

The role of *Bacillus subtilis* in the biological treatment of soda and kraft pulping wastewater

Elmira faal shirkadeh¹, Mearaj sharari^{2*}, Mohammad Ahmadi², Bita MoeziPour³, Farajollah HajiAlizadeh⁴

1- M.Sc. graduated of Wood Science and Technology department of natural resources Faculty of agriculture and natural resources University of Mohaghegh Ardabili Ardabil Iran.

1- Corresponding author, Associate prof. of Wood Science and Technology University of Mohaghegh Ardabili, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardabil, Iran. Email: mearaj.sharari@gmail.com

2- Assistant prof. of Wood Science and Technology department of natural resources Faculty of agriculture and natural resources University of Mohaghegh Ardabili Ardabil Iran.

3- M.Sc. Student of Wood Science and Technology department of natural resources Faculty of agriculture and natural resources University of Mohaghegh Ardabili Ardabil Iran.

Received: June 2025

Accepted: August 2025

Abstract

Problem definition and objectives: The growing demand for water and the resulting increase in wastewater generation in the pulp and paper industry particularly in soda and kraft pulping processes have led to the production of large volumes of black liquor with extremely high pollutant loads. These effluents are mainly composed of lignin, phenolic compounds, sulfur compounds, silica, and ash, which make their treatment and disposal both technically challenging and environmentally hazardous. Traditional treatment methods such as evaporation and incineration are economically unfeasible due to high energy demands, large capital investments, high operational costs, and relatively low efficiency. This study aims to investigate the potential of biological treatment of black liquor obtained from wheat straw soda and kraft pulping using free cells of *Bacillus subtilis*. The effectiveness of this method in reducing key pollution parameters including Biological Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), Total Suspended Solids (TSS), and Total Dissolved Solids (TDS) was evaluated.

Methodology: Black liquor was prepared under controlled laboratory conditions from soda and kraft pulping of wheat straw. Free cells of *B. subtilis*, obtained from the Iranian Industrial Microorganism Collection, were cultured in nutrient-rich media containing carbon and nitrogen sources, and added to diluted black liquor samples. The experiments were conducted at optimal conditions (pH = 7, 30°C, 80 rpm) over incubation periods of 0, 1, 3, 7, 11, and 14 days. Key parameters (BOD, COD, TSS, TDS) were measured in triplicate and statistical analysis was carried out using SPSS software.

Results: The results showed that *B. subtilis* significantly reduced pollution indicators, particularly in soda black liquor. After 14 days of treatment, COD reduction reached 51.04% in soda and 38.03% in kraft liquor. BOD was reduced by 67.54% in soda and 40.14% in kraft. TDS and TSS reduction rates were 45.88% and 22.43% in soda, and 49.32% and 17.32% in kraft, respectively. The most effective performance was observed within the first five days of treatment. Afterward, the rate of reduction performance decreased, likely due to nutrient depletion and increased

environmental toxicity. The overall treatment efficiency was significantly lower in kraft liquor due to its higher lignin condensation and sulfur content.

Conclusion: Biological treatment of soda and kraft black liquor using *B. subtilis* free cells proved effective in reducing major pollutants such as BOD, COD, TSS, and TDS. This method can serve as a cost-effective, efficient, and environmentally friendly approach for the primary treatment of effluents from cellulosic industries. Moreover, it may improve the performance of downstream processes such as activated sludge systems and biogas production.

Keywords: Biological Treatment, Black Liquor, Kraft, Soda, *Bacillus subtilis*, Wastewater Treatment.

نقش باکتری *Bacillus subtilis* در تیمار زیستی پساب خمیر سودا و کرافت

المیرا فعال شیرکده^۱، معراج شنری^{۲*}، محمد احمدی^۳، بیتا معزی پور^۲، فرج‌اله حاجی‌علیزاده^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مهندسی صنایع چوب و فراورده‌های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
 ۲- نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: mearaj.sharari@gmail.com
 ۳- استادیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
 ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی صنایع چوب و فراورده‌های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۴

چکیده

بیان مساله و اهداف: افزایش روزافزون مصرف آب و تولید پساب در صنایع خمیر و کاغذ، به‌ویژه در فرایندهای پخت سودا و کرافت، منجر به تولید حجم عظیمی از مایع سیاه با بار آلاینده‌گی بسیار بالا شده است. این پساب‌ها عمدتاً حاوی لیگنین، فنول‌ها، ترکیبات گوگردی، سیلیس و خاکستر هستند که نه تنها تیمار و دفع آن‌ها را دشوار می‌سازند، بلکه تهدیدی جدی برای محیط زیست و منابع آبی به شمار می‌روند. روش‌های سنتی تصفیه، از جمله تبخیر و سوزاندن به دلیل هزینه‌های زیاد انرژی، نیاز به سرمایه‌گذاری عظیم، هزینه عملیات زیاد و بازده نسبتاً کم از کارایی و صرفه اقتصادی لازم در مقیاس صنعتی برخوردار نیستند. از این رو در این پژوهش، اثربخشی تیمار زیستی مایع سیاه حاصل از فرایند پخت سودا و کرافت کاه گندم با بهره‌گیری از باکتری *Bacillus subtilis* و با استفاده از سلول‌های آزاد در کاهش پارامترهای آلودگی نظیر اکسیژن مورد نیاز بیولوژیکی (BOD)، اکسیژن مورد نیاز شیمیایی (COD)، کل مواد جامد معلق (TSS) و کل مواد جامد حل شده (TDS) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه، مایع سیاه پخت از فرایند سودا و کرافت کاه گندم در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی تهیه شد. تیمار زیستی با استفاده از سلول‌های آزاد *B. subtilis* که از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه گردیده بود، صورت گرفت. سلول‌های باکتریایی پس از تکثیر و آماده‌سازی در محیط کشت مایع حاوی مواد مغذی (کربن و نیتروژن) به نمونه‌های مایع سیاه رقیق شده افزوده شدند. شرایط بهینه برای تیمار (pH=7، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۸۰ دور در دقیقه) در بازه زمانی ۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱ و ۱۴ روز در نظر گرفته شد. شاخص‌های کلیدی آلودگی شامل BOD، COD، TDS و TSS در روزهای مختلف از تیمار اندازه‌گیری شد. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت پذیرفت.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که *B. subtilis* توانایی قابل توجهی در کاهش شاخص‌های آلودگی مایع سیاه، به ویژه در فرایند سودا دارد. در پساب سودا، میزان کاهش COD پس از ۱۴ روز تیمار به ۵۱/۰۴ درصد و در کرافت به ۳۸/۰۳ درصد رسید. کاهش BOD در سودا برابر با ۶۷/۵۴ و در کرافت ۴۰/۱۴ درصد بود. همچنین میزان کاهش TDS و TSS در سودا به ۴۵/۸۸ و ۲۲/۴۳ درصد و در کرافت به ترتیب ۴۹/۳۲ و ۱۷/۳۲ درصد ثبت شد. عملکرد تیمار زیستی در روزهای ابتدایی (۱ تا ۵) بیشترین کارایی را نشان داد و پس از آن به علت کاهش منابع غذایی و احتمال افزایش سمیت محیط، آهنگ کاهش شاخص‌ها کندتر شد. تحلیل منحنی‌های رشد و تخریب آلاینده‌ها نشان داد که کارایی *B. subtilis* در پساب کرافت به دلیل حضور لیگنین متراکم و ترکیبات گوگردی، به طور معناداری پایین‌تر از پساب سودا است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که تیمار زیستی مایع سیاه پخت سودا و کرافت با استفاده از باکتری *B. subtilis* به صورت سلول‌های آزاد، می‌تواند در کاهش آلاینده‌های اصلی نظیر BOD، COD و TDS پساب موثر باشد و به عنوان رویکردی اقتصادی، کارآمد و دوستدار محیط زیست در تصفیه اولیه پساب‌های صنایع سلولزی مورد استفاده قرار گیرد. فرایند تصفیه زیستی با باکتری‌ها به دلیل بهره‌وری زیاد، کاهش تولید لجن و سازگاری با شرایط

عملیاتی می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های پرهزینه شیمیایی و حرارتی باشد و زمینه بهبود عملکرد فرآیندهای بعدی مانند لجن فعال و تولید بیوگاز را فراهم کند.

واژه های کلیدی: تیمار زیستی، مایع سیاه پخت، کرافت، سودا، *Bacillus subtilis*، تصفیه پساب.

مقدمه

با توجه به محدودیت منابع آبی جهان و مصرف زیاد آب در صنایع خمیر و کاغذ و تولید پسابی تیره با بار آلاینده‌گی زیاد، ضرورت تصفیه صحیح این حجم از پساب از نظر زیست‌محیطی و اقتصادی دارای اهمیت ویژه می‌باشد [۱ و ۲]. برای تولید یک تن خمیر کاغذ حدود ۷ تن مایع سیاه تولید می‌شود که حدود ۴۸-۴۰ درصد آن از لیگنین تشکیل شده می‌باشد. این مقدار، به لحاظ حجمی تنها ۱۵-۱۰ درصد از کل مایع سیاه را شامل می‌شود، ولی مسئول ۹۵-۹۰ درصد آلودگی کل مایع سیاه می‌باشد [۳]. با اینکه نقطه اشباع الیاف کاه گندم در تهیه خمیر کاغذ نسبت به چوب کمتر بوده و مصرف آب و انرژی آن به ترتیب حدود ۵ و ۳۰ درصد کمتر از چوب است ولی یکی از مشکلات توسعه این صنعت با کاه گندم، وجود مقادیر زیاد خاکستر و ترکیبات فنلی می‌باشد که به حالیت بالای لیگنین مرتبط می‌شود [۴]. یکی از استراتژی‌های مهم برای تصفیه مایع سیاه در کارخانه‌های بزرگ خمیر و کاغذ، سوزاندن و بازیابی آن می‌باشد که مشکلاتی از جمله نیاز به سرمایه‌گذاری عظیم هزینه عملیات زیاد و پایین بودن نرخ برگشت بهره‌وری مواد و سرمایه دارد [۵]. از آنجا که یکی از ضروریات سوزاندن مایع سیاه در کوره‌های بازیابی، رساندن غلظت به ۸۰-۷۰ درصد می‌باشد [۶]. به دلیل وجود پارانشیم زیاد در ساقه کاه گندم و ۷-۴ درصد سیلیس و خاکستر حل شده در فرآیند قلیایی، حین تغلیظ مایع پخت سیاه در تیخیرکننده‌ها (تا حد ۵۰ درصد) و فرآیند بازیابی مواد شیمیایی مشکلاتی ایجاد می‌شود [۷ و ۸]. همچنین به جهت وجود سیلیس زیاد در کاه گندم و تبدیل آن به سیلیکات سدیم در مایع پخت سیاه عمل سوزاندن این ماده در کوره با صرف انرژی زیاد همراه بوده، بنابراین به‌کارگیری فرآیند بازیابی مواد قلیایی در پخت سودا و کرافت خصوصاً در ارتباط با ضایعات کشاورزی و کاه گندم به سختی قابل انجام می‌باشد [۹]؛ بنابراین به‌کارگیری

فرآیندهای زیستی برای باز بازیابی مواد قلیایی در پخت سودا و کرافت خصوصاً با ضایعات کشاورزی و کاه گندم، به لحاظ فنی و اقتصادی قابل انجام است [۹]. همچنین، مطالعه Chang و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که استفاده از گونه‌های *Bacillus* در تجزیه زیستی لیگنین قلیایی موجب بهبود فرآیند تیمار و افزایش کارایی آنزیم‌های سلولاز می‌شود [۲]. از این‌رو، روش‌های زیستی می‌توانند گزینه‌ای مناسب برای پیش تیمار تولید سوخت‌های زیستی و بیوگاز باشند [۱۰]. روش‌های بیولوژیکی از نظر سازگاری با محیط زیست، تثبیت مواد آلی، کاهش هزینه‌های بهره‌برداری و نگهداری، کاربرد گسترده، تحمل حد بالای مواد آلی، دفع بهینه لجن تولید شده، نسبتاً مورد اقبال بیشتری می‌باشد [۱۱ و ۱۲]. باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها، به دلیل تحمل دامنه وسیع PH، تطبیق‌پذیری بیوشیمیایی و سازگاری زیاد محیطی، قابلیت تجزیه بیولوژیکی بیشتری دارند. طبق تحقیقات انجام شده، گونه باکتریایی *B. subtilis* توانایی کاهش بار عمده آلودگی پساب از نظر شاخص آلودگی BOD_1 (۸۷/۲ درصد)، COD_2 (۹۴/۷ درصد) و لیگنین (۹۷ درصد) را دارد [۱۳]. در این تحقیق تلاش شده با اندازه‌گیری شاخص‌های آلودگی پساب، نظیر BOD ، TSS ، COD ، TDS ، اثر تیمار بیولوژیکی باکتری *B. subtilis* با استفاده از سلول‌های آزاد در کاهش شاخص‌های آلودگی پساب خمیر کاغذ سودا و کرافت کاه گندم در طی زمان تیمار مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی مایع سیاه پخت

¹ Biological Oxygen Demand

² Chemical Oxygen Demand

³ Total Suspended Solids

⁴ Total Dissolved Solids

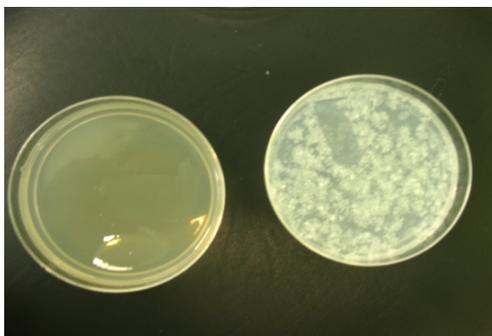
میکروارگانیزم

در این مطالعه از باکتری *B. subtilis* تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی ایران، استفاده شد.

محیط کشت جامد و کشت میکروبی

تهیه پلیت‌های کشت جامد، جهت کشت پش‌تیبان با استفاده از ۴۲ گرم PDA در ۱ لیتر آب مقطر و در شرایط کاملاً استریل انجام شد. عمل کشت، زیر هود لامینار بر روی پلیت‌های جامد انجام و به مدت ۱۰ روز تحت شرایط استریل در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد تا زیست‌توده باکتری بر روی این پلیت‌ها ظاهر شوند. به منظور دسترسی به کشت‌های تازه و جوان، این عمل هر ۲-۳ هفته یکبار بر روی پلیت‌های کشت جامد به تعداد مناسب تکرار شد.

مایع سیاه پخت کاه گندم از طریق پخت در آزمایشگاه صنایع سلولزی دانشگاه محقق اردبیلی تهیه گردید. شرایط عملیات پخت کاه گندم به روش سودا و کرافت در شرایط کاملاً یکسان با ۵۰ گرم کاه گندم در دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه با قلیایی‌ات و سولفیدیت ۱۶ درصد انجام شد. در ادامه، خمیر کاه گندم با استفاده از ۳ لیتر آب مقطر شستشو داده شده و پس‌اب حاصل از مش ۲۰۰ عبور داده شد. برای جلوگیری از تغییر خواص، پس‌اب را در ظروف سرپسته استریل شده ریخته و تا زمان انجام آزمایش برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در دمای زیر ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش‌های اولیه جهت امکان‌سنجی انجام فرآیند تخریب زیستی در کاهش شاخص‌های آلودگی، رقیق‌سازی مایع سیاه پخت به میزان ۱۰ برابر، انجام شد.

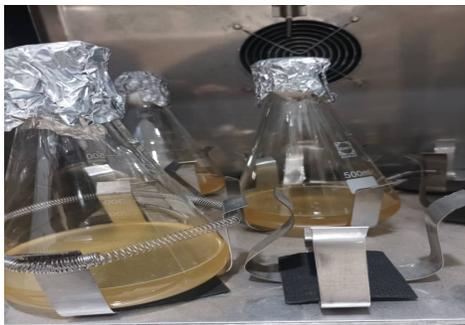


شکل ۱- باکتری رشد کرده بر روی پلیت (راست) و محیط کشت جامد (چپ)

از گاز استریل و فویل آلومینیومی بسته و درون اتوکلاو (۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۴-۱۲۱ درجه سانتی‌گراد) استریل گردید تلقیح باکتری از طریق کشت‌های پش‌تیبان جامد در زیر هود لامینار در این محیط انجام شد و ارلن‌های تلقیح شده با باکتری، داخل شیکر انکوباتور (دما ۳۰، دور شیکر 50 ± 80) به مدت ۳ روز انکوبه شد.

تکثیر باکتری در محیط کشت مایع

برای تهیه محیط کشت مایع، ۴۲ گرم از محیط کشت (Nutrient Broth) برند شرکت کیولب انگلستان را به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و بعد از حل شدن در آب به مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع آماده شده به ارلن مایرهای ۵۰۰ سی‌سی ریخته و درب آن با استفاده



شکل ۲- تکثیر باکتری در محیط کشت مایع

تیمار پساب با باکتری سلول آزاد

برای تیمار پساب از باکتری‌های تکثیرشده در محیط کشت مایع، ۵ میلی‌لیتر از باکتری را به همراه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مایع دارای مواد مغذی کربن (۱۰ گرم بر لیتر گلوکز) و نیتروژن (۵ گرم بر لیتر پپتون) و نمک‌های معدنی (MSB) شامل $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵، NH_4Cl ۰/۱، K_2HPO_4 ۰/۵، $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۰۵، $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ۲ گرم بر لیتر KH_2PO_4 به ۱۰۰ میلی‌لیتر پساب دارای pH برابر ۷ اضافه کرده و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۸۰ دور در دقیقه انکوبه کرده و در دوره زمانی ۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱ و ۱۴ روزه از انکوباتور خارج کرده و شاخص‌های آلودگی، مطابق روش‌های استاندارد، اندازه‌گیری شد.

متغیرها و ثابت‌های تیمار

به منظور انجام تیمارهای تحقیق، برخی خصوصیات نظیر (pH ۷)، دمای انکوباسیون (۳۰ درجه سانتی‌گراد)، دور شیکر (۸۰ دور در دقیقه)، تیمار به صورت سلول‌های آزاد باکتری (غیر تثبیت) و مواد مغذی به‌عنوان منبع

کربن، نیتروژن و ریز مغذی‌ها بر اساس تحقیقات پیشین و آزمون‌های اولیه به طور ثابت برای تمام تیمارها در نظر گرفته شد و برای بررسی مقایسه‌ای بین تیمارهای مختلف، متغیرهای تحقیق به شرح جدول ۱ در نظر گرفته شد. برای بررسی میزان خطا و پایایی نتایج تیمارهای مختلف، تمام آزمون‌های میکروبی با سه تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های آلودگی پساب

اندازه‌گیری اکسیژن موردنیاز بیولوژیکی (BOD)

برای انجام آزمون BOD از سیستم OxiDirect (شکل ۳) استفاده شد. مکانیسم انجام این سیستم بر پایه‌ی اندازه‌گیری فشار با استفاده از سنسورهای الکترونیکی می‌باشد. سیستم BOD متر متشکل از بطری و حسگر نمونه است که بالای آن حجم مشخصی از هوا وجود دارد. جهت اندازه‌گیری BOD، ابتدا پساب به حجم ۵۶ سی‌سی در ظروف شیشه‌ای ریخته و به آن ۳ قطره محلول نیتروفیکاسیون و ۳ قطره محلول KOH (برای خنثی کردن گاز جمع شده در بالای بطری) افزوده و آن را در یخچال انکوباتور به مدت ۵ روز قرار داده تا BOD خوانده شود.

جدول ۱- متغیرهای تحقیق و سطوح مختلف آن

مدت تیمار	مایع سیاه پخت	میکروارگانیزم
۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱، ۱۴	کرافت	
۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱، ۱۴		باکتری B. subtilis
۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱، ۱۴		سودا
۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱، ۱۴		



شکل ۳- دستگاه BOD متر

۲ میلی‌لیتر از بخش صافشده را در کیت مذکور اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت درون دایجستر COD Reactor CR 25 (شکل ۴) قرار داده تا عمل اکسید شدن مواد کامل شود؛ و بعد از خنک شدن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ۷۱۰۰ (شکل ۴) به روش رنگ سنجی، اندازه‌گیری شد.



شکل ۴- دایجستر و اسپکتروفوتومتر مربوط به COD متر

اندازه‌گیری اکسیژن موردنیاز شیمیایی (COD)

تعیین COD به روش APHA (۲۰۰۵) و با استفاده از روش فلاسک بسته حاوی کیت اکسیدکننده‌های قوی دی‌کرمات‌پتاسیم و اسید سولفوریک با توان اندازه‌گیری ۰-۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (spectrophotometer Aqua) انجام گرفت. نمونه پساب‌های رقیق‌شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ کرده و بعد

اندازه‌گیری کل مواد جامد معلق (TSS)

برای به دست آوردن TSS، کاغذ صافی که در اندازه‌گیری TDS استفاده شده بود را به همراه مواد باقیمانده بر روی آن را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۳± درجه سانتی‌گراد در آن قرار داده تا خشک شود. سپس وزن آن اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه‌ی زیر، TSS مورد محاسبه قرار گرفت:

$$TSS = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 10^6 (\text{mg/l}) \quad (2)$$

W1: وزن اولیه کاغذ صافی و W2: وزن کاغذ صافی به همراه مواد باقیمانده روی کاغذ

طرح آماری

به منظور تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و جهت مقایسه‌ی معناداری تأثیر هر یک از متغیرها بر شاخص‌های آلودگی بین دو گروه از آزمون T مستقل و برای تجزیه واریانس از آزمون F و مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

اندازه‌گیری کل مواد جامد محلول (TDS)

برای اندازه‌گیری میزان TDS، ابتدا کاغذ صافی را به همراه بوتله‌چینی در آون در دمای ۱۰۳± درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گذاشته شد تا کاملاً خشک شوند و پس از آن به منظور رسیدن به دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه در داخل دسیکاتور قرار داده و در ادامه، وزن خشک اولیه هر یک اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمایش، ۳۰ میلی‌لیتر از پساب را از کاغذ صافی دارای تخلخل ۰/۴۵ میکرومتر با استفاده از پمپ خلأ عبور داده و داخل بوتله‌چینی که از قبل وزن شده بود ریخته و در آون با دمای ۱۰۳± درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا کاملاً تبخیر شود. پس از اتمام کار مجدداً بوتله‌چینی را وزن کرده و با استفاده از رابطه‌ی زیر، TDS مورد محاسبه قرار گرفت:

$$TDS = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 10^6 (\text{mg/l}) \quad (1)$$

W1: وزن اولیه بوتله‌چینی

W2: وزن بوتله‌چینی به همراه ۳۰ میلی‌لیتر پساب

صاف شده خشک

نتایج و بحث

اثر *B.subtilus* بر نرخ کاهش COD در مایع سیاه

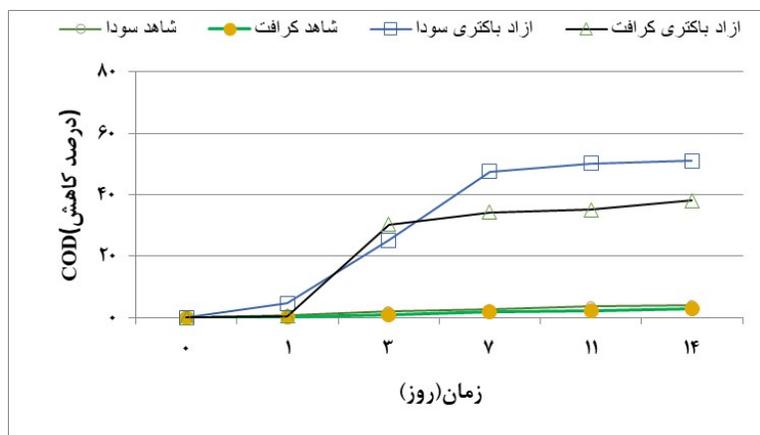
سودا و کرافت

وجود عنصر گوگرد (سولفور) در فرآیند کرافت، باعث تولید لیگنوسولفونات‌های مشتق‌شده از لیگنین می‌شود که برای تجزیه میکروبی مواد آلی پساب، نقش بازدارنده داشته و انتظار می‌رود میکروارگانیسم‌ها در تجزیه مایع سیاه فرآیند سودا موفق‌تر از فرآیند کرافت عمل کنند. مطابق شکل ۵ تا پایان روز اول، باکتری *B.subtilus* دوره سازگاری خود را طی کرده به طوری که میزان کاهش COD در مایع سیاه کرافت در این بازه زمانی، زیر ۱ درصد می‌باشد از آنجا که بر اساس مطالعات (Coleman ۱۹۶۷)، دوره‌ی نهفتگی باکتری *B.subtilus* ۲۰ ساعت می‌باشد، بنابراین سرعت سازگاری و شروع رشد نمایی در باکتری *B.subtilus* زیاد بوده و منطبق بر همین تحقیق، رشد و تکثیر حداکثری باکتری در روز سوم از طریق استفاده از گلوکز به میزان ۱ درصد برای تأمین منبع کربن مقدور می‌باشد [۱۴]. در این تحقیق، رشد نمایی این باکتری از انتهای روز اول شروع شده و در روز سوم با کاهش ۳۰/۳۳ درصدی COD، اثر خود را نشان می‌دهد. به اعتقاد Kyoung seon Min و همکاران (۲۰۱۵)، حداکثر فعالیت آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز در روز سوم تا چهارم انکوباسیون بوده و بعد با افت فعالیت مواجه می‌شود و سیر نزولی COD تا روز پنجم شیب کاهشی شدیدی را تجربه می‌کند [۱۵]. کاهش COD در انتهای روز چهاردهم به میزان ۳۸/۰۳ درصد، معنی‌دار می‌باشد به نحوی که COD اولیه با ۱۲۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پس از چهارده روز انکوباسیون به ۷۵۶۰ میلی‌گرم در لیتر، تقلیل پیدا کرد. با این حال بر اساس مطالعه Olanike و همکاران (۲۰۱۵)، لیگنین کرافت در چهار تا هشت روز اول سریع‌تر تخریب‌شده و با انکوباسیون طولانی‌تر سرعت تخریب کم می‌شود. علت آن تغییرات شیمیایی لیگنین در طول فرآیند خمیر سازی و به صورت سولفونه شدن و واکنش

تراکمی بوده است [۱۶] که این موضوع به‌وضوح در شکل ۵ مشهود است.

با توجه به ماهیت مایع سیاه فرآیند سودا و امکان تجزیه شوندگی مشتقات لیگنین و همی سلولز در مایع سیاه سودا، نرخ موفقیت کاهش COD در روز سوم توسط باکتری، ۲۵/۱ درصد محاسبه شد که این موضوع تا پایان روز هفتم تیمار، ادامه دارد. در شرایط مشابه با مقایسه نتایج این تیمار با فرآیند کرافت منطبق با شکل ۵، مشاهده می‌شود که نرخ موفقیت باکتری در فرآیند کرافت تا قبل روز هفتم به پایان رسیده است. Buraimoh و همکاران (۲۰۱۵)، معتقدند بر اساس منحنی رشد باکتری نزولی شدن منحنی تا روز دهم انکوباسیون منجر به نزولی بودن و تخریب تدریجی لیگنین و در صورت شروع رشد نمایی باکتری تخریب لیگنین نیز مجدداً شتاب بیشتری خواهد گرفت [۱۶]. شایان ذکر است بر اساس شکل ۵ در انتهای روز چهاردهم، میزان کاهش COD توسط باکتری در مایع سیاه سودا به ۵۱/۰۴ درصد (۴۶۸۰ mg/l) رسید. دلیل تفاوت زیاد بین تخریب‌های لیگنین در مطالعات مختلف وابسته به نوع باکتری، شرایط انکوباسیون، ساختار لیگنین و غلظت آن بیان شده است [۱۷].

به‌منظور انتخاب بهترین شرایط تیمار زیستی، تأثیر نوع پساب و مدت‌زمان تیمار بررسی شد. همان‌طور که شکل ۵ نشان می‌دهد در روز سوم تیمار، عملکرد باکتری در هر دو نوع پساب به‌ویژه در محیط سودا، به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. با وجود عملکرد بهتر باکتری در پساب سودا تا روز پنجم، تفاوت معناداری بین دو تیمار تا این زمان مشاهده نشد؛ اما از روز پنجم تا چهاردهم، تیمار کرافت با کاهش COD معادل ۳۸/۰۳ درصد (معادل ۷۵۶۰ میلی‌گرم در لیتر) نسبت به تیمار سودا ضعیف‌تر بود. علت این تفاوت را می‌توان در ویژگی‌های ساختاری لیگنین کرافت و سمیت بالای آن دانست که منجر به اتولیز سلولی باکتری در این محیط می‌شود.



شکل ۵- بررسی اثر مقایسه‌ای تخریب زیستی باکتری *B. subtilis* سلول آزاد در مایع سیاه سودا و کرافت بر نرخ کاهش COD

به جهت چرخه زیستی باکتری برای برون‌رفت از فاز نهفتگی، کاهش BOD به میزان ۳۲/۲۵ درصد، شتاب کاهشی مناسبی داشته و در انتهای روز چهاردهم تیمار به کاهشی معادل ۴۰/۱۴ درصد کاهش رسید. Kirby و همکاران (۲۰۰۵)، معتقدند که در طی تغییر زمان در دوره رشد میکروارگانیسم‌ها، میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب نیز تغییر می‌کند ایشان دریافتند که فعالیت آنزیم‌ها هیچ همبستگی با میزان توده سلولی میکروبی ندارد. علت این امر بستگی به شرایط کشت، دوره‌ی انکوباسیون، سرعت شیکر و وزن مولکولی مواد تخریب شونده دارند [۱۶].

در نقطه مقابل، محیط پساب سودا، شرایط مناسبی را برای تأمین مواد مغذی برای تکثیر سلول باکتری تأمین می‌کند. اولین نشانه آن کاهش زمان فاز نهفتگی باکتری می‌باشد، به طوری که در پایان روز اول (۲۴ ساعت)، ۹/۲ درصد از BOD را کاهش داده است. نکته حائز اهمیت، موفقیت باکتری به جهت سازگاری سریع‌تر در این محیط بوده است که نرخ موفقیت در کاهش BOD در روز سوم با ۳۶/۱۵ درصد می‌باشد. به طوری که در پایان روز چهاردهم، ضمن صعودی بودن نرخ کاهش BOD برخلاف آنچه در پساب کرافت مشاهده شد، به ۶۷/۵۴ درصد رسید. ریتم تغییرات BOD در طول ۱۴ روز تیمار از یک روال تبعیت کرده به طوری که با شیب فزاینده از روز سوم شروع و تا روز هفتم ادامه داشته است. Jing Yang و همکاران (۲۰۲۱) و همچنین، Vijayalakshmi و همکاران (۲۰۱۳)، دریافتند که بیشترین تخریب لیگنین در چهار روز اول انکوباسیون اتفاق می‌افتد. علت آن را به مصرف

اثر *B. subtilis* بر نرخ کاهش BOD در مایع سیاه

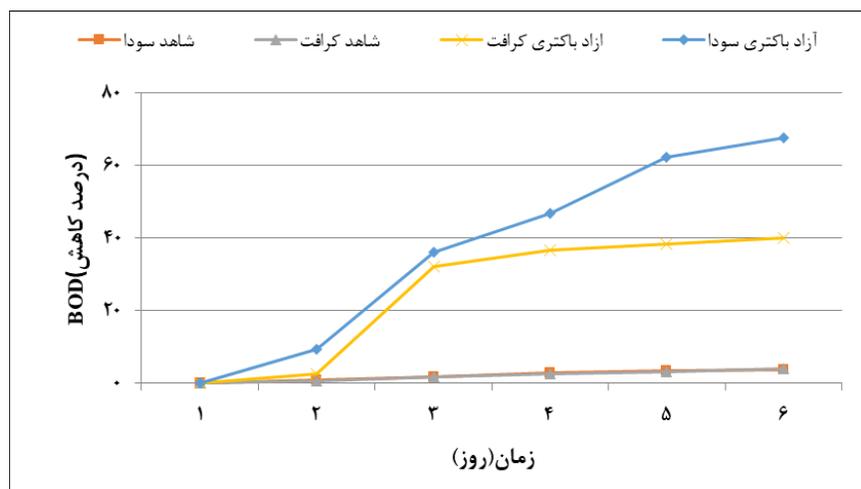
سودا و کرافت

در تصفیه پساب صنعتی، اندازه‌گیری هم‌زمان BOD و COD یکی از ضروریات بوده و بر اساس مطالعات Morales و همکاران (۲۰۲۳) اگر نسبت BOD به COD کمتر از ۰/۴۶ باشد، نرخ تخریب زیستی کم خواهد بود ولی انجام تیمار بیولوژیک با باکتری این شرایط را برای تحمل شوک آلودگی برای فرآیند لجن فعال آماده می‌کند [۱۸]. این نسبت هرچه به عدد ۱ نزدیک شود، نشان از سمیت کم آلاینده‌ها و امکان نرخ بالایی تخریب زیستی می‌باشد. در پساب‌های صنعتی ایده‌آل معمولاً این عدد ۰/۷۵ بوده و در این تحقیق ۰/۵۸۱ ارزیابی شد.

با توجه به مواد سمی و لیگنین سولفوردار سخت تجزیه شونده در مایع سیاه کرافت و مطابق شکل ۶، روند کاهش BOD در مایع سیاه کرافت مشابه COD بوده است؛ به طوری که پس از چهارده روز تیمار با باکتری آزاد BOD به میزان ۴۰/۱۴ درصد کاهش یافت در حالی که کاهش COD در همین بازه زمانی ۳۸/۰۳ درصد بوده است. بر اساس مطالعات seon Min Kyoung و همکاران (۲۰۱۵) از آنجا که میکروارگانیسم‌ها در فاز اولیه رشد، تمایل به مصرف منابع ساده کربن و نیتروژن دارند که معمولاً از طریق مواد مغذی اضافه‌شده به محیط تأمین می‌شود. به همین دلیل در روزهای ابتدایی انکوباسیون، رشد سریع باکتری‌ها مشاهده می‌شود، اما این امر لزوماً به کاهش چشمگیر BOD و COD منجر نمی‌شود، زیرا فعالیت آنزیم‌های تخریبی نیازمند زمان بیشتری برای القا و تثبیت می‌باشد [۱۵]. شایان ذکر است در روز سوم تیمار

چهاردهم)، ۴۰/۱۴ درصد کاهش BOD مشاهده شد. در حالی که در روز سوم محیط سودا، ۳۶/۱۵ درصد که این مقدار پس از ۱۱ روز (روز چهاردهم) به میزان ۶۷/۵۳ درصد کاهش نزدیک به ۳۱ درصد تفاوت را نشان داد.

لیگنین توسط باکتری‌ها به عنوان تنها منبع کربن برای رشد و متابولیسم خود ابراز داشتند [۱۹ و ۲۰]. در کل، محیط پساب کرافت به جهت خواص بازدارنده مواد سمی، نرخ کاهش BOD روند کاهشی داشته که در تأیید این موضوع در روز سوم، ۳۲/۲۵ درصد و پس از ۱۱ روز (روز



شکل ۶- بررسی اثر مقایسه‌ای تخریب زیستی باکتری *B.subtilus* سلول آزاد در مایع سیاه سودا و کرافت بر نرخ کاهش BOD

بوده و پس از آن تا روز چهاردهم روند نزولی دارد. در انتهای تیمار چهارده روزه، میزان TDS و TSS به ترتیب ۳۲/۴۹ و ۱۷/۳۲ درصد ثبت شد. در شکل ۷ اثبات شد که روند کاهش TDS بیش از TSS می‌باشد و دلیل آن مربوط به انحلال‌پذیری مواد آلی و در دسترس بودن آن‌ها برای تغذیه و تخریب، توسط آنزیم‌های سلولی می‌باشد.

اثر *B.subtilus* بر نرخ کاهش جامدات پساب مایع

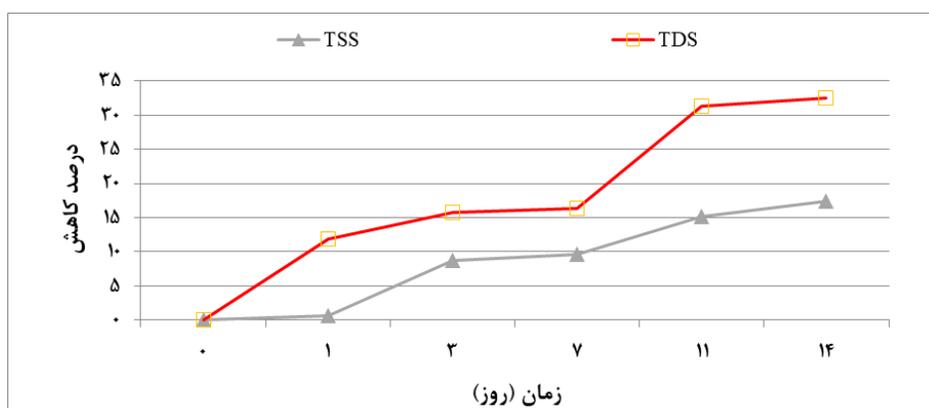
سیاه سودا

چنانچه انتظار می‌رفت، به دلیل نبود عنصر گوگرد در مایع سیاه سودا و سازگاری زودهنگام باکتری، شرایط فعالیت آن در این محیط مناسب‌تر از کرافت بود. در نتیجه، لیگنین و همی سلولز برای استخراج و تولید محصولات زیستی در دسترس‌تر قرار گرفتند؛ بنابراین پیش‌بینی می‌شود که فرآیندهای بایوریفاینری و تولید سوخت‌های زیستی در این نوع پساب عملکرد بهتری داشته باشند.

اثر *B.subtilus* بر نرخ کاهش جامدات پساب مایع

سیاه کرافت

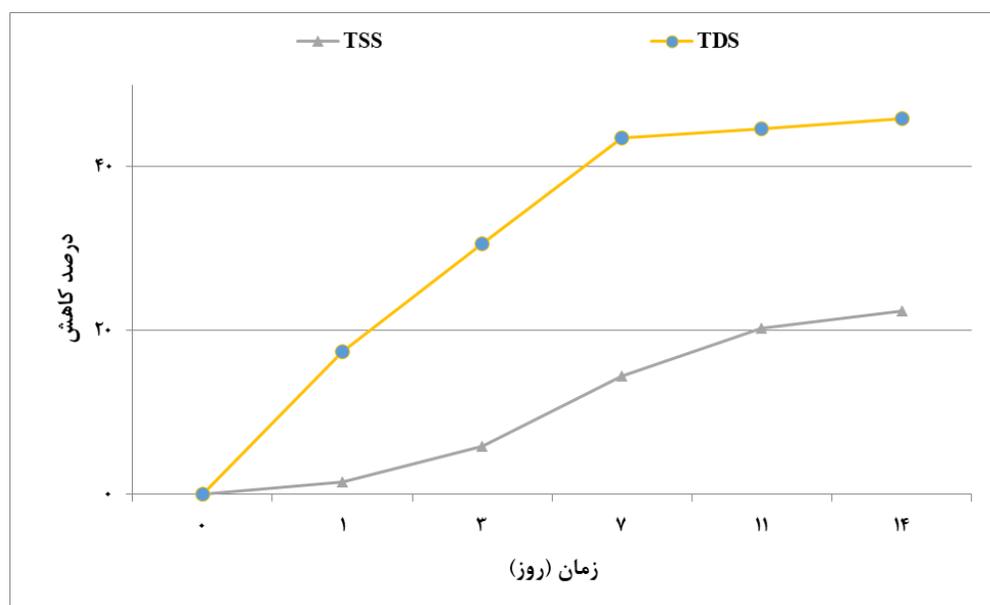
طبق آنچه در شکل ۷ قابل مشاهده است، روند کاهشی TDS و TSS تا روز سوم، صعودی بوده و در انتهای روز سوم به ترتیب ۱۵/۶۷ و ۸/۷۳ درصد از میزان جامدات فوق، کاسته شد. در ادامه روند تیمار، بنابر آنچه پیش‌تر اشاره شد به جهت پایان دوره رشد اولیه و پس از آن افزایش تولید آنزیم‌های لیگنینولیتیک، روند کاهش تا روز هفتم مشاهده شد که تفاوت میزان کاهش بین روز سوم تا هفتم در هر دو جامدات چیزی معادل ۱ تا ۱/۵ درصد می‌باشد. Perestelo و همکاران (۱۹۸۹)، دریافتند که اجزای کوچک مولکولی لیگنین خاصیت بازدارندگی در برابر رشد باکتری تا پنج روز اول را دارند که این امر منجر به مرگ باکتری‌ها به دلیل عدم وجود منبع کربن بوده و این معضل با افزودن ۱٪ گلوکز به محیط پساب برطرف می‌شود [۱۶]. ادامه روند تیمار، به نظر می‌رسد که باکتری توانسته است توانایی مناسب را کسب کند و رشد نمایی خود را مجدداً شروع و در کاهش جامدات مایع سیاه کرافت موفق عمل نماید. این روند تا روز یازدهم مشهود



شکل ۷- بررسی اثر مقایسه‌ای تخریب زیستی باکتری *B. subtilis* سلول آزاد در مایع سیاه کرافت بر نرخ کاهش جامدات پساب

محدود شد؛ اما با ادامه تیمار کاهش بیشتری مشاهده شد و در پایان روز چهاردهم، مقدار نهایی کاهش TSS برابر با ۲۲/۴۳ درصد ثبت شد. عملکرد بهتر باکتری در کاهش TDS نسبت به TSS، احتمالاً به دلیل قابلیت انحلال بیشتر مواد آلی محلول و دسترسی آسان‌تر آن‌ها برای تجزیه آنزیمی می‌باشد.

بر همین اساس، روند کاهش TDS تا روز هفتم به صورت صعودی ادامه یافت و طبق شکل ۸، مقدار کاهش آن به ۴۳/۵۲ درصد رسید. همچنین مقدار نهایی کاهش TDS پس از چهارده روز تیمار به ۴۵/۸۸ درصد افزایش یافت. از سوی دیگر، روند تغییرات TSS تحت تأثیر رشد باکتری تا روز سوم آهسته بود و کاهش آن به ۵/۹ درصد



شکل ۸- بررسی اثر مقایسه‌ای تخریب زیستی باکتری *B. subtilis* سلول آزاد در مایع سیاه سودا بر نرخ کاهش جامدات پساب

پخت سودا و کرافت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که این باکتری در بازه زمانی روز اول تا پنجم، عملکرد مطلوبی در کاهش شاخص‌های آلودگی نظیر COD، BOD، TDS و TSS داشته است.

نتیجه گیری

در این پژوهش، امکان‌سنجی استفاده از باکتری *Bacillus subtilis* به صورت سلول آزاد برای تخریب زیستی آلاینده‌های موجود در مایع سیاه حاصل از

- spisolated from Egyptian soil. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 5(1), 39-44. <https://www.researchgate.net/publication/237566835>
- [5] Mahesh, S., Prasad, B., Mall, I.D. and Mishra, I.M., 2006. Electrochemical degradation of pulp and paper mill wastewater. Part 1. COD and color removal. *Industrial & engineering chemistry research*, 45(8), pp.2830-2839. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ie0514096>
- [6] Zhang, L., Chen, K. and Peng, L., (2017). Comparative research about wheat straw lignin from the black liquor after soda-oxygen and soda-AQ pulping: structural changes and pyrolysis behavior. *Energy & Fuels*, 31(10), pp.10916-10923. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.energyfuels.7b01786>
- [7] Tutuş, A.H.M.E.T. and Eroğlu, H.Ü.D.A.V.E.R.D.I., 2003. A practical solution to the silica problem in straw pulping. *Appita Journal*, 56(2), pp.111-115. <https://www.researchgate.net/publication/279572437>
- [8] Tutus, A. and Eroglu, H., 2004. An alternative solution to the silica problem in wheat straw pulping. *Appita: Technology, Innovation, Manufacturing, Environment*, 57(3), pp.214-217. <https://search.informit.org/doi/abs/10.3316/informit>
- [9] Kumar, S., Haq, I., Prakash, J., Singh, S.K., Mishra, S. and Raj, A., 2017. Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of Kraft pulp. *3 Biotech*, 7(1), pp.1-12, DOI: 10.1007/s13205-017-0615-y
- [10] Lihong, M., Furong, L. and Jinli, W., 2009. Biological treatment of high-pH and high-concentration black liquor of cotton pulp by an immediate aerobic-anaerobic-aerobic process. *Water Science and Technology*, 60(12), pp.3275-3284. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.737>
- [11] Kamali, M., Gameiro, T., Costa, M.E.V. and Capela, I., 2016. Anaerobic digestion of pulp and paper mill wastes—An overview of the developments and improvement opportunities. *Chemical Engineering Journal*, 298, pp.162-182. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.119>
- [12] Kumar, A., Kumar, J. and Bhaskar, T., 2020. Utilization of lignin: A sustainable and eco-friendly approach. *Journal of the Energy Institute*, 93(1):235–271 <https://doi.org/10.1016/j.joei.2019.03.005>
- [13] Mir-Tutusaus, J.A., Baccar, R., Caminal, G. and Sarrà, M., 2018. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micro pollutants removal, A review. *Water research*, 138, pp.137-151 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056>
- [14] Coleman, G., 1967. Studies on the Regulation of Extracellular Enzyme Formation by *Bacillus subtilis*. مقایسه بین دو نوع پساب نشان داد که تیمار زیستی در مایع سیاه سودا، به‌طور معناداری مؤثرتر از کرافت بوده است. این تفاوت عملکرد را می‌توان به ترکیب شیمیایی متفاوت دو نوع پساب نسبت داد؛ به‌طوری‌که در پساب کرافت، وجود لیگنین متراکم، ترکیبات گوگردی، خاکستر و سیلیس، شرایط نامساعدی برای رشد باکتری ایجاد کرده و با افزایش سمیت محیط، موجب بروز پدیده اتولیز سلولی و در نتیجه کاهش اثربخشی تیمار می‌شود. در مقابل، مایع سیاه سودا فاقد این ترکیبات با‌دارنده بوده و با فراهم کردن شرایط تغذیه‌ای مناسب، محیط بهتری را برای فعالیت زیستی باکتری فراهم می‌کند. بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از تیمار زیستی با *B. subtilis* به‌عنوان روش پیش تیمار مؤثر و سازگار با محیط‌زیست در تصفیه اولیه پساب‌های صنایع سلولزی مبتنی بر پخت سودا نه‌تنها می‌تواند منجر به کاهش مؤثر آلاینده‌ها شود بلکه بستر مناسبی را برای بهبود عملکرد فرآیندهای تکمیلی نظیر لجن فعال و تولید بیوگاز نیز فراهم می‌سازد. با توجه به یافته‌های این تحقیق، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، استفاده از سیستم‌های تثبیت‌شده باکتری، تیمارهای ترکیبی با سایر میکروارگانیسم‌ها، یا افزودن پیش تیمارهای شیمیایی به‌منظور کاهش سمیت لیگنین، به‌ویژه در پساب کرافت، مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

- [1] Buraimoh, O. M., Amund, O. O. and Ilori, M. O., 2015. Kraft lignin degradation by autochthonous streptomycetes strains isolated from a tropical lagoon ecosystem. *Microbiol Biotech Food Sci*, 5 (3) pp. 248-253. <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2015/16.5.3.248-253>
- [2] Chang, Y.C., Choi, D., Takamizawa, K. and Kikuchi, S., 2014. Isolation of *Bacillus* sp. strains capable of decomposing alkali lignin and their application in combination with lactic acid bacteria for enhancing cellulase performance. *Bioresource technology*, 152, pp.429-436. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.11.032
- [3] Dafinov, A., Font, J. and Garcia-Valls, R., 2005. Processing of black liquors by UF/NF ceramic membranes. *Desalination*, 173(1), pp.83-90, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2004.07.044>
- [4] abd-elsalam, h.e. and el-hanafy, A.A., 2009. Lignin biodegradation with lignolytic bacterial strain and comparism of *Bacillus subtilis* and *Bacillus*

- [18] Aguilar-Torrejón, J. A., Balderas-Hernández, P., Roa-Morales, G., Barrera-Díaz, C. E., Rodríguez-Torres, I. and Torres-Blancas, T., 2023. Relationship, importance, and development of analytical techniques: COD, BOD, and, TOC in water An overview through time. *SN Applied Sciences*, 5(4), 118. <https://doi.org/10.1007/s42452-023-05318-7>
- [19] Yang, J., Zhao, J., Jiang, J., Xu, H., Zhang, N., Xie, J. and Wei, M., 2021. Isolation and characterization of *Bacillus* Sp. capable of degradating alkali lignin. *Frontiers in Energy Research*, 9, 807286. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.807286>
- [20] Vijayalakshmi, S., Ranjitha, J. and Rajeswari, V. D., 2013. Enzyme production ability by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*-A comparative study. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 6(4), pp. 29-32. <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ajpcr/article/view/479>
- Microbiology, 49(3), 421-431. <https://doi.org/10.1099/00221287-49-3-421>
- [15] Kyoung, S. M., Gyeongtaek, G., Han, M. W., Yunje, K. and Youngsoon, U., 2015. A dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis* exhibiting substrate-dependent optimum temperature for dyes and b-ether lignin dimer. *Scientific Reports*, 5: 8245, <https://doi.org/10.1038/srep08245>
- [16] Olanike, M. B., Olukayode, O. A. and Matthew, O. I., 2015. Kraft lignin degradation by autochthonous streptomycetes strains isolated from a tropical lagoon ecosystem. *J Microbial Biotech Food Sci*, 16: 5 (3) pp. 248-253, <http://ir.unilag.edu.ng:8080/xmlui/handle/123456789/955>
- [17] Hassan, E., Abd-Elsalam and Amr A. El-Hanafy, A., 2009. Lignin Biodegradation with Ligninolytic Bacterial Strain and Comparison of *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. isolated from Egyptian Soil. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5 (1): pp. 39-44. <https://www.researchgate.net/publication/237566835>