علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره شانزدهم، شماره یک، بهار ۹۳

جداسازی و بررسی باکتری های مزوفیل،ترموفیل، بی هوازی احیا کننده سولفات(SRBs) و قارچ های موثر بر پساب خروجی صنایع ریخته‌گری

محمدحسین حبیب الهی [1*]

mohamadhossein.habib@gmail.com

محمد کارگر [2]

عباسعلی دامنگیر [3]

سارا نبی زاده [4]

تاریخ دریافت:۸۹/۵/۲۰ **تاریخ پذیرش:۸۹/۱۰/۱۵**

چکیده

زمینه و هدف: امروزه با توجه به پیشرفت قوانین زیست محیطی و اهمیت پالایش پساب ها، تجزیه و حذف آن ها به عنوان یکی از موضوعات مهم مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش جداسازی و ارزیابی میکروارگانیسم های هوازی و بی هوازی موثر بر پساب حاوی ترکیبات روغنی می باشد.

روش بررسی: در این پژوهش نمونه ها از پساب واحد ریخته گری مس سرچشمه که حاوی ترکیبات روغنی است جمع آوری گردید و با استفاده از محیط کشت های اختصاصی به جداسازی و ایزوله باکتری های مزوفیل، ترموفیل، احیا کننده سولفات و قارچ ها پرداخته شد. سپس همهٔ کلنی ها از لحاظ میزان تولید بیوسورفاکتانت با استفاده از تست های آمیزندگی و اندازه گیری کاهش کشش سطحی در محیط نمکی حداقل (M.S.S) با دستگاه تنسیومتر ارزیابی گردید و در نهایت کلنی هایی که قدرت آمیزندگی بالا (بین۲/۵ تا ۴) و کاهش کشش سطحی بیشتر از ۹ میلی نیوتن بر متر را داشتند از لحاظ ایجاد تغییرات در ساختار پساب توسط دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفتند.

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج*(مسئول مکاتبات).

۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم.

۳- دانشجوی دکتری کشاورزی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران.

۴- فوق لیسانس زبان و ادبیات فارسی.

یافته ها و نتایج: از میان ۱۰۴ میکروارگانیسم جدا شده تنها ۱۵ باکتری مزوفیل بیش ترین تغییرات در ساختار پساب را نشان دادند و باکتری های ترموفیل، بی هوازی احیاکننده سولفات و همچنین قارچ ها اثرات ناچیزی را بر روی ساختار پساب داشتند. با توجه به نتایج به دست آمده جهت حذف ترکیبات سنگین و آلی از پساب ها، باکتری های هوازی و مزوفیل باید بیش تر مورد توجه قرار گیرند.

واژه های کلیدی: بیوسورفاکتانت، پساب، میکروارگانیسم های هوازی و بی هوازی، صنایع ریخته گری.

مقدمه

حضور ترکیبات آلی در آب یکی از عمده ترین منابع اصلی آلودگی محیط زیست می باشد. اجزای محلول در آب شامل نفت خام، میعانات گاز طبیعی، محصولات پالایشی و خصوصاً پساب ها شامل انواعی از ترکیبات می باشند که برای بسیاری از جانوران و گیاهان خطرناک است. تبدیل این پساب که یک امولسیون روغن در آب می باشد به آب قابل استفاده و استاندارد جهت مصارف صنعتی و کشاورزی باعث بهره برداری اقتصادی از حجم زیاد پساب تولیدی می شود و از طرفی دفع آن به محیط زیست با توجه به مقررات رو به رشد زیست محیطی بدین صورت امکان پذیر نمی باشد. پس تصفیه و پالایش پساب خروجی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱ و ۲).

به طور اساسی سه روش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای پالایش پساب ها وجود دارد. روش های فیزیکی تنها در شروع فرایند پالایش کاربرد دارد. همچنین استفاده از این روش ها در ادامه روش های شیمیایی می تواند نتیجه بهتری در بر داشته باشد. روش های شیمیایی به دلیل نیاز به معرف های شیمیایی ویژه، پرهزینه بوده و می تواند باعث سایر آلودگی ها نیز گردد. غالب ترکیبات روغنی موجود در پساب ها بر روی سطح قرار می گیرد و مانع عبور نور و نفوذ اکسیژن به داخل پساب می گردد بنابراین بهترین روش تجزیه و پالایش این نوع پساب ها استفاده از روش های بیولوژیکی توسط میکروارگانیسم ها می باشد که بسیار اقتصادی، باکفایت و موافق با محیط زیست می باشد (۱).

El-Bestawy و همکارانش در سال ۲۰۰۵ پالایش پساب ها به روش های شیمیایی و بیولوژیکی را مورد بررسی قرار دادند و ترکیبی از این روش ها را جهت حذف سریع و کارآمد مواد آلی و معدنی موجود در پساب ها پیشنهاد کردند. با وجود این باز هم پالایش های بیولوژیکی از لحاظ کاهش آلودگی های زیست محیطی و ایجاد بستری مناسب برای بازگشت پساب تصفیه شده به محیط زیست از اهمیت بیشتری برخوردار می باشد (۳).

Izanloo و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در بررسی پساب های حاوی ترکیبات روغنی نشان دادند که بیوفیلم های باکتریایی در حالت هوازی دارای بیش ترین تاثیرات بر روی این ترکیبات می باشد (۴).

Helmy و همکارانش در سال ۲۰۱۰ تجزیه میکروبی را به عنوان مهم ترین روش جهت پالایش پساب ها خصوصاً پساب های حاوی مواد آلی و روغنی با به کارگیری میکروفلورهای[1] بومی[2] و غیر بومی[3] معرفی نمودند (۵). سه گروه اصلی میکروارگانیسم های جدا شده از پساب خروجی حاصل از خنک کننده های کارگاه های ریخته گری شامل باکتری های هوازی به ویژه گونه های مختلف سودوموناس و کلی‌فرم، باکتری های بی هوازی احیاکننده سولفات به ویژه *Desulfovibrio desulfuricans* ، قارچ های ناقص به ویژه گونه های مختلف فوزاریوم، سفالوسپوریوم و کاندیدا می باشند. میکروارگانیسم ها به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم بر روی این پساب ها موثر می باشند و می توانند باعث ایجاد تغییرات فیزیکی و شیمیایی در ساختار آن ها گردند (۶).

نتایج حاصل از تحقیقات Kadarwati و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان داد که بیوسورفاکتانت های تولید شده توسط برخی از میکروارگانیسم ها می توانند تجزیه

1- Microbial flora
2- Indigenous
3- Extraneous

هیدروکربن های موجود در پساب ها را در درصدهای مختلفی افزایش دهند (۱).

تجزیهٔ بیولوژیکی ترکیبات آلی فرایندی زمان بر و وقت گیر می باشد که استفاده از فن آوری های جدید برای مثال افزودن بیوسورفاکتانت، شرایط را برای تحریک جمعیت میکروبی بومی محیا می کند و این میکروب ها با مصرف ترکیبات آلی به عنوان منبع غذایی سبب افزایش سرعت تجزیه بیولوژیکی می شوند. بیوسورفاکتانت ها به عنوان عوامل فعال کننده سطحی می باشند که به طور معمول جهت رفع آلودگی های زیستی با ایجاد شرایط مناسب برای حمله میکروبی استفاده می شوند. این ترکیبات توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند و با کاهش کشش سطحی و بین سطحی سبب افزایش حلالیت و پراکندگی ترکیبات آلی خصوصاً ترکیبات روغنی می گردند، پس در فرایند تجزیه و حذف این ترکیبات و کاهش BOD و COD پساب ها مؤثر می باشند (۳ و ۵). بنابراین هدف اصلی از این پژوهش جداسازی و بررسی باکتری های مزوفیل، ترموفیل، بی هوازی احیاکننده سولفات و قارچ های موثر بر پساب خروجی حاصل از امولسیون هایی که برای خنک کردن دستگاه ها در واحد ریخته گری استفاده می شوند و حاوی ترکیبات روغنی هستند، می باشد تا مؤثرترین گروه میکروارگانیسم ها جهت حذف ترکیبات آلی به روش بیولوژیکی و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه شناسایی و مورد بررسی قرار گیرند.

مواد و روش ها

نمونه گیری و جداسازی میکروارگانیسم ها: برای انجام این پژوهش نمونه ها از پساب خروجی خنک کننده دستگاه های واحد ریخته گری مس سرچشمه جمع آوری شد و در محیط کشت های اختصاصی، جداسازی میکروارگانیسم ها شامل باکتری های مزوفیل، ترموفیل و بی هوازی احیاکننده سولفات و همچنین قارچ ها انجام یافت.

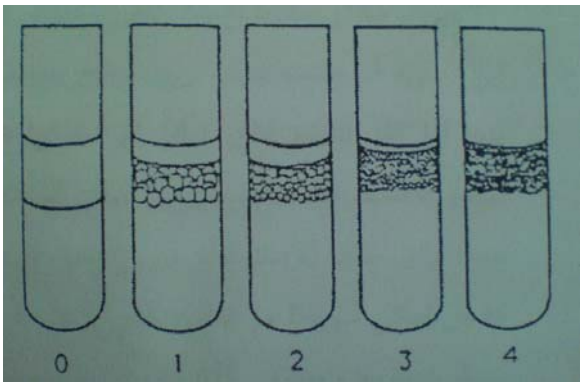
محیط های کشت: برای جداسازی باکتری های مزوفیل از محیط کشت های P.C.A[1] و S.N.A[2]، برای باکتری های ترموفیل از محیط کشت های T.S.B[3] و نوترینت آگار، برای باکتری های احیاکننده سولفات از محیط کشت Post gate B و برای جداسازی مخمرها و کپک ها از محیط کشت های Y.G.C[4] و P.D.A[5] استفاده گردید(تمامی ترکیبات از شرکت MERCK بودند). از محیط کشت M.S.S[6] برای تهیه محیط S.N.A و انجام تست های امولسیفیکاسیون و اندازه گیری کشش سطحی استفاده شد. برای اندازه گیری کشش سطحی و انجام تست های آمیزندگی ۰/۰۳٪ عصاره مخمر و ۰/۰۳٪ گلوکز به محیط کشت M.S.S اضافه گردید. محیط M.S.S شامل: دی هیدروژون پتاسیم فسفات ۲ گرم، هیدورژن دی پتاسیم فسفات ۵ گرم، سولفات آمونیوم ۳ گرم، کلرید کلسیم ۰/۰۱ گرم، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، سولفات آهن ۰/۰۱ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۰۲ گرم بر حسب گرم در لیتر آب مقطر (pH=۷) می باشد.

کشت میکروبی: همزمان با نمونه گیری و ارسال نمونه ها به آزمایشگاه به کمک فسفات بافر سالین (P.B.S) از آن ها رقت های متوالی برای جداسازی میکروارگانیسم های هوازی (باکتری های مزوفیل، ترموفیل و قارچ ها) و به کمک بافر رقیق کننده (محلول کار) رقت های متوالی برای جداسازی باکتری های احیاکننده سولفات تهیه شد. بافر رقیق کننده از دو ترکیب فسفات ذخیره و محلول کلرید منیزیم تهیه می‌شود. در تمامی موارد برای جداسازی میکروارگانیسم ها از روش Pour plate استفاده گردید، سپس از تمامی کلنی ها کشت خالص تهیه شد.

تست های آمیزندگی (امولسیفیکاسیون): تست های آمیزندگی بر اساس روش پیشنهادی Francy در سال ۱۹۹۱ انجام گرفت (۷). برای انجام تست های آمیزندگی از هیدروکربن های متداول مشتق شده از نفت خام شامل نفت

1- Plate Count Agar
2- Strengthed Nutrient Agar
3- Trypticase Soy Broth
4- Yeast Glucose Agar
5- Potato-Dextrose Agar
6- Minimum Salt Solution

سفید، بنزین و گازوئیل استفاده شد که این مشتقات نفتی ابتدا توسط کاغذ صافی معمولی آشغال‌گیری و سپس با عبور آن ها از صافی های ۰/۴۵ میکرومتری استریل شدند. تست های آمیزندگی بر روی تمامی کلنی های جداسازی شده انجام گرفت. هر کدام از کلنی ها به ۶ لوله حاوی ۵ میلی لیتر محیط M.S.S واجد عصاره مخمر و گلوکز افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر نفت سفید استریل شده به دو لوله اول، ۰/۵ میلی لیتر بنزین استریل به دو لوله دوم و ۰/۵ میلی لیتر گازوئیل استریل به دو لوله سوم افزوده شد و پس از مخلوط کردن با دستگاه vortex در دمای ۳۰ درجه سانتی به مدت سه روز گرمخانه گذاری گردید. این عمل برای تمامی کلنی های جداسازی شده تکرار شد و در هر سری آزمایش برای هر کدام از هیدروکربن ها بدون تلقیح میکروبی یک لوله به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* که در تحقیقات کارگر و همکارانش در سال ۱۳۸۵ در تست های آمیزندگی دارای بالاترین میزان آمیزندگی بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۷). پس از سه روز گرمخانه‌گذاری لوله ها خوب با دستگاه vortex مخلوط و ۱ ساعت دیگر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت با توجه به اندازه گویچه ها مطابق شکل ۱ میزان آمیزندگی از صفر تا چهار گزارش گردید.



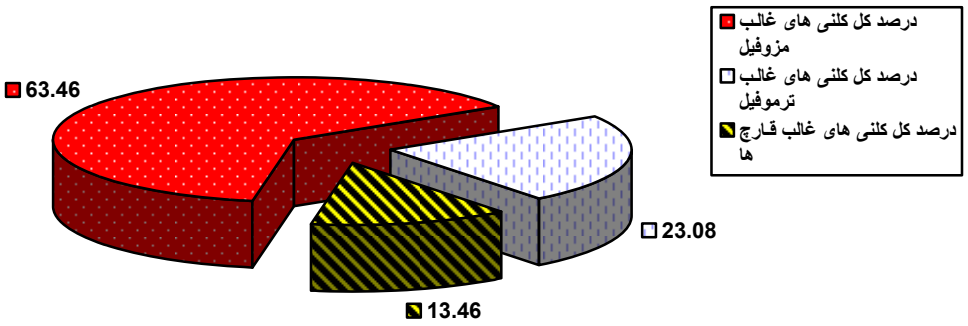
شکل ۱- نحوه گزارش میزان آمیزندگی از صفر تا چهار

تأیید ترشح بیوسورفاکتانت ها با اندازه گیری کشش سطحی: برای اندازه گیری کشش سطحی از دستگاه تنسیومتر (Tensiometer-TD1C LAUDA) استفاده شد و چون کشش سطحی تابع درجه حرارت محیط است، کشش سطحی تمامی نمونه ها در شرایط دمایی یکسانی (۲۸ درجه سانتی‌گراد) اندازه گیری شد. کلنی هایی که میزان آمیزندگی بالاتر از ۲/۵ داشتند برای اندازه گیری کشش سطحی انتخاب شدند. کلنی های مورد نظر به یک ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط M.S.S دارای عصاره مخمر و گلوکز تلقیح و به مدت سه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس کشش سطحی برای هر کلنی به دو صورت بدون سانتریفوژ و پس از سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه اندازه گیری و ثبت گردید. لازم به ذکر است که در هر مورد ۳ بار کشش سطحی اندازه گیری و میانگین آن‌ها در نظر گرفته شد. سپس اختلاف کاهش کشش سطحی نمونه ها با مقایسهٔ نمونه شاهد محاسبه گردید.

بررسی تأثیر میکروارگانیسم های انتخاب شده بر روی ساختار پساب با آنالیز HPLC: به منظور ارزیابی اثرات میکروبی بر روی ساختار پساب، کلنی هایی که اختلاف کاهش کشش سطحی بالاتر از ۹ میلی نیوتن بر متر داشتند، با دستگاه (SHIMADZO 10 AVD HPLC) ساخت کشور ژاپن آنالیز شدند.

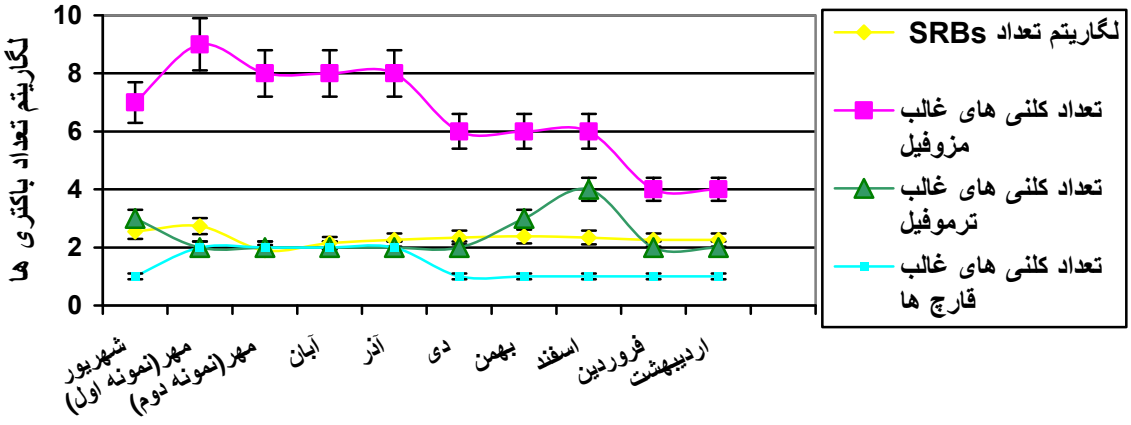
یافته ها

در این پژوهش میکروارگانیسم های بومی و جدا شده از پساب واحد ریخته گری مورد مطالعه قرار گرفتند. به طور کلی از ۱۰۴ میکروار گانیسم هوازی غالب جدا شده ۶۶ سویه (۶۳/۴۶٪) باکتری های مزوفیل، ۲۴ سویه (۲۳/۰۸٪) باکتری‌های ترموفیل و ۱۴ سویه (۱۳/۴۶٪) قارچ ها بودند. بیش ترین تعداد کلنی‌های غالب جدا شده در مدت پژوهش مربوط به باکتری های مزوفیل و کم ترین آن ها مربوط به قارچ ها بود (نمودار ۱) که این نشان دهنده غالب بودن فعالیت های باکتری های مزوفیل نسبت به سایر میکروارگانیسم ها در این نوع پساب ها که حاوی ترکیبات روغنی هستند، می باشد.



نمودار ۱- درصد فراوانی کل کلنی های غالب باکتری‌های مزوفیل، ترموفیل و قارچ ها

با استفاده از روش بیش ترین شمارش احتمالی (MPN) در لوله های حاوی محیط کشت Post gate B به صورت آزمون ۵ لوله‌ای انواع و تعداد باکتری های بی هوازی احیاکننده سولفات جداسازی و شمارش گردید. با استفاده از آزمون ضریب همبستگی پیرسون مشخص گردید که بین لگاریتم تعداد باکتری های بی هوازی احیا کننده سولفات و تعداد کلنی های غالب مزوفیل و ترموفیل و قارچ ها در سطح ۰/۰۵ رابطه معنی داری وجود ندارد (نمودار ۲).



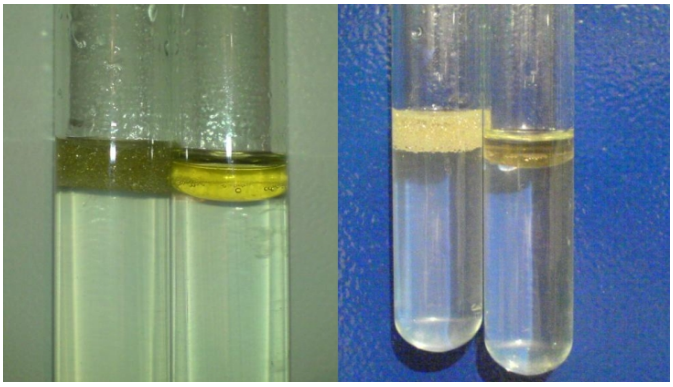
نمودار ۲- مقایسه لگاریتم تعداد باکتری‌های بی هوازی احیا کننده سولفات و تعداد کلنی های غالب مزوفیل و ترموفیل و قارچ ها در مدت پژوهش

بحث و نتیجه گیری

Tabatabaee و همکارانش در سال ۲۰۰۵ جهت بررسی توانایی تولید بیوسورفاکتانت ها توسط باکتری های ایزوله شده از مخازن روغنی از تست های همولیز، امولسیفیکاسیون و اندازه گیری کشش سطحی با دستگاه تنسیومتر استفاده کردند (۸). در این پژوهش نیز تمامی ۱۰۴ کلنی جدا شده از نظر تست های آمیزندگی مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص گردید که باکتری های ترموفیل، بی هوازی احیا کننده سولفات و قارچ ها قدرت آمیزندگی بسیار ناچیزی دارند.

Helmy و همکارانش در ژانویه ۲۰۱۰ ، نشان دادند که استفاده از بیوسورفاکتانت ها سبب افزایش تجزیه لجن های روغنی می گردد و افزودن آن ها همراه با میکروارگانیسم های سازگار با شرایط محیطی جهت تحریک و تسریع تجزیه بیولوژیکی و کسب نتیجه بهتر را پیشنهاد کردند (۵) بنابراین آن دسته از میکروارگانیسم ها که دارای قدرت آمیزندگی کم تری هستند از نظر تولید بیوسورفاکتانت و تجزیه بیولوژیکی ارزش پایین تری دارند که در این پژوهش نمونه ای با قدرت آمیزندگی کم تر از ۲/۵ به عنوان کنترل مورد بررسی گرفت و این نتیجه تایید شد.

تنها ۱۷ سویه از باکتری های مزوفیل قدرت آمیزندگی قابل قبولی (بین ۲/۵ تا ۴) را نشان دادند که از جهت میزان کاهش کشش سطحی با استفاده از دستگاه تنسیومتر بررسی شدند و مشخص گردید که از این تعداد ۱۵ سویه قابلیت تولید بیوسورفاکتانت و کاهش کشش سطحی بیشتر از ۹ میلی نیوتن بر متر را دارا هستند. کارگر و همکارانش در سال ۱۳۸۵ به شناسایی باکتری های مولد بیوسورفاکتانت در ۸۶ نمونه مختلف از آب و خاک های آلوده به ترکیبات نفتی پرداختند. آن ها از ۱۷۹ میکروارگانیسم جداسازی شده در شرایط هوازی و مزوفیل شامل ۱۵۸ سویه باکتریایی، ۱۰ سویه اکتینومیست، ۹ سویه قارچ و ۲ سویه مخمر، تنها ۹ سویه باکتریایی مولد بیوسورفاکتانت و قادر به کاهش کشش سطحی در حد قابل قبولی شناسایی کردند که در پژوهش آن ها نیز هیچ کدام از قارچ ها توانایی آمیزندگی هیدروکربن های متداول نفتی را نداشتند (۷).



شکل ۲- لوله‌های تست آمیزندگی

در این پژوهش مشابه تحقیقات انجام یافته توسط Rossmoore و همکارانش در سال ۱۹۹۴ (۹) با استفاده از دستگاه HPLC سویه های باکتریایی که توانایی تولید بیوسورفاکتانت (بین ۲/۵ تا ۴) و کاهش کشش سطحی بیش تر از ۹ میلی نیوتن بر متر را داشتند، از لحاظ تاثیر بر روی ساختار پساب بررسی شدند و مشخص گردید که این باکتری ها دارای تاثیرات متغیری بر روی ساختار و ترکیبات موجود در پساب می باشند و قابلیت حذف بسیار بالایی از ترکیبات آلی و معدنی را در شرایط مناسب محیطی دارند. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده بررسی و مطالعه بیشتر در مورد حذف ترکیبات آلی

و معدنی از پساب ها توسط باکتری های هوازی و مزوفیل پیشنهاد می گردد.

منابع

1. Kadarwati, S., Herlina, L., 2008. Effect of biosurfactant produced by bacillus in only wastewater degradation. Lemigas scientific contributions, Vol. 31, No. 3, pp. 40-46
2. Shaban, AM., Kamal, MM., Kenawy, N., El Manakhly, H., 2009. Role of interior structure of agro and non-agro materials for industrial wastewater treatment. Jounal of Applied Sciences Research, Vol. 5, No. 8, pp. 978-985
3. El-Bestawy, E., Hussein, H., Baghdadi, HH., El-Saka, MF., 2005. Comparison between biological and chemical treatment of wastewater containing nitrogen and phosphorus. J and Microbiol Biotechnol,Vol. 32, pp. 195-203
4. Izanloo, H., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Naddafi, K., Nasseri, S., Mahvi, AH., Nazmara, S., 2007. The treatment of wastewater containing crude oil with aerated submerged fixed-film reactor. Pakistan Journal of Biological Sciences, Vol. 10, No. 17, pp. 2905-2909
5. Helmy, Q., Kardena, E., Nurachman, Z., Wisjnuprapto., 2010. Application of biosurfactant produced by Azotobacter vinelandii AVO1 for enhanced oil recovery and biodegradation of oil sludge. International Journal of Civil & Environmental Engineering IJCEE, Vol. 10, No. 1, pp. 7-14
6. Rossmoore, HW., Rossmoore, LA., 1993. MIC in metalworking processes and hydraulic systems. A practical manual on Microbiologically Influenced Corrosion Engineers (NACE), Chapter, 5, pp. 31-40

۷. کارگر، محمد و همکاران، «شناسایی باکتری های مولد بیوسورفکتانت و کاربرد آنها در حذف آلاینده های نفتی»، فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست، تابستان ۱۳۸۵، دوره هشتم، شماره ۲، صفحات ۱۰۹تا ۱۱۸

8. Tabatabaee, A., Mazaheri, M., Noohi, AA., Sajadian, VA., 2005. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. Iranian J Env Health Sci Eng, Vol. 2, No. 1, pp.6-12
9. Rossmoore, LA., Rossmoore, HW., 1994. Metalworking fluid microbiology. Chapter, 9., pp. 247-271
10. Chipasa, KB., 2001. Limits of physicochemical treatment of wastewater in the vegetable oil refining industry. Polish Journal of Environmental Studies, Vol. 10, No. 3, pp. 141-147
11. Matsui, T., Miura, A., Liyama, T., Shinzato, N., Matsuda, H., Furuhashi, K., 2004. Effect of fatty oil dispersion on oil-containing wastewater treatment. Elsevier B.V, pp. 1-4.