

Water and Wastewater, Vol. 35, No. 2, pp: 40-52

# Biodegradation of Nicotine Using Aerobic Granules in Sequence Batch Reactor

Mohadeseh Shahriari<sup>1</sup>, Gholam Khayati<sup>2\*</sup> 

1. PhD. Student of Chemical Engineering, Dept. of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Assoc. Prof., Dept. of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Guilan, Rasht, Iran

(Corresponding Author) [khayati@guilan.ac.ir](mailto:khayati@guilan.ac.ir), [khayatiir@googlemail.com](mailto:khayatiir@googlemail.com)

(Received Feb. 27, 2024 Accepted May 27, 2024)

## To cite this article:

Shahriari, M. and Khayati, Gh., 2024. Biodegradation of nicotine using aerobic granules in sequence batch reactor. *Water and Wastewater*, 35(2), 40-52. <https://doi.org/10.22093/wwj.2023.445899.3403>.

## Abstract

Nicotine is a substance widely consumed globally as a drug. Due to its toxic nature and high solubility in water, it poses a significant threat to water quality. This study aimed to investigate the feasibility of forming aerobic granules from nicotine-acclimated activated sludge and examine the capability of these aerobic granules for nicotine degradation. The acclimation process led to the complete degradation of 500 mg/L of nicotine. Ultimately, the effluent concentrations of nicotine and COD were 3.4 mg/L and 53 mg/L, respectively, with the system achieving removal efficiencies of 99.14% for nicotine and 89.16% for COD. Additionally, a 6-hour cycle (1 minute filling, 10<sup>-1</sup> minute settling, 1 minute discharge, and the remaining time for aeration) resulted in the formation of granules with diameters ranging from 2-4 millimeters and a round shape, exhibiting high strength. After 60 days, the SVI<sub>30</sub>/SVI<sub>5</sub> ratio reached 1.0. The granular sludge showed higher extracellular polymeric substances and protein content compared to flocculent sludge, with a protein-to-polysaccharide ratio of 2.64. Furthermore, to assess the aerobic granules' ability to degrade and tolerate nicotine toxicity, the nicotine concentration was increased to twice the adapted concentration (1000 mg/L), resulting in a COD removal efficiency of 90.2% in the aerobic granular sequencing batch reactor.

**Keywords:** Acclimated Activated Sludge, Aerobic Granules, Nicotine Biodegradation, Tobacco Waste, Sequence Batch Reactor.



## 1. Introduction

Nicotine ( $C_{10}H_{14}N_2$ ), a toxic alkaloid, significantly impacts aquatic environments due to sources like agricultural runoff, industrial discharge, and cigarette waste (Wang et al., 2004). It originates from tobacco plants and has uses beyond cigarettes, including medical applications. Effective and affordable methods are needed to treat nicotine-laden wastewater (Zhong et al., 2010). Traditional nicotine removal techniques include advanced oxidation (Rodriguez et al., 2011), adsorption with different adsorbents (Rakić et al., 2010; Lazarevic et al., 2011; Suksri and Pongjanyakul, 2008; Singhal and Singh, 1976; Yang and Zhou, 2013), photocatalysis (De Franco et al., 2014) and nicotine extraction utilizing organic solvents (Maduro and Aznar, 2007).

However, biological processes are favored for balancing performance and cost (Meng et al., 2010). Studies have isolated nicotine-degrading microbes and enhanced these in activated sludge<sup>1</sup> (Zhang et al., 2019; Ruan et al., 2018; Gong et al., 2016; Wang et al., 2009; Wang et al., 2013). AS faces challenges with nicotine due to its toxicity and resistance to degradation. Microbial adaptation has shown promise in protecting against toxic shocks (Peng and Ling, 2017). Aerobic granular sludge<sup>2</sup> technology offers advantages over conventional AS, such as better settling, compact structure, and higher tolerance to toxins (Liu et al., 2021; Adav et al., 2008).

This study aimed to investigate the long-term acclimation of AS microorganisms to nicotine and the potential of cultivating AGS for treating nicotine-containing synthetic wastewater.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Seed sludge and materials

To maintain microbial diversity, primary AS was obtained from a municipal wastewater treatment plant (Anzali city, Iran). Nicotine with 99% purity was used (Sigma Aldrich, Germany). All chemicals used were of analytical grade.

### 2.2. Methods

The study began with 24-hour aeration of AS to eliminate organic compounds, using a Plexiglas reactor with a 1-liter volume. An aeration pump ensured proper mixing and maintained dissolved oxygen levels between 3-5 mg/L. Initially, mixed

liquid suspended solids<sup>3</sup> were 1500 mg/L, and the MLVSS/MLSS ratio was 0.85. The process cycle was 24 hours, with one hour for settling. Half the volume was replaced with a synthetic substrate containing nicotine after each cycle, maintaining a C:N:P ratio of 100:5:1 using  $NH_4Cl$  and  $KH_2PO_4$  as nitrogen and phosphorus sources, respectively, at room temperature ( $20 \pm 1^\circ C$ ). Nicotine concentration was gradually increased, and performance was monitored over 22 weeks.

### 2.3. Granulation

For granulation, a 1-liter graduated cylinder served as a sequential batch reactor<sup>4</sup>. It had a working volume of 800 ml, with effluent added at the top and discharged from a valve 9 cm above the bottom, maintaining a 50% volume exchange ratio<sup>5</sup>. The adapted AS from the previous step was used as biomass. To maintain the cycle time, settling time was reduced while aeration time increased. The reactor was fed synthetic wastewater based on glucose, with an organic loading rate of  $2 \text{ kg COD m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , and included  $CaCl_2$  and  $MgSO_4$ . The feeding cycle was 6 hours, with settling time gradually reduced from 10 to 1 minute.

To assess the effect of nicotine on aerobic granules<sup>6</sup>, the system was fed nicotine at 1000 mg/L, replacing glucose over one week to avoid shock. This concentration was twice that of the adaptation phase, testing AG's resistance and pollutant removal efficiency compared to acclimated AS.

### 2.4. Analytical analysis

Analytical methods included measuring COD, MLVSS, MLSS, SVI<sup>7</sup>, phosphorus, and ammonia nitrogen per APHA standards (American Public Health Association, 1926). Nicotine concentrations were analyzed using HPLC<sup>8</sup> with an Agilent C18 column and UV detector. EPS<sup>9</sup> was extracted using Chang's thermal method (Chang and Lee, 1998), with protein and polysaccharide concentrations measured by Lowry's and Dubois' methods, respectively (Lowry et al., 1951; Dubois et al., 1956).

<sup>3</sup> Mixed Liquid Suspended Solids (MLSS)

<sup>4</sup> Sequential Batch Reactor (SBR)

<sup>5</sup> Volume Exchange Ratio (VER)

<sup>6</sup> Aerobic Granules (AG)

<sup>7</sup> Sludge Volume Index (SVI)

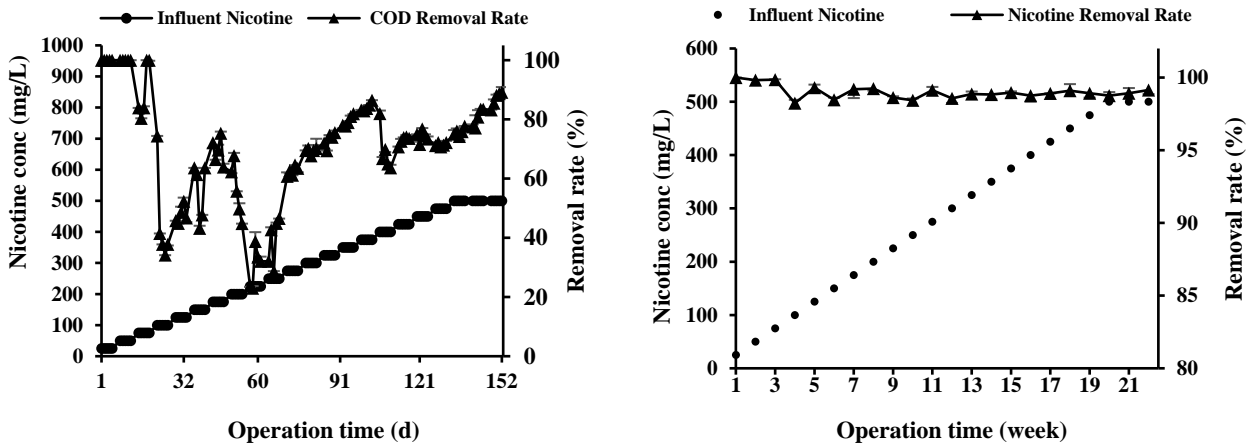
<sup>8</sup> High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

<sup>9</sup> Extracellular Polymeric Substances (EPS)

<sup>1</sup> Activated Sludge (AS)

<sup>2</sup> Aerobic Granular Sludge (AGS)





**Fig 1.** Removal rates changes (a. COD removal rate and b. Nicotine removal rate) at different influent nicotine concentrations

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Acclimation process of AS

Nicotine concentration in the feed was increased weekly from 25 to 500 mg/L over 20 weeks, then maintained at 500 mg/L for two weeks. As it is shown in Fig. 1 (a and b), initially, MLSS and MLVSS decreased due to nicotine toxicity and low organic content. At 175 mg/L nicotine, MLSS hit its lowest (600 mg/L), stabilizing until 225 mg/L, with MLVSS/MLSS ratio improving from 0.5 to 0.61. Feeding 500 mg/L nicotine for 21 days led to MLSS growth and MLVSS/MLSS ratio recovery to 0.89. Pollutant removal efficiency varied initially; COD removal decreased at 125 mg/L nicotine while nicotine removal remained stable. At concentrations above 250 mg/L, pollutant removal improved, indicating microbial adaptation. After three weeks at 500 mg/L nicotine, nicotine and COD removal efficiencies reached 99.14% and 89.16%, respectively, demonstrating successful microbial acclimation to nicotine.

#### 3.2. Granulation

Granule in the granulation process, a 6-hour cycle was used, gradually reducing the settling time from 10 to 1 minute over three phases. Initially, a 10-minute settling time was applied for one week, then reduced to 5 minutes in the second phase, and finally to 1 minute in the third phase. As the settling time decreased, the sludge became more compact and formed immature granules, which matured into larger, round shapes within a week. In the second phase, dark brown granules (4-2 mm) formed, and most sludge transformed into small yellow granules. By the third phase, with a 1-minute settling time, suspended particles were washed away, leading to uniform, compact, round, yellow granules.

Granule formation increased particle density, speeding up settling. A reliable method to detect sludge granulation is comparing  $SVI_5$  and  $SVI_{30}$  values. De Kreuk et al. suggested that a  $SVI_{30}/SVI_5$  ratio of 1.0 indicates complete granulation (De Kreuk et al., 2007). After 60 days, no flocculent sludge was observed, and the ratio was 1.0, confirming complete granulation.

Protein and polysaccharide are the main components of EPS, with total EPS content increasing during granulation (shown in Table 1). The protein content in granular sludge grew more than polysaccharides, due to its hydrophobic nature, leading to a protein-to-polysaccharide ratio (PN/PS) of 2.64. This ratio enhances system strength and granulation.

**Table 1.** EPS, protein, polysaccharide contents, and PN/PS ratio in activated sludge and aerobic granules

System	EPS (mg/g VSS sample)			
	EPS <sub>tot</sub>	PS	PN	PN/PS
AS	21.97±0.95	9.65±0.31	12.32±0.23	1.28
AG	61±1.23	16.75±0.54	44.24±0.82	2.64

To remove nicotine from wastewater, a 24-hour HRT<sup>1</sup> was used. Initially, a lower nicotine concentration with glucose was introduced to prevent shock loading, gradually removing glucose. Despite a decrease in granule size initially due to reduced organic loading rate and shock from changing the carbon source, the system remained stable, without significant changes in SVI. Nicotine concentration was increased up to 1000 mg/L to test granule strength and shock tolerance. Although COD removal

<sup>1</sup> Hydraulic Retention Time (HRT)



efficiency initially decreased, it reached 90.2% after two weeks, demonstrating the aerobic granules' potential in removing toxic substances and their resistance to shock.

#### 4. Conclusion

During AS adaptation, nicotine was the sole carbon and energy source, achieving 99.14%

nicotine removal and 89.16% COD removal. The adapted sludge formed 2-4 mm brown aerobic granules within 60 days, using a 6-hour feeding cycle. Granulation improved settling, with  $SVI_{30}/SVI_5$  reaching 1.0. To test nicotine tolerance, the nicotine concentration was doubled, and the granules effectively biodegraded it, achieving 90.2% COD removal efficiency.



آب و فاضلاب، دوره ۳۵، شماره ۲، صفحه: ۴۰-۵۲

## تصفیه زیستی نیکوتین با استفاده از گرانول‌های هوازی در رآکتور ناپیوسته متوالی

محدثه شهریاری<sup>۱</sup>، غلام خیاطی<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی دکترای مهندسی شیمی، گروه مهندسی شیمی،  
دانشکده فنی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران  
۲- دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی،  
دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(نویسنده مسئول) [khavati@guilan.ac.ir](mailto:khavati@guilan.ac.ir)، [khavatiir@googlemail.com](mailto:khavatiir@googlemail.com)

(دریافت ۱۴۰۲/۱۲/۸ پذیرش ۱۴۰۳/۳/۷)

برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام فرمایید:

شهریاری، م.، خیاطی، غ.، ۱۴۰۳، تصفیه زیستی نیکوتین با استفاده از گرانول‌های هوازی در رآکتور ناپیوسته متوالی.  
آب و فاضلاب، ۳۵(۲)، ۴۰-۵۲. <https://doi.org/10.22093/wwj.2024.445899.3403>

### چکیده

نیکوتین جزء مواد دارویی مخدر است که به‌طور گسترده‌ای در جهان مصرف می‌شود و به‌دلیل ماهیت سمی و حلالیت بالای آن در آب، تهدیدی قابل توجه برای کیفیت آب است. در این پژوهش، به بررسی امکان تشکیل گرانول‌های هوازی از لجن فعال سازگار با نیکوتین و بررسی قابلیت گرانول‌های هوازی تشکیل شده برای تجزیه نیکوتین پرداخته شد. عملیات سازگاری منجر به تجزیه کامل ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیکوتین شد. در نهایت غلظت نیکوتین و COD خروجی در پساب به ترتیب ۴/۳ و ۵۳ میلی‌گرم در لیتر بود و سیستم به کارایی حذف نیکوتین و COD به ترتیب ۹۹/۱۴ و ۸۹/۱۶ درصد دست یافت. همچنین در یک چرخه ۶ ساعته (۱ دقیقه پر شدن، ۱ تا ۱۰ دقیقه ته‌نشینی، ۱ دقیقه تخلیه و زمان باقیمانده هوادهی)، گرانول‌هایی با قطر ۲ تا ۴ میلی‌متر و شکل بیرونی گرد تشکیل شد که استحکام زیادی داشتند. با گذشت ۶۰ روز عملیات نسبت  $SVI_{30}/SVI_5$  به ۱/۰ رسید. میزان محصولات پلیمری خارج سلولی و به خصوص محتوای پروتئین در لجن گرانوله بیشتر از لجن لخته بود و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید به ۲/۶۴ رسید. همچنین برای بررسی توانایی تجزیه و تحمل سمیت نیکوتین توسط گرانول‌های هوازی، غلظت نیکوتین تا ۲ برابر غلظت سازگار شده (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) افزایش یافت و بیورآکتور ناپیوسته گرانوله هوازی به بازدهی حذف COD ۹۰/۲ درصد رسید.

واژه‌های کلیدی: لجن فعال سازگار شده، گرانول هوازی، حذف زیستی نیکوتین، ضایعات تنباکو، رآکتور ناپیوسته متوالی



## ۱- مقدمه

در میان آلاینده‌های آلی، نیکوتین ( $C_{10}H_{14}N_2$ )، به‌عنوان یک ترکیب آکالوئیدی به‌دلیل ماهیت سمی و حضور در محیط‌های آبی، اهمیت ویژه‌ای دارد. نیکوتین از طریق منابع مختلف از جمله رواناب‌های کشاورزی، تخلیه صنعتی و دفع نادرست ته‌سیگار وارد بدنه آب می‌شود (Wang et al., 2004). از جمله منابع اصلی نیکوتین گیاه توتون یا برگ‌های خشک شده آن است که اصطلاحاً تنباکو نیز گفته می‌شود. علاوه بر تولید سیگار، توتون و تنباکو دارای کاربردهای زیادی در زمینه پزشکی هستند. بنابراین نیاز به روش موثر و اقتصادی برای تصفیه فاضلاب توتون و تنباکو و کاهش غلظت نیکوتین احساس می‌شود (Zhong et al., 2010).

برای حذف نیکوتین تاکنون از تکنولوژی‌های مختلفی استفاده شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به اکسیداسیون پیشرفته (Rodriguez et al., 2011)، جذب با جاذب‌های مختلف (Lazarevic et al., 2011, Rakić et al., 2010, Suksri and Pongjanyakul, 2008, Singhal and Singh, 1976, Yang and Zhou, 2013) همچنین فوتوکاتالیست (De Franco et al., 2014) اشاره کرد. استخراج نیکوتین با استفاده از حلال‌های آلی نیز بررسی شده است (Maduro and Aznar, 2007). در مقابل این روش‌ها، فرایندهای زیستی به دلیل توازن داشتن میان عملکرد و هزینه‌های عملیاتی، برای حذف مواد آلی محلول مورد توجه قرار دارند (Meng et al., 2010). جامعه میکروبی با تغییر محتوای نیکوتین در محصولات نهایی، نقش مهمی در حذف نیکوتین دارند. چندین پژوهش بر روی جداسازی و شناسایی سویه‌های میکروبی خاص و تجزیه‌کننده نیکوتین انجام شده است (Zhang et al., 2019, Ruan et al., 2018, Gong et al., 2016).

علاوه بر این پژوهش‌ها، تقویت زیستی نوع خاصی از میکروب تجزیه‌کننده نیکوتین در لجن فعال نیز بررسی شده است (Wang et al., 2009, Wang et al., 2013). لجن فعال مجموعه‌ای از اجتماع میکروبی است که پتانسیل بالایی برای حذف زیستی آلاینده‌های مختلف دارد. با این حال نیکوتین به راحتی قابل تجزیه نیست و برای اکثر گروه‌های میکروارگانیسم‌ها بسیار سمی است. پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که فرایند سازگاری میکروارگانیسم‌ها مکانیسمی مؤثر برای محافظت از میکروارگانیسم‌ها در برابر شوک مواد سمی است. سازگاری با

ترکیبات آلی به جامعه میکروبی کمک می‌کند تا علاوه بر تحمل شرایط محیطی نامطلوب، زمان تجزیه زیستی را کاهش دهد (Peng and Ling, 2017). از سوی دیگر، در مقایسه با لجن فعال معمولی، لجن گرانوله هوازی به‌عنوان نوعی فناوری نگهداری زیست توده دارای امتیازاتی از جمله قابلیت ته‌نشینی بالا، ساختار میکروبی فشرده و توانایی بیشتر برای تحمل بارهای سمی و شوک است (Liu et al., 2021, Adav et al., 2008).

بنابراین هدف اولیه این پژوهش، بررسی سازگاری بلندمدت میکروارگانیسم‌های موجود در لجن فعال با نیکوتین به‌عنوان یک آلاینده سمی بود. همچنین، اهداف نهایی تعیین امکان کشت گرانول‌های هوازی با استفاده از لجن فعال سازگار و بررسی پتانسیل گرانول‌های هوازی برای تصفیه فاضلاب سنتتیک حاوی نیکوتین بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- بذر لجن و مواد

لجن فعال خام از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری (شهر انزلی، ایران) برای اطمینان از حضور جمعیت میکروبی متنوع تهیه شد. نیکوتین با خلوص ۹۹ درصد استفاده شد (سیگما آلد ریچ، آلمان). سایر مواد مورد استفاده نیز دارای خلوص آزمایشگاهی بودند.

## ۲-۲- روش کار

در ابتدا لجن فعال به مدت ۲۴ ساعت هوادهی شد تا ترکیبات آلی احتمالی از بین برود. فرایند سازگاری با استفاده از یک رآکتور از جنس پلکسی گلس و با حجم کاری ۱ لیتر انجام شد (نمای شماتیک سامانه آزمایشگاهی در شکل ۱). به‌منظور دستیابی به اختلاط مناسب همراه با هوادهی، از یک پمپ هوادهی با ظرفیت ۳۰۰ لیتر بر ساعت استفاده شد و غلظت اکسیژن محلول<sup>۱</sup> بین ۳ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر نگه داشته شد. هوا از طریق سنگ‌های هوایی که در پایین بیورآکتور تعبیه شده بودند وارد بیورآکتور شد. جامدات معلق مایع مخلوط<sup>۲</sup> در شروع فرایند ۱/۵ گرم بر لیتر و نسبت MLSS

<sup>1</sup> Dissolved Oxygen (DO)<sup>2</sup> Mixed Liquor Suspended Solids (MLSS)

در این مرحله از پژوهش استوانه مدرج به حجم ۱ لیتر (ارتفاع ۴۲ سانتی‌متر و قطر ۷ سانتی‌متر، نسبت ارتفاع به قطر (H/D) برابر با ۶، با هدف گرانولاسیون لجن فعال و به‌عنوان سامانه ناپیوسته متوالی<sup>۴</sup> استفاده شد. حجم کاری بیورآکتور ۸۰۰ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. پساب از بالای رآکتور اضافه و با نسبت تبادل حجمی ۵۰ درصد تخلیه شد. از لجن فعال سازگار شده در مرحله قبل به‌عنوان زیست توده استفاده شد. زمان ته‌نشینی به تدریج کاهش و در نتیجه زمان هوادهی برای حفظ زمان چرخه افزایش یافت. رآکتور با پساب سنتزی مبتنی بر گلوکز با نرخ بارگذاری آلی  $40 \text{ mg/L}$   $\text{CaCl}_2$  و  $2 \text{ kgCOD/m}^3 \text{ d}$  با غلظت معادل  $40 \text{ mg/L}$  از  $\text{Ca}^{2+}$  و  $\text{Mg}^{2+}$  خوراک‌دهی شد. چرخه خوراک‌دهی ۶ ساعته (۱ دقیقه پر شدن، ۱ تا ۱۰ دقیقه ته‌نشینی، ۱ دقیقه تخلیه و زمان باقیمانده هوادهی) در نظر گرفته شد که در آن به تدریج زمان ته‌نشینی از ۱۰ به ۱ دقیقه کاهش یافت. تمام نمونه‌گیری‌ها در انتهای فاز هوادهی انجام شد.

#### ۲-۴- بررسی تأثیر غلظت نیکوتین بر گرانول‌های هوازی

برای بررسی تأثیر غلظت نیکوتین بر گرانول‌های هوازی، یک دوره خوراک‌دهی با نیکوتین بر روی گرانول‌ها انجام شد. زمان ماند هیدرولیکی ۲۴ ساعت انتخاب شد. برای جلوگیری از شوک حاصل از تغییر منبع غذایی و همچنین تغییر در زمان چرخه خوراک‌دهی، در طی ۱ هفته به تدریج گلوکز از خوراک حذف و نیکوتین با غلظت  $1000 \text{ mg/L}$  به‌عنوان تنها منبع کربن به سیستم داده شد. این غلظت از نیکوتین معادل با ۲ برابر غلظت آداپته شده در مرحله سازگاری بود که برای سنجش مقاومت گرانول‌های هوازی در برابر شوک و مقایسه میزان حذف آلاینده توسط گرانول هوازی و لجن فعال سازگار شده، انتخاب شد.

#### ۲-۵- روش‌های آنالیز

اکسیژن‌خواهی شیمیایی<sup>۵</sup>، MLVSS، MLSS، شاخص حجمی لجن<sup>۶</sup>، فسفر و نیتروژن آمونیاکی پساب به‌طور مکرر طبق روش استاندارد اندازه‌گیری شدند (American Public Health Association, 1926). برای اندازه‌گیری COD روش کالریمتری

به جامدات معلق فرار مایع مخلوط<sup>۱</sup> (MLVSS/MLSS) برابر با

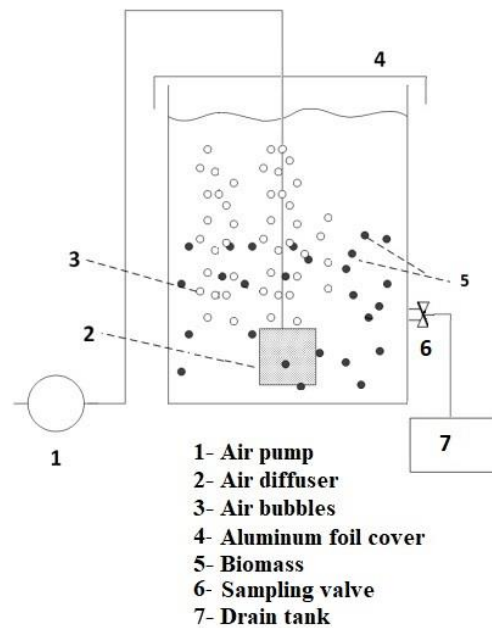


Fig. 1. Schematic diagram of experimental set-up

شکل ۱- طرح شماتیک سامانه آزمایشگاهی

در نظر گرفته شد. زمان ماند هیدرولیکی<sup>۲</sup> ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد که پس از طی این مدت، ۱ ساعت به محتویات بیورآکتور فرصت ته‌نشینی داده و نسبت تبادل حجمی<sup>۳</sup> ۵۰ درصد از مایع رویی تخلیه و با یک مخلوط سوبسترای سنتزی تازه حاوی غلظت‌های مختلف نیکوتین جایگزین شد. ترکیب اصلی محیط حاوی نسبت C:N:P 100:5:1 در نظر گرفته شد منابع نیتروژن و فسفر استفاده شدند. عملیات فوق در دمای اتاق ( $20 \pm C1^\circ$ ) انجام شد. در طول فرایند، غلظت نیکوتین به‌عنوان منبع کربن به تدریج افزایش یافت. تمام نمونه‌گیری‌ها در انتهای فاز هوادهی سیکل ترتیبی انجام شد. عملکرد حذف در این سیستم به مدت ۲۲ هفته برای حذف آلاینده و پس از رسیدن به بازده حذف موردنظر، حذف نیتروژن و فسفر بررسی شد.

#### ۲-۳- تشکیل گرانول

<sup>4</sup> Sequence Batch Reactor (SBR)

<sup>5</sup> Chemical Oxygen Demand (COD)

<sup>6</sup> Sludge Volume Index (SVI)

<sup>1</sup> Mixed Liquor Volatile Suspended Solids (MLVSS)

<sup>2</sup> Hydraulic Retention Time (HRT)

<sup>3</sup> Volume Exchange Ratio (VER)



طی ۲۰ هفته افزایش یافت و تا ۲ هفته غلظت ۵۰۰ mg/L تکرار شد. تغییرات در مقدار MLSS و MLVSS با غلظت‌های مختلف نیکوتین در شکل ۲ نشان داده شده است. در ابتدا، کاهش قابل توجهی در هر دو پارامتر به دلیل سمیت و کمبود منبع آلی در خوراک ورودی و نسبت کم خوراک به میکروارگانیسم مشاهده شد. همچنین میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تجزیه ماده سمی نیکوتین را نداشتند از بین رفته و شسته شدند. در غلظت ۱۷۵ mg/L نیکوتین، MLSS به کمترین میزان خود (۶۰۰ mg/L) رسید و پس از آن به مدت ۲ هفته و تا غلظت ۲۲۵ mg/L نیکوتین تغییر قابل ملاحظه‌ای در غلظت زیست‌توده مشاهده نشد. این در حالی است که محتوای فرار زیست‌توده پس از ریزش شدید در غلظت ۱۰۰ mg/L نیکوتین، روند صعودی پیدا کرده و نسبت MLVSS/MLSS از ۰/۵ به ۰/۶۱ افزایش یافت. می‌توان نتیجه گرفت جمعیت میکروبی حاضر در حال انطباق‌پذیری با ماده آلی موجود هستند. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است با افزایش غلظت نیکوتین، افزایش تدریجی MLSS نیز در هفته ۱۰ام به بعد قابل مشاهده است. همچنین سیستم توانست نسبت MLVSS/MLSS که در ابتدای فرایند کاهش شدید پیدا کرده بود را بازیابی کرده و به ۰/۸۹ برساند.

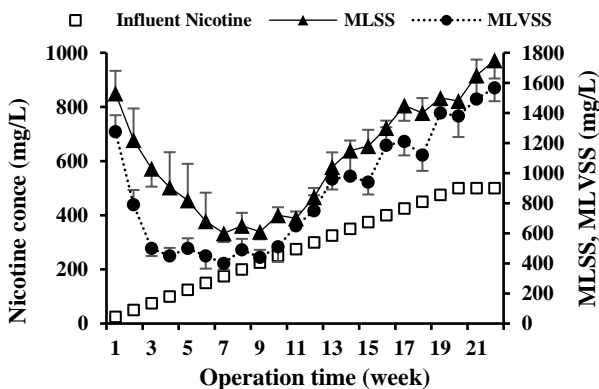


Fig. 2. Variations in MLSS and MLVSS at different influent Nicotine concentration

شکل ۲- تغییرات میزان MLSS و MLVSS با تغییر میزان غلظت نیکوتین در خوراک

در شکل ۳-a و ۳-b، تغییرات میزان حذف نیکوتین و COD در طی فرایند سازگاری نشان داده شده است. در هفته‌های آغازین

رفالکس بسته بر اساس روش استاندارد APHA بود. برای اندازه‌گیری COD ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر از نمونه، ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول هاضم و ۳/۵ میلی‌لیتر از شناساگر اسیدی به ویال‌های مخصوص ۱۰ میلی‌لیتری COD اضافه شد. حرارت‌دهی برای هضم شیمیایی و اندازه‌گیری شدت تغییر رنگ به ترتیب در دستگاه ترمورآکتور (Germany 125, AL Aqualytic) و دستگاه فوتومتر (Germany 100, AL Aqualytic) انجام شد. به منظور اندازه‌گیری MLSS از رآکتور در حال کار نمونه‌گیری شد. سپس با عبور نمونه از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ از پیش وزن شده و خشک کردن آن در آون با دمای ۱۰۳ تا ۱۰۵ درجه سلسیوس و وزن کردن مجدد آن MLSS محاسبه شد. به همین ترتیب با قرار دادن کاغذ صافی حاصل از MLSS در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس، MLVSS اندازه‌گیری شد. غلظت نیکوتین در تمام نمونه‌ها توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۱</sup> از طریق سری (Perkin Elmer Flexar (USA)، (۵ میکرومتر در روز، ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر L.D.) آنالیز شد. دستگاه دارای ستون Agilent C18 و یک دکتور UV که در طول موج ۲۵۴ نانومتر کار می‌کند، بود. غلظت نیکوتین با استفاده از متانول ۱۰۰ درصد به عنوان فاز متحرک در سرعت جریان ۱/۰ میلی‌لیتر در دقیقه با حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تجزیه و تحلیل شد.

همچنین از روش حرارتی ارائه شده توسط چانگ و همکاران برای استخراج محصولات پلیمری خارج سلولی<sup>۲</sup> استفاده شد (Chang and Lee, 1998). غلظت پروتئین<sup>۳</sup> طبق روش لوری و همکاران (Lowry et al., 1951) و غلظت پلی ساکارید<sup>۴</sup> بر اساس روش فتومتریک پیشنهاد شده توسط دوبویس و همکاران اندازه‌گیری شد (Dubois et al., 1956).

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- فرایند سازگاری لجن فعال به نیکوتین

تغییرات غلظت نیکوتین در خوراک به‌طور هفتگی اعمال شد. به این ترتیب غلظت نیکوتین به‌طور تدریجی از ۲۵ به ۵۰۰ mg/L

<sup>1</sup> High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

<sup>2</sup> Extracellular Polymeric Substances (EPS)

<sup>3</sup> Protein (PN)

<sup>4</sup> Polysaccharide (PS)



خوبی انجام شده، با این حال با رسیدن به غلظت ۱۲۵ mg/L

به دلیل پایین بودن غلظت نیکوتین و COD میزان حذف آلاینده به

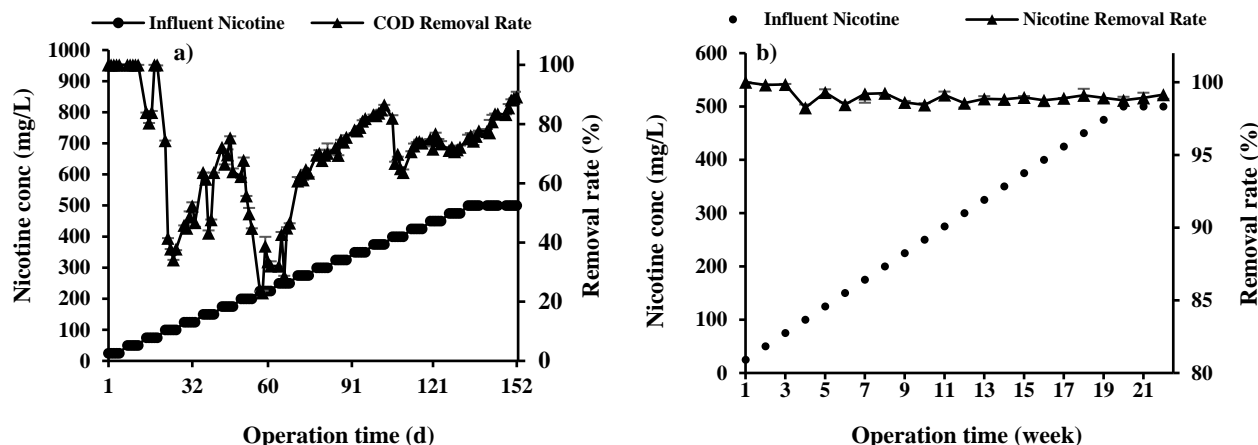


Fig. 3. a) COD removal rate and b) Nicotine removal rate at different influent Nicotine concentrations

شکل ۳- a) نرخ حذف COD و b) نرخ حذف نیکوتین با تغییر میزان غلظت نیکوتین ورودی

جدول ۱- عملکرد سامانه ناپیوسته متوالی در فرایند سازگاری

Table 1. The performance of SBR in the acclimation process

Parameter	COD (mg/L)	Nicotine (mg/L)	N-NH <sub>3</sub> (mg/L)	P (mg/L)
Influent	490	500	24.45	4.90
Effluent	53±12	4.30±0.9	4.39±0.64	0.93±0.23
Removal rate (%)	89.16±1.84	99.14 ± 0.65	82.04± 0.87	81.02± 0.45

حذف آلاینده آلی، فسفر و نیترژن آمونیاکی در جدول ۱ ارائه شده است.

### ۳-۲- فرایند گرانولاسیون

در فرایند گرانولاسیون، یک چرخه ۶ ساعته اعمال شد که در آن زمان ته نشینی به تدریج از ۱۰ به ۱ دقیقه کاهش یافت. سه فاز برای زمان ته نشینی در نظر گرفته شد. در ابتدا به مدت ۱ هفته به لجن ۱۰ دقیقه زمان برای ته نشینی داده شد. با منسجم تر شدن لجن و با شروع فاز دوم این زمان به مدت ۱ هفته به ۵ دقیقه کاهش یافت و در نهایت، در فاز سوم تا انتهای عملیات زمان ته نشینی ۱ دقیقه در نظر گرفته شد. با گذشت ۱ هفته و تغییر زمان ته نشینی ساختار لجن کمی فشرده شد و پس از آن به تدریج ساختار گرانول‌های نابالغ شکل گرفت. ۱ هفته طول کشید تا گرانول‌های بزرگتر با شکل‌های گرد ظاهر شوند. در طول فاز دوم گرانول‌های بزرگ (۲ تا ۴ میلی‌متر) با رنگ قهوه‌ای تیره تشکیل شد و تقریباً تمام

نیکوتین کارایی حذف COD کاهش چشمگیری یافت، در حالی که حذف نیکوتین تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرد. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که نیکوتین با تجزیه زیستی به مواد واسطه‌ای تبدیل می‌شود که COD موجود حاصل از این مواد واسطه است. همان طور که در شکل ۳-ا و ۳-ب قابل مشاهده است، نوسان در حذف آلاینده تا غلظت ۲۵۰ mg/L نیکوتین وجود داشت و در غلظت‌های بیشتر روند صعودی پیدا کرد که نشان‌دهنده سازگاری سیستم به نیکوتین به عنوان منبع غذایی است. در پایان فرایند سازگاری و پس از خوراک‌دهی سیستم با غلظت ۵۰۰ mg/L میلی‌گرم بر نیکوتین به مدت ۳ هفته، با مشاهده روند روبه‌رشد MLSS و نسبت MLVSS/MLSS ۰/۸۹ و در نهایت دستیابی به کارایی حذف نیکوتین و COD به ترتیب ۹۹/۱۴ و ۸۹/۱۶ درصد لجن فعال سازگار شده در نظر گرفته شد. عملکرد لجن فعال سازگار شده در



دانه‌های کوچک گرانول بزرگتر و بالغ‌تر شدند. در نهایت پس از

لجن‌ها پس از فاز دوم به گرانول‌های زرد کوچک تبدیل شدند. با کاهش زمان ته‌نشینی به ۱ دقیقه، ذرات معلق لجن شسته شده و

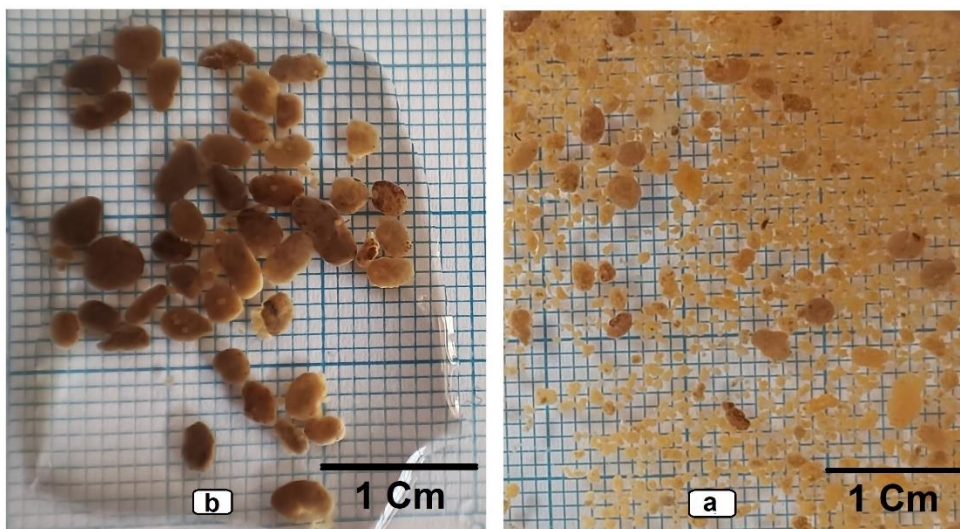


Fig. 4. Progress of aerobic granulation a) day 14, b) day 60

شکل ۴ - فرایند تشکیل گرانول هوازی (a) روز ۱۴ و (b) روز ۶۰

پروتئین و پلی ساکارید از اجزای غالب تشکیل‌دهنده مواد پلیمری

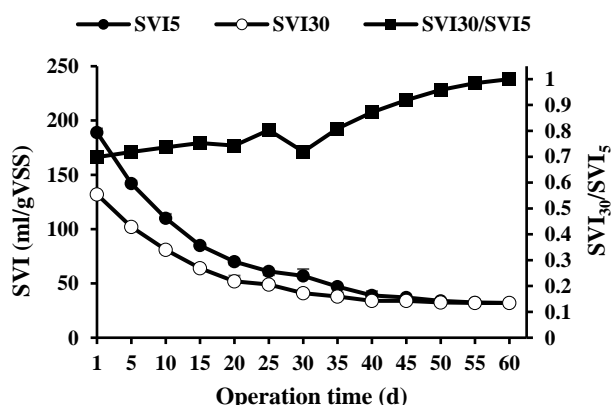


Fig. 5. SVI<sub>30</sub> and SVI<sub>5</sub> profiles in the aerobic granular bioreactor<sup>1</sup>

شکل ۵ - پروفایل SVI<sub>5</sub> و SVI<sub>30</sub> در بیورآکتور گرانوله هوازی

خارج سلولی هستند. در این پژوهش مواد پلیمری خارج سلولی کل به عنوان مجموع این دو مولفه برآورد شد. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است با گرانوله شدن لجن محتوای مواد پلیمری خارج سلولی کل افزایش یافت. از طرفی مشاهده شد که محتوای پروتئین در لجن گرانوله نسبت به پلی ساکارید رشد بیشتری داشته

پایان فاز سوم، گرانول‌ها اندازه یکنواخت، متراکم با شکل گرد و رنگ زرد داشتند. در شکل ۴ می‌توان روند رشد و تغییرات ظاهری لجن و تشکیل گرانول را مشاهده کرد.

SVI<sub>30</sub> و SVI<sub>5</sub> از مهمترین شاخصه‌های تشکیل گرانول در سیستم لجن فعال است (De Kreuk et al., 2007). با تشکیل گرانول چگالی ذرات بیشتر می‌شود و با افزایش چگالی عمل ته‌نشینی با سرعت بیشتری انجام می‌شود. از مطمئن‌ترین راه‌های پیشنهاد شده برای تشخیص گرانوله شدن لجن می‌توان به مقایسه بین SVI<sub>30</sub> و SVI<sub>5</sub> اشاره کرد.

دی کروک و همکاران گزارش کردند که برای در نظر گرفتن گرانوله شدن لجن در یک سیستم نسبت SVI<sub>30</sub>/SVI<sub>5</sub> باید برابر ۱/۰ باشد (De Kreuk et al., 2007). همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، پس از ۶۰ روز هیچ لجن لخته‌ای در محیط دیده نشد و نسبت SVI<sub>30</sub>/SVI<sub>5</sub> کاملاً برابر با ۱/۰ شد که می‌تواند به عنوان گرانوله شدن کامل لجن در نظر گرفته شود. کاهش شدید SVI در طول فرایند گرانوله شدن به دلیل سرعت ته‌نشینی سریع‌تر گرانول‌های هوازی در مقایسه با لخته‌های لجن فعال است.

### ۳-۳- غلظت پلیمرهای خارج سلولی

<sup>1</sup> Aerobic Granular Bioreactor (AGBE)



است. پروتئین به دلیل ماهیت آبگریزی به طور قابل توجهی در افزایش تجمع لجن در مقایسه با پلی ساکارید که عمدتاً خاصیت

جدول ۲- میزان EPS، محتوای پروتئین و پلی ساکارید آن و نسبت پروتئین به پلی ساکارید در لجن فعال و گرانول هوازی

Table 2. EPS, protein, polysaccharide contents and PN/PS ratio in activated sludge (AS) and aerobic granules

System	EPS (mg/g VSS sample)			
	EPS <sub>tot</sub>	PS	PN	PN/PS
AS	21.97±0.95	9.65±0.31	12.32±0.23	1.28
AG	61±1.23	16.75±0.54	44.24±0.82	2.64

جدول ۳- عملکرد سیستم گرانول هوازی در حذف نیکوتین

Table 3. The performance of AGRB

Parameter	Influent	Effluent	Removal rate (%)
COD (mg/L)	1000	98±6	90.20±1.56
N-NH <sub>3</sub> (mg/L)	50.04	3.41±0.83	93.18±0.76
P (mg/L)	10.01	1.79±0.21	82.12±0.34

۱۰۰۰ mg/L، دو برابر غلظت سازگار شده رسید تا استحکام و COD تحمل شوک آلاینده گرانولها بررسی شود. میزان حذف

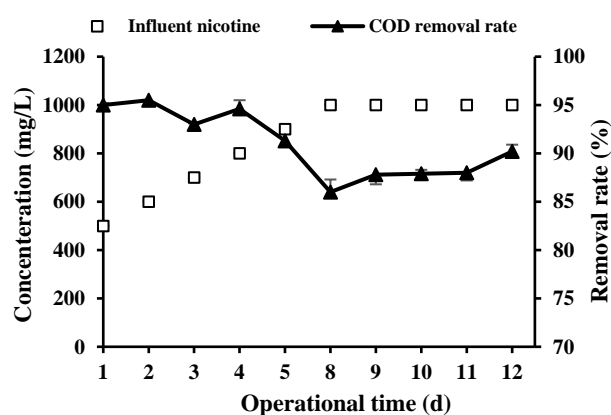


Fig. 6. COD removal rate of aerobic granules in different influent Nicotine concentration

شکل ۶- نرخ حذف COD توسط گرانولهای هوازی در غلظت های مختلف نیکوتین

آلاینده در شکل ۶ گزارش شده است. عملکرد سیستم نسبت به توانایی حذف سنجیده شد. همان طور که در شکل ۶ مشاهده می شود، در ابتدا بازده حذف COD با افزایش غلظت نیکوتین کاهش یافت، با گذشت ۲ هفته سیستم به بازدهی قابل قبولی در حذف COD رسید. علی رغم اینکه غلظت نیکوتین ۲ برابر غلظت سازگار شده بود، گرانولهای هوازی بدون گذراندن دوره طولانی سازگارسازی COD را به ۹۸ mg/L تقلیل داده و به حذف ۹۰/۲

به پلی ساکارید (PN/PS) که به عنوان یک پارامتر تعیین کننده در فرایند گرانولاسیون شناخته می شود در لجن گرانوله به ۲/۶۴ رسید. بالا بودن این شاخص به استحکام و تمایل گرانوله شدن سیستم کمک می کند.

۳-۴- تأثیر نیکوتین بر گرانولهای هوازی تشکیل شده

برای حذف نیکوتین، زمان ماند هیدرولیکی برابر با ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. ابتدا برای جلوگیری از شوک، غلظتی معادل ۱/۴ غلظت نهایی سازگار شده نیکوتین به همراه گلوکز برای مدت کوتاهی به سیستم تزریق شد و به تدریج گلوکز از خوراک حذف شد. نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. با توجه به تغییر زمان ماند هیدرولیکی و افزایش غلظت نیکوتین، اندازه گرانولها تا حدودی کاهش یافت.

در ابتدا به چند دلیل ذرات معلق در بیورآکتور افزایش یافت. اندازه گرانولها تا حدودی کاهش یافت. در درجه اول می توان به کاهش نرخ بارگذاری آلی از ۲ به ۵ kgCOD/m<sup>3</sup> d نسبت به مرحله گرانولاسیون اشاره کرد. همچنین شوک حاصل از تغییر منبع کربنی و تغییر در سیکل خوراک دهی بر تضعیف عملکرد سیستم تاثیرگذار بود. این در حالی بود که حالت گرانوله لجن کاملاً حفظ شده بود و تغییرات شاخص حجمی لجن محسوس نبود. غلظت نیکوتین روزانه به مقدار ۱۰۰ mg/L افزایش یافت تا به



اندازه ۲ تا ۴ میلی‌متر و قهوه‌ای رنگ تشکیل شد. قابلیت ته‌نشینی با گرانوله شدن لجن افزایش یافت به طوری که  $SVI_{30}/SVI_5$  به  $1/0$  رسید. به منظور بررسی میزان تحمل‌پذیری گرانول‌ها نسبت به سمیت نیکوتین، غلظت نیکوتین به ۲ برابر غلظت سازگار شده افزایش یافت و مشاهده شد که گرانول‌ها به خوبی نیکوتین را تجزیه کرده و سیستم به بازدهی حذف COD  $90/2$  درصد رسید.

#### ۵-قدردانی

نویسندگان این پژوهش، از دانشگاه گیلان برای تهیه و تدارک امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی تشکر می‌کنند.

درصد رسیدند. این نتیجه نشان‌دهنده توان بالای گرانول‌های هوازی در حذف ماده سمی و همچنین مقاومت بالای آنها در برابر شوک بود. در جدول ۳ عملکرد سیستم گرانوله در طی دوره عملیاتی گزارش شده است.

#### ۴- نتیجه‌گیری

در فرایند سازگار سازی لجن فعال از نیکوتین به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده شد و در نهایت سیستم توانست به بازدهی حذف نیکوتین و COD به ترتیب  $99/14$  و  $89/16$  درصد برسد. از لجن سازگار شده برای تشکیل گرانول هوازی استفاده شد و طی ۶۰ روز و در نظر گرفتن چرخه ۶ ساعته خوراک‌دهی گرانول‌هایی با

## References

- Adav, S. S., Lee, D. J., Show, K. Y. and Tay, J. H., 2008. Aerobic granular sludge: recent advances. *Biotechnology Advances*, 26, 411-423. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.002>.
- American Public Health Association, 1926. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Vol. 6.
- Chang, I. S. and Lee, C. H., 1998. Membrane filtration characteristics in membrane-coupled activated sludge system-the effect of physiological states of activated sludge on membrane fouling. *Desalination*, 120, 221-233. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(98\)00220-3](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(98)00220-3).
- De Franco, M. A. E., Da Silva, W. L., Bagnara, M., Lansarin, M. A. and Dos Santos, J. H. Z., 2014. Photocatalytic degradation of nicotine in an aqueous solution using unconventional supported catalysts and commercial  $ZnO/TiO_2$  under ultraviolet radiation. *Science of The Total Environment*, 494, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.139>.
- De Kreuk, M., Kishida, N. and Van Loosdrecht, M., 2007. Aerobic granular sludge—state of the art. *Water Science and Technology*, 55, 75-81. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.244>.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Gong, X., Ma, G., Duan, Y., Zhu, D., Chen, Y., Zhang, K. Q., et al. 2016. Biodegradation and metabolic pathway of nicotine in *Rhodococcus sp.* Y22. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2147-8>.
- Lazarevic, N., Adnadjevic, B. and Jovanovic, J., 2011. Adsorption of nicotine from aqueous solution onto hydrophobic zeolite type USY. *Applied Surface Science*, 257, 8017-8023. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.04.076>.
- Liu, Y. Q., Maulidiany, N., Zeng, P. and Heo, S., 2021. Decolourization of azo, anthraquinone and triphenylmethane dyes using aerobic granules: acclimatization and long-term stability. *Chemosphere*, 263, 128312. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128312>.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L. and Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Maduro, R. M. and Aznar, M., 2007. Liquid-liquid equilibrium of ternary systems containing nicotine. *Fluid Phase Equilibria*, 259, 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2007.02.016>.



- Meng, X. J., Lu, L. L., Gu, G. F. and Xiao, M., 2010. A novel pathway for nicotine degradation by *Aspergillus oryzae* 112822 isolated from tobacco leaves. *Research in Microbiology*, 161, 626-633. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.017>.
- Peng, S. S. and Ling, N. S., 2017. Biodegradation of Phenol by unacclimated and phenol-acclimated activated sludge: effects of operational factors on biodegradation efficiency and kinetics. *Journal of Physical Science*, 28, 53-67. <https://doi.org/10.21315/jps2017.28.3.4>.
- Rakić, V., Damjanović, L., Rac, V., Stošić, D., Dondur, V. and Auroux, A., 2010. The adsorption of nicotine from aqueous solutions on different zeolite structures. *Water Research*, 44, 2047-2057. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.019>.
- Rodriguez, S., Santos, A. and Romero, A., 2011. Effectiveness of AOP's on abatement of emerging pollutants and their oxidation intermediates: nicotine removal with Fenton's reagent. *Desalination*, 280, 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.055>.
- Ruan, A., Gao, Y., Fang, C. and Xu, Y., 2018. Isolation and characterization of a novel nicotinophilic bacterium, *Arthrobacter sp.* aRF-1 and its metabolic pathway. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65, 848-856. <https://doi.org/10.1002/bab.1682>.
- Singhal, J. and Singh, R., 1976. Studies on the adsorption of nicotine on kaolinites. *Soil Science and Plant Nutrition*, 22, 35-41. <https://doi.org/10.1080/00380768.1976.10432965>.
- Suksri, H. and Pongjanyakul, T., 2008. Interaction of nicotine with magnesium aluminum silicate at different pHs: characterization of flocculate size, zeta potential and nicotine adsorption behavior. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.02.016>.
- Wang, J. H., He, H. Z., Wang, M. Z., Wang, S., Zhang, J., Wei, W., et al. 2013. Bioaugmentation of activated sludge with *Acinetobacter sp.* TW enhances nicotine degradation in a synthetic tobacco wastewater treatment system. *Bioresource Technology*, 142, 445-453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.067>.
- Wang, M., Yang, G., Min, H., Lv, Z. and Jia, X., 2009. Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas sp.* HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: degradation study and analysis of its mechanisms. *Water Research*, 43, 4187-4196. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.012>.
- Wang, S., Xu, P., Tang, H., Meng, J., Liu, X., Huang, J., et al. 2004. Biodegradation and detoxification of nicotine in tobacco solid waste by a *Pseudomonas sp.* *Biotechnology Letters*, 26(19), 1493-1496. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000044450.16235.65>.
- Yang, J. L. and Zhou, J. B., 2013. Adsorption of nicotine from aqueous solution by activated carbons prepared from Chinese fir sawdust. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 29, 377-384. [Link]
- Zhang, H., Zhao, R., Huang, C., Li, J., Shao, Y., Xu, J., et al. 2019. Selective and faster nicotine biodegradation by genetically modified *Pseudomonas sp.* JY-Q in the presence of glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 339-348. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9445-z>.
- Zhong, W., Zhu, C., Shu, M., Sun, K., Zhao, L., Wang, C., et al. 2010. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas sp.* ZUTSKD. *Bioresource Technology*, 101, 6935-6941. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.142>.



© The Author(s)

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)