Journal of Health and Safety at Work 2023; 13(3): 531-543

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Investigation of Biodegradation of Toluene in Suspension Growth Reactor Containing Pseudomonas Putida

Samaneh Khodaverdloo[1], Mohammad Reza Pourmand[2], Ensieh Masoorian[2], Roohollah Ghasemi[3], Saba Kalantari[1], Farideh Gholbabaie[1*]

[1]Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Received: 2020-05-20 Accepted: 2023-08-14

ABSTRACT

Introduction: Toluene is significant pollutants in the air. Long-term exposure to toluene can lead to adverse effects. Biofiltration is one of the air pollutant control methods. In this study, Pseudomonas putida was selected as a microorganism capable of hydrocarbon degradation and its ability to biodegrade toluene in a suspension growth reactor was also investigated.

Material and Methods: Experiments were conducted in two days and in five hours. Each method consisted of three sample reactors (A, B, C) and one control reactor (D). In the first method, the amount of bacteria in the sample reactors is 0.5, 1 and 2 McFarland and the amount of toluene injection into the reactors is the same (0.5 microliters) and in the second method, the amount of toluene injection into the sample reactors is 0.5, 1 and 1.5 microliter and 1.5 microliter in the control reactor and the amount of bacteria in them was the same (1 McFarland).Toluene gas samples and carbon dioxide were periodically analyzed.

Results: In the first method of toluene decomposition, there was a significant difference between the three reactors (p-value = 0.002). The results of the second method were also significantly different between the three reactors (p-value<0.001). The decomposition of toluene in two methods also had a significant difference (p-value = 0.232). The amount of CO2 production was significantly different in the second method (p-value=0.003) and the first method (p-value<0.001), but no significant difference was observed in the comparison of the two methods (p-value=0.15).

Conclusion: Increasing bacterial in suspension growth reactor resulted in increased toluene biodegradation in shorter time while increasing toluene in suspension growth reactor may not have an additive effect on the biodegradation process.

Keywords: *Biodegradation, Toluene, Pseudomonas putida, Suspended-Growth Reactor (SGR)*

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Khodaverdloo S, Pourmand M, Masoorian E, Ghasemi R, Kalantari S, Gholbabaie F. Investigation of Biodegradation of Toluene in Suspension Growth Reactor Containing Pseudomonas Putida. J Health Saf Work. 2023; 13(3): 531-543.

1. INTRODUCTION

Volatile organic compounds are significant pollutants in the air because they have a direct impact on human health and the environment. These compounds evaporate quickly into the atmosphere and can be dispersed over a wide area. VOCs are mainly found in the atmosphere due to their relatively high vapor pressure and cause various environmental problems. Toluene is the most commonly used aromatic compound as a solvent among volatile organic compounds. This substance is an aromatic compound with a benzene ring and has properties similar to benzene, but with less volatility than it. It is used as a solvent in the preparation of paints, polishes, adhesives, rubber and plastic, and the production of various chemical compounds. Long-term exposure to toluene

* Corresponding Author Email: *fgolbabaei@tums.ac.ir*

Copyright © 2023 The Authors.
Published by Tehran University of Medical Sciences

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

can lead to personality disorders such as mental retardation, cerebellar dysfunction, bone marrow damage, and cranial neuropathy. Among VOCs, toluene is a compound that is difficult to biodegrade and remove from the gas stream. In various sources, several approaches have been introduced to control gaseous and vapor pollutants. None of these can be considered as the final pollutant control, and each of them has limitations and only transfers the pollutant from one phase to another. Biofiltration is one of the air pollution control methods that can convert pollutants into harmless compounds without consuming much energy and with high efficiency. However, despite the cost-effectiveness of biofiltration, there are operational problems caused by excessive growth of biomass, drying, and changing the structure of the filter bed. Suspension growth reactor (SGR) is an effective alternative to overcome the above limitations in biofiltration processes. On the other hand, the versatile and powerful enzyme structure found in microorganisms destroys almost all volatile organic compounds (VOCs) pollution. Among the types of microorganisms that can be used in the biofiltration method, Pseudomonas putida is known as the microorganism that has the best characteristics of hydrocarbon-degrading bacteria. In this study, Pseudomonas putida was selected as a microorganism capable of hydrocarbon degradation, and its ability to biodegrade toluene in a suspension growth reactor was also investigated.

2. MATERIAL AND METHODS

A nutrient solution (MSM) consisting of mineral (gr/l) and stock (gr/l) was prepared. Four one-liter reactors containing 250 ml of MSM were prepared and then autoclaved. Bacteria were inoculated in a certain amount in three reactors, and one reactor was included as a control in the experiment. Experiments were conducted in two separate ways for two days in five hours. Each method consisted of three sample reactors (A, B, C) and one control reactor (D). In the first method, the amount of Pseudomonas Putida bacteria in variable suspension (0.5, 1, and 2 McFarland in reactors), and in the second method, the amount of Toluene injection in the reactors was considered the same (0.5 µl in reactors). Moreover, the growth reactor of the different suspensions (0.5, 1, and 1.5 microliters in the reactors and the sample reactor, respectively, 1.5 microliters in the control reactor) and the amount of Pseudomonas Putida bacterium in them was considered the same (one McFarland). Then, the reactor was properly sealed to prevent any leakage. After the injection of toluene, the reactor was placed on a shaker incubator at 100 rpm and at a temperature of 30 °C and 7 pH; in addition to aeration, it would lead to a uniform distribution of toluene in the upper space of the reactor. In both methods, no bacteria were inoculated into the control reactor, and only toluene was injected to ensure the absence of leakage in the reactors. In order to make the density of toluene uniform in the upper space of the reactor and reduce the effect of Henry's law, sampling started 5-15 minutes after injection. Toluene gas samples were periodically removed from the upper space of the reactors and analyzed. The measurement was done by gas chromatography. The gas chromatography machine was equipped with an FID detector model CP-VALUE-3800 manufactured by VARIAN company. The flow rate of the carrier gas was 1.8 ml/min; the temperature of the injection section (injector) was set at 200°C; the column temperature was 130°C; and the detector temperature was set at 240°C. In this regard, the concentration of carbon dioxide in the upper space was also monitored. A CO_2 analyzer model TES-1370 was manufactured by TES Company in Taiwan. In each method, the sensor of the carbon dioxide measuring device was placed inside one of the reactors (so that there is no leakage), and carbon dioxide was measured by direct reading method. In the control reactor, only toluene was injected in two ways, and no bacteria existed in it so that leaks in the reactors could be examined by periodic sampling of the upper space.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The study aimed to investigate the biological degradation of toluene in a suspension growth reactor. The amount of toluene removal in the upper space of the growth reactor by Pseudomonas putida bacteria was investigated using two different methods. The data obtained from the study were analyzed using SPSS statistical software, and various tests were used, including Kolmogorov-Smirnov, one-way variance, Tukey's, and Kruskal-Wallis. The results showed that there was a significant difference between the biological analysis of toluene and the three reactors in the first method (variable bacteria) with a p-value of 0.002. The process of reducing toluene in the control

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

reactor was almost constant, indicating that there was no leakage in the reactors. Due to the constant amount of toluene in the reactors and the increase in biomass, it led to more consumption of toluene by bacteria, and as the biological decomposition of toluene increased, the amount of carbon dioxide production also increased. In the second method (variable toluene), the biological biodegradation of toluene differed significantly between the three reactors with a p-value < 0.001. Furthermore, Tukey's test results showed a significant difference between reactor A and reactor B (p-value = 0.004), and reactor C and reactor B (p-value < 0.001) in the second method. However, there was no significant difference between reactor A and reactor C (p-value = 0.392). At this stage, where the amount of bacteria is fixed and the amount of toluene is different, there is no direct relationship between the variables. It is possible to mention the specific capacity of bacteria in the amount of decomposition, which means that increasing the amount of toluene without increasing the amount of bacteria is practically ineffective and leads to failure in the filtration system. The biological analysis of toluene was compared in two ways and showed no significant difference (p-value = 0.232). The amount of carbon dioxide produced in the reactors in the second method (Toluene variable with p-value = 0.003) and the first method (variable bacteria with p-value < 0.001) were analyzed separately and were significantly different. However, compared to the two methods, no significant differences were observed (p-value=0.15).

4. CONCLUSIONS

The present study showed that increasing the amount of bacteria in a suspension growth reactor resulted in increased toluene biodegradation in a shorter time, while increasing toluene as a source of energy in a suspension growth reactor may not have an additive effect on the biodegradation process. Pseudomonas putida has simple nutritional needs, but its optimal amount has not been determined and should be estimated in other studies so that a system with better efficiency can be designed by controlling the amount of incoming pollutants. This variable needs further investigation. This study was conducted on a laboratory scale and needs to be optimized for use in the industry.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

بررسی تجزیه بیولوژیکی تولوئن در راکتور رشد سوسپانسیون حاوی باکتری سودوموناس پوتیدا

سمانه خداوردلو[۱]، محمدرضا پورمند[۲]، انسیه ماسوریان[۲]، روح اله قاسمی[۳]، صبا کلانتری[۱]، فریده گلبابایی[۱*]

[۱] گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۳۱، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۳

چکیده

مقدمه: تولوئن یکی از رایج‌ترین ترکیب آلی فرار است. مواجهه طولانی مدت با آن منجربه اثرات سوء سلامتی می‌شود. بیوفیلتراسیون یکی از روش‌های کنترل آلاینده‌های آلی هوا است. در این مطالعه باکتری سودوموناس پوتیدا با قابلیت تخریب هیدروکربن انتخاب و توانایی آن در تجزیه بیولوژیکی تولوئن مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: آزمایشات به دو شیوه، در دو روز و به مدت پنج ساعت انجام شد. هر شیوه شامل سه راکتور نمونه (A، B، C) و یک راکتور شاهد (D) بود. در شیوه اول مقدار باکتری در راکتورهای نمونه ۰/۵، ۱ و ۲ مک فارلند و میزان تزریق تولوئن به راکتورها یکسان (۰/۵ میکرولیتر) و در شیوه دوم، میزان تزریق تولوئن به راکتورهای نمونه ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میکرولیتر و نیز ۱/۵ میکرولیتر در راکتور شاهد و مقدار باکتری در آنها یکسان (۱ مک فارلند) بود. نمونه‌های گازی تولوئن و نیز CO_2 به صورت دوره‌ای آنالیز شد.

یافته ها: در شیوه اول تجزیه تولوئن بین سه راکتور اختلاف معنی داری داشت (p-value=۰/۰۰۲). نتایج شیوه دوم نیز بین سه راکتور اختلاف معنی‌دار داشت (p-value<۰/۰۰۱). تجزیه تولوئن در دو شیوه نیز با هم اختلاف معنی داری داشت (p-value=۰/۲۳۲). مقدار تولید CO_2 در شیوه دوم (p-value=۰/۰۰۳) و شیوه اول (p-value<۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌دار داشت ولی در مقایسه دو شیوه باهم اختلاف معنی داری مشاهده نشد(p-value=۰/۱۵).

نتیجه‌گیری: افزایش غلظت باکتری در راکتورهای رشد منجر به افزایش تجزیه تولوئن در زمان کوتاه تری می‌شود ولی افزایش تولوئن در راکتورهای رشد با روند تجزیه بیولوژیکی اثر همسو ندارد.

کلمات کلیدی: *تجزیه بیولوژیکی، تولوئن، سودوموناس پوتیدا، راکتور رشد سوسپانسیون*

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول مکاتبه: *fgolbabaei@tums.ac.ir*

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

مقدمه

ترکیبات آلی فرار(VOCs)[1] به دلیل تأثیر مستقیمی که بر سلامت انسان و محیط زیست بر جای می‌گذارد از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۱). این ترکیبات گروه عمده‌ای از آلاینده‌ها را تشکیل می‌دهند و از منابع مختلفی در هوا منتشر می‌شوند. حضور این آلاینده‌ها در هوا، اتمسفر را سمی کرده و امکان بروز بسیاری از بیماری‌ها و سرطان‌ها را فراهم می‌سازد (۲، ۳). در بین ترکیبات آلی فرار، تولوئن معمول‌ترین و رایج‌ترین ترکیب است. این ماده ترکیبی آروماتیک با حلقه بنزنی است و دارای خواصی مشابه خواص بنزن ولی با فراریت کمتر از آن می‌باشد و به عنوان حلال در تهیه رنگ‌ها، جلاها، انواع چسب، لاستیک و پلاستیک، تولید ترکیبات شیمیایی مختلف و در سایر صنایع کاربرد دارد. مواجهه طولانی مدت با تولوئن می‌تواند منجر به سندرم شخصیتی به صورت زوال عقلی، اختلال عملکرد مخچه، مغز استخوان و نوروپاتی جمجمه شود (۴، ۵). تولوئن حتی در غلظت‌های پایین سرطان زاست و باعث آسیب به کبد و کلیه شده و همچنین می‌تواند اثرات نامطلوبی بر سیستم عصبی مرکزی گذاشته و باعث آسیب ژنتیکی گردد (۶). درمیان VOCsها، تولوئن ترکیبی است که تجزیه بیولوژیکی و حذف آن از جریان گازی دشوار است (۷، ۸). لذا به نسبت سایر VOCsها گزینه بهتری جهت بررسی راندمان حذف خواهد بود.

در منابع مختلف چندین رویکرد به منظور کنترل آلاینده‌های گازی و بخارات معرفی شده‌اند که هیچ یک را نمی‌توان به عنوان کنترل نهایی آلاینده به حساب آورد و هر یک دارای محدودیت هستند و تنها آلاینده را از فازی به فاز دیگر منتقل می‌کنند (۹). بیوفیلتراسیون به عنوان یک روش بیوتکنولوژی می‌تواند بدون نیاز به مصرف انرژی زیاد، با بازدهی بالا و در دما و فشار محیط، آلاینده را به ترکیبات بی‌خطر تبدیل کند. در این سیستم، تجزیه تا آخرین مرحله یعنی ایجاد گازکربنیک و آب انجام می‌شود در حالی‌که در اغلب روش‌های متداول کنترل گازها، فاضلاب تولیدی یا گاز تغلیظ شده بر روی جاذب نیاز به تصفیه ثانویه دارد لذا این روش مقرون به صرفه بوده و بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). با این حال، با وجود مقرون به صرفه بودن بیوفیلتراسیون، مشکلات عملیاتی ناشی از رشد بیش از حد زیست توده، خشک شدن و تغییر ساختار بستر فیلتر در آنها مطرح است (۱۱، ۱۲). در مطالعه مقایسه‌ای که بر روی تجزیه بیولوژکی در راکتور رشد سوسپانسیون و بیوفیلتر در حذف VOCs از هوا انجام شده بود نشان داد که با افزایش دمای تقریبا دو درجه در بیوفیلتر، بستر خشک شده و شکاف بر میدارد و منجر به کاهش حذف VOCs می‌شود ولی راکتورهای رشد سوسپانسیون[2] (SGR) به طور مؤثر گازهای حاوی VOCs را تصفیه می‌کنند (۱۳). و در جریان هوای کمتر به دلیل سرعت هوای پایین‌تر و زمان ماند بیشتر، آلاینده‌ها برای جذب فرصت بیشتری داشته و کارآیی سیستم افزایش می‌یابد (۱۴).

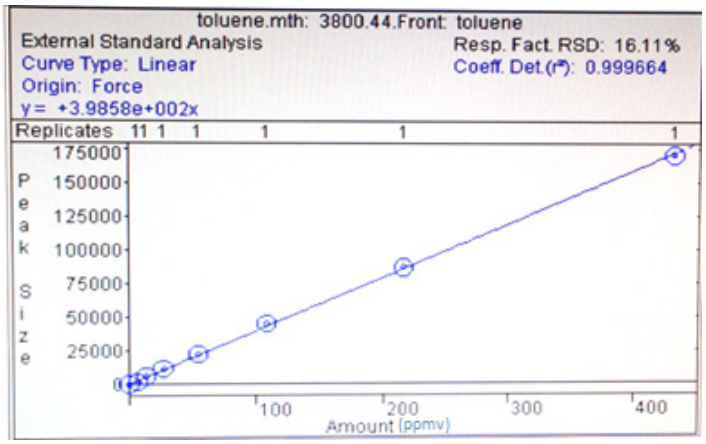
راکتور رشد سوسپانسیون (SGR) جایگزین موثری برای غلبه بر محدودیت‌های فوق در فرآیندهای بیوفیلتراسیون هستند و از نظر ساخت و ساز و کنترل فرآیند قابل اطمینان‌تر هستند (۱۵).

و از طرفی ساختار آنزیمی چندمنظوره و قدرتمند موجود در میکروارگانیسم‌ها تقریباً همه آلودگی‌های ترکیبات آلی فرار (VOCs) را از بین می‌برد (۵) با وجود سمیت بالای ترکیبات آلی فرار، معدنی‌سازی مستقیم یا سوخت و ساز آنها درگونه‌های زیادی از باکتریها و قارچها به طور گسترده‌ای گزارش شده است (۱۶). درمیان انواع میکروارگانیسمهای قابل استفاده در روش بیوفیلتراسیون باکتری سودوموناس پوتیدا به عنوان میکروارگانیسمی که دارای بهترین مشخصه باکتریهای تخریب‌کننده هیدروکربن هاست شناخته شده است (۱۷). در راکتور رشد سوسپانسیون با توجه به محدودیت در فضای فوقانی می‌توان سرعت جریان هوا و دما را تحت کنترل درآورد و از آنجاییکه یکی از دشوارترین آلاینده‌ها در تجزیه بیولوژیکی، تولوئن می‌باشد لذا در این مطالعه توانایی سودوموناس پوتیدا در تجزیه بیولوژیکی تولوئن در راکتور

1. Volatile Organic Compounds (VOCs)

2. Suspended-growth reactor

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]



شکل ۱: منحنی کالیبراسیون برای محدوده تراکم آلاینده مورد مطالعه

رشد سوسپانسیون مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

مواد و تجهیزات

در این مطالعه از سوش استاندارد سودوموناس پوتیدا (PTCC 1694[1]) از خانواده باکتری‌های گرم منفی و میله‌ای شکل، تولوئن ساخت مرک[2]آلمان، دستگاه اسپکتروفتومتری YOHO-UV1700 ساخت کمپانی کشور چین، دستگاه گاز کروماتوگرافی[3] مجهز به دتکتور FID مدل CP-VALUE-3800 ساخت کمپانی VARIAN و دستگاه CO_2 آنالایزرمدل TES-1370 ساخت کمپانی TES تایوان استفاده شد.

دستگاه گازکروماتوگرافی مجهز به ستون ۲۵متری با قطر درونی ۰/۲۵ میلی متری و ضخامت پوشش ۰/۲۵ میکرومتر بود. دبی گاز حامل ۱/۸ میلی لیتر بر دقیقه، دمای بخش تزریق(اینجکتور) برابر با ۲۰۰ درجه سانتی گراد، دمای ستون ۱۳۰ درجه سانتی گراد و دمای دتکتور ۲۴۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. منحنی کالیبراسیون برای محدوده غلظتی صفر تا ۴۵۰ پی پی‌ام نیز ترسیم شد (R^2=۰/۹۹۹) در زمان‌های مشخص با نمونه برداری از ورودی و خروجی هر دو ستون و تزریق به دستگاه گازکروماتوگرافی مجهز به دتکتور میزان جذب و تجزیه تولوئن محاسبه شد.

آماده‌سازی محلول مغذی

محلول مغذی (MSM)[4] متشکل از ماده معدنی (gr/l) و استوک (gr/l) تهیه شد. ماده معدنی شامل ۱ گرم KNO3، ۱ گرم KH2PO4، ۱ گرم K2HPO4، ۱ گرم NaCl، ۰/۴۰۹ گرم MgSO4.7H2O و ۰/۰۲۶ گرم CaCL2.2H2O و استوک نیز شامل ۱/۵گرم FeCL2.4H2O، ۰/۰۶ گرم H3BO3، ۰/۱ گرم MnCL2.4H2O، ۰/۰۱۸ گرم CoCL.6H2O، ۰/۰۷ گرم ZnCL2، ۰/۰۲۵ گرم NiCL2.6H2O، ۰/۰۱۵ گرم CuCL2.2H2O، ۰/۰۲۵گرم NaMoO4.2H2O و ۵/۲گرم EDTA-Na.4H2O می‌باشد. ماده معدنی و استوک به نسبت ۹۹۹ به ۱ میلی لیتر با هم ترکیب شدند (۱۸).

انتخاب‌گونه باکتری

درمیان انواع میکروارگانیسمهای قابل استفاده در روش بیوفیلتراسیون، باکتری سودوموناس پوتیدا به عنوان میکروارگانیسمی که دارای بهترین مشخصه باکتریهای تخریب‌کننده هیدروکربنهاست شناخته شده است (۲۶). از نظر نیازهای غذایی‌گونه‌های سودوموناس، نیاز غذایی بسیار ساده‌ای دارند و در محیط حاوی مقداری ماده آلی

1. Pseudomonas putida
2. Merck
3. Gas chromatography
4. Mineral salt medium

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

در ۸-۷ pH و در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد (در شرایط آزمایشگاهی) به خوبی رشد می‌کند این دمای بهینه برای رشد و فعالیت باکتری است در دماهای بالاتر، امکان مرگ سلول افزایش می‌یابد (۲۷). متابولیسم‌گونه‌های سودوموناس تنفسی بوده و حالت تخمیری ندارند. این باکتری ها قادرند از ۱۵۰ ترکیب آلی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند.

آماده‌سازی سوسپانسیون

به منظور ساخت سوسپانسیون، راکتور شیشه‌ای یک لیتری حاوی ۲۵۰ میلی لیتر از MSM استریل شد. باکتری به میزان مشخص درآنها تلقیح گردید. سپس درب راکتور به شیوه صحیح درزبندی شد تا هیچ‌گونه نشتی نداشته باشد. پس از تزریق تولوئن، راکتور روی انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰rpm و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و pH ۷ قرار گرفت تا علاوه بر هوادهی منجر به یکنواخت شدن توزیع تولوئن در فضای فوقانی راکتور شود (۱۸، ۱۹).

روش آزمایش

چهار راکتور یک لیتری حاوی ۲۵۰ میلی لیتر از MSM آماده و سپس اتوکلاو شدند. باکتری در مقداری مشخص در سه راکتور تلقیح شد و یک راکتور به عنوان شاهد در آزمایش لحاظ گردید. آزمایش به دو شیوه مجزا، در دو روز و به مدت پنج ساعت انجام شد. در شیوه اول غلظت باکتری متغیر و تولوئن ثابت و در شیوه دوم غلظت تولوئن متغیر و باکتری ثابت در نظر گرفته شد. در هر دو شیوه به راکتور شاهد هیچ باکتری تلقیح نشد و فقط تولوئن تزریق گردید تا از نبود نشتی در راکتورها اطمینان حاصل شود. باید در نظر داشت مقداری از گاز تولوئن تزریق شده به راکتور در محلول مغذی حل می‌شود (که با عنوان ثابت هنری شناخته شده است) لذا به منظور یکنواخت شدن تراکم تولوئن در فضای فوقانی[1] راکتور و کاهش اثر ثابت هنری، نمونه برداری ۵ الی ۱۵ دقیقه پس از تزریق آغاز گردید.

شیوه اول: در این شیوه غلظت باکتری متغیر و میزان تولوئن ثابت در نظر گرفته شد. بدین صورت که بعد از استریل نمودن راکتورها، باکتری در غلظتهای۰/۵، ۱ و ۲ مک فارلند به راکتور A، B و C به ترتیب تلقیح گردید. درب راکتورها به شیوه صحیح بسته شد تا هیچ‌گونه نشتی بخارات تولوئن وجود نداشته باشد. پس از بسته شدن درب راکتور، تولوئن به مقدار ۰/۵ میکرولیتر به راکتورها و راکتور شاهد (D) تزریق شد. راکتورها درون انکوباتور قرار گرفتند و نمونه برداری دوره‌ای تولوئن و دی اکسیدکربن از فضای فوقانی راکتور طی پنج ساعت انجام شد.

شیوه دوم: بعد از استریل نمودن راکتورها، تلقیح باکتری تا رسیدن به غلظت یک مک فارلند انجام گرفت. درب راکتورها به شیوه صحیح بسته شد تا هیچ‌گونه نشتی بخارات تولوئن وجود نداشته باشد. پس از بسته شدن درب راکتورها تولوئن در حجم‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میکرولیتر به راکتور A، B و C به ترتیب اضافه شد (۱۸). ۱/۵ میکرولیتر تولوئن به راکتور شاهد (D) تزریق شد. راکتورها درون انکوباتور قرار گرفتند و نمونه برداری دوره‌ای تولوئن (پانزده دقیقه یکبار) و دی اکسیدکربن از فضای فوقانی راکتور طی پنج ساعت انجام شد.

در هر شیوه، سنسور دستگاه اندازه‌گیری دی اکسید کربن داخل یکی از راکتورها قرار گرفت (به طوریکه هیچ‌گونه نشتی نداشته باشد) و دی اکسید کربن به روش قرائت مستقیم اندازه‌گیری شد.

آزمون‌های آماری

داده‌های به دست آمده از آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار Excel و SPSS نسخه ۲۰ تحلیل شد. آزمون‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل کولموگروف-اسمیرنوف به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها، واریانس یکطرفه[2]، توکی جهت بررسی اختلاف میانگین چند گروه و کروسکال والیس[3] بود و $p\leq ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی داری تجزیه و تحلیل گردید.

1. headspace

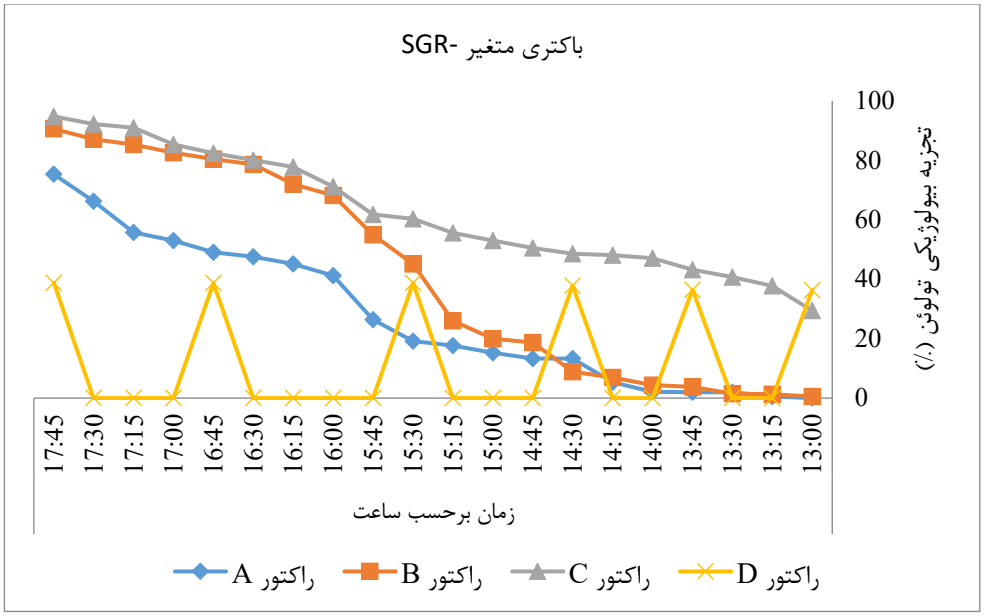
2. One-Way ANOVA
3. Kruskal_Wallis

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

جدول ۱: مقایسه میزان تجزیه بیولوژیکی در سه راکتور در شیوه اول

شیوه۱	انحراف استاندارد ± میانگین	p-value
راکتور A	۲۱/۲۳ ± ۲	۰/۰۰۲
راکتور B	۲۹/۵۵ ± ۲	
راکتور C	۴۰/۳۷ ± ۲	

*آزمون مورد استفاده تحلیل کروسکال والیس است.



شکل ۲: روند تجزیه بیولوژیکی تولوئن (برحسب ٪) در بازه زمانی ۵ ساعت در شیوه اول

یافته ها

ابتدا تجزیه بیولوژیکی تولوئن در شیوه اول (باکتری متغیر)، بررسی شد. فرض نرمال بودن داده‌ها رد شد(p-value=۰/۰۴۲) و با استفاده از آزمون کروسکال والیس مشاهده شد که تجزیه بیولوژیکی تولوئن در بین سه راکتور اختلاف معنی‌دار وجود داشت(p-value=۰/۰۰۲).

درجدول یک نتایج آزمون‌های این شیوه و در شکل ۲ روند تجزیه بیولوژیکی تولوئن درآن به نمایش گذاشته شده است.

در مرحله بعد، تجزیه بیولوژیکی تولوئن در شیوه دوم (تولوئن متغیر)، بررسی شد. داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند (p-value=۰/۰۰۲) و نتایج آزمون نشان داد تجزیه بیولوژیکی تولوئن بین سه راکتور اختلاف معنی‌دار داشت (p-value<۰/۰۰۱). بین راکتور A و B و راکتور C و B اختلاف معنی‌دار وجود داشت (p-value<۰/۰۰۱) ولی بین راکتور A و C اختلاف معنی داری وجود نداشت. راکتور B بیشترین (۵/۶۲ ± ۷۱/۹۵) و راکتور C کمترین (۶/۷ ±۳۴/۹۷) کارآیی را در تجزیه بیولوژیکی تولوئن داشته است. درجدول دو و سه نتایج آزمون‌های این شیوه و در شکل ۳ روند تجزیه بیولوژیکی تولوئن در آن به نمایش گذاشته شده است.

میانگین تولید دی اکسید کربن در دو شیوه به طور مجزا، اختلاف معنی داری داشت درحالیکه در مقایسه میانگین این متغیر بین دو شیوه ارتباط معنی داری دیده نشد. درخصوص کارآیی تجزیه بیولوژیکی تولوئن در دو شیوه به طور مجزا، اختلاف معنی‌دار وجود داشت ولی در مقایسه دو شیوه باهم، تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در جدول ۴ نتایج آزمون آماری و در شکل ۴ روند تولید

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

جدول ۲: مقایسه تجزیه بیولوژیکی تولوئن در سه راکتور

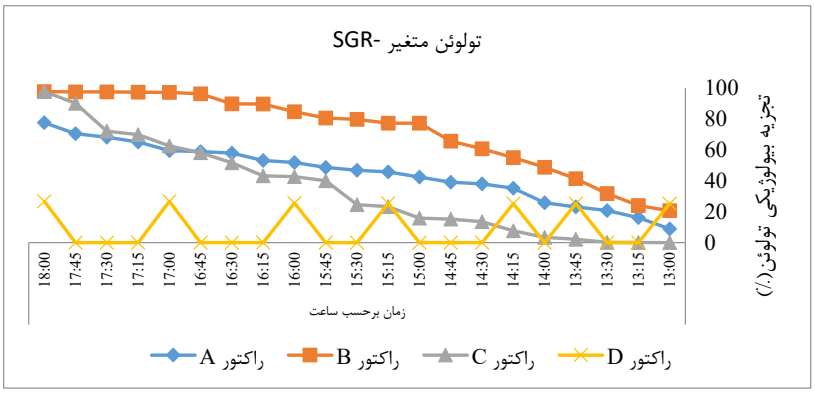
شیوه ۲	میانگین ± انحراف استاندارد	F	p-value*
راکتور A	۴۵/۴۱ ± ۴/۱۱	۱۱/۵۴	<۰/۰۰۱
راکتور B	۷۱/۹۵ ± ۵/۶۲		
راکتور C	۳۴/۹۷ ±۶/۷		

*آزمون مورد استفاده تحلیل واریانس یک طرفه است.

جدول۳: مقایسه میانگین راکتورها

راکتور		p-value*
راکتورB	راکتور A	۰/۰۰۴
	راکتور C	<۰/۰۰۱
راکتور A	راکتور C	۰/۰۰۶

* آزمون مورد استفاده توکی است.



شکل ۳: روند تجزیه بیولوژیکی تولوئن (برحسب ٪) در بازه زمانی ۵ ساعت در شیوه دوم

جدول ۴: مقایسه تولید دی اکسید کربن در دو شیوه

مقایسه	میانگین ± انحراف استاندارد	F	p-value*
تولوئن متغیر	۵۶۴/۸۵ ± ۱۶.۴	۱۴/۱۲	۰/۰۰۱
زیست توده متغیر	۶۳۶/۷۱ ± ۳۶.۵		

*آزمون مورد استفاده تحلیل واریانس یک طرفه است.

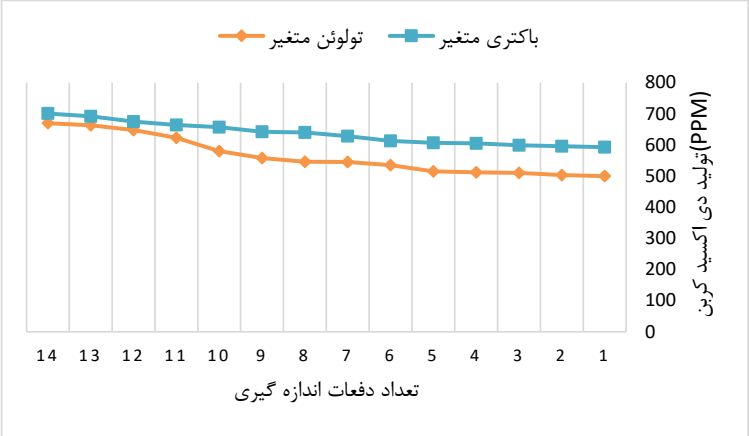
دی اکسید کربن نمایش داده است.

بحث

هدف از این مطالعه بررسی تجزیه بیولوژیکی تولوئن در راکتور رشد سوسپانسیون بود. به همین منظور با دو شیوه مختلف میزان حذف تولوئن در فضای فوقانی راکتور رشد سوسپانسیون توسط باکتری سودوموناس پوتیدا بررسی شد.

روند تجزیه بیولوژیکی تولوئن در شیوه اول (باکتری متغیر) طی مدت پنج ساعت در شکل ۱ به نمایش گذاشته

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]



شکل۴: تولید دی اکسید کربن در شیوه اول (زیست توده متغیر) و شیوه دوم (تولوئن متغیر)

شده است. روند کاهش تولوئن در راکتور شاهد تقریبا ثابت بوده و نشان از عدم نشتی در راکتورها دارد. روند تجزیه بیولوژیکی در حذف تولوئن در راکتور A نسبت به راکتور B و راکتور C کمترین ظرفیت حذف را داشت. راکتور C بالاترین ظرفیت تجزیه بیولوژیکی تولوئن از جریان هوا را داشت. می‌توان گفت با توجه با ثابت بودن مقدار تولوئن در راکتورها و افزایش زیست توده در آنها منجر به مصرف بیشتر منبع غذایی(تولوئن) توسط باکتریها یا به عبارتی همان تجزیه بیولوژیکی تولوئن گردید و همزمان با افزایش تجزیه بیولوژیکی تولوئن میزان تولید دی اکسیدکربن نیز افزایش یافت که نشان از وجود ارتباط مستقیم بین این دو متغیر بود.

این داده‌ها با مطالعات Dialynas و Diama-dopoulos در سال ۲۰۱۱ که بر روی تأثیر جذب زیست توده در حذف ترکیبات دارویی انتخابی در یک سیستم بیوراکتور غشایی معلق انجام شده بود هم خوانی داشت. در مطالعه اخیر نشان داد که حذف کاربامازپین، β۱۷- استرادیول و α ۱۷- اتینیل استرادیول و همچنین نیمی از حذف اسید کلوفیبریک می‌تواند به جذب مستقیم توسط باکتری در مدت زمان اقامت در راکتور سوسپانسیون نسبت داده شود که این تماس منجر به افزایش ظرفیت حذف شده است (۲۰) و در مطالعه‌ای مروری که Mudliarو همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی بیوفیلتراسیون ترکیبات آلی فرار از جریان هوا انجام دادند نشان دادند که باکتریها به عنوان کاتالیزور در روند تجزیه بیولوژیکی عمل می‌کنند و روند تجزیه را بهبود می‌بخشند (۲۱). و در مطالعه‌ای که توسط Zarook و همکاران (در سال ۱۹۹۷) انجام شد آنها ثابت کردند که میان تولید دی اکسید کربن در سیستم با رشد باکتری ارتباط دارد (۲۲).

روند کاهش تولوئن در شیوه دوم (شکل ۳) در راکتور شاهد تقریبا ثابت بود و نشان از عدم نشتی در راکتورها داشت. نتایج آزمون در شیوه دوم نشان داد تجزیه بیولوژیکی تولوئن در راکتور A (با غلظت اولیه ۱۰۰ ppm نسبت به ۰/۴ gr/m^3سوسپانسیون باکتریایی) نسبت به راکتور B (با غلظت اولیه ۲۱۰ ppm نسبت به ۰/۸ gr/m^3 سوسپانسیون باکتریایی) و راکتور C (با غلظت اولیه ۴۲۴ ppm نسبت به ۱/۶ gr/m^3سوسپانسیون) کمتر است و راکتور B بالاترین تجزیه بیولوژیکی در حذف تولوئن را داشت. در این مرحله که میزان باکتری ثابت و میزان تولوئن متفاوت بود بین متغیرها ارتباط مستقیم وجود نداشت. می‌توان به ظرفیت مشخص باکتریها در میزان تجزیه اشاره کرد بدین معنا که افزایش میزان تولوئن، بدون افزایش میزان باکتری عملا ناکارآمد بوده و منجر به شکست در سیستم فیلتراسیون می‌شود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

نتیجه فوق با نتایج پژوهش Nnamchi و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد (۲۳). در بررسی آنها، ارتباط مستقیم بین افزایش غلظت کروزن (یکنوع هیدروکربن آلی) و میزان رشد باکتری اثبات شد. سودوموناس پوتیدا در محیط‌های مختلف مقاومت بالایی دارد. قدرت تجزیه کنندگی سودوموناس پوتیدا به دلیل تولید بیوسورفاکتانت‌هایی است که باعث افزایش امولسینه شدن هیدروکربنهای نفتی و تغییر کشش سطحی و اتصال هیدروکربن به سطح سلول باکتری می‌شود (۲۴). این باکتری با وجود آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده قادر به تجزیه ترکیبات هیدروکربنی مختلف است. در شرایطی که این باکتری در معرض غلظت بالای فرآورده‌های نفتی قرار گیرد قادر است آنزیم‌ها و سورفاکتانت هایی تولید کند که شرایط تجزیه فرآورده را بهتر و در غلظت‌های پایین تکثیر باکتری بیشتر شود (۲۵).

در این مطالعه تجزیه بیولوژیکی تولوئن در راکتورها با افزایش غلظت تولوئن روند افزایشی نداشت و بیشترین میزان تجزیه بیولوژیکی در راکتور B با غلظت ۰/۸ gr/m^3 یا ۲۱۰ ppm و کمترین کارآیی در راکتور C با غلظت ۱/۶ gr/m^3 یا ۴۲۴ ppm بود. نتایج به دست آمده را شاید بتوان به عوامل مختلفی مانند ۱) محدودیت انتقال جرمی سوسپانسیون و اثر مهاری نسبت داد که در مطالعه El.nass و همکاران (در سال ۲۰۰۹) نشان دادند با افزایش غلظت فنول نرخ تجزیه بیولوژیکی توسط باکتری سودوموناس پوتیدا کاهش یافت (۲۶). یا به ۲) بهم خوردن فاز گازی و محدودیت اکسیژن در فضای فوقانی سوسپانسیون نسبت داد که Zarook و همکاران (در سال ۱۹۹۷) در مطالعه‌ای بر روی توسعه، اعتبار سنجی و تجزیه و تحلیل یک مدل بیوفیلتر نشان دادند که اکسیژن به عنوان یک عامل حیاتی در روند بیوفیلتراسیون نقش دارد و اگر هوا با اکسیژن غنی شود روند بیوفیلتراسیون بهبود می‌یابد ولی این فرض (اکسیژن بیش از حد) همیشه صحیح نیست به خصوص اگر غلظت ورودی بالا باشد. مطالعات نشان می‌دهد که مخلوط کردن در فاز گاز عامل مهمی است که نباید از آن غافل شد و برخی پارامترها باید به طور دقیق برآورد شوند (۲۲) و همچنین می‌توان به کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها در این غلظت اشاره داشت. این نتیجه با نتایج پژوهش Delhomenie و همکاران (در سال ۲۰۰۲) همخوانی دارد. در بررسی آنها زمانیکه غلظت تولوئن در ورودی سیستم بیش از ۲ gr/m^3 یا ۵۳۰ ppm رسید فعالیت میکروارگانیسمها در حذف تولوئن کاهش یافت (۲۷). و در مطالعه‌ای که Manohar و همکاران (در سال ۲۰۰۱) و sodha و همکاران (در سال ۲۰۱۲) انجام دادند بیان کردند که در تراکم‌های بالاتر به دلیل کاهش سایت‌های فعال، فرایند جذب کاهش می‌یابد (۲۸، ۲۹).

نتیجه گیری

با توجه با نتایج مطالعه حاضر افزایش غلظت باکتری در راکتور رشد سوسپانسیون منجر به افزایش تجزیه بیولوژیکی تولوئن در زمان کوتاهتری شد ولی افزایش تولوئن به عنوان منبع تامین انرژی در راکتور رشد سوسپانسیون ممکن است با روند تجزیه بیولوژیکی اثر افزایشی نداشته باشد. سودوموناس پوتیدا نیازهای غذایی ساده‌ای دارد ولی مقدار بهینه آن مشخص نشده است و باید مقدار بهینه آن در مطالعات دیگر برآورد شود تا با کنترل حجم آلاینده ورودی بتوان سیستمی با کارآیی بهتر طراحی کرد لذا این متغیر، نیاز به بررسی بیشتر دارد. این مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی انجام شده و به منظور استفاده در صنعت نیاز به بهینه‌سازی دارد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

REFERENCES

1. Gao, M., L. Li, and J. Liu, Simultaneous removal of hydrogen sulfide and toluene in a bioreactor: Performance and characteristics of microbial community. Journal of Environmental Sciences, 2011. 23(3): p. 353-359.
2. Barzegar, A., et al., Catalytic degradation of toluene by manganese oxide catalyst loaded on a natural zeolite support. Scientific Journal of Review, 2014. 3(5): p. 345-52.
3. Chaudhary DK, Park JH, Kim PG, Ok YS, Hong Y. Enrichment cultivation of VOC-degrading bacteria using diffusion bioreactor and development of bacterial-immobilized biochar for VOC bioremediation. Environmental Pollution. 2023.17:121089.
4. Nourmohammadi M, Karimi A, Golbabaei F, Pourmand MR, Rahimi Foroushanid A, Nourmohammadi E. Biodegradation of toluene in a two-phase low-pressure bioscrubber with using silicon oil as organic phase. Int J Environ Anal Chem. 2021.15:1-3.
5. Nayyeri H, Ghanavati H, Mazaheri H, Joshaghani AH. Simultaneous biodegradation of BTX by isolated degrading bacterial strains in a newly designed modulated bio-scrubber assisted to airlift parallel bioreactors. J Environ Health Sci Eng. 2022.7:1-7.
6. Moro AM, B.N., Charão M, Bulcão R, Freitas F, Baierle M, Nascimento S, Valentini J, Cassini C, Salvador M, Linden R. , Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen., 2012 Jul 4.
7. Wang L, Yang C, Cheng Y, Huang J, He H, Zeng G, et al. Effects of surfactant and Zn)II(at various concentrations on microbial activity and ethylbenzene removal in biotricking filter. Chemosphere. 2013;93)11(:2909-13.
8. Zhao L, Huang S, Wei Z. A demonstration of biofiltration for VOC removal in petrochemical industries. Environ Sci Process Impacts. 2014;16)5(:1001-7
9. Chaudhary DK, Park JH, Kim PG, Ok YS, Hong Y. Enrichment cultivation of VOC-degrading bacteria using diffusion bioreactor and development of bacterial-immobilized biochar for VOC bioremediation. Environmental Pollution. 2023.17:121089.
10. KESHAVARZI, S.H., et al., BIOTREATMENT OF INDUSTRIAL GASEOUS POLLUTANTS BY BIOFILTRATION. 2008. (persian)
11. Andrews G, A.W., Bioreactors, Gas Treatment. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. , 2002 Oct 15.
12. García-Peña EI, H.S., Favela-Torres E, Auria R, Revah S. , Toluene biofiltration by the fungus Scedosporium apiospermum TB1. Biotechnology and bioengineering. , 2001;76(1):61-9.
13. Neal, A.B. and R.C. Loehr, Use of biofilters and suspended-growth reactors to treat VOCs. Waste management, 2000. 20(1): p. 59-68.
14. Kizito S, Wu S, Wandera SM, Guo L, Dong R. Evaluation of ammonium adsorption in biochar-fixed beds for treatment of anaerobically digested swine slurry: experimental optimization and modeling. Sci Total Environ. 2016;563:1095-104
15. Koutinas M, P.L., Livingston AG. , An attempt to compare the performance of bioscrubbers and biotrickling filters for degradation of ethyl acetate in gas streams. J Chem Technol Biotechnol: International Research in Process, Environmental & Clean Technology., 2005 Nov;80(11):1252-60.
16. Jung, I.-G. and O.-H. Park, Enhancement of cometabolic biodegradation of trichloroethylene (TCE) gas in biofiltration. J Biosci Bioeng, 2005. 100(6): p. 657-661.
17. Nayyeri H, Mazaheri H, Hassani Joshaghani A, Ghanavati H. Pre-Proof File Bio-Scrubber Performance Equipped with Airlift Parallel Bioreactors (APB's) for BTX Biodegradation by Wastewater Sludge. Iran. J. Chem. Chem. Eng. Research Article Vol. 2022. 41(10).
18. Estrada, J.M., et al., Biocatalytic coatings for air pollution control: A proof of concept study on VOC biodegradation. Biotechnology and bioengineering, 2015. 112(2): p. 263-271.
19. Tsai SY, J.R., Biodegradation of pHenol and sodium salicylate mixtures by suspended Pseudomonas putida CCRC 14365. J Hazard Mater. , 2006 Nov 2;138(1):125-32.
20. Dialynas, E. and E. Diamadopoulos, The effect of biomass adsorption on the removal of selected pHarmaceutical compounds in an immersed membrane bioreactor system. J Chem Technol Biotechnol, 2012. 87(2): p. 232-237.
21. Mudliar S, G.B., Padoley K, Satpute D, Dixit R, Bhatt P, Pandey R, Juwarkar A, Vaidya A. , Bioreactors for treatment of VOCs and odours–A review. Journal of environmental management., 2010 May 1.
22. Srivastava AK, Singh RK, Singh D. Microbe-based

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]

bioreactor system for bioremediation of organic contaminants: present and future perspective. InMicrobe mediated remediation of environmental contaminants 2021. (pp. 241-253). Woodhead Publishing.

23. Nnamchi CI, O.J., Ezeogu LI., Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. Int J Environ Sci Technol (Tehran). , 2006 Mar 1.
24. Kumar M, L.V., Materano AD, Ilzins OA, Galindo-Castro I, Fuenmayor SL. . Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing Pseudomonas sp. IR1. Zeitschrift für Naturforschung C. , 2006.1;61(3-4):203-12.
25. Kafilzadeh F, H.F., Afrough R, Jamali H, Allahverdi G., Isolation and Identification of Pyrene-degrading Bacteria from Soils around Landfills in Shiraz and Their Growth Kinetic Assay. Journal of Fasa University of Medical Sciences. , 2011 Dec 15.
26. El-Naas, M.H., S.A. Al-Muhtaseb, and S. Makhlouf, Biodegradation of pHenol by Pseudomonas putida immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. J Hazard Mater, 2009. 164(2-3): p. 720-725.
27. Delhoménie MC, B.L., Bredin N, Roy S, Broussau S, Brzezinski R, Kugelmass JL, Heitz M. , Biofiltration of air contaminated with toluene on a compost-based bed. Advances in Environmental Research., 2002 Sep 1.
28. Yu F, Munoz B, Bienkowski PR, Sayler GS. Continuous trichloroethylene biodegradation by Pseudomonas putida F1 in a biofilm reactor and determination of an optimal feeding path via a response surface model. Eng Rep. 2021. 3(9):e12385.
29. Sodha K, Panchani SC, Nath K. Feasibility study of microbial regeneration of spent activated carbon sorbed with phenol using mixed bacterial culture. 2013.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-31]