



Biodegradation of Congo Red Azo Dye Using *Lysinibacillus Capsici* Immobilized on Polyurethane foam Biocarrier in Moving Bed Bioreactor

Soroush Dayani Najafabadi¹, Maryam Hasani Zonoozi^{2*}, Roya Aliaskarian³

1. Master of Environmental Engineering, Dept. of Civil Engineering, Iran University of Science and Technology (IUST), Tehran, Iran

2. Assist. Prof., Water and Environmental Engineering Group, Dept. of Civil Engineering, Iran University of Science and Technology (IUST), Tehran, Iran (Corresponding Author) mhzonoozi@iust.ac.ir

3. Master of Microbiology, Dept. of Molecular Cell Biology and Microbiology, Isfahan University, Isfahan, Iran



<https://doi.org/10.22093/wwj.2024.474675.3432>

Original Paper

Abstract

Biosustainability, toxicity, and the potential for disruption of aquatic ecosystems and human health have made azo dyes into a serious environmental issue in industrial wastewater. In this context, a group of bacteria isolated from dye-contaminated wastewater was used in a moving bed bioreactor with polyurethane foam biocarriers for the biodegradation of Congo red azo dye. According to the EzBioCloud database (eztaxon), the dominant bacterium identified through DNA extraction, PCR, and 16S-rRNA sequencing showed the highest similarity to *Lysinibacillus Capsici* PB300(T). The efficiency of dye and chemical oxygen demand (COD) removal in the MBBR was examined in relation to process time, filling ratio, and dye concentration. Dye removal in this system was optimized, maintaining the pH at 7 ± 0.2 , the temperature at 35 ± 1.0 °C, and COD at 980 mg/L. The highest removal efficiencies for dye and COD were 92% and 85.1%, respectively, after 72 hours at a dye concentration of 50 mg/L and a filling ratio of 40%. Kinetic modeling was employed to study biodegradation. The R^2 value for the first-order model was 0.9457, while for the second-order model it was 0.9791. The second-order kinetic model (Grau's equation) provided a more accurate prediction of dye degradation in the MBBR system. This study confirms the successful degradation of Congo red azo dye using immobilized bacteria on Polyurethane foam (PUF) biocarriers in the MBBR bioreactor.

Keywords:

Congo Red Azo Dye, Polyurethane Foam, Moving Bed Bioreactor, *Lysinibacillus Capsici* PB300(T), Biodegradation.



Received June 21, 2024
Revised: July 23, 2024
Accepted Aug. 5, 2024

To cite this article:

Dayani Najafabadi, S., Hasani Zonoozi, M. and Aliaskarian, R., 2024. Biodegradation of Congo red azo dye using *Lysinibacillus Capsici* immobilized on polyurethane foam biocarrier in moving bed bioreactor. *Water and Wastewater*, 35(3), 45-68.
<https://doi.org/10.22093/wwj.2024.474675.3432>

Use your device to scan and read the article online



© The Author(s).

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



1. Introduction

The industrialization of societies and the demand for dye-related products have led to increased pollution from wastewater discharge (Chauhan et al., 2024). Various industries utilize thousands of different dyes, with a significant amount entering the environment (Benkhaya et al., 2020). Synthetic dyes, such as azo dyes, are particularly problematic due to their stability and incomplete degradation (Mane et al., 2007). Congo red, an anionic azo dye, poses irreversible risks to living organisms (Siddiqui et al., 2023). Physicochemical techniques like irradiation and filtration are commonly used to remove azo dyes from wastewater, but they have limitations and generate harmful byproducts (Khandare et al., 2023). Biological treatment methods, on the other hand, offer a sustainable and cost-effective solution. These methods involve the use of microorganisms in bioreactors to degrade dyes through enzymatic processes (Tizazu et al., 2022). Biological treatment provides a viable alternative to overcome the challenges associated with physical and chemical methods for treating wastewater from dye-producing industries (Vikrant et al., 2018).

Recent research has focused on identifying bacterial species capable of degrading azo dyes, such as *Aeromonas sp.*, *Lysinibacillus sp.*, and *Pseudomonas sp.* (Gopinath et al., 2009; Zheng et al., 2017). Enzymes like azoreductase and laccase are crucial in this process. Previous studies have shown the efficiency of *Lysinibacillus Fusiformis* in removing methyl red dye and Congo red dye (Sari and Simarani, 2019; Lal Maurya et al., 2022). Immobilized cell growth systems, where microorganisms are attached to biocarriers, have been found to enhance pollutant degradation rates compared to free-floating cells (Vasilieva et al., 2023). In one study, *Bacillus Flexus GS1 IIT (BHU)* bacteria and low-density polyethylene¹ biocarriers were used in a packed bed bioreactor to degrade phenol (Swain et al., 2021b). Another study focused on optimizing phenol biodegradation in a biofilm reactor using *Bacillus Cereus GS2 IIT (BHU)* bacteria and moving biocarriers (Swain et al., 2022). Modified plastic carriers, particularly polyurethane foam-polypropylene², have shown high removal efficiency for naphthalene-containing wastewater (Sonwani et al., 2019). PUF biocarriers have also been effective in degrading Orange 7 dye (Swain et al., 2021a). This research aims to use PUF biocarriers with *Lysinibacillus sp.* biofilm in a moving bed bioreactor³ for the biodegradation of Congo red azo dye. The study will develop PUF biocarriers with a bacterial biofilm, optimize process variables, and evaluate the kinetics of dye removal.

¹ Low-Density Polyethylene (LDPE)

² Polyurethane Foam-Polypropylene (PUF-PP)

³ Moving Bed Bioreactor (MBBR)

2. Materials and methods

2.1. Preparation of culture media and synthetic wastewater

Congo red azo dye was purchased from Sigma-Aldrich Co. All chemical compounds used in culture medium and synthetic wastewater were purchased from Merck brand. Table 1 presents the chemical compounds used in mineral salt media⁴ and synthetic wastewater was prepared according to the values presented in Table 2. Glucose was used as the organic carbon source in synthetic wastewater.

2.2. Isolation of potential Congo red dye degrading bacterial species

Soil samples contaminated with wastewater from the Soof & Satin factory in Isfahan were collected and stored. Culture media were prepared using different concentrations of Congo red dye for the isolation of resistant bacteria. After a four-day incubation period, 10 mL of the grown bacteria were inoculated into the secondary culture medium, and the potential bacteria grown in the 200 mg/L dye concentration were isolated using the streak plate method.

2.3. Identification of the effective bacterial species in biodegradation

The Microsynth Research Center in Switzerland conducted a molecular genetic analysis of a bacterial species. DNA was purified using the CTAB method, and a polymerase chain reaction⁵ was performed using forward and reverse primers. The 16S-rRNA sequence was uploaded to EzBioCloud's database, compared with existing sequences using the 16S-based ID algorithm, and aligned using the CustalW nucleotide alignment tool. Evolutionary analysis was performed using the Neighbor-Joining method in MEGA 11.0 software.

2.4. MBBR specifications with polyurethane foam⁶ biocarriers

The MBBR equipped with PUF biocarriers was used to study the Congo red azo dye and chemical oxygen demand⁷ removal efficiency. The parameters of pH, temperature and COD were set at constant values of 7 ± 0.2, 35 ± 0.1 °C, and 980 mg/L, respectively. To enhance the biodegradation, bacteria from 250 mL Erlenmeyer flasks were added to the bioreactor system, facilitating biofilm formation. Over 20 days, glucose and Congo red azo dye were gradually added to the system until the desired values were reached.

⁴ Mineral Salt Media (MSM)

⁵ Polymerase Chain Reaction (PCR)

⁶ Polyurethane Foam (PUF)

⁷ Chemical Oxygen Demand (COD)



Table 1. MSM bacterial culture

Chemical compounds	Nutrient Broth	Glucose	FeCl ₃	MgSO ₄	MNSO ₄ .H ₂ O	CaCl ₂	KHPO ₄	K ₂ HPO ₄
Value (g/L)	1.3	0.9	0.01	0.42	0.28	0.05	0.5	1.5

Table 2. Types of materials and concentrations of compounds used in the preparation of synthetic wastewater

Chemical compounds	Glucose	FeCl ₃	MgSO ₄	MNSO ₄ .H ₂ O	CaCl ₂	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄
Value (g/L)	0.74-0.9*	0.01	0.42	0.28	0.05	0.5	1.5

* To maintain a constant COD of 980 mg/L, depending on dye concentration

2.5. Analytical methods

The study involved measuring Congo red dye concentration, and an analysis of COD, MLSS, biofilm morphology, and functional groups. The dye concentration was measured based on the absorbance at the peak wavelength of the dye (479.2 nm). COD and MLSS were measured using the APHA method. Palintest 9100 spectrophotometer was used to measure the dye and COD values. Biofilm morphology was analyzed using a TESCAN scanning electron microscope, and functional group analysis was performed using FTIR spectroscopy. The study employed a PerkinElmer Spectrum RX 1 instrument for sample preparation, and IRpal software version 0.2 for analyzing the composition of the functional groups of the Congo red dye before and after treatment.

2.6. Optimized ANN models

This section describes two kinetic models used to analyze the removal of the dye: first-order kinetics and second-order kinetics.

3. Results and discussion

3.1. Identification of the Isolated Bacterial sp.

The Congo red dye-degrading bacterium was identified through 16S-rRNA gene sequencing using the EzBioCloud database. The bacterium showed the highest similarity to *Lysinibacillus Capsici PB300(T)*. The phylogenetic tree indicated the highest similarity between the bacterium and *Lysinibacillus Sphaericus ATCC-4525* and *Lysinibacillus Cresolivorans SC03 EU043375*.

3.2. Morphological analysis of biofilm formation on PUF

The morphological analysis of PUF carriers using Scanning Electron Microscopy¹ revealed the presence of

irregular micropores on the PUF surface before biofilm formation. These micropores provided a large surface area for microorganisms to attach and form biofilms. SEM images on day 20 showed that the micropores were covered with thin layers of bacterial biofilm. This analysis confirmed the successful development of biofilm layer on the surface of PUF carrier, emphasizing the role of the porous structure in facilitating biofilm formation.

3.3. Evaluating the effect of different parameters on dye and COD removal efficiency

3.3.1. Impact of process time

The role of process time in Congo red dye degradation was assessed. The results show a significant increase in the removal percentages (%RE) with increasing process time. As depicted in Fig. 1, the dye and COD removal efficiencies, respectively, reached approximately 55% and 5% after 2 hours to about 92% and 85% after 72 hours. This is due to the presence of aerobic azo reductase enzymes in areas with high oxygen concentration, as well as the presence of low oxygen areas in the depth of the biofilm formed on mobile biocarriers. It should be noted that in the low oxygen environment, the reduction of the azo bond by aerobic bacteria and, subsequently, the decolorization of the Congo red azo dye is possible.

3.3.2. Impact of filling ratio

The filling ratio affected the performance of MBBR system in degrading Congo red dye. Higher filling ratios increased microbial density resulting in better dye removal. The dye removal percentage increased from 60.24% at a 20% filling ratio to 91.43% at a 40% filling ratio after 72 hours (Fig. 2).

¹ Scanning Electron Microscopy (SEM)



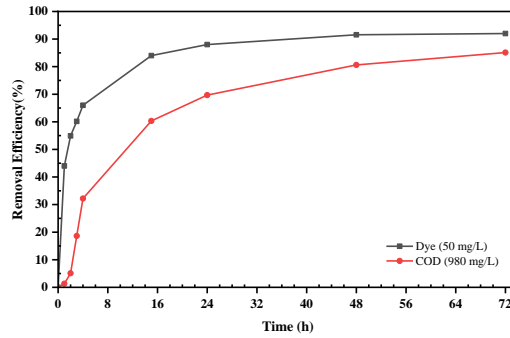


Fig. 1. Percentage of dye and COD removal in the MBBR with PUF biocarriers (filling ratio of 40%) over a 72-hour period

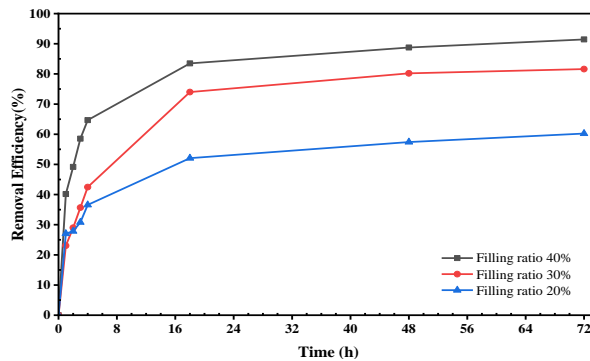


Fig. 2. Percentage of dye removal in the MBBR with PUF biocarriers under different filling ratios (initial dye concentration: 50 mg/L)

An increase in the percentage of filling with biocarriers, leads to more biofilm growth in the biological system, and increases the population of bacteria in both the low oxygen and high oxygen areas of the biofilm. Consequently, this leads to an increase in the rate of azo bond reduction and dye decomposition.

3.3.3. Impact of initial dye concentration

Three initial dye concentrations of 50, 100 and 150 mg/L were examined. The results showed that the dye

removal efficiency decreases with an increase in the initial dye concentration. The highest dye removal efficiency of 92% was obtained for the dye concentration of 50 mg/L, while the lowest efficiency of 86% was achieved for the maximum dye concentration of 150 mg/L (Fig. 3).

This decrease can be attributed to the fact that high levels of azo dye pollutants can disrupt the metabolic processes of microbes and reduce the production of enzymes involved in dye decomposition.

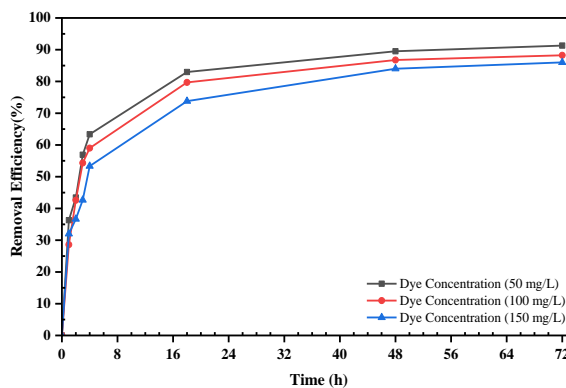


Fig. 3. Percentage of dye removal in the MBBR with PUF biocarriers (filling ratio of 40%) under different dye concentrations



3.4. Kinetic analysis of Congo red dye degradation

The kinetic analysis of Congo red dye degradation was investigated using first-order and second-order kinetic models. The obtained results show a better fit of the second order kinetic ($R^2=0.979$) than the first order kinetic ($R^2=0.946$) on the data obtained from the process.

3.5. FTIR analysis of Congo red dye before and after treatment

The FTIR analysis of Congo red dye before and after treatment in the MBBR system revealed distinct peaks at various wavelengths. The treated dye showed new peaks

and changes in peak positions and intensities, indicating successful dye degradation.

4. Conclusions

This study evaluated the efficiency of a MBBR equipped with PUF as a biocarrier for COD and Congo red azo dye removal. The dominant microbe, *Lysinibacillus Capsici PB300(T)*, achieved the highest dye removal efficiency of 92% over 72 hours under initial dye concentration of 50 mg/L and 40% biocarrier filling ratio. The second-order kinetic model showed better fit to the experimental data than the first-order model. FTIR studies confirmed the successful degradation of Congo red dye in the MBBR.





تجزیه زیستی رنگزای آزو کنگو قرمز با استفاده از باکتری *Lysinibacillus Capsici* تثبیت شده بر روی حامل زیستی فوم پلی اورتان در بیورآکتور بستر متحرک

سروش دیانی نجف‌آبادی^۱، مریم حسنی زنونزی^{۲*}، رویا علی‌عسکریان^۳

۱- کارشناسی ارشد مهندسی عمران- محیط‌زیست، دانشکده مهندسی عمران، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه مهندسی آب و محیط‌زیست، دانشکده مهندسی عمران، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران
(نویسنده مسئول) hzonoozi@iust.ac.ir
۳- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

doi <https://doi.org/10.22093/wwj.2024.474675.3432>

مقاله پژوهشی

چکیده

واژه‌های کلیدی:
رنگزای آزو کنگو قرمز،
فوم پلی‌اورتان، بیورآکتور
بستر متحرک،
Lysinibacillus
Capsici PB300 (T)
تجزیه زیستی



دریافت: ۱۴۰۳/۴/۱
اصلاح: ۱۴۰۳/۵/۲
پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۱۵

نگرانی از پایداری زیستی، سمیت و پتانسیل اختلال در اکوسیستم‌های آبی و سلامت انسان، رنگ‌زاهای آزو را به یک مسئله جدی زیست‌محیطی در فاضلاب‌های صنعتی تبدیل کرده است. در این راستا، دسته باکتری‌های ایزوله شده از فاضلاب آلوده به رنگزا در یک بیورآکتور بستر متحرک با حامل‌های زیستی فوم پلی‌اورتان برای تجزیه زیستی رنگزا آزو کنگو قرمز استفاده شد. بر اساس پایگاه داده EzBioCloud (eztaxon)، باکتری غالب که از طریق استخراج DNA، PCR و بارگذاری توالی (16S-rRNA) شناسایی شد که بیشترین تشابه را با باکتری *Lysinibacillus Capsici* PB300(T) داشت. کارایی حذف رنگزا و COD در MBBR در ارتباط با پارامترهای زمان فرایند، نسبت پر شدگی و غلظت رنگزا بررسی شد. حذف رنگزا در این سیستم بهینه‌سازی شد که در آن، pH برابر ۰/۲ ± ۰/۷، دما برابر ۱/۰ ± ۳۵ درجه سلسیوس و COD برابر ۹۸۰ میلی‌گرم در لیتر ثابت نگه داشته شدند. بیشترین کارایی حذف رنگزا و COD به ترتیب ۹۲ و ۸۵/۱ درصد پس از ۷۲ ساعت در غلظت رنگزا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و نسبت پر شدگی ۴۰ درصد به دست آمد. مدل‌سازی سینتیک برای مطالعه تجزیه زیستی استفاده شد. مقدار R2 مدل مرتبه اول برابر ۰/۹۴۵۷ و برای مدل مرتبه دوم برابر ۰/۹۷۹۱ بود. مدل سینتیک مرتبه دوم (معادله گراو) پیش‌بینی دقیق‌تری از تجزیه رنگزا را در سیستم MBBR توصیف کرد. این پژوهش تجزیه موفقیت‌آمیز رنگزای آزو کنگو قرمز را با استفاده از باکتری‌های تثبیت شده بر روی حامل‌های زیستی PUF در بیورآکتور MBBR تأیید می‌کند.

از دستگاه خود برای اسکن و خواندن مقاله به صورت آنلاین استفاده کنید



برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام فرمایید:

دیانی نجف‌آبادی، س.، حسنی زنونزی، م.، علی‌عسکریان، ر.، ۱۴۰۳، تجزیه زیستی رنگزای آزو کنگو قرمز با استفاده از باکتری *Lysinibacillus Capsici* تثبیت شده بر روی حامل زیستی فوم پلی‌اورتان در بیورآکتور بستر متحرک.

<https://doi.org/10.22093/wwj.2024.474675.3432>، آب و فاضلاب، ۳۵(۳)، ۶۸-۴۵



© The Author(s).

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



۱- مقدمه

نفتالین آمین - ۴ - سولفونیک اسید تشکیل شده و حاوی دو کروموفور آزو و اکسوکروم‌های اسیدی است که با ساختارهای بنزنی پیوند خورده‌اند (Siddiqui et al., 2023).

در سال‌های اخیر، پژوهش‌های گسترده‌ای در خصوص فرایندهای فیزیکی-شیمیایی و بیولوژیکی برای تصفیه فاضلاب‌های آلوده به رنگ‌زاهای آزو انجام شده است. در این میان، روش‌های تصفیه بیولوژیکی به‌عنوان رویکردی پایدار، دوستدار محیط‌زیست و مقرون‌به‌صرفه، گزینه مناسبی برای رفع محدودیت‌ها و مشکلات روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای تصفیه فاضلاب صنایع تولیدکننده رنگ‌زاهای به‌شمار می‌رود (Tizazu et al., 2022). تصفیه بیولوژیکی رنگ‌زاهای شامل استفاده از میکروارگانیسم‌ها در بیوراکتورهای سازگار شده تحت شرایط خاص بوده که طی فرایندهای آنزیمی، رنگ‌زاهای هدف را تجزیه می‌کنند (Vikrant et al., 2018).

با وجود مزایای تجزیه‌پذیری زیستی، انتخاب میکروارگانیسم‌های کارآمد برای تجزیه آلاینده‌های خاص مانند رنگ‌زاهای آزو در غلظت‌های زیاد همچنان چالش برانگیز است (Tran et al., 2020). محدودیت‌های فرایندهای بیولوژیکی کنونی برای تجزیه رنگ‌زاهای آزو شامل تجزیه آهسته آنها در روش‌های سنتی تصفیه فاضلاب به‌دلیل پایداری شیمیایی و منشأ سنتز آنها است (Senthil Rathi and Senthil Kumar, 2022). این رنگ‌زاهای به‌دلیل ساختار سخت تجزیه‌پذیر ناشی از وجود پیوند آزو (N=N) و همچنین به‌دلیل سمیت زیاد که ناشی از وجود حلقه‌های آروماتیک و گروه‌های سولفونات (SO_3H^-) است، تحت فرایندهای بیولوژیکی و تحت شرایط هوازی، به‌سختی تجزیه می‌شوند (Kapoor et al., 2021). از طرفی، تجزیه بیولوژیکی در شرایط بی‌هوازی و شکسته شدن پیوند آزو، به‌عنوان اولین مرحله از تجزیه رنگ‌زای آزو، خود منجر به تولید آمین‌های آروماتیک خطرناک می‌شود (Zafar et al., 2022) که می‌تواند ادامه مسیر تجزیه در شرایط هوازی را دچار اختلال کند.

رنگ‌زدایی از رنگ‌زاهای آزو در یک بیوراکتور بستر متحرک^{۱۰}، عمدتاً توسط یک جامعه میکروبی متنوع که به‌صورت بیوفیلم‌های باکتریایی بر روی حامل‌های زیستی رشد کرده‌اند و

در سال‌های اخیر، هم‌زمان با صنعتی شدن جوامع و تقاضای روزافزون برای محصولات وابسته به رنگ‌زاهای مانند صنایع نساجی، پژوهش‌های علمی زیادی بر روی کاهش سطوح آلودگی افزایش یافته ناشی از دفع فاضلاب‌های این‌گونه صنایع انجام شده است (Chauhan et al., 2024). سالانه بیش از 7×10^5 تن رنگ‌زا در سراسر جهان تولید می‌شود که در حدود ۱۰ درصد از آن به‌عنوان فاضلاب به محیط‌زیست وارد می‌شود (Benkhaya et al., 2020).

رنگ‌زاهای مصنوعی، به‌علت وجود حلقه‌های آروماتیک پیچیده، پایداری فیزیکی-شیمیایی، حرارتی و نوری بالایی دارند. به همین علت، عدم تجزیه و حذف کامل این آلاینده‌ها در محیط‌های آبی، باعث اختلال در سیستم‌های اکولوژیکی آب‌های دریافت‌کننده، افزایش مقدار اکسیژن‌خواهی شیمیایی^۱ و همچنین ایجاد خطرات جدی برای سلامتی انسان‌ها و موجودات زنده و آلودگی محیط‌زیست خواهد شد (Heidarpour et al., 2020, Mane et al., 2007).

طبق ادبیات علمی، طبقه‌بندی خلاصه‌ای از انواع شاخه‌های رنگ‌زا بر اساس ساختار شیمیایی و باریونی آنها ارائه شده است که می‌توان آنها را بر اساس بار سطحی شامل رنگ‌زاهای یونی و غیر یونی و یا بر اساس ساختار کروموفور^۲ رنگ‌زاهای طبقه‌بندی کرد. انواع کروموفور رنگ‌زا شامل: رنگ‌زاهای آزو^۳، سیانین^۴، زانتان^۵، نیترو^۶، کینون-ایمین^۷ و ایندیگوید^۸ است (Tkaczyk et al., 2020). از جمله رنگ‌زاهای مصنوعی که به‌طور فزاینده‌ای توسط صنایع مختلف استفاده می‌شوند، رنگ‌زاهای آزو هستند که شامل یک یا چند گروه عملکردی دیازینیل^۹ ($\text{R-N=N-R}'$) هستند (Tarbajova et al., 2023). در بین انواع رنگ‌زاهای آزو، رنگ‌زای آزو کنگو قرمز، یک رنگ‌زای آنیونی پرکاربرد است که از نمک سدیم بنزیدین‌دی‌آزو-بیس-۱-

¹ Chemical Oxygen Demand (COD)

² Chromophore

³ Azo

⁴ Cyanine

⁵ Xanthan

⁶ Nitro

⁷ Quinone-Imine

⁸ Indigoid

⁹ Diazinyl

¹⁰ Moving Bed Bioreactor (MBBR)



بالای رنگ‌زای کنگو قرمز را توسط این‌گونه باکتری تأیید کردند. با این حال، پژوهش‌های محدودی در مورد اثربخشی گونه باکتریایی *Lysinibacillus sp.* برای تجزیه زیستی رنگ‌زای کنگو قرمز گزارش شده است (Maurya et al., 2022).

علاوه بر این، برای افزایش سطح عملکرد سلول‌های میکروبی در سیستم‌های بیولوژیکی، پژوهشگران مطالعات متعددی را حول سیستم‌های رشد چسبیده ارائه کردند. در پژوهشی توسط سوان و همکاران در سال ۲۰۲۰، تجزیه زیستی فنل در یک بیورآکتور پر شده با حامل زیستی^۷ با استفاده از باکتری *Bacillus Flexus GSI* و حامل زیستی از جنس پلی‌اتیلن با چگالی پایین^۸ *IIT (BHU)* به‌عنوان ماده بستر بررسی شد. بالاترین نرخ حذف فنل در سیستم پیوسته جریان، با سرعت جریان ۱۰ میلی‌لیتر بر دقیقه ارزیابی شد (Swain et al., 2021b).

همچنین، در پژوهشی دیگر که بر بهینه‌سازی تجزیه زیستی فنل در رآکتور MBBR از جنس پلی‌اتیلن پوشیده شده با باکتری *Bacillus Cereus GS2 IIT (BHU)* متمرکز بود، شرایط بهینه حذف فنل در سرعت اختلاط ۱۰۰ دور بر دقیقه، غلظت فنل ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و زمان ماند هیدرولیکی^۹ ۲۴ ساعت به‌دست آمد (Swain et al., 2022).

در پژوهشی دیگر، حامل‌های پلاستیکی اصلاح شده‌ای شامل پلی‌پروپیلن (PP)، پلی‌اتیلن با چگالی پایین-پلی‌پروپیلن (LDPE-PP) و فوم پلی‌اورتان-پلی‌پروپیلن (PUF-PP) برای تصفیه فاضلاب حاوی نفتالین در رآکتور MBBR ارزیابی شد. پارامترهای بهینه فرایند با استفاده از روش سطح پاسخ^{۱۰}، شامل pH و HRT بهینه‌سازی شدند که در شرایط بهینه حذف رنگ‌زا برابر ۹۰/۲ درصد بود (Sonwani et al., 2019).

در پژوهش ماژول و همکاران در سال ۲۰۲۲ و پارتونیا و همکاران در سال ۲۰۱۸ نیز گزارش شده است که حامل زیستی PUF^{۱۱} به‌دلیل مقاومت شیمیایی قابل توجه، تخلخل و سطح ویژه بالا و پایداری آن، ماده‌ای باکیفیت برای تشکیل بیوفیلم محسوب

پتانسیل تولید آنزیم‌های مرتبط برای تجزیه زیستی این دسته از آلاینده‌ها را دارند، انجام می‌شود. تجمع باکتری‌ها در لایه بیوفیلم، مقاومت آنها را در برابر سمیت ناشی از آلاینده‌ها افزایش می‌دهد که این مسئله به‌دلیل غلظت زیاد مواد پلیمری خارج سلولی^۱ در لایه بیوفیلم نسبت به حالت رشد معلق است (Meng et al., 2009).

وجود لایه بیوفیلم، امکان انجام فرایندهای بیولوژیکی تحت شرایط بی‌اکسیژن و کم‌اکسیژن (در این پژوهش بی‌هوازی نامیده شد) تا شرایط با غلظت اکسیژن بالا (هوازی) را فراهم می‌کند. در فرایند حذف رنگ‌زای آزو در سیستم MBBR، کاهش آنزیمی پیوند آزو نقش اصلی برای رنگ‌زدایی را دارد. این مرحله بی‌هوازی توسط آنزیم‌های آزوردوکتاز^۲ ترشح شده از باکتری‌های موجود در عمق بیوفیلم تسهیل شده و منجر به تشکیل آمین‌های آروماتیک و سایر گروه‌های واسط می‌شود. این گروه‌های واسط که ممکن است شامل هیدرازین‌ها و ترکیبات فنولی باشند، در مرحله بعد تحت فرایندهای هوازی تا حد امکان تجزیه می‌شود. آنزیم‌های دخیل در مرحله دوم عمدتاً شامل آنزیم‌های اکسیدکننده قوی مانند لاکازها^۳ و پراکسیدازها^۴ است که در نهایت به مینرالیزه^۵ کامل رنگ‌زا و تولید محصولات بی‌ضرر مانند دی‌اکسیدکربن و آب منجر می‌شود (Ledakowicz and Paździor, 2021).

پژوهش‌های اخیر برای شناسایی گونه‌های مختلف باکتریایی تجزیه‌کننده انواع رنگ‌زاهای آزو از جمله: *Aeromonas sp.* و *Lysinibacillus sp.* انجام شده است (Zheng et al., 2017, Gopinath et al., 2009). در این فرایند، آنزیم‌هایی مانند آزوردوکتاز و لاکتاز^۶ نقش کلیدی ایفا می‌کنند. پژوهش قبلی توسط ساری و سیمارانی در سال ۲۰۱۹ نشان داد که باکتری *Lysinibacillus Fusiformis WIB6* توانایی بسیار زیادی در حذف رنگ‌زای متیل قرمز در طول فرایند تصفیه دارد (Sari and Simarani, 2019). همچنین موری و همکاران در سال ۲۰۲۲ پس از شناسایی باکتری *Lysinibacillus Fusiformis* حذف

⁷ Packed Bed Biocarrier Bioreactor (PBBR)

⁸ Low-Density Polyethylene (LDPE)

⁹ Hydraulic Retention Time (HRT)

¹⁰ Response Surface Methodology (RSM)

¹¹ Polyurethan Foam (PUF)

¹ Extracellular Polymeric Substances (EPS)

² Azoreductase

³ Laccases

⁴ Peroxidases

⁵ Mineralize

⁶ Lactase



جدول ۱- محیط کشت نمک‌های معدنی

Table 1. Mineral salts medium bacterial culture

Chemical compounds	Nutrient broth	Glucose	FeCl ₃	MgSO ₄	MNSO ₄ .H ₂ O	CaCl ₂	KHPO ₄	K ₂ HPO ₄
Value (g/L)	1.3	0.9	0.01	0.42	0.28	0.05	0.5	1.5

جدول ۲- نوع و غلظت مواد استفاده شده در ساخت فاضلاب مصنوعی

Table 2. Types and concentrations of materials used in the preparation of synthetic wastewater

Chemical compounds	Glucose	FeCl ₃	MgSO ₄	MNSO ₄ .H ₂ O	CaCl ₂	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄
Value (g/L)	* 0.74-0.9	0.01	0.42	0.28	0.05	0.5	1.5

* In order to maintain a constant COD of 980 mg/L, depending on dye concentration

شده در جدول ۱ در آب مقطر حل شدند. فاضلاب مصنوعی نیز با ترکیب اجزای بیان شده در جدول ۲، به غیر از ماده مغذی نوترینت برات^۲ و با استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن آلی تهیه شد.

۲-۲- جداسازی گونه باکتریایی پتانسیل تجزیه‌کننده رنگزای آزو کنگو قرمز

پس از نمونه‌برداری از خاک آلوده به فاضلاب کارخانه سوف و ساتین اصفهان، نمونه‌های خاک در کیسه‌های استریل در ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. محیط MSM با استفاده از مقدار متفاوتی از رنگزای کنگو قرمز (در محدوده ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برای جداسازی باکتری‌های مقاوم تهیه شدند. مقدار ۱۰ گرم خاک به محیط MSM اضافه شد و پس از آن مخلوط خاک و محیط کشت در آنکوباتور شیکردار در دمای ۳۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از ۴ روز دوره آنکوباسیون^۳، ۱۰ میلی‌لیتر از باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت اولیه (حاوی ۵۰ میلی‌گرم رنگزا در لیتر) به محیط کشت ثانویه (حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم رنگزا در لیتر) تلقیح شد. این فرایند مادامی که غلظت رنگزای محیط کشت در مرحله پایانی به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر رسید، ادامه یافت. سپس، باکتری‌های پتانسیل رشد کرده در غلظت رنگزا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، به روش کشت خطی جداسازی شد. باکتری غالب سپس به صورت ایزوله مجدداً پاساژ^۴ داده شد.

می‌شود (Majul et al., 2022, Partovinia and Rasekh, 2018). طبق نتایج علمی سواپین و همکاران نیز تجزیه بیولوژیکی رنگزای اسید نارنجی ۷ در رآکتور بیوفیلم پر شده با حامل زیستی PUF افزایش یافت (Swain et al., 2021a). با این حال پژوهش‌های محدودی از عملکرد گونه باکتریایی *Lysinibacillus sp.* چسبیده به حامل زیستی PUF برای تجزیه زیستی رنگزای آزو کنگو قرمز وجود دارد. از این رو این پژوهش، بر استفاده از حامل زیستی PUF در بیورآکتور MBBR برای تجزیه زیستی رنگزای آزو کنگو قرمز با اهداف زیر متمرکز است: - تشکیل بیوفیلم باکتریایی جداسازی شده با گونه غالب *Lysinibacillus Capsici* بر روی حامل زیستی PUF - ارزیابی تأثیر و بهینه‌سازی متغیرهای فرایند از جمله زمان فرایند، غلظت رنگزا و نسبت پرشدگی حامل‌های زیستی در بیورآکتور MBBR - ارزیابی سینتیک حذف رنگزای کنگو قرمز در بیورآکتور MBBR توسط مدل‌های مرتبه اول و دوم

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه محیط کشت و فاضلاب مصنوعی

رنگزای کنگو قرمز با شماره CAS 573-58-0 از شرکت سیگما - آلدریج تهیه شد. تمام ترکیبات شیمیایی استفاده شده در محیط کشت نمک‌های معدنی^۱ و فاضلاب مصنوعی از برند مرک تهیه شدند. برای تهیه محیط MSM، مواد شیمیایی مطابق با مقدار ارائه

² Nutrient Broth (NB)

³ Incubation

⁴ Passage

¹ Mineral Salts Medium (MSM)



آکواریمی (۱/۰ ± ۳۵ درجه سلسیوس) انجام شد. نمای شماتیک بیورآکتور آزمایشگاهی در شکل ۱ ارائه شده است. اثرات متغیرهای فرایند مانند غلظت رنگزای کنگو قرمز ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، زمان ۱ تا ۳ روز و نسبت پرشدگی ۲۰ تا ۴۰ درصد در بیورآکتور MBBR ارزیابی شد.

برای ارتقای مقیاس و سازگاری میکروباها در بیورآکتور با رنگزای کنگو قرمز، ابتدا دسته باکتری‌های جداسازی شده موجود در ارلن‌های ۲۵۰ سانتی‌مترمکعب که به بیشترین حد ممکن از غلظت زیست‌توده میکروبی رسیده بود، به سیستم بیورآکتور حاوی حامل‌های زیستی PUF اضافه شد تا شرایط تشکیل بیوفیلم مهیا شود. در این حال تمامی متغیرهای مهم سیستم بیورآکتور مانند pH، دما و DO در طول این فرایند کنترل شد. گلوکز ورودی و رنگزای آزو کنگو قرمز در چهار مرحله جداگانه طی ۲۰ روز به سیستم اضافه شد. این فرایند با هدف تقویت بیوفیلم بر سطح اسفنج‌ها و ثبات بخشیدن به عملکرد سیستم تا حد مطلوب انجام شد تا در نهایت غلظت نهایی COD برابر ۹۸۰ میلی‌گرم در لیتر و غلظت رنگزا برابر ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر رسید.

۲-۵- روش‌های سنجش

برای اندازه‌گیری غلظت رنگزای کنگو قرمز بر اساس نمودار طیف به‌دست آمده از دستگاه اسپکتروفتومتر، طول موج مربوط به بیشترین جذب این رنگزا در ناحیه مرئی برابر با ۴۷۹/۲ نانومتر است. غلظت رنگزا در نمونه‌های آزمایشی، شامل پساب خروجی و نمونه‌های مربوط به مقدار COD، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Palintest 9100 اندازه‌گیری شد. رابطه بین میزان جذب (ABS) و غلظت رنگزا (C) پس از ترسیم منحنی کالیبراسیون تعیین شد و سپس غلظت مجهول رنگزای کنگو قرمز در نمونه‌ها از طریق رابطه خطی حاصل شده محاسبه شد. همچنین درصد حذف رنگزا و COD از معادله ۱ قابل تعیین است

$$(RE)\% = \frac{S_{in} - S_{out}}{S_{in}} \times 100 \quad (1)$$

که در آن

S_{in} و S_{out} غلظت ورودی و خروجی رنگزای کنگو قرمز و COD در بیورآکتور MBBR است.

۲-۳- شناسایی گونه باکتریایی مؤثر در تجزیه زیستی

تجزیه و تحلیل ژنتیک مولکولی گونه باکتریایی در مرکز تحقیقاتی Microsynth واقع در بالگاج^۱ سوئیس انجام شد. DNA با استفاده از روش CTAB (برمید سترویل تری‌متیل آمونیوم) خالص‌سازی شد. همچنین، فرایند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۲ با استفاده از پرایمرهای پیشین (27F-5' AGTTTGATCMTGGCTCA AGG3') و پسین (1492R-5' GGTTACCTTGTTACGACTT3') انجام شد. PCR در مجموع ۳۵ سیکل داشته که با شرایط واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. توالی 16S-rRNA به‌دست آمده در پایگاه داده EzBioCloud's (eztaxon) بارگذاری و با توالی‌های موجود در پایگاه داده با استفاده از الگوریتم 16S-based ID مقایسه شد. توالی با استفاده از ابزار ترانز نوکلئوتیدی CustalW هم‌تراز شد و تجزیه و تحلیل تکاملی با استفاده از روش‌های همسایگی - پیوستگی (NJ) در نرم‌افزار MEGA 11.0 انجام شد.

۲-۴- مشخصات MBBR با حامل‌های زیستی PUF

بیورآکتور MBBR استفاده شده با هدف تجزیه زیستی هم‌زمان رنگزای کنگو قرمز و COD توسط حامل‌های زیستی PUF پوشیده شده با باکتری‌های پتانسیل ارزیابی شد. به همین منظور از مخزن ۲/۴۷ لیتری مکعب مستطیل از جنس پلکسی‌گلاس^۳ به ابعاد ۲۰×۱۳×۹/۵ سانتی‌مترمکعب استفاده شد. حجم کل و حجم استفاده شده در بیورآکتور به ترتیب ۲/۴۷ و ۲ لیتر در نظر گرفته شد. از طریق کمپرسورهای هوا، اکسیژن موردنیاز به داخل بیورآکتورها از طریق سنگ هوا تزریق شده تا شرایط هوازای حفظ شود. همچنین، مقدار pH و اکسیژن محلول^۴ فاضلاب مصنوعی به ترتیب با مقدار ۷ ± ۰/۵ و ۴/۲ ± ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها در دمای تنظیم شده توسط بخاری

¹ Balgach

² Polymerase Chain Reaction (PCR)

³ Plexiglass

⁴ Dissolved Oxygen (DO)



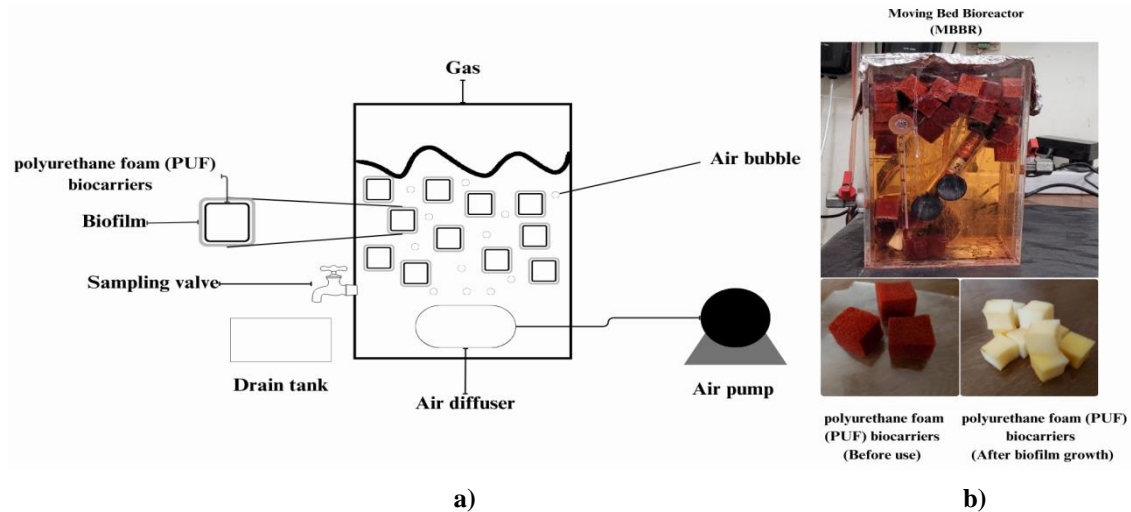


Fig. 1. Schematic (a) and photo (b) of moving bed bioreactor equipped with polyurethane foam biocarriers

شکل ۱- شماتیک (a) و تصویر (b) بیورآکتور MBBR حاوی حامل‌های زیستی PUF

کمک کند. در راستای شناسایی گروه‌های عملکردی و تجزیه و تحلیل کیفی ترکیبات مختلف، از طیف‌سنجی FTIR برای بررسی نحوه جذب و انتقال نور مادون قرمز توسط پیوندهای شیمیایی استفاده شد. آنالیز نمونه‌ها با استفاده از دستگاه PerkinElmer مدل Spectrum RX 1 انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای استفاده در دستگاه طیف‌سنجی FTIR از روش استخراج مایع-مایع با ماده استخراج‌کننده n-بوتانول استفاده شد. همچنین، از نرم‌افزار IRpal نسخه ۲/۰ برای تجزیه و تحلیل ترکیب گروه‌های عاملی رنگ‌زای کنگو قرمز قبل و بعد از فرایند تصفیه استفاده شد.

۲-۶- سینتیک حذف رنگ‌زا در بیورآکتور

۲-۶-۱- مدل سینتیک مرتبه اول

با فرض اینکه نرخ حذف رنگ‌زا از سینتیک مرتبه اول پیروی کند، معادله را می‌توان به صورتی که سوابین و همکاران در سال ۲۰۲۱ ارائه کردند، به صورت معادله ۳ بیان کرد (Swain et al., 2021a)

$$\frac{dF}{dt} = -k \cdot X \cdot F \quad (3)$$

که در آن

F غلظت خوراک (رنگ‌زا) برحسب میلی‌گرم در لیتر، t زمان ماند هیدرولیکی (h)، k ثابت سرعت مرتبه اول برحسب (L/mgVSS.h) و X غلظت جرم میکروبی برحسب میلی‌گرم در

همچنین، برای اندازه‌گیری COD از روش بیان شده در APHA و کیت‌های اندازه‌گیری HACH استفاده شد. به‌طور خلاصه، ابتدا نمونه‌ها با سرعت ۶۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس با استفاده از فیلترهای PTFE با اندازه حفرات ۰/۲۲ میکرون فیلتر می‌شوند. ۲ میلی‌لیتر از نمونه سانتریفیوژ و فیلتر شده به ویال‌های حاوی محلول هاضم و معرف اسید سولفوریک اضافه می‌شود. سپس ویال‌ها به مدت ۲ ساعت در رآکتور هاضم COD با دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از خنک شدن، میزان جذب نمونه در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Rice et al., 2012).

به‌منظور تعیین MLSS^۱ نمونه‌ها از روش استاندارد فیلتراسیون و سپس خشک کردن و توزین نمونه‌ها استفاده شد (Rice et al., 2012)

$$MLSS = \frac{W_2 - W_1}{V} \quad (2)$$

مورفولوژی بیوفیلم تشکیل شده روی حامل‌های PUF با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۲ مدل TESCAN (MIRA 3 LMU) تجزیه و تحلیل شد. قبل از آنالیز SEM، حامل‌های زیستی PUF در شرایط خلأ خشک شدند و سپس با پاشش نانوذر طلا پوشش داده شدند تا به قدرت تفکیک تصاویر

^۱ Mixed Liquor Suspended Solids (MLSS)

^۲ Scanning Electron Microscopy (SEM)



لیتر است. از آنجایی که مقدار X با زمان تغییر می‌کند، غلظت متوسط جرم میکروبی (\bar{X}) را می‌توان به صورت معادله ۴ استفاده کرد

معادله ۸ حاصل می‌شود که با ضرب آن در پارامتر k_s ، معادله

$$\frac{dF}{dt} = -(k_s \cdot \bar{X}) \cdot F = k_2 \cdot F \quad (۸)$$

$$\frac{dF}{dt} = -k \cdot \bar{X} \cdot F \quad (۴)$$

معادله فوق می‌تواند به صورت معادله ۹ ساده‌سازی شود

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + F_0 k_2 \cdot t} \quad (۹)$$

سپس از حاصل ضرب (\bar{X}) با ثابت سرعت مرتبه اول (k)، پارامتر جدید (k_1) حاصل می‌شود تا معادله سینتیک حذف خوراک (رنگ‌زا) به صورت معادله ۵ تعیین شود

پس از تفکیک کسرها در معادله قبل، معادله ۱۰ را خواهیم داشت

$$\frac{dF}{dt} = -k_1 \cdot F \quad (۵)$$

$$\frac{F_0 \cdot t}{F_0 - F} = \frac{1}{k_2 \cdot F_0} + t \quad (۱۰)$$

که در آن

k_1 نشان‌دهنده ثابت نرخ مرتبه اول (h^{-1}) است. با بسط دادن معادلات ۴ و ۵، معادله ۶ به صورت زیر قابل بازنویسی است

که در آن

$$\frac{F_0 - F}{t} = k_1 \cdot F \quad (۶)$$

F_0 غلظت اولیه سوبسترا برحسب میلی‌گرم در لیتر و k_2 ثابت سرعت مرتبه دوم ($L/mg \cdot VSS \cdot h$) را نشان می‌دهد. کارایی حذف سوبسترا است و که با پارامتر E ساده‌سازی می‌شود. همچنین، عبارت $\left(\frac{1}{k_2 \cdot F_0}\right)$ به عنوان یک ثابت در نظر گرفته می‌شود که با m نشان داده می‌شود. بنابراین معادله ۱۱ به صورت زیر قابل ارائه است

$$\frac{t}{E} = n \cdot t + m \quad (۱۱)$$

که در آن

F_0 غلظت اولیه خوراک برحسب میلی‌گرم در لیتر بوده و مقدار k_1 را نیز می‌توان از شیب منحنی ترسیم شده $\left(\frac{F_0 - F}{t}\right)$ در مقابل F به دست آورد.

که در آن n و $m(h)$ پارامترهای سینتیک مرتبه دوم هستند. پارامترهای سینتیک را می‌توان از شیب و عرض از مبدأ رگرسیون خطی $\frac{t}{E}$ در مقابل t به دست آورد.

۲-۶-۲- مدل سینتیک مرتبه دوم (رابطه گراو)

سینتیک مرتبه دوم برای حذف سوبسترا را می‌توان با معادله ۷ بیان کرد (Swain et al., 2021a)

$$\frac{dF}{dt} = -k_s \cdot \bar{X} \cdot F \quad (۷)$$

که در آن

k_s نشان‌دهنده ثابت سرعت مرتبه دوم برحسب $(L^2/g \cdot VSS \cdot gDYE \cdot h)$ است که به غلظت اولیه آلاینده و میانگین جرم میکروبی در بیورآکتور بستگی دارد. همان طور که قبلاً توضیح داده شد مقدار X با زمان متغیر بوده و غلظت متوسط جرم میکروبی

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی سوبه باکتری ایزوله شده

تجزیه و تحلیل توالی 16S-rRNA باکتری تجزیه‌کننده رنگ‌زای کنگو قرمز با استفاده از پایگاه داده (EzBioCloud (eztaxon انجام شد و کد (PXXXX01000046) مربوط به گونه میکروبی به دست



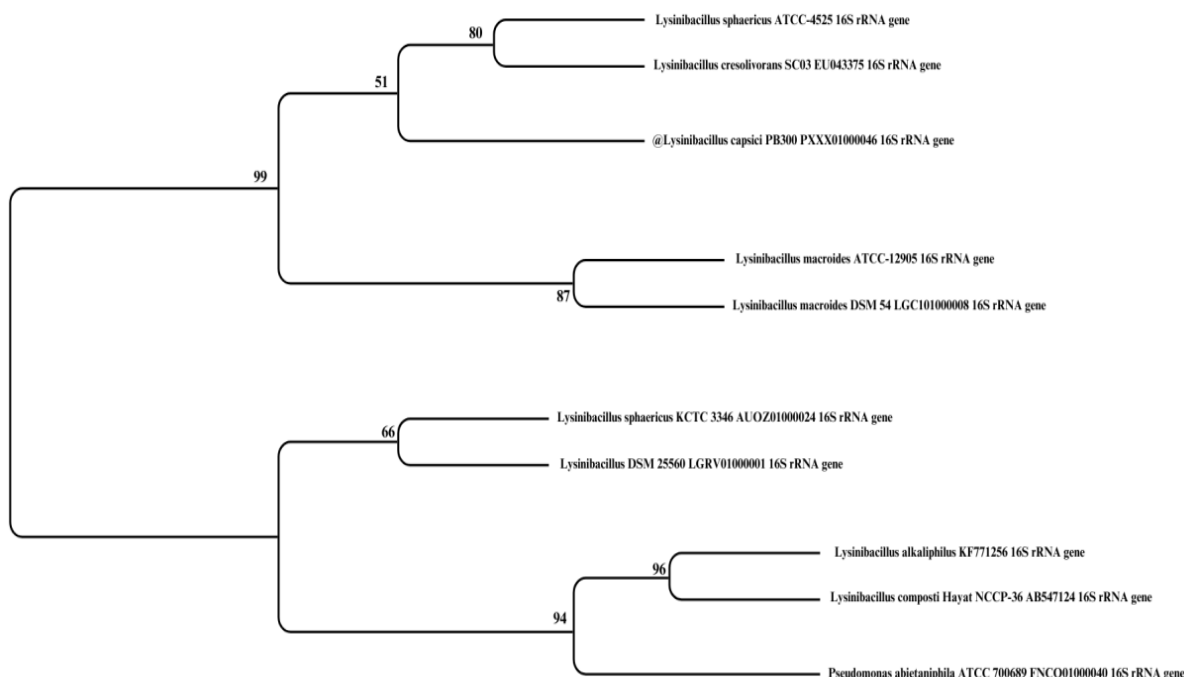


Fig. 2. The bacterial species *Lysinibacillus Capsici PB300(T)* isolated from a dye-contaminated site and its phylogenetic tree constructed by evolutionary analysis using the neighbor-joining (NJ) method based on 16S-rRNA sequence

شکل ۲- گونه باکتریایی *Lysinibacillus Capsici PB300(T)* که از یک مکان آلوده به رنگزای جدا شده و درخت فیلوژنتیک آن توسط تجزیه و تحلیل تکاملی با استفاده از روش همسایگی - پیوستگی (NJ) از توالی 16S-rRNA ترسیم شده است

باکتریایی (شکل ۳-ا)، وجود میکرو حفرات نامنظم را در سطح آشکار می‌کند. این حفره‌های کوچک، سطح وسیعی را برای میکروارگانیسم‌ها برای تشکیل بیوفیلم فراهم می‌کنند. علاوه بر این، وجود میکرو حفرات نامنظم، ظرفیت بیوفیلم را برای چسبیدن قوی تر به سطح حامل افزایش می‌دهد. تصاویر تهیه شده مربوط به روز ۲۰ام، همچنین نشان می‌دهد که میکرو حفرات با لایه‌های نازک از بیوفیلم باکتریایی پر شده‌اند (شکل ۳-ب).

۳-۳- بررسی اثر پارامترهای مختلف بر بازدهی حذف رنگزا و COD

سیستم بیورآکتور MBBR برای ارزیابی پارامترهای مختلف از جمله زمان فرایند، نسبت پرشدگی و غلظت رنگزا استفاده شد. یافته‌های این بخش می‌تواند درک بهتری از سیستم بیورآکتور با حامل زیستی PUF و بیوفیلم باکتریایی *Lysinibacillus Capsici* را ارائه دهد و در ارتباط با هر پارامتر نتایج مطلوب را

آمد. توالی یابی برای رسیدن به حداکثر شباهت سازماندهی شده که بیشترین شباهت را با باکتری *Lysinibacillus Capsici PB300(T)* داشت، پس از آن طبق بخش (۳-۲) درخت فیلوژنی ترسیم شده که در شکل ۲ ارائه شده است. درخت ترسیم شده نشان‌دهنده بیشترین شباهت میان باکتری شناسایی شده با گونه‌های *Lysinibacillus Sphaericus ATCC-4525* و *Lysinibacillus Capsici PB300(T)* است. همچنین باکتری *Cresolivorans SC03 EU043375* در *Lysinibacillus Macroides DSM 54 LGC101000008* شاخه‌ای جداگانه و با فاصله از میکروب شناسایی شده قرار گرفته که احتمال تشابه میکروب توالی‌یابی شده *Lysinibacillus Capsici PB300(T)* را با این میکروب رد می‌کند.

۳-۲- آنالیز مورفولوژی

مورفولوژی سطح حامل‌های زیستی PUF روز صفر (قبل از استفاده) و روز ۲۰ام (پس از تشکیل بیوفیلم) با استفاده از SEM بررسی شد. تصاویر SEM به دست آمده قبل از تشکیل بیوفیلم



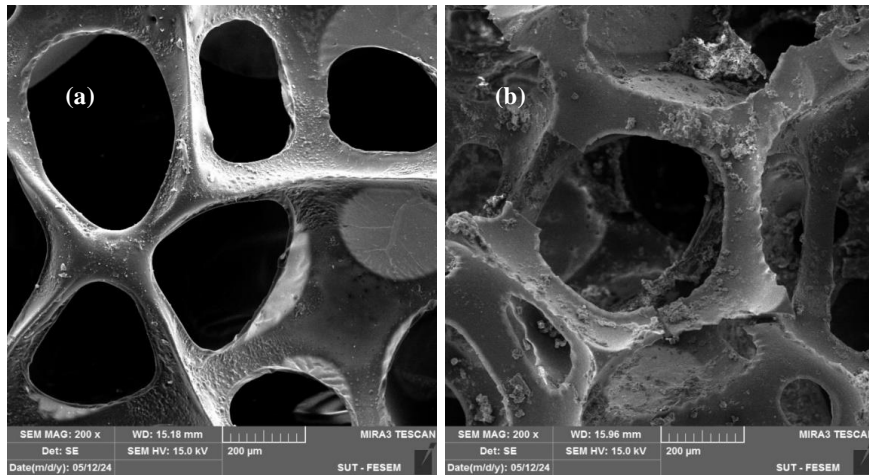


Fig. 3. Images of PUF biocarriers by a SEM: a) before biofilm immobilization (Day zero) and b) after biofilm formation (Day 20)

شکل ۳- تصاویر حامل‌های زیستی PUF توسط SEM: (a) قبل از تثبیت بیوفیلم (روز صفر) و (b) بعد از تشکیل بیوفیلم (روز ۲۰م)

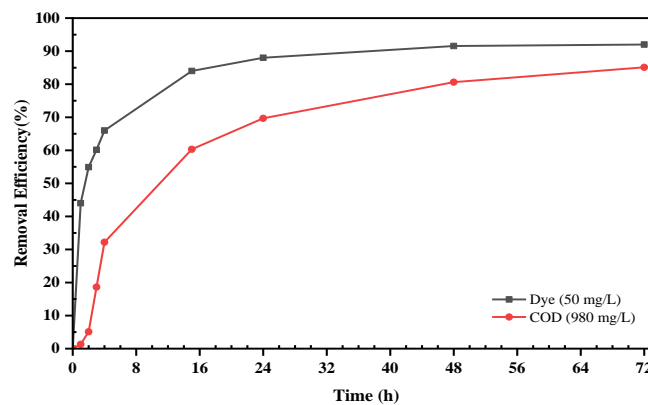


Fig. 4. Percentage of dye and COD removal in the MBBR with polyurethane foam biocarriers (filling ratio of 40%) over a 72-hour period

شکل ۴- درصد حذف رنگ‌زا و COD در بیورآکتور MBBR با حامل‌های زیستی PUF (۴۰ درصد پرشدگی) طی ۷۲ ساعت

پس از گذشت ۲ ساعت از شروع فرایند، تنها به حدود ۵۵ درصد رسید، در حالی که پس از ۷۲ ساعت به بیشترین میزان خود یعنی حدود ۹۲ درصد رسید. این در صورتی است که حذف رنگ‌زا در بیورآکتور MBBR هوادهی شده می‌تواند به‌علت وجود آنزیم‌های آزو ریدوکتاز هوازی در نواحی دارای غلظت اکسیژن بالا و نیز وجود نواحی کم اکسیژن در عمق بیوفیلم تشکیل شده بر روی حامل‌های زیستی متحرک باشد (Kong et al., 2022). چون در محیط کم اکسیژن، احیای پیوند آزو توسط باکتری‌های هوازی و متعاقباً، رنگ‌زدایی از رنگ‌زای آزو کنگو قرمز امکان پذیر می‌شود.

معین کند. بخش بعدی به‌طور کامل، نتایج آزمایش‌های انجام شده بر روی سیستم ناپیوسته را بررسی خواهد کرد.

۳-۱-۳- بررسی اثرات زمان فرایند بر عملکرد بیورآکتور

زمان فرایند نقش کلیدی در تجزیه رنگ‌زای کنگو قرمز دارد؛ زیرا سلول‌های باکتریایی در یک دوره زمانی خاص پیوند آزو و حلقه‌های آروماتیک را تجزیه و از منابع آلی برای رشد و تکثیر خود استفاده می‌کنند (Haque et al., 2021).

مطابق با شکل ۴ مشخص شد با افزایش زمان تا ۷۲ ساعت، بر میزان حذف رنگ‌زا و COD افزوده می‌شود. درصد حذف رنگ‌زا



۳-۳-۲- بررسی اثرات نسبت پرشدگی بر عملکرد بیورآکتور یکی از عوامل مهم در سیستم‌های بیورآکتور، نسبت پرشدگی حامل‌های زیستی است. نسبت پرشدگی حامل‌های زیستی به‌طور مستقیم با افزایش غلظت میکروبی در سیستم مرتبط است (Wang, et al., 2022, Gu et al., 2014). شکل ۵ نشان می‌دهد که افزایش نسبت پرشدگی در بیورآکتور، تأثیر مثبتی بر درصد حذف رنگزا دارد. مطابق با این شکل، اختلاف قابل توجهی در درصد حذف رنگزا بین نسبت‌های پرشدگی ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد در بازه زمانی صفر تا ۷۲ ساعت مشاهده می‌شود. به‌طور خاص، حذف رنگزا برای نسبت پرشدگی ۲۰ درصد پس از زمان ۷۲ ساعت برابر ۶۰/۲۴ درصد و برای نسبت پرشدگی ۴۰ درصد برابر ۹۱/۴۳ درصد است.

همان‌طور که اشاره شد، در یک سیستم MBBR هوادهی شده، شکستن پیوند آزو که منجر به رنگ‌بری از رنگزای آزو می‌شود، عمدتاً توسط باکتری‌های هوازی، در عدم حضور اکسیژن و از طریق انتقال الکترون از ماده آلی به پیوند آزو رخ می‌دهد. این باکتری‌ها قادر به احیای رنگ‌زاهای آزو و اکسید کردن آلاینده‌های آلی هستند. به‌علاوه، میکروارگانیسم‌های موجود بر روی سطح بیوفیلم

همچنین نتایج نشان داد افزایش زمان فرایند می‌تواند منجر به حذف بیشتری از مقدار COD در سیستم شود. میزان COD اولیه در سیستم تقریباً برابر با ۹۸۰ میلی‌گرم در لیتر است که متشکل از ماده آلی مکمل (گلوکز) و رنگ‌زا است. مطابق با شکل ۴ مقدار درصد حذف در بازه زمانی صفر تا ۲ ساعت برابر با ۳۷/۱۳ درصد است. به این ترتیب مشاهده می‌شود که مقدار COD طی ساعات اولیه به کندی مصرف می‌شود. این موضوع را می‌توان با حضور آلاینده رنگ‌زا در ساعات اولیه مرتبط دانست که عملکرد متابولیسمی میکروبی‌های هوازی برای تجزیه COD را محدود می‌کند. از طرفی با توجه به اینکه میکروبی‌های هوازی که در عمق حامل‌های زیستی در شرایط کم اکسیژن قرار گرفته‌اند، برای انتقال الکترون به پیوند آزو و احیای آن نیازمند منبع هیدروکربنی هستند، به نظر می‌رسد در ساعات اولیه، بخش قابل توجهی از حذف COD ناشی از عملکرد متابولیسمی این دسته از باکتری‌ها است (Kapoor et al., 2021) اما پس از گذشت زمان و کاهش غلظت رنگ‌زا، مصرف ماده آلی توسط باکتری‌ها در کل عمق بیوفیلم اعم از قسمت‌های کم اکسیژن تا بخش‌های با غلظت اکسیژن بالا رخ داده و حذف COD به حداکثر مقدار ۸۵/۱ درصد طی ۷۲ ساعت رسیده است.

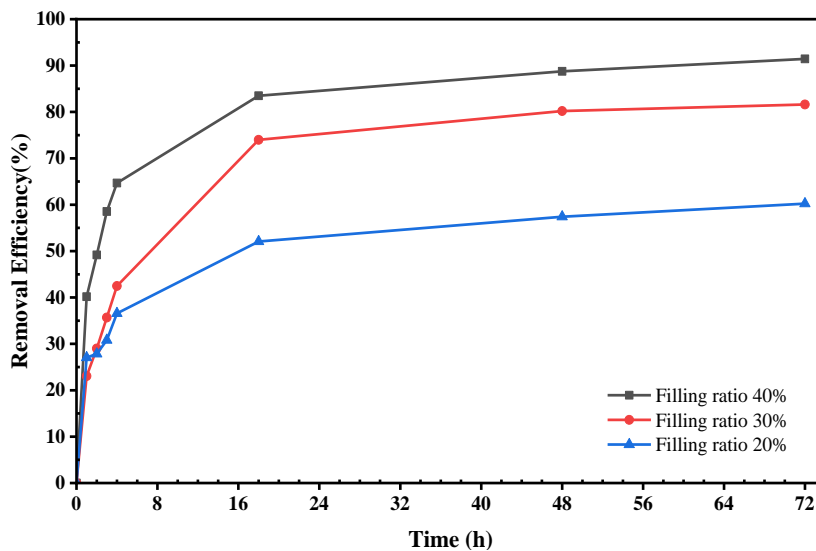


Fig. 5. Percentage of dye removal in the MBBR with polyurethane foam biocarriers under different filling ratios (initial dye concentration: 50 mg/L)

شکل ۵- درصد حذف رنگزا در بیورآکتور MBBR با حامل‌های زیستی PUF تحت نسبت پرشدگی‌های مختلف (غلظت اولیه رنگ‌زا: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر)



میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. این مشاهده نشان‌دهنده عدم تجزیه حداکثری رنگ‌زا ناشی از افزایش غلظت رنگ‌زا است. از طرفی، بر اساس مطالعات سینتیک حذف رنگ‌زا که در بخش بعد ارائه شده است، سینتیک حذف تحت هریک از غلظت‌های بررسی شده با دیگری متفاوت است. دلیل این مسئله مربوط به آن است که سطوح بالای آلاینده‌های رنگ‌زا می‌توانند فرایندهای متابولیکی میکروب‌ها را مختل و تولید آنزیم‌های دخیل در تجزیه رنگ‌زا را کاهش دهند (Saravanan et al., 2021). بنابراین، می‌توان عدم تجزیه حداکثری در غلظت‌های بالای رنگ‌زا را به میزان سمیت ناشی از غلظت اولیه رنگ‌زا موجود در سیستم مرتبط دانست. بالاترین نسبت حذف رنگ‌زا در سیستم می‌تواند به متغیرهایی مانند گونه‌های غالب میکروبی موجود در سیستم، غلظت میکروارگانسیم‌ها و آنزیم‌های خاصی که در فرایندهای بیوشیمیایی تولید می‌شوند، مربوط باشد که این پارامترها خود تحت تأثیر غلظت رنگ‌زا در محیط هستند.

۳-۳-۴- مقایسه نتایج این پژوهش با سایر پژوهش‌ها

در راستای مقابله با خطرات زیست‌محیطی ناشی از رنگ‌زاهای آزو، پژوهش‌های اخیر مسیرهای نوآورانه‌ای را برای تجزیه بیولوژیکی در بیورآکتورها ارائه کرده‌اند. از طرفی، این مطالعات از پتانسیل سوبیه‌های ایزوله شده در انواع مختلف بیورآکتورها، حامل‌های زیستی متنوع برای تجزیه انواع رنگ‌زاها به‌خصوص

که در شرایط هوازی هستند، آنزیم‌های آزوردوکتاز هوازی را آزاد کرده‌که به این فرایند کمک می‌کنند (Kong et al., 2022). همچنین، تجزیه آمین‌های آروماتیک و حذف کامل رنگ‌زا، توسط باکتری‌های هوازی تحت غلظت اکسیژن بالا انجام می‌شود. به‌همین دلیل، افزایش درصد پرشدگی با حامل‌های زیستی که منجر به رشد بیوفیلم بیشتری در سیستم بیولوژیکی می‌شود، از یک سو به سبب افزایش غلظت باکتری در محیط کم اکسیژن در لایه‌های داخلی بیوفیلم و از سوی دیگر به سبب افزایش جمعیت باکتری در لایه‌های بیرونی با غلظت اکسیژن بالا، منجر به افزایش نرخ احیای پیوند آزو و تجزیه رنگ‌زا می‌شود (Pinheiro et al., 2022).

۳-۳-۳- بررسی اثرات غلظت رنگ‌زا بر عملکرد بیورآکتور

شکل ۶ نشان می‌دهد که افزایش غلظت رنگ‌زا، تأثیرات منفی بر درصد حذف رنگ‌زا در بیورآکتور MBBR دارد. طبق نتایج حاصل شده، غلظت بهینه در این سیستم ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بوده که با درصد حذف تقریباً برابر با ۹۲ درصد پس از ۷۲ ساعت مرتبط است. همچنین تحت غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر درصد حذف رنگ‌زا پس از ۷۲ ساعت برابر با ۸۸/۲۴ درصد است. حداکثر غلظت رنگ‌زای بررسی شده در سیستم برابر ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر است که متناظر با درصد حذفی برابر با ۸۶ درصد پس از ۷۲ ساعت است. به‌عبارت دیگر، با افزایش غلظت رنگ‌زا از ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار رنگ‌زای باقیمانده در سیستم از ۴ تا ۲۱

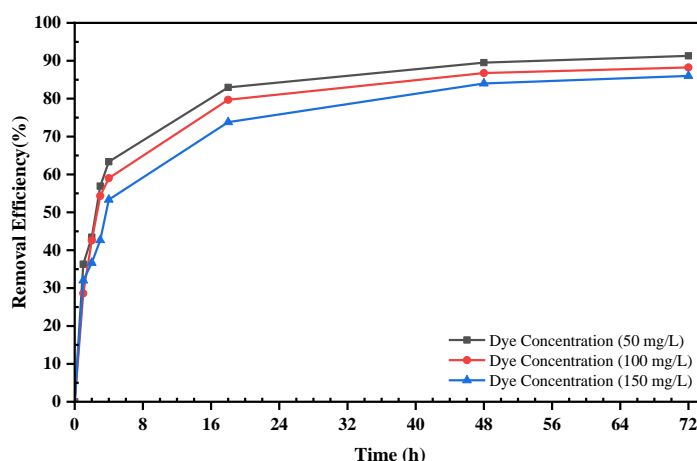


Fig. 6. Percentage of dye removal in the MBBR with polyurethane foam biocarriers (filling ratio of 40%) under different dye concentrations

شکل ۶- درصد حذف رنگ‌زا در بیورآکتور MBBR با حامل‌های زیستی PUF (درصد پرشدگی ۴۰ درصد) تحت غلظت‌های مختلف رنگ‌زا

درصد حذف بیشتری از رنگزا (۹۷/۲۸ درصد) دست یافتند، اما مقدار حذف COD در سیستم آنها به مراتب کمتر (۵۳ درصد) از این پژوهش (۸۵/۱ درصد) بوده است. دلیل این امر، به احتمال زیاد، استفاده چاترودی و همکاران از دو راکتور بی‌هوای-هوای مجزا در مقایسه با این پژوهش که از سیستم صرفاً هوادهی شده است، می‌باشد. با این وجود نتایج چاترودی و همکاران نشان می‌دهد که سیستم‌های بی‌هوای-هوای مجزا نسبت به سیستم صرفاً هوادهی شده برای رنگ‌زدایی عملکرد مطلوب‌تری دارد.

موریا و همکاران در سال ۲۰۲۲ توانستند ۹۲/۲۴ درصد از رنگزای کنگو قرمز را با غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر تحت زمان ماند ۹۶ ساعت در یک بیورآکتور PBBR پر شده با حامل زیستی اسفنج پلی‌اورتان با پوشش هیدروژل و کربن فعال، با منبع میکروبی استخراج شده از خاک آلوده به آلاینده‌های رنگزا، حذف کنند (Maurya et al., 2022). با وجود آنکه موریا و همکاران از حامل زیستی اصلاح شده هیدروژل در بیورآکتور PBBR برای حذف رنگزای کنگو قرمز استفاده کردند، اما نتایج ضعیف‌تری نسبت به این پژوهش گزارش کردند که این موضوع می‌تواند به تفاوت عملکرد سویه باکتری ایزوله و شناسایی شده در دو پژوهش مرتبط باشد. به عبارتی گونه باکتریایی *Lysinibacillus Capsici* در این پژوهش، پتانسیل بیوشیمیایی بیشتری برای تجزیه رنگ‌زاهای داشته است.

در پژوهشی دیگر، موریا و همکاران در سال ۲۰۲۳ موفق به حذف ۸۳/۷۵ درصد از رنگزای آزو اسید آبی (AB113) در یک بیورآکتور MBBR تحت زمان ماند هیدرولیکی ۴۸ ساعت و غلظت اولیه رنگزا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر شدند. آنها از حامل‌های زیستی پلی‌پروپیلن شیمیایی اصلاح شده استفاده کردند. این اصلاحات شامل اکسیداسیون با (KMnO₄) و پوشش کلسیم بود که به افزایش چسبندگی باکتری‌ها و ترشح EPS کمک کرد (Maurya et al., 2023).

همچنین در سال ۲۰۲۳، تریپاتی و همکاران موفق به حذف ۸۵/۲ درصد از رنگزای سبز درخشان^۲ در یک بیورآکتور PBBR تحت شرایط بهینه شدند. این پژوهش نشان داد که مقدار حذف ایده‌آل در نرخ جریان پیوسته ۰/۳ لیتر در ساعت (معادل زمان ماند

رنگ‌زاهای گروه آزو بهره برده‌اند. مقایسه این پژوهش با سایر مطالعات که در جدول ۳ به‌طور خلاصه ارائه شده است، درک بهتری از استراتژی‌های مؤثر تجزیه بیولوژیکی فراهم می‌کند، روش‌های نوآورانه را برجسته می‌سازد و بهترین شیوه‌ها را برای بهینه‌سازی حذف رنگزا در سیستم‌های بیورآکتور شناسایی می‌کند. به نتایج برخی از این پژوهش‌ها در زیر اشاره شده است:

در بیورآکتور متوالی بی‌هوای-هوای طراحی شده توسط حسینی کوپایه‌ای و همکاران در سال ۲۰۱۳، بیشترین درصد حذف رنگزای اسید قرمز ۱۸ (AR18) و COD به ترتیب برابر ۹۵ و ۹۲ درصد گزارش شده است. درصد حذف ایده‌آل رنگزا برای این سیستم تحت زمان سازگاری ۱۰۰ روز و HRT برابر با ۴۸ ساعت به‌دست آمده است. غلظت ورودی رنگزا و COD برابر با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بوده و از لجن میکروبی یک تصفیه‌خانه فاضلاب استفاده شده است (Hosseini Koupaie et al., 2013). علی‌رغم آنکه رنگزای اسید قرمز ۱۸ تعداد پیوند آزو کمتری (با یک پیوند آزو) نسبت به رنگزای کنگو قرمز (با دو پیوند آزو) دارد (Qiu et al., 2022)، تجزیه زیستی آن در سیستم مورد استفاده حسینی کوپایه‌ای و همکاران، مستلزم مدت‌زمان هیدرولیکی و زمان سازگاری قابل توجهی نسبت به این پژوهش بوده است. دلیل این موضوع احتمالاً استفاده از لجن تصفیه‌خانه بدون ایزوله کردن باکتری مناسب و سازگار با رنگزا در پژوهش حسینی کوپایه‌ای و همکاران بوده است. با این وجود به نظر می‌رسد غلظت زیاد لجن در سیستم حسینی کوپایه‌ای و همکاران تا حدی این نقیصه را جبران کرده و زمان‌های مورد نیاز بیان شده را به حد قابل قبول رسانده است.

در سال ۲۰۲۱، چاترودی و همکاران از یک بیورآکتور بستر ثابت بازگشتی^۱ بی‌هوای-هوای استفاده کردند که از سویه‌های میکروبی به‌دست آمده از خاک آلوده به آلاینده‌های رنگزا برای حذف رنگزای کنگو قرمز استفاده کردند. غلظت‌های رنگزا و COD به ترتیب ۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود و پس از ۲۴ ساعت، درصد حذف رنگزا و COD به ترتیب ۹۷/۲۸ و ۵۳ درصد تعیین شد (Chaturvedi et al., 2021). اگرچه چاترودی و همکاران در مقایسه با نتایج این پژوهش در مدت‌زمان کمتر به

² Brilliant Green (BG)¹ Reversible Fixed Bed Bioreactor (RFBB)

جدول ۳- نتایج حاصل از بیورآکتور MBBR استفاده شده برای تجزیه زیستی رنگزای آزوکنگو قرمز و مقایسه آن با نتایج دیگر پژوهش‌ها

Table 3. The results of the bioreactor MBBR used for the biodegradation of Congo red azo dye and its comparison with the results of other research

Dye	Initial dye concentration (mg/L)	Initial COD concentration (mg/L)	Process time (h)	Microbial sources	Bio-reactor type	Bio-carrier type	Dye removal (%)	COD removal (%)	References
Acid Red 18	100	1000	48	Mixed culture (municipal wastewater treatment plant)	Sequential anaerobic-aerobic bioreactor	Volcanic pumice stones	95	92	(Hosseini Koupaie et al., 2013)
Congo Red	200	1400	24	Bacteria culture isolated from dye-contaminated soil	Aerobic-anaerobic RFBB	Low-density polyethylene foam	97.28	53	(Chaturvedi et al., 2021)
Congo Red	50	-	96	Bacteria culture isolated from dye-contaminated soil (<i>Lysinibacillus Fusiformis</i>)	PBBR	Polyurethane sponge composite with hydrogel and active carbon	92.24	-	(Maurya et al., 2022)
Acid Blue 113	150	-	48	Bacteria culture isolated from dye-contaminated soil (<i>Lysinibacillus Macrolides</i>)	Aerobic MBBR	Chemically - modified polypropylene	83.75	-	(Maurya et al., 2023)
Brilliant Green	200	-	3.33	Bacteria culture isolated from dye-contaminated soil (<i>Bacillus Licheniformis</i>)	PBBR	Low-density polyethylene foam	85.2	-	(Tripathi et al., 2023)
Congo Red	50	980	72	Bacteria culture isolated from dye-contaminated soil (<i>Lysinibacillus Capsici</i>)	Aerobic MBBR	Polyurethane foam	92	85.1	Current research

ضریب سینتیکی m نیز متعاقباً برابر با $1/633$ حاصل شد. ضریب ثابت سینتیک مرتبه دوم k طبق معادله 11 برابر با $h \cdot g \cdot VSS / L^2 \cdot g \cdot DY E$ محاسبه شد. همچنین مقدار ضریب همبستگی (R^2) برای رنگزا برابر $0/9791$ حاصل شد که نشان‌دهنده قابلیت تخمین‌پذیری بهتر سینتیک مرتبه دوم برای رنگزا به نسبت سینتیک مرتبه اول است.

در میان پژوهش‌های انجام شده برای حذف آلاینده‌ها در بیورآکتورها و ارزیابی سینتیک‌های مرتبه اول و دوم، کوپایه‌ای و همکاران در سال 2013 برای حذف رنگزای اسید قرمز 18 (AR18) در بیورآکتور بی‌هوای-هوای بستر ثابت سینتیک مرتبه اول و دوم را ارزیابی کردند. آنها ضریب همبستگی را برای سینتیک مرتبه اول برابر با $0/997$ و برای سینتیک مرتبه دوم برابر با $0/897$ به دست آوردند (Hosseini Koupaie et al., 2013) که نشان‌دهنده برتری سینتیک مرتبه اول در مدل‌سازی فرایند آنها بود. اما در پژوهش دیگری که توسط سواين و همکاران در سال 2020 برای حذف آلاینده فنل در بیورآکتور MBBR با حامل زیستی PUF-PP انجام شد، معادله سینتیک مرتبه اول با ضریب همبستگی $0/964$ بر داده‌های آزمایشگاهی برآش شد، در حالی که برای معادله سینتیک مرتبه دوم، ضریب همبستگی $0/99$ گزارش شد که نشان داد سینتیک مرتبه دوم دقت بیشتری در مدل کردن فرایند آنها داشته است (Swain et al., 2020).

در بیورآکتور PBBR مورد استفاده توسط سواين و همکاران در سال 2021 با حامل‌های زیستی PUF، تجزیه زیستی اسید نارنجی 7 (AO7) در غلظت اولیه 300 میلی‌گرم در لیتر بررسی شد. در این پژوهش معادلات سینتیک مرتبه اول و دوم به ترتیب با ضرایب همبستگی $0/86$ و $0/983$ بر داده‌های آزمایشگاهی برآش شدند که نشان‌دهنده تخمین‌پذیری بهتر سینتیک مرتبه دوم نسبت به سینتیک مرتبه اول بود (Swain et al., 2021a).

۳-۵- نتایج آنالیز FTIR و شناسایی گروه‌های عاملی قبل و

بعد از فرایند تصفیه

تجزیه و تحلیل FTIR از نمونه رنگزای کنگو قرمز قبل و بعد از فرایند تصفیه در شکل 8 مشخص شده است. طیف نمونه رنگزای کنگو قرمز قبل از تصفیه، پیک‌های مشخصی را در طول موج‌های

$3/33$ (ساعت)، تحت غلظت اولیه رنگزا 200 میلی‌گرم در لیتر حاصل می‌شود. پژوهشگران از دسته باکتری ایزوله شده با باکتری غالب *Bacillus Licheniformis* که بر روی LDPE تثبیت شده بود، به‌عنوان منبع میکروبی استفاده کردند که به بهبود فرایند تجزیه زیستی کمک زیادی کرد (Tripathi et al., 2023).

به‌طور کلی بررسی مطالعات اخیر نشان‌دهنده افزایش تمایل پژوهشگران به استفاده از سیستم‌های زیستی با استفاده از سویه‌های باکتریایی سازگار با نوع آلاینده است که دلیل این امر، دستیابی به مقدار بازدهی بیشتر با صرف زمان هیدرولیکی کمتر است.

۳-۴- سینتیک‌های حذف رنگزا در سیستم بیورآکتور MBBR

مطالعات سینتیکی بر درک فرایندهای تجزیه رنگزاها بسیار حائز اهمیت هستند. با تحلیل نرخ تغییر پارامترهای سینتیکی با گذشت زمان، بینش ارزشمندی درباره کارایی و مکانیسم‌های تجزیه آلاینده‌ها در بیورآکتورها به دست می‌آید. در این پژوهش، سینتیک تجزیه رنگزای کنگو قرمز با غلظت اولیه 50 میلی‌گرم در لیتر بررسی شد. در این بررسی، هر دو مدل سینتیکی مرتبه اول و مرتبه دوم استفاده شدند. اندازه‌گیری‌ها در فواصل زمانی 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 15 ، 24 ، 48 و 72 ساعت انجام شد تا نرخ تجزیه آلاینده‌ها ارزیابی و عملکرد کلی تجزیه بررسی شود.

سینتیک مرتبه اول: ضرایب ثابت سینتیک مرتبه اول از ارزیابی خط مستقیم رگرسیون در شکل 7 -a بین پارامترهای $\frac{F_0-F}{t}$ و غلظت ثانویه رنگزا حاصل می‌شود. ضریب ثابت سینتیکی k_1 برای رنگزا مطابق معادله حاصله از رگرسیون خطی در شکل 7 برابر $0/789 \text{ h}^{-1}$ شد. همچنین با اندازه‌گیری غلظت MLSS برابر با $1/7$ گرم در لیتر، ثابت نرخ سینتیک مرتبه اول k از معادله 6 برابر با $0/4641 \text{ L/mg VSS.h}$ محاسبه شد. ضریب همبستگی (R^2) نیز پس از انجام فرایند رگرسیون خطی طبق سینتیک خطی مرتبه اول برای رنگزا برابر $0/9457$ به دست آمد.

سینتیک مرتبه دوم: مطابق با شکل 7 -b رگرسیون خطی بین پارامترهای $\frac{t}{F}$ و t برای رنگزا طبق سینتیک مرتبه دوم انجام شد. ضرایب سینتیک درجه دو شامل n و m از شیب و عرض از مبدأ رابطه حاصله، ارزیابی شد. ضریب سینتیکی n برابر با $0/0633$ و



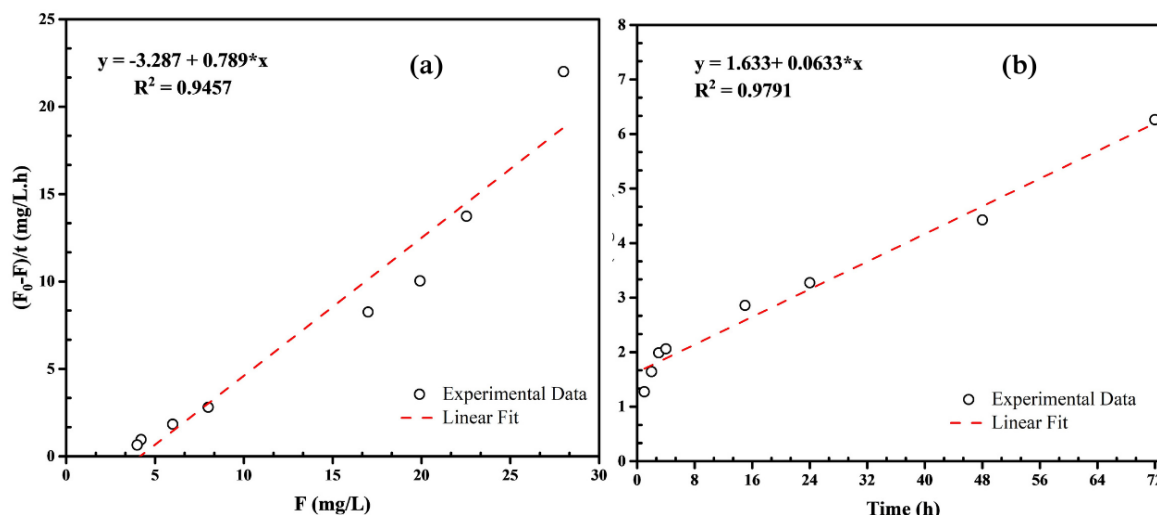


Fig. 7. Congo red dye removal kinetics for a) first-order model and b) second-order model

شکل ۷- سینتیک حذف رنگ‌زای کنگو قرمز برای مدل (a) درجه اول و (b) درجه دوم

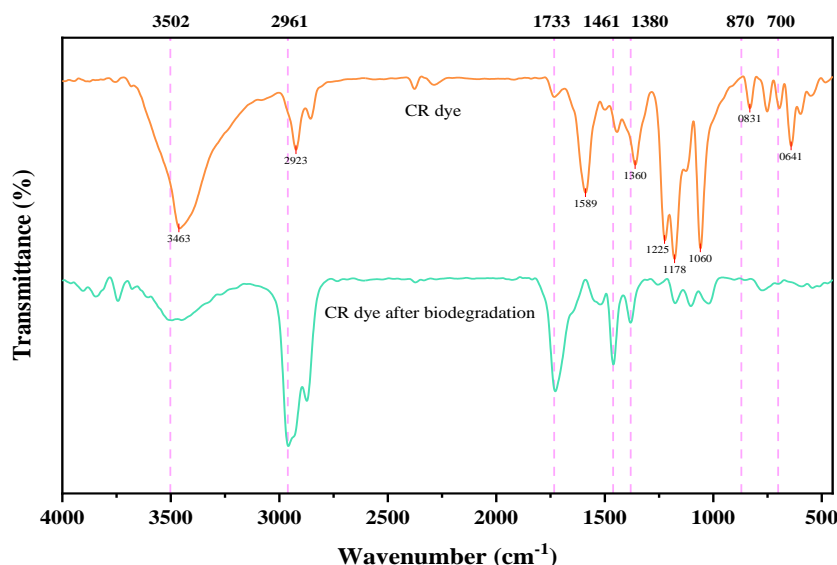


Fig. 8. FTIR spectra of Congo red dye and a sample of the same dye after biodegradation

شکل ۸- طیف‌های FTIR رنگ‌زای کنگو قرمز و نمونه‌ای از همین رنگ‌زا پس از تجزیه زیستی

پیک‌ها مربوط به پیوند (C-H) موجود در حلقه‌های آروماتیک است.

مشاهدات در طیف نمونه تصفیه شده شامل ناپدید شدن بسیاری از پیک‌های قبلی و ظهور پیک‌های جدید، جابه‌جایی پیک‌ها در فضا و افزایش شدت آنها در طول موج‌های مختلف است. کاهش و جابه‌جایی پیک در 3502 cm^{-1} بیانگر کشیدگی در پیوند (N-H) است. پیک در 2961 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاش کشیدگی پیوند

مختلف نشان می‌دهد. پیک مشاهده شده در طول موج 3463 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاش کشیدگی پیوندهای (O-H) و (N-H) است. پیک در 2923 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کشیدگی حلقه آروماتیک در پیوند (O-H) است. همچنین پیک در 1589 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی گروه آمین (NH_2) و پیوند آزو (N=N) است. پیک‌های 1380 cm^{-1} و 1225 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کشیدگی پیوند (C-N) و (S=O) هستند. در محدوده طول موج 870 cm^{-1} تا 700 cm^{-1}



ارزیابی شد که در آن غلظت COD اولیه برابر ۹۸۰ میلی‌گرم در لیتر بود. ضریب سینتیک مرتبه اول (k) برای تجزیه رنگ‌زا در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر برابر ۰/۴۶۴۱ برحسب (L/mgVSS.h) با ضریب هم‌بستگی (R^2) برابر ۰/۹۴۵۷ بود. همچنین، ضرایب سینتیک مرتبه دوم ۰/۰۶۳۳ برای (n)، ۱/۶۳۳ برای (m) و ۷/۲ برای (K_s) برحسب ($L^2/gVSS.gDYE.h$) با ضریب هم‌بستگی برابر با ۰/۹۷۹۱ بودند. نتایج حاصله نشان‌دهنده برازش بهتر سینتیک مرتبه دوم نسبت به سینتیک مرتبه اول بر داده‌های حاصل از فرایند است. همچنین، مطالعات FTIR، تجزیه موفقیت‌آمیز رنگ‌زای کنگو قرمز را در MBBR با حامل‌های زیستی PUF نشان داد.

۵-قدردانی

نویسندگان، مراتب قدردانی خود را از دانشگاه علم و صنعت ایران^۱ به منظور حمایت‌های مالی و تأمین فضا و تجهیزات موردنیاز برای انجام پژوهش، ابراز می‌دارند. همچنین شایان ذکر است پژوهش بخشی از طرح پژوهشی شماره "۴۰۱۵۰۵۵" است که تحت حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور^۲ قرار گرفته است.

¹ Iran University of Science and Technology (IUST)

² Iran National Science Foundation (INSF)

(C-H) است. ظهور پیک جدید در 1733 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاش کشیدگی پیوند (C=O) است. همچنین، ظهور پیک جدید در طول موج ۱۴۶۱ و 1380 cm^{-1} می‌تواند به وجود حلقه‌های (C-C) و گروه‌های عاملی شامل پیوندهای (N-O) نسبت داده شود. تجزیه موفقیت‌آمیز رنگ‌زای آزو کنگو قرمز در بیورآکتور MBBR به طریق ناپدید شدن، انتقال مکانی و ظهور پیک‌های جدید در محدوده طول موج ۷۰۰ تا 870 cm^{-1} نیز نشان داده شده است.

۴-نتیجه‌گیری

این پژوهش، کارایی بیورآکتور هوازی MBBR در حذف رنگ‌زای آزو کنگو قرمز و COD را ارزیابی کرد که از حامل‌های زیستی از جنس حامل‌های زیستی PUF بهره می‌برد. پس از طی کردن عملیات سازگاری و افزایش مقیاس، میکروب غالب *Lysinibacillus Capsici PB300(T)* شناسایی و سپس در بیورآکتور استفاده شد. تحت شرایط ایده‌آل و بهینه، بیورآکتور به‌طور میانگین ۹۲ درصد حذف رنگ‌زا را در طی یک دوره ۷۲ ساعته حاصل کرد. این فرایند با نسبت پرشدگی ۴۰ درصد و غلظت رنگ‌زا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. همچنین مقدار حذف COD در شرایط بهینه پس از ۷۲ ساعت برابر ۸۵/۱ درصد

References

- Benkhaya, S., M' Rabet, S. and El Harfi, A., 2020. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, 115, 107891. <https://dx.doi.org/10.1016/j.inoche.2020.107891>.
- Chaturvedi, A., Rai, B. N., Singh, R. S. and Jaiswal, R. P., 2021. Comparative toxicity assessment using plant and luminescent bacterial assays after anaerobic treatments of dyeing wastewater in a recirculating fixed bed bioreactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9, 105466. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2021.105466>.
- Chauhan, P. S., Singh, K., Choudhary, A., Brighu, U., Singh, S. K. and Bhattacharya, S., 2024. Combined advanced oxidation dye-wastewater treatment plant: design and development with data-driven predictive performance modeling. *npj Clean Water*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41545-024-00308-7>.
- Gopinath, K. P., Asan Meera Sahib, H., Muthukumar, K. and Velan, M., 2009. Improved biodegradation of Congored by using *Bacillus sp.* *Bioresource Technology*, 100, 670-675. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.048>.
- Gu, Q., Sun, T., Wu, G., Li, M. and Qiu, W., 2014. Influence of carrier filling ratio on the performance of moving bed biofilm reactor in treating coking wastewater. *Bioresource Technology*, 166, 72-78. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.026>.



- Haque, M. M., Haque, M. A., Mosharaf, M. K. and Marcus, P. K., 2021. Novel bacterial biofilm consortia that degrade and detoxify the carcinogenic diazo dye Congo red. *Archives of Microbiology*, 203, 643-654. <https://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-02044-1>.
- Heidarpour, H., Padervand, M., Soltanieh, M. and Vossoughi, M., 2020. Enhanced decolorization of rhodamine B solution through simultaneous photocatalysis and persulfate activation over Fe/C₃N₄ photocatalyst. *Chemical Engineering Research and Design*, 153, 709-720. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2019.09.007>.
- Hosseini Koupaie, E., Alavi Moghaddam, M. R. and Hashemi, S. H., 2013. Evaluation of integrated anaerobic/aerobic fixed - bed sequencing batch biofilm reactor for decolorization and biodegradation of azo dye Acid Red 18: comparison of using two types of packing media. *Bioresource Technology*, 127, 415-421. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.003>.
- Kapoor, R. T., Danish, M., Singh, R. S., Rafatullah, M. and HPS, A. K., 2021. Exploiting microbial biomass in treating azo dyes contaminated wastewater: mechanism of degradation and factors affecting microbial efficiency. *Journal of Water Process Engineering*, 43, 102255. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102255>.
- Khandare, S. D., Teotia, N., Kumar, M., Diyora, P. and Chaudhary, D. R., 2023. Biodegradation and decolorization of trypan blue azo dye by marine bacteria *Vibrio* sp. JM-17. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 51, 102802. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102802>.
- Kong, F., Ren, H. Y., Liu, D., Wang, Z., Nan, J., Ren, N. Q., et al. 2022. Improved decolorization and mineralization of azo dye in an integrated system of anaerobic bioelectrochemical modules and aerobic moving bed biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 353, 127147. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127147>.
- Ledakowicz, S. and Paździor, K., 2021. Recent achievements in dyes removal focused on advanced oxidation processes integrated with biological methods. *Molecules*, 26, 870. <https://dx.doi.org/10.3390/molecules26040870>.
- Majul, L., Wirth, S. and Levin, L., 2022. High dye removal capacity of *Peniophora laxitexta* immobilized in a combined support based on polyurethane foam and lignocellulosic substrates. *Environmental Technology*, 43, 684-695. <https://dx.doi.org/10.1080/09593330.2020.1801851>.
- Mane, V. S., Mall, I. D. and Srivastava, V. C., 2007. Use of bagasse fly ash as an adsorbent for the removal of brilliant green dye from aqueous solution. *Dyes and Pigments*, 73, 269-278. <https://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.12.006>.
- Maurya, K. L., Swain, G., Kumar Sonwani, R., Verma, A. and Sharan Singh, R., 2022. Biodegradation of Congo red dye using polyurethane foam-based biocarrier combined with activated carbon and sodium alginate: batch and continuous study. *Bioresource Technology*, 351, 126999. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126999>.
- Maurya, K. L., Kumar, M., Sonwani, R. K., Jaiswal, V. K., Verma, A. and Singh, R. S., 2023. Enhancement of azo dye bioremediation using chemically modified polypropylene biocarrier: comparative analysis and kinetic modeling. *Bioresource Technology Reports*, 21, 101375. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101375>.
- Meng, F., Chae, S. R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H. S. and Yang, F., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. *Water Research*, 43, 1489-1512. <https://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.044>.



- Partovinia, A. and Rasekh, B., 2018. Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 48, 1-38. <https://dx.doi.org/10.1080/10643389.2018.1439652>.
- Pinheiro, L. R. S., Gradissimo, D. G., Xavier, L. P. and Santos, A. V., 2022. Degradation of azo dyes: bacterial potential for bioremediation. *Sustainability*, 14, 1510. <https://dx.doi.org/10.3390/su14031510>.
- Qiu, H., Shen, F., Yin, A., Liu, J., Wu, B., Li, Y., et al. 2022. Biodegradation and detoxification of azo dyes by halophilic/halotolerant microflora isolated from the salt fields of Tibet autonomous region China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.877151>.
- Rice, E. W., Bridgewater, L. and Association, A. P. H., 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association Washington, DC. USA. [Link]
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Vo, D. V. N., Jeevanantham, S., Karishma, S. and Yaashikaa, P. R., 2021. A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: microbial enzymes. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126451. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126451>.
- Sari, I. P. and Simarani, K., 2019. Decolorization of selected azo dye by *Lysinibacillus fusiformis* W1B6: biodegradation optimization, isotherm, and kinetic study biosorption mechanism. *Adsorption Science and Technology*, 37, 492-508. <https://dx.doi.org/10.1177/0263617419848897>.
- Senthil Rathi, B. and Senthil Kumar, P., 2022. Sustainable approach on the biodegradation of azo dyes: a short review. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 33, 100578. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100578>.
- Siddiqui, S. I., Allehyani, E. S., Al-Harbi, S. A., Hasan, Z., Abomuti, M. A., Rajor, H. K., et al. 2023. Investigation of Congo red toxicity towards different living organisms: a review. *Processes*, 11, 807. <https://dx.doi.org/10.3390/pr11030807>.
- Sonwani, R. K., Swain, G., Giri, B. S., Singh, R. S. and Rai, B. N., 2019. A novel comparative study of modified carriers in moving bed biofilm reactor for the treatment of wastewater: process optimization and kinetic study. *Bioresource Technology*, 281, 335-342. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.121>.
- Swain, G., Maurya, K. L., Kumar SonwanI, R., Sharan Singh, R., Prakash Jaiswal, R. and Rai, B. N., 2022. Effect of mixing intensity on biodegradation of phenol in a moving bed biofilm reactor: process optimization and external mass transfer study. *Bioresource Technology*, 351, 126921. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126921>.
- Swain, G., Singh, S., Sonwani, R. K., Singh, R. S., Jaiswal, R. P. and Rai, B. N., 2021a. Removal of Acid Orange 7 dye in a packed bed bioreactor: process optimization using response surface methodology and kinetic study. *Bioresource Technology Reports*, 13, 100620. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100620>.
- Swain, G., Sonwani, R. K., Giri, B. S., Singh, R. S., Jaiswal, R. P. and Rai, B. N., 2020. Collective removal of phenol and ammonia in a moving bed biofilm reactor using modified bio-carriers: process optimization and kinetic study. *Bioresource Technology*, 306, 123177. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123177>.
- Swain, G., Sonwani, R. K., Giri, B. S., Singh, R. S., Jaiswal, R. P. and Rai, B. N., 2021b. A study of external mass transfer effect on biodegradation of phenol using low-density polyethylene immobilized *Bacillus flexus* GS1 IIT (BHU) in a packed bed bioreactor. *Water and Environment Journal*, 35, 285-294. <https://dx.doi.org/10.1111/wej.12626>.



- Tarbajova, V., Kolackova, M., Chaloupsky, P., Dobesova, M., Capal, P., Pilat, Z., et al. 2023. Physiological and transcriptome profiling of *Chlorella sorokiniana*: a study on azo dye wastewater decolorization. *Journal of Hazardous Materials*, 460, 132450. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132450>.
- Tizazu, S., Tesfaye, G., Andualem, B., Wang, A. and Guadie, A., 2022. Evaluating the potential of thermo-alkaliphilic microbial consortia for azo dye biodegradation under anaerobic-aerobic conditions: optimization and microbial diversity analysis. *Journal of Environmental Management*, 323, 116235. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116235>.
- Tkaczyk, A., Mitrowska, K. and Posyniak, A., 2020. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: a review. *Science of The Total Environment*, 717, 137222. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137222>.
- Tran, T., Hoa, V., Nga, N. T. T., Le, D. A., Tan, L. V., Huong, L. T. X., et al. 2020. Biodegrading evaluation of azo dye group – Congo Red, Methyl Blue and Methyl Orange using bacteria isolated from textile wastewater sediment. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991, 012088. <https://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/991/1/012088>.
- Tripathi, P., Tiwari, S., Sonwani, R. K. and Singh, R. S., 2023. Assessment of biodegradation kinetics and mass transfer aspects in attached growth bioreactor for effective treatment of brilliant green dye from wastewater. *Bioresource Technology*, 381, 129111. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129111>.
- Vasilieva, S., lukyanov, A., antipova, C., grigoriev, T., lobakova, E., chivkunova, O., et al. 2023. Interactive effects of ceftriaxone and chitosan immobilization on the production of arachidonic acid by and the microbiome of the Chlorophyte *Lobosphaera sp. IPPAS C-2047*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 10988. [Link]
- Vikrant, K., Giri, B. S., Raza, N., Roy, K., Kim, K. H., Rai, B. N., et al. 2018. Recent advancements in bioremediation of dye: current status and challenges. *Bioresource Technology*, 253, 355-367. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.029>.
- Wang, J. H., Zhao, X. L., Hu, Q., Gao, X., Qu, B., Cheng, Y., et al. 2022. Effects mechanism of bio-carrier filling rate on rotating biofilms and the reactor performance optimization method. *Chemosphere*, 308, 136176. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136176>.
- Zafar, S., Bukhari, D. A. and Rehman, A., 2022. Azo dyes degradation by microorganisms-an efficient and sustainable approach. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 103437. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103437>.
- Zheng, Y., Chen, D., Li, N., Xu, Q., Li, H., He, J., et al. 2017. Highly efficient simultaneous adsorption and biodegradation of a highly-concentrated anionic dye by a high-surface-area carbon-based biocomposite. *Chemosphere*, 179, 139-147. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.096>.

