مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و ششم - بهار ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

# بررسی حذف رنگ Reactive Black 5 به‌وسیله باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک جدا شده از پساب کارخانه‌های نساجی

**سید محمدرضا نجاتی، عباس فرازمند*، مهرداد آذین**

پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف:** تصفیه پساب کارخانه‌های نساجی به دلیل وجود املاح و رنگ‌های مختلف در آن، از گذشته مورد توجه و بررسی بوده است. در این بررسی تلاش شد تا با کمک باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک جدا شده از پساب واقعی، از یک پساب ساختگی، فرآیند رنگ‌بری صورت پذیرد.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا از پساب نمونه‌گیری شده یک کارخانه نساجی واقع در کاشان، در محیط‌های TSB دارا و بدون نمک، غنی سازی صورت گرفت. سویه‌های جدا و خالص شده از لحاظ توان رشد و حذف رنگ، در محیط‌های کشت ساختگی رنگ‌بری مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** کنسرسیوم سه سویه باکتریایی برتر جدا شده، از توان رنگ‌بری در محدوده وسیعی از غلظت نمک (تا ده درصد)، غلظت رنگ (تا ۱۰۰۰ppm)، دما (۳۰ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد) و pH (۵/۵ تا ۸/۵) برخوردار بود.

**بحث:** می‌توان از کنسرسیوم باکتریایی در شرایط محیطی متفاوت، برای رنگ‌بری از پساب حاوی رنگ‌های آزو استفاده کرد. که این روش تصفیه، مقرون به‌صرفه و مناسب برای حفظ محیط زیست می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از پساب کارخانه‌های نساجی برای جدا سازی سویه‌های بومی که تحمل‌کننده شرایط واقعی خود پساب، نظیر املاح و رنگ‌های مختلف و همچنین دارای توانایی حذف رنگ در شرایط محیطی محل نمونه‌گیری هستند، مؤثر و کارامد است.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک، رنگ‌های آزو، رنگReactive Black5 ، پساب نساجی، حذف زیستی

## مقدمه

رشد فزاینده جمعیت و از سویی دیگر گسترش صنعت و کشاورزی سبب کمبود آب سالم در جهان شده است. در نتیجه ضرورت تـصفیه و بازیابی مجدد آب‌های مصرفی اهمیت خاصی پیدا کرده است. کارخانه‌های متعدد نساجی از بزرگ‌ترین مصرف‌کنندگان آب هستند، به همین جهت مقدار متنابهی پساب نیز در این صنعت به وجود می‌آید (۲۱). پساب کارخانه‌های نساجی حاوی مواد شیمیایی مختلف از جمله رنگ‌ها، فلزات سنگین، دترجنت ها، املاح، آنیون‌ها نظیر کلرور، سولفور، سولفید و هم‌چنین مواد معلق زیاد هست (۱۲). رنگ‌های سنتتیک در صنایع نساجی، کاغذ، عکاسی، مواد غذایی، مواد آرایشی و بهداشتی، داروئی، چاپ، پلاستیک و چرم استفاده می‌شوند (۱۳،۲۳). صنعت نساجی مصرف‌کننده دو سوم از کل رنگ‌های سنتتیک تولیدی در جهان است. که حدود۲۰-۱۰٪ از کل این رنگ‌ها، در طول فرآیندهای رنگ‌کاری به دلیل عدم کارایی در فرآیندهای رنگرزی، در پساب‌های نساجی رها می‌شود (۲۶). رنگ‌های آزو

**نویسنده مسئول :**
پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: farazmand2002@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۷

به دلیل قابلیت تجزیه‌پذیری کم و استفاده گسترده، سبب تأثیرهایی بر فرآیندهای متداول تصفیه پساب صنایع نساجی در چند دهه اخیر شده است. ورود این‌گونه رنگ‌ها در قالب پساب به محیط زیست نه تنها ایجاد منظره ناخوشایند می‌کند بلکه تأثیرهای زیادی روی آب‌های جاری و حتی روی آب‌های زیرزمینی دارد. کاهش کیفیت آب، عدم نفوذ نور به لایه‌های زیرین آب، اثر بر حلالیت گازها، آسیب زدن به آبزیان و ... ازجمله عوامل تهدیدکننده محیط‌زیست است (۹،۱۱). روش‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی به‌منظور رنگ‌بری از پساب‌های نساجی به کار می‌روند که در راندمان، هزینه‌های اقتصادی و اثرهای زیست محیطی متفاوت می‌باشند (۸). استفاده از میکروارگانیسم‌ها و روش‌های زیستی رنگ‌زدایی، به دلیل تنوع ژنتیکی و متابولیکی، کم‌هزینه بودن، ساده و کارآمدتر بودن، عدم آسیب‌رسانی به طبیعت و تولید مقدار کم مواد دفعی گزینه‌ای مناسب برای تصفیه آلاینده‌ها ازجمله رنگ‌های آزو می‌باشند (۳). رنگ‌بری از پساب‌های نساجی از اوایل دهه ۸۰ آغاز شده است. قدمت به‌کارگیری میکروارگانیسم‌ها در تیمار و بهبود وضعیت پساب‌های شهری به زمان‌های قدیم بازمی‌گردد. در تحقیق‌های مشابهی تاکنون از بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی، باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری و اجباری، برخی مخمرها و قارچ‌ها و جلبک‌ها و اکتینومیست‌ها در راستای حذف بیولوژیک ترکیب‌های رنگی آزو از پساب نساجی، استفاده شده است. تجزیه رنگ‌ها توسط باکتری‌های مختلف از جمله *پروتئوس میرابیلیس*[1]، سویه‌های *سودوموناس*[2] ، *آکتینوباسیلوس سوکسینوجنس*[3]، *سودوموناس لوتئولا*[4] و *مایکوباکتریوم اویوم*[5] گزارش شده است(۲،۳،۹).

پساب بسیاری از کارخانه‌های نساجی ایران به دلیل قرارگیری در موقعیت‌های جغرافیایی شور، در زمین‌های شور و کویری رها می‌شود، از طرفی چون در مراحلی از رنگرزی برای بالا بردن کارایی از نمک‌های محلول نیز استفاده می‌شود، بنابراین استفاده از باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک انتخاب خوبی برای تصفیه این‌گونه پساب‌ها بشمار می‌آیند؛ زیرا این باکتری‌ها، تحمل‌پذیری بالایی به شرایط سخت محیطی مانند وجود مقدار بالای نمک و مواد آلاینده مانند فلزهای سنگین و اکسی‌آنیون ها را از خود نشان می دهند (۲).

1. Proteus mirabilis
2. Pseudomonas spp
3. Actinobacillus succinogenes
4. Pseudomonas luteola
5. Mycobacterium avium

تجزیه زیستی آلوده‌کننده‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی توسط عامل‌های مختلف محیطی مانند: دما، pH، اکسیژن و غیره تحت تأثیر قرار می‌گیرد. بنابراین استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی در این زمینه می‌تواند بسیار مؤثر باشد. در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک موجود در سیستم یک تصفیه‌خانه پساب کارخانه نساجی در کاشان که توانایی رنگ-بری از یکی از سخت تخریب‌پذیرترین رنگ‌های مورد استفاده در نساجی، یعنی رنگ Reactive Black 5 را دارد، صورت پذیرفت. هم‌چنین اثر چند عامل مختلف بر میزان رنگ‌بری این سویه‌ها موردبررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌گیری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه:**

نمونه‌گیری از پساب خروجی دستگاه‌های مختلف و پساب نهایی و پساب بخش‌های مختلف سیستم تصفیه‌خانه یک کارخانه نساجی واقع در شهر کاشان و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه طبق استاندارد شماره ۲۴۴۰ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد (۱۴).

**جدا سازی سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک:**

همه نمونه‌ها به‌منظور جدا سازی سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک غربال‌گری شد. به این صورت که پنج میلی‌لیتر از نمونه پساب به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط TSB[6] بدون نمک و TSB با پنج درصد نمک (در یک لیتر از آب مقطر: $MgSO_4$، ۴/۸ گرم و $MgCl_2$ ، ۳/۵ گرم و KCl ، ۱گرم و NaCl، ۴۰/۵ گرم) در ارلن های ۲۵۰ میلی‌لیتر افزوده شد. pH نمونه‌ها با HCl یا NaOH یک نرمال روی ۷/۴ تنظیم و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm گرم‌خانه گذاری شد. پس از یک هفته از ارلن‌های فوق روی پلیت‌های TSA[7] بدون نمک و TSA با پنج درصد نمک کشت داده شد (۲). تمامی محیط‌های کشت و نمک‌های مصرف شده از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

هم‌چنین از رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱ و۰/۰۰۰۰۰۱ تهیه شده از پساب بر روی پلیت های TSA بدون نمک و دارای پنج درصد نمک کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد.

6. Tryptic Soy Broth
7. Tryptic Soy Agar

انتخاب دمای ۳۷ درجه به دلیل شرایط موجود در تصفیه‌خانه به خصوص واحد لجن فعال که به‌طور میانگین دارای دمای ۳۷ درجه می‌باشد، بود.

**غربال‌گری سویه‌ها بر اساس توان رنگ‌بری:**

در این مرحله برای شناسایی سویه‌های دارای قدرت رنگ‌بری و انتخاب سویه‌های برتر از لحاظ میزان و سرعت رنگ‌بری، هر یک از سویه‌های جدا سازی و خالص‌شده به ارلن‌های کشت حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت رنگ‌بری (حاوی یک درصد گلوکز، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، پنج درصد نمک و ۵۰ ppm رنگ) یک درصد مایه تلقیح (از کدورت ۰/۵ مک فارلند باکتری) افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم-خانه‌گذاری شد. از میان رنگ‌های مورد استفاده در این کارخانه، یکی از سخت تجزیه‌پذیرترین آن‌ها یعنی رنگ Remazol Black B انتخاب شد و به همراه گلوکز، جدا از محیط کشت فوق سترون و به محیط‌ها افزوده شد.

از میان ۲۰ سویه جدا و خالص‌سازی شده، سه سویه توان رشد و رنگ‌بری مطلوب در محیط کشت ساخته شده از رنگ Reactive Black 5 را پس از مدت سه روز دارا بودند. هم-چنین این سویه‌ها ازنظر موارد زیر نیز مورد بررسی قرار گرفتند:

۱. بررسی رنگ‌بری در pHهای مختلف.
۲. توانایی رنگ‌بری در غلظت‌های مختلف رنگ.
۳. توانایی رنگ‌بری در غلظت‌های مختلف نمک.
۴. بررسی توانایی باکتری‌های جدا شده برای استفاده از رنگ به‌عنوان منبع کربن.
۵. توانایی حذف رنگ توسط کنسرسیومی از سه سویه برتر.

تمامی آزمایش‌های فوق با سه تکرار در شرایط پایه دمای ۳۷ درجه و pH = ۷/۴ و غلظت ۵۰ppm رنگ و پنج درصد نمک انجام شد و محیط‌های حاوی رنگ و بدون رنگ تلقیح نشده به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین برای بررسی میزان رنگ‌بری نمونه‌ها، هر ۲۴ساعت یک‌بار از آن‌ها نمونه گرفته شد.

به دلیل عملکرد مناسب سه سویه برتر، کنسرسیومی از این سه سویه باکتریایی تهیه شد.

**انواع روش‌های هوادهی:**

۱. حالت هوادهی: ظروف نمونه فقط روی شیکر با دور ۱۵۰rpm گرم‌خانه‌گذاری شد.
۲. حالت ایستا: ظروف نمونه به طور مستقیم به انکوباتور ثابت منتقل شد و در نتیجه بعد از اتمام اکسیژن اندک موجود در ظرف نمونه، شرایط Anoxic درون ظروف محتوی نمونه حاکم گشت.
۳. حالت هوادهی-Anoxic : ظروف نمونه ابتدا روی شیکر با دور ۱۵۰rpm گرم‌خانه‌گذاری شد و سپس به انکوباتور ثابت منتقل شد.

**سنجش فعالیت رنگ‌زدایی:**

برای بررسی میزان رنگ و کدورت آن در محیط، ابتدا طیف جذبی رنگ در محدوده‌ی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (WPA: Biochrom WPA 80-3003-75 Model Biowave II) که به کمک هوا صفر شده بود، تعیین شد. بدین ترتیب بیشینه طول‌موج جذبی[1] رنگ مشخص گشت. که برای Reactive Black 5 برابر با λmax =۶۰۰nm بود. از محیط‌های کشت گرماگذاری شده در زمان مورد نظر (زمان‌های مختلف از بعد از تلقیح باکتری، برای بررسی میزان رنگ‌بری مورد بررسی قرار گرفت) یک میلی‌لیتر نمونه با دور rpm۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از رسوب توده باکتریایی، از مایع رویی درون کووت ریخته شد و میزان جذب رنگ در بیشینه طول موج جذبی آن اندازه‌گیری و درصد رنگ‌بری نیز مطابق فرمول زیر محاسبه گشت:

$$D\ (\%) = (A-A_0)/\ A_0 \times ۱۰۰$$

(جذب در محیط، پس از رنگ‌بری = A ، جذب محیط شاهد رنگی= $A_0$ ، درصد رنگ‌بری = D)

**بررسی برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیک و توان رشد سویه‌های برتر در شرایط مختلف محیطی:**

میزان رشد باکتری‌ها، از طریق تراکم نوری (OD) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (BiowaveII) در طول-موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۴). رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Burke انجام شد (۱۹). هم‌چنین این رنگ آمیزی و نتیجه آن با استفاده از KOH سه درصد تأیید شد (۷).

تحمل نمک سدیم کلراید در حضور تراکم صفر تا ۱۵ درصد (w/v) در محیط نوترینت براث مورد سنجش قرار گرفت.

1. λmax

رشد در دماهای مختلف در محیط نوترینت براث با پنج درصد نمک سدیم کلراید در دماهای ۳۰، ۳۳، ۳۶، ۳۹، ۴۲ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

محدوده pH برای رشد با تنظیم pH نهایی محیط با HCl و NaOH یک نرمال بین ۳ تا ۱۴ در محیط نوترینت براث بررسی گشت.

عملکرد کنسرسیوم باکتریایی از لحاظ نوع هوادهی و زمان کافی و مناسب جهت رنگ‌بری مطلوب نیز مورد بررسی قرار گرفت.

**بررسی مکانیسم رنگ‌بری سویه‌های برتر:**

میکروارگانیسم‌های مختلف در مقابل رنگ‌هایی با ساختار یکسان روش‌های متفاوتی را برای شکست ساختار رنگ به کار می‌گیرند. به‌منظور مشخص کردن مکانیسم رنگ‌بری از دو روش بررسی طیف UV-Vis و مشاهده ظاهری توده سلولی استفاده شد. در این بررسی اولین گام مقایسه طیف UV-Vis محیط کشت رنگ‌بری، قبل و بعد از رنگ‌بری است که برای این کار محیط رنگ‌بری، قبل و بعد از رنگ‌بری توسط باکتری با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس طیف UV-Vis محلول رویی حاصل از سانتریفوژ در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (WPA: Biochrom WPA 80-3003-75 Model Biowave II) رسم و مقایسه شدند. هم‌چنین مشاهده ظاهری توده رشد باکتری در محیط دارای رنگ و بدون رنگ نیز مورد مشاهده قرار گرفت.

**تعیین فعال یا غیرفعال بودن رنگ‌بری توسط سویه‌های برتر:**

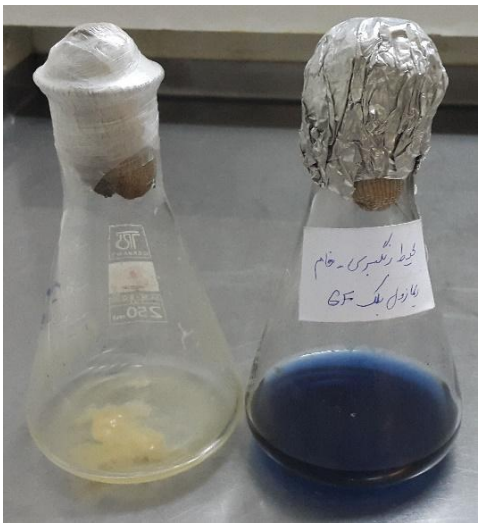
ابتدا کشت مایع محیط کشت رنگ‌بری شده توسط باکتری ورتکس شد تا مخلوط یکنواختی از کدورت باکتریایی به دست آید. سپس این کشت به دو قسمت تقسیم گردید. یک قسمت اتوکلاو شد تا فعالیت متابولیسمی باکتری‌ها از بین برود و قسمت دیگر هم‌چنان حاوی سلول‌های زنده باقی ماند. هر دو نوع نمونه با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی و رسوب حاصل از هر یک از نمونه‌ها تحت تأثیر یک میلی‌لیتر از ۱۰ ppm رنگ قرار گرفتند. نتایج تا ۲۴ساعت پس از این کار بررسی شدند.

## نتایج و بحث

در روش غنی‌سازی نمونه پساب در محیط کشت TSB دارای پنج درصد نمک و سپس کشت گسترده بر روی پلیت‌های TSA دارای پنج درصد نمک، تعداد ۱۷ سویه از باکتری‌های موجود در پساب که بیش‌تر آن‌ها دارای رشد سریع و توانایی تحمل و رشد در پنج درصد نمک موجود در محیط کشت را دارا بودند، جدا سازی شدند. با استفاده از روش کشت مستقیم نمونه پساب و رقت‌های آن بر روی محیط کشتTSA دارای پنج درصد نمک، تعداد سه سویه از سویه‌های کند رشد موجود در پساب نیز جدا سازی شد. این روش بر این اساس انتخاب شد که سویه‌های کند رشد در محیط‌های کشت غنی‌سازی مایع، که به سرعت توسط سویه‌های دارای رشد سریع اشباع می‌شوند، مجال رشد کافی را پیدا نمی‌کنند. در این روش احتمال رشد و جدا سازی سویه‌های کند رشد ایجاد گردید. در پایان مرحله جدا سازی، از ۲۰ سویه جدا شده، کشت خالص تهیه و نگهداری شد. در مرحله غربال‌گری انتخاب سویه‌های برتر بر اساس میزان و سرعت رنگ‌بری و هم‌چنین نوع مکانیسم رنگ‌بری سویه‌های جدا شده، صورت گرفت. از بین ۲۰ سویه جدا شده، سه سویه SN7، SN11، SN20 بهترین توان رنگ‌بری را از خود نشان دادند. که به ترتیب ۸۵/۷±۰/۸، ۷۶/۴±۰/۴ و ۸۲/۵±۰/۶ درصد حذف رنگ را در مدت سه روز از خود نشان دادند. میانگین و انحراف معیار تمامی تکرارها محاسبه و گزارش شد و هیچ سطح معناداری از تفاوت داده‌های تکرارشده مشخص نگردید. هم-چنین موارد گفته شده برای تأیید برتر بودن سه سویه بالا انجام گرفت که مشخص شد هر سه سویه توان رشد در محدوده وسیعی از pH، دما و غلظت‌های مختلف نمک و رنگ یعنی pHهای ۵/۵ تا ۸/۵ ، دماهای ۳۰ تا ۳۸ درجه سانتی-گراد، مقادیر درصد نمک ۲ تا ۱۰ (w/v) و غلظت‌های مختلف از رنگ Remazol Black B از ۵۰ تا ۱۰۰۰ ppm را دارا می‌باشند. هم‌چنین توانایی استفاده از رنگ به‌عنوان منبع کربن نیز با حذف گلوکز از محیط کشت رنگ‌بری انجام گرفت. در نتیجه تنها ماده‌ای که در این حالت در محیط می‌توانست به‌عنوان منبع کربن مورد استفاده باکتری قرار گیرد، رنگ بود. که هر سه سویه توان استفاده از رنگ به‌عنوان منبع کربن را نیز داشتند. در مقایسه رنگ‌بری کنسرسیوم تشکیل شده از سه سویه برتر با رنگ‌بری هر سویه، مشخص شد که توان رنگ‌بری کنسرسیوم از حالات تک‌سویه بیش‌تر است. بنابراین کنسرسیومی از این سه سویه باکتریایی تهیه شد؛ که این

کنسرسیوم توان رشد و رنگ‌بری تا ۹۲درصد(±۰/۵) در محیط کشت ساخته شده از رنگ Reactive Black 5 را در شرایط پایه یادشده، در مدت سه روز دارا بود(شکل۱).

در بررسی رنگ‌آمیزی گرم سویه‌های برتر مشخص شد که دو سویه کوکوباسیل گرم منفی و یک سویه باسیل گرم مثبت اسپوردار می‌باشد.

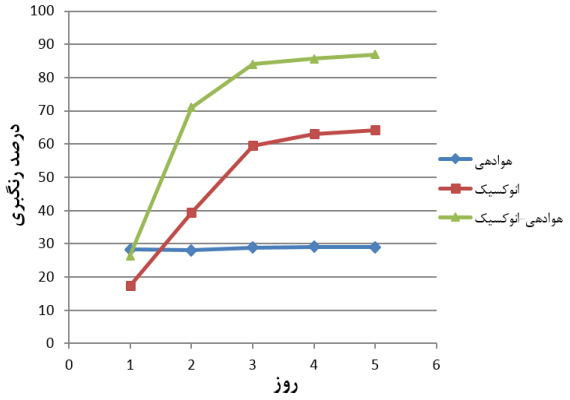


شکل۱- محیط رنگ‌بری شده توسط کنسرسیوم (در سمت چپ) در کنار محیط شاهد (سمت راست)

نتایج حاصل از رسم منحنی رشد هر سه سویه حاکی از آن بود که هر سه سویه بعد از گذشت مدت زمان ۲۴ساعت به حداکثر میزان رشد یعنی به پایان فاز لگاریتمی خود می‌رسند و این بدان معناست که می‌توانند بهترین عملکرد را پس از گذشت این مدت زمان داشته باشند. این مدت زمان در حالت-های مختلف هوادهی به خصوص حالت هوادهی-Anoxic برای عملکرد مناسب رنگ‌بری سویه‌ها در نظر گرفته شد.

در بررسی حالات مختلف هوادهی(شکل۲): رنگ‌بری مطلوبی از هیچ یک از سویه‌ها در حالت هوادهی روی شیکر حاصل نشد(مانند اکثر گزارش‌هایی که تاکنون شده است) (۱۷،۲۳). در حالت ایستا به دلیل رشد کم سویه‌ها ولی وجود شرایط مناسب برای فعالیت آنزیماتیک مناسب در راستای حذف رنگ، رنگ‌بری به نسبت مطلوبی حاصل شد. اما در حالت هوادهی-Anoxic به دلیل رشد مناسب سویه‌ها در مرحله هوادهی و سپس عملکرد بهینه آن‌ها در حالت Anoxic، رنگ‌بری بسیار مطلوبی حاصل شد. رنگ‌بری در باکتری‌ها از پایه یک فعالیت آنزیمی است که تحت شرایط بی‌هوازی انجام می‌شود و این به دلیل پیوند شدید الکترون کشنده آزو است که با اکسیژن محیط بر سر گرفتن الکترون از حاملان الکترونی مانند NADH رقابت می‌کند (۲۶).

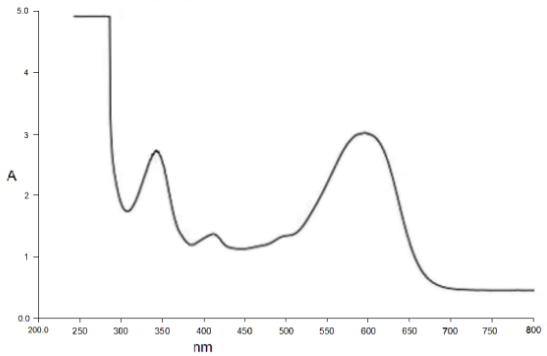
بر اساس گزارش‌ها رنگ‌بری توسط باکتری‌ها ممکن است در



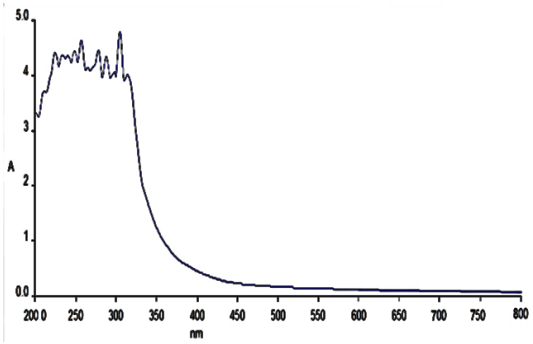

شکل۲- اثر انواع هوادهی بر میزان رنگ‌بری کنسرسیوم

اثر جذب سطحی و یا تجزیه زیستی باشد. در جذب سطحی، بررسی طیف UV-Vis نشان‌دهنده کاهش ارتفاع تمام پیک‌ها به یک نسبت است اما اگر رنگ‌بری در اثر تجزیه زیستی حاصل شده باشد، پیک موجود در ناحیه مرئی حذف و یا پیک جدیدی اضافه می‌شود (۱۰). جذب سطحی هم‌چنین با مشاهده توده سلولی قابل تشخیص است که در این صورت توده سلولی شدید رنگی می‌شود ولی در تجزیه زیستی این گونه نیست (۵).

در بررسی مقایسه طیف UV-Vis محیط کشت رنگ‌بری، طیف UV-Vis محلول رویی حاصل از سانتریفوژ در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر ( WPA: Biochrom WPA 80-3003-75 Model Biowave II) برای محیط کشت رنگ‌بری، قبل و بعد از رنگ‌بری به‌صورت زیر رسم شد (شکل۳و۴).




شکل۳- طیف UV-Vis محیط کشت رنگ‌بری، قبل از رنگ‌بری




شکل۴- طیف UV-Vis محیط کشت رنگ‌بری، بعد از رنگبری

همان‌طور که از نمودارهای رسم شده مشخص است، در طول‌موج ۶۰۰ nm در محیط کشت رنگ‌بری، قبل از انجام پروسه رنگ‌بری، بیشینه جذب وجود داشته است. که این مقدار جذب در محیط کشت رنگ‌بری بعد از رنگ‌بری توسط هر سه سویه و درنتیجه کنسرسیوم آن‌ها، دیگر وجود ندارد. این موضوع حاکی از حذف رنگ توسط هر سه سویه از محیط کشت رنگ‌بری است.

هم‌چنین مشاهده ظاهری توده رشد باکتری در محیط رنگ‌دار و بدون رنگ نیز به‌صورت چشمی انجام شد. که توده باکتریایی هر سه سویه در محیط کشت رنگ‌بری پس از انجام رنگ‌بری، به طور کامل بدون رنگ جذب‌شده و به‌صورت یکنواخت سفید یا شیری‌رنگ بود. یعنی هیچ آثاری از نشست رنگ روی سطح سلول دیده نشد.

در تعیین فعال یا غیرفعال بودن رنگ‌بری توسط سویه‌های برتر، نتایج بدین گونه بود که توده باکتریایی اتوکلاو شده و مایع رویی آن بعد از سانتریفوژ و هم‌چنین مایع رویی حاصل از سانتریفوژ توده باکتریایی زنده، هیچ‌کدام توانایی رنگ‌بری نداشتند و تنها توده زنده باکتریایی دارای قدرت رنگ‌بری بود. مشاهده این‌که تنها توده سلولی زنده باکتری‌ها قادر به رنگ-بری هستند، دلیلی دیگر بر این واقعیت است که رنگ‌بری توسط باکتری‌های مورد بررسی به‌صورت فعال انجام می‌شود و در اثر جذب سطحی که به طور معمول به‌صورت غیرفعال است نمی‌باشد. در بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، مکانیسم رنگ‌بری، جذب سطحی است. هم‌چنین این فعالیت آنزیمی توسط یک آنزیم ترشحی انجام نمی‌شود. زیرا در این صورت مایع رویی نیز باید توانایی رنگ‌بری می‌داشت (۱۶).

Julie Bornot و همکارانش در سال ۲۰۱۵ با استفاده از دینوکوکوس جئوترمالیس توانست از پساب، تا ۶۸ درصد رنگ‌بری را انجام دهد. این باکتری جزء میکروارگانیسم‌های باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک است که انتخاب خوبی برای تصفیه این‌گونه پساب‌ها به شمار می‌آیند؛ زیرا این باکتری‌ها، تحمل‌پذیری بالایی به شرایط سخت محیطی مانند وجود مقدار بالای نمک و مواد آلاینده مانند فلزات سنگین و اکسی‌آنیون ها را از خود نشان می دهند.

P. A. Joshi و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در تجزیه بیولوژیکی رنگ با استفاده از کنسرسیومی متشکل از باکتری‌های جدا شده از پساب نساجی دریافتند که کنسرسیومی از باکتری سودوموناس و اکتینوباکترها توانایی رنگ‌بری از پساب نساجی را تا ۹۶ درصد دارا هستند (۱۵). در این پژوهش نیز مشخص گردید که توانایی رنگ‌بری کنسرسیوم باکتریایی از حالات تک‌سویه بیش‌تر است.

Franciscon Elisangela و همکارانش در سال ۲۰۰۹ توسط سویه ای از استافیلوکوک توانستند تا ۸۵درصد رنگ-بری را از پساب نساجی انجام دهند. آنها با ایجاد سیستم هوازی – انوکسیک، ابتدا به توده باکتریایی مورد نظر رسیده و سپس آن را وارد حالت انوکسیک کردند. تا در این شرایط بهترین عملکرد آنزیماتیک برای حذف رنگ را ایجاد کنند (۶). نتایج بررسی آنها با نتایج این تحقیق در بررسی انجام گرفته در رابطه با انواع حالات هوادهی در راستای رنگ‌بری مطلوب نیز منطبق می باشد.

O.P. Abioye و همکارانش در سال ۲۰۱۵ با استفاده از استافیلوکوکوس در محیط متیل رد توانستند به رنگ‌بری ۵۰ تا ۶۲ درصد از این رنگ، در مدت ۱۲ روز دست یابند (۱). در این بررسی نیز رنگ‌بری کنسرسیوم باکتریایی برتر از رنگ آزوی مورد بررسی، به میزان ۹۲درصد، پس از گذشت سه روز حاصل گردید.

Sharma Shilpa و همکارانش در سال ۲۰۱۵ با استفاده از یک سویه ی اندوفیت جدید توانستند در دمای ۳۴ درجه به ۸۴ درصد رنگ‌بری دست پیدا کنند. آنها برای منبع ازت خود به جای عصاره مخمر از عصاره گوشت استفاده کردند (۲۱). ولی در این پژوهش از عصاره مخمر به‌عنوان منبع ازت محیط-کشت استفاده گردید.

Jaabir و همکاران درسال ۲۰۱۳ دریافتند که از تصفیه ی فاضلاب می توان به عنوان یک روش مؤثر در استفاده ی مجدد از فاضلاب صنعتی، بخاطر وجود عناصری مثل N. P برای مقاصد آبیاری کشاورزی استفاده نمود. آنها بر این باور بودند که می توان از پساب تصفیه شده برای مقاصد دیگر به جز صنعت

استفاده کرد که باور درستی بود. آن‌ها توانستند که پس از بررسی‌های فراوان به این موضوع برسند که ارگانیسم‌ها همانند باکتری‌ها می‌توانند علاوه بر رشد و رنگ‌بری در پساب، آن را برای مقاصدی هم‌چون کشاورزی آماده سازند (۱۸). در پایان این بررسی نیز پیشنهادهای بالا برای مطالعه و بررسی بیش‌تر، جهت استفاده مجدد از پساب تصفیه شده ارائه گشت.

## نتیجه گیری

در نهایت می‌توان گفت استفاده از پساب کارخانه‌های نساجی برای جدا سازی سویه‌های بومی که تحمل کننده شرایط واقعی خود پساب نظیر وجود املاح و رنگ‌های مختلف و هم-چنین دارای توانایی حذف رنگ هستند، بسیار کمک کننده است. که به کمک آن‌ها می‌توان در شرایط محیطی متفاوت مانند دما، pH، غلظت نمک و غلظت رنگ و... طیف وسیعی از رنگ‌های آزو موجود در پساب را رنگ‌بری کرد. تا بدین ترتیب بتوان بخشی از آب از دست رفته را حداقل در بخش‌های صنعتی و برخی مصارف کشاورزی و حفظ فضاهای سبز و... دوباره مورداستفاده قرارداد.

## سپاسگزاری

از ریاست محترم پژوهشکده زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جناب آقای دکتر میردامادی و تمامی کارکنان این پژوهشکده که شرایط لازم برای انجام این پروژه را محیا و ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

# منابع


1. Abioye, O. P., V. T. Iroegu and S. A. Aransiola (2015). "Biodegradation of Methyl Red by Staphylococcus aureus Isolated from Waste Dump Site." ESTHAG 8(3): 131.
2. Asad S ,Amoozegar MA, Pourbabaee AA, Sarbolouki MN, Dastgheib SMM. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. BIRTEB.2007;98(11):2082-8 .(full text in Persian)
3. Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents: a review. BIRTEB. 1996;58(3):217-27 .
4. Bornot, J., C. Molina-Jouve, J.-L. Uribelarrea and N. Gorret (2015). "Quantitative Characterization of the Growth of Deinococcus geothermalis DSM-11302: Effect of Inoculum Size, Growth Medium and Culture Conditions." MICRKN 3(3): 441-463.
5. Chen, K.-C., J.-Y. Wu, D.-J. Liou and S.-C. J. Hwang (2003). "Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains." JBITD4 .101(1): 57-68.
6. Elisangela F, Andrea Z, Fabio DG, de Menezes Cristiano R, Regina DL, Artur C-P. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative Staphylococcus arlettae strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. IBBIES 2009;63(3):280-8
7. Finegold, S. M., D. M. Citron, E. J. Baron and E. J. Goldstein (1990). "Short prereduced anaerobically sterilized (PRAS) biochemical scheme for identification of clinical isolates of bile-resistant Bacteroides species." JCMIDW 28(10): 2220-2223.
8. Forgacs E, Cserhati T, Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. IJSET. 2004.
9. Frijters C, Vos RH, Scheffer G, Mulder R. Decolorizing and detoxifying textile wastewater, containing both soluble and insoluble dyes, in a full scale combined anaerobic/aerobic system. WATRAG. 2006;40(6):1249-57.
10. Fu-Xin, H., W. Yi-Qun, G. Dong-Hong and G. Fu-Xi (2003). "Spectroscopy and optical properties of novel metal (II)-azo complex films in blue-violet light region." PYLAAG .20(12): 2259.
11. Golka K, Kopps S, Myslak ZW. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. TOLED5.
12. Groff, K. A. (1993). "Textile waste." WAERED: 421-423.
13. Gupta VK. Application of low-cost adsorbents for dye removal–A review. JEVMAW.
14. Iranian National Standards Organization. (2015). "Iranian National Standards Organization." Retrieved august 2015, from http://www.isiri.org/portal/files/std/2440.htm.
15. Joshi, P. A., S. Jaybhaye and K. Mhatre (2015). "Biodegradation of dyes using consortium of bacterial strains isolated from textile effluent." EJEBAU 5(7): 36-40.
16. Kaur, B., B. Kumar, N. Garg and N. Kaur (2015). "Statistical Optimization of Conditions for Decolorization of Synthetic Dyes by Cordyceps militaris MTCC 3936 Using RSM." BRIIDT 2015 .
17. Khehra, M. S., H. S. Saini, D. K. Sharma, B. S. Chadha and S. S. Chimni (2006). "Biodegradation of azo dye CI Acid Red 88 by an anoxic–aerobic sequential bioreactor." DYPIDX 70(1): 1-7
18. Kumar, S. S. and M. Jaabir (2013). "Biological treatment of textile wastewater and its re-use in irrigation: Encouraging water efficiency and sustainable development." JWROA8 2(5): 133-140.
19. Murray, R. G. E., R. N. Doetsch and C. F. Robinow (1994). "Determinative and cytological light microscopy." Methods for general and molecular bacteriology 1: 22-41.
20. Rubin E, Rodriguez P, Herrero R, Cremades J, Barbara I, de Vicente S, et al. Removal of methylene blue from aqueous solutions using as biosorbent Sargassum muticum: an invasive macroalga in Europe. JCTBD. 2005.
21. Shilpa, S. and R. Shikha . "Biodegradation of Dye Reactive Black-5 by a Novel Bacterial Endophyte." IRJEAS . Vol. 4(4), 44-53, April (2015)

22. Srinivasan A, Viraraghavan T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. JEVMAW.
23. Supaka, N., K. Juntongjin, S. Damronglerd, M.-L. Delia and P. Strehaiano (2004). "Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system." CMEJAJ. 99(2): 169-176.
24. Widdel, F. (2007). "Theory and measurement of bacterial growth." Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie 4: 1-11.
25. Zee F. Anaerobic azo dye reduction: Ph. D. thesis. Wageningen University, Wageningen-Netherlands; DENHAAG 2002
26. Zimmermann, T., H. G. Kulla and T. Leisinger (1982). "Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by Pseudomonas KF 46." EJBCAI .129(1): 197-203.