

پتانسیل حذف استایرن توسط میکروارگانیزم هوازی رودوکوکوس اریتروپولیس PTCC 1767

مصطفی عرب جعفری^۱، نرگس فلاح^۲، میترا دادور^۳، بهرام ناصر نژاد^۴

۱- کارشناسی ارشد مهندسی شیمی گرایش محیط زیست، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
۲- استادیار و عضو هیئت علمی گروه صنایع غذایی و بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
(نویسنده مسئول) ۶۴۵۴۳۱۹۹ (۰۲۱) nfallah2001@aut.ac.ir

۳- دانشیار و عضو هیئت علمی گروه پتروشیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
۴- استاد و عضو هیئت علمی گروه صنایع غذایی و بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران

(دریافت ۹۲/۱۱/۴ پذیرش ۹۳/۸/۳)

چکیده

در این تحقیق قابلیت حذف زیستی استایرن توسط میکروارگانیزم هوازی رودوکوکوس اریتروپولیس PTCC1767 سازگار نشده و سازگار شده مورد بررسی قرار گرفت. در هر دو حالت غلظت اولیه توده زیستی برابر ۳۱ میلی‌گرم در لیتر و میزان غلظت استایرن برابر ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها در دمای ۳۲ درجه سلسیوس و pH برابر ۷ انجام شد. میکروارگانیزم غیر سازگار قادر بود غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استایرن را در مدت زمان ۱۵ ساعت به‌طور کامل حذف نماید اما با افزایش غلظت استایرن میزان حذف کاهش یافت به‌طوری که در مدت زمان ۴۸ ساعت تنها ۱۷ درصد از غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر استایرن حذف شد. توده زیستی سازگار شده تا غلظت ۹۰ میلی‌گرم در لیتر توانست غلظت‌های اولیه مختلف استایرن در محدوده ۱۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر را در مدت زمان ۲/۷ تا ۴۵ ساعت به‌طور کامل حذف کند. سینتیک تخریب زیستی استایرن توسط میکروارگانیزم غیر سازگار شده نیز تعیین شد. داده‌های به‌دست آمده با مدل سینتیکی مونود و پنج مدل بازدارنده هالدین، وب، ایبا و تیزر تطبیق یافتند. مدل هالدین نسبت به تمام مدل‌ها (با $R_2 = 0/99$ و $R_1 = 0/08$) (SSE = ۰/۰۰۸) تطبیق مناسب‌تری داشت. پارامترهای سینتیکی مدل هالدین عبارت‌اند از: $K_i = 34/58 \text{ mg/L}$ ، $K_s = 7/594 \text{ mg/L}$ ، $q_m = 4/235 \text{ mg/g dry cellh}$.

واژه‌های کلیدی: استایرن، رودوکوکوس اریتروپولیس، سازگارسازی، مدل‌سازی سینتیکی

۱- مقدمه

و زیرزمینی شده و همچنین باعث آلودگی خاک و هوا می‌شود و مشکلات اکولوژیکی جدی را به دنبال دارد.

استایرن و متابولیت‌های آن مواد سمی هستند که اثرات منفی شدیدی بر روی سلامتی انسان دارند. بخارات این ماده اثر مخدر دارد و همچنین حضور این ماده در محیط سبب آسیب و تحریک چشم و پوست می‌شود. از دیگر اثرات این ماده می‌توان سردرد، خستگی، چرت زدن، ضعف بدنی، کاهش وزن، درد در عضلات، عصبی شدن، فراموشی و تغییرات در سیستم کاری کبد را نام برد. این ماده سمی بیماری آسم را به‌شدت تشدید می‌کند و موجب سوزش و خارش مجاری تنفسی نیز می‌شود. همچنین این ماده جهش‌زا و سرطان‌زا نیز معرفی شده است و در لیست مواد خطرناک ارائه شده از سوی سازمان حفاظت از محیط زیست آمریکا^۱.

رشد روز افزون صنایع پتروشیمی و پلیمر سبب تولید حجم زیادی از پساب‌های حاوی انواع مواد شیمیایی سخت تجزیه‌پذیر شده است. یکی از پرکاربردترین محصولات این صنایع استایرن است. استایرن در تولید محصولات نظیر پلی‌استایرن، استایرن بوتادین لاتکس، اکریلونیتریل بوتادین استایرن، استایرن ایزوپروپن، پلی‌استایرن دی‌ونیل بنزن و غیره به‌کار برده می‌شود. استفاده گسترده از این ماده و نیز فناوری تولید و مصرف آن سبب راهیابی این ماده به فاضلاب صنایع مختلف شده است. در سال ۲۰۰۸، ۳۰ میلیون تن از این ماده در جهان تولید شده و هر ساله این میزان تولید ۲ تا ۳ درصد افزایش می‌یابد [۱]. ایران نیز با تولید سالانه ۷۰۰ هزار تن، از تولیدکنندگان اصلی این ماده محسوب می‌شود. ورود این ماده سمی به محیط زیست سبب آلودگی آب‌های سطحی

¹ US Environmental Protection Agency (USEPA)

استایرن در رتبه ۱۸۹ قرار دارد [۲، ۳ و ۴].

برای پاکسازی پساب‌های آلوده به آلاینده‌های آروماتیک نظیر استایرن، بنزن، تولوئن، زایلن و غیره می‌توان از روش‌های فیزیکی و شیمیایی و بیولوژیکی استفاده نمود. از جمله روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌توان به جذب توسط کربن فعال، فرایندهای غشایی، فرایندهای اکسیداسیون پیشرفته^۱ نظیر فرایند H_2O_2/UV ، فرایند O_3/UV و استخراج توسط حلال اشاره کرد. فرایندهای فیزیکی و شیمیایی ذکر شده اغلب موجب بروز مشکلات ثانویه در پساب این واحدها و ایجاد مواد واسطه سمی می‌شود که خود نیاز به تصفیه دارند و این کار هزینه بالایی دارد که سبب می‌شود استفاده از آنها مقرون به صرفه نباشد [۵]. در مقابل استفاده از فرایندهای بیولوژیکی به ویژه شناسایی و استفاده از گونه‌های غالب میکروبی به دلیل مقرون به صرفه بودن و سازگاری بیشتر با محیط زیست و تخریب کامل مواد سمی دارای ارجحیت است [۵ و ۶].

میکروارگانسیم‌های مختلفی شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها برای حذف زیستی استایرن مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اغلب مطالعات صورت گرفته مربوط به استفاده از بیوفیلترها برای حذف استایرن از فاز گازی و شناسایی متابولیسم میکروبی این ماده بوده است [۷-۱۲]. چند نمونه از گونه‌های میکروبی که در بررسی‌های گذشته برای حذف استایرن به کار برده شده‌اند، عبارت‌اند از: سودوموناس^۲، کورینه‌باکتریوم^۳، مایکوباکتریوم^۴، رودوکوکوس رودوکروس^۵، اگزوفیالا جینسلمی^۶ و اسپروتریکیس واریسیاتوس^۷ [۱۸-۳].

یکی از گونه‌های شاخص باکتریایی که قدرت تخریب بسیار بالایی در حذف مواد آلی دارد، باکتری هوازی رودوکوکوس /ریتروپولیس^۸ است. این باکتری در خاک‌های آلوده به مواد آلی و نفتی و همچنین در آب دریا و لجن‌های موجود در تصفیه‌خانه‌های صنعتی و شهری به‌طور گسترده یافت می‌شود [۱۹، ۲۰ و ۲۱]. این باکتری به دلیل سازگاری زیاد با محیط‌های مختلف تقریباً در هر محیطی رشد می‌کند. دمای بهینه رشد این میکروارگانسیم در حذف آلکان‌ها بین ۲۵ تا ۳۵ درجه سلسیوس است ولی این گونه قادر است در دمای ۱۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس نیز رشد نماید. همچنین pH بهینه برای رشد آن در حذف مواد هیدروکربنی بین ۷/۵-۶/۵

گزارش شده است و قادر است در پساب با ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر نمک نیز رشد نماید و در واقع این باکتری یک گونه نمک‌دوست است [۱۹]. این باکتری برای حذف گسترده وسیعی از مواد آلی نظیر فنل^۹، رسورسینول^{۱۰}، کتکول^{۱۱}، پارائیتروفنل^{۱۲}، پاراکلروفنل^{۱۳}، هیدروکینون^{۱۴} و دیگر مواد آروماتیک به‌کار برده شده است [۲۱].

در واکنش‌های بیوشیمیایی نیز همانند تمامی واکنش‌ها مسئله زمان مطرح می‌شود و کمیتی که عامل زمان را در واکنش‌ها مورد بحث قرار می‌دهد سینتیک واکنش است. داشتن اطلاعات در مورد سینتیک واکنش (سرعت رشد میکروارگانسیم‌ها یا سرعت حذف سوبسترا) و همچنین غلظت زیست توده از اهمیت بالایی برخوردار است. برای یک واحد تصفیه پساب با در دست داشتن چنین اطلاعاتی می‌توان پیش‌بینی درستی را در مورد کیفیت آب خروجی از واحد تصفیه داشت. یک مدل سینتیکی دقیق و پارامترهای مربوط به آن می‌تواند مهندسان واحدهای تصفیه پساب را در بهینه کردن شرایط عملیاتی سیستم تصفیه یاری کند به نحوی که جریان آب خروجی از واحد تصفیه با استانداردهای محیط‌زیستی منطبق باشد [۲۲، ۲۳ و ۲۴].

نظر به بالا بودن غلظت استایرن موجود در برخی پساب واحدهای صنعتی مصرف‌کننده استایرن و اثرات مخرب این ماده بر سلامتی انسان و محیط زیست و نیز محدود بودن مطالعات پیرامون سینتیک حذف زیستی استایرن در غلظت بالا، تیمار زیستی این ماده با یک گونه شاخص باکتریایی ضروری به نظر می‌رسد. از سویی تاکنون تحقیقی بر روی به‌کارگیری گونه بومی رودوکوکوس /ریتروپولیس *PTCC 1767* که یک باکتری شاخص و دارای قدرت ذاتی بالا در تخریب مواد سمی است، انجام نشده است. در این مطالعه هدف، مطالعه توانایی باکتری رودوکوکوس /ریتروپولیس *PTCC 1767* برای حذف زیستی استایرن در دو حالت سازگار شده و غیر سازگار بود و مدل‌سازی سینتیکی حذف استایرن توسط این گونه نیز بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- میکروارگانسیم، محیط کشت، مواد شیمیایی

باکتری رودوکوکوس /ریتروپولیس *PTCC 1767* که از خاک‌های آلوده به نفت اطراف پالایشگاه تبریز جدا شده است، از کلکسیون

¹ Advanced Oxidation Process (AOPs)

² *Pseudomonas*

³ *Corynebacterium*

⁴ *Maycobacterium*

⁵ *Rhodococcus Rhodochrous*

⁶ *Exophiala Janselami*

⁷ *Sporothrix Varieciatus*

⁸ *Rhodococcus Arythroplis*

⁹ Phenol

¹⁰ Resorcinol

¹¹ Catechol

¹² P-nitrophenol

¹³ P-chlorophenol

¹⁴ Hydroquinone

غلظت استایرن در فاز مایع با استفاده از ضریب توزیع استایرن در فاز گاز و مایع در ۳۲ درجه سلسیوس برآورد شد. برای ارزیابی ضریب توزیع استایرن مایع به میزان ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۵ و میکرولیتر استایرن به سرم باتل ۱۲۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد. درب بطری‌ها به وسیله تفلون پوشش داده شده با سیلیکون سپتا و با سرپوش آلومینیوم مهر و موم شده بود. پس از به تعادل رسیدن بخار و مایع، غلظت استایرن در فاز گازی با روش گاز کروماتوگرافی تعیین شد و ضریب توزیع با استفاده از مقدار کل استایرن اضافه شده محاسبه شد [۶ و ۲۵].

غلظت بیومس به وسیله محاسبه دانسیته نوری (OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری جاسکو^۴ V-550 تعیین شد و با استفاده از یک نمودار کالیبراسیون، میزان جذب نور به میزان جرم خشک توده سلولی ربط داده شد. pH به وسیله pH متر محصول هچ^۵ اندازه‌گیری شد. تمام اندازه‌گیری‌ها سه مرتبه تکرار شد و میزان انحراف معیار نتایج روی نمودار مشخص شد.

۲-۳- آزمایش‌ها

تمامی آزمایش‌ها با هر دو نوع میکروارگانیزم سازگار و غیر سازگار در مقیاس ناپیوسته و در سرم باتل‌های به حجم ۱۲۰ میلی‌لیتر انجام شد. ۲۰ میلی‌لیتر از حجم سرم باتل‌ها به محیط کشت اختصاص یافت و درب آن‌ها با درپوش مخصوص (تفلون پوشش داده شده با سیلیکون سپتا) و سرپوش آلومینیومی بسته شد. مقدار استایرن لازم برای تامین غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر به وسیله سرنگ مخصوص به داخل سرم باتل‌ها ریخته شد و بعد از رسیدن به حالت تعادل، زیست توده توسط سرنگ به سرم باتل‌ها اضافه شد و واکنش زیستی آغاز شد. پس از آن در بازه‌های زمانی مختلف از فاز گازی بالای سرم باتل‌ها نمونه‌گیری شد و غلظت فاز گازی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی سنجیده شد. این کار از زمان ۲ تا ۴۸ ساعت در زمان‌های مشخص ادامه یافت. برای تمامی آزمایش‌های ذکر شده دما ۳۲ درجه سلسیوس، pH برابر ۷ و دور شیکر انکوباتور برابر ۱۶۰ دور بر دقیقه بود [۲۵، ۲۶ و ۲۷]. همچنین وزن اولیه توده زیستی نیز در هر دو حالت سازگار و غیر سازگار برابر ۰/۳۱ گرم وزن خشک توده زیستی در لیتر در نظر گرفته شد. در آزمایش‌های سینتیکی، استایرن به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده قرار گرفت و این آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

بانک میکربی ایران (پژوهشگاه علمی و صنعتی ایران) به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. به منظور رشد باکتری پس از باز کردن لیوفیلز در محیط مغذی حاوی پپتون ۵ گرم، عصاره گوشت ۳ گرم و آگار ۱۵ گرم (به ازای هر لیتر آب مقطر) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سلسیوس کشت داده شد. به منظور انجام آزمایش‌ها در سیستم ناپیوسته از محیط کشت با مشخصات ذکر شده در جدول ۱ حاوی غلظت‌های مختلف استایرن با خلوص ۹۹ درصد به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. استایرن و همچنین کلیه مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه از شرکت مرک^۱ آلمان تهیه شدند.

جدول ۱- مشخصات محیط کشت

غلظت (میلی گرم در لیتر)	مواد شیمیایی
۸۰۰۰	K ₂ HPO ₄
۱۰۰۰	KH ₂ PO ₄
۲۰۰۰	NH ₄ Cl
۵	MgSO ₄ ·6H ₂ O
۲۰	CaCl ₂ ·2H ₂ O
۵	MnCl ₂ ·4H ₂ O
۱	Na ₂ MoO ₄
۰/۵	CuCl ₂
۵	FeNH ₄ Citrate
۵	ZnCl ₂
۵۰	EDTA
۱۰	NaCl

۲-۲- روش‌های آنالیز

غلظت استایرن در فاز گاز درون سرم باتل‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی^۲ (یانگ لین، ACME-6100) مجهز به یک آشکارساز یونیزاسیون هلیوم^۳ (HID) و ستون موئین TRB-5 با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۵۳ میلی‌متر و ضخامت ۳ میکرومتر انجام شد. دمای آون دستگاه GC در ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه حفظ شد و سپس تا ۱۴۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه افزایش داده شد. درجه حرارت تزریق کننده و آشکارساز در ۲۰۰ و ۲۴۰ درجه سلسیوس ثابت شد. در بازه‌های زمانی مختلف ۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه گاز از هریک از سرم باتل‌ها به وسیله سرنگ مخصوص GC، استخراج شد و مورد آنالیز قرار گرفت.

¹ Merck

² Gas Chromatography (GC)

³ Helium Ionization Detector (HID)

⁴ Jesco

⁵ Hach Instrument

۲-۴- سازگاری

به منظور سازگار کردن گونه میکربی با استاینر، سازگاری با روش پله‌ای به شرح زیر انجام شد. ابتدا میکروارگانیسم به محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌گرم استاینر در سرم باتل اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت، غلظت استاینر اندازه‌گیری شد و سپس میکروارگانیسم با استفاده از ساتریفوژ (۹۰۰۰g، ۱۰ دقیقه) از محیط جدا شد و با محیط کشت دوبار شستشو شده و سپس مجدد به محیط کشت جدید حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استاینر اضافه شد و این کار تا زمانی که استاینر به طور کامل حذف شد، تکرار شد و سپس میکروارگانیسم به محیط کشت حاوی غلظت بالاتر استاینر (۳۰ میلی‌گرم در لیتر) اضافه شد و هر ۲۴ ساعت یکبار کشت با این غلظت استاینر تا حذف کامل آن ادامه یافت. این روند در غلظت‌های ۵۰، ۶۰ و ۷۰ تکرار شد. برای غلظت ۷۰ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر استاینر، مدت زمان هر کشت به ۴۸ ساعت تغییر پیدا کرد. سازگاری تا غلظت ۹۰ میلی‌گرم در لیتر ۱۱ هفته به طول انجامید.

۲-۵- مدل‌های سینتیکی

رشد میکروارگانیسم‌ها یک پدیده پیچیده به شمار می‌رود که تلاش‌های زیادی برای یافتن مدل مناسب توصیف کننده آن انجام شده است. هنگامی که میکروارگانیسم‌ها بر روی یک سوبسترای خاص رشد می‌کنند، با استفاده از ضریب بازدهی می‌توان بین سینتیک رشد میکروارگانیسم‌ها و سینتیک حذف سوبسترا رابطه برقرار نمود (رابطه ۱) [۲۸].

$$SDR = \frac{-\mu X}{Y_X/S} \quad (1)$$

مدل‌های سینتیکی مختلفی برای رشد میکروارگانیسم‌ها (حذف سوبسترا) توسط محققان پیشنهاد شده است. مدل‌هایی که داده‌های تجربی این تحقیق با آنها انطباق یافته است در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- مدل‌های سینتیکی و معادلات مربوط به آنها

معادله	مدل سینتیکی
$\mu_g = \mu_{max} S / (S + S^2/K_i + K_s + SK_s/K_i)$	هالدین
$\mu_g = \mu_{max} S (1 + S/K) / (S + K_s + S^2/K_i)$	وب
$\mu_g = \mu_{max} S / (S + K_s + S^2/k_i (1 + S/K))$	یانو
$\mu_g = \mu_{max} S [\exp(-S/K_i)] / (S + K_s)$	ایبا
$\mu_g = \mu_{max} S / (S + K_s)$	مونود
$\mu_g = \mu_{max} [\exp(-S/K_i) - \exp(-S/KS)]$	تیزر

۲-۶- جذب زیستی

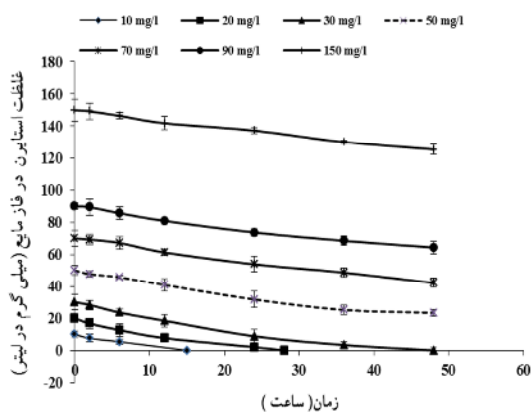
به منظور بررسی میزان جذب استاینر توسط توده زیستی، ابتدا توده زیستی (غلظت ۰/۳۱ میلی‌گرم در لیتر) به سرم باتل‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت سنتزی، بدون استاینر، اضافه شد و سپس نمونه‌ها به منظور غیر فعال شدن توده زیستی درون اتوکلاو قرار داده شد. پس از رسیدن نمونه‌ها به دمای محیط (۳۲ درجه سلسیوس)، به دو سرم باتل استاینر اضافه شد تا غلظت اولیه آن در سرم باتل‌ها برابر ۳۰ و ۷۰ میلی‌گرم در لیتر شود. سپس غلظت استاینر در زمان‌های مختلف توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، مورد سنجش قرار گرفت. برای هر یک از غلظت‌ها، آزمایش سه بار تکرار شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- حذف زیستی استاینر توسط میکروارگانیسم

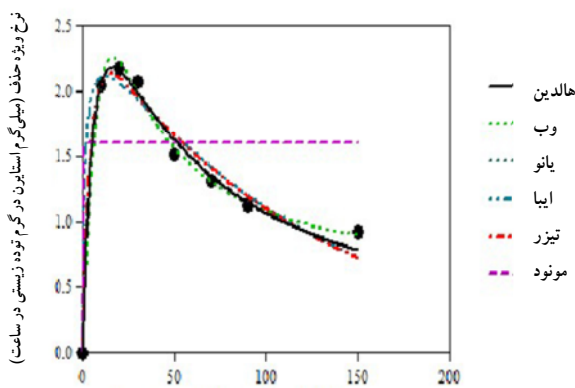
رودوکوکوس اریتروپولیس PTCC 1767

در این بخش توانایی تجزیه بیولوژیکی استاینر توسط میکروارگانیسم رودوکوکوس اریتروپولیس PTCC 1767 بررسی شد. در شکل ۱ تغییرات غلظت استاینر بر حسب زمان برای غلظت‌های اولیه ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر توسط توده زیستی غیر سازگار شده با غلظت ۰/۳۱ گرم توده زیستی در لیتر نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، میزان تخریب استاینر وابسته به غلظت اولیه استاینر است و با افزایش میزان غلظت استاینر، میزان حذف نیز کاهش یافته است. این امر نشان دهنده این است که با وجود توانایی رودوکوکوس اریتروپولیس PTCC 1767 در حذف استاینر، این ماده در غلظت‌های بالاتر خاصیت بازدارندگی دارد. این نتیجه در سایر مطالعات انجام شده در زمینه تخریب استاینر توسط



شکل ۱- تغییرات غلظت استاینر بر حسب زمان برای توده زیستی غیر سازگار

در ابتدا باید به این نکته توجه کرد که مقدار ضریب تعیین^۱ (R^2) و نیز مجموع مربعات خطا^۲ (SSE) مهم‌ترین شاخص‌ها برای قضاوت در مورد مناسب بودن یا نبودن مدل انتخابی است که برای انطباق داده‌های آزمایشگاهی به‌کار رفته است [۶]. با توجه به داده‌های آزمایشگاهی به‌دست آمده، مشخص شد که سوبسترای مورد مطالعه روی رشد جمعیت میکروبی اثر بازدارندگی دارد و بعد از یک غلظت معین هرچه غلظت افزایش می‌یابد، نرخ حذف آلاینده نیز کاهش می‌یابد. در مطالعات قبلی که بر روی استایرن و سایر آلاینده‌های بازدارنده مانند فنل، بنزن، تولوئن و غیره صورت گرفته است، اغلب از مدل‌های بازدارنده نظیر هالدين، وب، یانو، ایبا و تیزر استفاده شده است [۱، ۶، ۲۵، ۲۹، ۳۰ و ۳۱].



غلظت استایرن (میلی‌گرم در لیتر)

شکل ۲ - تغییرات نرخ ویژه حذف با غلظت اولیه استایرن با مدل‌های نام برده شده برای توده زیستی غیر سازگار

اگرچه ضریب همبستگی مدل‌های بازدارنده هالدين، وب، یانو، ایبا، و تیزر بسیار به هم نزدیک است اما مدل هالدين با دارا بودن $R^2 = 0/99$ و $SSE = 0/008$ نسبت به دیگر مدل‌ها با کیفیت‌تر است.

همچنین به‌منظور اثبات اثر بازدارندگی استایرن، داده‌های به‌دست آمده با مدل غیربازدارنده مونود نیز تطبیق داده شد که نتایج بیانگر عدم تطبیق داده‌های تجربی بر این مدل ($R^2 = 0/59$ و $SSE = 0/019$) بود و این خود گویای بازدارنده بودن استایرن است.

۳-۳- مقایسه مدل به‌دست آمده با کارهای گذشته

تاکنون مطالعاتی بر روی بررسی سینتیکی حذف استایرن صورت گرفته است. در اینجا نیز نتایج به‌دست آمده از این مطالعات با

میکروارگانیزم‌های خالص و یا مخلوط نیز مشاهده شده است [۱، ۶، ۱۰، ۱۳ و ۲۹].

برای بررسی مکانیسم حذف استایرن توسط توده زیستی و مطالعه به‌عنوان منبع کربن مصرف می‌شود و یا عمل جذب صورت می‌پذیرد، آزمایش جذب زیستی با روش ذکر شده در بخش ۲-۴ انجام شد. مشاهده شد که میزان بسیار کمی از استایرن (کمتر از ۵ درصد) توسط توده زیستی رودوکوکوس/اریتروپولیس جذب شده است. نتایج سرم باتل‌های شاهد (محیط کشت حاوی استایرن بدون میکروارگانیزم) نیز نشان داد که فراریت استایرن بسیار ناچیز (کمتر از ۰/۱ درصد) بوده است. از این رو می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مکانیسم اصلی تخریب، حذف زیستی بوده است. در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که حذف زیستی، مکانیسم غالب گونه رودوکوکوس در تخریب محدوده وسیعی از آروماتیک‌ها نظیر بنزن، زایلن و تولوئن است [۱۹].

۳-۲- سینتیک تجزیه بیولوژیکی استایرن، در محیط شامل استایرن به عنوان تنها منبع کربن

برای به‌دست آوردن سینتیک حذف آلاینده در ابتدا باید برای هر یک از غلظت‌های اولیه به‌کار رفته آن تغییرات غلظت با زمان دنبال شود و سپس نرخ ویژه حذف تعیین شود. به این منظور شیب ابتدایی نمودار حاصل از تغییرات غلظت با زمان برای هر یک از غلظت‌های اولیه به‌کار رفته محاسبه شد. از تقسیم شیب حاصله یا نرخ حذف بر غلظت اولیه توده زیستی، نرخ ویژه حذف برای هر یک از غلظت‌ها به‌دست آمد.

هدف از تعیین سینتیک حذف آلاینده یافتن مدلی است که نشان‌دهنده ارتباط میان نرخ ویژه حذف با غلظت اولیه آلاینده باشد. داده‌های به‌دست آمده برای نرخ ویژه حذف نشان داد که با افزایش غلظت تا یک غلظت آستانه، نرخ ویژه حذف افزایش پیدا کرد اما بعد از این غلظت نرخ ویژه حذف کاهش یافت. از این رو داده‌های به‌دست آمده در این مطالعه و مدل‌های بازدارنده هالدين، وب، یانو، ایبا و تیزر تطبیق داده شدند و مقدار پارامترهای سینتیکی و R^2 تقریب مربعات خطا برای مدل‌های ذکر شده، تعیین شد (جدول‌های ۲ و ۳). به‌منظور اطمینان از بازدارندگی استایرن، داده‌های به‌دست آمده همچنین با مدل سینتیکی غیر بازدارنده مونود نیز تطبیق داده شدند. شکل ۲ نشان‌دهنده داده‌های تجربی و تطبیق یافته با مدل‌های ذکر شده برای توده زیستی اولیه ۰/۳۱ (گرم توده زیستی در لیتر) با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism 5 است.

¹ Correlation Coefficient

² Sum of Squared Errors

جدول ۳- پارامترهای سینتیکی به دست آمده در مدل های مختلف برای توده زیستی غیرسازگار

R ²	k	k _i (mg/L)	k _s (mg/L)	q _m (g/(g dry cell h))	مدل سینتیکی
۰/۹۹	-	۳۴/۵۸	۷/۵۹۴	۴/۲۳۵	هالدین
۰/۹۷	۸۵/۴۹	۲۴/۲۶	۵/۰۱۳	۳/۳۵	وب
۰/۹۸	۱۰ ^{۱۱} *۳/۹۳	۳۴/۵۸	۸۹۲۹/۰	۲/۳۲۶	یانو
۰/۹۶	-	۱۱۹/۲	۱/۳۱	۲/۵۴	ایبا
۰/۹۷	-	۱۲۱/۳	۴/۳۳	۲/۵۱۶	تیزر
۰/۵۹	-	-	۱۰ ^{۱۰} *۱/۶۸	۱/۵۹	مونود

تفاوت دو مدل ناچیز خواهد شد. ثابت نیمه سرعت به دست آمده در این مطالعه از همه موارد ذکر شده به جز لجن فعال صنعتی^۱ بزرگ تر است.

تفاوت مدل هالدین که یک مدل بازدارنده به شمار می رود با مدل مونود در ترم (S^2/K_i) است. وقتی مقدار عددی این ترم کم باشد (در غلظت های پایین) مدل هالدین به مدل مونود نزدیک می شود. ولی در غلظت های بالا، این ترم قابل نظر نبوده و سبب افت نرخ ویژه حذف می شود. هرچه مقدار ثابت بازدارندگی سوپسترا (K_i) برای مدلی بالاتر باشد، جمعیت میکروبی یا گونه خالص مورد مطالعه حساسیت کمتری نسبت به سوپسترای بازدارنده دارد و بالعکس [۲۸]. از صورت کلی مدل سینتیکی هالدین هم مشخص است که هرچه ثابت بازدارندگی سوپسترا عدد بزرگ تری باشد، ترم بیان کننده بازدارندگی (S^2/K_i) ، در غلظت های بالاتر اهمیت می یابد. ثابت بازدارندگی سوپسترا در این مطالعه از سایر مطالعات دیگر به جز سودوموناس E-93486 بیشتر است. همان گونه که از معادله و منحنی مربوط به مدل سینتیکی هالدین مشخص است، ابتدا با افزایش غلظت سوپسترا نرخ حذف افزایش می یابد ولی بعد از یک غلظت معینی رو به کاهش می گذارد. بنابراین این معادله دارای یک نقطه بیشینه است که دانستن غلظت مربوط به این نرخ ویژه حذف بیشینه، اهمیت بالایی دارد، زیرا بعد از این غلظت، نرخ ویژه حذف کاهش می یابد و در واقع اثر بازدارندگی سوپسترا آغاز می شود.

¹ Industrial Activated Sludge

جدول ۴- مقایسه نتایج سینتیکی این مطالعه با مطالعات قبلی

مراجع	pH	T (°C)	S _{threshold}	k _i (mg/L)	k _s (mg/L)	q _m (g/(g dry cell h))	گونه
این مطالعه	۷	۳۲	۱۷/۳۲	۳۴/۵۸	۷/۵۹۴	۴/۲۳۵	رودوکوکوس اریتروپولیس PTCC1767
[۱]	۷	۳۰	۳۲/۳۱	۱۵۶/۶	۵/۹۸۴	۱۶۵	سودوموناس E-93486
[۶]	۷	۳۲	۱۷/۲۵	۲۱/۵۷	۱۳/۸	۱۶۰	لجن فعال صنعتی
[۲۸]	-	۲۵	۹/۶۲	۲۶/۵۵	۳/۴۹	۲۳/۲۲	مخلوط ^۱
[۷]	۷/۵	۲۵	۴/۱۲	۲۱/۸	۰/۷۸	۶۳۰	اکروفیالاجینسلی
[۲۵]	۷	۳۲	۰/۱۷	۰/۱۸۶	۰/۱۵۴	۲۱۰	رودوکوکوس پیریدینولیس ^۲ PYJ-1*

*غلظت پروتئین برابر ۵۰ درصد وزن توده سلولی در نظر گرفته شده است.

² Mixed Culture

³ Rhodococcus Pysidinovorans PYJ-1*

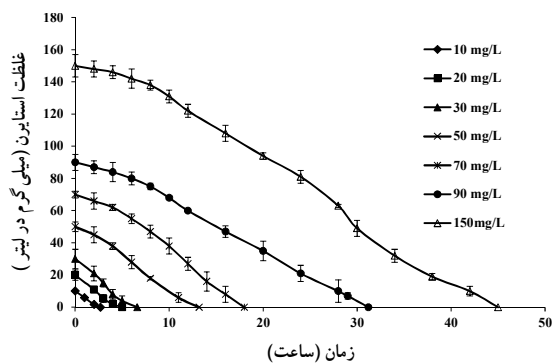
باعث افزایش بیشینه نرخ ویژه حذف می‌شود [۳۳]. ساهینکایا و همکاران و بیوتران و همکاران اظهار داشتند زمانی که از لجن فعال سازگار شده استفاده می‌شود میزان q_m در مقایسه با لجن غیر سازگار شده کاهش می‌یابد. آن‌ها این مطلب را به این گونه ادعا کردند که لجن فعال سازگار شده از برخی باکتری‌ها با ضرایب نرخ رشد پایین تشکیل شده است که برای فرایند تخریب، وجود آن‌ها ضروری است [۳۱ و ۳۴]. به این ترتیب باید بررسی نمود که با انجام عمل سازگاری می‌توان به نرخ ویژه حذف بالاتری دست یافت یا خیر.

در بررسی سینتیکی میکروارگانسیم رودوکوکوس/اریتروپولیس سازگار نشده، نقطه قوت آن را می‌توان در میزان بازدارندگی و مقاومت این میکروارگانسیم به ماده سمی مانند استایرین دید و می‌توان از این گونه در تصفیه پساب‌هایی که حاوی غلظت بالایی از استایرین در پساب هستند و بازدارندگی آن برای گونه‌های دیگر شدید می‌باشد، استفاده نمود.

۳-۴- تاثیر سازگاری در تخریب زیستی استایرین

با توجه به مطالعات قبلی که بر روی سینتیک حذف استایرین صورت پذیرفته و این که همه گونه‌های باکتریایی استفاده شده در این مطالعات با استایرین سازگار شده بودند و همچنین اهمیت بحث سازگاری و تاثیر بسیار زیاد آن بر میزان حذف سوبسترا، بررسی تخریب زیستی استایرین توسط میکروارگانسیم سازگار شده رودوکوکوس/اریتروپولیس نیز مورد بررسی قرار گرفت.

شکل ۳ تغییرات غلظت استایرین بر حسب زمان را برای غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر زمانی که از گونه سازگار شده رودوکوکوس/اریتروپولیس *PTCC1767* استفاده شده است را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل و مقایسه آن با شکل ۱ می‌توان دریافت که



شکل ۳- تغییرات غلظت استایرین بر حسب زمان با توده زیستی سازگار شده

در غلظت‌های کمتر از $\sqrt{k_s * k_i}$ که به $S_{threshold}$ معروف است با افزایش غلظت، مقدار نرخ ویژه حذف افزایش می‌یابد و در غلظت‌های بالاتر از این مقدار با افزایش غلظت، نرخ ویژه حذف کاهش می‌یابد. مقایسه مقدار به‌دست آمده در این پژوهش با مطالعات گذشته نشان می‌دهد که مقدار $\sqrt{k_s * k_i}$ به جز گونه سودوموناس *E-93486* از سایر مطالعات بیشتر است.

با توجه به نتایج حاصله می‌توان دریافت که پارامتر بیشینه نرخ ویژه حذف (q_m) برای گونه رودوکوکوس/اریتروپولیس سازگار نشده این مطالعه نسبت به سایر گونه‌های به‌کار برده شده برای حذف استایرین بسیار کمتر است که البته علت این امر را می‌توان در این مطلب یافت که گونه‌های به‌کار برده شده در مطالعات دیگر همگی به نحوی با محیطی که در آن استایرین بوده است، تطبیق یافته‌اند. سودوموناس *E-93486* قبل از بررسی و تعیین پارامترهای سینتیکی ابتدا به مدت ۲۴ ساعت با ۹ میلی‌گرم در لیتر استایرین، سپس با اضافه کردن ۴۵ میلی‌گرم استایرین به صورت روزانه به مدت یک هفته و سپس با ۹۰ میلی‌گرم در لیتر استایرین به مدت پنج هفته تغذیه شده است و با محیط حاوی استایرین سازگار شده است [۱]. همچنین گونه *آگزوفیلا جینسملی* نیز به مدت ۹ هفته با ۰/۰۲۷ تا ۰/۰۹۱ میلی‌مول استایرین سازگار شده است [۱۲]. گونه رودوکوکوس پیریدینورانس *PYJ-1* از بیوفلتری جدا شد که به مدت ۱۰۰ روز در حال حذف ترکیباتی شامل استایرین بوده است [۲۵]. مخلوط باکتریایی نیز مانند گونه رودوکوکوس پیریدینورانس از فیلتری که در حال حذف بخارات استایرین از هوای آلوده به آن بوده است، استخراج شده و سازگاری با محیط حاوی استایرین در مورد آن نیز صورت گرفته است [۲۹]. لجن فعال مورد استفاده در پژوهش بابایی و همکاران از تصفیه‌خانه شرکت پتروشیمی تبریز گرفته شده است که حاوی استایرین بوده است [۶]. بنابراین بالاتر بودن بیشینه نرخ ویژه حذف (q_m) به‌دست آمده در این مطالعات نسبت به این مطالعه را می‌توان به سازگار شدن گونه‌های میکروبی مورد استفاده با استایرین ارتباط داد. همچنین ساهینکایا و همکاران نیز در بررسی سینتیک حذف ۴-کلروفنل با لجن بیان می‌کنند که در شرایطی که از گونه سازگار شده استفاده کردند، میزان قابلیت حذف زیستی نسبت به زمانی که از گونه سازگار نشده استفاده شد، به مراتب افزایش یافته است [۳۱]. همچنین آنچاتر و والا بیان می‌کنند که با اعمال فرایند سازگاری قابلیت حذف زیستی افزایش یافته است [۳۲]. ساز و ریتمن نیز ذکر کرده‌اند که سازگاری میکروارگانسیم‌ها به غلظت بالاتر فنل بر روی پارامترهای سینتیکی تاثیر می‌گذارد ولی زمانی که از توده سازگار شده در بررسی سینتیک استفاده شد، مشخص شد که سازگاری

آلکالیجنس/تروفوس^۱ می‌شود [۳۶]. همچنین بابایی و همکاران این مطلب را در مورد استایرن و لجن فعال عنوان نموده‌اند [۶]. حالت عکس این نتیجه هم در بررسی‌ها گزارش شده است. ساهینکایا و دیلک اثر افزایش ۴- کلرو فنل را بر ضریب بازدهی لجن فعال بررسی کردند و مشاهده کردند که مقادیر ضریب بازدهی تغییر چندانی نمی‌کند و می‌تواند ثابت در نظر گرفته شود [۳۱]. همچنین جدول ۵ نشان می‌دهد که مقدار ضریب بازدهی برای توده زیستی سازگار شده بسیار پایین‌تر از توده سازگار نشده است که یکی از دلایل این امر این است که میکروارگانیسم‌ها در مواجهه با استایرن به‌عنوان یک ماده سمی برای محافظت از خود به تولید یک ماده محافظ برون سلولی نظیر پروتئین‌ها می‌پردازند که همین مسئله می‌تواند دلیل کاهش ضریب بازدهی باشد. همچنین یکی دیگر از دلایل نیز می‌تواند این باشد که میکروارگانیسم‌ها بیشتر منبع کربن را در حالت بقاء صرف نموده‌اند تا این که برای رشد و نمو صرف کنند.

جدول ۵- تغییرات ضریب بازدهی با غلظت اولیه استایرن در توده

زیستی سازگار نشده و سازگار شده

غلظت استایرن (mg/L)	توده زیستی سازگار نشده	توده زیستی سازگار شده
۱۰	۱۳/۳۸±۰/۳	۰/۸۷۷±۰/۰۷
۲۰	۷/۷۸±۰/۲	۱/۸۸±۰/۰۵
۳۰	۴/۸۵±۰/۱۵	۱/۵۱±۰/۰۳
۵۰	۵/۲±۰/۲۵	۰/۸۸±۰/۰۵
۷۰	۴/۲۲±۰/۲۲	۰/۵۵±۰/۰۶
۹۰	۳/۳±۰/۲	۰/۳۹±۰/۰۴
۱۵۰	۲/۲۵±۰/۱۵	۰/۲۲±۰/۰۵

۳-۶- رشد میکروارگانیسم‌ها و کاهش غلظت استایرن در سیستم منحنی رشد میکروبی دارای شکل S مانند است. یعنی ابتدا یک فاز تأخیر وجود دارد و سپس فاز لگاریتمی و رشد قرار دارد و پس از آن مرحله رشد ایستایی و فاز ثابت و در آخر مرحله مرگ قرار دارد [۳۵]. در بررسی رشد توده زیستی در مورد سوبستراهای بازدارنده مانند تولوئن، زایلن، بنزن و استایرن معمولاً فاز تأخیری به‌خاطر سمیت این مواد برای میکروارگانیسم‌ها وجود دارد، ولی در مورد باکتری رودوکوکوس/اریتروپولیس PTCC1667 برای حذف استایرن این فاز مشاهده نشد و این بخاطر مقاومت بیشتر این باکتری نسبت به دیگر گونه‌ها در مقابل سمیت و بازدارندگی استایرن است. در شکل ۴ تغییرات غلظت توده زیستی و غلظت استایرن با زمان برای غلظت اولیه استایرن برابر ۳۰ میلی‌گرم در

سازگاری میکروارگانیسم باعث افزایش سرعت حذف شده و قدرت تخریب زیستی رودوکوکوس/اریتروپولیس بسیار افزایش یافته است، و به این ترتیب می‌توان با سازگاری گونه باکتریایی با صرف وقت و هزینه کمتر به بازدهی بسیار بالایی در تصفیه پساب‌های آلوده پرداخت. ولی حتی با سازگاری این باکتری تا غلظت ۹۰ میلی‌گرم در لیتر باز هم در غلظت‌های بالا می‌توان اثر بازدارندگی استایرن را مشاهده نمود.

۳-۵- ضریب بازدهی

مقدار ضریب بازدهی که یک پارامتر بدون بعد است، از رابطه ۲ محاسبه می‌شود

$$Y_{x/s} = \frac{X_{\max} - X_0}{S_0 - S_{\min}} \quad (2)$$

که در این رابطه

X_0 و X_{\max} به ترتیب نشان دهنده غلظت توده زیستی در لحظه شروع و بیشینه غلظت توده زیستی به‌دست آمده در طول آزمایش است. همچنین S_0 و S_{\min} به ترتیب نشان دهنده غلظت سوبسترا در لحظه شروع و پایان واکنش میکروبی است [۳۵].

جدول ۵ مقادیر تعریف شده بالا را برای غلظت‌های اولیه مختلف استایرن برای توده زیستی سازگار نشده و همچنین رودوکوکوس/اریتروپولیس سازگار شده به غلظت ۹۰ میلی‌گرم در لیتر استایرن را نشان می‌دهد.

همان‌گونه که در جدول ۵ مشخص است، مقدار ضریب بازدهی برای توده زیستی سازگار نشده یک روند کاهشی دارد. همچنین ضریب بازدهی برای توده زیستی سازگار شده تا غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر ابتدا افزایش و سپس یک روند کاهشی خیلی ملایم را داشت. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود با افزایش مقدار غلظت استایرن، COD کل افزایش می‌یابد و چنانچه روند افزایش غلظت توده زیستی هم به همان شدت افزایش COD باشد، لازم است ضریب بازدهی تغییر چندانی نکند ولی یافته‌های این مطالعه این مطلب را اثبات نمی‌کند. دلیل را می‌توان در این واقعیت جستجو کرد که استایرن یک سوبسترای بازدارنده است و حضور آن در محیط رشد بیشتر از آن که سبب رشد شود، صرف حفظ و بقای جمعیت میکروبی می‌شود. بنابراین با وجود تغییرات زیاد در مقدار COD کل، مقدار رشد میکروبی افزایش اندکی داشته و در نتیجه ضریب بازدهی عدد ثابتی نخواهد بود. چنین نتیجه‌ای، افت ضریب بازدهی، با افزودن سوبسترای بازدارنده، در مطالعه هیل و همکاران نیز گزارش شده است. یافته‌های این محققان نشان داده است که افزایش غلظت ۴- کلروفنل سبب کاهش ضریب بازدهی

¹ A. Eutrophus

۱- میکروارگانیسم هوازی رودوکوکوس اریتروپولیس *PTCC 1667* توانایی حذف زیستی غلظت‌های اولیه مختلف استایرن از ۱۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر را به میزان ۱۷ تا ۱۰۰ درصد در مدت زمان ۱۵ تا ۴۸ ساعت از محیط کشت سنتزی دارد.

۲- مدل سینتیکی هالدین با دقت بسیار بالا و قابل قبولی حذف استایرن توسط باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *PTCC 1767* را پیش‌بینی می‌کند. مدل‌های نهایی به‌دست آمده برای توده زیستی سازگار نشده عبارت است از:

$$q = \frac{4.235s}{s + 7.594 + s^2 / 34.58} \quad (3)$$

۳- چنانچه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *PTCC 1767* تا غلظت ۹۰ میلی‌گرم در لیتر استایرن سازگار شود قادر خواهد بود در مدت در زمان ۲/۷ تا ۴۲ ساعت غلظت ۱۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم از استایرن را به‌طور کامل (۱۰۰ درصد) حذف نماید.

سازگاری باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *PTCC 1767* با استایرن سبب افزایش قابل توجه نرخ ویژه حذف شد.

لیتر مشاهده می‌شود. همان‌طور که از شکل مشخص است در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر هم‌زمان با حذف استایرن رشد باکتری نیز مشاهده می‌شود



شکل ۴- تغییرات غلظت توده زیستی و غلظت استایرن در غلظت اولیه ۳۰ میلی‌گرم در لیتر استایرن بر حسب زمان

۴- نتیجه‌گیری

در بررسی حذف استایرن از محیط کشت سنتزی به‌وسیله میکروارگانیسم رودوکوکوس اریتروپولیس *PTCC 1667* نتایج زیر حاصل شد:

۵- مراجع

- Gąszczak, A., Bartelmus, G., and Greń, I. (2012). "Kinetics of styrene biodegradation by *Pseudomonas sp.E-93486*." *APPL. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 565-573.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., and Stensel, H.D. (2012). *Wastewater engineering, treatment and reuse*, 5th Ed., Metcalf and Eddy, McGraw-Hill Inc., NY.
- Fallah, N., Bonakdarpour, B., Nasernejad, B., Alavimoghadam, M. (2010). "The use of submerged membrane bioreactor for the treatment of a styrene containing synthetic wastewater." *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, 7, 115-122.
- Warhurst, A.M., and Fewson, C.A. (1994) "Microbial metabolism and biotransformation of styrene." *A Review, Appl. Bacter.*, 77, 597-606.
- Fritsche, W., and Hofrichter, M. (2005). "Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms." *Environmental Biotechnology*, 45, 203-227.
- Babae, R., Bonakdarpour, B., Nasernejad, B., and Fallah, N. (2010). "Kinetics of styrene biodegradation in synthetic wastewaters using an industrial activated sludge." *Hazard. Mater.*, 184, 111- 117.
- Cox, H.H.J., Moerman, R.E., Baalen, S.V., Heiningen, W.N.M.V., Doddema, H.J., and Harder, W. (1997). "Performance of a styrene-degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*." *Biotechnol. Bioeng*, 53, 259-266.
- Okamoto, K., Izawa, M., and Yanase, H. (2003). "Isolation and application of a styrene degrading strain of *Pseudomonas putida* to biofiltration." *J. Biosci. Bioeng*, 95, 633-636.
- Zilli, M., Converti, A., and Felice, D.R. (2003). "Macrokinetic and quantitative microbial investigation on bench scale biofilter treating styrene-polluted gaseous streams." *Biotechnol. Bioeng.*, 83, 29-38.
- Warhurst, A.M., Clarke, K.F., Hill, R.A., Holt, R.A., and Fewson, C.A. (1994). "Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259." *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1137-1145.
- Annachhatre, A.P., and Gheewa, SH. (1996). "Biodegradation of chlorinated phenolic compounds." *Biotechnol. Adv.*, 14, 35-56.

12. Silva, F., Pirra, A., Sousa, J., Arroja, L., and Capela, I. (2011). "Biodegradation kinetics of winery wastewater from port wine production." *Chem. Biochem. Eng.*, 4, 493-499.
13. O'Leary, N.D., O'Connor, K.E., and Dobson, A.D.W. (2002). "Biochemistry genetics and physiology of microbial styrene degradation." *A review, FEMS Microbiol.*, 26, 403-417.
14. Itoh, N., Yoshida, K., and Okada, K. (1996). "Isolation and identification of styrene-degrading *Corynebacterium* strains and their styrene metabolism." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 1826-1830.
15. Burbark, B.L., and Perry, J.J. (1993). "Biodegradation and biotransformation of groundwater pollutant mixture by *Mycobacterium vaccae*." *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1025-1029.
16. Cao, W., and Wang, Y. (2004). "Compound - specific hydrogen and carbon isotopic fractionation during artificial enhanced bioremediation of petrochemical hydrocarbons." *Proceeding of 227th ACS National Meeting*, Anaheim, CA, USA, Washington, DC.
17. Vazquez, R. G., Youssef, C.B., and Waissman- vilanova, J. (2005). "Two- step modeling of biodegradation of phenol by an acclimated activated sludge." *Chem. Eng.*, 117, 245-252.
18. Rene, E.R., Veiga, M.C., and Kennes, C. (2010). "Biodegradation of gas-phase styrene using the fungus *Sporothrix variegatus*: Impact of pollutant load and transient operation." *Chemosphere*, 79, 221-227.
19. Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., and Křen, V. (2009). "Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*." *A Review, Environment. International*, 35, 162-177.
20. De Carvalho, C.C.C.R. , and Da Fonseca, M.M.R. (2005). "The remarkable *Rhodococcus erythropolis*." *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 67, 715-726.
21. Ejková, A.C., Masa'k, J., Jirku, V., Vesely, M., Pa'tek, M., and Nes'vera, J. (2005). "Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism." *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 21, 317-321.
22. Andreozzi, R., Cesaro, R., Marotta, R., and Pirozzi, F. (2006). "Evaluation of biodegradation kinetic constants for aromatic compounds by means of aerobic batch experiments." *Chemosphere*, 62, 1431-1436.
23. Vodicka, P., Koskinen, M., Naccarati, A., Oesch-Bartlomowicz, B., Vodickova, L., Hemminki, K., and Oesch, F. (2006). "Styrene metabolism, genotoxicity, and potential carcinogenicity." *Drug Metab Rev.*, 38, 805-853.
24. Lin, C.W., Cheng, Y.W., and Tsai, S.L. (2007). "Multi-substrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*." *Process Biochemistry*, 42, 1211-1217.
25. Jung, I.G., and Park, C.H. (2005). "Characteristics of styrene degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* isolated from a biofilter." *Chemosphere*, 61, 451-456.
26. Carla, C.C.R., and Carvalho, D. (2012). "Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions." *Microbiology*, 163, 125-136.
27. Grady Jr, C.P.L., Smets, B.F., and Barbeau, D.S. (1996). "Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology." *Water Res.*, 30, 742-748.
28. Liu, W.D., and Lee, C.Y., (2007). "Practical identification analysis of Haldane kinetic parameters describing phenol biodegradation in batch operation." *J. Environ. Eng. Manage.*, 17, 71-80
29. Jorio, H., Brzezinski, R., and Heitz, M. (2005). "A novel procedure for the measurement of the kinetics of styrene biodegradation in a biofilter." *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 796-804.
30. Oh, W.D., Lim, P.E., Seng, C.E., Mohamed, N., Adnan, R., Leong, K.Y., and Voon, S.Y. (2012). "Effect of initial biomass concentration on bioregeneration of 4-chlorophenol-loaded granular activated carbon: Kinetic and efficiency studies." *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 3, 253-263.
31. Sahinkaya, E., and Dilek, F.B. (2005). "Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge—evaluation of biokinetic coefficients." *Environ. Res.*, 99, 243-252.
32. Anchatra, A., and Vala, J. (2006). "Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached Kraft mill effluent due to biomass adaptation." *J. Hazard. Mater*, 135, 256-263.
33. Sae'z, P.B., and Rittmann, B.E. (1993). "Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and an inhibitory cometabolite (4-chlorophenol)." *Biodegradation*, 4, 3-21.
34. Buitron, G., Gonzales, A., and Lopez-Marin, L.M. (1998). "Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria." *Water Sci. Technol.*, 37, 371-378.
35. Shuler, M.L., and Karagi, F. (1992). *Bioprocess Engineering*, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
36. Hill, G.A., Milne, B.J., and Nawrocki, P.A. (1996). "Cometabolic degradation of 4-chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 163-168.