

# بررسی تجزیه‌زیستی پارانیتروفنل در کشت لرزان و بیوراکتور هواگرد خارجی توسط باکتری آلکالیجنس فایکالیس

فرشته نعیم‌پور<sup>۲</sup>

لیلی آبکار<sup>۱</sup>

(دریافت ۸۸/۶/۲۶ پذیرش ۸۹/۴/۸)

## چکیده

در این مطالعه برای اولین بار توانایی تجزیه‌زیستی پارانیتروفنل توسط باکتری آلکالیجنس فایکالیس در یک پساب نمونه در بیوراکتور هواگرد بررسی شد. در ابتدا اثر عواملی چون منبع نیتروژنی (عصاره مخمر، پپتون و اوره)، قلیابیت محیط (pH برابر ۶، ۷ و ۸) و غلظت اولیه نیتروفنل (۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بر رشد باکتری و حذف نیتروفنل در کشت لرزان بررسی گردید. سپس عملکرد بیوراکتور هواگرد در حذف نیتروفنل تحت شرایط مناسب به‌دست آمده در کشت لرزان در غلظت‌های اولیه ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و نرخ‌های هوادهی متفاوت ۱، ۲ و ۴ لیتر در دقیقه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج کشت لرزان بیانگر آن است که استفاده از عصاره مخمر و pH ۸ منجر به بالاترین مقدار توده زیستی و میزان حذف نیتروفنل می‌گردند. نتایج بیوراکتور هواگرد در تمامی نرخ‌های هوادهی، نشان دهنده درصد حذف بیشتر نیتروفنل و کاهش زمان حذف نسبت به کشت لرزان است. بیشترین میزان حذف در کشت لرزان و بیوراکتور هواگرد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب به میزان ۴۰ و ۶۰ درصد به‌دست آمد. در میان نرخ‌های هوادهی، ۲ لیتر در دقیقه، بیشترین میزان حذف را در همه غلظت‌های نیتروفنل در بیوراکتور نشان می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** آلکالیجنس فایکالیس، بیوراکتور هواگرد خارجی، پارانیتروفنل، پساب، تجزیه‌زیستی

## Investigation of Para-nitrophenol Biodegradation in Shake Flasks and External Airlift Bioreactor by *Alcaligenes faecalis*

Leili Abkar<sup>1</sup>

Fereshteh Naeimpoor<sup>2</sup>

(Received Sep. 17, 2009 Accepted June 29, 2010)

### Abstract

In this study, removal of para-nitrophenol (PNP) from synthetic wastewater by *Alcaligenes faecalis* was investigated for the first time in an external airlift bioreactor. The effect of factors such as pH (6, 7 and 8) and nitrogen source (yeast extract, peptone and urea) as well as initial PNP concentration (50, 75, 100 and 125 mg/lit) on PNP removal and bacterial growth was first examined in shake flask experiments. Then, performance of airlift bioreactor was studied at various aeration rates (1, 2 and 4 l/min) and initial PNP concentrations (50, 75 and 100 mg/lit). In shake flask experiments, yeast extract and pH value of 8 led to the highest bacterial growth and PNP removal. In all bioreactor experiments, PNP removal was higher and biodegradation time was lower compared to shake flask experiments. The maximum of 40 and 60% PNP removal were obtained in shake flask and bioreactor experiments at 50 mg/l initial PNP concentration respectively. Among examined aeration rates, 2 L/min resulted in the highest PNP removal percentage at all initial PNP concentration.

**Keywords:** *Alcaligenes faecalis*, External Airlift Bioreactor, Para-nitrophenol (PNP), Wastewater, Biodegradation.

1. M.Sc., School of Chemical Eng., Biotech. Research Lab., Iran University of Sciences and Tech., Tehran  
2. Assist. Prof., School of Chemical Eng., Biotech. Research Lab., Iran University of Sciences and Tech., Tehran (Corresponding Author) (+98 21) 77451500 fnaeim@iust.ac.ir

۱- کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی شیمی، آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران  
۲- استادیار دانشکده مهندسی شیمی، آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران (نویسنده مسئول) ۰۲۱)۷۷۴۵۱۵۰۰ fnaeim@iust.ac.ir

هوازی و هم بی هوازی توانایی تجزیه زیستی نیتروفل را دارند، اما از دید عملی پساب آلوده به ۴- نیتروفل باید به صورت هوازی مورد تجزیه زیستی قرارگیرد زیرا تجزیه بی هوازی تحت شرایط متانژنیک علاوه بر این که فرایند کندی است، ممکن است منجر به تولید مشتقات سمی آمینو نیز بشود [۱۵].

علاوه بر انتخاب میکروارگانیسم توانا، یکی از چالشها در تجزیه زیستی ماده آلاینده، انتخاب بیوراکتور مناسب است. توجه خاص به استفاده از بیوراکتورها برای حذف این ماده در سیستم های هوازی به دلیل نیاز به سه مولکول اکسیژن در مکانیسم تجزیه هوازی آن است [۱۶].

در میان انواع بیوراکتورها، بیوراکتور هواگرد یکی از گزینه های بسیار مناسب برای انجام واکنش های زیستی به خصوص در زمینه تصفیه پساب است زیرا به دلیل طراحی مکانیکی ساده، عدم نیاز به همزن مکانیکی، هزینه ساخت پایین و اختلاط خوب و مؤثر، برتری قابل توجهی نسبت به سایر انواع بیوراکتورها دارد. در جدول ۱ نمونه هایی از کاربرد بیوراکتورهای متفاوت در تجزیه زیستی آلاینده ها آورده شده است.

با توجه به عملکرد مثبت بیوراکتور هواگرد در حذف آلاینده هایی نظیر فنل و سرول<sup>۸</sup> در تحقیقات مختلف، در این مطالعه تأثیر بیوراکتور هواگرد خارجی در حذف پارانیتروفنل با استفاده از گونه *آلکالیجنس فایکالیس* بررسی شد.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- میکروارگانیسم و تهیه مایه تلقیح

میکروارگانیسم مورد استفاده در آزمایشها، باکتری *آلکالیجنس فایکالیس* ATCC<sup>۹</sup> ۸۷۵۰ بود. این باکتری به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری های ایران وابسته به سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه و بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد. نگهداری این میکروارگانیسم از طریق تهیه زیر کشت و حفظ آن در دمای ۴ درجه سلسیوس تا حداکثر یکماه انجام گرفت. به منظور تهیه مایه تلقیح، در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مغذی شامل پپتون، کلرید سدیم و عصاره مخمر به ترتیب با غلظت ۱۰، ۱۰ و ۵ گرم در لیتر یک لوپ وارد گردید و به مدت ۱۸ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس ۱ میلی لیتر از این کشت اولیه به ۵۰ میلی لیتر از همان محیط کشت مغذی اضافه شد و به مدت ۶ ساعت (میان فاز لگاریتمی) در دور ۲۰۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. به منظور کاهش زمان تأخیر و

ترکیبات فنلی به طور گسترده در صنایع شیمیایی تولید و وارد محیط زیست می شوند. این ترکیبات در آب رودخانه ها، خاکها و پساب خروجی از صنایع یافت می شوند. داده های کمی موجود برای ترکیبات فنلی در صنایع مختلف اغلب به صورت غلظت کل فنل گزارش می گردد. به طور نمونه غلظت فنل گزارش شده در پساب پالایشگاهها حدود ۵۰ میلی گرم در لیتر برای واحدهای تقطیر و برای واحد شکست کاتالیستی در محدوده ۵۰ تا ۵۰۰ میلی گرم در لیتر است [۱]. چن و همکاران<sup>۱</sup> میزان فنل کل را در پساب صنعتی مانند تولید رنگ و رزین ۴۰۰ میلی گرم در لیتر و در تولید اسید نفتالیک ۱۲ میلی گرم در لیتر گزارش کردند [۲].

حضور گروه های جانبی مانند گروه های کلر و نترات در فنل، سبب افزایش سمیت این ماده می گردد [۱]. در میان ترکیبات فنلی، ۴- نیتروفلن به دلیل استفاده وسیع در صنایع مختلف، یکی از مهم ترین ترکیبات فنلی به شمار می رود [۳-۵]. این ماده جزو مواد آلی با قدرت آلاینده گی بسیار بالا است که موجب سرطان، کاهش ایمنی بدن و ایجاد تغییرات ژنتیکی در انسان می شوند [۶]. به همین دلیل سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا<sup>۲</sup>، ۴- نیتروفلن را در گروه آلاینده های خطرناک قرار داده است [۷]. بنابراین باید روش های تصفیه مناسبی برای کاهش سمیت این ماده قبل از تخلیه به طبیعت مورد استفاده قرارگیرد. در بین روش های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی حذف نیتروفلن، روش بیولوژیکی به دلیل سازگاری با محیط زیست، عدم تولید محصولات جانبی، امکان تبدیل آن به مواد بی ضرر و کم هزینه بودن مورد توجه محققان قرار گرفته است [۴، ۵، ۸-۱۱].

روش بیولوژیکی با استفاده از میکروارگانیسم ها سعی در کاهش و یا به حداقل رساندن میزان سمیت ۴- نیتروفلن دارد. بنا به گزارش سازمان حفاظت محیط زیست، میزان سمیت این ماده ۶۴ میلی گرم در لیتر اعلام شده است [۱۲]. استفاده از میکروارگانیسم های جداسازی شده از مناطق آلوده یکی از روش های مرسوم برای حذف بیولوژیکی مواد آلاینده است. باکتری هایی نظیر *موراکسلا*<sup>۳</sup>، *سودوموناس*<sup>۴</sup>، *آرتروباکتر*<sup>۵</sup>، *رودوکوکوس*<sup>۶</sup> و *نوکاردیا*<sup>۷</sup> که از مناطق آلوده جداسازی شده اند، قادر به تجزیه زیستی کامل ۴- نیتروفلن هستند [۹، ۱۱، ۱۳، ۱۴]. گرچه هم میکروارگانیسم های

<sup>۱</sup> Chen et al.

<sup>۲</sup> U.S. Environmental Protection Agency (USEPA)

<sup>۳</sup> *MoraXella*

<sup>۴</sup> *Pseuoumonas*

<sup>۵</sup> *Arthrobacter*

<sup>۶</sup> *Rhodococcus*

<sup>۷</sup> *Nocardia*

<sup>۸</sup> Cerol

<sup>۹</sup> American Type Culture Collection (ATCC)

سازگاری با ۴-نیتروفنل، به محیط کشت مغذی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نیتروفنل اضافه گردید. سلول‌ها بعد از سانتریفوژ شدن در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه، با سرم فیزیولوژیک شسته شد و دانسیته نوری ( $OD_{600}$ ) آنها برابر عدد ۱ تنظیم گردید. از مایه تلقیح به دست آمده به میزان ۵ درصد در هر دو مقیاس ارلن و بیوراکتور استفاده شد.

#### ۲-۲- محیط کشت نمکهای معدنی

محیط کشت معدنی در نظر گرفته شده در ارلن و بیوراکتور شامل ۴/۲ گرم در لیتر  $KH_2PO_4$ ، ۷ گرم در لیتر  $K_2HPO_4$ ، ۱/۱ گرم در لیتر  $NaCl$ ، ۰/۱ گرم در لیتر  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۱ گرم در لیتر  $(NH_4)Cl$  و ۳ میلی‌لیتر از محلول مواد ریز مغذی بود. محلول مواد ریز مغذی شامل ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر EDTA، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر  $H_3BO_3$ ، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۳ میلی‌گرم در لیتر  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۳ میلی‌گرم در لیتر  $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۲ میلی‌گرم در لیتر  $NiSO_4 \cdot 7H_2O$  و ۱ میلی‌گرم در لیتر  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  بود. ۵/۰ گرم در لیتر گلوکز و ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر به عنوان سوسترای مکمل استفاده شد [۱۵ و ۲۳].

#### ۳-۲- اندازه‌گیری رشد سلولی و نیتروفنل

رشد سلولی با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. به منظور تعیین میزان نیتروفنل پس از جدا کردن سلول‌ها با استفاده از سانتریفوژ ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، pH محلول رویی توسط سود ۰/۱ نرمال تا عدد ۹ و یا بالاتر از آن تنظیم می‌گردد. دانسیته نوری محلول در طول موج ۴۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده می‌شود و پس از مقایسه با منحنی استاندارد، میزان نیتروفنل موجود در نمونه تعیین می‌گردد [۱۴].

#### ۴-۲- بیوراکتور هواگرد

شمای یک بیوراکتور هواگرد خارجی و قسمت‌های مختلف آن شامل بالابرا<sup>۱</sup>، ناودان<sup>۲</sup>، جداکننده<sup>۳</sup> و توزیع کننده گاز<sup>۴</sup> در شکل ۱ مشاهده می‌شود. بیوراکتور مورد استفاده در این تحقیق از جنس

<sup>1</sup> Riser

<sup>2</sup> Downcomer

<sup>3</sup> Separator

<sup>4</sup> Sparger

جدول ۱- کاربرد بیوراکتورهای متفاوت در تجزیه آلاینده‌های زیستی

محقق	میزان حذف (درصد)	غلظت ماده آلاینده (میلی‌گرم در لیتر)	ماده آلاینده	حجم راکتور (لیتر)	نوع راکتور	میکروارگانیسم
باجاج و همکاران <sup>۵</sup> [۱۷]	۳۰-۱۰۰	۴۰۰-۱۴۰۰	فنل	۰/۲	هواگرد داخلی	لجن فعال شهری
وینود و ردی [۱۸]	-	۲۰-۲۵	فنل و کلروفنل	۲/۶	بستر متحرک <sup>۸</sup>	سودوموناس پوتیدا <sup>۹</sup>
ویجینی و همکاران <sup>۱۰</sup> [۱۹]	۹۰	۲۰۰-۴۵۰	فنل	۰/۱۵	هواگرد داخلی	سودوموناس استوتزری <sup>۱۱</sup>
ساروانان و همکاران <sup>۱۲</sup> [۲۰]	۱۰۰ حذف برای هر دو آلاینده به تنهایی، ترکیب آنها ۷۵-۱۰۰	۳۰۰ و ۸۰۰	فنل و سرول <sup>۱۳</sup> ، به تنهایی و از ترکیب دو آلاینده	۲/۵	هواگرد	سودوموناس
تامی و همکاران <sup>۱۴</sup> [۲۱]	۱۰۰	۳۰۰	پارانیتروفنل	۵	راکتور ناپیوسته متوالی	لجن فعال شهری
تامی و همکاران [۲۲]	۱۰۰	۴۵۰	پارانیتروفنل	۲	راکتور دو فازی <sup>۱۵</sup> ناپیوسته متوالی	لجن فعال شهری

<sup>5</sup> Bajaj

<sup>6</sup> Vinod

<sup>7</sup> Reddy

<sup>8</sup> Fluidized Bed

<sup>9</sup> *Pseudomonas putida*

<sup>10</sup> Viggiani et al.

<sup>11</sup> *Pseudomonas Stutzer*

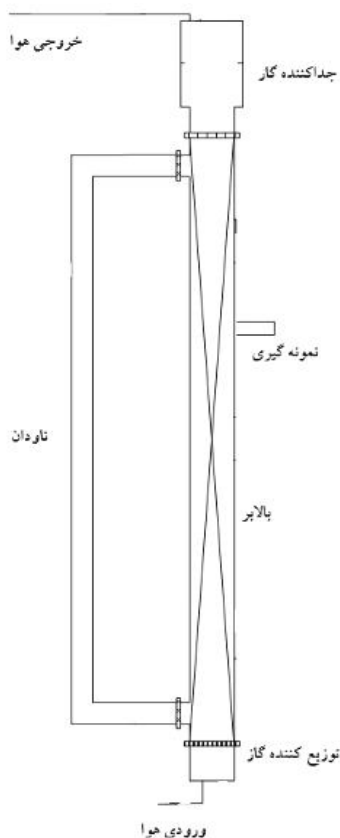
<sup>12</sup> Saravanan et al.

<sup>13</sup> m-Cerol

<sup>14</sup> Tomei et al.

<sup>15</sup> Two Phase Sequencing Batch Reactor

مانومتر، تراکلریدکربن با دانسیته‌ی ۱۵۹۳ کیلوگرم بر متر مکعب، مایع درون بیوراکتور آب و گاز عبوری نیز هوا بود. دانسیته آب و هوا نیز به ترتیب ۹۹۶/۸۶۳ و ۱/۲۹۳ کیلوگرم بر متر مکعب می‌باشد.



شکل ۱- شمایی از بیوراکتور هواگرد خارجی

## ۲-۶- آزمایش‌ها

آزمایش‌های کشت لرزان در ارلن‌های به حجم ۲۵۰ و با حجم کاری ۵۰ میلی‌لیتر در شرایط عملیاتی دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه و در بیوراکتور با حجم کاری ۷۰۰ میلی‌لیتر در ۳ نرخ متفاوت هوادهی ۰.۱، ۲ و ۴ لیتر در دقیقه و در دمای محیط  $28 \pm 2$  درجه سلسیوس انجام گرفت.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- کشت لرزان

#### ۳-۱-۱- بررسی تاثیر منبع نیتروژنی

تحقیقات انجام شده قبلی نشان داده است که سوبستراهای مکمل می‌توانند در تجزیه‌زیستی نیتروآروماتیک‌ها تأثیر مثبتی داشته باشند [۸ و ۲۶]. روند تجزیه در بسیاری از موارد با افزودن گلوکز به عنوان منبع کربنی و منبع نیتروژنی مناسب بهبود یافته و گزارشی

شیشه پیرکس با ضخامت ۲ میلی‌متر بود. ارتفاع و قطر بالابر و ناودان به ترتیب ۷۰۰ و ۳۲.۵۰۰ و ۲۲ میلی‌متر و حجم اسمی بیوراکتور یک لیتر بود. سطح مقطع توزیع‌کننده گاز ۷/۵ سانتی‌متر مربع و قطر سوراخهای آن ۱ میلی‌متر بود. یک سوراخ در مرکز و ۸ سوراخ دیگر به فواصل مساوی از مرکز دایره قرار گرفتند [۲۴].

برای استریل کردن بیوراکتور، ابتدا تمامی قسمت‌های داخلی و خارجی آن با آب شهری و سپس قسمت‌های داخلی آن با محلول اتانول ۷۰ درصد کاملاً شسته شد. در آخرین مرحله نیز قسمت‌های داخلی توسط آب مقطر استریل کرده شد. هوای لازم توسط یک کمپرسور بدون روغن با ظرفیت ۴۵ لیتر در دقیقه تأمین و پس از عبور از یک روتامتر با قابلیت اندازه‌گیری ۱ تا ۱۰ لیتر در دقیقه وارد یک فیلتر با قطر سوراخهای ۰/۲ میکرومتر گردید. برای جلوگیری از تبخیر آب در سیستم، هوا پس از عبور از فیلتر وارد یک مخزن ۱ لیتری حاوی آب مقطر استریل گردید تا از بخار آب اشباع شود و سپس به بیوراکتور وارد شد.

## ۲-۵- محاسبه ماندگی گاز

برای اندازه‌گیری ماندگی گاز<sup>۱</sup> در بیوراکتور از مانومتر یو<sup>۲</sup> شکل استفاده می‌شود [۲۴ و ۲۵]. دو سر مانومتر به دو خروجی، یکی در قسمت پایین بیوراکتور و دیگری در بالای بیوراکتور متصل می‌گردد. با استفاده از این مانومتر، اثر اختلاف فشار ناشی از ماندگی گاز به صورت اختلاف ارتفاع مشاهده می‌شود. با استفاده از رابطه‌ی ۱ اختلاف ارتفاع در مانومتر به اختلاف فشار تبدیل می‌شود

$$\Delta P = \rho g h \quad (1)$$

که در این رابطه

$h$  اختلاف ارتفاع ایجاد شده در مانومتر بر حسب متر،  $g$  ثابت گرانشی بر حسب متر بر مجذور ثانیه،  $\rho$  چگالی مایع درون مانومتر بر حسب کیلوگرم بر متر مکعب و  $\Delta P$  اختلاف فشار بر حسب پاسکال است. از اختلاف فشار به دست آمده می‌توان به کمک رابطه‌ی ۲ ماندگی گاز را به دست آورد

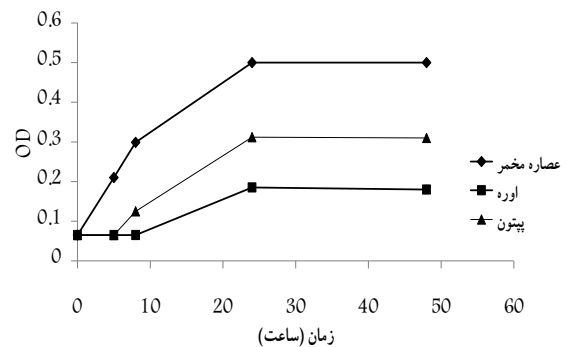
$$\varepsilon_g = \frac{1 - \Delta P / (\rho_1 g L)}{1 - \rho_g / \rho_1} \quad (2)$$

که در این رابطه

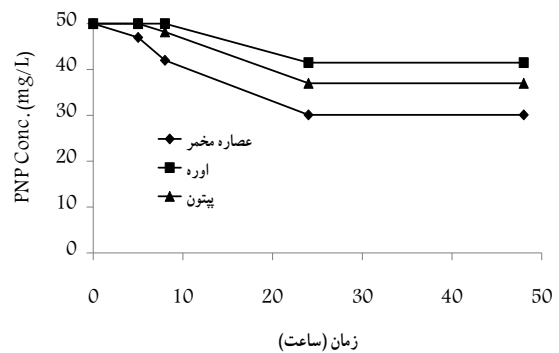
$\varepsilon_g$  ماندگی گاز،  $\rho_1$  دانسیته سیال درون بیوراکتور بر حسب کیلوگرم بر متر مکعب،  $\rho_g$  دانسیته هوا بر حسب کیلوگرم بر متر مکعب و  $L$  فاصله‌ی عمودی بین دو خروجی بر حسب متر است. مایع درون

<sup>1</sup> Gas Hold Up  
<sup>2</sup> U

مبنی بر تأثیرات منفی منبع نیتروژنی و کربنی مکمل ارائه نشده است [۲۷]. به دلیل اهمیت نقش منبع نیتروژنی، سه ماده عصاره مخمر، پپتون و اوره به غلظت ۱ گرم در لیتر انتخاب و تأثیر آنها بر حذف و رشد توده سلولی بررسی گردید. روند رشد در شکل ۲ و روند حذف در شکل ۳ در حضور هر یک از منابع عصاره مخمر، پپتون و اوره و نتایج نهایی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که باکتری در حضور منابعی مانند پپتون و عصاره



شکل ۲- روند زمانی رشد *آلکالیجنس فایکالیس* در حضور ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، پپتون و اوره در کشت لرزان



شکل ۳- روند زمانی حذف نیتروفلن توسط باکتری *آلکالیجنس فایکالیس* در حضور ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر، پپتون و اوره در کشت لرزان

جدول ۲- اثر منابع نیتروژنی مختلف بر رشد باکتری و حذف پارانیتروفنل

منابع نیتروژنی	رشد (دانسیته نوری)	حذف نیتروفلن (درصد)
عصاره مخمر	۰/۵	۴۰
پپتون	۰/۳	۳۰
اوره	۰/۱۸۸	۱۷

مخمر که منابع نیتروژنی غیر مشخص هستند و علاوه بر نیتروژن حاوی مواد بسیار دیگری مانند ویتامین‌ها و فلزات می‌باشند، بهتر رشد نموده و در نتیجه مقادیر بیشتری از نیتروفلن حذف می‌گردد. در حضور اوره با ساختار مشخص، علاوه بر تولید توده زیستی کمتر نسبت به دو منبع دیگر، درصد حذف کمتری نیز مشاهده شد. منابع نیتروژنی تأثیرگذار به ترتیب عصاره مخمر، پپتون و اوره هستند.

### ۳-۱-۲- بررسی تأثیر pH

به منظور بررسی تأثیر قلیابیت، سه کشت یکسان با pH اولیه ۶، ۷ و ۸ گرمخانه‌گذاری گردید و میزان حذف نیتروفلن پس از ۲۴ ساعت با یکدیگر مقایسه شد (جدول ۳). همانطور که مشاهده می‌شود

افزایش pH سبب افزایش رشد توده‌زیستی و در نتیجه افزایش حذف ۴-نیتروفلن گردیده است. چنین نتیجه‌ای توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است [۵ و ۱۰]. زیبر و همکاران<sup>۱</sup> نشان داده‌اند که سمیت نیتروفلن به شدت به pH محیط بستگی داشته و در نتیجه کاهش pH (محیط اسیدی)، بازدارندگی افزایش می‌یابد. بنابراین روند تجزیه نیتروفلن به دلیل بازدارندگی ایجاد شده در رشد سلولی در محیط‌های اسیدی متوقف می‌گردد. به عکس، افزایش pH تا مقدار ۸، سبب کاهش سمیت نیتروفلن و در نتیجه فعالیت بهتر باکتری می‌گردد [۲۸].

جدول ۳- اثر pH بر رشد باکتری و حذف پارانیتروفنل

pH	رشد (دانسیته نوری)	حذف نیتروفلن (درصد)
۶	۰/۳۱۴	۲۶
۷	۰/۵	۴۰
۸	۰/۵۳۴	۴۸

### ۳-۱-۳- غلظت بازدارندگی نیتروفلن

به منظور تعیین غلظت بازدارندگی نیتروفلن، آزمایش‌ها در کشت لرزان در ۴ سطح متفاوت ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر انجام شد (شکل‌های ۴ و ۵). نتایج نشان می‌دهد که غلظت بازدارندگی ۴-نیتروفلن برای باکتری *آلکالیجنس فایکالیس*، ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر است زیرا در این غلظت هیچ رشد و حذفی مشاهده نشد. میزان حذف در غلظتهای ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ به ترتیب برابر ۴۰، ۳۱/۸ و ۲۱ درصد بود. هرچه غلظت اولیه پارانیتروفنل بیشتر باشد، فاز تأخیر آن بیشتر می‌شود. در این حالت مواد مغذی موجود در محیط کشت تنها صرف تولید سلول‌های جدید نمی‌شود

<sup>۱</sup> Zeyer et al.

### ۳-۲- بیوراکتور هواگرد

در این قسمت به بررسی نتایج آزمایش‌های مربوط به بیوراکتور در دو بخش رفتار هیدرودینامیکی و اثر غلظت اولیه آلاینده بر رشد باکتری و حذف نیتروفلن در نرخهای مختلف هوادهی پرداخته شد. لازم به ذکر است که محیط کشت مناسب به دست آمده در آزمایش‌های انجام شده در ارلن، در کلیه آزمایش‌های بیوراکتور مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۲-۱- بررسی رفتار هیدرودینامیکی بیوراکتور

ماندگی گاز یکی از پارامترهای بسیار مهم در مطالعه هیدرودینامیکی بیوراکتورهای هواگرد است. یکی از عوامل مؤثر بر ماندگی گاز و تنها عاملی که پس از طراحی و ساخت بیوراکتور قابل تغییر است، نرخ هوادهی است. به همین دلیل به بررسی اثر تغییر نرخ هوادهی بر ماندگی گاز پرداخته شد. برای کسب اطمینان از دقت و صحت نتایج، آزمایش‌ها دو بار انجام شدند و نتایج به صورت میانگین دو تکرار گزارش شد. نتایج در جدول ۴ آمده است. همان‌طور که انتظار می‌رفت با افزایش نرخ هوادهی، ماندگی گاز افزایش یافت. نتایج مشابهی توسط دیگر محققان به دست آمده است [۲۹، ۳۰ و ۳۱].

جدول ۴- بررسی اثر نرخ هوادهی بر ماندگی گاز

ماندگی گاز	نرخ هوادهی (لیتر در دقیقه)
۰/۱۵۵	۱
۰/۲۹۹	۲
۰/۳۹۵	۴

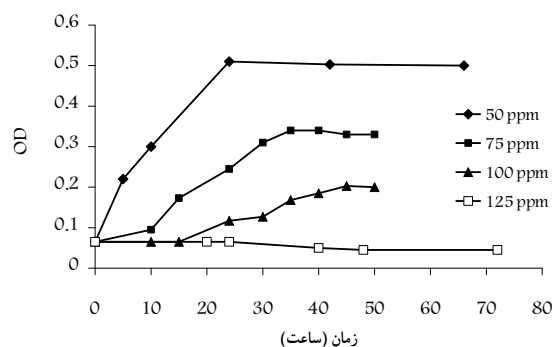
### ۳-۲-۲- بررسی اثر غلظت اولیه نیتروفلن بر رشد باکتری و حذف

#### نیتروفلن

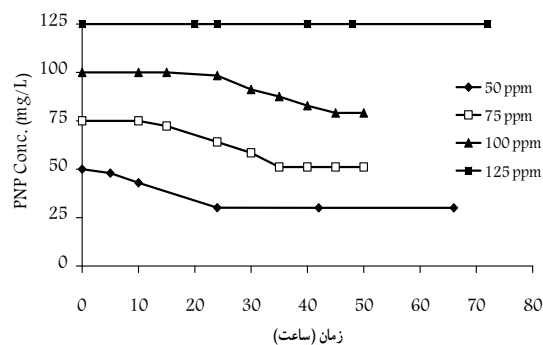
اثر غلظت اولیه نیتروفلن در گستره ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر روند رشد باکتری و حذف نیتروفلن در سه نرخ هوادهی ۱، ۲ و ۴ لیتر در دقیقه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در شکل‌های ۶ تا ۱۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اولیه نیتروفلن، غلظت توده سلولی کاهش و زمان حذف نیتروفلن افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش نرخ هوادهی در یک غلظت مشخص، همواره توده سلولی تولید شده و میزان حذف افزایش نمی‌یابد، بلکه با افزایش نرخ هوادهی از ۱ به ۲ لیتر در دقیقه افزایش ولی با افزایش نرخ هوادهی از ۲ به ۴ لیتر در دقیقه کاهش می‌یابد. میزان حذف در هر یک از نرخهای هوادهی در جدول ۵ به تفکیک غلظت آورده شده است.

در نرخهای پایین هوادهی، اکسیژن کافی در دسترس سلول‌ها

بلکه قسمت عمده‌ای از آن صرف تولید آنزیم‌هایی برای خنثی کردن اثر بازدارندگی می‌شود. مشابه چنین نتیجه‌ای، افزایش فاز تأخیر با افزایش غلظت پارانیتروفنل در گونه جداسازی شده سودوموناس پوتید/ PNP1 مشاهده شده است [۱۵]. نیتروآروماتیک‌ها که پارانیتروفنل نیز جزو آنهاست، برای میکروارگانیسم‌ها سمی هستند و وجود گروه نیترو ( $\text{NO}_2$ ) حتی در غلظتهای پایین، متابولیسم طبیعی اغلب میکروارگانیسم‌ها را متوقف می‌نماید. در یک تحقیق سیکما و همکاران<sup>۱</sup> در سال ۱۹۹۵ اعلام نموده‌اند که ترکیبات فنلی به دلیل حلالیت بسیار بالا، اثر نامطلوبی بر غشای سلولی دارند و ساختار اسیدهای چرب موجود در غشا را بهم می‌ریزند که به دنبال آن، میکروارگانیسم توانایی ادامه فعالیتهای حیاتی خود را از دست می‌دهد. طبیعتاً این اثر با افزایش غلظت افزایش می‌یابد [۵]. لازم به ذکر است که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیتروفلن برای بیشتر میکروارگانیسم‌ها، سمی شناخته شده است [۴].



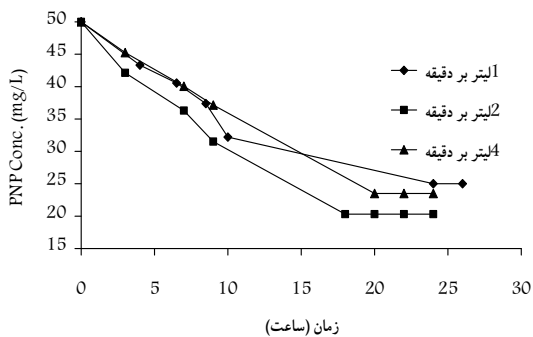
شکل ۴- روند زمانی رشد باکتری آلکالیجنس فایکالیس در غلظتهای ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر در کشت لرزان



شکل ۵- روند زمانی حذف ۴-نیتروفلن توسط باکتری آلکالیجنس فایکالیس در غلظتهای ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر در کشت لرزان

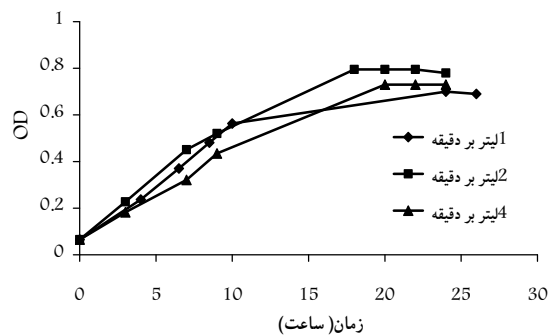
<sup>1</sup> Sikkema et al.

[۳۲]. نتیجه مشابهی برای حذف یک علفکش در بیوراکتور هواگرد توسط زرد و همکاران گزارش شده است. این محققان نرخ هوادهی را از ۰/۱۵ تا ۳/۵ لیتر در دقیقه تغییر داده و مشاهده کردند که تا نرخ هوادهی ۲/۵ لیتر در دقیقه، درصد حذف افزایش یافت و در اثر افزایش بیشتر نرخ هوادهی، درصد حذف کاهش یافت [۳۳].

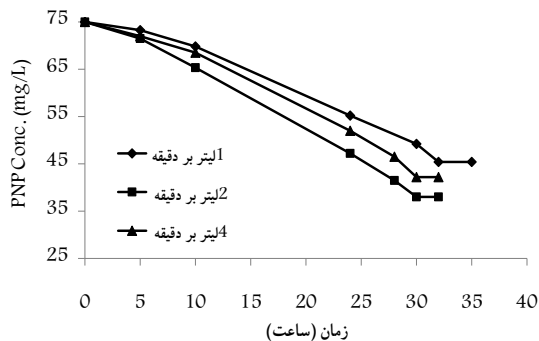


شکل ۷- روند زمانی حذف ۴-نیتروفنل در بیوراکتور هواگرد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر با نرخهای هوادهی ۲، ۱ و ۴ لیتر در دقیقه

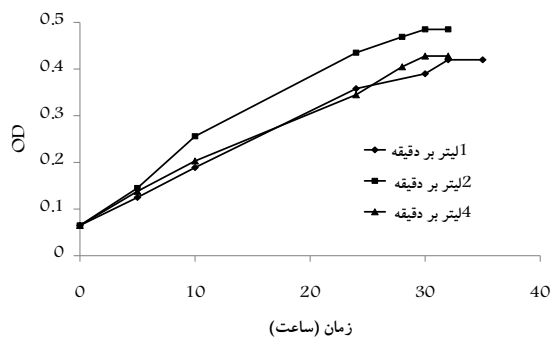
نیست و علاوه بر اثر سمیت نیتروفنل، کمبود میزان اکسیژن نیز مانع رشد می‌گردد و با افزایش نرخ هوادهی، رشد سلولی و درصد حذف افزایش می‌یابد [۳۰]. با افزایش بیشتر هوادهی، افزایش تنش برشی و بزرگ‌تر شدن اندازه حبابها، ضریب انتقال جرم کاهش یافته و متعاقباً سوبسترای در دسترس کاهش می‌یابد. در نتیجه میزان حذف و توده‌زیستی تولید شده نیز با کاهش مواجه می‌شود



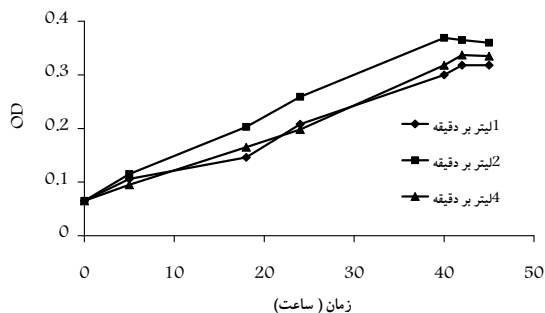
شکل ۶- روند زمانی رشد باکتری آلکالیجنس فایکالیس در بیوراکتور هواگرد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر با نرخهای هوادهی ۲، ۱ و ۴ لیتر در دقیقه



شکل ۹- روند زمانی حذف ۴-نیتروفنل در بیوراکتور هواگرد در غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر با نرخهای هوادهی ۲، ۱ و ۴ لیتر در دقیقه



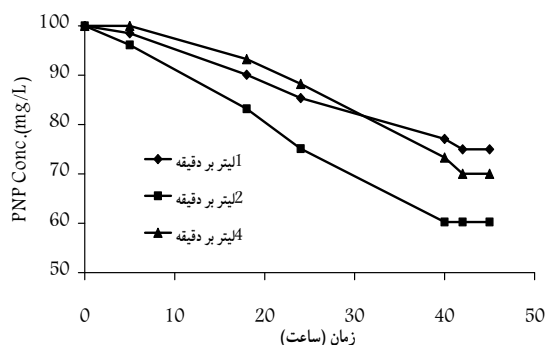
شکل ۸- روند زمانی رشد باکتری آلکالیجنس فایکالیس در بیوراکتور هواگرد در غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر با نرخهای هوادهی ۲، ۱ و ۴ لیتر در دقیقه



شکل ۱۰- روند زمانی رشد باکتری آلکالیجنس فایکالیس در بیوراکتور هواگرد در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با نرخهای هوادهی ۲، ۱ و ۴ لیتر در دقیقه

#### ۴- نتیجه‌گیری

باکتری آلکالیجنس فایکالیس از توانایی خوبی در کاهش سمیت پارانیتروفنل برخوردار است. نتایج به دست آمده از کشت لرزان بیانگر این است که افزودن عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژنی، علاوه بر افزایش تولید توده زیستی سبب افزایش درصد حذف پارانیتروفنل می‌گردد. همچنین افزایش قلیائیت محیط نیز تأثیر مثبتی بر روند حذف دارد. کاربرد بیوراکتور هواگرد در تمامی غلظت‌ها و نرخ‌های هوادهی باعث افزایش تولید توده زیستی و میزان حذف نسبت به کشت لرزان شد که این موضوع بیانگر عملکرد مثبت بیوراکتور هواگرد در کاهش سمیت پارانیتروفنل است. به طور کلی، افزایش غلظت اولیه پارانیتروفنل به دلیل افزایش سمیت، باعث کاهش توده زیستی، کاهش میزان حذف و افزایش زمان حذف در کشت لرزان و بیوراکتور گردید. افزایش نرخ هوادهی تا ۲ لیتر در دقیقه در تمامی غلظت‌ها بیشترین درصد حذف را به همراه داشت و افزایش بیشتر آن به ۴ لیتر در دقیقه باعث کاهش درصد حذف نیتروفنل و تولید توده زیستی نسبت به نرخ هوادهی ۲ لیتر در دقیقه شد. در مجموع می‌توان گفت در صنایعی که میزان ۴- نیتروفنل در پساب تولیدی آنها کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر است، باکتری آلکالیجنس فایکالیس می‌تواند در کاهش سمیت عملکرد نسبتاً مؤثری داشته باشد و استفاده از راکتور هواگرد می‌تواند به بهبود عملکرد سیستم کمک نماید.



شکل ۱۱- روند زمانی حذف ۴-نیتروفنل در بیوراکتور هواگرد در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با نرخ‌های هوادهی ۱، ۲ و ۴ لیتر بر دقیقه

جدول ۵- میزان حذف نیتروفنل در غلظت‌های اولیه و نرخ‌های هوادهی مختلف در بیوراکتور هواگرد خارجی

نرخ هوادهی (لیتر در دقیقه)	حذف در بیوراکتور هواگرد (%)		
	۱۰۰	۷۵	۵۰
۱	۲۵	۴۰	۵۰
۲	۳۹/۷۵	۴۹	۶۰
۴	۳۰	۴۳/۷	۵۳

#### ۵- مراجع

- 1- Tomei, M.C., Annesini, M.C., and Bussoletti, S. (2004). "4-Nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor: Kinetic study and effect of filling time." *Water Research*, 38, 375-384.
- 2- Chen, J., Rulkens, W.H., and Bruning, H. (1997). "Photochemical elimination of phenols and COD in industrial wastewaters." *Water Science Technology*, 35, 231-238.
- 3- Spain, J.C., Vanveld, P.A., Monti, C. A., Pritchard, P. H., and Cripe, C.R. (1984). "Comparison of p-nitrophenol biodegradation in field and laboratory test systems." *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (5), 944-950.
- 4- Bhatti, Z. I., Toda H., and Furukawa, K. (2002). "P-Nitrophenol degradation by activated sludge attached on nonwovens." *Water Research*, 36, 1135-1142.
- 5- Kulkarni, M., and Chaudhari A. (2006). "Biodegradation of p-nitrophenol by *P. putida*." *Bioresource Technology*, 97, 982-988.
- 6- Burns, L., Bradley, S., and White, J. (1994). "Immunotoxicity of mono-nitrotoluenes in female B6C3F1 mice: I. Para-nitrotoluene." *Drug and Chemical Toxicology*, 17, 317-358.
- 7- USEPA. (1980). *Ambient water quality for Nitrophenols*, EPA-440/5 80-063, US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- 8- Zhang, J., Sun, Zh., Li, Y., Peng, X., Li, W., and Yana, Y. (2008). "Biodegradation of p-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity." *Hazardous Materials*, 163, 723-728.
- 9- Bhushan, B., Chauhan, A.S., Samanta, K., and Rakesh, K.J. (2000). "Kinetics of biodegradation of p-nitrophenol by different bacteria." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274, 626-630.
- 10- Wan, N., Gu, J.D., and Yan, Y. (2007). "Degradation of p-nitrophenol by *Achromobacter xylosoxidans* Ns isolated from wetland sediment." *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59, 90-96.
- 11- Gemini, V.L., Gallego, A., Oliveira, V.M., Gomez, C.E., Manfio, G.P., and Korol, S.E. (2005). "Biodegradation and detoxification of p-nitrophenol by *Rhodococcus wratislaviensis*." *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55, 103-108.



- 12- USEPA. (1976). *Water quality criteria*, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- 13- Spain, J.C., and Gibson, D.T. (1991). "Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp." *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), 812-819.
- 14- Prakash, D., Chauhan, A., and Rakesh, K.J. (1996). "Plasmid-encoded degradation of p-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1036, 375-381.
- 15- Loser, C.A., and Hertelt, I. (1998). "Growth kinetics of the 4-nitrophenol degrading strain *Pseudomonas putida* PNPI." *Acta Biotechnology*, 18 (1), 29-41.
- 16- Ye, J., Singh, A.P., and Ward, O. (2004). "Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics." *Microbiology and Biotechnology*, 20, 117-135.
- 17- Bajaj, M., Gallert, C., and Winter, J. (2008). "Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor." *Bioresource Technology*, 99(17), 8376-8381.
- 18- Vinod, A.V., and Reddy, G.V. (2006). "Mass transfer correlation for phenol biodegradation in a fluidized bed bioreactor." *Hazardous Materials*, 136, 727-734.
- 19- Viggiani, A., Olivieri, G., Siani, L., Donato, A.D., Marzocchell, A., Salatino, P., Barbieri, P., and Galli, E. (2006). "An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1." *Biotechnology*, 123, 464-477.
- 20- Saravanan, P., Pakshirajan, K., and Saha, P. (2008). "Biodegradation of phenol and m-cresol in a batch and fed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas* sp." *Bioresource Technology*, 99(18), 8553-8558.
- 21- Tomei, M. C., Annesini, M.C., Lubertia, R., Cento, G., and Senia, A. (2003). "Kinetics of 4-nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor." *Water Research*, 37, 3803-3814.
- 22- Tomei, M.C., Annesini, M.C., Rita, S., and Daugulis, J.A. (2008). "Biodegradation of 4-nitrophenol in a two-phase sequencing batch reactor: Concept demonstration, kinetics and modeling." *Applied Microbiology Biotechnology*, 80, 1105-1112.
- 23- Ray, P., Oubelli, M., and Loser, C. (1999). "Aerobic 4-nitrophenol degradation by microorganisms fixed in a continuously working aerated solid-bed reactor." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 284-290.
- 24- Khakbaz Varkani, M., and Naeimpoor, F. (2008). "Air lift bioreactor and its application on biological removal of phenol." *12<sup>th</sup> National Iranian Chemical Eng. Conf.*, Sahand University of Tech., Tabriz. (In Persian)
- 25- Loh, K.C., and Liu, J. (2001). "External loop inversed fluidized bed airlift bioreactor (EIFBAB) for treating high strength phenolic wastewater." *Chemical Engineering Science*, 56, 6171-6176.
- 26- Freitas, C., Fialova, M., Zahradnik, J., and Teixeira, J. (2000). "Hydrodynamics of a three-phase external-loop airlift bioreactor." *Chemical Engineering Science*, 55, 4961-4972.
- 27- Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." *Microbiology Molecular Biology Review*, 67, 593-656.
- 28- Rehman, A., Raza, Z. A., Afzal, M., and Khalid, Z.M. (2007). "Kinetics of p-nitrophenol degradation by *Pseudomonas pseudomallei* wild and mutant strains." *Environmental Science and Health*, 42, 1147-1154.
- 29- Zeyer, J., Kocher, H.P., and Timmis, K.N. (1986). "Influence of parasubstituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2." *Applied Environmental Microbiology*, 52, 334-339.
- 30- Mehrnia, M.R., Towfighi, J., Bonakdarpour, B., and Akbarnejad, M.M. (2005). "Gas hold-up and oxygen transfer in a draft-tube airlift bioreactor with petroleum-based liquids." *Biochemical Engineering*, 22, 105-110.
- 31- Sun, Sh., Liu, Ch., Wei, W., and Bao, X. (2006). "Hydrodynamics of an annulus airlift reactor." *Powder Technology*, 162, 201-07.
- 32- Yan, J., Jianping, W., Jing, B., Xiaoqiang, J., and Zongding, H. (2007). "Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*." *Hazardous Materials*, 147, 672-676.
- 33- Znad, H., Kasahara, N., and Kawase, Y. (2006). "Biological decomposition of herbicides (EPTC) by activated sludge in a slurry bioreactor." *Process Biochemistry*, 41, 1124-1128.