

حذف بنزن و تولوئن از محیط آبی به روش بیولوژیکی

علی مسگری شادی، سهیلا یغمایی، جعفر صادق سلطانمحمدزاده، زهرا قبادی

دانشگاه صنعتی شریف - دانشکده مهندسی شیمی

E-mail: Ali_mshadi@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق از چهار محل (فاضلاب پتروشیمی تبریز، فاضلاب کارخانه رنگ سازی، خاکهای اطراف مخزن ذخیره بنزن در پمپ بنزن و کمپوست حاصل از زباله‌های شهری) نمونه برداری میکروبی انجام شد و ۱۶ باکتری جداسازی گردید. از بین ۱۶ باکتری ۵ باکتری انتخاب شده و توانایی آنها در حذف بنزن و تولوئن مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان میدهد هر ۵ باکتری توانایی حذف بنزن در غلظتهای بالا را دارند. بیشترین درصد حذف توسط باکتریها بدین صورت میباشد: ۷۰٪ KAI در صد، ۵۰٪ RA1 در صد، ۶۰٪ RA2 در صد، ۷۰٪ PA1 در صد و ۷۰٪ PA2 در صد.

واژه های کلیدی: سوسپانسیون میکروبی؛ تجزیه زیستی؛ کمپوست؛ ترکیبات غیرزیستی

مقدمه

در سال ۱۹۶۵ میلادی، مارتین الکساندر، اصلی را به این ترتیب مطرح کرد: هیچ ماده طبیعی وجود ندارد که در شرایط محیطی مناسب در مقابل تخریب میکروبی کاملاً مقاوم باشد. در واقع نمیتوان تجمع هیچ ماده طبیعی را در بیوسفر (جو و سطح کره زمین) مشاهده کرد چرا که آنها در معرض چرخه های تخریب میکروبی هستند. البته سوخته های فسیلی مانند مخازن نفتی، تجمع پیدا کرده اند زیرا شرایط محیطی آنها طوری است که برای سوخت و ساز میکروبی مناسب نمی باشد. مواد شیمیایی ساخته دست انسان که در محیط زیست به طور غیر طبیعی با غلظتهای زیاد وجود دارند مواد غیر زیستی نامیده می شوند. البته این عبارت برای مواد طبیعی که بر اثر فعالیتهای انسان، به طور غیر معمول و با غلظتهای بالا در محیط زیست باقی مانده اند نیز به کار می رود. این ترکیبات به راحتی توسط میکروبیها تخریب نمی شوند چرا که ساختمان مولکولی و توالی پیوندهای آنها برای آنزیمهای تجزیه کننده شناخته شده نیست. نتیجه این که، این مواد در مقابل تخریب زیستی مقاوم هستند و یا به صورت ناقص و کند تجزیه شده، به تدریج در محیط زیست تجمع پیدا می کنند. به این ترکیبات، مواد مقاوم می گویند.

حذف بنزن در مخلوطی از سوبستراهای آروماتیکی (تولوئن، ارتو زایلن، نفتالین، پیروول ...) توسط اریک اروین و همکارانش [۱] بررسی شد و نتیجه بدست آمده این بود که کشتهای انجام شده بر روی هیدروکربنهای آروماتیکی بهتر از کشتهای انجام شده بر روی آروماتیکیهای شامل نیتروژن، اکسیژن و گوگرد می توانند بنزن را حذف کنند. سانگ هو یوئم و همکارش [۲] توانستند در یک راکتور دو فاز و توسط یک باکتری بنزن را حذف کنند. حذف مخلوطی از بنزن، تولوئن و پارا زایلن بوسیله کشت خالص و کشت مخلوط توسط پدرو آلوارز و تیموتی و گل [۳] بررسی گردید. بیلی هایقلر و همکارانش [۴] آزمایشهایی ترتیب دادند تا بتوانند با یک گونه باکتری، طیف وسیعی از آروماتیکیها را حذف کنند. یاداو و ردی [۵] حذف BTEX را توسط یک نوع قارچ بررسی کردند. لوسیا کاوالکا و همکارانش [۶] باکتریایی با قدرت حذف بالا جداسازی کرده و تاثیر محیطهای کشت BTEX را بر روی حذف هر سه ماده مطالعه کردند. نکته قابل توجه این است که اکثر تحقیقات انجام شده بغیر از [۶] در غلظتهای پایین BTX بوده است به

همین دلیل سعی شده است در این تحقیق باکتریها در غلظتهای بالای بنزن و تولوئن آزمایش شوند.

روشها و ابزار

دستگاه اندازه گیری غلظت

برای اندازه گیری غلظت بنزن در محیط کشت از دستگاه HPLC استفاده شد که مشخصات آن به شرح زیر است:

* HPLC _ Dual λ Absorbance Detector

Waters 2487

* Nova _ Pak R C18 60 A 4 μ m

3.9 * 150 mm HPLC cartridge column

contains : Dimethylocta decylsilyl

bonded amorphous silica

Methyl alcohol

فاز متحرک آب و استونیتریل به نسبت ۳۰ به ۷۰ و با شدت جریان ۱/۴ میلی لیتر بر دقیقه انتخاب شد. لازم به ذکر است که نمونه های میکروبی قبل از تزریق به دستگاه HPLC با فیلترهای میکروبی ۰/۲۲ میکرون صاف می شدند.

روش جداسازی میکروبیها

انتخاب محل مناسب برای نمونه برداری، یکی از مهمترین مراحل جداسازی میکروبیها می باشد. بنابراین ۴ نمونه میکروبی از محلهای زیر تعیین گردید: ۱- فاضلاب پتروشیمی تبریز ۲- فاضلاب کارخانه رنگ سازی ۳- خاکهای اطراف مخزن ذخیره بنزین در پمپ بنزین ۴- کمپوست حاصل از زباله های شهری. برای جداسازی میکروبیها از روش غنی سازی محیط کشت (Enrichment culture) استفاده شده است. در این روش ابتدا مخلوط میکروبی در یک محیط مغذی قرار گرفته و بعد از تقویت شدن، میکروبیها به محیط کشت اختصاصی که فاقد مواد مغذی است منتقل می شوند سپس باکتریهای مورد نظر جداسازی می گردند. مراحل جداسازی باکتریها بصورت اجمالی در زیر آورده شده است:

قدم اول: تهیه محلول یکنواخت از نمونه های میکروبی.

قدم دوم: انتقال مخلوط میکروبی به محیط کشت مغذی همراه با افزایش متناوب غلظت بنزن.

قدم سوم: انتقال میکروبیها از محیط کشت مغذی به محیط

کشت اختصاصی با افزایش متناوب غلظت بنزن

در اینجا دو محیط A و B بدین ترتیب تعریف می شوند که

محیط A حاوی محیط کشت اختصاصی است ولی محیط B

علاوه بر محیط کشت اختصاصی حاوی ماده مغذی "عصاره

خمیر" (yeast extract) به میزان ۱ گرم بر لیتر می باشد.

ترکیب محیط کشت اختصاصی در جدول ۱ آورده شده

است.

جدول ۱- محیط کشت اختصاصی

ماده شیمیایی	غلظت بر حسب گرم بر لیتر
(NH ₄) ₂ SO ₄	۳
KH ₂ PO ₄	۰ / ۶
K ₂ HPO ₄	۲ / ۴
MgSO ₄	۱ / ۵
CaSO ₄	۰ / ۱۵
FeSO ₄	۰ / ۰۴

نکته قابل توجه این است که حجم سوسپانسیون میکروبی داخل ارلنها فقط ۱/۵ حجم کل ارلن انتخاب شده است تا هوادهی بصورت مناسب انجام بگیرد. سر ارلنها بعلت فراریت بنزن بسته شده بود و در دستگاه شیکر - گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و ۱۳۰ دور بر دقیقه قرار میگرفتند. قدم چهارم: انتقال میکروبیها از محیط آبی به محیط جامد با تهیه رفتهای متوالی.

باکتریهایی که خالص تشخیص داده شدند (از روی شکل ظاهری کلونیهای تشکیل یافته) به محیطهای اسلنت (slant) انتقال داده شدند. حدود ۱۶ نوع باکتری بدست آمد که نتیجه رنگ آمیزی گرم آنها در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- مشخصات باکتریهای جداسازی شده

باکتریهای جدا شده از خاک پمپ بنزین	
کو کو باسیلهای زیر گرم منفی	BA ₁

کمک رشد استفاده نشد و محیط کشت فقط حاوی مواد معدنی و بنزن (تولوئن) به عنوان تنها منبع کربن و انرژی انتخاب شد.

مقایسه باکتریهای خالص منتخب

دومین مرحله تهیه ۵ کشت با نامهای B (مخلوط باکتریهای جدا شده از نمونه پمپ بنزین) و P (مخلوط باکتریهای جدا شده از نمونه پتروشیمی) و R (مخلوط باکتریهای جدا شده از رنگسازی) K (مخلوط باکتریهای جدا شده از کمپوست) و RA₁ (کشت خالص باکتری) بود که بنزن به مقدار ۱۷۶ ppm به هر ۵ کشت اضافه شد. میزان حذف بنزن در این ۵ کشت در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳-مقایسه کشتهای مخلوط و خالص

میزان حذف (ppm)	درصد حذف %	
۳۸	۲۲	B
۷۲	۴۱	P
۴۹	۲۸	R
۶۰	۳۴	K
۷۹	۴۵	RA ₁

مشاهده می گردد که کشت خالص باکتری RA₁ نتیجه بهتری نسبت به کشتهای مخلوط میکروبی نشان داده است بنابراین ترجیح داده شد که باکتریها بطور خالص مورد آزمایش قرار گیرند. از بین ۱۶ باکتری، ۵ باکتری که از محیط A جدا شده و در این مرحله از آزمایشها نتایج بهتری (بصورت نسبی) نشان داده بودند انتخاب شدند تا بقیه آزمایشها بر روی این ۵ باکتری انجام گیرند.

حذف بنزن

باکتریها در غلظتهای ۹۶، ۱۳۶، ۱۶۳، ۳۴۱، ۳۸۰ و ۸۰۰ (میلی گرم برلیتر) از بنزن کشت داده شدند که تقریباً در تمامی این غلظتها، باکتری RA₁ دو روز، باکتری RA₂

کو کو باسیلهای گرم مثبت	BB ₂
کو کسیهای گرم مثبت	BB ₁
باکتریهای جدا شده از فاضلاب رنگسازی	
کو کسیهای گرم منفی	RA ₁
کو کو باسیلهای گرم منفی	RA ₂
باسیلهای گرم منفی	RB ₁
کو کسیهای گرم مثبت (تسیح مانند)	RB ₂
باکتریهای جدا شده از کمپوست	
باسیلهای گرم منفی (ریز)	KA ₁
کو کسیهای گرم مثبت (درشت)	KA ₂
کو کسیهای گرم مثبت (تسیح مانند)	KA ₃
باسیلهای گرم منفی ریز	KB ₁
باسیلهای گرم منفی ریز	KB ₂
باکتریهای جدا شده از فاضلاب پتروشیمی	
کو کو باسیلهای ریز گرم مثبت	PA ₁
کو کسیهای گرم مثبت	PA ₂
کو کو باسیلهای ریز گرم منفی	PB ₁
کو کسیهای درشت گرم منفی	PB ₂

نتایج

شناسایی اولیه باکتریها

در نخستین مرحله مقایسه ای بین محیطهای A و B در مورد میزان حذف بنزن توسط باکتریها در این محیط انجام گرفت بدین ترتیب که برای تمامی ۱۶ باکتری دو محیط A و B تهیه گردید. مقایسه میزان حذف بنزن نشان داد که افزودن ماده کمک رشد عصاره مخمر یعنی محیط B تأثیری در افزایش حذف بنزن ندارد بنابراین در ادامه آزمایشها از ماده

PA₁ است با این تفاوت که باکتری KA₁ ضعیفتر از باکتری PA₁ عمل می کند.

حذف تولوئن

میزان حذف تولوئن توسط ۴ باکتری RA₁ و RA₂ و PA₁ و KA₁ در چهار غلظت ۵۰ ppm و ۱۴۷ ppm و ۲۸۲ ppm و ۳۰۹ ppm مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در اشکال ۶ تا ۹ و در انتهای متن نشان داده شده است. تمامی باکتریها بجز KA₁ با افزایش غلظت تولوئن تا ۳۰۰ ppm میزان حذف بیشتری را نشان میدهند در حالی که باکتری KA₁ تقریباً میزان حذف ثابتی دارد. در تمامی باکتریها در صد حذف تولوئن با افزایش غلظت تولوئن کاهش می یابد که این کاهش در باکتریهای RA₂ و KA₁ با شیب تندتری انجام میشود. با توجه به نتایج به نظر میرسد از بین این چهار باکتری، PA₁ نسبت به بقیه قابلیت بیشتری در حذف تولوئن دارد.

لازم به ذکر است که تمامی داده های گزارش شده نتیجه اندازه گیری غلظت تولوئن بعد از روز اول بوده است.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به شکلها مشخص می گردد که در غلظتهای کمتر از ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر بنزن رفتار باکتریهای PA₁، PA₂ و KA₁ شبیه به هم می باشد. هر سه باکتری در غلظت ۹۶ میلی گرم بر لیتر بیشترین درصد حذف را که بیش از ۷۰ درصد می باشد نشان می دهند در حالی که باکتریهای RA₁، RA₂ دارای درصد حذفی کمتر از ۶۰ درصد هستند. در غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر باکتریهای RA₁، PA₁ و RA₂ بهتر از دو باکتری دیگر عمل کرده اند و این بدین معنی است که سه باکتری مذکور توانایی بیشتری در تحمل غلظت بسیار بالای تولوئن دارند.

همانطوری که قبلاً اشاره شد این تحقیق در جهت شناسایی باکتریهایی با توانایی بالا در حذف بنزن در غلظتهای بالا سوق داده شده است بنابراین برای مقایسه با تحقیقات انجام شده قبلی می توان مرجع [۶] را انتخاب نمود چرا که در

سه روز، باکتری PA₁ سه روز، باکتری PA₂ سه روز و باکتری KA₁ دو روز توانایی حذف بنزن نشان دادند که بیشترین مقدار حذف بنزن توسط این باکتریها بر حسب غلظتهای مختلف بنزن در شکلهای ۱ تا ۵ و در انتهای متن نشان داده شده است.

لازم به توضیح است که با توجه به فرار بودن بنزن، برای متمایز شدن فراریت از میزان حذف زیستی این موادفرار، برای آزمایش در هر غلظت خاص نمونه های شاهدهی (محیط کشت بدون میکروب) با همان غلظت تهیه میشد بنابراین تمامی غلظتهای مورد آزمایش مذکور همان غلظتهای باقی مانده در فاز مایع می باشند.

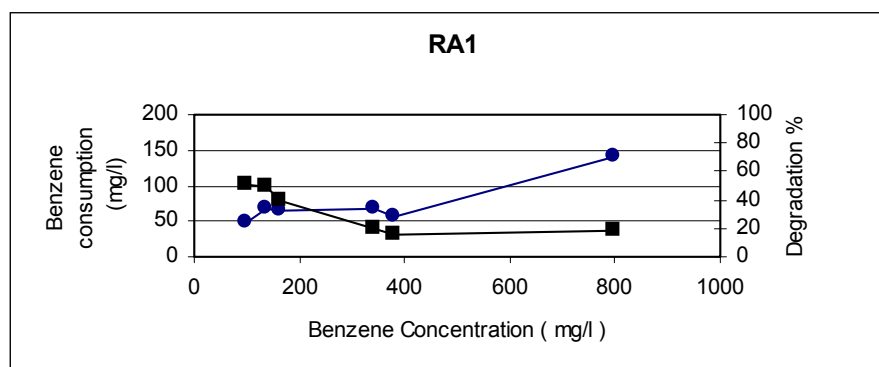
با توجه به شکلها مشخص می شود که هر ۵ باکتری با افزایش غلظت بنزن در محیط درصد حذف کمتری نشان می دهند. باکتری RA₁ در غلظتهای مختلف بنزن تقریباً میزان حذف یکسانی نشان می دهد که حدود ۶۰ ppm است و بیشترین درصد حذف در ۹۶ ppm و ۱۳۶ ppm دیده میشود همچنین در غلظتهای بالاتر از ۱۶۳ ppm افت محسوسی در درصد حذف وجود دارد در حالی که در میزان حذف این افت مشاهده نمی گردد. میزان حذف بنزن توسط باکتری RA₂ با افزایش غلظت بنزن، افزایش می یابد در حالی که در صد حذف در غلظتهای بالاتر از ۱۳۶ ppm افت شدیدی پیدا کرده و تقریباً ثابت می ماند. باکتری PA₁ در ۹۶ ppm بیشترین درصد حذف را داراست. به نظر میرسد این باکتری در محدوده ۲۰۰ ppm تا ۴۰۰ ppm دارای یک بیشینه مصرف بنزن باشد. البته این رفتار نسبتاً غیر معمول در باکتری KA₁ نیز دیده میشود. میزان حذف بنزن باکتری PA₂ تا غلظت ۳۸۰ ppm صعودی است ولی در غلظتهای بالا دچار افت میشود این باکتری هم از لحاظ میزان حذف و هم از نظر در صد حذف بنزن بهترین نتایج را نشان میدهد. باکتری KA₁ مانند باکتریهای PA₁ و PA₂ در ۹۶ ppm بیشترین میزان حذف همچنین بیشترین درصد حذف بنزن را نشان میدهد. رفتار این باکتری تقریباً شبیه رفتار باکتری

- by pure cultures and culture aquifer slurries”, *App. Environ. Microbiol.*, Vol. 57 , No.10 ,2981-2985,1991.
4. Billy E. Haigler, Charles A. Pettigrew, and Jim C. Spain, “Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS ”, *App. Environ. Microbiol.*, Vol.58 , No.7,2237-2244 , July 1992.
5. J.S. Yadav and C.A. Reddy, “Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading asidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*”, *App. Environ. Microbiol.*, Vol.59 , No.3 ,756-762,1993.
6. Lucia Cavalca, Patrizia Di Gennaro, and Milena Colombo, “Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil”, *Res. Microbiol.*, Vol.151 ,877-887,2000.
7. H.F. Ridgway, J. Safarik, and D. Phipps, “Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer”, *App. Environ. Microbiol.*, Vol.56 , No.11,3565-3575,1990.
8. Inez J.T. Dinkla, Esther M. Gabor , and Dick B. Janssen, “Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid” *App. Environ. Microbiol.*, Vol.67 , No.8 ,3406-3412.

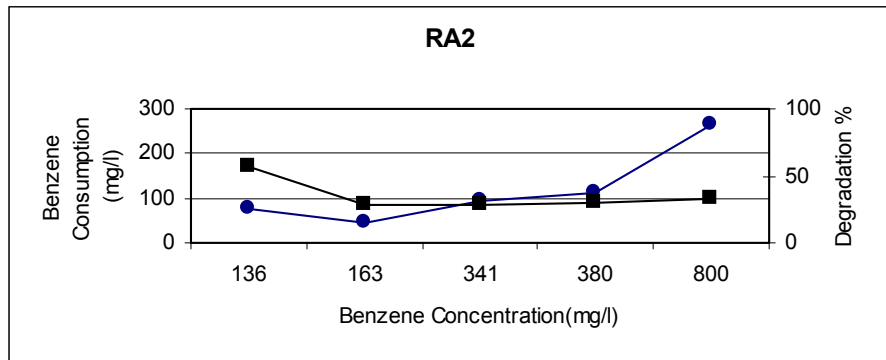
این مقاله نیز باکتریها در غلظتهای بالایی از بنزن و تولوئن مورد آزمایش قرار گرفته اند. در این مرجع بیشترین غلظت بنزن آزمایش شده حدود ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر می باشد که بعد از یک روز بیش از ۵۰ درصد آن حذف شده است. با توجه به نمودارها مشاهده می گردد که باکتریهای PA1 و PA2 نیز در عرض کمتر از سه روز به ترتیب حدود ۵۰ و ۴۰ درصد از بنزن را حذف می کنند. در غلظتهای بالای تولوئن افت محسوسی در درصد حذف مشاهده می گردد ولی در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر هر ۴ باکتری بیش از ۴۰ درصد تولوئن را حذف می کنند بنابراین بهتر است این باکتریها در غلظتهای پایین تولوئن مورد استفاده قرار گیرند.

مراجع

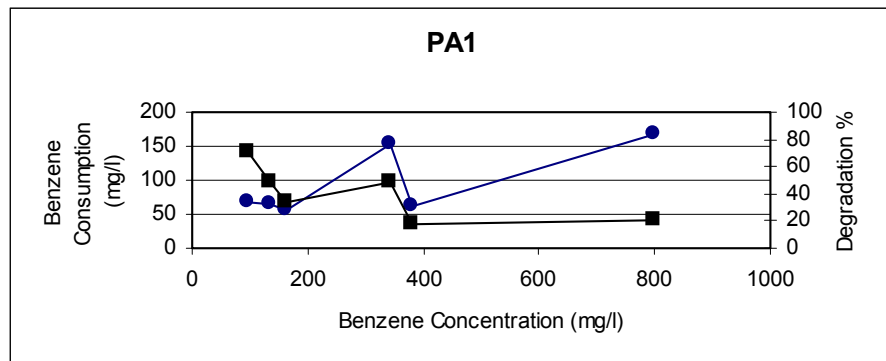
- Erik Arvin, Bjorn K. Jensen, and Anders Torp Gundersen, “Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene”, *App. Environ. Microbiol.*, Vol. 55 , No. 12,3221-3225, 1989.
- Sung-Ho and Andrew J. Daugulis, “Benzene degradation in two- phase partitioning bioreactor by *Alcaligenes xylooxidans* Y234”, *Process Biochemistry*, Vol.36 ,765-772,2001.
- Pedro J. J. Alvarez and Timotty M. Vogel, “ Substrate interactions of benzene , toluene, and para-xylene during microbial degradation



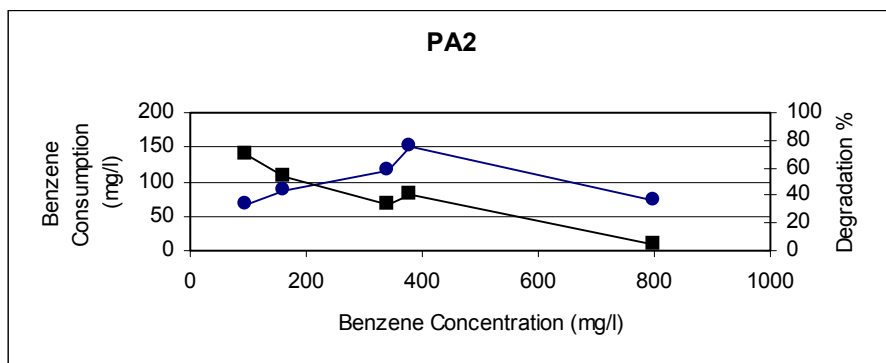
شکل ۱- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) بنزن توسط باکتری RA1 بر حسب غلظت بنزن.



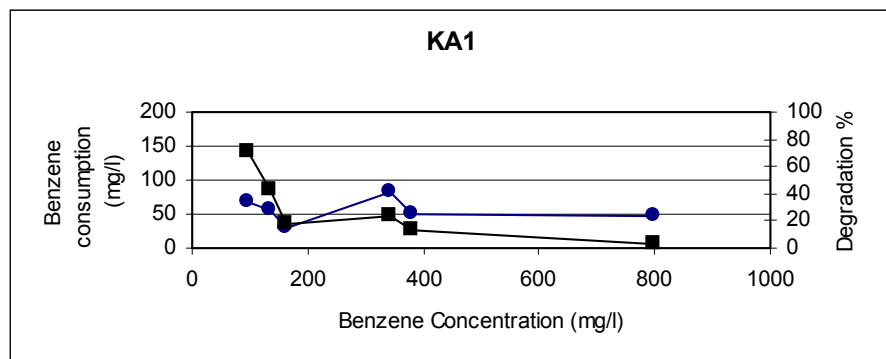
شکل ۲- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) بنزن توسط باکتری RA2 بر حسب غلظت بنزن.



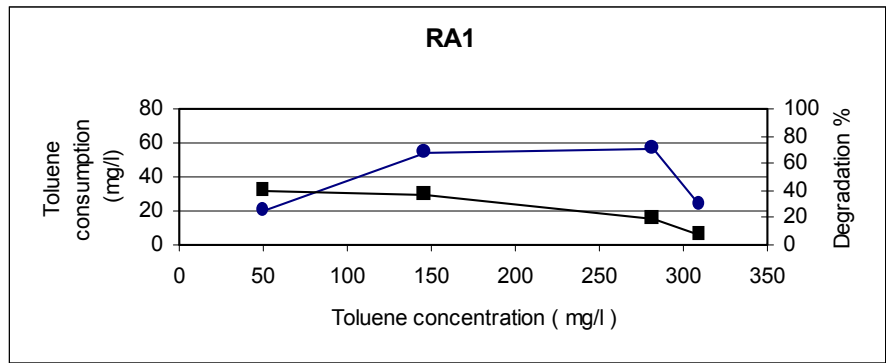
شکل ۳- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) بنزن توسط باکتری PA1 بر حسب غلظت بنزن.



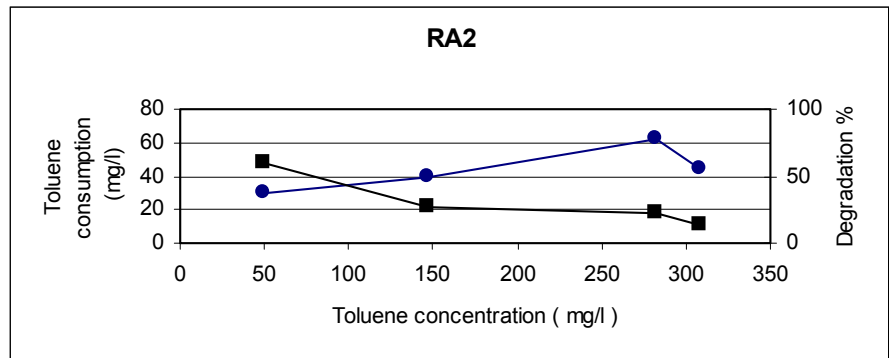
شکل ۴- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) بنزن توسط باکتری PA2 بر حسب غلظت بنزن.



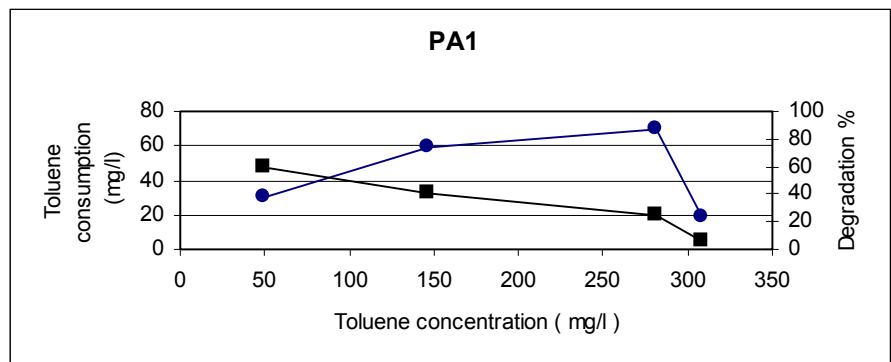
شکل ۵- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) بنزن توسط باکتری KA1 بر حسب غلظت بنزن.



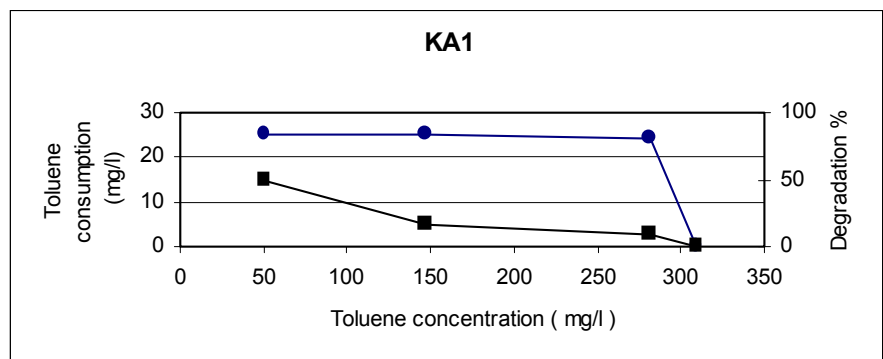
شکل ۶- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) تولوئن توسط باکتری RA1 بر حسب غلظت تولوئن.



شکل ۷- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) تولوئن توسط باکتری RA2 بر حسب غلظت تولوئن.



شکل ۸- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) تولوئن توسط باکتری PA1 بر حسب غلظت تولوئن.



شکل ۹- میزان حذف (■) و درصد حذف (●) تولوئن توسط باکتری KA1 بر حسب غلظت تولوئن.