

حذف بیولوژیکی غلظت های بالای فنل توسط گرانول های قارچ فوزاریوم کولموروم از محلول های سنتتیک

رسول خسروی^۱، سید غلامرضا موسوی^۲، شهلا رودبار محمدی^۳

نویسنده مسئول: تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بهداشت محیط moussavi@modares.ac.ir

پذیرش: ۹۰/۰۵/۱۷

دریافت: ۹۰/۰۳/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: ترکیبات فنلی در فاضلاب صنایع مختلف حضور داشته و جزو آلاینده های دارای تقدم می باشند. استفاده از گونه های خالص میکروبی به ویژه قارچ ها و مخمرها به دلیل سازگار بودن با محیط و داشتن پتانسیل تخریب کامل آلاینده ها در غلظت های بالا، توان رقابت با فرایندهای متداول را داراست. در این مطالعه بررسی کارایی گرانول های قارچ فوزاریوم کولموروم جهت تجزیه غلظت های بالای فنل انجام گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه کارایی حذف فنل از فاضلاب مصنوعی در مقیاس آزمایشگاهی به صورت ناپیوسته انجام شده است. جهت اندازه گیری COD از روش تقطیر باز و برای سنجش مقدار فنل از روش رنگ سنجی ۴- آمینو آنتی پیرین با استفاده از اسپکتروفوتومتر *Unico-UV 2100 UV/VIS* در طول موج ۵۰۰ نانومتر استفاده گردید. برای شناسایی گونه قارچ از محیط کشت *PDA* و *CLA* استفاده شد. غلظت فنل مورد استفاده در این آزمایش بین ۲۰۰۰۰-۵۰۰ mg/L بوده است.

یافته ها: نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت فنل فاضلاب به عنوان عامل محدودکننده تجزیه نمی باشد. گرانول های قارچ فوزاریوم کولموروم قادر است حداکثر غلظت موجود در صنایع که نزدیک ۲۰۰۰۰ میلی گرم بر لیتر را در مدت زمان ۳۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به طور کامل تجزیه کرده و همزمان بیش از ۹۷٪ COD محلول را که حدود ۳۶۰۰۰ میلی گرم بر لیتر است، حذف نماید.

نتیجه گیری: قارچ فوزاریوم کولموروم به دلیل داشتن توانایی بسیار بالا در تجزیه فنل، راندمان بالای حذف COD و همچنین ته نشینی راحت و سریع، گزینه مناسبی جهت تصفیه انواع فاضلاب های فنلی با غلظت های مختلف فنل است.

واژگان کلیدی: فنل، فاضلاب مصنوعی، قارچ فوزاریوم کولموروم، سیستم ناپیوسته

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دکترای بهداشت محیط، استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دکترای قارچ شناسی، استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

یکی از نتایج توسعه سریع صنایع، تولید حجم زیاد فاضلاب و در نتیجه آلوده شدن منابع آب های سطحی و زیرزمینی به مواد شیمیایی آلی و غیر آلی مختلفی از قبیل ترکیبات فنلی، رنگ ها و فلزات سنگین است (۱). فنل و ترکیبات فنلی جزو مواد آلی با ترکیبات بسیار پایدار بوده (۲) و از آلاینده های متداول منابع آبی می باشند (۳) که به صورت طبیعی از قطران زغال سنگ و تقطیر بنزین، و به صورت مصنوعی در اثر حرارت دادن سولفات بنزن سدیمی با سود آبدار در فشار بالا تولید می شود (۴). به طور معمول سالانه حدود ۶ میلیون تن فنل در سراسر جهان تولید می شود (۵) فنل و مشتقاتش در فاضلاب های صنایع مختلفی از قبیل پالایشگاه های نفت (۶-۵۰۰ mg/L)، کوره های زغال سنگ (۶۸۰۰ mg/L - ۹)، کک سازی ها (۲۸ - ۳۹۰۰ mg/L)، کارخانه های پتروشیمی (۲/۸ - ۱۲۲۰ mg/L)، رزین و پلاستیک، فرایندهای تولید روغن زیتون، کارخانه های پارچه و چرم، فرایندهای ریخته گری، کارخانه های کاغذ و خمیر کاغذ و کارخانه های بازیافت کائوچو حضور دارند و عمدتاً از طریق تخلیه ی فاضلاب های این صنایع وارد محیط می شود (۶). فنل حتی با غلظت های کم (مثلاً ۲۵ mg/L - ۵) می تواند به زندگی ماهی ها آسیب برساند (۷). بنابراین به منظور حفظ و کنترل سلامت انسان و محیط در مقابل اثرات مضر فنل، ضروری است که فاضلاب های حاوی این ترکیبات سمی قبل از تخلیه به محیط با یک فرایند موثر و دوستانه محیط تصفیه گردند (۸). روش های تصفیه زیادی از قبیل جذب روی کربن فعال، اکسیداسیون شیمیایی، اکسیداسیون الکتروشیمی و تجزیه بیولوژیکی برای حذف فنل از محیط آلوده توسعه یافته است (۹). با وجود خصوصیات سمی فنل، تعدادی از میکروارگانیسم ها می توانند فنل و ترکیبات فنلی را تحت شرایط هوازی مورد استفاده قرار دهند که این امر مسیر توسعه تصفیه های اقتصادی برای پساب های آلوده می باشد (۱۰). هر چند تصفیه بیولوژیکی فاضلاب های فنلی می تواند با سیستم های لجن فعال متعارف انجام گردد، اما

مشاهده شده که این فرایندها به دلیل نوسانات در بارگذاری فنل و یا به دلیل تماس با بارهای فنلی زیاد، که در برخی صنایع از جمله واحدهای روغن زیتون وجود دارد، دچار مشکل شده و کارایی خوبی ندارند. بنابراین برای رفع این مشکل کشت های خالصی از گروه های میکروبی مختلفی تهیه شده و کارایی آن در حذف فنل مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱). در این میان اخیراً کشت های خالص قارچ ها و مخمرها توانایی بالایی در حذف فنل نشان داده اند (۷). Jiang و همکاران (۲۰۰۴) دو گونه باکتری تجزیه کننده فنل جداسازی کردند و پتانسیل تجزیه فنل آنها را تشریح نمودند (۱۲). تحقیقات زیادی نشان داده که با استفاده از ساختار گرانولی که میکروارگانیسم ها تشکیل می دهند می توان تجزیه غلظت های بالاتری از فنل را به ویژه در شرایط هوایی به دست آورد. Hofmann و (۱۹۸۵) و Krueger، Vallini و همکاران (۲۰۰۱)، ALexieva و همکاران (۲۰۰۴) و Santos و Linardi (۲۰۰۴)، بعضی از قارچ ها را از پساب صنایع جداسازی و شناسایی کرده اند که می توانند غلظت های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ mg/L فنل را تجزیه نمایند (۷). جدول ۱ بعضی از مطالعات جدیدی که بررسی تجزیه فنل در آب را با استفاده از کشت های خالص یا مخلوط انجام داده شده را نشان می دهد. بنابراین اخیراً به استفاده از بیومس قارچ ها برای تجزیه آلاینده های سمی به علت مقاومت آنها به شرایط محیطی و نیز مواد سمی، توجه زیادی معطوف شده است. اگر چه تاکنون گونه های قارچی زیادی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است ولی هنوز گونه های بومی زیادی نیز وجود داشته که استفاده از آن ها برای تصفیه فاضلاب و کنترل آلودگی محیط گزارش نشده است. از طرفی با توجه به وجود فاضلاب هایی با غلظت بالای فنل از جمله پساب صنایع شیمیایی تولید روغن زیتون نیاز به روشی جهت تصفیه این غلظت های بالا می باشد. در این راستا، در این مطالعه از بیومس گرانولی قارچ فوزاریوم کولموروم جدا شده از پساب صنعتی برای تجزیه غلظت های بالای فنل استفاده شده است. در این تحقیق اثر غلظت های مختلف بر عملکرد بیومس گرانولی در تجزیه فنل و حذف COD آن مطالعه شده است.

جدول ۱: مطالعات انجام شده جهت بررسی تجزیه فنل در آب با استفاده از کشت های خالص یا مخلوط

توضیحات	حد اکثر میزان تجزیه* g/g/h	غلظت اولیه فنل mg/L	گونه	رفرنس
محیط بی هوازی	NA	۵۰۰	جمعیت باکتریایی	*
استخراج شده از پساب صنعتی	NA	۳۶۸-۶۶۰	کنسرسیون باکتریایی	*
محیط خالص	NA	۱۰۰-۵۰۰	<i>B. thermoLeovorans</i> sp. A2	*
محیط خالص روی بسترهای شناور	NA	۱۰۰۰	<i>Candida tropicalis</i> LB-L20	*
استخراج شده از لجن فعال	NA	۶۰-۳۵۰	<i>Acinetobacter</i> sp.	*
قارچ های جداسازی شده از پساب فرایندهای تولید استیل	NA	۳۷۶-۱۸۸۰	<i>Graphium</i> sp. FIB4	*
محیط خالص و جهش داده شده هایشان	NA	۶۰۰-۱۲۰۰	<i>T. cutaneum</i> R57	*
استخراج شده از لجن فعال	NA	۰-۲۰۰۰	<i>Candida tropicalis</i>	(۷)
استخراج شده از گرانول های هوازی	۰/۲۹۲	۴۰۰	<i>Pandoraea apista</i> strain LMG 16407	*
استخراج شده از گرانول های هوازی	۰/۰۵۹	۴۰۰	<i>Hydrogenophaga palleronii</i> DSM 63	*
استخراج شده از گرانول های هوازی	۰/۰۳۹	۱۰۰-۳۰۰۰	<i>Candida tropicalis</i>	(۱۳)
استخراج شده از لجن فعال	NA	۱۰۰-۲۰۰۰	NA	(۸)
استخراج شده از لجن تصفیه خانه ی فاضلاب	NA	۵۰۰-۲۵۰۰	<i>Corynebacterium</i> sp. DJ1	(۱۴)
فراهم شده از (National Chemical Laboratory, Pune, India)	NA	۲۰۰۰	<i>Candida tropicalis</i> NCIM 3556 ceLLs	(۱۵)
استخراج شده از گرانول های هوازی	NA	۵۰۰-۱۵۰۰	<i>Acinetobacter</i>	(۱۶)
استخراج شده از پساب صنایع	NA	۵۰۰-۲۰۰۰۰	گرانول هوازی	این مطالعه

× منبع (۱۰) و منابع ارجاع شده در آن ×× در واحد g/g vss/h فنل NA: موجود نبود

مواد و روش ها

مواد: در این مطالعه برای تهیه غلظت های مختلف فنل، مقدار ۲۰ g فنل کریستالی با آب به حجم یک لیتر رسانده شد و به عنوان محلول استوک مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه فاضلاب از آب شیر استفاده شد. برای تامین نوترینت های لازم برای میکرواورگانیزم ها، KH_2PO_4 ، K_2HPO_4 ، NH_4CL و عناصر جزئی به فاضلاب اضافه شد. از بین مواد شیمیایی مورد استفاده ۴-آمینو آنتی پیرین مصرفی، محصول شرکت سیگما آلدریج و فنل محصول شرکت شارلو و سایر مواد شیمیایی محصول شرکت مرک بوده است. برای شناسایی گونه قارچ از محیط کشت PDA و CLA استفاده گردید.

روش کشت و شناسایی قارچ: برای شناسایی گونه قارچ از محیط کشت PDA و CLA استفاده شد. در این تحقیق ویژگی های ماکروسکوپی مثل سرعت رشد و نحوه رشد کلنی و نیز خصوصیات میکروسکوپی قارچ مثل اندازه و شکل ماکروکنیدهای تشکیل شده در اسپوردوکیوم، شکل

میکروکونیدیو فور، شکل سلول انتهایی و پایه ماکروکنیدی، وجود و عدم وجود میکروکنیدی، نحوه تولید میکروکنیدی، نوع فیالید، وجود یا فقدان کلامیدوسپور و نیز چگونگی تشکیل آن مبنای شناسایی گونه ی فوزاریوم بود.

خودهی بیومس گرانولی: مقداری از نمونه قارچ به ۲۰۰ میلی لیتر آب شیر کلرزدایی شده اضافه و کل نمونه به داخل ارلن ۵۰۰ میلی لیتری انتقال داده و به آن ۱ میلی لیتر نوترینت اضافه گردید. نوترینت اضافه شده حاوی NH_4CL به عنوان منبع نیتروژن و KH_2PO_4 و K_2HPO_4 به عنوان منبع فسفر میکرواورگانیزم ها بود. ارلن به درون هم زن مجهز به انکوباتور مدل KS 4000i controL ساخت IKA آلمان انتقال یافت و دمای آن روی ۳۷ درجه سانتی گراد و دور آن روی ۱۰۰ rpm تنظیم گردید (شکل ۱). پس از هر ۲۴ ساعت، نمونه را با آب به حجم رسانده و در پایان هر هفته مقدار ۱ میلی لیتر نوترینت به محیط مایه اضافه گردید. پس از مدت یک ماه محتوی راکتور

فرایند تجزیه و نحوه ی آنالیز نمونه ها: غلظت های مورد استفاده از ۵۰۰ تا ۲۰۰۰۰ mg/L بود. در هر دوره آزمایش، COD و فنل نمونه اولیه و نیز نمونه های برداشت شده در فواصل زمانی مختلف سنجیده و گزارش گردید. با توجه به این که در طول زمان ماند مقداری از نمونه تبخیر می شد، ابتدا با آب مقطر به حجم اولیه رسانده شده و سپس مقدار ۱ cc از نمونه را با سمپلر برداشته و به حجم مورد نیاز برای آنالیز فنل و COD رقیق شد. در این تحقیق جهت اندازه گیری COD از روش تقطیر باز، و برای سنجش مقدار فنل از روش رنگ سنجی ۴- آمینو آنتی پیرین با استفاده از اسپکتروفتومتر Unico-UV 2100 UV/VIS در طول موج ۵۰۰ نانو متر براساس روش های ارایه شده در کتاب استاندارد آزمایش های آب و فاضلاب (۱۷) استفاده گردید.

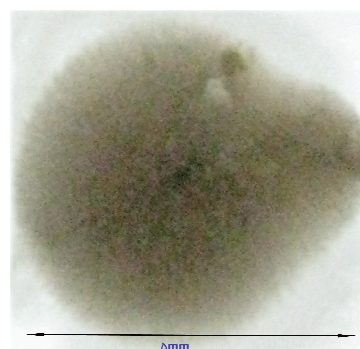
یافته ها

با توجه به شکل ۳ مشخص است که راندمان تجزیه این قارچ برای غلظت ۵۸۷ mg/L فنل پس از یک هفته به بالای ۹۹٪ رسیده است. همزمان حذف COD نیز صورت گرفته و با افزایش زمان ماند حذف COD نیز به بالای ۹۴٪ رسیده است. شکل ۴ غلظت بالاتری از فنل مورد مطالعه را نشان می دهد، در این حالت نیز گرانول های قارچ فوزاریوم کولموروم قادرند، ظرف مدت یک هفته بالای ۹۹٪ از فنل فاضلاب را تجزیه نمایند و مشخص می شود که غلظت بالاتر فنل سرعت تجزیه را بالاتر می برد. همچنین راندمان حذف COD پس از ۲۴۰ ساعت زمان ماند، نزدیک ۹۵٪ رسیده است. در این مرحله غلظت اولیه فنل ۱۸۳۶۰ mg/L بوده است. با توجه به شکل ۵ مشخص می گردد که این قارچ بدون داشتن فاز تاخیری تجزیه ۱۰۰٪ فنل را در مدت زمان ۳۳ روز انجام داده است. شکل ۶ که راندمان حذف COD را با غلظت اولیه ۳۶۰۴۵ mg/L نشان می دهد، بیانگر این موضوع است که این میکروارگانیسم در مدت ۳۳ روز زمان ماند، ۹۹/۷٪ غلظت اولیه را حذف نموده است.

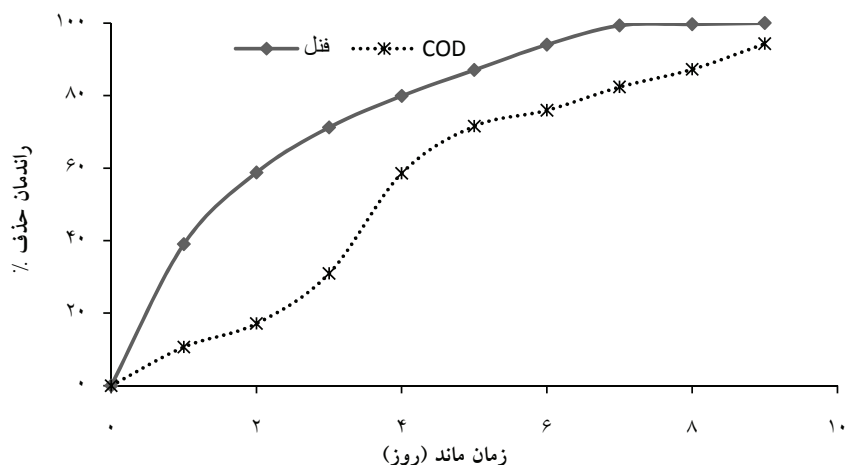
درون یک مزور ۲۵۰ سی سی ریخته شد تا فرصت کافی برای ته نشینی گرانول های ریز تشکیل شده فراهم شود، پس از ته نشینی کامل این گرانول ها، مایع رویی تخلیه و گرانول های ته نشین شده به درون راکتور بازگردانده شد و پس از افزودن ۱ میلی لیتر نوترینت با محلول ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر فنل به حجم ۲۰۰ cc رسانده شد و دوباره به درون هم زن مجهز به انکوباتور با تنظیمات ذکر شده انتقال یافت و به مدت یک ماه نگه داری و راهبری، همانند ماه اول انجام گردید. در پایان این ماه توده هایی از بیومس گرانولی با قطر بین ۵-۲ میلی متر (شکل ۲) در محیط کشت آبی مشاهده گردید که به راحتی قابل ته نشینی بود. در پایان این مدت محتوی ارلن داخل مزور ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد تا گرانول های رشد کرده کاملاً ته نشین گردد. سپس مایع رویی به ارلن دیگری انتقال داده شد تا شرایط رشد و تکثیر گونه در این ارلن نیز ادامه یابد، گرانول های ته نشین شده به داخل راکتور برگردانده شد تا شروع فرایند تجزیه در این راکتور ناپیوسته انجام گردد.



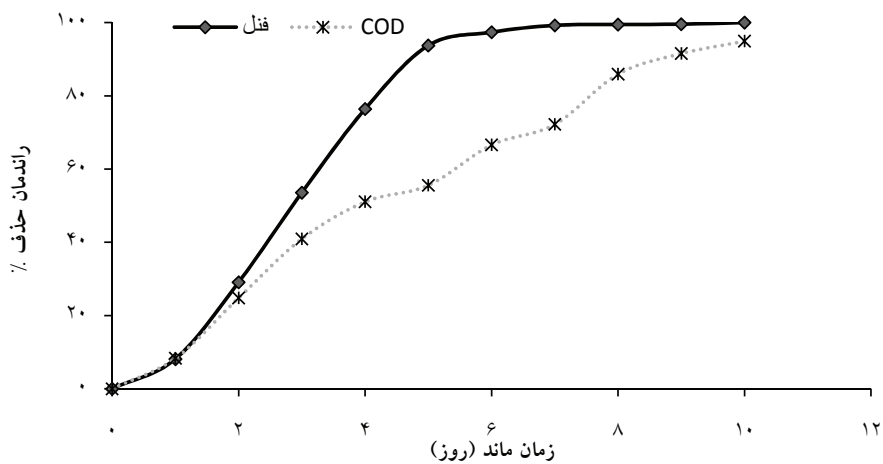
شکل ۱: هم زن مجهز به انکوباتور و راکتورهای آزمایشی



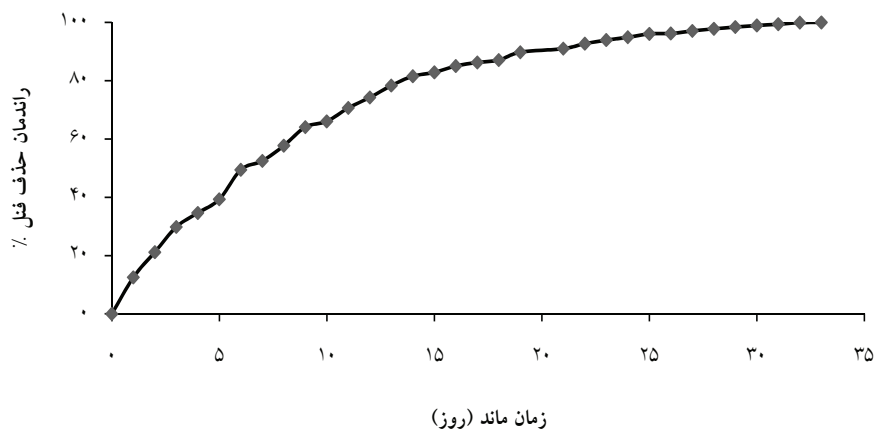
شکل ۲: تصویر یک گرانول شکل گرفته از قارچ



شکل ۳: راندمان تجزیه فنل و حذف COD نسبت به زمان (غلظت اولیه فنل ۵۸۷ mg/L و غلظت اولیه COD ۱۲۳۲ mg/L)



شکل ۴: راندمان تجزیه فنل و حذف COD نسبت به زمان (غلظت اولیه فنل ۹۱۱ mg/L و غلظت اولیه COD ۱۷۷۸ mg/L)



شکل ۵: راندمان تجزیه فنل نسبت به زمان (غلظت اولیه فنل ۱۸۳۶۰ mg/L)

توانستند بدون اثرپذیری از غلظت فنل، کارایی خوبی در تجزیه غلظت‌های بین $1700-1000$ mg/L را داشته باشند اما با اضافه کردن غلظت فنل و رساندن آن به 2000 mg/L کارایی حذف این سیستم کاهش پیدا کرد (۸). همانطور که بیان شد، این گرانول‌های بیولوژیکی قادرند همزمان با تجزیه فنل حذف COD را نیز به همراه داشته باشند.

نتیجه گیری

یکی از عواملی که می‌تواند دلیل بر توانایی بالای تحمل شوک‌های زیاد این بیومس بیولوژیکی باشد لایه ژلاتینی غنی از پلی ساکاریدی باشد که این بیومس در اطراف خود تشکیل می‌دهد که این لایه مانع تماس مستقیم سلول با غلظت‌های بالای فنل موجود در سیستم می‌گردد (۱۶). به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که این بیومس گرانولی قادر است حداکثر غلظت فنل موجود در پساب صنایع را به طور کامل تجزیه نماید و همزمان COD آن را با راندمان بسیار بالایی کاهش داده، به طوری که می‌شود پساب سیستم را به داخل منابع آب‌های پذیرنده تخلیه نمود.

صورت سرعت حذفی برابر با 83 mg/L.h داشته و در کل این دوره ی ۳۳ روزه، به طور متوسط سرعت حذفی برابر با 24 mg/L.h را نشان داده است. شکل ۶ که راندمان حذف COD با غلظت 36045 mg/L را نشان می‌دهد در مدت زمان ماند ۳۳ روزه حذف بیش از ۹۹٪ COD را نشان می‌دهد. برای حذف COD در این مرحله نیز مشخص است که در دو روز اول سرعت حذف پایینی وجود داشته اما با تجزیه فنل و شکستن آن به ترکیبات ساده تر، راندمان حذف COD نیز افزایش یافته است، که این مساله می‌تواند مبین این باشد که فنل پس از تجزیه به عنوان منبع انرژی این گرانول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و تبدیل به جرم سلولی می‌گردد. با توجه به مطالعات انجام شده تاکنون هیچ گونه ی خالص و یا مخلوط گرانولی و یا غیر گرانولی بیولوژیکی نتوانسته در غلظت‌های بیش از 3000 mg/L مورد بهره برداری قرار گیرد، در تحقیقی که Adva و همکاران (۲۰۰۷) انجام دادند مشخص شد غلظت 1000 mg/L اثرات ممانعت کننده بر روی گونه دیده نشده اما با افزایش غلظت فنل تا 1500 mg/L اثرات ممانعت کننده رشد و تجزیه قابل مشاهده بوده است (۱۶). همچنین در تحقیقی که موسوی و همکاران (۲۰۱۰) انجام دادند، گرانول‌های بیولوژیکی به کار برده در راکتور SBR

- ules. *Bioresource Technology*. 2009;100(21):5051-5.
15. Varma RJ, Gaikwad BG. Rapid and high biodegradation of phenols catalyzed by *Candida tropicalis* NCIM 3556 cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;43(6):431-5.
16. Adav SS, Chen M-Y, Lee D-J, Ren N-Q. Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules. *Chemosphere*. 2007;67(8):1566-72.
17. APHA. *Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters*. 20s ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA); 1998.

Removal of High Concentration of Phenol from Synthetic Solutions by *Fusarium Culmorum* Granules

Khosravi R.¹, *Moussavi G.R.¹, Roudbar Mohammadi Sh.³

¹Department of Environmental Health, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received; 13 June 2011 Accepted; 08 August 2011

ABSTRACT

Background and Objectives: Effluent generated in several industries contains phenolic compounds, which have been classified as priority pollutants. Due to its toxicity, the conventional systems are inefficient for treatment of phenol-Laden wastewater. Biological processes using pure microbial culture, including fungi and yeast, are environmentally friendly techniques capable of complete destruction of contaminants.

Materials and Methods: This work was aimed at investigating the efficiency of a fungi specie in the decomposition of high concentrations of phenol ranging from 500 to 20000 mg/L. Several batch reactors were operated at different phenol concentration. The concentration of residual phenol was monitored over time using colorimetric method 4-aminoantipyrine. The removal efficiency was calculated considering the initial phenol concentration.

Results: Experimental data indicated that the phenol could efficiently degrade using the selected culture. The developed granules could completely degrade phenol at concentrations up to 20000 mg/L.

Conclusion: It can be concluded from the experimental data that the biodegradation using the Fungi granules is a very efficient and thus promising technique for treatment of wastewaters containing phenolic compounds.

Keywords: Phenol, Synthetic waste water, *Fusarium Culmorum* Fungi, Batch reactor

*Corresponding Author: moussavi@modares.ac.ir

Tel: +98 21 82883827 Fax: +98 21 82883825