علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره سیزدهم، شماره چهار، زمستان ۹۰

بررسی تصفیه زیستی فنل به کمک باکتری های بومی جدا شده از پساب حاوی فنل

سمیه اسکندری[1*]

Eskandary.s@gmail.com

آرزو طهمورث پور[2]

مهران هودجی[3]

تاریخ دریافت:۸۷/۴/۱۸ تاریخ پذیرش:۸۷/۱۰/۱۹

چکیده

پساب کارخانه‌های تبدیل ذغال سنگ، در زمره مهم ترین پساب های آلاینده محیط زیست می باشد. برای تصفیه این گونه پساب ها، اغلب از سیستم‌های بیولوژیکی هوازی استفاده می شود. درصد حذف مواد آلاینده در این سیستم‌ها، بستگی به میزان فعالیت میکروارگانیسم‌های موجود دارد. برخی از مواد موجود در پساب ها برای فعالیت میکرو ارگانیسم ها حالت بازدارنده دارند، مثل تولوئن و فنل. فنل و ترکیبات آن در مقادیر بالا برای محیط زیست و انسان سمی محسوب می‌شود، حذف این ترکیب از پساب ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. راه های مختلفی برای تصفیه فنل و از بین بردن آن وجود دارد که از بین این روش ها بهترین روش تصفیه زیستی است. در طی این تحقیق از طریق جداسازی سویه‌های بومی که در پساب فنل دار کارخانه ذوب آهن وجود داشتند اقدام به شناسایی، حذف فنل و سازش پذیر کردن سویه‌ها به مقادیر بالای فنل گردید. نتایج نشان داد از بین سویه‌های جدا شده گونه ای از جنس سودوموناس مقدار فنل را از ۲۲۳۳ میلی گرم بر لیتر در طی مدت ۹۶ ساعت به صفر رساند و گونه ای دیگر این مقدار را در طی مدت ۱۲۰ ساعت به صفر رساند. با به کارگیری این سویه‌ها به تنهایی و یا حتی به صورت ترکیبی از چند سویه سازگار شده با مقدار بالای فنل می‌توان میزان فنل موجود در این پساب ها را در طی مدت زمان کوتاه تری به صفر رساند.

کلمات کلیدی: تصفیه زیستی، فنل، جداسازی، باکتری بومی، پساب.

۱- دانشجوی دکتری خاک شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان [*](مسئول مکاتبات)

۲- استادیار گروه علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان

۳- دانشیار گروه خاک شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

فنل یکی از هیدروکربن‌های آروماتیک سمی است که آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا آنرا در زمره آلاینده‌های خطرناک محیطی قرار داده است(۱).این ماده و مشتقات آن در پساب صنایع متعددی از جمله کارخانه‌های تولید رزین، رنگ، سموم دفع آفات، داروسازی، پالایشگاه‌های نفت، صنایع پتروشیمی، معادن ذغال سنگ و تعدادی صنایع دیگر وجود دارد و سبب آلودگی محیط زیست به خصوص منابع آب می شود(۲).

برای تصفیه فاضلاب‌های حاوی فنل روش های متعددی وجود دارد که از مهم ترین آن ها می‌توان به اکسیداسیون شیمیایی، جذب سطحی، تصفیه بیولوژیکی و ترکیبی از روش های یاد شده اشاره کرد(۳و۴).

در میان روش های یاد شده، سیستم‌های بیولوژیکی به دلیل مزایای خاصی که نسبت به سایر روش ها دارند، بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند. یکی از مزایای عمده این روش ها این است که سازگاری بیشتری با محیط زیست دارند، به عبارت دیگر از دیدگاه محیط زیست ایمن تر محسوب می شوند. مزیت دیگر این سیستم‌ها نسبت به روش های شیمیایی این است که معمولاً در آن ها ماده شیمیایی زیان آوری برای محیط زیست مصرف نمی شود، لذا دفع پساب و لجن حاصل از این فرآیندها نسبت به فرآیندهای شیمیایی ، اثرات سوء به دنبال ندارد(۵).

تصفیه زیستی فنل به وسیله باکتری ها طی تحقیقات زیادی بررسی شده و باکتری های متنوعی بر حسب مقدار فنل و خصوصیات فیزیولوژیکی باکتری، جداسازی و بررسی شدند. اکثرباکتری هایی که تا کنون مورد ارزیابی قرار گرفته اند، قادر به تجزیه فنل در غلظت های پایین بودند به این دلیل که فنل در غلظت های بالا با ایجاد لیز سلولی مانع رشد اکثر میکروارگانیسم ها می شود(۸-۶).

در طی تحقیقات و بررسی‌هایی که بر روی فنل انجام گرفته مشخص شده است، در صورتی که باکتری منبع کربن دیگری به غیر از فنل در دسترس نداشته باشد و در طی مدت زمان نسبتاً طولانی در برابر آن قرار گیرد می‌تواند خود را با شرایط سازش داده و از فنل به عنوان یک منبع کربن یا انرژی استفاده نموده و آن را به دی اکسید کربن و متان تبدیل کند(۹و۱۰).

با علم به این که در سیستم‌های تصفیه بیولوژیکی، میکروارگانیسم‌ها عامل تصفیه آلاینده‌های موردنظر هستند، لذا شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌ها گام مهمی در روند تکاملی سیستم‌های تصفیه فاضلاب به خصوص مواد سمی محسوب می شود.

به طور کلی در این تحقیق به جداسازی و بررسی باکتری های تجزیه کننده فنل از پساب صنعتی و مطالعه روند تجزیه فنل توسط مقاوم ترین باکتری ها در محیط کشت مصنوعی و پساب فنولیک پرداخته شده است.

مواد و روش ها

۱. نمونه برداری:دو نمونه پساب به ترتیب از ورودی استخر فنلی (استخری که اضافه پساب های حاوی فنل به آن ریخته می شود) (A) و خروجی آب کندانسور واحد قطران بخش کک سازی کارخانه ذوب آهن اصفهان (B) تهیه گردید. نمونه‌ها در بطری‌های شیشه ای اسید شویی شده و استریل جمع آوری گردیده و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

۲. تعیین خصوصیات پساب ها:

- تعیین pH پساب ها: pH نمونه‌های پساب پس از انتقال به آزمایشگاه به وسیله دستگاه pH متر مدل ۲۶۲ کالیبره شده با محلولهای بافر، اندازه گیری شد(۱۱).
- تعیین BOD[1] پساب ها: برای اندازه گیری BOD از روش تیتراسیون استفاده شده است(۱۱).

1-Biological Oxygen Demand

Archive of SID

www.SID.ir

- تعیین COD[1] پساب ها: برای اندازه گیری میزان COD از روش تقطیر برگشتی بسته استفاده شد(۱۱).
- تعیین میزان فنل: در اندازه گیری فنل از معرف گیبس استفاده شد که به هر نمونه ۱۵۰ میلی لیتری که در دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شده بود ۳۰ میلی لیتر $NaHCO_3$ یک مولار و ۲۰ میلی لیتر از معرف گیبس اضافه شده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد(۱۲).

۳. تعیین جمعیت باکتری های هتروتروف در پساب A: به این منظور اقدام به کشت رقت‌هایی از نمونه پساب A در محیط کشت نوترینت آگار شد و پس از یک دوره انکوباسیون گذاری کلنی‌های تک شمارش شد(۱۳).

۴. جداسازی باکتری های تجزیه کننده فنل: به منظور بررسی باکتری های دارای قدرت تجزیه فنل از محیط کشت حاوی ۵۳۵۰ میلی گرم Na_2HPO_4، ۲۶۷۰ میلی گرم NH_4Cl، ۰/۶ میلی گرم $CaCl_2.H_2O$، ۶ میلی گرم $MgSO_4$، ۲/۴میلی گرم $FeSO_4.H_2O$ و ۰/۰۹ میلی گرم $MnSO_4.H_2O$ در۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰۰ میلی گرم فنل استفاده شد که در لوله‌های در پیچ دار به میزان ۱۰ میلی لیتر توزیع گردید و به صورت سه تکرار، آزمایش انجام یافت. لوله‌ها بر روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. هر روز به مدت یک دقیقه به وسیله نیمه باز کردن درب لوله‌ها بر روی شیکر هوادهی انجام می‌گرفت و در پایان هر هفته در صورت مشاهده کدورت در محیط کشت تلقیح به محیط جدید صورت می‌گرفت(۱۳و۱۴).

۵. بررسی پراکندگی باکتری هایی که قدرت تجزیه فنل را دارند: به این منظور از لوله‌هایی که کدورت در آن ها مشاهده می‌شد رقت‌های مختلف تهیه و سپس بر روی محیط کشت‌های آگار دار حاوی فنل کشت داده می‌شدند. در نهایت پس از یک دوره انکوباسیون گذاری کلنی‌های تک شمارش گردید (۱۴).

۶. انتخاب سویه‌های پر قدرت از میان سویه‌های جدا شده: پس از جدا سازی سویه‌های باکتریایی، به منظور غربال بهترین و قوی ترین سویه‌ها، آن ها را در محیط کشت مایع فنل دار در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل کشت داده و باکتری هایی که در حداقل زمان ممکن شروع به رشد نمودند و همچنین از حداکثر کدورت در مجاورت فنل برخوردار بودند، به عنوان سویه‌های میکروبی مناسب انتخاب گردیدند.

۷. منحنی رشد و حذف سویه‌ها در ۲۰۰۰ ، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل: باکتری های مقاوم که توانایی رشد بر روی ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر فنل را داشتند انتخاب شده و به محیط‌های کشت مایع حاوی ۲۰۰۰ ، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل انتقال داده شدند و سپس منحنی رشد و حذف فنل آن ها به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر در دوره‌های زمانی ۲۴ ساعته رسم شد(۱۵).

۸. مقایسه رشد و حذف فنل سویه‌های بسیار مقاوم در محیط کشت مصنوعی و پساب B: جهت بررسی رفتار سویه‌ها در محیط کشت مصنوعی و پساب حاوی فنل از نمونه پساب B تهیه شده از واحد کک سازی استفاده شد که در این بررسی از دو سویه ای استفاده شد که در ۴۰۰۰ میلی گرم برلیتر فنل توانسته بودند به خوبی رشد کنند و منحنی رشد و تجزیه فنل آن ها رسم شد.

1-Chemical Oxygen Demand

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

در طی ایـن بررسـی برخـی پـارامترهـای فیزیکـی و شیمیایی هر دو پساب تهیه شده اندازه گیری شد و بـه صـورت جدول زیر ارایه گردید.

جدول ۱- خصوصیات اندازه‌گیری شده در پساب مورد مطالعه

خواص پساب / پساب	اسیدیته	BOD (mg/lit)	COD (mg/lit)	میزان فنل (mg/lit)
پساب A	۷/۵۶	۳۲۸/۳	۱۲۷۹ /۳	۱۲۰۷
پساب B	۸/۹۱	N.D.	۹۸۷۰	۲۲۳۳

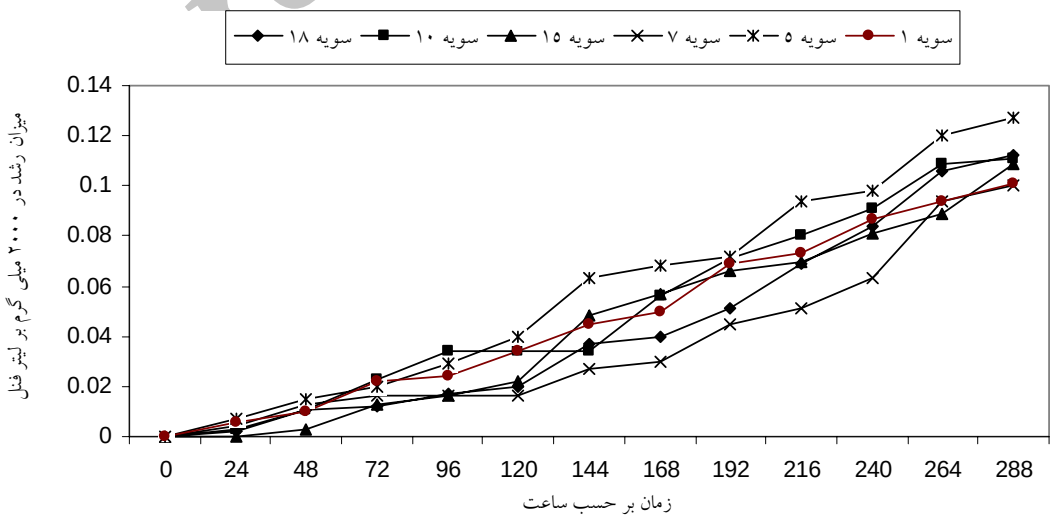
N.D: Not detectable

تعداد کل باکتری های هتروتروف موجود در پسابA، باکتری های تجزیه کننده فنل و پراکندگی آن ها در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول ۲- تعداد کل باکتری های هتروتروف، باکتری های تجزیه کننده فنل و پراکندگی باکتری های تجزیه کننده در پساب A

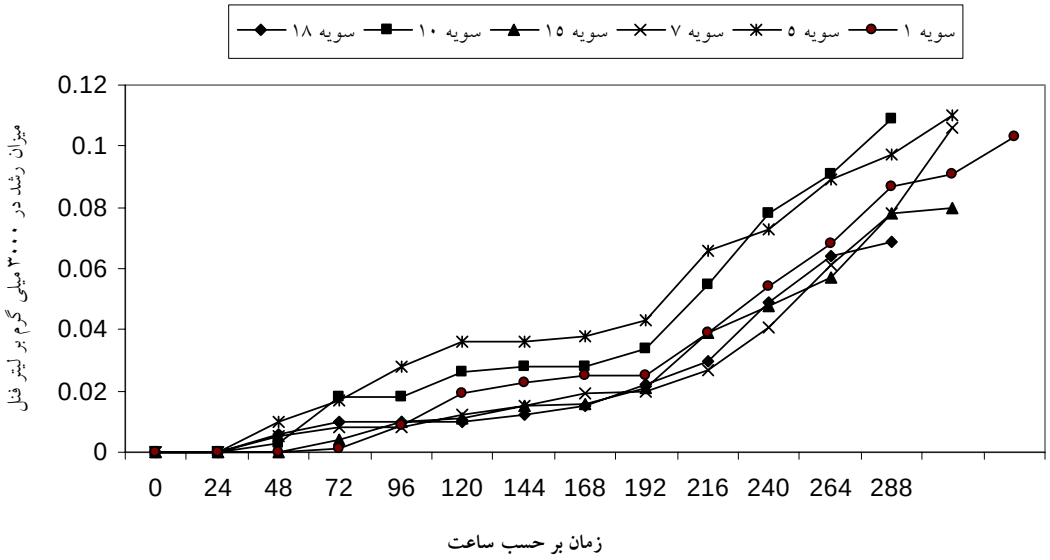
	کل باکتری های هتروتروف	باکتری های تجزیه کننده فنل	درصد باکتری های تجزیه کننده فنل
تعداد	$۳/۰۹۶*۱۰^{۶}$	$۱/۴۶۶*۱۰^{۶}$	٪۴۷/۴۷

منحنی رشد و حذف مقـاوم تـرین سـویه در ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتـر فنـل در نمودارهـای ۱ تـا ۶ نشان داده شده است.

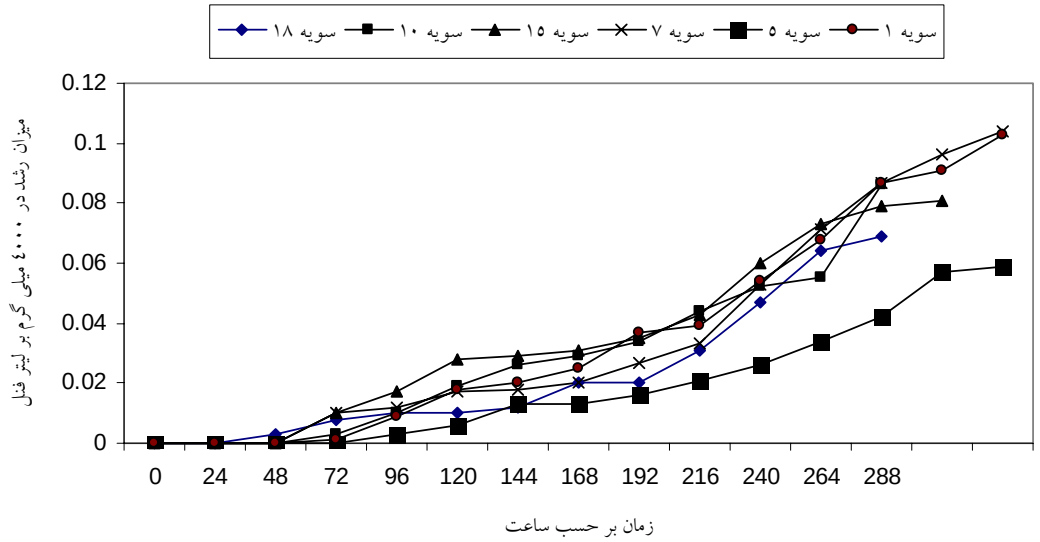


نمودار ۱- منحنی رشد سویه‌های مقاوم در ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

www.SID.ir

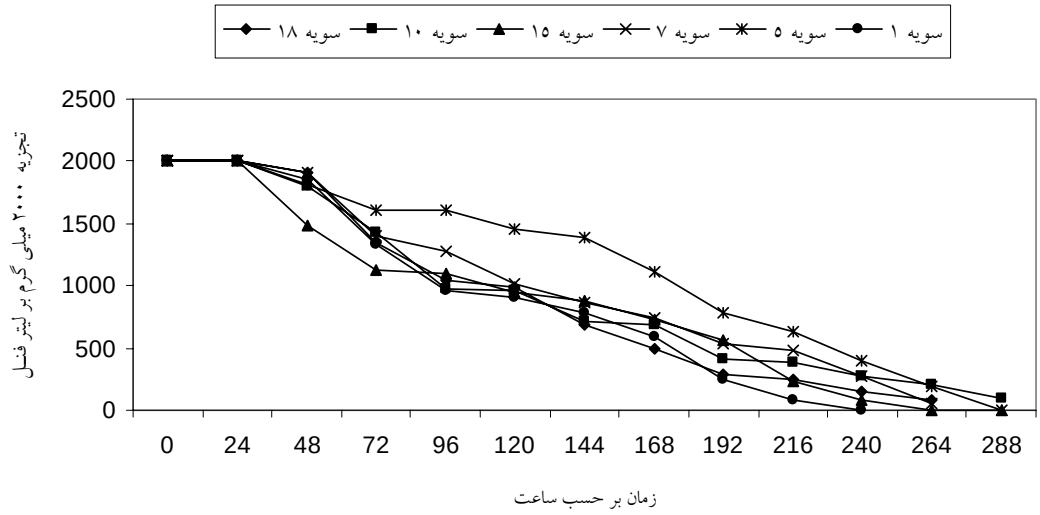


نمودار ۲- منحنی رشد سویه‌های مقاوم در ۳۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

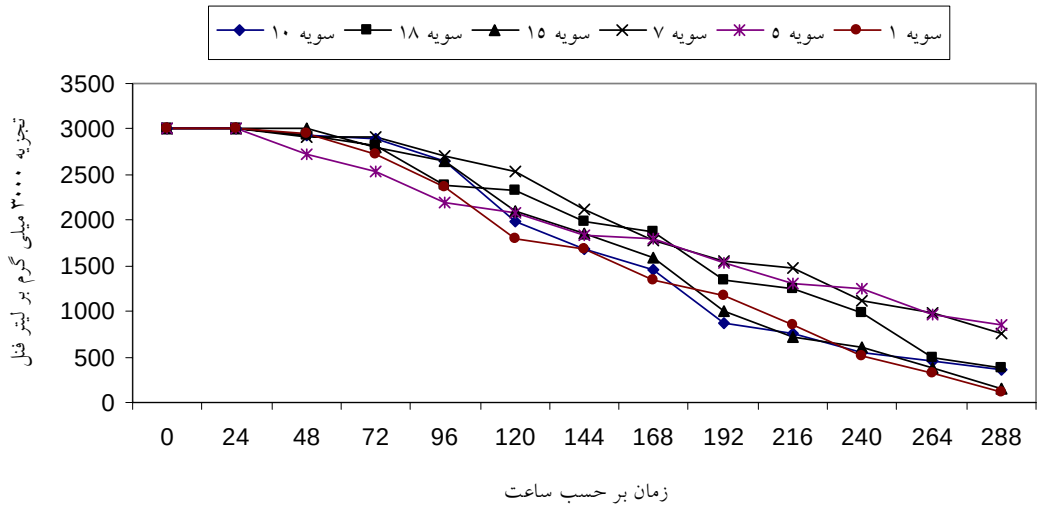


نمودار ۳- منحنی رشد سویه‌های مقاوم در ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

www.SID.ir

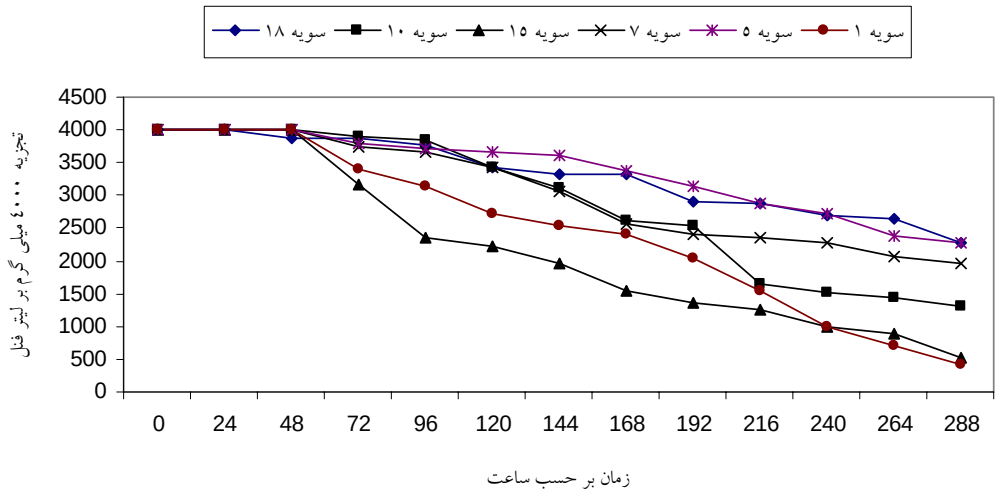


نمودار ۴- منحنی تجزیه سویه‌های مقاوم در ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

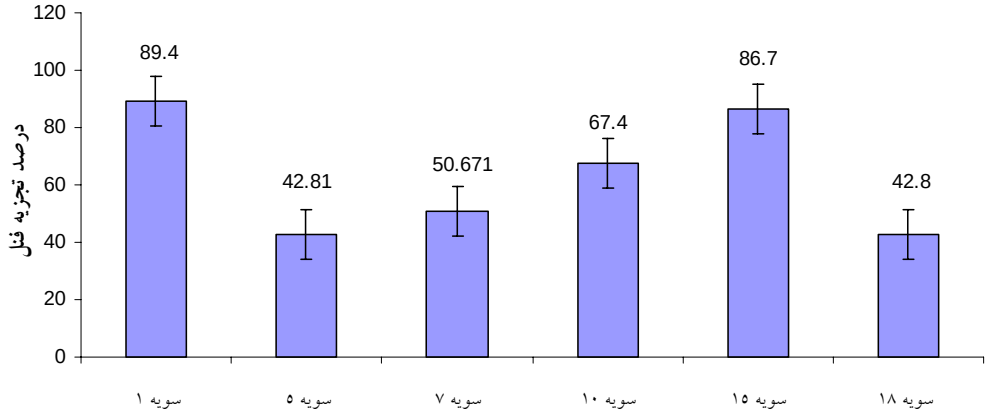


نمودار ۵- منحنی تجزیه سویه‌های مقاوم در ۳۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

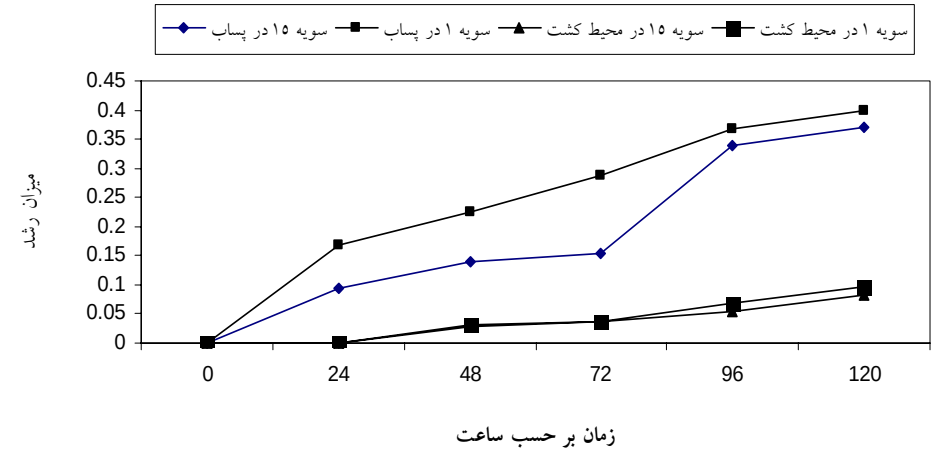
www.SID.ir



نمودار ۶- منحنی تجزیه سویه‌های مقاوم در ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

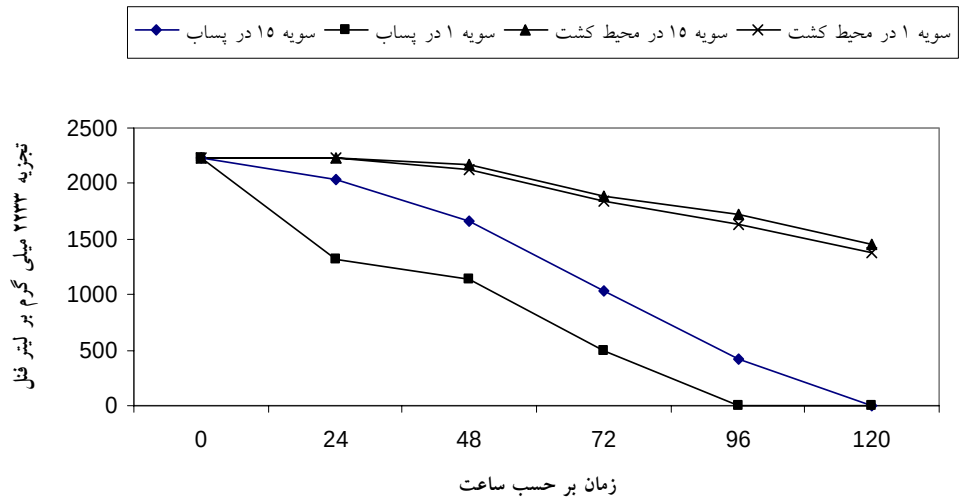


نمودار ۷- درصد حذف فنل توسط سویه‌های مقاوم در محیط کشت حاوی ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل

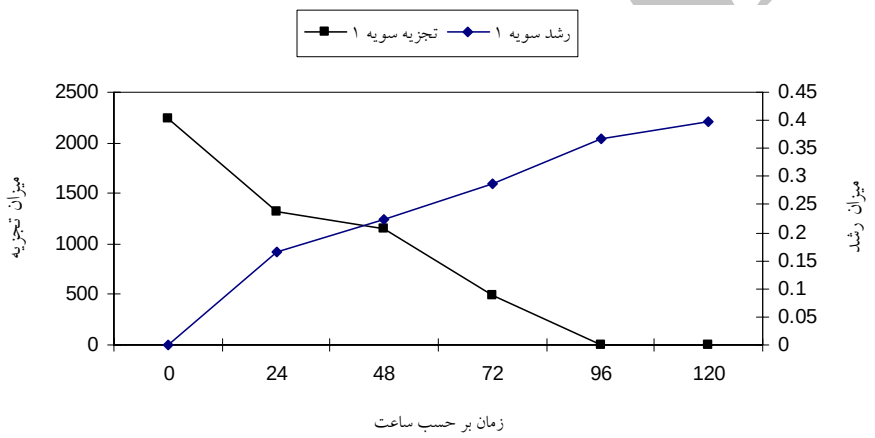


نمودار ۸- مقایسه رشد سویه ۱ و ۱۵ در محیط کشت مصنوعی و پساب B

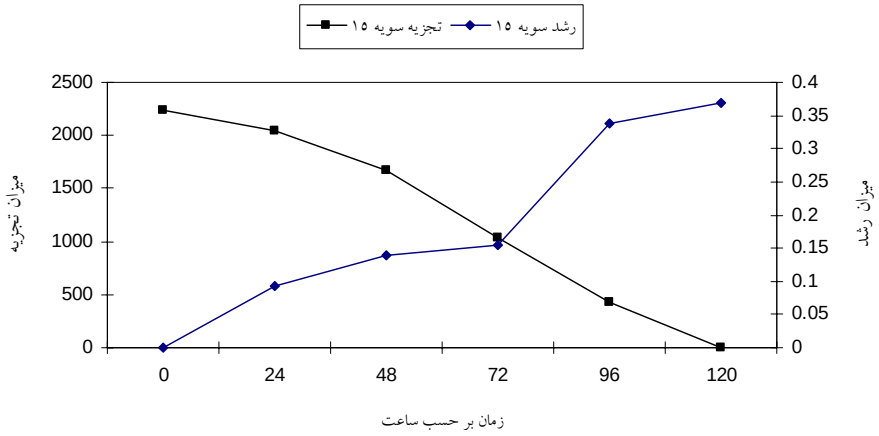
www.SID.ir



نمودار ۹- مقایسه تجزیه فنل سویه ۱ و ۱۵ در محیط کشت مصنوعی و پساب B



نمودار ۱۰- منحنی رشد و تجزیه فنل سویه ۱ در پساب B



نمودار ۱۱- منحنی رشد و تجزیه فنل سویه ۱۵ در پساب B

www.SID.ir

تفسیر نتایج

مقدار فنل هر دو پساب چندین برابر استانداردهای بین المللی تعریف شده برای پساب های صنعتی بود. از طرفی مقدار استاندارد BOD_5 برای پساب های صنعتی ۲۰ میلی گرم بر لیتر و حداکثر آن بسته به نوع صنعت و شرایط فیزیکی و شیمیایی آن ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر تعیین شده است که با توجه به مقدار BOD_5 این دو پساب، مقدار اندازه‌گیری شده برای پساب A بسیار بالاتر است. اما BOD_5 پایین پساب دوم نشان دهنده پاک بودن پساب و یا فقدان میکروارگانیسم هایی است که به مصرف اکسیژن نیاز دارند، یا میکروارگانیسم ها در این پساب مرده و یا در حال مرگ هستند که با توجه به بالا بودن مقدار فنل هر یک از این احتمالات می‌تواند صادق باشد(۱۶).

همچنین میزان استاندارد COD برای پساب های صنعتی ۱۲۰میلی گرم بر لیتر تعیین شده که مقدار حداکثر آن ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر گزارش شده است. COD هر دو پساب مورد آزمایش بسیار بالاتر از استانداردهای ارایه شده است. بالاتر بودن میزان COD نسبت به BOD_5 به این دلیل است که وقتی ترکیبات سمی از جمله فنل در پساب وجود داشته باشد، از فعالیت میکروارگانیسم هایی که مواد آلی را تخریب میکنند کاسته می شود و حضور این ترکیبات در طی انجام آزمایش باعث کاهش میزان BOD_5 می‌گردد(۱۶).

لازم به ذکر است این پساب به محیط تخلیه نشده و در بخش کک سازی به صورت چرخه ای مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در این مطالعه اقدام به جداسازی سویه‌هایی از باکتری شد که در ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل به راحتی رشد کرده و فنل را تجزیه می‌کنند. سپس با انتقال این سویه‌ها به محیط‌های کشت حاوی مقادیر بالاتری از فنل به صورت ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر برای بررسی رفتار این سویه‌ها منحنی رشد و تجزیه فنل رسم شد. نتایج نشان داد که سویه‌ها در ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل به راحتی رشد کرده و فنل را تجزیه می‌کنند، در حالی که در ۳۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل رشد با ۱ تا ۲ تاخیر و در ۴۰۰۰ میلی گرم برلیتر فنل رشد ۳ تا ۴ روز به تاخیر افتاده ولی در نهایت سویه رشد کرده و فنل را تجزیه می‌کند.

Adav و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تحقیقی تحت عنوان تصفیه ی زیستی هوازی پیریدین در حضور فنل به این نتیجه رسیدند که اگر مقدار فنل را از ۵۰۰ به ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر برسانند تجزیه زیستی پیریدین محدود می شود که این به دلیل ویژگی ممانعت کننده از رشد فنل است(۱۷).

Neumann و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز در بررسی درجه تجزیه فنل و آترازین توسط سویه سدوموناس به این نتیجه رسیدند که این سویه قادر است در برابر ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل مقدار ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر آترازین را تجزیه کند و در مقدارهای بالاتر فنل قادر به این کار نیست(۱۸).

از کل سویه‌هایی که قادر به تجزیه فنل بودند ۶۰٪ به عنوان سویه‌های مقاوم برای تجزیه و رشد در محیط فنل دار جداسازی شدند و همچنین از بین این سویه‌های مقاوم به فنل ۷۰٪ کوکوباسیل گرم منفی ، ۲۰٪ باسیل گرم منفی و ۱۰٪ کوکوباسیل گرم مثبت شناسایی شدند.

Vatanabe و همکاران در سال ۲۰۰۲ در پساب کارخانه رزین هلند اسفنگوباکتریوم را جداسازی کردند(۱۹). در سال ۲۰۰۲ Teramoto و همکاران در خاک آمریکا آلکالیجنز را جدا کردند(۲۰). هر چند با افزایش مقدار فنل دوره تاخیری سویه بدلیل اثر بازدارنده از رشد فنل بیشتر می شود اما در نهایت سویه رشد کرده و فنل را تجزیه می‌کند(۲۰).

Gonzalez و همکاران در سال ۲۰۰۱ تجزیه زیستی فنل را در یک محیط کشت طبیعی از سدوموناس پوتیدا بررسی کردند. زمانی که مقدار COD بین ۶۰۰ تا ۱۲۰۰ میلی گرم بر لیتر باشد باکتری فنل را به سرعت از محیط تصفیه می‌کند، اما زمانی که میزان COD ۲۴۰۰ میلی گرم بر لیتر باشد سیستم به زمانی بیشتر از ۵ روز برای تصفیه فنل نیاز دارد(۲۱).

Archive of SID

www.SID.ir

انتظار میرفت که با توجه به ۴ برابر بودن COD نسبت به مقدارهای مورد بررسی در مطالعه Gonzalez و همکاران در پساب دوم مدت زمان طولانی تری لازم باشد تا سویه‌ها فنل را تجزیه کنند، اما به دلیل سازگار بودن سویه‌ها فنل را در مدت زمان کوتاهتری تجزیه کردند.

منابع

1. Department for Environment, food and Rural Affairs (DEFRA). 2005. Soil Guideline values for Phenol Contamination.
2. Department for Environment, food and Rural Affairs (DEFRA). 2003. Contaminant in soil: collation of toxicological data and Intake values for Humans.
3. Patterson, J.W.1975.Wastewater treatment technology. Ann Arbor science publishers, Inc., USA.
4. Freeman, H. 1989. Standard Hand book of hazardous waste treatment and disposal. Mc Graw – Hill, USA.
5. Rehm, H. and G. Reed.1999. Biotechnology Second Edition. Vol. 11a. WIVY-VCH, Weinbeim Germany
6. Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., and S. Harayama. 1998. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol – degrading bacteria in activated sludge. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64. pp: 4399-4402.
7. Abuhamed, T. and E. Bayraktar. 2004. The biodegradation of benzene, toluene and phenol in a two-phase system. Biochemical Engineering Journal. 19, 137-146.
8. Wen, C. and C., Jo. 2004. Characterization of phenol and tricholoroethene degradation by the *Rhizobium ralstonia* Taiwanese. Research in microbiology. Vol. 52. pp: 8-15.
9. Baker M.D. and Mayfield C.I. (1980) Microbial and biological decomposition of chlorophenols and phenol in soil. Water, Air and Soil Pollution.Vol. 13 pp:411−424.
10. Robert, J., Shimpand, F., and K. Pfaender.1987. Effect of adaptation to phenol on biodegradation of Mono Substituted Phenol Aquatic Microbial Communities. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 53. pp: 1496-1499.
11. APHA-American public Health Association. 1998. Standard Methods for the examination for the water and wastewater .20th ed . AWWA, WPCF, Washington, D.C.
12. Quintana, M.G., Didion, C, and H. Dalton. 1997. Colorimetric method for a rapid detection of oxygenated aromatic biotransformation products. J. biotechnology techniques, vol. 11.pp:585-587.
13. Shih, C., Davey, M., Zhou, J., Tiedje, J. and C., Criddle.1996. Effect of phenol feeding pattern on microbial community structure and cometabolism of trichloroethylene. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 62. pp: 2953-2960.
14. Rigo, M. and R.M. Alegre. 2004. Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms kinetics of the biodegradation. Folia Microbiology. Vol. 49. pp: 41-45.
15. Neumann, G., Teras, R., Monson, L., Kivisaar, M., Schauer, F., and J. Heipieper.2004.Simultaneos degradation of Atrazine and Phenol by pseudomonas sp. Strain ADP: Effect of Toxicity and Adaptation. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70. pp: 1907-1912.
16. Shih, C., Davey, M., Zhou, J., Tiedje, J. and C., Criddle.1996. Effect of phenol feeding pattern on microbial community structure and co metabolism of trichloroethylene.

Archive of SID

www.SID.ir

Applied and Environmental Microbiology. Vol. 62. pp: 2953-2960.
17. Adav, S., Lee, D., and N.Q. Ren.2007. Biodegradation of Pyridine using aerobic granules in the presence of phenol. Water Research J. Vol. 41.pp: 2903-2910.
18. Neumann, G., Teras, R., Monson, L., Kivisaar, M., Schauer, F., and J. Heipieper.2004.Simultaneos degradation of Atrazine and Phenol by pseudomonas sp. Strain ADP: Effect of Toxicity and Adaptation. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70. pp: 1907-1912.
19. Watanabe, K., Futamata, H. and Harayama, S. 2002. Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. Kluwer Academic press. 8 1,655-663.
20. Termamoto, M., Ohnishi K., Harayama S. and K. Watanabe. 2002. An rac/xy1s Family member at a high level in a hierarchy of regulators for phenol metabolizing enzymes in common's testosterone: R5.Applied and Environmental Microbiology Journal, 184:3941-3946.
21. Gonzalez, J., Herrera, G., Garcia, M.T. and M., Pena. 2001. Biodegradation of phenol in a continuous process. Bioresearches technology. Vol. 76. pp: 245-251.

Archive of SID

www.SID.ir