# مقایسه سمیت محلول بیس‌فنول A قبل و بعد از فرایندهای اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن با استفاده از آزمون زیستی دافنیامگنا*

محمدهادی دهقانی[1]؛ زهیر نوروزی[1]؛ الهام نیک‌فر[1]*؛ نوشین راستکاری[2]

## چکیده

**زمینه:** بیس‌فنول A یک ماده سمی و مقاوم در مقابل تجزیه شیمیایی می‌باشد. اولتراسونیک از جمله روش‌های مؤثر در تخریب ترکیبات آلاینده و مقاوم در محیط‌زیست است که بر پایه تولید حباب‌های کوچک از طریق پدیده کاویتاسیون منجر به تخریب مواد آلی می‌شود. پژوهش حاضر با هدف مقایسه سمیت بیس‌فنول A قبل و بعد از فرایندهای اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن با استفاده از دافنیامگنا انجام شد.

**روش‌ها:** برای انجام آزمایش‌های زیست‌آزمونی از دافنیامگنا به‌عنوان شاخص سمیت استفاده شد. آزمایشات سونوشیمیایی توسط دستگاه اولتراسونیک با توان ورودی 500 وات و فرکانس‌های 35 و 130 کیلوهرتز انجام شد. نمونه‌های اولیه جهت آزمایشات، از محلول خروجی هر یک از راکتورها که غلظت اولیه بیس‌فنول A آن‌ها 100 میلی‌گرم در لیتر بود، تهیه گردید. غلظت پراکسید هیدروژن کاربردی، 2 میلی‌گرم در لیتر بود.

**یافته‌ها:** نتایج آزمایش‌های زیست‌آزمونی نشان داد که دافنیامگنا متأثر از سمیت بیس‌فنول A می‌باشد. مقادیر LC50-24 hr، LC50-48 hr، LC50-72 hr و LC50-96 hr به‌ترتیب 42/94، 34/48، 24/26 و 20/22 میلی‌گرم در لیتر بودند. سمیت محلول خروجی از فرایند تلفیقی اولتراسونیک و هیدروژن پراکسید کم‌تر از سمیت به‌دست‌آمده برای بیس‌فنول A و محلول‌های خروجی از هرکدام از فرایندها به‌صورت مجزا بود.

**نتیجه‌گیری:** براساس آزمون سمیت حاد توسط دافنیامگنا، فرایند تلفیقی اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن قادر است که سمیت بیس‌فنول A را از طریق شکستن این ترکیب به محصولات دیگری کاهش دهد. امکان استفاده از این فرایند به‌عنوان یک گزینه برای تصفیه فاضلاب‌های حاوی ترکیبات بیس‌فنول A وجود دارد.

**کلیدواژه‌ها:** بیس‌فنول A، اولتراسونیک، پراکسید هیدروژن، سمیت، دافنیامگنا

**«دریافت: 1391/8/9 پذیرش: 1392/1/27»**

1. گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

2. پژوهشکده محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **عهده‌دار مکاتبات:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، تلفن: 09124223309

Email: e.nikfar@gmail.com

* **این مقاله منتج از پایان نامه دانشجویی خانم الهام نیک‌فر جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی بهداشت محیط از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد.**

## مقدمه

**امروزه وجود ترکیبات و مواد مقاوم و سمی در منابع آب و همچنین تولید فاضلاب‌های حاوی ترکیبات سمی و پیچیده، کاربرد فرایندهای متداول تصفیه آب و فاضلاب را محدود و در برخی موارد ناتوان کرده است. بیشترین غلظت بیس‌فنول A مربوط به پساب اولیه کارخانه پلی‌کربناته و در حدود 100 میلی‌گرم در لیتر است (1). به‌علت این‌که تنها مقدار کمی از این ماده در طی تصفیه فاضلاب حذف می‌شود، فاضلاب حاوی بیس‌فنول A می‌تواند منبع آلودگی در محیط آبزی باشد (2).**

سمیت مشتقات هالوژن‌دار بیس‌فنول A، مانند ترابرموبیس‌فنول A و تتراکلروبیس‌فنول A بیشتر از بیس‌فنول A است. نگرانی اصلی در مورد سمیت بیس‌فنول A و مشتقات آن نیست بلکه پتانسیل استروژنی آن‌هاست که مطالعات متعدد آن را تأیید می‌کند(3).

بیس‌فنول A آلوده‌کننده اکوسیستم آبزی بوده و حلالیت آن در آب خیلی بیشتر از EC50 (Effective concentration (غلظت ماده سمی که در زمان معینی اثری ویژه از خود به جا می‌گذارد)) است. بیس‌فنول A موجود در آب شیرین و دریا، سمیت حادی در حدود 10–1 میلی‌گرم در لیتر برای ارگانیسم‌های آبزی دارد (6-4). اثرات در ماهی مداکا (medaka) در غلظت 1/82 میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است، اما در غلظت 0/355 میلی‌گرم در لیتر به‌مدت 60 روز مزمن می‌باشد(6). بیس‌فنول A در آب طبیعی در نتیجه پساب تصفیه‌نشده صنایع یافت می‌شود و در اکوسیستم آبزی بسیار خطرناک می‌باشد به‌علت این‌که مختل‌کننده غدد درون‌ریز است و نقش گیرنده استروژن را دارند (7). حضور حتی غلظت کم بیس‌فنول A در آب، زندگی آبزیان را از طریق اثر مختل‌کننده غدد درون‌ریز تحت تأثیر قرار می‌دهد (8). بیس‌فنول A سمیت کم تا متوسط (EC50 جلبک، 1 میلی‌گرم در لیتر) و پتانسیل کم برای تجمع زیستی در ارگانیسم‌های آبزی دارد. NOEC (Non observed Effect concentration (غلظت ماده سمی که در زمان معینی اثر قابل مشاهده‌ای از خود به جا نمی‌گذارد)) مزمن برای دافنیا مگنا 3/146 میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (1).

مطالعات گوناگونی با استفاده از گونه‌های مختلف موجودات زنده مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و سلول‌های حیوانی زئوپلانکتون‌ها برای بررسی کارایی فرایندهای اکسیداسیون پیشرفته در کاهش میزان سمیت آلاینده‌ها در محیط‌های آبی انجام شده است. نتایج آزمایشات انجام‌شده بر روی دافنیامگنا نشان دادند که این موجود، حساسیت بیشتری به آلودگی محیط دارد. بنابراین اندازه‌گیری سمیت محلول‌های آبی به‌دلیل احتمال تولید مواد واسطه سمی ضروری به‌نظر می‌رسد (13-9).

در این مطالعه سمیت بیس‌فنول A قبل و بعد از تأثیر فرایندهای اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن با استفاده از دافنیامگنا مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به زمان تولیدمثل کوتاه، حساسیت بالا، ساده بودن آزمایش و پایین بودن هزینه‌های آزمایشگاهی و از همه مهم‌تر به‌خاطر توان بکرزایی و تولید نوزادهایی از یک جنس با همانندی ژنتیکی که در اعتبار نتایج حاصل بسیار مهم است، دافنیامگنا مورد استفاده قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

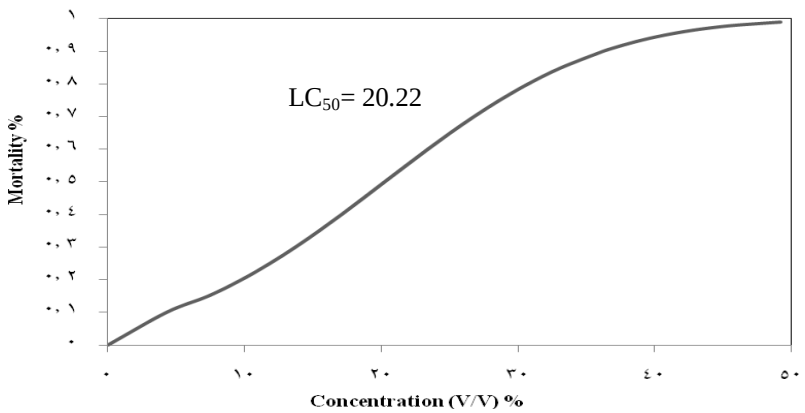
این تحقیق یک مطالعه تجربی کاربردی بوده که در سال 1390 در آزمایشگاه شیمی آب و فاضلاب و میکروبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. به‌منظور انجام آزمایش‌های زیست‌آزمونی از دافنیاهای کشت داده‌شده در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده گردید. محیط کشت استفاده‌شده جهت کشت دافنیا بر اساس روش استاندارد با اختلاط 5 گرم کود گوسفندی خشک، 25 گرم خاک باغچه و یک لیتر آب قنات جلالیه ساخته شده بود. به‌منظور تهیه دافنیاهایی با صفات ژنتیکی یکسان، ابتدا یکی از دافنیاها به‌تنهایی به یک بشر 2000 میلی‌لیتری حاوی محیط کشت موردنظر منتقل شده و تکثیر کرد سپس نوزادهای به دنیا آمده، نگه‌داری و تغذیه شدند و جهت انجام آزمون سمیت مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایشات سونوشیمیایی با استفاده از دستگاه اولتراسونیک با توان ورودی 500 وات و در فرکانس‌های 35 و 130 کیلوهرتز به‌صورت مجزا و تلفیقی با 2 میلی‌گرم در لیتر پراکسید هیدروژن انجام شد. البته غلظت‌های پراکسید هیدروژن کاربردی در مقادیر 2، 5، 15 و 30 میلی‌گرم در لیتر بود که در مقادیر بالای 2 میلی‌گرم در لیتر، دافنیاها از بین می‌رفتند و به‌همین دلیل در این مطالعه پراکسید هیدروژن با غلظت 2 میلی‌گرم در

لیتر مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تعیین سمیت، ابتدا محلول بیس‌فنول A با غلظت 5 میلی‌گرم در لیتر از محلول استوک اولیه با غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر ساخته شد. سپس محلول‌هایی که به‌ترتیب حاوی 5، 10، 20، 30، 40، 50، 75 و 100 درصد از محلول 100 میلی‌گرم در لیتر بودند در بشرهای 100 میلی لیتری آماده شدند. جهت بررسی سمیت محلول حاوی بیس‌فنول A بعد از فرایندهای اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن، ابتدا محلول با غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر ساخته شده و یک بار تحت فرایند اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن به‌صورت مجزا و در مرحله بعد تحت فرایند اولتراسونیک به‌صورت تلفیقی با پراکسید هیدروژن قرار گرفت. به‌دلیل مجهول بودن غلظت پساب خروجی از فرایندهای موردنظر، نمونه‌های مورد نیاز جهت آزمایش زیست‌آزمونی بر اساس درصد حجمی که به‌ترتیب حاوی 5، 10، 20، 30، 40، 50، 75 و 100 درصد از محلول خروجی از فرایندها بودند در بشرهای 100 میلی لیتری آماده‌سازی شدند. پس از تهیه نمونه‌های موردنیاز در بشرهای جداگانه به هر کدام از غلظت‌ها تعداد 10 عدد دافنیا با صفات ژنتیکی یکسان اضافه شد و تعداد مرگ و میر دافنیاها در غلظت‌های مختلف در مدت 24، 48، 72 و 96 ساعت جهت محاسبه غلظت کشنده مشاهده و ثبت گردید.

روش انجام آزمایش‌ها بر اساس روش‌های استاندارد و دستورالعمل شماره EPA-821-R-02-012 سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها و محاسبه غلظت کشنده 50 درصد با استفاده از روش آماری پروبیت با نرم‌افزار SPSS انجام گردید. واحد سمیت نیز از تقسیم عدد 100 بر غلظت کشنده 50 به‌دست آمد.

## یافته‌ها

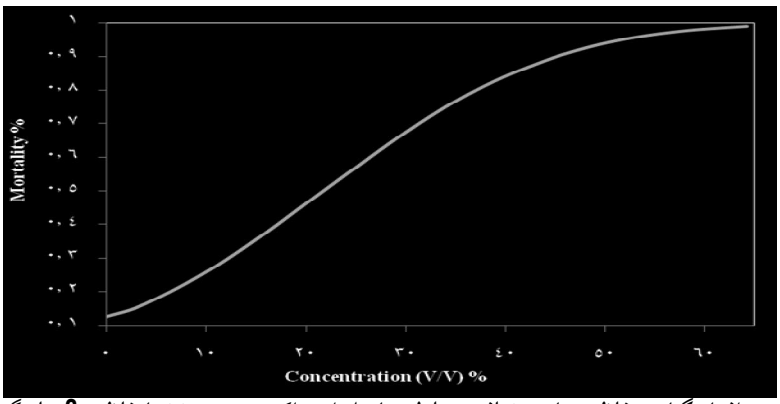
سمیت بیس‌فنول A و محلول حاصل از فرایندهای اولتراسونیک با فرکانس‌های 35 و 130 کیلوهرتز، پراکسید هیدروژن و فرآیند تلفیقی اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن بر روی دافنیامگنا به‌صورت غلظت کشنده 50 و واحد سمیت در دوره‌های زمانی 24، 48، 72 و 96 ساعت مورد بررسی قرار گرفته و نتایج با یکدیگر مقایسه شدند (جدول1). همانطور که مشاهده می‌شود محلول حاصل از فرآیند تلفیقی دارای کمترین سمیت و محلول حاصل از پراکسید هیدروژن دارای بیشترین سمیت می‌باشد. احتمال مرگ و میر دافنیامگنا نیز در غلظت‌های مختلف بیس‌فنول A و محلول حاصل از فرآیندهای مورد مطالعه بررسی شده و LC50 96 ساعته برای هر کدام از فرآیندها به طور جداگانه تعیین گردید (نمودارهای 5-1). همانطور که در نمودارها مشخص است با افزایش درصد حجمی، میزان مرگ و میر دافنیامگنا نیز افزایش می‌یابد و بعد از آن نمودار با شیب نسبتا ثابتی پیش می‌رود.



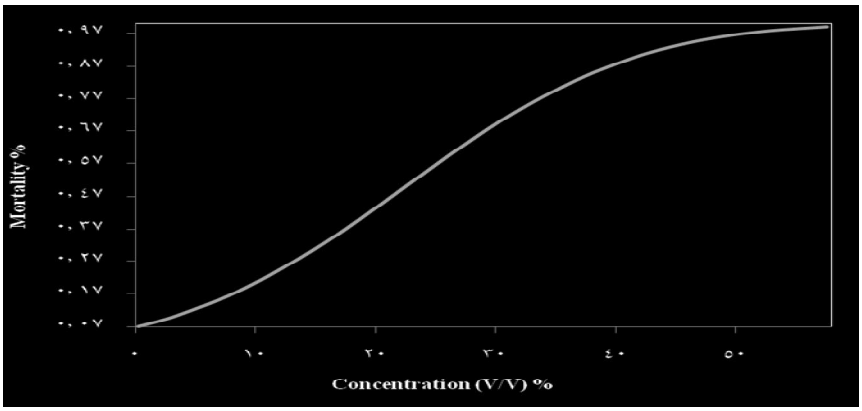

**نمودار 1-** احتمال مرگ و میر دافنیا مگنا در غلظت‌های مختلف بیس‌فنول A و تعیین $LC_{50}$ 96 ساعته

**جدول1- نتایج آزمون سمیت بیس‌فنولA و محلول حاصل از فرایندهای مورد مطالعه بر روی دافنیامگنا**

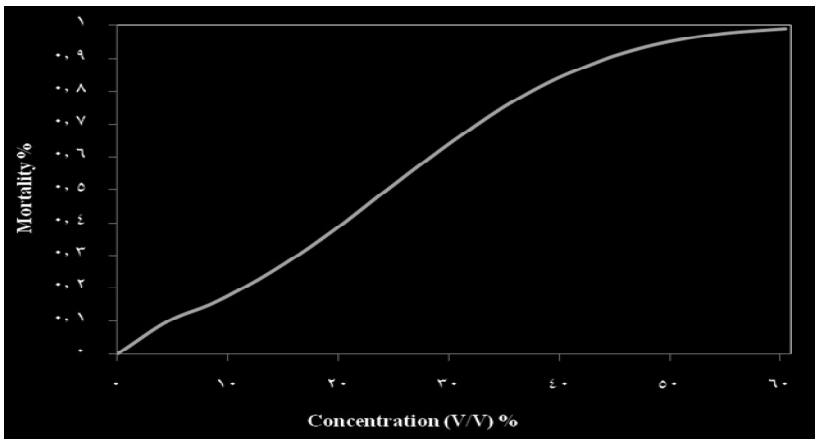
| محلول مورد آزمایش/ فرایند مورد نظر | معیار | زمان (ساعت) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 24 | 48 | 72 | 96 |
| بیس‌فنولA | $LC_{50}$ (mg/l) | 42/94 | 34/48 | 24/26 | 20/22 |
| | حد بالای $LC_{50}$ (mg/l) | 65/26 | 62/62 | 29/90 | 25/67 |
| | حد پایین $LC_{50}$ (mg/l) | 26/88 | 11/74 | 18/95 | 15/17 |
| | واحد سمیت (Tu) | 2/33 | 2/9 | 4/12 | 4/94 |
| محلول حاصل از هیدروژن پراکسید | $LC_{50}$ (mg/l) | 48/39 | 38/55 | 28/27 | 21/71 |
| | حد بالای $LC_{50}$ (mg/l) | 63/15 | 52/05 | 39/34 | 28/53 |
| | حد پایین $LC_{50}$ (mg/l) | 37/06 | 26/38 | 16/44 | 15 |
| | واحد سمیت (Tu) | 2/07 | 2/59 | 3/54 | 4/61 |
| محلول حاصل از فرایند اولتراسونیک با فرکانس 35 کیلوهرتز | $LC_{50}$ (mg/l) | 50/75 | 41/07 | 32/06 | 22/48 |
| | حد بالای $LC_{50}$ (mg/l) | 73/20 | 65/39 | 83/77 | 28/56 |
| | حد پایین $LC_{50}$ (mg/l) | 35/56 | 22/18 | 18/69 | 16/73 |
| | واحد سمیت (Tu) | 1/97 | 2/43 | 3/12 | 4/45 |
| محلول حاصل از فرایند اولتراسونیک با فرکانس 130 کیلوهرتز | $LC_{50}$ (mg/l) | 53/81 | 45/77 | 38/53 | 24/4 |
| | حد بالای $LC_{50}$ (mg/l) | 80/53 | 73/92 | 57/61 | 30/68 |
| | حد پایین $LC_{50}$ (mg/l) | 37/24 | 26/67 | 23/08 | 18/57 |
| | واحد سمیت (Tu) | 1/86 | 2/18 | 2/59 | 4/09 |
| محلول حاصل از فرایند اولتراسونیک با فرکانس 130 کیلوهرتز به همراه هیدروژن پراکسید | $LC_{50}$ (mg/l) | 80/46 | 69/02 | 52/36 | 41/23 |
| | حد بالای $LC_{50}$ (mg/l) | 115/68 | 97/87 | 67/53 | 53/15 |
| | حد پایین $LC_{50}$ (mg/l) | 63/87 | 53/89 | 41/25 | 31/25 |
| | واحد سمیت (Tu) | 1/24 | 1/45 | 1/91 | 2/42 |



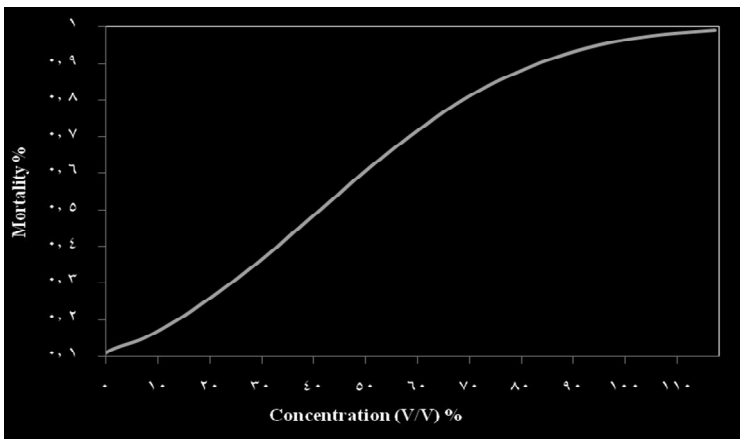

**نمودار 2 -** احتمال مرگ و میر دافنیا مگنا در غلظت های مختلف محلول حاصل از پراکسید هیدروژن با غلظت 2 میلی‌گرم در لیتر و تعیین $LC_{50}$ 96 ساعته




**نمودار 3 -** احتمال مرگ و میر دافنیا مگنا در غلظت های مختلف محلول حاصل از فرایند اولتراسونیک با فرکانس **35** کیلوهرتز و تعیین $LC_{50}$ **96** ساعته




**نمودار 4 -** احتمال مرگ و میر دافنیا مگنا در غلظت های مختلف محلول حاصل از فرایند اولتراسونیک با فرکانس **130** کیلوهرتز و تعیین $LC_{50}$ **96** ساعته




**نمودار 5 -** احتمال مرگ و میر دافنیا مگنا در غلظت های مختلف محلول حاصل از فرایند اولتراسونیک با فرکانس **130** کیلوهرتز به همراه هیدروژن پراکسید با غلظت **2** میلی‌گرم در لیتر و تعیین $LC_{50}$ **96** ساعته

## بحث

با توجه به نتایج آزمایشات زیست‌آزمونی، مشاهده می‌گردد که هرکدام از فرایندها تا حدودی از پتانسیل حذف بیس‌فنولA و کاهش سمیت آن برخوردار بوده‌اند. بنابراین فرضیه کاهش سمیت بیس‌فنولA بعد از انجام فرایندهای موردنظر مورد قبول است و بسته به نوع فرایند به‌کار رفته، کاهشی در میزان سمیت محصولات حاصل از حذف بیس‌فنولA در مقایسه با سمیت بیس‌فنولA اولیه ورودی به راکتورها وجود دارد. مقایسه بین LC50 فرایند اولتراسونیک در دو فرکانس 35 و 130 کیلوهرتز نشان می‌دهد که میزان سمیت محصولات حاصل از فرایند اولتراسونیک با فرکانس 35 کیلوهرتز بالاتر از سمیت محصولات حاصل از فرایند اولتراسونیک با فرکانس 130 کیلوهرتز است. علت این وضعیت می‌تواند تولید محصولات میانی بیشتر و دارای سمیت بالاتر در حین فرایند اولتراسونیک در فرکانس 35 کیلوهرتز باشد. راندمان پایین فرایند اولتراسونیک در فرکانس 35 کیلوهرتز و حذف کم‌تر محصولات میانی باعث بالاتر رفتن سمیت در پساب ناشی از راکتور اولتراسونیک با فرکانس 35 کیلوهرتز در مقایسه با پساب 130 کیلوهرتز شده است. در مورد فرایند تلفیقی اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن به‌دلیل اثر تشدیدکنندگی و کارایی بالای فرایند در حذف بیس‌فنولA، مقادیر سمیت به‌دست‌آمده به مراتب کم‌تر از سمیت محلول حاصل از فرایند اولتراسونیک و پراکسید هیدروژن به‌صورت مجزا بود. مطالعاتی در زمینه سمیت بیس‌فنولA در دوره‌های زمانی مختلف انجام شده است. به‌عنوان مثال، Sarah J در سمیت بیس‌فنولA بر روی دافنیامگنا گزارش کرد که LC50 24 و 48 ساعته بیس‌فنولA بر روی دافنیامگنا بیش‌تر از 10/5 میلی‌گرم در لیتراست (14). Sun Young Park و همکارش در مطالعه‌ای، LC50 24 ساعته بیس‌فنولA بر روی دافنیامگنا را برابر با 35/8 میلی‌گرم در لیتر تعیین کردند (15). به‌طورکلی نتایج مطالعات سمیت بیس‌فنولA دارای طیف نسبتاً گسترده و متفاوتی می‌باشد. علت تفاوت در مقادیر ذکرشده این است که در رفتار بیواندیکاتور در آزمایشات زیست‌آزمونی، فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و عوامل محیطی نقش عمده‌ای دارند لذا تفاوت در مقادیر ذکرشده می‌تواند بسیار زیاد باشد. ترتیب سمیت بالاتر بیس‌فنولA پس از انجام فرایندهای ذکرشده، به‌صورت زیر به‌دست آمد:

H2O2> US-35> US-130> US/H2O2

همان‌طور که در توالی فوق مشخص است بالاترین سمیت در مورد محصولات خروجی از فرایند پراکسید هیدروژن و کمترین سمیت در مورد محصولات خروجی از فرایند تلفیقی US/H2O2 بود.

## نتیجه‌گیری

بیس‌فنولA دارای اثر سمی بر روی دافنیامگنا است و بسته به نوع فرایند اکسیداسیون، محصولات حاصل از تجزیه بیس‌فنولA در مجموع واجد سمیت کم‌تر و متفاوت است. بنابراین با توجه به وجود سمیت در مخلوط محصولات حاصل از تجزیه بیس‌فنولA در مقایسه با سمیت بیس‌فنولA اولیه قبل از فرایند طولانی نمودن زمان فرایندها برای رسیدن به تخریب کامل محصولات میانی و جلوگیری از اثرات سوء آن‌ها در محیط زیست ضروری می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## References

1. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. Chemosphere. 1998;36(10):2149-73.

2. Yeo MK, Kang M. Photodecomposition of bisphenol A on nanometer-sized TiO2 thin film and the associated biological toxicity to zebrafish (Danio rerio) during and after photocatalysis. Water Res. 2006;40(9):1906-14.
3. Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT. On-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. J Chromatogr A. 2010;1217(21):3511-18.
4. Neamtu M, Frimmel FH. Degradation of endocrine disrupting bisphenol A by 254 nm irradiation in different water matrices and effect on yeast cells. Water Res. 2006;40(20):3745-50.
5. Wang G, Wu F, Zhang X, Luo M, Deng N. Enhanced TiO2 photocatalytic degradation of bisphenol A by β-cyclodextrin in suspended solutions. J Hazard Mater. 2006;133(1-3):85-91.
6. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. Toxicology. 2006;226(2):79-89.
7. Brugnera MF, Rajeshwar K, Cardoso JC, Zanoni MV. Bisphenol A removal from wastewater using self-organized TIO2 nanotubular array electrodes. Chemosphere. 2010;78(5):569-75.
8. Torres RA, Pétrier C, Combet E, Carrier M, Pulgarin C. Ultrasonic cavitation applied to the treatment of bisphenol A. Effect of sonochemical parameters and analysis of BPA by-products. Ultrason Sonochem. 2008;15(4):605-11.
9. Bae JS, Freeman HS. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the Daphnia magna. Dyes and Pigments. 2007;73(1):81-5.
10. Gottlieb A, Shaw C, Smith A, Wheatley A, Forsythe S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. J Biotechnol. 2003;101(1):49-56.
11. Movahedian H, Bina B, Asghari G. [Toxicity evaluation of wastewater treatment plant effluents using Daphnia magna (Persian)]. Iranian J Environmental Health Science & Engineering. 2005;2(2):1-4.
12. Manusadzianas L, Sadauskas K, Vitkus R. Comparative study of indices used in toxicity evaluation of effluents. Desalination. 2010;250(1):383-9.
13. Fern?ndez-Alba A, Hernando D, Agüera A, C?ceres J, Malato S. Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. Water Res. 2002;36(17):4255-62.
14. Brennan SJ, Brougham CA, Roche JJ, Fogarty AM. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on Daphnia magna. Chemosphere. 2006;64(1):49-55.
15. Park SY, Choi J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. Environ Int. 2007;33(6):817-22.