علوم محیطی ۳، بهار ۱۳۸۳
ENVIRONMENTAL SCIENCES 3, Spring 2004
۴۹-۵۹

جداسازی و بهینه‌سازی باکتری قطران‌خوار به‌منظور رفع آلاینده‌های محیطی

غلامحسین ابراهیمی‌پور
دکترای میکروبیولوژی، استادیار دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی
ویدا تفکری
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

درمان بیولوژیکی محیط‌های آلوده به آلاینده‌های‌آلی و غیرآلی، یکی از مؤثرترین روش‌های جدید در قرن اخیر است که در آن از میکروارگانیسم‌ها برای پاک‌سازی استفاده می‌شود. این روش در حقیقت کاربرد نوین شیوه قدیمی مورد استفاده در تصفیه فاضلاب است، که امروزه در زمینه پاک‌سازی خاک‌ها، لجن‌ها و آب‌های سطحی آلوده به آلاینده‌های مختلف به‌کار می‌رود. هدف اصلی این تحقیق جداسازی و تعیین شرایط بهینه میکروارگانیسمی است که جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده به قطران ذغال‌سنگ در پالایشگاه قطران ایران واقع در اصفهان، به‌صورت صنعتی استفاده شود. نتایج حاصل از بررسی‌های منطقه‌ای و مطالعات بیولوژیکی خاک نشان‌دهنده وجود میکروارگانیسم‌های بومی فعال مصرف‌کننده قطران است.

کلیدواژه‌ها: قطران ذغال‌سنگ، میکروارگانیسم، درمان بیولوژیکی.

Isolation and Optimization of Utilizing Coal Tar Bacterium to Remove Environmental Contaminantes

Gholamhossein Ebrahimipour, Ph.D.
Assistant Professor, Faculty of Science, Shahid Beheshti University
Vida Tafakkori, M.Sc.
Student, Faculty of Science, Shahid Beheshti University

Abstract

The bioremediation of environments contaminated with a variety of organic and inorganic compounds is one of the most effective and new technologies in this century, using microorganisms for decontamination. In reality, it is simply a new application of an old technology once primarily used in waste water treatment. Today bioremediation is routinely applied to the soils, sludge, groundwater and surface waters contaminated with different substances. The main purpose of this research is the isolation and optimization of a microorganism that is used for decontaminating contaminated soils using coal tar, from the coal tar refinery in Isfahan. The results of site characterization and biofeasibility testing have shown the presence of an active and native coal tar utilizing microorganisms. This research has optimized coal tar utilizing conditions, by identifying the best strain.

Keywords: Coal tar, microorganism, bioremediation.

مقدمه

قطران جسم جامد سیاه رنگی است که از تقطیر خشک ذغال‌سنگ، تورب، چوب، نفت خام یا سایر موادآلی به‌دست می‌آید. این ماده متشکل از هیدروکربن‌های آروماتیکی و مقدار بسیار کمی آب و مواد معدنی است (نصر اصفهانی، ۱۳۸۱). هیدروکربن‌های آروماتیکی از نظر شیمیایی شامل یک، دو یا چند حلقه بنزنی متصل به هم هستند که از احتراق ناقص سوخت های فسیلی و ترکیبات آلی حاصل می شوند (Jacob *et al*, 1986). در قرن اخیر سطوح این مواد در کشورهای صنعتی به دلیل افزایش کاربرد نادرست منابع طبیعی رو به افزایش است (Johnson *et al*, 1985). امروزه اثرات پتانسیل بالقوه پلی‌آروماتیک‌های چندحلقه‌ای از نظر سرطان‌زایی در محیط و خطرات احتمالی از نظر سلامت انسانی مورد توجه است (Miller *et al*, 1981). به دلیل خاصیت ژنوتوکسیسیتی[1] این مواد، آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا، برخی از این مواد را جزو آلاینده‌هایی که باید در پساب صنایع مورد توجه قرار بگیرند، فهرست کرده است (Keit & Telliard, 1979). این مطلب به گسترش روش‌هایی منجر شده است، که قادر به پاک‌سازی مناطق آلوده به این مواد باشد. از میان روش‌های مختلف تصفیه خاک، تصفیه بیولوژیکی به دلیل تمام محاسنی که در مقایسه با روش‌های دیگر دارد، از جمله کاهش هزینه‌های اقتصادی و عدم تولید مواد مضر محیطی به‌عنوان روش ارجح و کارآمد تصفیه انتخاب می‌شود. تصفیه بیولوژیکی یا درمان‌زیستی[2] یعنی استفاده از سیستم‌های بیولوژیکی جهت حذف آلاینده‌های محیط زیست، به‌نحوی که هیچ خطری برای انسان و اکوسیستم ایجاد نکند (Frischer, 1998). در این پژوهش سعی بر جداسازی و تعیین شرایط بهینه میکروارگانیسم مناسب جهت درمان زیستی خاک‌های آلوده در منطقه پالایشگاه قطران ذغال‌سنگ[3] اصفهان شده است.

مواد و روش‌ها

همه مواد جز موارد زیر از محصولات مرک تهیه شدند: نوترینت آگار از شرکت Oxid و Tris base، Tris hydroxyl-methyl amino methan از شرکت Sigma.

• محل نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده موجود در پالایشگاه ذغال‌سنگ اصفهان، صورت گرفت. پنج نقطه برای این منظور در نظر گرفته شد: ۱) خاک اطراف مخازن نگهداری، ۲) خاک اطراف محل بارگیری قطران، ۳) خاک مناطق کشاورزی اطراف، ۴) خاک مرطوب حاصل از نشت لوله‌های رابط و ۵)خاک اطراف واحد تولید کک در پالایشگاه ذوب آهن.

نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی تمیز، به‌روی یخ، تا رسیدن به آزمایشگاه حمل شد. در طی مسیر هوادهی نیز صورت گرفت.

• جداسازی باکتری‌های قطران‌خوار

به این منظور از روش خالص‌سازی روی محیط جامد استفاده شد. ابتدا حدود ۱۰ گرم از خاک آلوده درون یک ارلن شیاردار ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر آب استریل شده به آن اضافه شد. آن‌گاه به مدت یک ساعت نمونه‌ها، در دمای اتاق و دور rpm100 تکان داده شدند. پس از گذشت این مدت، ارلن‌ها ثابت نگه داشته شد تا خاک و سایر ذرات رسوب کنند. سپس از سوپرناتانت، رقت‌های مختلف شامل 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه شد و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط نوترینت آگار، با میله سر کج دریگالسکی[4] کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های متعددی روی سطح آگار ظاهر شدند. کلنی‌های حاصل روی سطح محیط نوترینت آگار خالص‌سازی شدند.

• انتخاب بهترین سویه مصرف‌کننده

به این منظور از محیط پایه نمکی[5] (BSM) و ۱ گرم قطران، استفاده شد. محیط پایه نمکی شامل ۰/۰۲۴ گرم Na_2HPO_4، ۰/۱۹۵ گرم NH_4Cl، ۰/۰۱ گرم $FeSO_4.7H_2O$، ICT ۰/۰۵ گرم KCl، ۰/۰۱ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۸ گرم NaCl، ۰/۰۱ گرم $CaCl_2.2H_2O$ و ۱ میلی‌لیتر از محلول عناصر میکرو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است (Gibbs, 1975). ۱۰۰میلی‌لیتر محیط پایه نمکی درون ارلن‌های شیاردار ۲۵۰ میلی‌لیتری با pH=۸ تهیه شد. سپس ۱ گرم قطران نیز به آن اضافه شد. از هر یک از نمونه‌های جدا شده، کدورتی معادل نیم مک‌فارلند

تهیه و آن‌گاه ۱ میلی‌لیتر از هر یک به ارلن‌های جداگانه تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۸ روز در دمای اتاق تکان داده شدند (100 rpm[۶]) و نمونه‌برداری جهت اندازه‌گیری پروتئین در روزهای ۰، ۱، ۲، ۵، ۸ صورت گرفت. پس از پایان روز هشتم برای انتخاب بهترین سویه مصرف‌کننده، تست پروتئین‌سنجی به روش لاری روی نمونه‌ها انجام شد (Sueszmuth *et al*, 1987). به این منظور ابتدا ۱ میلی‌لیتر از نمونه، داخل اپندورف به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد. به رسوب سلولی حاصل ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و پس از به هم زدن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سود ۰/۳ مولار اضافه و مخلوط شد. لوله‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند. سپس رنگ‌آمیزی به روش لاری صورت گرفت.

جهت تعیین مقدار پروتئین تولیدی حاصل از مصرف قطران توسط باکتری جدا شده از منحنی خط استاندارد استفاده شد. به این منظور از از آلبومین سرم گاوی[۷] با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۱۰۰، ۱۲۰۰، ۱۳۰۰، ۱۴۰۰ میکروگرم در ۱ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد.

• تعیین شرایط بهینه مصرف قطران توسط باکتری انتخاب شده

تعیین شرایط بهینه مصرف قطران در ۱۰۰ میلی لیتر محیط BSM شامل ۱ گرم قطران به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی و جهت بررسی اثر فاکتورهای مختلف دما، pH، منبع حداقل نیتروژن و فسفر صورت گرفت. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری در روزهای ۰، ۱، ۳، ۷ و ۱۰ انجام گرفت. به منظور مقایسه تیمارهای مختلف تست پروتئین سنجی روی نمونه‌ها صورت گرفت و نتایج طبق طرح آماری CRD[۸] متعادل برای روز آخر بررسی شد. فاکتورهای مختلف در مقادیر زیر بررسی شدند:

pH های ۶/۲، ۷/۲، ۸/۲ و ۹/۲، دماهای ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد، و همچنین مقادیر نیتروژن معدنی شامل ۰/۲۹۰، ۰/۱۹۵، ۰/۱۳ و ۰/۰۶۵گرم NH_4Cl و مقادیر فسفر معدنی شامل ۰/۱۴۴، ۰/۰۷۲، ۰/۰۲۴ و ۰/۰۰۸ گرم Na_2HPO_4 به ازای یک گرم قطران در نظر گرفته شد.

• تست نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و رنگ‌آمیزی دانه‌های فسفات

به‌منظور توجیه نتایج حاصل از بهینه‌سازی منابع نیتروژن و فسفر، این سه تست انجام شد. برای انجام تست نیتریفیکاسیون از تعیین اکسیده‌شدن آمونیوم به نیترات و برای انجام تست دنیتریفیکاسیون از محیط احیای نیترات به نیتریت و معرف‌های آن استفاده شد (شریفی، ۱۳۷۹). دانه‌های فسفات نیز به روش بارن و همکارانش رنگ‌آمیزی شدند (Baron & Finegold, 1990).

• تست وزن سنجی قطران

به‌منظور تعیین مقدار قطران مصرف‌شده توسط باکتری ایزوله شده از تست وزن‌سنجی به روش (Thoand *et al*, 1999) استفاده شد. طبق این روش آروماتیک‌ها در کلروفرم محلول می‌باشند. پس از بررسی حلالیت قطران در این حلال، فاز آب از فاز محلول در کلروفرم جدا و پس از تبخیر کلروفرم، قطران باقیمانده وزن شد. تفاوت میان وزن شاهد بدون میکروب و نمونه دارای میکروب مقدار مصرف قطران را نشان می‌داد.

نتایج

• بررسی نتایج جداسازی و انتخاب بهترین سویه مصرف‌کننده قطران

با استفاده از روش خالص‌سازی روی محیط نوترینت آگار، ۸ سویه باکتری جداسازی شد. از بین این ۸ سویه جداسازی شده، تنها ۳ سویه قادر به استفاده مستقل از قطران با امولسیونه‌کردن آن در محیط پایه نمکی و در نتیجه مصرف آن به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی بودند. به منظور انتخاب بهترین سویه مصرف‌کننده تست پروتئین سنجی بین ۳ سویه مذکور انجام و با توجه به نتایج این تست، بهترین مصرف‌کننده باکتری شماره ۴ انتخاب شد. این نتایج در شکل ۳-۱ و جدول ۳-۱ آورده شده است. همان‌طور که در جدول ۳-۱ مشاهده می‌شود،

تفاوت معنی‌داری میان سویه‌های مصرف‌کننده موجود است، و باکتری شماره ۴ بیشترین رشد و مصرف قطران را نشان می‌دهد. در این پژوهش این باکتری ICT[9] نامگذاری شد که بر اساس تست‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی به احتمال بسیار قوی این باکتری یک جنس جدید از خانواده نایسریاسه با شباهت بسیار زیاد به گونه آسینتوباکتر کلکواستیکوس[10] است.

• بررسی نتایج تعیین شرایط بهینه مصرف قطران

نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای مختلف pH، دما، منبع نیتروژن و فسفر به ترتیب در شکل‌های ۳-۲ تا ۳-۵ و نتایج آماری این بررسی‌ها در جداول۳-۲ تا ۳-۵ آورده شده است. همان‌طور که نتایج تست‌ها نشان می‌دهد، میان pHهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. بنابراین از میان آن‌ها pH = ۷/۲ که یک pH خنثی و منطبق با pH خاک مناطق بسیار آلوده در پالایشگاه بود، به‌عنوان pH بهینه انتخاب شد. از میان دماهای مختلف با توجه به نتایج تست پروتئین سنجی و مقایسات آماری که حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار میان نتایج آن‌ها بود، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه انتخاب شد. در مورد منابع نیتروژن و فسفر هم به ترتیب مقادیر حداقل ۰/۱۳ و ۰/۰۰۸ گرم NH_4Cl و Na_2HPO_4 به‌عنوان مقادیر بهینه انتخاب شدند، چرا که بین مقادیر مختلف آن‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر آماری وجود نداشت.

• بررسی نتایج تست‌های نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و دانه‌های فسفات

نتایج حاصل از افزودن معرف‌ها با تولید رنگ ارغوانی، در نتیجه وجود نیتریت در محیط بیانگر قدرت اکسیده شدن آمونیوم به نیتریت توسط باکتری جدا شده بود.

پس از افزودن معرف‌های تست احیای نیترات به نیتریت هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد، که نشانگر عدم وجود نیتریت در محیط بود. بنابراین، پودر روی افزوده شد تا اگر در محیط نیتراتی وجود داشته باشد به نیتریت تبدیل شود و روی به‌عنوان کاتالیزور در آن عمل کند و محیط ارغوانی گردد؛ اما نتیجه مجدداً منفی بود که نشانگر قدرت دنیتریفیکاسیون باکتری بود. رنگ‌آمیزی دانه‌های فسفات هم نشانگر وجود دانه‌های فسفات به‌طور کاملاً واضح بود.

• بررسی نتایج تست وزن سنجی قطران

قطران ذغال‌سنگ مجموعه‌ای از آروماتیک‌ها است که به‌خوبی در کلروفرم حل شد. تفاوت وزن شاهد و نمونه میکروبی، نشان‌دهنده مصرف ۲۰٪ قطران ظرف مدت ۱۰ روز در شرایط بهینه بود.

بحث

اصولاً درمان زیستی اغلب می‌تواند حدود یک دوم تا یک سوم ارزان‌تر از سایر روش‌های درمان در محیط باشد (Vossoughi *et al*, 2002).

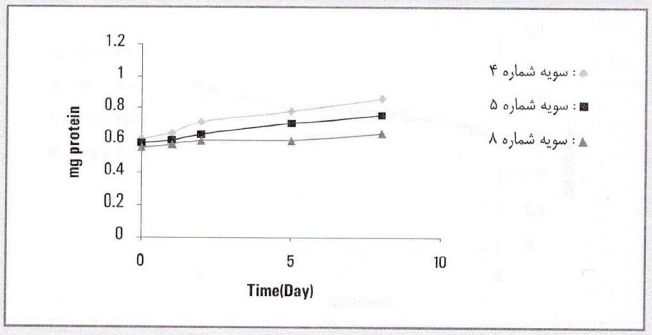
از میان ۸ سویه جداسازی شده از خاک‌های پالایشگاه قطران ذغال‌سنگ اصفهان، ۳ باکتری به‌دلیل قابلیت تولید بیوسورفاکتانت قادر به امولسیونه‌کردن قطران و در نتیجه مصرف آن بودند. بیوسورفاکتانت‌ها، یک گروه از مولکول‌های فعال در سطح با ساختار بسیار متنوع هستند که به وسیله میکروارگانیسم‌ها، سنتز می‌شوند (Desal & Banat,1997).

مقایسه تست پروتئین سنجی و نتایج آماری، نمایانگر وجود تفاوت معنی‌دار میان سویه‌های ۴، ۵ و ۸ بود. بنابراین سویه ۴ به‌عنوان سویه برتر در این پژوهش انتخاب شد.

نتایج آماری مقایسات pH های مختلف، تفاوت معنی‌داری را برای سویه انتخابی نشان نمی‌دهد. این احتمالاً به دلیل قدرت ایجاد pH مطلوب توسط خود باکتری است که در میان برخی گونه‌ها مشاهده شده است (Schlegel, 1992).

به‌منظور توجیه عدم اختلاف معنی‌دار میان مقادیر مختلف منابع نیتروژن و فسفر، تست‌های نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و رنگ‌آمیزی دانه‌های فسفات روی باکتری انجام شد و نتایج هرسه تست مثبت بود.

دنیتریفیکاسیون یعنی احیای نیترات یا نیتریت به یکی از گازهای ازته (شریفی، ۱۳۷۹). باکتری ICT در این پژوهش واجد این توانایی بود و دلیل قابلیت رشد یکسان آن در مقادیر مختلف نیتروژن هم همین بود.



شکل ۳-۱: مقایسه سویه‌های مصرف کننده قطران در محیط پایه با pH=8 در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به همراه ۱ گرم قطران و ۱ میلی‌لیتر از کدورت باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند ظرف مدت ۸ روز.

جدول ۳-۱: مقایسه آماری میان سویه‌های مصرف کننده قطران.

ANOVA

REPLECANT

	Sum of Squares	df	Mean Squares	F	Sig.
Between Groups	3.436E-02	2	1.718E-02	14.871	.005
Within Groups	6.931E-03	6	1.155E-03		
Total	4.129E-02	8			

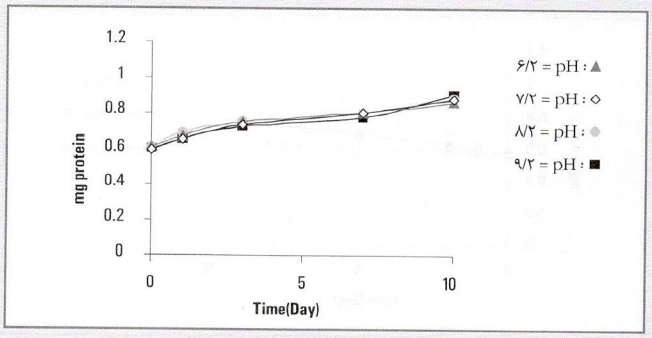
Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: REPLECANT
LSD

(I) TREATMENT	(J) TREATMENT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
4.00	5.00	7.4000E-02*	2.78E-02	.037	6.09E-03	.14191
	8.00	.15133*	2.78E-02	.002	8.34E-02	.21924
5.00	4.00	-7.400E-02*	2.78E-02	.037	-.14191	-6.1E-03
	8.00	7.7333E-02*	2.78E-02	.032	9.43E-03	.14524
8.00	4.00	-.15133*	2.78E-02	.037	-.21924	-8.3E-02
	5.00	-7.733E-02*	2.78E-02	.032	-.14524	-9.4E-03

* The mean difference is significant at the .05 level.



شکل ۳-۲: مقایسه pH های مختلف برای باکتری ICT در محیط پایه حاوی قطران در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به همراه ۱ گرم قطران و ۱ میلی‌لیتر از کدورت باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند ظرف مدت ۱۰ روز.

جدول ۳-۲: مقایسه آماری بین pH های مختلف برای باکتری ICT

ANOVA

REPLECANT

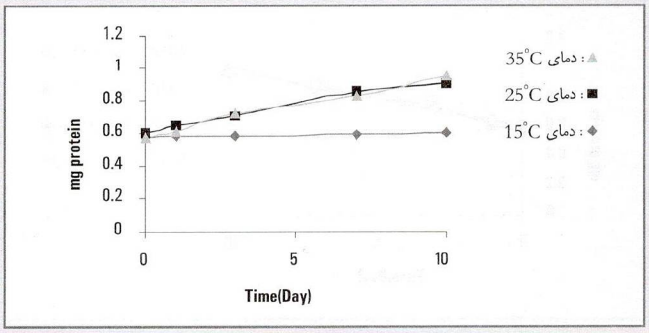
	Sum of Squares	df	Mean Squares	F	Sig.
Between Groups	9.087E-04	3	3.029E-04	.214	.884
Within Groups	1.130E-02	8	1.412E-03		
Total	1.221E-02	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: REPLECANT
LSD

(I) TREATMENT	(J) TREATMENT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6.20	7.20	-1.667E-02	3.07E-02	.602	-8.7E-02	5.41E-02
	8.20	7.0000E-03	3.07E-02	.825	-6.4E-02	7.78E-02
	9.20	-6.333E-03	3.07E-02	.842	-7.7E-02	6.44E-02
6.20	6.20	1.6667E-02	3.07E-02	.602	-5.4E-02	8.74E-02
	8.20	2.3667E-02	3.07E-02	.463	-4.7E-02	9.44E-02
	9.20	1.0333E-02	3.07E-02	.745	-6.0E-02	8.11E-02
6.20	6.20	-7.000E-03	3.07E-02	.825	-7.8E-02	6.38E-02
	7.20	-2.367E-02	3.07E-02	.463	-9.4E-02	4.71E-02
	9.20	-1.333E-02	3.07E-02	.675	-8.4E-02	5.74E-02
6.20	6.20	6.3333E-03	3.07E-02	.842	-6.4E-02	7.71E-02
	7.20	-1.033E-02	3.07E-02	.745	-8.1E-02	6.04E-02
	8.20	1.3333E-02	3.07E-02	.675	-5.7E-02	8.41E-02



شکل ۳-۳: مقایسه دماهای مختلف برای باکتری ICT در محیط پایه حاوی قطران با pH = ۷/۲ و ۱ گرم قطران و ۱ میلی‌لیتر از کدورت باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند ظرف مدت ۱۰ روز.

جدول ۳-۳: مقایسه آماری میان دماهای مختلف برای باکتری ICT

ANOVA

REPLECANT

	Sum of Squares	df	Mean Squares	F	Sig.
Between Groups	.104	2	5.209E-02	35.957	.000
Within Groups	8.691E-03	6	1.449E-03		
Total	.113	8			

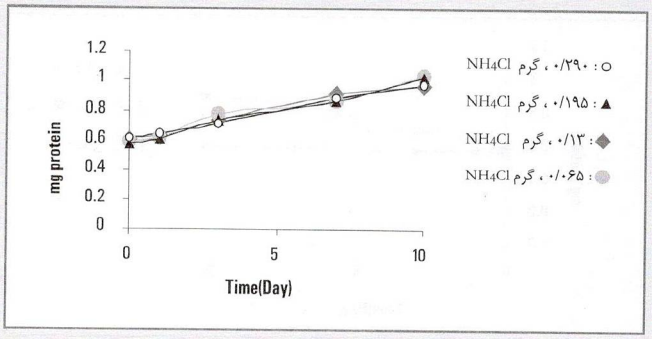
Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: REPLECANT
LSD

(I) TREATMENT	(J) TREATMENT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
15.00	25.00	-.21033*	3.11E-02	.001	-.28637	-.13429
	35.00	-.24267*	3.11E-02	.000	-.31871	-.16663
25.00	15.00	.21033*	3.11E-02	.001	.13429	.28637
	35.00	-3.233E-02*	3.11E-02	.338	-.10837	4.37E-02
35.00	15.00	.24267*	3.11E-02	.000	.16663	.31871
	25.00	3.2333E-02*	3.11E-02	.338	-4.4E-02	.10837

* The mean difference is significant at the .05 level.



شکل ۴-۳: مقایسه مقادیر مختلف نیتروژن معدنی برای باکتری ICT در محیط پایه حاوی قطران با pH=۷/۲ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به همراه ۱ گرم قطران و ۱ میلی‌لیتر از کدورت باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند ظرف مدت ۱۰ روز.

جدول ۴-۳: مقایسات آماری میان مقادیر مختلف نیتروژن معدنی برای باکتری ICT

ANOVA

REPLECANT

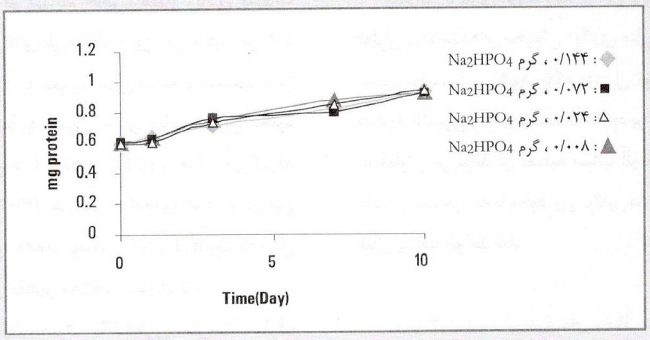
	Sum of Squares	df	Mean Squares	F	Sig.
Between Groups	5.022E-03	3	1.674E-03	.365	.780
Within Groups	3.665E-02	8	4.581E-03		
Total	4.167E-02	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: REPLECANT
LSD

(I) TREATMENT	(J) TREATMENT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0.065	1.90	-4.600E-02	5.53E-02	.429	-.17344	8.14E-02
	2.90	-4.233E-02	5.53E-02	.466	-.16977	8.51E-02
	4.30	-7.333E-03	5.53E-02	.898	-.13477	.12010
0.13	1.00	4.6000E-02	5.53E-02	.429	-8.1E-02	.17344
	2.90	3.6667E-03	5.53E-02	.949	-.12377	.13110
	4.30	3.8667E-02	5.53E-02	.504	-8.9E-02	.16610
0.195	1.00	4.2333E-02	5.53E-02	.466	-8.5E-02	.16977
	1.90	-3.667E-03	5.53E-02	.949	-.13110	.12377
	4.30	3.5000E-02	5.53E-02	.544	-9.2E-02	.16244
0.290	1.00	7.3333E-03	5.53E-02	.898	-.12010	.13477
	1.90	-3.867E-02	5.53E-02	.504	-.16610	8.88E-02
	2.90	-3.500E-02	5.53E-02	.544	-.16244	9.24E-02



شکل ۵-۳: مقایسه مقادیر مختلف فسفر معدنی برای باکتری ICT در محیط پایه حاوی قطران با pH=۷/۲ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به همراه ۱ گرم قطران، مقدار حداقل بهینه NH_4Cl و ۱ میلی لیتر از کنورت باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند ظرف مدت ۱۰ روز.

جدول ۵-۳: مقایسات آماری میان مقادیر مختلف فسفر معدنی برای باکتری ICT

ANOVA

REPLECANT

	Sum of Squares	df	Mean Squares	F	Sig.
Between Groups	3.977E-04	3	1.326E-04	.012	.998
Within Groups	8.493E-02	8	1.062E-03		
Total	8.533E-02	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: REPLECANT
LSD

(I) TREATMENT	(J) TREATMENT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0.008	.360	2.3333E-03	8.41E-02	.979	-.19167	.19633
	1.080	-9.333E-03	8.41E-02	.914	-.20333	.18467
	2.160	-1.100E-02	8.41E-02	.899	-.20500	.18300
0.024	.120	-2.333E-03	8.41E-02	.979	-.19633	.19167
	1.080	-1.167E-02	8.41E-02	.893	-.20567	.18233
	2.160	-1.333E-02	8.41E-02	.878	-.20733	.18067
0.072	.120	9.3333E-03	8.41E-02	.914	-.18467	.20333
	.360	1.1667E-02	8.41E-02	.893	-.18233	.20567
	2.160	-1.667E-03	8.41E-02	.985	-.19567	.19233
0.144	.120	1.1000E-02	8.41E-02	.899	-.18300	.20500
	.360	1.3333E-02	8.41E-02	.878	-.18067	.20733
	1.080	1.6667E-03	8.41E-02	.985	-.19233	.19567

برخی باکتری‌ها در شرایط خاص، مقدار زیادی فسفات معدنی را به فرم گرانول‌های پلی‌فسفاته درون خود ذخیره می‌کنند که این گرانول‌ها اصولاً به صورت بدون شاخه و مستقیم سنتز می‌شوند. این گرانول‌ها به احتمال خیلی زیاد به‌عنوان ذخیره فسفر و انرژی مورد استفاده باکتری قرار می‌گیرند (Fischer *et al*, 2001). مشاهده دانه‌های فسفات در این باکتری مؤید ذخیره این دانه‌ها توسط باکتری ICT بود که دلیل رشد یکسان در حضور مقادیر مختلف فسفر است.

باکتری ICT با قدرت مصرف ۲۰٪ قطران ذغال‌سنگ ظرف مدت ۱۰ روز، نسبت به بسیاری از باکتری‌هایی که توسط محققین دیگر ایزوله شده‌اند، یک مصرف‌کننده سریع برای آروماتیک‌ها محسوب می‌شود. به‌طوری‌که باور و همکارانش باکتری‌هایی با درصد مصرف ۴۳- ۸٪ برای نفتالین و ۳۱- ۳٪ برای فنانترین، البته ظرف مدت ۲۸ روز، را جداسازی کردند (Bouwer *et al*, 1994). در همین راستا صفی‌کردی و همکارانش باکتری‌هایی را از پالایشگاه قطران ایزوله کردند، که ظرف مدت ۹۰ ساعت ۱۰۰٪ نفتالین، ظرف مدت ۸ روز ۹۰٪ آنتراسین سه حلقه‌ای ساده و ظرف مدت ۱۴ روز ۸۰٪ فنانترین سه حلقه‌ای با شاخه جانبی را مصرف می‌کنند (Safekordi & Yaghmaei, 2001). خسینا و همکارانش تجزیه‌ای بالغ بر ۵۰٪ را پس از یک دوره ۳ ماهه، برای بنزوپیرین موجود در خاک آلوده با نفت، نشان‌دادند (Khesina *et al*, 1969). هینگا و همکارانش گزارش کردند که پس از ۲۳۰ روز، ۲۹٪ از بنزوآنتراسین اولیه که به میکروکوزم[11] اضافه شده بود، به دی‌اکسیدکربن تبدیل شده بود. آن‌ها حدس زدند که اگر میزان تولید دی‌اکسیدکربن به‌همان صورت بماند، در عرض ۳۵ سال تمام بنزوآنتراسین به دی‌اکسیدکربن تبدیل خواهد شد (Hinga *et al*, 1980). با وصف این حقیقت که قطران ذغال‌سنگ ماده‌ای است متشکل از آروماتیک‌های مختلف، اعم از ۲، ۳، ۴ و ۵ حلقه‌ای، و با علم به این مسئله که سرعت تجزیه آروماتیک‌ها با افزایش تعداد حلقه‌ها کاهش می‌یابد و آروماتیک‌های ۴ و ۵ حلقه‌ای نیز در قطران حضور دارند (جدول ۱-۴) می‌توان مصرف ۲۰٪ قطران ظرف مدت ۱۰ روز را درصدی قابل ملاحظه برای این ماده دیر تجزیه‌شونده برآورد کرد.

بنابراین باکتری ایزوله شده در این پژوهش، نه تنها در حذف قطران و آلاینده‌های محیطی دیگری مثل نفت‌خام، یک باکتری موفق محسوب می‌شود، بلکه به‌دلیل توانایی نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و ذخیره فسفات علاوه بر تصفیه خاک‌های آلوده به قطران می‌تواند در تصفیه پساب آلوده نیز کاربردی فراوان داشته باشد، چرا که با وجود این توانایی‌ها، مانع از یوتریفیکاسیون فعال پساب خواهد شد.

جدول ۴-۱: درصد آروماتیک‌های مختلف در قطران ذغال سنگ

Poly Aromatic	% Coal Tar
Benzene	0.023
Thiophene	0.027
Toluene	0.153
M- Xylene	0.248
O- Xylene	0.189
Phenol	0.104
Indene	0.072
Cresols	0.306
Xylenol	0.180
Naphthalene	11.003
Thionaphthene	0.207
Quinoline	0.207
Isoquinoline	0.041
2-Me-Naphthalene	1.265
1-Me-Naphthalene	0.545
Biphenyl	0.333
2-6-D.M.N	0.104
Acenaphthene	2.313
Dibenzofuran	0.428
Fluorene	1.845
Dibenzothiophene	0.428
Phenanthrene	1.130
Anthracene	1.548
Acridine	0.162
Carbazole	0.864
Methylanthracene	0.801
2-Phenyl-Naphthelene	0.203
Fluoranthene	3.056
Pyrene	1.922
Chrysene	0.549
Benzofluoranthene	0.117
Perylene	0.032

پی‌نوشت‌ها:

1. Genotoxisity
2. Bioremediation
3. Coal Tar
4. Drigalsky
5. Basal Salt Medium
6. Round per minute
7. Bovine Serum Albomin
8. Completely Randomized Design
9. Isfahan Coal Tar
10. Acinetobacter calcoaceticus
11. Microcosm

منابع

شریفی، مسعود (۱۳۷۹). *کاربرد، تفسیر و اصول آزمایش‌های بیوشیمیایی در باکتری‌شناسی پزشکی*. تبریز: احرار.

نصر اصفهانی، مهرداد (۱۳۸۱). *ساخت ذغال فعال از پیچ پالایشگاه قطران اصفهان*. پایان‌نامه کارشناسی ارشد مهندسی شیمی. دانشگاه علم و صنعت ایران.

Baron, E. and S. Finegold (1990). *Diagnostic Microbiology.* Toronto: C.V. Mosby.

Best, E. (2001). *Mikrobiologyische Methoden.* Berlin: Auflage Spektrum Akademischer Verlage, Gustav Fischer-Heidelberg.

Bouwer, B. *et al* (1994). Degradattion of Xenobiotic Compounds in Situ: Capabilities and Limits. *FEMS Microbiological Review;* 15:307-317.

Desal, J. D. and I. M. Banat (1997). Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potential. *Microbiol. mol. Biol. Review*, 61:47-64.

Frischer, Wolfgang (1998). *Umwet- Mikrobiologye.* Gustav Fischer- Jena, Stuttgart- Luebeck, Ulm.

Gibbs, C.F. (1975). Quantative Studies on Marin Oil Biodegradation of Crude Oil.I. Nutrient Limitation at 14°C. *Proc. Roy. Soc. London*: 188:61-62.

Hinga, K.R. *et al* (1980). Biogeochemistry of Benzanthracene in an Enclosed Marine Ecosystem. Environmental Science Technology, 14(9):1136-1143.

Jacob, J. *et al* (1986). Polycyclic aromatic hydrocarbons of environment and occumulational importance. *Fresenius Z. Anal.Chem.,* 323:1-10.

Johnson, A.C. and D.M. Larsen (1985). The Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Surfacial Sediments Penobscot Bay (Maine, USA), in Relation to Other Sites World Wide. *Mar Environ. Res.* 15:1-16.

Keit, L.H. and W.A. Telliard (1979). Telliard Priority Pollutants 1. A Perspective View. *Environmental Science Technology*, 13:416-423.

Khesina, A. Y. *et al* (1969). Benzpyrene Breakdown by Soil Microflora. *B.Exp.Biol.Med.* 68(10): 1139.

Miller, E. C. and J.A. Miller (1981). Searches for Ultimate Chemical Carcinogens and their Reactions with Cellular Macromolecules. *Cancer,* 47:2327-2345.

Safekordi, A. and S. Yaghmaei (2001). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Some Bacteria Isolated from Coal Tar Contaminated Soil. *Scientia Iranica*, 8(3):197-202.

Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Sueszmuth, R. *et al* (1987). *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*. Stuttgart: Georg Thiem Verlag.

Thoand, G. *et al* (1999). Laboratory Evaluation of Crude Oil Biodegradation with Commercial or Nutural Microbial Inocula. *Canadian Journal of Microbiology,* 45:106-115.

Vossoughi, M. *et al* (2002). Some Investigation on Bioremediation of PAHs Contaminated Soil in IRAN Tar Refinery. *Biochemistry Engineering Journal,* 15(1):1-10.