جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسم های تجزیه کننده سیانید از پساب سیکل خنک کننده کوره های کک ساز ذوب آهن اصفهان

شبنم میری زاده[1]، سهیلا یغمایی[2*]، زهرا قبادی[3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بیوتکنولوژی، تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت
[2] استاد، تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت
[3] کارشناس ارشد، تهران، دانشگاه صنعتی شریف، مرکز تحقیقاتی بیوشیمی و کنترل محیط زیست

چکیده

سیانید یک ترکیب سمی و بسیار خطرناک است که هم اکنون یکی از مشکلات اساسی پسابهای صنایع فولاد در ارتباط با کوره‌های کک سازی در ایران می‌باشد. تصفیه بیولوژیکی سیانیدها نسبت به روش‌های شیمیایی روشی ارزان، مطمئن و سازگار با محیط زیست است. به همین منظور در این مطالعه میکروارگانیسم هایی با توانایی مصرف سیانید به عنوان تنها منبع نیتروژن در شرایط قلیایی جداسازی و خالص گردید. سویه های باکتریایی جدا شده به وسیله انواعی از واکنش‌های بیوشیمیایی باکتریولوژیک و تستهای استاندارد از قبیل رنگ آمیزی گرم و مورفولوژی کلنی‌ها بررسی شدند. عملکرد هر یک از میکروارگانیسم ها در تجزیه سیانید مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات در دمای 30°C و pH=10-9/5 و شرایط هوادهی 150 rpm انجام گرفت. میکروارگانیسم انتخاب شده به عنوان بهترین سوش تحمل 500 میلی گرم بر لیتر سیانید را داشت و سیانید در غلظت 200 میلی گرم بر لیتر طی چهار روز به طور کامل مصرف شد.

کلمات کلیدی

تصفیه بیولوژیکی ، سیانید ، شرایط قلیایی ، جداسازی میکروارگانیسم

نکات برجسته پژوهش

- جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده سیانید (میکروارگانیسم های بومی)
- ایمنی بالای تحقیقات به دلیل شرایط قلیایی و عدم تولید گاز HCN

* yaghmaei@sharif.ir

1- مقدمه

ترکیبات سیانیدی بطور وسیعی در دنیا تولید و مصرف می‌گردد. منظور از سیانید همان یون CN است که یک ترکیب شیمیایی کربن و نیتروژن دار می‌باشد و با بسیاری از مواد معدنی و آلی واکنش می‌دهد. سیانید یک ترکیب فوق العاده سمی است که بطور طبیعی و صنعتی وارد محیط می‌شود. ترکیبات سیانیدی توسط گونه‌های بسیاری از باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و بند پایان سنتز می‌شود و از طریق خروجی واحدهایی از قبیل داروسازی، صنعت اتومبیل، روکش فلزات، صنعت الکترونیک، تهیه کک و زغال سنگ، پلاستیک سازی، سموم کشاورزی و معادن طلا وارد محیط زیست می‌گردد[1]. سیانید معمولا در محیط به شکل‌های مختلف HCN، نمک های KCN،NACN و انواع کمپلکس‌های فلزی از جمله $Zn(CN)_2$ و پتاسیم فری سیانید حضوردارد. ویژگی سمیت هر کمپلکس فلزی سیانید به وسیله توانایی آزاد سازی (CNوHCN) تعیین می‌شود. مهمترین اثر سمی سیانید مهار سیتوکروم اکسیداز و در نتیجه تداخل در تنفس سلولی است و در این حالت اگر چه اکسیژن در اختیار سلول قرار دارد ولی قادر به استفاده از آن نیست و نتیجه این عمل تجمع اسید لاکتیک و مرگ سلولی ناشی از آنوکسی است. دوز کشنده سیانید سدیم و پتاسیم 200-300 میلی گرم بر لیتر بوده در حالی که HCN ، 50 میلی گرم بر لیتر می‌باشد[2]. سازمان جهانی بهداشت حداکثر غلظت مجاز سیانید در آب را 0/07 میلی گرم در لیتر تعیین کرده است[3]. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران نیز این مقدار را به عنوان استاندارد ملی در نظرگرفته است[4]. به دلیل سمیت و خطرات بالای سیانید کنترل و حذف آلودگی‌های سیانید همیشه مد نظر بوده است. روش‌های شیمیایی زیادی برای تصفیه پساب های حاوی سیانید توسعه یافتند اما تمام این روش‌ها تنها بر روی HCN، CN و سیانیدهایی که پیوند ضعیفی با فلزات دارند موثر است. کمپلکس‌های فلزی سیانید نمی‌توانند با این روش ها تصفیه شوند. این روش ها بر اساس بازیابی سیانید به روش اسیدی شدن و یا تخریب با اکسیداسیون شیمیایی است. روش معمول حذف سیانید در سطح دنیا اکسیداسیون شیمیایی – کلر زنی در محیط قلیایی است و سایر روش‌های حذف عبارتند از اکسیداسیون در حضورکاتالیست، ازون زنی، پراکسید هیدروژن ، پراکسی سولفات، جذب سطحی با استفاده از کربن فعال، اسمز معکوس و روش های بیولوژیکی می‌باشد. روش‌های شیمیایی و فیزیکی، گران و نیازمند تجهیزات خاص هستند و غالبا از لحاظ زیست محیطی مشکل ساز می باشند. بنابراین توسعه روشی جایگزین که توانایی بالا در حذف با هزینه پایین داشته باشد بسیار ضروری است. روش تصفیه بیولوژیکی یک جایگزین مطمئن و سازگار با محیط زیست و ارزان می باشد که متکی به توانایی میکروارگانیسم های بومی است[5,6]. در زمینه حذف بیولوژیکی سیانید در شرایط اسیدی یا خنثی مطالعات زیادی صورت گرفته است . اکثرا گونه های میکروبی تحمل شرایط قلیایی را دارند ولی قادر به تجزیه سیانید نمی باشند. به همین دلیل مطالعات در این خصوص محدود بوده است. یکی از مطالعات انجام شده در مورد قارچ *Fusarium solani* بوده که سیانید را به عنوان تنها منبع نیتروژن مصرف می کند[7]. باکتری *Burkholderia cepacia* توانایی مصرف سیانید را در pH بهینه 10 را دارد ولی نیاز به منبع کربن گلوکز دارد و نسبتا به یون های فلزی از قبیل آهن و مس حساس است[8,9]. مطالعه حاضر که برای اولین بار در ایران انجام شده دارای چند برجستگی مهم نسبت به تحقیقات قبلی می باشد. نخست بررسی تجزیه بیولوژیکی سیانید در شرایط قلیایی است که مطالعه تحت این شرایط را راحتر می سازد و از امنیت بالایی برخوردار است؛ دوم جداسازی و استفاده از میکروارگانیسم های بومی است که مدت ها در معرض سیانید بوده اند.

2- مواد و روش ها

2-1- **نمونه برداری**: به منظور دستیابی به باکتری‌هایی با قابلیت تحمل سیانید در غلظت بالا، از پساب سیکل خنک کننده کوره‌های کک ساز ذوب آهن اصفهان نمونه برداری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. pH نمونه 7/2 و غلظت

سیانید تقریبا 210 میلی گرم بر لیتر بود.

2-2- غنی سازی ، جداسازی و شناسایی باکتری ها : از محیط نوترینت براث جهت غنی سازی باکتری ها استفاده شد. درون ارلن‌های250میلی لیتری حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت 10% از نمونه تلقیح و به منظور سازگاری میکروارگانیسم ها، کشت های 3 روزه همراه با تغییر غلظت سیانید از 30 تا 100 میلی گرم بر لیتر طی2 هفته انجام و محیط غنی شده بر روی شیکر چرخاننده در شرایط 30°C و 150 rpm انکوبه شد. برای جداسازی باکتری‌ها با توانایی مصرف سیانید بعنوان منبع N از محیط بافری K_2HPO_4-NaOH حاوی 100 میلی گرم بر لیتر سیانید استفاده شد. پس از دو مرحله کشت در محیط بافری مایع، با استفاده از روش کشت خطی میکروارگانیسم ها جدا و پلیت ها در30°C و 24 ساعت انکوبه شدند و این کار تا زمانی که مطالعات میکروسکوپی خالص و یک شکل بودن کلنی ها را در محیط کشت جامد تائید کند ادامه یافت. در نهایت از هر میکروارگانیسم اسلنت تهیه و در دمای 4 درجه نگهداری شد. سویه‌های باکتریایی جدا شده به وسیله انواعی از واکنش‌های بیوشیمیایی باکتریولوژیک و آزمون های رشد (اکسیداز، کاتالاز) تست های قندی از قبیل : تخمیرلاکتوز، ساکاروز، گلوکز، تست هیدرولیز نشاسته و تستهای استاندارد از قبیل رنگ آمیزی گرم ، مورفولوژی و رنگ کلنی به منظور شناسایی ارزیابی شدند[10].

2-3- محیط و شرایط کشت: ا لیتر محیط کشت بافری K_2HPO_4-NaOH حاوی 4g NaOH، 4/35g K_2HPO_4 و 10 ml از محلول نمک های trace (0/3 g $FeSO_4.7H_2O$، 1/8 g $MgSO_4.7H_2O$، 0/13 g $CoCl_2$، 0/04 g $CaCl_2$، 0/02 g MoO_3 ، 0/04 g $MnCl_2.4H_2O$ در 1 لیتر آب دیونیزه) و 1g عصاره مخمر می باشد. سیانید بصورت محلول استریل KCN در غلظت‌های مختلف به عنوان تنها منبع نیتروژن و گلوکز به عنوان تنها منبع کربن در غلظت 1g/l استفاده شد. pH بین 5/9-10، شدت هوادهی 150 دور بر دقیقه ، دمای انکوباسیون 30 °C تنظیم و در تمام مراحل آزمایش یک نمونه کنترلی بدون تلقیح قرار داده شد.

2-4- ارزیابی حذف سیانید: میکروارگانیسم های جدا شده برای بررسی توانایی حذف سیانید در محیط بافری حاوی KCN در غلظت های (100-200-300-350-400-450و 500) در ارلن‌های 500 میلی لیتری حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت تلقیح شدند. نمونه برداری در فواصل مختلف طی 2 هفته انجام گرفت. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سیانید باقیمانده اندازه گیری شد.

3- اندازه‌گیری و سنجش سیانید

اندازه گیری غلظت سیانید باقیمانده در محلول با دستگاه اسپکتوفتومتر DR5000 بر اساس روش Pyridine-Pyrazalone انجام شد. طول موج دستگاه 612 nm بود.[11]

4-نتایج و بحث

4-1- میکروارگانیسم‌های جدا شده : دراین مطالعه 5 میکروارگانیسم جداسازی و خالص گردید. این نمونه ها S1-S5 نامگذاری شدند. خصوصیات مورفولوژی، گرم و خصوصیات دیگر آنها در جدول (1) ذکر شده است. به منظور بررسی عملکرد هر یک از میکروارگانیسم‌ها آزمایشاتی انجام گرفت تا قابلیت هر یک در تجزیه سیانید مشخص و بهترین سوش انتخاب شود. نتایج آن در جدول (2) ارائه شده است. برای این منظور از غلظت سیانید 200 میلی گرم بر لیتر استفاده شد و دمای انکوباسیون 30°Cبود. همان طور که مشخص است گونه S2 با بیش از 85% تجزیه سیانید در 72 ساعت بیش ترین کارائی را در مقایسه با سایر میکروارگانیسم ها از خود نشان داد. بنابراین از این سوش در مراحل بعدی این مطالعه استفاده شد.

جدول 1: مشخصات میکروارگانیسم های جداسازی شده

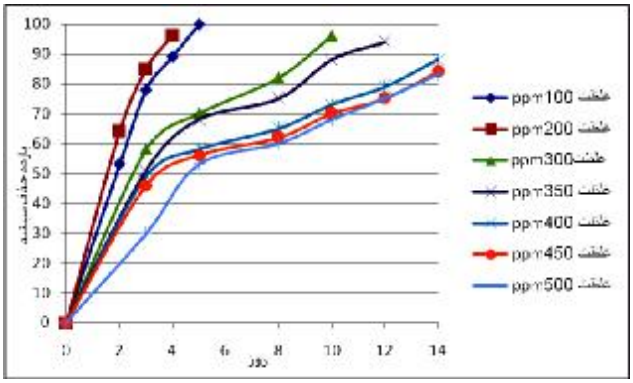
میکروارگانیسم ها	S1	S2	S3	S4	S5
شکل ظاهری	باسیل درشت	باسیل درشت و دراز	کوکسی	باسیل ریز- نحوه قرارگیری بصورت لانه زنبوری	باسیل ریز
رنگ کلنی	سفید	زرد براق	زرد مات	زرد	سفید براق
آزمون رنگ آمیزی گرم	گرم مثبت	گرم منفی	گرم مثبت	گرم منفی	گرم منفی
آزمون کاتالاز	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت
آزمون اکسیداز	منفی	مثبت	مثبت	منفی	مثبت
آزمون هیدرولیز نشاسته	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی
آزمون تخمیر لاکتوز، ساکاروز، گلوکز	هر سه قند را تخمیر می‌کند	فقط گلوکز را تخمیر می‌کند	هر سه قند را تخمیر می‌کند	فقط گلوکز را تخمیر می‌کند	فقط گلوکز را تخمیر می‌کند
تولید گاز H_2S	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی

جدول 2: بررسی عملکرد میکروارگانیسم ها در تجزیه سیانید

میکروارگانیسم ها	S1	S2	S3	S4	S5
درصد حذف %	45	86	62	73	67

4-2- ارزیابی حذف سیانید :

حذف سیانید توسط سوش انتخاب شده در غلظت های 100،200،300،350،400،450و500 تا 2 هفته ارزیابی شد. نتایج حاصل در قالب منحنی بر اساس بازده حذف سیانید در شکل (1) نمایش داده شده است. همانطور که از شکل مشخص است غلظت 200 میلی گرم بر لیتر به عنوان غلظت بهینه در کمترین زمان انکوباسیون انتخاب شد. غلظت سیانید نمونه‌های کنترلی بدون تلقیح ثابت بود بنابراین تبخیر سیانید بصورت HCN در طول آزمایش مشاهده نگردید.



شکل(1): تاثیر غلظت اولیه سیانید روی میکروارگانیسم S2

5- نتیجه‌گیری

پساب حاوی سیانید قابل تصفیه با روش های شیمیایی و فیزیکی است . اما این روش‌ها به دلیل گران بودن معرف ها ، نیاز به تجهیزات خاص و همچنین افزودن آلاینده دیگر به محیط زیست مطلوب نیستند. روش بیولوژیکی به دلیل ارزان بودن و سازگاری با محیط زیست جایگزین مناسبی برای تصفیه سیانید به حساب می‌آید. یک فرایند بیولوژیکی موفق، به حضور میکروب هایی با توانایی فیزیولوژیکی و متابولیکی تجزیه آلاینده در محیط وابسته است. در این مطالعه 5 میکروارگانسیم جدا سازی و خالص شد و تاثیر غلظت اولیه سیانید بر روی بهترین سوش انتخاب شده بررسی گردید. در ادامه تحقیق شرایط عملکرد بهینه باکتری های فوق مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مراجع

[1] Smith, T. I. Mudder., *The chemistry and treatment of cyanidation wastes*, Mining Journal Books Ltd., London, United Kingdom, 1991

[2] J. L. Huiatt, "*Cyanide from mineral processing: Problems and research needs*," in Proc. Conf. Cyanide and the environment. Tucson, Arizona,1984, pp. 65-81

[3] World Health Organization, *Cyanide in drinking-water, background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality*, WHO., Geneva, 2003

[4] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, *Quality standards of drinking water*, Tehran, 1997

[5] Harris, R., A. W. Bunch, and C. J. Knowles**,** *Microbial cyanide and nitrile metabolism*, Sci. Prog. 71**:**293–304, 1987

[6] R.R. Dash, C.B. Majumder, A. Kumar, *Treatment of metal cyanide bearing wastewater by simultaneous adsorption biodegradation (SAB)*, J. Hazard.Mater. 387–396.London, United Kingdom. 2008

[7] . Dumestre, A., T. Chone, J.-M. Portal, M. Gerard, and J. Berthelin,.*Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of Fusarium solaniisolated from contaminated soils.* Appl. Environ. Microbiol. 63**:**2729–2734, 1997

[8] Adjei, M. D., and Y. Ohta, *Isolation and characterization of a cyanideutilizing Burkholderia cepacia strain*. World J. Microbiol. Biotechnol. 15:699–704, 1999.

[9] Adjei, M. D., and Y. Ohta, Factors affecting the biodegradation of cyanide by *Burkholderia cepacia* strain C-3. J. Biosci. Bioeng. 3:274–277,2000

[10] D. H. Bergey and G. H. John, "Bergey's manual of determinative Bacteriology," William and Wilkins, Baltimore, Maryland, pp. 71-74, 1994,

[11]www.hach.com/asset-get.download-en.jsa?id=7639983603