Water and Soil Science, Vol. 34, NO. 2, Summer 2024, pp. 79-91.

DOI: 10.22034/ws.2023.54488.2511 ISSN:2717-3755 https://water-soil.tabrizu.ac.ir/

Research Article

Textile Azo Dye Biodecolorization Using a Facultative Thermophile *Bacillus paralicheniformis* SN7 Isolated from Textile Effluents

M Sabartahan[1], A Farazmand *[2], AA Pourbabaee[3]

Received: January 4, 2023 Accepted: August 18, 2023
Revised: June 18, 2023 Published online: June 21, 2024

1-M.Sc. Graduate, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Qom, Iran.

2-Assist. Prof., Department of of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran (IROST), Iran.

3-Prof., Dept. of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering & Technology, University of Tehran, Iran.

*Corresponding Author, Email: farazmand@irost.ir

Abstract:

Background and Objectives

Synthetic dyes, widely used in the textile industry, are the major water contaminants. Bacterial degradation is an eco-friendly, cost- effective, highly efficient approach. Unfortunately, some of these toxic wastewaters are discharged into the environment without proper treatment, which results in environmental pollution. Today, the available water for use in industrial activities, agriculture, etc. is decreasing. By treating the wastewater of textile factories, the purified water can be returned to the production cycle. Microorganisms such as bacteria, filamentous fungi, yeasts and algae are able to decolorize azo dyes, but so far there has been no complete report on decolorization by facultative thermophilic bacteria. Facultative thermophiles are those that can grow at high temperatures as well as at relatively lower temperatures, e.g., below 50 °C.

Methodology

To isolate dye-degrading bacteria, wastewater samples were collected from different parts of a textile wastewater treatment plant located in Kashan, Iran. The different media such as tryptic soy broth (TSB), modified M9 minimal salts medium, was used to enrich the bacteria in textile wastewater. The enriched samples were used for the isolation and purification of textile azo dyes degrading bacteria as a pure culture on TSA and wastewater agar (WA) plates under aerobic conditions. In this study, the strains of facultative thermophile bacteria that can effectively degrade azo dyes were successfully isolated in the M9 media (53°C). The decolorization activity of isolated bacteria was determined by using the modified M9 medium containing 150 mg L-1 commonly used dyes Rimazol Black 5, Reactive Red 198, Reactive Blue 21, and Reactive Yellow 15, under aerobic conditions for 24 h followed by anaerobic (anoxic) conditions for 48 h. Optimization of decolorization conditions in selected bacteria was done using Minitab 14 software and Response Surface Methodology (RSM). These experiments were conducted in order to investigate the factors of temperature, salt concentration, inoculation, color concentration, pH, and time at different levels.

©: The Author(S)
Publisher: University of Tabriz

The identification of the selected SN7 bacterial strain was done through 16S rRNA gene sequence analysis and conventional biochemical tests and was registered in Persian Type Culture Collection (PTCC).

Findings

The conditions for the proliferation and enrichment of dye-degrading bacteria in textile wastewater were provided through the enrichment method using TSB culture medium containing Rimazol Black and modified M9 medium containing Rimazol Black. The 47 dye degrading bacterial strains were isolated by using culture medium containing of Remazol black 5, 12 strains of facultative thermophilic bacteria that degrade dyes in textile waste were obtained by investigating the ability of the isolated bacteria to grow at 53°C. The ability of bacteria to decolorize azo dyes was 22 to 71.5% at 48 ° C for 72 h. Among the isolated bacteria, two strains SN7 and SN10 had the most decolorization and the decolorization rate of each at 48°C after three days of incubation was 71.5% and 70%, respectively. The SN7 strain was used to further investigate the dye degradation due to the ability of the SN7 strain to grow well in the medium containing the dye as well as its ability to remove it in a shorter period of time. Analysis of the 16S gene sequence of SN7 strain shows 93.99% similarity with Bacillus paralicheniformis Bac84. Therefore, this strain was named Bacillus paralisniformis SN7 and was registered with PTCC number 1907 in the Culture Collection for Research and Industrial Microorganisms of Iran. The strain Bacillus paralicheniformis SN7 was chosen and was used for further characterization. B. paralicheniformis SN7 was capable of degrading reactive dyes such as of Remazol black 5, Reactive Red 198, Reactive Blue 21 and Reactive Yellow 15. The ability of this bacterium to decolorize Remazol Black 5, Reactive Red 198, Reactive Blue 21, and Reactive Yellow 15 was 71.5, 75.6, 72.2, 76.2%, respectively. The optimum concentration of dye, pH, and temperature as analyzed by RSM were found to be 50 mg L-1, 7, and 45°C, respectively, for decolorization of Remazol black 5 (71.5%).

Conclusion

Among the isolated bacteria, facultative thermophilic strains were isolated and B. paraliceniformis SN7 has the ability to degrade dyes. Degradation of azo dyes, unlike surface adsorption, is of considerable importance as a desirable method because the dye is completely degraded by microbial enzymes. Some microorganisms can use dye compounds as their source of carbon and energy. Complete biological decolorization has also been observed in anoxic condition. Under anoxic conditions, decolorization was higher compared to aerobic conditions when the bacteria were cultured under aerobic conditions and then under anoxic conditions. Sequential of two stages under aerobic and anoxic conditions has been proposed for decolorization of azo dye-containing wastewaters. Anoxic conditions do not contain molecular oxygen and may contain nitrate or nitrite.

Keywords: Azo dyes, *Bacillus paralicheniformis* SN7, Degradation, Facultative thermophile bacteria, Textile.

نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۴ شماره ۲ صفحه‌های ۷۹ تا ۹۱/ سال ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

حذف زیستی رنگ آزو نساجی با استفاده از باکتری گرمادوست اختیاری *Bacillus paralicheniformis* SN7 جداشده از پساب نساجی

میلاد صابرطحان[۱]، عباس فرازمند*[۲]، احمدعلی پوربابایی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۷

تاریخ ویرایش:۱۴۰۲/۰۳/۲۸ تاریخ انتشار انلاین :۱۴۰۳/۰۴/۰۱

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی قم، ایران

۲- استادیار، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران،

۳ - استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، ایران

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: farazmand@irost.ir

چکیده :

استفاده از روش زیستی، یکی از روش‌های مقرون به صرفه برای حذف رنگ محسوب می‌شود. هدف از این تحقیق جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده رنگ‌های آزو سازگار با شرایط حرارتی فاضلاب نساجی است. برای دستیابی به باکتری‌های تجزیه‌کننده رنگ، از پساب یک تصفیه‌خانه فاضلاب نساجی نمونه‌برداری شد. برای غنی‌سازی جمعیت و جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB)، محیط M9 تغییر یافته و محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) و پساب-آگار(WA) در دمای ۳۷°C استفاده شد. با بررسی توانایی رشد باکتری‌های جدا شده در دمای ۵۳°C بر روی محیط M9 حاوی رنگ ریمازول مشکی ۵ باکتری‌های گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده انتخاب گردید. توانایی رنگ‌زدایی جدایه‌ها پس از یک مرحله رشد هوازی ۲۴ ساعته و سپس رشد در شرایط بی‌هوازی (آنوکسیک) ۴۸ ساعته بررسی شد. در این تحقیق ۷۴ سویه باکتری جداسازی شد که از میان آنها ۱۲ سویه گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده رنگ بدست آمد. جدایه *Bacillus paralicheniformis* SN7 بیشترین توانایی حذف رنگ به میزان ۷۱/۵٪ را در بین این باکتری‌ها داشت. مطالعات بیشتر بر روی تجزیه رنگ‌ها توسط این باکتری نشان‌دهنده توانایی خوب آن در تجزیه رنگ‌های پر کاربرد ریمازول مشکی ۵، راکتیو قرمز ۱۹۸، راکتیو آبی ۲۱، راکتیو زرد ۱۵ به ترتیب به میزان ۷۱/۵، ۷۵/۶، ۷۲/۲، ۷۶/۲٪ بود. با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) شرایط بهینه حذف رنگ ریمازول مشکی به میزان ۷۰٪ در دمای ۴۵°C، pH ۷ و غلظت نمک ۲٪ و غلظت رنگ ۵۰mg L^{-1} بدست آمد. استفاده از روش دو گامی هوادهی و شرایط بی‌هوازی، برای رنگ‌زدایی بهتر پیشنهاد گردیده است.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های گرمادوست اختیاری ، *Bacillus paralicheniformis* SN7 ، صنعت نساجی ، رنگ‌های آزو

مقدمه

در صنایع نساجی، دارویی، آرایشی، کاغذسازی و غذایی از رنگ‌های مصنوعی به طور گسترده استفاده می‌شود. رنگ‌های مصنوعی به طور معمول به دلیل داشتن ساختارهای مولکولی پیچیده آروماتیک، در برابر تجزیه زیستی پایدارتر هستند. در حدود ۱۰۰۰۰ رنگ و رنگدانه‌های مختلف در صنعت نساجی استفاده شده و سالانه بیش از ۷۰۰ هزار تن از آن در سراسر جهان تولید می‌شود. با صنعتی شدن جوامع، گرایش به استفاده از رنگ‌های مصنوعی نیز به طور چشمگیری افزایش یافته است (دلاماتریس و همکاران ۲۰۱۷).

رنگ‌های راکتیو (واکنشی)[1] با ویژگی داشتن طیف وسیعی از رنگ‌ها و سهولت استفاده از آن، به طور گسترده‌ای در صنعت نساجی کاربرد یافته است. رنگ‌های آزو، آنتراکینون و فتالوسیانین سه گروه متداول از رنگ‌های راکتیو محسوب می‌شوند که بیشترشان نیز سمی و سرطانزا هستند. تخلیه مستقیم پساب‌های رنگی حاوی رنگ‌های راکتیو، به منابع آبی محیط زیست آسیب می‌رساند. رنگ‌های راکتیو با داشتن ترکیبات آروماتیک، فلزات و کلریدها برای آبزیان سمی بوده و با کاهش قدرت نفوذ نور، موجب اختلال در فعالیت فتوسنتزی فتوتروف‌های آبزی می‌شود (سلیا و همکاران ۲۰۱۶).

از روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی مانند جذب، انعقاد و لخته سازی، اکسیداسیون و روش الکتروشیمیایی برای حذف رنگ از پساب نساجی استفاده می‌شود. این روش‌ها به دلیل مصرف انرژی بالا، تولید لجن زیاد و تشکیل فرآورده‌های جانبی، مشکلات زیادی دارد. در سال‌های اخیر روش‌های زیستی به عنوان روشی دوستدار محیط زیست و مقرون به صرفه در کنار روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای تصفیه فاضلاب‌های نساجی استفاده شده است. تصفیه زیستی فرایندی بدون آلودگی و با تولید لجن کم محسوب می‌شود که می تواند رنگ‌های مصنوعی را به ترکیبات معدنی نسبتاً کمتر سمی تبدیل کرده و آب بی‌رنگ تولید نماید (کیورید و همکاران ۲۰۱۷).

تحقیقات زیادی بر روی فرایند تصفیه زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته است. در یک پژوهش پانزی و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از باکتری *Vibrio fischeri* و سپس اکسیداسیون و ازناسیون[2] در دمای ترموفیل توانسته‌اند تا ۵۰ درصد رنگ‌زدایی پساب انجام گیرد. در تحقیقی آبیو و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از *Staphylococcus* در محیط متیل رد توانسته‌اند به رنگ‌زدایی ۵۰ تا ٦٢ درصدی در دماهای مختلف حالت ترموفیل در مدت ۱۲ روز دست یابند. در تحقیقی با استفاده از باکتری اکستریموفیل (افراطی‌دوست) *Deinococcus geothermalis* رنگ‌زدایی تا میزان ٦٨ درصد را گزارش شده است (برنوت و همکاران ۲۰۱۵). تجزیه زیستی یک رنگ مونوآزو همراه با کلرزدایی در پساب نساجی با استفاده از یک سویه *Bacillus cereus* تا میزان ۹۹ درصد توسط فتیان و همکاران (۲۰۱۳) گزارش شده است.

در این مقاله رنگ‌زدایی زیستی رنگ آزو نساجی با استفاده از باکتری‌های گرمادوست اختیاری جداشده از پساب نساجی مورد بررسی قرار گرفته است. به باکتری‌های گرمادوستی که بتوانند در دمای زیر ۵۰°C رشد کنند، گرمادوست معتدل (یا گرما دوست اختیاری) گفته می‌شود. هدف از این تحقیق غربالگری و جداسازی باکتری‌های گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده رنگ است که بتوانند در شرایط ویژه حرارتی فاضلاب نساجی دوام داشته و از قدرت تجزیه کنندگی برخوردار باشند. بر این اساس جدایه *B. paralicheniformis* SN7 که دارای توانایی رشد خوب در محیط حاوی رنگ و حذف رنگ‌های پرکاربرد در صنعت نساجی نظیر ریمازول

[1] Reactive dyes

[2] Ozonation

مشکی ۵، راکتیو قرمز ۱۹۸، راکتیو آبی ۲۱، راکتیو زرد ۱۵ بود جداسازی و بعنوان سویه‌ای با پتانسیل بالای معرفی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده رنگ، از بخش‌های مختلف یک تصفیه خانه فاضلاب نساجی واقع در شهر کاشان نمونه‌برداری صورت گرفت. در جدول ۱ مشخصات کیفی فاضلاب صنعتی کارخانه نشان داده شده است.

جدول ۱- مشخصات فاضلاب صنعتی نساجی مورد آزمایش.

نوع پساب	pH	BOD5 (mg L^{-1})	COD (mg L^{-1})	TDS (mg L^{-1})
پساب ورودی به تصفیه خانه	٤	٧٨٦	١٨٢٠	٢٣٨٦

غنی‌سازی و غربالگری باکتری‌های گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده رنگ

استفاده از محیط کشت TSB

برای غنی سازی باکتری‌های موجود در پساب نساجی، از محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) استفاده شد. از نمونه‌های گرفته شده از حوضچه‌های متعادل سازی و هوادهی تصفیه خانه فاضلاب نساجی در محلول سرم فیزیولوژی سوسپانسیون تهیه و از آن به عنوان مایه تلقیح در ارلن‌های ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط استفاده گردید. این ارلن‌ها به مدت چهار روز با استفاده از شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شد.

از آنجایی که حداقل دمای حوضچه‌های تصفیه خانه فاضلاب صنعتی مورد مطالعه ۳۷°C بود از اینرو برای دستیابی به باکتری‌های گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده این دما برای جداسازی اولیه باکتری‌های تجزیه‌کننده استفاده شد. با توجه به اینکه پساب صنایع نساجی علاوه بر ترکیبات رنگی (نظیر رنگ‌های آزو) دارای مقادیر قابل توجهی نمک‌های معدنی است، از اینرو برای جداسازی باکتری‌های نمک دوست و یا تحمل کننده نمک از محیط‌های کشت TSB به دو شکل حاوی نمک‌های معدنی به میزان ۲٪ (w/v) و بدون نمک‌های معدنی استفاده شد. مخلوط نمک‌های معدنی مورد استفاده شامل ($g\ L^{-1}$) ۱/۹۲ $MgSO_4$، ۱/٤ $MgCl_2$، ۰/٤ KCl، ١٦/٢ NaCl در یک لیتر آب مقطر است (اسد و همکاران ۲۰۰۷).

استفاده از محیط حداقل M9 تغییر یافته

از محیط حداقل M9 که به آن منابع کربن و ازت و یک رنگ آزو سخت تجزیه پذیر اضافه شده‌بود برای غنی سازی باکتری‌ها و آزمایش‌های رنگ‌زدایی استفاده گردید. با استفاده از این محیط، شرایط مختلف رشد برای باکتری‌های موجود در نمونه‌های پساب که توانایی رشد در محیط رنگی را داشتند فراهم شد. با تهیه انواع محیط حداقل M9 شرایط برای رشد باکتری‌های مختلف با نیاز تغذیه‌ای و سرعت رشد متفاوت فراهم گردید (آوالش و همکاران ۲۰۱٤).

محیط‌های حداقل M9 تغییریافته مورد استفاده عبارتند از:

محیط حداقل M9 حاوی منابع کربن (گلوکز $g\ L^{-1}$ ٤[1])، نیتروژن (عصاره مخمر $g\ L^{-1}$ ۲) و رنگ (ریمازول مشکی $mg\ L^{-1}$ ۵۰)

محیط حداقل M9 حاوی منبع نیتروژن (عصاره مخمر $g\ L^{-1}$ ۲) و رنگ (ریمازول مشکی $mg\ L^{-1}$ ۵۰)

محیط حداقل M9 حاوی منبع کربن (گلوکز $g\ L^{-1}$ ٤) و رنگ (ریمازول مشکی $mg\ L^{-1}$ ۵۰)

محیط حداقل M9 حاوی رنگ (ریمازول مشکی $mg\ L^{-1}$ ۵۰)

برای غنی کردن باکتری‌ها، مقدار یک میلی لیتر نمونه به ۵۰ میلی لیتر محیط‌های استریل تریپتیک سوی براث (TSB) و M9 تغییریافته تلقیح و به مدت ٤ روز در شیکر انکوباتور در دور ۱۵۰rpm و دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شد. پس از مشاهده کدری ناشی از رشد میکروارگانیسم‌ها، جداسازی و خالص سازی باکتری‌ها از طریق کشت بر روی محیط‌های TSA آگار و پساب آگار[3] صورت گرفت (سانون و همکاران ۲۰۱۸).

جداسازی و خالص سازی باکتری‌ها:

استفاده از محیط TSA

به منظور جداسازی و خالص سازی باکتری‌های موجود در پساب و محیط‌های غنی کننده، از محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) با و یا بدون نمک‌های معدنی (۲٪) استفاده شد.

استفاده از محیط کشت پساب-آگار(WA)

از محیط کشت انتخابی ساخته شده از پساب خام ورودی به تصفیه خانه و آگار $g\ L^{-1}$ ۲۰ به نام پساب-آگار(WA) استفاده شد. این محیط موجب مهار رشد باکتری‌هایی که ممکن است به صورت تصادفی در محیط وجود داشته باشند شده و راه حل مناسبی برای غلبه بر باکتریهای دارای رشد سریع بود (تیگینی و همکاران ۲۰۱۹). نمونه‌ها به مدت یک تا سه روز در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری و سپس باکتری‌ها به روش کشت خطی بر روی پلیت پساب-آگار (WA) خالص سازی شد (ورما و همکاران ۲۰۱٤).

غربالگری باکتری‌های گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده رنگ‌های پساب نساجی

از محیط M9 حاوی گلوکز (۱٪)، عصاره مخمر (۰/۵٪)، مخلوط نمک معدنی (۲٪) و رنگ ($mg\ L^{-1}$۵۰) برای انتخاب باکتری‌های گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده رنگ از میان باکتری‌های جدا شده اولیه، استفاده شد. نمونه‌ها در دمای ۵۳°C گرمخانه گذاری شد. رنگ‌های مورد استفاده برای انجام آزمایش شامل راکتیو قرمز ۱۹۸، راکتیو آبی ۲۱، ریمازول مشکی ۵، راکتیو زرد ۱۵ است. درصد کاهش هر یک از رنگ‌های فوق با استفاده از روش اسپکتوفوتومتری به ترتیب در طول موج‌های ۵۳۰، ۵۸۰، ۵۹۸ و ۳۹۸ نانومتر تعیین گردید. با توجه به اینکه ریمازول مشکی ۵ از رنگ‌های سخت تجزیه پذیر مورد استفاده در صنعت نساجی است، از اینرو از این رنگ برای بررسی بیشتر تجزیه زیستی و رنگ بری توسط باکتری‌های منتخب استفاده شد.

بررسی فعالیت رنگ‌زدایی

میزان فعالیت رنگ‌زدایی باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از محیط M9 تغییر یافته حاوی مقدار $mg\ L^{-1}$۵۰ با استفاده از رنگ‌های پرکاربرد ریمازول مشکی ۵، راکتیو قرمز ۱۹۸، راکتیو آبی ۲۱، راکتیو زرد ۱۵ با در نظر گرفتن سه تکرار انجام شد. با تلقیح سوسپانسیون باکتری (غلظتی برابر کدری OD=0.5 نیم مک فارلند) به محیط کشت مایع به میزان پنج درصد (بجز نمونه شاهد)، گرمخانه گذاری در دمای۵۳°C صورت پذیرفت. توانایی رنگ‌زدایی جدایه‌ها پس از یک مرحله رشد هوازی ٢٤ ساعته و سپس رشد درشرایط بدون اکسیژن (آنوکسیک) ٤٨ ساعته مورد بررسی قرار

[3] Wastewater Agar

گرفت. برای تامین شرایط هوازی، از دستگاه انکوباتور شیکر دار با سرعت چرخش ۱۵۰rpm استفاده و برای حالتشرایط بدون اکسیژن (آنوکسیک) (پس از مرحله هوادهی) از انکوباتور بدون شیکر استفاده گردید. برای تعیین میزان رنگزدایی، ابتدا نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس با روش اسپکتروفوتومتری میزان جذب اندازه گیری شد. با استفاده از فرمول $D\ (\%)= (A-A_0)/A\times100$ راندمان حذف تعیین گردید (اسد و همکاران ۲۰۰۷).

(A = میزان جذب محیط پس از رنگزدایی، A_0 = جذب محیط شاهد (رنگی)، D = راندان رنگزدایی)

برای تعیین میزان رشد باکتری‌ها از اندازگیری میزان جذب به روش اسپکتروفوتومتری در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر استفاده شد.

بررسی شرایط بهینه رنگزدایی ریمازول مشکی ۵ به روش سطح پاسخ

بهینه سازی شرایط رنگزدایی در باکتری منتخب SN7 با استفاده از نرم افزار Mintab 14 و روش RSM انجام شد. آزمایش‌های انجام شده برای بررسی عوامل دما، غلظت نمک، میزان تلقیح، غلظت رنگ، pH، زمان در سطح‌های مختلف بود. بازه‌های مورد آزمایش عبارتند از:

دما: [۳۷ و ۵۳ درجه سلسیوس]، غلظت نمک: [۰ و ۱۰ درصد]، میزان تلقیح [۵/ ۰تا ۵ درصد]، غلظت رنگ [۵۰، ۲۵۰mg L^{-1}]، pH [۵ تا ۸] و زمان [۳۰ تا ۴۸ ساعت]. انتخاب عوامل مهمتر با روش پلاکت برمن انجام شد.

شناسایی سویه باکتری منتخب

شناسایی سویه باکتری منتخب SN7 از طریق تعیین توالی ژن 16S rRNA توسط مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (PTCC) صورت پذیرفت و در آن مرکز ثبت گردید.

نتایج و بحث

جداسازی و غربالگری باکتری‌های گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده رنگ

با روش غنی سازی با استفاده از محیط کشت TSB حاوی ریمازول مشکی و محیط M9 تغییر یافته حاوی ریمازول مشکی شرایط برای تکثیر و غنی سازی باکتری‌ها تجزیه‌کننده رنگ‌های پساب نساجی فراهم شد. با استفاده از محیط‌های کشت جامد TSA و پساب- آگار، باکتری‌های غنی شده در محیط کشت مایع جداسازی و خالص سازی گردید. به این ترتیب تعداد ۴۷ سویه باکتری بدست آمد. با بررسی توانایی رشد باکتری‌های جداسازی شده برای رشد در دمای ۵۳°C نیز تعداد ۱۲ سویه باکتری گرمادوست اختیاری تجزیه‌کننده رنگ‌های پساب نساجی بدست آمد.

بررسی توانایی رنگزدایی سویه‌های جداسازی شده

با استفاده از رنگ ریمازول مشکی، توانایی ۱۲ سویه جدا شده گرمادوست اختیاری منتخب در رنگزدایی در محیط کشت M9 تغییریافته مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به توانایی قابل مشاهده حذف رنگ توسط باکتری‌های جداشده تحت شرایط بی‌هوازی (آنوکسیک) نسبت به شرایط رشد هوازی، از اینرو بررسی توانایی رنگزدایی جدایه‌ها پس از یک مرحله رشد هوازی و سپس رشد در شرایط بی‌هوازی مورد بررسی قرار گرفت. در جدول شماره ۲ مقایسه توانایی رنگزدایی سویه‌های جدا شده در شرایط کشت دمای ۴۸°C پس از گذشت سه روز (۲۴ ساعت رشد در شرایط هوازی و ۴۸ ساعت رشد در شرایط بی‌هوازی) نشان داده شده

است. میزان حذف رنگ ریمازول مشکی با ا ستفاده از این ۱۲ سویه جدا شده آزمایش گردید. میزان توانایی حذف رنگ از مقدار ۲۲٪ (توسط جدایه SN12) تا ۷۱/۵٪ (توسط جدایه SN10) متغیر بود.

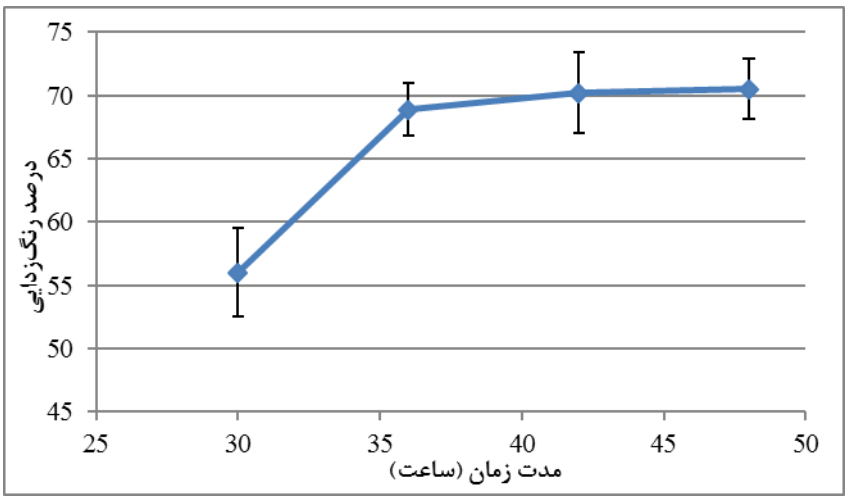
جدول ۲- مقایسه توانایی رنگزدایی سویه‌های جدا شده در محیط کشت M9 تغییریافته حاوی ریمازول مشکی ۵ در شرایط کشت در دمای۴۸°C پس از سه روز (۲۴ ساعت رشد در شرایط هوازی و ۴۸ ساعت رشد در شرایط بی‌هوازی).

سویه باکتری	میزان رنگزدایی (٪)	سویه باکتری	میزان رنگزدایی (٪)
SN1	٤٥	SN7	٧١/٥
SN2	٦٥	SN8	٤٣
SN3	٢٥	SN9	٤٤
SN4	٤٠	SN10	٧٠
SN5	٦٨	SN11	٤٢
SN6	٤٨	SN12	٢٢

از میان باکتری‌های جدا شده دو سویه SN7 و SN10 بیشترین توانایی رنگزدایی را داشت و میزان رنگزدایی توسط هر یک از آنها به ترتیب ۷۱/۵ و ۷۰ درصد در دمای۴۸°C پس از گذشت سه روز گرمخانه گذاری بدست آمد. با توجه به توانایی رشد خوب سویه SN7 در محیط حاوی رنگ و نیز توانایی حذف در مدت زمان گرمخانه‌گذاری کمتر، از این باکتری برای بررسی بیشتر استفاده شد.

برای شناسایی سویه SN7 توالی ژن کدکننده 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفت. بررسی توالی این ژن نشان دهنده میزان تشابه ۹۹/۹۳ درصدی با *Bacillus paralicheniformis* Bac84 است. از اینرو این سویه بعنوان *Bacillus paralicheniformis* SN7 معرفی و در مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران با شماره PTCC 1907 ثبت گردید.

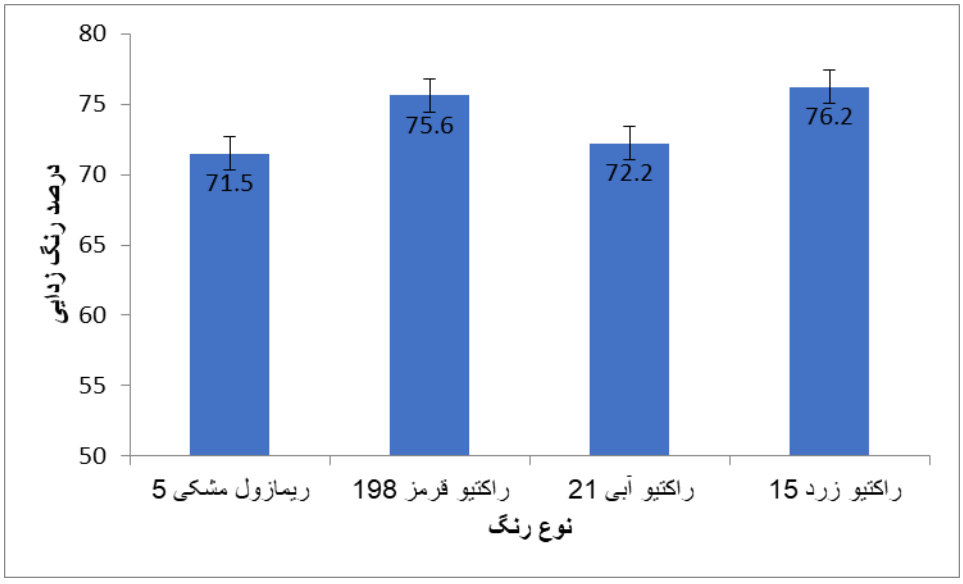
در زمان کشت باکتری *B. paralicheniformis* SN7 در شرایط هوادهی بر روی شیکر (هوازی)، اگرچه توده زنده باکتری‌ها افزایش می‌یافت ولیکن ازبین رفتن محسوس رنگ صورت نگرفت. با تغییر شرایط کشت باکتری از حالت هوادهی بر روی شیکر (هوازی) به حالت سکون در گرمخانه و ایجاد شرایط موقت بی‌هوازی، ازبین رفتن رنگ مشاهده گردید. استفاده از شرایط هوازی درابتدای فرایند موجب افزایش جمعیت باکتری‌ها شده و در حالت آنوکسیک شرایط برای عمل تجزیه فراهم می‌گردد. توانایی حذف رنگ در *B. paralicheniformis* SN7 رابطه مستقیمی با مدت زمان گرمخانه‌گذاری دارد. با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی، میزان رنگزدایی نیز افزایش یافت (شکل ۱). ادامه انکوباسیون باکتری پس از ٣٦ ساعت از زمان تلقیح نشان داد که اثر افزایشی در حذف رنگ ندارد.



شکل ۱- بررسی تاثیر زمان گرمخانه‌گذاری بر میزان درصد حذف رنگ ریمازول مشکی توسط *B. paralicheniformis* SN7 در شرایط بی‌هوازی.

بررسی توانایی حذف رنگ‌های پرکاربرد نساجی توسط *B. paralicheniformis* SN7

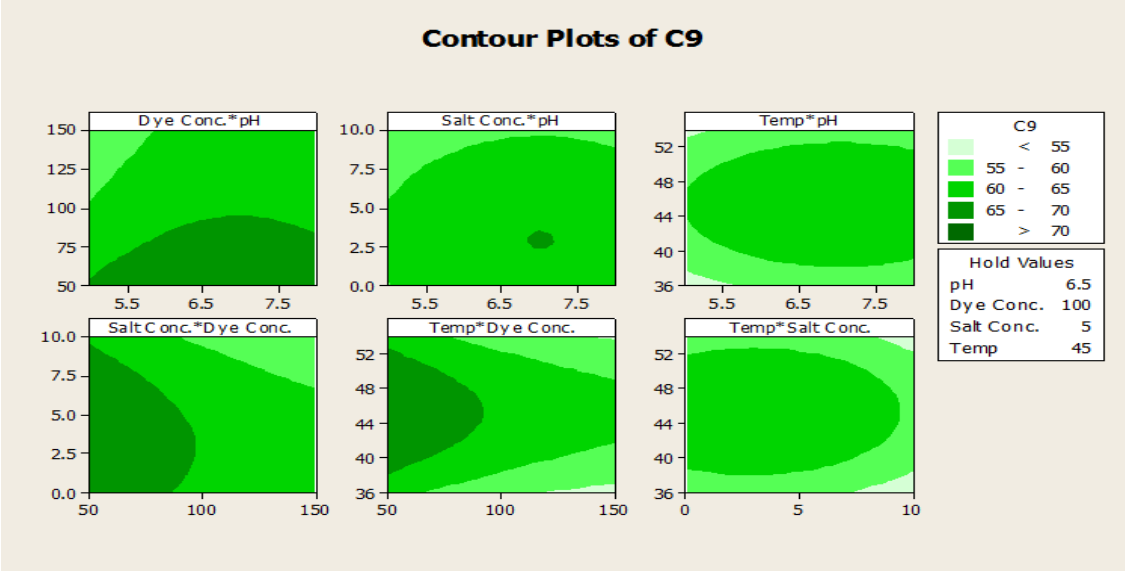
رنگ‌های ریمازول مشکی ۵، راکتیو قرمز ۱۹۸، راکتیو آبی ۲۱، راکتیو زرد ۱۵ از رنگ‌های پرکاربرد در صنعت محسوب می‌شوند. مطالعات بیشتر بر روی تجزیه رنگ‌ها توسط این باکتری نشان دهنده توانایی آن در تجزیه رنگ‌های ریمازول مشکی ۵، راکتیو قرمز ۱۹۸، راکتیو آبی ۲۱، راکتیو زرد ۱۵ به ترتیب به میزان ۷۱/۵، ۷۵/۶، ۷۲/۲، ۷۶/۲٪ بود (شکل ۲).



شکل ۲- بررسی مقایسه‌ای حذف رنگ‌های ریمازول مشکی ۵، راکتیو قرمز ۱۹۸، راکتیو آبی ۲۱، راکتیو زرد ۱۵ توسط *B. paralicheniformis* SN7

تعیین شرایط بهینه رنگزدایی ریمازول مشکی به روش سطح پاسخ

به منظور بهینه سازی شرایط محیطی حذف رنگ ریمازول مشکی ۵ توسط *B. paralicheniformis* SN7 آزمایش‌های بهینه سازی برای پارامترهای pH، دما، غلظت نمک و غلظت رنگ با روش سطح پاسخ (RSM) صورت گرفت. در شکل منحنی میزان (کانتور) دو بعدی (شکل ۳) تأثیر متقابل pH، غلظت اولیه رنگ، غلظت نمک و دما بر میزان درصد رنگزدایی ریمازول مشکی ۵ ترسم شده که این نمودار نشان میدهد شرایط بهینه برای حذف رنگ به میزان ۷۰٪ در دمای۴۵°C، غلظت نمک ۲ درصد، غلظت رنگ ۵۰mg L^{-1} و pH برابر ۷ صورت می‌پذیرد.



شکل ۳- نمودار منحنی میزان (کانتور) دو بعدی مربوط به اثر متقابل pH، غلظت اولیه رنگ، غلظت نمک و دما بر میزان درصد رنگزدایی ریمازول مشکی ۵ توسط *B. paralicheniformis* SN7

موضوع سازوکار چگونگی رنگزدایی رنگ‌های آزو توسط میکروارگانیسم‌ها (نظیر احیاء پیوندهای آزو به آمین‌های آروماتیک) و تجزیه آن (برای مثال تجزیه به مولکول‌های کوچکی که منجر به تولید H_2O، CO_2 و محصولات جانبی معدنی می‌شوند) توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. حذف میکروبیولوژیکی رنگ یا حتی تجزیه آن می‌تواند از طریق روش‌های مختلفی نظیر جذب سطحی، تولید آنزیم‌هایی که رنگ‌ها را مورد حمله قرار می‌دهند و یا ترکیبی از هر دو روش صورت پذیرد (آنا و همکاران ۲۰۲۲).

در مورد حذف رنگ توسط باکتری‌های جدا شده در این تحقیق سه گروه قابل تمایز وجود دارد. دسته اول باکتری‌هایی که علیرغم رشد، تغییری در حذف رنگ ایجاد نکردند. دسته دوم باکتری‌هایی که علاوه بر رشد موجب جذب رنگ و تغییر رنگ ظاهری زیست‌توده باکتری و کاهش رنگ محیط شدند و دسته سوم باکتری هایی که علاوه بر رشد موجب ازبین رفتن رنگ گشته و

زیست‌توده آن نیز متاثر از جذب سطحی رنگ نشدند. لازم به ذکر است که عمل جذب سطحی از طریق تبادل یون انجام می‌شود، زیرا دیواره سلولی میکروب حاوی گروه‌های هیدروکسی و کربوکسی است که می‌تواند به عنوان جایگاه اتصال رنگ برای چسبیدن به آن عمل کند. عمل جذب رنگ می‌تواند توسط زیست توده سلول‌های زنده یا مرده صورت گیرد. در جذب سطحی رنگ توده زنده نیز تغییر یافته و به رنگ ماده رنگی موجود در محلول تمایل پیدا می‌نماید. البته این روش چندین عیب دارد. برای مثال رنگ‌های آزو نمی‌توانند به شکل‌های غیرسمی تبدیل شوند، بنابراین دفع این پسماند متشکل از زیست توده باکتری و رنگ نیز مشکل‌ساز است. تجزیه رنگ‌های آزو، برخلاف عمل جذب سطحی از اهمیت قابل توجهی بعنوان یک روش مطلوب برخوردار است، زیرا رنگ به طور کامل توسط آنزیم‌های میکروبی تجزیه می‌شود. میکروارگانیسم‌هایی که قادر به رنگ‌زدایی و تجزیه رنگ هستند شامل قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها، جلبک‌ها و باکتری‌ها هستند (آنا و همکاران ۲۰۲۲).

رنگ‌های آزو بطور معمول یک یا چند گروه سولفونیک اسید بر روی حلقه‌های آروماتیک دارند که مانع رشد میکروارگانیسم‌های معمول می‌شود. این رنگ‌ها سنتز اسیدهای نوکلئیک و نیز رشد سلول را مهار کرده و با توجه به این که رنگ‌زدایی توسط سلول‌های باکتری به میزان رشد آنها وابسته است، از اینرو با کاهش میزان رشد در غلظت‌های بالای رنگ، ویژگی توانایی رنگ‌زدایی باکتری نیز کاهش می‌یابد (جیاراتانون و همکاران ۲۰۰۰). اما برخی میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی استفاده از رنگ به عنوان منبع کربن و انرژی هستند. برای مثال باکتری گرم منفی *Rhodocyclus gelatinsous* که از پساب نساجی جداشده است، توانایی استفاده از رنگ به عنوان منبع کربن را دارد (گالی و همکاران ۲۰۱٤).

رنگ‌زدایی زیستی رنگ‌های آزو به صورت کارامد تحت شرایط کم اکسیژن تا شرایط بی‌هوازی صورت می‌پذیرد (اسواتی و همکاران ۲۰۲۱). میزان رنگ‌زدایی *B. paralicheniformis* SN7 پس از گرمخانه گذاری در شرایط هوازی (بر روی شیکر) و سپس در شرایط بی‌هوازی نشان دهنده حذف بیشتر رنگ در حالت آنوکسیک نسبت به حالت هوازی بود. استفاده از روش دو گامی شامل مراحل هوادهی (هوازی) و سپس شرایط ساکن (بی‌هوازی)، رنگ‌زدایی بهتری را نشان می‌دهد. استفاده از باکتری‌ها برای رنگ‌زدایی در شرایط بی‌هوازی توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. در تحقیقی درسال ۲۰۲۱ رنگ‌زدایی و معدنی شدن متیل اورانژ با استفاده از مخلوط کشت باکتری‌ها در یک راکتور بی‌هوازی بستر آکنده با جریان روبه بالا[4] بررسی شده است. کشت مخلوط میکروبی این راکتور که از یک سیستم تصفیه فاضلاب بهداشتی حاصل شده است تمایل زیادی برای رنگ‌زدایی/معدنی کردن متیل اورانژ تا غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر را دارد. حذف مقادیر ۹۷٪ رنگ، ۸۸٪ TN، ۸٦٪ COD و ۸۳٪ TOC در بهترین شرایط تصفیه در زمان ماند هیدرولیکی ۱۲ ساعت حاصل شده است. وجود ساکارز و NO_3^--N در غلظت‌های بهینه به طور قابل توجهی در افزایش رنگ‌زدایی معدنی شدن متیل اورانژ نقش داشته است. نسبت بهینه COD/NO_3^--N برای رنگ‌زدایی و معدنی شدن همزمان و موثر متیل اورانژ در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر با زمان ماند ۱۲ ساعت برابر ٤۸ گزارش گردیده است (اسواتی و همکاران ۲۰۲۱). در یک مطالعه، از *Brevibacterium sp.* strain VN-15 که از فرآیند لجن فعال یک کارخانه نساجی جدا سازی بود برای رنگ زدای و سم زدایی به صورت متوالی برای

[4] Anoxic up-flow packed bed reactor

چهار رنگ آزو راکتیو سولفونه در یک فرایند پیوسته ساکن/هوادهی[5] استفاده گردیده است. در طول فرایند تصفیه زیستی با استفاده از این سویه، فعالیت تیروزینازی مشاهده شده که نقش این آنزیم را در فرآیند رنگ‌زدایی و تجزیه نشان می‌دهد، اما هیچ فعالیتی برای لاکاز و پراکسیداز مشاهده نشده است (فرانسیسکون و همکاران ۲۰۱۲). با توجه به خصوصیات *B. paralicheniformis* SN7 پیشنهاد می‌گردد تحقیق برای استفاده از این سویه جهت مصارف صنعتی در رنگ‌زدایی رنگ‌های فاضلاب نساجی به روش مذکور صورت گیرد.

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش سویه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده رنگ‌های آزو پرکاربرد از یک تصفیه خانه فاضلاب صنعت نساجی جداسازی شد. از میان باکتری‌های جدا شده، سویه‌های گرمادوست اختیاری غربال شده و توانایی تجزیه و رنگ‌زدایی در آنها بررسی و *B. paralicheniformis* SN7 بعنوان باکتری دارای توانایی بالا در تجزیه رنگ معرفی شد. میزان توانایی *B. paralicheniformis* SN7 در رنگ‌زدایی رنگ‌های مختلف متفاوت است که این موضوع ممکن است به ساختار و پیچیدگی ساختمان مولکولی رنگ مرتبط باشد. با توجه به ویژگی‌های *B. paralicheniformis* SN7 پیشنهاد می‌گردد پژوهش بیشتر برای بهره‌گیری از این سویه برای کاربرد صنعتی آن در رنگ‌زدایی رنگ‌های فاضلاب نساجی به روش یاد شده انجام گیرد.

[5] Static/aerobic

منابع مورد استفاده

Asad S, Amoozegar MA, Pourbabaee AA, Sarbolouki MN and Dastgheib SM, 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. Bioresource Technology 98(11):2082–2088.

Awaleh MO and Soubaneh YD, 2014. Waste water treatment in chemical industries: The concept and current technologies. Hydrology Current Research 5(1): 1-12.

Celia MP and Suruthi S, 2016. Textile dye degradation using bacterial strains isolated from textile mill effluent. International Journal of Applied Research 2(3):337–341.

Dellamatrice PM, Silva-Stenico ME, Moraes LA, Fiore MF and Monteiro RT, 2017. Degradation of textile dyes by cyanobacteria. Brazilian Journal of Microbiology 48: 25-31.

Franciscon E, Grossman MJ, Paschoal JAR, Reyes FGR and Durrant LR, 2012. Decolorization and biodegradation of reactive sulfonated azo dyes by a newly isolated *Brevibacterium sp*. strain VN-15. Springerplus 1(1):37.

Ghaly AE, Ananthashankar R, Alhattab M and Ramakrishnan VV, 2014. Production, characterization and treatment of textile effluents: A critical review. Chemical Engineering & Process Technology 5: 182.

Jiraratananon R, Sungpet A and Luangsowan P, 2000. Performance evaluation of nanofiltration membranes for treatment of effluents containing reactive dye and salt. Desalination 130(2): 177-183.

Kurade MB, Waghmode TR, Patil SM, Jeon BH and Govindwar SP, 2017. Monitoring the gradual biodegradation of dyes in a simulated textile effluent and development of a novel triple layered fixed bed reactor using a bacterium-yeast consortium. Chemical Engineering Journal 307:1026–1036.

Ngo ACR and Tischler D, 2022. Microbial degradation of azo dyes: Approaches and prospects for a hazard-free conversion by microorganisms. International Journal of Environmental Research and Public Health 19(8): 4740.

Punzi Marisa, 2015. Treatment of Textile Wastewater by Combining Biological Processes and Advanced Oxidation. PhD Thesis, Lund University, Sweden.

Sonune N and Anil Garode, 2018. Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer Bacillus licheniformis from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. Biotechnology Research and Innovation 2 (1): 37-44.

Swathi D, Sabumon PC and Trivedi A, 2021. Simultaneous decolorization and mineralization of high concentrations of methyl orange in an anoxic up-flow packed bed reactor in denitrifying conditions. Journal of Water Process Engineering 40: 101813.

Tigini, V, Bevione F, Prigione V, Poli A, Ranieri L, Spennati F, Munz G and Varese GC, 2019. Wastewater-Agar as a selection environment: A first step towards a fungal in-situ bioaugmentation strategy. Ecotoxicology and Environmental Safety171: 443–450.