مجله دانشكده بهداشت و انستيتو تحقيقات بهداشتي
دوره ٦ شماره ٣و٤ پاييز و زمستان ١٣٨٧ ، صفحات : ١٢٨-١١٩

جداسازي و شناسايي باكتري تجزيه كننده اكريلونيتريل از لجن فعال سيستم تصفيه فاضلاب پتروشيمي و بررسي كارآيي آن در حذف اكريلونيتريل

مهندس محمد شاكرخطيبي: دانشجو دوره دكترا، گروه مهندسي محيط زيست، دانشكده فني و مهندسي، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران
دكتر حسين گنجي دوست: استاد، گروه مهندسي محيط زيست، دانشكده فني و مهندسي، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران
نويسنده رابط: hganji@modares.ac.ir
دكتر بيتا آيتي: استاديار، گروه مهندسي محيط زيست، دانشكده فني و مهندسي، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران
دكتر اسماعيل فاتحي فر: استاديار، مركز تحقيقات مهندسي محيط زيست، دانشكده مهندسي شيمي، دانشگاه صنعتي سهند، تبريز، ايران
تاريخ دريافت : ١٣٨٧/٤/٩ تاريخ پذيرش: ١٣٨٧/١٠/٢٨

چكيده

زمينه و هدف: اكريلونيتريل به عنوان ماده اوليه اصلي در توليد رزين ABS (اكريلونيتريل بوتادين استايرن) بـه طـور وسـيعي در صـنعت پتروشيمي و ديگر فرآيندهاي صنعتي و تجاري مورد استفاده قرار مي گيرد. تجزيه زيستي اين تركيب به دليل ويژگـي هـاي سـمي آن بـه آساني توسط ميكروارگانيسم ها انجام نمي شود و در صورت عدم تصفيه مناسب، تخليه پساب آلوده به اكريلونيتريل مي تواند سبب بروز آلودگي شديد محيط زيست شود. هدف از انجام اين تحقيق، جداسازي و شناسايي گونه باكتريايي تجزيه كننده اكريلونيتريل از لجن فعال سيستم تصفيه فاضلاب صنعت پتروشيمي و همچنين، بررسي سرعت كاهش غلظت يا حذف كامل آن در سيـستم تـصفيه زيـستي توسـط گونه جداسازي شده مي باشد. به علاوه، تغييرات غلظت محصولات مياني و نهايي حاصل از تجزيه اكريلونيتريل نيـز مـورد مطالعـه قـرار گرفته است.

روش كار: براي انجام اين تحقيق، سه راكتور زيستي ناپيوسته هركدام به حجم ٢٥٠ ميلي ليتر مورد استفاده قرار گرفت. جمعيت ميكروبي مورد نياز براي راه اندازي سيستم، از لجن فعال برگشتي حوض هوادهي سيستم تصفيه فاضلاب مجتمع پتروشيمي تبريز تامين گرديد. بـه منظور تامين مواد معدني و عناصر جزئي مورد نياز ميكروارگانيسم ها از محيط بافر فسفات (PBM) و جهت تامين كربن و نيتروژن مورد نياز سيستم زيستي از اكريلونيتريل به عنوان آلاينده استفاده شد. همچنين، از محيط كشت R2A به منظور دستيابي به باكتري خـالص و از رنگ آميزي گرم، مشاهده ميكروسكوپي و آزمون هاي بيوشيميايي با بهره گيري از محيط هاي انتخـابي از جملـه اكـسيداسيون يـا تخميـر گلوكز (O-F glucose)، مك كانكي آگار (MacConkey agar)، آگار آهن حاوي سه قند لاكتوز، سـاكارز و گلـوكز(TSI)، ائـوزين متيلن بلو(EMB)، سالمونلا شيگلا آگار (SS agar)، SIM، آزمون هاي احياء نيترات، ذوب ژلاتين، تخمير لاكتوز، اكـسيداز و كاتـالاز جهت شناسايي باكتري استفاده شد. در نهايت، بازده سيستم زيستي در تجزيه غلظت هاي اوليه مختلف اكريلونيتريل و محصولات مياني و نهايي حاصل از فرآيند تجزيه زيستي مورد مطالعه قرار گرفت.

نتايج: نتايج بدست آمده نشان دهنده ميانگين حذف ۴۶% و ۹۸% اكريلونيتريل به ترتيب در مدت ۴۶ و ۷۰ ساعت پس از شـروع واكـنش در غلظت اوليه ۵۰۰ ميلي گرم بر ليتر بود. در غلظت اوليه ۷۰۰ ميلي گرم بر ليتر، متوسط حذف اكريلونيتريل در سيـستم زيـستي پـس از گذشت ۴۶ و ۹۴ ساعت از شروع واكنش، به ترتيب برابر ۵۰% و ۹۸/۶% بود، در صورتيكه با اعمال غلظت اوليه ۱۰۰۰ ميلي گرم بـر ليتـر، ميانگين حذف پس از ۴۶ و ۹۴ ساعت به ترتيب ۳۰% و ۴۰% بوده و با گذشت ۱۱۸ ساعت از شروع واكنش، غلظت متوسط اكريلونيتريـل در نمونه هاي برداشت شده ۵۸۰ ميلي گرم بر ليتر بود. نتايج مربوط به جداسازي و شناسايي گونـه باكتريـايي در شـرايط بهينـه عملكـرد سيستم زيستي حكايت از نقش موثر باسيل گرم منفي متعلق به گروه گاما پروتئوباكتريا (Proteobacteria) تحت عنـوان پـسودوموناس پوتيدا (Pseudomonas putida) داشت.

نتيجه گيري: تجزيه اكريلونيتريل با استفاده از فرآيندهاي زيستي امكانپذير مي باشد، حال آنكه كارآيي گونـه هـاي مختلـف باكتريـايي در تجزيه زيستي اين تركيب متفاوت است. باسيل گرم منفي پسودوموناس پوتيدا به راحتي به محيط داراي اكريلونيتريل تا غلظت ۷۰۰ ميلـي گرم بر ليتر سازگار مي شود و از كربن و نيتروژن حاصل از تجزيه آن به منظور رشد و ساختارسـازي سـلولي مـي توانـد اسـتفاده نمايـد. همچنين، اين گونه علاوه بر استفاده مستقيم از اكريلونيتريل، از اكريليک اسيد و آمونياک نيز به ترتيب به عنوان منبع تامين كربن و نيتروژن مورد نياز استفاده مي نمايد. بنابراين، انتظار مي رود گونه شناسايي شده نقش مهمي در تصفيه فاضلاب واحد ABS صنايع پتروشيمي ايفا نمايد.

واژگان كليدي: اكريلونيتريل، تصفيه فاضلاب پتروشيمي، تجزيه زيستي، جداسازي ميكروبي، پسودوموناس پوتيدا

مقدمه

با توسعه سريع صنايع پتروشيمي در جهان، مقادير قابل توجهي فاضلاب داراي ترکيبات آلي نيتروژن دار توليد مي شود. در اين ميان، توليد رزينهاي اکريلونيتريل بوتادين استايرن (ABS)، باعث ايجاد فاضلاب آلوده به ترکيبات سمي سيانيددار مي شود و در صورت عدم تصفيه مناسب، ممکن است باعث بروز آلودگي شديد محيط زيست گردد(Chang et al. 2006). اکريلونيتريل به عنوان ماده اوليه اصلي در توليد ABS به طور وسيعي در فرآيندهاي صنعتي و تجاري مورد استفاده قرار مي گيرد. اين ترکيب، يک آلاينده فرار با نقطه جوش ۶۵ درجه سانتيگراد مي باشد و از سوي سازمان حفاظت محيط زيست ايالات متحده (USEPA) در فهرست ترکيبات سرطان زا براي انسان طبقه بندي شده است (Leeuwen and Krzyzanowski 2000). انتشار اين ترکيب از فرآيندها و فاضلاب صنعتي به شکل بخار و مايع است و در صورت مواجهه انسان با غلظت هاي ۲/۵ تا ۵ ميلي گرم بر مترمکعب، در دراز مدت باعث کاهش شديد گويچه هاي سرخ، سفيد و هموگلوبين خون مي-شود (Chekhovskaya 1980; Diane and Speece 1991).

فرآيندهاي تصفيه زيستي به عنوان يک گزينه اقتصادي و سازگار با محيط زيست به طور متداول در تصفيه فاضلاب واحدهاي توليد رزين ABS مورد استفاده قرار گرفته اند (Chang et al. 2006). با توجه به تنوع زياد آلاينده ها و وجود ترکيبات سمي در فاضلابهاي صنعتي، ميکروارگانيسم‌هايي که توانايي سازگارشدن با يک آلاينده را داشته باشند، در محيط غالب شده، نقش اساسي را در تصفيه آن آلاينده ايفا خواهند کرد؛ که اين سازگاري باعث افزايش قابل توجهي در سرعت تجزيه زيستي و کارايي سيستم تصفيه خواهد شد (Hu et al. 1998). در اين راستا، تجزيه زيستي اکريلونيتريل موجود در فاضلاب توسط برخي از محققان با استفاده از گونه هاي باکتريايي مختلفي از جمله آرتروباکتر، کورينه باکترينيا، نوکارديا و پسودوموناس (Watanabe et al. 1987)، رودوکوکوس (Bigey et al. 1999; Kobayashi et al. 1992)، اسيدووروکس و کوماموناس آزمونوستروني (Wang et al. 2004)، اسينتوباکتر (Wyatt and Knowles 1995) و سيتروباکتر فروندي (Deshkar et al. 2003) گزارش شده است. در تحقيقات ديگر، برخي از اين گونه ها نيز به طور موفقيت آميزي براي حذف اکريلونيتريل از خاک (Deshkar et al. 2003)، فاضلاب (Wyatt and Knowles 1995; Wang et al. 2004) و بخارات (Roach et al. 2004) مورد استفاده قرار گرفته اند. به منظور بررسي سرعت تجزيه زيستي اکريلونيتريل، تحقيقات ديگري با اعمال غلظت هاي مختلف اين آلاينده انجام شده است که از نتايج اين تحقيقات مي توان به موارد زير اشاره نمود: حذف کامل اکريلونيتريل با غلظت اوليه ۲۰۰۰ ميلي-گرم بر ليتر در مدت ۱۴۰ ساعت با استفاده از راکتور زيستي ناپيوسته هوازي داراي محيط باکتريايي مخلوط (Li et al. 2007)، تجزيه اکريلونيتريل تا غلظت ۲۷۹ ميلي گرم بر ليتر طي فرآيند دنيتريفيکاسيون در شرايط فاقد اکسيژن (Anoxic) با استفاده از گونه هاي اسيدووروکس فاسيليس-بي (Acidovorax facilis B) و پسودوموناس نوتيکا (Pseudomonas nautica) (Wang et al. 2001)؛ حذف کامل اکريلونيتريل در شرايط هوازي تا غلظت هاي ۸۸۹ و ۴۰۰ ميلي گرم بر ليتر به ترتيب از فاضلاب مصنوعي و واقعي واحد ABS و شناسايي باسيل گرم منفي تجزيه کننده تحت عنوان گونه AAS6 (Wang et al. 2001). با اين حال، به رغم فعاليت واحدهاي توليد ABS در چند مجتمع پتروشيمي کشور و توليد فاضلاب آلوده به اکريلونيتريل در اين واحدها، مطالعه اي در اين زمينه در داخل کشور انجام نشده است تا با بهره گيري از نتايج بدست آمده، بتوان در جهت بهبود عملکرد سيستم هاي تصفيه زيستي موجود و طراحي سيستم هاي جديد گام برداشت.

در اين تحقيق، تجزيه زيستي اكريلونيتريل در راكتورهاي زيستي ناپيوسته مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از انجام اين تحقيق، جداسازي و شناسايي گونه باكتريايي مناسب از لجن فعال سيستم تصفيه فاضلاب پتروشيمي است كه توانايي تجزيه اكريلونيتريل را به عنوان منبع تامين كربن و نيتروژن مورد نياز دارا باشد. همچنين، تعيين كارايي گونه جداسازي شده در تجزيه زيستي غلظت هاي اوليه مختلف اكريلونيتريل، روند تغييرات محصولات مياني و نهايي حاصل از تجزيه آن و بررسي ميزان كاهش غلظت آن در زمان هاي مختلف، از اهداف ديگر اين تحقيق به شمار مي رود.

روش كار

لجن فعال و سازگارسازي آن: با توجه به اينكه فاضلاب ورودي به سيستم تصفيه زيستي مجتمع پتروشيمي تبريز آلوده به اكريلونيتريل خروجي از واحد توليد ABS است و ميكروارگانيسم هاي موجود در حوض هوادهي اين سيستم نسبت به اكريلونيتريل به طور نسبي سازگاري پيدا كرده اند، لجن فعال مورد استفاده، از لجن برگشتي به حوض هوادهي سيستم تصفيه زيستي اين تصفيه خانه تامين گرديد. حجم نمونه لجن فعال برداشت شده ۵ ليتر و غلظت متوسط مواد جامد معلق آن۸۹۰۰ ميلي گرم بر ليتر بود. به منظور اطمينان از سازگاري ميكروارگانيسم هاي موجود در نمونه لجن با آلاينده مورد نظر، بلافاصله پس از انتقال نمونه به آزمايشگاه، يک ليتر از نمونه به همراه يک ليتر محيط بافر فسفات (White et al. 1988; Nawaz et al. 1991) به يک راكتور ۲ ليتري منتقل شد سپس، اكريلونيتريل با غلظت ۳۰۰ ميلي گرم بر ليتر به آن اضافه شد و در انكوباتور با دماي ۳۰ درجه سانتيگراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقيقه قرار داده شد. اين مرحله به مدت يک ماه و تا رسيدن به شرايط پايدار (ثابت شدن غلظت اكريلونيتريل در نمونه هاي برداشت شده) به طول انجاميد و سپس، لجن فعال موجود در راكتور با غلظت كل مواد جامد معلق ۲۷۶۰ ميلي گرم بر ليتر براي انجام آزمون هاي بعدي مورد استفاده قرار گرفت. تركيب محيط بافر فسفات (PBM) مورد استفاده (بر حسب گرم در ليتر) به صورت سولفات منيزيم ۷ آبه (۰/۲)، كلسيم كلرايد ۲ آبه (۰/۰۲)، آمونيوم كلرايد (۰/۱)، دي پتاسيم هيدروژن فسفات (۰/۲) و پتاسيم دي هيدروژن فسفات (۰/۲) بود. به علاوه، مقدار ۱۰ ميلي ليتر در ليتر از محلول حاوي عناصر جزئي با تركيب (بر حسب ميلي گرم بر ليتر) سولفات آهن ۷ آبه (۳۰۰)، منيزيم كلرايد ۴ آبه (۱۸۰)، كبالت كلرايد ۶ آبه (۱۰۶)، Na_2MoO_4 ۲ آبه (۳۴) و سولفات روي ۷ آبه (۴۰) به محيط بافر فسفات اضافه شد و در نهايت pH محيط به عدد ۷ رسيد.

آزمون هاي تجزيه زيستي اكريلونيتريل با لجن فعال سازگار شده: به منظور انجام آزمون هاي تجزيه زيستي اكريلونيتريل، سه راكتور ناپيوسته هر كدام به حجم مفيد ۲۵۰ ميلي ليتر مورد استفاده قرار گرفت. هر يک از راكتورها حاوي ۱۰۰ ميلي ليتر محيط بافر فسفات به همراه ۱۰ ميلي ليتر لجن فعال سازگار شده بود. غلظت كل مواد جامد معلق در هر يک از راكتورها ۲۷۶۰ ميلي گرم بر ليتر بود. روش كار به اين ترتيب بود كه پس از آماده سازي راكتورها، غلظت هاي اكريلونيتريل ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ ميلي گرم بر ليتر به ترتيب به راكتورهاي ۱، ۲ و ۳ اضافه شده و پس از پوشاندن با درپوش هايي از جنس تفلون/ سيليكون، در انكوباتور- شيكر با سرعت ۱۲۰ دور در دقيقه و دماي ۳۰ درجه سانتيگراد قرار داده شدند. همچنين، يک راكتور شاهد با شرايط مشابه بدون افزودن اكريلونيتريل، به منظور انجام آزمون هاي كنترلي مورد استفاده قرار گرفت. مقدار اوليه pH در تمامي راكتورها در عدد ۷ تنظيم گرديد و به منظور تامين اكسيژن مورد نياز سيستم، به طور متناوب ۲۵ ميلي ليتر اكسيژن (تحت فشار يک اتمسفر) با استفاده از سرنگ شيشه- اي بدون نشت به هر يک از راكتورها تزريق شد. نمونه ها به حجم ۵ ميلي ليتر در زمان هاي مختلف برداشت شده و پس از عبور دادن از كاغذ صافي با قطر منافذ ۰/۴۵ ميكرومتر، جهت تعيين غلظت اكريلونيتريل، اكريلاميد، اكريليک اسيد، آمونياک، pH و دانسيته نوري (OD) مورد استفاده قرار

گرفت. نمونه برداري در اين مرحله تا تاييد شرايط پايدار که ۱۶ روز به طول انجاميد، ادامه پيدا کرد.

جداسازي باکتري و آزمون هاي تجزيه زيستي با گونه‌اي خالص شده: پس از انجام آزمايش هاي تجزيه زيستي اکريلونيتريل با استفاده از لجن فعال سازگار شده که در بالا توضيح داده شد، جهت جداسازي گونه هاي تجزيه کننده مهم موجود در لجن، رقت هاي مختلفي از محيط حاوي ميکروارگانيسم ها تهيه و بر روي پليت هاي حاوي محيط کشت (R2A) (Reasoner and Geldreich 1995) کشت داده شد. سپس، پليت ها در دماي ۳۰ درجه سانتيگراد قرار داده شد. در مرحله بعد، براي اطمينان از خلوص کلني ها، از هر يک از کلني هاي مجزاي بدست آمده، کشت مجدد بر روي محيط R2A انجام شد. ترکيب محيط R2A (Merck-1.00416) بر حسب گرم بر ليتر عبارت از عصاره خمير مايه (yeast extract) (۰/۵)، پروتئوز پپتون شماره ۳ (۰/۵)، کازآمينواسيد (۰/۵)، دکستروز (۰/۵)، نشاسته محلول (۰/۵)، پيروات سديم (۰/۳)، دي پتاسيم فسفات (۰/۳)، سولفات منيزيم (۰/۰۵) و آگار (۱۵) بود. پس از دستيابي به چند گونه خالص و تکثير آنها با انجام کشت هاي متعدد، هر يک از اين گونه ها به راکتورهاي استريل ۲۵۰ ميلي ليتري منتقل شد و جهت انجام آزمون هاي تجزيه زيستي مورد استفاده قرار گرفت. روش کار در اين مرحله مشابه روش توضيح داده شده در قبل از جداسازي بود و از ترکيب ۱۰۰ ميلي ليتر محيط PBM، ۱۰ ميلي ليتر نمونه حاوي باکتري خالص و ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ ميلي گرم بر ليتر اکريلونيتريل در هر يک از نوبت هاي آزمايش استفاده گرديد. راکتورها در محيط تاريک داخل انکوباتور- شيکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقيقه و دماي ۳۰ درجه سانتيگراد قرار داده شدند و در نهايت، کارايي باکتري هاي خالص در تجزيه اکريلونيتريل مورد ارزيابي قرار گرفت. حجم نمونه هاي برداشت شده در هر نوبت ۲ ميلي ليتر بود و تمامي نمونه ها بعد از عبور از کاغذ صافي با قطر منافذ ۰/۴۵ ميکرومتر از نظر غلظت اکريلونيتريل، اکريلاميد، اکريليک اسيد، آمونياک، OD و pH مورد آزمايش قرار گرفتند. در هر مرحله تعداد ۹ نمونه در زمان هاي مختلف پس از شروع واکنش برداشت شد و از نظر پارامترهاي ذکر شده مورد آزمايش قرار گرفت. به منظور اطمينان از صحت نتايج، ۳ تا ۵ تکرار براي هر يک از نمونه ها انجام شد و از روش ميانگين براي ثبت آنها استفاده گرديد. تجزيه و تحليل نتايج بدست آمده در همه مراحل با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel صورت گرفت.

شناسايي باکتري: پس از انجام آزمون هاي تجزيه زيستي، رنگ آميزي گرم و آزمايش هاي لازم براي شناسايي گونه باکتريايي که بهترين کارايي را در تجزيه اکريلونيتريل داشت، انجام گرفت. فعاليت کاتالاز با ايجاد حباب هاي هوا پس از افزودن يک قطره از محلول پراکسيد هيدروژن ۳% بر روي کلني باکتريايي مجزا و فعاليت اکسيداز نيز با آشکار شدن رنگ بنفش پس از افزودن يک قطره از محلول تترامتيل پارافنيلن دي آمين ۱% بر روي کلني باکتريايي مجزا تعيين گرديد (Forbes et al. 2007). بررسي ويژگي‌هاي حرکتي و ريخت شناسي، با مشاهدات ميکروسکوپي و آزمون حرکت با استفاده از محيط SIM (Merck-1.05470) انجام شد. در ادامه، توانايي متابوليکي گونه جداسازي شده بوسيله کشت بر روي محيط هاي انتخابي از جمله اکسيداسيون يا تخمير گلوکز (O-F glucose)، مک کانکي آگار (MacConkey agar- Merck-1.05465)، آگار آهن حاوي سه قند لاکتوز، ساکارز و گلوکز(TSI- Merck-1.03915)، ائوزين متيلن بلو(EMB- Merck-1.01347)، و سالمونلا شيگلاآگار(SS agar- Merck-7667) تعيين گرديد. به علاوه، خصوصيات فيزيولوژيک گونه جداسازي شده با استفاده از آزمون هاي تخمير لاکتوز، احياي نيترات و ذوب ژلاتين (Merck-1.04070) تعيين شد. لازم به ذکر است که تمامي پليت ها به مدت دو روز در دماي ۳۰ درجه سانتيگراد قرار داده شدند.

آزمون هاي کنترلي: از آنجائيکه اکريلونيتريل يک ترکيب نسبتا فرار به شمار مي رود، احتمال خروج آن به صورت

بخار از داخل راكتورهاي مورد استفاده در طول انجام آزمايش وجود داشت. به منظور حصول اطمينان از عدم خروج بخارات اكريلونيتريل، آزمون هاي كنترلي با استفاده از نمونه شاهد استريل حاوي محيط PBM و بدون لجن فعال انجام گرفت. در نتيجه، در طول زمان واكنش (۱۱۸ ساعت) تغييرات غلظت اكريلونيتريل موجود در راكتور قابل صرفنظر كردن بود.

روشهاي تجزيه و تحليل: نمونه ها با استفاده از سرنگ شيشه اي به طور مستقيم از راكتورها جمع آوري شد و مقادير pH و OD_{600} به ترتيب با استفاده از pH متر و اسپكتروفتومتر (Pharmacia-LKB-Novaspec II) در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعيين گرديد. به منظور اندازه – گيري غلظت اكريلونيتريل، اكريلاميد، اكريليک اسيد و آمونياک ابتدا نمونه ها با عبور از كاغذ صافي با قطر منافذ ۰/۴۵ ميكرومتر صاف شد سپس، غلظت اكريلونيتريل، اكريلاميد و اكريليک اسيد با استفاده از كروماتوگرافي گازي (Varian CP 3800) مجهز به آشكارساز FID و ستون مويي (Capillary Column: CP- WAX 52 CB 25m×0.32mm×1.2µm) و غلظت آمونياک با استفاده از الكترود آمونياک (Cole Parmer) اندازه گيري شد.

نتايج

جداسازي و شناسايي باكتري: بررسي نتايج حاصل از آزمايش هاي انجام شده در راستاي جداسازي گونه هاي باكتريايي تجزيه كننده اكريلونيتريل حاكي از وجود پنج گونه متفاوت در لجن فعال سازگار شده سيستم تصفيه فاضلاب پتروشيمي بود. در اين ميان، با توجه به نتايج بدست آمده از آزمون هاي تجزيه زيستي، يكي از گونه ها كارايي بهتري در تجزيه اكريلونيتريل نشان داد. رنگ‌آميزي گرم و مشاهده ميكروسكوپي نشان داد كه اين گونه، متعلق به باسيل هاي ميله اي شكل ساپروفيت، گرم منفي و متحرک است. به علاوه، آزمون هاي بيوشيميايي نيز نشان داد كه گونه جداسازي شده، كاتالاز مثبت، اكسيداز مثبت و از نظر احياي نيترات منفي بود. اين گونه در محيط هاي مک كانكي آگار، ائوزين متيلن بلو آگار و سالمونلا شيگلا آگار رشد كرده، گلوكز را به صورت اكسيداتيو مصرف مي نمايد. در حالي كه يک گونه غير تخمير كننده لاكتوز به شمار مي رود. همچنين، عدم ذوب ژلاتين و عدم تخمير قندهاي موجود در محيط TSI از ويژگي هاي ديگر اين گونه بود. بنابراين، با توجه به نتايج بدست آمده، تعلق گونه جداسازي شده به گروه گاما پروتئوباكتريا (Proteobacteria) تحت عنوان پسودوموناس پوتيدا (Pseudomonas putida) مورد تاييد قرار گرفت (Forbes et al. 2007). تصاوير ميكروسكوپي مربوط به گونه جداسازي شده در شكل ۱ نشان داده شده است.

تجزيه زيستي اكريلونيتريل و رشد سلولي: تجزيه زيستي اكريلونيتريل، محصولات مياني و نهايي توليد شده در اثر فرآيند تجزيه و رشد سلولي در غلظت هاي اوليه ۱۰۰۰-۵۰۰ ميلي گرم بر ليتر اكريلونيتريل مورد مطالعه قرار گرفت. نمودار ۱ نمونه اي از منحني تجزيه زيستي اكريلونيتريل، محصولات مياني و نهايي توليد شده، رشد سلولي و pH را در برابر زمان واكنش در غلظت اوليه ۵۰۰ ميلي گرم بر ليتر نشان مي دهد. همانطوري كه در اين نمودار ارائه شده است، P. putida قادر به رشد در غلظت اوليه ۵۰۰ ميلي گرم بر ليتر بود و بازده حذف اكريلونيتريل در ۲۲ و ۴۶ ساعت پس از شروع واكنش، به ترتيب ۳۲% و ۴۶% بوده است، ضمن اينكه تجزيه كامل اكريلونيتريل در مدت ۷۰ ساعت اتفاق افتاد. نتايج حاصل از اين مرحله نشاندهنده توليد متعاقب محصول مياني اكريلاميد و محصولات نهايي اكريليک اسيد و آمونياک بود. به اين ترتيب كه پس از گذشت ۷۰ ساعت، غلظت اكريلاميد به حداكثر ۲۳۴ ميلي گرم بر ليتر رسيد و با شروع روند كاهشي آن، غلظت اكريليک اسيد در ۱۰۰ ساعت به ۲۰۶ ميلي گرم بر ليتر رسيد. حداكثر غلظت آمونياک نيز به ۱۲۱ ميلي گرم بر ليتر در ۱۱۸ ساعت رسيد. مقدار OD_{600} كه نشاندهنده نرخ رشد باكتري ها در سيستم زيستي است، در ابتدا ثابت بود و افزايش آن پس از گذشت

۲۲ ساعت شروع و در ۷۰ ساعت به ۲/۹ رسید، از سوي ديگر با پيشرفت واکنش مقدار pH از ۷/۲ به ۶/۸۵ کاهش پيدا کرد.

نتايج حاصل از اعمال غلظت اوليه ۷۰۰ ميلي گرم بر ليتر نشاندهنده نياز به زمان واکنش طولاني تري براي حذف کامل اکريلونيتريل بود. نمودار ۲ نمونه اي از منحني تجزيه زيستي اکريلونيتريل، محصولات مياني و نهايي توليد شده، رشد سلولي و pH را در برابر زمان واکنش در غلظت اوليه ۷۰۰ ميلي گرم بر ليتر نشان مي-دهد. با توجه به اين نمودار، بازده حذف اکريلونيتريل در ۲۲ و ۴۶ ساعت پس از شروع واکنش، به ترتيب ۱۹/۳% و ۵۰% بود و در مدت ۹۴ ساعت، ميزان حذف آن به ۹۸/۶% رسيد. به موازات کاهش غلظت اکريلونيتريل، غلظت ترکيب مياني اکريلاميد افزايش يافت و پس از گذشت ۸۲ ساعت از شروع واکنش به حداکثر غلظت ۳۲۵ ميلي گرم بر ليتر رسيد؛ ضمن اينکه با پيشرفت واکنش از غلظت اکريلاميد کاسته شد و غلظت ترکيبات نهايي اکريليک اسيد و آمونياک در ۱۱۸ ساعت به ترتيب ۲۷۸ و ۱۷۳ ميلي گرم بر ليتر بود. از سوي ديگر، مقدار OD_{600} با پيشرفت واکنش افزايش يافت و پس از ۹۴ ساعت به ۳/۴ رسيد. مقدار pH نيز از ۷/۲ اوليه به ۶/۷ در ۱۱۸ ساعت کاهش يافت.

به منظور بررسي حداکثر ظرفيت حذف اکريلونيتريل توسط P. putida، غلظت اوليه ۱۰۰۰ ميلي-گرم بر ليتر نيز تجربه شد. منحني تغييرات پارامترهاي اندازه گيري شده در طول زمان واکنش در غلظت اوليه ۱۰۰۰ ميلي گرم بر ليتر در نمودار ۳ نشان داده شده است. به دليل غلظت اوليه بيشتر اکريلونيتريل، زمان واکنش نيز طولاني تر شده و در مدت ۱۱۸ ساعت، بازده حذف ۴۲% بدست آمد. ضمن اينکه، در ۲۲، ۴۶ و ۹۴ ساعت، بازده حذف به ترتيب ۶%، ۳۰% و ۴۰% بود و حداکثر غلظت اکريلاميد، اکريليک اسيد و آمونياک به ترتيب ۲۸۹، ۲۱۹ و ۲۱۳ ميلي گرم بر ليتر در ۱۱۸ ساعت پس از شروع واکنش در اين مرحله رسيد. با اين حال، مقدار OD_{600} با پيشرفت واکنش اندکي افزايش يافت و پس از ۹۴ ساعت به ۲/۵ رسيد، مقدار pH نيز در طول زمان واکنش تقريبا ثابت بود.

بحث

بر اساس تحقيقات انجام شده در اين زمينه، تجزيه زيستي اکريلونيتريل در دو مرحله متوالي انجام مي شود که نتيجه مرحله نخست، توليد اکريلاميد در اثر ترشح آنزيم نيتريل هيدراتاز بوسيله باکتري هاي تجزيه کننده و حاصل تجزيه مرحله دوم، توليد اکريليک اسيد و آمونياک در اثر ترشح آنزيم آميداز مي باشد. Li و همکاران در تحقيقي بر روي تجزيه هوازي اکريلونيتريل با استفاده از محيط باکتريايي مخلوط، در مدت ۱۴۰ ساعت، حذف کامل ۲۰۰۰ ميلي گرم بر ليتر اکريلونيتريل را گزارش نمودند (Li et al. 2007). در تحقيق ديگري که با استفاده از باکتري خالص AAS6 توسط Wang و همکاران انجام شد، غلظت اوليه ۴۰۰ ميلي گرم بر ليتر اکريلونيتريل موجود در فاضلاب واقعي در مدت ۴۶/۶ ساعت و غلظت اوليه ۸۸۹ ميلي گرم بر ليتر اکريلونيتريل موجود در فاضلاب مصنوعي در مدت ۷۳/۵ ساعت به طور کامل مورد تجزيه زيستي قرار گرفت(Wang et al. 2001).

در اين تحقيق، گونه باکتري P. putida پس از مراحل سازگارسازي لجن فعال سيستم تصفيه فاضلاب پتروشيمي و انجام آزمون هاي تجزيه زيستي اکريلونيتريل جداسازي و شناسايي شد. نتايج حاصل از آزمون هاي تجزيه زيستي نشان داد که در اين تحقيق نيز تجزيه زيستي اکريلونيتريل دو مرحله اي بوده و در نتيجه تجزيه اکريلونيتريل، توليد اکريلاميد و متعاقب آن در اثر ادامه تجزيه زيستي، ترکيبات نهايي و ساده تر شامل اکريليک اسيد و آمونياک توليد شد. گونه خالص جداسازي شده توانست در غلظت هاي تا ۷۰۰ ميلي گرم بر ليتر، تجزيه زيستي کامل اکريلونيتريل را در طول زمان واکنش تحت شرايط هوازي انجام دهد، طوري که در غلظت ۵۰۰ ميلي گرم بر ليتر، ۷۰ ساعت و در غلظت ۷۰۰ ميلي گرم بر ليتر، ۹۴ ساعت براي تجزيه زيستي کامل اکريلونيتريل مورد نياز بود. در غلظت-

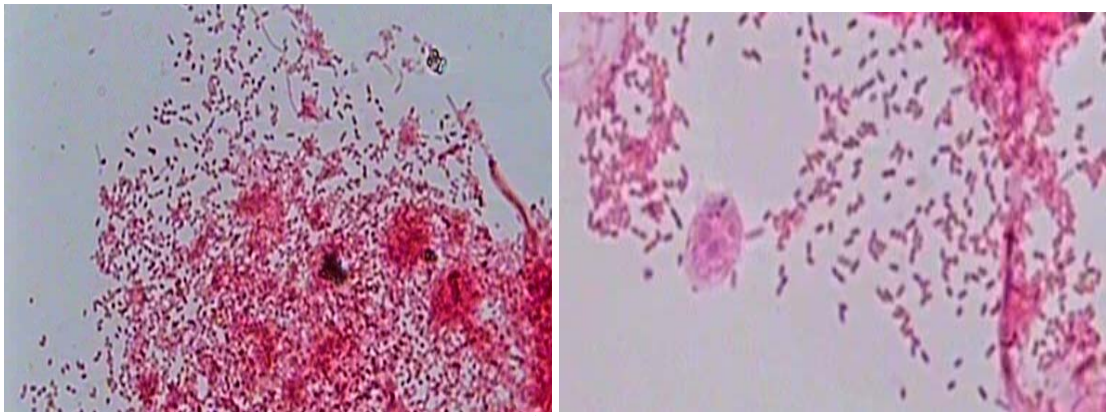
هـاي بـالاتر از ۷۰۰ ميلـي گـرم بـر ليتـر، حـذف كامـل اكريلونيتريل حتي در مدت ۱۱۸ ساعت نيز حاصـل نـشد. از دلايل عدم تجزيه كامل اكريلونيتريـل در غلظـت هـاي زياد مي توان بـه اثـرات بازدارنـدگي تركيبـات واسـطه و نهـايي ناشـي از تجزيـه اكريلونيتريـل بـر روي فعاليـت ميكروبي و يا ناكافي بودن مقدار اكسيژن محلول به عنـوان گيرنده اصلي الكترون اشاره نمود. بـه عـلاوه، در غلظـت اوليه ۱۰۰۰ ميلي گرم بر ليتر، افزايش طول فاز سـكون بـه دليل اثرات بازدارندگي ناشي از غلظت بالاي اكريلونيتريل مشاهده گرديد. مطابق با گزارش Li و همكاران (۲۰۰۷)، مقدار pH در اين تحقيق نيز به موازات پيـشرفت واكـنش به مقدار بسيار ناچيزي افت نمود كه اين امر به دليل توليد اكريليک اسيد و آمونياک ناشي از تجزيه اكريلونيتريل بود. از سوي ديگر، با توجـه بـه رونـد تغييـرات پارامترهـا در نمودارهاي ۱ و ۲ مي تـوان نتيجـه گرفـت كـه گونـه P. putida قادر به استفاده از هر دو شـكل اكريلونيتريـل و تركيبات نهـايي حاصـل از تجزيـه آن (اكريليـک اسـيد و آمونياک) جهت تامين كربن و نيتروژن مورد نياز خود مـي باشد كه اين نتيجه گيري تاييدكننده نتـايج گـزارش شـده توسط Li و همكاران(Li et al. 2007) بـود و در عـين حال با گزارش مبني بر توانايي مصرف محصولات نهـايي (اكريليک اسيد و آمونياک) و عدم توانايي مصرف مستقيم اكريلونيتريـل توسـط گونـه هـاي بـاكتري خـالص (Wang et al. 2004; Shanker et al. 1990)، متفاوت مي باشد.

نتيجه گيري

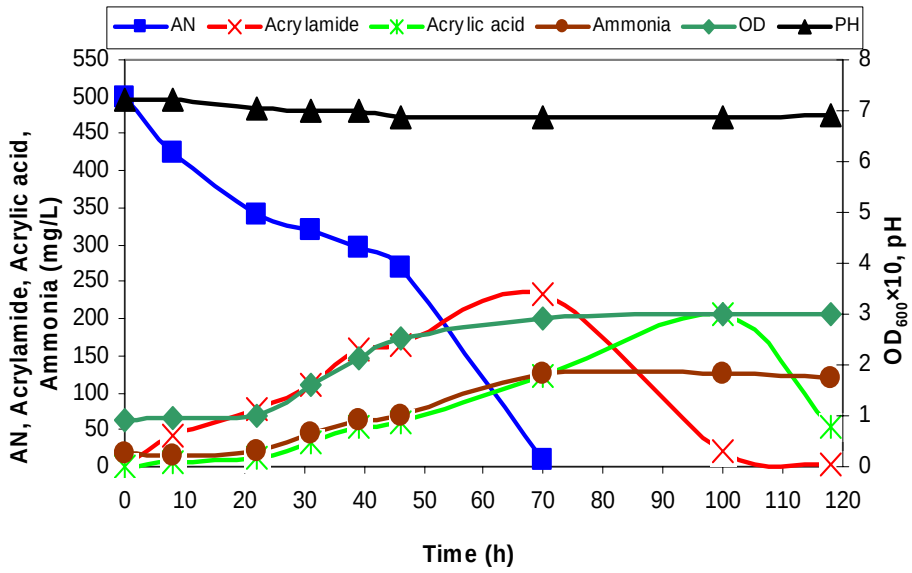
نتايج بدست آمده از اين تحقيـق نـشان داد كـه گونـه بـاكتري P. putida در تجزيـه زيـستي اكريلونيتريـل از فاضلاب صـنايع پتروشـيمي و شـيميايي در شـرايط هـوازي قابليت كاربرد دارد و مي تواند در غلظت هاي اوليـه تـا ۷۰۰ ميلي گرم بر ليتر اكريلونيتريل، با محيط سازگارشود. بنابراين، غني سازي لجن فعال سيستم تصفيه زيستي فاضلاب صـنايع مذكور نسبت به اين گونه مي توانـد باعـث افـزايش كـارايي تجزيه زيستي اكريلونيتريل شـود. همچنـين، در تاييـد ديگـر مطالعات انجام شده در اين زمينه كه قبلا اشاره شد، اين گونه باكتريـايي عـلاوه بـر اسـتفاده مـستقيم از اكريلونيتريـل، از اكريليک اسيد و آمونياک نيز به ترتيب به عنوان منبـع تـامين كربن و نيتروژن مورد نياز خود استفاده مي نمايد.

تشكر و قدرداني

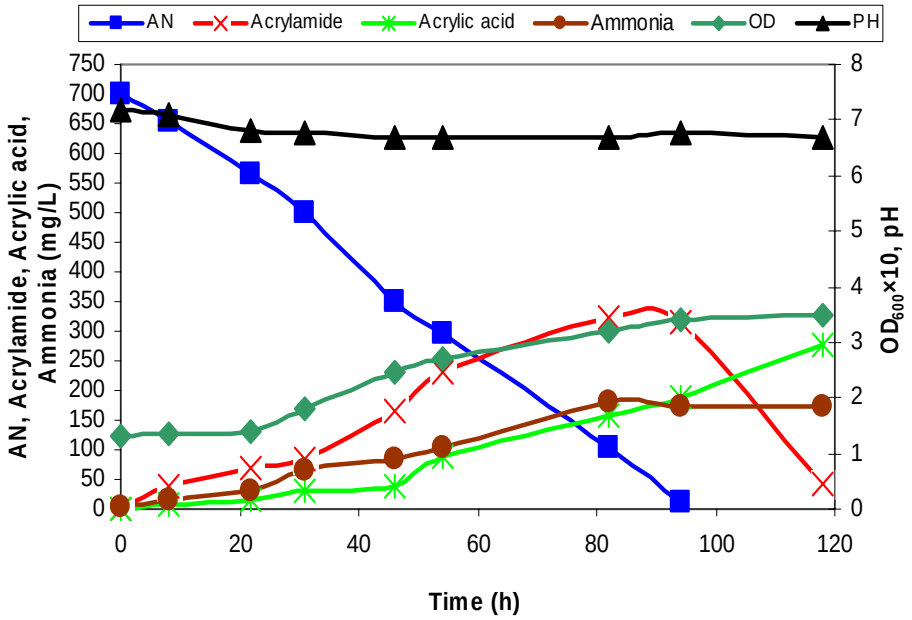
اين تحقيق با حمايت هاي مـالي شـركت پـژوهش و فناوري پتروشيمي (شماره پروژه- ۸۵۰۸۳) انجام شد؛ به اين منظور، نويسندگان مقاله از دكتر محمدي و مهنـدس عنايـت زاده قدرداني مي نمايند. همچنين، از آقاي فرشچيان به دليـل مشاوره در مراحل كشت، جداسازي و شناسايي ميكروبي در آزمايشگاه ميكروبيولوژي آب و فاضلاب دانشكده بهداشـت دانشگاه علوم پزشكي تبريز سپاسگزاري مي گردد.



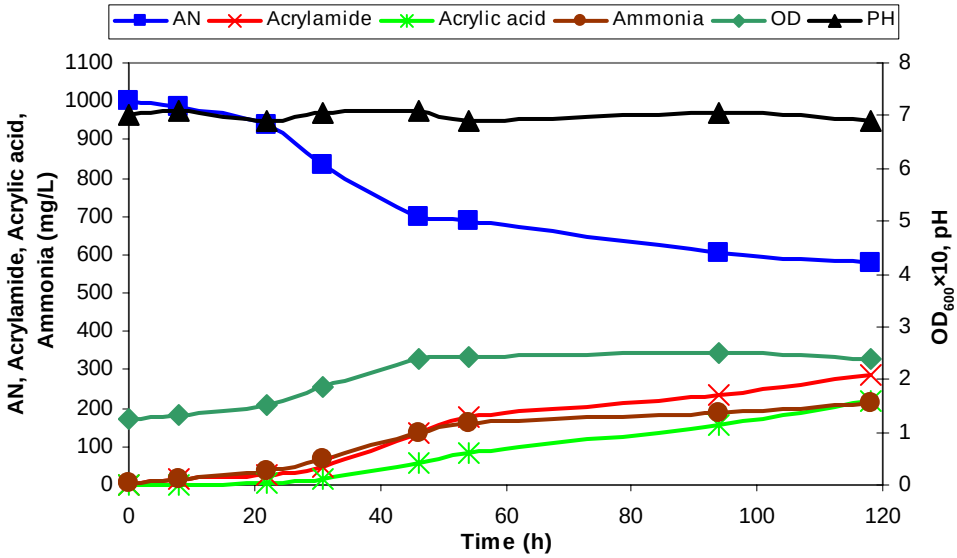
شكل ۱- تصاوير ميكروسكوپي گونه باكتري جداسازي شده



نمودار ۱- منحني تجزيه زيستي اکريلونيتريل و ترکيبات مياني و نهايي آن در غلظت اوليه ۵۰۰ ميلي گرم بر ليتر



نمودار ۲- منحني تجزيه زيستي اکريلونيتريل و ترکيبات مياني و نهايي آن در غلظت اوليه ۷۰۰ ميلي گرم بر ليتر



نمودار ۳- منحني تجزيه زيستي اكريلونيتريل و تركيبات مياني و نهايي آن در غلظت اوليه ۱۰۰۰ ميلي گرم بر ليتر

منابع

Bigey, F., Chebrou, H., Fournand, D. and Arnaud, A., 1999. Transcriptional analysis of the nitrile-degrading operon from Rhodococcus sp. ACV2 and high level production of recombinant amidase with an Escherichia coli-T7 expression system, *Journal of Applied Microbiology*. **86**(5), pp. 752-760.

Chang, C.Y., Chang, J.S., Lin, Y.W., Erdei, L. and Vigneswaran, S., 2006. Quantification of air stripping and biodegradation of organic removal in acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS) industry wastewater during submerged membrane bioreactor operation, *Desalination*. **191,** pp. 162-168.

Chekhovskaya, N., 1980. Ambient waste quality criteria: acrylonitrile, USEPA, Washington DC.

Deshkar, A., Dhamorikar, N., Godbole, S., Krishnamurthi, K., Saravanadevi, S., Vijay, R., Kaul, S. and Chakrabarti, T., 2003. Bioremediation of soil contaminated with organic compounds with special reference to acrylonitrile, *Annali di Chimica*. **93**(9-10), pp. 729-737.

Diane, J.W.B. and Speece, R.E., 1991. A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations, Research Journal of Water Pollution *Control Federation*. **63**, pp. 198-206.

Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S., 2007. Baily and Scott's Diagnostic Microbiology (12th ed.), Elsevier Mosby, Missouri.

Hu, H.Y., Fujie, K., Nozawa, M., Makabe, T. and Urano, K., 1998. Effects of biodegradable substrates and microbial concentration on the acclimation of microbes to acrylonitrile in aerobic submerged biofilter, *Water Science Technology*. **38**(7), pp. 81-89.

Kobayashi, M., Nagasawa, T. and Yamada, H., 1992. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over, *Trends in Biotechnology*. **10**(11), pp. 402-408.

Leeuwen, F.X.R. and Krzyzanowski, M., 2000. Air Quality Guidelines, WHO Regional publications, European series, (2nd edition), No 91.Copenhagen.

Li, T., Liu, J., Bai, R., Ohandja, D.G. and Wong, F.S., 2007. Biodegradation of organonitriles by adapted activated sludge consortium with acetonitrile-degrading

bacteria, *Journal of Environmental Science and Health.* **39**(7), pp. 1767-1779.

Wang, C.C., Lee, C.M. and Cheng, P.W., 2001. Acrylonitrile removal from synthetic wastewater and actual industrial wastewater with high strength nitrogen using a pure bacteria culture, *Water Science Technology*. **43**(2), pp. 349-354.

Watanabe, I., Satoh, Y. and Enomoto, K., 1987. Screening, isolation and taxonomical properties of microorganisms having acrylonitrile-hydrating activity, *Agricultural and Biological Chemistry*. **51**(12), pp. 3193-3199.

White, J.M., Jones, D.D., Huang, D. and Gauthier, J.J., 1988. Conversion of cyanide to formate and ammonia by a pseudomonad obtained from industrial wastewater, *Journal of Industrial Microbiology*. **3**, pp. 263-272.

Wyatt, J.M. and Knowles, C.J., 1995. The development of a novel strategy for the microbial treatment of acrylonitrile effluents, *Biodegradation.* **6**(2), pp. 93-107.

microorganisms, *Water Research.* **41**, pp. 3465-3473.

Nawaz, M.S., Franklin, W., Campbell, W.L., Heinze, T.M. and Cerniglia, C.E., 1991. Metabolism of acrylonitrile by Klebsiella pseumoniae, *Archives of Microbiology*. **156**(3), pp. 231-238.

Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E., 1995. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Applied and environmental Microbiology*. **49**(1), pp. 1-7.

Roach, P.C., Ramsden, D.K., Hughes, J. and Williams, P., 2004. Biocatalytic scrubbing of gaseous acrylonitrile using Rhodococcus rubber immobilized in synthetic silicone polymer (ImmobaSil) rings, Biotechnology and *Bioengineering*. **85**(4), pp. 450-455.

Shanker, R., Ramakrishna, C. and Seth, P.K., 1990. Microbial degradation of acrylamide monomer, *Archives of Microbiology*. **154,** pp. 192-198.

Wang, C.C., Lee, C.M. and Chen, L.J., 2004. Removal of nitriles from synthetic wastewater by acrylonitrile utilizing