

Evaluation of the biodegradation of black liquor derived from soda process effluent using *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cell systems

Mearaj Sharari¹, Elmira Faal Shirkadeh², Mohammad Ahmadi¹, Bita Moezipour¹, Farajollah HajiAlizadeh², Akbar Rostampour Haftkhani¹

1 Associate Prof. Department of Wood Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2 M.Sc. Graduated, Department of Wood Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Extended Abstract

Introduction

Large quantities of wastewater containing complex organic compounds, lignin, phenolics, suspended solids, and various toxic substances are generated by the pulp and paper industry. Effluents with elevated BOD, COD, TSS, and TDS pose serious environmental and public-health risks if discharged without adequate treatment. Black liquor produced from soda pulping particularly when using non-wood raw materials such as wheat straw also contains high levels of silica, making conventional treatment methods expensive, inefficient, and in many cases impractical. Biological treatment using microorganisms has therefore gained attention as a more eco-friendly and cost-effective option, capable of degrading complex organic pollutants while reducing the need for chemicals and energy. However, free microbial cells often experience problems such as washout, gradual loss of activity, and sensitivity to toxic components. Immobilizing biomass on porous supports, especially polyurethane foam, helps retain the cells, stabilize enzyme activity, increase tolerance to environmental fluctuations, and enable repeated use. In this study, the performance of the white-rot fungus *P. chrysosporium* in both free and immobilized forms was evaluated for the treatment of soda black liquor. The focus was on reducing major pollution indicators, including COD, BOD, TDS, and TSS, to provide a sustainable approach for managing industrial wastewater.

Materials and Methods

Black liquor was obtained from laboratory-scale soda pulping of wheat straw. A 50-g oven-dry sample of wheat straw was cooked in a batch digester at 160 °C for 30 minutes using an active alkali charge of 16% NaOH based on oven-dry straw. After washing the pulp, the resulting black liquor was collected, filtered, and stored at 4 °C until needed. Before biological treatment, the liquor was diluted tenfold with distilled water. Fungal treatment was carried out at 30 °C using free and immobilized *P. chrysosporium* cells, with polyurethane foam (PUF) serving as the immobilization matrix. Experiments were conducted under near-optimal pH conditions (6.5–7) over treatment periods of 0, 1, 3, 7, 11, and 14 days. Pollution parameters COD, BOD, TDS, and TSS were measured at each interval. All experiments were performed in triplicate. Statistical analyses were conducted using SPSS software.

Results and Discussion

In soda black liquor, both free and immobilized cells of *P. chrysosporium* substantially reduced the organic and dissolved solids load, but the immobilized fungus consistently showed superior performance for all monitored parameters. By day 14, the immobilized biomass achieved reductions of 78.03% in COD, 87.54% in BOD and 74.89% in TDS, whereas the free-cell system resulted in 58.05%, 71.54% and 56.22% reduction, respectively. The highest degradation rates for both systems occurred during the early stages of treatment, particularly up to day 7, after which the removal efficiency increased more slowly. This decline in the rate of pollutant removal can be attributed to the depletion of readily biodegradable organic matter, gradual limitation of nutrients and oxygen within the biomass, and partial autolysis or aging of fungal cells. The consistently higher performance of the immobilized fungus indicates that attachment on polyurethane foam improves contact between the biomass and soluble substrates, enhances local retention of enzymes and metabolites, and protects the cells against hydraulic wash-out and fluctuations in wastewater composition. The three-dimensional structure and high porosity of the

carrier likely facilitate better mass transfer and provide additional active sites for adsorption and subsequent enzymatic degradation. Overall, the results demonstrate that immobilization not only increases the extent of COD, BOD and TDS removal, but also stabilizes fungal activity over time, thereby improving the robustness and overall efficiency of biological treatment for soda black liquor.

Conclusion

This study demonstrates that *P. chrysosporium* particularly in immobilized form on polyurethane foam—is an efficient, stable, and environmentally sound option for the primary biotreatment of soda black liquor. Both free and immobilized systems reduced COD, BOD, TDS, and TSS under controlled laboratory conditions, but the immobilized fungus consistently outperformed free cells. By day 14, the immobilized system achieved reductions of 78.03% (COD), 87.54% (BOD), and 74.89% (TDS), compared to 58.05%, 71.54%, and 56.22% for free cells, highlighting the improved treatment efficiency. The highest removal rates occurred during the first week, after which the process slowed, likely due to nutrient depletion and partial saturation of the immobilization matrix. These findings confirm the strong potential of *P. chrysosporium* to degrade complex organic pollutants in black liquor through its active ligninolytic enzymes. Immobilization enhances biomass stability, increases resilience to environmental changes, and improves enzymatic performance by ensuring sustained substrate access. Accordingly, immobilization on carriers such as polyurethane foam offers a cost-effective, environmentally friendly, and operationally stable strategy for primary treatment of effluents from the pulp and paper industry. Moreover, this approach can serve as an effective pretreatment before secondary processes such as activated sludge or advanced treatment, thereby supporting the development of semi-industrial and industrial-scale biotreatment systems based on immobilized microorganisms. Overall, the study highlights immobilized white-rot fungi as a scalable and sustainable alternative to conventional chemical or thermal treatment methods for industrial wastewater management.

Keywords: Bioremediation, *Phanerochaete chrysosporium*, soda black liquor, cell immobilization, polyurethane foam, wastewater treatment

Article Type: Research Article

Acknowledgement

This article was derived from a research project supported by Mohaghegh Ardabili University under research contract No. 19422/9/D/1404. The authors hereby express their sincere gratitude and appreciation to all the research and laboratory staff of Mohaghegh Ardabili University for their valuable assistance and support.

Conflicts of interest

The authors of this article declared no conflict of interest regarding the authorship or publication of this article.

Data Availability Statement

The datasets are available upon a reasonable request to the corresponding author.

Authors' contribution

Meraj Sharari: Conceptualization, experimental design, data validation, and original draft writing; **Elmira Faal Shirkadeh:** Conducting the experiments; **Mohammad Ahmadi:** Manuscript editing and data analysis; **Bita Moazipour:** Literature review and supervision of treatment implementation; **Farajollah HajiAlizadeh:** Assistance in research execution and statistical analysis; **Akbar Rostampour Haftkhani:** Literature review, manuscript revision, and preparation of the final version.

*Corresponding Author, E-mail: mejaraj.sharari@gmail.com

Citation: Sharari, M., Faal Shirkadeh, F., Ahmadi, M., Moezipour, B., HajiAlizadeh, F., & Rostampour Haftkhani, A. (2026). Evaluation of the biodegradation of black liquor derived from soda process effluent using *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cell systems. *Water and Soil Management and Modeling*, 6(3), 21-34.

doi: 10.22098/mmws.2025.18853.1731

Received: 18 November 2025, Received in revised form: 13 December 2025, Accepted: 08 January 2026, Published online: 27 August 2026

Water and Soil Management and Modeling, Year 2026, Vol. 6, No. 3, pp. 21-34.

Publisher: University of Mohaghegh Ardabili

© Author(s)





ارزیابی تخریب زیستی مایع سیاه حاصل از پساب فرآیند سودا با استفاده از قارچ *Phanerochaete chrysosporium* به صورت سلول آزاد و تثبیت شده

معراج شرری^{۱*}، المیرا فعال شیرکده^۲، محمد احمدی^۱، بیتا معزی پور^۱، فرج اله حاجی علیزاده^۲، اکبر رستم پور هفتخوانی^۱

۱ دانشیار، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲ دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی صنایع چوب و فراورده های سلولزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

مایع سیاه حاصل از فرآیند پخت سودا کاه گندم در صنایع خمیر و کاغذ، حاوی مقادیر قابل توجهی لیگنین، ترکیبات فنولی، مواد گوگرددار، سیلیس و جامدات محلول و معلق است. این ترکیبات به دلیل ساختار پیچیده و پایداری بالا، به سختی تجزیه می شوند و باعث افزایش شاخص های آلایندهی مانند COD و BOD می شوند. در این مطالعه، مایع سیاه حاصل از پخت آزمایشگاهی کاه گندم با استفاده از سود سوزآور در دمای ۱۶۰ درجه سلسیوس و با قلیاییت فعال ۱۶ درصد تهیه شد. پس از شست و شوی خمیر، مایع سیاه جمع آوری و برای آزمایش های بعدی در دمای زیر ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور ارزیابی قابلیت تیمار زیستی، نمونه ها با آب مقطر ده برابر رقیق سازی شدند. با توجه به هزینه بالای روش های مرسوم فیزیکی و شیمیایی، استفاده از روش های زیستی به عنوان رویکردی اقتصادی و سازگار با محیط زیست ضروری است. عملکرد قارچ *Phanerochaete chrysosporium* در دو حالت سلول آزاد و تثبیت شده بر فوم پلی یورتان (PUF) برای کاهش آلاینده های COD، BOD، TSS و TDS در مایع سیاه سودا بررسی شد. تیمارها تحت شرایط pH=7، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دوره ۱۴ روزه انجام گرفت و شاخص های کیفی پساب طبق استاندارد APHA اندازه گیری شدند. تحلیل آماری داده ها با استفاده از آزمون t مستقل و آزمون دانکن صورت پذیرفت. نتایج نشان داد هر دو تیمار زیستی کاهش قابل توجهی در آلاینده ها داشتند اما قارچ تثبیت شده عملکرد بهتری نشان داد. در پایان روز چهاردهم، میزان کاهش COD، BOD و TDS در تیمار تثبیت شده به ترتیب ۸۷/۵۴ و ۷۴/۸۹ درصد بود؛ در حالی که در تیمار سلول آزاد این مقادیر به ترتیب ۵۸/۰۵، ۷۱/۵۴ و ۵۶/۲۲ درصد ثبت شد. بیشترین کاهش در هفته نخست مشاهده شد و پس از آن به دلیل کاهش مواد آلی قابل تجزیه و افت فعالیت متابولیکی، روند کاهش شاخص ها کندتر شد. یافته ها نشان می دهند که قارچ *P. chrysosporium*، در حالت تثبیت شده، گزینه ای موثر و پایدار برای تصفیه اولیه مایع سیاه سودا است و می تواند نقش مؤثری در کاهش بار آلودگی و بهبود کارایی مراحل بعدی تصفیه مانند لجن فعال یا سامانه های تولید انرژی زیستی ایفا کند. این سامانه زیستی می تواند جایگزینی کم هزینه و سازگار با محیط زیست برای روش های شیمیایی و حرارتی پرهزینه در صنعت خمیر و کاغذ باشد.

واژه های کلیدی: تیمار زیستی، *Phanerochaete chrysosporium*، مایع سیاه سودا، تثبیت سلولی، فوم پلی اورتان، تصفیه پساب

نوع مقاله: پژوهشی

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: meeraaj.sharari@gmail.com

استناد: شرری، معراج، فعال شیرکده، المیرا، احمدی، محمد، معزی پور، بیتا، حاجی علیزاده، فرج اله و رستم پور هفتخوانی، اکبر (۱۴۰۵). بررسی اثر قارچ *Phanerochaete chrysosporium* در تخریب زیستی مایع سیاه حاصل از پخت سودا کاه گندم به صورت سلول آزاد و تثبیت شده.

مدل سازی و مدیریت آب و خاک، ۳۶(۳)، ۲۱-۳۴.

doi: 10.22098/mmws.2025.18853.1731

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۷، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۸، تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۰۵

مدل سازی و مدیریت آب و خاک، سال ۱۴۰۵، دوره ۶، شماره ۱، صفحه ۲۱ تا ۳۴.

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه محقق اردبیلی



۱- مقدمه

صنعت خمیر و کاغذ در زمره صنایع پرمصرف منابع آبی قرار دارد و حجم قابل توجهی پساب تولید می‌کند که سرشار از ترکیبات آلی پیچیده، مواد رنگی، لیگنین، فنول، مواد معلق، یون‌های معدنی و ترکیبات سمی است. این پساب‌ها به دلیل داشتن مقادیر بالای شاخص‌های آلودگی مانند اکسیژن خواهی بیولوژیکی^۱ (BOD)، اکسیژن خواهی شیمیایی^۲ (COD)، مواد جامد معلق^۳ (TSS) و مواد جامد حل شده^۴ (TDS) در صورت تخلیه مستقیم به محیط‌های آبی، می‌تواند کیفیت اکوسیستم‌های آبی و خاکی را به‌طور جدی تحت تأثیر قرار دهد و سلامت انسان را تهدید کند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مقادیر COD و BOD پساب خام در برخی واحدهای خمیر و کاغذ می‌تواند به ترتیب به بیش از ۲۰ تا ۵۰ و ۷ تا ۹ هزار میلی‌گرم بر لیتر برسد و غلظت TDS و TSS نیز عموماً بالاتر از حدود مجاز تخلیه گزارش شده است (Chandra et al., 2011; Sharma et al., 2022; Liang et al., 2020; Haq et al., 2023). پساب حاصل از فرآیند پخت قلیایی نظیر سودا، که به‌طور گسترده در فرآوری مواد لیگنوسلولزی غیرچوبی مانند کاه گندم کاربرد دارد، علاوه بر غلظت بالای ترکیبات آلی و رنگ‌زا، حاوی مقادیر قابل توجهی سیلیس محلول (به میزان ۴ تا ۷ درصد) و کلوئیدی است (Janusz et al., 2017; Do et al., 2020; Torrades et al., 2008). بررسی‌ها بر روی مایع سیاه حاصل از خمیرسازی کاه و کلش غلات نشان داده‌اند که سیلیس در مراحل بازیابی شیمیایی می‌تواند موجب تشکیل رسوبات سیلیکاتی در تبخیر کننده‌های بازیابی مایع سیاه است که باعث ایجاد کلوخه، افزایش لزجت، کاهش انتقال حرارت و رسوب‌گذاری در تبخیر کننده‌ها و دیگ‌های بازیابی شود و امکان بازیابی را تقریباً غیرممکن می‌کند (Do et al., 2020). در بسیاری از کارخانه‌های خمیر و کاغذ مبتنی بر مواد اولیه غیرچوبی در کشور که فاقد فناوری‌های پیشرفته بازیابی هستند، مدیریت این مایع سیاه قلیایی با بار آلی و معدنی بالا به یک چالش جدی زیست‌محیطی و عملیاتی تبدیل شده است. با این حال در پژوهش حاضر تمرکز اصلی بر کاهش شاخص‌های آلودگی آلی (BOD، COD، TDS و TSS) در مایع سیاه سودا است و غلظت سیلیس به‌عنوان پارامتر مستقل اندازه‌گیری نشده است؛ هرچند نتایج می‌تواند در طراحی راهکارهای یکپارچه مدیریت مایع سیاه غنی از سیلیس مورد استفاده قرار گیرد. روش‌های فیزیکی و شیمیایی سنتی مانند انعقاد و لخته‌سازی شیمیایی، جذب سطحی، اسمز معکوس، الکتروکواکولاسیون و فرآیندهای اکسیداسیون پیشرفته، با وجود کارایی مناسب در برخی کاربردها، معمولاً با چالش‌هایی نظیر

مصرف بالای مواد شیمیایی، تولید حجم زیاد لجن ثانویه، هزینه‌های سرمایه‌گذاری و بهره‌برداری قابل توجه و حساسیت نسبت به تغییرات ترکیب و بار آلودگی پساب همراه هستند (al., 2023; Haq et al., Kamali et al., 2016; Liang et al., 2020). در مقابل، استفاده از روش‌های تخریب زیستی به‌عنوان رویکردی سازگار با محیط زیست و از نظر انرژی و هزینه رقابتی، توجه گسترده‌ای را به خود جلب کرده است (Karichappan et al., 2023; Latif et al., 2014). با وجود ظرفیت‌های بالای میکروارگانیسم‌ها، استفاده از آن‌ها در حالت سلول آزاد با مشکلاتی مانند شست‌وشوی زیست‌توده از راکتور، کاهش فعالیت در بلندمدت، حساسیت به ترکیبات سمی موجود در پساب و نیاز به عملیات جداسازی مکرر همراه است. برای رفع این محدودیت‌ها، سامانه‌های تثبیت سلولی روی حامل‌های متخلخل توسعه یافته‌اند. این رویکرد ضمن نگهداری زیست‌توده در محیط راکتور، موجب افزایش غلظت سلولی، بهبود پایداری عملکرد آنزیمی، تحمل بیشتر نسبت به نوسانات محیطی و امکان استفاده مجدد در چرخه‌های تصفیه می‌شود (Couto, 2009; Gandhi et al., 2012; Rodarte-Morales et al., 2010).

حامل‌های تثبیت سلولی به‌طور کلی به دو دسته طبیعی و مصنوعی تقسیم می‌شوند. حامل‌های طبیعی مانند آلژینات سدیم، آگار، کیتین و سلولز، زیست‌سازگار، غیرسمی، تجزیه‌پذیر و ارزان قیمت هستند، اما از نظر پایداری مکانیکی و مقاومت شیمیایی در شرایط صنعتی محدودیت دارند و به مرور دچار تخریب ساختاری می‌شوند. همچنین کنترل منافذ و تأمین جریان مناسب اکسیژن و مواد مغذی به سلول‌ها در این مواد دشوارتر است (Bouabidi et al., 2009; Couto, 2019). در مقابل، حامل‌های مصنوعی مانند پلی‌وینیل الکل، پلی‌اکریل آمید و به‌ویژه فوم پلی‌یورتان (PUF)، به دلیل ساختار متخلخل، مقاومت مکانیکی بالا، پایداری در برابر تغییرات pH و دما، قابلیت استریل‌سازی و سطح تماس زیاد، گزینه‌ای مناسب‌تر برای کاربری‌های صنعتی محسوب می‌شوند. PUF به‌طور ویژه با فراهم‌سازی سطح تماس زیاد، قابلیت نفوذ مناسب، سبکی و امکان رشد سه‌بعدی میکروارگانیسم‌ها توانسته عملکرد تثبیت سلولی را به‌شکل قابل توجهی افزایش دهد (Sharari et al., 2013; Vandana et al., 2019; Latif et al., 2023). یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در فرآیند تخریب زیستی، قارچ پوسیدگی سفید *Phanerochaete chrysosporium* است که به دلیل ترشح آنزیم‌های لیگنولیتیک برون‌سلولی همچون لیگنین پراکسیداز (LiP)، منگنز پراکسیداز (MnP) و لاکاز (Lac) توانایی بی‌نظیری

³ Total Suspended Solids⁴ Total Dissolved Solids¹ Biological Oxygen Demand² Chemical Oxygen Demand

خصوصیات فیزیکوشیمیایی پساب، نمونه‌ها در ظروف استریل و در بسته انتقال داده شده و تا زمان انجام آزمایش‌های تحلیلی، در دمای زیر ۴ درجه سانتی‌گراد در سردخانه نگهداری شدند. با استناد به نتایج مقدماتی و به منظور ارزیابی امکان‌پذیری تخریب زیستی در کاهش مؤلفه‌های آلاینده، مایع سیاه پخت با نسبت ده برابر با آب مقطر، رقیق‌سازی شد.

۲-۲- میکروارگانیزم

قارچ پوسیدگی سفید *P. chrysosporium* مورد استفاده در این مطالعه که از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی ایران تهیه و برای تصفیه پساب، مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- محیط کشت جامد و کشت میکروبی

برای تهیه محیط کشت جامد جهت ایجاد بانک میکروبی و نگهداری کشت پشتیبان، مقدار ۴۲ گرم در محیط^۱ PDA مطابق دستورالعمل سازنده در آب مقطر حل و در دمای ۱۲۱-۱۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از کاهش دما به حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد، محیط کشت به صورت آرام در پتری‌دیش‌های استریل، ریخته و تا زمان استفاده در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کشت میکروبی در شرایط استریل و زیر هود لامینار انجام شد و پلیت‌ها با اسکالپل استریل، تلقیح شده و به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. جهت دستیابی به کشت‌های تازه، این فرآیند هر ۲ تا ۳ هفته تکرار شد.

۲-۴- کشت قارچ در محیط مایع و افزودنی‌های

مغذی به محیط پساب

به منظور تکثیر قارچ، نیاز به تهیه محیط کشت مایع است. محیط مایع حاوی ترکیبات جدول ۱ تهیه، صاف و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری (۱۰۰ mL در هر ارلن) ریخته و در دمای ۱۲۱-۱۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد (شکل ۱). فرمولاسیون محیط بر اساس Sharari et al. (2011) و Sharari et al. (2013) با اندکی تغییر انتخاب شد (Sharari et al., 2013; Sharari et al., 2011).

۲-۵- حامل و تثبیت قارچ

در این تحقیق از PUF بعنوان حامل برای تثبیت سلولی استفاده شد. نمونه‌های فوم پلی‌اورتان به صورت دیسک‌های ۳×۲ سانتی‌متر آماده و با آب گرم و سپس آب مقطر به طور مکرر شست‌وشو و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. به منظور تثبیت قارچ بر روی اسفنج پلی‌اورتان، ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع آماده شده در ظروف ارلن مایر به حجم ۲۵۰ سی‌سی ریخته و در هر

در تخریب ساختار پیچیده و مقاوم لیگنین دارد (Jin et al., 2021; Min et al., 2015). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که استفاده از این بستر در تثبیت قارچ *P. chrysosporium* باعث بهبود چشمگیر در کاهش COD، BOD، رنگ و جامدات محلول در پساب‌های صنعتی است (Santos et al., 2021; Sharari et al., 2013; Zhang et al., 2021). تحقیقات متعددی نیز به بررسی تأثیر نوع حامل در تثبیت سلولی پرداخته‌اند و نتایج نشان داده‌اند که فوم پلی‌اورتان از نظر دوام، پایداری مکانیکی و قابلیت نفوذپذیری نسبت به حامل‌های طبیعی مانند آلژینات، عملکرد بهتری دارد (Wu et al., 2005). و در نتیجه به دلیل رشد سریع‌تر و تحمل بهتر در شرایط سخت صنعتی، گزینه‌ای جذاب برای تصفیه زیستی است. با وجود مطالعات متعدد درباره کارایی قارچ‌های پوسیدگی سفید و مزایای تثبیت سلولی، مایع سیاه حاصل از پخت سودا با کاه گندم که پسابی با محتوای بالای سیلیس است کمتر به صورت هدفمند از منظر تصفیه زیستی بررسی شده است. در بسیاری از کارخانه‌های مبتنی بر مواد اولیه غیرچوبی، نبود سیستم‌های بازیابی و چالش‌های فنی اقتصادی مدیریت این پساب، نیاز به روش‌های ساده، کم‌هزینه و قابل‌پیاده‌سازی را برجسته می‌سازد. افزون بر این، تاکنون مطالعه‌ای که عملکرد قارچ *P. chrysosporium* را در دو حالت سلول آزاد و تثبیت‌شده بر فوم پلی‌یورتان، به صورت مقایسه‌ای و تحت شرایط عملیاتی یکسان در مایع سیاه سودا حاصل از خمیرسازی کاه گندم ارزیابی کرده باشد، گزارش نشده است. نوآوری پژوهش حاضر در این است که با طراحی شرایط کنترل‌شده و یکسان کارایی این قارچ را در دو سامانه آزاد و تثبیت‌شده برای کاهش هم‌زمان شاخص‌های آلودگی شامل COD، BOD، TDS و TSS در این پساب ارزیابی و مقایسه می‌کند. در صورت تأیید کارایی و پایداری، این سامانه می‌تواند به عنوان مرحله‌ای مقدماتی در زنجیره تولید سوخت‌های زیستی و گاززیستی در مقیاس آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه و آماده‌سازی مایع سیاه پخت

نمونه‌های مایع سیاه حاصل از پخت کاه‌گندم، در آزمایشگاه تخصصی صنایع سلولزی دانشگاه محقق اردبیلی تولید شدند. فرآیند پخت با بهره‌گیری از روش سودا و در شرایط کاملاً کنترل‌شده، بر روی ۵۰ گرم کاه‌گندم در دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه، با سطح قلیائیت و سولفیدیت برابر با ۱۶ درصد صورت پذیرفت. پس از فرآیند پخت، خمیر حاصل با استفاده از ۳ لیتر آب مقطر شست‌وشو داده شد و مایع سیاه تولیدشده با عبور از صافی مش ۲۰۰ جداسازی شد. برای حفظ ثبات

^۱ Potato Dextrose Agar

با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ده روز نگهداری شد تا میسیلوم‌های قارچ بر روی اسفنج، رشد کنند (شکل ۱)، (Gandhi and Udayasoorian, 2012).

ظرف به تعداد ۶ عدد اسفنج (به شکل سکه‌ای برش داده شده) اضافه شد و پس از استریل کردن در اتوکلاو و خنک شدن، عمل تلقیح در زیر هود لامینار انجام شده و به صورت ساکن در انکوباتور

جدول ۱- ترکیب محیط غذایی مایع مورد استفاده برای تکثیر قارچ

Table 1 – Composition of the liquid culture medium used for fungal propagation

(MSB) ¹		(g/l) Carbon source	(g/l) Nitrogen source
Salts	Amount (g/l)		
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5		
NH ₄ Cl	0.1	Glucose	Peptone
K ₂ HPO ₄	0.5	10 (G)	5 (P)
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.05		
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.1		
KH ₂ PO ₄	2		



شکل ۱- تصویر قارچ کشت داده شده به صورت سلول آزاد (راست) تثبیت شده بر روی PUF (چپ)

Fig. 1 – Image of the fungus cultured in free-cell form (right) and immobilized on PUF (left)

تیمارها در نظر گرفته شد و برای بررسی مقایسه‌ای بین تیمارهای مختلف، متغیرهای تحقیق به شرح جدول ۲ در نظر گرفته شد. برای بررسی میزان خطا و پایایی نتایج تیمارهای مختلف، تمام آزمون‌های میکروبی با سه تکرار انجام شد.

۲-۸- اندازه‌گیری شاخص‌های آلودگی پساب

۲-۸-۱- اندازه‌گیری اکسیژن مورد نیاز 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 است. 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 پنج روز قرار داده تا BOD خوانده شود (APHA, 2005).

۲-۶- تیمار پساب سودا با قارچ آزاد و تثبیت شده

پس از اتمام ده روز انکوباسیون و رشد میسیلوم‌های قارچ در محیط کشت مایع، ابتدا مایع کشت را از میسیلوم‌ها جدا کرده و پس از دوبار شستشو با آب مقطر استریل شده با استفاده از میکسر، آنها را میکس کرده (شکل ۲) و به مقدار ۵ میلی لیتر به همراه ۲ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی مواد مغذی کربن و نیتروژن و نمک‌های معدنی (جدول ۱) به پساب دارای pH=۷ افزوده و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۸۰ دور در دقیقه قرار داده و در دوره‌ی زمانی ۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱ و ۱۴ روز از انکوباتور خارج کرده و شاخص‌های آلودگی، مطابق روش‌های استاندارد، اندازه‌گیری شد. در خصوص تیمار پساب با قارچ تثبیت شده هم مثل قارچ آزاد عمل شد با این تفاوت که در هر ارلن ۶ عدد اسفنج قرار داده شد (Sharari et al., 2013).

۲-۷- متغیرها و ثابت‌های تیمار

به منظور انجام تیمارهای تحقیق، برخی خصوصیات نظیر pH=۷، دمای انکوباسیون (۳۰ درجه سانتی گراد)، دور شیکر (۸۰ دور در دقیقه)، مواد مغذی بعنوان منبع کربن، نیتروژن و ریز مغذی‌ها بر اساس تحقیقات پیشین و آزمون‌های اولیه به طور ثابت برای تمام

¹ Mineral Salt Broth

جدول ۲- صفات ثابت و متغیر تحقیق و سطوح مختلف آن

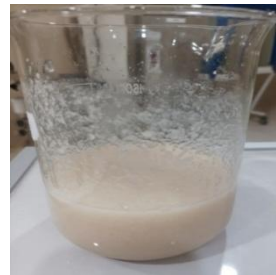
Table 2 – Fixed and variable attributes of the study and their different levels

Treatment time (days)	Microbial cell type	Black liquor type	Microorganism
0, 1, 3, 7, 11, 14	Free cells	Soda	Fungus:
0, 1, 3, 7, 11, 14	Immobilized cells		<i>P.chrysosporium</i>



شکل ۳- دستگاه BOD متر

Fig. 3 – BOD meter apparatus



شکل ۲- میسلیوم میکس شده قارچ برای تیمار پساب بصورت سلول آزاد

Fig. 2 – Mixed mycelium of the fungus for wastewater treatment as free cells

۲-۸-۲- اندازه گیری اکسیژن مورد نیاز شیمیایی

(COD)

تعیین COD به روش APHA (۲۰۰۵) و با استفاده از روش فلاسک بسته حاوی کیت اکسیدکننده‌های قوی دی‌کرمات-پتاسیم و اسید سولفوریک با توان اندازه‌گیری ۰-۱۵۰۰ میلی گرم بر لیتر (spectrophotometer Aqua) انجام گرفت. نمونه پساب‌های رقیق شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ کرده و بعد ۲ میلی لیتر از بخش صاف شده را در کیت مذکور اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت درون دایجستر COD Reactor CR 25 (شکل ۴) قرار داده تا عمل اکسیدشدن مواد کامل شود. و بعد از خنک شدن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷۱۰۰ (شکل ۴) به روش رنگ سنجی، اندازه‌گیری شد.

۲-۸-۳- اندازه‌گیری کل مواد جامد محلول (TDS)

برای اندازه‌گیری میزان TDS، ابتدا کاغذ صافی را به همراه بوته‌چینی در آون در دمای 103 ± 1 درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت گذاشته شد تا کاملاً خشک شوند و پس از آن جهت رسیدن به دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه در داخل دسیکاتور قرار داده و در ادامه وزن خشک اولیه هر یک اندازه‌گیری شد (APHA, 2005). برای انجام آزمایش، ۳۰ میلی لیتر از پساب را از کاغذ صافی دارای تخلخل ۰/۴۵ میکرومتر با استفاده از پمپ خلا عبور داده و داخل بوته‌چینی که از قبل وزن شده بود ریخته و در آون با دمای 103 ± 1 درجه سانتی گراد گذاشته شد تا کاملاً تبخیر شود. پس از اتمام کار مجدداً بوته‌چینی را وزن کرده و با استفاده از رابطه زیر، TDS مورد محاسبه قرار گرفت:

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

W_1 : وزن اولیه بوته چینی و W_2 : وزن بوته چینی به همراه ۳۰ میلی لیتر پساب صاف شده خشک

۲-۸-۴- اندازه‌گیری کل مواد جامد معلق (TSS)

برای به‌دست 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 103 ± 1 درجه سانتی گراد در آون قرار داده تا خشک شود (شکل ۵). سپس وزن آن اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه‌ی زیر، TSS مورد محاسبه قرار گرفت:

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

W_1 : وزن اولیه کاغذ صافی و W_2 : وزن کاغذ صافی به همراه مواد باقیمانده روی کاغذ

۲-۹- طرح آماری

به منظور تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. کلیه تیمارها در سه تکرار مستقل انجام و نتایج به‌صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد. جهت مقایسه‌ی معناداری تأثیر هر یک از متغیرها بر شاخص‌های آلودگی بین دو گروه قارچ آزاد و تثبیت‌شده از آزمون t مستقل در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها در سطوح مختلف زمان تیمار، تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵ درصد به کار رفت.



شکل ۴- دایجستر و اسپکتروفوتومتر مربوط به COD متر
Fig. 4 – COD digestion unit and corresponding spectrophotometer



شکل ۵- پساب عبور داده شده از کاغذ صافی برای اندازه گیری TSS
Fig. 5 – Filtrate passed through filter paper for TSS measurement

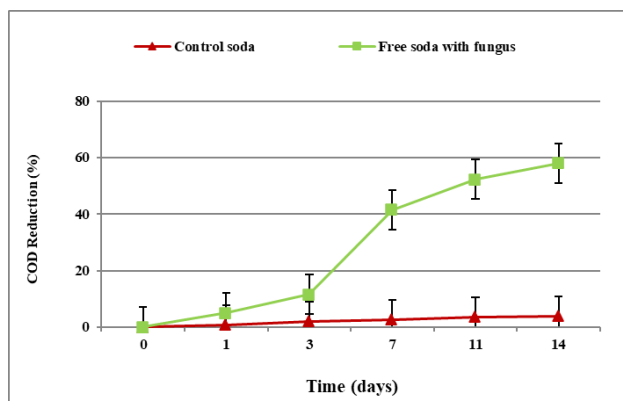
۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر سلول های آزاد قارچ *p.chrysosporium*

در مایع سیاه سودا بر COD

فرآیند تولید خمیر با استفاده از روش سودا و ماده مؤثر NaOH انجام گرفت و با توجه به تحقیقات پیشین به دلیل توان زیاد این قلیا در حل پذیری لیگنین موجود در کاه گندم، منجر به تولید مایعی با آلاینده‌گی و سمیت کمتر نسبت به سایر روش‌های پخت می‌شود. بر این اساس، مقدار COD در مایع سیاه حاصل از فرآیند سودا برابر با ۹۵۶۰ میلی گرم در لیتر گزارش شده است که سطح بار آلی نسبتاً کمتری را در پساب نشان می‌دهد و شرایط مناسب‌تری را برای تخریب زیستی فراهم می‌آورد. در ارزیابی رفتار زیستی

قارچ *P. chrysosporium* در این محیط، نتایج حاکی از آن است که در طی دوره نهفتگی تا روز سوم، کاهش COD در حدود ۱۱/۵ درصد مشاهده شده و پس از آن با ورود به فاز رشد و فعالیت متابولیکی قارچ، کاهش COD به صورت پیوسته ادامه می‌یابد (شکل ۶). شرایط زیست محیطی پایدارتر، سمیت کمتر و حضور ترکیبات آلی قابل تجزیه در پساب سودا از عوامل مؤثر در بهبود راندمان عملکرد زیستی قارچ محسوب می‌شوند. مطالعه Wu et al. (2005) نیز عملکرد قابل قبول *P. chrysosporium* را در حذف آلاینده‌های آلی محلول از محیط‌های دارای بار آلی زیاد را تأیید می‌کند (Wu et al., 2005).



شکل ۶- نمودار اثر تیمار قارچ آزاد بر COD در مایع سیاه سودا
Fig. 6 – Effect of free-cell fungal treatment on COD in soda black liquor

حضور ترکیبات قندی محلول، شرایط مساعدتری را برای فعالیت آنزیمی قارچ فراهم می‌کند. به طوری که مقدار BOD در پایان روز چهاردهم به حدود ۱۸۵۰ میلی گرم بر لیتر کاهش یافت که معادل کاهش ۷۱/۵۳ درصدی است (شکل ۷). نتایج این مطالعه با یافته‌های Sharari et al. (2011) مطابقت دارد؛ آن‌ها در تیمار پساب باگاس با استفاده از *P. chrysosporium* کاهش حدود ۵۲ درصدی در BOD را طی بازه زمانی مشابه گزارش کردند که بر توانایی بالای قارچ در حذف ترکیبات آلی قابل تجزیه زیستی تأکید

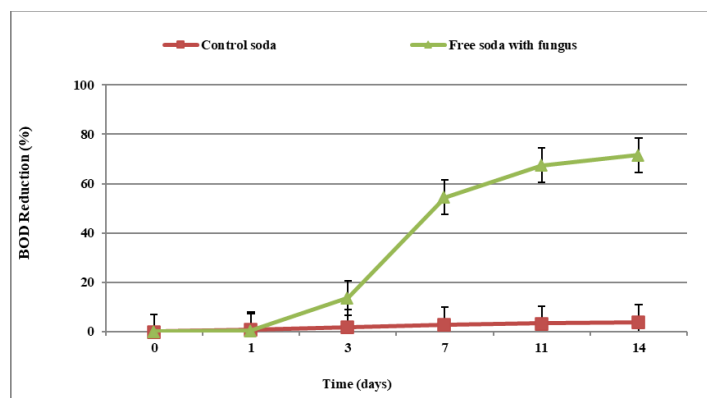
۳-۲- اثر سلول های آزاد قارچ *p.chrysosporium*

در مایع سیاه سودا بر BOD

مقدار اولیه BOD در مایع سیاه سودا پس از رقیق سازی ده برابری برابر با ۶۵۰۰ میلی گرم بر لیتر اندازه گیری شد. مطابق با الگوی مشاهده شده در کاهش COD، کاهش BOD نیز در تیمار پساب سودا با سلول های آزاد قارچ *p.chrysosporium* به طور قابل توجهی رخ داد. این موضوع را می‌توان به ویژگی‌های شیمیایی محیط سودا نسبت داد؛ محیطی که با حلالیت بالای لیگنین و

(et al., 2005). این یافته‌ها بیانگر آن است که شرایط کمتر سمی و ترکیبات محلول‌تر موجود در پساب سودا، امکان دسترسی مؤثرتر قارچ به سوبستراهای قابل تجزیه را فراهم کرده و موجب بهبود عملکرد زیستی در کاهش بار آلی پساب است.

دارد (Sharari et al., 2011). همچنین مطالعه Wu et al. (2005) بر روی پساب کرافت حاکی از آن بود که قارچ مذکور در قالب بیوفیلم توانست کاهش ۴۸ تا ۵۱ درصدی BOD را طی چهارده روز فراهم کند، که تطابق خوبی با نتایج فعلی دارد (Wu et al., 2005).



شکل ۷- نمودار اثر تیمار قارچ آزاد بر BOD در مایع سیاه سودا

Fig. 7 – Graph illustrating the effect of free-cell fungal treatment on BOD in soda black liquor

است؛ در آن پژوهش نیز قارچ *P. chrysosporium* در قالب سلول آزاد یا تثبیت‌شده، منجر به کاهش چشمگیر در پارامترهای مرتبط با جامدات از جمله TDS و TS شد (Sharari et al., 2013). همچنین، یافته‌های (Torres-Farradá et al., 2024) در بررسی مکانیسم‌های تخریب زیستی قارچ‌های پوسیدگی سفید نشان می‌دهد که حذف آلاینده‌ها عمدتاً از طریق ترکیب دو مکانیسم جذب اولیه بر سطح زیست‌توده و تجزیه آنزیمی تدریجی صورت می‌گیرد (Torres-Farradá et al., 2024). یافته‌های حاضر با نتایج مرورهای جامع اخیر نیز در حوزه تصفیه زیستی پساب صنعت خمیر و کاغذ نیز هم‌خوانی دارد؛ به‌گونه‌ای که (Haq et al., 2020) و (Kumar et al., 2020) گزارش کرده‌اند سامانه‌های مبتنی بر قارچ‌ها و باکتری‌ها، علاوه بر کاهش COD و BOD معمولاً با کاهش قابل‌توجهی در جامدات محلول و معلق همراه هستند و مکانیسم ترکیبی جذب اولیه و تخریب آنزیمی را به‌عنوان سازوکار غالب مطرح می‌کنند (Haq et al., 2020, Kumar et al., 2020). نتایج حاضر با الگوی گزارش‌شده برای تیمار زیستی پساب خمیر و کاغذ نیز هم‌خوان است؛ به‌عنوان مثال Malaviya و Rathore (۲۰۰۷) در بیوراکتور هوازی حاوی کنسرسیوم قارچی، کاهش هم‌زمان COD، رنگ و جامدات محلول (TDS) را گزارش کردند که بخش عمده آن در ۲۴ ساعت نخست تیمار و در قالب یک مرحله جذب سریع به‌دنبال تجزیه زیستی رخ داده است (Malaviya & Rathore, 2007).

۳-۳- اثر سلول‌های آزاد قارچ *p.chrysosporiuom*

در مایع سیاه پخت سودا بر جامدات

مقدار TDS در مایع سیاه سودا پس از رقیق‌سازی برابر با ۳۹۳۶ میلی‌گرم بر لیتر بود. ارزیابی اثر سلول‌های آزاد قارچ *P. chrysosporium* بر کاهش جامدات موجود در مایع سیاه حاصل از پخت سودا نشان داد که فرآیند حذف آلاینده‌ها تحت تأثیر دو مکانیسم اصلی، شامل جذب سطحی اولیه و تجزیه زیستی تدریجی قرار دارد. مطابق با الگوی مشاهده‌شده در شکل ۸، کاهش TDS طی دو مرحله مجزا صورت گرفت: مرحله اول که با جذب ترکیبات محلول همراه بود که تا پایان روز نخست اتفاق افتاد و مرحله دوم که نمایانگر تجزیه آنزیمی ترکیبات محلول است از روز سوم آغاز شده و تا پایان روز هفتم با شیب کاهشی قابل توجهی ادامه یافت. این روند در خصوص TS نیز مشاهده شد چرا که کاهش TDS به‌طور مستقیم بر کاهش مجموع جامدات تأثیرگذار می‌باشد. در مقابل، رفتار TSS اندکی متفاوت بود؛ به‌طوری‌که کاهش آن طی سه روز نخست به‌کندی پیش رفت. این پدیده به تمایل اولیه قارچ برای تجزیه ترکیبات محلول نسبت داده می‌شود، در حالی که تجزیه مواد معلق به‌عنوان یک مرحله ثانویه در فرآیند فعالیت آنزیمی قارچ اتفاق می‌افتد (Sharari et al., 2013). در انتهای روز چهاردهم سلول‌های آزاد قارچ موفق به کاهش ۴۲/۸۱، ۵۶/۲۲ و ۲۰/۰۷ درصدی به ترتیب در TDS، TS و TSS شد. این اعداد نشانگر اثربخشی قابل توجه قارچ در محیط سودا و ظرفیت آن در حذف مؤلفه‌های مختلف جامدات می‌باشند. پژوهش Sharari et al. (2013)، نیز نتایجی مشابه را در تیمار پساب باگاس گزارش کرده

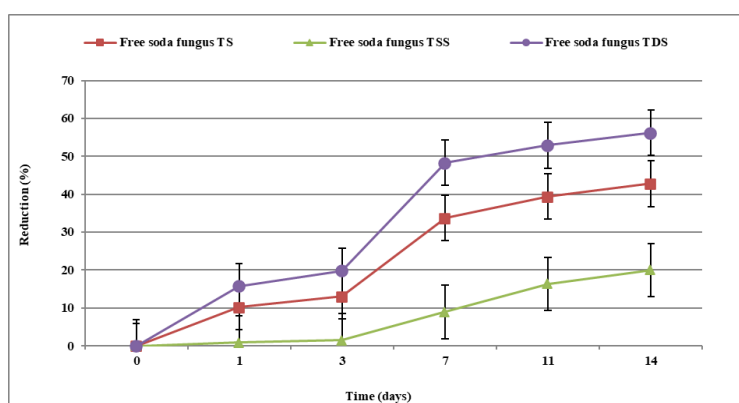
بود ($p < 0.05$) و تغییرات داخل تکرارها محدود بود که نشان دهنده دقت و تکرارپذیری قابل قبول داده ها است. نتایج این مطالعه با یافته های (Sharari et al., 2013) هم راستا می باشد؛ در آن پژوهش، استفاده از قارچ *P. chrysosporium* تثبیت شده بر فوم پلی اورتان در تصفیه پساب باگاس، موجب کاهش COD تا حدود ۷۶ درصد در روز چهاردهم شد که مؤید اثرگذاری تثبیت سلولی در بهبود فعالیت قارچ است (Sharari et al., 2013). علاوه بر این، Santos et al. (2021) در مطالعه ای که بر *P. chrysosporium* تثبیت شده در راکتور نیمه پیوسته پرداختند، نتایج نشان داد که قارچ های تثبیت شده قادر به کاهش COD تا بیش از ۷۵ درصد در پساب های صنعتی بوده و اینکه تثبیت سلولی می تواند نقش مؤثری در بهبود کارایی تصفیه زیستی پساب های آلوده ایفا کند (Santos et al., 2021). این نتایج نشان می دهند که تثبیت سلولی، ضمن افزایش پایداری زیستی قارچ و مقاومت آن در برابر نوسانات محیطی، می تواند نقش کلیدی در ارتقاء کارایی تصفیه زیستی پساب های صنعتی ایفا کند.

۳-۴- اثر قارچ در شرایط آزاد و تثبیت سلولی بر

COD

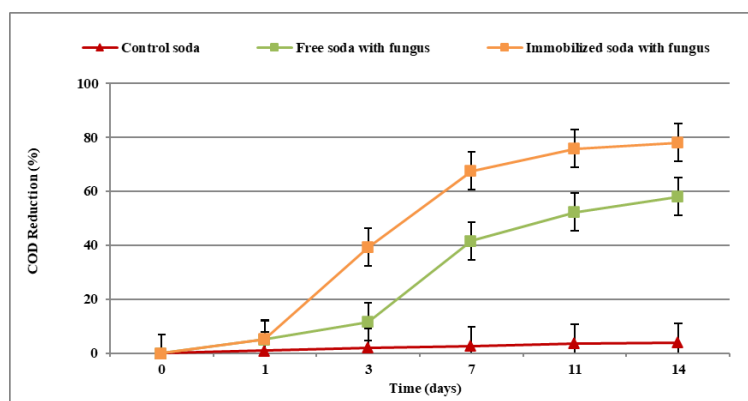
با توجه به ماهیت کمتر آلاینده و سمیت کمتر پساب حاصل از فرآیند سودا، سازگاری قارچ *P. chrysosporium* در این محیط به ویژه در حالت تثبیت شده، قابل توجه است. بر اساس نتایج به دست آمده و مطابق شکل ۹، تیمار قارچ تثبیت شده در پساب سودا از روز سوم به طور معناداری با کاهش COD معادل ۳۳/۳۹ درصد نسبت به سایر تیمارها عملکرد متمایزی از خود نشان داد. در مقابل، قارچ آزاد در همین روز در گروه آماری متفاوتی قرار دارد. این اختلاف تا روز هفتم ادامه داشته و در نهایت

در روز چهاردهم، قارچ آزاد در پساب سودا موفق به کاهش ۵۸/۰۵ درصدی COD (معادل ۴۰۱۰ میلی گرم در لیتر) شد این در حالی است که بالاترین عملکرد قارچ تثبیت شده در پساب سودا، کاهش COD را تا ۷۸/۰۳ درصد (معادل ۲۱۰۰ میلی گرم در لیتر) رقم زد. بر اساس نتایج حاصل از سه تکرار مستقل، تفاوت میانگین مقادیر COD بین دو تیمار آزاد و تثبیت شده در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم نسبت به گروه شاهد بدون قارچ از نظر آماری معنادار



شکل ۸- نمودار تغییرات TS، TDS و TSS در اثر تیمار قارچ آزاد در پساب سودا

Fig. 8 – Graph of TS, TDS, and TSS variations resulting from free-cell fungal treatment in soda black liquor



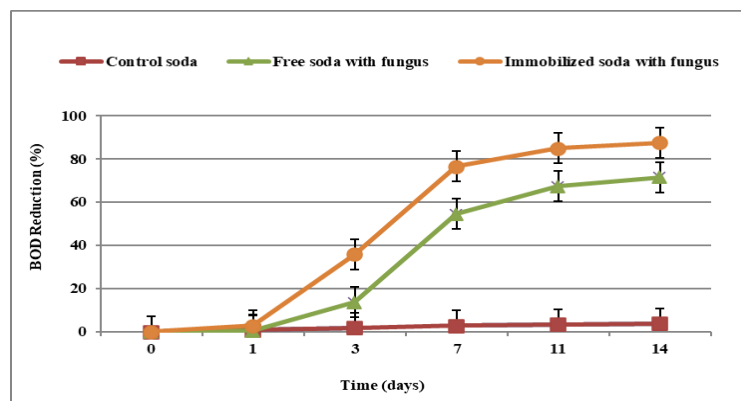
شکل ۹- نمودار بررسی اثر مقایسه ای تیمار قارچ آزاد و تثبیت شده بر COD در مایع سیاه سودا

Fig. 9 – Comparative analysis of the effects of free and immobilized fungal treatments on COD in soda black liquor

بدون قارچ از نظر آماری معنادار بوده است ($p < 0.05$). دامنه انحراف معیار در مقادیر BOD طی سه تکرار برای هر تیمار نسبت به میانگین‌ها محدود بود که حاکی از پایداری عملکرد سامانه تثبیت‌شده در کاهش BOD است. مطالعه (Sharari et al., 2010) نیز نشان داده است که قارچ *P. chrysosporium* در شرایط تیمار تثبیت‌شده به‌ویژه زمانی که مواد مغذی مناسب به محیط افزوده شود، دارای بالاترین فعالیت آنزیمی (از جمله پراکسیداز و لاکاز) بوده و در بازه زمانی روز سوم تا هفتم به اوج کارایی در کاهش آلاینده‌های آلی مانند BOD می‌رسد (Sharari et al., 2010). این یافته‌ها همچنین با نتایج (Udayasoorian, 2012) هم‌راستا هستند که گزارش کردند که تثبیت قارچ‌ها یا باکتری‌ها بر بستر فوم پلی‌یورتان می‌تواند به کاهش قابل توجه BOD و COD در پساب‌های با بار آلی متوسط کمک کند (Gandhi et al., 2012). نتایج آزمون مقایسه میانگین‌ها در پایان دوره چهارده روزه نیز مؤید آن است که تیمار تثبیت‌شده در محیط سودا با اختلافی معنادار، برترین گزینه در کاهش BOD بوده و می‌تواند در شرایط صنعتی نیز به‌عنوان روشی کارآمد و پایدار مورد استفاده قرار گیرد.

۵-۳- اثر قارچ در شرایط آزاد و تثبیت سلولی بر BOD

بررسی تیمارهای مختلف قارچ *P. chrysosporium* در کاهش BOD پساب نشان داد که یکی از موفق‌ترین تیمارها به‌طور معناداری مربوط به قارچ تثبیت‌شده در محیط سودا است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده و مطابق شکل ۱۰، ترکیب دو عامل یعنی تثبیت سلولی و سمیت کمتر پساب سودا موجب شد که از روز سوم به بعد، کاهش BOD در این تیمار به‌طور محسوسی نسبت به سلول آزاد، بیشتر باشد. در روز سوم، قارچ تثبیت‌شده در محیط سودا توانست BOD را به میزان ۳۸/۸۵ درصد کاهش دهد، که تقریباً ۲۰ درصد بیش از تیمار دیگر بود. این روند افزایشی در اثربخشی تا روز چهاردهم ادامه یافت و در نهایت، کاهش BOD در این تیمار به ۸۷/۵۴ درصد (کاهش از ۶۵۰۰ به ۸۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) رسید، در حالی که قارچ آزاد در همین محیط در پایان چهارده روزه، تنها حدود ۷۱/۵۴ درصد (کاهش از ۶۵۰۰ به ۱۸۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) کاهش نشان داد، که شامل اختلافی معنادار در حدود ۱۶ درصد است. آزمون t مستقل نشان داد که این اختلاف در روزهای هفتم و چهاردهم در مقایسه با تیمار سلول آزاد و نیز نسبت به گروه شاهد



شکل ۱۰- نمودار بررسی اثر مقایسه‌ای تیمار قارچ آزاد و تثبیت‌شده بر BOD در مایع سیاه سودا

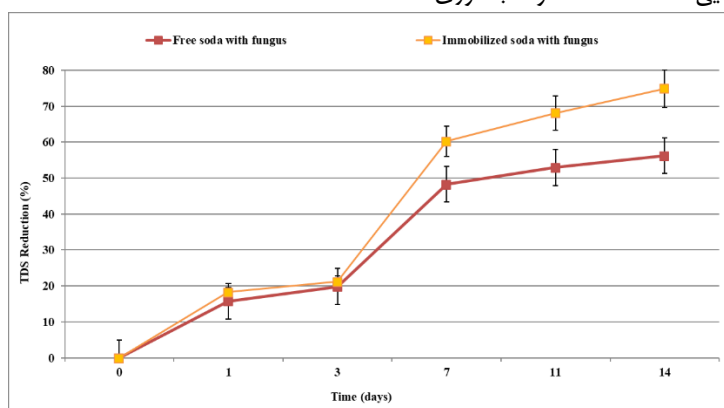
Fig. 10 – Comparative analysis of the effects of free and immobilized fungal treatments on BOD in soda black liquor

شد. در تیمار قارچ تثبیت‌شده، کاهش TDS با شیب بیشتری ادامه یافت که این امر احتمالاً ناشی از پایداری بیشتر زیست‌توده و تداوم فعالیت آنزیمی در بستر تثبیت‌شده بود. در مقابل، قارچ آزاد با وجود کاهش قابل توجه، روند ملایم‌تری را تجربه کرد. در پایان روز چهاردهم، نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمار قارچ تثبیت‌شده در محیط سودا موجب کاهش ۷۴/۸۹ درصدی (کاهش از ۳۹۳۶ به ۹۸۸ میلی‌گرم بر لیتر) در TDS شد، در حالی که تیمار قارچ آزاد همین شاخص را ۵۶/۲۲ درصد (کاهش از ۳۹۳۶ به ۱۷۲۳ میلی‌گرم بر لیتر) کاهش داد. بررسی نتایج سه تکرار برای هر تیمار نشان داد که اختلاف میانگین TDS بین دو سامانه آزاد و تثبیت‌شده و نیز نسبت به گروه شاهد بدون قارچ در اغلب زمان‌های نمونه‌برداری معنادار بوده است ($p < 0.05$). این

۳-۶- اثر قارچ در شرایط آزاد و تثبیت سلولی بر TDS

بررسی اثر قارچ *P. chrysosporium* بر کاهش TDS در مایع سیاه حاصل از پخت سودا نشان داد که مکانیسم جذب اولیه در ساختار سلولی قارچ، نقش مهمی در کاهش سریع TDS در روز نخست ایفا می‌کند (شکل ۱۱). این پدیده در هر دو تیمار قارچ آزاد و تثبیت‌شده قابل مشاهده بود. در ادامه و بین روزهای اول تا سوم، روند کاهش TDS با افت و خیز همراه بود که می‌توان آن را به برگشت نسبی بخشی از مواد آلی جذب‌شده به فاز مایع و آغاز مرحله تجزیه زیستی مرتبط دانست (Sharari et al., 2013). از روز سوم تا چهاردهم، هر دو تیمار مسیر کاهشی نسبتاً مشابهی را دنبال کردند، اما تفاوت در شیب کاهش از روز هفتم به بعد نمایان‌تر

کاهش هایی در محدوده ۷۵ درصد به صورت پایدار قابل دستیابی بوده است (Gandhi et al., 2012). این یافته ها تأکید می کنند که علاوه بر انتخاب نوع قارچ، انتخاب بستر تثبیت مناسب و نوع پساب نقش تعیین کننده ای در اثربخشی سامانه های تخریب زیستی دارند. این نتایج با تصویر کلی ارائه شده در مرورهای اخیر نیز سازگار است؛ به طوری که (Latif et al., 2023) در بررسی نقش قارچ های پوسیدگی سفید در تصفیه پساب های صنعتی گزارش کردند که تثبیت این قارچ ها بر روی حامل های مناسب، علاوه بر تسهیل بازیابی زیست توده به کاهش پایداری تر آلاینده های محلول و جامد منجر می شود (Latif et al., 2023). به طور کلی، تحلیل آماری داده ها نشان داد که هر دو عامل حالت قارچ به صورت آزاد یا تثبیت شده و زمان تیمار اثر معناداری بر کاهش COD، BOD و TDS دارند ($p < 0.05$) و در اغلب موارد، تیمار قارچ تثبیت شده در مقایسه با قارچ آزاد در یک گروه آماری مجزا و برتر قرار گرفت که برتری سامانه تثبیت شده را از منظر آماری نیز تأیید می کند.



شکل ۱۱- نمودار بررسی اثر مقایسه ای تیمار قارچ آزاد و تثبیت شده بر TDS در مایع سیاه سودا
Fig. 11 – Comparative analysis of the effects of free and immobilized fungal treatments on TDS in soda black liquor

۴- نتیجه گیری

تغییرات نیز حاکی از آن بود که شدت کاهش در روزهای ابتدایی، به ویژه تا روز هفتم، بیش تر بوده و در ادامه به دلیل کاهش مواد مغذی و احتمال اشباع نسبی بستر، نرخ کاهش به صورت ملایم تر ادامه یافته است.

این نتایج نشان می دهد که قارچ *P. chrysosporium* به ویژه در حالت تثبیت شده بر روی فوم پلی یورتان پتانسیل مناسبی برای به کارگیری در سامانه های زیست تخریبی تصفیه مایع سیاه سودا در مقیاس آزمایشگاهی دارد و می تواند به کاهش قابل توجه بار آلی و جامدات محلول و معلق کمک کند. با این حال، از آنجا که مطالعه حاضر در مقیاس آزمایشگاهی و در شرایط کنترل شده انجام شده است، تعمیم مستقیم نتایج به مقیاس صنعتی مستلزم انجام مطالعات آزمایشگاهی، بررسی عملکرد در

موضوع حاکی از آن است که کاهش مشاهده شده در TDS عمدتاً ناشی از فعالیت زیستی قارچ بخصوص در حالت تثبیت شده بر روی فوم پلی یورتان بوده و اثرات غیرزیستی مانند ته نشینی یا جذب سطحی نقش کمتری داشته اند. این نتایج نشان دهنده عملکرد پایدار و اثربخش قارچ در محیط های با ترکیبات محلول قابل تجزیه و سمیت پایین نظیر سودا می باشد. یافته های این تحقیق با نتایج گزارش شده توسط (Sharari et al., 2013) مطابقت دارد، جایی که قارچ *P. chrysosporium* تثبیت شده بر بستر پلی یورتان در تصفیه پساب باگاس موفق به کاهش بیش از ۷۰ درصدی TDS در یک دوره چهارده روزه شد. در آن مطالعه نیز نقش ترکیبی جذب اولیه و فعالیت آنزیمی در کاهش مؤثر ترکیبات محلول مورد تأکید قرار گرفته است (Sharari et al., 2013). همچنین، پژوهش (Udayasoorian and Gandhi, 2012) نشان داد که استفاده از فوم پلی یورتان به عنوان بستر تثبیت میکروارگانیسم ها در سیستم های تصفیه زیستی می تواند موجب افزایش پایداری و بهبود چشمگیر در حذف آلاینده هایی مانند TDS شود، به طوری که

در این پژوهش، اثربخشی قارچ *P. chrysosporium* در تخریب زیستی مایع سیاه حاصل از فرآیند پخت سودا به دو صورت سلول آزاد و تثبیت شده مورد ارزیابی قرار گرفت. هدف اصلی، بررسی کاهش شاخص های آلاینده ای شامل COD، BOD، TDS و TSS در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی بود؛ شاخص هایی که نقش مهمی در تعیین کیفیت نهایی پساب صنعتی ایفا می کنند. یافته ها نشان دادند که هر دو تیمار قارچی قادر به کاهش معنادار آلاینده های موجود در پساب بودند، اما تیمار تثبیت شده در تمامی پارامترها عملکرد برتری از خود نشان داد. در پایان دوره ۱۴ روزه، قارچ تثبیت شده موفق به کاهش COD تا ۷۸/۰۳٪، BOD تا ۸۷/۵۴٪ و TDS تا ۷۴/۸۹٪ شد در حالی که مقادیر مربوط به قارچ آزاد به ترتیب ۵۸/۰۵٪، ۷۱/۵۴٪ و ۵۶/۲۲٪ گزارش شد که نسبت به تیمار قارچ آزاد اختلاف قابل توجهی را نشان داد. بررسی روند

تضاد منافع نویسندگان

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص نگارش و انتشار مطالب و نتایج این پژوهش ندارند.

دسترسی به داده‌ها

داده‌ها و نتایج استفاده شده در این پژوهش از طریق مکاتبه با نویسنده مسئول در اختیار قرار خواهد گرفت.

مشارکت نویسندگان

معراج شرری: مفهوم‌سازی، طراحی آزمایش و پایش صحت داده‌ها و نگارش اولیه مقاله؛ **المیرا فعال شیرکده:** اجرای آزمایش‌ها؛ **محمد احمدی:** ویرایش مقاله و تحلیل داده؛ **بی‌تا معزی پور:** بررسی منابع و نظارت بر اجرای تیمارها؛ **فرج‌اله حاجی عزیزاده:** کمک در انجام تحقیق و تحلیل آماری و اکبر رستم پور هفتخوانی: بررسی منابع، بازبینی و تهیه نسخه نهایی

راکتورهای پیوسته، ارزیابی پایداری در برابر نوسانات کیفی پساب و تحلیل‌های فنی-اقتصادی است.

بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که سامانه قارچ تثبیت‌شده بر فوم پلی‌یورتان به‌عنوان یک گزینه‌ی امیدبخش برای پیش‌تصفیه زیستی مایع سیاه سودا مطرح است و بررسی کارایی آن در مقیاس آزمایشگاهی و نیمه صنعتی همراه با ادغام در فرآیندهای ثانویه نظیر لجن فعال یا سامانه‌های تولید انرژی زیستی، می‌تواند موضوع تحقیقات آینده باشد.

سپاسگزاری

این مقاله با حمایت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی از طرح پژوهشی با شماره قرارداد ۱۹۴۲۲/۹/۱۴۰۴ استخراج شده است. بدین وسیله، نویسندگان مقاله بر حسب ادای احترام، مراتب تقدیر و تشکر را از کلیه عوامل پژوهشی و آزمایشگاهی دانشگاه محقق اردبیلی، اعلان می‌دارند.

Reference:

- APHA. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21st ed.). American Public Health Association, Washington, DC.
- Bouabidi, Z. B., El-Naas, M. H., & Zhang, Z. (2019). Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 17(1), 241-257. doi: 10.1007/s10311-018-0795-7
- Chandra, R., Abhishek, A., & Sankhwar, M. (2011). Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products. *Bioresource technology*, 102(11), 6429-6436. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.048.
- Couto, S. R. (2009). Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances*, 27(3), 227-235. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001
- Do, N. H., Pham, H. H., Le, T. M., Lauwaert, J., Diels, L., Verberckmoes, A., ... & Le, P. K. (2020). The novel method to reduce the silica content in lignin recovered from black liquor originating from rice straw. *Scientific Reports*, 10(1), 21263. doi:10.1038/s41598-020-77867-5
- Gandhi, M. S., & Udayasoorian, C. (2012). Immobilization of bacillus subtilis on polyurethane foam for the treatment of pulp and paper mill effluent. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6(3), 1281-1287. <https://www.researchgate.net/publication/264155132>
- Haq, I., Mazumder, P., & Kalamdhad, A. S. (2020). Recent advances in removal of lignin from paper industry wastewater and its industrial applications—A review. *Bioresource Technology*, 312, 123636. doi:10.1016/j.biortech.2020.123636
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkołazka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS microbiology reviews*, 41(6), 941-962. doi:10.1093/femsre/fux049
- Jin, L., Zeng, G., Chen, H., Wang, L., Ji, H., Lin, S., . . . Sun, D. (2021). Mechanism of Lignin Degradation via White Rot Fungi Explored Using Spectral Analysis and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *BioResources*, 16(3). doi:10.15376/biores.16.3.5494-5507
- Kamali, M., Gameiro, T., Costa, M. E. V., & Capela, I. (2016). Anaerobic digestion of pulp and paper mill wastes—An overview of the developments and improvement opportunities. *Chemical Engineering Journal*, 298, 162-182. doi:10.1016/j.cej.2016.03.119
- Karichappan, T., Venkatachalam, S., & Jeganathan, P. M. (2014). Analysis of efficiency of Bacillus subtilis to treat bagasse based paper and pulp industry wastewater-A novel approach. 58(2), 198-204. doi: 10.5012/jkcs.2014.58.2.198
- Kumar, V., Thakur, I. S., & Shah, M. P. (2020). Bioremediation approaches for treatment of pulp and paper industry wastewater: Recent

- advances and challenges. *Microbial Bioremediation & Biodegradation*, 1-48. doi:10.1007/978-981-15-1812-6_1
- Latif, W., Ciniglia, C., Iovinella, M., Shafiq, M., & Papa, S. (2023). Role of white rot fungi in industrial wastewater treatment: a review. *Applied Sciences*, 13(14), 8318. doi:10.3390/app13148318
- Malaviya, P., & Rathore, V. S. (2007). Bioremediation of pulp and paper mill effluent by a novel fungal consortium isolated from polluted soil. *Bioresource Technology*, 98(18), 3647-3651. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.021
- Min, K., Gong, G., Woo, H. M., Kim, Y., & Um, Y. (2015). A dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis* exhibiting substrate-dependent optimum temperature for dyes and β -ether lignin dimer. *Scientific Reports*, 5(1), 8245. doi:10.1038/srep08245
- Rodarte-Morales, A., Moreira, M., Feijoo, G., & Lema, J. (2010). Evaluation of two fungal strains for the degradation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs). *Chemical Engineering Transactions*, 20, 31-36. doi:10.3303/CET1020006
- Santos, A. D. O., Bandeira, L., Silva, G. M. M., Wanderley, C. R. P., & Rodrigues, K. (2021). Use of *Phanerochaete chrysosporium* in a Semibatch Reactor for Removal of Indigo Carmine from Synthetic Textile Wastewater. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, e21200503. doi:10.1590/1678-4324-2021200503
- Sharari, M., Jahan Latibari, A., Guillet, A., Arousseau, M., Mouhamadou, B., Rafeiee, G., ... Parsapaghough, D. (2011). Application of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in biotreatment of bagasse effluent. *Biodegradation*, 22(2), 421-430. doi:10.1007/s10532-010-9415-3
- Sharari, M., Latibari, A., Rafeiee, S., & Mirshokraei, A. (2010). Investigation on the influence of nutrients and treatment period on enzyme activities of *Phanerochaete chrysosporium*. *Sharari, M., Roohani, M., Latibari, A. J., Guillet, A., Arousseau, M., & Sharari, A. (2013). Treatment of bagasse preparation effluent by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam: Enzyme production versus pollution removal. *Industrial Crops and Products*, 46, 226-233. doi:10.1016/j.indcrop.2013.02.001*
- Sharma, P., Iqbal, H. M., & Chandra, R. (2022). Evaluation of pollution parameters and toxic elements in wastewater of pulp and paper industries in India: A case study. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 5, 100163. doi: 10.1016/j.cscee.2021.100163
- Torres-Farradá, G., Thijs, S., Rineau, F., Guerra, G., & Vangronsveld, J. (2024). White rot fungi as tools for the bioremediation of xenobiotics: a review. *Journal of Fungi*, 1(3), 167. doi: 10.3390/jof10030167
- Torrades, F., Saiz, S., García-Hortal, J. A., & García-Montañó, J. (2008). Degradation of wheat straw black liquor by Fenton and photo-Fenton processes. *Environmental Engineering Science*, 25(1), 92-98. doi:10.1089/ees.2007.0021
- Vandana, T., Kumar, S. A., Swaraj, S., & Manpal, S. (2019). Purification, Characterization, and Biodelignification Potential of Lignin Peroxidase from Immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *BioResources*, 14(3). doi: 10.15376/biores.14.3.5380-5399
- Wu, J., Xiao, Y.-Z., & Yu, H.-Q. (2005). Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology*, 96(12), 1357-1363. doi:10.1016/j.biortech.2004.11.019
- Zhang, C., Wang, Q., Zuo, Z., Ding, J., Xu, G., & Zou, J. (2021). Interactive effects of microplastics and tetracycline on bioaccumulation and biochemical status in jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Frontiers in Environmental Science*, 9, 764344. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109796