

علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره دهم، شماره سه، پاییز ۸۷

## تأثیر ترکیبات ازت بر تولید پلی هیدروکسی آلکانوات ها با استفاده از لجن فعال

نادر مختارانی<sup>۱</sup> (مسئول مکاتبات)

mokhtarani@modares.ac.ir

حسین گنجی دوست<sup>۱</sup>

منیژه خالقی سرنامی<sup>۲</sup>

مهدی برقی<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: ۸۶/۷/۱۷

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۳۰

### چکیده

از میان پلاستیک های قابل تجزیه گروهی تحت عنوان PHAs و کوپلیمرهای آن که بالغ بر چهل ترکیب مختلف می باشد، به علت قابلیت تجزیه پذیری کامل، انعطاف پذیری، مقاومت ۱۰۰٪ در برابر آب، پایین بودن نسبی هزینه تولید و همچنین سادگی فرآیند نسبت به سایر پلیمرهای زیست تخریب پذیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این کار تحقیقاتی بررسی تأثیر ترکیبات ازت بر تولید پلیمر با استفاده از لجن فعال بوده است.

بر اساس نتایج به دست آمده وجود ترکیبات ازت در سوبسترا نه تنها باعث توقف فرآیند تولید PHAs نگردیده بلکه باعث افزایش بازده تولید پلیمر نیز شده است. از میان ترکیبات ازت مورد استفاده اثر عصاره مخمر (Yeast Extract) بیشتر از پپتون (Pepton) و اثر پپتون بیشتر از سولفات آمونیوم تعیین گردیده است.

اضافه شدن ازت به خوراک راکتور تولید پلیمر باعث افزایش میزان مصرف استات می گردد. در این تحقیق میزان مصرف استات در هنگامی که از عصاره مخمر به عنوان منبع ازت استفاده شده نسبت به حالتی که سوبسترا فاقد ازت می باشد بیش از ۵۰٪ افزایش نشان می دهد.

افزایش نسبت کربن به ازت خوراک راکتور تولید پلیمر تا میزان ۲۵ (گرم بر گرم) باعث افزایش میزان تولید پلیمر شده، اما افزایش بیشتر این نسبت تأثیر چشمگیری بر بازده تولید پلیمر ندارد. در این آزمایش حداکثر میزان PHAs تولیدی مربوط به  $C/N=25$  و برابر با ۲۳٪ بوده که با آن چه توسط استات به تنهایی حاصل گردیده اختلاف قابل توجهی ندارد. از دیگر نتایج تحقیق این بود که پساب هایی را که دارای نسبت کربن به ازت بالاتر از ۲۵ (گرم بر گرم) هستند را می توان به عنوان منبع کربن جهت تولید PHAs مورد استفاده قرار داد.

واژه های کلیدی: پلیمرهای زیست تخریب پذیر، تصفیه هوازی\_ بی هوازی، لجن فعال، PHAs, SBR, C/N

۱- دانشکده فنی و مهندسی ، دانشگاه تربیت مدرس

۲- شرکت جهش کیمیا ، خیابان آزادی ، ضلع غربی دانشگاه صنعتی شریف ، کوچه شهید صادقی ، پلاک ۲۶

۳- مرکز تحقیقات بیوشیمی و محیط زیست ، دانشگاه صنعتی شریف

## مقدمه

امروزه پلاستیک ها در تولید انواع فرآورده های صنعتی، از صنعت خودروسازی گرفته تا دنیای پزشکی، دارای کاربرد بوده و تنها در ایالات متحده امریکا سالانه نزدیک به ۵۰ میلیون تن از انواع پلاستیک تولید می شود. اما این مواد به عنوان زباله های مقاوم به تجزیه میکروبی، چالش های زیست محیطی پیچیده ای به بار آورده است (۱).

با توجه به هشدارهای سازمان های مختلف زیست محیطی در مورد مشکلات ناشی از رها شدن پلاستیک ها در طبیعت، در سال های اخیر، کوشش های قانونی برای جلوگیری از دورریز پلاستیک های تجزیه ناشدنی، افزایش یافته است. این کوشش ها صنعت گران پلاستیک را واداشته تا در پی پلاستیک هایی باشند که پیامدهای زیست محیطی کمتری دارد (۲). پلاستیک های نشاسته ای تجزیه پذیر و پلاستیک های میکروبی از دستاورد کوشش های چند ساله پژوهشگران در این زمینه می باشد.

در پلاستیک های نشاسته ای، قطعه های کوتاهی از پلی اتیلن با مولکول های نشاسته به هم می پیوندند. هنگامی که این پلاستیک ها در مراکز دفن زباله، دفع می شود، باکتری های خاک مولکول های نشاسته را تجزیه نموده و قطعات پلی اتیلن آزاد می شود. این گونه پلاستیک ها اکنون در بازار وجود داشته و برای نگه داری مواد غذایی و دیگر وسایل یکبار مصرف مورد استفاده قرار می گیرد. با وجود این، کمبود اکسیژن در محل های دفن زباله و مقاومت قطعات پلی اتیلنی به تجزیه بیولوژیکی، استفاده از این نوع پلاستیک ها را با محدودیت مواجه ساخته است.

تاکنون تعداد زیادی از پلاستیک های میکروبی نیز در جهان تولید گردیده اما امروزه تولید انبوه آن ها به علت عواملی چون بالا بودن نسبی قیمت سوبسترا، پایین بودن میزان تولید و همچنین هزینه های مربوط به استریل نگه داشتن محیط (جهت جلوگیری از آلوده شدن میکروب ها در کشت خالص) به صورت محدود انجام پذیرفته و باعث شده تا این گروه از پلیمرها نتواند با سایر پلاستیک ها رقابت داشته باشد. بر اساس

یکی از مطالعات انجام گرفته (۳) هزینه قابل توجه مواد اولیه علت اصلی بالا بودن قیمت پلاستیک های قابل تجزیه در مقایسه با پلاستیک های معمولی عنوان گردیده است. Lee در گزارشی هزینه تولید پلیمرهای قابل تجزیه در کشت خالص را در حدود ۲۰ برابر قیمت پلاستیک های مصنوعی برآورد نموده است (۴).

از میان پلاستیک های قابل تجزیه که تاکنون تهیه گردیده گروهی تحت عنوان PHAs ( Polyhydroxy alkanooates) و کوپلیمرهای آن که بالغ بر چهل نوع ترکیب می باشد، به علت قابلیت تجزیه پذیری کامل، انعطاف پذیری، مقاومت ۱۰۰٪ در برابر آب، پایین بودن نسبی هزینه تولید و همچنین سادگی فرآیند نسبت به سایر پلیمرهای زیست تخریب پذیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۵ و ۶). این نوع ترکیبات به علت خواص فیزیکی، مکانیکی و همچنین به علت سازگاری با بدن حتی در عمل های جراحی نیز دارای کاربرد می باشد (۷).

این نوع بیوپلاستیک که به صورت گرانول در داخل سلول میکروارگانیسم تجمع یافته و پس از استخراج و خالص سازی به پودری سفید رنگ تبدیل می شود، توسط گروه های مختلف میکروارگانیسم ها قابل تهیه می باشد (۸). تقریباً ۳۰۰ نوع میکروارگانیسم، شامل انواع گرم مثبت و منفی شناسایی گردیده که قادر به ذخیره PHAs می باشند. از جمله میکروارگانیسم هایی که توانایی تولید PHAs را دارند، می توان به گونه های *باسیلوس*، *ازتوباکتر*، *سودوموناس* و *آلکالیجنز* اشاره نمود (۹).

یکی از مهم ترین ترکیبات گروه PHAs، پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) می باشد. این پلیمر اولین بار در سال ۱۹۲۵ توسط میکروبیولوژیستی به نام لمون در انستیتوپاستور پاریس، کشف شد (۱۰). در اوایل دهه ۱۹۶۰، در ایالات متحده آمریکا تولید کمی PHB با اهداف تجاری آغاز و حق امتیاز جهت افزایش تولید و جداسازی PHB کسب شد (۱۱).

در دهه ۱۹۷۰، پژوهش ها نشان داد که PHB

در زمینه دفع انواع پلاستیک هدف اصلی از انجام این تحقیق بررسی تاثیر ترکیبات مختلف ازت بر تولید PHAs با استفاده از لجن فعال تعیین گردیده است.

### مواد و روش ها

#### مواد

در این پژوهش از تری هیدروکسی بوتیریک اسید (Sigma-USA) جهت اندازه گیری کمی 3HB و از کopolymer PHA (Sigma-USA) که شامل ۸۸٪ وزنی 3HB و ۱۲٪ وزنی 3HV بوده جهت اندازه گیری کمی 3HV استفاده شد. سدیم پروپیونات مورد استفاده با خلوص آزمایشگاهی و از شرکت Spectrum آمریکا تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده نیز با خلوص آزمایشگاهی و از شرکت Merck آلمان تهیه شده است.

#### دستگاه ها

در این تحقیق به منظور شناسایی و اندازه گیری PHAs از کروماتوگراف گازی (GC) مدل PU4410/FID ساخت شرکت فیلیپس با ستون موبین (BP-10) با قطر داخلی ۰/۲۲ میلیمتر و طول ۲۵ متر استفاده شده است. سایر شرایط مورد استفاده نیز عبارتند از:

Injection Temp=180°C, Upper Temp=150°C,  
Column Temp=100°C, Upper Time=1 min,  
Detector Temp=200°C, Ramp Rate=8°C/min.

جهت اندازه گیری COD از اسپکتروفوتومتر Varian مدل 50 Conc و به منظور کنترل pH از یک دستگاه کنترل کننده pH ساخت شرکت زاگ شیمی مدل CNT906 با دقت ۰/۱ واحد به صورت on-line استفاده شده است.

#### روش ها

به منظور خو دادن میکروارگانیزم ها جهت تولید پلیمر از یک سیستم SBR (بی هوازی- هوازی) با حجم ده لیتر استفاده شد. این راکتور به صورت مداوم (Continues) و

بسیاری از ویژگی های پلاستیک های نفتی (مانند پلی اتیلن) را دارد. از این رو، کم کم صحبت ها پیرامون بهره گیری از این ترکیب به عنوان جایگزینی مناسب برای پلاستیک های تجزیه ناپذیر کنونی آغاز شد. بالاخره در سال ۱۹۹۰ کمپانی Wella در آلمان به تولید اولین محصول تجاری Biopol به صورت یک بطری زیست تخریب پذیر جهت بسته بندی شامپو اقدام نمود (۱۰).

در تحقیقی دیگر در سال ۱۹۹۷ تولید بیوپلاستیک از لجن مازاد حاصل از تصفیه فاضلاب شهری مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲). در سال ۱۹۹۹ تولید PHAs از فاضلاب صنایع غذایی مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). در این تحقیق فاضلاب حاصل از کارخانجات آبجوسازی و کارخانه ساخت و عمل آوری سویا مورد استفاده قرار گرفته و مشخص گردید که در فرآیند لجن فعال نیز امکان تولید PHAs وجود دارد.

در سال ۲۰۰۳ اثر pH و همچنین زمان ماند سلولی لجن در هنگام تولید PHA از لجن فعال مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۴). در این تحقیق pH بین ۷ تا ۸ در مرحله تطبیق لجن مناسب ترین میزان جهت حداکثر تولید پلیمر تعیین گردیده است. در این آزمایش افزایش زمان ماند سلولی باعث کاهش توانایی لجن در تولید پلیمر شده است. در سال ۲۰۰۵ در یک پژوهش تولید PHAs در راکتور لجن فعال در مقیاس آزمایشگاهی برای اولین بار در کشور تجربه گردیده است (۱۵).

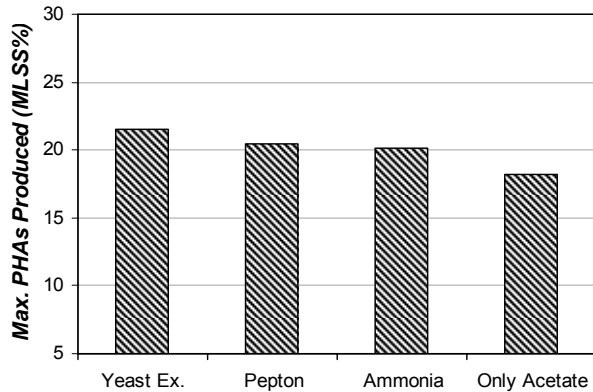
تهیه PHAs از پساب دارای محاسنی است که از مهم ترین آن ها می توان تولید نسبتاً ارزان بیوپلاستیک، کاهش حجم لجن مازاد و به دنبال آن کاهش هزینه های تصفیه فاضلاب را برشمرد. لازم به ذکر است که بر اساس مطالعات انجام گرفته در صورت بازیافت PHAs از لجن مازاد تصفیه خانه فاضلاب حجم آن به کمتر از ۳۰٪ تقلیل می یابد (۱۶).

طی دو دهه گذشته تلاش های زیادی به منظور تولید بهینه PHAs انجام پذیرفته اما علی رغم این تلاش ها قیمت فعلی این نوع ترکیبات هنوز چند برابر پلاستیک های معمولی می باشد (۱۷).

با عنایت به موارد فوق و با توجه به مشکلات مطرح



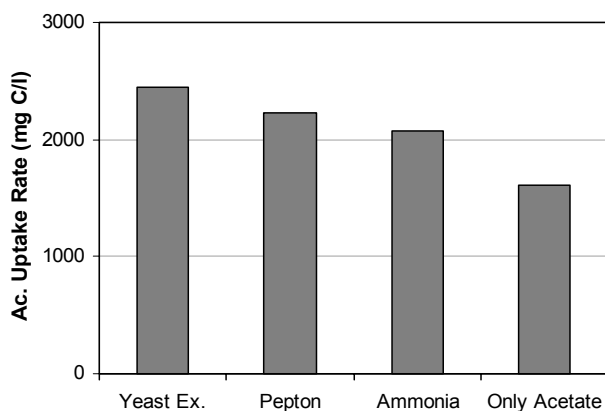
عصاره مخمر در مقایسه با دو ترکیب دیگر و همچنین بالابودن میزان تولید پلیمر در هنگام استفاده از پپتون در مقایسه با سولفات آمونیوم کاملاً مشخص می گردد.



شکل ۳- اثر افزودن ترکیبات مختلف ازت بر

#### حداکثر پلیمر تولیدی

در شکل ۴ اثر ترکیبات مختلف ازت بر میزان مصرف استات با یکدیگر مقایسه شده است. همان طور که مشاهده می شود اضافه شدن ازت به خوراک راکتور تولید پلیمر باعث افزایش میزان مصرف استات (Acetate Uptake Rate) گردیده که با همراه شدن آمینو اسیدها به ازت (پپتون) این میزان بیشتر و در نهایت با وارد شدن ویتامین ها (عصاره مخمر) باز هم افزایش یافته است. همان طور که ملاحظه می شود میزان مصرف استات در هنگامی که از عصاره مخمر به عنوان منبع ازت استفاده شده نسبت به حالتی که سوبسترا فاقد ازت می باشد بیش از ۵۰٪ افزایش نشان می دهد.



شکل ۴- اثر افزودن ترکیبات مختلف ازت بر سرعت

#### مصرف استات

طبق روش های مندرج در کتاب استاندارد متد (۱۹) مورد ارزیابی قرار گرفته اند. لازم به ذکر است که در این تحقیق کلیه آزمایش ها حداقل سه بار تکرار و نتایج با سطح اطمینان بیش از ۹۰٪ معنی دار بوده است.

#### نتایج و بحث

##### ۱- اثر اضافه نمودن ازت در خوراک راکتور تولید پلیمر

در این آزمایش اثر اضافه نمودن ترکیبات مختلف ازت به خوراک راکتور تولید پلیمر مورد ارزیابی قرار گرفته است. بدین منظور از سولفات آمونیوم، پپتون (Pepton) و عصاره مخمر (Yeast extract) به عنوان منبع تامین ازت استفاده شد. علت انتخاب این سه ترکیب اختلاف در ساختار آن ها می باشد. در این مرحله چهار آزمایش انجام و اثر ترکیبات مختلف ازت بر میزان تولید پلیمر مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله در کلیه آزمایش ها غلظت ازت مورد استفاده ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در نظر گرفته شده است. همچنین در کلیه آزمایش ها از  $K_2HPO_4$  جهت تامین فسفر مورد نیاز استفاده گردید. حداکثر میزان تولید پلیمر در هر یک از حالت های فوق نیز در شکل ۳ با یکدیگر مقایسه شده است.

همان طور که مشاهده می شود افزودن ازت به خوراک راکتور تولید پلیمر بر عکس آن چه که در کشت خالص گزارش گردیده، نه تنها باعث کاهش میزان تولید محصول نشده بلکه باعث افزایش آن نیز گردیده است. همچنین از میان ترکیبات مورد استفاده تاثیر عصاره مخمر بیشتر از سایر ترکیبات، و اثر پپتون نیز بیشتر از سولفات آمونیوم بوده است. شایان ذکر است که ازت موجود در سولفات آمونیوم از نوع ازت آمونیاکی بوده در حالی که در دو ترکیب دیگر از نوع آلی می باشد. همچنین در پپتون تعدادی از آمینو اسیدها وجود داشته در حالی که در عصاره مخمر علاوه بر وجود آمینو اسید، انواع ویتامین نیز وجود دارد. از آن جا که آمینو اسید و ویتامین ها از ترکیبات اساسی و مورد نیاز باکتری ها می باشند، بنابراین عصاره مخمر برای باکتری ها ترکیبی مناسب تر از پپتون و پپتون نیز مناسب تر از سولفات آمونیوم می باشد. حال با این فرضیه دلیل افزایش میزان تولید PHA در هنگام استفاده از

سلول و به دنبال آن سرعت مصرف استات و تولید پلیمر مطرح می باشد مرتبط دانست (۲۰).

در این آزمایش حداکثر میزان PHAS تولیدی مربوط به  $C/N=25$  و برابر با ۲۳٪ می باشد. اگرچه این مقدار با آن چه که توسط استات به تنهایی حاصل گردیده اختلاف قابل توجهی ندارد، اما نتیجه می شود که فاضلاب های با  $C/N$  بیش از ۲۵ نیز جهت تولید PHAS مناسب می باشد. در این مورد اختلاف بین حداکثر میزان پلیمر تولیدی در نسبت کربن به ازت ۱۵ و ۲۵ با سطح اطمینان بیش از ۹۹٪ معنی دار بوده است.

بنابراین بر اساس نتایج حاصل، حداقل نسبت کربن به ازت جهت تولید پلیمر به میزان ۲۵ (گرم بر گرم) تعیین و نتیجه می شود که پساب هایی که حاوی مقادیر ترکیبات ازت هستند نیز می توانند به عنوان منبع کربن جهت تولید PHAS مورد استفاده قرار گیرند. (لازم به ذکر است که در تولید PHAS با استفاده از کشت خالص افزودن منبع ازت به سوبسترا به عنوان ممانعت کننده در انجام فرآیند مطرح می باشد).

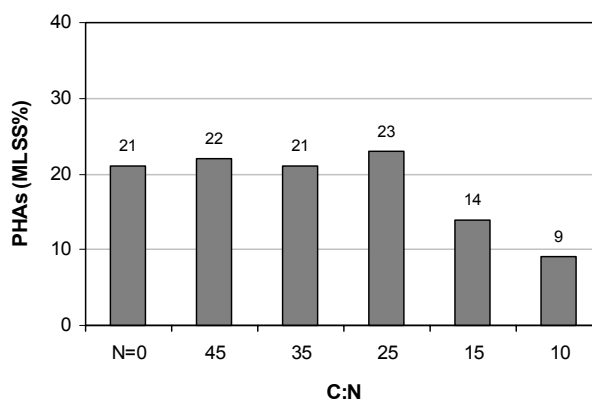
#### نتیجه گیری

- وجود ترکیبات ازت در سوبسترا در هنگام استفاده از لجن فعال برعکس آن چه که در کشت خالص گزارش گردیده باعث توقف فرآیند تولید PHAS نمی گردد.
- از میان ترکیبات ازت مورد استفاده اثر افزودن عصاره مخمر (Yeast Extract) بیشتر از پپتون (Pepton) و اثر پپتون بیشتر از سولفات آمونیوم تعیین گردیده است.
- از آن جا که آمینو اسید و ویتامین ها از ترکیبات اساسی و مورد نیاز باکتری ها می باشند، بنابراین عصاره مخمر برای باکتری ها ترکیبی مناسب تر از پپتون و پپتون نیز مناسب تر از سولفات آمونیوم است.
- اضافه شدن ازت به خوراک راکتور تولید پلیمر باعث

اما با مقایسه دو شکل ۳ و ۴ نتیجه می شود که کل سوبسترای مصرفی در مسیر تولید PHAS مورد استفاده قرار نگرفته است. به عبارت دیگر در این حالت استات مورد استفاده فقط جهت تولید PHAS مورد استفاده قرار نگرفته و در مسیرهای تولید پروتئین و ICH (Inter-Cellular Hydrocarbon) نیز مصرف می شود (۳).

#### ۲- اثر تغییر C/N در خوراک راکتور تولید پلیمر

همان طور که از آزمایش های قبل نتیجه شد، اضافه نمودن ازت به خوراک در راکتور تولید پلیمر نه تنها باعث کاهش میزان تولید پلیمر نگردد بلکه باعث افزایش آن نیز شد. اما آن چه که در این مرحله باید مشخص شود میزان بهینه ازت یا به عبارت دیگر نسبت کربن به ازت در سوبسترا می باشد. بدین منظور پنج آزمایش انجام و اثر تغییر C/N با استفاده از سولفات آمونیوم به عنوان منبع ازت مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۵- تاثیر نسبت کربن به ازت سوبسترا بر تولید

#### پلیمر

نتایج حاصل از انجام آزمایش های مذکور در شکل ۵ آورده شده است. همان طور که مشاهده می شود، افزایش نسبت کربن به ازت خوراک راکتور تولید پلیمر تا میزان ۲۵ (گرم بر گرم) باعث افزایش میزان تولید پلیمر شده، اما افزایش بیشتر این نسبت تاثیر چشمگیری بر بازده تولید پلیمر ندارد. علت این امر را می توان به افزایش بیش از حد غلظت مواد مغذی (ازت) در سوبسترا که به عنوان یک عامل محدود کننده برای فعالیت

8. Pfeffer, J.T., Recycling. Solid Waste Manag. Eng., Prentice Hall, 1992, pp. 72-84.
9. Kim B.S. and Chang H.N., (1998), Production of poly (3-hydroxybutyrate) from starch *Azotobacter chroococcum*; *Biothechnol Letters*; 20, pp. 109-112.
10. Griffin, G.J.L., "Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers", 1994, Chapman & Hall, 1st Ed.
11. Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W. and Fuller, R.C., (1990), "Plastics form bacteria and for bacteria: poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) as natural, biodegradable polyesters", *Advances in Biochemical Engineering*, 41, 77-93.
12. Lee S. and Yu, J. (1997), Production of biodegradable thermoplastics from municipal sludge by a two-stage bioprocess. *Resources, Conservation and Recycling*, 19, p p.151-164.
13. Chua H., yu P.H.F. (1999), Production of biodegradable plastics form chemical wastewater- a novel method to reduce excess activated sludge generated from industrial wastewater treatment, *Wat.Sci. Tech.*, 39(10-11), pp. 273-280.
14. Adline S.M. Chua, Hiroo Takabatake Hiroyasu Satoh and Takashi Mino. (2003), Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Wat. Res.* 37, pp. 3602-3611
15. H. Ganjidust, E. Vasheghani Farahani, M. Borghee and N. Mokhtarani. (2005), Investigation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) Production in Activated Sludge Reactor. *Iranian Journal of Polymer Sci. and Tech.* 17, pp. 353-357
- افزایش میزان مصرف استات گردیده که با همراه شدن آمینو اسیدها به ازت (پیتون) این میزان بیشتر و در نهایت با وارد شدن ویتامین ها (عصاره مخمر) باز هم افزایش یافته است. لازم به ذکر است که سوبسترا علاوه بر مصرف در مسیر تولید PHAs در مسیرهای تولید پروتئین و ICH نیز مصرف می شود.
- حداکثر میزان پلیمر در نسبت کربن به ازت ۲۵ (گرم بر گرم) و به میزان ۲۳٪ حاصل شد.
  - پساب هایی را که دارای نسبت کربن به ازت بالاتر از ۲۵ (گرم بر گرم) هستند می توان به عنوان منبع کربن جهت تولید PHAs مورد استفاده قرار داد.

## منابع

1. <http://www.mehrnaz752.blogfa.com/8512.aspx>
2. Warner Bulletin, Special Report, No-43, November 1994, Page 10.
3. Takabatake H., Satoh H., Mino T. and Matsuo T. (2000), Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process. *Water Sci. Technol.*, 42, pp. 351-356.
4. Lee, S.Y., (1996), Review bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. and Bioeng.* 49, pp. 1-14.
5. Chua, H., Yu, P.H.F. and Ho, L.Y., (1997), Recovery of biodegradable polymers from food-processing wastewater activated sludge system, *J.IES*, 37(2), pp. 9-13.
6. Kumagai, Y., (1992), Enzymatic degradation of binary blends of microbial poly (3-Hydroxy butyrate) with enzymatically active polymers, *Polym. Degrad. Stab.*, 37, pp. 253-256.
7. Pelissero, A., Update on Biodegradable Plastics Materials. *Imballaggio*, 1987, pp. 38, 54.

- R.M., (1978), "A rapid gas chromatographic method for the determination of PHB in microbial biomass", *Eur. J. Appl. Microb. Biotech.*, 6, pp. 905-910.
19. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater; American Public Health Association; 19th Edition, Washington, DC. 1995.
20. Metcalf & Eddy Inc. Wastewater Engineering, Treatment, and Reuse, 4th edition, McGraw-Hill, New York, pp. 565, 2003.
16. Samuel Lee, Jian yu., (1997), Production of biodegradable thermo plastics from municipal sludge by a two stage bioprocess ; *Resources, Conservation and Recycling* ; 19, pp. 151-164.
17. Mokhtarani, N., Determination of Effective Factors on the Production of Poly-Hydroxyalkanoates (PHAs) by Activated Sludge; PhD Thesis in Environmental Engineering, Tarbiat Modares University, School of Engineering, 2005.
18. Braunegg, G.; Sonnleitner, B and Lafferty,