

تحلیلی بر

فرآیند تجزیه بیهوایی

و

فعالیت میکروارگانیسمهای مؤثر در آن

بیژن بینا - مرضیه و حید دستجردی

تجزیه بیهوایی عبارت است از تجزیه بیولوژیکی مواد آلی در غیاب اکسیژن آزاد. در طی این

فرآیند مواد آلی در غیاب اکسیژن تخریب، و به متان و دی اکسید کربن و مقداری هم

گازهای دیگر تبدیل می شوند. بر اساس یک نظر کلی تخریب اساساً در دو فاز صورت

می گیرد که در فاز اول ماده آلی توسط باکتریهای اسید ساز به اسیدهایی با زنجیر کوتاه

تبدیل می شود و در فاز دوم اسیدهای حاصل توسط باکتریهای مولد متان، به متان و دی

اکسید کربن تبدیل می شوند. لازم به ذکر است که نظریه جدید در رابطه با تخریب مواد آلی

شامل چهار مرحله می باشد که در مورد آن بحث خواهد شد.

به دلیل حساسیت زیاد باکتریهای مولد متان نسبت به اکسیژن، در گذشته اشکالات مکرری

در عمل هضم بوجود آمده است. لیکن امروزه با توجه به افزایش آگاهی در رابطه با عوامل

جلوگیری کننده عمل هضم و نیز کنترل بهتر در رابطه با تخلیه فاضلابهای صنعتی و نیز

وجود تکنیکهای عملی و طرح هاضمهای تأیید شده روش تجزیه بیهوایی مورد توجه قرار گرفته است.

برای پیشگیری از این مشکل های عملی و طرح هاضمهای تجزیه بیهوایی میتوان ابتدا تا

هدف از تجزیه بیهوایی

همانطوری که ذکر شد در تصفیه بیهوایی مواد آلی

تخریب شده و دی اکسید کربن، متان و بیوماس توسط

باکتریها تولید می شود که با ایجاد شرایط صحیح

می توان فعالیت میکروارگانیسمهای درگیر را بهینه کرد.

۲- سنتز مواد سلولی جدید(رشد)

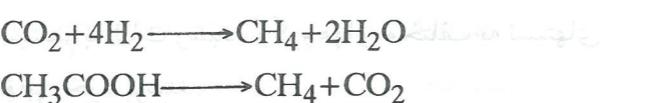
بنابراین تخریب مواد آلی نه تنها محصولات حاصل از تخریب شیمیایی را تولید می کند بلکه بیوماس هم ایجاد می کند که تولید آن در سیستمهای بیهوای بین (W/W) ۱۵٪-۱٪ کیلوگرم بپواماس بر کیلوگرم سوبسترا (ماده غذایی) متغیر است . تولید هر یک از محصولات مذکور می تواند تحت تأثیر درجه حرارت ، زمان ماند ، pH ، نوع و غلظت سوبسترا قرار بگیرد . مزایای تجزیه بیهوای عبارتند از :

تشکیل متان بعنوان گاز سوختی ، عدم نیاز به اکسیژن و دستگاههای هواده ، پایین بودن میزان لجن تولیدی ، ثابت مقدار زیادی از فاضلاب و احتیاج کم به مواد مغذی .

عیوب روش تجزیه بیهوای عبارتند از : کنترل عملی و مسایل نگهداری ، نیاز حرارتی ، کیفیت کفاب^(۱) .

ابتدا مواد آلی تحت عمل آنزیمهای هیدرولیتیک هیدرولیز شده یعنی چربیها به گلیسریول و اسیدهای متانی می باشند . باکتریهای انجام دهنده این واکنش را باکتریهای استات ساز^(۱) می گویند .

۴- تولید متان : آخرین مرحله در تصفیه بیهوای فاضلاب است و در حقیقت در آن دو نوع واکنش رخ می دهد که در طی آن دی اکسید کربن و هیدروژن به متان و آب و در دیگر استات به متان و دی اکسید کربن تبدیل می گردد .



فرآیند تجزیه بیهوای به صورت یک زنجیره غذایی میکروبی در نظر گرفته می شود که در آن محصولات دفع شده توسط هر دسته از باکتریها ، توسط گروه دیگر جذب می شود . در هضم بیهوای ، متان حاصل از استات دو برابر متان تولید شده از احیای دی اکسید کربن است . شرایط عمل مانند pH ، درجه حرارت ، زمان ماند ، غلظت سوبسترا وغیره ... در تجزیه بیهوای مورد اندازه گیری می باشند . چون هر تغییر شیمیایی یا بیولوژیکی ، واکنش جمعیتهای میکروبی را در پی خواهد داشت و ممکن است تغییراتی در سوخت و ساز باکتری در خلال تغییر آنزیمی یا رشد یا تخریب متابولیکی فعال بخشایی از جمعیت ایجاد کند .

میکروبیولوژی هضم بیهوای
برای تکمیل تبدیل مواد آلی به CO_2 و CH_4 فعالیت متابولیکی هماهنگ یک راکتور بیهوای لازم است . سه نوع باکتری در این فرآیند نقش دارند : ۱- باکتریهای هیدرولیز کننده ۲- باکتریهای تخمیر کننده ۳- باکتریهای تولید کننده متان . از این تعداد باکتری تعدادی بیهوای اختیاری و تعداد بیشتری بیهوای هستند .

۱- هیدرولیز : عبارت است از تبدیل مواد آلی به واحدهای کوچکتر . این کار عموماً توسط آنزیمهای بیرون سلولی صورت می گیرد چون مواد آلی دارای مولکولهای بزرگی می باشند . چون هر تغییر شیمیایی یا سلول نیستند . لازم به ذکر است که بعضی از باکتریها آنزیم تولید کرده (تعداد کمی از آنها) و بقیه مولکولهای شکسته شده را تجزیه می کنند .

۲- تخمیر : در این مرحله واحدهای کوچک ایجاد شده در مرحله قبل به اسیدهای چرب با زنجیر کوتاه(VFA) ، گازها ، دی اکسید کربن و هیدروژن و مقداری لاکتیک اسید و اتانول تبدیل می شوند . (دی اکسید کربن و هیدروژن در مرحله واسطه از تجزیه پیروات به وجود می آیند .)

۳- تولید استات : در این مرحله محصولات احیا شده حاصل از مرحله قبل تحت شرایط بیهوای به اسید

۱- Supernatant

توضیح کلی فرآیند
مطالعات قبلی در زمینه تجزیه بیهوای به شناخت سه مرحله : هیدرولیز پلیمرهای محلول ، تخمیر محصولات حاصل به اسیدهای آلی فرار و ایجاد متان منتج شده بود ولی اخیراً با مشاهده اینکه باکتریهای متانی قادر به استفاده از طیف محدودی از مواد می باشد نظریه چهار مرحله ای هضم بیهوای مطرح شده که در آن در حد فاصل تخمیر و ایجاد متان مرحله تشکیل استات و هیدروژن از اسیدهای آلی فرار (مرحله استوژنیز) وجود دارد و در نتیجه این فرآیند

هدف از مطالعه میکروبیولوژی هضم بیهوای
هدف از مطالعه میکروبی بیهوای ثبت کاربردهای عملی فرآیند برای تصفیه فاضلابهای صنعتی و دیگر فاضلابها می باشد . انجام آزمایشات در رابطه با گروههای خاص ، روابط پیچیده و فازهای زیادی که در یک سیستم بیهوای وجود دارد ، بینشی در رابطه با مکانیزمهای بیهوای بدست می دهد . لازم به ذکر است که جنبه های دیگری از تحقیق برای تفسیر کاملتر سیستمهای تجزیه بیهوای و مزایای آن هنگامیکه برای ثبت فاضلابهای سمی بکار برد هم شوند ، مورد نیاز می باشد .

میکرواورگانیزمهای بیهوای
یکی از دلایل اصلی برای اندک بودن اطلاعات در زمینه مراحل مختلف هضم بیهوای مشکل بودن کشت میکرواورگانیزمهای مطلقاً بیهوای می باشد . اکسیژن مولکولی در اثر واکنش با اجزاء سلولی مختلف به فرم خلیلی سمی H_2O_2 و آنیون سوپر اکساید تبدیل می شود . هنگامیکه H_2O_2 آنیونهای سوپر اکساید به طور خارج سلولی واکنش می دهد ، رادیکالهای هیدروکسیل از جمله اکسیدانهایی هستند که تشکیل می شوند . اکسیژن تها^(۲) یکی دیگر از آسیب زندگان به سلول است که از واکنش رادیکالهای هیدروکسیل و آنیونهای سوپر اکساید تشکیل می گردد . سلول باکتریایی در مقابل این پتانسیل کشنده معرفها بوسیله آنزیمهای Superoxide Dismutase (SOD) ، کاتالاز و پراکسیداز محافظت می شوند . زمان بقای تعدادی از میکرواورگانیزمهای بیهوای مورد بررسی قرار گرفته و معلوم شده محدوده این زمان از ۴۵ دقیقه برای میکرواورگانیزمهای بیهوای مورد بررسی قرار گرفته

و معلوم شده محدوده این زمان از ۴۵ دقیقه برای Peptostre Peptococcus Anaerobius ^{۱- Acetogen} ^{۲- Single}

سلولولیتیک، میکرواورگانیزمهای تخریب کننده سلولز نیز در فاز اول هضم وجود دارند که دو نوع از آنها که در هاضم حاوی خوک پیدا شده عبارتند از: Ruminicola و Rumenbacteria Bacteroides Ruminicola یک باکتری گرم منفی میله‌ای تکنیک غنی سازی محیط کشت به قصد روشن کردن جنبه‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی فعالیت میکرواورگانیزمها به کار می‌رود. از دیگر آنزیمهای هیدرولیزکننده آمیلازها هستند که حاصل فعالیت باکتریهای آمیلوولیتیک مثل: C.butyricum, Bacteroides SSP, Bacillus subtilis, Lacto Bacillus SSP, B.cereus, B.licheniformis, می‌باشند. این باکتریها نشاسته، گلیکورزن و پلی ساکاریدها را از طریق تقسیم هیدرولیتیکی حلقه‌های ۴ و ۶ و ۱۰- گلوکوساید تجزیه می‌کنند. تعداد باکتریهای آمیلوولیتیک برابر 4×10^4 عدد در میلی لیتر محیط کشت گزارش شده است. از دیگر آنزیمهای هیدرولیزکننده پکتین می‌باشد که توسط بعضی از گونه‌های باسیلوس و کلستریدیم ساخته می‌شود مثل دکسترآنازها که حاصل گونه‌های باسیلوس می‌باشند.

اثربازدارندگی محصول نهایی در خلال هیدرولیز عقیده بر این است که غلظت محصولات حاصل از هیدرولیز بر آنزیمهای هیدرولیتیک مربوطه اثر می‌گذارد. اگرچه مکانیزم این عمل هنوز شناخته نشده ولیکن معلوم شده که سنتز آمیلاز B.subtilis, B.licheniformis بوسیله گلوکز متوقف شده و اگر سنتز آن توسط B.stearotherophilus صورت بگیرد بوسیله فروکتوز متوقف می‌شود. همچنین سنتز آنزیمهای پروتئولیتیک به وسیله آمینو اسیدها تحت تأثیر قرار گرفته و متوقف می‌شود.

می‌کنند. در کشت مخلوط باکتریها پروتئازها روی بعضی از لیپازها اثر بازدارندگی دارند.

تعداد باکتریهای لیپولیتیک به میزان 10^5 عدد در میلی لیتر هاضم گزارش شده و تکنیکهای غنی سازی منجر به جداسازی میکرواورگانیزمهای لیپولیتیک شده است. همچنین تعداد 10^6 باکتری پروتئولیتیک شامل:

Cl. Butricum-Cl. Titasbudrense
Cl. Bifementas
Cl. Mangentii-Cl. Perfrigens-Peptococcus
Anaerobias- Staphylococcud Aurea

در میلی لیتر هاضم گزارش شده‌اند همچنین وجود باکتریهای دیگری وابسته به گونه‌های Carcina, Bacteriods, Propioni Bacterium گزارش شده است. آنزیمهای باکتریهای هیدرولیز کننده در محدوده $pH = 5-11$ پایدار بوده و دارای فعالیت بهینه متفاوتی می‌باشند. برای مثال آنزیمهای پروتئولیتیک استرپتوکوکسیها (پروتئازها) در $pH = 5-8$ فعال می‌باشند. در یک کار تحقیقی بیشتر باکتریهای پروتئولیتیک جدا شده علاوه بر فعالیت اصلی خودشان قادر به هیدرولیز کربوهیدراتها و ایجاد اسید بودند که بیانگر وجود تنوعی از باکتریهای هیدرولیز کننده در هاضم بیهوایی می‌باشد که قادرند بیش از یک ماده غذایی را بشکنند و در نتیجه باید یک خاصیت انتخابی از خود نشان دهند.

در مورد هیدرولیز پلی ساکاریدهای فیبری اگر چه روشهای تخریب کاملاً شناخته نشده‌اند ولی وجود یازده نوع باکتری مزوپیل سلولولیتیک^(۱) در یک هاضم حاوی فاضلاب خوک پیدا شده که همه آنها بجز یکی، گرم منفی و مطلقاً بیهوایی بوده‌اند و تعداد آنها برابر 4×10^5 عدد در میلی لیتر مایع هاضم گزارش شده است. همچنین باکتری سلولولیتیک^(۲) قادر به تبدیل سلولز به اتانول، اسید استیک و قندهای قابل تخمیر می‌باشد. در هاضم بیهوایی علاوه بر باکتریهای

بیهوازی اختیاری تعداد بیشتری از میکرواورگانیزمهای
بیهوازی برابر هستند که تعداد آنها $10-100$ برابر تعداد
اختیاریها گزارش شده و علت آن را به پایین بودن Eh
نسبت می دهند.

در هر صورت میکرواورگانیزمهای یک سیستم بیهوازی
تحت تأثیر منبع تغذیه راکتور می باشند و ترکیب جریان
وروودی، درجه جمعیتهای میکروبی که در طول سیستم
توسعه می بابد را مشخص می کند و بهر حال در
طی وقوع یک فرآیند بیهوازی گروههای هتروژنی او
میکرواورگانیزمها بطور متوالی ظاهر می شوند تا اینکه
سیستم به ثبات رسیده و گروههای مختلف به نسبتها
نهایی خود برسند.

باکتریهای هیدرولیز کننده

به علت اینکه پلیمرهای بزرگ و نامحلول نمی توانند با
داخل سلول باکتری منتقل شوند، عمل هیدرولیز د
خارج از سلول انجام می گیرد و در نتیجه هیدرولیز
لیپیدها، پروتئینها و کربوهیدراتها یک واکنش آنزیمی
بیرون سلولی است. همانطور که ذکر شد در تجزیه
بیهوازی بعضی از باکتریها آنزیم تولید می کنند و بقیه
باکتریها مولکولهای شکسته شده را تجزیه می نمایند
بنابراین کار آنزیمهای هیدرولیز کننده مثل
لیپازها، پروتئازها و سلولازها تخریب مولکولهای
پیچیده به واحدهای قابل استفاده برای سلولهای
میکروبی دیگر است.

در فاضلابهایی که پلیمرهای آلی جزء تشکیل دهنده
اصلی هستند باکتریهای هیدرولیز کننده و آنزیمهای آنها
در درجه اول اهمیت قرار دارند چون در اثر فعالیت آنها
مواد غذایی ساده‌تر برای مراحل بعدی تخریب تولید
می شود.

mekanizm hideroliz lipidha kamala shnaxte nshde wli
nazar mi rسد آنزیمهای لیپاز مسبب این فرآیند، عمل
Micrococc Clostrida حمله کرده و اسیدهای چرب و گلیسیرول تولید

۷۲ ساعت برای گونه کلستریدیوم پرفروژنس می باشد.

موازن غذایی در هاضمهای بیهوایی

فرآیند هضم نیازمند محیطی مناسب برای رشد میکرو اورگانیزمه است که این محیط باید حاوی منابع انرژی، کربن، نیتروژن و عناصر نادر و یونهای دیگری مثل سولفور برای بیوسترز باکتریایی باشد. معمولاً جریان فاصلاب دارای این مواد غذایی می باشد مگر اینکه فاصلاب دارای طبیعت ویژه خاصی باشد. در فاصلاب منبع اصلی نیتروژن، آمونیاک موجود در فاصلاب یا نیتروژن حاصل از هیدرولیز پروتئینها و آمیناسیون آمینواسیدها و یا نیتروژن حاصل از هیدرولیز ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی مثل اوره می باشد. کربن لازم از کربوهیدراتها، دی اکسید کربن و اسیدهای چرب فراهم می شود. و در رابطه با نسبت N/C در فاصلابهای حیوانی که مقادیر افزایش N زیاد است این نسبت را بالافزايش یک ماده فرعی کنترل می کنند (مثلاً افزایش نشاسته). به نظر میرسد در این سیستم نیاز به فسفر کم باشد بنابراین محتوای فسفات فاصلاب بعضی از کارخانجات ممکن است باعث محدودیت رشد باکتریها شوند. میزان نیاز به سولفور هم در یک رآکتور بیهوایی مانند نیاز به فسفر است. همچنین برای فرآیند هضم بیهوایی عناصری مثل آهن، نیکل، منیزیم، کلسیم، باریم و کبالت لازم است.

طبیعت باکتریهای هضم کننده

جریان فاصلاب معمولاً دارای منبع اولیه میکروبی برای فرآیند هضم می باشد که همانگونه که ذکر شد ایر میکرو اورگانیزمه ا اختیاری و اجباری می باشند. د صورتیکه در سیستم به دلایلی از روی بی توجهی اکسیژن ایجاد شود میکرو اورگانیزمه ای بیهوایی اختیاری آنرا برای مصرف و سبب تثبیت Eh می شوند (تنظیم Eh برای فعالیت متابوژنها لازم است برابر -۳۰۰mv). در فلور موجود در رآکتور در مقایسه با گرو

باکتریهای تخمیر کننده می‌توانند با توجه به این روش می‌توانند همانطور که گفته شد از مراحل مهم فرآیند هضم بیهواریست که در آن ترکیبات واسطه مهمی مثل استات، پروپیونات، بوتیرات، کاپروات، کاپریلات و والرات که از اسیدهای چرب بازنگیرکوتاه هستند، تشکیل می‌شود. در مرحله تخمیر، قندها به الكل تبدیل می‌شوند و از آمینواسیدها ابتدا پیروات، لاتکتات، پروپیونات، بوتیرات، فرمات و استات و نیز دی اکسید کربن و ئیدروژن حاصل می‌شود که استات مهمترین آنهاست. (پروپیونات توسط محدودی از میکرواورگانیزمها در شرایط بیهواری تجزیه می‌شود). شکسته شدن آمینواسیدها در شرایط بیهواری در اثر فعل و انفعالات بین باکتریهای متانوژن و باکتریهای تجزیه کننده آمینواسیدها صورت می‌گیرد و گزارش شده که بعنوان گیرنده الکترونیک کربون عمل می‌کند، شکسته می‌شوند (بطور اکسیداتیو). محصولات نهایی حاصل از آمینواسیدها، اسیدها و الكل می‌باشند که کاتابولیزم آنها توسط تعداد زیادی از میکرواورگانیزمها بیهواری اجباری و اختیاری صورت می‌گیرد و در شرایط بیهواری کلستریدیا، مایکوپلاسمای و استرپتوبکسی مسئول دامنه کردن آمینه کردن آمونیاک ساده‌تر می‌باشند که توسط آنها آرژنین به آمونیاک CO₂ و ATP، نیتین به استات و پروپیونات و بوتیرات درجه حرارت، pH، ترکیب و کیفیت مواد غذایی جریان ورودی روی محصول نهایی در این مرحله اثر دارد. گونه‌های کلستریدیوم و Butri Bacterium با تخمیر مواد غذایی ایجاد استون، بوتانول، بوتیریک اسید و ایزوپروپانول می‌کنند. Cl. butricum ایجاد بوتیرات و Cl. Aceto Butylicum ایجاد استون و بوتانول می‌کند. در یک هاضم بیهواری حاوی

فاضلاب حیوانی باکتریهای تخمیر کننده لاتکتات در حدود 3×10^6 عدد در میلی لیتر مایع هاضم گزارش شده که لاتکتات حاصل از فعالیت این باکتریها توسط احیاکنندگان سولفات مثلاً Desulfovibrio مصرف می‌شود. باکتریهای تولید کننده لاتکتات به دو دسته همو و هترو تقسیم می‌شوند که هر گروه بصورت زیر عمل می‌کنند:

$$\text{Glucose} \longrightarrow 2 \text{ Lactate}$$

$$\text{Glucose} \longrightarrow \text{Lactate} + \text{Ethanol} + \text{CO}_2$$

گروه همو شامل استرپتوبکسی و لاتکتو باسیل و گروه هترو شامل تعدادی از گونه‌های لاتکتو باسیل و Leuconostoc می‌باشند. لازم به ذکر است که توسط بعضی از گونه‌های باکتری بجا ای اتانول استات تولید می‌شود. همچنین آنزیم سیترات لیاز (حاصل از بعضی باکتریهای لاتکتیک اسید) سیترات را به استات و اگزالات تبدیل می‌کند که بعداً این اگزالات به دی اکسید کربن و پیروات تبدیل می‌شود.

$$3 \text{ Citrate} \longrightarrow \text{Lactate} + 3 \text{ Acetate} + 5\text{CO}_2 + \text{Diacetyl}$$

که دی استیل بوسیله آنزیم استوئین دهیدروژناز موجود در باکتری سازنده لاتکتات به استوئین احیا می‌شود.

باکتریهای b-اکسیداسیون استات که محصول اصلی تخمیر در هاضم بیهواریست می‌تواند از طریق اکسیداسیون اسیدهای چرب نیز بوجود آید. اکثر اسیدهای چرب موجود در فاضلابهای حیوانی تری گلیسیریدها هستند که تجزیه آنها با آزادسازی یک مولکول استات و ترکیبات دوکربنی در هر واکنش از طریق b-اکسیداسیون می‌باشد. سیکل b-اکسیداسیون تا تجزیه کامل اسیدهای چرب اشیاع ادامه می‌یابد که در این رابطه برای تبدیل اسیدهای چرب زوج کربن (بوتیرات، کاپروات، کاپریلات) به استات و ئیدروژن وجود یک میکرواورگانیزم بیهواری به همراه یک متانوژن مصرف کننده ئیدروژن و یا یک

متیل آمین و استات بعنوان الکترون دهنده منحصر بفرد برای رشد و تولید متان استفاده می‌کنند و عمل احياء دی اکسید کربن توسط متانوژنها در یک روش مرحله‌ای صورت می‌گیرد. اکثر باکتریهای متانوژن اوتوتروف هستند اما برای متابولیزم بعضی از آنها مواد غذایی آلی مثل استات لازم است در حدود ۶۰٪ کربن سلولی Ruminantium Methano bact می‌شود و عمل تبدیل اسید استیک به CO₂ و CH₄ بوسیله Methano sarcina barkeri و Methano spirillum hungatti از طریق تبدیل کربن متیل استات بوسیله اتمهای ئیدروژن خودش (استات)، به متان صورت می‌گیرد.

هنگامیکه CO بعنوان منبع منحصر به فرد انرژی مصرف می‌شود باکتریهای ترموفیل Thermoaotrophicum و Methano bact آنژیم CO دهیدروژنازی که حاوی کروموفور F420 بعنوان الکترون گیرنده است، از ۴ مول CO₂، ۳ مول CO₂ و ۱ مول CH₄ تولید می‌کند، بعداً F420 احیا شده در واکنش احیای CO₂ به متان بعنوان الکترون دهنده عمل می‌کند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

در یک جمع بندی کلی می‌توان گفت که با توجه به اینکه در تصفیه بیهواری:

- مقادیر بسیار زیادی از فاضلاب ثبیت می‌شود.
- منابع غذایی موردنیاز میکرواورگانیزمها سهیم در تجزیه بیهواری عموماً در خود فاضلاب وجود دارند.
- میزان لجن تولید شده کم است.
- گاز سوختی حاصل می‌شود.
- استفاده از این روش از نظر اقتصادی حتی در محله‌ای کمتر از ۳۰۰۰ نفر مقرون به صرفه خواهد بود.
- همچنین با توجه به اینکه امروزه استفاده از روش تجزیه بیهواری در تصفیه فاضلاب جنبه جهانی پیدا کرده

باکتریهای متانوژن متانوژنیز یعنی تبدیل H₂ و CO₂ به متان توسط باکتریهای متانوژن که حساسترین باکتریها به اکسیژن می‌باشند. جداسازی و کشت باکتریهای متانوژن به روشهایی که تولید شرایط کاملاً بیهواری می‌کند بستگی دارد. انرژی متانوژنها مستقیماً به سیستمی که متان را بعنوان تنها محصول مهم نهایی تولید می‌کند معطوف می‌شود. باکتریهای Methanosaeca از اتانول و

