Archive of SID

تجزیه زیستی آنتراسن در محیط کشت فوق اشباع توسط کشت مخلوط

روشنک رضائی کلانتری[1]، احمد بادکوبی[2*]، سیدعباس شجاع‌الساداتی[3]، حسین گنجی‌دوست[4]

۱- دانشجوی دکتری بخش مهندسی عمران ، محیط زیست، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استادیار بخش مهندسی عمران، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- استاد بخش مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس

٤- دانشیار بخش مهندسی عمران، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس

* ایران؛ تهران؛ صندوق پستی ۱٤۳-۱٤۱۱۵

Badkoubi@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: آبان۱۳۸۱، پذیرش مقاله:اسفند۱۳۸۱)

چکیده - آلودگی خاکها به مواد نفتی (TPH) که از اجزای مختلفی نظیر آروماتیکهای حلقوی تشکیل شده، مشکلات زیست محیط بسیاری را ایجاد کرده است. در این تحقیق تجزیه زیستی آنتراسن با استفاده از چهار گروه از باکتری‌های مخلوط ـ که از نمونه های خاک آلوده به ترکیبات نفتی دراطراف پالایشگاه تهران جداسازی شده ـ مورد مطالعه قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های خاک به چهار محیط معدنی مجزا حاوی آنتراسن ، نفتالین، تولوئن و مخلوط هر سه، منتقل شده و پس از تطبیق به مدت ۷۰ روز با کدهای مخلوط A ، N ، T و ANT جداسازی ونامگذاری گردیدند. به منظور بررسی توانایی تجزیه زیستی مواد آلی مورد نظرتوسط میکروارگانیسم‌های جدا شده، به محیط معدنی حاوی ۰/٦۵ و ۷۰میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن از هر چهار نوع مخلوط میکروبی به طور جداگانه تلقیح میکروبی صورت گرفت. بهترین راندمان برای غلظت‌های فوق به‌ترتیب۱۰۰٪ و ۹۸٪ مربوط به میکروارگانیسم‌های مخلوط N بود. در نتیجه مخلوط N برای بررسی تجزیه بیولوژیکی انتخاب شد. ثابت سرعت تجزیه غلظت‌های مختلف آنتراسن توسط مخلوط N در محیط‌های فوق اشباع از آنتراسن تعیین شد. ثابت سرعت تجزیه بیولوژیکی برای غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر ازآنتراسن به ترتیب ۰/۰۵۱٤، ۰/۰٦۸٦، ۰/۰۵٦۳، ۰/۱۲۳۸ و ۰/۰۳٤۸ در روز بود. بالاترین ثابت سرعت تجزیه و بالاترین راندمان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد.

کلید واژگان: آنتراسن، تجزیه زیستی، میکروارگانیسم های مخلوط

۱- مقدمه

توسعه روزافزون استفاده از مواد شیمیایی در تولیدات صنعتی، مقادیر زیادی ضایعات شیمیایی خطرناک تولید کرده است که اغلب به آلودگی محیط زیست منجر می‌شوند. آلودگی محیط زیست به هیدروکربن‌های نفتی در زمره این آلودگی‌ها قرار گرفته است [۱]. نشت ترکیبات نفتی تحت تأثیر نیروهای کاپیلاری و ثقلی، منجر به حرکت عمودی در خاکهای غیر اشباع شده و در صورت زیاد بودن مقدار آن، این مواد به جریان آبهای زیرزمینی می‌رسند.

بر اثر نشت ترکیبات نفتی، موادی مانند بنزن، تولوئن، زایلن، اتیل بنزن[1] و هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی[2]

1. BTEX

2. PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

www.SID.ir

Archive of SID

موجب آلوده شدن آب وخاک می‌شوند.

هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی ترکیباتd سمی[1] هستند[۲] که خصوصیات موتاژنی[2] و سرطانزایی[3] دارند[۳]. و یکی از مهمترین آلوده‌کننده‌های محیط محسوب می‌شوند [٤]. برای تجزیه این ترکیبات عموماً از روشهای زیستی استفاده می‌شود[٥]. یکی ازمؤثرترین روشهای به کار گرفته شده، روش تصفیه بیولوژیکی[4] از طریق احیای بیولوژیکی[5] است[٦-۹]. مزیت این روش نسبت به سایر روشهای فیزیکی و شیمیایی هزینه کمتر آن است [۱۰و۱۱]. از سایر مزایای این روش، سمیت کمتر مواد حاصل از تجزیه در محیط نسبت به مواد اولیه است. سرعت کم تجزیه بیولوژیکی طبیعی در محیط ممکن است ناشی از جمعیت کم میکروبی بوده یا ناشی از ناتوانی متابولیسم میکروبی در شرایط محیطی باشد[۱۲]. مخمرها و باکتریها توانایی تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی را دارند اما در بیشتر مواقع این بررسیها در شرایط کومتابولیسم[6] یا در غلظت‌های پایین سوبسترا[7] یا توسط میکروارگانیسم‌های خالص صورت گرفته است[۱۳]. از آنجا که در محیط، میکروارگانیسم‌ها به‌صورت خالص موجود نیستند، بلکه به صورت مخلوط بوده و ممکن است در متابولیسم یکدیگر دخالت کرده و بر تجزیه ترکیبات مورد نظر تأثیر بگذارند، در این مطالعه، جمعیت مخلوط میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

هدف از این تحقیق، جداسازی مخلوط میکروبی با توانایی تجزیه ترکیبات نفتی که در محیط کشت مایع است و آنتراسن به عنوان یکی از ترکیبات نفتی نسبتاً سخت تجزیه‌پذیر است، مورد استفاده قرار گرفت. ضمن آنکه به منظور تخمین پتانسیل تجزیه توسط جمعیت میکروبی، الگوی مصرف سوبسترا نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- مواد

از نمونه‌های خاک آلوده به ترکیبات نفتی در اطراف پالایشگاه تهران به عنوان منبع جداسازی میکروارگانیسم ها استفاده شد. محیط کشت غنی‌سازی حاوی:(گرم برلیتر) KH_2PO_4(۳/٤)، K_2HPO_4(٤/۳)، $SO_4(NH_4)_2$(۲)، $MgCl_2.7H_2O$(۰/۲)، Cl_2 $Ca.2H_2O$(۰/۰٤) و ۰/۰۳ $FeSO_4$ بود.

محلول عناصر کم مقدار[8] حاوی: (میلی‌گرم بر لیتر) $MnCL_2$ ٤۰، MoO_3 ۸۰، $CuSO_4$ ٦، $ZnSO_4$ ٦۰ و H_3BO_3 ۱۳ بود[١٤]. از آنتراسن به عنوان نماینده ترکیبات PAH در ترکیبات نفتی استفاده شد. آنتراسن مورد استفاده با خلوص ۹۸٪ ازشرکت مرک آلمان تهیه شد. متانل مورد استفاده به عنوان فاز متحرک کروماتوگرافی مایع با کارایی بال HPLC[9] از شرکت مرک[10] تهیه شد. برای استخراج آنتراسن از محیط کشت از دی کلرومتان ازشر کت مرک و برای کشت میکروبی از نوترینت آگار از شرکتهای مدیا[11] و نوترینت برات از شرکت دیفکو[12] استفاده شد.

دستگاه HPLC مورد استفاده محصول شرکت واترز[13]

1. Toxic
2. Mutagenic
3. Carcinogenic
4. Biotreat
5. Bioremediation
6. Cometabolism
7. Substrate

8. Trace elements
9. High Performance Liquid Chromatography
10. Merck
11. Hi media
12. Difco
13. Waters

www.SID.ir

Archive of SID

باستون ODS[1] بود. فاز متحرک حاوی ۹۰ درصد متانل و ۱۰ درصد آب دوبار تقطیر به صورت ایزوکراتیک مورد استفاده قرار گرفت .

۳- روش جداسازی میکروارگانیسم ها

۱۵ گرم خاک آلوده به ترکیبات نفتی را با ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط نموده و به مدت ۲٤ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار دادیم. سپس به مدت ۱۵ دقیقه زمان داده شد تا سوسپانسیون ته‌نشین شود. یک میلی‌لیتر ازمایع رویی سوسپانسیون فوق به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی سترون اضافه شد. محیط کشت معدنی حاوی ۹۷۵ میلی لیتر محلول غنی‌سازی و ۲۵ میلی‌لیتر محلول عناصر کم‌مقدار بود. pH محیط در حد ٦/۸ تنظیم شد. محلول فوق در اتوکلاو با فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سترون و سپس منبع کربن به آن اضافه شد.

منابع کربنی مورد استفاده، آروماتیک‌های حلقوی بودند. تولوئن ، نفتالین و آنتراسن مورد استفاده قرار گرفت. به هر ارلن سترون حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی و مقداری تولوئن اضافه شد؛ این مرحله در مورد نفتالین و آنتراسن نیز تکرار شد. ضمن آنکه به منظور بررسی جمعیت میکروبی در محیط حاوی مخلوط آروماتیک‌ها ، به ارلن سترون حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی و مخلوط تولوئن، نفتالین و آنتراسن اضافه شد (یک سوم مقدار در مراحل قبل که به طور جداگانه استفاده شد). ارلن‌ها برروی همزن درون انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. برای تأمین مواد مغذی و منبع کربنی کافی، هر ۵ الی ۷ روز یک بار، محیط تازه شده و یک میلی لیتر از محیط قبلی به محیط جدید اضافه می‌شد. پس از حدود ۷۰ روز حدود یک میلی‌لیتر از محلولهای فوق به طور جداگانه به روی محیط نوترینت آگار منتقل و پس ازگرماگذاری برای مدت ۲٤ ساعت، چهار دسته مخلوط میکروبی جداسازی شد. مخلوط A (میکروارگانیسم‌هایی که تنها منبع کربن آن آنتراسن بود) ، مخلوط N (تنها منبع کربن نفتالین بود)، مخلوط T (تنها منبع کربن تولوئن بود) و مخلوط ANT (منبع کربن مخلوطی از آنتراسن، نفتالین و تولوئن بود).

٤- بررسی تجزیه زیستی

در مرحله بعدی توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور به ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری سترون، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی سترون و ۰/۰۹۷۵ میلی‌گرم آنتراسن (۰/٦۵ میلی‌گرم در لیتر) اضافه شد. سپس از چهار دسته مخلوط میکروبی، به طور جداگانه به محیط تلقیح صورت گرفت. برای تلقیح از کلنی‌های روی نوترینت آگار برداشته و به محلول سرم فیزیولوژی (۸/۵ گرم در لیتر نمک طعام) سترون منتقل و پس از یکنواخت سازی ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول سرم فیزیولوژی حاوی میکروارگانیسم‌ها به محیط کشت معدنی اضافه شد. برای بررسی مقدار مواد خارج شده بر اثر فراریت و برقراری موازنه جرم، در ارلن‌ها با پلی اورتان به ضخامت ۷-۵ سانتیمتر بسته شد. پلی اورتان جاذب مواد آلی فرار است[۱۵]. به منظور اطمینان از تجزیه بیولوژیکی، برای هر نمونه، یک شاهد که تمامی شرایط آن با نمونه‌ها یکسان بود و فقط باکتری به آن تلقیح نشده بود

1. Octadesyl Silyl

www.SID.ir

Archive of SID

بـه کـار رفت و نتایج به دست آمده نسبت به شاهد سنجیده شـد. ارلـن‌هـا حـاوی نمونـه‌ها و شاهدها بر روی همزن با سـرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده و دردمای محیط میزان تجـزیه آنتراسـن بررسی شد. مقدار آنتراسن موجود در مایع بـا اسـتفاده از روش اسـتخراج مایع – مایع با دی کلرومتان استخراج و با دستگاه HPLC سنجش شد [۱۶].

بـرای بررسـی جمعیـت میکروبـی از روش شـمارش میکروبـی[1] و (MPN)[2] اسـتفاده شـد. در روش MPN از نمونـه باکتری مورد نظر در سرم فیزیولوژی سترون به طور سـری محلولهایـی بـا رقـت‌های ۰/۱ نسبت به یکدیگر تهیه شـد. بـه دلیل اینکه از جمعیت میکروبی مورد نظر اطلاعی در دسـت نـبود از رقـت 10^{-1} تـا رقت 10^{-10} استفاده شد. سـپس به محیط نوترینت برات سترون که به طور ۵ لوله‌ای اسـتفاده می‌شد به میزان ۱۰٪ کل حجم رقت میکروبی مورد نظر استفاده شد. (یک میلی‌لیتر از رقت‌های مورد نظر به لوله حـاوی ۹ میلـی‌لیتر نوترینـت برات اضافه شد.) پس از ۴۸ سـاعت در دمـای ۳۰ درجـه سـانتیگراد رشـد میکروبـی با مشـاهده کـدورت قابل رویت بود. سپس نتایج با استفاده از جدول استاتیکی تخمین زده شد[۱۲و۱۷].

در مـرحله بعـد بـه مـنظور بررسـی احـتمال سمیت، از غلظـت ۲۰۰۰ میلـی گـرم در لیتر آنتراسن استفاده شد و در مـرحله سـوم، مـیزان تجزیه آنتراسن توسط باکتریهای مورد نظـر در محیطـی بـا غلظـت ۷۰ میلـی‌گرم بر لیتراز آنتراسن تعیین شد. در مرحلهٔ چهارم سرعت تجزیه و الگوی مصرف آنتراسـن توسـط مخلـوط باکتریهای گروه N با غلظت‌های اولـیه ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیترآنتراسن به‌دست آمد.

۵- نتایج و بحث

ایـن مطالعـه شـامل چهـار مـرحله اسـت. در مرحله اول از غلظت ۰/۶۵ میلی‌گرم آنتراسن در یک لیتر محلول معدنی و جمعیـت میکروبـی مخلـوط A، مخلـوط N، مخلـوط T و مخلـوط ANT استفاده شد. میزان آنتراسن باقیمانده پس از ۷۰ روز تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱ تغییرات غلظت آنتراسن پس از ۷۰ روز با استفاده از مخلوط‌های میکروبی A، N، T و ANT

مخلوط میکروبی	غلظت آنتراسن درروز صفر (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت آنتراسن در روز ۷۰ (میلی‌گرم بر لیتر)	میزان کاهش
مخلوط A	۰/۶۵	۰/۰۸	٪۸۷/۶
مخلوط N	۰/۶۵	۰	٪۱۰۰
مخلوط T	۰/۶۵	۰/۴۳	٪۳۳۸
مخلوط ANT	۰/۶۵	۰/۵۲	٪۲۰

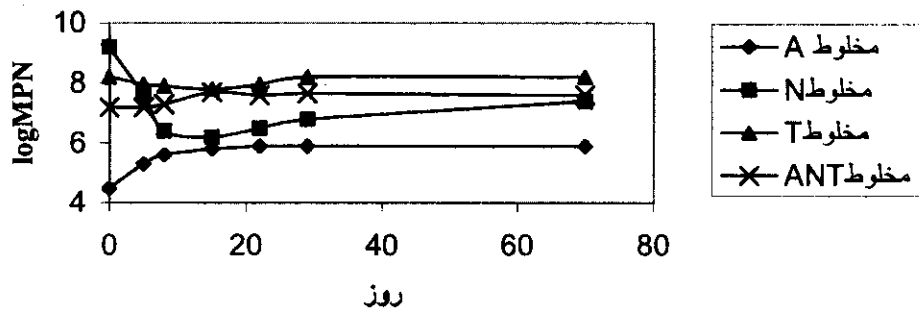
در طـی ایـن مـدت بـرای بررسـی رفـتار جمعیـت‌های مختـلف میکروبـی به‌دست آمده، تغییرات جمعیت میکروبی نیز مورد سنجش قرار گرفت. نتایج در نمودار ۱ آمده است.

همـان‌طـور کـه در شـکل ۱ نشان داده شده، از آنجا که باکـتریهای مخلوط A از ابتدا به آنتراسن عادت کرده بودند، در محـیط جدیـد کـه حـاوی مقـدار زیادی مواد غذایی بود سریعاً رشد کرده و تعداد آنها تقریباً ۲۷ برابر شد. باکتریهای مخلـوط N بـه محـض آنکه در محیطی قرار گرفتند که تنها منـبع کربـن آن آنتراسن بود به دلیل شوک زیادی که به آنها وارد شـد، بشـدت از تعـداد آنها کاسته شد اما پس از مدتی توانسـتند بـه محـیط جدیـد عـادت کنند، طوری که پس از مـدت کوتاهـی جمعیـت آنهـا افـزایش یافـت. در مـورد

1. Plate count
2. Most Probable Number

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱ تغییرات جمعیت میکروبی در طی مدت ۷۰ روز در محیط آنتراسن با غلظت اولیه ۰/۶۵ میلی‌گرم بر لیتر

باکتریهای مخلوط T نیز وضعیت مشابهی مشاهده شد با این تفاوت که سرعت کاهش و همچنین روند افزایش در آنها نسبت به مخلوط N کندتر بود.

مخلوط میکروبی ANT نیز از ابتدا افزایش جمعیت داشته اما سرعت افزایش جمعیت آن نسبت به مخلوط A کمتر بود، طوری که در طی مدت ۱۵ روز، تعداد آنها به ۲/۹ برابر رسید که می‌تواند به دلیل وجود باکتریهای مخلوط N و مخلوط T باشد. زیرا جمعیت براورد شده مربوط به مجموع جمعیت میکروبی موجود در محیط مورد استفاده است.

با توجه به مقایسه بین تجزیه آنتراسن توسط باکتریهای مورد نظر، باکتریهای مخلوط N پس از آنکه توانستند خود را با محیط جدید وفق دهند، بسرعت در تجزیه آنتراسن شرکت کردند طوری که مقدار آنتراسن را به صفر رساندند که در مقایسه با مخلوط A و مخلوط ANT که شامل میکروارگانیسم‌های عادت یافته به آنتراسن بود، در تجزیه آنتراسن فعالتر ظاهر شدند.

نتایج بررسی احتمال سمیت آنتراسن برای چهار دسته باکتری فوق در جدول ۲ و تغییرات جمعیت میکروبی در نمودار ۲ آمده است.

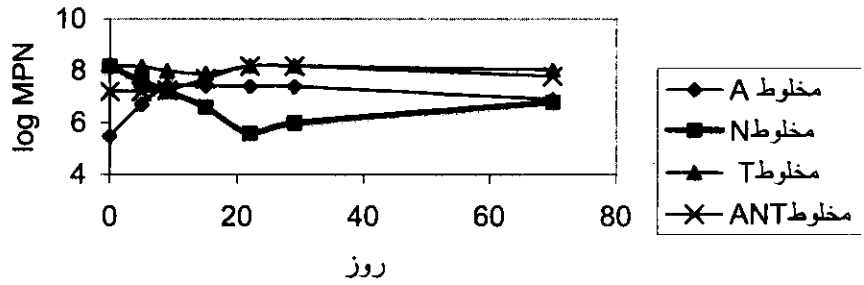
جمعیت مخلوط A در این محیط بسرعت افزایش یافت طوری که پس از ۹ روز به حداکثر خود رسید و پس از آن ثابت ماند اما با وجود این نتوانست فعالیت خوبی در تجزیه آنتراسن داشته باشد.

جدول ۲ تغییرات غلظت اولیه آنتراسن پس از ۷۰ روز با غلظت اولیه ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیترا استفاده از مخلوط‌های میکروبی A، N، T و ANT

مخلوط میکروبی	غلظت اولیه آنتراسن (میلی‌گرم‌برلیتر)	غلظت آنتراسن بعد از ۷۰ روز (میلی‌گرم بر لیتر)	میزان کاهش
مخلوط A	۲۰۰۰	۱۶۰۰	٪۲۰
مخلوط N	۲۰۰۰	۱۱۵۰	٪۴۲/۵
مخلوط T	۲۰۰۰	۱۲۰۰	٪۴۰
مخلوط ANT	۲۰۰۰	۱۲۰۰	٪۴۰

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲ تغییرات جمعیت میکروبی در مدت ۷۰ روز در محیط آنتراسن با غلظت اولیه ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

جمعیت مخلوط N در ابتدا بسرعت کاهش یافت و این کاهش جمعیت تا حدود روز ۲۹ ادامه یافت طوری که در طی این مدت از $۱/٦ \times ۱۰^{۸}$ به ٤×۱۰^{۵} عدد در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید اما پس از آن افزایش یافت؛ ضمن آنکه آنترانس مقدار بیشتری را نسبت به بقیه تجزیه کرد. جمعیت مخلوط T نیز در ابتدا با روند کندی کاهش یافت اما پس از مدتی کوتاه افزایش یافت. مخلوط ANT در این محیط ابتدا به‌کندی و سپس بعد از ۱۵ روز سریعتر افزایش یافت طوری که در روز بیست و هفتم به حداکثر تعداد خود رسید. جمعیت مخلوط ANT حاصل جمعیت باکتریهایی است که به N و T و A عادت کرده‌اند، بنابراین می‌تواند برایندی از تغییرات جمعیت آنها باشد. به دلیل وجود باکتریهای A روند افزایشی در پیش گرفته اما به دلیل وجود باکتریهای N و T این افزایش کند بوده اما پس از ۱۵ روز، از آنجا که باکتری‌های T افزایش یافتند، این روند سریعتر شده و سپس از حدود روز ۲۷ که مخلوط N نیز به حداکثر جمعیت خود رسید، جمعیت مخلوط ANT نیز به حداکثر مقدار خود رسید.

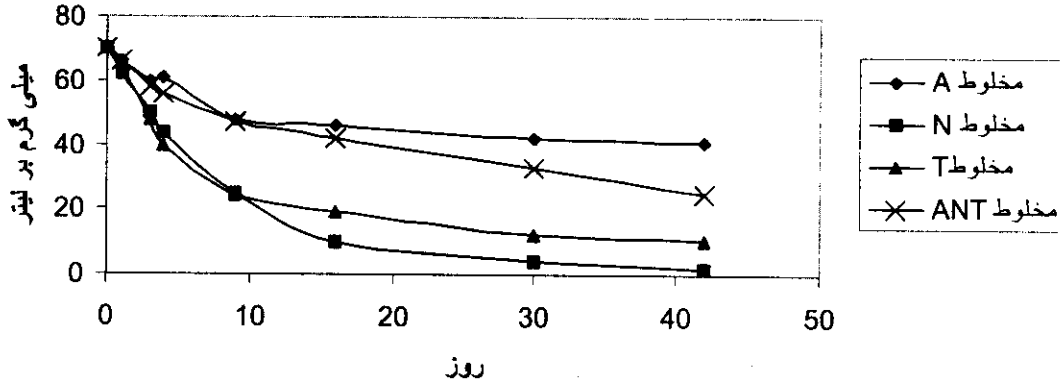
نتایج جدول۲ نشان می‌دهد که غلظت آنتراسن حتی در حد ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر، برای باکتری های جدا شده از محیط سمی نبوده طوری که توانستند افزایش جمعیت داشته باشند (اما درمدت طولانی‌تری نسبت به غلظت ۰/٦۵ میلی‌گرم در لیتر) ضمن آنکه آنتراسن را نیز تجزیه کردند.

در مرحله بعد به منظور مقایسه فعالیت باکتریها سرعت تجزیه آنتراسن با غلظت اولیه ۷۰ میلی‌گرم بر لیتردر طی مدت ٤۲ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده است.

با توجه به نتایج حاصل، بیشترین مقدار تجزیه مربوط به میکروارگانیسم‌های مخلوط N بوده است طوری که غلظت آنتراسن را در محیط از ۷۰ به ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر رساند؛ کلیه باکتریها با سینتیک درجه اول آنتراسن را تجزیه کردند. بیشترین ثابت سرعت تجزیه مربوط به مخلوط N و برابر ۰/۰۹۱۹ در روز بود. ثابت سرعت تجزیه مخلوط T برابر ۰/۰٤٤۸ و مربوط به مخلوط A و ANT بترتیب برابر ۰/۰۱۲۲ و ۰/۰۲۲۸ در روز بود. با توجه به موارد فوق باکتریهای مخلوط N بیشترین سرعت تجزیه را داشتند طوری که توانستند در طی مدت ٤۲ روز ۹۷/۹ درصد از آنتراسن را تجزیه کنند.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳ تغییرات غلظت آنتراسن در مدت ٤٢ روز با استفاده از مخلوط‌های A، N، T و ANT

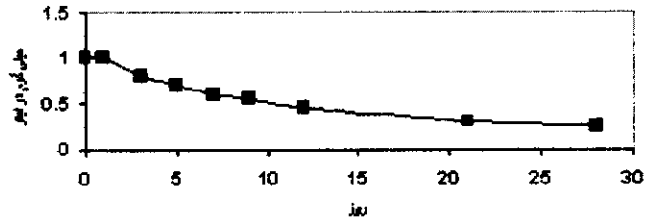
با توجه به توانایی بهتر میکروارگانیسم‌های مخلوط N درتجزیه آنتراسن، در مرحله بعد برای تعیین الگوی مصرف سوبسترات غلظت‌های مختلفی از آنتراسن با تلقیح مخلوط N مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیترمحلول مغذی بود. به منظور بررسی بهتر و امکان مقایسه، در تمامی غلظتها از جمعیت میکروبی یکسان به میزان ۹×۱۰^{۷} عدد در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج تجزیه در نمودار ٤ و تغییرات جمعیت میکروبی در نمودار ۵ آمده است.

باکتریهای مخلوط N در این مرحله نیز در ابتدا کاهش جمعیت داشتند. این کاهش در مورد غلظت ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیترآنتراسن تا روز سوم ادامه یافت. پس از آن به مدت حدود ۲ روز جمعیت ثابت بود و سپس افزایش یافت. روند افزایش جمعیت در مورد غلظتهای ۵، ۱۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر تا روز ۲۱ ادامه یافت و پس از آن جمعیت تقریباً ثابت ماند. در محیط حاوی آنتراسن با غلظت کمتر (کمتر از ۱ میلی‌گرم بر لیتر، زیرا در روز ۲۱ به میزان ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتررسید)، روند افزایش جمعیت ادامه داشت. مشاهدات میکروبی در این غلظت نشان داد که انبوهی از باکتریهای بسیار ریز سبز رنگ وجود دارد که حدود ۸۰٪ از کل جمعیت میکروبی، مربوط به این باکتریها بود که درمحیطهای غلیظ‌تر وجود نداشتند (تعداد بسیار کمی باکتری سبز رنگ در محیط ۵ میلی‌گرم درلیتر اولیه ـ که در روز ۲۱ به میزان ۱ میلی‌گرم بر لیتر رسید ـ مشاهده شد). ضمن آنکه کاهش روند جمعیت در محیطی که غلظت اولیه آن ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود، نسبت به ۱۰ و همچنین ۱۰ نسبت به ۵ بیشتر بود که این می‌تواند به دلیل عدم حضور باکتریهای خاصی که در محیط‌های غلیظ تر وجود ندارد باشد و احتمالاً غلظت‌های بالا برای این دسته از باکتریها سمی است.

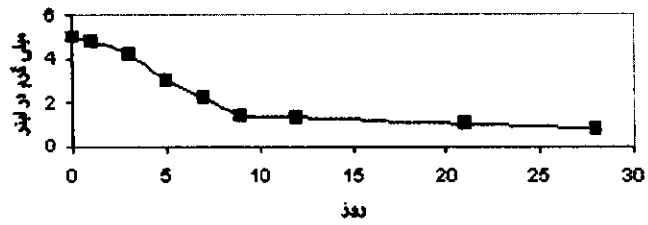
ثابت سرعت تجزیه درمحیطهای ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتراسن بترتیب برابر ۰/۰۵۱٤، ۰/۰٦۸٦، ۰/۰۵٦۳و ۰/۱۲۳۸ در روز بود. دو برابر شدن ثابت سرعت تجزیه در محیطهای غلیظ‌تر می‌تواند ناشی از وجود غذای کافی در محیط باشد؛ ضمن آنکه غلظت آنتراسن در محیط به حد مهار کنندگی رشد نیز ـ که به کاهش سرعت تجزیه منجر می‌شود ـ نرسید. در محیط با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیترآنتراسن کاهش جمعیت تا روز پنجم ادامه یافت

www.SID.ir

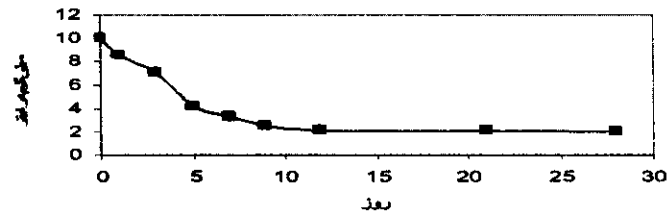
Archive of SID



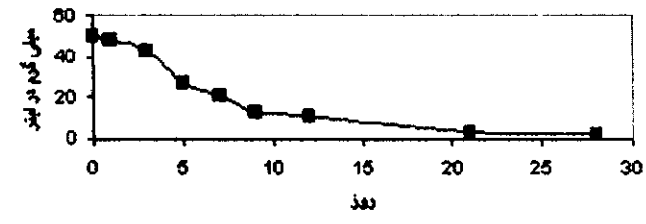
الف) غلظت اولیه آنتراسن ۱ میلی‌گرم در لیتر



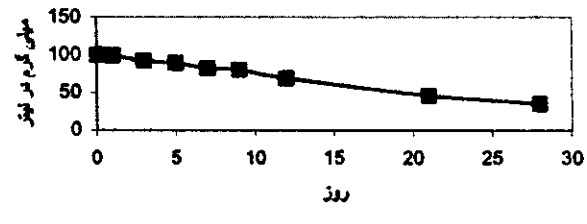
ب) غلظت اولیه آنتراسن ۵ میلی‌گرم در لیتر



پ) غلظت اولیه آنتراسن ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر



ت) غلظت اولیه آنتراسن ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر

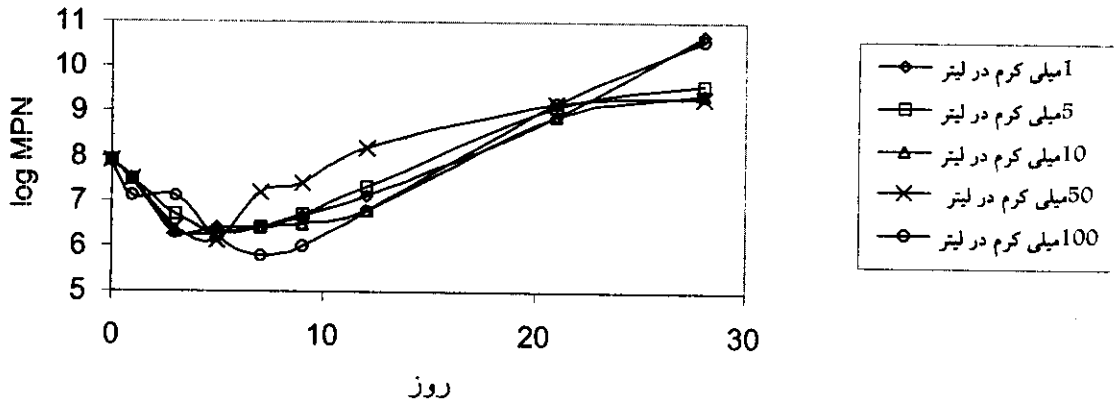


ث) غلظت اولیه آنتراسن ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

نمودار ٤ تغییرات غلظت آنتراسن در مدت ۲۸ روز با استفاده از مخلوط میکروبی N برای غلظت های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۵ تغییرات جمعیت میکروبی مخلوط N در محیط‌هایی با غلظت‌های اولیه ۱،۵،۱۰،۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر از آنتراسن

و پس از روز هفتم روند افزایش جمعیت مشاهده می‌شود. سرعت تجزیه نیز بعد از روز نهم بیشتر شد. ثابت سرعت تجزیه در این محیط در روز در حدود ۰/۰۳۸٤ بود. این کاهش ثابت سرعت می‌تواند به دلیل خاصیت مهارکنندگی غلظت بالای آنتراسن در رشد باکتریها باشد (ضمن آنکه در محیط ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز نسبت به ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ثابت سرعت کاهش یافت).

در محیط ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتردر طی ۲٤ ساعت پس از تلقیح، جمعیت باکتریها به $\frac{1}{6.5}$ برابر مقدار اولیه رسید؛ در حالی که در ٤ محیط دیگر $\frac{1}{2/6}$ برابر شد. از آنجا که جمعیت میکروبی مخلوط N مخلوطی از باکتریهای مختلف است، در جدا سازی مخلوط N چهار نوع باکتری به رنگهای سبز، کرم، لیمویی و زرد پررنگ مشاهده شد.) تغییرات جمعیت، مربوط به تغییرات جمعیت تک‌تک این باکتریها و حاصل آنها است. احتمال اینکه آنتراسن در غلظتهای بالا برای یک یا دو نوع از باکتریهای فوق سمی باشد وجود دارد که در غلظتهای کمتر چنین اثری مشاهده نشد.

٦- نتیجه‌گیری نهایی

۱- در خاکهای اطراف پالایشگاه میکروارگانیسم‌هایی وجود دارد که توانایی تجزیه آنتراسن را دارند.

۲- با وجود آنکه مخلوط میکروبی A به رشد در محیط آنتراسن عادت کرده بود، مخلوط N توانایی بیشتری در تجزیه آنتراسن داشت. در نتیجه، فعالیت متابولیکی این دسته از باکتری‌ها بیشتر از سایر باکتریها است.

۳- ثابت سرعت تجزیه آنتراسن در محیطهای ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتردر محدودهٔ ۰/۰۵۱٤ تا ۰/۰٦۸٦۰ در روز است.

٤- ثابت سرعت تجزیه در محیط حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، دو برابر مقدار آن در محیطهای ۱۰-۱ میلی‌گرم بر لیتربود که می‌تواند ناشی از در اختیار داشتن مقدار کافی از مواد غذایی باشد.

۵- غلظت بالای آنتراسن برای یک یا چند نوع باکتری از مخلوط N اثر مهار کنندگی دارد و به تأخیر رشد در نتیجه کاهش سرعت تجزیه منجر می‌شود، طوری که ثابت سرعت تجزیه درغلظت اولیه ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۰/۰۹۱۹ و در ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتراز آنتراسن به ۰/۰۳۸٤ در روز رسید.

www.SID.ir

Archive of SID

۷- سپاسگزاری

کلیه آزمایشهای مربوط به سنجش با دستگاه HPLC در آزمایشگاه هیدروکربنهای نفتی سازمان حفاظت محیط زیست صورت گرفت. به این وسیله از همکاری آن سازمان سپاسگزاری می‌شود.

۸- منابع

[1] Aelion, C. M.; Long, S.C.; "Heterogenity in Contaminant Concentration and Microbial Activity in Subsurface Sediment"; In: *Hydrocarbon Bioremediation;* Lewis publisher; Printed in USA; 1994; pp. 192-200.

[2] Deeb, R. A.; Alvarez-Cohen, L.; "Aerobic Biotransformation of Gasoline Aromnatics in Multicomponent Mixtures";*Bioremediation J.* ;Vol.4; No.2 ; 2000;pp. 171-179.

[3] Yerushalmi, L.; Guiot, S. R.; "Biodegradation of Benzene in a Laboratory – Scale Biobarrier at Low Dissolved Oxygen Concentrations"; *Bioremediation J.*; Vol. 5; No.1; 2001; pp. 63-77.

[4] Dobler, R.; Saner, M.; Bachofen. R.; "Population Changes of Soil Microbial Communities Induced by Hydrocarbon and Heavy Metal Contamination"; *Bioremediation J.*; Vol. 4; No.1; 2000; pp.41-56.

[5] Loehr, R. C.; Webster, M. T.; "Decreased Release of PAHs from Soil as a Result of Field Bioremediation"; *Practice periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive waste management*; Vol.4; No.3; July 2000; pp. 118-125.

[6] Cornellissen, G.; Rigterink, H.; Ferdinandy, M.M.A.; Vannoort, P.C.M.; "Rapidly Desorbing Fraction of PAHs in Contaminated Sediments as a Predctor of the Extent of Bioremediation"; *Environ. Sci.* Technol.; Vol.32; No.7; 1998; pp. 966-970.

[7] Vecchioli, G. I.; Costanza, O. R.; Giorgieri, S. A.; Remmler M.; "Extent of cleaning Achievable by Biorennediation of Soil Contaminated with Petrochemical Sludges"; *J. Chem. Tech. and Biotech.*; Vol.70; No.4; 1997; pp. 331-336.

[8] Macrae, J. D.; Hall, K. J.; "Comparision of Methods used to Determine the Availability of PAH in Maine Sediment"; *Environ. Sci. Technol.;* Vol.32; No.23; 1998; pp.3809-3815.

[9] Whyte, L. G.; Boubonniere, L.; Cellerose, C.; Greer, C. W.; "Bioremediation Assesment of Hydrocarbon Contaminated Soils from the High Arctic"; *Bioremediation J.;* Vol.3; No.1; 1999; pp. 69-79.

[10] Cookson, J.T.; *Bioremediation Engineering Design and Application;* Mc Graw Hill; 1995; pp.20-21

[11] Ewies, J. B.; Ergas, S. J.; Chang, D. P.V.; Schroder, E. D.; *Bioremediation Principles;* Mc Graw Hill; 1998; pp. 1-21.

[12] Juhasz, A. L.; Stanley, G. A.; Britz, M. L.; "Degradation of High Molecular Weight PAHs in Contaminated Soil by a Bacterial Consortium: Effects on Microtox and Mutagenicity Bioassays"; *Bioremediation J.;* Vol.4; No.4; 2000; pp.271-283.

[13] Romero, M. C.; Cazau, M. C.; Giorgieri, S.; Arambarri, A.M.; "Phenanthrene Degradation by Microorganisms Isolated from a Contaminated Stream"; *Environmental Pollution;* Vol.101; 1998;pp. 355-359.

[14] Kozliak, E. I.; Ostlie–Dunn, T. L.; Jachobson, M. L.; Mattson, S. R.; Domak, R. T.; "Efficient steady – state Volatile Organic Compound Removal from Air by Live Bacteria Immobilized on Fiber Supports"; *Bioremediation J.;* Vol.4;No.1;2000;pp. 81-96.

[15] Badkoubi, A.; Steven S. D. K.; Murarka, I. P.; "Qantification of Pentachlorophenol Transformation Product Distribution in the Presence of P*hanerochaete Chrysosporium*"; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.;*Vol.30; 1996;pp. 1-8.

[16] APHA, AWWA, WEF, *Standard methods for Examination of water and wastewaters*; 18th ed.; USA; 1992.

[17] Taylor, J.; "The Estimation of Numbers of Bacteria by Tenfold Dilution Series"; *J. Appl. Bact.;*Vol.25;No.1; 1962;pp. 54-61.

www.SID.ir