

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

سمیه اسکندری^{۱*}

Eskandary.s@gmail.com

آرزو طهمورث پور^۲

مهران هودجی^۳

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 میکروارگانیسم 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

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 می‌شود (۲).

برای تصفیه فاضلاب‌های حاوی فنل روش‌های متعددی وجود دارد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به اکسیداسیون شیمیایی، جذب سطحی، تصفیه بیولوژیکی و ترکیبی از روش‌های یاد شده اشاره کرد (۳ و ۴).

در میان روش‌های یاد شده، سیستم‌های بیولوژیکی به دلیل مزایای خاصی که نسبت به سایر روش‌ها دارند، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از مزایای عمده این روش‌ها این است که سازگاری بیشتری با محیط زیست دارند، به عبارت دیگر از دیدگاه محیط زیست ایمن‌تر محسوب می‌شوند. مزیت دیگر این سیستم‌ها نسبت به روش‌های شیمیایی این است که معمولاً در آن‌ها ماده شیمیایی زیان‌آوری برای محیط زیست مصرف نمی‌شود، لذا دفع پساب و لجن حاصل از این فرآیندها نسبت به فرآیندهای شیمیایی، اثرات سوء به دنبال ندارد (۵).

تصفیه زیستی فنل به وسیله باکتری‌ها طی تحقیقات زیادی بررسی شده و باکتری‌های متنوعی بر حسب مقدار فنل و خصوصیات فیزیولوژیکی باکتری، جداسازی و بررسی شدند. اکثر باکتری‌هایی که تا کنون مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند، قادر به تجزیه فنل در غلظت‌های پایین بودند به این دلیل که فنل در غلظت‌های بالا با ایجاد لیز سلولی مانع رشد اکثر میکروارگانیسم‌ها می‌شود (۶-۸).

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 دی‌اکسید کربن و متان تبدیل کند (۹ و ۱۰).

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

به طور کلی در این تحقیق به جداسازی و بررسی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنل از پساب صنعتی و مطالعه روند تجزیه فنل توسط مقاوم‌ترین باکتری‌ها در محیط کشت مصنوعی و پساب فنولیک پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

۱. نمونه برداری: دو نمونه پساب به ترتیب از ورودی استخر فنلی (استخری که اضافه پساب‌های حاوی فنل به آن ریخته می‌شود) (A) و خروجی آب کندانسور واحد قطران بخش کک‌سازی کارخانه ذوب آهن اصفهان (B) تهیه گردید. نمونه‌ها در بطری‌های شیشه‌ای اسید شویی شده و استریل جمع‌آوری گردیده و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

۲. تعیین خصوصیات پساب‌ها:

- تعیین pH پساب‌ها: pH نمونه‌های پساب پس از انتقال به آزمایشگاه به وسیله دستگاه pH متر مدل ۲۶۲ کالیبره شده با محلول‌های بافر، اندازه‌گیری شد (۱۱).

- تعیین BOD^۱ پساب‌ها: برای اندازه‌گیری BOD از روش تیتراسیون استفاده شده است (۱۱).

۵. بررسی پراکندگی باکتری هایی که قدرت تجزیه فنل را دارند: به این منظور از لوله‌هایی که کدورت در آن‌ها 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، آن‌ها 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 آن‌ها 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 بر لیتر فنل توانسته بودند به خوبی رشد کنند و منحنی رشد و تجزیه فنل آن‌ها رسم شد.
- ۱- تعیین COD^۱ پساب‌ها: برای اندازه گیری میزان COD از روش تقطیر برگشتی بسته استفاده شد (۱۱).
- ۲- تعیین میزان فنل: در اندازه گیری فنل از معرف گیسیس استفاده شد که به هر نمونه ۱۵۰ میلی لیتری که در دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده بود ۳۰ میلی لیتر NaHCO₃ یک مولار و ۲۰ میلی لیتر از معرف گیسیس 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 Na₂HPO₄ ، ۲۶۷۰ میلی گرم NH₄Cl ، ۰/۶ میلی گرم CaCl₂.H₂O ، ۶ میلی گرم MgSO₄ ، ۲/۴ میلی گرم FeSO₄.H₂O و ۰/۰۹ میلی گرم MnSO₄.H₂O در ۱۰۰۰ 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 (۱۳ و ۱۴).

نتایج

در طی این بررسی برخی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی هر دو پساب تهیه شده اندازه گیری شد و به صورت جدول زیر ارایه گردید.

جدول ۱- خصوصیات اندازه گیری شده در پساب مورد مطالعه

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

N.D: Not detectable

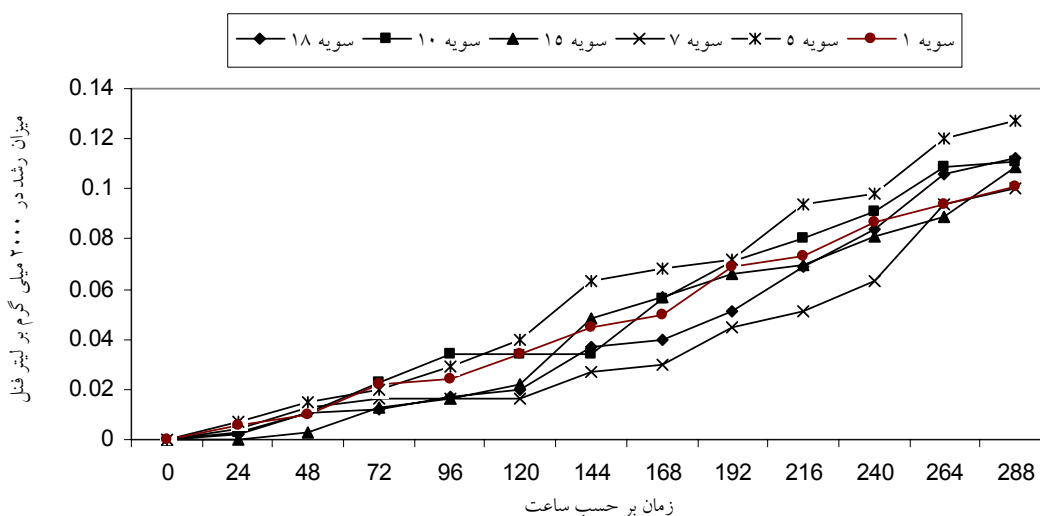
تعداد کل باکتری های هتروتروف موجود در پساب A، باکتری های تجزیه کننده فنل و پراکندگی آن ها در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول ۲- تعداد کل باکتری های هتروتروف، باکتری های تجزیه کننده فنل و

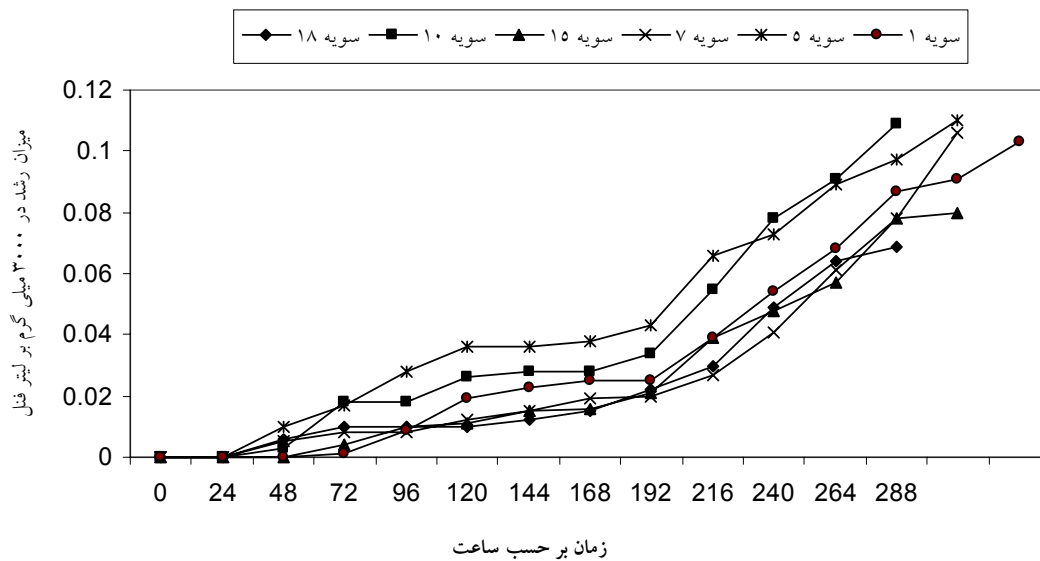
پراکندگی باکتری های تجزیه کننده در پساب A

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

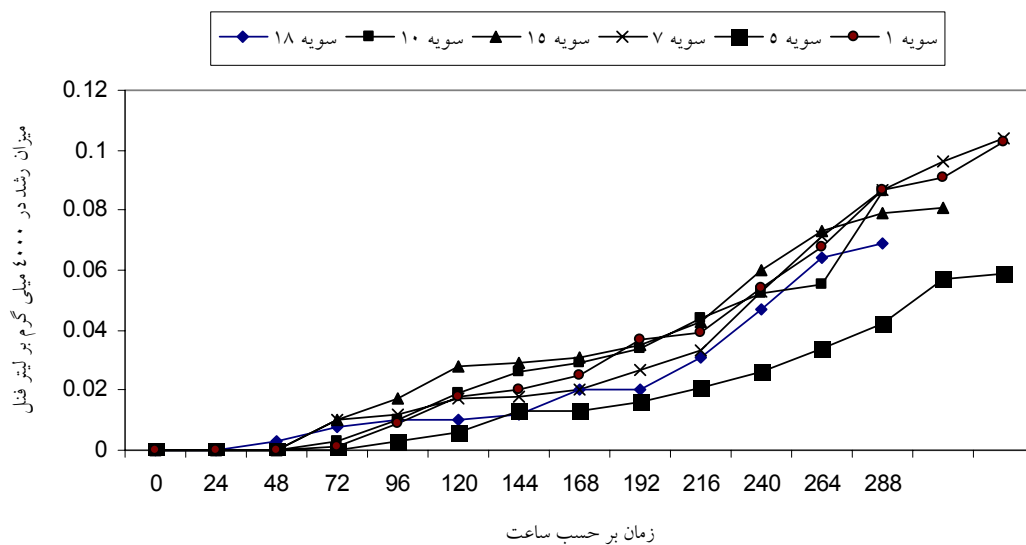
منحنی رشد و حذف مقاوم ترین سویه در ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل در نمودارهای ۱ تا ۶ نشان داده شده است.



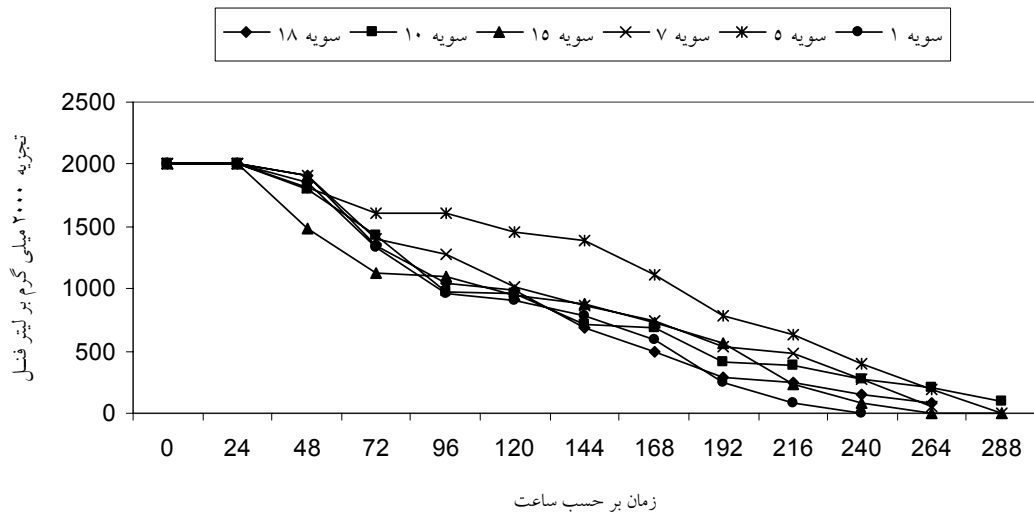
نمودار ۱- منحنی رشد سویه های مقاوم در ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل



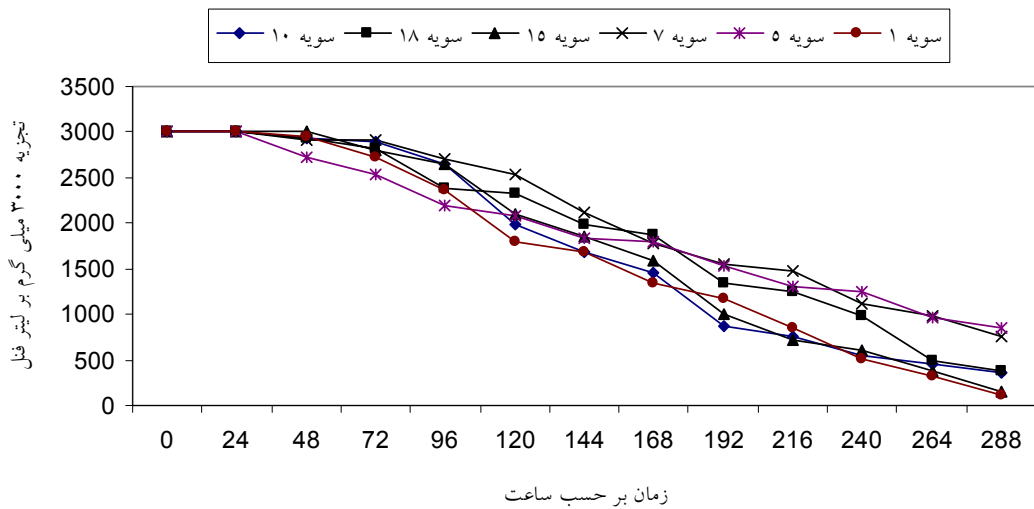
نمودار ۲- منحنی رشد سویه‌های مقاوم در ۳۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل



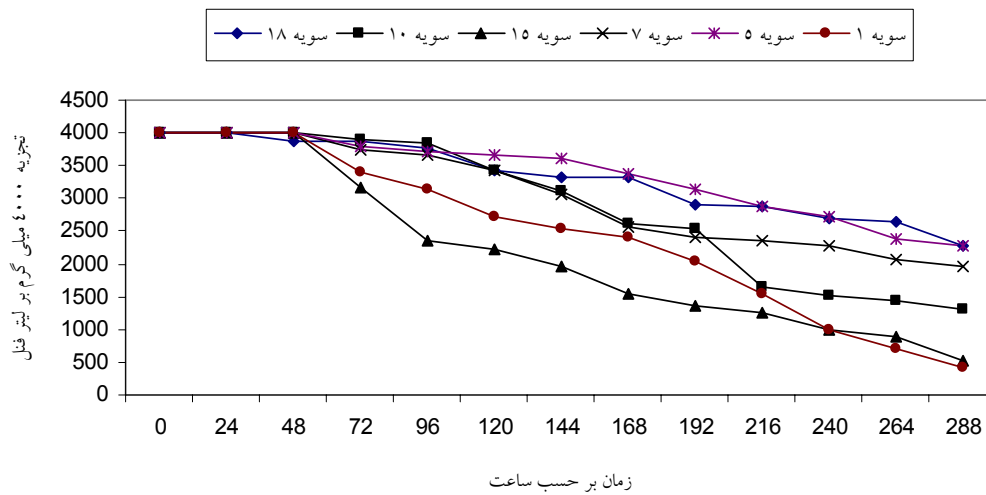
نمودار ۳- منحنی رشد سویه‌های مقاوم در ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل



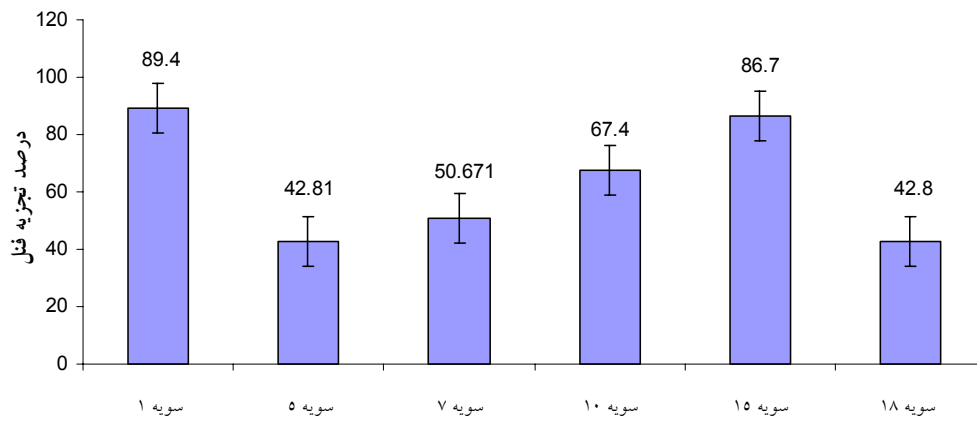
نمودار ۴- منحنی تجزیه سوبه‌های مقاوم در ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل



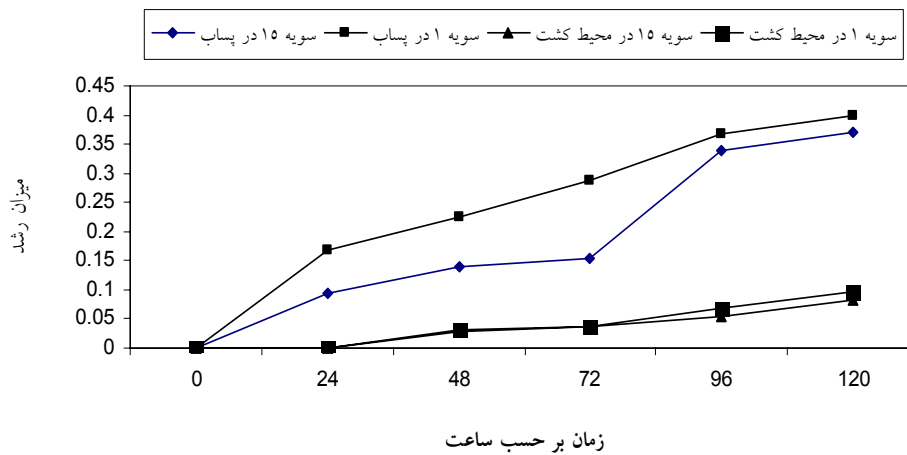
نمودار ۵- منحنی تجزیه سوبه‌های مقاوم در ۳۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل



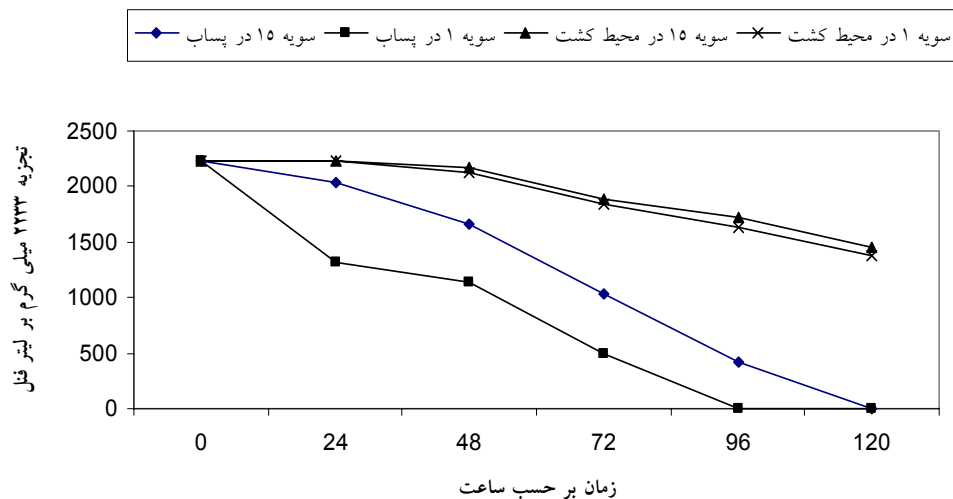
نمودار ۶- منحنی تجزیه سویه‌های مقاوم در ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل



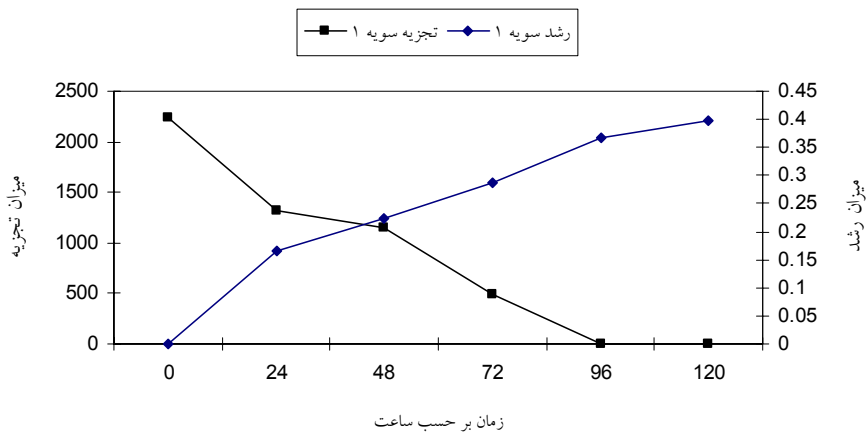
نمودار ۷- درصد حذف فنل توسط سویه‌های مقاوم در محیط کشت حاوی ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل



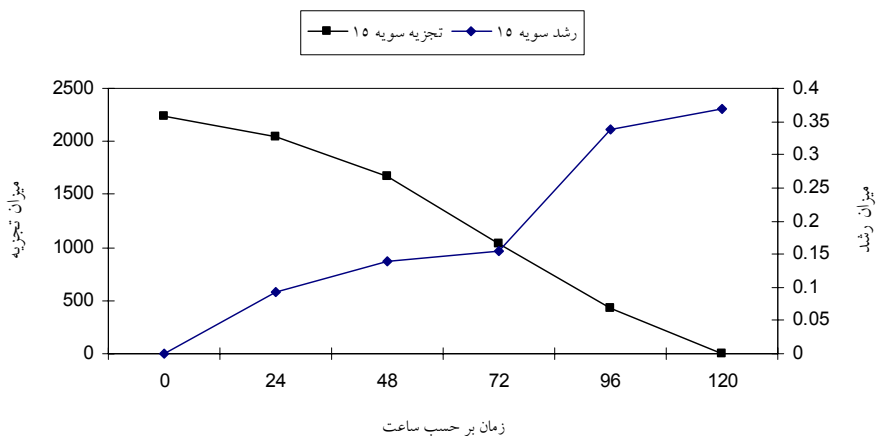
نمودار ۸- مقایسه رشد سویه ۱ و ۱۵ در محیط کشت مصنوعی و پساب B



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

تفسیر نتایج

مقدار فنل هر دو پساب چندین برابر استانداردهای بین‌المللی تعریف شده برای پساب‌های صنعتی بود. از طرفی مقدار استاندارد BOD₅ برای پساب‌های صنعتی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر و حداکثر آن بسته به نوع صنعت و شرایط فیزیکی و شیمیایی آن ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شده است که با توجه به مقدار BOD₅ این دو پساب، مقدار اندازه‌گیری شده برای پساب A بسیار بالاتر است. اما BOD₅ پایین پساب دوم نشان دهنده پاک بودن پساب و یا فقدان میکروارگانیسم‌هایی است که به مصرف اکسیژن نیاز دارند، یا میکروارگانیسم‌ها 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 پساب‌های صنعتی ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شده که مقدار حداکثر آن ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است. COD هر دو پساب مورد آزمایش بسیار بالاتر از استانداردهای ارایه شده است. بالاتر بودن میزان COD نسبت به BOD₅ به این دلیل است که وقتی ترکیبات سمی از جمله فنل در پساب وجود داشته باشد، از فعالیت میکروارگانیسم‌هایی که مواد آلی را تخریب می‌کنند کاسته می‌شود و حضور این ترکیبات در طی انجام آزمایش باعث کاهش میزان BOD₅ می‌گردد (۱۶).

لازم به ذکر است این پساب به محیط تخلیه نشده و در بخش کک‌سازی به صورت چرخه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در این مطالعه اقدام به جداسازی سویه‌هایی از باکتری شد که در ۱۰۰۰ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر لیتر برای بررسی رفتار این سویه‌ها منحنی رشد و تجزیه فنل رسم شد. نتایج نشان داد که سویه‌ها در ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل به راحتی رشد کرده و فنل را تجزیه می‌کنند، در حالی که در ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل

رشد با ۱ تا ۲ تاخیر و در ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر 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 هوای پیریدین در حضور فنل به این نتیجه رسیدند که اگر مقدار فنل را از ۵۰۰ به ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برسانند تجزیه زیستی پیریدین محدود می‌شود که این به دلیل ویژگی ممانعت‌کننده 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 میلی‌گرم بر لیتر فنل مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آترازین را تجزیه کند و در مقادیر 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 می‌شود 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 میلی‌گرم بر لیتر باشد باکتری فنل را به سرعت از محیط تصفیه می‌کند، اما زمانی که میزان COD ۲۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باشد سیستم به زمانی بیشتر از ۵ روز برای تصفیه فنل نیاز دارد (۲۱).

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., Shimband, 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. Simultaneous 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.

انتظار میرفت که با توجه به ۴ برابر بودن COD نسبت به مقادیرهای 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 trichloroethene degradation by the *Rhizobium ralstonia* Taiwanese. *Research in microbiology*. Vol. 52. pp: 8-15.

- 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.
- 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. Simultaneous 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