بررسی امکان‌سنجی قابلیت تجزیه بیولوژیک متیل ترشیاری بوتیل اتر(MTBE) توسط میکروارگانیسم‌های جدا شده از لجن‌های فعال در فاز مایی و تاثیر ترکیبات محرک القایی بر میزان تجزیه‌پذیری

مهندس سامان احمدی زاد(MSc) [1] - *دکتر علی خوانین(Ph.D) [1] - دکتر مهرداد فرخی (Ph.D) [2]

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بهداشت محیط

پست الکترونیک: Ahmadizad2000@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۱۸

چکیده

مقدمه: متیل ترشیاری بوتیل اتر (MTBE) به عنوان مکمل سوخت اکسیژن‌دار برای بهسوزی و بالا بردن عدد اکتان در غلظت ۱۵ درصد حجمی به عنوان جایگزین ترا اتیل سرب و به منظور دستیابی به احتراق بهتر و نیز کاهش انتشار آلاینده‌های خروجی از اتومبیل‌ها و محصولات آلی حاصل از احتراق به بنزین و گازوئیل اضافه می‌شود. این ترکیب مایعی است آبدوست که هم در هوا و هم در آب و خاک حلالیت دارد و دارای قدرت حلالیت بسیار بالایی در آب (۴۸،۰۰۰mg/L) است. به‌علت آثار نامطلوب این ترکیب روی کیفیت آب‌های آشامیدنی و محیط زیست، حذف آن برای حفظ بهداشت عمومی و رفع نگرانی‌های زیست محیطی ضروری به‌نظر می‌رسد.

هدف: هدف اصلی انجام این تحقیق، امکان سنجی قابلیت تجزیه بیولوژیک MTBE توسط میکروارگانیسم‌های جدا شده از لجن‌های فعال در فاز مایی است و اهداف جزیی تحقیق نیز شناسایی و جداسازی سویه میکروبی بومی تجزیه کننده MTBE، توانایی سویه در میزان حذف آن و در نهایت بررسی تاثیر ترکیبات محرک القایی (از قبیل پت هومیک و عصاره مخمر) در افزایش میزان تجزیه پذیری MTBE است.

مواد وروش‌ها: میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر از منابع مختلفی جدا شده و اغلب از لجن‌های تصفیه خانه‌های فاضلاب شهری و صنایع پتروشیمی استفاده شد. تمام آزمایش‌ها در درجه حرارت ثابت ۲۵ ^{o}C انجام شد. در آزمایش‌ها میکروبی انجام شده از ویال‌های ۵۰mL و ۱۲۵mL با درپوش‌های پوشیده با نوار تفلون استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده در کشت‌های میکروبی محیط حاوی محلول نمک‌های معدنی بود. برای اندازه‌گیری غلظت MTBE و محصولات هیدرولیزی احتمالی از قبیل TBA از روش گاز کروماتوگرافی و به‌صورت دو تایی در هر نمونه با تزریق مستقیم فضای خالی ویال ها به دستگاه گاز کروماتوگراف با ستون موئین و آشکارساز یونیزاسیون در شعله استفاده شد. مخلوط میکروبی (Microbial Consortium) حاصل ابتدا در پلیت‌های کشت حاوی محلول نمک‌های معدنی با محیط آگار و بخار MTBE به‌عنوان تنها منبع کربن کشت داده شدند. پس از گذشت سه هفته کلنی‌های تک رشد کرده به محلول حاوی نمک‌های معدنی انتقال داده شدند. در این آزمایش‌ها یک مخلوط میکروبی هوازی قادر به تجزیه متیل ترشیاری بوتیل اتر (MTBE) بود که این مخلوط غنی سازی شد و به‌مدت چهار ماه در شرایط آزمایشگاهی مقاوم سازی شد. برای بررسی اثر تحریک‌پذیری تجزیه MTBE از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ مخمر و ۲۰ میلی گرم در لیتر پت هومیک استفاده شد.

نتایج: آزمایش‌ها نشان دادند که MTBE در شرایط هوازی و کومتابولیک تجزیه‌پذیر است. در شرایط هوازی تجزیه بیولوژیک MTBE کاملا مشهود بود. یک مخلوط میکروبی در شرایط آزمایشگاه که توانایی مطلوبی در تجزیه متیل ترشیاری بوتیل اتر داشت از لجن‌های فعال در فاز مایی جداسازی شد و *کوکوباسیلوس گرم مثبت کاتالاز مثبت* تشخیص داده شد .

مخلوط میکروبی تجزیه‌گر قادر به تجزیهٔ غلظت‌های بالایی از MTBE تا حدود ۱۰۰۰mg/L بودند ولی غلظت های بالاتر از ۱۰۰۰mg/L MTBE قابل تجزیه نبودند. در طول مدت انجام آزمایش‌ها در شرایط بسته تجمع بیومس در ویال‌های کشت مشاهده نشد، اما بیومس چسبیده مشاهده شد (غلظت اولیه بیومس چسبیده g/L ۰/۱۱ بر اساس وزن خشک بود). عصاره مخمر و پت هومیک با ایجاد اثر القایی باعث تسریع و تشدید تجزیه MTBE به میزان بیش از ۲۰ درصد می‌شوند.

نتیجه گیری: MTBE در شرایط هوازی و کومتابولیک تجزیه پذیر بوده و ترکیبات با اثر القایی باعث تسریع و تشدید تجزیه آن می‌شوند.

کلید واژه‌ها: متیل ترشیاری بوتیل اتر/ زوال زیستی/ فاضلاب

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره هفدهم شماره ۶۶ ، صفحات:۸۶-۷۶

مقدمه

متیل ترشیاری‌بوتیل‌اتر(MTBE) یک ترکیب اتری قطبی است. این ترکیب به گازوئیل و بنزین اضافه می‌شود و هیچ گونه منبع طبیعی ندارد. MTBE یک مادهٔ فرار، قابل اشتعال، بی‌رنگ و در دمای اتاق به حالت مایع بوده و دارای قدرت حلالیت بسیار بالایی در آب(۴۸۰۰۰mg/L)، الکل و دیگر اترها است. این ترکیب به عنوان مکمل سوخت اکسیژن‌دار جهت بهسوزی و بالا بردن عدد اکتان تا ۱۱۰ و به عنوان جایگزین سرب به منظور دستیابی به احتراق بهتر و همچنین کاهش انتشار منوکسید کربن و محصولات آلی حاصل از احتراق به بنزین و گازوئیل

۱. تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بهداشت محیط ۲. دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده بهداشت، گروه بهداشت محیط

اضافه می‌شود(۱).

این ماده اولین بار در اواخر دهۀ ۱۹۷۰ در غلظت تقریباً ۷-۲ درصد حجمی در ایتالیا و آمریکا تهیه شد و در ایران نیز از سال ۱۳۷۹ به بعد مصرف آن آغاز شد(۲) میزان تولید آن در هیجده سال اخیر بالغ بر شصت میلیون تن بوده که دلیل عمده استفاده از آن افزایش عدد اکتان و حذف سرب از سوخت‌ها است(۳). این ترکیب همچنین به دلیل ارزانی، سادگی تولید و اختلاط مطلوب با بنزین معمولی، بر دیگر مواد اکسیژن‌دار ترجیح داده شد (۴و۵) مهمترین مشکلات ترکیب MTBE شامل پایین بودن آستانه طعم و بو، نفوذ سریع به منابع آب زیرزمینی و حلالیت بالا، مشکل حذف در غلظت های کم در روش‌های متداول تصفیه آب و ایجاد خطرات بهداشتی بالقوه آن برای انسان و سایر موجودات زنده است(۶و۷) تا حدی که سازمان حفاظت محیط‌زیست آمریکا MTBE را در فهرست آلاینده‌ها جزو ترکیبات « احتمالاً سرطانزا برای انسان » قرار داده‌است(۸و۹)، این ترکیب تا غلظت ۲۷۰ میلی گرم در مترمکعب اثر بهداشتی حادی ایجاد نکرده، اما تماس با دوزهای بالاتر می‌تواند علایم خطر را بروز دهد. از سویی این ماده در آب طعم و بوی تند و شدیدی شبیه ترپن‌ها ایجاد کرده و از راه تنفس و پوست جذب بدن می‌شود و در غلظت‌های بالاتر از ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر در موش‌های آزمایشگاهی نیز باعث ایجاد سرطان کبد و کلیه شده و اختلال در سیستم اعصاب مرکزی(CNS) ، سیستم تنفسی، حساسیت‌های پوستی و چشم و آثار مزمن نوروپاتی در موش‌های نر از دیگر عوارض آن است(۱۰).

مشکل اصلی MTBE در حال حاضر آلودگی آب‌های زیرزمینی است. منابع عمده آلودگی آب زیرزمینی به MTBE شامل نشت از تانک‌های ذخیرۀ زیرزمینی و خطوط انتقال، سرریز شدن از مخازن نگهداری، محل‌های آلوده شده و محل‌های تولید و ذخیره MTBE است(۱۱). در خصوص حذف این ترکیب نیز باید عنوان داشت که اغلب محققین معتقدند که تجزیه بیولوژیک MTBE مشکل است. برخی محققان به واسطه نیاز به دوره‌های انطباق طولانی بیشتر از ۶ ماه، MTBE را در گروه ترکیبات مقاوم در برابر تجزیه بیولوژیک و دیرتجزیه‌پذیر طبقه‌بندی کرده‌اند. اما تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده که MTBE در صورت تماس طولانی مدت با جمعیت میکروبی قابل تجزیه بیولوژیک است.

از مهم‌ترین روش‌های کاهش و حذف MTBE می‌توان به جذب سطحی، جذب عمقی، کندانسیون، اکسیداسیون حرارتی، ازناسیون، فتولیزاولتراویولت، پرتوافکنی اولتراسونیک و روش‌های مختلف اکسیداسیون پیشرفته اشاره نمود. اما روش‌های رایج‌تر حذف MTBE از آب‌های آشامیدنی شامل هوادهی (آزادسازی توسط هوا)، جذب (توسط کربن فعال یا جاذب‌های دیگر) و فرآیندهای اکسیداسیون پیشرفته (مثلاً فتواکسیداسیون با اشعه ماوراء بنفش و یا اکسیداسیون شیمیایی نظیر ازن- آب اکسیژنه) می‌باشد(۱۲و۱۳) فرآیندهای اکسیداسیون پیشرفته اغلب گران هستند به‌ویژه زمانی که دبی کم باشد، مقرون به صرفه نخواهند بود(۳و۸).

اگر چه بسیاری از روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای حذف آلودگی‌های موجود در آب انجام شده، در حال حاضر تجزیه بیولوژیکی روشی است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های شیمیایی در حذف MTBE باشد و آثار مضر و سوء آن در محیط زیست را با هزینه‌های کمتر بکاهد. در مطالعات آزمایشگاهی شواهدی یافت شده مبنی بر اینکه MTBE به روش بیولوژیکی قابل تجزیه است و می‌توان آن را در شرایط

هوازی توسط میکروارگانیسم‌های هوازی تجزیه بیولوژیکی نمود(۱۱). این ترکیب می‌تواند همراه با گونه‌های خاصی از باکتری‌ها یا باکتری‌هایی که به‌صورت طبیعی تحت شرایط هوازی جداسازی شده‌اند تصفیه شود، اما رشد باکتری‌ها کند و با محصول پایینی از توده سلولی همراه است(۳و۱۴) این مطالعه به منظور بررسی قابلیت تجزیه MTBE توسط میکروارگانیسم‌های جداشده از لجن فعال و تاثیر ترکیبات با اثر القایی بر میزان تجزیه آن در سال ۱۳۸۵ در گروه بهداشت محیط دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

- **ویال‌ها:** آزمایش‌های این تحقیق در سیستم بسته صورت گرفت، بدین منظور از ویال‌های با ظرفیت‌های ۵۰ml و ۱۰۰ml استفاده شد. درب ویال‌ها با نوار تفلون پوشیده شد تا از جذب MTBE جلوگیری نماید(۳).

- **محیط‌های کشت مصرفی:** این محیط‌کشت‌ها شامل TSB، TSA و محیط پایه یا محیط کشت حاوی محلول نمک‌های معدنی بودند. محیط‌کشت‌های TSB و TSA بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده که عموماً کارخانه مرک (MERCK) و کارلو اربا (CARLO ERBA) بودند، تهیه شدند. قابل ذکر است که میزان آگار مورد استفاده در ساخت محیط‌کشت‌ها با غلظت ۱/۵ درصد بود. همچنین با توجه به منابع مطمئن، ترکیب و میزان مواد مصرفی در تهیه محیط محلول نمک‌های معدنی مورد استفاده قرار گرفت (۴و۱۵).

- **محلول MTBE :** MTBE مورد استفاده در آزمایش‌های که به عنوان محلول ذخیره استفاده شد، از کمپانی مرک آلمان تهیه شد. این ترکیب دارای ۹۹/۹ درصد خلوص بوده و وزن ملکولی آن ۸۸/۱۵ g/mole است.

- **آنالیز MTBE:** اندازه‌گیری غلظت MTBE و محصولات هیدرولیزی احتمالی با نمونه‌برداری از بخش فضای خالی بالای ویال‌ها و با تزریق مستقیم فضای خالی ویال‌ها (Head Space ۵۰µl) به دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) فیلیپس، مدل PU-14100 انجام شد. در آنالیز MTBE از ستون موئین(0.3mm id, 0.5µ m film of bondied Fused Silica Capillary, 5ocm×dimethylsilicon gum) و آشکارساز یونیزاسیون در شعله (FID) استفاده شد. تعیین غلظت MTBE نیز با استفاده از منحنی غلظت استاندارد محاسبه شد.

- **روش رنگ‌آمیزی:** در این تحقیق به منظور شناسایی باکتری‌های تجزیه‌گر از مخلوط میکروبی از روش رنگ‌آمیزی گرم بهره گرفته شد.

- **تهیه و جداسازی میکروارگانیسم‌های لجن و خاک:** نمونهٔ لجن فعال از تصفیه‌خانه های فاضلاب شوش، اکباتان و شهرک قدس در تهران، پالایشگاه نفت آبادان، پتروشیمی شیراز، بندر ماهشهر و نمونه‌های خاک آلوده به MTBE از برخی پمپ بنزین‌های شهر تهران و شهرستان‌ها جمع آوری شد.

- **تهیه و استخراج پت هومیک در آزمایشگاه:** استخراج اسید هومیک از خاک در آزمایشگاه بر اساس دستورالعمل انجمن بین المللی مواد هیومیکی (IHSS) صورت پذیرفت(۱۶).

- **عصارهٔ مخمر:** عصارهٔ مخمر پودر زردرنگی است که به عنوان یک مادهٔ القایی برای تحریک تجزیهٔ MTBE در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفته است.

روش انجام تحقیق:

۱- مقاوم‌سازی میکروارگانیسم‌ها و تطابق میکروب‌ها با MTBE: پس از اینکه درون ویال‌ها ۱۰ سی‌سی محیط TSB و ۱ سی‌سی سوسپانسیون میکروبی تزریق شد،

با توجه به سریال رقت (کاهش نمایی غلظت TSB در دسترس باکتری‌ها)، غلظت‌های MTBE نیز به‌صورت ۱۵و۱۲،۱۰،۸،۵،۳،۲،۱ گرم در لیتر در سری‌های مختلف در ویال‌ها تزریق شد. به منظور انجام عمل اکسیژن دهی و اختلاط کامل محتویات، ویال‌ها به‌صورت خوابیده درون سبدهای مخصوص در دمای آزمایشگاه (۲۵°C) روی شیکر با دور ۱۰۰RPM قرار داده شدند. به مدت دو هفته عمل شیک شدن (تکان دادن) ادامه داشته و طی این مدت تمام ویال‌ها به‌صورت روزانه و گاهی دو روز یک بار از نظر میزان کدورت تولیدی به‌صورت چشمی (ویال‌های حاوی محیط کشت TSB) و میزان کاهش MTBE (در ویال‌های حاوی محیط پایه) توسط آنالیز با دستگاه GC، بررسی شدند.

پس از گذشت ۱۴روز براساس عامل کدورت تولیدی، ویال‌ها از نظر واکنش‌پذیری کامل، عدم واکنش‌پذیری یا واکنش بینابینی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از این که در مرحله اول که از غلظت ۱ گرم در لیتر مقاوم سازی آغاز شد، میکروارگانیسم‌ها توانستند تا غلظت ۱۵ گرم در لیتر در برابر MTBE مقاوم شوند، مراحل بعدی مقاوم سازی به منظور دستیابی مقاومت میکروبی در غلظت های بالاتر از ۱۵ گرم در لیتر MTBE آغاز شد، بدین صورت که از ویال‌های سری قبل، بالاترین غلظت (مثبت) را انتخاب نموده و عمل مقاوم‌سازی روی میکروارگانیسم‌های آن صورت پذیرفت، در اصل آخرین ویال مقاوم یا مثبت بیانگر آن است که میکروارگانیسم‌ها توانسته‌اند تا این غلظت در محیط حاوی MTBE رشد کرده و زنده بمانند، از این رو پس از انتخاب ویال‌ها، کشت‌های مراحل بعدی با همین رویکرد انجام شد و غلظت‌های بالاتر از ۵۰ گرم در لیتر MTBE برای مقاوم‌سازی بیشتر استفاده شد. به همین منوال به منظور تلقیح میکروبی در کشت های بعدی، از نمونه‌های مقاوم شده مرحله قبل استفاده شد.

۲- تعیین میزان تجزیه‌پذیری MTBE توسط میکروارگانیسم‌های مقاوم: در این مرحله که هدف تجزیه MTBE توسط میکروارگانیسم‌های مقاوم شده مرحله قبلی است، سعی شد تا کربن در دسترس میکروارگانیسم‌ها حتی‌الامکان کاهش یابد و شرایطی فراهم شود که میکروارگانیسم‌ها به جهتی سوق پیدا کنند تا مجبور به استفاده از کربن موجود در MTBE شوند و اصطلاحاً آن را «تجزیه» نمایند(۱۳). بنابراین اجبارنمودن میکروارگانیسم ها به تجزیه MTBE به‌صورت زیر انجام پذیرفت:

۲-۱- کاهش منابع کربن در دسترس میکروارگانیسم‌های مقاوم : به منظور محدودکردن منابع کربن، غلظت کربن موجود در محیط کشت TSB کاهش یافت. به همین منظور رقت‌هایی از TSB به منظور دستیابی به سویه‌های تجزیه‌گر مناسب MTBE تهیه شد. رقت‌های انتخاب شدهٔ TSB به منظور تجزیه‌پذیری MTBE شامل رقت‌های ۱/۲، ۱/۸، ۱/۳۲، ۱/۱۲۸ و ۱/۵۱۲ بودند. ۵ نمونه میکروبی (نمونه‌های A,B,D,E,F) نیز که دارای حداکثر مقاومت بوده و در مراحل قبلی تهیه شده بودند، به عنوان نمونه ذخیره برای تعیین میزان تجزیه‌پذیری میکروبی MTBE مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر MTBE: در این مرحله هدف تشخیص و جداسازی آن دسته از سویه‌های میکروبی تجزیه‌گر MTBE بود که در مراحل قبلی مقاوم‌سازی شده بودند، بنابراین از محیط‌های آگار ۱/۵ درصد و آگارز ۱ درصد استفاده شد.

لازم به ذکر است که در ایده‌ای جدید به جای استفاده از آب مقطر در تهیه محیط‌های آگار و آگارز از محلول حاوی نمک‌های معدنی استفاده شد تا یک محیط کاملاً

غنی از مواد مورد نیاز رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم آید با این تفاوت که در این ابتکار، محیط عاری از منبع کربن بود و تنها منبع کربن در دسترس MTBE بوده تا میکروارگانیسم‌ها مجبور به استفاده و به عبارتی تجزیه آن شوند. برای کشت‌های میکروبی درون پلیت‌ها ۶ نمونه از نمونه‌های لجن فاضلاب و خاک که ابتدا مقاوم‌سازی شده و سپس تجزیه‌گر شده بودند، انتخاب شده و به منظور مقایسه و کنترل، دو نمونه شاهد نیز همزمان تهیه شد. به ازای هر نمونه دو پلیت کشت حاوی محیط آگار و دو پلیت کشت حاوی محیط آگارز تهیه شد، که مجموعاً ۲۶ کشت میکروبی تهیه شد و دو نمونه هم شاهد بودند. سپس با فواصل زمانی معین (هر ۶ ساعت یک بار) پلیت‌های کشت داده شده از نظر تشکیل کلنی و رشد میکروارگانیسم‌ها بررسی شدند و هر دو روز یک بار با باز کردن درب جار (فضای استقرار پلیت‌ها) اکسیژن مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها تامین شده و۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر MTBE نیز به عنوان منبع کربن و انرژی به ویال تعبیه شده درون جار اضافه شد.

۲-۳- آماده‌سازی سویه‌های تجزیه‌گر MTBE برای تعیین میزان تجزیه‌پذیری در غلظت ۱۰۰۰mg/L: از سویه‌های مقاوم و تجزیه‌گر MTBE که قادر به تجزیهٔ غلظت ۳۰۰۰mg/L MTBE بودند، برای تجزیه کامل غلظت ۱۰۰۰mg/L MTBE استفاده شد. پس از اینکه روی محیط TSA (روی پلیت) کلنی‌های مختلف رشد نمودند، از آنها برای انجام تجزیه MTBE استفاده شد.

۳- بررسی اثر تحریک‌پذیری تجزیه MTBE توسط عوامل محرک القایی (عصارهٔ مخمر و پت هومیک): برای بررسی اثر تحریک‌پذیری تجزیه MTBE توسط عصارهٔ مخمر و پت هومیک از هر کدام ۳ رقت تهیه شد و پس از استریل کردن، همگام با تجزیهٔ ۱۰۰۰mg/L MTBE از آنها نیز استفاده شد. غلظت‌های تهیه شدهٔ عصارهٔ مخمر برای استفاده در تجزیه‌پذیری MTBE شامل ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم در لیتر بودند و غلظت‌های تهیه شدهٔ پت هومیک نیز معادل ۰/۰۱ و ۰/۰۲ و ۰/۰۳ گرم در لیتر انتخاب شدند. لازم به ذکر است که تأثیر همزمان پت هومیک و عصاره مخمر نیز در غلظت‌های ۰/۵g/L عصاره مخمر و ۰/۰۲g/L پت هومیک روی سرعت تجزیه و تحریک تجزیه‌پذیری MTBE نیز بررسی شد.

نتایج

نتایج نهایی مرحلهٔ مقاوم‌سازی میکروارگانیسم‌ها با MTBE طی ۶ پاساژ مکرر و پس از سه ماه آزمایش روی نمونه‌های میکروبی حاصل از لجن‌های فعال و خاک‌های آلوده به MTBE نشان داد که میکروارگانیسم‌های حاصله می‌توانند در برابر غلظت‌های بالایی از MTBE مقاومت کنند و این خود اولین قدم برای دستیابی به تجزیهٔ بیولوژیک MTBE در محیط‌های مایی است.

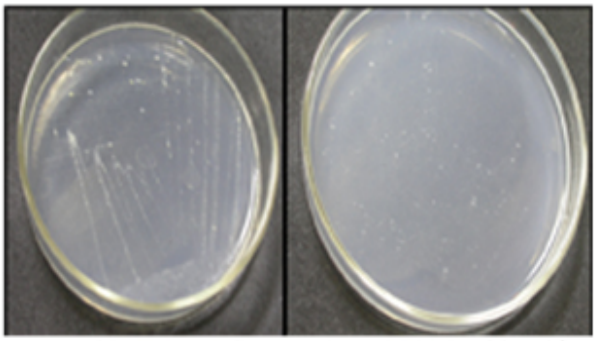
لازم به ذکر است که میزان مقاومت میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های مختلف(نمونه‌های A,B,D,E,F) تا حدودی مشابه هم بودند، درجدول۱ مقاومت نهایی میکروارگانیسم‌ها در برابر MTBE در نمونه‌های مختلف نشان داده شده است.

جدول ۱: مقاومت نهایی میکروارگانیسم‌ها در برابرMTBE در نمونه‌های مختلف

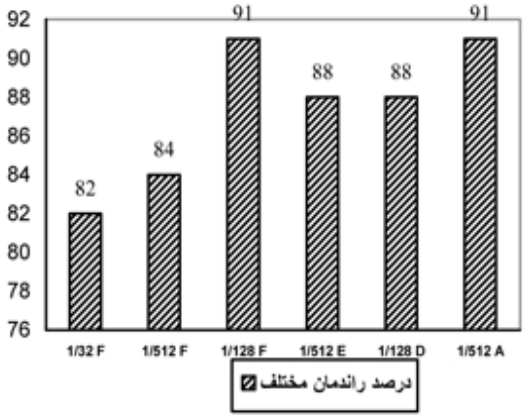
نمونه	میزان مقاومت در برابر MTBE برحسب (mg/L)
A	۳۷،۰۰۰
B	۴۴،۴۰۰
D	۳۳،۳۰۰
E	۳۳،۳۰۰
F	۳۳،۳۰۰

شکل ۱ نیز نمونه‌هایی از کلنی‌های شیری رشد کرده در سطح آگارز و آگار را در نمونه‌های مقاوم به MTBE

نشان می‌دهد. نمودار ۱ نیز بازده حذف MTBE با استفاده از سویه‌های تجزیه‌گر را نشان می‌دهد.

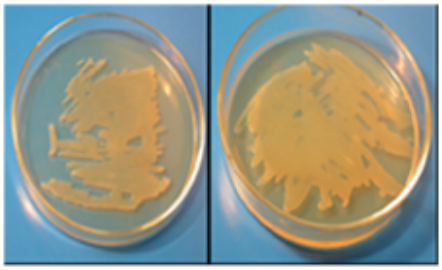


شکل ۱: کلنی‌های فراوان، بسیار ریز، متراکم و سفید متمایل به شیری روی محیط آگارز



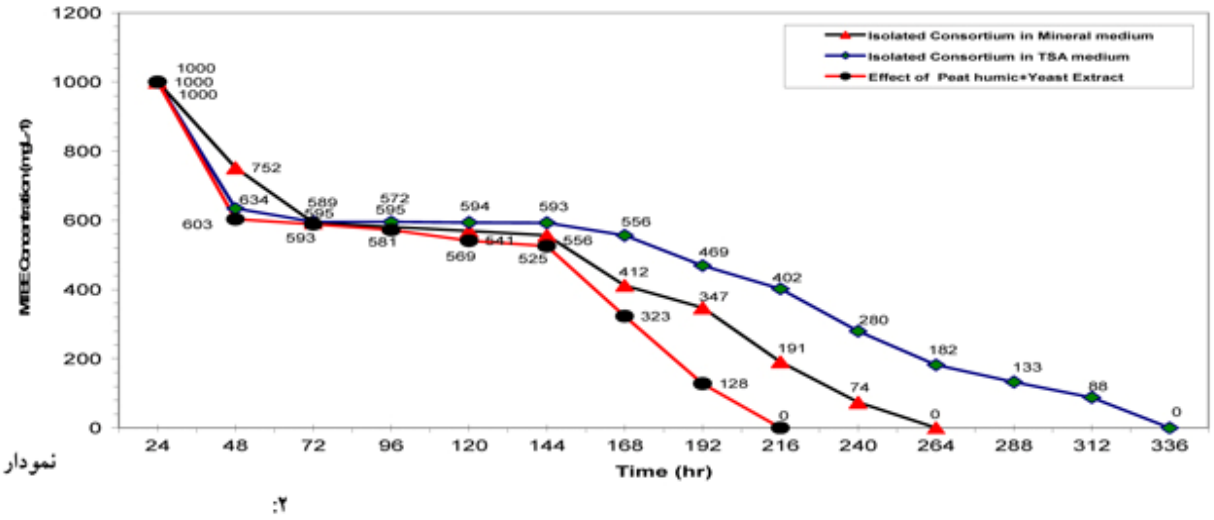
نمودار ۱: راندمان حذف MTBE با استفاده از سویه‌های تجزیه‌گر

شکل ۲ نمونه‌هایی از کلنی های زرد رنگ رشد کرده در روی محیط TSA را در نمونه‌های مختلف نشان می‌دهد که از آنها برای تجزیه MTBE در غلظت ۱۰۰۰mg/L استفاده شد.



شکل ۲: نمونه‌هایی از کلنی‌های زرد رنگ رشد کرده در روی محیط TSA

همچنین مقایسه تجزیه MTBE درغلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر توسط سویه‌های تجزیه‌گر MTBE به تنهایی با اثر سویه‌های تجزیه‌گر در حضور عصاره مخمر + پت هومیک در تحریک تجزیه‌پذیری MTBE و یکبار با اثر سویه‌های رشد کرده روی TSA در غلظت ۱۰۰۰mg/L در محیط کشت حاوی محلول نمک‌های معدنی در نمودار ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲:

مقایسه تجزیه MTBE درغلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر توسط سویه‌های تجزیه‌گر MTBE به تنهایی با اثر سویه‌های تجزیه‌گر در حضور عصاره مخمر + پت هومیک در تحریک تجزیه‌پذیری MTBE

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل حداکثر میزان مقاومت میکروارگانیسم‌های جدا شده از لجن‌های فعال تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شوش، اکباتان، شهرک قدس، نمونه خاک باغچه و خاک‌های آلوده و درمعرض MTBE مربوط به نمونه B بود، که میزان آن ۴۴۴۰۰ mg/L است. متوسط میزان مقاومت میکروارگانیسم‌ها (در هر ۵ نمونه) برابر با ۳۶۲۶۰mg/L بود. نتایج مشابهی در تحقیقات انجام شده توسط Eweis و همکارانش (سال ۱۹۹۷) گزارش شده، در این مطالعه یک محیط کشت مخلوط باکتریایی از یک بیوفیلم کمپوست در لوس‌آنجلس به دست آمد که پس از یک سال مقاوم‌سازی و عادت با محیط (تطابق) باکتری‌های مقاوم شده پس از ۳ ماه شروع به حذف MTBE با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تا ۸۹ درصد نمودند(26)، همچنین نتایج حاصل از تحقیق Mormille و همکارانش (سال ۱۹۹۴) نشان داد که تجزیه بیولوژیکیMTBE پس از ۱۵۲ روز زمان عادت با محیط امکان پذیر است(۱۷).

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه بیولوژیک MTBE در غلظت‌های ۷۴۰۰mg/L و ۱۴۸۰۰mg/L روی محیط کشت TSB و محیط پایه و همچنین براساس مشاهده راندمان‌های حذف در گروه‌های مختلف نمونه و رقت‌های TSB چنین استنباط شد که راندمان حذف توسط نمونه‌ها همگی در رنج و محدودهٔ خاصی هستند(۲۵-۲۰ درصد حذف) یعنی از حدی بالاتر نرفته‌اند و علت آن وابستگی شدید میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر MTBE به اکسیژن محیط رشد است، زیرا این میکروارگانیسم‌ها کاملاً هوازی بوده و تحت تأثیر غلظت اکسیژن محلول در دسترس هستند و اگر میزان اکسیژن محلول در محیط رشد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر کمتر از ۰/۹mg/L برسد، رشد میکروبی نیز به حداقل رسیده و متوقف می‌شود. این نتایج مشابه نتایج حاصل از تحقیقات Salanitro و همکارانش(سال ۱۹۹۴) است(۳). در تحقیق ما باکتری‌های تجزیه‌کننده MTBE به‌صورت یک مخلوط میکروبی تهیه شدند که در شرایط هوازی قادر به تجزیه MTBE بودند، بگونه‌ای که در طی آزمایشات ابتدا از ویال‌های ۵۰ سی‌سی برای محیط رشد استفاده شد، اما نتایج نشان داد که میکروارگانیسم‌های مقاوم و تجزیه‌گر MTBE به طور مستقیم تحت تأثیر غلظت اکسیژن محلول در محیط هستند، به همین منظور با افزایش غلظت اکسیژن محلول در دسترس (با تغییر ویال‌ها از ۵۰ سی سی با ۱۰۰ سی سی) بازده حذف و تجزیه MTBE تا ۵۰ درصد افزایش یافت. این نتایج مشابه نتایج حاصله از تحقیقات Schmidt & Schirmer (سال ۲۰۰۴) در خصوص تجزیه بیولوژیکی MTBE است. نتایج این مطالعات نشان داد که در تمام محیط کشت‌های خالص که برای تجزیه MTBE مورد استفاده قرار گرفتند، میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر MTBE از اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده نموده‌اند(۱۸). در گام بعدی به بررسی میزان تجزیه‌پذیری MTBE توسط سویه‌های تجزیه‌گر در غلظت ۳۰۰۰mg/L پرداخته شد، در این مرحله نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰۰mg/L MTBE به علت تجمع بیش از حد TBA و متانول(این دو ترکیب محصولات جانبی غالب ناشی از تجزیه MTBE هستند) مسیر تجزیه تغییر می‌یابد یعنی با توجه به تجزیه‌پذیرتر بودن TBA نسبت به MTBE، میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر دیگر علاقه‌ای به تجزیه MTBE نداشته و از کربن موجود در TBA که راحت‌تر تجزیه می شود، به عنوان منبع کربن ساده‌تر و انرژی استفاده می‌نمایند و خودبه خود مسیر تجزیه عوض

می‌شود و بازده حذف MTBE کاهش می‌یابد و می‌توان گفت که متوقف می‌شود. این نتایج با نتایج حاصل از تحقیقWilson و همکارانش(سال ۲۰۰۱) که تجزیه بیولوژیکی هوازی اکسیژنه‌های بنزین MTBE و TBA را مورد بررسی قرار دادند همخوانی دارد(۱۹). این نتایج مشابه نتایج تحقیقی است که Xiaolin Wang و Marc Deshusses (سال ۲۰۰۳) به آن دست یافتند. در نهایت نتایج اصلی حاصل از این تحقیق بیان می‌دارد که میزان تجمع TBA به غلظت MTBE بستگی دارد و با افزایش غلظت MTBE در محیط حاوی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر غلظت TBA بالا رفته و میزان تجمع TBA سیر صعودی پیدا می‌نماید.

بنابراین دو نتیجه زیر را می‌توان در خصوص کاهش تجزیه‌پذیری MTBE عنوان نمود:

- تغییر مسیر متابولیسم و روی آوردن میکروارگانیسم‌ها به تجزیهٔ TBA تولیدی به دلیل تجزیه‌پذیری راحت‌تر آن.
- کاهش جمعیت میکروبی و مرگ آن‌ها به علت افزایش غلظت متانول تولیدی به عنوان یک عامل محدودکننده رشد.

همچنین در ادامه مطالعات بررسی تأثیر همزمان پت‌هومیک و عصاره مخمر در تحریک تجزیه‌پذیری در غلظت MTBE ۱۰۰۰mg/L در محیط کشت حاوی محلول نمک‌های معدنی در غلظت‌های ۰/۵ g/L عصاره مخمر + ۰/۰۲ g/L پت هومیک نشان داد که این سویه‌ها در حضور غلظت‌های ۰/۵g/L عصاره مخمر + ۰/۰۲g/L پت هومیک قادر به تجزیه کامل MTBE پس از گذشت ۲۱۶ ساعت معادل ۹روز هستند. غلظت‌های ۰/۵g/L عصاره مخمر + ۰/۰۲ g/L پت هومیک تا ۲۰ درصد باعث تسریع تجزیه MTBE شد. اثر آب اکسیژنه نیز در تشدید سرعت تجزیه‌پذیری MTBE در غلظت ۱۰۰۰mg/L در محیط کشت حاوی محلول نمک‌های معدنی در دو غلظت ۶۰ و ۴۰ میکرو لیتر مورد بررسی قرار گرفت، نتایج حاصل از آزمایش ها نشان دادند که سویه‌های تجزیه‌گر MTBE در حضور غلظت ۴۰ میکرولیتر آب اکسیژنه قادر به تجزیه کامل MTBE پس از گذشت ۲۴۰ ساعت (۱۰روز) هستند و در اصل آب اکسیژنه در غلظت ۴۰ میکرو لیتر تا ۱۰ درصد باعث تسریع تجزیه MTBE شد اما غلظت ۶۰ میکرو لیتر تاثیر مهم و قابل توجهی در تسریع تجزیه MTBE نداشت.

همچنان که در آزمایشات Xiaolin Wang و Marc Deshusses (سال ۲۰۰۳) نیز مشاهده می شود، اثر غلظت ۵ برابر آهن و مس به عنوان عناصر ضروری و جزئی ($Fe^{+2}\times5$ و $Cu^{+2}\times5$) در تسریع تجزیه MTBE کمتر از اثر غلظت ۱ برابر ($Fe^{+2}\times1$ و $Cu^{+2}\times1$) آنهاست (۲۰).

منابع

1. Staff W. Oxygenates To Hike Gasoline Price. The Oil And Gas Journal 1992, 4(2): 28-9.

2. Ambrose J H, Ellemder C H, Townsend R . Thermodynamic Properties Of Organic Oxygen Compounds, XLIII. Vapor Pressures Of Some Ethers . Chemistry Thermodynamics 1976; 8 (1) :165-178.

3. Salanitro J P, Diaz L A, Williams M P, Wisniewski H L. Isolation Of A Bacterial Culture That Degrades Methyl T-Butyl Ether. Applied And Environmental Microbiology 1994; 60 (7) : 2593-2596.

4. Squillace P J, Pankow J F, Zogorski J S. Review Of The Environmental Behavior And Fact Of Methyle Tert-Butyl Ether. Environmental Toxicology And Chemistry 1997; 16 (9): 1836 – 1844 .

5. Horan C M, Brown E J. Biodegradation And Inhibitory Effects Of MTBE Added To Microbial Consortia . University Of Northern Lowa , Environmental Programs, Cedar Falls, 2000, IA 50614 : 33-46 .

6. USEPA . MTBE Fact Sheet # 1- Overview .. USEPA Office Of Underground Storage Tanks . Washington. 1998; 97(4) : 5 .

7. Francois A, Mathis H, Gode Froy D, Piveteau P, Fayolle F, Monot F. Biodegradation Of Methyle Tert-Butyl Ether And Other Full Oxygenates By A New Strain , Mycobacterium Aus-Troa Fricanum JFP 2012. Applied And Environmental Microbiology 2002; 68 (6) : 2754 – 2762 .

8. Ecklund E E, Mills G A. Alternative Fuels: Progress And Prospects. Chemtechnology, 1989,19 (2): 549-556.10-. Yeh C. K., Novak J .T . Anaerobic Biodegradation Gasoline Oxygenates In Soils . Water Environmental Research 1994; 66 (5) : 744 – 752 .

9. Merck And Company Inc. The Merck Index. Merck And Company Inc., Rahway, New Jersey., 1989,11 (3) : 32-44.

10 Horan C M, Brown E J. Biodegradation And Inhibitory Effects Of MTBE Added To Microbial Consortia. University Of Northern Lowa, Environmental Program, Cedar Falls 2000, IA 50614: 33-46.

11 Keller A A. Cost And Performance Evaluation Of Treatment Technologies For MTBE-Contaminated Water. Department Of Chemical Engineering, UCSB, Santa Babara, 2000, 17 (4): 245-259

12. Centi G. Catalytic Conversion Of MTBE To Biodegradation Chemicals In Contaminated Water . Catalysis Today 2002; 75(7): 69 – 76 .

13. Eweis J, B. Pre-Sented At The Air And Waste Management Association 90th Annual Meeting And Exhibitation . Torento . Ontario . Canada . American Water Works Association, Washington D.C., 1997,18 (6) : 332 – 348 .

14. Hyman M, Won P K, Williamson K, O'Reilly M. Cometabolism Of MTBE By Alkane-Utilizing Microorganisms. In: G. B. Wickramanayake And R. E. Hinchee (Ed.), Natural Attenuation: Chlorinated And Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus, Ohio., 1998, 12 (7): 321–326.

15. Salanitro J P. Isolation Of Bacterial Culture That Degrades Methyle Tert-Butyl Ether. Applied And Environmental Microbiology 2000; 60(8):2593-2596.

16. Veith, G.D., DJ. Call And L.T. Brooke, Structure-Toxicity Relationships For The Fathead Minnow, Pimephales Promelas:Narcotic Industrial Chemicals, Can. J. Fish. Aqua. Sci., 1983, 40: 743-748.

17. Mormille M R, Et Al . Aerobic Biodegradation Of Gasoline Oxygenates : Extrapolation Of Information To Multiple Sites And Redox Conditions. Environmental Science & Technology 1994; 28: 1724-33.

18. Schmidt T C, Et Al . Microbial Degradation Of Methyle Tert-Butyl Ether And Tert-Butyl Alcohol In The Subsurface. Contaminant Hydrology: 70: 173-81.

19. Wilson G J, Et Al . Aerobic Biodegradation Of Gasoline Oxygenates MTBE And TBA . Water Science & Technology 2001; 43(2): 277- 84.

20. Yeh C K, Novak J T. The Effect Of Hydrogen Peroxide On The Degradation Of Methyle Tert-Butyl Ether In Soils . Water Environmental Research 1995; 67 (5) : 828 - 834 .

Survey The Possibility of Biodegradability of Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE) by Isolated Microorganisms of Activated Sludges in the Aqueous Solutions and Effects of Stimulator Substances on Biodegradation

Ahmadi zad S.(MSc)[1]- *Khavanin A.(Ph.D)[1]- Farokhi M.(Ph.D)[2]

***Corresponding Author:** Environmental Health Dapartment, Tarbiat Modarres University, Tehran, IRAN
E-mail: Ahmadizad2000@yahoo.com

Received: 10/ Dec/2007 Accepted: 6/Apr/ 2008

Abstract

Introduction: Methyl tert-butyl ether (MTBE) has been incorporated in reformulated gasoline at concentrations up to 15% (vol) to replace lead tetraethyl in order to comply with the octane index and to reduce the polluting emissions in exhaust gases.This compound is water soluble (48,000 mg/L) and one of the most common pollutants of ground water and surface water. Because of its undesirable effects on drinking water and ecologically harmful effects, MTBE removal has become a public health and environmental concern.

Objective: Evaluatin of biodegradability of MTBE by isolated microorganisms from activated sludge.

Materials and Methods: In this study a microbial consortium that efficiently degraded methyl tert-butyl ether was obtained by Isolated microorganisms of Activated Sludges in the Aqueous Solutions. Microorganisms were isolated from a variety of sources, generally from petroleum or chemical and urban wastewater treatment plants. All experiments were conducted at a constant temperature of 25ºC. Vials of 50 ml and 125 ml volume sealed with Teflon-lined Mini-Nert caps were used for microcosm experiments. In all experiments 1% sodium azide were used as controls. Cultures were incubated at 25°C in the dark on an orbital shaker (rotation speed of 150 rpm). The mineral medium was used for batch cultures. Samples of bacterial cultures that metabolize MTBE have been analysed for both MTBE and its metabolite TBA by direct GC analysis using FID. Cultures able to metabolize MTBE have been found in activated sludge and soils. Microbial consortium were plated on agar with MTBE vapor as the carbon source. After three weeks growth to saturation, independent clones were diluted into fresh mineral medium. This microorganisms, was a gram-positive bacterium. An aerobic microbial consortium able to biodegrade methyl tert-butyl ether (MTBE) was enriched in laboratory for four months.

Results: MTBE has been shown to biodegrade under aerobic conditions and cometabolic conditions. Clearly, aerobic biodegradation of MTBE is demonstrable. In our laboratory, a microbial consortium was isolated from activated sludges based on its ability to grow on MTBE and was identified as cocobacillus. The capacity of this microbial consortium to degrade and grow on MTBE as a sole carbon and energy source is described in this paper. No biomass aggregates were observed during all the batch cultures, but the attached biomass was observed (the concentration of the initial attached biomass was about 0.11 g/ L of dry weight). 500 mg of yeast extract per liter and 20 mg of Peat humic support growth of microbial consortium, it clearly had a stimulatory effect on consumption upper than 20%. Consortium was capable of degrading concentration as great as 1000 mg/l MTBE, whereas concentrations of 1000 mg/l MTBE and higher was not degraded.

Conclusion: MTBE in low concenteration is biodegradable and biodegradability of MTBE enhanced by stimulator substances.

Key words: Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE)/ Biodegradation/ Sewage

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 66, Pages 76-86

1. Environmental Health Dapartment, Tarbiat Modarres University, Tehran, IRAN
2. Environmental Health Dapartment, Faculty of Health,GUMS , Rasht, IRAN