

Study of the Optimal Conditions for Zn^{+2} Removal Using the Biomass of Isolated Bacteria from Ravang Mine

MEHDI SAFARI¹, MOHSEN SHAHRIARI MOGHADAM^{2*}, MOHSEN SAMIMI³, ZAHRA AZIZI⁴

1. Assistant Professor of Department of Geology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Assistant professor of Department of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
3. Assistant professor of Department of Chemical Engineering, Faculty of Energy, Kermanshah University of Technology, Kermanshah, Iran
4. Graduate Student (MSc) of Animal Biosystematics, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Behshti University, Tehran

ABSTRACT

Environmental pollution consist of heavy metals is the most important environmental problems and leads to serious damage for human health. In order to reduce the harmful effects of heavy metals, their treatment methods should be developed, of which the use of biological absorbers are particularly important. The objective of this study was to isolate the Zn^{+2} -resistant bacteria from Ravanj lead- and zinc-Mine in Markazi Province and to find the most efficient strains for zinc adsorption. For this purpose, samples were collected from the mine sediments and the Zn^{+2} resistant bacteria were enriched in the medium and isolated. After determining the resistance of isolated bacteria to Zn^{+2} , the most effective strain (MS3, *Delftia lacustris*) were detected by 16S rDNA sequencing. Then after the dried strains biomass was prepared and the effect of main operational variables such as pH , Zinc to Bacteria Biomass concentration ratio (ZB), and the retention time of bacteria biomass in the Zinc medium on Zinc removal has been evaluated and analyzed using the response surface method and Box-Behnken model. A numerical optimization model was performed to obtain the maximum amount of Zinc removal from aqueous solution. Among the isolated strains, the MS3 (*Delftia lacustris*) was the most tolerance strain to the Zinc (1200 mg/l). The maximum percentage of Zinc removal based on the quadratic model was obtained at $X_{pH} = 0.8990$ (means $pH = 5.84$), $X_{ZB} = -0.8627$ (means Zinc to Bacteria Biomass concentration ratio of, 1:327.83 and $X_t = -0.9394$ (means $t = 9.34 \text{ min}$). The maximum amount of Zinc removal percentages based on the experimental design and the simulated model were 9.86% and 9.49% respectively, indicating the high accuracy of the model. Therefore, the MS3 strains can be used as a bio-absorbent for Zinc removal.

Keywords: Biosorption, Bactria, Optimization, Box-Behnken model, Response surface method, Zinc removal

*Corresponding author's Email: mohsen.shahriari@uoz.ac.ir

بررسی شرایط بهینه حذف Zn^{+2} با استفاده از زیست توده باکتری‌های جداسازی شده از معدن راونج

مهدی صفری^۱، محسن شهریاری مقدم^{۲*}، محسن صمیمی^۳، زهرا عزیززی^۴

۱. استادیار، گروه زمین‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳. استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده انرژی، دانشگاه صنعتی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۴. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوسیستماتیک جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران،

ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۴ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۳/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۲۲)

چکیده

آلودگی محیط به فلزات سنگین از مهم‌ترین معضلات زیست‌محیطی بوده و منجر به آسیب‌های جدی بر سلامت انسان می‌شود. به منظور کاهش اثرات زیان‌بار این فلزات باید روش‌های تصفیه آن‌ها توسعه یابد که در این بین استفاده از جاذب‌های زیستی اهمیت ویژه‌ای دارد. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌های مقاوم به Zn^{+2} از معدن سرب و روی راونج و شناسایی کارآمدترین سویه برای جذب روی بود. بدین منظور از رسوبات معدن، نمونه‌برداری انجام شد و باکتری‌های مقاوم به Zn^{+2} غنی‌سازی و خالص‌سازی شدند. پس از تعیین مقاومت جدایه‌های خالص‌شده به Zn^{+2} کارآمدترین جدایه شناسایی شد. پس از آن زیست‌توده خشک سویه خالص‌شده تهیه و تأثیر متغیرهای اصلی عملیاتی شامل pH محیط، نسبت غلظت فلز روی به زیست‌توده باکتری (ZB) و زمان ماند زیست‌توده باکتری در محیط حاوی روی (t) بر میزان حذف Zn^{+2} با استفاده از روش سطح پاسخ و مدل Box-Behnken ارزیابی و بهینه‌سازی عددی مدل برای رسیدن به بیشترین مقدار حذف Zn^{+2} از محیط آبی انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده از بین جدایه‌های خالص‌شده، سویه *Delftia lacustris* MS3 بیش‌ترین توانایی را در تحمل Zn^{+2} نشان داد (۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر). ماکزیمم درصد حذف Zn^{+2} بر پایه مدل درجه دوم، در $X_{pH} = 0.8990$ (یعنی $pH = 5.84$)، $X_{ZB} = -0.8627$ (یعنی نسبت غلظت Zn^{+2} به زیست‌توده باکتری $ZB = 1:327.83$) و $X_t = -0.9394$ (یعنی $t = 9.34 \text{ min}$) بدست آمد. حداکثر میزان جذب Zn^{+2} در آزمایش‌های انجام شده بر پایه طراحی آزمایشات ۹/۸۶۰٪ بود و در شرایط تحت مدل ۹/۴۹۰٪ پیش‌بینی شد که دقت بالای مدل طراحی‌شده را نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان از سویه MS3 در جذب روی، به عنوان یک جاذب زیستی مؤثر در تصفیه زیستی فلزات سنگین استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: حذف روی، باکتری، جذب زیستی، بهینه‌سازی، مدل جعبه بنکن، روش سطح پاسخ

مقدمه

آلودگی محیط زیست به فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین معضلات کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. آلودگی محیط به فلزات سنگین می‌تواند بر اثر عوامل طبیعی از قبیل فوران‌های آتشفشانی، آتش‌سوزی جنگل‌ها و یا توسط باران‌های اسیدی روی دهند. با این وجود فعالیت‌های انسانی مختلف از قبیل شهرنشینی، کشاورزی، کارخانجات مختلف و صنایع معدنی از مهم‌ترین عوامل ورود فلزات سنگین به محیط زیست هستند (Li et al., 2014). از میان عوامل ذکرشده، معدنکاری اهمیت ویژه‌ای داشته و مطالعات متعددی نشان داده است که محیط‌زیست پیرامون معادن (خاک، آب و گیاهان) آلوده به

غلظت‌های بالای فلزات سمی مختلف است که می‌تواند مشکلات جدی را برای سلامت انسان و جانوران ایجاد کند (Martínez- Martínez et al., 2013; Khan et al., 2008, Liu et al., 2005). فلزات سنگین مختلف از قبیل روی (Zn)، سرب (Pb)، کادمیوم (Cd)، جیوه (Hg) و کروم (Cr) به فلزات و فلزناهایی گفته می‌شود که چگالی بیشتر از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب داشته باشند. فلزات سنگین قابل تجزیه نیستند در نتیجه اگر فعالیتی برای حذف آن‌ها صورت نگیرد برای مدت‌های مدید در محیط باقی‌مانده و اکوسیستم‌های مختلف، محصولات کشاورزی، کیفیت آب و خاک و همچنین سلامت انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Ma et al., 2016).

راهبردهای فیزیکی-شیمیایی مختلفی جهت حذف فلزات سنگین از محیط مانند فیلتراسیون، جذب سطحی، ترسیب شیمیایی، تصفیه الکتروشیمیایی، اکسیداسیون-احیا، تبادل یون،

* نویسنده مسئول: mohsen.shahriari@uoz.ac.ir

آن‌ها می‌توان به بهینه‌سازی جذب زیستی سرب و کادمیوم توسط زیست‌توده باکتری *Pseudomonas azotoformans* (Choińska-Pulit et al., 2018)، بهینه‌سازی جذب زیستی کرم با استفاده از زیست‌توده *Nostoc linckia* (Mona et al., 2011) و بهینه‌سازی جذب زیستی کادمیوم توسط زیست‌توده *Aspergillus niger* اشاره کرد (Amini et al., 2009). استان مرکزی به عنوان بخشی از نوار ماگمایی ارومیه - بزمان و زون سنندج - سیرجان توان معدنی (فلزی- غیرفلزی) در خور توجهی دارد. از همین رو معدنکاری در این استان سابقه دیرینه دارد. با توجه به وجود معادن مختلف در استان مرکزی نیاز به معرفی و تکامل روش‌های نوین و سازگار با محیط‌زیست برای پالایش پساب‌های تولیدشده ضروری به نظر می‌رسد. از مهم‌ترین معادن استان فارس معادن سرب- روی است که از آنها می‌توان به معدن سرب و روی "راونج" اشاره کرد. بر اساس مطالعات انجام شده سالیانه در حدود $10^6 \times 426$ تا $10^6 \times 1380$ کیلوگرم فلز روی وارد محیط زیست می‌شود، با توجه به اثرات زیانبار این فلز بر محیط زیست و جانداران (Zhang et al., 2012) با تعیین شرایط بهینه حذف روی توسط زیست‌توده میکروارگانیسم‌ها می‌توان از داده‌های بدست آمده به عنوان مدلی آزمایشی جهت امکان طراحی و مدل‌سازی جذب دیگر فلزات سنگین استفاده نمود.

مطالعه حاضر با هدف جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های مقاوم به Zn^{+2} از معدن سرب و روی راونج استان مرکزی، بررسی توانایی سویه‌های جداسازی شده در تحمل غلظت‌های مختلف روی و همچنین بهینه‌سازی جذب روی توسط کارآمدترین سویه خالص شده با استفاده از طراحی آزمایشات بر پایه مدل *Box - behnken* و تحلیل آن به روش پاسخ سطح انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی مقاوم به روی

با استفاده از روش نمونه‌برداری تصادفی از ۶ نقطه مختلف معدن سرب و روی "راونج" استان مرکزی (E $36^{\circ}49'8''$ و $49^{\circ} N$ $33^{\circ}51'10''$) نمونه‌برداری از لایه سطحی ۰-۱۵ سانتی‌متری خاک انجام شد. این منطقه گسل خوردگی شدید داشته و سنگ‌های آذرین بصورت رگه‌ای و توده‌ای، سنگ‌های ژوراسیک و کرتاسه و گاهی ترسی‌یر را بریده‌اند. توده ماده معدنی در درون سنگ‌های آهکی کرتاسه زین و از نوع گالن، بلاند، پیریت، کالکوپیریت، مس و نیز کانیهای ثانوی بصورت سروسیت و

فناوری غشائی، اسمز معکوس، استخراج با حلال و ... تاکنون توسعه یافته است. با این حال اکثر این روش‌ها دارای معایبی مانند نیاز به تجهیزات فنی پیشرفته، مصرف زیاد انرژی، کارایی پایین، عدم انتخابی عمل کردن فرآیند تصفیه، عدم جداسازی کامل فلزات و ... هستند (Guo et al., 2010).

در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های زیستی برای پالایش مناطق آلوده مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند. زیست پالایی توسط میکروارگانیسم‌ها به طور عمده توسط دو روش تجمع زیستی (Bioaccumulation) و جذب زیستی (Biosorption) بر اساس نوع میکروارگانیسم و همچنین نوع فلز سنگین صورت می‌گیرد. تجمع زیستی فرایندی فعال است که در آن فلزات سنگین به داخل سلول منتقل می‌شوند. در این روش فلزات در داخل سلول انباشته شده و برای انجام این پدیده سلول انرژی مصرف می‌کند (Ledin, 2000). جذب زیستی از مهم‌ترین روش‌های جایگزین محسوب می‌شود. در این روش آلاینده‌ها بدون صرف انرژی به زیست‌توده جذب می‌شوند. امکان استفاده از توده زنده، غیرزنده و همچنین زیست‌توده پیش تیمار شده با مواد شیمیایی، مزیت استفاده از این روش نسبت به تجمع زیستی است (Kiran et al., 2005). باکتری‌های مختلفی با قابلیت تحمل و تجمع فلزات سنگین از مناطق مختلف دنیا شناسایی شده است که از آنها می‌توان به *Pseudomonas aeruginosa* (Limcharoensuk Cupriavidus taiwanensis, aeruginosa) (Chatterjee Geobacillus thermodentrificans et al., 2015) (García et al., 2016) *Bacillus sp.* et al., 2010) و *Agrobacterium tumefaciens* (Wei et al., 2009) *Halomonas sp.* (Rajesh and Rajesh, 2015) اشاره کرد.

فاکتورهای مختلفی از قبیل سویه استفاده‌شده، غلظت و نوع فلز سنگین، pH محیط، دما و زمان بر راندمان جذب فلز سنگین از محیط تأثیرگذار هستند (Das et al., 2008, Wang and Chen, 2006). برای به حداکثر رساندن جذب زیستی باید شرایط فرایند برای نوع جاذب استفاده‌شده بهینه گردد. روش‌های مختلفی برای بهینه‌سازی وجود دارد که با توجه به اهداف ذکر شده، استفاده از روش‌های مبتنی بر طراحی آزمایش مانند روش پاسخ سطح با توجه به قابلیت تحلیل آزمایش‌های طراحی شده توسط مدل‌هایی با تعداد کم آزمایش‌ها و همچنین قابلیت استخراج یک معادله برای هدف خروجی به ازای فاکتورهای ورودی، نسبت به روش‌های دیگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Ryan and Morgan, 2011). مطالعات محدودی در زمینه استفاده از روش‌های مبتنی بر طراحی آزمایش جهت بهینه‌سازی جذب زیستی فلزات سنگین انجام شده است که از

Termination Method روش سنجر و توسط شرکت سینا ژن تعیین توالی شد. پس از تعیین توالی‌های مورد نظر، با استفاده از BLAST در پایگاه اطلاعاتی^۱ NCBI جستجوهای همولوژی به عمل آمد.

تعیین MIC^۲

به منظور تعیین کمترین غلظتی از فلز روی که موجب جلوگیری از رشد جدایه‌های خالص‌شده خواهد شد از روش ارائه‌شده توسط (Weigand *et al.*, 2008) استفاده شد. بدین منظور جدایه‌های خالص‌شده ابتدا به محیط کشت نوترینت برات منتقل و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور شیکر rpm ۱۲۰ به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. سپس ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری بدست آمده با استفاده از سرم نمکی به اندازه‌ای رقیق گردید که کدورت آن پس از بررسی جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به میزان ۰/۱ رسیده باشد. در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به محیط کشت نوترینت آگار (pH ۶/۸) حاوی غلظت‌های مختلف کلرید روی (۲۴۰ تا ۱۴۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل و بر روی محیط گسترده شد و رشد جدایه‌ها طی سه روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد.

تأثیر Zn²⁺ بر میزان رشد جدایه خالص شده

بررسی میزان رشد سویه مقاوم به روی در محیط کشت نوترینت برات و بر اساس روش ارائه‌شده توسط (2015) *et al.*، Limcharoensuk انجام شد. بدین منظور سویه MS3 ابتدا در محیط کشت نوترینت برات در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. سپس به محیط نوترینت برات جدید غنی‌سازی شده با ۶۵ و ۱۹۶ میلی‌گرم بر لیتر Zn²⁺ با OD_{600nm} اولیه ۰/۰۸ منتقل و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رشد باکتری هر ۴ ساعت یک بار با اندازه‌گیری OD_{600m} سنجیده شد.

تهیه زیست‌توده خشک سویه MS3

ابتدا سویه خالص‌شده در محیط کشت نوترینت برات در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور شیکر rpm ۱۲۰ به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد و سپس زیست‌توده تولیدی به مدت ۱۰ دقیقه با rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس توسط آب مقطر استریل شستشو و مجدداً سانتریفیوژ شد. سپس زیست‌توده

انگلیزیت است. از نظر دانه‌بندی رسوبات این منطقه تشکیل شده از ۶۰٪ ماسه درشت، ۲۵٪ گراول، ۱۰ درصد کنگلومراها و ۵ درصد رس و کوچکتر از رس است. پس از نمونه‌برداری، نمونه‌ها با هم مخلوط و یک نمونه مرکب تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای یخچال نگهداری شد. میزان pH رسوبات برابر ۷/۵ اندازه‌گیری شد. در این منطقه با توجه به وجود ماده معدنی رسوبات حاصل هوازدگی سنگ‌های منشع این ماده معدنی بوده و دارای بافت دانه‌ریز هستند. برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به Zn²⁺ حدود یک گرم از رسوبات نمونه‌برداری شده به ارلن شیاردار ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت برات (۵ گرم عصاره مخمر، ۳ گرم عصاره پپتون، ۵ گرم NaCl) غنی‌شده با ۲۶۰ میلی‌گرم بر لیتر Zn²⁺ منتقل و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور شیکر rpm ۱۲۰ به مدت یک هفته انکوبه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته و به محیط کشت جدید (مشابه شرایط ذکر شده) اضافه و به مدت یک هفته انکوبه شد. این فرایند ۴ بار تکرار گردید. در پایان جدایه‌های باکتریایی با چندین بار کشت مجدد بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار (۵ گرم عصاره مخمر، ۳ گرم پپتون، ۵ گرم NaCl، ۱۲ گرم آگار) خالص شدند. سپس میزان تحمل به فلز روی جدایه‌های مختلف (MIC) سنجش گردید و جدایه‌ای که بیشترین توانایی را در تحمل روی داشت به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. جدایه انتخاب‌شده توسط بررسی توالی rDNA ۱۶S شناسایی شد. بدین منظور جدایه خالص‌شده در محیط کشت نوترینت آگار تکثیر و سپس استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت high pure PCR product محصول شرکت Roche آلمان صورت گرفت و درجه خلوص DNA استخراج‌شده در دو طول‌موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. جهت تکثیر ژن rDNA ۱۶S از پرایمرهای Universal با توالی 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (27F) و 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (1492R) استفاده گردید. مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ °C برای مدت ۵ دقیقه انجام شد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه، طولیل شدن در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۵ دقیقه توسط دستگاه Primus 25 advanced® thermocycler انجام شد (Shahriari Moghadam *et al.*, 2016). بعد از انجام الکتروفورز روی ژل، محصولات PCR از روی ژل بازرایی شده و قطعات تکثیرشده و خالص‌شده با استفاده از یک DNA Sequencer بر اساس Chain

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

2. Minimal Inhibitory Concentration

روی (t) بر میزان حذف فلز روی بررسی شد. سطوح و مقادیر متغیرها (پایین (-۱)، وسط (۰) و بالا (+۱)) در جدول (۱) آورده شده است.

مقادیر متغیرها برای مقدار pH محیط کشت ۱/۵، ۴ و ۶/۵، نسبت غلظت فلز روی به زیست توده باکتری (ZB) ۳۸۰:۱، ۳۸:۱، ۱:۲۰ و زمان ماند زیست توده باکتری در محیط حاوی روی ۱۰، ۹۵ و ۱۸۰ دقیقه بود. با استفاده از این روش ۱۳ آزمایش با دو تکرار آزمون در نقطه مرکزی برای تعیین خطا انجام گرفت. طراحی آزمایشها برای متغیرهای عملیاتی و نتایج آنها در جدول (۲) نشان داده شده است.

بدست آمده در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت سه روز در آون خشک و توسط هاون کوبیده شدند و پس از الک کردن (الک شماره ۶۰، ۰/۲۵ میلی متر) از آن برای انجام آزمایشات جذب زیستی استفاده شد (Limcharoensuk et al., 2015).

طراحی آزمایشات و بهینه سازی جذب زیستی

در مطالعه حاضر، مدل طراحی آزمایشی *Box-Behnken* جهت مشخص کردن تعداد و شرایط آزمایشهای مورد نیاز و روش سطح پاسخ (RSM) جهت تحلیل شرایط بهینه عملیاتی حذف روی استفاده شد. تأثیر متغیرهای اصلی عملیاتی از قبیل مقدار pH محیط کشت (pH)، نسبت غلظت فلز روی به زیست توده باکتری (ZB) و زمان ماند زیست توده باکتری در محیط حاوی

جدول ۱- سطوح و دامنه متغیرها

فاکتورها	علائم	محدوده سطوح		
		-۱	۰	۱
محیط کشت pH	pH	۱/۵	۴	۶/۵
نسبت غلظت فلز روی به زیست توده باکتری	ZB	۱:۳۸۰	۱:۳۸	۱:۲۰
زمان ماند (دقیقه)	t	۱۰	۹۵	۱۸۰

جدول ۲- طراحی آزمایشها برای پنج متغیر مستقل و پاسخها

شماره آزمایش	متغیرهای تغییر داده شده			پاسخ
	X_{pH}	X_{ZB}	X_t	Zn. R%
۱	۰	۱	۱	۷/۳۳۴
۲	-۱	-۱	۰	۵/۲۷۵
۳	۰	۰	۰	۵/۶۲۵
۴	-۱	۱	۰	۴/۵۶۱
۵	۰	-۱	-۱	۸/۹۷۰
۶	-۱	۰	۱	۷/۰۰۹
۷	۱	۱	۰	۸/۲۹۰
۸	۰	۱	-۱	۶/۹۴۰
۹	۱	۰	-۱	۸/۲۴۳
۱۰	-۱	۰	-۱	۴/۳۵۷
۱۱	۰	-۱	۱	۸/۶۱۰
۱۲	۰	۰	۰	۶/۴۸۳
۱۳	۱	-۱	۰	۹/۸۶۰
۱۴	۰	۰	۰	۸/۹۱۷
۱۵	۱	۰	۱	۷/۴۶۷

با متغیرهای مرتبط منطبق گردید. صورت ریاضی مدل درجه دوم در معادله ۱ نشان داده شده است:

(رابطه ۱)

$$P = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_{ij}$$

که در آن p درصد حذف روی از محیط، X_i و X_{ij}

تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) یک روش قابل اعتماد برای تعیین درجه اطمینان داده‌های تجربی است (Montgomery 2017). جهت تجزیه و تحلیل آماری بهتری از مدل، ارزیابی واریانس (ANOVA) انجام شد. متغیر پاسخ با یک مدل مربع کامل به منظور یافتن رابطه حذف روی

کلنی‌های گرد با رنگ کرمی بود. این سویه برای انجام مطالعات بعدی انتخاب و بر اساس روش‌های ملکولی شناسایی شد و بیشترین شباهت را (۹۹٪) به گونه *Delftia lacustris* (شماره دستیابی: MH085940) نشان داد. این گونه با قابلیت تجزیه پپتیدوگلیکان برای اولین بار در دریاچه‌ای در دانمارک شناسایی و توصیف شده است (Jorgensen et al., 2009). همچنین *et Wu al.*, (2016) این گونه را از پساب‌های پتروشیمی جداسازی کردند، نتایج این محققین نشان داد این سویه قادر به تحمل فلزات سنگین کرم، جیوه، کادمیوم و سرب بوده است. از دیگر گونه‌های متعلق به جنس *Delftia*، می‌توان به *Delftia tsuruhatensis* با توانایی تحمل بالای سرب و روی، جداسازی شده از معدنی در مکزیک اشاره کرد (Bautista Hernandez et al., 2012). مطالعه حاضر بر روی *D. lacustris* نشان داد این سویه قادر به تحمل ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر Zn^{+2} بوده است، میزان تحمل سویه خالص‌شده در مطالعه حاضر نزدیک به توان سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa B237*، *Cupriavidus taiwanensis E324* (Limcharoensuk et al., 2015) و کمتر از *D. tsuruhatensis* (Bautista Hernandez et al., 2012) بود. مکانیسم‌های مختلفی از قبیل پمپ‌های خارج‌کننده فلزات سنگین، بسته‌بندی و قرنطینه کردن داخل و خارج سلولی فلزات سنگین و همچنین فعالیت‌های آنزیمی برای سم‌زدایی فلزات سنگین تاکنون در باکتری‌ها گزارش شده است (Bruins et al., 2000) در برخی از سویه‌های متعلق به جنس *Pseudomonas* و *Cupriavidus* همچنین *metal - chelating proteins* مانند متالوتیونین‌ها و گلوکوتایون‌ها در بسته‌بندی و قرنطینه کردن فلزات سنگین و کاهش سمیت آن‌ها دخیل هستند (Lima et al., 2006; and Siripornadulsil and Siripornadulsil, 2013).

جدول ۳- تعیین MIC سویه‌های جداسازی شده

mg/lit	۷۲ ساعت		
	MS1	MS2	MS3
۲۴۰	+	+	+
۲۸۸	+	-	+
۳۳۶	+	-	+
۳۸۴	-	-	+
۴۳۲	-	-	+
۴۸۰	-	-	+
۷۲۰	-	-	+
۹۶۰	-	-	+
۱۲۰۰	-	-	+
۱۴۴۰	-	-	-

(+) رشد باکتری؛ (-) عدم رشد باکتری

متغیرهای مستقل کد نشده، β_0 عبارت انحراف و β_{ij} ، β_{ii} ، β_i ضرایب رگرسیون می‌باشند. مدل تجربی ریاضی با استفاده از آزمون ANOVA با سطح معنی‌دار ۰.۵٪ بررسی شد. اهمیت آماری مدل‌های مرتبه دوم بوسیله آزمون آماری فیشر^۱ (F -value) تعیین گردید. هر گاه مقدار F محاسبه‌شده بیشتر از F -value جدول باشد، مقدار p (p -value) بسیار کوچکتر خواهد بود و این حقیقت اهمیت مدل آماری را نشان خواهد داد. مقدار F محاسبه‌شده به عنوان رگرسیون میانگین مربعات (از جمله خطی، مربع و برهم‌کنش) و میانگین باقی‌مانده مربعات مطابق با معادله ۲ تعریف شده است:

$$F - \text{value} = \frac{MS_{\text{regression}}}{MS_{\text{residual}}} \quad (\text{رابطه ۲})$$

که در آن:

$$MS_{\text{regression}} = \frac{SS_{\text{regression}}}{DF_{\text{regression}}} \quad (\text{رابطه ۳})$$

$$MS_{\text{residual}} = \frac{SS_{\text{residual}}}{DF_{\text{residual}}} \quad (\text{رابطه ۴})$$

در روابط مجموع درجه آزادی (DF) برابر با تعداد کل آزمایش‌ها منهای یک است.

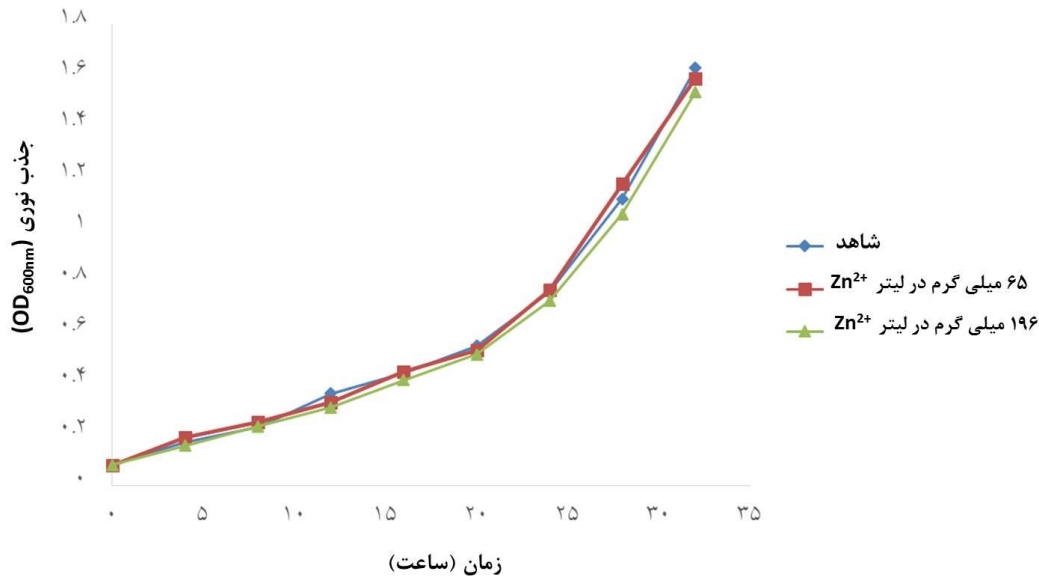
همچنین درجه آزادی رگرسیون برابر با تعداد جملات منهای یک و درجه آزادی باقیمانده برابر با مجموع درجه آزادی منهای درجه آزادی رگرسیون هست (Montgomery 2017).

نتایج و بحث

تعیین سویه باکتریایی کارآمد مقاوم به روی

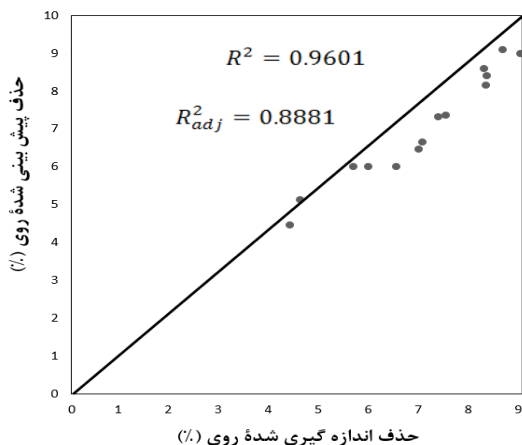
پس از غنی‌سازی باکتری‌هایی با قابلیت تحمل با Zn^{+2} ، سه سویه باکتریایی جداسازی و خالص شدند. نتایج بررسی توان جدایه‌های خالص‌شده در تحمل غلظت‌های مختلف Zn^{+2} در جدول (۳) آورده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده سویه‌های MS1، MS2 و MS3 به ترتیب قادر به تحمل ۳۳۶، ۲۴۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر Zn^{+2} بودند. تا کنون مطالعات مختلفی در زمینه جداسازی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین از مناطق مختلف انجام شده است. تعداد باکتری‌های جداسازی شده در مطالعات مختلف متفاوت است، در برخی از مطالعات تعداد باکتری‌ها کم (بین ۱ تا ۹ باکتری) (Sayyadi et al., 2017; Limcharoensuk et al., 2015; Jiang et al., 2017; Olukoya et al., 1997) و در تعدادی از مطالعات نیز تعداد بیشتری باکتری جداسازی شده است (Nithya et al., 2011). بر اساس نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر سویه MS3 از میان جدایه‌های خالص‌شده بیشترین توانایی را در تحمل Zn^{+2} در محیط داشت نشان داد. این سویه باسیلی شکل، گرم منفی با

کمی بر میزان رشد این باکتری در محیط کشت داشته است در حالی که با افزایش غلظت (بیشتر از ۱۳۰ میلی گرم در لیتر) سرعت رشد باکتری کاهش می یابد. عدم مشاهده تغییرات معنی دار در میزان رشد باکتری در محیط حاوی روی (۱۹۶ میلی گرم بر لیتر) نشان دهنده توانایی و سازگاری این باکتری در رشد در محیط های حاوی غلظت های بالای Zn^{+2} است.



شکل ۱- منحنی رشد سویه MS3 در محیط کشت شاهد و محیط کشت دارای Zn^{+2}

۰/۰۵ نشانگر آن است که پارامترهای مدل معنی دار است. بر این اساس X_{pH}, X_t و X_{pH}, X_{ZB}, X_{ZB}^2 دارای شرایط رگرسیون معنی داری هستند. همچنین در جمله X_{pH}, X_{ZB} با توجه به اینکه مقدار p بین ۰/۰۵ و ۰/۱ قرار گرفته است احتمال با اهمیت و معنادار بودن پارامتر وجود دارد. پارامترهای با مقادیر p بیشتر از ۰/۰۵ همانند X_{ZB}, X_t و X_{pH}^2, X_t, X_t^2 در دسته مقادیر با اهمیت بسیار پایین (کم اهمیت) قرار دارند.



شکل ۲- مقایسه میزان حذف Zn^{+2} اندازه گیری شده و پیش بینی شده

نتایج رشد سویه MS3 در محیط کشت دارای Zn^{+2} نشان داد (شکل ۱) وجود روی در محیط کشت تأثیر معنی داری بر میزان رشد سویه MS3 نداشته است ($p > 0.05$). نتایج مطالعه انجام شده توسط Wei et al., (2009) بر روی باکتری جداسازی شده از معدن طلا در چین (CCNWR333-2) نیز نشان داده است غلظت های پایین فلز روی (۶۵ میلی گرم بر لیتر) تأثیر

تأثیر پارامترهای عملیاتی بر حذف Zn^{+2} ؛ آنالیز واریانس پاسخ برای بررسی درصد حذف بیولوژیکی فلز روی (Zn, R) به کمک زیست توده باکتری، یک مدل درجه دوم با استفاده از روش خطای حداقل مربعات بدست آمد که رابطه آن در معادله ۵ نشان داده شده است.

$$Zn, R\% = 6.008 + 1.206 X_{pH} - 1.074 X_{ZB} + 0.240 X_t + 0.271 X_{pH}^2 + 1.467 X_{ZB}^2 + 0.488 X_t^2 + 0.536 X_{pH} \cdot X_{ZB} - 0.855 X_{pH} X_t + 0.189 X_{ZB} X_t \quad (5)$$

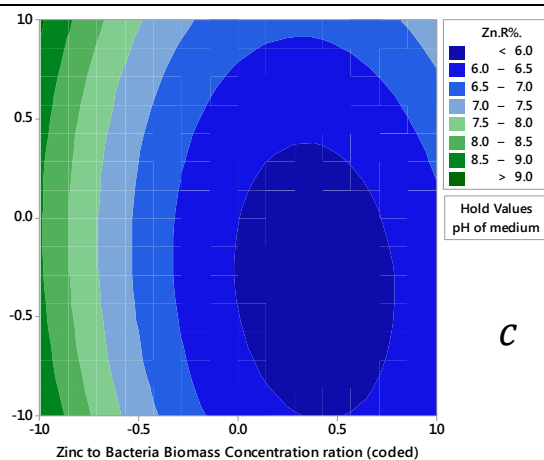
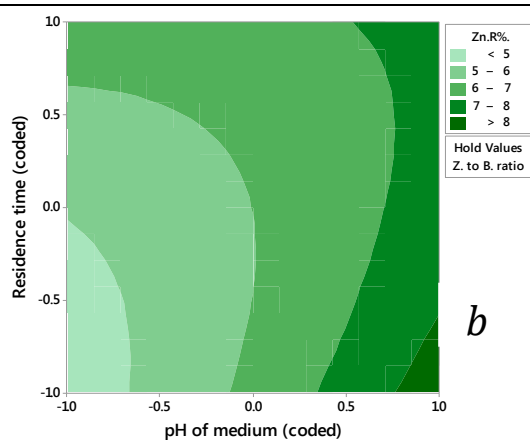
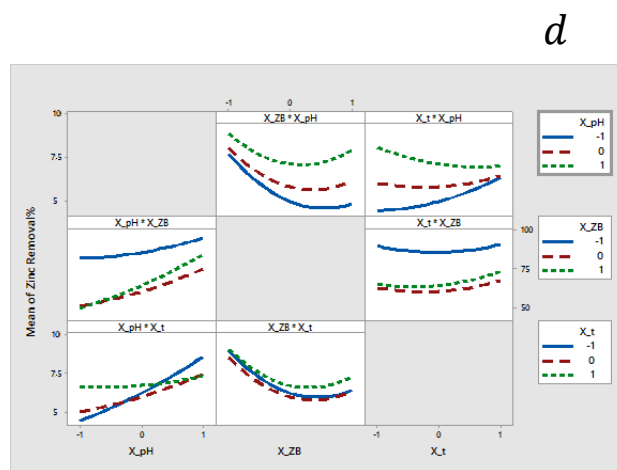
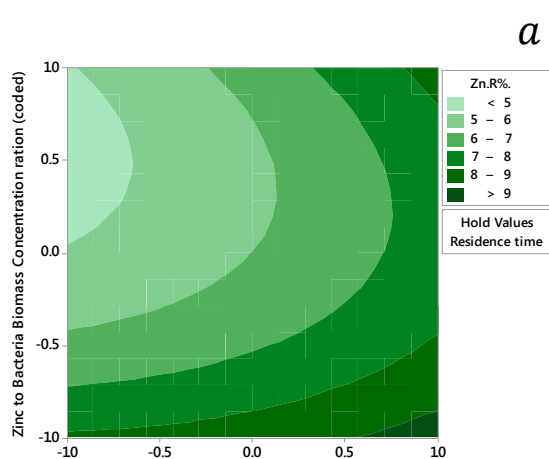
مقادیر اندازه گیری شده درصد حذف Zn^{+2} از محیط آبی و همچنین پیش بینی آن با مدل درجه دوم در شکل (۲) قابل مشاهده است. مقادیر R^2 و R^2_{adj} از مدل حذف Zn^{+2} به ترتیب ۰/۹۶۰۱ و ۰/۸۸۸۱ بدست آمد.

آنالیز واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم برای حذف روی، در جدول (۴) گزارش شده است. همان طور که مشخص است درجه آزادی کل ۱۴ و همچنین درجه آزادی رگرسیون و خطای باقیمانده به ترتیب ۹ و ۵ می باشد.

مقایسه بین شاخص F-value در جدول (۴) نشان می دهد که مقدار F محاسبه شده بزرگتر برای مدل دارای سطح اهمیت بالاتری است. همچنین شاخص p-value برای مقادیر p کمتر از

جدول ۴- آنالیز واریانس (ANOVA) برای مدل درجه دوم حذف Zn^{+2}

میزان معناداری	p - value	F - value	MS	SS	DF	موارد آنالیز
معناداری بالا	۰/۰۰۵	۱۳/۳۵	۳۷۸/۵۸	۳۴/۰۷۲۵	۹	Regression
معناداری بالا	۰/۰۰۱	۴۱/۰۴	۱۱/۶۳۷۹	۱۱/۶۳۷۹	۱	X_{pH}
معناداری بالا	۰/۰۰۲	۳۲/۵۳	۹/۲۲۳۵	۹/۲۲۳۵	۱	X_{ZB}
کم‌اهمیت	۰/۲۵۹	۱/۶۲	۰/۴۶۰۳	۰/۴۶۰۳	۱	X_t
کم‌اهمیت	۰/۳۷۳	۰/۹۵	۰/۲۷۰۶	۰/۰۶۴۱	۱	X_{pH}^2
معناداری بالا	۰/۰۰۳	۲۸/۰۴	۷/۹۵۱۱	۷/۵۹۴۷	۱	X_{ZB}^2
کم‌اهمیت	۰/۱۳۹	۳/۱۰	۰/۸۷۸۳	۰/۸۷۸۳	۱	X_t^2
احتمالاً معنادار	۰/۱۰۰	۴/۰۵	۱/۱۴۹۲	۱/۱۴۹۲	۱	$X_{pH} \cdot X_{ZB}$
معنادار	۰/۰۲۴	۱۰/۳۱	۲/۹۲۲۴	۲/۹۲۲۴	۱	$X_{pH} \cdot X_t$
کم‌اهمیت	۰/۵۱۱	۰/۵۰	۰/۱۴۲۱	۰/۱۴۲۱	۱	$X_{ZB} \cdot X_t$
			۰/۲۸۳۵	۱/۴۱۷۷	۵	Residual error
کم‌اهمیت	۰/۳۷۴	۱/۸۲	۰/۳۴۵۷	۱/۰۳۷۱	۳	Lack-of-fit
			۰/۱۹۰۳	۰/۳۸۰۶	۲	Pure error
				۳۵/۴۹۰۳	۱۴	Total



شکل ۳- (a) گراف کانتور درصد حذف Zn^{+2} بر پایه مقدار pH محیط کشت (کد شده)، (b) نسبت غلظت فلز روی به زیست توده باکتری (کد شده) و (c) زمان ماند زیست توده باکتری در محیط حاوی روی (کد شده) و (d) گراف تأثیر اصلی و برهم‌کنش متغیرها بر درصد حذف Zn^{+2}

(Yang and Volesky, 1999). نتایج مطالعه حاضر نشان داد با افزایش میزان pH میزان جذب روی بر زیست‌توده خشک باکتری MS3 افزایش یافته است. به طور کلی توان جذب زیست‌توده استفاده شده به غلظت فلز استفاده شده و محل‌های جذب فعال در ارتباط است. نتایج مشابهی هم در مطالعه انجام شده توسط Limcharoensuk *et al.*, (2015) بر روی سویه‌های *Cupriavidus Pseudomonas aeruginosa* B237 *taiwanensis* E324 بدست آمد. نتایج این محققین نشان داده است که با افزایش pH میزان جذب روی و کادمیوم بر توده خشک باکتری افزایش یافته است. در مطالعه انجام شده توسط Rajesh and Rajesh (2015) نیز pH در حد خنثی را به عنوان pH بهینه برای جذب کادمیوم و سرب توسط سویه *Halomonas BVR1* معرفی کرده‌اند. این محققین بیان کرده‌اند که با افزایش pH محیط pH $deprotonation$ گروه‌های آمینی امکان بیشتری داشته و یون‌های H^+ کاهش می‌یابند. این فرایند منجر به کاهش رقابت بین مکان‌های باند شده فعال جاذب می‌شوند. اگر چه در pH اسیدی جاذب زیستی به عنوان یک باز ضعیف عمل کرده و در نتیجه گروه‌های آمینی به آسانی با پروتون‌های آزاد موجود در محلول پروتون‌دار می‌شوند. در pH ‌های پایین پروتون‌ها با کاتیون فلزات رقابت کرده و ظرفیت جاذب کاهش می‌یابد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد گذشت زمان تأثیر معنی‌داری بر جذب روی توسط جاذب استفاده شده نداشته است و روی به سرعت جذب زیست‌توده سویه MS3 شده و در محیط به تعادل می‌رسد. مطالعه انجام شده بر روی *Curtobacterium sp.* FM01 نشان داده است جذب زیستی این باکتری را می‌توان به سه مرحله اصلی تقسیم کرد؛ این محققین بیان کردند در شروع آزمایش (۵ تا ۱۰ دقیقه اول شروع آزمایش) جذب زیستی نیکل و سرب به سرعت انجام می‌شود، در مرحله دوم (۲۰ تا ۴۰ دقیقه به ترتیب برای نیکل و سرب) جذب زیستی به سرعت کاهش می‌یابد و تقریباً ثابت باقی می‌ماند و بعد از این مرحله میزان جذب زیستی تفاوت چندانی پیدا نمی‌کند (Masoumi *et al.*, 2016). نتایج محققین دیگر نیز نشان داده است فرایند جذب زیستی فلز سرب توسط *Bacillus pumilus* در ۲۰ دقیقه اولیه شروع آزمایش به سرعت رخ می‌دهد و پس از آن از سرعت آن کاسته و در نهایت به تعادل می‌رسد (Sayyadi *et al.*, 2017).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد جذب زیستی با افزایش غلظت جاذب در محیط افزایش یافته است. این امر به این دلیل است که نسبت مول روی به نسبت جاذب استفاده شده در

مدل تجربی برای حذف Zn^{+2} در نمودارهای کنترل در شکل (۳) رسم شده است. در شکل (۳a) نمودار حذف Zn^{+2} بر پایه X_{pH} و X_{ZB} (زمان ماند کد شده در سطح متوسط یا به عبارتی $X_t = 0$) رسم شده است. در شکل (۳b) نمودار حذف Zn^{+2} بر پایه X_t و X_{pH} (در $X_{ZB} = 0$) و همچنین در شکل (۳c) نمودار حذف Zn^{+2} بر پایه X_t و X_{ZB} (در $X_{pH} = 0$) رسم شده است. همان‌گونه که در شکل (۳a) مشخص است در شرایط سطح متوسط زمان ماند، درصد حذف Zn^{+2} با افزایش مقدار pH محیط افزایش یافته است و این مقدار و روند افزایشی آن در نسبت‌های پایین فلز به زیست‌توده باکتری بیشتر است. نتایج شکل (۳b) در شرایط سطح متوسط کد شده برای نسبت غلظت فلز به زیست‌توده نشان می‌دهد که درصد حذف Zn^{+2} با افزایش pH افزایش یافته است و نرخ افزایشی آن در زمان‌های ماند بیشتر، بالاتر است. نتایج شکل (۳c) نیز در شرایط سطح متوسط کد شده برای فاکتور pH نشان می‌دهد که درصد حذف Zn^{+2} در سطح پایین نسبت فلز به زیست‌توده باکتری و در تمامی سطوح زمانی به بیشترین مقدار خود می‌رسد، در حالی که در سطح بالای X_{ZB} میزان حذف Zn^{+2} حتی با گذشت زمان و در بالاترین سطح زمان هم ناچیز خواهد بود. بنا بر نتایج شکل (۳d) در منحنی‌های برهم‌کنش ستون اول با محور افقی X_{pH} ، درصد حذف Zn^{+2} در تمامی سطوح X_{ZB} و X_t با افزایش مقدار pH روند صعودی خود را حفظ کرده است و تنها در سطح بالای زمان ماند، تغییرات pH به خودی خود تأثیر محسوسی بر روند افزایشی حذف فلز نخواهد داشت. در منحنی‌های برهم‌کنش ستون دوم با محور افقی X_{ZB} ، روند حذف Zn^{+2} در تمامی سطوح X_t و X_{pH} کاهش می‌یابد. در روند حذف فلز در ستون سوم با محور افقی X_t اگرچه در سطوح میانی و بالایی فاکتور X_{ZB} افزایش محسوسی مشاهده می‌شود اما این رفتار در سطوح پایین فاکتور نسبت فلز به زیست‌توده باکتری تکرار نشده است و تقریباً بی‌اثر است. در این ستون با افزایش سطوح فاکتور X_{pH} ، تغییرات پارامتر زمان تأثیرات متفاوتی را بر حذف فلز نشان می‌دهد. بر این اساس روند افزایش حذف فلز در سطوح پایینی X_{pH} افزایشی، در سطح میانی تقریباً بی‌اثر و در سطح بالایی کد شده، افزایشی خواهد بود.

میزان pH محیط یک عامل کلیدی در جذب زیستی است که میزان آن باید بهینه شود. میزان pH محیط بر حلالیت فلزات سنگین و همچنین در دسترس بودن *functional group* در سطح جاذب‌ها تأثیرگذار هستند. با کاهش میزان pH محل‌های فعال جذب یون‌های فلزی موجود در زیست‌توده ممکن است در نتیجه وجود یون‌های هیدروژن موجود کافی نباشند

حذف Zn^{+2} در $X_{pH} = 0.8990$ (یعنی $pH = 5.84$)، $X_{ZB} = -0.8627$ (یعنی نسبت غلظت Zn^{+2} به زیست‌توده باکتری $ZB = 327.83:1$) و $X_t = -0.9394$ (یعنی $t = 9.34 \text{ min}$) خواهد بود. تحت شرایط مدل آزمایش شماره ۱۳ میزان حذف Zn^{+2} از محیط آبی را $9/490\%$ پیش‌بینی خواهد کرد که با توجه به مقدار واقعی آزمایشی آن ($9/860\%$)، مدل از دقت بالا و قابل قبولی برخوردار است.

نتیجه‌گیری

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های مقاوم به Zn^{+2} از معدن سرب و روی راونج استان مرکزی انجام شد. بررسی توانایی سوبه‌های جداسازی شده در تحمل به غلظت‌های مختلف روی و همچنین روش سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی جذب روی توسط کارآمدترین سوبه خاص شده صورت گرفت. ماکزیمم درصد حذف Zn^{+2} بر پایه مدل درجه دوم، در $X_{pH} = 0.8990$ (یعنی $pH = 5.84$)، $X_{ZB} = -0.8627$ (یعنی نسبت غلظت Zn^{+2} به زیست‌توده باکتری $ZB = 1:327.83$) و $X_t = -0.9394$ (یعنی $t = 9.34 \text{ min}$) بدست آمد. مقادیر اندازه‌گیری شده درصد حذف Zn^{+2} از محیط آبی و همچنین پیش‌بینی آن با مدل درجه دوم در شکل (۲) قابل مشاهده است. مقدار R^2 از مدل حذف Zn^{+2} برابر $0/96$ بدست آمد. همچنین حداکثر میزان جذب Zn^{+2} در آزمایش‌های انجام شده بر پایه طراحی آزمایشات $9/86\%$ بود و در شرایط تحت مدل پیش‌بینی شد که دقت بالای مدل طراحی شده برای تعیین شرایط بهینه جذب Zn^{+2} را نشان می‌دهد. به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده آن است که استفاده از زیست‌توده باکتری سوبه MS3 در نسبت بهینه با غلظت فلز اضافه کردن زیست‌توده به محیط حاوی فلز، می‌تواند به عنوان روشی مؤثر با بازدهی بالا در فرایند حذف Zn^{+2} مورد استفاده قرار گیرد.

REFERENCES

- Aksu, Z., & Çağatay, Ş. Ş. (2006). Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems. *Separation and Purification Technology*, 48(1), 24-35.
- Al-Garni, S. M. (2005). Biosorption of lead by Gramve capsulated and non-capsulated bacteria. *Water Sa*, 31(3), 345-350.
- Amini, M., Younesi, H., & Bahramifar, N. (2009). Statistical modeling and optimization of the

غلظت‌های پایین روی کم است. اگر چه در غلظت‌های بالا مکان‌های فعال موجود برای جذب نسبت به یون‌های موجود تعدادشان کم می‌شود. در نتیجه حذف فلز از محیط وابستگی نزدیک به غلظت آن در محیط دارد (Malkoc and Nuhoglu, 2005). در مطالعه حاضر با افزایش غلظت جاذب به فلز و نیروی محرکه انتقال جرم یون‌های فلزی بین حلال آبی و جاذب افزایش یافت. نتایج مشابهی هم توسط دیگر محققین بدست آمده است، به عنوان مثال Özdemir et al. (2009). جذب زیستی روی با افزایش غلظت اولیه فلز در محیط بر روی زیست‌توده *Geobacillus toebii* افزایش می‌یابد. این افزایش می‌تواند به دلیل افزایش برهمکنش‌های الکترواستاتیکی در سایت‌هایی باشد که وابستگی کمتری به یون‌های فلزی دارد. همچنین نتایج مشابهی نیز توسط دیگر محققین بدست آمده است (Mashitah et al., 2008, Salinas et al., 2000).

نتایج مطالعات انجام شده توسط Masoudzadeh et al., (2011) در زمینه جذب کادمیم بر زیست‌توده سوبه ZF12 نشان داده است با افزایش غلظت جاذب در محیط، درصد حذف نیز افزایش می‌یابد. همچنین نسبت زیست‌توده که به دلیل افزایش سطح و تعداد عوامل فعال موجود در زیست‌توده است. اما با این وجود مقدار جذب شده به ازای واحد وزن جاذب کاهش می‌یابد که دلیل آن این است که فلز موجود در محیط کفایت لازم برای پرکردن تمامی سایت‌های فعال موجود در جاذب را ندارد. همچنین برخی از محققین بیان کرده‌اند در غلظت‌های بالای جاذب، انباشتگی زیست‌توده و همچنین تداخل ایجاد شده بین باندهای سایت‌ها منجر به کاهش جذب توسط جاذب خواهد شد (Aksu and Çağatay, 2006, Al-Garni, 2005).

بهینه‌سازی

بهینه‌سازی عددی مدل برای رسیدن به بیشترین مقدار حذف Zn^{+2} انجام شد و بر اساس نقطه اکسترمم رابطه ۵ مقدار مینیمم درصد حذف Zn^{+2} در $X_{pH} = 0.3131$ ، $X_{ZB} = -0.4343$ و $X_t = -1$ به عبارتی کمترین درصد حذف Zn^{+2} برابر با $3/915$ خواهد بود. مقدار ماکزیمم درصد

cadmium biosorption process in an aqueous solution using *Aspergillus niger*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 337(1-3), 67-73.

- Bautista-Hernández, D. A., Ramírez-Burgos, L. I., Duran-Páramo, E., & Fernández-Linares, L. (2012). Zinc and lead biosorption by *Delftia tsuruhatensis*: a bacterial strain resistant to metals isolated from mine tailings. *Journal of Water Resource and Protection*, 4(04), 207.

- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), 198-207.
- Chatterjee, S. K., Bhattacharjee, I., & Chandra, G. (2010). Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 117-125.
- Choińska-Pulit, A., Sobolczyk-Bednarek, J., & Łaba, W. (2018). Optimization of copper, lead and cadmium biosorption onto newly isolated bacterium using a Box-Behnken design. *Ecotoxicology and environmental safety*, 149, 275-283.
- Das, N., Vimala, R., & Karthika, P. (2008). Biosorption of heavy metals—an overview. *Indian journal of biotechnology*. 7- 159-169.
- García, R., Campos, J., Cruz, J. A., Calderón, M. E., Raynal, M. E., & Buitrón, G. (2016). Biosorption of Cd, Cr, Mn, and Pb from aqueous solutions by *Bacillus* sp strains isolated from industrial waste activate sludge. *TIP*, 19(1), 5-14.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W. & He, Y. (2010). Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource technology*, 101(22), 8599-8605.
- Jiang, J., Pan, C., Xiao, A., Yang, X. and Zhang, G. (2017). Isolation, identification, and environmental adaptability of heavy-metal-resistant bacteria from ramie rhizosphere soil around mine refinery. *3 Biotech*, 7(1), 1-5.
- Jorgensen, N. O., Brandt, K. K., Nybroe, O., & Hansen, M. (2009). *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(9), 2195-2199.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z., & Zhu, Y. G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental pollution*, 152(3), 686-692.
- Kiran, I., Akar, T., & Tunali, S. (2005). Biosorption of Pb (II) and Cu (II) from aqueous solutions by pretreated biomass of *Neurospora crassa*. *Process Biochemistry*, 40(11), 3550-3558.
- Ledin, M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms—processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*, 51(1-4), 1-31.
- Li, Z., Ma, Z., van der Kuijp, T. J., Yuan, Z., & Huang, L. (2014). A review of soil heavy metal pollution from mines in China: pollution and health risk assessment. *Science of the total environment*, 468, 843-853.
- Lima, A. I. G., Corticeiro, S. C., & Figueira, E. M. D. A. P. (2006). Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. *Enzyme and microbial technology*, 39(4), 763-769.
- Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., & Auesukaree, C. (2015). Bioaccumulation and biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 322-330.
- Liu, H., Probst, A., & Liao, B. (2005). Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou lead/zinc mine spill (Hunan, China). *Science of the Total Environment*, 339(1-3), 153-166.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of environmental management*, 174, 14-25.
- Malkoc, E., & Nuhoglu, Y. (2005). Investigations of nickel (II) removal from aqueous solutions using tea factory waste. *Journal of Hazardous Materials*, 127(1-3), 120-128.
- Martínez-Martínez, S., Acosta, J. A., Cano, A. F., Carmona, D. M., Zornoza, R., & Cerda, C. (2013). Assessment of the lead and zinc contents in natural soils and tailing ponds from the Cartagena-La Unión mining district, SE Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 124, 166-175.
- Mashitah, M. D., Azila, Y. Y., & Bhatia, S. (2008). Biosorption of cadmium (II) ions by immobilized cells of *Pycnoporus sanguineus* from aqueous solution. *Bioresource Technology*, 99(11), 4742-4748.
- Masoudzadeh, N., Zakeri, F., bagheri Lotfabad, T., Sharafi, H., Masoomi, F., Zahiri, H. S. & Noghabi, K. A. (2011). Biosorption of cadmium by *Brevundimonas* sp. ZF12 strain, a novel biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas. *Journal of hazardous materials*, 197, 190-198.
- Masoomi, F., Khadivinia, E., Alidoust, L., Mansourinejad, Z., Shahryari, S., Safaei, M. & Noghabi, K. A. (2016). Nickel and lead biosorption by *Curtobacterium* sp. FM01, an indigenous bacterium isolated from farmland soils of northeast Iran. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 950-957.
- Mona, S., Kaushik, A., & Kaushik, C. P. (2011). Biosorption of chromium (VI) by spent cyanobacterial biomass from a hydrogen fermentor using Box-Behnken model. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(4), 656-663.
- Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments. John wiley & sons.
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B. and Pandian, S.K. (2011). Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. *Marine environmental research*, 71(4), 283-294.
- Olukoya, D.K., Smith, S.I. and Ilori, M.O. (1997). Isolation and characterization of heavy metals

- resistant bacteria from Lagos Lagoon. *Folia microbiologica*, 42(5), 441-444.
- Özdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., & Güven, K. (2009). Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub. sp. decanicus and *Geobacillus thermoleovorans* sub. sp. stromboliensis: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 152(1), 195-206.
- Rajesh, V., & Rajesh, N. (2015). An indigenous *Halomonas* BVR1 strain immobilized in crosslinked chitosan for adsorption of lead and cadmium. *International journal of biological macromolecules*, 79, 300-308.
- Ryan, T. P., Morgan, J. P., (2011). Modern Experimental Design. *J. Stat. Theory Pract.*, 1(3-4): 501-506
- Salinas, E., de Orellano, M. E., Rezza, I., Martinez, L., Marchesvky, E., & de Tosetti, M. S. (2000). Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 72(2), 107-112.
- Sayyadi, S., Ahmady-Asbchin, S., Kamali, K., & Tavakoli, N. (2017). Thermodynamic, equilibrium and kinetic studies on biosorption of Pb²⁺ from aqueous solution by *Bacillus pumilus* sp. AS1 isolated from soil at abandoned lead mine. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 80, 701-708.
- Shahriari Moghadam, S., Safaei, N., & Ebrahimipour, G. H. (2016). Optimization of phenol biodegradation by efficient bacteria isolated from petrochemical effluents. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 2(3), 249.
- Siripornadulsil, S., & Siripornadulsil, W. (2013). Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: potential for microbial bioremediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 94, 94-103.
- Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 427-451.
- Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., & Tang, M. (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of hazardous materials*, 162(1), 50-56.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-75.
- Wu, W., Huang, H., Ling, Z., Yu, Z., Jiang, Y., Liu, P., & Li, X. (2016). Genome sequencing reveals mechanisms for heavy metal resistance and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Delftia lacustris* strain LZ-C. *Ecotoxicology*, 25(1), 234-247.
- Yang, J., & Volesky, B. (1999). Biosorption of uranium on Sargassum biomass. *Water Research*, 33(15), 3357-3363.
- Zhang, X., Yang, L., Li, Y., Li, H., Wang, W. and Ye, B. (2012). Impacts of lead/zinc mining and smelting on the environment and human health in China. *Environmental monitoring and assessment*, 184(4), 2261-2273.