

Evaluation of biodecolorization of the textile azo dye by halophilic archaea

Masoomeh Selseleh Hassan-Kiadehi

MSc of Microbiology, University of Tehran, Tehran, Iran, m.selseleh@ut.ac.ir

Mohammad Ali Amoozegar *

Professor of Microbiology, University of Tehran, Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir

Sedigheh Asad

Assistant professor of Biotechnology, University of Tehran, Tehran, Iran, Asad@ut.ac.ir

Abstract

Introduction: Azo dyes are the biggest group of colors. One of the special characteristic of this group of dye is the presence of double bonds of Nitrogen (N=N). Several studies reported biodecolorization using microorganisms, so far. However, it is for the first time to our knowledge that decolorization by halophilic archaea have been reported.

Materials and methods: Among the 15 strains of archaea isolated from Qeshm saline cave and 7 type strains from Iranian biological resource center, 2 strains showed high ability in decolorization of azo dye. Effects of different factors including pH (5-9), temperature (30-50 °C), various salt concentrations (12.5-30%), different concentrations of dye (400-5000 mg/L), different carbon sources and several nitrogen sources and agitation have been measured after 4 days of incubation in static condition. Moreover, the toxicity tolerance of halo archaeal strains to dye, growth and decolorization rates were studied. Statistical significance was assessed by ANOVA Tukey's multiple comparison test.

Results: Strain A with 99.1 % similarity to *Halogeometricum borinquense* and strain B with 99.4 % similarity to *Haloferax mediterranei* were the best decolorizing strains. Both strains had their highest decolorization rate in the presence of NaCl (15-17.5 %), pH 7, microaerophilic condition and yeast extract as nitrogen source. *Halogeometricum borinquense* showed higher decolorization rate in the presence of saccharose and glucose as carbon sources at 45 °C temperature and for *Haloferax mediterranei* temperature of 40 °C and propionic acid as carbon source were best decolorizing conditions. These strains were able to decolorize dyes at 1000 mg/L concentration and tolerate dye concentrations to the highest level of 5000 mg/L.

Discussion and conclusion: In conclusion, our results indicate that halophilic archaea have very high potential to decolorize azo dyes. Regarding high amounts of salts in textile wastewaters, using such microorganisms which can tolerate the harsh environment in order to decolorize azo dyes, could be a new approach in this field.

Key words: Azo dyes, halophilic archaea, decolorization, *Haloferax mediterranei*, *Halogeometricum borinquense*

* Corresponding author

Received: January 20, 2016 / **Accepted:** November 5, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۱۷-۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵

ارزیابی رنگ‌زدایی زیستی ترکیبات رنگی آزو توسط آرکی‌های نمک‌دوست

مصومه سلسه حسن کیادهی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، m.selseh@ut.ac.ir
محمد علی آموزگار*: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
صدیقه اسعد: استادیار بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، asad@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: رنگ‌های آزو بزرگ‌ترین گروه رنگی را تشکیل می‌دهند که وجود پیوندهای $N=N$ متصل به گروه‌های آروماتیک، از ویژگی‌های بارز این رنگ‌ها است. تاکنون مطالعات زیادی در رنگبری زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته است؛ اما مطالعه رنگبری توسط آرکی‌های نمک‌دوست برای اولین بار گزارش شده است.

مواد و روش‌ها: از میان ۱۵ سویه جدا شده از غارنمکی قشم ایران و ۷ سویه تایپ نگهداری شده در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، ۲ سویه توانایی بالایی در رنگبری از رنگ‌های آزو را از خود نشان دادند. اثر فاکتورهای مختلف شامل pH (۵-۹)، دمای (۳۰-۵۰)، غلظت نمک (۳۰-۱۲/۵ درصد)، غلظت‌های مختلف رنگ (۴۰۰-۵۰۰ میلی گرم بر لیتر)، منابع کربن و نیتروژن و هوادهی مختلف در این دو سویه منتخب پس از چهار روز گرماگذاری در شرایط ایستا بررسی شد. همچنین اثر سمیت رنگ بر آرکی‌ها انجام شد. هم‌زمان با میزان رنگبری، رشد نیز سنجیده شد. از آزمون آماری آنوا به منظور مشخص کردن اختلاف معنادار استفاده شد.

نتایج: سویه A با درصد شباهت ۹۹/۱ به *Halogeometricum borinquense* و سویه B با درصد شباهت ۹۹/۴ به *Haloferax mediterranei* بهترین سویه‌های رنگبر بودند. هر دوی سویه‌ها در NaCl بین ۱۵ تا ۱۷/۵ درصد، ۷pH شرایط ایستا و بهترین رنگبری را در حضور عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن داشتند. اگرچه بررسی‌ها در دمای ۴۵ درجه و منبع کربن ساکارز و گلوکز برای *Halogeometricum borinquense* بیشترین رنگبری را نشان می‌داد؛ *Haloferax mediterranei* بهترین رنگبری را در دمای ۴۰ درجه و منبع کربن پروپیونیک اسید داشت. هر دو سویه در غلظت‌های حدود ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر قابلیت رنگبری داشتند و تا غلظت ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر رنگ را تحمل می‌کردند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که آرکی‌های نمک‌دوست توانایی زیادی در رنگبری دارند. با توجه به شوری پساب‌های نساجی، استفاده از این میکروارگانیسم‌ها مهم به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: رنگ‌های آزو، آرکی‌های نمک‌دوست، رنگبری، *Halogeometricum borinquense*
Haloferax mediterranei

* نویسنده مسئول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

مقدمه

رنگ‌های آزو با پیوند دوگانه نیتروژن متصل به گروه‌های آروماتیک، شناخته می‌شوند (۱). دست‌کم ۳۰۰۰ نوع رنگ آزو در صنایع نساجی، کاغذ، غذایی، آرایشی و دارویی استفاده می‌شوند. از میان کاربردهای متنوع رنگ‌های سنتتیک، سالیانه بیش از ۳۰۰۰۰ تن مواد رنگی مختلف در جهان تولید می‌شوند که در میان آنها رنگ‌های آزو بیش از ۶۰ درصد رنگ‌ها را در کارخانه‌ها تشکیل می‌دهند (۲). رنگ‌ها براساس کاربرد و ساختار شیمیایی دسته‌بندی می‌شوند. آنها حاوی کروموفور و اگزوکروم هستند. کروموفورها به گروه‌هایی از اتم‌ها گفته می‌شود که عامل رنگی، رنگ‌ها هستند. اگزوکروم‌ها شامل یک الکترون کشنده و یک دهنده الکترون هستند که موجب افزایش رنگ کروموفور می‌شوند. از مهم‌ترین کروموفورها، آزو (-N=N-)، کربونیل (-C=O)، متین (C=H)، نیترو (-NO₂) و رنگ‌های کوئینویدی می‌توان اشاره کرد و از مهم‌ترین اگزوکروم‌ها، آمین (NH₃-)، کربوکسیل (-COOH)، سولفونات (-SO₃H) و هیدروکسیل (-OH) هستند (۳). روزانه مقادیر زیادی از این رنگ‌ها در نتیجه فعالیت‌های مختلف صنعتی (به‌ویژه کارخانه‌های نساجی) وارد پساب‌ها می‌شوند که این رنگ‌ها بر منابع آبی، خاک و ارگانیسم‌ها آثار مخرب می‌گذارند (۴). در طول فرآیند رنگ‌رزی همه رنگ‌ها به فیبرها وصل نمی‌شود و مقداری از رنگ‌ها در حمام رنگ باقی می‌ماند؛ به‌طوری که ۲۰ درصد رنگ‌های اسیدی، ۳۰ درصد رنگ‌های مستقیم و ۵۰ درصد رنگ‌های راکتیو در پساب‌ها آزاد می‌شوند (۵). مقدار رنگی که استفاده شده ناچیز است؛ ولی مشکل اصلی پایداری این رنگ‌ها در پساب‌هاست که در نتیجه با داشتن یک یا

چند گروه سولفونیک‌اسید در حلقه آروماتیک آنها باعث مهار رشد یا مهار سنتز اسیدهای نوکلئوتید می‌شوند (۶). مقاومت رنگ‌های آزو به دلیل وجود پیوند شدیداً الکترون‌کشنده آزو به اکسیژن‌ها و وجود گروه‌های آروماتیکی بزرگ متصل به پیوند آزو است (۱). میزان رنگ‌زدایی به نوع، وزن مولکولی و گروه‌های جانشین رنگ بستگی دارد. ترکیبات آزو با گروه‌های هیدروکسی و آمینو نسبت به متیل، متوکسی، سولفور و نیترو بیشتر تمایل به تخریب دارند (۷). روش‌های تیمار آنزیمی و میکروبی، به‌منظور رنگبری و تجزیه رنگ‌ها، نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی، از امتیازات بالایی برخوردار است؛ از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱. قیمت پایین؛ ۲. تولید لجن با مقدار کم؛ ۳. تولید محصولات فاقد سمیت؛ ۴. سازگار با طبیعت؛ ۵. نیاز به آب کمتر در پاک‌سازی در مقایسه با روش‌های فیزیکی شیمیایی (۸). باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها، اکتینومیست‌ها، مخمرها و گیاهان میکروارگانیسم‌هایی هستند که تاکنون رنگبری در آنها مطالعه شده است (۲). نمک‌های مختلفی در صنعت نساجی به کار می‌روند، به‌طور عمومی کارخانه‌های نساجی در استفاده از رنگ‌های راکتیو، غلظتی حدود ۱۰۰-۶۰ گرم بر لیتر نمک به کار می‌برند، در نتیجه میکروارگانیسم‌ها باید قابلیت تحمل این شرایط نمکی را به‌منظور فرآیند رنگبری داشته باشند (۹). نخستین مطالعات بر توانایی رنگبری در نمک‌دوست‌ها و تحمل‌کننده آن بر گونه‌های جنس *Halomonas* انجام گرفته است (۱۰). هدف این پژوهش، مطالعه توانمندی آرکی‌های نمک‌دوست در رنگبری رنگ آزو به‌منظور استفاده از آنها در پاک‌سازی پساب‌های نساجی است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی استفاده‌شده: نمک‌ها و مواد

استفاده‌شده از شرکت مرک^۱ خریداری و رنگ‌ها از شرکت سیبا^۲ تهیه شدند.

سویه‌های میکروبی، جداسازی و خالص‌سازی: از

مجموع ۲۲ سویه، ۱۵ سویه جداشده از مناطق پرشور ایران و ۷ سویه تایپ نگهداری‌شده در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران هستند.

به‌منظور جداسازی آرکی‌های نمک‌دوست،

نمونه‌برداری از مناطق پرشور ایران صورت گرفت. برای غربالگری تلقیح نمونه آب به دو صورت مستقیم و سانتی‌فیوژ شده و نمونه‌های رسوب و نمک با تهیه سریال رقت تا رقت 10^{-7} بر محیط MGM با ۲۳ درصد نمک (در یک لیتر آب مقطر: NaCl ۱۸۳/۹ گرم؛ $MgCl_2$ ۲/۲۹ گرم؛ $MgSO_4$ ۲/۶۸ گرم؛ KCl ۵/۳۶ گرم؛ پپتون ۱ گرم، عصاره مخمر ۰/۲ گرم) انجام گرفت. pH نمونه با Tris یک مولار روی ۷/۲ تنظیم و در انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد برای یک ماه گرما‌گذاری شدند و بعد از یک ماه به محیط جدید MGM دارای ۲۳ درصد نمک انتقال داده شد و تا خالص شدن آنها این کار ادامه پیدا کرد.

شناسایی مولکولی سویه‌های میکروبی: شناسایی

سویه‌ها، از طریق توالی ژن *16S rRNA*، DNA کلنی‌های تازه رشد کرده بر محیط MGM با استفاده از روش تغییر یافته مارمور^۳، استخراج شد (۱۱). تأیید استخراج DNA، از طریق بارگذاری ۱۰ درصد از نمونه همراه با رنگ (با نسبت ۶ به ۱) بر ژل آگاروز (۰/۷ درصد) در دستگاه الکتروفورز افقی انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، از پرایمرهای 5' TCCGGTTGATCCTGCCG 3' و 5'

AGGATCAAGTGTCCGGGTGCG 3' 1530R

برای آرکی‌ها استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در سویه‌های جداسازی‌شده، به این روش صورت گرفت: واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد انجام و سپس، مرحله تکثیر آغاز شد که شامل ۳۰ چرخه تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۲ ثانیه بود. در انتها، به‌منظور تکمیل نهایی ساختارهای تکثیر شده، یک مرحله سنتز به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، به مراحل افزوده شد. پس از تکثیر توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای استفاده‌شده، نمونه محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت Bioneer در کره، فرستاده شد و توالی‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار Chromas Pro بررسی و با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعات ژنومی EzTaxon مقایسه شد و میزان شباهت آن با سویه‌های مختلف ثبت‌شده، تعیین و برای بررسی‌های بعدی ذخیره گردید.

بررسی اولیه رنگبری: ابتدا رنگبری ۲۲ سویه بر رنگ Remazol black B انجام شد سپس بعد از انتخاب چهار سویه با بیشترین رنگبری، بررسی رنگبری بر رنگ مونو آزو Acid blue 161 انجام شد و در نهایت دو سویه با بیشترین رنگبری انتخاب شدند. میزان رنگ حذف‌شده از محیط طی یک هفته به‌روش اسپکتروفتومتری شیمادزو بررسی شد.

هر کدام از ۲۲ سویه آرکی‌های نمک‌دوست به لوله‌های کشت حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت رنگبری MGM ۲۳ درصد (حاوی ۱/۸۳ گرم سدیم کلراید، ۰/۲۲ گرم منیزیم کلراید، ۰/۲۶ گرم منیزیم سولفات، ۰/۰۵۳ گرم پتاسیم کلراید، ۰/۰۲ گرم

شد.

به منظور بررسی شرایط هوازی، دو حالت هوادهی با شیکر دور ۱۵۰ rpm و ایستا در انکوباتور آزمایشی شد، محیط پایه در لوله‌ها در شیکر و انکوباتور گرماگذاری شدند. دما از فاکتور مهم در بررسی به شمار می‌رود که رنگبری در دماهای ۳۰-۳۵-۴۰-۴۵-۵۰ بررسی شد؛ همچنین برای سنجش pH با pH متر Sartorius مدل PB-11، رنگبری در pHهای مختلف ۹-۵ بررسی شد. غلظت‌های مختلف NaCl از ۱۲/۵ تا ۳۰ درصد بررسی شد؛ سپس منابع کربن ساده گلوکز، ساکارز، لاکتوز، مالتوز و اسیدهای آلی شامل استات سدیم، اسیدسیتریک و پروپیونیک اسید با غلظت نهایی ۱ درصد در محیط MGM بررسی شد. در ادامه از سه منبع نیتروژن آلی شامل عصاره مخمر، عصاره سویا، پپتون و دو منبع نیتروژن معدنی شامل اوره و سولفات آمونیوم با غلظت نهایی ۰/۵ درصد همراه با بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCl استفاده شدند و برای بررسی تحمل پذیری غلظت‌های رنگ، غلظت‌های مختلفی از رنگ بررسی شد که این غلظت‌ها شامل ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر بود. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد و محیط‌های رنگ‌دار تلقیح نشده به عنوان شاهد استفاده شدند.

برای به دست آوردن طیف جذبی هر رنگ ابتدا طیف جذبی هر رنگ از محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر رسم شد تا حداکثر طول موج جذبی هر رنگ مشخص شود. از لوله‌های گرماگذاری شده در زمان ذکر شده ۱ میلی لیتر نمونه برداشت و با دور ۱۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. میزان جذب هر رنگ در حداکثر طول موج جذبی آن اندازه‌گیری شد.

عصاره مخمر و ۰/۱ گرم پپتون گوشت، pH توسط Tris یک مولار روی ۷ تنظیم شد)، با غلظت ۵ درصد مایع تلقیح (از کدورت ۰/۵ مک فارلند آرکی معادل $10^8 \times$ (۱/۵) افزوده شدند و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. رنگ‌های آزو جدا از محیط کشت سترون شد سپس با مقدار ۵۰ میلی گرم بر لیتر به محیط‌ها اضافه شد.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی آرکی‌های منتخب:

ریخت‌شناسی کلنی‌ها در محیط MGM ۲۳ درصد بعد از یک هفته بررسی شد. رنگ آمیزی گرم (۱۲) و آزمایش گرم در KOH ۳ درصد تأیید شد (۱۳). حرکت آرکی‌ها از طریق روش‌های لام مرطوب (۱۲) تعیین شد. فعالیت کاتالاز با تولید حباب در محلول ۳ درصد هیدروژن پراکسید ارزیابی شد و فعالیت اکسیداز با استفاده از دیسک‌های آماده از شرکت Himedia تعیین شد. تحمل نمک سدیم کلرید در حضور تراکم ۵ تا ۳۰ درصد در همان محیط پایه ذکر شده سنجش شد. رشد در دماهای ۲۵ تا ۵۰ درصد در محیط پایه بررسی شد و محدوده pH برای رشد با تنظیم آن توسط Tris یک مولار بین ۴ تا ۹ درصد تعیین شد.

بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رنگبری: اثر فاکتور

مختلف با تغییر یک عامل در هر آزمایش در شرایط پایه ذکر شده انجام شد و از رنگ Remazol black B به عنوان نماینده رنگ‌های آزو استفاده شد. اثر عوامل مختلف در روز چهارم بررسی گردید. همچنین هم‌زمان با بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رنگبری، رابطه بین رشد آرکی‌ها و رنگبری در حضور همان فاکتور نیز سنجیده شده است. رشد آرکی‌ها از طریق تراکم نوری (OD) و توسط اسپکتروفوتومتر شیمادزو بررسی شد. براساس آزمون آنوا معنادار بودن همه فاکتورها بررسی

درصد رنگبری طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$D (\%) = (A - A_0) / A \times 100$$

A = جذب در محیط، پس از رنگبری

A₀ = جذب محیط شاهد (رنگی)

D = درصد رنگبری

به منظور بررسی میزان رشد باکتری بعد از رنگبری ابتدا ۱ میلی لیتر از نمونه‌ها برداشته شد و تراکم نوری (OD) آنها با دستگاه اسپکتروفوتومتری شیمادزو در طول موج ۶۲۰ نانومتر جذب آنها خوانده شد و بعد از سانتیفریژ با دور ۱۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جذب آنها در همین طول موج خوانده شد. در نهایت با تفریق این داده‌ها میزان رشد در محیط رنگبری به دست آمد.

بررسی سمیت رنگ بر آرکی‌ها: پس از قرار گرفتن آرکی‌ها به مدت ۲۰ روز در محیط دارای رنگ، محیط مایع با استفاده از سانتیفریژ با دور ۱۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه رسوب گذاری شد و رسوب حاصل، در محیط جامد کشت داده شد و رشد بعد از یک هفته بررسی شد.

نتایج

سویه‌های میکروبی و شناسایی سویه‌های جدا شده:

سویه‌های تایپ نگهداری شده در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران^۵ شامل *Haloarchaeobius* IBRC-M 10013، *Halovivax limisalsi iranensis* IBRC-M 10022، *Halovivax certinus* IBRC-M 10256، *Halopenitus persicus* IBRC-M 10041، *Halorienticus persicus* IBRC-M 10043، *Halovenus aranensis* IBRC-M 10015 و *Halopenitus Malekzadehii* IBRC-M 10418 بودند.

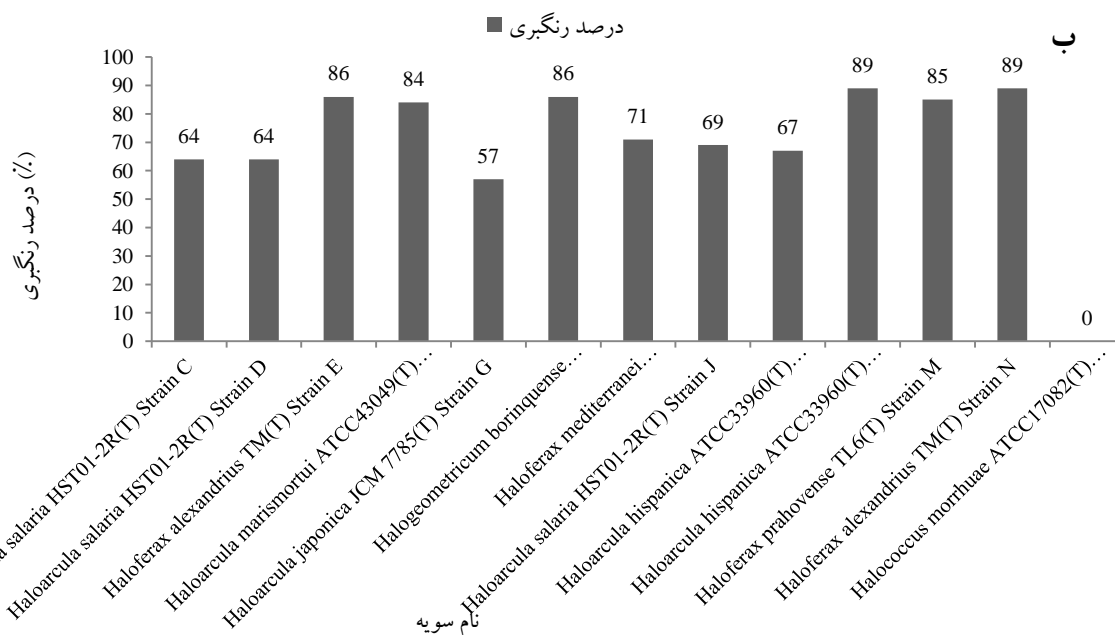
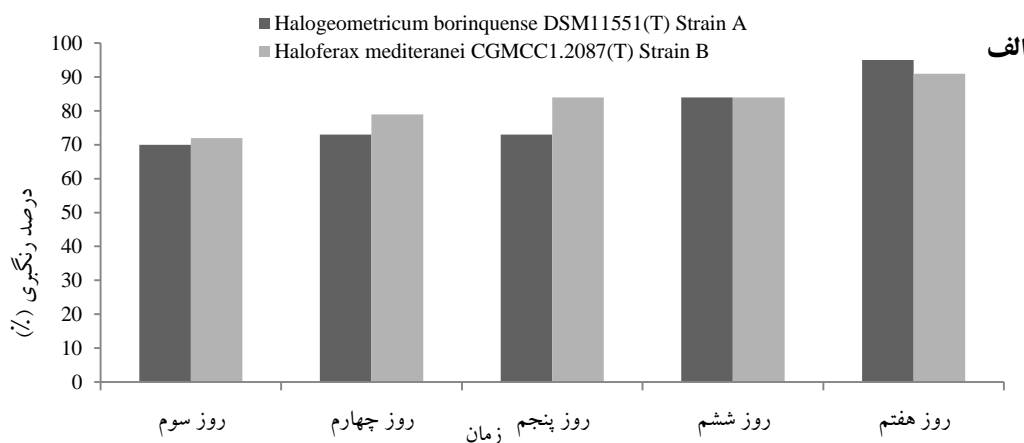
بررسی‌های مولکولی از سویه‌های جدا شده از مناطق مختلف پرشور ایران صورت گرفت و ۱۵ سویه آرکی‌های نمک‌دوست شناسایی شدند. آنها در محدوده نمک ۱۲/۵ تا ۳۰ درصد رشد می‌کنند. جدول ۱، نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های آرکی و میزان شباهت آنها با نزدیک‌ترین گونه‌های شناخته شده را نشان می‌دهد.

جدول ۱- مقایسه توالی ژن 16S rRNA سویه‌های آرکی‌های نمک‌دوست جدا شده

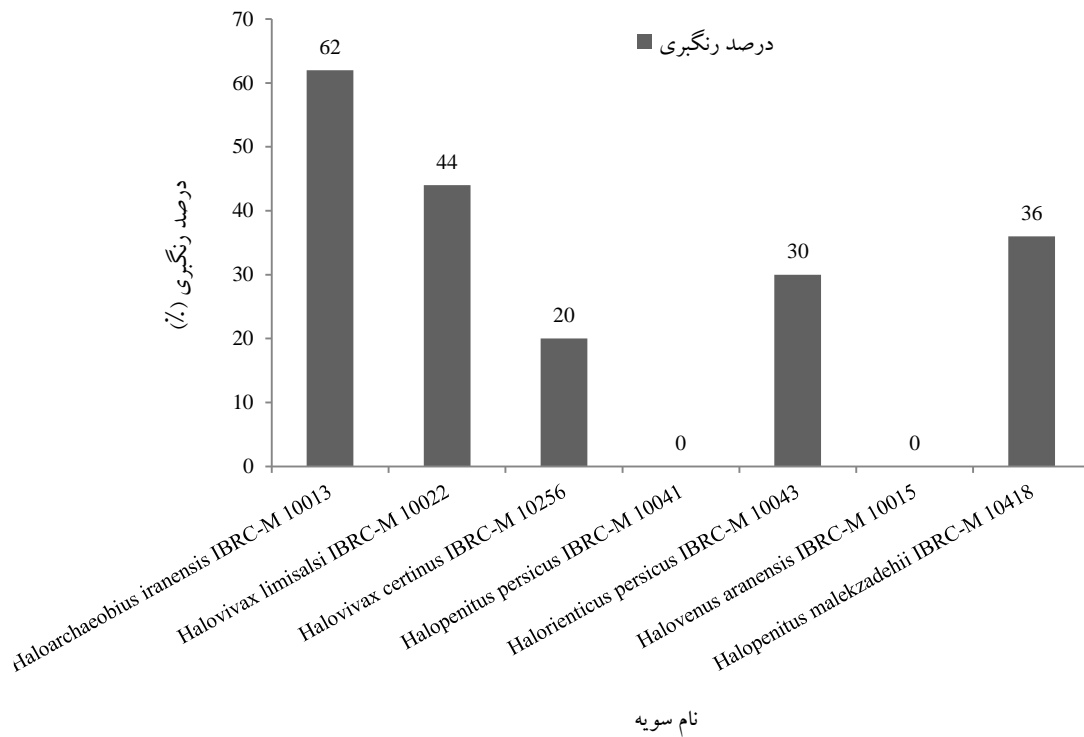
ردیف	نام سویه	بیشترین میزان شباهت به گونه‌های تایپ	درصد شباهت براساس ژن 16S rRNA
۱	A	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM11551 (T)	۹۹/۱
۲	B	<i>Haloferax mediterranei</i> CGMCC1.2087 (T)	۹۹/۴
۳	C	HST01-2R (T) <i>salaria</i> <i>Haloarcula</i>	۹۷/۴
۴	D	HST01-2R (T) <i>Haloarcula salaria</i>	۹۷/۱
۵	E	<i>Haloferax alexandrius</i> TM (T)	۹۹/۸
۶	F	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC43049 (T)	۹۷/۳
۷	G	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785 (T)	۹۸/۷
۸	H	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM11551 (T)	۹۹
۹	I	<i>Haloferax mediterranei</i> CGMCC1.2087 (T)	۹۹/۳
۱۰	J	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R (T)	۹۸
۱۱	K	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC33960 (T)	۹۷/۸
۱۲	L	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC33960 (T)	۹۹/۶
۱۳	M	<i>Haloferax prahovense</i> TL6 (T)	۱۰۰
۱۴	N	<i>Haloferax alexandrius</i> TM (T)	۹۹/۹
۱۵	O	<i>Halococcus morrhuae</i> ATCC17082 (T)	۹۸/۵

Halogeometricum borinquense و سویه B با شباهت ۹۹/۴ به آرکی *Haloferax mediteranei* بودند. در مرحله بعد توانایی رنگبری چهار سویه برتر بر رنگ مونو آزو Acid blue 161 بررسی شد که در شکل ۳ نشان داده شده است و در نهایت سویه A و سویه B به‌عنوان سویه‌های برتر انتخاب شدند. رنگبری دو سویه برتر A و B را در شکل ۱ (الف)، ۳ و ۴ مشاهده می‌کنید.

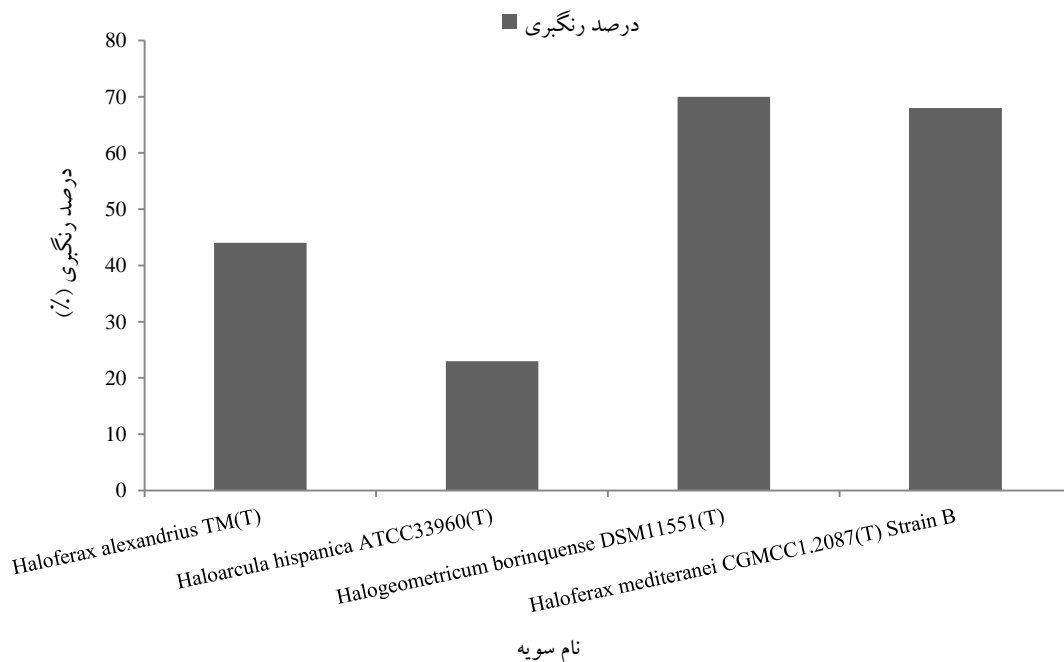
آزمون رنگبری: رنگبری رنگ‌های آزو در ۲۲ سویه بررسی شد و نتایج در شکل ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. از میان ۲۲ سویه آرکی نمک‌دوست، چهار سویه به‌عنوان سویه‌های برتر در رنگبری رنگ دی آزو Remazol black B شناسایی شدند که شامل سویه‌های N با شباهت ۹۹/۹ به آرکی *Haloferax alexandrius*، سویه L با شباهت ۹۹/۶ به آرکی نمک‌دوست *Haloarcula hispanica*، سویه A با شباهت ۹۹/۱ به



شکل ۱- بررسی اولیه رنگبری آرکی‌های نمک‌دوست بر رنگ Remazol black B با اسپکتروفتومتری (حذف رنگ بر حسب درصد) الف. سویه‌های منتخب از روز سوم تا هفتم ب. سویه‌های جدا شده از غار نمکی در روز هفتم



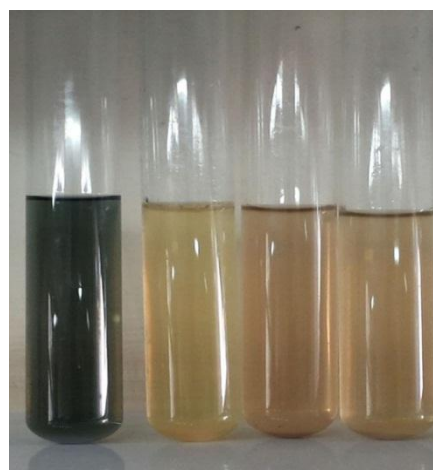
شکل ۲- بررسی اولیه رنگبری آرکی‌های تایپ (از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران گرفته شد) بر رنگ Remazol black B در روز هفتم با اسپکتروفتومتری (حذف رنگ بر حسب درصد)



شکل ۳- رنگبری چهار آرکی نمک‌دوست منتخب بر رنگ ۱۶۱ Acid blue در روز هفتم با روش اسپکتروفتومتری (حذف رنگ بر حسب درصد)

رنگبری هم در شرایط ایستا و هم در شرایط هوادهی صورت می‌گیرد. در سویه B در شرایط هوازی رشد بیشتری دارد اما در شرایط بی‌هوازی رنگبری بهتری نشان داده شده است. در سویه A در شرایط ایستا هم رشد و هم رنگبری بهتری دیده شد.

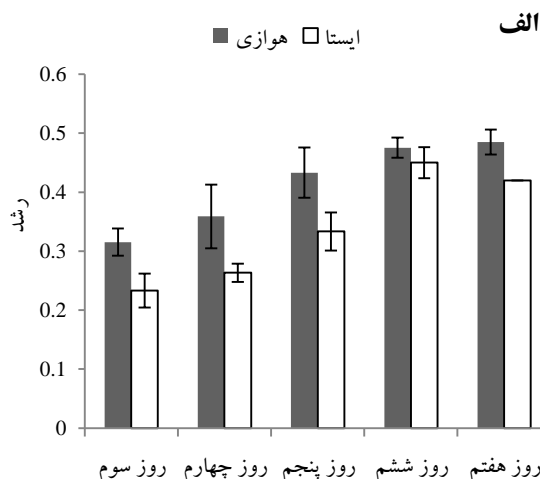
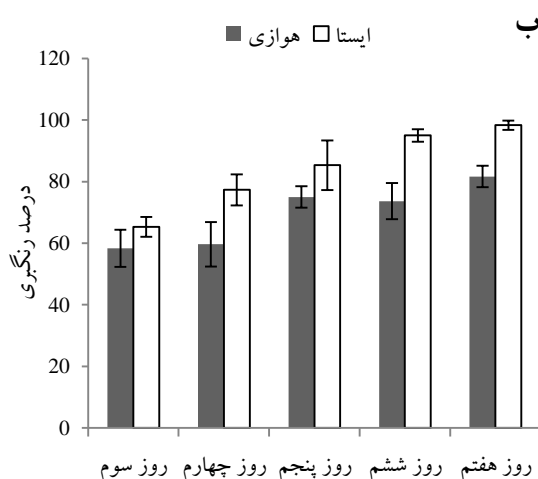
اثر دماهای مختلف بر رنگبری: اثر دما بر رنگبری در سویه‌های منتخب در شکل ۷ نشان داده شده است. بهترین دمای رنگبری در *Haloferax strain B* (در دمای ۴۰) با ۷۷ درصد رنگبری گزارش شد. با توجه به آزمون آنوا از نظر آماری تفاوت معناداری در رنگبری بین دماهای ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد وجود ندارد؛ اما تفاوت معناداری بین دمای ۴۰ با دماهای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد وجود دارد. از آنجا که در دمای ۴۰ میزان رشد کمتری نسبت به دمای ۴۵ و ۵۰ دارد، بهینه رنگبری در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد. در آرکی *Halogeometricum strain A* در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد ۹۴ درصد رنگبری مشاهده شد که تفاوت معناداری با بقیه دماها داشت.



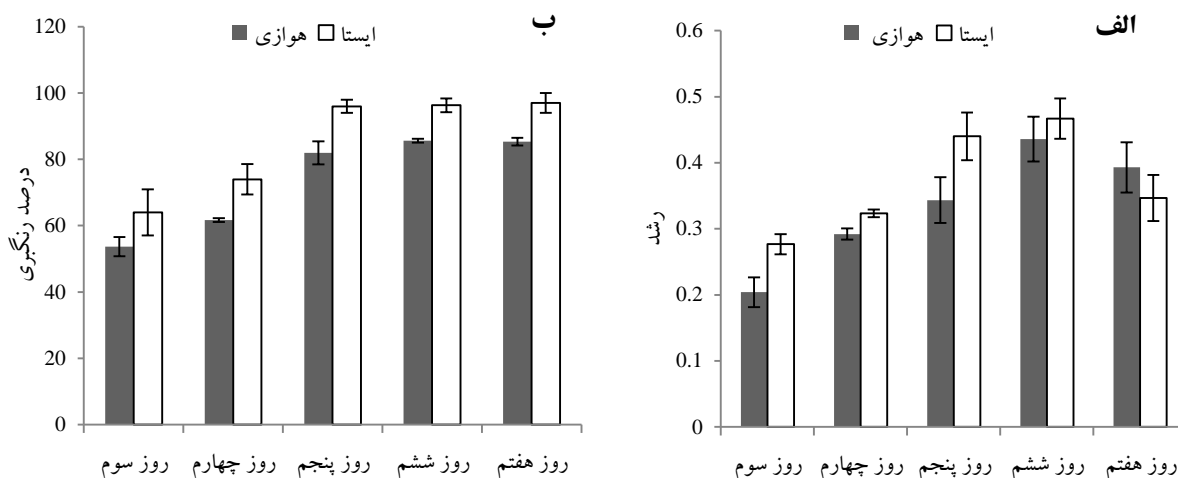
شکل ۴- رنگبری دوسویه آرکی برتر *Haloferax mediterranea strain B* و *Haloferax mediterranea strain A* در محیط پایه رنگبری با Remazol black B از چپ به راست به ترتیب: محیط شاهد حاوی Remazol black B (بدون تلقیح سویه مورد نظر)، محیط پایه بدون تلقیح سویه و رنگ، محیط حاوی رنگ Remazol Black B به همراه تلقیح *Haloferax mediterranea strain B* پس از ۴ روز، محیط حاوی رنگ Remazol Black B به همراه تلقیح *Haloferax mediterranea strain A* پس از ۴ روز

اثر فاکتورهای مختلف در سویه‌های منتخب

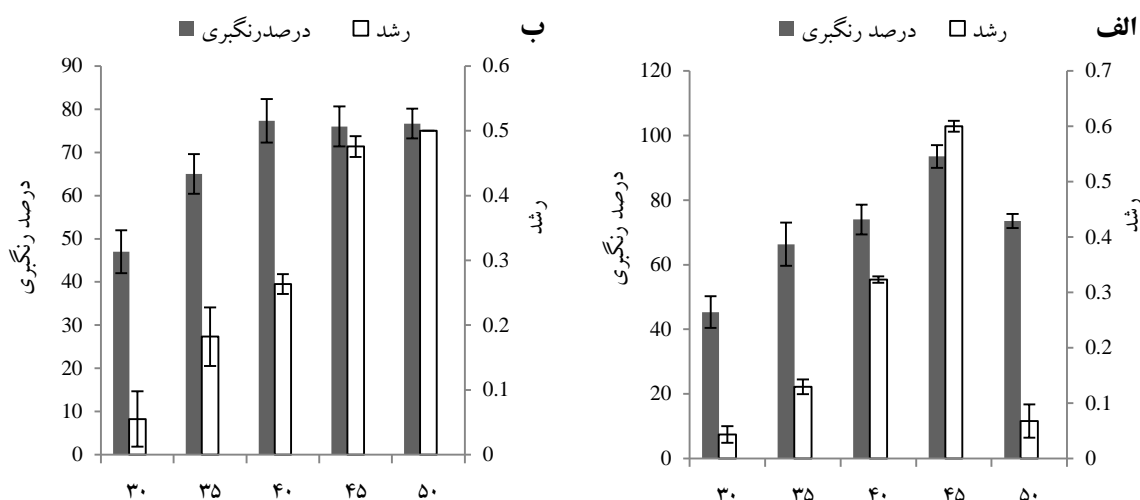
اثر هوادهی بر رنگبری: اثر هوادهی بر رنگبری بررسی شد و نتایج در شکل ۵ و ۶ نشان داده شده است.



شکل ۵- مقایسه رشد و رنگبری در شرایط هوازی و ایستا در *Haloferax strain B* الف. رشد ب. رنگبری



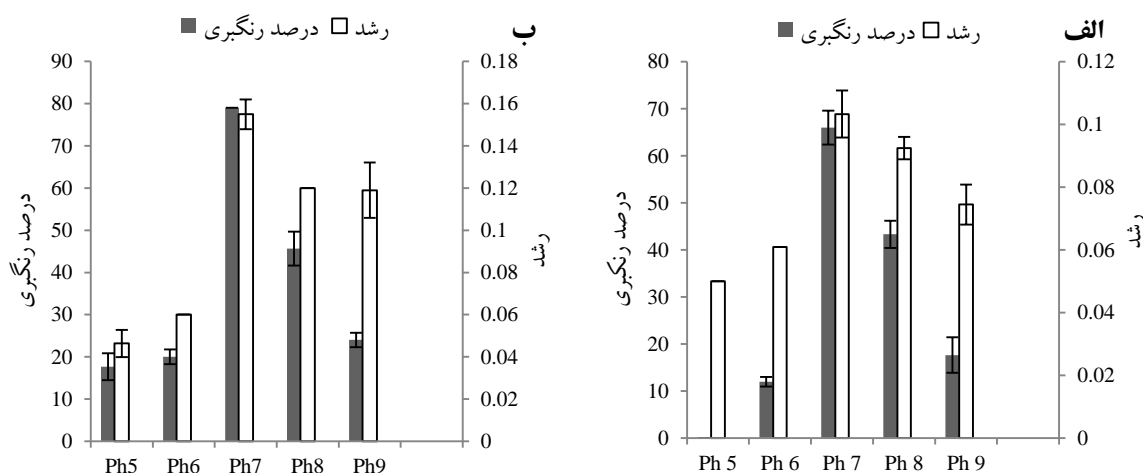
شکل ۶- مقایسه رشد و رنگبری در شرایط هوازی و ایستا در *Halogeometricum strain A*. رشد ب. رنگبری



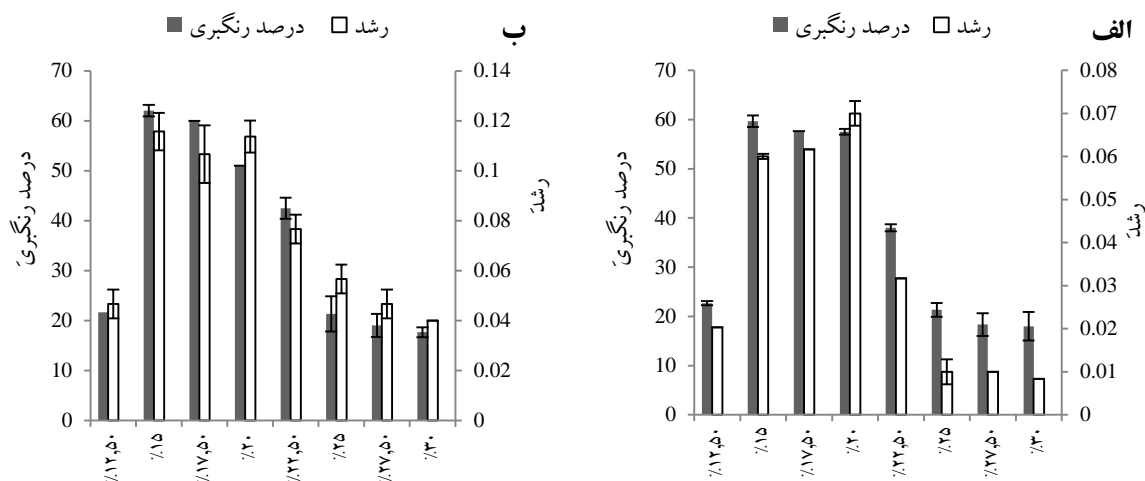
شکل ۷- رابطه بین رشد و رنگبری در دماهای مختلف الف. در *Halogeometricum strain A*. ب. *Haloferax strain B*

اثر غلظت‌های مختلف از NaCl: غلظت‌های مختلف NaCl از ۱۲/۵ تا ۳۰ درصد بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۹ نیز ملاحظه می‌شود *Halogeometricum strain A* به دلیل اینکه تفاوت معنی‌داری بین ۱۵ درصد با ۱۷/۵ درصد نمک هم در رنگبری و هم در رشد ندارد و بهترین رنگبری و رشد در هر دو درصد‌های نمک است. در *Haloferax strain B* در غلظت نمک ۱۷/۵ درصد بیشترین رنگبری و رشد دارد.

اثر pH‌های مختلف بر رنگبری: اثر pH بر رنگبری در سویه‌های آرکی منتخب در شکل ۸ نشان داده شده است. در آرکی *Halogeometricum strain A* در pH ۷ بیشترین رنگبری و رشد میکروارگانیسم مشاهده شد و در آرکی منتخب *Haloferax strain B* نیز در همین pH بیشترین رنگبری دارد.



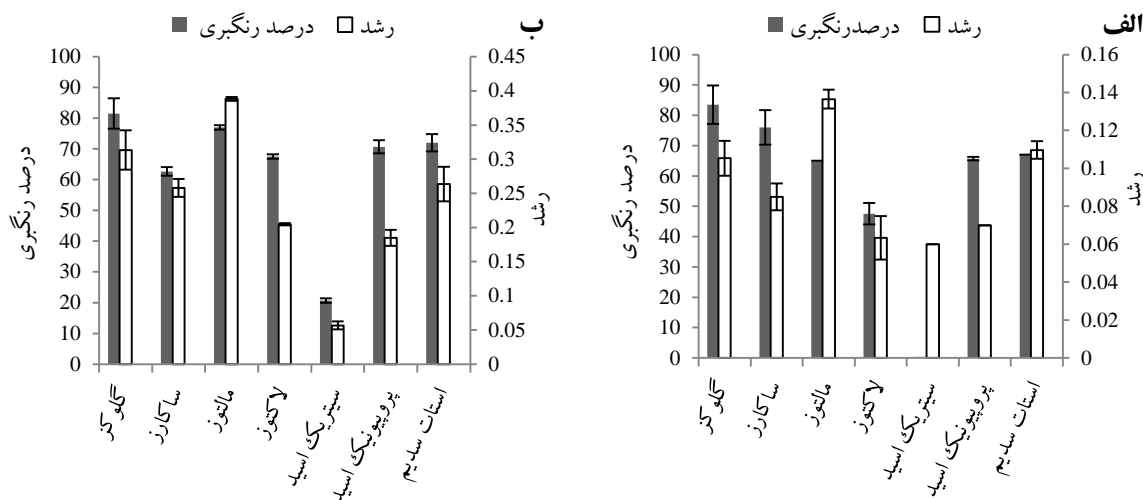
شکل ۸- نمودار اثر pH مختلف بر رنگبری الف. *Halogeometricum* strain A. ب. *Haloferax* strain B



شکل ۹- نمودار اثر غلظت‌های مختلف نمک بر رنگبری الف. *Halogeometricum* strain A. ب. *Haloferax* strain B

بهترین شرایط را به خود اختصاص می‌دهد. در سویه *Halogeometricum* strain A ساکارز تفاوت معنی‌داری با گلوکز و استات سدیم ندارد و رشدش با استات سدیم تفاوت معنادار دارد؛ اما با گلوکز این گونه نیست؛ پس ساکارز و گلوکز هردو منبع کربن مناسب برای این سویه هستند.

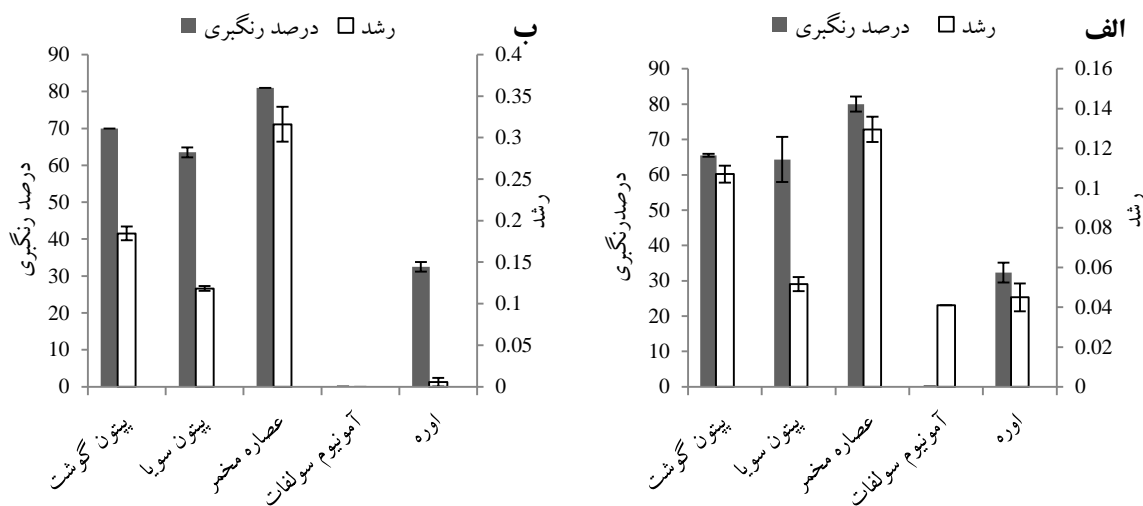
اثر منابع مختلف کربن بر رنگبری: اثر منابع مختلف کربنی بر رشد و رنگبری سویه‌های منتخب در شکل ۱۰ نشان داده شده است. در سویه *Haloferax* strain B براساس آزمون آنوا تفاوت معناداری بین قندها در رنگبری به جز سیتریک اسید وجود ندارد؛ ولی با توجه به اینکه تفاوت معناداری در رشدشان دیده می‌شود، در حضور قند پروپیونیک اسید با داشتن کمترین رشد



شکل ۱۰- نمودار اثر منابع کربن مختلف بر رنگبری الف. *Halogeometricum* strain A. ب. *Haloferax* strain B

میلی‌مولار Tris-Hcl استفاده شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در حضور مخمر رشد و رنگبری بیشترین درصد را به خود اختصاص داده است. پس از مخمر، پیتون گوشت و پیتون سویا بیشترین میزان رنگبری را دارند. در حضور اوره رنگبری کاهش یافته و در حضور آمونیوم سولفات رنگبری دیده نشده است.

اثر منبع نیتروژن بر رنگبری: اثر منابع مختلف نیتروژن بر رشد و رنگبری رنگ ریمازول بلک توسط سویه‌های آرکی منتخب در شکل ۱۱ نشان داده شده است. در این آزمایش از سه منبع نیتروژن آلی شامل عصاره مخمر، عصاره سویا، پیتون و دو منبع نیتروژن معدنی شامل اوره و سولفات آمونیوم همراه با بافر ۵۰



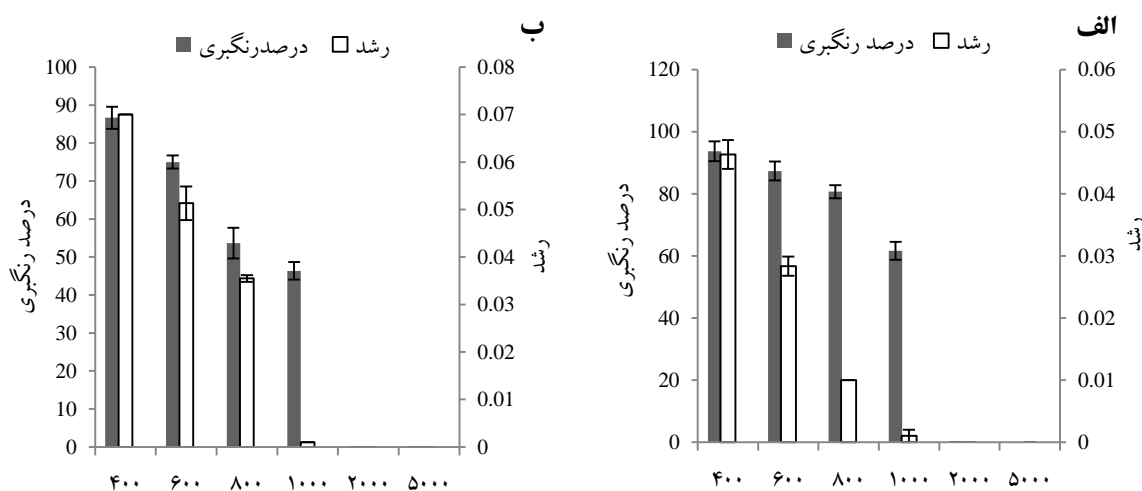
شکل ۱۱- نمودار اثر منابع نیتروژن متفاوت بر رنگبری الف. *Halogeometricum* strain A. ب. *Haloferax* strain B

در غلظت ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر رنگبری در هیچ کدام از سویه‌ها مشاهده نشد.

بررسی سمیت رنگ بر آرکی‌ها: پس از ۲۰ روز که آرکی‌ها در محیط دارای رنگ قرار گرفت، با ساتریفوژ ۱۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه، رسوب در محیط جامد کشت داده شد و با گذشت دو هفته هر دو سویه منتخب در غلظت ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر رشد کردند.

اثر غلظت‌های مختلف رنگ: رنگبری در غلظت‌های

مختلف بررسی شد. این غلظت‌ها شامل ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر است که در شکل ۱۲ درصد رنگبری‌شان گزارش داده شده است. از آنجا که همه فاکتورها در روز ۴ بررسی شده است، در بررسی غلظت رنگ، به دلیل اینکه در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر رنگبری در روز چهارم مشاهده نشد، در روز دهم بررسی‌ها صورت گرفته است. گفتنی است که



شکل ۱۲- نمودار اثر غلظت‌های مختلف رنگ بر رنگبری الف. strain A. *Haloferax* ب. strain B

Methanospirillum و *Methanococcus voltaei*

hungat JF1 بودند که اثر رنگبری آنها بر رنگ‌های راکتیو بررسی شد (۱۵). در مطالعات دیگر رنگبری رنگ‌های آزو توسط گروهی از آرکی‌ها با استفاده از راکتور ZVI-UASB صورت گرفته است، نام این آرکی‌ها ذکر نشده است اما از گروه متانوژن بودند (۱۶). در رابطه با میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست در باکتری‌های نمک‌دوست رنگبری گزارش شده است، نخستین بار اسد^۶ و همکارانش باکتری‌های نمک‌دوست *Halomonas* sp. A3، *Halomonas* sp. D2

بحث و نتیجه‌گیری

سالانه میلیون‌ها تن از رنگ‌های آزو تولید می‌شود و ۱۰ تا ۱۵ درصد آن وارد پساب‌ها و در نتیجه وارد محیط اطرافمان می‌شود و حیات موجودات و محیط‌زیست را با خطر جدی روبه‌رو می‌کند (۱۴).

مطالعاتی مبنی بر رنگبری توسط آرکی‌های غیرنمک‌دوست صورت گرفته است از آن جمله در بررسی رنگبری آرکی‌های غیرنمک‌دوست می‌توان به آرکی‌های متانوژنیک (در کنسرسیون بی‌هوازی ترموفیل) اشاره کرد. این آرکی‌ها شامل *M.barkeri*

داده‌ها بررسی شد. در نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، شرایط هوادهی تفاوت‌چندانی با رنگبری در شرایط ایستا وجود ندارد اما باوجود رشد کمتر در شرایط ایستا، این شرایط مناسب‌تر در نظر گرفته شده است. رشد کمتر به این دلیل اهمیت دارد که جمعیت کمتری از این آرکی‌ها در پساب وجود دارند و راحت‌تر و با هزینه کمتری از پساب‌ها، در مراحل انتهایی تصفیه پساب، جمع‌آوری می‌شوند. ممکن است رنگبری در شرایط هوازی این سویه‌ها، به این دلیل باشد که آنزیم دخیل در رنگبری این آرکی‌های نمک‌دوست، فعالیتش در حضور اکسیژن مهار نشود. در بررسی منابع کربن مختلف، سیتریک‌اسید اثر کمی در رنگبری در *Haloferax* سویه B بدون تأثیر در رنگبری *Halogeometricum* سویه A داشته است، بقیه منابع اثر قابل توجهی در رنگبری داشته‌اند. *Haloferax* سویه B در حضور قند پروپیونیک‌اسید بهترین شرایط رنگبری را به خود اختصاص می‌دهد. در *Halogeometricum* سویه A ساکارز و گلوکز هر دو منبع کربن مناسب برای این سویه هستند. رنگبری در گلوکز بیشتر گزارش شده است. گلوکز با افزایش رشد و در نتیجه افزایش تنفس و مصرف اکسیژن از محیط، شرایط بی‌هوازی را برای رنگبری فراهم می‌کند (۲۱).

سویه B در دمای ۴۰ و سویه A در دمای ۴۵ درجه رنگبری بیشتری دارند. هر دو سویه در دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه توانایی رنگبری دارند. بررسی اثر دما بر رنگبری نشان داد که افزایش دما و کاهش دما باعث کاهش رنگبری می‌شود و بهینه فعالیت آنزیم رنگبر در دماهای به‌دست‌آمده است. در مطالعات بر قارچ‌ها افزایش دما در ازین رفتن سلول و تخریب آنزیم‌های آزوردوکتاز نقش دارد (۲۲). هرچند برخی از گزارش‌ها حاکی از وجود

Halomonas sp. Gb را جداسازی کردند که قادر به رنگبری تا مقادیر بالای ۱۵ درصد نمک NaCl بود (۱۰). خلید^۷ و همکارانش، نشان دادند که *Shewanella putrefaciens AS96* قادر به رنگبری رنگ‌های آزو تا ۱۰۰ درصد در مدت زمان ۸ ساعت در غلظت نمکی ۴ درصد است (۱۷).

ساللا^۸ و همکارانش، پاک‌سازی زیستی از طریق *Gracilibacillus sp. GTY* بر رنگ Acid red B در غلظت نمکی ۱۵ درصد را بررسی کرده‌اند (۱۸).

مطالعاتی مبنی بر حضور آرکی‌های نمک‌دوست در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی وجود دارد، از آن جمله به *Halobacterium sp* می‌توان اشاره کرد. از گزارش‌های دیگر سویه آرکی EH_4 است که قادر به متابولیزه کردن ترکیبات هیدروکربن‌های اشباع است. تعدادی از آرکی‌ها مثل *Haloferax sp.* هم قادر به تجزیه اسیدهای آروماتیک هستند (۱۹). آرکی نمک‌دوست *Halorubrum* سویه Ha25 آنزیم آمیلوپولولاناز خارج سلولی نمک‌دوست و مقاوم به حلال را در غلظت بالای نمک سدیم کلراید تولید می‌کند (۲۰).

در این پروژه بررسی رنگبری و اثر عوامل مختلف بر رنگبری رنگ‌های آزو (مهم‌ترین رنگ نساجی) در ۲۲ سویه آرکی‌های نمک‌دوست که دوسویه به‌عنوان سویه برتر انتخاب شد. از میان ۲۲، دو سویه A و B که براساس شباهت‌های فیلوژنی دارای بیشترین قرابت به گونه‌های آرکی *Haloferax mediterrane* و *Halogeometricum borinquense* دارند، انتخاب شدند. هم‌زمان با بررسی اثر عوامل مختلف با رنگبری، میزان رشد و رنگبری نیز به‌طور هم‌زمان برای هر عامل مطالعه شد. با استفاده از آزمون آماری آنوا معنی‌دار بودن

است (۲۲).

در بررسی غلظت‌های مختلف نمک NaCl، بهترین رنگبری در غلظت ۱۵ تا ۱۷/۵ درصد نمک مشاهده شد و این حداکثر رنگبری هماهنگ با رشد سویه‌های آرکیایی بود. افزایش بیشتر درصد نمک بر رشد سویه‌های آرکیایی اثر مثبت داشت؛ اما در فعالیت رنگبری کاهش نشان داد. در نتیجه غلظت‌های بالاتر بر رنگبری اثر مستقل از رشد میکروارگانیسم دارد. افزایش نمک بر بار سطحی آنزیم‌ها مؤثر است.

این سویه‌ها غلظت رنگ را تا ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر را تحمل می‌کنند. همان‌طور که از داده‌های شکل ۱۲ مشاهده می‌شود این سویه‌ها در غلظت‌های ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر با وجود رشد کم، درصد رنگبری بالای ۴۰ درصد دارند. در مطالعات صورت گرفته در رنگبری Direct red 81 در *Enterococcus faecalis* YZ 66 در ۷۰۰ میلی گرم بر لیتر گزارش شد (۲۵). در مطالعات مربوط به مجموعه‌ای از باکتری‌ها در یک محیط رنگبری گزارش شده که این مجموعه قادر به رنگبری حدود ۸۷ درصد در حضور ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر رنگ است (۹) ولی با توجه به اینکه آرکی‌های بررسی شده در این پژوهش خود به تنهایی در حضور ۱۰۰۰ میلی گرم رنگ تا ۵۰ درصد رنگبری می‌کنند، توانایی این میکروارگانیسم‌ها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها در غلظت‌های بالای رنگ نشان می‌دهد. توانایی رنگبری در غلظت‌های بالای رنگ از صفاتی است که کمتر در سویه‌هایی با این توانایی گزارش شده است (۲۶). کاهش رنگبری و رشد در غلظت‌های بالای رنگ ممکن است به دلیل سمی بودن رنگ برای آرکی‌ها و مهار فعالیت متابولیکی آنها باشد. همچنین رنگ‌ها سنتز نوکلئیک‌اسیدها را مهار می‌کنند

آزوردو کتازهای پایدار در دمایی بالا هستند که قادر است تا دمای ۶۰ پایدار بماند (۲۳). با توجه به داده‌های به دست آمده از آرکی‌های نمک‌دوست این گروه از میکروارگانیسم‌ها توانایی بسیاری در رنگبری در دماهای بالاتر از ۴۰ درجه دارند و این سویه‌ها بهترین رشد را در این دماها دارند. رنگبری در سویه B تا دماهای ۵۰ درجه، بدون کاهش در درصد رنگبری صورت گرفت. با توجه به اینکه مطالعه بر آنزیم‌های رنگبری در آرکی‌های نمک‌دوست صورت نگرفته است، آنزیم موجود در این آرکی‌ها از پایداری بالایی در دماهای بالا برخوردار است و این با توجه به اینکه فرایند رنگریزی در صنایع نساجی در دماهای بالا صورت می‌گیرد یک مزیت به حساب می‌آید. همچنین با توجه به اینکه این سویه‌ها در غلظت‌های بالای ۱۵ درصد توانایی رنگبری دارند و اینکه پساب‌های نساجی شوری بالایی دارند از دیگر مزایای استفاده از این آرکی‌ها است.

اگرچه بعضی از باکتری‌ها مثل هالوموناس‌ها (۱۰) توانایی زندگی در محیط‌های شور دارند و مطالعات زیادی مبنی بر رنگبری توسط آنها وجود دارد؛ اما گزارشی از رنگبری توسط آرکی‌ها موجود نیست با وجود اینکه آرکی‌ها در شرایط شور و سخت محیطی بر باکتری‌ها غالب هستند و شانس زنده ماندن آنها در این شرایط نسبت به باکتری‌ها بیشتر است (۲۴)

در بررسی pH در هردو سویه بیشترین رنگبری در شرایط خنثی بود و این حداکثر رنگبری هماهنگ با رشد بیشتر سویه‌ها در pH ۷ بود. طبق داده‌های به دست آمده آنزیم رنگبری و بیشترین مقدار رشد آرکی‌ها در pH خنثی است. با افزایش pH میزان رشد نیز کاهش می‌یافت. بیشترین رنگبری گزارش شده در باکتری‌ها در pH ۶-۱۰ و در قارچ‌ها pH خنثی و اسیدی گزارش شده

گروه از میکروارگانیسم‌ها در شرایط مشابه به صنایع نساجی دما، نمک بالا و دیگر شرایط سخت توانایی رنگبری دارند، شرایطی که برای میکروارگانیسم‌های دیگر غیرقابل تحمل است.

References

- (1) Patil PS., Shedbalker UU., Kalyani DC., Jadhav JP. Biodegradation of Reactive Blue 59 by isolated bacterial consortium PMB11. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2008; 35 (10): 1181-1190.
- (2) Madhuri M., Rijuta G., Ganesh D., Girish R. Decolorization and detoxification of sulfonated toxic diazo dye CI Direct Red 81 by *Enterococcus faecalis* YZ 66. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2014; 12 (1): 151.
- (3) Dos Santos AB., Cervantes FJ., van Lier JB. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology* 2007; 98 (12): 2369-2385.
- (4) Saratale RG., Saratale GD., Chang JS., Govindwar SP. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2011; 42 (1): 138-157.
- (5) Rani C., Jana A., Bansal A. Potential of different white rot fungi to decolourize textile azo dyes in the absence of external carbon source. *Environmental technology* 2012; 33 (8): 887-896.
- (6) Chen K., Wu J., Liou D., Hwang S. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology* 2003; 101 (1): 57-68.
- (7) Nigam P., Banat IM., Singh D., Marchant R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochemistry* 1996; 31 (5): 435-442.

(۲۷). با توجه به نتایج به‌دست آمده در شکل ۱۰ در غلظت‌های بالای رنگ با کاهش رشد، رنگبری نیز کاهش می‌یابد. با توجه به مطالعات بر سایر میکروارگانیسم‌ها، عصاره مخمر بهترین منبع نیتروژن است که منجر به تولید NADH می‌شود و به‌عنوان دهنده الکترون عمل می‌کند و باعث کاهش رنگ آزو توسط میکروارگانیسم می‌شود (۲۲). براساس نتایج به‌دست آمده در پژوهش‌های ما در آرکی‌های نمک‌دوست نیز عصاره مخمر بهترین منبع نیتروژن در رنگبری است.

مقایسه رشد و رنگبری نشان می‌دهد که با افزایش رشد، رنگبری نیز افزایش یافته اما همه‌جا صادق نیست مثلاً در شرایط هوازی و ایستا با وجود رشد بیشتر در شرایط هوازی رنگبری تقریباً برابر شرایط ایستا است چون فرایند رنگبری، فرآیندی بی‌هوازی است.

میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک در بیوتکنولوژی دارای اهمیت هستند. از آنجاکه کارخانه‌های نساجی از نمک استفاده می‌کنند (غلظتی حدود ۶۰-۱۰۰ گرم بر لیتر نمک (۹). استفاده از این میکروارگانیسم‌ها اهمیت دارد و به‌علاوه این میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل تنش‌های ناشی از فلزات سنگین و اکسی‌آنیون‌های سمی که معمولاً در پساب‌ها وجود دارند، هستند. براساس دانش کنونی ما تاکنون گزارشی از رنگبری رنگ‌های آزو توسط آرکی‌های نمک‌دوست منتشر نشده است. با توجه به اینکه آرکی‌ها در گروه‌های فیزیولوژیکی وسیعی تقسیم‌بندی می‌شوند (نمک‌دوست، گرمادوست، اسیددوست، متانوژن و مصرف‌کننده‌های نیتروژن) (۲۴) و هرکدام از این گروه‌ها در شرایط سخت توانایی زندگی دارند و همچنین با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پروژه، این

- (8) Rathod JV. Cloning and heterologous expression of genes involved in azo dye decolorization and metabolic engineering for efficient bioremediation. [Dissertation]. India: University of Baroda; 2013.
- (9) Balapure KH., Jain K Chattaraj S., Bhatt NS., Madamwar D. Co-metabolic degradation of diazo dye—Reactive blue 160 by enriched mixed cultures BDN. *Journal of hazardous materials* 2014; 279: 85-95.
- (10) Asad S., Amoozegar MA., Pourbabae AA., Sarboloki MN., Dastgheib SMM. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource technology* 2007; 98 (11): 2082-2088.
- (11) Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of molecular biology* 1961; 3 (2): 208-218.
- (12) Gerhardt P., Murray R., Wood WA., Krieg NR. *Methods for general and molecular bacteriology*: American Society for Microbiology Washington, DC; 1994.
- (13) Baron EJ., Finegold SM., Bailey, S. *Diagnostic Microbiology*. 8th ed. St.louis: Mosby; 1990.
- (14) Kagalkar AN., Jagtab UM., Jadhav JP., Bapat VA., Govindwar SP. Biotechnological strategies for phytoremediation of the sulfonated azo dye Direct Red 5B using *Blumea malcolmii* Hook. *Bioresource technology* 2009; 100 (18) : 4104-4110.
- (15) Dos Santos AB., De Madrid MP., De Bok FAM., Satms AJM., Van lier JB., Cervantes FJ. The contribution of fermentative bacteria and methanogenic archaea to azo dye reduction by a thermophilic anaerobic consortium. *Enzyme and microbial technology* 2006; 39 (1): 38-46.
- (16) Zhang Y., Jing Y., Zhange Jingxin., Sun L., Quan X. Performance of a ZVI-UASB reactor for azo dye wastewater treatment. *Journal of chemical technology and biotechnology* 2011; 86 (2): 199-204.
- (17) Khalid A., Arshad M., Crowley DE. Decolorization of azo dyes by *Shewanella* sp. under saline conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 79 (6): 1053-1059.
- (18) Salah Uddin M., Zhou J., Qu Y., Guo J., Wang P., Zhao LH. Biodecolorization of azo dye acid red B under high salinity condition. *Bull Environ Contam Toxicol* 2007; 79 (4): 440-444.
- (19) Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008; 15 (2): 74-92.
- (20) Siroosi M., Amoozegar MA., Khajeh K., Habibi Rezaei M., Fazeli M. Purification and characterization of an extracellular halophilic and organic solvent-tolerant amylopullulanase from a haloarchaeon, *Halorubrum* sp. strain Ha25. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (7): 1-14.
- (21) Dhanve R., Shedbalkar U., Jadhav J. Biodegradation of diazo reactive dye Navy Blue HE2R (Reactive Blue 172) by an isolated *Exiguobacterium* sp. RD3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2008. 13 (1): 53-60.
- (22) Khan R., Bhawana P., Fulekar MH. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2013; 12 (1): 75-97.
- (23) Pearce CI., Loyd JR., Guthrie JT. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and pigments* 2003; 58 (3): 179-196.
- (24) Valentine DL. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5 (4): 316-323.
- (25) Sahasrabudhe MM., Salatale RG., Saratale GD., Pathade GR. Decolorization and detoxification of sulfonated toxic diazo dye CI Direct Red 81 by *Enterococcus*

- faecalis YZ 66. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2014; 12 (1): 151.
- (26) Moosvi S., Kehaira H., Madamwar D. Decolorization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; 21 (5): 667-672.
- (27) Wuhrmann K., Mechsner KI., Kappeler Th. Investigation on rate determining factors in the microbial reduction of azo dyes. *European journal of applied microbiology and biotechnology* 1980; 9 (4): 325-338.

¹- Merck

²- CIBA

³- Marmur

⁴- Polymerase Chain Reaction (PCR)

⁵- Iranian Biological Resource Center

⁶- Asad

⁷- Khalid

⁸- Salah