

## جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های غالب موجود در لجن فعال واحد تصفیه پساب ABS و بررسی پتانسیل تجزیه بیولوژیکی اکریلونیتریل

زهرا اکبری<sup>۱</sup>، محمد شاکر خطیبی<sup>۲\*</sup>، محمد مسافری<sup>۳</sup>، نجیبه اصل رهنمای اکبری<sup>۴</sup>، زهره شیری<sup>۵</sup>، محمدرضا فرشچیان<sup>۶</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۴/۰۱

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** اکریلونیتریل به‌عنوان ماده اولیه اصلی در تولید رزین ABS در صنایع پتروشیمی کاربرد دارد و به‌عنوان یکی از آلاینده‌های پساب خروجی فرایند تولید ABS مطرح می‌باشد. با توجه به اهمیت کاربرد سیستم‌های بیولوژیکی در تصفیه این پساب، این مطالعه باهدف جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های غالب موجود در واحد بیولوژیکی تصفیه پساب ABS و ارزیابی پتانسیل تجزیه بیولوژیکی اکریلونیتریل انجام شده است. **مواد و روش کار:** ساختار جمعیت میکروبی با ۸ نوبت نمونه‌برداری از حوض هوادهی بررسی گردید. بدین منظور، از محیط‌های کشت PCA، R2A، سابروزدکستروز آگار و رزبنگال به‌منظور کشت عمومی باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده شد. به‌منظور شناسایی جنس باکتری‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی و برای شناسایی قارچ‌ها از کشت روی لام استفاده شد. پتانسیل تجزیه بیولوژیکی اکریلونیتریل، از طریق تعیین غلظت اکریلونیتریل، اکریلامید و اکریلیک‌اسید با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC) ارزیابی گردید.

**یافته‌ها:** از مجموع ۲۰ باکتری جداسازی‌شده، ۷ جنس متعلق به نایسریا، موراکسلا، آکالیزنز، باسیلوس، سودوموناس، شیگلا و استافیلوکوکوس بوده است. قارچ‌های شناسایی‌شده نیز شامل اسپریلوس، کلدوسپوریوم، تریکودرما، کریزسپوریوم و پنی‌سیلیوم بوده است. نتایج بررسی حذف اکریلونیتریل نشان‌دهنده کاهش ۷۱ درصدی این آلاینده در واحد بیولوژیکی بوده است. غلظت اکریلیک‌اسید به‌عنوان یکی از محصولات نهایی تجزیه اکریلونیتریل از ۳۹ mg/l در ورودی به ۹۴ mg/l در خروجی افزایش یافته و غلظت اکریلامید در طول واحد تصفیه تقریباً ثابت بوده است.

**بحث و نتیجه‌گیری:** باکتری و قارچ غالب در واحد بیولوژیکی به‌ترتیب به‌عنوان سودوموناس و اسپریلوس شناسایی شد. در این میان، جنس‌های *Alcaligenes*، *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Moraxella* به‌عنوان باکتری‌های نیتروفاयर هتروتروف شناسایی شده‌اند که توانایی تجزیه ترکیبات نیتروژن‌دار از جمله اکریلونیتریل را دارند.

**کلیدواژه‌ها:** اکریلونیتریل بوتادین استایرن، لجن فعال، فاضلاب صنعتی، ساختار میکروبی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره پنجم، ص ۳۸۳-۳۷۵، مرداد ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۵۵۹۵۲

Email: shakerkhatibim@tbzmed.ac.ir

### مقدمه

گردد (۱،۲). اکریلونیتریل به‌عنوان ماده اولیه اصلی در تولید رزین ABS به‌طور وسیعی در فرایندهای صنعتی و تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب، یک آلاینده فرار با نقطه جوش °C ۶۵ می‌باشد و از سوی آژانس حفاظت محیط‌زیست ایالات‌متحده

تولید رزین‌های اکریلونیتریل بوتادین استایرن (ABS) منجر به تولید فاضلاب حاوی ترکیبات آلی نیتروژن‌دار شده و در صورت عدم تصفیه مناسب، ممکن است باعث بروز آلودگی شدید محیط زیست

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۲</sup> دکترای مهندسی محیط زیست، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> دکترای مهندسی بهداشت محیط، استاد دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۴</sup> کارشناس ارشد انگل‌شناسی، مربی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۵</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهرا

<sup>۶</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

گرم منفی AAS6 (۱۳) اشاره نمود. در یکی از مطالعات محدود انجام شده در این زمینه در ایران، شاکرخطیبی و همکاران کارایی میکروارگانیسم‌های سازگار شده حاصل از لجن فعال واحد تصفیه فاضلاب پتروشیمی را در حذف اکریلونیتریل مورد بررسی قرار داده و ضمن جداسازی و شناسایی گونه غالب باکتریایی متعلق به گاماپروتئوباکتیریا با عنوان سودوموناس پوتیدا، بازده حذف اکریلونیتریل از پساب مصنوعی واحد ABS را در محدوده ۳۰ تا ۹۸/۶ درصد در غلظت‌های اولیه ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ mg/l اکریلونیتریل گزارش کرده‌اند (۱۴).

با توجه به اینکه ساختار جمعیت میکروبی لجن فعال و فعالیت میکروارگانیسم‌ها وابسته به طبیعت و نوع هیدروکربن‌های در دسترس، ترکیبات مغذی و دیگر شرایط محیطی از جمله pH، دما، اکسیژن محلول، اختلاط سیستم و ساختار واحد بیولوژیکی می‌باشد (۱۵، ۱۶)، شناسایی ساختار میکروبی فعال موجود در یک سیستم تصفیه می‌تواند به منظور به‌روزرسانی طراحی و بهره‌برداری سیستم‌های تصفیه مورد استفاده قرار گیرد (۱۷). در راستای ارزیابی عملکرد واحد تصفیه بیولوژیک پساب واحد ABS، این مطالعه باهدف جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های فعال موجود در سیستم لجن فعال این واحد تصفیه پساب در پتروشیمی تبریز انجام شده است. به‌علاوه، پتانسیل تجزیه بیولوژیک اکریلونیتریل در این واحد تصفیه مورد بررسی قرار گرفته است.

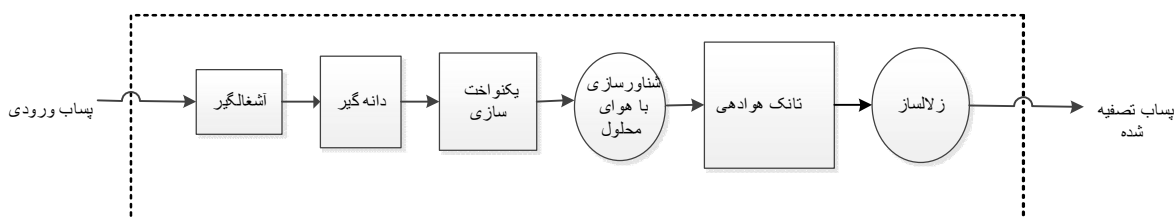
### مواد و روش کار

واحد تولید رزین ABS با ظرفیت تولید ۳۵۰۰۰ تن در سال یکی از واحدهای مهم شرکت پتروشیمی تبریز محسوب می‌شود. پساب خروجی از این واحد توسط یک سیستم پیش تصفیه به روش لجن فعال (شکل ۱) تصفیه‌شده و پساب خروجی واحد پیش تصفیه به‌منظور تصفیه تکمیلی به واحد بازیافت مرکزی مجتمع هدایت می‌شود. خصوصیات پساب خروجی از واحد تولید ABS در جدول ۱ ارائه شده است.

(USEPA) در فهرست ترکیبات سرطان‌زا برای انسان طبقه‌بندی شده است (۳). انتشار این ترکیب از فرایندها و فاضلاب صنعتی به شکل بخار و مایع است و در صورت مواجهه انسان با غلظت‌های  $2/5-5 \text{ mg/m}^3$  در درازمدت باعث کاهش شدید گلبول‌ها و هموگلوبین خون می‌شود (۴).

فرایندهای تصفیه زیستی به‌عنوان یک گزینه اقتصادی و سازگار با محیط زیست به‌طور متداول در تصفیه فاضلاب واحدهای تولید رزین ABS مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۵). با توجه به تنوع زیاد آلاینده‌ها و وجود ترکیبات سمی در فاضلاب‌های صنعتی، میکروارگانیسم‌هایی که توانایی سازگارشدن با یک آلاینده را داشته باشند، در محیط غالب شده، نقش اساسی را در تصفیه آن آلاینده ایفا خواهند کرد و این سازگاری باعث افزایش قابل توجهی در سرعت تجزیه زیستی و کارایی سیستم تصفیه خواهد شد. در این راستا، تجزیه زیستی اکریلونیتریل در فاضلاب توسط برخی از محققان با استفاده از گونه‌های باکتریایی از جمله آرتروباکتر، کورینه‌باکتریا، نوکاردیا و سودوموناس (۶)، رودوکوکوس (۷) اسیدووروکس و کوماموناس آزمونوسترونی (۸) و اسینتوباکتر (۹) گزارش شده است. در تحقیقات دیگر، برخی از این گونه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی برای حذف اکریلونیتریل از خاک (۱۰) و فاضلاب (۸، ۹) مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

به‌منظور بررسی سرعت تجزیه زیستی اکریلونیتریل، تحقیقات دیگری با اعمال غلظت‌های مختلف این آلاینده انجام شده است که در این میان می‌توان به حذف کامل اکریلونیتریل با غلظت اولیه  $2000 \text{ mg/l}$  در مدت ۱۴۰ ساعت با استفاده از راکتور زیستی ناپیوسته هوازی حاوی محیط باکتریایی مخلوط (۱۱) تجزیه اکریلونیتریل تا غلظت  $279 \text{ mg/l}$  با استفاده از فرایند دنیتریفیکاسیون در شرایط فاقد اکسیژن (Anoxic) با بهره‌گیری از گونه‌های اسیدووروکس فاسیلیس بی (*Acidovorax facilis B*) و سودوموناس نوتیکا (*Pseudomonas nautica*) (۱۲)، حذف کامل اکریلونیتریل در شرایط هوازی تا غلظت‌های ۴۰۰ و  $889 \text{ mg/l}$  به‌ترتیب از فاضلاب واقعی و مصنوعی واحد ABS و شناسایی باسیل



شکل (۱): فلودیاگرام واحد پیش تصفیه پساب واحد ABS

دکستروز آگار و RB انجام شد. بدین منظور، ۱۰ ml از دوغاب لجن فعال برداشته شده و به ۹۰ ml محلول بافر فسفات اضافه شده و به صورت سریالی در همان بافر فسفات، ۱۰ برابر رقیق سازی شد. مقادیر یکسان (۰/۱ ml) به منظور کشت هتروتروفها بر روی محیط کشت غنی از مواد غذایی PCA و محیط کشت متوسط مواد غذایی R2A و برای کشت قارچها از محیط کشت RB و سابروز دکستروز آگار استفاده شد. تعداد کلنیهای تشکیل شده بر روی هر یک از محیطها برای باکتریهای هتروتروف پس از ۲ روز انکوباسیون در ۳۷ °C و در مورد قارچها پس از ۷ روز انکوباسیون در ۲۰ °C شمارش شد. سپس کلنیهای متفاوت از محیطهای کشت انتخاب شده و بر روی محیط کشت نوترینت آگار به منظور خالص سازی کشت داده شد. برای شناسایی باکتریهای جداسازی شده، روشهای استاندارد شناسایی باکتریها مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). به منظور شناسایی قارچها نیز از کشت روی لام و شفاف سازی با محلول لاکتوفنل کاتن بلو استفاده شد (۲۰، ۲۱).

### یافته‌ها

نتایج حاصل از اندازه گیریهای انجام شده بر روی پساب ورودی به واحد بیولوژیکی و لجن فعال داخل این واحد در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج، مقدار pH در تمامی نمونهها در محدوده خنثی بوده که به دلیل وجود واحد خنثی سازی قبل از واحد بیولوژیکی می باشد. همچنین، میانگین مقادیر غلظت اکسیژن محلول نمونهها نیز ۳ mg/l بوده که برای انجام واکنشهای تجزیه بیولوژیکی هتروتروفیک و نیتریفیکاسیون غلظت مناسبی محسوب می شود.

جدول (۲): ویژگیهای پساب و لجن فعال در واحد

بیولوژیکی		
پارامتر	واحد	مقدار
DO	mg/l	± ۳/۰۴
دما	°C	۲/۸ ± ۳۱/۲
pH	---	± ۷/۰۵
COD	mg/l	۴۷ ± ۶۳۸
BOD5	mg/l	۴۷ ± ۲۳۷
MLSS	mg/l	± ۱۸۱۶
MLVSS	mg/l	۱۴۰۸

بر اساس نتایج بررسی میکروبی، پس از کشت اولیه نمونهها، تعداد زیادی از کلنیهای باکتریایی بر روی پلیتها در طی ۴۸

جدول (۱): خصوصیات پساب خروجی از واحد تولید ABS

پارامتر	واحد	مقدار
Q	m <sup>3</sup> /d	۵۸ ± ۴۶۹
دما	°C	۲/۹ ± ۳۴/۴۶
pH		۰/۰۱۶ ± ۶/۳۷
COD	mg/l	۴۱۴ ± ۱۳۴۵
BOD5	mg/l	۴۷۳ ± ۷۸۳
TSS	mg/l	۵۷۴ ± ۶۴۹
اکریلونیتریل	mg/l	۳۱۴
اکریلامید	mg/l	۳۸
اکریلیک اسید	mg/l	۸/۸
نیتروژن آمونیاکی	mg/l	۳۵ ± ۵۴
TKN	mg/l	۱۶۴

نمونه برداری مرکب ساعتی متناسب با دبی (ترکیب ۸ ساعته) در ۸ نوبت طی ۶ ماه مطابق با روشهای استاندارد نمونه برداری آب و فاضلاب انجام شده است. نمونه برداری از لجن فعال به منظور تعیین غلظت MLSS و MLVSS و بررسی ساختار میکروبی انجام شده است. همچنین به منظور بررسی پتانسیل حذف بیولوژیکی اکریلونیتریل، نمونه برداری از ورودی و خروجی واحد بیولوژیکی انجام شده است. در تمامی نمونهها، پارامترهای اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیایی (BOD5)، اکسیژن مورد نیاز شیمیایی (COD)، کل نیتروژن کجدا (TKN)، نیتروژن آمونیاکی و سیانید بر اساس روشهای استاندارد آزمایشهای آب و فاضلاب اندازه گیری شده است (۱۸). دما، DO و pH به صورت لحظه ای با استفاده از دستگاههای پرتابل ترمومتر، DO متر مدل (AQUALYTIC - AL20OXI) و pH متر مدل (EDT RE 357-Microprocessor) در محل اندازه گیری شده و به منظور تعیین مقادیر MLSS و MLVSS از کاغذ صافی فایبرگلاس با قطر منافذ ۰/۴۵ μ استفاده شده است. غلظت اکریلونیتریل، اکریلامید و اکریلیک اسید با استفاده از کروماتوگرافی گازی مدل (Varian CP 3800) مجهز به آشکارساز FID و ستون مویی (Capillary Column: CP- WAX) 52 CB 25m×0.32mm×1.2μm تعیین شده است.

به منظور انجام آزمایشهای جداسازی و شناسایی میکروبی، نمونههای لجن فعال با استفاده از بطریهای استریل از حوض هوادهی برداشته شده و در دمای ۴°C به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور شمارش باکتریهای هتروتروف هوازی از روشهای کشت گسترده و کشت بشقابی استفاده شد. شمارش سلولهای میکروبی با روش کشت گسترده در محیطهای کشت PCA، R2A، سابروز

نتایج کشت قارچ‌ها حاکی از شناسایی قارچ‌های آسپرژیلوس، کلدوسپوریوم، تریکودرما، کریزسپوریوم و پنی‌سیلیوم بوده است. نتایج حاصل از جداسازی و شناسایی قارچ‌ها در جدول ۴ ارائه شده است.

**جدول (۴):** قارچ‌های جداسازی شده از لجن فعال

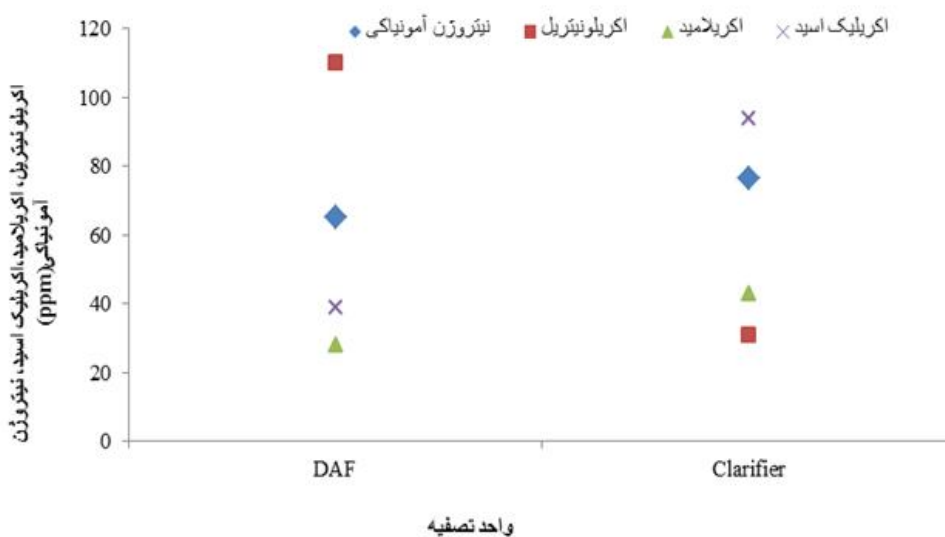
جنس	تعداد کلنی‌های	درصد از کل
آسپرژیلوس	۳۶	۶۲
تریکودرما	۶	۱۰/۳
کلدوسپوریوم	۱۲	۲۰/۶
کریزسپوریوم	۲	۳/۴۴
پنی‌سیلیوم	۲	۳/۴۴
کل	۵۸	۱۰۰

به‌منظور بررسی پتانسیل حذف اکریلونیتریل و مکانیسم تجزیه بیولوژیکی و تبدیل این ترکیب به محصولات میانی و نهایی در واحد بیولوژیکی، آنالیز پارامترهای موردنیاز در پساب ورودی و خروجی از واحدهای مختلف تصفیه از جمله واحد بیولوژیکی انجام شده است. تغییرات پارامترهای اکریلونیتریل، اکریلامید، اکریلیک اسید و آمونیاک در مراحل مختلف تصفیه در شکل ۲ نشان داده شده است.

ساعت انکوباسیون رشد کرده و با انجام آزمایش‌های تکمیلی و اختصاصی و خالص‌سازی کلنی‌های تشکیل شده، از مجموع ۲۰ جنس باکتری جداسازی شده، ۷ جنس شامل نایسریا، موراکسلا، آلكالیژنز، باسیلوس، سودوموناس، شیگلا و استافیلوکوکوس شناسایی شدند. اطلاعات مربوط به باکتری‌های جداسازی شده در جدول ۳ ارائه شده است.

**جدول (۳):** باکتری‌های جداسازی شده از لجن فعال

جنس	تعداد کلنی‌های	درصد از کل
جداسازی	جدا شده	جداسازی
شیگلا	۱۰۵	۲۴/۹
نایسریا	۱۱۰	۲۶/۱
سودوموناس	۱۳۱	۳۱/۱
آلكالیژنز	۲۱	۴/۹
استافیلوکوکوس	۲۳	۵/۵
موراکسلا	۱۳	۳/۲
باسیلوس	۱۸	۴/۳
کل	۴۲۱	۱۰۰



**شکل (۲):** تغییرات غلظت اکریلونیتریل، اکریلامید، اکریلیک اسید و آمونیاک در واحد لجن فعال

این امر هم‌زمان با کاهش غلظت اکریلونیتریل رخ داده است. مقادیر غلظت اکریلامید در طول تصفیه تقریباً ثابت بوده که نشان‌دهنده تبدیل آن به محصولات نهایی می‌باشد.

اکریلیک اسید و آمونیاک به‌عنوان محصولات نهایی تجزیه بیولوژیکی اکریلونیتریل و اکریلامید به‌عنوان محصول میانی تجزیه اکریلونیتریل می‌باشند. نتایج ارائه شده در شکل ۲ نشان‌دهنده افزایش غلظت اکریلیک اسید و آمونیاک در واحد بیولوژیکی بوده که

## بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی، از اجزاء اصلی فلوک‌های لجن فعال به شمار می‌روند. بر اساس مطالعات انجام شده، صدها سوش از باکتری‌ها در لجن فعال حضور دارند که تنها بخش کوچکی از آن‌ها توسط تکنیک‌های مبتنی بر کشت قابل ردیابی هستند (۲۲). با این حال، تکنیک‌های کشت مورد استفاده به‌منظور شناسایی باکتری‌ها قادرند داده‌های قابل اعتماد تولید کرده و به دلیل ارزان بودن و در دسترس بودن این روش‌ها به‌طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۳).

بر اساس تحقیقات انجام شده، تجزیه بیولوژیکی اکریلونیتریل در دو مرحله متوالی انجام می‌شود که نتیجه مرحله نخست، تولید اکریلامید در اثر ترشح آنزیم نیتریل هیدراتاز به‌وسیله باکتری‌های تجزیه‌کننده و حاصل مرحله دوم، تولید اکریلیک اسید و آمونیاک در اثر ترشح آنزیم آمیداز می‌باشد (۱۱). با توجه به شکل ۲ ملاحظه می‌گردد که با حذف اکریلونیتریل، غلظت اکریلیک اسید و آمونیاک افزایش یافته و غلظت اکریلامید تغییرات کم‌تری داشته است. بر اساس نتایج حاصل از جداسازی و شناسایی باکتری، از بین گونه‌های شناسایی شده، گونه‌های آلکالیژنز، سودوموناس، باسیلوس و موراکسلا متعلق به باکتری‌های نیتریفایر هتروتروف می‌باشند که این باکتری‌ها اکریلونیتریل و اکریلامید را به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار می‌دهند (۲۴، ۲۵).

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۳ ملاحظه می‌گردد که از جمله باکتری‌هایی که بر روی محیط‌های کشت مغذی رشد داده شده‌اند، دو نوع متعلق به سودوموناس و آلکالیژنز می‌باشند. بر اساس نتایج تحقیقات مشابه، توانایی سودوموناس‌ها و آلکالیژن‌ها در تجزیه ترکیبات آروماتیک و کلرینه مختلف گزارش شده است (۱۴، ۲۶). همچنین، پیش از این، توانایی سودوموناس در تجزیه اکریلونیتریل در تحقیقات مختلف گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به نتایج مطالعات Wang و همکاران اشاره نمود که حاکی از شناسایی سودوموناس نوتیکا به‌عنوان تجزیه‌کننده اکریلونیتریل در پساب صنعتی بوده است (۱۲). بر اساس نتایج مطالعات انجام شده توسط شاکرخطیبی و همکاران، گونه سودوموناس پوتیدا به‌عنوان تجزیه‌کننده ترکیبات اکریلونیتریل و اکریلامید گزارش شده است (۱۴). در مطالعه دیگری، توانایی گونه‌های مختلف سودوموناس در تجزیه اکریلامید و سیانید گزارش شده است (۲۷). سودوموناس‌ها جزء باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی هستند که هرگز به‌صورت تخمیری عمل نمی‌کنند. بعضی از باکتری‌های مربوط به این گونه قادرند بیش از ۱۰۰ نوع ماده آلی مختلف را به‌عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار دهند. توانایی بالای سودوموناس‌ها در تجزیه مواد آلی صرفاً به‌دلیل توانایی آن‌ها در تولید آنزیم‌های

کاتابولیکی نبوده بلکه، به قابلیت‌های این گونه‌ها در تنظیم مسیرهای متابولیکی مربوط می‌شود (۲۸).

از سوی دیگر، حضور باسیلوس‌ها و استافیلوکوکوس‌ها در تصفیه بیولوژیکی فاضلاب‌های صنعتی در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. در این راستا، توانایی گونه‌های باسیلوس در تجزیه اکریلامید (۲۹) و سیانید توسط محققین گزارش شده است. در مطالعات دیگر، گونه‌های باسیلوس پیومیلیس (۳۰)، باسیلوس سوبیتیلیس (۳۱) و استافیلوکوکوس سیفوری (۳۲) به‌عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده سیانید گزارش شده‌اند. همچنین، بر اساس نتایج تحقیقات انجام شده، موراکسلا به‌عنوان تجزیه‌کننده سریع اکریلامید گزارش شده است (۲۵). در خصوص توانایی شینگلا برای تجزیه آلاننده‌های موجود در پساب ABS تاکنون گزارشی ارائه نشده است.

بر اساس نتایج بررسی‌های میکروبی، تمام میکروارگانیسم‌های شناسایی شده در این مطالعه غیرمتحرک بوده‌اند. این نوع باکتری‌ها در پژوهش‌های متعددی به‌منظور تجزیه مواد سمی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳۳). بر این اساس، Akcil و همکاران در مطالعه‌ای کارآمدی باکتری‌های غیرمتحرک در سیستم‌های تصفیه فاضلاب‌های حاوی مواد سمی را تأیید نموده‌اند (۳۴).

با وجود اینکه رشد قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها در سیستم‌های لجن فعال بسیار محدود می‌باشد، برخی از گونه‌های قارچی در فلاک‌های لجن فعال مشاهده شده‌اند (۲۲). بر اساس نتایج تحقیقات انجام شده، بخشی از تخریب بیولوژیکی ترکیبات آلی مربوط به جذب بیولوژیکی می‌باشد که در این فرایند، ترکیبات سمی به جای تجزیه بیولوژیکی توسط میکروارگانیسم‌ها، جذب سلول‌های میکروبی می‌شوند. در این مکانیسم، سلول‌های زنده و مرده میکروبی تأثیرگذار بوده و قارچ‌ها به‌عنوان جاذب‌های بیولوژیکی (Biosorbent) شناخته شده‌اند. در این میان، گونه‌های اسپریلوس می‌توانند در جذب و تجزیه بیولوژیکی ترکیبات سیانیددار مؤثر باشند (۳۵-۳۷). بر اساس نتایج یک مطالعه، اسپریلوس به‌عنوان قارچ تجزیه‌کننده اکریلامید گزارش شده است (۲۹). از سوی دیگر، توانایی گونه‌های تریکودرما (۳۸) و پنی‌سیلیوم مایسنسکی (۳۹) در تجزیه ترکیبات سیانیددار گزارش شده است. در خصوص توانایی دیگر قارچ‌های شناسایی شده در این مطالعه در تجزیه بیولوژیکی و یا جذب بیولوژیکی ترکیبات اکریلونیتریل و اکریلامید، گزارشی منتشر نشده است.

در این مطالعه، به‌منظور ارزیابی حضور دیگر میکروارگانیسم‌ها در واحد بیولوژیکی لجن فعال، از مشاهدات میکروسکوپی استفاده شد. نتایج این مشاهدات حاکی از حضور جنس‌های پروتوزوا و متازوا به ویژه روتیفرها بوده که نشان‌دهنده سازگاری این میکروارگانیسم‌ها

شناسایی شده متعلق به خانواده ساپروفیت‌های هایفومیست شفاف بوده‌اند، ۶۲ درصد جمعیت قارچی متعلق به جنس اسپرژیلوس بوده و این قارچ به‌عنوان قارچ غالب شناسایی شده است. ارزیابی پتانسیل تجزیه بیولوژیکی اکریلونیتریل نشان داد که میکروارگانیسم‌های غالب موجود در لجن فعال توانایی حذف ۷۱ درصد از اکریلونیتریل ورودی به واحد بیولوژیکی را داشته‌اند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از امور بهداشت، ایمنی، محیط زیست شرکت پتروشیمی تبریز به دلیل حمایت‌های آنان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### References:

1. Chang C-Y, Tanong K, Chiemchaisri C, Vigneswaran S. Feasibility study of a cyclic anoxic/aerobic two-stage MBR for treating ABS resin manufacturing wastewater. *Bioresour Technol* 2011 ; 102(9): 5325-30.
2. Popuri SR, Chang C-Y, Xu J. A study on different addition approach of Fenton's reagent for DCOD removal from ABS wastewater. *Desalination* 2011;277(1): 141-6.
3. Leeuwen FXR KM, editor. *Air Quality Guidelines*. Copenhagen: WHO Regional publications; 2000.
4. Blum DJW, Speece RE. A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *J Water Pollut Control Fed* 1991: 198-207.
5. Chang C-Y, Chang J-S, Lin Y-W, Erdei L, Vigneswaran S. Quantification of air stripping and biodegradation of organic removal in acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS) industry wastewater during submerged membrane bioreactor operation. *Desalination* 2006;191(1): 162-8.
6. Watanabe I, Satoh Y, Enomoto K. Screening, isolation and taxonomical properties of microorganisms having acrylonitrile-hydrating activity. *Agric Biol Chem* 1987;51(12): 3193-9.
7. Bigey F, Chebrou H, Fournand D, Arnaud A. Transcriptional analysis of the nitrile degrading operon from *Rhodococcus* sp. ACV2 and high level production of recombinant amidase with an *Escherichia coli*-T7 expression system. *Appl Microbiol* 1999;86(5): 752-60.
8. Wang C-C, Lee C-M, Chen L-J. Removal of nitriles from synthetic wastewater by acrylonitrile utilizing bacteria. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2004;39(7):1767-79.
9. Wyatt JM, Knowles CJ. The development of a novel strategy for the microbial treatment of acrylonitrile effluents. *Biodegradation* 1995;6(2): 93-107.
10. Deshkar A, Dhamorikar N, Godbole S, Krishnamurthi K, Saravanadevi S, Vijay R, et al. Bioremediation of soil contaminated with organic compounds with special reference to acrylonitrile. *Ann Chim* 2002;93(9-10): 729-37.
11. Li T, Liu J, Bai R, Ohandja D-G, Wong F-S. Biodegradation of organonitriles by adapted activated sludge consortium with acetonitrile-degrading microorganisms. *Water Res* 2007;41(15): 3465-73.
12. Wang CC, Lee CM, Cheng PW. Acrylonitrile removal from synthetic wastewater and actual

- industrial wastewater with high strength nitrogen using a pure bacteria culture. *Water Sci Technol* 2001;43(2): 349-54.
13. Wang C-C, Lee C-M. Denitrification with acrylamide by pure culture of bacteria isolated from acrylonitrile-butadiene-styrene resin manufactured wastewater treatment system. *Chemosphere* 2001;44(5): 1047-53.
  14. Shakerkhatibi M GH, Ayati B, Fatehifar E. Isolation and identification of an acrylonitrile-degrading bacterium from a petrochemical activated sludge and survey of its efficiency in acrylonitrile removal. *Scientific Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research* 2009;6(3-4): 119-28. (Persian)
  15. Chaillan F, Lefleche A, Bury E, Phantavong Yh, Grimont P, Saliot A, et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol* 2004;155(7): 587-95.
  16. Thangaraj K, Kapley A, Purohit HJ. Characterization of diverse *Acinetobacter* isolates for utilization of multiple aromatic compounds. *Bioresour Technol* 2008;99(7):2488-94.
  17. El-Sayed WS, Ibrahim MK, Abu-Shady M, El-Beih F, Ohmura N, Saiki H, et al. Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67(9):2026-9.
  18. Federation WE, American Public Health A. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC, USA: American Public Health Association (APHA); 2005.
  19. Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB. Manual of methods for general bacteriology. Washington, DC: American society for microbiology; 1981. P.31.
  20. Kersters K, Vancanneyt M. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2005 [cited 2016 Aug 12]; Available from: <https://biblio.ugent.be/publication/436918>
  21. Kreisel H, Schauer F. *Mycological laboratory methods*. Gustav Fischer Verlag; 1987.
  22. Bitton G. *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons; 2005.
  23. Shokrollahzadeh S, Azizmohseni F, Golmohammad F, Shokouhi H, Khademhaghighat F. Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran. *Bioresour technol* 2008;99(14): 6127-33.
  24. Hu TL, Kung KT. Study of heterotrophic nitrifying bacteria from wastewater treatment systems treating acrylonitrile, butadiene and styrene resin wastewater. *Water Sci Technol* 2000;42(3-4): 315-21.
  25. Jebasingh SEJ, Lakshmikandan M, Rajesh RP, Raja P. Biodegradation of acrylamide and purification of acrylamidase from newly isolated bacterium *Moraxella osloensis* MSU11. *Int Biodeter Biodegr* 2013;85: 120-5.
  26. Portune K, Prez M, Lvarez F, C G. Investigating bacterial populations in styrene-degrading biofilters by 16S rDNA tag pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;99(1): 3-18.
  27. Dash RR, Dash RR, Balomajumdar C. Treatment of cyanide bearing effluents by adsorption, biodegradation and combined processes: effect of process parameters. *Desalin Water Treat* 2014;52(16-18): 3355-66.
  28. Rehm H, Reed G, editors. *Biotechnology*. 2<sup>nd</sup> ed: Weinheim; 1999.
  29. Charoenpanich J. Removal of acrylamide by microorganisms. Edited by Yogesh B Patil and Prakash Rao; 2013.P.99.
  30. Skowronski B, Strobel GA. Cyanide resistance and cyanide utilization by a strain of *Bacillus pumilus*. *Can J Microbiol* 1969;15(1): 93-8.
  31. Nwokoro O, Dibua MEU. Degradation of soil cyanide by single and mixed cultures of

- Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus subtilis*. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014;65(1): 113-9.
32. Kowalska M, Bodzek M, Bohdziewicz J. Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms. *Process Biochem* 1998;33(2): 189-97.
  33. Thuy LDT, Grigoreva TV, Yakusheva OI, Nikonorova VN, Ilinskaya ON. Optimization of petrochemical wastewater pretreatment in bioreactor with immobilized microflora. *Proceedings of Kazan University Natural Sciences/Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta Seriya Estestvennye Nauki* 2013;155(2).
  34. Akcil A. Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnol Adv* 2003;21(6): 501-11.
  35. Santos BAQ, Ntwampe SKO, Doughari JH, Muchatibaya G. Operating conditions for the continuous bioremediation of free cyanide contaminated wastewater using *Aspergillus awamori*. *Water Sci Technol* 2014; 69(5): 989-93.
  36. Sabatini L, Ferrini C, Micheloni M, Pianetti A, Citterio B, Parlani C, et al. Isolation of a strain of *Aspergillus fumigatus* able to grow in minimal medium added with an industrial cyanide waste. *World J Microbiol Biotechnol* 2012;28(1): 165-73.
  37. Patil YB, Paknikar KM. Development of a process for biodegradation of metal cyanides from waste waters. *Process Biochem* 2000;35(10): 1139-51.
  38. Bodzek M, Bohdziewicz J, Kowalska Mg. Immobilized enzyme membranes for phenol and cyanide decomposition. *J Membrane Sci* 1996;113(2): 373-84.
  39. Barclay M, Hart A, Knowles CJ, Meeussen JCL, Tett VA. Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enzyme Microbial Technol* 1998;22(4): 223-31.



## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DOMINANT MICROORGANISMS IN ACTIVATED SLUDGE OF ABS EFFLUENT TREATMENT PLANT AND EVALUATION OF THEIR POTENTIAL FOR ACRYLONITRILE BIODEGRADATION

Zahra Akbari<sup>1</sup>, Mohammad Shaker Khatibi<sup>2\*</sup>, Mohammad Mosaferi<sup>3</sup>, Najibe Asl Rahnema Akbari<sup>4</sup>, Zohre Shiri<sup>5</sup>, Mohammad Reza Farshchian<sup>6</sup>

Received: 20 Apr, 2016; Accepted: 22 June, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Acrylonitrile is widely used as the main raw material in the production of Acrylonitrile butadiene styrene (ABS). It can be considered as pollutant in ABS process effluent. Since the importance of biological systems to treatment the ABS effluents, this study aimed to identify the dominant microorganisms in biological wastewater treatment plant and to evaluate the potential for biodegradation of acrylonitrile.

**Materials & Methods:** Microbial populations in the biological unit were examined during 8 runs of sampling. The culture media including PCA, R2A, Sabouraud Dextrose Agar and Rose Bengal were used for bacterial and fungal culturing. Biochemical tests were used to identify bacterial genus and the culturing was used for fungal identification. The potential of acrylonitrile biodegradation was assessed through the measurement of the concentration of acrylonitrile, acrylamide and acrylic acid.

**Results:** A total of 20 bacteria isolated, 7 genera including *Neisseria*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Shigella* and *Staphylococcus* were identified as dominant. The fungal genera including *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, and *Penicillium* were also identified as dominant. From a total of 71% acrylonitrile in biological unit. Acrylic acid concentration as breakdown product of acrylonitrile in influent and effluent were 39 and 94 mg/l, respectively. However, acrylamide concentration as a byproduct was almost constant.

**Conclusion:** Dominant bacterium and fungi are identified as *Pseudomonas* and *Aspergillus*, respectively. Among the isolated bacteria, the genera of *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Moraxella* belong to heterotrophic nitrifying bacteria that have the ability to breakdown nitrogen compounds such as acrylonitrile.

**Keywords:** Acrylonitrile butadiene styrene, Activated sludge, Industrial wastewater, Microbial structure

**Address:** Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**Tel:** +98 41 33355952

**Email:** shakerkhatibim@tbzmed.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(5): 383 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> M.S. Student, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Environmental Engineering Department, Faculty of Health Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> Professor, Environmental Health Engineering Department, Faculty of Health Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>4</sup> Lecturer, Parasitology Department, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>5</sup> M.S. in Microbiology, Faculty of Microbiology, AL Zahra University, Tehran, Iran

<sup>6</sup> M.S. in Microbiology, Faculty of Health Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran