

## در معرض فنل

فرناز امیری (دانشجوی دکترا)

سهیلا یغمایی (دانشیار)

سحر سمیع (کارشناس ارشد)

دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف

در این تحقیق ریزاندامگان تجزیه کننده فنل از لجن فعال سازگار با فنل، که در مدت شش ماه با پساب سنتتیک حاوی فنل در سیستم لجن فعال سازگار شده است، جدا سازی و خالص سازی شده و پس از بررسی عملکرد هر سوش در معرض فنل، در حضور و غیاب سوبسترای کمکی، بهترین سوش میکروبی انتخاب می شود. به منظور مدل سازی سینتیک رشد سلولی، بهترین سوش در معرض غلظت های مختلف فنل در ظروف لرزنده قرار گرفته و رشد آن به همراه مقدار فنل باقی مانده در زمان های مختلف تا تجزیه ی کامل فنل اندازه گیری می شود. سپس با کمک مدل سینتیکی هالدن<sup>۱</sup> و داده های به دست آمده، مدل سازی در محیط MATLAB ۶٫۵ انجام، و ثابت های سینتیکی رشد سلول برابر با  $K_I = ۱۱۵٫۶۲ (mg/L)$  و  $K_S = ۹۲۰٫۳ (mg/L)$ ،  $\mu_m = ۰٫۵۹۲ (۱/h)$  برآورد می شود. مدل سینتیکی تعیین شده برای شبیه سازی فرایند تصفیه ی زیستی و بزرگ نمایی مقیاس، در طراحی واحد صنعتی بسیار مناسب است.

واژگان کلیدی: مدل سینتیکی، معادله ی هالدن، بازدارندگی، فنل، سیستم لجن فعال.

## ۱. مقدمه

صنعتی معادل ۱ میلی گرم در لیتر گزارش شده است. بنابراین برای حفظ اکوسیستم آبی تصفیه ی پساب های صنعتی قبل از ورود به منابع آبی ضروری است.<sup>[۱]</sup> روش های تصفیه ی متعددی برای کاهش محتوای فنل در پساب وجود دارد. روش های تصفیه به دو دسته ی فیزیکی - شیمیایی و زیستی تقسیم می شوند. از روش های فیزیکی - شیمیایی موجود برای تصفیه ی پساب حاوی فنل می توان به اکسایش شیمیایی، جذب سطحی، استخراج با حلال، فرایند غشایی و... اشاره کرد.<sup>[۲]</sup> این روش ها پرهزینه اند و منجر به تشکیل ترکیبات سمی ثانویه، مانند فنل های کلرینه، می شوند. روش های تصفیه ی زیستی به دلیل هزینه ی کم تر و سازگاری با محیط زیست بسیار مورد توجه اند.<sup>[۳-۸]</sup>

«ریزاندامگان» عامل اصلی تصفیه در سیستم تصفیه ی زیستی اند. ریزاندامگان تجزیه کننده ی آلاینده های سمی در طبیعت وجود دارند و به لحاظ توانایی تجزیه ی زیستی رفتارهای متفاوتی نشان می دهند. از آنجا که گونه های میکروبی مؤثر در فرایند تصفیه، بسته به نوع ماده ی آلاینده و نوع سیستم تصفیه متفاوت اند، شناسایی و معرفی این گونه ریزاندامگان و به دست آوردن سینتیک رشد آنها در معرض آلاینده ی مورد نظر برای استفاده ی طراحان و بهره برداران سیستم های تصفیه پساب بسیار مفید است.<sup>[۳-۱۰]</sup> به عنوان مثال این امر به فناوری زیست افزایی<sup>۳</sup> که در راستای بهبود عملکرد سیستم های تصفیه ی زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته، کمک شایانی می کند. زیست افزایی عبارت است از کاربرد یک ریزاندام انتخاب شده برای افزودن به

پیشرفت و توسعه ی فعالیت های صنعتی و کشاورزی به تولید ترکیبات آلی سمی با عنوان ترکیبات زئوبیوتیک<sup>۲</sup> انجامیده است. از جمله ی این ترکیبات می توان به ترکیبات آروماتیک، خصوصاً آروماتیک های تک حلقه یی که جزو آلاینده های درجه ی اول شناخته شده اند، اشاره کرد.<sup>[۱]</sup> این ترکیبات به دلیل آثار شناخته شده یا مشکوک در سرطان زایی، جهش زایی، آسیب رسانی به جنین، یا سمی بودن بسیار شدید از مقررات کنترلی خاصی برخوردارند.<sup>[۳]</sup>

فنل و ترکیبات فنلی از جمله ترکیبات آروماتیک تک حلقه یی هستند که به طور معمول در پساب های خروجی صنایع مختلف - از قبیل پالایش نفت و پتروشیمی، تولید فنل و رزین های فنلی، دارویی، چوب و کاغذ، تولید انواع حشره کش ها و سموم کشاورزی، چرم و دباغی، رنگ، تولید انواع مواد پاک کننده و غیره - وجود دارند.<sup>[۴-۶]</sup>

بر اساس آخرین اطلاعات به دست آمده از سازمان محیط زیست، حد مجاز فنل برای تخلیه به آب های سطحی معادل ۱ میلی گرم در لیتر، برای مصارف کشاورزی و آبیاری نیز معادل ۱ میلی گرم در لیتر و برای تخلیه به چاه جاذب بسیار ناچیز ذکر شده است. با توجه به اینکه فرایندهای تصفیه موجب افزایش بوی بسیاری از ترکیبات فنلی می شود، توصیه می شود که در منابع آب مصرفی عمومی، غلظت ترکیبات از ۱ میلی گرم در لیتر تجاوز نکند. همچنین حد مجاز فنل خروجی از پساب حاصل از کارخانجات

یک فرایند تصفیه‌ی پساب در حال کار، به منظور ارتقاء کیفیت آب یا کاهش هزینه‌های عملیاتی است. [۱۶-۱۳، ۱۰، ۸، ۷] اگرچه این احتمال وجود دارد که توده‌ی ریزاندامگان بومی در مسیر قابل قبولی توسعه یابند ولی با توجه به محدودیت‌های عملیاتی، تغییرات احتمالی ترکیب پساب ورودی، و آشفتگی‌های سیستم، و نیز به منظور حفظ تنوع مخلوط میکروبی می‌توان با معرفی ریزاندامگان برتر بر این مشکلات فائق آمد؛ این امر باید در یک وضعیت حساب شده و کنترل شده به منظور حفظ تمامیت اکوسیستم میکروبی صورت پذیرد. افزون بر این، بعد از شناسایی ریزاندام‌ها، می‌توان با استفاده از دانش بیوتکنولوژی و روش‌های مهندسی ژنتیک، قابلیت‌های آنها را برای تجزیه‌ی آلاینده‌ی مورد نظر و مشتقات آن افزایش داد. [۱۸-۱۴، ۱۱]

مدل‌های سینتیکی مختلفی برای نشان‌دادن بازدارندگی رشد ریزاندامگان در معرض ترکیبات سمی (مانند فنل) وجود دارد. از میان مدل‌های موجود، مدل هالدن به دلیل سادگی ریاضی و برخورداری از ثابت بازدارندگی سوبسترا، برای محاسبه‌ی پارامترهای سینتیکی محیط‌های کشت خالص و مخلوط در حالت‌های پیوسته و ناپیوسته بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اکثر تحقیقات صورت‌گرفته در زمینه‌ی تجزیه‌ی زیستی فنل، سینتیک رشد باکتری‌هایی مانند *Pseudomonas pudita*، *Pseudomonas fluorescens*، *Acinetobacter calcoaceticus*، *Pseudomonas cepacia* و *Bacillus brevis* مورد بررسی قرار گرفته است. سرعت رشد بیشینه‌ی به دست آمده با استفاده از معادله‌ی هالدن برای محیط کشت‌های خالص و مخلوط در محدوده‌ی  $0.51 - 0.61 h^{-1}$  گزارش شده است. ثابت اشباع و بازدارندگی سوبسترا، بسته به نوع ریزاندام و محیط کشت استفاده شده، محدوده‌ی وسیعی را در بر می‌گیرد. [۱۸، ۸، ۶، ۵]

## ۲. روش تحقیق

### ۲.۱. تولید لجن فعال سازگار با فنل

از لجن تصفیه‌خانه‌ی پساب شهری (تصفیه‌خانه‌ی فیظریه) برای تولید لجن فعال و سپس سازگار کردن آن با فنل استفاده شد. برای تقویت مخلوط میکروبی، لجن اولیه در سیستم لجن فعال (راکتور شیشه‌ی دارای محفظه‌ی هوادهی به حجم ۷ لیتر و مخزن ته‌نشینی به حجم ۱/۵ لیتر) به مدت یک ماه توسط ملاس با  $COD = 150 mg/L$  به صورت پیوسته خوراک‌دهی شده و در ضمن اوره و فسفات به عنوان منابع نیتروژن و فسفر به‌گونه‌ی اضافه می‌شود که  $COD : N : P$  برابر با ۱ : ۵ : ۱۰۰ باشد. سپس به تدریج غلظت ملاس در مدت ۱ ماه تا  $COD = 700 mg/L$  افزایش داده می‌شود. در طی این مرحله به تدریج رنگ لجن از سیاه به قهوه‌ی طلایی تغییر می‌یابد که این تغییر رنگ نشان‌دهنده‌ی فعال شدن لجن است. در مرحله‌ی بعد با پایین آوردن تدریجی غلظت ملاس و بالابردن غلظت فنل در مدت ۶ ماه، توده‌ی زیستی با غلظت  $700 mg/L$  فنل سازگار می‌شود. در طی مرحله‌ی سازگاری، ریزاندامگان موجود در مخلوط میکروبی محدود و محدودتر می‌شود و فقط ریزاندامگان قادر به تحمل فنل در سیستم باقی می‌مانند که با القاء آنزیم‌های لازم در آنها به منظور استفاده از فنل به عنوان منبع کربن و انرژی، قادر به تجزیه‌ی زیستی فنل خواهند شد.

### ۲.۲. جداسازی و خالص‌سازی ریزاندامگان تجزیه‌کننده‌ی فنل از

#### لجن فعال سازگار با فنل

در این مرحله سعی بر آن است تا از لجن فعال سازگار شده با فنل، ریزاندامگان

تجزیه‌کننده‌ی فنل جداسازی و خالص‌سازی شود. به این ترتیب از پالوت نمونه‌گیری شده و بعد از مطالعات میکروسکوپی مشخص می‌شود که لجن سازگار شده با فنل حاوی پنج‌گونه ریزاندامگان است. برای جداسازی ریزاندامگان تجزیه‌کننده‌ی فنل، از دو نوع محیط کشت جامد نوترینت آگار<sup>۴</sup> برای جداسازی باکتری‌ها و پتیتو - دکستروز - آگار<sup>۵</sup> (*PDA*) برای جداسازی قارچ‌ها (مخمر و کپک) استفاده می‌شود. بعد از تهیه‌ی محیط‌های کشت جامد و سترون‌سازی در اتوکلاو (در دمای  $120^{\circ}C$  و ۱۵ پوند فشار به مدت ۲۰ دقیقه)، و تهیه‌ی سوسپانسیون‌های میکروبی با رقت‌های  $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$  و  $10^{-5}$  از نمونه‌ی گرفته‌شده از پالوت، تلقیح در شرایط کاملاً استریل به پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد نوترینت آگار و پتیتو - دکستروز - آگار، صورت می‌پذیرد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای  $34^{\circ}C$  از روی رنگ و شکل کلنی‌های رشد یافته در محیط‌های کشت جامد، پنج نوع سوش میکروبی تشخیص داده می‌شود: سه گونه‌ی میکروبی از محیط نوترینت آگار که  $N1$  (توده‌ی نارنجی‌رنگ) و  $N2$  (توده‌ی شفاف) و  $N3$  (توده‌ی سفید) نام می‌گیرد و دو گونه از محیط پتیتو - دکستروز - آگار که  $P1$  (توده‌ی شیری‌رنگ) و  $P2$  (توده‌ی سفیدرنگ) نامیده می‌شود. سپس همچون گذشته دو محیط کشت جامد نوترینت آگار و پتیتو - دکستروز - آگار آماده شده و از هر کلنی در محیط کشت جامد مربوطه، یک کشت خطی تهیه می‌شود. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری پلیت‌ها در دمای  $34^{\circ}C$ ، با مشاهده‌ی توده‌های هم‌رنگ و هم‌شکل در هر کشت خطی و بررسی میکروسکوپی آنها، این نتیجه حاصل می‌شود که کشت‌های خطی خالص‌اند و در هر محیط کشت، توده‌های رشد یافته از یک گونه‌ی میکروبی‌اند. در مرحله‌ی بعد برای خالص‌سازی نهایی از توده‌های تشکیل شده در کشت خطی، برای هر پنج گونه‌ی میکروبی به‌طور جداگانه اسلنت (محیط کشت جامد شیب‌دار) تهیه می‌شود. به این منظور بعد از آماده‌سازی محیط کشت‌های نوترینت آگار و پتیتو - دکستروز - آگار و سترون‌سازی و تهیه‌ی اسلنت خام در لوله‌های آزمایش، تلقیح از محیط‌های حاوی کشت خطی توسط لوپ در شرایط کاملاً استریل به اسلنت خام صورت می‌پذیرد.

### ۲.۲. بررسی عملکرد ریزاندام جداسازی و خالص شده

در این مرحله، نخستین گام برای تعیین نوع ریزاندامگان جداسازی و خالص شده، شناختن ریزاندامگان از نظر مورفولوژی است. با مطالعه‌ی مستقیم میکروسکوپی و انجام رنگ‌آمیزی گرم به منظور تعیین گرم سوش‌های  $N1$ ،  $N2$  و  $N3$  اطلاعات مفیدی درباره‌ی ریزاندامگان به دست می‌آید.

برای انتخاب بهترین سوش میکروبی جداسازی و خالص شده، ابتدا سوش‌های میکروبی به‌طور جداگانه در محیط پیش‌کشت غنی‌سازی می‌شوند. این محیط برای سوش‌های  $N1$  و  $N2$  و  $N3$  محلول نوترینت برات<sup>۶</sup> ( $NB$ ) و برای سوش‌های  $P1$  و  $P2$ ، محیط اختصاصی مخمر بیست - مالت<sup>۷</sup> ( $YM$ ) است. از طرف دیگر محیط اختصاصی فنل طبق جدول ۱ تهیه می‌شود.

فنل به دلیل سمی بودن همیشه بعد از استریل شدن محیط کشت اختصاصی در شرایط استریل به محیط اضافه می‌شود. برای این منظور محلول حاوی  $10 g/L$  فنل تهیه شده و در ارلن درپوش‌دار درون یخچال نگه‌داری می‌شود. به دلیل وجود احتمال تغییر غلظت فنل، به‌هنگام استفاده از این محلول ابتدا غلظت فنل آن اندازه‌گیری می‌شود. حجمی از محلول استوک فنل (با توجه به غلظت فنل در آن) که در  $100 ml$  محیط کشت اختصاصی غلظت  $500 mg/L$  فنل را ایجاد کند محاسبه، و در زیر هود و شرایط استریل به ارلن‌های حاوی محیط کشت اختصاصی اضافه می‌شود.

غلظت (g/l)	ترکیب
۳	$(NH_4)_2SO_4$
۰٫۶	$KH_2PO_4$
۲٫۴	$K_2HPO_4$
۱٫۵	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
۰٫۱۵	$CaSO_4$
۰٫۰۳	$FeSO_4$

### ۳. روش‌های اندازه‌گیری

به منظور اندازه‌گیری غلظت فنل، از روش رنگ‌سنجی مستقیم بر پایه‌ی تغلیظ سریع با ۴- آمینو آنتی پیرین به دنبال اکسیداسیون با پتاسیم فروسیانید و خواندن جذب در طول موج بیشینه  $500\text{ nm}$  (توسط دستگاه Spectronic ۲۱D)، استفاده می‌شود. به این منظور منحنی استاندارد براساس چگالی نوری برحسب غلظت فنل در نمونه‌های استاندارد تهیه می‌شود. [۱۹]

با توجه به این‌که غلظت سوسپانسیون تلقیح مخمر و باکتری باید به ترتیب  $10^6\text{ cells/ml}$  و  $10^8\text{ cells/ml}$  باشد و نیز به دلیل وقت‌گیر بودن عملیات شمارش، بعد از انجام شمارش به وسیله‌ی لام نئو بار، چگالی نوری سوسپانسیون تلقیح شمارش‌شده‌ی هر سوش در طول موج بیشینه‌ی  $600\text{ nm}$  (محدوده‌ی نور مرئی) خوانده می‌شود. این مقدار برای سوسپانسیون تلقیح سوش  $P1$  و  $P2$  که مخمر هستند برابر با  $0٫۵$ ، برای سوسپانسیون تلقیح سوش  $N1$  که باسیل گرم منفی است برابر با  $0٫۵$ ، و برای سوسپانسیون تلقیح سوش  $N2$  و  $N3$  که کوکسی هستند برابر با  $0٫۱۸$  به دست می‌آید. به این ترتیب، به منظور آماده‌سازی سوسپانسیون تلقیح با غلظت مورد نظر، به جای شمارش میکروبی از روش اندازه‌گیری چگالی نوری استفاده می‌شود. [۲۵]

به منظور به دست آوردن چگالی سلولی، بعد از آماده‌سازی سوسپانسیون‌های میکروبی با غلظت‌های مختلف و خواندن چگالی نوری آنها در محدوده‌ی نور مرئی و طول موج  $600\text{ nm}$  (از محیط شاهد برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده می‌شود)، وزن خشک سلولی هر سوسپانسیون، به روش وزنی و خشک کردن در دمای  $105^\circ\text{C}$  به دست آمده و نمودار استاندارد براساس وزن خشک سلولی برحسب چگالی نوری تهیه می‌شود. [۱۸]

### ۴. نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از مطالعات میکروسکوپی سوش‌های جداسازی و خالص‌سازی شده از لجن فعال سازگار با فنل، در جدول ۲ ارائه شده است. عملکرد هر یک از سوش‌های جداسازی و خالص‌شده در معرض  $500\text{ mg/L}$  فنل در دو حالت A (سوش میکروبی غنی‌شده بعد از رقیق شدن با سرم فیز بولوژی یک و رسیدن به غلظت دلخواه به محیط اختصاصی فنل اضافه می‌شود) و B (سوش میکروبی غنی‌شده بعد از رقیق شدن با محلول نوترینت برات - درمورد سوش‌های  $N1$ ،  $N2$  و  $N3$  - یا  $YM$  - درمورد سوش‌های  $P1$  و  $P2$  - و رسیدن به غلظت دلخواه به محیط اختصاصی فنل اضافه می‌شود)، بعد از ۲۴ ساعت بررسی شد که نتایج به دست آمده در شکل ۱ ارائه شده است.

جدول ۲. اطلاعات به دست آمده از مطالعات میکروسکوپی سوش‌های جداسازی و خالص شده.

شکل ظاهری سوش	تست گرم	نام سوش
میله‌یی (باسیل)	گرم منفی	$N1$
کروی (کوکسی)	گرم مثبت	$N2$
کروی (کوکسی)	گرم منفی	$N3$
مخمر (بیضوی)	- -	$P1$
مخمر (گردتر و بزرگتر از $P1$ )	- -	$P2$

یک ارلن به عنوان شاهد انتخاب شده که تلقیح در مورد آن صورت نمی‌گیرد، و در شرایط یکسان با سایر ارلن‌ها قرار می‌گیرد؛ سپس مقدار حذف فنل با توجه به مقدار غلظت فنل در شاهد تعیین می‌شود. برای هر سوش میکروبی یک ارلن A و یک ارلن B در نظر گرفته می‌شود.

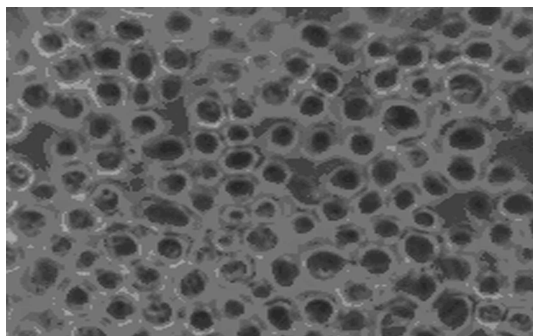
- در دسته‌ی A سوش میکروبی غنی‌شده پس از رقیق‌سازی توسط سرم فیز بولوژی یک استریلیزه و رسیدن به غلظت مورد نظر ( $10^6\text{ cells/ml}$  مخمر و  $10^8\text{ cells/ml}$  باکتری)، به میزان  $1\%$  ( $10\text{ ml}$ ) به ارلن حاوی محیط کشت اختصاصی تلقیح می‌شود.
- درمورد دسته‌ی B سوش میکروبی غنی‌شده پس از رقیق‌سازی توسط محلول نوترینت برات (درمورد سوش‌های  $N1$ ،  $N2$  و  $N3$ ) یا  $YM$  (درمورد سوش‌های  $P1$  و  $P2$ ) و رسیدن به غلظت مورد نظر ( $10^6\text{ cells/ml}$  مخمر و  $10^8\text{ cells/ml}$  باکتری)، به میزان  $1\%$  حجمی ( $10\text{ ml}$ ) به ارلن حاوی محیط کشت اختصاصی تلقیح می‌شود.

پس از اتمام تلقیح، همه‌ی ارلن‌ها به همراه شاهد در انکوباتور لرزان در دمای  $34^\circ\text{C}$  و دور  $180\text{ rpm}$  به مدت ۲۴ ساعت گرمادهی می‌شوند. پس از گذشت ۲۴ ساعت و اندازه‌گیری مقدار فنل باقی‌مانده، درصد حذف فنل محاسبه شده و بهترین سوش تعیین می‌شود.

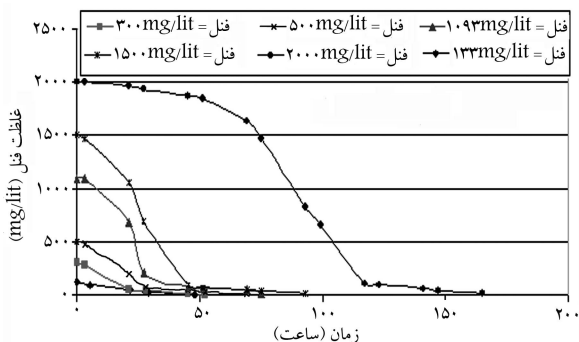
#### ۴.۲. انجام آزمایشات با سوش انتخاب شده به صورت ناپیوسته

به منظور مدل‌سازی سینتیک رشد، در این مرحله سوش انتخاب شده به صورت ناپیوسته در مقیاس آزمایشگاهی در ظروف ارلن مایر  $500\text{ ml}$  میلی لیتری حاوی  $10^6\text{ ml}$  محیط کشت اختصاصی فنل، در معرض غلظت‌های مختلف فنل (۳۳، ۳۰۰، ۵۰۰، ۹۳، ۱۵۰ و  $2000$  میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان تنها منبع کربن قرار گرفته و مقدار حذف فنل و همچنین رشد آن در زمان مورد بررسی قرار می‌گیرد.

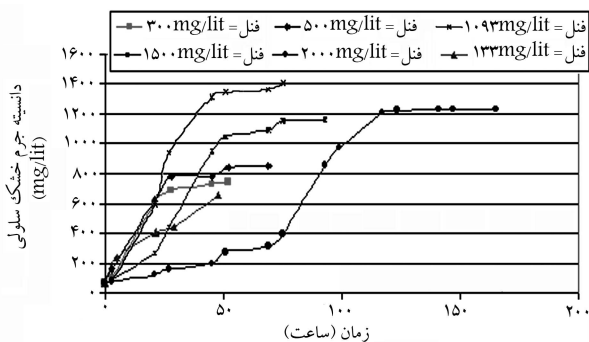
به این منظور برای انجام آزمایشات در هر غلظت انتخابی برای فنل، ابتدا سوش انتخاب شده غنی‌سازی می‌شود. سپس تعدادی ارلن در نظر گرفته می‌شود که با افزایش غلظت فنل و در نتیجه افزایش زمان لازم برای تجزیه کامل فنل تعداد ارلن‌ها افزایش می‌یابد. پس از آماده‌سازی محیط اختصاصی فنل، اتوکلاو صورت می‌گیرد. حجمی از محلول استوک فنل (با توجه به غلظت فنل در آن) که در  $10\text{ ml}$  محیط کشت اختصاصی غلظت مورد نظر فنل را ایجاد کند محاسبه، و در زیر هود و شرایط استریل به ارلن‌های حاوی محیط کشت اختصاصی اضافه می‌شود. سوش میکروبی غنی‌شده پس از رقیق‌سازی و رسیدن به مقدار غلظت مورد نظر ( $10^6\text{ cells/ml}$ )، به میزان  $1\%$  ( $10\text{ ml}$ ) به ارلن حاوی محیط کشت اختصاصی تلقیح می‌شود. در زمان‌های مختلف مقدار فنل و ریزاندامگان اندازه‌گیری می‌شود. این روند تا رسیدن به مقادیر بسیار کم فنل ادامه می‌یابد.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپی مخمر BBRC-۹۰۲۶ (×۵۰۰).



شکل ۴. تغییرات غلظت فنل با زمان در غلظت‌های اولیه‌ی مختلف فنل.



شکل ۵. تغییرات چگالی جرم خشک سلولی مخمر BBRC-۹۰۲۶ با زمان در غلظت‌های اولیه مختلف فنل.

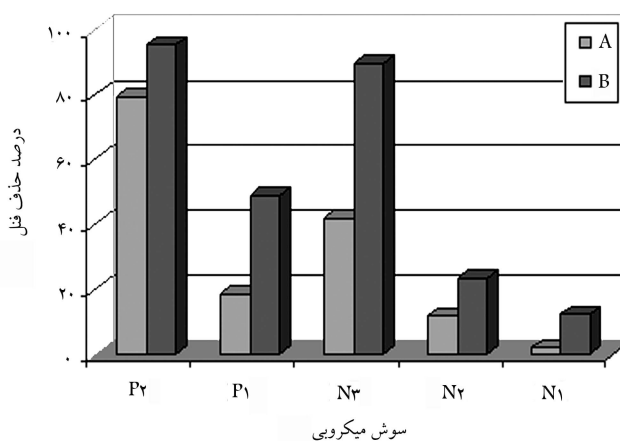
مخمر صورت گرفته و داده‌های حاصل در شکل‌های ۴ و ۵، نشان داده شده است. در نتیجه‌ی این آزمایشات مشخص شد که هرچه غلظت اولیه‌ی فنل بیشتر باشد، زمان بیشتری برای تجزیه‌ی آن لازم است. با توجه به نمودار غلظت فنل بر حسب زمان (شکل ۴)، غلظت‌های پائین فنل بدون فاز تأخیر توسط مخمر BBRC-۹۰۲۶ تجزیه می‌شود. ولی چنان که مشاهده می‌شود در غلظت  $2000 \text{ mg/L}$  فنل فاز تأخیر قابل ملاحظه‌ی وجود دارد.

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت فنل تا میزان  $1000 \text{ mg/L}$ ، سطح نمودار چگالی جرم خشک سلولی با زمان روند افزایشی دارد ولی به ترتیب با افزایش غلظت فنل به  $1500 \text{ mg/L}$  و  $2000 \text{ mg/L}$  این روند نزولی می‌شود. این نکته نشانگر آن است که با افزایش غلظت فنل، بازدارندگی فنل برای رشد مخمر افزایش می‌یابد.

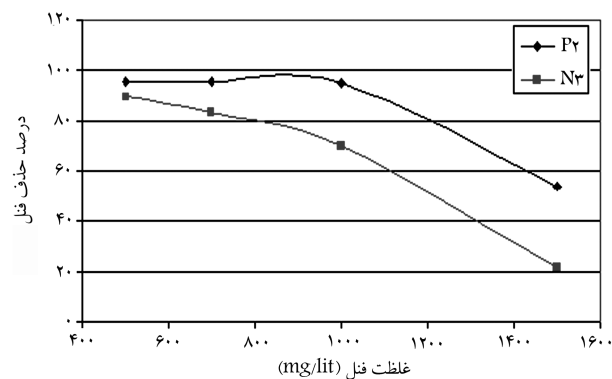
با استفاده از مقادیر چگالی جرم خشک سلولی مخمر BBRC-۹۰۲۶

با توجه به شکل ۱، درصد حذف فنل در ارلن‌های دسته‌ی B نسبت به دسته‌ی A بالاتر است. بر این اساس در حضور سوبسترای کمکی راندمان حذف فنل بیشتر از وقتی است که فنل تنها منبع کربن باشد. از طرف دیگر سوش‌های P۲ و N۳ نسبت به سایر سوش‌های میکروبی عملکرد بهتری در حذف فنل داشته‌اند. سپس عملکرد این دو سوش در معرض سه غلظت دیگر از فنل (۷۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و در حضور سوبسترای کمکی مورد بررسی قرار می‌گیرد. چنان که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، قابلیت مخمر P۲ برای حذف فنل نسبت به سوش N۳ بالاتر است و راندمان حذف آن تا غلظت  $1000 \text{ mg/L}$  بالاتر از ۹۰ درصد است. از طرف دیگر، چنان که در شکل ۱ مشاهده می‌شود اختلاف درصد حذف فنل در حضور و غیاب سوبسترای کمکی برای سوش P۲ کم‌تر از سوش N۳ است. به این ترتیب P۲ به عنوان سوش برتر تجزیه‌کننده‌ی فنل انتخاب می‌شود. این سوش میکروبی هم‌اکنون با کد شناسایی BBRC-۹۰۲۶<sup>A</sup> در بانک میکروبی مرکز تحقیقات بیوشیمی و کنترل محیط زیست دانشگاه صنعتی شریف موجود است (شکل ۳).

به منظور مدل‌سازی سینتیک رشد مخمر BBRC-۹۰۲۶، آزمایش‌هایی به صورت ناپیوسته انجام می‌شود. به این ترتیب که مقدار حذف فنل و همچنین رشد آن با زمان با قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف فنل مورد بررسی قرار می‌گیرد. آزمایشات در غلظت‌های اولیه‌ی مختلف فنل (۱۳۳، ۳۰۰، ۵۰۰، ۱۰۹۳، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و با میزان تلقیح ( $OD_{600} = 0.75$ ) از



شکل ۱. عملکرد پنج سوش میکروبی در حذف فنل در دو حالت A و B.



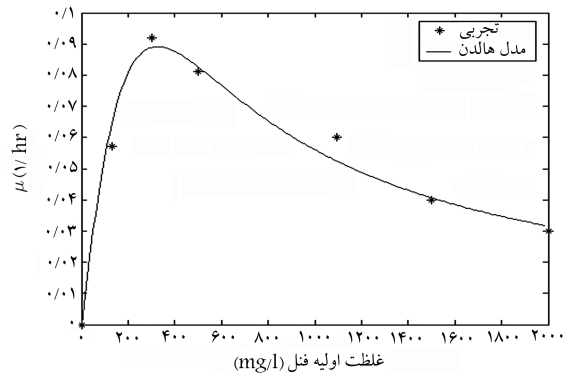
شکل ۲. مقایسه‌ی عملکرد سوش P۲ و N۳.

با روش غیرخطی حداقل مربعات چنین به دست می آید:

$$\mu_m = 0,592 (1/h), \quad K_s = 920,3 (mg/L)$$

$$K_I = 115,67 (mg/L)$$

با استفاده از پارامترهای معادله هالدن و مقادیر اولیه سوبسترا ( $S_0$ )، سرعت ویژه رشد محاسبه شده و برحسب غلظت اولیه فنل رسم می شود (خط پیوسته). این سرعت با سرعت ویژه رشد به دست آمده از داده های تجربی برحسب غلظت اولیه فنل مقایسه می شود (شکل ۶). با توجه به شکل ۶ نمودار مدل شده تقریب خوبی از داده های تجربی است.



شکل ۶. تغییرات سرعت ویژه رشد مخمر BBRC-۹۰۲۶ با غلظت اولیه فنل.

## ۵. نتیجه گیری

ریزاندامگان اجزای مهمی در تصفیه ی پساب های شهری و صنعتی محسوب می شوند، به طوری که جداسازی و خالص سازی ریزاندامگانی که قابلیت انجام کارهای ویژه مانند توانایی تجزیه ی آلاینده های خاص - را دارند، و تعیین سینتیک رشد آنها به منظور فهم ظرفیت ریزاندام برای تجزیه ی آلاینده ی مورد نظر گام مهمی در روند تکاملی سیستم های تصفیه پساب به خصوص تصفیه ی پساب های حاوی مواد سمی محسوب می شود. [۱۲، ۱۳]

آلاینده های سمی از جمله آروماتیک های تک حلقه ای مانند فنل، مانع از رشد ریزاندام هستند. لذا برای به دست آوردن ثابت های سینتیکی ریزاندامگان در معرض این آلاینده ها باید از مدلی استفاده شود که ضریب بازدارندگی در آن لحاظ شده باشد. به این ترتیب از مدل هالدن که یکی از معمول ترین مدل ها برای توصیف بازدارندگی ترکیبات سمی است، استفاده شده است. این مدل سینتیکی همواره مورد توجه محققان بوده و تخمین قابل قبولی از داده های تجربی را ارائه داده است. [۱۸، ۱۲، ۶، ۵]

با توجه به تحقیق صورت گرفته و ثابت های سینتیکی به دست آمده، این نتیجه حاصل می شود که مخمر BBRC-۹۰۲۶، از قابلیت خوبی در تجزیه ی زیستی فنل تا غلظت تقریبی  $2000 \text{ mg/L}$  برخوردار است و می توان از آن به منظور زیست افزایی به منظور بهبود عملکرد سیستم تصفیه ی پساب استفاده کرد. به علاوه مدل سینتیکی تعیین شده وسیله ی مناسبی برای مدل سازی و شبیه سازی فرایند تصفیه ی زیستی و نیز بزرگ نمایی مقیاس برای طراحی واحد صنعتی است. [۱۳، ۵]

در فاز رشد لگاریتمی در معرض غلظت های اولیه  $133, 300, 500, 1093$ ،  $1500$  و  $2000$  میلی گرم بر لیتر از فنل و با میزان تلقیح  $OD_{600} = 0,75$  از مخمر، سینتیک رشد مخمر BBRC-۹۰۲۶ با استفاده از روش های حل عددی در محیط  $MATLAB 6/5$  مدل می شود. معادله ی هالدن به صورت معادله ی ۱ نوشته می شود:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (1)$$

که در آن،  $\mu$  سرعت رشد ویژه ( $h^{-1}$ )،  $\mu_{max}$  سرعت رشد ویژه بیشینه ( $h^{-1}$ )،  $S$  غلظت سوبسترا ( $mg/L$ )،  $K_S$  ثابت اشباع سوبسترا ( $mg/L$ )،  $K_I$  ضریب بازدارندگی سوبسترا ( $mg/L$ ) و  $X$  چگالی جرم خشک سلولی ( $mg/L$ ) معادله ی هالدن به دلیل سادگی ریاضی و کم بودن تعداد ثوابت آن، و نیز به علت در نظر گرفتن ثابت بازدارندگی سوبسترا بسیار مورد توجه است.

به منظور مدل سازی ابتدا با استفاده از داده های مربوط به چگالی جرم خشک سلولی مخمر در فاز رشد لگاریتمی برای هر غلظت اولیه فنل، سرعت ویژه رشد مخمر ( $\mu$ )، از معادله ی (۲)  $\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu \cdot t$  با استفاده از روش حداقل مربعات، به دست می آید.  $X_0$  برابر با چگالی جرم خشک سلولی در لحظه شروع است. با داشتن غلظت های اولیه فنل ( $S_0$ )، و به دست آوردن سرعت ویژه رشد مخمر ( $\mu$ )، پارامترهای معادله ی هالدن ( $K_S, \mu_m, K_I$ ) از طریق برازش منحنی<sup>۱</sup>

## پانویس

1. Haldane
2. xenobiotic
3. bioaugmentation
4. nutrient agar
5. potato-dextrose-agar
6. nutrient broth
7. yeast-malt
8. biochemical and bioenvironmental research center
9. least squares
10. curve fitting

## منابع

1. Environmental regulations and standards, Iran department of environment publications, (summer, 1378).
2. Cardinal, L.J., and Stenstrom, M.K. "Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in the activated sludge process", *Research Journal Water Pollution Control* 63, (7) pp.950-957 (1997).
3. Ng, A., et al, "Nitrification enhancement in the powdered activated carbon- activated sludge process for the treatment of petroleum refinery wastewaters", *J. Water*

- Pollut. Control Fed.*, **56**, p. 157 (1987).
4. Stenstrom, M.K.; Cardinal, L., and Libra, J. "Treatment of hazardous substances in wastewater treatment plants", *Environmental Progress*, **8**(2), pp. 107- 112 (1989).
  5. Arutchelvan, V.; Kanakasabai, V.; Elangovan, R.; Nagarajan, S., and Muralikrishnan, V. "Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*", *Journal of Hazardous Material*, **129**, pp.216-222 (2006).
  6. Kumar, A.; Kumar, Sh., and Kumar, S. "Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC1194", *Biochemical Engineering Journal*, **22**, pp. 151-159 (2005).
  7. Yaghmaei S., Amiri, F. and Samie, S., "Application of bioaugmentation technology to improve the activated sludge treatment process in removal of aromatic compounds", The 11th Iranian Chemical Engineering Congress, 28th-30th, (November, 2006).
  8. Quan, X.; Shi, H.; Liu, H.; Lv P, and Qian, Y. "Enhancement of 2,4- dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture", *Water Research*, **38**, pp. 245-253 (2004).
  9. Yaghmaei, S. "Studies on treatment of carbonaceous wastewater by fixed film aeration tank", *Scientia Iranica*, (1), **9**, pp. 47-52 (2002).
  10. Wilderer, P.A.; Rubio, M.A., and Davids, L. "Impact of the addition of pure cultures on the performance of mixed culture reactors", *Water Research*, **25**, pp. 1307-13 (1991).
  11. Amiri, F., Yaghmaei, S. and Samie, S., "Bioaugmentation technology and its application in bioremediation", *Iranian Journal of Chemical Engineers (Persian)*, **5** (22), pp.6-14 (1385).
  12. Sahinkaya, E., and Dilek, F.B. "Biodegradation of 4- chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge- evaluation of biokinetic coefficients", *Environmental Research*, **99**, pp. 243-252 (2005).
  13. Yaghmaei, S. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by some bacteria isolated from coal tar contaminated soil", *Scientia Iranica*, **8**(3), pp. 197-202 (2001).
  14. Dybas, M.J.; Hyndman, D.W.; Heine, R.; Tiedje, J.; Linning, K.; Wiggert, D.; Voice, T.; Zhao, X.; Dybas, L., and Criddle, C.S. "Development, operation, and long-term performance of a full-scale biocurtain utilizing bioaugmentation", *Environ. Sci. Technol.* **36**, pp. 35-36, (2002).
  15. Yaghmaei, et al. "Experimental comparison of two modifications of activated sludge for treatment of furfural-containing wastewater", *Iranian Journal of Chemical Engineering*, **2**(1), pp. 3-9 (2005).
  16. Yu, Z., and Mohn, W.W. "Bioaugmentation with resinacid- degrading bacteria enhances resin removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents", *Water Research*, **35**, pp. 883- 890 (2001).
  17. Bouchez, T.; Patureau, D.; Wagner, M.; Delgenes, J.P., and Moletta, R. "Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization", *Water Sci Technol*, **41**, pp. 61-68 (2000).
  18. Wang, S.J., and Loh, K.C. "Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation", *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, pp. 177-184 (1999).
  19. APHA, AWWA and WPCF, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 18<sup>th</sup> ed., American public Health Association, Washington, DC, (1994).