Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۱۲، جلد ۴، شماره ۱، زمستان ۸۹، صفحه ۷۹ تا صفحه ۸۵

توانایی قارچ‌های چوب‌زی *Trametes hirsuta* و *Trametes gibbosa* در رنگ بری رنگ‌های آزویی

حسین عشقی[۱]، محمود ذکائی[۲]، پروین پاک فطرت[۳]

۱- استاد شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد. heshghi@ferdowsi.um.ac.ir joy_filding2006@yahoo.com
۲- استاد زیست شناسی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، دانشجوی کارشناسی ارشد، مشهد- ایران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/٦ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۹

چکیده

دو قارچ مولد پوسیدگی سفید به نام‌های *Trametes hirsuta* و*Trametes gibbosa* برای قدرت رنگ بری دو رنگ آزویی (Congo Red و Orange G) انتخاب شدند.آزمایش‌ها دریک دوره ۱۵ روزه با غلظت‌های مختلف رنگ (۵۰،۲۵،۱۵ و ۷۵ میلی گرم برلیتر) آماده شده در محیط کشت آبی عصاره مالت انجام و برای تعیین درصد رنگ بری، هر ۷۲ ساعت نمونه‌ها روی طول موج ماکزیمم به دست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری، جذب گرفته شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که هر دو قارچ توانایی تجزیه هردو رنگ آزویی را در زمان‌های متفاوتی بعد از تلقیح را داشته، اما بهترین نتایج روی Congo Red (۹۷/۷٪) در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیترو Orange G (۹۷/۸٪) در غلظت ۷۵ میلی گرم بر لیتر،۱۱روز بعد از تلقیح توسط *Trametes gibbosa* به دست آمد. همین طور *Trametes hirsuta* رنگ بری خوبی روی Congo Red (۹٤/٦٪) در غلظت ۷۵ میلی گرم بر لیتر و Orange G (۹٤/۸٪) در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نشان داد.

کلید واژه: قارچ مولد پوسیدگی سفید, *Trametes hirsute*, *Trametes gibbosa*, Congo Red, Orange G.

مقدمه

در کارخانجات صنایع نساجی، بیش از ۵۰٪ رنگ‌ها بعد از فرایند رنگ کردن، به هدر رفته وبه مقدار زیادی به فاضلاب‌ها ریخته می‌شوند(۱۰، ۲). امروزه برآورد شده که سالانه حدود ۷۰۰ هزار تن رنگ یا حداقل ۱۰ درصد از کل تولیدات رنگ‌های نساجی در کارخانجات وارد آب‌های آزاد می شوند که بسیاری از بررسی‌ها نشان می دهد این رنگ‌ها سمی و سرطانی بوده و اگراین رنگدانه‌ها در تماس با داروهای خاصی مثل آسپرین در داخل بدن آدمی قرار گیرند می توانند واکنش‌های آلرژیک و یا آسم را در افراد حساس تشدید نمایند (۷، ۳). رنگ‌ها طوری طراحی می شوند که نسبت به نور، آب و اکسید شدن مقاومند پس تجزیه آن‌ها کار راحتی نبوده و در محیط به عنوان ترکیبات مخرب و رادیکالی انباشته (۷) و به آسانی نمی توان با روش‌های تصفیه رایج آب آن را از بین برد (۸، ۴). صنایع رنگ نساجی تحت فشاری روز افزون از جانب سازمان‌های مرتبط با محیط زیست بوده تا فن آوری‌های کاربردی فعلی را با فن آوری‌های جدید و دوست محیطی تعویض نمایند. در این رابطه روش‌های بیولوژیکی توجه بیشتری را به خود جلب نموده زیرا آن‌ها را به عنوان روش‌های پایدار و دوست محیطی به حساب

www.SID.ir

Archive of SID

می‌آورند. گسترش روزافزون آزمایش‌های انجام شده روی رنگ بری مواد رنگی از طریق قارچ، به خصوص قارچ‌های پوساننده سفید موید این امر می‌باشد (۱). یکی از مهم ترین کاربردهای قارچ‌های پوساننده چوب در تصفیه فاضلاب و آلودگی‌ها می‌باشد. به دلیل غیر اختصاصی بودن آنزیم‌های تجزیه کننده در این قارچ‌ها، علاوه بر تجزیه لیگنین، سایر ترکیبات که دارای حلقه آروماتیک‌اند(۱۴). قارچ‌های پوساننده سفید برای تجزیه ترکیبات رادیکالی شبیه زنوبیوتیک‌ها، لیگنین و رنگ‌ها به وسیله آنزیم‌های لیگنولیتیک خارج سلولی شان مناسب هستند. این سیستم آنزیمی خارج سلولی غیراختصاصی شامل عمدتا لیگنین پراکسیداز(Lip)، منگنز پراکسیداز(Mnp) و لاکاز است که می‌توانند به تنوعی از ساختارهای آروماتیک پیچیده از جمله مواد رنگی حمله کنند. برخی از قارچ‌های پوساننده سفید همه نوع آنزیم‌ها را تولید می‌کنند در صورتی که تعدادی دیگر یک یا دونوع آنزیم را تولید می‌نمایند (۱۲، ۱۱، ۱).رنگ‌های آزویی، بزرگ‌ترین گروه از رنگ‌های سنتزی مورد استفاده در صنایع غذایی و نساجی با تنوع وسیع در رنگ و ساختار اند. این رنگ‌ها به وسیله حضور یک یا تعداد بیشتری پیوند آزویی (-N=N-) در ارتباط با یک یا تعداد بیشتری ترکیب آروماتیک، قابل شناسایی اند. هم چنین آن‌ها گاهی ممکن است حامل گروه‌های اسید سولفونیک نیز باشند(۱۳، ۵). بررسی اخیر، یافته‌هایی را روی تجزیه رنگ‌های آزویی از محلول‌هایی با استفاده از بازیدیومیست‌های پوساننده سفید گزارش می‌دهد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌ها

دو قارچ مولد پوسیدگی سفید به نام‌های *Trametes hirsuta* و*Trametes gibbosa* از جنگل‌های عباس آباد بهشهر جمع آوری و با استفاده از کلید شناسایی قارچ‌های پلی پور ریواردن در دسته *Trametes hirsuta* و*Trametes gibbosa* شناسایی شدند (۴).نمونه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار کشت و در دمای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد (به ترتیب) به مدت ۷ روز در انکوباتور برای رشد نگه داری و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال تا زمان نیاز قرار داده و هر ماه یک بار واکشت می‌شدند.

محیط کشت و شرایط کشت

برای هر قارچ ۵ گروه (۳بار تکرار) ارلن‌های ۱۰۰ سی سی که حاوی ۳۰ سی سی محیط کشت آبی عصاره مالت (۱۷گرم عصاره مالت در یک لیترآب مقطر) و تنظیم شده در۶ =pH به کمک محلول ۰/۵ نرمال NaOH و HCl، مهیا و سپس تمام ارلن‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. رنگ‌ها نیز در غلظت‌های مورد نظر به طور مجزایی آماده و به یک محلول مادر اتوکلاو شده (۱۰۰۰سی سی) اضافه شدند طوری که غلظت نهایی در ارلن‌ها به ۵۰،۲۵،۱۵ و ۷۵ میلی گرم در لیتر برسد. با پنبه دیسک زن، دیسک‌های ۴ میلی متری از کلونی قارچی در حال رشد روی پلیت‌های عصاره مالت آگار زده شده (دیسک‌ها از مناطق حاشیه‌ای با فعالیت بالای رشد برداشته شدند) و ۳ عدد دیسک درون ارلن‌های حاوی ۳۰ سی سی عصاره مالت قرار داده شد (تمام این اعمال باید در زیر لامینار در یک محیط استریل انجام شود). سپس ارلن‌ها در دمای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای *T.hirsuta* و *T.gibbosa* به مدت ۱۵ روز در انکوباتور نگه داری شدند.

آزمایش‌های رنگ بری

برای آزمایش توانایی کشت‌ها برای رنگ بری رنگ‌های آزویی، هررنگ با میکروفیلتر سرسرنگی ۰/۲۵ میکرومتر، استریل و به محیط کشت‌هایی که قبلا استریل شده بود اضافه شد طوری که غلظت به ۵۰،۲۵،۱۵ و ۷۵ میلی گرم در لیتر برسد. برای تعیین درجه رنگ بری، به این دلیل که مقداری رنگ توسط مسیلیوم‌ها و کاغذ صافی جذب شده، ۵ میلی لیتر اتانول به منظور برگرداندن رنگ‌ها اضافه شد. تجزیه رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(UV-۱۱۰۰) با اندازه گیری جذب در

www.SID.ir

Archive of SID

طول موج ماکزیمم برای هر رنگ بعد از ۸،۵، ۱۱و۱۵ روزبررسی و در کشت‌های کنترل، قارچ‌ها در محیط کشت بدون رنگ کشت داده شدند.

ساختار و طول موج ماکزیمم رنگ‌های آزویی (Congo Red و Orange G) در این کار در شکل ۱ نشان داده شده است(شکل ۱).

اثر غلظت رنگ

آزمایش‌های انجام شده با غلظت‌های مختلف رنگ صورت گرفت. برای بررسی توانایی قارچ در برابر رنگ بری از۴ غلظت مختلف رنگ (۷۵-۱۵ میلی گرم بر لیتر) استفاده شد.

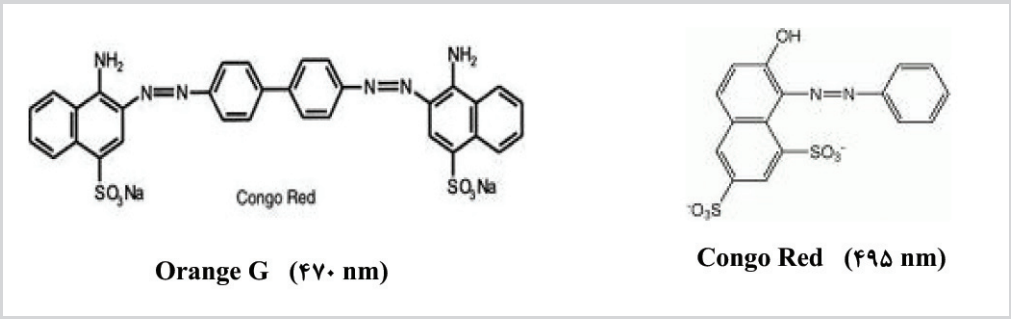
وزن خشک مسیلیوم

وزن خشک توده مسیلیوم قارچی توسط فیلتر کردن محتوای هر ارلن با استفاده از کاغذ صافی Whatmann no:۱ به دست آمد. هر کاغذ صافی قبل و بعد از فیلتر کردن با ترازوی دیجیتال دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری و بعد از صاف کردن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون گذاشته تا خشک شود. هنگام صاف کردن به دلیل این که مقداری رنگ به کاغذ صافی می‌چسبد از مقداری اتانول استفاده گردید تا رنگ را در خود حل نموده و سپس پتری حاوی رنگ و اتانول را به مدت ۲ ساعت در هوای آزاد گذاشته تا اتانول تبخیر و رنگ به جامانده به عصاره قارچی اضافه شود.

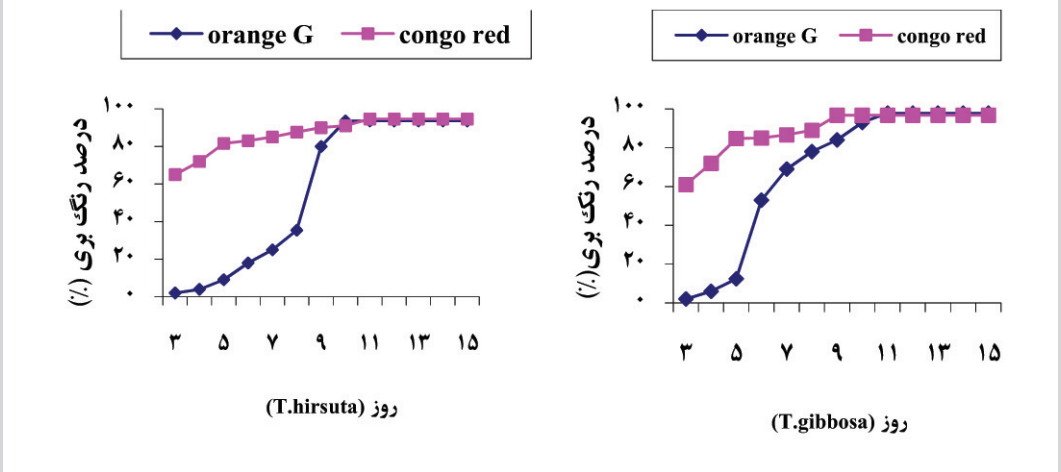
نتایج

آنالیز دستگاه اسپکتروفتومتر

برای بررسی تجزیه رنگ‌های آزویی توسط این دو قارچ، جذب نوری (۴۰۰-۷۰۰nm) نمونه‌های رنگی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (۱۱۰۰UV) اندازه گیری شد. تجزیه در روزهای اول ممکن است به خاطر جذب رنگ توسط مسیلیوم‌های قارچ باشد. دستگاه اسپکتروفتومتری برای هر رنگ یک پیک نشان داد که برای Congo Red و Orange G به ترتیب ۴۹۵ و ۴۷۰ نانومتر به دست آمد(نمودار۱).



شکل ۱- ساختار و طول موج ماکزیمم به دست آمده برای رنگ‌های آزویی



نمودار۱- مدت زمان لازم برای رنگ بری Congo Red و Orange G توسط *T. gibbosa* و *T. hirsuta* در یک دوره ۱۵ روزه

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی‌های اولیه

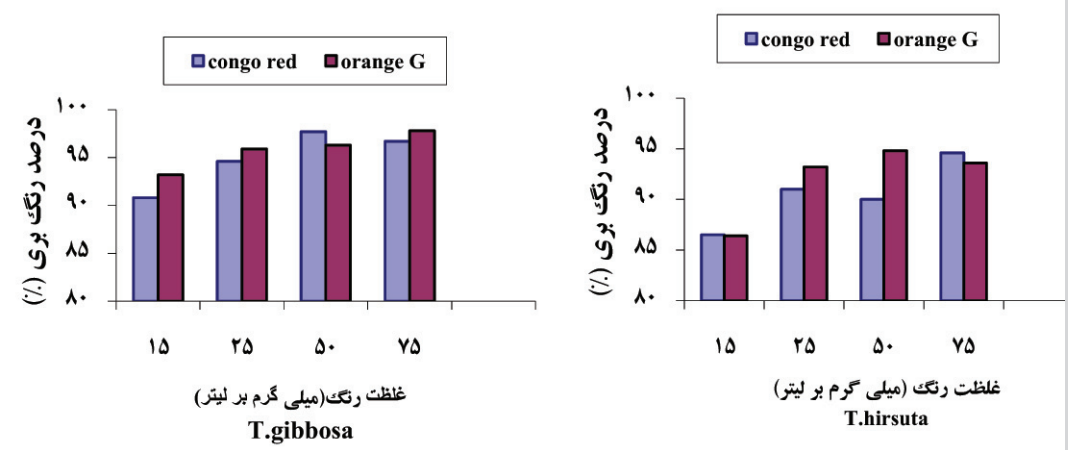
نتایج بررسی‌های اولیه روی رنگ بری دو رنگ توسط *T.gibbosa* نشان داد ماکزیمم رنگ بری را برای Congo Red (٪۹۷/۷) ۱۰ روز بعد از کشت در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نشان داد. هم چنین حداکثر رنگ بری برای Orange G (٪۹۷/۸) ۱۱ روز بعد از کشت در غلظت ۷۵ میلی گرم به دست آمد. از روز یازدهم به بعد هیچ تغییری دررنگ بری صورت نگرفت.رنگ بری هر دو رنگ توسط *T. hirsuta* نیز از الگویی مشابه قبل پیروی می‌کند اما حداکثر رنگ بری Congo Red (٪۹۴/۶) و Orange G (٪۹۴/۸) ۱۱ روز بعد از کشت در غلظت ۷۵و۵۰ میلی گرم بر لیتر(به ترتیب) به دست آمد (نمودار۲).

در آزمایش‌های انجام شده حداکثر رنگ بری بعد از ۱۱ روز به دست آمد. از این دوره زمانی بهینه برای آزمایش‌های بعدی کمک گرفته شد.

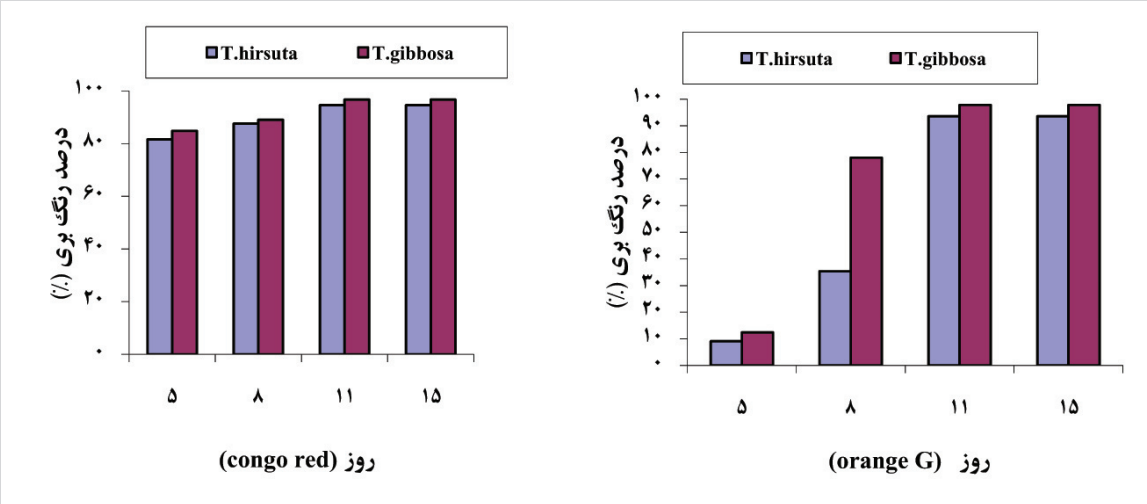
نمودار ۳ درصد رنگ بری رنگ‌ها را در غلظت ۷۵ میلی گرم توسط *T. gibbosa* و *T. hirsuta* در یک دوره زمانی ۱۵ روزه نشان می‌دهد.

رشد قارچ در محیط کشت شامل رنگ

سمیت رنگ برای رشد قارچ به وسیله مقایسه وزن خشک میسیلیوم (DMW) در محیط کشت‌هایی با غلظت‌های متفاوت (۷۵-۱۵میلی گرم بر لیتر) به دست آمد در کنار این آزمایش، قارچ در محیط کشت فاقد



نمودار۲- درصد رنگ بری congo red و orange G توسط *T. gibbosa* و *T. hirsuta* در غلظت‌های مختلف (۱۵ روز بعد از تلقیح)

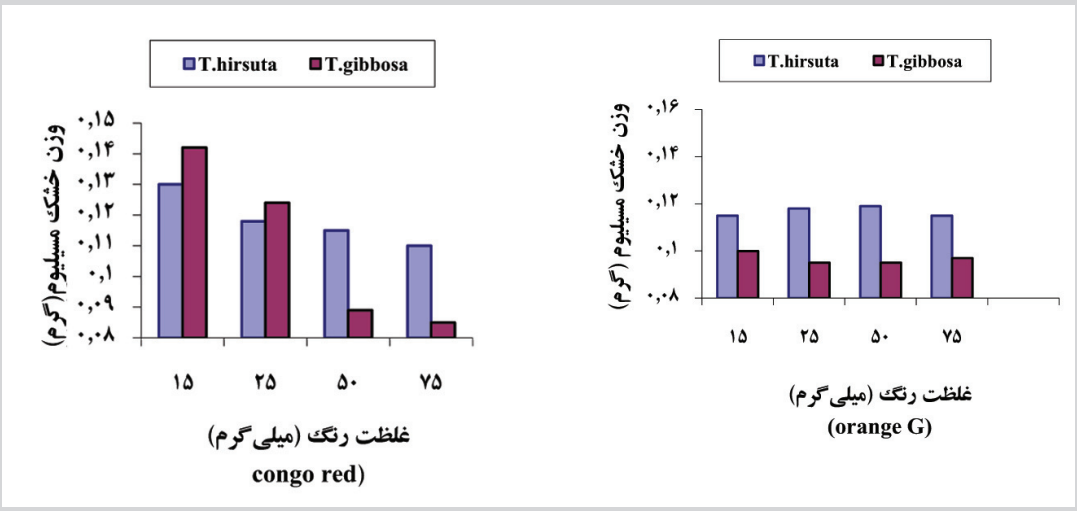


نمودار۳- درصد رنگ بری congo red و orange G توسط *T. gibbosa* و *T. hirsuta* در غلظت ۷۵ میلی گرم (در یک دوره ۱۵ روزه)

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ، به عنوان گروه کنترل، کشت داده شد. نتایج مربوط به وزن خشک مسیلیوم دو قارچ *T. gibbosa* و *T. hirsuta* در غلظت‌های مختلف Congo Red نشان می‌دهد که با افزایش غلظت رنگ، رشد قارچ کمتر می‌شود پس می‌توان نتیجه گیری کرد که این رنگ در غلظت‌های بالا برای هر دو قارچ سمی می‌باشد. اما در مورد Orange G نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که با افزایش غلظت رنگ، تغییری در رشد قارچ‌ها صورت نمی‌گیرد البته رشد قارچ با توجه به شاهد (محیط کشت + قارچ) در کل کمتر بوده واین نشان می‌دهد که Orange G سمیت کمی برای قارچ دارد که مستقل ازغلظت است (نمودار ۴).



نمودار٤- وزن خشک مسیلیوم قارچ‌های *T. gibbosa* و *T. hirsuta* در محیط کشت مایع حاوی رنگ درغلظت‌های مختلف (۵ روز بعد از تلقیح)

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه توانایی رنگ بری دو قارچ چوب زی *T. gibbosa* و *T. hirsuta* روی دو رنگ مختلف آزویی Congo Red و Orange G مورد بررسی قرار گرفت. هر دو میکروارگانیسم دارای فعالیت اکسیدازی بودند و به همین دلیل توانستند هر دو رنگ را تجزیه کنند.در این آزمایش‌ها به میزان بالایی از رنگ بری در طی یک دوره ۱۵ روزه دست یافتیم. هر دو قارچ رنگ بری خوبی را در مورد رنگ Congo Red در طی ۵ روز اول کشت نشان دادند این نتیجه در مورد رنگ Orange G نیز به دست آمد با این تفاوت که شروع تجزیه از روز پنجم بعد کشت بود و در بازه زمانی ۸-۵ روز حداکثر رنگ بری صورت گرفت. می‌توان گفت رنگ بری دو رنگ Congo Red و Orange G توسط *T. gibbosa* و *T. hirsuta* به یک اندازه صورت گرفت تنها تفاوت در زمان شروع تجزیه بود که در مورد Congo Red از روز اول رنگ بری شروع شد اما Orange G از روز پنجم رنگ بری انجام شد که احتمالا نشان دهنده تفاوت در نوع رنگ‌ها، ساختارشان و چگونگی قرارگیری رنگ در جایگاه فعال آنزیم مربوط است(۸). Orange G به دلیل حجیم تربودن و پیچیده تر بودن ساختارش، جایابی آن را در جایگاه فعال آنزیم‌های تجزیه کننده دشوار می‌سازد(۶)، به همین دلیل می‌تواند شروع رنگ بری را تحت تاثیر قرار دهد هم چنین این احتمال هم وجود دارد که به طور کلی آنزیم‌های تجزیه کننده در ارتباط با Orange G دیرتر به محیط آبی ترشح می‌شوند که تمام این موارد نیاز به آزمایش‌های وسیع تری دارد(۱۴). البته با توجه به این که λmax جذب این رنگ با گذشت زمان تغییر می‌کند می‌توان فرض کرد که این رنگ با ساختار پیچیده در روزهای اول هم تجزیه می‌شود اما چون به ترکیبات رنگی جدید تبدیل می‌شود باعث تاخیر در رنگ بری می‌شود. هم چنین نتایج نشان

www.SID.ir

Archive of SID

داد که *T. gibbosa* قدرت رنگ بری بیشتری در مورد هر دو رنگ نسبت به *T. hirsuta* دارد که می‌تواند دلالت بر تفاوت در نوع آنزیم‌های سنتز شده در این دو قارچ دارد.در قسمت بعدی آزمایش‌ها به بررسی سمیت این دو رنگ روی رشد قارچ‌های مورد مطالعه پرداختیم. نتایج به دست آمده نشان داد که رنگ Congo Red با افزایش غلظت مانع از رشد هر دو قارچ می‌شود اما نکته قابل توجه این بود که کاهش رشد قارچ‌ها منجر به کاهش تجزیه در رنگ نشد که نشان می‌دهد که قارچ در مقادیرجزیی هم قادر به رنگ بری می‌باشد و این که نه تنها فعالیت آنزیم کاهش نمی یابد بلکه به نظر می‌رسد که افزایش رنگ تولید آنزیم را تحریک می‌کند(۱). در مورد Orange G نیز به این نتیجه رسیدیم که این رنگ به طور کلی مستقل از غلظت رشد قارچ را کم می‌کند ولی کاهش رشد باز هم منجر به کاهش تجزیه نمی شود.

منابع

1.Asgher, M., Kausar, S., Bhatti, HN., Sah, S., Ali, M. (2008). Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by Schizophyllum commune IBL-06. Int Biodeter Biodegr, 61;189–193.

2.Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, KH., Artur, CP., Gubitz, GM. (2001). Indigo degradation with purified laccases from Trametes hirsuta and Sclerotim rolfsii. J Biotechnol, 89;131-139.

3.Dawson, DI. (1981). Polymeric dyes. Aldrichim Acta ,14;23-29.

4.Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., Yan, B.(2004). Enhancement of laccase production by Pleurotus ostreatus and its use for the decolorization of anthraquinone dye. Process Biochemistry, 39;1415–1419.

5.Jin, R.F., Zhou, J.T., Zhang, A.L., Wang, J. (2008). Bioaugmentation of the decolorization rate of acid red GR by genetically engineered microorganism Escherichia coli JM109 (pGEX-AZR). World J Microbiol Biotechnol, 24;23–29.

6.Levin, L., Forchiassin, F., Viale, A. (2005). Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by Trametes trogii: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. Process Biochemistry, 40 ; 1381–1387.

7.Moreira, MT., Viacava, C., Vidal ,G. (2004). Fed-batch Decolorization of Poly R-478 by Trametes Versicolor. Braz Arch Biol and Technol, 47;179-183.

8.Nozaki, K., Beh, CH., Mizuno, M., Isobe, T., Shiroishi, M., Kanda, T., Amano, Y. (2008). Screening and Investigation of Dye Decolorization Activities of Basidiomycetes. J Biosci Bioeng, 105;69-72.

9.Ryvarden, L. , Gilbertson, R.L.(1994). European polypores,Fungiflora,Oslo.715.

10. Sathiya moorthi, P., Periyar selvam, S., Sasikalaveni, A., Murugesan, K., Kalaichelvan, PT. (2007). Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. African J Biotechnol, 6;424-429.

11. Srikanlayanukul, M., Khanongnuch, C., Lumyong, S.(2006). Decolorization of textile wastewater by immobilized coriolus versicolor rc3 in repeated-batch system with the effect of sugar addition. CMU. Journal , 5(3);301.

12. Willmott, N., Guthrie, J., Nelson, G. (1998). The biotechnology approach to co-

www.SID.ir

Archive of SID

lour removal from textile effluent. J. Soc. Dyers Colour, 114;38-41.

13. Zeroual, Y., Su Kim, B., Won Yang, M., Blaghen, M., Min Lee, M. (2007). Decolorization of some azo dyes by immobilized geotrichum sp. Biomass in fluidized bed bioreactor. Appl Biochem Biotechnol , 142;307–316.

14. Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Mart´nez, AT., Mart´nez, MJ.(2006). Laccase purification and characterization from Trametes trogii isolated inTunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. Enzyme and Microbial Technology, 39; 141–148.

www.SID.ir