

بررسی تجزیه زیستی آنزیمی در بیوراکتور SBR تحریک شده با پراکسید هیدروژن

حسین مومنی نژاد^{*}، پریسا برات پور

گروه بهداشت محیط، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: آترازین یکی از پر استفاده ترین علفکش های اس تریازین است و اس تریازین شامل آترازین، آمترین و پرومترین می باشد. آترازین از پایدارترین علفکش های آلوده کننده منابع آبی است. این ماده در کنترل علف های هرز پهن برگ مزارع، ذرت استفاده می شود. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تجزیه زیستی آنزیمی در بیوراکتور SBR تحریک شده با پراکسید هیدروژن بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجزیه زیستی آنزیمی که در سال ۱۳۹۶ انجام شد، کار تجزیه زیستی آنزیمی القا شده سم آترازین در یک راکتور ناپیوسته متوالی (SBR) انجام شد. فاضلاب سنتتیک با حل کردن ۱ گرم پودر آترازین در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد. مراحل مختلف آزمایش شامل خودی و غنی سازی باکتری های تجزیه کننده آترازین و تعیین غلظت اولیه آترازین (۱۰۰-۲۵ میلی گرم بر لیتر)، تعیین اثر غلظت هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، تعیین اثر زمان واکنش و فعالیت های میکروبی بود. میزان pH در مراحل آزمایش به صورت ثابت در عدد ۷ نگه داشته شد. غلظت باقیمانده آترازین با استفاده از دستگاه HPLC اندازه گیری شد.

یافته ها: خودی این مطالعه در مدت زمان ۷۲ روز انجام شد. تعداد روزهای مورد نیاز به منظور حذف کامل آترازین کاهش پیدا کرد و از ۳۲ روز در مرحله اول خودی به ۱ روز رسید. نسبت بهینه H_2O_2/ATZ برابر با ۱۱ اندازه گیری شد که غلظت آترازین به میزان ۲۵ میلی گرم بر لیتر با غلظت هیدروژن پراکسید به میزان ۷/۵ میلی مولار در زمان واکنش (HRT) ۲۴ ساعت به طور کامل حذف شد. در غلظت های آترازین ۲۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب در زمان های ۱۵ و ۵۴ ساعت حذف کامل به دست آمد. با افزایش غلظت آترازین از ۲۵ میلی گرم بر لیتر به ۵۰ میلی گرم بر لیتر فعالیت آنزیم دهیدروژناز از ۸/۸ به ۹/۷ تری فنیل فورمازان بر گرم بیومس در روز افزایش یافت.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، تجزیه آترازین با استفاده از آنزیم پراکسیداز در حضور پراکسید هیدروژن یک روش زیستی آنزیمی بسیار کارآمد و جدید برای تجزیه و حذف کامل این آلاینده از آب آلوده و فاضلاب می باشد.

واژه های کلیدی: آترازین، آنزیم پراکسیداز، تجزیه زیستی، راکتور ناپیوسته متوالی

^{*} نویسنده مسئول: حسین مومنی نژاد، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بهداشت محیط

Email: h.momeninejad@modares.ac.ir

اکسیداسیون پیشرفته (AOP) مثل UV/H_2O_2 ، H_2O_2/F^{2+} و فرآیندهای فوتوکاتالیستی است (۱۰). تعداد دیگری از روش‌های حذف آترازین استفاده از ممبران فیلتر، جذب زیستی (۲) فرآیندهای CO (II)/PMS استفاده از اشعه گاما (۱۱) و استفاده از زغال زیستی و کربن فعال برای حذف و جذب آترازین به کار می‌رود (۱۲). به دلیل مزایای منحصر به فرد فرآیندهای زیستی، از جمله دوست‌دار محیط زیست بودن، تجزیه آلاینده‌ها به کمک باکتری‌ها و در نتیجه عدم تولید فرآورده‌های جانبی، سمی و خطرناک و همچنین عدم مصرف مواد شیمیایی، طراحی و ساخت و راهبری آسان و ارزان این نوع فرآیندها و قابلیت انعطاف‌پذیری بالا استفاده از این فرآیند در حذف آلاینده‌های آلی در اولویت قرار دارد (۱۳).

تعدادی از فرآیندهای بیولوژیکی برای تصفیه آترازین شامل فیلتر هوازی بیولوژیکی مستغرق^(۱) (۱۴) و راکتور بی‌هوازی با جریان رو به بالا پوشش هیبریدی^(۲) (۱۵) و بیوراکتور غشایی^(۳) (۱۶) و راکتور بیوفیلم با جریان بستر^(۴) (۱۷) هستند. بر اساس مطالب ذکر شده، تجزیه بیولوژیکی آترازین با راکتورهای مختلفی تحت شرایط هوازی (۱۴) و بی‌هوازی (۱۵) و انوکسیک (۱۶) انجام گرفته است. برای تجزیه آترازین به عنوان یک آفتکش روش هوازی یک شیوه خارج سلولی است که به وسیله آنزیم‌های اکسیداتیو، به

آفت‌کش‌ها یک راه حل مؤثر برای کاهش حشرات، بیماری‌ها و علف‌های ناخواسته هستند که بر محصولات مواد غذایی تأثیر می‌گذارند (۱). آفت‌کش‌ها به چند دسته تقسیم‌بندی می‌شوند از جمله؛ باکتریایی، قارچ‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها که این‌ها شامل؛ کلروتالونیل‌ها، متامیدوموس، پیرمترین، کلروفیوس و آترازین می‌شود (۲). یکی از علف‌کش‌هایی که در محیط زیست به کار می‌رود اس‌تریازین است که شامل؛ آترازین، سیازین، آسترین و پیرومترین است (۴ و ۳). آترازین یک علف‌کش است که در کشاورزی استفاده گسترده‌ای دارد (۵). آترازین برای کنترل علف‌های هرز پهن برگ در مناطقی که کشت ذرت، برنج و نیشکر دارند کاربرد بیشتری دارد (۶). در گزارش‌های اخیر غلظت آترازین در آب‌های سطحی ۴۲ میکروگرم بر لیتر و در رودخانه‌هایی که در مناطق کشاورزی هستند دارای غلظت ۱۰۲ میکروگرم بر لیتر است (۷). اتحادیه اروپا استاندارد آترازین در آب‌های آشامیدنی را ۰/۱ میکروگرم بر لیتر و USEPA استاندارد آن را ۳ میکروگرم بر لیتر اعلام کرده است (۸). گزارش شده است در طولانی مدت انتشار آترازین در سیستم غدد درون ریز و تناسلی انسان و حیوان‌ها اثر می‌گذارد. به عبارتی این سم یک ماده شیمیایی سرطان‌زا است (۹).

تلاش برای استفاده از روش‌های معمول تصفیه مثل به کار بردن ازن ناکارآمد است. در سال‌های اخیر بیشتر نگرش‌ها به فرآیندهای

1- Submerged biological aerated filter (SBAF)
2-Hybrid Upflow Anaerobic Sludge Blanket (HUASB)
3-Membrane Bio-Reactor (MBR)
4-Fluidized - Bed Biofilm Reactor (FBBR)

لذا هدف از این مطالعه بررسی تجزیه زیستی آنزیمی سم آترازین موجود در آب آلوده در بیو راکتور ناپیوسته متوالی و اهداف کلی تعیین غلظت بهینه پراکسید هیدروژن، تعیین اثر غلظت بر تجزیه آترازین، تعیین اثر زمان بر تجزیه آترازین و تعیین فعالیت میکروارگانیسمها و پراکسیداز بوده است.

روش بررسی

در این مطالعه تجزیه زیستی آنزیمی که در سال ۱۳۹۶ انجام شد، کار تجزیه زیستی آنزیمی القا شده سم آترازین در یک راکتور ناپیوسته متوالی (SBR) انجام شد. فاضلابی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت سنتتیک بوده و با استفاده از قرص پودر آترازین با خلوص ۹۹ درصد ساخت شرکت pubchem به روش رقیق سازی با آب شهری، تهیه شد. به این منظور برای ساخت محلول مورد نظر دمای آب باید در حد دمای اتاق ۲۵ تا ۲۶ درجه سانتیگراد حفظ شود و آترازین به آن اضافه شود. از آنجا که نوع متابولیسم موجود در راکتور تنفسی می باشد، لذا به منظور تأمین نسبت کربن به نیتروژن به فسفر متناظر با ۱۰۰/۵/۱، از مخلوط نوترینت تهیه شده حاوی کلرید آمونیوم (منبع نیتروژن)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات و پتاسیم دی هیدروژن فسفات (به عنوان منبع فسفر و تأمین کننده ظرفیت بافری سیستم) استفاده شد. همچنین تنها منبع کربن و انرژی، آترازین بوده است.

ویژه اکسیژناز و یا پراکسیداز تسریع می یابد. پراکسیداز به عنوان یک آنزیم خارج سلولی شناخته می شود که سلول های قارچ، باکتری ها، گیاهان و حیوانات تولید می کنند که در حضور پراکسید هیدروژن فعال می شود. آنزیم پراکسیداز توانایی شکستن باندهای کربن - کربن را دارد و باعث تصفیه زیستی پیشرفته می شود. تحریک میکروارگانیسمها برای تولید آنزیم های پراکسیداتیو می تواند روش مناسبی برای تجزیه زیستی پیشرفته ترکیب های آفتکش باشد. میکروارگانیسمها برای خنثی کردن و محافظت در برابر اثر پراکسید هیدروژن آنزیم های مختلفی تولید می کنند که یکی از آنها پراکسیداز است. بنابراین با افزودن پراکسید هیدروژن به محیط کنسرسیوم باکتریایی در بیوراکتور، باعث تحریک بیومس برای تولید پراکسیداز و شتاب بخشیدن به فرآیندهای زیستی می شود (۱۲).

در واقع می توان نتیجه گرفت که روش تولید در محل آنزیم های اکسیداتیو باعث تقویت و تسریع سرعت تجزیه تصفیه زیستی می شود که یک روش مؤثر برای تصفیه ترکیبات مقاوم به تجزیه مانند ترکیبات علفکش و آفت کش می باشد. یکی از مهم ترین مزایای راکتور SBR به عنوان یکی از انواع سیستم های لجن فعال با جریان پیوسته، انعطاف پذیری بالای سیستم می باشد. همچنین مقاومت آن در برابر شوک بار آلی بالاست. سایر مزایای آن شامل؛ هزینه احداث پایین، بازدهی بالا، عدم نیاز به تانک ته نشینی و راهبری آسان می توان نام برد (۱۸).

استفاده شد. در زمان راه اندازی، فاضلاب سنتتیک از بالای راکتور تزریق شد. شماتیک راکتور SBR در شکل ۱ نشان داده شده است.

پس از راه اندازی اولیه و رفع نواقص و اطمینان از آب بند بودن مجموعه سیستم آزمایشی، انجام مرحله اصلی و جمع آوری داده‌ها آغاز شد. در این مرحله ۵۰۰ میلی‌لیتر از مایع مخلوط خودهی شده مرحله قبل برداشته و به راکتور SBR اضافه شد و همچنین با استفاده از ۲۰۰ میلی‌لیتر آترازین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و آب و نوترینت، حجم راکتور به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و اثر پارامترهای مختلف که در اهداف در میحث مقدمه آورده شده است، بررسی شد.

برای گرفتن نمونه‌ها، ورودی و خروجی نمونه‌ها به صورت روزانه گرفته شدند. نمونه‌ها از طریق فیلتر با منافذ ۰/۲۲ میکرومتر قبل از آنالیز عبور داده شدند. غلظت آترازین در ورودی و خروجی راکتور با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه با ستون فاز معکوس (۵ × ۶/۶ × ۴ × ۲۵۰ میلی‌متر، ستون C18)، دتکتور (UV-vis detector) در طول موج ۲۲۰ نانومتر تعیین شد. فاز متحرک مخلوطی از آب و استونیتریل و متانول با نسبت حجمی ۶۰/۲۵/۱۵ و نسبت جریان تزریقی ۱/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. عملکرد راکتور SBR در حذف آترازین بر حسب راندمان تجزیه (رابطه ۱) و راندمان معدنی سازی (رابطه ۲) تعیین شد.

1-Total suspended solids (TSS)

راکتور مورد استفاده جهت خودهی و غنی‌سازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آترازین یک ارلن‌مایر با حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر که حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر از لجن خودهی شده با ترکیب‌های نفتی با مواد جامد کل^(۱) ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول حاوی آلاینده آترازین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۳۰۰ میلی‌لیتر ترکیب آب شهری و نوترینت بود. انجام این مرحله ۷۲ روز به طول انجامید. پراکسید هیدروژن به صورت روزانه با استفاده از سپر در مرحله واکنش و بعد از ته نشینی تزریق می‌شد. همچنین در زمان‌های مختلف برای اندازه‌گیری آترازین باقیمانده نمونه‌برداری انجام می‌شد. پس از کاهش غلظت آترازین به کمتر از ۲ میلی‌گرم بر لیتر، سیستم خاموش و پس از یک ساعت ته‌نشینی تمامی روآب راکتور تخلیه شد. سپس ۸۰۰ میلی‌لیتر از مخلوط ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آترازین، آب شهری و نوترینت به راکتور اضافه شد و نمونه‌برداری تکرار شد. پس از کاهش غلظت به زیر ۲ میلی‌گرم بر لیتر، مشخص شد که میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه آترازین خوگرفته‌اند.

به منظور ادامه کار و بررسی اهداف یک راکتور استوانه‌ای از جنس شیشه دارای قطر ۹/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۲/۵ سانتی‌متر است و حجم کاری آن ۱ لیتر و به صورت ناپیوسته و در شرایط آنزیمی راهبری شد. دو شیر خروجی در بدنه راکتور جهت تخلیه پساب و نمونه‌گیری تعبیه گردید. به منظور اختلاط در راکتور از یک مگنت و استایرر

انتقال داده شد و با تنظیم طول موج آن به ۴۷۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت پراکسیداز به شکل U/gbiomass تعریف شد که بیانگر مقدار پراکسیداز تولید شده مورد نیاز برای اکسیداسیون ۱ میلی‌لیتر سوبسترا در هر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در pH ۷ است (۲۰).

همچنین فعالیت دهیدروژناز که با استفاده از آن می‌توان فعالیت‌های باکتریایی را اندازه گرفت مورد سنجش قرار داده شد. برای سنجش DHA، نمک ۲ و ۳ و ۵ تری‌فنیل تترازولیوم کلراید (TTC)^(۱) به عنوان پذیرنده دهیدروژن استفاده شد. هنگامی که TTC اتم‌های دهیدروژن را می‌پذیرفت از حالت بی رنگی به ترفنیل فورمازان قرمز (TF) تغییر می‌کرد (۲۱). از بیوراکتور نمونه‌های بیومس گرفته شده به لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر بافر تریس (pH=۷/۶)، ۲ میلی‌لیتر گلوکز (۱ مولار) و ۲ میلی‌لیتر TTC (۰/۵ درصد) و سپس قرار داده شد در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت افزوده شد. بعد از بیرون آوردن از انکوباتور به میزان ۲ میلی‌لیتر از سدیم دیتیونات، سپس ۵ میلی‌لیتر تولوئن افزوده گردید و در سانتی‌فریوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. در نهایت روآب آن برداشته شد و در طول موج ۴۹۲ نانومتر در اسپکتروفوتومتر قرار داده شد. DHA بر حسب منحنی کالیبراسیون TF محاسبه شده و با $TF/g_{biomass}$ تری-

رابطه ۱: راندمان تجزیه آتزازین (۱۹)

$$E (\%) = \frac{(ATR_{in} - ATR_{out})}{ATR_{in}} \times 100$$

غلظت استامینوفن در ورودی = ATR_{in}

غلظت استامینوفن در خروجی = ATR_{out}

رابطه ۲: راندمان معدنی سازی آتزازین (۱۹)

$$E (\%) = \frac{(TOC_{in} - TOC_{out})}{TOC_{in}} \times 100$$

TOC_{in} = غلظت ورودی

TOC_{out} = غلظت خروجی

برای محاسبه ضرایب کینتیکی مانند ثابت نیمه اشباع (K_s) و حداکثر سرعت ویژه مصرف (ATZ (V_{max}) در این فرآیند از معادله میکائلیس - منتن خطی^(۱) استفاده شده که در معادله ۴-۱ نشان داده شده است.

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_s}{V_{max}}\right) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

که در این رابطه؛ $V = 7$ گرم ATZ به ازای هر گرم بیومس در روز، $V_{max} = U$ (نرخ مصرف ویژه (ATZ)، $S =$ غلظت ATZ بر حسب گرم بر لیتر

فعالیت‌های آنزیمی پراکسیداز و دهیدروژناز بیومس در هر ران آزمایش راکتور SBR مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش تاندجو و همکاران اندازه‌گیری شد. برای استخراج آنزیم از بیومس، ۱۰ میلی‌لیتر مایع مخلوط در سانتی‌فریوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۴۰ میکرولیتر سوپرناتانت، ۳۵۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷)، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول و ۱۶۰ میکرولیتر از پراکسید دهیدروژن به اسپکتروفوتومتر

1-Linearized Michaelis-Menten model

2- 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride(TTC)

خودهی به ۱ روز رسید. آترازین ترکیبی پیچیده بوده و در ترکیب خود دارای کلر است، از ترکیبها مقاوم به تجزیه به شمار می‌آید که به آسانی به وسیله باکتری‌ها قابل مصرف و تجزیه نیست. بنابراین برای تجزیه زیستی این ترکیبها مقاوم لازم است تا باکتری‌ها با آلایند مورد نظر خودهی شوند تا توان آنزیمی لازم را پیدا کنند. در مرحله خودهی، باکتری‌ها به صورت کومتابولیک و یا متابولیسم وابسته به رشد در تماس با این آلایندها قرار گرفته تا بتوانند آنزیم‌های لازم برای تجزیه این ترکیبها را به دست آورند. برخی از محققین معتقدند توانایی تولید آنزیم و میزان تولید این آنزیم‌های القایی به وسیله میکروارگانیسم با افزایش غلظت ترکیب‌های مقاوم بیشتر می‌شود (۱۹).

در این مرحله تأثیر غلظت پراکسید هیدروژن بر کاهش غلظت آترازین از فاضلاب ساختگی مورد مطالعه قرار گرفت. بعد از تزریق پراکسید هیدروژن با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار و گذشت ۲۴ ساعت از فرآیند، راندمان حذف آترازین به ۷۲ درصد رسید. بعد از مرحله ته‌نشینی و تخلیه و تزریق مجدد ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آترازین، غلظت ۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن تزریق شد و راندمان حذف ۱۰۰ درصد به دست آمد. با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن به ۷/۵ میلی‌مولار راندمان حذف تغییری نکرده و حذف کامل انجام شد. طبق نتایج به دست آمده با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن ۷/۵ به ۱۰ میلی‌مولار راندمان حذف آترازین

فنیل فورمازان بر گرم بیومس در روز بیان شد (۲۱).

برای شناسایی گونه‌های باکتری غالب در بیوراکتور در حالت پایدار، نمونه‌هایی از بیومس در غلظت بهینه پراکسید هیدروژن گرفته شد و در محیط کشت مایع نمک (MSM) کشت داده شدند. ترکیب MSM برات شامل: مونوپتاسیم فسفات (۰/۵)، دی پتاسیم فسفات (۱/۵)، منیزیم سولفات (۰/۵)، آمونیم کلراید (۰/۸) و کلرید سدیم (۰/۵) بود. pH در 7.2 ± 0.2 و دمای آن در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تنظیم شد و سپس به MSM برات با نسبت ۰/۱ درصد اضافه شد. ۱۵ گرم بر لیتر آگار به محیط کشت برای استحکام اضافه شد.

یافته‌ها

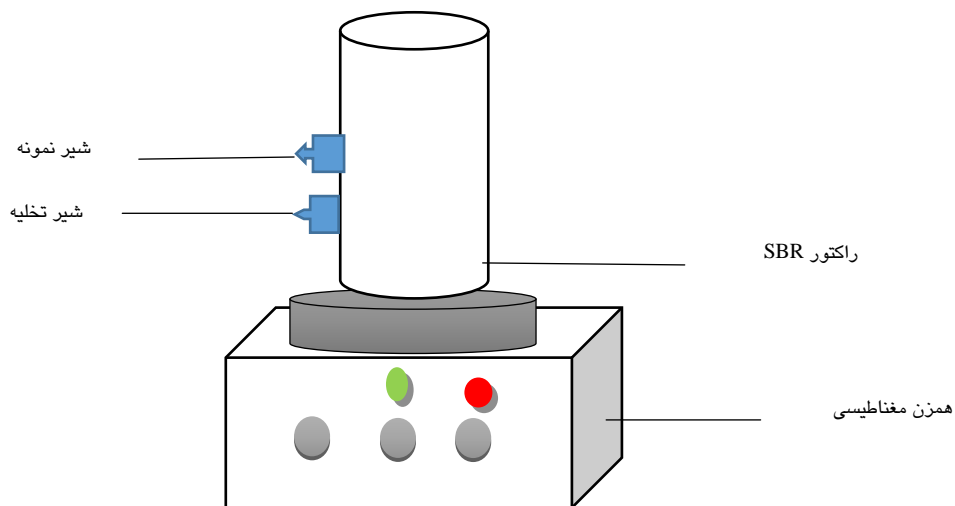
نمودار ۱ نتایج خودهی بیومس در سامانه خودهی با H_2O_2 برای تجزیه آترازین را نشان می‌دهد. شرایط انجام واکنش برای حداکثر حذف آترازین، غلظت‌های ورودی ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آترازین زمان واکنش ۲۴ ساعت و غلظت ثابت هیدروژن پراکسید، ۲/۵ میلی‌مولار بود. دوره خودهی ۷۲ روز به طول انجامید. دوره خودهی در ۶ مرحله طبق نمودار ۱ انجام شد. این مراحل به ترتیب طی ۳۲، ۱۸، ۱۱، ۷، ۳ و ۱ روز انجام شد. با گذشت زمان، تعداد روزهای مورد نیاز به منظور حذف کامل آترازین کاهش پیدا کرد و از ۳۲ روز در مرحله اول

این است که بین داده‌های آزمایشگاهی و مدل میکائیلیس منتن همبستگی زیادی وجود دارد. از معادله خط این نمودار نیز برای محاسبه ضرایب کینتیکی استفاده شده است. طبق نمودار ۳ مقادیر U و K_s به ترتیب $13/77$ گرم آترازین به ازای هر گرم جرم سلولی در ساعت و $76/58$ میلی‌گرم آترازین بر لیتر محاسبه شد. مقدار بالاتر از K_s نسبت به غلظت‌های ورودی آترازین در این مطالعه بیانگر این است که میزان حذف آترازین در شرایط راهبری انتخابی به طور مستقیم با غلظت آن متناسب است. بنابراین، به طور واضح مشخص است که بیوراکتور تحریک شده با هیدروژن پراکسید می‌تواند به شکل کارآمدی در برابر شوک بارگذاری‌های بالای آترازین مقاومت کند و به شرایط پایدار راندمان حذف آترازین برسد.

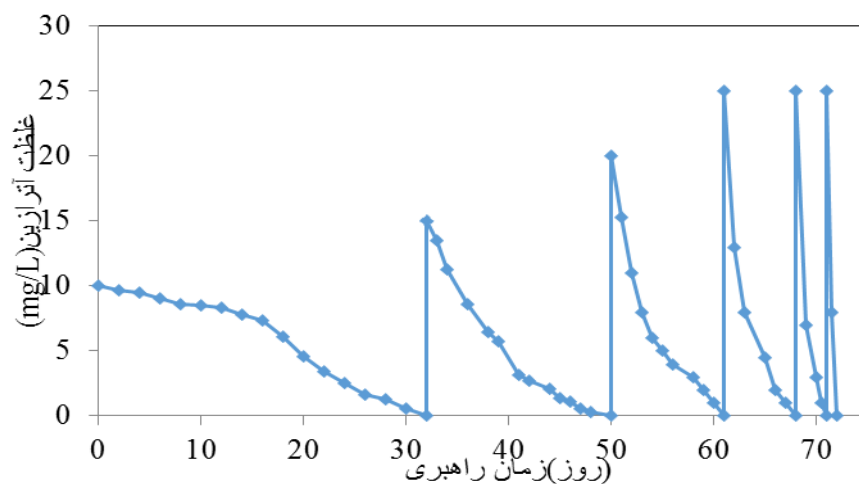
در نمودار ۴ همان‌طور که مشاهده می‌شود، در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آترازین، فعالیت آنزیم دهیدروژناز $8/8$ تری‌فنیل فورمازان بر گرم بیومس در روز بود و با افزایش غلظت آترازین به ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت و به $9/7$ میکروگرم تری‌فنیل فورمازان بر گرم بیومس در روز رسید. همچنین در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آترازین، فعالیت آنزیم پراکسیداز $1/2$ $U/g_{biomass}$ بوده که با افزایش غلظت آترازین به ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم تغییری نداشته و همان $1/2$ $U/g_{biomass}$ است.

از ۱۰۰ درصد به ۸۵/۵ درصد کاهش یافت. همچنین در غلظت ۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن میزان حذف آترازین به $46/3$ درصد کاهش پیدا کرده است. در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱۵ ساعت طول کشید تا غلظت ورودی آترازین به صفر رسید. با افزایش غلظت ورودی آترازین به ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، زمان لازم به منظور حذف ۱۰۰ درصد آترازین به ۴۰، ۳۴ و ۵۴ ساعت افزایش یافت. با افزایش غلظت ورودی آترازین به ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، زمان لازم به منظور حذف ۱۰۰ درصد آترازین به ۴۰، ۳۴ و ۵۴ ساعت افزایش یافت. که بیانگر این است که با افزایش غلظت ورودی، مدت زمان مورد نیاز به منظور حذف کامل آترازین افزایش می‌یابد و باکتری‌ها برای تجزیه کامل آن به زمان بیشتری نیاز دارند (۲۲). نتایج حاصل از نمودار ۲ نشان می‌دهند که حذف کامل ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر از آترازین ورودی در زمان ۱۵ ساعت انجام شد. غلظت‌های ورودی ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آترازین طی این زمان به مقادیر $16/05$ ، 23 ، 43 میلی‌گرم بر لیتر کاهش پیدا کردند و غلظت بهینه هیدروژن پراکسید به آترازین برابر با ۱۱ مورد بررسی قرار گرفت.

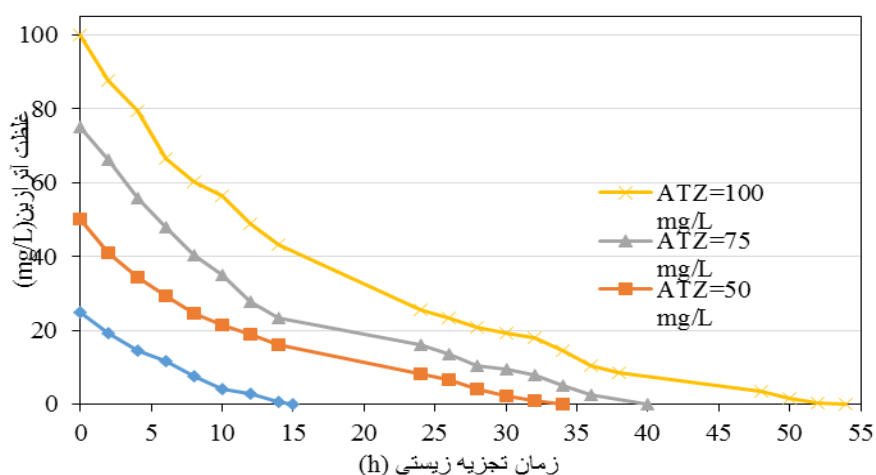
مقادیر V_{max} و K_s نیز به ترتیب عرض از مبدا و شیب خط نمودار $1/V$ در برابر $1/S$ می‌باشد. همان‌طور که در نمودار ۳ نشان داده شده است، نتایج معادله خطی $1/V$ در برابر $1/S$ با R^2 برابر با $0/9607$ بیانگر



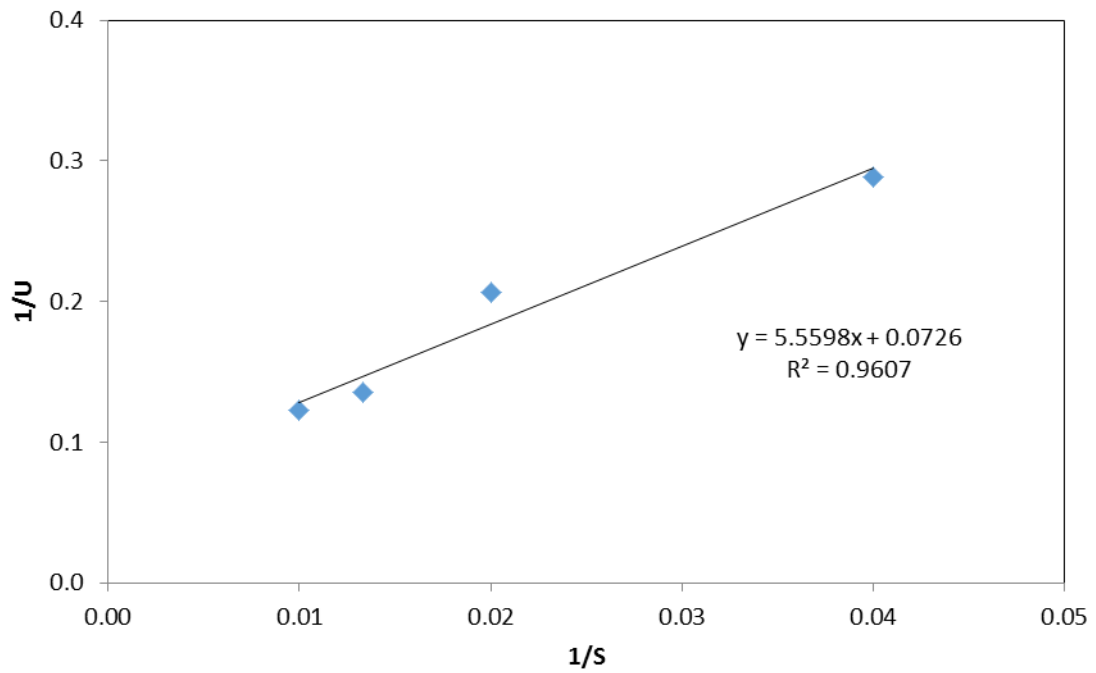
شکل ۱: شماتیک راکتور SBR



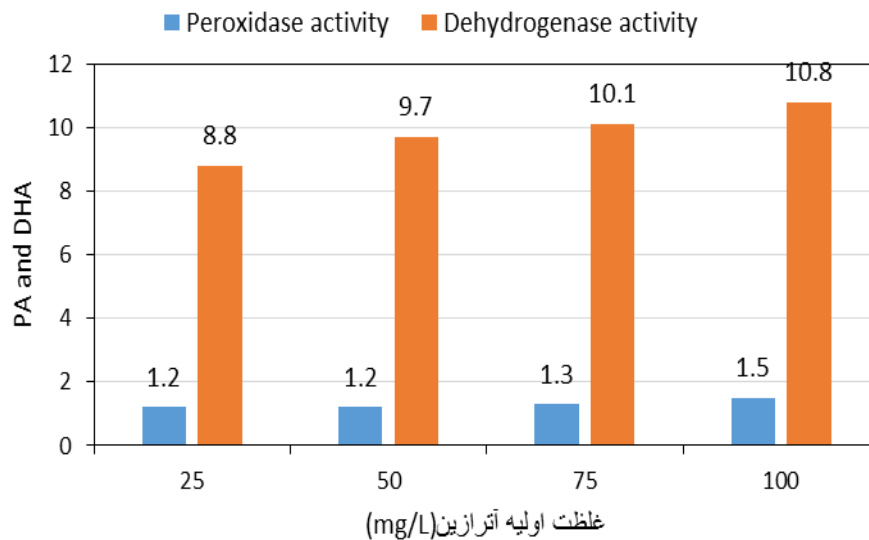
نمودار ۱: راه اندازی راکتور SBR القاشده با هیدروژن پراکسید برای تجزیه بیولوژیک ATZ (غلظت‌های ۲۵-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت هیدروژن پراکسید ۲/۵ میلی‌مولار، زمان کل خودهی ۷۲ روز)



نمودار ۲: اثر زمان واکنش بر تجزیه بیولوژیکی غلظت‌های مختلف آنزیم در راکتور SBR تحریک شده با هیدروژن پراکسید (غلظت ۱۰۰-۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آنزیم، زمان واکنش بسته به شرایط آزمایش (ساعت) و نسبت هیدروژن پراکسید به آنزیم برابر ۱۱)



نمودار ۳: معادله خط رابطه میکائیلیس - منتن برای محاسبه ضرایب کینتیکی در راکتور SBR تحریک شده با هیدروژن پراکسید



نمودار ۴: تعیین تغییرات آنزیم دهیدروژناز و پراکسیداز (غلظت آنراژین ۱۰۰-۲۵ میلی‌گرم بر لیتر، زمان واکنش ۲۴-۷۲ ساعت)

بحث

آترازین ترکیبی پیچیده بوده و در ترکیب خود دارای کلر است، از ترکیبات مقاوم به تجزیه به شمار می آید که به آسانی توسط باکتری‌ها قابل مصرف و تجزیه نیست. بنابراین برای تجزیه زیستی این ترکیبات مقاوم لازم است تا باکتری‌ها با آلاینده مورد نظر خودی شوند تا توان آنزیمی لازم را پیدا کنند. در مرحله خودی، باکتری‌ها به صورت کومتابولیک و یا متابولیسیم وابسته به رشد در تماس با این آلاینده‌ها قرار گرفته تا بتوانند آنزیم‌های لازم برای تجزیه این ترکیبات را به دست آورند. برخی از محققین معتقدند توانایی تولید آنزیم و میزان تولید این آنزیم‌های القایی توسط میکروارگانیسم با افزایش غلظت ترکیبات مقاوم بیشتر می‌شود (۱۹)، لذا هدف از این مطالعه حذف آترازین با استفاده از آنزیم پراکسیداز فعال شده با هیدروژن پراکسید بود.

کاهش زمان مورد نیاز برای حذف ۹۵ درصد از آترازین در بیوراکتور ناپیوسه متوالی به وضوح نشان می‌دهد که میکروارگانیسم‌ها در راکتور خودی شده و تحت شرایط القایی آنزیم پراکسیداز به طور کامل غنی‌سازی شده است (۲۳). بر اساس نتایج غلظت بهینه پراکسید هیدروژن، دیده می‌شود که تجزیه آترازین در راکتور ناپیوسه متوالی در حضور پراکسید هیدروژن تسریع شد و منجر به کاهش قابل توجهی در زمان مورد نیاز برای تصفیه شد. افزایش بیشتر غلظت پراکسید هیدروژن به بالاتر از ۷/۵ میلی‌مولار موجب کاهش حذف آترازین تا ۸۵ درصد

شد که این بدان معناست که کاهش تخریب آترازین در مقدار بالای پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد. بنابراین غلظت بهینه پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار بود که عملکرد این راکتور در تجزیه آترازین بالاترین مقدار بود (۲۳).

زیگولا و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی فاضلاب تصفیه شده حاوی آترازین با خاک اصلاح شده پرداختند. غلظت اولیه آترازین ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر بود که در خاک‌های آبیاری شده با فاضلاب تصفیه شده همراه با سودوموناس ۸۰ درصد این ماده در طی ۱۰ روز تجزیه می‌شود (۲۴).

در یک تحقیق که به وسیله رابین جونز و همکاران انجام شد با استفاده از یک پایلوت کربن فعال که دارای ستون ۱۶۰ میلی‌متر \times ۱ متر محتوی آب رودخانه دارای آترازین با غلظت ۰/۵، ۱۰ یا ۲۰ میکروگرم بر لیتر همراه با باکتری رودکوکوس رودوکوروس که بالاترین میزان تجزیه این ماده در روز ۴۴۳ به میزان $6/6 \pm 5/5$ درصد بوده است (۲۵).

کاهش راندمان حذف آترازین با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن به ۱۵ میلی‌مولار را می‌توان به اثر سمیت پراکسید هیدروژن بر متابولیسیم میکروارگانیسم‌ها نسبت داد و در نتیجه موجب غیر فعال شدن آنزیم پراکسیداز می‌گردد (۱۳). بنابراین

نشان‌دهنده مصرف شدن کربن‌های آترازین به وسیله میکروارگانسیم‌ها به عنوان سوبسترا و منبع کربن می‌باشد. تأیید این مطلب را می‌توان در راندمان بالای حذف آترازین در هنگام افزایش غلظت مشاهده کرد که دیده شد با افزایش غلظت آترازین، راندمان حذف آن نیز به صورت سریع به حذف کامل می‌رسید. به دلیل ثابت بودن نسبت بهینه H_2O_2/ATZ در طی تغییرات غلظت آترازین، فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز ثابت بوده و تغییرات چندانی در آن مشاهده نمی‌شود (۲۷).

نتیجه‌گیری

در این کار، مطالعه تجزیه زیستی القا شده با آنزیم پراکسیداز سم آترازین موجود در آب آلوده در بیوراکتور ناپیوسته متوالی بررسی شد. نتایج نشان داد که با تحریک سلول‌ها به تولید پراکسیداز با استفاده از پراکسید هیدروژن در این بیوراکتور، تجزیه زیستی آنزیمی سم آترازین به صورت کامل انجام می‌گیرد. زمانی که پراکسید تزریق نشد، به طور چشمگیری افزایش تجزیه سم آترازین مشاهده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، تجزیه آنزیم با استفاده از آنزیم پراسیداز در حضور پراکسید هیدروژن یک روش زیستی آنزیمی بسیار کارآمد و جدید برای تجزیه و حذف کامل این آلاینده از آب آلوده و فاضلاب می‌باشد. با افزایش غلظت آترازین از ۲۵ به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، فعالیت آنزیم دهیدروژناز به صورت کاملاً مشخص افزایش یافته و این نشان‌دهنده

غلظت بهینه پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار به دست آمد.

راندمان حذف آترازین با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن به ۱۵ میلی‌مولار را می‌توان به اثر سمیت پراکسید هیدروژن بر متابولیسم میکروارگانسیم‌ها نسبت داد و در نتیجه موجب غیر فعال شدن آنزیم پراکسیداز می‌گردد (۱۳). بنابراین غلظت بهینه پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار به دست آمد. اولین مرحله در تجزیه هوازی مواد آلی به وسیله آنزیم‌ها، حمله آنزیم‌های خارج سلولی به ویژه آنزیم‌های اکسیژناز مانند پراکسیداز به پیوندهای کربن - کربن یا کربن-اکسیژن موجود در ترکیب‌های آلی می‌باشد (۲۶). با اضافه کردن پراکسید هیدروژن به راکتور ناپیوسته متوالی، می‌تواند به طور مؤثر تولید آنزیم پراکسیداز به وسیله باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس که در فاضلاب قرار دارند را تحریک کند (۲۳).

با افزایش غلظت ورودی آترازین به ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، زمان لازم به منظور حذف ۱۰۰ درصد آترازین به ۳۴، ۴۰ و ۵۴ ساعت افزایش یافت. که بیانگر این است که با افزایش غلظت ورودی، مدت زمان مورد نیاز به منظور حذف کامل آترازین افزایش می‌یابد و باکتری‌ها برای تجزیه کامل آن به زمان بیشتری نیاز دارند (۲۲). با افزایش غلظت آترازین از ۲۵ به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، فعالیت آنزیم دهیدروژناز به صورت کاملاً مشخص افزایش یافته و این

مصرف شدن کربن‌های آترازین به وسیله میکروارگانیسم‌ها به عنوان سوبسترا و منبع کربن می‌باشد. تأیید این مطلب را می‌توان در راندمان بالای حذف آترازین در هنگام افزایش غلظت مشاهده کرد که دیده شد با افزایش غلظت آترازین، راندمان حذف آن نیز سریعاً به حذف کامل می‌رسید.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع دکترای با کد اخلاق IR.TMU.REC.1395.421 دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه اجرا شد.

REFERENCES

1. Komtchou S, Dirany A, Drogui P, Delegan N, El Khakani MA, Robert D, et al. Degradation of atrazine in aqueous solution with electrophotocatalytic process using TiO_2-x photoanode. *Chemosphere* 2016; 57: 79-88.
2. Mkhalid I. Photocatalytic remediation of atrazine under visible light radiation using Pd-Gd 2O_3 nanospheres. *Journal of Alloys and Compounds* 2016; 682: 766-72.
3. Seffernick JL, Aleem A, Osborne JP, Johnson G, Sadowsky MJ, Wackett LP. Hydroxyatrazine N-ethylaminohydrolase (AtzB): an amidohydrolase superfamily enzyme catalyzing deamination and dechlorination. *Journal of Bacteriology* 2007; 189(19): 6989-97.
4. Rügge K, Bjerg PL, Mosbæk H, Christensen TH. Fate of MCPP and atrazine in an anaerobic landfill leachate plume (Grindsted, Denmark). *Water Research* 1999; 33(10): 2455-8.
5. Ji Y, Dong C, Kong D, Lu J. New insights into atrazine degradation by cobalt catalyzed peroxymonosulfate oxidation: kinetics, reaction products and transformation mechanisms. *Journal of Hazardous Materials* 2015; 285: 491-5.
6. Stipičević S, Galzina N, Udiković-Kolić N, Jurina T, Mendaš G, Dvorščak M, et al. Distribution of terbuthylazine and atrazine residues in crop-cultivated soil: The effect of herbicide application rate on herbicide persistence. *Geoderma* 2015; 259: 30: 0-9.
7. Zhang JJ, Lu YC, Zhang SH, Lu FF, Yang H. Identification of transcriptome involved in atrazine detoxification and degradation in alfalfa (*Medicago sativa*) exposed to realistic environmental contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2016; 130: 103-112.
8. Khan JA, He X, Shah NS, Khan HM, Hapeshi E, Fatta-Kassinos D, et al. Kinetic and mechanism investigation on the photochemical degradation of atrazine with activated H_2O_2 , $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ and HSO_5^- . *Chemical Engineering Journal* 2014; 252(3): 403-93.
9. Xu L, Zang H, Zhang Q, Chen Y, Wei Y, Yan J, et al. Photocatalytic degradation of atrazine by $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}/\text{Ag}-\text{TiO}_2$: kinetics, mechanism and degradation pathways. *Chemical Engineering Journal* 2013; 232: 174-82.
10. Komtchou S, Dirany A, Drogui P, Delegan N, El Khakani MA, Robert D, et al. Degradation of atrazine in aqueous solution with electrophotocatalytic process using TiO_2-x photoanode. *Chemosphere* 2016; 157: 79-88.
11. Khan JA, Shah NS, Khan HM. Decomposition of atrazine by ionizing radiation: kinetics, degradation pathways and influence of radical scavengers. *Separation and Purification Technology* 2015; 156: 140-7.
12. Tan G, Sun W, Xu Y, Wang H, Xu N. Sorption of mercury (II) and atrazine by biochar, modified biochars and biochar based activated carbon in aqueous solution. *Bioresource Technology* 2016; 211: 727-35.
13. Shekoohiyan S, Moussavi G, Naddafi K. The peroxidase-mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in a H_2O_2 -induced SBR using in-situ production of peroxidase: biodegradation experiments and bacterial identification. *Journal of Hazardous Materials* 2016; 313: 170-8.
14. Baghapour MA, Nasserri S, Derakhshan Z. Atrazine removal from aqueous solutions using submerged biological aerated filter. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2013; 11(1): 6.
15. Mullai P, Yogeswari M, Sridevi K, Saritha N. Biotreatment of simulated atrazine wastewater using hybrid upflow anaerobic sludge blanket (HUASB) reactor. *Green Technology and Environmental Conservation (GTEC 2011)*. International Conference on: IEEEE; 2011; 248-53.
16. Buttiglieri G, Bouju H, Malpei F, Ficara E, Canziani R. Microcalorimetry: A tool to investigate aerobic, anoxic and anaerobic autotrophic and heterotrophic biodegradation. *Biochemical Engineering Journal* 2010; 52(1): 25-32.
17. Tafoya Garnica A, Macías Flores A, Ruiz Ordaz N, Juárez Ramírez C, Galíndez Mayer J. Kinetics of atrazine biodegradation by suspended and immobilized mixed microbial cells cultivated in continuous systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2009; 84(7): 982-91.

18. Chang HN, Moon RK, Park BG, Lim SJ, Choi DW, Lee WG, et al. Simulation of sequential batch reactor (SBR) operation for simultaneous removal of nitrogen and phosphorus. *Bioprocess Engineering* 2000; 513-21.
19. Moussavi G, Shekoohiyan S. Simultaneous nitrate reduction and acetaminophen oxidation using the continuous-flow chemical-less VUV process as an integrated advanced oxidation and reduction process. *Journal of Hazardous Materials* 2016; 329: 318-38.
20. Tandjaoui N, Tassist A, Abouseoud M, Couvert A, Amrane A. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Brassica rapa* peroxidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2015; 4(2): 208-13.
21. Jafari SJ, Moussavi G, Yaghmaeian K. High-rate biological denitrification in the cyclic rotating-bed biological reactor: Effect of COD/NO₃⁻, nitrate concentration and salinity and the phylogenetic analysis of denitrifiers. *Bioresource Technology* 2015; 197: 482-8.
22. Shekoohiyan S, Moussavi G, Naddafi K. The peroxidase-mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in a H₂O₂-induced SBR using in-situ production of peroxidase: Biodegradation experiments and bacterial identification. *Journal of Hazardous Materials* 2016; 170: 313-8.
23. Baratpour P, Moussavi G. The accelerated biodegradation and mineralization of acetaminophen in the H₂O₂-stimulated upflow fixed-bed bioreactor (UFBR). *Chemosphere* 2018; 210: 1115-23.
24. Masaphy S, Mandelbaum RT. Atrazine mineralization in slurries from soils irrigated with treated waste water. *Applied Soil Ecology* 1997; 6(3): 283-91.
25. Jones LR, Owen SA, Horrell P, Burns RG. Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. *Water Research* 1998; 32(8): 2542-9.
26. Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International* 2011; 2011.
27. Moussavi G, Shekoohiyan S, Naddafi K. The accelerated enzymatic biodegradation and COD removal of petroleum hydrocarbons in the SCR using active bacterial biomass capable of in-situ generating peroxidase and biosurfactants. *Chemical Engineering Journal* 2017; 308: 1081-9.

An Investigation on the Bioavailability of SBR Bioreactor Enzyme Inhibitor Induced with Hydrogen Peroxide

Momeninejad H*, Baratpour P

Department of Environmental Health, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Received: 29 Aug 2018 Accepted: 17 Apr 2019

Abstract

Background & aim: S-triazine, is one of the most widely used herbicides of estrazines, and S-triazine, contains of atrazine, amtryn and prom ether. S-triazine is one of the most stable herbicides that pollute water resources. This material is used for controlling broad-leaved weeds and corn. The purpose of this study was to determine the bioavailability of SBR bioreactor enzyme inhibitor, which was stimulated with hydrogen peroxide.

Methods: in this biodegradation enzyme study which took place in 2017, the toxin-induced enzymatic biodegradation of atrazine in a sequencing batch reactor (SBR) was performed. Synthetic sewage was prepared by dissolving 1 gram of atrazine powder in 1000 ml distilled water. Different stages of the experiment included enrichment of atrazine degrading bacteria and determination of initial concentration of atrazine (10025 mg / l), determination of the effect of hydrogen peroxide concentration (H₂O₂), determination of reaction time and microbial activity. The pH of the test was stationary at 7. The concentration of atrazine was measured by HPLC.

Results: The validity of this study was 72 days. The number of days required to completely eliminate atrazine was reduced and from 32 days in the first stage, it was reduced to 1 day. The optimal H₂O₂ / ATZ ratio was 11, with atrazine concentration of 25 mg / L with a concentration of 7.5 mmol per hour at the reaction time (HRT) of 24 hours completely eliminated. In atrazine concentrations, 25 and 100 mg / l were eliminated at 15 and 54 hours, respectively. With increasing atrazine concentration from 25 mg/l to 50 mg / l, the activity of the enzyme dehydrogenase increased from 8.8 to +9.7 TF/g_{biomass}.d. was increased.

Conclusion: Based on the results of this study, atrazine decomposition using peroxidase enzyme in the presence of hydrogen peroxide is an effective and novel biodegradable enzyme for the complete decomposition and removal of this pollutant from contaminated water and sewage.

Keywords: Atrazine, Peroxidase Enzyme, Biodegradation, Sequential Discontinuous Reactor

Corresponding author: Momeninejad H, Department of Environmental Health Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email: h.momeninejad@modares.ac.ir

Please cite this article as follows:

Momeninejad H, Baratpour P. An Investigation on the Bioavailability of SBR Bioreactor Enzyme Inhibitor Induced with Hydrogen Peroxide. *Armaghane-danesh* 2019; 24(1): 170-184