Archive of SID

تصفیه بیولوژیکی پساب حاوی مواد قندی با استفاده از میکروارگانیسمها

ویدا مقصودی[1]* و زهرا قبادی نژاد[2]

۱- مربی، دانشگاه صنعتی شریف، مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمیو محیط زیست

۲- دانش آموخته کارشناسی، دانشگاه صنعتی شریف، مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمیو محیط زیست

چکیده

کربن از منابع غذایی رشد میکروارگانیسمها بوده و وجود آن با سایر مواد آلاینده در پساب برخی از کارخانه‌های مواد غذایی و راهیابی آن به منابع آب زیرزمینی سبب مشکلات زیست محیطی متعدد می‌شود. یکی از آلوده کننده‌های محیط زیست پساب کارخانه نوشابه سازی بوده و در بعضی مواقع ژله شدن آن که در اثر مقدار زیاد بار آلی افزوده شده به پساب مورد تصفیه می‌باشد. در این تحقیق میکروارگانیسمهایی از سطوح مختلف کارخانه، همچنین از لجن فعال آن جدا شد. از میان این میکروارگانیسمها مخمرها به علت فعالیت در محیطی با غلظت زیاد قند و pH قلیایی انتخاب شدند. از میان ۱۲ مخمر، مخمر شماره ۱۱ ((*Pichia Satoi*) بیشترین کاهش TOC را نسبت به سایر مخمرها از خود نشان داد (۸۷/۵ درصد کاهش). شرایط بهینه از نظر pH، دما و دور همزن برای این مخمر به ترتیب ۹، ۳۰°C و ۲۰۰rpm بود.

کلید واژگان: پساب نوشابه‌سازی، کربن آلی کل، مخمر، آلودگی پساب، لجن فعال، کاهش TOC

۱- مقدمه

یکی از آلاینده‌های مهم محیط زیست، پساب کارخانه‌های نوشابه‌سازی می‌باشد. آلاینده‌های این پساب شامل: مواد آلی قابل تجزیه میکروبی، ترکیبات آلی فرار، فلزات سمی، میکروارگانیسمهای بیماری‌زا، مواد قلیایی و شوینده می‌باشند [۱]. فرآیندهای بیولوژیکی پاکسازی این پسابها، سیستم لجن فعال می‌باشد که در توده این لجن بسیاری از میکروارگانیسمها از قبیل باکتری، قارچ، مخمر، ویروس و پرتوزوا یافت می‌شود [۲]. باکتریها بخصوص از نوع گرم منفی از اجزای مهم تشکیل دهنده لجن فعال می باشد. بعضی از انواع قارچها تحت شرایط خاصی قادر به ادامه زندگی در این سیستم هستند [۳].

از آنجائی که مخمرها می توانند غلظت زیاد مواد قندی را به خوبی تحمل کنند شرایط مناسب‌تر برای رشد و تکثیر در لجن فعال دارند [٤]. بررسی اولیه در استفاده از میکروبها، برای کنترل آلودگی محیط زیست، بیشتر روی میکروبهای غیر هوازی متمرکز بوده و بعدها، میکروبهایی که قادر به تجزیه حشره‌کشها، پسابهای شیمیایی و صنعتی باشند، از محیط جدا گردیده و به طور تجاری به کار برده می‌شوند. انواع مختلف میکروبهای مصرف کننده مواد آلی از محیط اطراف مثل پساب، لجن، خاک و غیره به وسیله محیطهای کشت مغذی جدا می‌شوند [۵]. رشد این میکروبها در محیطهای مغذی حاوی کربن، نیتروژن، فسفر و سایر مواد معدنی، شکل می‌گیرد و بعضی از مواقع برای بهبود نسل آنها از اشعه نیز استفاده می‌شود [٦]. یکی از مشکلات سیستم پاکسازی بیولوژیکی با استفاده از لجن فعال، حجیم شدن و ژله‌ای شدن پساب مورد نظر می‌باشد. حجیم شدن در اثر اضافه شدن بار آلی به پساب می‌باشد [۷] و عمل تصفیه می‌بایستی در مدت زمان

* مسؤول مکاتبات مقاله: maghsodi@sharif.sina.edu

www.SID.ir

Archive of SID

کوتاه با توده میکروبی موجود در لجن فعال صورت پذیرد [۷]. سیستم، در صورت نداشتن کارایی لازم این توده، در مدت زمان تعیین شده دچار مشکل می‌شود. بنابراین می‌توان با استفاده از روش بیواوگمنتاسیون[1] مشکل را حل کرد[۸]. در این روش می توان با جداسازی میکروبها از سطوح مختلف رشد و به‌کارگیری آنها در محیطهای مناسب و با روشهای آزمایشی از بار آلودگی سیستم مورد نظر کاست. در واقع بیواوگمنتاسیون به خدمت درآوردن میکروب موجود در سیستم برای کاهش آلودگی همان سیستم می‌باشد. در این تحقیق میکروارگانیسمهایی از سطوح مختلف کارخانه از جمله لجن فعال جدا شد. از میان این میکروبها، مخمرها به علت فعالیت در محلول غلیظ قندی و pH قلیایی امکان رشد بیشتری را نسبت به سایر میکروارگانیسمها دارا می‌باشند. کربن آلی کل یا TOC [2] ز طریق اکسیداسیون کربن آلی با حرارت و اکسیژن و با اکسیدانهای شیمیایی به CO_2 تبدیل شده و گاز دی اکسید کربن آزاد شده از طریق آشکارساز مادون قرمز قابل اندازه‌گیری می‌باشد [۹].

۲- مواد و روشها

۲-۱- مشخصات پساب

پساب از یک کارخانه نوشابه‌سازی تهیه شد. دستگاه TOC (Skalar-TOCAnalyzer-CA 10) برای اندازه‌گیری کل کربن آلی و اسپکتروفتومتر مدل SPECTRONIC20D+ و شیکر انکوباتور موجود در مرکز بیوشیمی‌مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- میکروارگانیسمها

برای رشد میکروارگانیسمهای جدا شده از محیط کارخانه بخصوص از لجن فعال، از محیط کشت مناسب، به منظور تکثیر مخمرها، از PDA [3] استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده با رقت 10^{-1} تا 10^{-6} در سرم یویولوژی را تحت شرایط استریل بر روی پلیتهای حاوی محیط کشت اضافه کرده و آنها در حرارت ۳۰ °C به مدت ٤٨ تا ٧٢ ساعت قرار گرفتند. بعد از این مدت با بررسی پلیتها مخمرهای مختلفی در کانیهای جدا از هم، کاملاً رشد کرده‌اند.

۲-۳- مرحله خالص سازی [4]

در این مرحله از محیط PDA استفادهٔ مناسبی برای رشد مخمرها می‌باشد [۱۰]. در پلیتهایی که مخمرها رشد کرده‌اند اگر مخمری به صورت خالص و کلنی تک وجود داشته باشد تحت شرایط استریل با وسیله‌ای به نام لوپ قسمتی از آن را برداشته و به محیط اسلنت PDA منتقل و کاملاً پخش می‌کنیم. چنانچه کلنی‌ای مشاهده کردیم که به صورت ناخالص وجود دارد در این صورت قسمتی از آن را که بیشتر به یک مخمر وابسته است با لوپ برداشته در سطح پلیتی که حاوی محیط PDA می‌باشد به‌صورت خطی کشت داده آنها را در انکوباتور ۳۰ °C قرار می‌دهیم. بعد از ٢٤ تا ٤٨ ساعت از کلنیهای تکی که روی محیط پلیت رشد کرده‌اند با لوپ به سطح اسلنتهای PDA منتقل می‌کنیم، به این ترتیب از هر مخمری به صورت خالص، یک اسلنت تهیه کرده که در مراحل بعدی از آنها در تهیه منحنی رشد و کاهش غلظت TOC استفاده می‌شود.

۲-٤- آزمایش‌های حذف کربن آلی به وسیلهٔ مخمرها

آزمونهای مختلفی برای بررسی مصرف کربن موجود در پساب به وسیله مخمرها وجود دارد که عبارتند از: اندازه‌گیری BOD ، COD و TOC که در این طرح به کمک دستگاه کاملاً پیشرفته TOC میزان TOC نمونه‌های پساب، قبل و بعد از تصفیه بیولوژیکی مخمر اندازه‌گیری شد [۹]. در این روش ابتدا از هر یک از مخمرهای مورد نظر به اندازه یک لوپ در یک لوله آزمایش حاوی ۵ ml سابور و دکستروز براث استریل اضافه کرده

1. Bioaugmentation
2. Total organic carbon
3. Potato dextrose agar
4. Screening test

www.SID.ir

Archive of SID

و آن را خیلی خوب مخلوط کرده و در انکوباتور ۳۰°C، ۲٤ ساعت قرار می‌دهیم. این عمل برای تهیه کشت اولیه از مخمر انجام می‌شود. بعد از ۲٤ ساعت لوله مورد نظر را سانتریفوژ کرده به مخمر ته‌نشین نشده مقدار کمی‌آب مقطر استریل اضافه می‌کنیم و بعد از بهم زدن جذب نوری آن (OD) به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٤۰ nm خوانده می‌شود. جذب باید عدد ۱ را نشان دهد در غیر این صورت با اضافه کردن آب OD نمونه را به ۱ می‌رسانیم. زیرا در OD=۱ تعدادها مشخص و حساب شده می‌باشد و برای اینکه بتوانیم مخمر تمام مخمرها را با هم مقایسه کنیم در یک حجم مشخص تعداد مساوی از آنها را به پساب مورد نظر تلقیح می‌کنیم. بعد نمونه که حاوی تعداد مشخصی مخمر است به یک محیط پیش کشت [1] منتقل می‌کنیم محیط پیش کشت مناسب سابور و دکستروز براث است. از سوسپانسیونهای آماده شده با OD = ۱ به میزان ٤ml به ۵۰ml محیط پیش کشت اضافه کرده و در شیکر انکوباتور ۳۰°C با دور ۱۳۰ rpm به مدت ۲٤ ساعت قرار می‌دهیم. بعد از این زمان محلول داخل ارلن را سانتریفوژ کرده، محلول رویی را دور ریخته و مجدداً به مخمر ته‌نشین شده آب اضافه و مانند قبل میزان جذب به یک رسانده شود. این سوسپانسیون آماده است تا به پساب مورد نظر تلقیح شود. قبل از تلقیح pH پساب را از ۱۱ به ٦ رسانده می‌شود. سپس در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حدود ml ۵۰ از این پساب را منتقل کرده و از سوسپانسیون مخمر آماده شده ٤ ml تحت شرایط استریل به پساب اضافه کرده به مدت ٤۸ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ °C و دور ۱۳۰ rpm داده می‌شود. بعد از این زمان محلول داخل ارلنها را سانتریفوژ کرده و TOC آنها اندازه گرفته می‌شود.

۳- نتایج

جدول شماره ۱ کاهش غلظت TOC بوسیله ۱۲ مخمر جدا شده از لجن فعال و سطوح دیگر کارخانه در pH = ٦ و دمای ۳۰°C را نشان می‌دهد. مخمر شماره ۱۱ در بین این ۱۲ مخمر، بیشترین کاهش را از خود نشان داده است.

جدول ۱ کاهش غلظت TOC به وسیلهٔ مخمر ۱۲ جدا شده

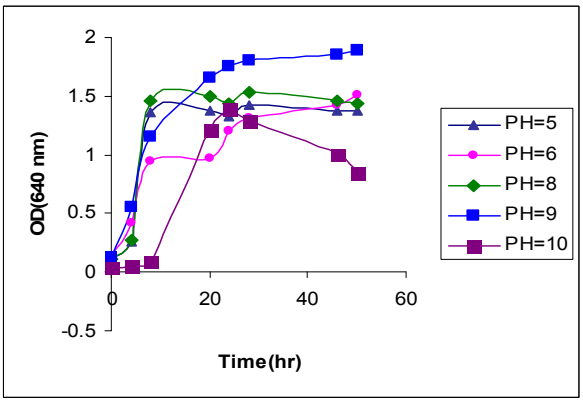
شمارهٔ مخمر	غلظت اولیه ٦۸، ۱٦٦۹ mg/l	درصد کاهش
Y-1	۸٦۰/۵۹	٪٤۸
Y-2	۷٦۸/٦٤	٪۵۳
Y-3	۱۰۹۱/۹٤	٪۳٤/٦
Y-4	۹٤۱/٦۷	٪٤۳
Y-5	۱۰۸۹/۸٦	٪۳۰
Y-6	۱۰۳٦/۷۵	٪۳۷
Y-7	۱۰۹۳/۰۸	٪۳٤
Y-8	۱۰۷۱/۷٤	٪۳۵
Y-9	۱۰٤۱/۱٤	٪۳۷
Y-10	۷٤۵/۳۷	٪۵۵
Y-11	٦۳۹/۹۵	٪٦۱/٦
Y-12	۱۲۵۰/۲۳	٪۷۵

مطالعه میکروسکوپی این مخمر انجام و عکسهایی از آن تهیه شد که در شکل ۵ نشان داده شده است. شناسایی این مخمر به وسیله یکی از دانشجویان کارشناسی ارشد دانشگاه الزهرا انجام گرفت [۱۱]. بعد از انجام آزمایشهای توکسونومیکال، نوع Y-11 به نام Pichia Saitoi مشخص گردید [۱۲]. شرایط بهینه برای این مخمر با اندازه‌گیری TOC در pH های مختلف، درجه حرارتهای مختلف و دور همزن صورت گرفت. شکل ۱، رشد سلولی مخمر، شکل ۲، pH بهینه، شکل ۳ دمای بهینه برای رشد مخمر و شکل ٤ دور همزن یا میزان هوادهی مخمر را نشان می‌دهد.

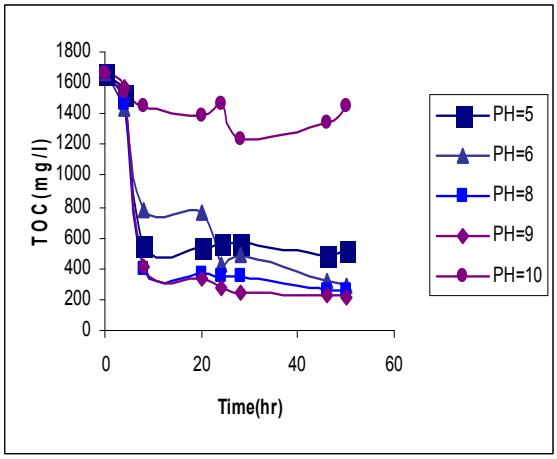
1. Preculture

www.SID.ir

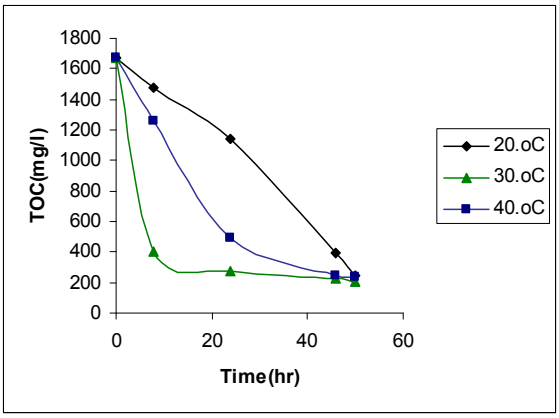
Archive of SID



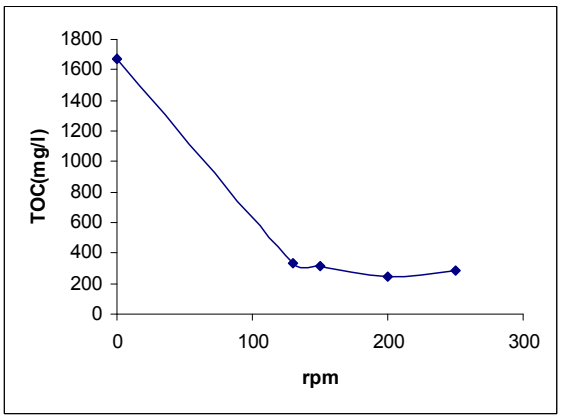
شکل ۱ رشد سلولی مخمر Y-11 در pH های مختلف



شکل ۲ کاهش TOC به وسیله مخمر Y-11 در pH های مختلف



شکل ۳ کاهش TOC به وسیله مخمر Y-11 در دماهای مختلف



شکل ٤ اثر دور همزن در کاهش TOC به وسیله مخمر Y-11

٤- بحث

از اطلاعات و داده‌های به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که مخمر شماره ۱۱ غلظت کربن آلی را تا حد ۸۷/۵ درصد کاهش داده است که این کاهش در دمای ۳۰ °C و pH = ۹ با دور همزن ۲۰۰ rpm در بیشترین حد بوده است. البته در این پیش تصفیه زمان بسیار اهمیت دارد و مخمری بهتر عمل می‌کند که بتواند مشکل ژله‌ای شدن پساب را در کوتاه‌ترین مدت ممکن حل کند. با توجه به شکل ۱ مشاهده می‌شود که بعد از مدت زمان ۸ تا ۱۰ ساعت رشد سلولی این مخمر بسیار خوب بوده که نشان دهندهٔ فعالیت خوب در مخمر ساعات اولیه است و بعد از حدود ٤٨ ساعت حداکثر رشد مخمر مشاهده می‌شود. اگر مخمر جدا شده تحت شرایط بهینه رشد و فعالیت به عنوان یک پیش تصفیه کننده[1] به پساب مورد نظر قبل از تصفیه بیولوژیکی افزوده شود کاهش قابل ملاحظه‌ای در غلظت بار آلی تا حد بیش از ۸۷/۵ درصد خواهیم داشت.

٥- تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر صعودی عضو هیأت علمی‌دانشگاه الزهرا و خانم معصومی‌دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه الزهرا که کمال همکاری را در اجرای این پروژه داشته‌اند و همچنین از معاونت

1. Starter

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی دانشگاه صنعتی شریف سپاسگزاری و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Bitton,G. 1999.“Wastewater Microbiology”, Ed., John Wiley sons, Inc, Publication. pp: Florida, Gainesville, FL, March 22-23, New York.

[8] Chdoba, J. 1989. “Activated sludge Bulking control”. In: Encyclopedia control Technology. Waste water treatment Technology. P.N. Cheremisin off, Ed. Gulf, Houston, Tx., 3: 171-202.

[9] Tchobonoglous, G., Burton, FL. 1300 pp. 1991. Inc. “Wastewater Engineering: Treatment, Dispostal and Reuse”, 3rd Ed. Mcgraw-Hill, New York.

[10] Atlas, RM. and Parksm LC. 1079 pp. 1996. Handbook of Microbiological: Media, Second ed. CRC press.

[۱۱] معصومی، ل، «کاهش قند به روش بیولوژیکی و با استفاده از مخمر»، رساله کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، بهمن ۷۹.

[12] Brnett, J.A. 1990. “Yeast: Characteristics and Identification. 2nd Ed”. Cambridge University Press. P: 531.

171-173.

[2] Berk, SG. and Gunderson, JH. 1993 Wastewater organisms, A Color Atlas. Lewis, Boca Raton, FL. pp: 25.

[3] Tomlinson, TG. and Williams, IL. Fungi, 1975. In: Ecological Aspects of used water Treatment, Vol 1. Curds, C.R. and Hawkes, H.A., Eds. Academic press, London. pp: 93-152.

[4] Barnett, JA. 1990. Yeasts: Characteristics and Identification, second ed., Cambridge. pp: 5-7.

[5] Walter, MV. 1997. Bioaugmentation. In: Manual of Environmental Microbiology. Hurst, CJ., McInerney, MJ. Washington, D.C. pp: 763-757.

[6] Johnson, LM, Mc Do well, CS and Koupta, M. 1985. Microbiology in Polluttion control, From bugs to biotechnology, Dev. Ind. Microbiol. 26: 365-376.

[7] Sykes, JC. 1989, “The use of biological selector technology to minimize sludge bulking. pp: cl-c25”. In: Biolgical Nitrogen and Phosphorous Removal: The florida Experience, TREEO center, University of

www.SID.ir

Archive of SID

Biological Treatment of the Waste Water Containing Carbohydrates Using Microorganisms

Maghsoodi V. [1*], Ghobadi Nejad Z. [2]

*1- Biochemical and Bioenvironmental Research Center, Sharif University of Technology (BBRC), Tehran, Iran

2- B.Sc. Graduate. Biochemical and Bioenvironmental Research Center, Sharif University of Technology (BBRC), Tehran, Iran

The beverage industry has been a heavy producer of organic pollution. The major contaminants found in its waste water are biodegradable organic compounds, volatile organic compounds, toxic metals, recalcitrant xenobiotics, suspended solids, nutrients (Nitrogen and Phosphor) microbial pathogens and parasites. Activated sludge flocs contain a wide range of microorganisms such and bacteria, fungi, yeast, viruse, and protozoa. In this study, we isolated some strains of yeasts from the factory's sludge. More than 50 strains of yeasts were selected. Among them 12 strains had a high removal of TOC. Yeast No. 11 (*Pichia atoi*) has shown an overall efficiency of 87. 5% in terms of TOC removal.

Key words: Beverage Wastewater, Activated Sludge, Total Organic Carbon (TOC), Microorganisms, Yeasts, Biogumetation

*. Corresponding author E-mail address: maghsodi@sharif.edu

www.SID.ir