



فصلنامه علوم محیطی، دوره هفدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸

۹۱-۱۰۶

## بهینه‌سازی فرآیند حذف رنگزا از پساب رنگی با استفاده از باکتری نمک‌دوست هالوموناس سویه D<sub>2</sub> در کشت ایستا

علی پرتوی نیا<sup>۱\*</sup>، مریم اوتادی<sup>۲</sup> و امیرحسین علاالدینی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۰۱

**پرتوی نیا، ع.، م. اوتادی و ا. علاالدینی. ۱۳۹۸. بهینه‌سازی فرآیند حذف رنگزا از پساب رنگی با استفاده از باکتری نمک‌دوست هالوموناس سویه D<sub>2</sub> در کشت ایستا. فصلنامه علوم محیطی. ۱۷(۴): ۹۱-۱۰۶.**

**سابقه و هدف:** امروزه پساب صنعت‌های مختلف شامل مواد معدنی و آلی خطرناک از جمله ترکیب‌های آروماتیک نظیر فنول‌ها، فلزهای سنگین و رنگزاهای می‌باشند که بیشتر در غلظت‌های خیلی کم نیز سبب سرطان و مسمومیت می‌شوند. با توجه به روند افزایشی این آلاینده‌ها و بویژه ترکیب‌های رنگزا در محیط زیست، مطالعه و توسعه روش‌های جلوگیری از ورود و یا حذف این آلاینده‌ها دارای اهمیت می‌باشد. تولوئیدین قرمز یک رنگزا دارای گروه آزو است که بطور گسترده در صنایع نساجی برای رنگ آمیزی الیاف سلولزی استفاده می‌شود. بطور کلی روش‌های مختلف شیمیایی، فیزیکی، زیستی، نوری و یا تلفیقی برای حذف انواع آلاینده‌ها و رنگزاهای محیط زیست وجود دارد. در سال‌های اخیر روش‌های زیست‌پالایی نظیر تجزیه زیستی بعنوان یک روش کارآمد برای حذف این آلاینده‌ها مورد توجه قرار گرفته است. از این رو، هدف‌های مطالعه حاضر، شامل بررسی میزان حذف رنگزا تولوئیدین قرمز از یک پساب رنگزای سنتزی، بررسی متغیرهای اثرگذار بر میزان حذف زیستی و بهینه‌سازی با استفاده از تکنیک سطح پاسخ می‌باشد که برای این بررسی باکتری نمک‌دوست هالوموناس سویه D<sub>2</sub> مورد استفاده قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق، بررسی وضعیت تأثیرگذاری متغیرها و بهینه‌سازی شرایط عملکردی با استفاده از روش آماری و نرم‌افزار Ex-Design pert نسخه ۷ انجام شده و میزان تجزیه زیستی رنگزا با در نظر گرفتن ۳۰ آزمایش با استفاده از روش رویه پاسخ (RSM) و طرح ترکیب مرکزی (CCD) بررسی شده است. با توجه به منبع‌های مطالعاتی و تحقیق‌های انجام شده قبلی در این راستا که بصورت یک عامل در یک زمان (OFAT) انجام شده‌اند، اثر ۴ متغیر غلظت رنگزا (۱۰-۳۰ ppm)، غلظت نمک (۲-/۱۰)، pH (۵/۹-۵/۵) و دما (۲۰-۴۰) در حذف زیستی رنگزا مورد بررسی قرار گرفته است. آزمایش‌های حذف زیستی در فاز آبی برای یک پساب سنتزی مدل، در مقیاس ارلن و کشت ایستا در انکوباتور برای مدت زمان ۱۰ روز انجام شده است. در ادامه تجزیه و تحلیل نتایج با روش آنالیز واریانس انجام شده است.

**نتایج و بحث:** بر طبق نتایج به دست آمده و آنالیز واریانس، از بین ۴ فاکتور انتخابی دو متغیر غلظت نمک و دما بیشترین تأثیر در میزان حذف زیستی رنگزا توسط باکتری در محدوده انتخابی داشته‌اند و همین‌طور با توجه به نتایج آنالیز آماری می‌توان گفت که غلظت رنگزا و pH احتمالاً اثرگذار بوده‌اند. همچنین اثرهای متقابلی مربوط به غلظت رنگزا و pH، غلظت نمک و pH، غلظت نمک و دما (در سطح ۵٪) بر میزان تجزیه زیستی پساب رنگی تأثیرگذار می‌باشد. از طرفی بیشترین میزان حذف زیستی رنگزا در پایان روز دهم معادل ۶۲/۴٪ محاسبه شد و شرایط بهینه برای بیشترین حذف زیستی رنگزا در این روز در pH معادل ۸/۵ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت نمک و رنگزا به ترتیب معادل ۴٪ و ۱۶/۸ ppm به دست آمده است. در ادامه با استفاده از روش سطح پاسخ، تابع چند جمله‌ای درجه دوم برای میزان درصد حذف

\*Corresponding Author. Email Address: a\_partovi@sbu.ac.ir

رنگزا از پساب در مدت زمان ۱۰ روز با ضریب تعیین  $D_2$  معادل ۰/۹۵ بیان شد. همچنین متوسط خطا در بررسی میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا با استفاده از مدل مطرح شده و داده‌های آزمایشگاهی بطور متوسط ۹/۹ درصد محاسبه شد.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج، تابع درجه دوم پیشنهادی در این تحقیق برای باکتری نمک‌دوست هالوموناس سویه  $D_2$  در حذف‌زیستی رنگزای تولوئیدین قرمز، می‌تواند بعنوان یک مدل با دقت بالا و قابلیت پیش‌بینی مؤثر شرایط مختلف، مورد استفاده قرار گیرد. همچنین باکتری هالوموناس سویه  $D_2$  در این تحقیق، مشابه نتایج به‌دست آمده از تحقیق قبلی ما با استفاده از سویه Gb توانایی بالایی در تجزیه‌زیستی رنگزا در محیط‌های نامساعد و شور نشان داد، با این تفاوت که شرایط بهینه متفاوت بوده و سویه  $D_2$  برای استفاده در محیط‌های بازی پیشنهاد می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری هالوموناس  $D_2$ ، بهینه‌سازی، پساب صنعتی، تجزیه‌زیستی، رنگزا تولوئیدین قرمز.

## مقدمه

در عصر حاضر بسیاری از اکوسیستم‌ها در نتیجه فعالیت‌های انسانی دچار آسیب و تخریب شده‌اند و این موضوع همواره مورد توجه دانشمندان و محققان بوده است. پساب‌های صنایع امروزه شامل مواد معدنی و آلی خطرناکی نظیر ترکیب‌های آروماتیک، فلزهای سنگین و رنگزها می‌باشند که در برخی موارد غلظت خیلی کم آن‌ها، سبب سرطان و مسمومیت پستانداران می‌شود. رنگزها از جمله مهمترین آلودگی‌های آبی هستند که ناشی از فعالیت صنایع مختلف و فعالیت‌هایی همچون دباغی، نساجی، خشک‌شویی، چرم، لاستیک، پلاستیک، رنگزا و ... می‌باشند (Srinivasan et al., 2010; Roberts et al., 2015). با توجه به روند افزایشی انواع آلاینده‌ها و بویژه ترکیب‌های رنگزا به محیط‌زیست یکی از مهمترین کارهایی که باید در این زمینه صورت پذیرد مطالعه و توسعه روش‌هایی برای جلوگیری از ورود این آلاینده‌ها و یا حذف آن‌ها از محیط زیست می‌باشد. بعنوان نمونه تولوئیدین قرمز یک رنگزا دارای گروه مونو آزو است که بطور گسترده در صنایع نساجی برای رنگ آمیزی الیاف سلولزی استفاده می‌شود. رنگزا تولوئیدین قرمز دارای فرمول شیمیایی  $C_{17}H_{13}N_3O_3$  و دارای جرم مولکولی  $g/mol$  ۳۰۷ بوده و دارای ثبات و پوشش‌دهی عالی می‌باشد (Mo-harrery et al., 2012). از این رنگزا در زمینه‌های مختلفی از قبیل جوهر چاپ و پرینترها، تهیه رنگزا روغنی، آبرنگ‌ها، صنایع نساجی، صنایع خودروسازی، لوازم آرایشی و ... استفاده می‌شود (Hassaan and El Nemr, 2017; Forgacs et al., 2004). اگرچه رنگزهای آزو سمی نیستند، ولی در شرایط بی‌هوازی، می‌توانند بوسیله میکروارگانیزم‌ها تجزیه شده و

آمین‌های آروماتیک سرطان‌زا بوجود آورند (Esteves et al., 2007; Gupta et al., 2009; Moharrery et al., 2012; Moharrery et al., 2019). براساس مقاله‌ها و اطلاعات ایمنی مواد شیمیایی (MSDS) برای رنگزای تولوئیدین قرمز، خطرهای مختلف نظیر آلرژی، التهاب دستگاه تنفسی و گوارش، تهوع و استفراغ، تحریک چشم و پوست گزارش شده است (Estlander et al., 2012; Truchliński et al., 2015). بنابراین لازم است نسبت به حذف رنگزای تولوئیدین قرمز و دیگر رنگزهایی که وارد محیط زیست می‌شوند اقدام‌هایی صورت پذیرد.

بطور کلی روش‌های متعددی برای حذف انواع آلاینده‌ها و رنگزها از محیط زیست وجود دارد که اساس عملکرد برخی از این روش‌ها بر پایه روش‌های شیمیایی، فیزیکی، زیستی، نوری و یا تلفیقی از آن‌ها می‌باشد. از انواع این روش‌ها می‌توان به رزین تبادل یونی، ته‌نشینی شیمیایی، جداسازی غشایی، استخراج با حلال، فتواکسیداسیون، اسمز معکوس، ازناسیون، انعقاد الکتریکی، لخته‌سازی و جذب سطحی اشاره کرد که در چند دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Do et al., 1994; Al-Bastaki, 2004; Forgacs et al., 2004; Daneshvar et al., 2006; Han et al., 2010; Sadri et al., 2010). لازم به بیان است که در بین روش‌های مختلف، انتخاب فناوری‌های ساده و کم هزینه که ضمن بالا بردن کارایی، پیاده‌سازی آن‌ها در مقیاس صنعتی نیز امکان‌پذیر باشد بسیار مهم بوده و دارای اهمیت می‌باشد. اگرچه برخی از این روش‌ها از سرعت عمل و قابلیت بالایی در حذف آلاینده‌های رنگزا برخوردار هستند، ولی به برخی دلایل برای استفاده در تصفیه پساب‌های رنگی، راه حل موفق و مناسبی نیستند. از این دلیل‌ها می‌توان به هزینه

اثرگذار می‌باشند که برخی از این فاکتورها عبارتند از غلظت اولیه رنگزا، دما و pH محیط، ساختار مولکولی آلاینده، منابع کربنی و نیتروژنی محیط و غیره (Saratale *et al.*, 2011). در تحقیقی که توسط Moharrery *et al.* (2012) انجام شده است، توانایی باکتری هالوموناس D<sub>2</sub> در تجزیه زیستی و حذف تولوئیدین قرمز، رنگزا آزوی غیر قابل انحلال در آب، با استفاده از روش یک فاکتور در یک زمان (OFAT)، مورد مطالعه قرار گرفت. بنابر نتایج آن‌ها، باکتری هالوموناس D<sub>2</sub> توانایی رنگ‌زدایی تولوئیدین قرمز در pH بین ۶/۵-۹/۵ و دمای بین ۲۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد را داشته و ماکزیمم میزان حذف رنگزا در شرایط بهینه ۲۵ ppm غلظت اولیه رنگزا، pH برابر با ۶/۵، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد نمک گزارش شد (Moharrery *et al.*, 2012). در پژوهش دیگری که توسط Asad *et al.* (2007) انجام شده، توانایی باکتری‌های مختلف هالوفیل و هالوتولرانت جدا شده از پساب صنایع نساجی، برای رنگ‌زدایی رنگ‌زاهای آزوی نساجی مورد بررسی قرار گرفت. بنا بر نتایج آن‌ها، سه سویه هالوموناس، توانایی رنگ‌زدایی رنگ‌زاهای آزو را در گستره وسیعی از غلظت نمک NaCl (بالتر از ۲۰ درصد وزنی-حجمی)، دمای بین ۲۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد، pH بین ۵-۱۱ بعد از چهار روز گرمخانه‌گذاری در کشت استاتیک نشان دادند (Asad *et al.*, 2007).

در پژوهش انجام شده توسط Hafshejani *et al.* (2014) شرایط بهینه حذف زیستی رنگزا Direct Blue-71 توسط میکروارگانیزم *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) و در نظر گرفتن ۳ متغیر بررسی شد. در این تحقیق بمنظور دستیابی به ماکزیمم میزان حذف رنگزا، متغیرهای مختلف نظیر دمای انکوباسیون (۲۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد)، pH محلول (۵-۱۰) و غلظت اولیه رنگزا (۲۵-۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بررسی شدند. مطابق نتایج به دست آمده، شرایط بهینه با استفاده از RSM، دمای ۳۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۸/۰۱ و ۴۹/۹۵ میلی‌گرم بر لیتر برای غلظت رنگزا به دست آمد که میزان حذف رنگزا در این شرایط ۸۴/۸ درصد محاسبه شده است (Hafshejani *et al.*, 2014).

عملیاتی بالا، نداشتن کارایی برای طیف وسیعی از رنگ‌ها و همچنین تولید محصول‌های جانبی در حین فرآیند که خود سمی بوده و نیاز به تصفیه و پاک‌سازی مجدد دارند، اشاره نمود. افزون بر BOD و COD بالا و حضور یون‌های فلزی در این پساب‌ها از دیگر دلایل‌های ناکارآمدی، روش‌های فیزیکی و شیمیایی بشمار می‌روند (Forgacs *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2012). از این رو اخیراً، برای غلبه بر این محدودیت‌ها، روش‌های زیستی نظیر استفاده از توان میکروارگانیزم‌های بومی و جداسازی شده با استفاده از آنزیم‌ها در کانون توجه محققان مختلف قرار گرفته است (Chen *et al.*, 2003; Bhatt *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Hamed *et al.*, 2014; Guadie *et al.*, 2017).

در حالت کلی فرآیندهای زیست شناختی برای تصفیه پساب‌های رنگی به سه دسته تصفیه هوازی، تصفیه بی‌هوازی و ترکیبی از این دو روش تقسیم می‌شوند (Delée *et al.*, 2009; Pearce *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 1998). در سیستم هوازی میکروارگانیزم‌ها از اکسیژن بعنوان الکترون‌گیرنده استفاده می‌کنند. در نتیجه در فرآیندهای هوازی بدلیل حضور اکسیژن و رقابت شدید آن با گروه آزو بعنوان گیرنده الکترون، اکسیژن موجب اکسیداسیون عامل کاهنده شده و در نتیجه رنگبری بیولوژیکی به ندرت صورت می‌گیرد، بنابراین می‌توان گفت که کمتر باکتری توانایی رنگبری رنگزا آزو را در شرایط هوازی دارد (Chan *et al.*, 2009). محققان نشان دادند که از بین سه روش هوازی، بی‌هوازی و استاتیک (ایستا)، اگرچه روش بی‌هوازی بیشترین میزان رنگبری را داشته است ولی عملکرد این روش تفاوت زیادی با روش ایستا نداشته است که دلیل آن‌را در کاهش میزان اکسیژن در محیط کشت بعد از رشد در شرایط ایستا بیان کرده‌اند (Asad *et al.*, 2007). در سالیان اخیر استفاده از باکتری‌های نمک‌دوست بدلیل تحمل شرایط نمکی بسیار بالا و همچنین شرایط محیطی نامساعد مورد استفاده قرار گرفته است (Asad *et al.*, 2007; Moharrery *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2014; Moharrery *et al.*, 2019).

از طرفی، مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که فاکتورهای مختلفی در میزان حذف رنگ‌زاهای آزو توسط میکروارگانیزم‌های

منظور اثر ۴ متغیر غلظت رنگزا، غلظت نمک، pH و دما در میزان حذف‌زیستی با استفاده از روش سیستماتیک طرح آزمایش سطح پاسخ و ترکیب مرکزی برای اولین بار مورد مطالعه و بهینه‌سازی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### پساب سنتزی

در این پژوهش رنگزا تولوئیدین قرمز، بعنوان یک مدل تحقیقاتی از رنگزاهای آزو، از نماینده شرکت Ciba Geigy GmbH (کشور سوئیس) خریداری شده و بعنوان تنها منبع کربن و انرژی در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. محلول غلیظ رنگزا با حل کردن پودر رنگزا در حلال DMF (مرک، آلمان) تهیه شد. پساب سنتزی و محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق شامل نمک‌های معدنی (۵)  $\text{KNO}_3$ ، (۱)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (۰/۵۴)،  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (۰/۸۷)،  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (۰/۰۱)،  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (۰/۰۲)،  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (۰/۰۲)،  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (۰/۰۰۵) (برحسب g/lit) در آزمایش‌های تجزیه‌زیستی مورد استفاده قرار گرفت (Mohar-Mohar *et al.*, 2012; Moharrery *et al.*, 2019). محیط کشت نمک‌های معدنی در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار استریل شده و پس از تنظیم pH مورد استفاده قرار گرفت. جهت تنظیم pH، محلول‌های NaOH و HCl (یک نرمال) جداگانه استریل شده و با توجه به pH مورد نظر، به محیط پایه اضافه شدند. سورفکتانت توئین ۸۰ (۰/۲۵) نیز در فرآیند حذف رنگزا استفاده شد. مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل نمک‌های معدنی، حلال‌ها و محلول اسید و باز از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

### میکروارگانیزم نمک‌دوست

در این پژوهش، میکروارگانیزم نمک‌دوست هالوموناس سویه  $D_2$  که پیشتر توسط یک گروه تحقیقاتی در دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه تهران جداسازی و شناسایی شده بود بمنظور حذف رنگزا استفاده شد.

### آزمایش‌های حذف‌زیستی رنگزا تولوئیدین قرمز

بمنظور بررسی آزمایش‌های تجزیه‌زیستی، ۱۵ ml از محیط کشت نمک‌های معدنی درون لوله‌های آزمایش با

که منجر به بالاترین میزان حذف رنگزا می‌شود از هدف‌های بسیار مهم می‌باشد که در تحقیق‌های قبلی بطور عمده مطالعات با روش یک فاکتور در یک زمان انجام شده است که لزوماً منجر به یافتن شرایط بهینه نمی‌شود. همچنین وجود یک رابطه و تابع برای تعیین میزان حذف‌زیستی رنگزا و وضعیت اثرگذاری متغیرهای تداخلی و اثرهای تقابلی آن‌ها در این فرآیند بسیار دارای اهمیت است. طراحی آزمایش‌ها، روشی سازمان‌یافته‌ای است که برای به‌دست آوردن اطلاعاتی درباره فاکتورها، تأثیرهای متقابل آن‌ها و تعیین رابطه‌ای میان فاکتورهای مؤثر بر یک فرآیند و پاسخ (خروجی) آن فرآیند مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش طراحی آزمایش‌ها، روشی آماری است که بر پایه آنالیز واریانس بنا شده است. در این روش‌ها تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین متغیرها انتخاب شده و پس از انجام آزمایش‌ها با ارزیابی آماری پاسخ‌های به‌دست آمده، شرایط بهینه تعیین می‌گردد (Montgomery, 2006; Bezerra *et al.*, 2008). روش سطح پاسخ (RSM) یکی از مهم‌ترین روش‌های آماری چند متغیره است که در مدل‌سازی و طراحی آزمایش‌های مختلف کاربرد دارد. روش سطح پاسخ بعنوان مجموعه‌ای از رویکردهای ریاضی و آماری برای بیان روابط بین فاکتورها و پاسخ‌ها تعریف شده است. فاکتورها، متغیرهایی هستند که می‌توانند بصورت مستقل تغییر یابند. در حالی که، پاسخ‌ها یا متغیرهای وابسته، مقادیر اندازه‌گیری شده و به‌دست آمده از آزمایش‌ها می‌باشند. هدف این تکنیک این است که بطور هم‌زمان سطح‌های تمامی متغیرها برای به‌دست آوردن بهترین عملکرد سیستم بهینه‌سازی شود (Myers *et al.*, 2016).

از آنجائی‌که در تحقیق‌های قبلی انجام شده در این حوزه از روش یک فاکتور در یک زمان استفاده شده است و این روش‌ها بطور معمول قابلیت بهینه‌سازی دقیق نداشته و همچنین اثرهای تداخلی متغیرها که از عامل‌های مهم و اثرگذار در فرآیند می‌باشد را نادیده می‌گیرند، در مطالعه حاضر، هدف مدل‌سازی و بهینه‌سازی میزان حذف رنگزای تولوئیدین قرمز بعنوان آلاینده و تنها منبع کربن و انرژی، از یک پساب رنگزای سنتزی توسط باکتری نمک‌دوست هالوموناس سویه  $D_2$  با روش کشت ایستا است. برای این

تعداد محدود آزمایش، مدلی از نوع تابع درجه دوم برای میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا پیشنهاد می‌شود که بخوبی می‌تواند اثر هر یک از متغیرهای انتخاب شده و اثرهای تداخلی آن‌ها را در پاسخ بررسی کند. با استفاده از تابع و مدل به دست آمده می‌توان میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا را در سطح‌های مختلف هر یک از متغیرها در بازه انتخاب شده تعیین کرد و همینطور مقادیر هر یک از متغیرها در نقطه بهینه که بالاترین میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا اتفاق می‌افتد را مشخص نمود. مقادیر مربوط به میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا بنابر طرح آزمایش اولیه با استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۷، برای ۳۰ آزمایش پیشنهاد شده و در شرایط مختلف متغیرهای غلظت رنگزا، غلظت نمک، pH و دما بررسی شد که نتایج مربوطه در جدول ۱ نشان داده شده است.

### بررسی مدل‌های مختلف در میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا

برای تحلیل و آنالیز آماری نتایج میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا به دست آمده، از نرم‌افزار آماری Design-Expert نسخه ۷ استفاده شده است. در این تحقیق، ابتدا بهترین مدل برای بررسی میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا انتخاب و سپس با استفاده از مدل به دست آمده، شیوه اثرگذاری هر یک از متغیرهای در نظر گرفته شده بررسی می‌شود. مطابق نتایج به دست آمده از جدول ۲، مدل درجه دوم توسط نرم‌افزار پیشنهاد شده است. از منظر مدل‌سازی آماری، بهترین مدل، مدلی است که شامل چند جمله‌ای بالاترین درجه باشد که در آن بیشترین ترمها در پاسخ اثرگذار (مقدار p کمتر از ۰/۰۱) هستند.

برای تجزیه و تحلیل نتایج ابتدا مجموع مربعات، میانگین مربعات، مقدار F و مقدار p (احتمال) هر متغیر در مدل‌های مختلف محاسبه می‌شود و سپس نتایج براساس مقادیر p تحلیل می‌شوند و اثر هر یک از متغیرهای اصلی بطور مجزا و اثر تداخلی آن‌ها بر میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا تعیین می‌شود. نتایج مربوط به آنالیز واریانس (ANOVA) که برای نتایج میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا با استفاده از نرم‌افزار محاسبه شده در جدول ۳ نشان داده شده است. مطابق نتایج جدول ۳، مقدار F و p مربوط به مدل برای تجزیه‌زیستی پساب

حجم ۳۵ ml ریخته شده و پس از تنظیم pH و افزودن رنگزا که بصورت جداگانه استریل شده بود، تلقیح سویه باکتری هالوموناس سویه D<sub>2</sub> به لوله‌های آزمایش انجام شد (Asad et al., 2007; Moharrery et al., 2012). پس از تلقیح، لوله‌ها به مدت ۱۰ روز در شرایط ایستا گرماگذاری شدند تا فرآیند حذف و تجزیه‌زیستی رنگزا صورت گیرد. در این پژوهش ۴ متغیر غلظت رنگزا (۱۰-۳۰ ppm) غلظت نمک (۲٪-۱۰٪)، pH (۵/۵-۵/۵) و دما (۲۰°C-۴۰°C) در نظر گرفته شدند براساس طرح آزمایش پیشنهادی با روش رویه پاسخ ۳۰ آزمایش انجام و در هر مورد تابع هدف میزان حذف‌زیستی رنگزا توسط باکتری هالوموناس سویه (Y) D<sub>2</sub> اندازه‌گیری شد. کلیه آزمایش‌ها با ۳ مرتبه تکرار انجام شده‌اند و همچنین آزمایش کنترل بدون تلقیح میکروبی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

### روش اندازه‌گیری غلظت رنگزا در پساب

در این تحقیق، برای اندازه‌گیری غلظت رنگزا باقیمانده در فاز آبی، از روش اسپکتروفتومتری استفاده شده است. برای این منظور پس از هم‌زدن لوله‌ها و اختلاط کافی، ۳ ml از محیط‌کشت نمونه برداری شده و با استفاده میکروسانتریفیوژ (Hettich, Micro 200R, Germany) با دور ۷۵۰۰ rpm برای مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سلول‌های باکتری از آن جدا شده و جذب نوری مایع رویی در طول موج ۴۹۰ nm توسط اسپکتروفتومتر (Varian Cary 100, USA) قرائت و میزان حذف رنگزا با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شده است (Wang et al., 2009; Moharrery et al., 2012).

$$\text{مشخص - میزان جذب نمونه در زمان صفر} = \text{درصد حذف رنگزا} \\ \left( \frac{\text{میزان جذب نمونه در زمان صفر}}{\text{میزان جذب نمونه در زمان}} \right) \times 100 \quad (1)$$

### نتایج و بحث

#### میزان حذف‌زیستی رنگزا از پساب سنتزی

تعداد ۳۰ آزمایش، برای بررسی میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا در نظر گرفتن متغیرها در سطح‌های مختلف انجام شد که در هر یک از آن‌ها، پاسخ بعنوان تابع هدف، میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا در نظر گرفته شد. در این شرایط تنها با انجام

جدول ۱- درصد حذف رنگزا از پساب سنتزی توسط هالوموناس سویه D<sub>2</sub> پس از زمان ۱۰ روز  
 Table 1. Removal percentage of dye from synthetic wastewater by *Halmonase* strain D<sub>2</sub> after 10 days

آزمایش Run	غلظت رنگزا Dye conc.	غلظت نمک NaCl conc.	pH	دما Temperature	درصد رنگبری Dye removal (%)
1	15	4	8.5	25	40.6
2	20	6	7.5	30	39.1
3	15	8	6.5	35	24.3
4	20	6	7.5	30	33.7
5	15	4	8.5	35	65.6
6	25	4	8.5	25	29.3
7	25	4	8.5	35	60.3
8	20	6	7.5	30	41.1
9	25	4	6.5	35	65.5
10	30	6	7.5	30	36.2
11	10	6	7.5	30	24.3
12	20	10	7.5	30	5.9
13	20	6	7.5	20	34.7
14	25	8	6.5	35	30.4
15	15	4	6.5	35	41.8
16	15	8	8.5	35	26.7
17	15	4	6.5	25	30.1
18	20	6	7.5	40	59.2
19	20	2	7.5	30	35.2
20	20	6	9.5	30	38.9
21	25	8	6.5	25	28.8
22	15	4	6.5	25	27.8
23	20	6	5.5	30	38.7
24	15	8	6.5	25	13.7
25	25	8	8.5	25	18.5
26	20	6	7.5	30	40
27	25	8	8.5	35	19.9
28	15	8	8.5	25	24.3
29	20	6	7.5	30	40.1
30	20	6	7.5	30	39.7

میزان تجزیه‌زیستی تأثیرگذار هستند. بیشترین تأثیر مربوط به غلظت نمک بوده است. همچنین ترم‌های دوتایی (مقاطع) مربوط به غلظت رنگزا و pH (AC)، غلظت نمک و pH (BC)، غلظت نمک و دما (BD)، بر میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا (در سطح ۵٪) تأثیرگذار می‌باشند. کیفیت مدل چندجمله‌ای در برازش نمودن داده‌ها با ضریب تعیین R<sup>2</sup> بیان می‌گردد که این میزان برای مدل درجه دوم پیشنهاد شده برابر ۰/۹۶ محاسبه شده که نشان دهنده دقت بالای مدل در برازش

رنگزا به ترتیب ۳۷/۶۳ و کوچکتر از ۰/۰۰۰۱ است و مقدار p-value در سطح معناداری ۰/۰۱ قرار دارد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مدل بشدت معنادار است و مدل انتخابی مدل بسیار مناسب و با دقت بالا برای برازش نتایج و داده‌های آزمایشگاهی می‌باشد. با توجه به مقادیر p به دست آمده برای متغیرهای مختلف مشخص می‌شود که دو متغیر اصلی غلظت نمک و دما، اثر معناداری بر میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا در سطح ۱٪ داشته‌اند و دو متغیر غلظت رنگزا و pH احتمالاً در

جدول ۲- انتخاب بهترین مدل برای بررسی میزان رنگ‌بری از پساب رنگزا  
Table 2. Selection of the best model for examination of decolorization percent

منبع Source	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square	مقدار F F-value	مقدار p p-value	
متوسط و کل Mean vs. Total	36428.71	1	36428.71			
خطی و متوسط Linear vs. Mean	3264.11	4	816.0275	10.316	0.0001>	
تداخلی و خطی 2FI vs. Linear	840.2075	6	140.0346	2.339	0.0733	
درجه دوم و تداخلی Quadratic vs. 2FI	897.5438	4	224.386	14.040	0.0001>	مدل پیشنهادی Proposed model
درجه سوم و درجه دوم Cubic vs. Quadratic	190.355	8	23.79438	3.374	0.0633	
باقیمانده Residual	49.35833	7	7.05119			
کل Total	41670.28	30	1389.009			

دارند و مدل می‌تواند با اطمینان مورد استفاده قرار گیرد.

### بررسی اثرهای متغیرهای اصلی در میزان حذف رنگزا

نحوه تأثیر هر یک از متغیرهای اصلی بر میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا در شکل ۲ نشان داده شده است. مطابق شکل (A) ۲ با افزایش غلظت رنگزا، میزان تجزیه‌زیستی اندکی افزایش یافته و سپس تغییر چندانی نداشته است که دلیل آن افزایش میزان حذف با افزایش غلظت رنگزا (سویسترا) بعنوان تنها منبع کربن و انرژی است. امینی و همکاران در سال ۲۰۱۹ در بررسی تجزیه‌زیستی رنگزای تولوئیدین قرمز نشان دادند که با افزایش غلظت رنگ، میزان تجزیه‌زیستی نیز افزایش یافته است (Amini et al., 2019). مطابق شکل (B) ۲ با افزایش غلظت نمک، میزان تجزیه‌زیستی و حذف رنگزا تا غلظت ۵٪ ثابت بوده و سپس کاهش یافته است که احتمالاً این مسأله بدلیل بازدارندگی نمک بر فعالیت میکروارگانیزم و در نتیجه کاهش راندمان آن می‌باشد. ولی نتیجه بررسی این متغیر نشان‌دهنده رشد و فعالیت این باکتری تا غلظت ۵٪ نمک بوده که می‌تواند در شرایط هالوفیل و محیط‌های شور بخوبی مورد استفاده قرار گیرد. بطور مشابه در تحقیقی در ارتباط با تصفیه‌زیستی پساب حاوی رنگزای آزو و اثر میزان شوری نشان داده شد که با افزایش غلظت نمک تا ۵ گرم بر لیتر، میزان حذف‌زیستی ماده رنگزا افزایشی و سپس

نتایج آزمایشگاهی است.

در ادامه با استفاده از نتایج به دست آمده از جدول آنالیز واریانس با روش سطح پاسخ، تابع چند جمله‌ای درجه دوم برای میزان درصد حذف رنگزا از پساب در مدت زمان ۱۰ روز مطابق رابطه ۲ به دست آمد.

$$\begin{aligned} \text{غلظت رنگزا} (\%) = & 10/172 \times (\text{غلظت رنگزا}) - 280/556 + 35/505 \times (\text{غلظت نمک}) + 27/079 \times \text{pH} - 0/290 \times \\ & (\text{نمک}) - 1/481 \times (\text{pH} \times \text{غلظت رنگزا}) - 0/843 \times (\text{غلظت رنگزا}) - \\ & 0/089 \times (\text{غلظت نمک}) - 0/503 \times (\text{pH} \times \text{غلظت رنگزا}) - \\ & 0/077 \times (\text{نمک}) + 1/166 \times (\text{غلظت نمک})^2 \end{aligned} \quad (2)$$

متوسط خطا در بررسی میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا با استفاده از مدل مطرح شده و داده‌های آزمایشگاهی بطور متوسط ۹/۹ درصد بوده است که نشان دهنده این است که نتایج مدل به دست آمده و داده‌های آزمایشگاهی مطابقت بسیار خوبی با یکدیگر دارند و مدل می‌تواند بطور مناسب و با اطمینان کافی مورد استفاده قرار گیرد. شکل ۱ رابطه بین میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا با استفاده از داده‌های آزمایشی و مقادیر به دست آمده توسط مدل مطرح شده را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است میزان اختلاف نتایج در همه آزمایش‌های مختلف انجام شده، قابل توجه نبوده است که این مطلب نیز نشان می‌دهد که نتایج مدل و داده‌های آزمایشگاهی مطابقت بسیار خوبی با یکدیگر

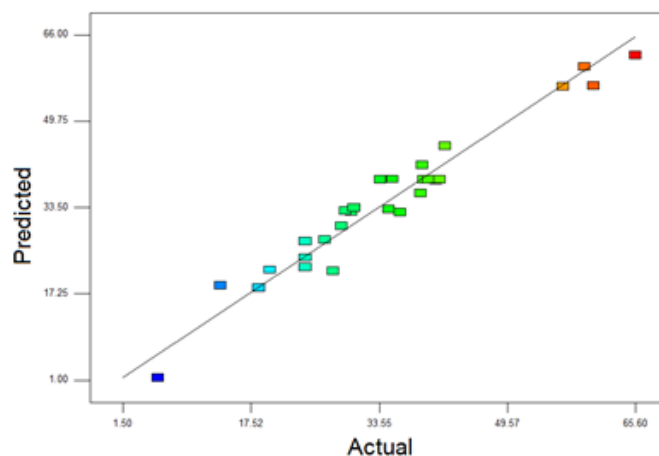
جدول ۳- آنالیز واریانس مربوط به تجزیه‌زیستی پساب رنگزا  
Table 3. Analysis of variance table for decolorization of dye wastewater

منبع Source	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square	مقدار F F-value	مقدار p p-value	وضعیت تأثیر متغیرها Effectiveness of variables
مدل Model	4989.64	10	498.96	37.63	<0.0001	مناسب Significant
غلظت رنگ A-Color conc	44.83	1	44.83	3.38	0.0817	متغیر احتمالاً مؤثر Possibly significant factor
غلظت نمک B-NaCl conc	2090.67	1	2090.6	157.67	<0.0001	متغیر مؤثر Significant factor
بی‌اچ C-pH	43.2	1	43.2	3.26	0.0869	متغیر احتمالاً مؤثر Possibly significant factor
دما D-Temp	1085.41	1	1085.4	81.86	<0.0001	متغیر مؤثر Significant factor
AC	283.92	1	283.92	21.41	0.0002	برهم‌کنش مؤثر Significant interaction
BC	140.42	1	140.42	10.59	0.0042	برهم‌کنش مؤثر Significant interaction
BD	404.01	1	404.01	30.47	<0.0001	برهم‌کنش مؤثر Significant interaction
A <sup>2</sup>	140.18	1	140.18	10.57	0.0042	درجه دوم متغیر مؤثر significant quadratic variable
B <sup>2</sup>	608.69	1	608.69	45.9	<0.0001	درجه دوم متغیر مؤثر significant quadratic variable
D <sup>2</sup>	105.11	1	105.11	7.93	0.011	درجه دوم متغیر مؤثر significant quadratic variable
باقیمانده Residual	251.94	19	13.26			
عدم برازش Lack of fitness	216.74	14	15.48	2.2	0.1968	غیر مؤثر Not significant
خطای خالص Pure error	35.19	5	7.04			
جمع کل Total	5241.57	29				

کمی داشته است (Mahmoud *et al.*, 2016). مطابق شکل (D) ۲ با افزایش دما از ۲۵ به ۳۵ درجه سانتی‌گراد، میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا افزایش پیدا کرده است که این مسأله بدلیل فعالیت بیشتر میکروارگانیسم در دمای بالاتر و افزایش فعالیت آنزیمی برای تجزیه‌زیستی می‌باشد. در تحقیق های قبلی، نتیجه مشابه در مورد تأثیر دما بر فرآیند رنگبری دو رنگزای 79 disperse blue و 10 acid orange توسط باکتری *Bacillus fusiformis* KMK5 مشاهده شده است

کاهش یافته است (Guo *et al.*, 2008). با توجه به نتایج شکل (C) ۲ می‌توان گفت که فعالیت میکروارگانیسم هالوموناس مورد استفاده با افزایش pH افزایش یافته است که دلیل آن pH بهینه و مناسب برای رشد باکتری مورد استفاده است. بطور مشابه، Mahmoud *et al.* (2016) در بررسی حذف رنگ آزوی قرمز توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر نشان دادند که با افزایش میزان pH از ۱ تا ۷، میزان رنگبری افزایش محسوس داشته است و با تغییر pH از ۷ به ۹ میزان رنگبری، افزایش بسیار





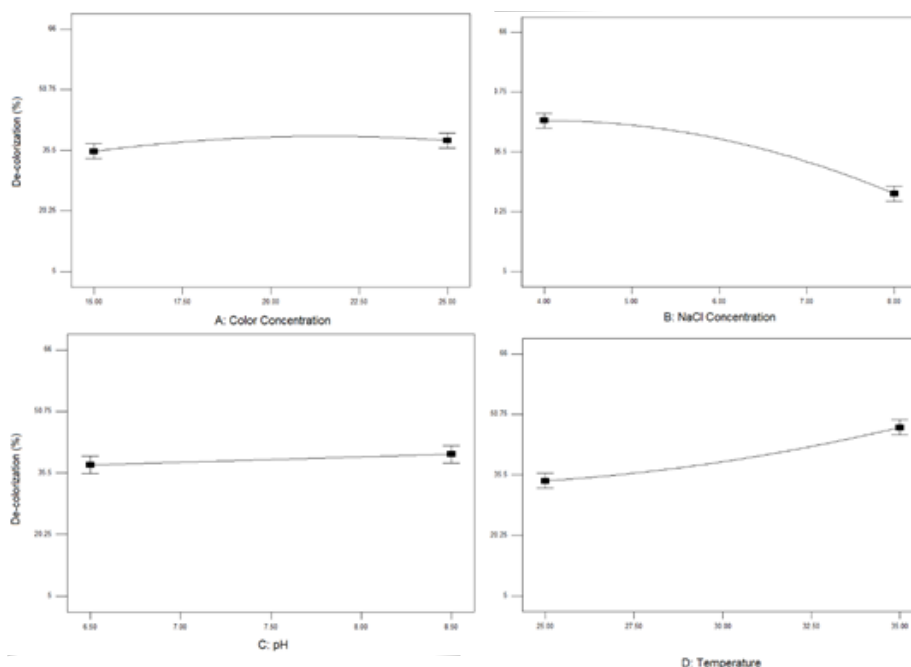
شکل ۱- گراف داده های آزمایشگاهی برحسب مقادیر پیش بینی توسط مدل برای درصد حذف رنگزا توسط سویه  $D_2$   
**Fig. 1- Graph of the actual response values versus the predicted values obtained by model for decolorization percent by strain  $D_2$**

می توان به روشنی، برهم کنش متغیرها و نقش آن ها در میزان تجزیه زیستی پساب رنگزا را بطور کیفی بررسی نمود. برای مثال از شکل ۳ می توان دریافت که اگرچه در دمای بالاتر میزان حذف رنگزا بیشتر بوده ولی در این دما، افزایش غلظت نمک تأثیر بیشتری بر میزان حذف رنگزا داشته است و روند کاهشی با شیب تند مشاهده می شود. مطابق شکل (A) ۴ برهم کنش دو متغیر pH و غلظت رنگزا بر میزان تجزیه زیستی پساب رنگزا نقش مؤثر داشته است. در

(Kolekar *et al.*, 2008). در مجموع با توجه به نتایج می توان گفت که بیشترین تأثیر مربوط به غلظت نمک و سپس دما بوده است.

### بررسی تأثیر برهمکنش متغیرهای دوتایی در میزان حذف رنگزا

در شکل ۳ نمودارهای سه بعدی مربوط به اثرهای متغیرهای دوتایی معنادار و برهم کنش آن ها بر میزان تجزیه زیستی پساب رنگزا نشان داده شده است. با بررسی این شکل ها



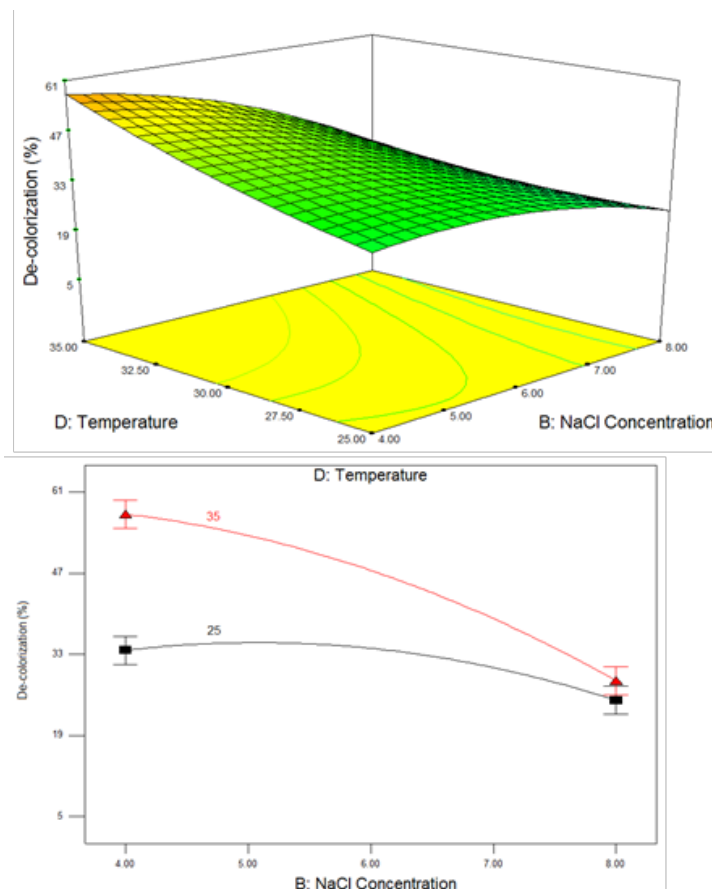
شکل ۲- بررسی تأثیر متغیرهای اصلی بر میزان حذف رنگزا از پساب، غلظت رنگزا (A)، غلظت نمک (B)، دما (C)، pH (D)  
**Fig. 2- The effect of the main variables on the decolorization of wastewater (A) color conc. (B) NaCl Conc. (C) temperature (D) pH**

بیشترین میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا می‌شود انجام شد. با توجه به نتایج و مطابق شکل ۵ بیشترین میزان تجزیه‌زیستی رنگزا توسط باکتری هالوموناس سویه  $D_2$  به میزان ۶۲/۴ درصد تجزیه‌زیستی در غلظت رنگزا و غلظت نمک به ترتیب ppm ۱۶/۸۱ و ۴ درصد، pH معادل ۸/۵، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و این نقاط شرایط نقطه بهینه می‌باشند. این نتیجه تطابق خوبی با تحقیق قبلی ما در مورد استفاده از باکتری هالوموناس سویه Gb در حذف رنگزا تولوئیدین قرمز دارد. در تحقیق قبلی بر اساس روش رویه پاسخ، بیشترین میزان حذف‌زیستی رنگزا در روز دهم معادل ۶۸٪ در غلظت ppm ۲۵ مشاهده شده است که نشان‌دهنده عملکرد و توانایی به نسبت ضعیف‌تر سویه  $D_2$  نسبت به سویه Gb در حذف رنگزای تولوئیدین قرمز است. البته بنا بر نتایج می‌توان گفت سویه  $D_2$  مورد استفاده در این تحقیق برای شرایط بازی مناسب‌تر بوده در حالیکه سویه Gb عملکرد بهتر در pH‌های اسیدی از خود

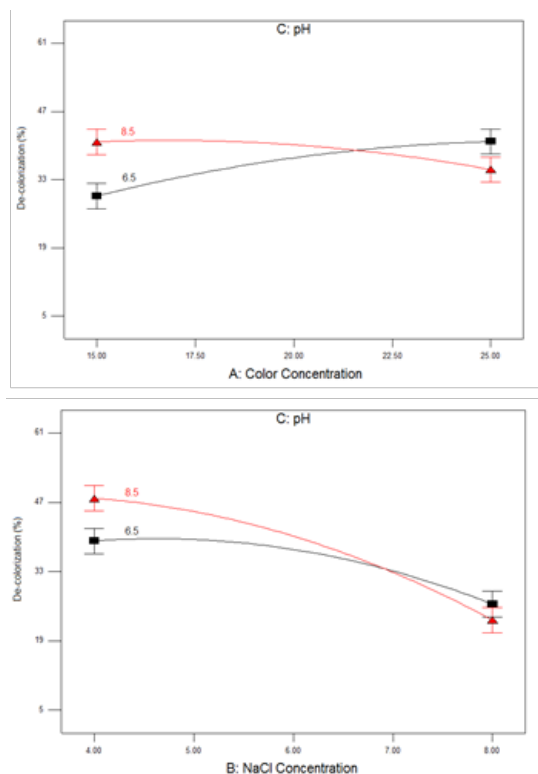
pH اولیه محیط‌کشت معادل ۶/۵ و شرایط اسیدی، با افزایش غلظت رنگزا، میزان حذف‌زیستی رنگزا افزایش یافته است در حالی که در pH بازی اولیه محیط معادل ۸/۵، افزایش غلظت رنگزا تأثیر منفی بر میزان حذف رنگزا داشته است بنابراین می‌توان گفت تولید متابولیت‌های میانی در حین فرآیند که خود بر pH محیط اثرگذار هستند و موجب تغییر آن می‌شوند بسیار روی فرآیند رنگ‌بری مؤثر بوده و بنابراین نمی‌توان فرآیندهای مشابه را بصورت یک فاکتور در یک زمان مطالعه کرد و حتماً باید اثرهای تداخلی و برهمکنش متغیرها لحاظ شود. بطور مشابه مطابق شکل (B) در هر دو pH مورد استفاده، با افزایش غلظت نمک میزان رنگ‌بری کاهش یافته، ولی در غلظت‌های نمک کمتر از ۷٪، pH قلیایی شرایط بهتری برای حذف رنگزا نشان می‌دهد.

### بهینه‌سازی میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا

در ادامه نتایج بهینه‌سازی شرایط آزمایشگاهی که منجر به



شکل ۳- اثر تداخلی دو متغیر مستقل دما و غلظت نمک و تأثیر آن‌ها بر میزان حذف رنگزا، گراف سه بعدی (A) و نمودار اثرهای تداخلی (B)  
 Fig. 3- Interaction effect of two independent variables, NaCl concentration and temperature and their effect on decolorization percent, 3D surface (A) and interaction (B)

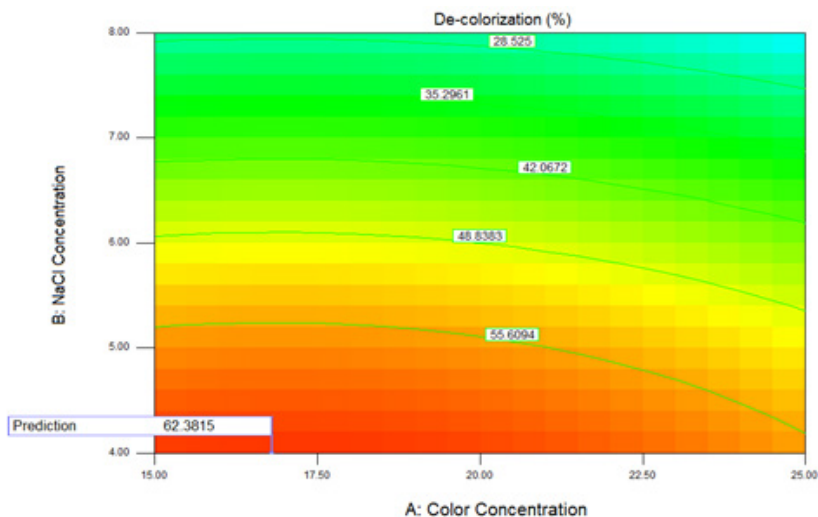


شکل ۴- نمودار اثر های تداخلی متغیرهای دوتایی (الف) غلظت رنگزا و pH (ب) غلظت نمک و pH

Fig. 4- Interaction effects of two independent variables, (A) color conc. And pH (B) NaCl concentration and pH

(2012). *et al.* در بررسی میزان تجزیه‌زیستی رنگزا تولوئیدین قرمز با استفاده از باکتری نمک‌دوست هالوموناس سویه  $D_2$  نشان دادند که با افزایش دما در ۲۵ به ۳۵ درجه سانتی‌گراد میزان حذف رنگزا تولوئیدین قرمز، افزایش پیدا کرده است و بالاترین میزان حذف در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اتفاق

نشان می‌دهد (Amini *et al.*, 2019). به‌طور کلی می‌توان گفت که مطالعات در مورد بهینه‌سازی میزان تجزیه‌زیستی رنگزا و بررسی نحوه تأثیر متغیرهای مختلف بر آن در تحقیق‌های قبلی، بسیار کم است و بیشتر تحقیق‌های قبلی با روش کلاسیک یک فاکتور در یک زمان بررسی شده است. برای مثال Moharrery



شکل ۵- نتایج بهینه‌سازی میزان تجزیه‌زیستی پساب رنگزا

Fig. 5- Optimization results for decolorization of synthetic dye wastewater

رنگزا توسط باکتری را داشته و غلظت رنگزا و pH احتمالاً تأثیرگذار بوده‌اند و همچنین می‌توان گفت که متغیرها بر روی یکدیگر تأثیر متقابل دارند. در ادامه یک تابع درجه دوم بر حسب متغیرهای انتخابی برای پیش‌بینی میزان حذف‌زیستی رنگزای تولوئیدین قرمز با قابلیت برازش بسیار خوب پیشنهاد شد. در مجموع از نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان گفت فرآیندهای تصفیه‌زیستی آلاینده‌ها، بویژه پساب‌های آلوده به رنگزا را اغلب نمی‌توان بصورت یک فاکتور در یک زمان مورد مطالعه قرار داد و بی‌گمان باید اثرهای تداخلی و برهم‌کنش متغیرها لحاظ شود. در پایان نتایج نشان‌دهنده توانایی بالای باکتری نمک‌دوست مورد استفاده در تجزیه‌زیستی رنگزا بوده که می‌تواند عملکرد موفق‌تری در محیط‌های با شوری بالا داشته باشد.

### پی‌نوشت‌ها

- اطلاعات ایمنی (Material safety data sheet: MSDS)<sup>1</sup>  
 مواد شیمیایی  
 طرح ترکیب مرکزی (Central composite design: CCD)<sup>2</sup>  
 روش سطح پاسخ (Response surface methodology: RSM)<sup>3</sup>  
 یک فاکتور در یک زمان (One factor at a time: OFAT)<sup>4</sup>

افتاده است و همچنین شرایط بهینه تجزیه‌زیستی در تحقیق آن‌ها عبارت است از غلظت رنگزا ۲۵ ppm ، غلظت نمک ۵ درصد و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۶/۵ که در این شرایط ۸۰ درصد از رنگزا موردنظر حذف شده است (Moharrery *et al.*, 2012). نتایج مطالعه حاضر با تحقیق (Asad *et al.*, 2007) مطابقت خوبی دارد. آن‌ها در بررسی حذف رنگزا ریمازول بلک توسط میکروارگانیزم هالوموناس D<sub>2</sub> نتیجه گرفتند که با افزایش دما از ۲۵ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد، میزان حذف رنگزا افزایش یافته است و بطور مشابه، در تحقیق حاضر، بیشترین میزان تجزیه‌زیستی رنگزا در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است (Asad *et al.*, 2007).

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق بهینه‌سازی تصفیه‌زیستی پساب رنگزا حاوی تولوئیدین قرمز، توسط باکتری نمک‌دوست هالوموناس سویه D<sub>2</sub> برای اولین بار با استفاده از روش رویه پاسخ و طرح ترکیب میانی مطالعه شده است. تابعی برای میزان حذف‌زیستی رنگزا در مدت زمان ۱۰ روز در کشت حالت ایستا بر حسب ۴ متغیر انتخابی غلظت رنگزا، غلظت نمک، pH و دما بیان شد. با توجه به جدول آنالیز واریانس، دو متغیر غلظت نمک و دما بیشترین تأثیر در میزان حذف‌زیستی

### منابع

- Al-Bastaki, N., 2004. Removal of methyl orange dye and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> salt from synthetic waste water using reverse osmosis. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 43, 1561-1567.
- Amini, B., Otadi, M. and Partovinia, A., 2019. Statistical modeling and optimization of Toluidine Red biodegradation in a synthetic wastewater using Halomonas strain Gb. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 17(1), 319-330.
- Asad, S., Amoozegar, M.A., Pourbabae, A.A., Sarbolouki, M.N. and Dastgheib, S.M.M., 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource Technology*. 98, 2082-2088.
- Bayoumi, M.N., Al-Wasify, R. and Hamed, S.R., 2014. Bioremediation of textile wastewater dyes using local bacterial isolates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3, 962-970.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. and Escalera, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76, 965-977.
- Bhatt, N., Patel, K.C., Keharia, H. and Madamwar, D., 2005. Decolorization of diazo-dye Reactive Blue 172 by *Pseudomonas aeruginosa* NBAR12. *Journal of Basic Microbiology*. 45, 407-418.
- Chan, Y.J., Chong, M.F., Law, C.L. and Hassell, D.G.,

2009. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 155, 1-18.
- Chang, J.S. and Lin, Y.C., 2008. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonasluteola* strain. *Biotechnology Progress*. 16, 979-985.
- Chen, K.C., Wu, J.Y., Liou, D.J. and Hwang, S.C.J., 2003. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*. 101, 57-68.
- Daneshvar, N., Oladegaragoze, A. and Djafarzadeh, N., 2006. Decolorization of basic dye solutions by electrocoagulation: An investigation of the effect of operational parameters. *Journal of Hazardous Materials*. 129, 116-122.
- Delée, W., O'Neill, C., Hawkes, F.R. and Pinheiro, H.M., 1998. Anaerobic treatment of textile effluents: A review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 73, 323-335.
- Do, J.S. and Chen, M.L., 1994. Decolourization of dye-containing solutions by electrocoagulation. *Journal of Applied Electrochemistry*. 24, 785-790.
- Estlander, T. and Jolanki, R., 2012. *Paints, Lacquers, and Varnishes*. Kanerva's Occupational Dermatology. T. Rustemeyer, P., Elsner, S.M. and Maibach, H.I. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 675-689.
- Esteves, F. and Sousa, E., 2007. C.I. Reactive Black 5 degradation by advanced electrochemical oxidation process. In *Proceedings Autx textile conference 7, AEOP, Tampere, Finland*. p. 1.
- Feng, C., Fang-yan, C. and Yu-bin, T., 2014. Isolation, Identification of a Halotolerant Acid Red B Degrading Strain and its Decolorization Performance. *APCBEE Procedia*. 9, 131-139.
- Forgacs, E., Cserháti, T. and Oros, G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environment International*. 30, 953-971.
- Guadie, A., Tizazu, S., Melese, M., Guo, W., Ngo, H.H. and Xia, S., 2017. Biodecolorization of textile azo dye using *Bacillus* sp. strain CH12 isolated from alkaline lake. *Biotechnology Reports*. 15, 92-100.
- Guo, J., Zhou J., Wang D., Yang J. and Li, Z., 2008. The new incorporation bio-treatment technology of bromoamine acid and azo dyes wastewaters under high-salt conditions. *Biodegradation*. 19, 93-98.
- Gupta, V.K. and Suhas, 2009. Application of low-cost adsorbents for dye removal-A review. *Journal of Environmental Management*. 90, 2313-2342.
- Hafshejani, M.K., Ougbue, C.J. and Morad, N., 2014. Application of response surface methodology for optimization of decolorization and mineralization of triazo dye Direct Blue 71 by *Pseudomonas aeruginosa*. 3 *Biotech*. 4, 605-619.
- Han, R., Wang, Y., Sun, Q., Wang, L., Song, J., He, X. and Dou, C., 2010. Malachite green adsorption onto natural zeolite and reuse by microwave irradiation. *Journal of hazardous materials*. 175, 1056-1061.
- Hassaan, M., El Nemr, A., 2017. Health and Environmental impacts of dyes: mini review. *American Journal of Environmental Science and Engineering*. 1, 64-67.
- Jain, K., Shah, V., Chapla, D. and Madamwar, D., 2012. Decolorization and degradation of azo dye - Reactive Violet 5R by an acclimatized indigenous bacterial mixed cultures-SB4 isolated from anthropogenic dye contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 213, 378-386.
- Kolekar, Y.M., Pawar, S.P., Gawai, K.R., Lokhande, P.D., Shouche, Y.S. and Kodam, K.M., 2008. Decolorization and degradation of Disperse Blue 79 and Acid Orange 10, by *Bacillus fusiformis* KMK5 isolated from the textile dye contaminated soil. *Bioresource Technology*. 99, 8999-9003.
- Mahmoud, M.S., Mostafa, M.K., Mohamed, S.A., Sobhy, N.A. and Nasr, M., 2017. Bioremediation of red azo dye from aqueous solutions by *Aspergillus niger* strain

- isolated from textile wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 5, 547-554.
- Moharrery, L., Otadi, M., Miraly, N., Rezaei Zangeneh, M.M. and Amiri, R., 2019. Degradation of toluidine red, an oil soluble azo dye by *Halomonas* strain IP8 at alkaline condition. *Chemical Engineering Communications*. 206, 61-68.
- Moharrery, L., Otadi, M., Safekordi, A.A., Amiri, R. and Ardjmand, M., 2012. Biodegradation of Toluidine Red, an oil soluble azo dye, with *Halomonas* Strain D2. *World Applied Sciences Journal*. 18, 1065-1072.
- Montgomery, D.C., 2006. *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley and Sons Inc. USA.
- Myers R.H., Montgomery D.C., Anderson-Cook C.M., 2016. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons. USA.
- Pearce, C.I., Lloyd, J. and Guthrie, J., 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: A review. *Dyes and Pigments*. 58, 179-196.
- Roberts, S.M., James, R.C. and Williams, P.L., 2015. *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. John Wiley & Sons. USA.
- Sadrimoghaddam, S., Alavimoghaddam, M.R. and Arami, M., 2010. Coagulation/flocculation process for dye removal using sludge from water treatment plant: Optimization through response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*. 175, 651-657.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S. and Govindwar, S.P., 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 42, 138-157.
- Srinivasan, A. and Viraraghavan, T., 2010. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. *Journal of Environmental Management*. 91, 1915-1929.
- Truchliński, J., Sembratowicz, I., Gorzel, M. and Kiełtyka-Dadasiewicz, A., 2015. Allergenic potential of cosmetic ingredients. *Archives of Physiotherapy and Global Researches*. 19, 7-15.
- Wang, H., Su, J.Q., Wei Zheng, X., Tian, Y., Jing Xiong, X. and Zheng, T., 2009. Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Citrobacter* sp. CK3. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63, 395-399.





Environmental Sciences Vol.17/ No.4 /winter 2020

91-106

## Optimization of dye effluent decolorization by halotolerant *Halomonas* strain D<sub>2</sub> in static culture condition

Ali Partovinia<sup>1\*</sup>, Maryam Otadi<sup>2</sup> and Amirhossein Alaeddini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biorefinery Department, Faculty of New Technologies Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 2018.10.10 Accepted: 2019.06.22

**Partovinia, A., Otadi, M. and Alaeddini, A., 2020.** Optimization of dye effluent decolorization by halotolerant *Halomonas* strain D<sub>2</sub> in static culture condition. *Environmental Sciences*. 17(4): 91-106.

**Introduction:** Nowadays, the industrial effluents contain mineral and organic hazardous materials such as phenols, heavy metals, and dyes, which are carcinogenic and poisonous compounds even at low concentrations. An increase in such components especially dyestuffs in the environment makes the remediation of these pollutants valuable. Toluidine Red is a pigment containing azo groups, which is invasively used in different industries. There are several chemical, physical, biological, optical, and combinational methods for different pollutant removal from the environment. In recent years, the bioremediation technique has been considerably developed as an effective method in pollutant removal. Therefore, the goal of this study was to optimize the Toluidine Red removal from the synthetic dyes wastewater by *Halomonas* strain D<sub>2</sub> in static culture conditions. In this survey, optimization and variables' effectiveness study was performed by the response surface methodology (RSM).

**Material and methods:** In this research, the effectiveness status of variables and optimum conditions were studied by the statistical approach of Design Expert V.7 software. Biodegradation of dye was investigated by 30 experiments according to the Central Composite Design (CCD) and RSM. According to previous related research performed by one factor at time (OFAT), the effects of four variables of dye concentration, NaCl salt concentration, pH, and temperature on bioremediation at 10-30 ppm, 2-10 %, 5.5-9.5 and 20-40 °C, respectively, were studied. Bioremediation experiments in the aqueous phase of the synthetic model effluent have been performed in shake flask scale and static culture condition in an incubator for 10 days. Then the analysis of the resulted data was performed by analysis of variance.

**Results and discussion:** According to the results and analysis of variance, salt concentration and temperature are the most significantly effective variables on bioremediation in the studied range while pH and dye concentration were probably less significant. Furthermore, the interactive effect of dye concentration and pH, salt concentration and pH as well as salt

\*Corresponding Author. *Email Address:* a\_partovi@sbu.ac.ir

concentration and temperature were in a 95% effectiveness possibility limit. On the other hand, the maximum dye removal was observed on the 10th day of the experiment with 62.4%. The optimum condition for bioremediation was observed at a pH of 8.5, the temperature of 35°C, and salt and dye concentrations of 4% and 16.8 ppm, respectively. By RSM, a correlation of second order for dye removal percentage after 10 days was presented with  $R^2$  equal to 0.95. The average error of the proposed correlation and real experimental data was about 9.9%.

**Conclusion:** The second-order correlation proposed in this paper can effectively predict the different operational condition effects on removal of Toluidine Red by *Halomonas* strain D2 that is a useful bacterium in dye biodegradation. Comparing this survey with our previous study, which was about decolorization by Gb strain, shows that the optimum condition is different for each strain type. On the other hand, D2 strain performance was higher in the basic condition in comparison with strain Gb, however, in acidic conditions, the Gb strain's performance was better.

**Keywords:** *Halomonas* strain D2, Industrial effluents, Bioremoval, Toluidine Red, Optimization.