وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش

available online @ www.jcst.icrc.ac.ir
نشریه علمی- پژوهشی علوم و فناوری رنگ/ ۱۱ (۱۳۹۶)، ۱۵۲-۱۴۵

نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ
Journal of Color Science and Technology
www.jcst.icrc.ac.ir

بررسی رنگبری زیستی مواد رنگزای آزو توسط اکتینومیست‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک

فرزانه مهدوی زفرقندی[۱]، محمد علی آموزگار[۲*]، صدیقه اسد[۳]، مریم سیروسی[۴]

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران، کد پستی: ۱۹۳۹۵۶۴۶۶

۲ـ دانشیار، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

۳ـ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۷۶۱۴۴۱۸

۴ـ دانشجوی دکتری، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، صندوق‌پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۱۳ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۶/۶/۲۰

چکیده

هدف این مطالعه جدا کردن اکتینومیست‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک با توانایی رنگبری از مواد رنگزای آزو است. به این منظور، اکتینومیست‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک جدا شده از پساب کارخانه نساجی مرینوس قم و دریافت شده از مرکز ذخایر ژنتیکی زیستی ایران، با توجه به توانایی رنگبری از ماده رنگزای آزوی Remazol Black B مورد غربالگری قرار گرفتند و سویه‌های M18 و M77 بیشترین رنگبری را نشان دادند. توانایی رنگبری از ماده رنگزای Remazol Black B توسط این دو سویه در حضور نمک سدیم‌کلراید (۰تا ۱۵٪)، pH (۱۱-۵)، محدود دمایی (℃ ۴۰-۲۵) در شرایط ایستا مورد بررسی قرار گرفت. بهترین درصد رنگبری برای سویه‌های M18 و M77 به ترتیب در محدوده نمک ۱۲,۵ (۶۰٪) و ۱۰-۲,۵ ٪ (۷۰٪-۶۰٪)، pH بین ۷ تا ۹ (۷۰٪ در مورد سویه M18 و ۶۵٪ در مورد سویه M77) و دمای ۳۵ (۷۰٪) و ۴۰ ℃ (۶۸٪) مشاهده شد. این دو سویه گزینه‌های مناسبی برای کاربرد عملی در تصفیه پساب‌های آلوده به مواد رنگزا هستند.

واژه‌های کلیدی: مواد رنگزای آزو ، اکتینومیست‌های نمک دوست وتحمل‌پذیر نمک، رنگبری.

Evaluation of Biological Decolorization of the Textile Azo-Dyes by Halophilic and Halotolerant Actinomycetes

F. Mahdavi Zafarghandi[1], M. A. Amoozegar[*2], S. Asad[3], M. Siroosi[4]

[1.] Islamic Azad Pharmacological University of Tehran, P. O. Box: 193956466, Tehran, Iran

[2.] Department of Microbiology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, P. O. Box: 14155-6455, Tehran, Iran

[3.] Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, P. O. Box: 1417614418, Tehran, Iran

[4.] Department of Microbiology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, P. O. Box: 14155-6455, Tehran, Iran

Received: 27-08-2016 Accepted: 03-05-2017 Available online: 11-09-2017

Abstract

The aim of the present study was to isolate halophilic and halotolerant Actinomycetes with azo dye decolorization ability. To this purpose, different strains of halophilic and halotolerant Actinomycetes isolated from effluent of a textile industry and those received from microbial bank of IBRC were screened on the Remazol Black B for finding dye decolorizing ones. Two strains, M18 and M77, revealed the best decolorization results and effect of different factors including NaCl (0-15%), Temperature (25-40 °C), and pH (5-11) in static condition on their decolorization ability were studied. The best decolorization results on Remazol by Black B by M18 and M77 were at 12.5 and 2.5-10%, pH values of 7-9, and temperatures of 35 and 40 °C, respectively. According to the ability of strains to decolorize the mixed azo dyes, they can be good options for degrading azo dyes in textile effluents. J. Color Sci. Tech. 11(2017), 145-152© Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Azo-dyes, Halophilic and Halotolerant Actinomycetes, Decolorization

***Corresponding author: amoozegar@ut.ac.ir**

Archive of SID
www.SID.ir

۱ـ مقدمه

صنعت نساجی مصرف‌کننده دو سوم از مواد رنگزای سنتزی تولید شده در صنعت است. این گروه از مواد رنگزا عمدتاً ماکروملکول‌هایی هستند که به راحتی شکسته نشده و برخی از آن‌ها اثرات سمی بر روی موجودات زنده دارند [۱]. مواد رنگزای آزو که با پیوند دوگانه نیتروژن-نیتروژن متصل به گروه‌های آروماتیک شناخته می‌شوند [۲]، از لحاظ تجاری جزء مهم‌ترین گروه از مواد رنگزای سنتزی محسوب می‌گردند. دلیل اهمیت مواد رنگزای آزو، قدرت رنگی بسیار بالای این گروه و تولید آنها از مواد اولیه‌ای است که به آسانی تهیه می‌شوند.

ورود پساب صنایع نساجی آلوده به این مواد رنگزا به محیط‌زیست، موجب کاهش کیفیت آب، عدم نفوذ نور به لایه‌های زیرین آب و اثر بر حلالیت گازها شده و از طرف دیگر، سمیت خود مواد رنگزا و یا مواد حاصل از شکست آنها نیز از جمله عوامل تهدیدکننده محیط‌زیست هستند [۳]. روش‌های شیمیایی و فیزیکوشیمیایی تصفیه پساب نیز علاوه بر پر هزینه بودن، مواد دفعی زیادی را ایجاد می‌کنند که از بین بردن این مواد، مشکلات دیگری را به همراه می‌آورد [۴، ۵]. میکروارگانیسم‌ها به دلیل داشتن تنوع ژنتیکی و متابولیکی گسترده می‌توانند گزینه‌های مناسبی در پاکسازی زیستی مواد رنگزای آزو باشند. هزینه کم، عدم آسیب‌رسانی به طبیعت و تولید کم مواد دفعی از مزایای استفاده از میکروارگانیسم‌ها در این زمینه است [۵].

در ساختار بسیاری از مواد رنگزا فلزات سمی مانند کرم وجود دارند که در طی رنگرزی آزاد شده و وارد پساب می‌شوند. هم‌چنین در مراحلی از رنگرزی برای بالا بردن کارایی از نمک‌های محلول مانند کلرید سدیم و کلرید پتاسیم نیز استفاده می‌شود [۶]. با توجه به اینکه میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک، مقاومت بسیار بالایی را نسبت به شرایط سخت محیطی نظیر وجود غلظت‌های بالای نمک و آلاینده‌هایی همچون فلزات سنگین و اکسی‌آنیون‌ها از خود نشان می‌دهند، می‌توان از آنها برای تصفیه این‌گونه پساب‌ها استفاده کرد.

گروه‌های جانشین مختلفی که در ساختار مواد رنگزای آزو وجود دارد، می‌تواند بر روی فعالیت رنگبری از این مواد رنگزا تأثیرگذار باشند [۷] مثلاً وجود برخی از گروه‌ها مانند هیدروکسیل و آمین شکست مواد رنگزا را آسان‌تر و در مقابل وجود گروه‌هایی مانند متیل، متوکسی، سولفور و نیترو در ساختار مواد رنگزا شکست آن را مشکل می‌سازد [۵، ۸]. با توجه به این نکته، میکروارگانیسم‌هایی که انواع مختلفی از مواد رنگزای آزو را بی‌رنگ کنند، از ارزش زیست‌فناوری بالاتری برخوردارند [۹]. تا کنون بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی [۱۱-۹] و قارچ‌ها [۱۳، ۱۲] توانایی رنگبری مواد رنگزای آزو را از خود نشان داده‌اند.

در این پژوهش ابتدا اکتینومسیت‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک از پساب کارخانه نساجی مرینوس قم جدا شدند و فعالیت رنگبری آنها از ماده رنگزای آزوی Remazol Black B به همراه اکتینومیست‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک شناسنامه‌دار شده در مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران[1] مورد بررسی قرار گرفت. از بین این اکتینومیست‌ها، دو سویه انتخاب شد و سپس اثر عوامل مختلف بر فعالیت رنگبری آنها مورد بررسی قرار گرفت.

۲- بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد

در این مطالعه از ماده رنگزای آزو به نام Remazol Black B (دی آزو) استفاده گردید که از شرکت سیبا[2] خریداری شد. ترکیبات و مواد موجود در محیط کشت‌ها از شرکت مرک[3] تهیه شدند. نمونه‌ها از پساب خروجی و نهایی کارخانه نساجی مرینوس قم جمع‌آوری شدند.

۲ـ۲ـ جداسازی اکتینومیست‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک از پساب کارخانه نساجی

برای جداسازی اکتینومیست‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک از پساب کارخانه، از محیط GC آگار[4] حاوی ۵ درصد نمک (ترکیبات موجود در محیط کشت در یک لیتر آب مقطر: گلیسرول، ۱۰گرم؛ کازیین بدون ویتامین، ۰,۳ گرم؛ KNO_3، ۳,۳۳ گرم؛ K_2HPO_4، ۱,۶۶ گرم؛ NaCl، ۳,۳۳ گرم؛ $MgSO_4.7H_2O$، ۰,۰۸گرم؛ $CaCO_3$ ۰,۰۳گرم؛ $FeSO_4.7H_2O$، ۰,۰۱گرم؛ آگار، ۱۵گرم) به همراه آنتی‌بیوتیک‌های صاف شده نالیدیکسیک اسید[5] (به منظور حذف باکتری‌های گرم منفی) و نیستاتین[6] (به منظور حذف قارچ‌ها) به مقدار mg/ml ۵۰ استفاده شد. pH محیط جداسازی قبل از اتوکلاو با تریس یک نرمال در محدوده بین ۷,۲ تا ۷,۴ تنظیم شد. بر روی محیط GC آگار، پساب‌های بدون تیمار، پساب‌های با تیمار خشک و پساب‌های با تیمار حرارتی °C ۷۰ تلقیح شده و به مدت یک تا دو هفته در دمای °C ۳۲ گرماگذاری شدند. در این مرحله از کلنی‌هایی که رنگ سفید – خاکستری و ظاهری خشک و گچی و مشکوک به اکتینومیست داشتند لام تهیه شد، و در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه، به منظور خالص‌سازی اکتینومیست‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک جدا شده از پساب، از محیط کشت ISP_2 به همراه ۵ درصد نمک استفاده شد (ترکیبات موجود در محیط کشت در یک لیتر آب مقطر: آگار، ۱۵ گرم ؛ گلوکز، ۴ گرم؛ مالت، ۱۰گرم؛ عصاره مخمر، ۴ گرم) [۱۴].

1- IBRC (Iran Biological Resource Center)
2- Siba
3- Merck
4- Glycerol Casein Agar
5- Nalidixic Acid
6- Nistatin

Archive of SID
www.SID.ir

محلول گلوکز به‌طور جداگانه در دمای ۱۱۰ °C به مدت ۷ دقیقه اتوکلاو گردید و سپس به محیط اضافه شد. pH محیط قبل از اتوکلاو کردن با تریس یک نرمال در ۷٫۲ تا ۷٫۴ تنظیم شد. کلنی‌های جدا شده از پساب درون محیط ISP_2 آگار به منظور خالص‌سازی کشت داده شده و یک هفته در دمای ۳۲ °C گرماگذاری شدند.

۲ـ۳ـ بررسی فعالیت رنگبری اکتینومیست‌های جدا شده از پساب کارخانه نساجی و اکتینومیست‌های شناسنامه‌دار مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران

پس از جداسازی اکتینومیست‌ها از پساب کارخانه، میزان رنگبری ماده رنگزای Remazol Black B توسط سویه‌های جدا شده از پساب و سویه‌های شناسنامه‌دار مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، مورد سنجش قرار گرفت. به این منظور ۰٫۱ گرم از وزن تر اکتینومیست‌ها به لوله‌های حاوی ۱۰میلی‌لیتر از محیط رنگبری D-dey حاوی ماده رنگزا (ترکیبات محیط کشت در یک لیتر آب مقطر: گلوکز، ۴ گرم؛ عصاره مخمر، ۴ گرم؛ پپتون، ۲ گرم؛ NaCl، ۵۰ گرم؛ Remazol Black B، ۵۰ میلی‌گرم) تلقیح گردید و کشت‌ها به مدت یک هفته در دمای ۳۲ °C گرماگذاری شدند (گلوکز و مواد رنگزا هرکدام جداگانه اتوکلاو شده و به محیط اضافه شدند). بر اساس بیشترین سرعت و میزان رنگبری توسط سویه‌های مورد بررسی، دو سویه انتخاب شدند و اثر عوامل مختلف بر روی فعالیت رنگبری آنها بر روی رنگزای Remazol Black B مورد بررسی قرار گرفت. منظور از سرعت رنگبری این است که در روز اول از گرماگذاری (پس از مدت ۲۴ ساعت) کدام یک از سویه‌ها بیشترین رنگبری را نشان داده‌اند.

۲ـ۴ـ بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی سویه‌های منتخب

ریخت‌شناسی کلنی‌ها بر روی محیط ISP_2 حاوی ۵ درصد نمک بررسی شد. رنگ‌آمیزی گرم انجام و با آزمون KOH ۳ ٪ تایید شد [۱۵]. فعالیت کاتالازی با تولید حباب در محلول ۳ ٪ پراکسید هیدروژن و فعالیت اکسیدازی با استفاده از دیسک‌های آماده اکسیداز ارزیابی شدند. فعالیت آمیلازی با کشت باکتری‌ها در محیط نشاسته آگار محتوی ۵ درصد نمک NaCl و اضافه‌کردن ید مشخص شد. فعالیت DNase باکتری‌ها با کشت دادن در محیط دئوکسی ریبونوکلئاز آگار به همراه ۵ درصد نمک NaCl و سپس با افزودن اسید کلریدریک ۱ نرمال بعد از طی دوره گرماگذاری بررسی شد. فعالیت پروتئازی در محیط Skim milk Agar به همراه ۵ درصد نمک NaCl با بررسی ایجاد نواحی شفاف اطراف کلنی‌ها انجام شد. فعالیت لیپازی در محیط توئین ۸۰ آگار به همراه ۵ درصد NaCl براساس روش Harrigan و McConce (۱۹۷۶) ارزیابی گردید. به منظور انجام آزمون اوره آز، از کشت فعال اکتینومیست‌ها به میزان ۱ درصد در لوله‌هایی حاوی محیط کشت اوره آز براث به همراه ۵ درصد نمک NaCl تلقیح و تغییر رنگ به سمت بنفش-صورتی بررسی شد. برای بررسی محدوده نمک، pH و دمای رشد باکتری‌ها از محیط ISP_2 براث استفاده گردید. برای سنجش میزان تحمل‌پذیری نمک NaCl سویه‌ها، غلظت ۰ تا ۱۵ ٪ نمک در دمای ۳۲°C بررسی شد. محدوده pH برای رشد سویه‌ها با تنظیم pH نهایی محیط کشت در محدوده بین ۱۱-۴ با استفاده از HCl و NaOH انجام شد. رشد در دماهای ۴، ۱۰، ۲۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ °C در محیط ISP_2 براث به همراه ۵ درصد نمک NaCl مورد مطالعه قرار گرفت. لازم به ذکر است که برای سنجش رشد سویه‌ها وزن تر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

۲ـ۵ـ تعیین ترادف 16S rRNA و آنالیز فیلوژنی

به منظور استخراج DNA از سویه‌ها، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت شده سویه‌ها در دور ۴۰۰۰ ×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب‌های حاصل دو بار در۱۰میکرولیتر سوکروز ۱۰ درصد شستشو داده شدند و مجدداً سانتریفوژ شدند. یک لوپ از رسوب‌ها در ۵۵۰ میکرولیتر بافر SET (NaCl ۷۵mM، (pH ۸) mM ۲۵ EDTA، تریس ۲۰ mM (pH ۷/۵)، لیزوزیم (۵ mg/ml)) به حالت سوسپانسیون درآورده شدند و در دمای ۳۷ °C به مدت ۱ ساعت گرماگذاری شدند. به سوسپانسیون حاصل ۲۰۰ میکرولیتر SDS ۵ ٪ اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ °C گرماگذاری شدند. به محلول‌های لیز شده ۲۰۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم (۱ : ۱) جهت رسوب پروتئین‌ها و جداسازی آن‌ها اضافه شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴ °C سانتریفوژ شدند. به محلول‌های رویی به اندازه ۰٫۱ حجم آن سدیم استات M ۳ (غیربافری) اضافه و سانتریفوژ شدند. رسوب‌های حاصل با ۱ میلی‌لیتر اتانل ۷۰ درصد (۲۰ °C-) شستشو داده و به مدت ۱ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g سانتریفوژ شدند، سپس رسوب‌ها در بافر TE حل و به مدت یک شب در ۴ °C نگهداری شدند. سپس ژن‌های 16S rRNA سویه‌ها، توسط پرایمرهای 9F (5-AAGAGTTTGATCATGGCTCAG-3) و 1541R (5- AGGAGGTGATCCAACCGCA-3) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایطی که در جدول ۱ ذکر شده‌اند، تکثیر شدند.

جدول ۱: مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

نام مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
Pre-denaturation	۹۶	۳۰۰	۱
Denaturation	۹۶	۶۰	۳۰
Annealing	۵۸	۶۰	۳۰
Extension	۷۲	۶۰	۳۰
Final extension	۷۲	۳۰۰	۱

Archive of SID

www.SID.ir

بعد از اتمام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی و تایید پیوندهای حاصل توسط الکتروفورز ژل آگاروز، محصول واکنش برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. برای مقایسه ترادف‌های 16S rRNA سویه‌ها از نرم‌افزار BLAST موجود در Eztaxon استفاده شد. موقعیت فیلوژنی سویه‌های منتخب با رسم درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA6 تعیین شد.

۲ـ۶ـ بررسی اثر عوامل مختلف بر میزان رنگبری سویه‌های منتخب

مطالعه رنگبری در لوله آزمایش در شرایط متفاوت با تغییر دادن یک عامل در هر آزمایش و ثابت نگه داشتن سایر شرایط پایه یاد شده انجام شد. ماده رنگزای Remazol Black B به عنوان نماینده مواد رنگزای آزو در این آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. عوامل مورد بررسی مقادیر مختلف pH، دما، نمک NaCl و غلظت رنگزا (۵۰۰۰ mg/l، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰) بودند. تمام آزمایشات بالا با ۳ بار تکرار انجام شدند و برای هر آزمایش به طور جداگانه محیط دارای ماده رنگزای پایه بدون تلقیح سویه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و نتایج در روز هفتم گرماگذاری مورد بررسی قرار گرفتند. در انتها به منظور تعیین میزان رشد، وزن تر سویه‌ها در هفتمین روز گرماگذاری نیز اندازه‌گیری شد.

۲ـ۷ـ بررسی میزان رنگبری

به منظور تعیین میزان رنگبری مواد رنگزا، ابتدا طیف جذبی ماده رنگزای Remazol Black B در محدوده طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید تا بیشینه طول موج در محدوده مرئی مشخص شود. سپس از نمونه‌های گرماگذاری شده به میزان ۱ میلی‌لیتر برداشته و در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. میزان جذب مواد رنگزا در بیشینه طول موج جذبی‌شان اندازه‌گیری و درصد رنگبری مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

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

A= میزان جذب ماده رنگزا در محیط پس از رنگبری

A_0 = میزان جذب ماده رنگزا در محیط شاهد رنگی

D = درصد رنگبری

به منظور تعیین میزان رنگبری، میزان جذب مایع رویی نمونه‌های رنگبری شده پس از سانتریفیوژ (دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) و محیط قبل از رنگبری با دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین و مقایسه شدند. لازم به ذکر است برای بررسی و ارزیابی دقیق‌تر نتایج رشد و رنگبری سویه‌ها از رابطه آماری ANOVA استفاده گردید.

۳ـ نتایج و بحث

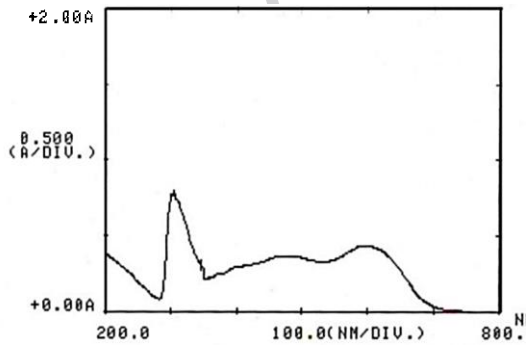
۳ـ۱ـ بررسی فعالیت رنگبری اکتینومیست‌ها

مواد رنگزای آزو امروزه در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند و ورودشان به محیط موجب آلودگی گسترده اکوسیستم می‌شود. با توجه به سمیت این مواد رنگزا و ناکارآمد بودن روش‌های تصفیه فیزیکی و شیمیایی پساب‌های محتوی این مواد رنگزا، روش‌های حذف زیستی به کمک میکروارگانیسم‌ها می‌توانند بسیار کارآمد باشند. مواد رنگزای آزو دارای گروه‌های جانشینی مختلفی در ساختارشان هستند که بر روی فعالیت رنگبری میکروارگانیسم‌ها بر روی آنها تاثیرگذارند [۷]. برای مثال وجود گروه‌هایی مانند هیدروکسیل و آمین شکست ماده رنگزا را آسان‌تر و گروه‌هایی مانند متیل، متوکسی، سولفو و نیترو شکست ماده رنگزا را مشکل می‌کنند [۵، ۸]. تعدادی از مواد رنگزای آزو نیز که جزو مواد رنگزای سولفونه هستند به دلیل اینکه برای احیا باید به غشای سلول وارد شوند به سختی شکسته می‌شوند [۱۶].

در این پژوهش توانایی رنگبری ماده رنگزای آزوی Remazol Black B توسط ۱۶ سویه اکتینومیستی جدا شده از پساب کارخانه نساجی و اکتینومیست‌های شناسنامه‌دار مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به سرعت و میزان رنگبری، دو سویه M18 و M77 انتخاب شده و پس از شناسایی، مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. نتایج حاصل در جدول ۲ آورده شده است. طیف جذبی این ماده رنگزا در شکل ۱ آورده شده است. مطالعه‌ای مشابه با آنچه که در این بررسی انجام شده است، بر روی فعالیت رنگبری چندین گونه اکتینومیستی بر روی مواد رنگزای آزوی Acid fast red و Congo red انجام شده است [۱۷].

۳ـ۲ـ شناسایی سویه‌های منتخب

ترادف 16S rRNA هر دو سویه M18 و M77، نزدیک‌ترین ارتباط فیلوژنیکی را با جنس *Streptomyces* نشان دادند. این شباهت در مورد سویه M77 با *S. albogriseolus*، ۹۸،۸٪ و در مورد سویه M18 با *S. xinghaiensis*، ۹۹٪ بود. هر دو سویه پس از رنگ‌آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ به شکل رشته‌ای و گرم مثبت دیده شدند. صفات بیوشیمیایی هر دو سویه M18 و M77 در جدول ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱: طیف جذبی ماده رنگزای Remazol Black B در محدوده طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: درصد رنگبری ۱۶ سویه از روز اول تا هفتم پس از تلقیح در حضور ماده رنگزای Remazol Black B.

سویه	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم
ROAL/12	۷	۱۰	۱۲	۱۸	۲۱	۲۷	۳۴
ROAL 40/34	۱۱	۳۲	۴۷	۵۷	۶۲	۶۶	۶۹
ROAL 2/18	۱۰	۳۰	۳۹	۵۴	۵۹	۶۴	۶۹
M77	۱۸	۳۶	۴۳	۶۴	۶۷	۶۹	۷۱
ROAC42- Red/40	۱۴	۲۲	۳۵	۵۲	۵۸	۶۲	۶۷
M1	۱۱	۱۳	۲۰	۳۵	۴۱	۴۶	۵۶
M2	۵	۶	۸	۱۴	۲۴	۲۷	۳۵
M3	۱۵	۲۱	۳۳	۳۶	۳۸	۵۰	۵۷
M4	۱۱	۱۴	۱۸	۳۰	۳۵	۴۲	۵۴
M5	۱۳	۱۶	۱۷	۲۷	۳۰	۳۵	۴۱
M6	۱۵	۱۹	۲۲	۳۱	۳۷	۳۹	۴۴
M7	۱۲	۱۶	۲۳	۲۴	۳۲	۴۸	۵۶
M8	۷	۳۴	۳۷	۴۵	۵۱	۶۰	۶۸
M9	۱۲	۱۷	۲۳	۳۱	۳۶	۴۲	۴۹
M10	۱۳	۲۷	۳۰	۵۵	۵۶	۶۸	۷۰
M18	۲۷	۴۱	۵۳	۶۰	۶۵	۶۹	۷۳

جدول ۳: ویژگی‌های متابولیسمی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه‌های منتخب.

ویژگی	سویه M77	سویه M18
کاتالاز	مثبت	مثبت
اکسیداز	منفی	منفی
محدوده رشد در NaCl (٪)	۰-۱۰ (بهینه ۷,۵)	۰-۱۰ (بهینه ۷,۵)
محدوده دمایی رشد (°C)	۱۰-۴۰	۱۰-۴۰
محدوده pH	۵-۱۱ (بهینه ۸-۷)	۵-۱۱ (بهینه ۸-۷)
آبکافت نشاسته	مثبت	مثبت
آبکافت توئین ۸۰	منفی	منفی
آبکافت کازئین	مثبت	مثبت
DNase	منفی	منفی
اوره آز	منفی	منفی

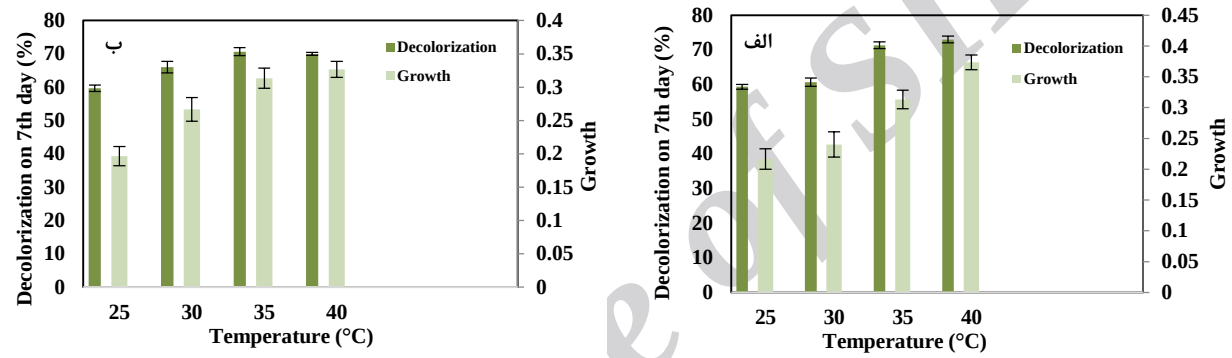
۳-۳- اثر عوامل مختلف بر روی رنگبری سویه‌های منتخب

تاثیر عوامل دما، غلظت‌های مختلف نمک NaCl، غلظت‌های مختلف مواد رنگزا (۵۰۰۰ mg/l، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰) و pH بر روی رنگبری دو سویه منتخب مورد مطالعه قرار گرفتند. در بررسی اثر دما مشخص شد که افزایش دما اثر افزاینده‌ای بر میزان رنگبری و رشد سویه‌ها دارد و دو دمای ۳۵ و ۴۰ °C به ترتیب براساس رابطه آماری به عنوان دمای بهینه برای سویه‌های M18 و M77 انتخاب شدند (شکل۲). این افزایش رنگبری با افزایش دما را می‌توان به دلیل افزایش رشد سویه‌ها و یا افزایش فعالیت آنزیم مسئول رنگبری در دماهای بالاتر بیان کرد. سه سویه مختلف باکتریایی که از پساب

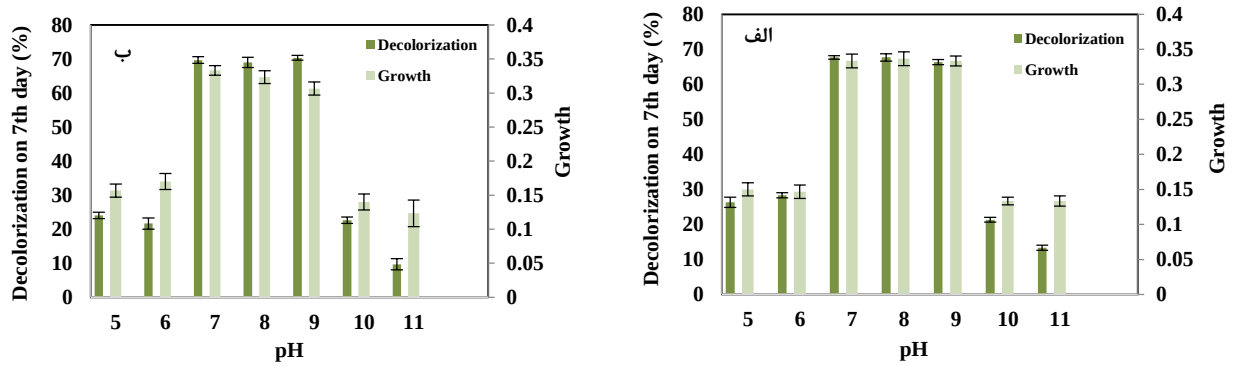
Archive of SID
www.SID.ir

آلوده به ماده رنگزای آزو جدا شده بودند نیز در دمای ۳۵ °C بیشترین فعالیت رنگبری را از خود نشان داده‌اند [۱۸]. *Shewanella oneidensis* WL-7 نیز مشابه با آنچه که در این مطالعه دیده شد، با افزایش دما از ۲۵ °C-۲۰ به ۳۵ °C-۳۰ رنگبری بیشتری را بر روی ماده رنگزای Reactive Black 5 از خود نشان داد [۱۹]. افزایش فعالیت رنگبری با افزایش دما توسط باکتری *Proteus mirabilis* در مورد ماده رنگزای آزوی RED RBN [۲۰] و در مورد *Escherichia coli* سویه NO_3 نیز گزارش شده است [۲۱].

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، هر دو سویه در pHهای ۷، ۸ و ۹ بیشترین رنگبری را داشتند و براساس رابطه آماری ANOVA اختلاف معنادار بین رشد و رنگبری در هر دو سویه در این سه pH وجود ندارد. بررسی اثر pH بر روی رشد و رنگبری هر دو سویه منتخب در این مطالعه نشان داد که در محدوده pH خنثی تا قلیایی بیشترین فعالیت رنگبری مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه pH پسابی که سویه‌ها از آن جدا شدند حدود ۹ بود، فعالیت بهینه در محدوده pH قلیایی در مورد سویه‌ای که از پساب جدا شده بود منطقی به نظر می‌رسد. *E. coli* سویه NO_3 نیز توانایی رنگبری از ماده رنگزای آزوی C.I. Reactive Red 22 را در محدوده pH بهینه بین ۷ تا ۹ مشابه با آنچه که در مورد سویه‌های منتخب در این مطالعه دیده شد، را دارد [۲۱]. هم‌چنین در مورد باکتری *S. oneidensis* WL-7 بهینه فعالیت رنگبری بر روی ماده رنگزای Reactive Black 5 در محدوده pH ۶ تا ۸ گزارش شده است که تا حدودی نزدیک به سویه‌های منتخب در این بررسی است [۱۹]. باکتری *Bacillus thuringiensis* BYJ1 نیز در محدوده pH خنثی تا قلیایی بیشترین رنگبری را بر روی ماده رنگزای Remazol Black B نشان داده و بیشترین فعالیت رنگبری آن در ۷ = pH دیده شده است [۲۲].

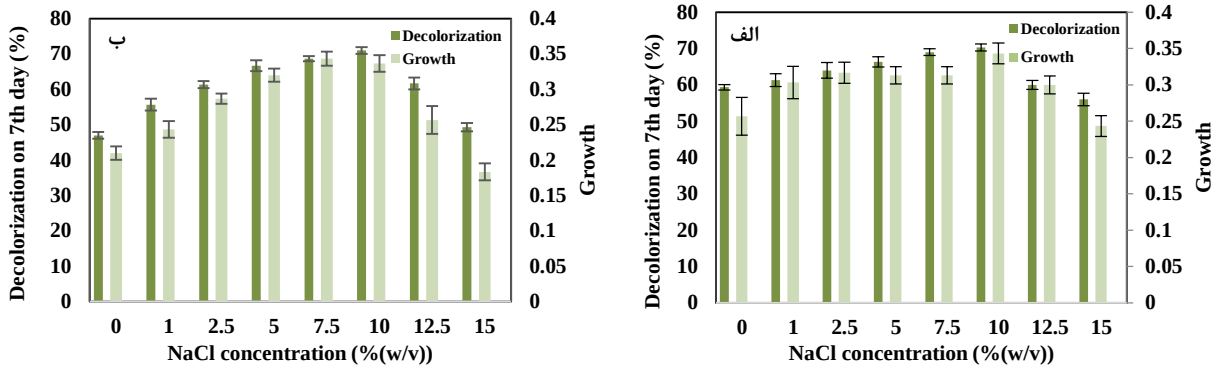


شکل ۲: درصد رنگبری و میزان رشد در دماهای مختلف، الف: سویهM77 و ب: سویه M18.



شکل ۳: درصد رنگبری و میزان رشد در pHهای مختلف الف: سویه M77 و ب: سویه M18 .

www.SID.ir



شکل ۴: درصد رنگبری و میزان رشد در غلظت‌های مختلف NaCl الف: سویهM77 و ب: سویهM18 .

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم مشاهده شد سویه M18 در غلظت‌های بین ۲,۵ تا ۱۲,۵٪ نمک، بیشترین میزان رنگبری را از خود نشان می‌دهد، اما پس از مقایسه رشد سویه براساس رابطه آماری در این غلظت‌ها، با توجه به اینکه این سویه در غلظت ۱۲,۵ ٪ با همان میزان رنگبری، رشد کمتری داشته است، پس بنابراین این غلظت نمک می‌تواند به عنوان غلظت بهینه انتخاب شود اما در مورد سویه M77 در غلظت‌های ۲,۵ تا ۱۰ ٪ بیشترین رنگبری اتفاق افتاده و هیچ رابطه معنادار در میزان رنگبری و رشد سویه در این غلظت‌ها وجود ندارد (شکل۴). بنابراین هر دو سویه در حضور نمک فعالیت رنگبری بیشتری دارند. این افزایش فعالیت رنگبری در حضور نمک در مورد باکتری تحمل کننده نمک *Halomonas* sp. و در ارتباط با ماده رنگزای Remazol Black B نیز گزارش شده است [۲۳]. سویه دیگری از این باکتری به نام *Halomonas* sp strain GTW نیز برای رنگبری به نمک وابسته بوده و بیشترین فعالیت رنگبری از مواد رنگزای آزو را در غلظت بین ۱۰ تا ۲۰ ٪ از NaCl از خود نشان داد [۲۴]. جدایه قارچی *Neosartorya* sp. نیز با قابلیت رشد در محیطی با ۱۰٪ نمک، توانایی جذب زیستی ماده رنگزای آزوی کنگو قرمز را دارد [۲۵]. اثر غلظت‌های مختلف نمک بر روی فعالیت رنگبری، به بارهای سطحی آنزیم مؤثر در رنگبری و فعالیت آنها در حضور این نمک مربوط می‌شود. توانایی رنگبری در محدوده وسیعی از غلظت‌های مختلف نمک بسیار حائز اهمیت است به طوری که می‌تواند استفاده از سویه مورد نظر را برای رنگبری پساب در صنعت مناسب گرداند [۱۶، ۱۰، ۷، ۲].

بررسی نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف ماده رنگزا بر روی رنگبری دو سویه منتخب نشان داد که طبق آنالیز آماری ANOVA، در سویه M77 اختلاف معناداری در میزان رنگبری و رشد در غلظت ۴۰۰ mg/l (که رنگبری بهتری نسبت به سایر غلظت‌های دیگر داشته) نسبت به سایر غلظت‌ها وجود دارد و در سویه M18 این اختلاف معنادار در میزان رنگبری و رشد در غلظت‌های ۴۰۰ و ۶۰۰ mg/l ماده رنگزا که رنگبری بیشتری داشتند با سایر غلظت‌ها وجود دارد، به طوری که با افزایش غلظت ماده رنگزا، رنگبری بسیار ناچیزی از هر دو سویه مشهود بوده است. با سنجش میزان رشد سویه‌ها در بیستمین روز پس از تلقیح نشان داده شد که از غلظت‌های ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ mg/l به ترتیب توانایی رشد سویه‌ها کمتر شده به طوری که در غلظت ۵۰۰۰ mg/l فاقد رشد بوده‌اند که این خود بیانگر رابطه مستقیم رشد و رنگبری این سویه‌ها است و همچنین توانایی زنده ماندن سویه‌ها در غلظت‌های بالای ۱۰۰۰ و mg/l ۵۰۰۰ ماده رنگزا نیز ارزیابی شد که هر دو سویه فقط در غلظت ۱۰۰۰ mg/l زنده باقی‌ماندند. بنابراین افزایش غلظت ماده رنگزا عمدتاً موجب کاهش رشد و توانایی رنگبری سویه‌ها می‌شود. به طوری که در غلظت بالای ماده رنگزا (۵۰۰۰mg/l) هیچگونه رشدی دیده نشد. کاهش میزان رنگبری و رشد سویه‌ها در غلظت‌های بالا ممکن است به دلیل مهار فعالیت‌های متابولیکی سویه‌ها در اثر سمیت ماده رنگزا باشد. با توجه به گزارشات به دست آمده، مواد رنگزا، سنتز اسیدهای نوکلئیک [۲۷] و رشد سلول [۲۸] را مهار می‌کنند. از آنجایی که میزان رنگبری سویه‌ها به میزان رشد آنها بستگی دارد، در نتیجه در غلظت‌های بالای ماده رنگزا به دلیل کاهش رشد سویه‌ها، کاهش رنگبری مشاهده می‌شود.

با اینکه تاکنون سویه‌های کمی با توانایی رشد در غلظت بالای ماده رنگزا گزارش شده‌اند [۹, ۱۰, ۲۸, ۲۹]، مواردی از رشد و رنگبری میکروارگانیسم‌ها در غلظت بالای ماده رنگزا وجود دارد. باکتری *P. mirabilis* در غلظت بالای ماده رنگزای آزوی RED RBN (۱۰۰۰ mg/l)، در حدود ۸۵٪ را رنگبری کرد [۲۰].

۴ـ نتیجه‌گیری

با توجه به قابلیت‌های سویه‌های منتخب در این مطالعه مبنی بر توانایی رنگبری در حضور نمک NaCl (۱ تا ۱۵٪)، محدوده وسیع pH (۵ تا ۱۱) و غلظت‌های بالای ماده رنگزا (۱۰۰۰ mg/ml)، می‌توان آنها را گزینه‌های مناسبی برای کاربردهای عملی در صنایع در نظر گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

۵ـ مراجع

1. V. T. YZ F, Fungal degradation of dye wastewaters: a review. *Bioresour. Technol.*, 79, (2001), 251-62.
2. B. S. Carliell CM, S.J. Barclay, N. Naidoo, C.A. Buckley, D.A. Mulholland, E. Senior. Microbial decolorization of areactive azo dye under anaerobic conditions. *Water Sa.* 21 (1995), 61-69.
3. D. T. Talarposhti AM, T. Donnelly, G.K. Anderson. Color removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. *Water Res*., 2 (2001), 425-432.
4. P. Verma, P. Baldrian, F. Nerud. Decolorization of structurally different synthetic dyes using cobalt (II)/ascorbic acid/hydrogen peroxide system. *Chemosphere*. 50(2003), 975-979.
5. B. I. Nigam P, P. Nigam, D. Singh, R. Marchant. Microbial process for the Decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Proc. Biochem.* 31 (1996), 435-442.
6. J. L. Barredo, Microorganisms for health care, food and enzyme production. *Research signpost* (2003), 233-256.
7. W. J. Chen KC, D.J. Liou, S.C. Hwang, Decolorization of the textile azo dyes by newly isolated bacterial strains. *J. biotechnol*. 101(2003), 57-68.
8. K. H. Zimmermann T, T. Leisinger. Properties of purified orange II azo reductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *J. Biochem*. 129 (1982), 197-203.
9. S. I. Kodam KM, P. D. Lokhande, K. R. Gawai, Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. *World J. Microbial. Biotechnical.* 21(2005), 367-370.
10. K. H. Moosvi S, D. Madamwar, Decolorization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. *World J. Microb. Biot.* 21 (2005), 667-672.
11. B. U. Sani RK, Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 24 (1999), 433-437.
12. D. Balan, R.T.R. Monteneiro, Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi, *biotechnol.* 89 (2001), 141-145.
13. M. D. Verma P, Decolorization of Azo dyes using *Basidiomycete* strain PV 002.W. *J. Microb*. (2005), 481-485.
14. W. J. Li, P. Xu, L.P. Zhang, S.K. Tang, X.L. Cui, , P.H. Mao, L.H. Xu, , P. Schumann, E. Stackebrandt, C.L. Jiang, Streptomonospora alba sp. nov., a novel halophilic actinomycete, and emended description of the genus Streptomonospora Cui et al. 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003), 1421-1425.
15. M. Bagheri, et al., *Bacillus iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (2012), 811-816.
16. M. K. Wuhrmann, T. Kappeler, Investigation on rate determining factors in the microbial reduction of azo dyes. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9 (1980), 325-338.
17. N.A. El-Sersy, S.W. Hassan, H. Abd-Elnaby, Bioremediation of acid fast red dye by *Streptomyces globosus* under static and shake condition. *Afr. J. Biotechnol.* 10(2011), 3467-3474.
18. M. P. Shah, K. A. Patel, S. S. Nair, A. M. Darji, Decolorization of Remazol Black-B by three bacterial isolates. *Int. J. Environ. Biorem. Biodegrad.* 2 (2014), 44-49.
19. J. Wu, K. S. Kim, N. C. Sung, C. H. Kim, Y. C. Lee, Isolation and characterization of *Shewanella oneidensis* WL-7 capable of decolorizing azo dye Reactive Black 5. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55 (2009), 51-59.
20. K. C. Chen, W. T. Huang, J. Y. Wu, J. Y. Houng, Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23(1999), 686-690.
21. T.-S. K. J.S. Chang, Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with Escherichia coli NO_3, *Bioresour. Tech*. 75(2000), 107-111.
22. A. Joshi, et al., Optimization of parameters for decolorization of a textile azo dye, Remazol Black B (RBB) by a newly isolated bacterium, *Bacillus thuringiensis* BYJ1. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8(2014), 3837-3849.
23. S. Asad, M. A. Amoozegar, A. A. Pourbabaee, M. N. Sarbolouki, S. Dastgheib, Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria *Bioresour. Technol.* 98(2007), 2082-2088.
24. J. Z. J Guo, D. Wang, C. Tian, P. Wang, A novel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. *Biodegradation*. 19(2008), 15-19.
25. ح. مقیمی، ا. آذین، ر. حیدری تبار، جداسازی و شناسایی جدایه قارچی *Neosartorya* sp. به عنوان جاذب زیستی ماده رنگزا کنگو قرمز، نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ، ۱۰ (۱۳۹۵)، ۱۸۴-۱۷۷.
26. D. Delille, A. Basseres, A. Dessommes, Effectiveness of bioremediation for oil- polluted Antarctic seawater. *Polar. Biol.* 19 (1998), 237-241.
27. T. Ogawa, M. Shibata, C. Yatome, E. Idaka, Growth inhibition of *Bacillus subtilis* by basic dyes. *Environ. Contam. Toxicol.* 40 (1998), 545-552.
28. T. Ogawa, H. Fujii, K. Kawai, C. Yatome, E. Idaka, Growth inhibition of *Bacillus subtilis* upon interaction between basic dye and DNA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42 (1989), 402-408.
29. J. K. Supaka, S. Damronglerd, M. L. Delia, P. Strehaiano, Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic- aerobic system. *Chem. Eng. J.* 99 (2004), 169-176.

Archive of SID

www.SID.ir