

The Effect of Nitrate, Salinity, Pollutant Concentration and Cell Mass on BTEX Degradation in Microaerophilic Environment

MOBINA SHAKIBA¹, TEYMOOR SOHRABI^{*2}, FARHAD MIRZAEI³, AHMAD ALI POURBABAIEI⁴

1. PhD Student, Irrigation and Reclamation Engineering Department, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Professor, Irrigation and Reclamation Engineering Department, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Associate Professor, Irrigation and Reclamation Engineering Department, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Apr. 24, 2018- Revised: July. 5, 2018, Accepted: July. 25, 2018)

ABSTRACT

Despite of numerous studies on BTEX biodegradation, a few researches has been conducted to optimize the environmental conditions for biodegradation of this pollutant considering the effective factors. The objective of this study was to investigate the effect of environmental factors such as nitrate, salinity and cell mass (the isolated bacterium from the soil) on BTEX degradation and to optimize the environmental conditions for biodegradation. In order to identify the appropriate microorganism for BTEX degradation, isolation of the bacterium from the oil contaminated soil was performed firstly. Then the nitrate, salinity, cell mass and BTEX concentrations were considered as independent variables to optimize BTEX degradation conditions by the isolated bacterium. Finally, a quadratic polynomial mathematical model was suggested by the Design Expert software ($R^2=0.85$). This research showed that the isolated bacterium is able to degrade BTEX and the proper condition for degradation can be achieved by applying the above-mentioned model. Results showed that the effect of BTEX and Nitrate concentration on BTEX degradation is significant. So that increasing BTEX concentration to the extent of 200 ppm and decreasing nitrate concentration to the extent of 400 ppm reduced BTEX degradation to 4.2% and 9%, respectively.

Keywords: Biodegradation, optimization, BTEX, polynomial mathematical model

بررسی پیامد نیترات و شوری، غلظت آلاینده و جمعیت میکروبی بر تجزیه زیستی BTEX در محیط میکروآئروفیلیک

مینا شکیب^۱، تیمور سهرابی ملایوسف^{۲*}، فرهاد میرزایی^۳، احمدعلی پوربابایی^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی آبیاری و آبادانی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استاد، گروه مهندسی آبیاری و آبادانی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. دانشیار، گروه مهندسی آبیاری و آبادانی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴. دانشیار، گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۴ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۴/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۴/۲۴)

چکیده

علی‌رغم پژوهش‌های فراوان انجام شده در زمینه تجزیه‌زیستی BTEX، تحقیقات اندکی در زمینه بهینه‌سازی شرایط محیطی برای تجزیه‌زیستی این آلاینده با توجه به عوامل تأثیرگذار صورت گرفته است. هدف از این مطالعه تجزیه BTEX توسط ریزجانداران جدا شده از خاک و بررسی تأثیر عواملی همچون نیترات، BTEX، شوری و جمعیت میکروبی و بهینه‌سازی شرایط برای تجزیه می‌باشد. به منظور شناسایی ریزجانداران مناسب برای تجزیه BTEX در مرحله اول جداسازی و خالص‌سازی باکتری مناسب از خاک آلوده به مواد نفتی انجام شد. سپس غلظت نیترات، غلظت BTEX، شوری و جمعیت سلولی به صورت متغیرهای مستقل به منظور بهینه‌سازی شرایط تجزیه توسط باکتری فوق در نظر گرفته شد. در نهایت یک مدل چندجمله‌ای توسط نرم‌افزار Design Expert برای تجزیه با $R^2=85\%$ پیشنهاد شد. تحقیق حاضر نشان داد که باکتری جداسازی شده برای تجزیه BTEX مناسب و با استفاده از معادله حاصل می‌توان شرایط را برای تجزیه‌زیستی با کارایی بالاتر مهیا نمود. نتایج نشان داد که غلظت اولیه BTEX و نیترات در تجزیه BTEX معنی‌دار است، بطوریکه با افزایش غلظت BTEX به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۴/۲ درصد و همچنین با کاهش غلظت نیترات به مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۹ درصد کاهش در تجزیه BTEX مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه‌زیستی، بهینه‌سازی، BTEX، مدل چندجمله‌ای

مقدمه

بسیاری از اراضی دنیا در سطوح وسیع دچار مشکل آلودگی ناشی از مواد هیدروکربنی هستند. این اراضی نه تنها خاصیت بالقوه خود را برای استفاده کشاورزی و تولید بهینه محصول از دست می‌دهند بلکه با نشت آلاینده‌ها به آب‌های زیرزمینی سبب آلودگی منابع آبی شده که ممکن است حتی آب‌های زیرزمینی را برای همیشه غیرقابل استفاده نمایند. در این میان می‌توان به BTEX که فراوان‌ترین ترکیب هیدروکربنی در آب‌های آلوده به مواد نفتی است اشاره نمود. این آلاینده شامل بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و ایزومرهای زایلن با سمیت بالا و

دارای پتانسیل جهش‌زایی و سرطان‌زایی است (Fathepure, 2014). این ترکیب همچنین در سنتز بسیاری از ترکیب‌های مصنوعی مانند آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها نیز بکار برده می‌شود. در این ترکیبات BTEX به صورت حلال می‌باشد که به عنوان حامل برای توزیع و تثبیت عنصر شیمیایی مورد نظر استفاده می‌شود (Ucankus, 2005). BTEX از طریق زه‌آب‌های صنعتی وارد آب می‌شود اما منبع اصلی آلودگی BTEX نشت بنزین در منابع بزرگ دیگر، پخش سطحی و نشت از لوله‌های انتقال نفت و بنزین می‌باشد (Sunita, 2017).

تجزیه زیستی با استفاده از ریزجانداران به صورت یک روش مقرون به صرفه با کارایی بالا برای حذف ترکیبات نفتی

* نویسنده مسئول: myousef@ut.ac.ir

شور بسیار اندک می‌باشد (Fathepure. B. Z, 2014). در این پژوهش عامل مهم شوری به‌عنوان یک متغیر مستقل مؤثر بر تجزیه‌زیستی BTEX در نظر گرفته شد تا علاوه بر ارزیابی عملکرد باکتری مورد نظر بر تجزیه‌زیستی BTEX در محیط شور، شرایط بهینه برای حصول حداکثر زیست‌پالایی با وجود این عامل نیز بررسی شود. جمعیت سلولی و غلظت اولیه BTEX به عنوان عامل‌های مهم در تجزیه‌زیستی BTEX گزارش شد (Mi Jin *et al.*, 2013)، در این پژوهش در بررسی تأثیر این عامل‌ها بر تجزیه‌زیستی BTEX، این دو عامل نیز به عنوان متغیرهای مستقل به پارامترهای شوری و نیترات اضافه شد.

تجزیه آلودگی‌های آلی زیست‌محیطی در آب‌های زیرزمینی یک فرآیند پیچیده است که موفقیت آن به عوامل مختلفی شامل نوع آلودگی، نوع ریزجانداران و شرایط تجزیه‌کنندگی آن‌ها (جمعیت میکروبی کافی و اثر تعاملی حاصل از سایر ریزجانداران) و بسیاری از فاکتورهای محیطی بستگی دارد (Jeon *et al.*, 2003; Saeki *et al.*, 2010; Gandolfi *et al.*, 2010). کاربرد باکتری‌های تجزیه‌کننده BTEX برای تجزیه‌زیستی مؤثر نیاز به بهینه‌سازی برخی از فاکتورها شامل نیترات، شوری و جمعیت سلولی برای باکتری مشخص دارد (Knezevich *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2006).

طرح آزمایش‌های آماری با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)^۱ به‌صورت گسترده برای آزمایش‌های بهینه‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Myers *et al.*, 2009) و اطلاعاتی درباره تأثیر مستقیم، تأثیر ترکیب دو به دو متغیرهای مستقل را بر عامل هدف (پاسخ) فراهم می‌نماید. طراحی آزمایش با تعیین اهداف یک آزمایش و انتخاب فاکتورهای فرآیند برای مطالعه آغاز می‌شود. یک طرح آزمایش مناسب، میزان اطلاعاتی که می‌تواند از یک تعداد معین آزمون به دست آید را بیشینه می‌کند. در این تحقیق از روش سطح پاسخ بر مبنای طرح Box-Behnken برای ارزیابی اثر متغیرهای مستقل بر عملکرد پاسخ و همچنین پیشگویی بهترین مقدار پاسخ استفاده شد (Ferreira *et al.*, 2007).

مطالعات اکولوژی و جداسازی از طریق غنی‌سازی در آزمایشگاه به شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده و سویه‌هایی که به‌طور کاربردی در محیط‌های آلوده مهم هستند کمک فراوانی می‌نماید (Jin *et al.*, 2012; Kim and Jeon, 2009; Shinoda *et al.*, 2004). از آنجایی که توانایی و مقاومت باکتری‌هایی که از محیط‌های آلوده به مواد نفتی جداسازی می‌شوند در تجزیه

شامل BTEX^۱ به اثبات رسیده است (Atlas and Hazen, 2011). هر چند که تجزیه‌زیستی هوازی نسبت به شرایط بی‌هوازی سریع‌تر می‌باشد و به مقدار نسبتاً زیادی اکسیژن نیاز دارد (Maxwell and Baqai, 1995)، اما تجزیه‌زیستی بی‌هوازی نقش مهم‌تری را در حذف آلودگی‌های زیستی ایفا می‌کند و مزایایی همچون تولید زیست‌توده پایین‌تر (به دلیل رشد کمتر ریزجانداران) و در دسترس داشتن کافی گیرنده‌های الکترون را دارد (Coates *et al.*, 2001; Vogt *et al.*, 2011). به هر حال فرآیند بی‌هوازی گاهی به دلیل سختی تزریق اکسیژن به آب‌های زیرزمینی تنها راه حل برای حذف آلودگی‌ها است؛ بنابراین این تحقیق در شرایط میکروآئروفیلیک و بدون تزریق اکسیژن و در شرایطی نزدیک به شرایط بی‌هوازی انجام شد.

به‌طور معمول شدت تجزیه‌زیستی در شرایط میکروآئروفیلیک و بی‌هوازی را با افزودن پذیرنده‌های الکترون افزایش می‌دهند. سرعت تجزیه‌زیستی از میزان در دسترس بودن پذیرنده‌های الکترون به ترتیب از اکسیژن، نیترات، آهن سه‌ظرفیتی و سولفات پیروی می‌کند. در ابتدا واکنشی که مطلوب‌تر است انجام می‌شود تا زمانی که پذیرنده الکترون آن پایان یابد (Newell *et al.*, 1996). Cunningham (2001) در تحقیقات خود نشان داد که در شرایط وجود نیترات و سولفات، مصرف نیترات بر سولفات ترجیح داده می‌شود و کاهش سولفات در منطقه‌ای خارج از محل تحت دنیتریفیکاسیون اتفاق می‌افتد و بعد از مصرف اکسیژن، نیترات به عنوان دومین پذیرنده الکترون مصرف می‌شود. بنابراین در این تحقیق نیترات به‌عنوان پذیرنده الکترون انتخاب شد. تحقیقات انجام‌شده کاربرد نیترات را در افزایش تجزیه‌زیستی BTEX به دلیل پتانسیل بالای واکنش اکسایشی و کاهش آن نشان داده است (Corseuil *et al.*, 2015).

اکثر مکان‌های تولید و استخراج نفت و گاز طبیعی در کشور در مناطقی با شوری بالا واقع شده‌اند که این مناطق از نظر اقتصادی و اکولوژی مهم می‌باشند. بنابراین مطالعات پاکسازی آلودگی‌های نفتی در محیط‌هایی با شوری بالا باید مورد توجه قرار گیرد. از آنجایی که فرآیندهای معمول میکروبی در مناطقی با شوری بالا به‌خوبی انجام نمی‌شود، تجزیه‌زیستی در این محیط‌ها تنها با استفاده از ریزجانداران مقاوم به شوری امکان‌پذیر است. علی‌رغم مطالعات گسترده در زمینه شناسایی میکروارگانیزم‌های قادر به تجزیه BTEX، اطلاعات در زمینه ریزجانداران و کارایی آن‌ها در تجزیه‌زیستی BTEX در محیط

زیستی آلاینده‌های هیدروکربنی بیشتر از باکتری‌ها در مناطق فاقد آلودگی است؛ بنابراین در این تحقیق به منظور جداسازی باکتری‌های موردنظر از چهار نوع خاک آلوده به آلاینده‌های نفتی در استان قم استفاده گردید. قابل ذکر است که شوری و کمبود اکسیژن از عوامل نامساعد محیطی و تأثیرگذار بر تجزیه زیستی BTEX می‌باشند که در این مطالعه سعی بر بررسی تأثیر هر دو پارامتر به صورت هم‌زمان شد. در نهایت به بهینه سازی فاکتورهای متغیر (نیترات، شوری و جمعیت سلولی) برای بالا بردن راندمان تجزیه زیستی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها

به منظور غنی‌سازی باکتری‌های متحمل به شوری تجزیه‌کننده BTEX، ۱ گرم از هر نمونه خاک آلوده به فلاسک ۲۵۰ میلی

لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی (جدول ۱) و ترکیبی از BTEX به‌عنوان تنها منبع کربن در ارلن مایر اضافه شد (Shim et al., 2005). ۱۲۰ میکرولیتر از ترکیب BTEX شامل ۳۰ میکرولیتر از هر جز به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی اضافه شد تا غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای هر جزء بدست آید (Due et al., 2008). سپس آنکوباسیون ارلن مایر به‌صورت بسته و در محیط تاریک در درجه حرارت ۲۸-۳۰ درجه بدون شیکر و در شرایط بی‌هوازی صورت گرفت. بعد از یک ماه ۲ میلی‌لیتر از محلول به محیط کشت تازه انتقال یافته و یک ماه دیگر آنکوباسیون ادامه یافت. این مرحله دو بار تکرار گردید و سپس باکتری‌های تجزیه‌کننده BTEX بر روی پلیت حاوی محیط معدنی و BTEX جداسازی و کشت داده شد و این جداسازی تا بدست آمدن جدایه خالص ادامه یافت (Shahriari, 2013).

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده محیط کشت معدنی

نمک مورد استفاده	NaCl	MgCl ₂	KH ₂ PO ₄	NH ₄ Cl	K ₂ HPO ₄	KCl
غلظت (گرم بر لیتر)	۲	۰/۵	۰/۴۵	۰/۳	۰/۹	۰/۳

انتخاب جدایه برتر

به منظور بررسی توانایی ریزجانداران شناسایی‌شده در کاهش غلظت BTEX و انتخاب یک باکتری مناسب، پس از جداسازی و خالص‌سازی ریز جانداران مناسب برای تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی موجود در آب زیرزمینی به بررسی میزان تحمل جدایه‌های موردنظر پرداخته و جدایه برتر انتخاب شد. در این مرحله توانایی باکتری‌های منتخب در تجزیه BTEX در شرایط میکروآتروفیلیک توسط سنجش میزان رشد باکتری‌ها و میزان BTEX مصرفی مورد ارزیابی قرار گرفت و بهترین جدایه به عنوان باکتری تجزیه‌کننده BTEX انتخاب شد.

در ده بطری ۵۰ میلی‌لیتر درپوش دار، ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت معدنی (جدول ۲) تهیه (Shim et al., 2005) و برای ایجاد شرایط میکروآتروفیلیک درپوش آلومینیوم آن‌ها

به‌طور کامل بسته شد. با توجه به چگالی BTEX، ۹/۱۲ میکرولیتر از ترکیب BTEX (شامل ۲/۳ میکرولیتر از هر جز) با استفاده از میکرو سرنج به ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی تزریق تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر BTEX (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای هر جز) حاصل شود (Due et al., 2008). یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر یک از باکتری‌های رشد یافته (۲/۵ درصد) حاوی ۱×۱۰^۷ باکتری بر طبق استاندارد مک‌فارلند، جدا و به محیط کشت مایع تلقیح و در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی-گراد در محیط تاریک به مدت ۱۰ روز در شرایط بی‌هوازی و بدون شیکر نگهداری شد. بعد از گذشت ۲۰ روز غلظت BTEX باقیمانده در محیط‌هایی که رشد باکتری مشاهده شده بود اندازه گیری و جدایه‌ای که توانایی بیشتری در کاهش غلظت BTEX داشت برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

جدول ۲- اجزای تشکیل‌دهنده محیط کشت معدنی

نمک	غلظت (گرم بر لیتر)	نمک	غلظت (گرم بر لیتر)
MnSO ₄ .H ₂ O	۰/۰۰۸	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	۰/۰۰۲
CaCl ₂ .2H ₂ O	۰/۰۰۱	K ₂ HPO ₄	۰/۵
MgSO ₄ .7H ₂ O	۰/۰۰۹۸	NaCl	۲۰
CaCl ₂ .2H ₂ O	۰/۰۰۱	KH ₂ PO ₄	۰/۵
(NH ₄) ₂ NO ₃	۰/۳	Nitrioloacetic acid	۲۰

تجزیه زیستی BTEX توسط باکتری منتخب

طرح آزمایش‌ها و آنالیز داده‌ها

در این تحقیق از روش سطح پاسخ بر مبنای طرح Box-Behnken برای ارزیابی اثر متغیرهای مستقل غلظت BTEX، غلظت نیترات، میزان شوری و جمعیت میکروبی در سه سطح حداقل، متوسط و حداکثر بر عملکرد پاسخ (میزان حذف BTEX) و همچنین پیشگویی بهترین مقدار پاسخ استفاده شد. سطح‌های حداقل و حداکثر برای غلظت BTEX (۲۰۰-۴۰۰) میلی‌گرم بر لیتر، غلظت نیترات (۱۰۰-۶۰۰) میلی‌گرم بر لیتر، شوری (۱-۳) درصد و جمعیت میکروبی (۱-۳) درصد در نظر گرفته شد. در مجموع کل آزمایش‌ها با روش Box-Behnken برابر ۲۹ آزمایش تعیین شد. سپس بر اساس طرح آزمایش‌ها مقادیر نیترات و شوری و BTEX و جمعیت میکروبی به محیط معدنی ارائه شده در جدول (۲)، اضافه شد. از $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ به عنوان منبع نیترات و از NaCl برای شوری استفاده گردید (Shim et al., 2005). یک نمونه شاهد حاوی محیط کشت معدنی ارائه شده در جدول (۲)، بدون افزودن باکتری و با در نظر گرفتن متوسط مقادیر نیترات و شوری و غلظت BTEX به منظور اطمینان از تجزیه BTEX توسط باکتری مورد نظر تهیه گردید. بعد از ۲۰ روز میزان BTEX باقیمانده اندازه‌گیری و وارد نرم‌افزار Design Expert گردید. با استفاده از نرم‌افزار یک معادله به داده‌های حاصل از آزمایش‌ها برازش داده شد و سپس اعتبار مدل از طریق انجام یک آزمایش زیست‌پالایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز شیمیایی

غلظت BTEX توسط دستگاه گازکروماتوگرافی مدل Agilent 6890N مجهز به ستون HP-5 ۳۰ متری و آشکارساز (FID) اندازه‌گیری شد. دمای دستگاه در محل تزریق، آشکارساز و ستون به ترتیب در ۲۵۰، ۳۰۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. از گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل و از گازهای اکسیژن و هیدروژن به عنوان سوخت برای FID استفاده شد (Khajeh and Mosavi Zadeh, 2012). مقادیر LOD و LOQ و درصد Recovery برای بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن به صورت جدول زیر می‌باشد.

جدول ۳- مقادیر LOD و LOQ و درصد Recovery برای اجزای

BTEX				
زایلن	اتیل بنزن	تولوئن	بنزن	
۰/۰۸۳	۰/۰۸۱	۰/۰۵۴	۰/۰۶۵	LOQ
۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۲	LOD
۱۰/۱/۱	۱۰/۴/۵	۱۰/۸/۳	۱۰/۸/۱	(%)Recovery

نتایج و بحث

در مرحله جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها، ۹ باکتری از خاک جداسازی شد. از باکتری‌های مذکور ۳ باکتری رشد خوبی در محیط کشت مذکور داشتند؛ بنابراین میزان BTEX مصرفی آن‌ها اندازه‌گیری شد. آنالیز میزان BTEX نشان داد که تنها یک باکتری از بین سه باکتری مورد آزمایش قادر به تجزیه BTEX بوده و به‌عنوان باکتری برتر انتخاب گردید.

در جدول (۴) میزان حذف BTEX توسط باکتری‌ها نشان داده شده است که میزان تجزیه تولوئن از سایر اجزا بیشتر است. Dou et al. (2008) نیز در تحقیقات خود در بررسی پتانسیل تجزیه بی‌هوازی توسط تقویت زیستی با کنسرسيوم سازگار شده با BTEX تحت شرایط کاهشی نیترات، میزان تجزیه تولوئن را بیش از سایر اجزای تشکیل‌دهنده ترکیب BTEX بیان کرده بودند که احتمالاً به دلیل سریع‌تر بودن واکنش دکربوکسیلاسیون از متیل می‌باشد.

جدول ۴- میزان تجزیه BTEX توسط باکتری‌های رشد یافته در محیط

کشت معدنی حاوی BTEX

نمونه	درصد حذف بنزن	درصد حذف تولوئن	درصد حذف اتیل‌بنزن	درصد حذف زایلن
باکتری نوع ۱	۰	۰	۰	۰
باکتری نوع ۲	۰	۶	۰/۰۷	۱/۸
باکتری نوع ۳	۱۱/۲۶	۲۴/۳۸	۱۴/۶۵	۱۰/۵۷

روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی تجزیه BTEX

روش سطح پاسخ (RSM) برای بهینه‌سازی تجزیه زیستی BTEX مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به منابع موجود به‌عنوان فرض اولیه مقداری شوری (۱-۳٪)، نیترات ۶۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، جمعیت سلولی (۱-۳٪) و غلظت BTEX در حدود ۲۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد. درایه‌های ماتریس برای طرح Box-Behnken برای بررسی اثر اصلی و برهم‌کنش بین متغیرها و به منظور تعیین شرایط بهینه برای تجزیه زیستی BTEX در جدول (۵) مشاهده می‌شود.

پاسخ آزمایش‌ها تحت شرایط آزمایش در جدول (۵) ارائه شد که از نتایج یک معادله چندجمله‌ای درجه ۲ توسط نرم‌افزار Design Expert 7.0.0 پیشنهاد شد. مدل رگرسیونی به صورت زیر می‌باشد:

$$\text{BTEX} + 0.058806 - 3.81288 \times \text{درصد تجزیه (BTEX)} + 56.56249 \text{ N} + 6.83095 \text{ S} + 10.75954 \text{ CM} - 0.042914 \text{ BTEX} \times \text{N} - 3.56043 \text{ E} - 003 \times \text{BTEX} \times \text{S} - 0.011475 \times \text{BTEX} \times \text{CM} - 5.08160 \times \text{N} \times \text{S} - 2.55546 \times \text{N} \times \text{C} + 0.94216 \times \text{S} \times \text{CM} + 9.58216 \text{ E} - 005 \text{ BTEX}^2 - 31.91187 \text{ N}^2 - 1.37505 \text{ S}^2 - 1.98842 \text{ CM}^2$$

جدول ۵- ماتریس طرح Box Behnken برای چهار متغیر و نتایج حذف BTEX

درصد تجزیه BTEX پیش‌بینی شده	BTEX درصد تجزیه	جمعیت سلولی (درصد)	شوری (درصد)	غلظت نیترات (ppm)	غلظت BTEX (ppm)	اجرا
۱۵/۹	۱۶/۹	۲	۲	۰/۶	۲۰۰	۱
۱۳/۲	۱۳/۰	۲	۱	۰/۳۵	۲۰۰	۲
۱۴/۸	۱۴/۷	۳	۲	۰/۳۵	۲۰۰	۳
۴/۸	۳/۵	۱	۲	۰/۳۵	۴۰۰	۴
۳/۲	۳/۵	۳	۲	۰/۳۵	۴۰۰	۵
۳/۲	۵/۶	۱	۲	۰/۱	۳۰۰	۶
۷/۵	۸/۳	۱	۲	۰/۶	۳۰۰	۷
۵/۲	۳/۶	۳	۲	۰/۱	۳۰۰	۸
۱۰/۷	۱۰/۱	۲	۲	۰/۱	۲۰۰	۹
۳/۶	۴/۷	۲	۲	۰/۱	۴۰۰	۱۰
۹/۷	۹/۱	۲	۲	۰/۳۵	۳۰۰	۱۱
۷/۹	۱۰/۰	۳	۳	۰/۳۵	۳۰۰	۱۲
۶/۹	۵/۶	۲	۳	۰/۶	۳۰۰	۱۳
۹/۷	۱۰/۹	۲	۲	۰/۳۵	۳۰۰	۱۴
۸/۷	۸/۵	۲	۱	۰/۶	۳۰۰	۱۵
۹/۷	۹/۳	۲	۲	۰/۳۵	۳۰۰	۱۶
۶/۴	۵/۲	۲	۳	۰/۱	۳۰۰	۱۷
۵/۴	۷/۹	۳	۱	۰/۳۵	۳۰۰	۱۸
۹/۷	۱۱/۱	۲	۲	۰/۳۵	۳۰۰	۱۹
۱۴/۶	۱۶/۱	۲	۳	۰/۳۵	۲۰۰	۲۰
۶/۵	۶/۷	۱	۱	۰/۳۵	۳۰۰	۲۱
۴/۶	۴/۰	۲	۳	۰/۳۵	۴۰۰	۲۲
۹/۷	۸/۰	۲	۲	۰/۳۵	۳۰۰	۲۳
۱۱/۸	۱۰/۱	۱	۲	۰/۳۵	۲۰۰	۲۴
۴/۵	۷/۳	۲	۲	۰/۶	۴۰۰	۲۵
۵/۴	۵/۰	۱	۳	۰/۳۵	۳۰۰	۲۶
۶/۹	۳/۷	۳	۲	۰/۶	۳۰۰	۲۷
۳/۲	۳/۰	۲	۱	۰/۱	۳۰۰	۲۸
۴/۶	۲/۴	۲	۱	۰/۳۵	۴۰۰	۲۹

Lack Fit (شاخص آماری برازش مدل با نتایج حاصل از آزمایش ها) در مدل قابل ملاحظه نمی‌باشد و ۱۳/۳۷ درصد احتمال دارد که به دلیل خطا رخ دهد. ضرایب رگرسیونی و رابطه متقابل بین هر یک از فاکتورهای مستقل برای $P < 0.05$ قابل ملاحظه می باشد. همان‌طور که در جدول (۶) مشاهده می‌شود غلظت BTEX و نیترات از پارامترهای تأثیرگذار در مدل هستند. در جدول زیر A, B, C, D و به ترتیب نشان‌دهنده متغیرهای غلظت

در معادله فوق S, N و CM و به ترتیب درصد شوری، میزان نیترات برحسب میلی‌گرم بر لیتر و جمعیت میکروبی برحسب درصد را نشان می‌دهد. برای سنجش معتبر بودن مدل، از آنالیز واریانس استفاده گردید. F-Value مدل برابر ۵/۹۹ و Pمدل برابر ۰/۰۰۱ نشان‌دهنده معتبر بودن مدل می‌باشد. تنها ۰/۱٪ احتمال دارد که F-Value به دلیل خطا اتفاق بیفتد. مدل توسط تعیین ضریب $R^2 = 85\%$ نیز اعتبار سنجی شد. مقدار of

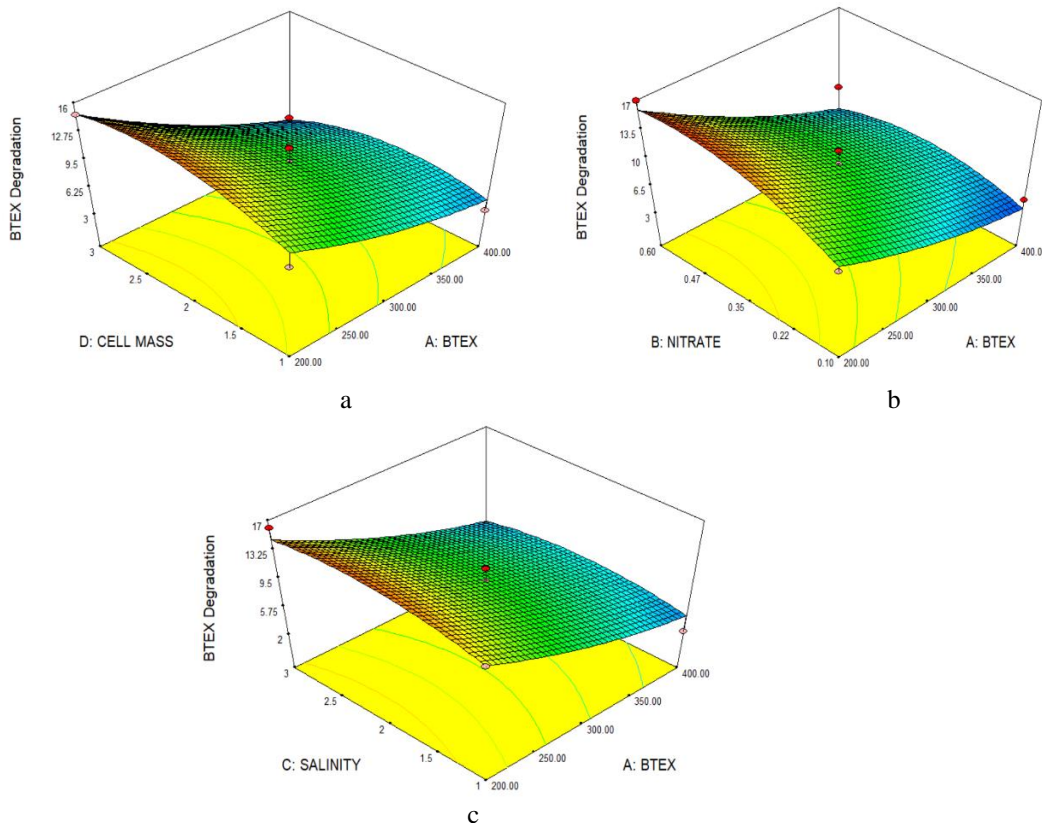
شکل (۱) نمایش گرافیکی سه‌بعدی تأثیر چهار متغیر بر تجزیه BTEX را نشان می‌دهد. کارایی تجزیه BTEX با افزایش جمعیت سلولی به صورت یکنواخت افزایش می‌یابد، اما تأثیر افزایش جمعیت سلولی بر تجزیه BTEX قابل توجه نمی‌باشد که ممکن است به دلیل کم بودن محدوده تغییرات جمعیت سلولی اتفاق افتاده باشد (شکل ۱a). Mi Jin et al. (2013) نیز در بهینه سازی شرایط برای تجزیه هوازی BTEX با استفاده از طرح مرکب مرکزی، تأثیر افزایش جمعیت سلولی از 1×10^7 تا 1×10^8 را بر تجزیه BTEX ناچیز گزارش نمود.

همچنین همان‌طور که شکل (۱) نشان می‌دهد هر چه غلظت اولیه BTEX بیشتر باشد درصد تجزیه BTEX به دلیل سمیت بالای BTEX کمتر می‌شود. Dou et al. (2008) در بررسی تجزیه بی‌هوازی BTEX نشان دادند غلظت‌های اولیه کم از چهار جز ترکیب BTEX اثر منفی آشکاری در تجزیه این ترکیب ندارد و این در حالی است که غلظت اولیه زیاد ترکیب BTEX اثر بازدارنده بر تجزیه این ترکیب بخصوص برای بنزن و زایلن دارد. Mi Jin et al. (2013) نیز در بررسی شرایط بهینه برای تجزیه هوازی BTEX، تأثیر افزایش غلظت اولیه BTEX را بر تجزیه BTEX منفی و معنی‌دار گزارش نمود به طوری که با افزایش غلظت BTEX از ۱۲۰ تا ۳۶۰ میلی‌گرم بر لیتر درصد تجزیه BTEX به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

BTEX و غلظت نیترات و شوری و جمعیت سلولی می‌باشند. نتایج نشان داد که ضریب غلظت BTEX و غلظت نیترات بسیار معنی‌دار و ضرایب نیترات در نیترات و جمعیت سلولی در جمعیت سلولی نیز معنی‌دار هستند.

جدول ۶- آنالیز واریانس برای مدل

	F	p-value	
	Value	Prob > F	
Model	۵/۹۹	۰/۰۰۱	معنی‌دار
BTEX	۵۷/۲۳	۰/۰۰۰۱	معنی‌دار
NITRATE	۶/۱۳	۰/۰۲۶۷	معنی‌دار
SALINITY	۰/۳۶	۰/۵۵۷۷	
CELL MASS	۰/۳۳	۰/۵۷۳۷	
AB	۱/۰۲	۰/۳۲۹۷	
AC	۰/۱۱	۰/۷۴۲۵	
AD	۱/۱۷	۰/۲۹۸۴	
BC	۱/۴۳	۰/۲۵۱۷	
BD	۰/۳۶	۰/۵۵۷۲	
CD	۰/۷۹	۰/۳۹۰۲	
A2	۱/۳۲	۰/۲۷	
B2	۵/۷۱	۰/۰۳۱۴	معنی‌دار
C2	۲/۷۲	۰/۱۲۱۶	
D2	۵/۶۸	۰/۰۳۱۹	معنی‌دار



شکل ۱- نمودار سه‌بعدی RS نشان‌دهنده برهم‌کنش چهار متغیر

(میکروآنروفلیک) صورت گرفت و از آنجایی که سرعت تجزیه در شرایط میکروآنروفلیک بسیار کم می‌باشد با سپری شدن زمان بیشتر، تجزیه بیشتری صورت خواهد گرفت.

اعتبارسنجی مدل

به منظور اعتبارسنجی مدل آزمایش تجزیه‌زیستی برای میزان نیترات ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ۲ درصد و جمعیت سلولی ۲ درصد انجام و میزان تجزیه با خروجی مدل مقایسه گردید. همان‌طور که در جدول (۷) مشاهده می‌شود دقت مدل در پیش‌بینی میزان تجزیه قابل قبول می‌باشد.

بهینه‌سازی شرایط

در این بخش با استفاده از نرم‌افزار Design Expert و با استفاده از معادله بدست آمده بهینه‌سازی شرایط برای غلظت‌های مختلف BTEX در شوری برابر ۱ درصد برای حصول حداکثر زیست‌پالایی انجام و میزان جمعیت میکروبی و نیترات تعیین شد.

مطالعات انجام‌شده در راستای تحریک زیستی با استفاده از نیترات، کارایی این پذیرنده الکترون را در افزایش سرعت تجزیه هیدروکربن‌ها طی روند کاهش غلظت آن در طی فرآیند نشان می‌دهد (شکل ۱b). Shim et al., (2005) در تحقیقات خود نشان دادند که محیط کشت حاوی نیترات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن باعث تجزیه سریع‌تر و کامل‌تر از بنزن می‌شود که به دلیل استفاده باکتری از نیترات به عنوان پذیرنده الکترون جایگزین در هنگامی که اکسیژن در محیط تمام می‌شود، می‌باشد. همان‌طور که در شکل (۱) هم مشاهده می‌شود افزایش غلظت نیترات تأثیر مثبت در تجزیه BTEX دارد و با افزایش غلظت آن در محیط میزان تجزیه‌زیستی افزایش معنادار یافته است. در بررسی تأثیر شوری بر تجزیه BTEX، با افزایش شوری از ۱ تا ۳ درصد، میزان تجزیه BTEX به مقدار کمی افزایش یافته است ولی معنادار نمی‌باشد. به‌طورکلی در این تحقیق تجزیه‌زیستی BTEX در شرایط بدون تزریق اکسیژن

جدول ۷- مقایسه میزان تجزیه BTEX پیش‌بینی و اندازه‌گیری شده

درصد خطا	میزان تجزیه BTEX		میزان شوری درصد	میزان نیترات (ppm)	ترکیب BTEX (ppm)	جمعیت سلولی (درصد)
	پیش‌بینی شده	مشاهده شده				
۱۲	۱۵/۸۸	۱۴/۲۲	۲	۶۰۰	۲۰۰	۲

جدول ۸- شرایط بهینه برای تجزیه BTEX بدست آمده توسط نرم‌افزار Design Expert

میزان تجزیه (درصد)	میزان نیترات (ppm)	جمعیت سلولی (درصد)	میزان شوری (درصد)	ترکیب (BTEX ppm)
۱۵/۰۵	۵۹۰	۱/۹۹	۱	۲۰۰
۹/۰۵	۵۴۰	۱/۷۳	۱	۳۰۰
۵/۵	۴۸۰	۱/۴۸	۱	۴۰۰

همان‌طور که در جدول (۸) مشاهده می‌شود به عنوان مثال در شرایطی که غلظت آلودگی BTEX در محیط برابر ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ۱ درصد است، بهترین مقدار برای میزان نیترات و جمعیت سلولی برای حصول مقدار بیشینه تجزیه BTEX به ترتیب برابر ۵۴۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۱/۷۳ درصد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نیترات و شوری) برای بررسی اثر مستقیم و یا متقابل پارامترها بر تجزیه BTEX صورت گرفت. با استفاده از شیوه RSM، تأثیر نیترات و غلظت BTEX اولیه بر تجزیه BTEX مشخص گردید و مقدار بهینه برای غلظت نیترات و جمعیت سلولی در غلظت‌های ثابت و مشخص BTEX و میزان شوری تعیین شد. کاربرد معادله فوق در شرایط محیطی که به شرایط بیان‌شده در این تحقیق نزدیک است توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

باکتری جداشده از خاک آلوده به مواد نفتی علی‌رغم وجود شرایط سخت میکروآنروفلیک قادر به تجزیه BTEX می‌باشد. در این تحقیق طرح آزمایش‌های بر پایه آمار برای بررسی اثر چهار متغیر مستقل (جمعیت سلولی، غلظت BTEX، غلظت

این مقاله در سال ۱۳۹۶ در قالب طرح پژوهشی با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور اجرا گردیده است و مؤلفان از مساعدت‌های آنان تقدیر می‌نمایند.

REFERENCES

- Atlas, R., Hazen. T.C.(2011). Oil Biodegradation and Bioremediation; A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environmental Science & Technology*. 45(16), 6709-6715
- Corseuil, H.X., Gomez, D. E., Schambeck, C. M., Ramos, D. T., Alvarez. P.J.J. (2015). Nitrate addition to groundwater impacted by ethanol-blended fuel accelerates ethanol removal and mitigates the associated metabolic flux dilution and inhibition of BTEX biodegradation. *Journal of Contaminant Hydrology*. 174, 1–9
- Coates, J.D., Chakraborty, R., Lack, J.G., Achenbach, L.A. (2001). Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* 411: 1039–1043.
- Cunningham, J.A., Rahme, H., Hopkins, G.D., Lebron, C. and Reinhard, M. (2001). Enhanced in situ bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. *Environmental Science & Technology* 35(8), 1663-1670
- Dou. J., Liu. X., Hu. Z., Deng. D.(2008). Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction, *J. Hazard. Mater.* 151, 720–729.
- Fatpure, B. (2014). Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. Review article.: *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.00173
- Ferreira, S.C., Bruns, R. Ferreira, H., Matos, G., David, J., Brandao, G. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*. 597(2), 179-86.
- Gandolfi, I., Sicolo, M., Franzetti, A., Fontanarosa, E., Santagostino, A., Bestetti, G. (2010). Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bio resource. Technol.* 101, 568–575.
- Jin, H.M., Kim, J.M., Lee, H.J., Madsen, E.L., Jeon, C.O.M. (2012). *Alteromonas* as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil contaminated coastal sediment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7731–7740
- Jeon, C.O., Park, W., Padmanabhan, P., DeRito, C., Snape, J.R., Madsen, E.L. (2003). Discovery of a previously undescribed bacterium with distinctive dioxygenase that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13591–13596.
- Khajeh, M., Mosavi Zadeh, F. (2012). Response Surface Modeling of Ultrasound- Assisted Dispersive Liquid- Liquid Microextraction for Determination of Benzene, Toluene and Xylene in water Sample. *Bull Environ Contam Toxicol.* 89, 38-43.
- Knezevich, V., Koren, O., Ron, E.Z., Rosenberg, E. (2006). Petroleum bioremediation in seawater using guano as the fertilizer. *Biorem. J.* 10, 83–91.
- Kim, J.M., Jeon, C.O. (2009). Isolation and characterization of a new benzene, toluene, and ethyl benzene degrading bacterium, *Acinetobacter* sp. B113. *Curr. Microbiol.* 58, 70–75.
- Maxwell, C.R., Baqai, H.A. (1995). *Remediation of petroleum hydrocarbons by inoculation with laboratory-cultured microorganisms*. In: Hinchey RE, Fredrickson J, Alleman BC Bioaugmentation for site remediation. Battelle Press, Columbus.
- Mi Jin, H., Choi, E. J., Jeon, C.O. (2013). Isolation of a BTEX-degrading bacterium, *Janibacter* sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. *Bioresource Technology*. 145, 57–64.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M. (2009). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, third ed. New York.
- Newell, C.J., McLeod, R.K., Gonzales, J.R., and Wilson, J.T. (1996). *Bioscreen Natural Attenuation Decision Support System, User' s Manual-Version 1.3*, National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/600/R-96/087.
- Ruiz, M., Pasadakis, N., Kalogerakis, N. (2006). Bioremediation and toxicity determination of natural seawater polluted with weathered crude oil by salt tolerant consortia in a SBR. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1490–1493.
- Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A., Matsuda, H. (2009). Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresour. Technol.* 100, 572–577.
- Shahriari, M.H. (2013). Investigation of bioavailability and biodegradation kinetics of phenanthrene in saline soils. PhD Thesis, University of Tehran.
- Shim, H., Hwang, B., Lee, S. S., and Kong, S.H. (2005). Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. *Biodegradation* 16, 319–327.
- Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., Kato, N. (2004). Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1385–1392.
- Sunita, J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*. 223, 277–286.
- Ucankus, T. (2005). Modeling natural attenuation of petroleum hydrocarbons (BTEX) in heterogeneous aquifers. MSc. thesis, Middle East Technical University.
- Vogt, C., Kleinstuber, S., Richnow H.H. (2011). Anaerobic benzene degradation by bacteria. *Microbial Biotechnology* 4(6), 710–724