کربن بود رشد یافتند. در نهایت با تعیین مقدار میکروارگانیسم و غلظت نفت ضرایب بیوسینتیک مشخص شدند. برای این امر از معادله اصلاح شده مونود استفاده شد.

**یافته ها:** با توجه به اینکه پل ارتباطی بین نتایج حاصل از مطالعات آزمایشگاهی و کاربردهای صنعتی حذف بیولوژیکی در تصفیه فاضلاب، تعیین ضرایب بیوسینتیک است، مطالعات بیوسینتیک برای تکمیل نتایج تحقیقات قبلی انجام پذیرفت. در این مطالعه میزان  $kd$  برابر  $0/107$  بر معکوس روز،  $Y$  برابر با  $0/882$  میلی گرم بر لیتر،  $k$  برابر با  $9/39$  بر معکوس روز و در نهایت  $Ks$  برابر با  $169/3$  میلی گرم بر لیتر در روز محاسبه گردید. **نتیجه گیری:** در این مطالعه مشخص گردید که امکان استفاده از سودوموناس آئروژنوزا در مقیاس صنعتی وجود دارد. نتایج این مطالعه نیز منجر به معرفی پارامترهای بیوسینتیک گردید.

**واژگان کلیدی:** نفت خام، تجزیه بیولوژیکی، ضرایب بیوسینتیک، تصفیه فاضلاب

۱- کارشناس ارشد محیط زیست و عضو هیئت علمی گروه مهندسی عمران و محیط زیست، موسسه آموزش عالی جامی

۲- دکترای بهداشت محیط و دانشیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

۳- دکترای مهندسی شیمی، دانشیار دانشگاه اصفهان

۴- دکترای مهندسی شیمی، استادیار دانشگاه اصفهان

## مقدمه

نشت و پخش شدن تصادفی ترکیبات نفتی دو عامل مهم ورود ترکیبات نفتی در هنگام اکتشاف، تولید، پالایش، حمل و نقل و نگه‌داری ترکیبات نفتی است. ورود فراورده‌های ناشی از نفت خام از طریق کشتی‌هایی که قادر به حمل بیش از هزاران تن فراورده‌های نفتی هستند یکی از عوامل آلاینده دریاها و اقیانوس‌ها به این گونه ترکیبات است که میزان آن نیز روز به روز افزایش می‌یابد (۱). بخش‌های مختلف نفت خام نیز می‌تواند به طرق متفاوت وارد محیط زیست گردد. گازوییل، بنزین، نفت سفید، نفت کوره و... به طور گسترده‌ای در زندگی امروزی بشر مورد استفاده قرار می‌گیرند و رها شدن تصادفی و یا نشت آنها منجر به آلودگی آب و خاک شده و مشکلات فراوانی را برای محیط زیست ایجاد می‌نماید. سوخت‌های متداول که از مشتقات نفت خام می‌باشند ترکیبی پیچیده شامل پارافین‌ها، الفین‌ها، هیدروکربن‌های آروماتیک، هیدروکربن‌های آلیفاتیک و مقادیر اندکی از مولکول‌های حاوی سولفور، نیتروژن و اکسیژن می‌باشد (۲). به طور معمول ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام سمی‌تر از ترکیبات آلیفاتیک با همان تعداد اتم کربن است و در غلظت‌های بالاتری نیز در آب یافت می‌شوند که این امر به دلیل پنج برابر بالاتر بودن حلالیت آروماتیک‌ها در مقایسه با آلیفاتیک‌هاست (۳). روش‌های گوناگون برای حذف این ترکیبات در محیط‌های آبی پیشنهاد شده است. روش‌های فیزیکی مانند شناورسازی و روش‌های شیمیایی مانند استفاده از سورفکتانت‌ها به طور معمول پرهزینه و دارای محدودیت‌های فراوانی هستند. تحقیقات بسیاری بر روی تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی به انجام رسیده و نشان داده است که این روش کاملاً امکان‌پذیر بوده و می‌تواند یکی از اقتصادی‌ترین و موثرترین روش‌های حذف ترکیبات نفتی از محیط‌های آبی باشد (۱۰-۴). در این زمینه مطالعات مشابهی نیز به انجام رسیده است. به طور مثال لی و همکارانش (۱۱) در مطالعه‌ای 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. لی با کمک این میکروارگانیسم‌ها توانست ۸۵٪ نفت خام موجود در این گونه پس آب‌ها را در مدت زمان ۷ روز تجزیه نماید. تلز 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 (Adaptation) برای افزایش قابلیت میکروارگانیسم‌های 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 و در نهایت نیز به بررسی ضرایب بیوسینتیک پرداخت (۱۲). دیبل و همکارش بارتا 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 میکروارگانیسم‌های نفت خوارست ولی نیتروژن و فسفر کافی را در اختیار ندارد (۱۳). ویرا و همکارانش (۲) نیز در مطالعه‌ای به مقایسه تجزیه بیولوژیکی گازوییل توسط دو دسته از میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک دریاچه‌ای که حاوی مقادیر زیادی از گازوییل بود پرداختند. آنها موفق به حذف ۹۰٪ گازوییل موجود در آب در مدت زمان ۴۰ روز شدند و در ادامه کار بهینه‌سازی شرایط رشد این میکروارگانیسم‌ها را نیز انجام دادند. طلائی و همکاران (۱۴) در سال ۱۳۸۸ نیز در مطالعه خود موفق به جداسازی میکروارگانیسم‌هایی از خاک آلوده به بنزین و گازوییل در یک پمپ بنزین شدند که قادر به تجزیه گازوییل بود. هم چنین آنها در مطالعه‌ای دیگر در همان سال نیز موفق به جداسازی میکروارگانیسم‌های دیگر شده بودند که قادر به تجزیه نفت خام شناور بر روی آب بود (۱۵). کلیه تحقیقات فوق بدون انجام مطالعات بیوسینتیک قابلیت کاربرد مستقیم در صنعت را ندارند. لذا محققین مختلف پس از یافتن میکروارگانیسم‌ها و انجام مطالعات گوناگون بر

مورد نظر سودوموناس آئروژنوزا شناسایی گردید که کارایی بالایی در تجزیه ترکیبات نفتی را از خود نشان داده بود. از میکروارگانسیم مذکور جهت نگه‌داری طولانی و استفاده در مطالعات بعدی اسلنت تهیه گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

میکروارگانسیم‌ها هر ۴ ماه یک بار پس از مرحله فعال‌سازی به اسلنت‌های جدید منتقل می‌شدند تا امکان استفاده از آنها در تحقیقات بعدی میسر باشد (۱۸-۱۶). در این مطالعه جهت به‌کارگیری میکروارگانسیم‌های جدا شده در تحقیقات قبلی در مقیاس صنعتی، با کمک معادله تصحیح شده موند بررسی‌های لازم برای تعیین پارامترهای سینتیکی آن انجام شد.

#### معادله مورد استفاده

در این معادله از مدل اصلاح شده موند استفاده گردید (۱۷). معادله مورد استفاده در این مطالعه به صورت زیر به دست آمد:

$$r_{su} = -\frac{kXS}{K_s + S} = -\frac{S_0 - S}{\theta} \quad (1)$$

با تقسیم معادله فوق بر  $X$  معادله شماره ۲ به دست می‌آید:

$$\frac{kS}{K_s + S} = \frac{S_0 - S}{\theta X} \quad (2)$$

معادله ۳ با معکوس نمودن معادله شماره ۲ به دست آمد:

$$\frac{X\theta}{S_0 - S} = \frac{K_s}{k} \frac{1}{S} + \frac{1}{k} \quad (3)$$

مقدار  $K_s$  و  $\frac{1}{k}$  را می‌توان با رسم  $\frac{X\theta}{S_0 - S}$  در مقابل  $\frac{1}{S}$  محاسبه نمود. مقدار  $Y$  و  $k_d$  توسط معادله زیر محاسبه می‌گردد:

$$\frac{1}{\theta_c} = -Y \frac{r_{su}}{X} - k_d \quad (4)$$

روی آنها به بررسی ضرایب بیوسینتیک آنها نیز می‌پردازند. به طور مثال تلز و همکاران در مطالعه خود با کمک معادله اصلاح شده موند در یک سیستم تصفیه فاضلاب‌های نفتی به روش لجن فعال ضرایب بیوسینتیک را مشخص نمودند (۱۲). هم چنین طلایی و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۶ ضرایب بیوسینتیک تعدادی از میکروارگانسیم‌های جداسازی شده از خاک و فاضلاب را که در تجزیه نفت خام شناور بر روی آب به کار گرفته شده بودند مشخص نمودند. آنها در مطالعه خود از معادله موند استفاده کردند (۱۸). جنیدی و همکارانش نیز در مطالعه خود به بررسی کشت خالص باکتری سودوموناس آئروژنوزا در تجزیه فرمالدهید پرداختند. آنها در مطالعه خود ضرایب بیوسینتیک را نیز با کمک معادله موند بررسی نمودند (۱۶).

در این مطالعه محققین میکروارگانسیم‌های جدا شده در تحقیق قبلی خود را که از نوع سودوموناس آئروژنوزا بود و در تجزیه نفت خام شناور بر روی سطح آب به کار گرفته شده بود مورد استفاده قرار داده و پارامترهای سینتیکی آن را توسط معادله موند مورد بررسی قرار دادند.

#### مواد و روش‌ها

##### جداسازی میکروارگانسیم‌ها

میکروارگانسیم‌های مورد استفاده در این مطالعه قبلاً در تحقیق دیگری توسط نویسندگان مقاله از خاک اطراف یک پمپ بنزین در شهر اهواز جداسازی و شناسایی شده بود (۱۵). در مطالعه قبلی جهت جداسازی و خالص‌سازی این میکروارگانسیم از خاک از روش کشت در محیط مایع برای جداسازی میکروارگانسیم‌ها و پس از آن استفاده از کشت خطی برای خالص‌سازی آنها استفاده گردیده بود (۱۵). پس از بررسی کارایی میکروارگانسیم‌های جدا شده و خالص شده از نظر کارایی در حذف نفت خام شناور بر روی سطح آب بهترین آنها (از لحاظ راندمان حذف نفت خام) مشخص و مورد شناسایی قرار گرفت. در آن مطالعه میکروارگانسیم

با توجه به  $r_{su} = -\frac{S_0 - S}{\theta}$  معادله ۴ به صورت زیر به کار گرفته شد:

$$\frac{1}{\theta_c} = Y \frac{S_0 - S}{X\theta} - k_d \quad (5)$$

با رسم  $\frac{1}{\theta_c}$  در مقابل  $\frac{S_0 - S}{X\theta}$  شیب خط حاصل برابر با Y و عرض از مبدا آن برابر با  $-k_d$  می باشد. در معادلات فوق پارامتر  $S_0$  غلظت ماده آلاینده ورودی، S غلظت ماده آلاینده در خروجی، X غلظت میکروارگانیسم ها،  $\theta_1$  زمان ماند هیدرولیکی،  $\theta_c$  زمان ماند میکروبی،  $K_d$  ضریب مرگ سلولی و  $K_S$  ثابت نیم سرعت می باشد. هم چنین در معادلات فوق K نرخ حداکثر مصرف ماده آلاینده در واحد جرم میکروارگانیسم ها می باشد. این پارامتر ( $K\mu$ ) طبق معادله ۶-۲ با Y، یعنی ضریب حداکثر بازده و  $\mu_{max}$  یا همان حداکثر نرخ رشد ویژه در ارتباط است. پس از محاسبه مقدار K و Y از طریق معادلات فوق می توان مقدار  $\mu_{max}$  را به کمک معادله ۶ محاسبه نمود (۱۹).

$$k = \frac{\alpha_{max}}{Y} \quad (6)$$

### تولید محیط کشت معدنی

برای انجام آزمایش ها در محیطی فاقد هرگونه منبع کربن محیط کشت زیر طراحی و در آزمایش ها برای تعیین ضرایب بیوسینتیک مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که در طول این مطالعه از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن استفاده می گردد. ۰/۱ گرم در لیتر  $MgSO_4$ ، ۰/۵ گرم در لیتر  $KH_2PO_4$ ، ۰/۰۱ گرم در لیتر  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ، ۰/۰۰۱ گرم در لیتر  $FeSO_4$ ، ۱ گرم در لیتر  $NaNO_3$ ، ۰/۵ گرم در لیتر  $K_2HPO_4$  و pH نمونه به کمک محلول هیدروکسید سدیم بر روی ۷/۲ تنظیم شد (۱۸).

### افزایش تعداد میکروارگانیسم ها

جهت بررسی پارامترهای سینتیکی از اسلنت های تهیه شده برای نگه داری سودوموناس آئروژنوزا به کمک لوپ آزمایشگاهی و در شرایط استریل مقدار میکروارگانیسم به محیط کشت مایع

نوترینت براث که یک محیط کشت بسیار متداول در تحقیقات میکروبیولوژی برای رشد اکثر میکروارگانیسم ها می باشد، انتقال یافت (۱۸). از ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری که ۱۰۰ میلی لیتر از آن با محیط کشت مذکور پر شده بود برای کشت سودوموناس استفاده شد. کلیه مراحل انتقال و تلقیح در زیر هود میکروبی و در مقابل شعله انجام پذیرفت تا از انتقال سایر میکروارگانیسم های موجود در هوا به محیط کشت جلوگیری شود. ارلن مایر حاوی محیط کشت در یک شیکر انکوباتور با شدت هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شد. پس از این مدت میکروارگانیسم ها به شدت شروع به رشد نموده و محیط کشت به دلیل رشد آنها به شدت کدر شد. جهت جداسازی میکروارگانیسم ها از محیط کشت طبق روش های استاندارد از سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید (۱۴-۱۶). مقدار میکروارگانیسم های اولیه اندازه گیری شد و از آنها در غلظت های یکسان برای تعیین پارامترهای سینتیکی استفاده شد.

### تعیین پارامترهای سینتیکی

برای تعیین پارامترهای سینتیکی ۱۰ عدد ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی استریل آماده گردید و pH آن دقیقاً بر روی ۷ تنظیم شد و در هر کدام ۱ میلی لیتر نفت خام تزریق شد. ۵ عدد از ارلن مایرها بدون تلقیح میکروارگانیسم و به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شدند و ۵ عدد دیگر مورد تلقیح با میکروارگانیسم ها قرار گرفتند. کلیه ارلن مایرها در یک شیکر انکوباتور با شدت هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. در زمان های ۲۴ ساعت، ۳۶ ساعت، ۴۸ ساعت، ۶۰ ساعت و ۷۲ ساعت دو ارلن مایر (یکی نمونه حاوی میکروارگانیسم و دیگری نمونه شاهد) از شیکرانکوباتور خارج می گردیدند و مقدار میکروارگانیسم های موجود در آن و مقدار نفت خام باقی مانده اندازه گیری شد (۱۸). پس از گذشت ۷۲ ساعت و به دست آوردن مقادیر مورد نیاز میکروارگانیسم مذکور به تعداد کافی، اطلاعات به دست آمده در معادله اصلاح شده موند قرار گرفت و میزان پارامترهای مورد نظر محاسبه گردید.

## روش انجام آزمایش ها

لازم به توضیح است که باکتری به کار گرفته شده در این مطالعه (سودوموناس آئروژنوزا)، در مطالعات قبلی با کمک کشت در محیط جامد نوترینت آگار و بررسی مورفولوژی باکتری با کمک میکروسکوپ و کلنی های تشکیل شده بر روی محیط کشت، انجام آزمون های اکسیداز، کاتالاز، گرم و بررسی پیگمان های رنگی تولیدی در دمای بالا (۴۰ درجه سانتی گراد) و هم چنین بررسی قابلیت حل شدن این پیگمان ها در آب، کلروفورم و اسید استیک و در نهایت قابلیت کشت در محیط هایی هم چون وژوسپروسکار (Methylred-Vegesproskare broth) و قابلیت تولید H<sub>2</sub>S و قابلیت رشد در محیط بی هوازی شناسایی شد (۱۵).

## یافته ها

تحقیق در ضرایب بیوسینتیک پل ارتباطی تحقیقات آزمایشگاهی و صنعت می باشد. به همین دلیل بسیاری از محققین به ارزیابی این ضرایب نیز پرداخته اند. نتایج انجام آزمایش ها در این مطالعه برای تعیین ضرایب بیوسینتیک در جدول ۱ نمایش داده شده است که با کمک این اطلاعات و سایر جداول موجود در ادامه این گزارش ضرایب بیوسینتیک محاسبه گردیدند. برای تعیین ثابت های سینتیکی K<sub>s</sub> و K در این مطالعه ابتدا از معادله زیر استفاده گشت:

$$\frac{X \theta}{S_0 - S} = \frac{K_s}{k} \frac{1}{S} + \frac{1}{k} \quad (3)$$

برای اندازه گیری pH در این مطالعه از pH متر دیجیتال استفاده شد. جهت اندازه گیری مقدار نفت خام موجود در محیط از روش استاندارد ارایه شده توسط طلایی و همکارانش استفاده شد (۱۸-۱۶). این روش هم چنین توسط سایر محققین، نظیر یوروم و همکارانش نیز به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته بود (۲۳). در این روش پس از حل نمودن نفت خام باقی مانده در محیط در یک حلال آلی (تترا کلرید کربن) و جداسازی دو فاز محیط کشت و حلال حاوی نفت، می توان مقدار نفت خام را توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین نمود. بدین منظور از یک دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج قابل تنظیم ۱۹۰ الی ۲۵۰۰ نانومتر و ساخت JascoV-۵۷۰ در طول موج ۴۰۰ نانومتر استفاده گردید. برای حذف خطاهای ناشی از ذرات معلق، نمونه با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه و برای مدت زمان ۱۵ دقیقه مورد سانتریفوژ قرار گرفت. هم چنین جهت جلوگیری از ایجاد خطای ناشی از تولید کمپلکس ها، کلیه نمونه ها قبل از سنجش به کمک اسپکتروفتومتر ۱۰۰ بار رقیق شدند (۲۳ و ۱۱). اندازه گیری میکروارگانیزم ها نیز به دو روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و اندازه گیری کل جامدات معلق فرار و به روش استاندارد انجام پذیرفت (۱۸-۱۶). لازم به ذکر است که از روش اندازه گیری کل جامدات معلق فرار فقط برای کالیبراسیون روش اسپکتروفتومتری استفاده شد.

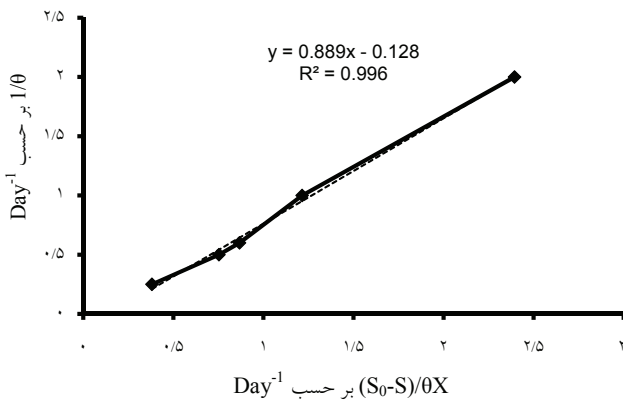
جدول ۱: مقادیر به دست آمده از آزمایش های تعیین ضرایب بیوسینتیک

شماره	S <sub>0</sub> mg/l	S mg/l	θ = θ <sub>c</sub> d	X mgVSS/l
۱	۷	۱۲۶	۴	۷۸
۲	۱۳	۱۲۶	۲	۷۵
۳	۱۸	۱۲۶	۱/۵	۸۳
۴	۳۰	۱۲۶	۱	۷۹
۵	۴۱	۱۲۶	۰/۵	۷۱

جدول ۳: مقادیر مختلف  $\frac{(S_0 - S)}{X\theta}$  و  $\frac{1}{\theta}$  محاسبه شده

شماره	$d^{-1} \frac{1}{\theta}$	$d^{-1} \frac{(S_0 - S)}{X\theta}$
۱	۰/۲۵	۰/۳۸۱۴۱
۲	۰/۵	۰/۷۵۳۳۳
۳	۰/۶	۰/۸۶۷۴۷
۴	۱	۱/۲۱۵۱
۵	۲	۲/۳۹۴۳

در شکل ۲ نمودار رگرسیون خطی بین  $\frac{1}{\theta}$  و  $\frac{(S_0 - S)}{X\theta}$  رسم گردیده و مقادیر  $K_d$  و  $Y$  از آن محاسبه گردید.



شکل ۲: رگرسیون خطی بین  $\frac{1}{\theta}$  و  $\frac{(S_0 - S)}{X\theta}$

بنابراین میزان  $K_d$  برابر  $0.1284 d^{-1}$  و مقدار  $Y$  برابر با  $0.8896$  میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. برای محاسبه  $\mu_{max}$  از معادله زیر استفاده شد که همان معادله ۲-۶ بر حسب  $\mu_{max}$  می باشد:

$$\alpha_{max} = kY \quad (6)$$

با توجه به معادله فوق میزان  $\mu_{max}$  برابر  $0.782 d^{-1}$  محاسبه شد.

### بحث و نتیجه گیری

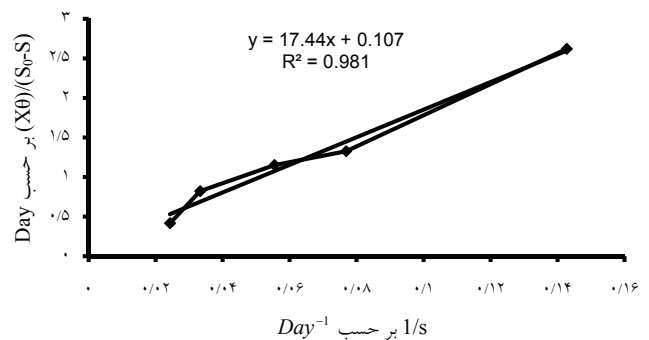
مطالعات سینتیکی برای تعمیم امکان استفاده از نتایج تحقیقات در مقیاس صنعتی بسیار مهم می باشد. کنترل شرایط محیطی در تجزیه مواد آلی بسیار مهم است. شرایط محیطی را

با استفاده از اطلاعات موجود در جدول ۲ معادله فوق رسم گردید. با رسم  $\frac{1}{S}$  در برابر  $\frac{X\theta}{S_0 - S}$  شیب خط حاصل از رگرسیون برابر  $\frac{K_s}{k}$  و عرض از مبدا آن برابر  $\frac{1}{k}$  می باشد.

جدول ۲: مقادیر مختلف  $\frac{X\theta}{S_0 - S}$  و  $\frac{1}{S}$  محاسبه شده

شماره	$\frac{1}{S}$	$\frac{X\theta}{S_0 - S}$
۱	۰/۱۴۲۸	۲/۶۲۱۸
۲	۰/۰۷۶۹	۱/۳۲۷۴
۳	۰/۰۵۵۵	۱/۱۵۲۷
۴	۰/۰۳۳۳	۰/۸۲۲۹
۵	۰/۰۲۴۳	۰/۴۱۷۶

در شکل ۱ نمودار رگرسیون بین  $\frac{1}{S}$  و  $\frac{X\theta}{S_0 - S}$  رسم گردیده و با کمک آن ضرایب  $K$  و  $K_s$  محاسبه گشته است.



شکل ۱: رگرسیون بین  $\frac{1}{S}$  و  $\frac{X\theta}{S_0 - S}$

بنابراین میزان  $K$  برابر با  $9.31 d^{-1}$  و میزان  $K_s$  برابر  $mg/L.d$   $162/42$  می باشد. در مرحله بعد به کمک معادله ۳-۲ مقدار  $Y$  و  $K_d$  با کمک معادله زیر و استفاده از داده های جدول ۳ تعیین گردید. با رسم  $\frac{(S_0 - S)}{X\theta}$  در برابر  $\frac{1}{\theta_c}$  شیب خط برابر  $Y$  و عرض از مبدا برابر  $-K_d$  می گردد.

$$\frac{1}{\theta_c} = Y \frac{S_0 - S}{X\theta} - k_d \quad (7)$$

کم تر از سایر ضرایب بیوسیتیک می باشد که در این مطالعه نیز این ضریب کم تر از سایر ضرایب محاسبه شده است. میزان  $K_d$  محاسبه شده در این مطالعه در محدوده حداکثر این پارامتر در فاضلاب شهری می باشد. بالا بودن مرگ و میر باکتری ها در این مطالعه به خاطر استفاده از کشت خالص نمی تواند به دلیل رقابت یا طعمه خواری باشد ولی این امر را می توان با وجود ترکیبات سمی موجود در نفت خام مانند ترکیبات آروماتیک که بیش از سایر ترکیبات نفتی در آب قابلیت حل شدن را دارند توجیه نمود (۱۱ و ۱۸). در ارزیابی بازده کلی هر فرایند تصفیه بیولوژیکی وابستگی ثابت های آهنگ واکنش بیولوژیکی به دما بسیار اهمیت دارد. دما نه تنها بر فعالیت های سوخت و سازی جمعیت میکروبی اثر می گذارد، بلکه اثری وسیع بر عواملی چون آهنگ های انتقال گاز و ویژگی های ته نشینی مواد جامد بیولوژیکی دارد. در این مطالعه از دمای ثابت ۳۰ درجه سانتی گراد برای انجام آزمایش ها استفاده گردید. در جدول ۴ نیز مقادیر نمونه وار ضرایب بیوسیتیک در فرایند لجن فعال در تصفیه فاضلاب شهری نمایش داده شده است.

تلز در مطالعه ای مشابه که در آن به بررسی تصفیه آب آلوده به نفت تولیدی در چاه های نفت در یک سیستم لجن فعال متعارف پرداخته بود مقادیر ضرایب بیوسیتیک را به صورت زیر محاسبه نمود (۱۲):  $Y = 0.44 \text{ mgVSS/mgTPH}$  برابر  $K_s$  (منظور از TPH شاخص کل ترکیبات نفتی است) برابر  $0.36 \text{ mg/L}$ ،  $K$  برابر  $1/36 \text{ mgTPH/mgMLSS.d}$  و  $K_d$  برابر  $0.41/\text{day}$  محاسبه گردید. تلز در مطالعه خود توانست ۹۹٪ کل ترکیبات نفتی موجود در محیط را در طی مطالعات خود تجزیه نماید. همان طور که مشخص است مقادیر  $Y$ ،  $K_d$ ، و  $K$  خصوصا  $K_s$  در مطالعه مذکور کم تر از مقادیر محاسبه شده در این تحقیق بود. لازم به ذکر است که مواد نفتی که در مطالعه تلز و همکارانش مورد تجزیه قرار گرفت بخش محلول نفت موجود در آب به علاوه مقدار اندکی قطرات ریز شناور در آب بود لیکن در مطالعه حاضر محققین

می توان با تنظیم pH، تنظیم دما، افزودن مواد مغذی یا عناصر کم یاب، افزودن یا کاستن اکسیژن محلول و اختلاط مناسب کنترل کرد. شرایط زیست محیطی سبب می شود که از وجود محیط مناسب برای رشد میکروارگانیسم ها اطمینان حاصل کرد.

برای اطمینان از رشد میکروارگانیسم ها باید اجازه دهیم میکروارگانیسم ها به مدت کافی در سیستم باقی بمانند تا تکثیر شوند. این زمان به آهنگ رشد آنها بستگی دارد که مستقیما با آهنگ سوخت و ساز آنها یا آهنگ مصرف مواد زاید مرتبط است. اگر شرایط محیطی به درستی کنترل شده باشد، با کنترل آهنگ رشد میکروارگانیسم ها می توان از تثبیت موثر مواد زاید اطمینان یافت. به همین دلیل بیش تر محققین این مطالعات را نیز انجام می دهند. در جدول ۴ مقادیر نمونه وار ضرایب بیوسیتیک مربوط به فاضلاب شهری نمایش داده شده است (۱۹). همان طور که مشخص است مقادیر  $K$  و  $K_d$  در این مطالعه تقریبا در محدوده مقادیر مربوط به فاضلاب شهری در سیستم لجن فعال می باشد در حالی که مقادیر  $Y$  و  $K_s$  از حداکثر این مقادیر معمول، اندکی بیش تر است. میزان  $k$  محاسبه شده نشان دهنده این واقعیت می باشد که سرعت تصفیه فاضلاب های حاوی نفت خام محلول به کمک سودوموناس آئروژنوزا تقریبا در حدود سرعت تصفیه فاضلاب شهری در سیستم لجن فعال می باشد.

در سیستم های باکتریایی مورد استفاده در تصفیه فاضلاب، توزیع سن سلولی به گونه ای است که همه سلول های سیستم در مرحله رشد لگاریتمی نیستند. در نتیجه، رابطه رشد را باید به شکلی اصلاح کرد که انرژی لازم برای نگه داری سلول را توجیه کند (۱۹). عوامل دیگری چون مرگ و میر و طعمه خواری را نیز باید در نظر داشت. معمولا این عوامل را با هم یکی می کنند و فرض می کنند که کاهش جرم سلولی ناشی از این عوامل با غلظت ارگانیسم های موجود تناسب دارد. به همین دلیل از ضریب مرگ سلولی یا  $k_d$  استفاده می گردد. به طور معمول میزان  $k_d$  یا ضریب مرگ میر سلولی

جدول ۴: ضرایب بیوسنتیک معمول برای فرایند لجن فعال در تصفیه فاضلاب خانگی (۱۹)

ضرایب	واحد	مقادیر	
		محدوده	معمول
k	day <sup>-1</sup>	۲ الی ۱۰	۵
K <sub>s</sub>	mg/lBOD <sub>5</sub>	۱۰۰ الی ۲۵	۶۰
	mg/lCOD	۶۰ الی ۱۰	۴۰
Y	VSSmg / BOD <sub>5</sub> mg	۰/۴ الی ۰/۸	۰/۶
k <sub>d</sub>	day <sup>-1</sup>	۰/۰۲۵ الی ۰/۰۷۵	۰/۱

مقادیر فوق برای دمای ۲۰ درجه سانتی گراد گزارش گردیده است.

همان طور که در جدول ۵ مشخص است در مطالعه ناکلا به دلیل استفاده از فاضلابی با COD بسیار بالا که در محدوده ۱۳۱۵۰ الی ۲۳۳۷۵ میلی گرم در لیتر و هم چنین تجزیه پذیری مناسب آن، مقدار ضریب K<sub>s</sub> بسیار بالاتر از فاضلاب شهری بود که مقادیر نمونه وار آن قبلاً ذکر شده است. با توجه به حلالیت کم ترکیبات تشکیل دهنده نفت خام در آب میزان ضریب K<sub>s</sub> در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه ناکلا بسیار کم تر و برابر با ۱۶۹/۹۳ mg/L.d محاسبه گردید. نقی زاده و همکارانش نیز به بررسی ضرایب بیوسنتیک در فرایند بیوراكتور غشایی مستغرق در تصفیه فاضلاب شهری پرداختند. آنها در مطالعات خود به کمک معادله مونود موفق به تعیین این ضرایب شدند. آنها مقادیر Y، K<sub>d</sub>، K<sub>s</sub> و μ<sub>max</sub> را به ترتیب برابر با ۰/۶۷ mgVSS/mgCOD، ۰/۵ day<sup>-1</sup>، ۶۵/۵ mg/L و ۱/۸۶ day<sup>-1</sup> محاسبه نمودند (۲۳).

از نفت خام شناور بر روی سطح آب استفاده نمودند که دارای آلودگی بسیار بالاتری نسبت به مطالعه تلز بود. دلیل آلودگی بالاتر در این مطالعه عدم انحلال مقادیر زیاد نفت در آب می باشد. لیکن نفت به مقدار زیاد می تواند در آب شناور شده و آلودگی شدیدی ایجاد نماید. در این مطالعه ۴ میلی لیتر بر لیتر از نفت خام بر روی سطح آب شناور بود که آلودگی بسیار بالایی را ایجاد می نمود.

ناکلا و همکارانش (۲۰) در مطالعه خود بر روی مدل سازی سینتیک تجزیه بیولوژیک هوازی فاضلاب های حاوی روغن و چربی زیاد ضرایب بیوسنتیک خود را که بر پایه معادله مونود بود به صورت زیر محاسبه نمود. آنها این ضرایب را قبل و بعد از عبور فاضلاب خام از یک سیستم شناور سازی با هوای محلول به صورت درج شده در جدول ۵ محاسبه نمودند:

جدول ۵: ضرایب بیوسنتیک حاصل از مطالعات ناکلا در تصفیه فاضلاب های حاوی روغن و چربی

ضرایب بیوسنتیک قبل از عبور فاضلاب از سیستم شناورسازی با هوای محلول		ضرایب بیوسنتیک پس از عبور فاضلاب از سیستم شناور سازی با هوای محلول	
k (mgCOD/mgVSS.D)	۴/۷۷	k (mgCOD/mgVSS.D)	۴/۸۶
K <sub>s</sub> (mg/L)	۱۴۲۶۲	K <sub>s</sub> (mg/L)	۲۵۳۴۸
Y (mgVSS/mgCOD)	۰/۵	Y (mgVSS/mgCOD)	۰/۱۳۵



ضریب هم بستگی در این مطالعه نیز مناسب و به طور متوسط در آزمایشات مختلف ۰/۹ بوده است. به طور معمول ضرایب بیوسینتیک در مطالعات گوناگون بسیار متفاوت است. حتی در مطالعات مشابه و یا تکرار آنها نیز این جواب ها اندکی تغییر می کند و این امر به دلیل تغییر در سوبسترا و یا ترکیبات مغذی ورودی مانند ترکیبات نیتروژنه است (۲۲).

اولیورا و همکارانش (۲۱) نیز به بررسی تجزیه بیولوژیکی فرمالدهید در یک راکتور بی هوازی با بستر ثابت پرداختند. اولیورا در مطالعه خود به بررسی ضرایب بیوسینتیک راکتور خود پرداخت و با کمک معادله اصلاح شده مونود توانست مقادیر این ضرایب را با ضریب هم بستگی ۰/۸۸۵۴ به دست آورد. همان طور که در شکل ۱ و شکل ۲ مشخص است

## منابع

- Hua J. Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy. *Ocean Engineering*. 2006;33:152-67.
- Vieira PA, Vieira RB, Franc FP, Cardoso VL. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials*. 2007;140:52-59.
- Tiburtius ERL, Zamora PP, Leal ES. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. *Journal of Quim*. 2004;27:1-16.
- Gogoi BK, Dutta NN, Goswami P, Krishna Mohan TR. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Adv Environ Res*. 2003;7:767-82.
- Townsend GT, Prince RC, Suflita JM. Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer. *FEMS Microbiol Ecol*. 2004;49:129-35.
- Kaluarachchi JJ, Cvetkovic V, Berglund S. Stochastic analysis of oxygen- and nitrate-based biodegradation of hydrocarbons in aquifers. *J Cont Hydrol*. 2000;41:335-65
- Bielicka K, Kaczorek E, Olszanowski A, Voelkel A. Examination of biodegradation of hydrocarbons in emulsified systems. *Publish J Environ Stud*. 2002;11:11-16.
- Diaz MP, Grigson SJW, Peppiatt CJ, Burgess JG. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar Biotech*. 2000;2:522-32.
- Lakha SS, Miller M, Campbell RG, Elahimanesh KSP, Hart MM, Trevors JT. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *J Microbiol Methods*. 2005;63(1):1-19.
- Grishchenkov VG, Townsend RT, McDonald TJ, Autenrieth RL, Bonner JS, Boronin AM. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochem*. 2000;35:889-96.
- Li Q, Kang C, Zhang C. Waste water produced from an oilfield and continuous treatment with and oil-degrading bacterium. *Process Biochem*. 2005;40:873-77.
- Tellez GT, Nirmalakhandan N, Gardea-Torresdey JL. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. *Journal of Advances in Environmental Research*. 2002;6:455-70.
- Dibble JT, Bartha R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 1979;37(4):729-39.
- Talaie AR, Jafaarzadeh N, Talaie MR. Optimization biodegradation of floating diesel fuel contaminated wastewater using the tagochi method. *Journal of Water & Wastewater*. 2008;20(3):57-68.
- Talaie AR, Jafaarzadeh N, Talaie MR, Beheshti M. Optimization of floating crude Biodegradation by experimental design method. *Koomesh Journal of Semnan University Medical Sciences*. 2008;11(1):41-54.
- Jonidi A, Talaie AR, Jorfi S, Mehrabani MM. Investigation of formaldehyde degradation using isolated microorganisms from wastewater of chemical industries. *Iran occupational Health Journal*. 2009;5(1-2):47-53.
- Talaie AR, Talaie MR, Jorfi S, Mehrabani MM. The determination of kinetic parameters in biodegradation of methanol in a SBR Reactor. *Proceeding of 2nd Conference and Exhibition of Environmental Engineering*; 2008; University of Tehran, Tehran, Iran.
- Talaie AR. Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms [dissertation]. Ahvaz: Science and Research University Branch-Ahvaz; 2008.
- Metcalf & Eddy Inc. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4th ed. New Delhi: Tata McGraw-Hill; 2003.
- Nakhla G, Liu V, Bassi A. Kinetic modeling of aerobic biodegradation of high oil and grease rendering wastewater. *Bioresource Technology*. 2006;97:131-39.
- Oliverira SVWB, Moraes EM, Adorno MAT, Varesche MBA, Foresti E, Zaiat M. Formaldehyde degradation in an anaerobic packed-bed bioreactor.

- Water Research. 1999;38:1685-94.
22. Laor Y, Storm PF, Farmer WJ. Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral-associated humic acid. Water Research. 1999;33(7):1719-29.
23. Urum K, Pekdemir T, Copur M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. Journal of Colloid and Interface Science. 2004;276:456-64.
24. Naghizadeh A, Mahvi AH, Mesdaghinia AR, Sarkhosh M. Bio-kinetic Paramters in municipal wastewater treatment with a submerged membrane Reactor (SMBR). Proceeding of 12th National Congress of Environmental Health; 2008; Tehran, Iran.

## **The Determination of Bio-kinetic Coefficients of Crude Oil Biodegradation Using Pseudomonas Aeruginosa Bacteria**

**Talaie Khozani A.R.<sup>1</sup>, Jafarzadeh Haghighi fard N.<sup>2</sup>, Talaie Khozani M.R.<sup>3</sup>, Beheshti M.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Department of Civil and Environmental Engineering of Jami Institute of Technology, Delijan, Iran

<sup>2</sup>Department of Environmental Health, School of Health, Jondishapour University of Medical Sciences, Ahwas, Iran

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received 21 December 2009; Accepted 14 March 2010

### **ABSTRACT**

**Backgrounds and Objectives:** Oil pollution can be generated as a result of spillage, leakage, discharge, exploration, production, refining, transport and storage of crude oil and fuels in the environment. Consequently, many researchers have developed and studied the chemical, physical and biological methods to degrade crude oil. Among them, the biological treatments are the most interesting as they are simple and economical methods. The aim of this study was to determine bio-kinetic coefficients of crude oil degradation by pseudomonas aerogenusa. This microorganism was isolated in our previous work.

**Materials and Methods:** In this study the bio-kinetic coefficients of crude oil biodegradation were evaluated. Pseudomonas aerogenusa bacteria which had been isolated from the soil sample taken from a gas station in our previous work were used in this study. This microorganism was cultured in the liquid medium containing crude oil as sole carbon source. Finally with determining the amount of microorganisms and crude oil concentration during biodegradation process, the bio-kinetic coefficients based on modified Monod equation were calculated.

**Results:** bio-kinetic coefficients obtained from laboratory studies are vital factors in industrial applications. As a result, the bio-kinetic study was performed to find bio-kinetic coefficients for biodegradation of crude oil using the isolated bacteria. The results showed that  $\mu$ ,  $Y$ ,  $k$  and  $K_s$  were equal 0.107, 0.882, 9.39 and 169.3 respectively.

**Coculusion:** Our results showed that pseudomonas aerogenusa is usable for treatment of oily wastewaters in the full scale facility. Results of this study indicated bio kinetics confections.

**Key words:** Crude oil, Biodegradation, Bio-kinetic coefficients, Wastewater treatment

---

\*Corresponding Author: [atalaie@gami.ac.ir](mailto:atalaie@gami.ac.ir)

Tel: +98 866 4225678 Fax: +98 866 4225678