دانشکده مهندسی شیمی

بررسی حذف بیولوژیکی فنل در بیوراکتور هواگرد

دانشجو:

مریم خاکباز ورکانی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی شیمی گرایش بیوتکنولوژی

اردیبهشت ماه **۱۳۸۷**

دانشکده مهندسی شیمی

بررسی حذف بیولوژیکی فنل در بیوراکتور هواگرد

دانشجو:

مریم خاکباز ورکانی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی شیمی گرایش بیوتکنولوژی

استاد راهنما:

دکتر فرشته نعیم‌پور

اردیبهشت ماه **۱۳۸۷**

به نام آنکه جان را فکرت آموخت

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم که همواره در زندگی پشتیبان من بوده‌اند.

تشکر و قدردانی:

با تشکر از سرکار خانم دکتر فرشته نعیم‌پور که با راهنمایی‌های خردمندانه‌اشان انجام این تحقیق را میسر فرمودند.

در اینجا لازم می‌دانم از دوست گرامی جناب آقای مهندس پرتوی که زحمات زیادی را در این راه متحمل شدند، تشکر و قدردانی نمایم.

چکیده

حضور ترکیبات آلی حلقوی از جمله فنل در پساب بسیاری از صنایع، باعث اهمیت روش‌های حذف آن گردیده است. روش‌های زیستی حذف فنل، به‌عنوان یکی از آلاینده‌های محیط‌زیست، در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از طرفی استفاده از بیوراکتور هواگرد، در تصفیه پساب‌های صنعتی رویکردی جدید در این مقوله به‌شمار می‌آید. در این تحقیق، پس از مطالعه‌ی منابع مختلف و بررسی بیوراکتورهای به‌کار رفته در تصفیه پساب و با توجه به مباحث هیدرودینامیکی، یک بیوراکتور هواگرد خارجی با حجم اسمی یک لیتر طراحی و ساخته شد. ابتدا به بررسی عوامل موثر بر رشد و رفتار سینتیکی باکتری *Alcaligenes faecalis* در کشت‌لرزان پرداخته شد. پس از به‌دست آوردن شرایط بهینه رشد بر روی فنل، به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، اثر غلظت اولیه و نرخ هوادهی بر زمان تجزیه کامل فنل در بیوراکتور هواگرد با استفاده از طراحی آزمایش‌ها و روش رویه پاسخ، بهینه‌سازی آماری متغیرها برای کوتاه‌کردن زمان تجزیه غلظت‌های بالای فنل مورد بررسی قرار گرفت. با انجام آزمایش در کشت لرزان به این نتیجه رسیدیم که استفاده از ۷درصد حجمی مایه‌تلقیح با عمر ۲۸ ساعت باعث کاهش ۳۰ درصدی زمان تجزیه کامل فنل می‌شود. نتایج حاصل از بیوراکتور هواگرد نشان می‌دهد که غلظت اولیه فنل، هم بر زمان تجزیه و هم بر میزان توده سلولی تولیدشده اثرگذار است، درحالی‌که نرخ هوادهی، بیشتر بر زمان تجزیه اثر می‌گذارد و بر میزان توده سلولی تولیدشده اثر قابل‌توجهی ندارد. بررسی رفتار سینتیکی باکتری *Alcaligenes faecalis* در کشت‌لرزان و بیوراکتور هواگرد، نشان می‌دهد که معادله خطی هالدن به‌خوبی بیانگر رفتار این باکتری می‌باشد. با تغییر سیستم مورد استفاده در تجزیه‌زیستی فنل از کشت لرزان به بیوراکتور هواگرد (در نرخ هوادهی ۳ لیتر بر دقیقه)، نرخ رشد ویژه ماکزیمم از ۰,۱۱۳ به ۰,۸۹بر ساعت و ضریب بازدارندگی از ۳۶۱,۱ به ۴۴,۹ میلی‌گرم بر لیتر می‌رسند، که این نشان‌دهنده‌ی بهبود روند تجزیه‌زیستی فنل در بیوراکتور هواگرد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *فنل، تجزیه‌زیستی، بیوراکتور هواگرد، کشت لرزان، عمر و حجم مایه‌تلقیح، غلظت اولیه فنل، نرخ هوادهی*

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل۱

مقدمه ۱

۱-۱. مقدمه ۲

فصل۲

مروری بر منابع مطالعاتی ۶

۲-۱. مقدمه ۷

۲-۲. میکروارگانیسم و اثر آن در حذف فنل ۷

۲-۲-۱. روش‌های حذف فنل ۸

۲-۲-۲. میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیب‌های آروماتیک مانند فنل ۹

۲-۲-۳. مکانیسم تجزیه هوازی فنل ۱۱

۲-۲-۴. محیط‌های کشت متداول در حذف فنل ۱۳

۲-۳. پارامترهای موثر در تجزیه زیستی فنل ۱۴

۲-۳-۱. حجم مایه‌تلقیح ۱۴

۲-۳-۲. عمر مایه‌تلقیح ۱۵

۲-۳-۳. اکسیژن ۱۷

۲-۳-۴. دما ۱۸

۲-۳-۵. pH ۲۰

۲-۳-۶. تثبیت باکتری ۲۲

۲-۳-۷. نوع بیوراکتور ۲۲

۲-۴. سینتیک رشد باکتری ۲۴

۲-۴-۱. مدل سینتیکی رشد ۲۴

۲-۴-۲. غلظت بازدارندگی فنل ۲۶

۲-۵. روش‌های اندازه‌گیری فنل ۲۷

۲-۶. بیوراکتور هواگرد ۲۹

۲-۶-۱. ابعاد بیوراکتور ۳۰

۲-۶-۲. نرخ هوادهی ۳۱

۲-۶-۳. ماندگی گاز ۳۲

۲-۶-۴. رابطه میان ماندگی گاز در بالابر و ناودان ۳۴

۲-۷. طراحی و تحلیل آزمایش‌ها ۳۵

۲-۷-۱. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از روش رویه پاسخ ۳۷

۲-۷-۲. کاربرد روش سطح پاسخ در فرآیندهای تخمیری ۳۸

فصل۳ ۴۲

مواد و روش‌ها ۴۲

۳-۱. مقدمه ۴۳
۳-۲. مواد ۴۳
۳-۳. محیط‌های کشت ۴۵
۳-۳-۱. محیط‌کشت نیوترینت آگار ۴۵
۳-۳-۲. محیط‌کشت LB ۴۶
۳-۳-۳. محیط‌کشت نمک‌های معدنی ۴۷
۳-۴. استریلیزاسیون ۴۹
۳-۵. میکروارگانیسم، نگهداری آن و تهیه مایه‌تلقیح ۵۰
۳-۵-۱. تهیه کشت جامد اولیه ۵۱
۳-۵-۲. تهیه زیرکشت ۵۲
۳-۵-۳. تهیه مایه‌تلقیح ۵۳
۳-۶. روش‌های اندازه‌گیری ۵۴
۳-۶-۱. اندازه‌گیری pH ۵۴
۳-۶-۲. اندازه‌گیری وزن خشک ۵۴
۳-۶-۳. آنالیز فنل ۵۷
۳-۷. بررسی سینتیک رشد ۶۲
۳-۸. آزمایش‌های انجام شده در کشت لرزان ۶۲
۳-۸-۱. استریلیزاسیون ۶۳
۳-۸-۲. تلقیح ۶۳
۳-۸-۳. نمونه‌گیری ۶۴
۳-۹. طراحی، ساخت و آزمایش‌های مربوط به بیوراکتور هواگرد ۶۴
۳-۹-۱. طراحی و ساخت ۶۴
۳-۹-۲. استریلیزاسیون ۶۶
۳-۹-۳. هوادهی ۶۶
۳-۹-۴. تلقیح ۶۷
۳-۹-۵. نمونه‌گیری از بیوراکتور ۶۷
۳-۹-۶. اندازه‌گیری ماندگی گاز ۶۸
۳-۱۰. طراحی و تحلیل آزمایش‌ها ۶۹
۳-۱۰-۱. متغیرها، توابع هدف و روش طراحی آزمایش‌ها ۷۰
۳-۱۰-۲. طرح آزمایش‌ها ۷۱
۳-۱۰-۳. تحلیل نتایج ۷۲
۳-۱۰-۴. بررسی دقت نرم‌افزار در پیش‌بینی رفتار تابع هدف ۷۳
۳-۱۰-۵. بهینه‌سازی ۷۳

فصل۴ ۷۵

نتایج و بحث ۷۵

۴-۱. مقدمه ۷۶

۴-۲. آزمایش‌های انجام‌شده در کشت لرزان ۷۶

۴-۲-۱. بررسی اثر عمر مایه تلقیح بر رشد باکتری و نرخ تجزیه فنل ۷۷

۴-۲-۲. بررسی اثر حجم مایه تلقیح بر رشد باکتری و نرخ تجزیه فنل ۷۹

۴-۲-۳. حذف فنل توسط اکسیداسیون شیمیایی ۸۱

۴-۲-۴. منحنی رشد باکتری *Alcaligenes faecalis* ۸۱

۴-۲-۵. غلظت بازدارندگی سوبسترا ۸۲

۴-۲-۶. مدل سینتیکی رشد باکتری *Alcaligenes faecalis* ۸۵

۴-۲-۷. بررسی اثر تثبیت بر رشد باکتری و نرخ تجزیه فنل ۸۷

۴-۳. آزمایش‌های انجام‌شده در بیوراکتور هواگرد ۸۹

۴-۳-۱. بررسی اثر نرخ هوادهی بر ماندگی گاز ۸۹

۴-۳-۲. حذف فنل توسط اکسیداسیون شیمیایی ۹۰

۴-۳-۳. اثر شدت هوادهی و غلظت اولیه بر رشد باکتری و زمان تجزیه ۹۱

۴-۳-۴. غلظت بازدارندگی سوبسترا ۹۷

۴-۳-۵. مدل سینتیکی رشد باکتری *A. faecalis* ۱۰۰

۴-۳-۶. مقایسه زمان تجزیه فنل در کشت لرزان و بیوراکتور هواگرد ۱۰۲

۴-۳-۷. بررسی اثر غلظت و نرخ هوادهی با آنالیز واریانس ۱۰۳

۴-۳-۸. بررسی دقت پیش‌بینی نرم افزار ۱۰۶

۴-۳-۹. بهینه‌سازی شرایط ۱۰۷

فصل۵

جمع‌بندی و پیشنهاد ۱۰۹

۵-۱. جمع‌بندی ۱۱۰

۵-۲. پیشنهادات ۱۱۱

پیوست الف

مشخصات فنل ۱۱۲

پیوست ب

نتایج آزمایش‌های انجام‌شده در کشت لرزان ۱۱۴

پیوست ج

نتایج آزمایش‌های انجام‌شده در بیوراکتور هواگرد ۱۲۲

مراجع و مآخذ ۱۳۱

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۲-۱. مکانیسم تجزیه هوازی فنل توسط قارچ *Scedosporium apiospermum* ۱۲

شکل۲-۲. مسیر کاتابولیکی تجزیه‌زیستی فنل ۱۲

شکل۲-۳. اثر حجم مایه‌تلقیح بر تجزیه فنل ۱۵

شکل۲-۴. رشدسلولی و تجزیه‌فنل‌درغلظت‌های اولیه مختلف با دانسیته‌نوری مایه‌تلقیح (a)۰,۵۹۴، (b) ۰,۹۱۷و (c) ۱,۲۲۶ ۱۶

شکل۲-۵. اثر دما بر تجزیه فنل توسط قارچ *Fusarium* sp. HJ01 ۱۹

شکل۲-۶. اثر دما بر راندمان حذف فنل در تماس‌دهنده بیولوژیکی دوار ۱۹

شکل۲-۷. اثر دما بر رشد قارچ *Scedosporium apiospermum* در حضور فنل با غلظت ۵ میلی‌مولار ۲۰

شکل۲-۸. اثر pH بر تجزیه فنل توسط قارچ *Fusarium* sp. HJ01 ۲۱

شکل۲-۹. اثر pH بر رشد قارچ *Scedosporium apiospermum* در حضور فنل با غلظت ۵ میلی‌مولار ۲۱

شکل۲-۱۰. تجزیه فنل در حالت آزاد (□) و تثبیت‌شده (●SIKUG 041 و SIKUG 012✱) توسط باکتری *Acinetobacter* ۲۲

شکل۲-۱۱. سازگاری مدل رشد Haldane و داده‌های تجربی ۲۴

شکل۲-۱۲. نرخ رشد ویژه باکتری *Alcaligenes faecalis* در غلظت‌های اولیه مختلف فنل ۲۷

شکل۲-۱۳. انواع بیوراکتور هواگرد ۳۰

شکل۲-۱۴. اثر نرخ هوادهی بر زمان تجزیه کامل فنل با غلظت‌های اولیه: (♦)۲۰۰؛ (■)۵۰۰؛ (▲)۸۰۰؛ (●)۱۲۰۰و (✱)۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۳۲

شکل۲-۱۵. مقایسه اثر نرخ هوادهی بر میزان ماندگی گاز در غلظت‌های مختلف ذرات جامد: (□)۰٪؛ (○) ۵٪ و (Δ) ۱۰٪ ۳۳

شکل۲-۱۶. اثر ذرات جامد و نرخ هوادهی بر ماندگی گاز در قطرهای مختلف اسپارژر: (●) ۱,۶؛ (□) ۱ و (▼) ۰,۵ میلی‌متر ۳۴

شکل۳-۱. باکتری *Alcaligenes faecalis* (ATCC 8750) ۵۱

شکل۳-۲. کشت‌خطی باکتری *A. faecalis* بر روی پلیت نیوترینت آگار ۵۲

شکل۳-۳. رابطه غلظت و دانسیته نوری باکتری *Alcaligenes faecalis* در طول موج ۶۰۰ نانومتر ۵۶

شکل۳-۴. تغییر رنگ محلول‌های فنلی با غلظت‌های (A)۱؛ (B)۲؛ (C)۳؛ (D)۴ و (E)۵ میلی‌گرم بر لیتر ۵۸

شکل۳-۵. دستگاه فتومتر Palintest ۶۰

شکل۳-۶. نمایی شماتیک از بیوراکتور هواگرد خارجی طراحی و ساخته‌شده به‌همراه اتصالات مربوطه ۶۵

شکل۳-۷. روتامتر مدل LZB-6WB، با قابلیت اندازه‌گیری ۱۰-۱ لیتر بر دقیقه ۶۷

شکل۳-۸. مانومتر U شکل مورد استفاده در اندازه‌گیری ماندگی گاز ۶۸

شکل۴-۱. اثر عمر مایه‌تلقیح بر سرعت تجزیه‌زیستی فنل با غلظت اولیه ۴۰۰میلی‌گرم بر لیتر توسط باکتری *Alcaligenes faecalis* در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰ rpm ۷۸

شکل۴-۲. اثر عمر مایه‌تلقیح بر رشد باکتری *Alcaligenes faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰ rpm ۷۸

شکل۴-۳. اثر حجم مایه‌تلقیح بر رشد باکتری *Alcaligenes faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰ rpm ۷۹
شکل۴-۴. اثر حجم مایه‌تلقیح بر سرعت تجزیه‌زیستی فنل با غلظت اولیه ۴۰۰میلی‌گرم بر لیتر توسط باکتری *Alcaligenes faecalis* در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰ rpm ۸۰
شکل۴-۵. منحنی رشد باکتری *Alcaligenes faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰ rpm ۸۲
شکل۴-۶. تجزیه فنل با غلظت‌های اولیه ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر توسط باکتری *Alcaligenes faecalis* دردمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور۲۰۰ rpm ۸۳
شکل۴-۷. میزان رشد باکتری *Alcaligenes faecalis* بر روی فنل با غلظت‌های اولیه ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور۲۰۰ rpm ۸۳
شکل۴-۸. تاثیر غلظت اولیه فنل بر طول فاز تاخیر ۸۵
شکل۴-۹. مقایسه داده‌های آزمایشگاهی با مدل سینتیکی خطی هالدن ۸۶
شکل۴-۱۰. تجزیه فنل در غلظت‌های اولیه مختلف توسط باکتری *A. faecalis* در حالت تثبیت‌شده دردمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰ rpm ۸۸
شکل۴-۱۱. تجزیه فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۴۰۰ توسط باکتری *A. faecalis* در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۲
شکل۴-۱۲. میزان رشد باکتری *A. faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۴۰۰ در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۳
شکل۴-۱۳. تجزیه فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۶۰۰ توسط باکتری *A. faecalis* در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۳
شکل۴-۱۴. میزان رشد باکتری *A. faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۶۰۰ در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۴
شکل۴-۱۵. تجزیه فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۸۰۰ توسط باکتری *A. faecalis* در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۴
شکل۴-۱۶. میزان رشد باکتری *A. faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۸۰۰ در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۵
شکل۴-۱۷. تجزیه فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۱۰۰۰ توسط باکتری *A. faecalis* در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۵
شکل۴-۱۸. میزان رشد باکتری *A. faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۱۰۰۰ در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۶
شکل۴-۱۹. تجزیه فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۱۲۰۰ توسط باکتری *A. faecalis* در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۶
شکل۴-۲۰. میزان رشد باکتری *A. faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۱۲۰۰ در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۷
شکل۴-۲۱. تجزیه فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۱۴۰۰ توسط باکتری *A. faecalis* در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۸

شکل۴-۲۲. میزان رشد باکتری *A. faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۱۴۰۰ در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۸
شکل۴-۲۳. تجزیه فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۱۶۰۰ توسط باکتری *A. faecalis* در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۹
شکل۴-۲۴. میزان رشد باکتری *A. faecalis* بر روی فنل با غلظت اولیه (mg/lit) ۱۶۰۰ در بیوراکتور هواگرد با نرخ‌های هوادهی مختلف ۹۹
شکل۴-۲۵. تطابق مدل سینتیکی خطی هالدن با داده‌های آزمایشگاهی در نرخ‌های هوادهی مختلف ۱۰۱
شکل۴-۲۶. بررسی اثر غلظت و نرخ هوادهی بر زمان تجزیه فنل با نرم‌افزار DX7 ۱۰۵
شکل۴-۲۷. بررسی اثر غلظت و نرخ هوادهی بر توده سلولی تولیدشده با نرم‌افزار DX7 ۱۰۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱. محیط‌کشت مورد استفاده میکروارگانیسم‌های مختلف برای تجزیه فنل ۱۳
جدول۲-۲. اثر غلظت اولیه توده‌زیستی بر نرخ تجزیه فنل ۱۷
جدول۲-۳. اثر نرخ هوادهی بر تجزیه فنل با غلظت اولیه ppm ۴۰۰ ..... ۱۸
جدول۲-٤. اثر دما بر راندمان حذف فنل با باکتری *Pseudomonas putida* DSM 548 ..... ۱۸
جدول۲-۵. میزان حذف فنل با تغییر پارامترهای تماس‌دهنده بیولوژیکی دوار ۲۳
جدول۲-٦. گستره غلظت فنل برای باکتری‌های مختلف ۲۶
جدول۲-۷. روش‌های مختلف اندازه‌گیری فنل ۲۸
جدول۲-۸. ابعاد بیوراکتورهای هواگرد مورد استفاده در پژوهش‌های مختلف ۳۱
جدول۲-۹. رابطه میان ماندگی گاز در بالابر و ناودان در راکتورهای هواگرد ۳۵
جدول۲-۱۰. سطوح متغیرها و کد مربوطه در بهینه‌سازی تولید گلوتامیناز ۳۹
جدول۲-۱۱. مقدار p برای توابع پاسخ ۴۰
جدول۲-۱۲. تجزیه و تحلیل داده‌های تجزیه زیستی فنل با روش رویه پاسخ توسط نرم‌افزار Design Expert ۴۱
جدول۳-۱. لیست مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش‌ها ۴۴
جدول۳-۲. مواد تشکیل‌دهنده ۲۸ گرم نیوترینت آگارِ خشک ۴۵
جدول۳-۳. ترکیب محیط‌کشت MSM، غلظت محلول غلیظ و حجم لازم از محلول غلیظ برای تهیه ۵۰cc محیط‌کشت ۴۸
جدول۳-٤. مشخصات نمونه‌گیرهای به‌کار رفته در آزمایش‌ها ۴۹
جدول۳-۵. جذب نمونه‌های استاندارد در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر ۵۹
جدول۳-٦. بررسی دقت دستگاه فتومتر Palintest ۶۲
جدول۳-۷. مشخصات هندسی بیوراکتور ۶۶
جدول۳-۸. طرح آزمایش‌های انجام‌شده در بیوراکتور هواگرد ۷۲
جدول٤-۱. دانسیته نوری مایه‌تلقیح با عمرهای مختلف ۷۷
جدول٤-۲. میزان حذف فنل توسط اکسیداسیون شیمیایی در محلولی با غلظت اولیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل ۸۱
جدول٤-۳. بررسی اثر غلظت اولیه فنل بر نرخ تجزیه و زمان لازم برای تجزیه کاملِ توسط باکتری *Alcaligenes faecalis* در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دورrpm ۲۰۰ ..... ۸۴
جدول٤-٤. مقدار نرخ رشد ویژه در غلظت‌های اولیه مختلف فنل ۸۶
جدول٤-۵. مقایسه رشد باکتری *A. faecalis* در حالت آزاد و تثبیت‌شده در غلظت‌های اولیه مختلف فنل دردمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور rpm ۲۰۰ ..... ۸۸
جدول٤-٦. مقایسه زمان لازم برای تجزیه فنل در غلظت‌های اولیه مختلف توسط باکتری *A. faecalis* دردمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور rpm ۲۰۰ ..... ۸۸
جدول٤-۷. بررسی اثر نرخ هوادهی بر ماندگی گاز ۹۰
جدول٤-۸. میزان حذف فنل توسط اکسیداسیون شیمیایی در محلولی با غلظت اولیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنل ۹۱
جدول٤-۹. اثر نرخ هوادهی بر مقادیر پارامترهای معادله‌ی خطی هالدن ۱۰۰
جدول٤-۱۰. مقایسه زمان تجزیه‌زیستی کامل فنل (hr) در کشت لرزان و بیوراکتور هواگرد ۱۰۲

جدول٤-١١. درصد کاهش زمان تجزیه‌زیستی کامل فنل در بیوراکتور هواگرد در مقایسه با کشت لرزان.....۱۰۳
جدول٤-١٢. مقایسه ثوابت سینتیکی معادله‌ی خطی هالدن در بیوراکتور و کشت لرزان.....۱۰۳
جدول٤-١٣. آنالیز واریانس متغیر زمان.....۱۰۴
جدول٤-١٤. آنالیز واریانس متغیر غلظت.....۱۰۴
جدول٤-١٥. اثر غلظت (A) و نرخ هوادهی (B) بر زمان.....۱۰۵
جدول٤-١٦. اثر غلظت (A) و نرخ هوادهی (B) بر توده سلولی.....۱۰۵
جدول٤-١٧. مشخصات آزمایش‌های بررسی دقت پیش‌بینی نرم‌افزار.....۱۰۷
جدول٤-١٨. مقایسه نتایج حاصل از انجام آزمایش و پیش‌بینی نرم‌افزار.....۱۰۷
جدول٤-١٩. شرایط بهینه برای تجزیه بیشترین مقدار فنل در کوتاه‌ترین زمان ممکن.....۱۰۸

فهرست علائم اختصاری

غلظت محلول غلیظ	C_1 (mg/lit)
غلظت نمک در محلول	C_2 (mg/lit)
حجم لازم از محلول غلیظ	V_1 (milt)
حجم محلول مورد نظر	V_2 (milt)
سرعت گردش در کشت لرزان	rpm (1/min)
نرخ رشد ویژه	μ (1/hr)
نرخ رشد ویژه ماکزیمم	μ_{max} (1/hr)
غلظت توده سلولی	X (mg/lit)
غلظت اولیه توده سلولی	X (mg/lit)
غلظت فنل	S (mg/lit)
غلظت اولیه فنل	S (mg/lit)
ضریب اشباع	K_S (mg/lit)
ضریب بازدارندگی	K_i (mg/lit)
اختلاف فشار	ΔP (Pa)
دانسیته مایع درون مانومتر	P (kg/m^3)
دانسیته مایع	ρ_l (kg/m^3)
دانسیته هوا	ρ_g (kg/m^3)
اختلاف ارتفاع در مانومتر	H (m)
ماندگی گاز در بالابر	ε_g
شتاب گرانش	G (m/s^2)
فاصله عمودی بین دو خروجی در بالابر	L (m)
متغیر طراحی آزمایش‌ها (غلظت اولیه فنل)	A (mg/lit)
متغیر طراحی آزمایش‌ها (نرخ هوادهی)	B (lit/min)
نسبت واریانس	F
احتمال	P
تعداد آزمایش در سطح بالا	N(+)
تعداد آزمایش در سطح پایین	N(-)
تعداد کل آزمایش‌ها	N_T
سطح مقطع بالابر	A_r
سطح مقطع ناودان	A_d

فصل۱

مقدمه

۱-۱. مقدمه

در سال‌های اخیر در نتیجه‌ی رشد صنایع، علی‌الخصوص صنایع شیمیایی و پتروشیمی، حضور آلودگی‌های آلی در آب‌های سطحی رشد چشمگیر و روزافزونی داشته است. پساب خروجی از این صنایع اغلب حاوی ترکیبات حلقوی[1] می‌باشد. این ترکیبات به طور طبیعی تجزیه نمی‌شوند و نتیجتاً در محیط‌زیست باقی می‌مانند. حضور آلودگی‌های دست‌ساز بشر در محیط‌زیست به یک معضل بهداشتی تبدیل شده است (Vinod et al., 2006). فنل و ترکیبات فنلی از متداول‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده‌ی پساب‌های خروجی از پالایشگاه‌ها، صنایع پتروشیمی، کارخانجات تولید رزین‌های پلیمری، سرامیک و استیل ضدزنگ می‌باشند (Melo et al., 2005). فنل در آب حلالیت نسبتاً بالایی دارد (۸۴ گرم بر لیتر) و به راحتی می‌تواند به منابع زیرزمینی آب‌های آشامیدنی نفوذ نماید (مشخصات شیمیایی و فیزیکی کامل آن در پیوست الف آمده است). حتی وجود غلظت‌های کم فنل در آب، باعث ایجاد حساسیت‌های پوستی، بو و مزه‌ی بد آب می‌شود و برای مصرف‌کنندگان آن خطر بزرگی به‌شمار می‌آید. فنل برای بسیاری از فعالیت‌های بیوشیمیایی نیز حالت سمیت ایجاد می‌کند و مانع از انجام آنها می‌شود(Sa and Boaventura, 2001). استاندارد جهانیِ آژانس حفاظت از محیط‌زیست امریکا (EPA[2])، حداکثر میزان فنل موجود در پساب صنایع برای واردشدن به آب‌های سطحی یا استفاده کشاورزی را ۰,۵ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت مجاز فنل موجود در آب آشامیدنی را نیز یک میکروگرم بر لیتر گزارش کرده است.

در گذشته ترکیبات فنلی با فرآیندهای هزینه‌بر فیزیکی و شیمیایی از پساب صنایع حذف می‌شدند. این فرآیندها کماکان در برخی کشورها به‌کار می‌روند. اما با پیشرفت دانش بیوتکنولوژی

[1] Aromatic
[2] Environmental Protection Agency

روش‌های زیستی[1] حذف فنل مورد توجه قرار گرفته‌اند (Sa and Boaventura, 2001). روش‌های زیستی حذف فنل از فرآیندهایی هستند که کارایی بسیار موثری در سیستم‌های تصفیه پساب دارند. از اولین روش‌های تجزیه زیستی پساب‌های حاوی فنل، فرآیند لجن فعال می‌باشد. برتری این روش بر روش‌های فیزیکی و شیمیایی، هزینه عملیاتی پایین و عدم تولید محصولات جانبی است. زیرا در پایان تمام آلودگی‌ها به مواد معدنی (CO_2, H_2O) تبدیل می‌شوند. عیب این روش تحمل کم سیستم نسبت به تغییرات بار فنل ورودی می‌باشد (Abuhamed et al., 2004 and Yan et al., 2007).

اگرچه هم میکروارگانیسم‌های هوازی و هم میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی توانایی تجزیه‌زیستی فنل را دارند، معمولاً از میکروارگانیسم‌های هوازی استفاده می‌شود. زیرا میکروارگانیسم‌های هوازی رشد سریع‌تری بر روی ترکیبات بازدارنده مانند فنل دارند و تجزیه‌زیستی آن را در زمان کوتاه‌تری انجام می‌دهند و فنل را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی سریع‌تر مصرف می‌کنند (Jung-Huva et al., 2002 and Melo et al., 2005). قسمت عمده‌ی مطالعاتی که در زمینه‌ی تجزیه‌زیستی فنل انجام شده، با استفاده از سوش‌های خالص میکربی مانند *Alcaligenes*، *Pseudomonas*، *Rhodococcus*، *Azotobacter*، *Phanerochaere* و *Cryptococcus* بوده است. گزارش‌هایی نیز مبنی بر توانایی برخی سویه‌های مخمر در تجزیه‌زیستی فنل نیز مشاهده شده است (Godjevargova et al., 2003).

یکی دیگر از چالش‌های موجود در تجزیه‌زیستی فنل، انتخاب بیوراکتور مناسب برای این کار می‌باشد. به‌طور معمول در فرآیندهای بیولوژیکی از بیوراکتورهای همزن‌دار استفاده می‌شود. مزیت این بیوراکتورها این است که کاربرد و تنظیم زمان ماند در آن‌ها ساده است. ولی در عین حال در برابر شوک[2] و شستشو[3] آسیب‌پذیرند و زمان زیادی طول می‌کشد تا از حالت آشفتگی خارج شوند. علاوه بر این تنش برشی واردشده به میکروارگانیسم‌ها در بیوراکتورهای همزن‌دار بسیار زیاد است و ممکن است باعث تخریب و تغییر مورفولوژی آنها گردد. اما بیوراکتورهای پرشده[4] نسبت به شوک و شستشو مقاوم هستند و به سرعت می‌توانند خود را بازیابی کنند و از حالت آشفتگی خارج شوند، زیرا

[1] Biological
[2] Shock
[3] Washout
[4] Packed bed bioreactors

میکروارگانیسم‌های فعال به سطح بستر جامد چسبیده‌اند. اما مشکلی که بیوراکتورهای پرشده دارند، عدم امکان اندازه‌گیری رشد سلولی است. زیرا میکروارگانیسم به سطح جامد می‌چسبد و در هر بار نمونه‌گیری فقط قسمتی از توده سلولی تولیدشده را می‌توان اندازه‌گیری کرد. بدون داشتن مقدار دقیق توده سلولی تولیدشده نیز نمی‌توان سینتیک رشد باکتری بر روی فنل را به‌دست آورد (Jung-Huva et al., 2002). گزینه دیگری که مطرح است، بیوراکتور هواگرد[1] می‌باشد. در این نوع بیوراکتور هوا از یک نقطه به بالابر تزریق می‌شود و اختلاف ماندگی گاز در بالابر و ناودان باعث چرخش سیال می‌شود. بنابراین هیچ نقطه مرکزی برای پخش انرژی در بیوراکتور وجود ندارد و توزیع تنش در طول بیوراکتور یکنواخت است. بنابراین نیروی مکانیکی شدیدی بر میکروارگانیسم‌ها وارد نمی‌شود. با توجه به مزایای بیوراکتور هواگرد (طراحی مکانیکی ساده، عدم نیاز به همزن مکانیکی، هزینه ساخت پایین، اختلاط خوب و موثر، محدودشدن خطر آلودگی به دلیل عدم وجود تجهیزات داخلی، وجود تنش‌های ناچیز و ...) ما بر آن شدیم تا به بررسی حذف بیولوژیکی فنل در بیوراکتور هواگرد بپردازیم.

در فصل دوم، به مروری بر منابع مطالعاتی می‌پردازیم. در این فصل ابتدا به بررسی میکروارگانیسم‌های به‌کار رفته در حذف ترکیبات آروماتیکی از جمله فنل، مکانیسم تجزیه هوازی فنل و محیط‌های کشت متداول در حذف فنل پرداخته شده‌است. سپس پارامترهای موثر بر تجزیه‌زیستی فنل مانند حجم و عمر مایه‌تلقیح، اکسیژن، دما، pH، تثبیت باکتری و نوع بیوراکتور به‌کار رفته، مطرح شده‌اند. در ادامه به بررسی سینتیک رشد باکتری‌ها بر روی ترکیبات بازدارنده و غلظت بازدارندگیِ آن‌ها پرداخته شده است. سپس با توجه به استفاده از بیوراکتور هواگرد در آزمایش‌های اصلی تجزیه‌زیستی فنل، ابعاد بیوراکتورهای هواگرد به‌کار رفته در تصفیه پساب، نرخ هوادهی و میزان ماندگی گاز در آنها مطالعه شده است. در پایان این فصل نیز به کاربرد روش طراحی و تحلیل آزمایش‌ها در فرآیندهای تخمیری اشاره شده است. در فصل سوم ابتدا مواد مورد استفاده در آزمایش‌ها، محیط‌های کشت و معرف‌ها آورده شده‌اند. سپس به میکروارگانیسم مورد استفاده، نگهداری آن و تهیه مایه‌تلقیح اشاره شده است. در ادامه روش اندازه‌گیری pH، وزن خشک سلولی و

[1] Airlift bioreactor

غلظت فنل و دستگاه‌های مورد استفاده مطرح شده‌اند. مطالعه سینتیک رشد باکتری، یکی دیگر از مباحثی است که در این فصل به آن پرداخته شده است. نحوه انجام آزمایش در کشت‌لرزان، استریلیزاسیون، تلقیح و نمونه‌گیری از ارلن‌مایرها و همچنین طراحی و ساخت بیوراکتور هواگرد، استریلیزاسیون، تلقیح و نمونه‌گیری از آن، نحوه هوادهی و اندازه‌گیری ماندگی گاز در آن از جمله مباحث مطرح شده در این فصل می‌باشد. در پایان نیز متغیرها، توابع هدف، روش طراحی آزمایش‌ها، طرح آزمایش‌ها و نحوه تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار Design Expert توضیح داده شده است. در فصل چهارم به بررسی توانایی سویه میکربی *Alcaligenes faecalis* (ATCC 8750) در تجزیه‌زیستی فنل پرداخته می‌شود. به این منظور طی سلسله آزمایش‌هایی اثر پارامترهای موثر بر تجزیه‌زیستی فنل (عمر و حجم مایه تلقیح) در کشت لرزان بررسی می‌گردد. سپس با به دست آوردن شرایط مناسب، به تعیین غلظت بازدارندگی و سینتیک رشد باکتری می‌پردازیم. برای بررسی تجزیه‌زیستی فنل لازم است رابطه‌ی بین نرخ رشد ویژه و غلظت فنل تعیین گردد . بنابراین با توجه به بازدارندگی فنل از مدل سینتیکی رشد هالدن[1] استفاده می‌نماییم. در آخرین سری آزمایش‌های انجام‌شده در کشت لرزان به بررسی اثر تثبیت باکتری بر زمان تجزیه فنل می‌پردازیم. در مرحله بعدی با استفاده از روش طراحی آزمایش‌های فاکتوریل کامل[2] آزمایش‌هایی برای انجام در بیوراکتور هواگرد تعیین می‌شود. در این راه، دو متغیر (غلظت اولیه فنل و نرخ هوادهی) و دو تابع پاسخ (زمان تجزیه کامل فنل و توده سلولی تولیدشده) انتخاب و سطوح متغیرها معین می‌گردد. در پایان با استفاده از روش رویه پاسخ[3] توسط نرم‌افزار Design Expert به بررسی میزان اثر هر یک از پارامترها و بهینه‌سازی شرایط آزمایش برای به‌دست آوردن کوتاه‌ترین زمان تجزیه با بیشترین توده سلولی تولیدشده خواهیم پرداخت.

[1] Haldane's growth kinetic model
[2] Full factorial design
[3] Response surface