

رنگبری از پساب کارخانه های نساجی به وسیله کنسرسیوم باکتری های ترموفیل

میلاذ صابرطحان^۱، عباس فرازمنند^{۲*}، احمدعلی پوربابایی^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی و علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۲. پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
۳. گروه بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه آب در دسترس برای مصارف آشامیدنی و صنعتی محدود است. با استفاده از فرآیند تصفیه می توان آب مصرفی در صنایع را که از عمده ترین مصرف کننده های آب می باشد بازیافت کرده و به چرخه صنعت بازگردانده می شود. با استفاده از باکتری های تجزیه کننده ترکیب های رنگی عملیات تجزیه و حذف رنگ ها به خصوص رنگ های گروه آزو را انجام داده شد.

مواد و روش: نمونه ها در محیط های تربیتیکاز سوی براث (TSB) کشت داده شد. با استفاده از یک محیط کشت حاوی ترکیب های رنگی پساب نساجی، توانایی رشد و تجزیه رنگ توسط سویه های جدا شده بررسی شد. از شرایط گرمخانه گذاری در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و هوادهی به مدت سه روز برای ارزیابی مقایسه ای سویه ها استفاده شد.

یافته ها: از میان ۲۴ سویه جدا شده از پساب کارخانه نساجی، کنسرسیومی از سه سویه برتر برای رنگبری پساب استفاده شد. این سه سویه جدا شده پس از غربالگری با شرایط خاص برای کنسرسیوم استفاده شد.

بحث: با استفاده از باکتری های تجزیه کننده ترکیب های رنگی عملیات تجزیه و حذف رنگ ها به خصوص رنگ های گروه آزو صورت گرفت. دمای بالای ۸۰ درجه پساب در حوضچه متعادل سازی تصفیه خانه و وجود املاح در آن، محل مناسبی را برای جداسازی باکتری های گرمادوست و تحمل کننده گرما و نمک فراهم کرده است. باکتری های جداسازی شده از سه ویژگی قابلیت تجزیه رنگ، رشد در دما بالا و تحمل نمک برخوردار شدند.

نتیجه گیری: ایجاد کنسرسیومی از سه سویه جدا شده، امکان رنگبری از نمونه واقعی پساب نساجی تا میزان ۹۰ درصد حاصل شد. این سه سویه توان رنگبری از پساب را در دمای ۳۶ تا ۵۱ درجه سانتی گراد و مقادیر pH ۵/۵ تا ۹/۵ و میزان نمک از ۰ تا ۷ درصد را دارا شدند.

واژه های کلیدی: باکتری های ترموفیل، رنگبری، نساجی، پساب، کنسرسیوم باکتریایی و تجزیه زیستی

مقدمه

مصرف کنندگان آب و در ضمن آلوده کننده مهم محیط زیست به شمار آمده اند. پساب کارخانه های نساجی حاوی مواد شیمیایی مختلف از جمله رنگ ها، فلزات سنگین، دترجنت ها، املاح، آنیون ها نظیر کلرور، سولفور، سولفید و هم چنین مواد معلق زیاد می باشد. ورود پساب نساجی به محیط زیست نه تنها ایجاد منظره ناخوشایند می کند بلکه

صنایع نساجی از زمان قدیم به عنوان یکی از بزرگ ترین

نویسنده مسئول:

پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی
ایران

پست الکترونیکی: farazmand@irost.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۳

تا به بدش: ۱۳۹۶/۳/۷

تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد و محیط‌های حاوی رنگ و بدون رنگ تلقیح نشده به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت (۵).

پس از بررسی‌های صورت گرفت کنسرسیون سه سویه از لحاظ تحمل دمایی، تحمل مقدار رنگ موجود در پساب و محیط ساختگی، مقدار رنگبری و سرعت رشد بررسی و جدا گردید.

بررسی میزان رنگ و کدورت در محیط:

ابتدا طیف جذبی هر رنگ در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر تعیین شد تا بیشینه طول موج جذبی هر رنگ مشخص شود. سپس منحنی استاندارد هر رنگ با توجه به میزان جذب در بیشینه طول موج جذبی و غلظت رنگ در محیط، رسم شد. از لوله‌های گرمخانه گذاری شده در زمان مورد نظر یک میلی‌لیتر نمونه برداشته شد و با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. میزان جذب هر رنگ در بیشینه طول موج جذبی آن اندازه‌گیری و درصد رنگبری نیز مطابق فرمول زیر محاسبه شد (۱، ۳):

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

$A =$ جذب در محیط، پس از رنگبری

$A_0 =$ جذب محیط شاهد رنگی

$D =$ درصد رنگبری

بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیک و

ریخت‌شناسی:

کلیه آزمایش‌های این بخش در مرحله رشد لگاریتمی باکتری‌ها انجام گرفت به‌جز آزمایش‌های مربوط به اسپور باکتری‌ها که در مرحله رکود رشد می‌باشند. ریخت‌شناسی کلنی روی محیط نوترینت آگار به‌اضافه پنج درصد سدیم کلراید بعد از دو روز بررسی شد. رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Burke انجام شد (۴).

تحمل نمک سدیم کلراید در حضور تراکم صفر تا ۱۰ درصد در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در محیط نوترینت آگار و محیط ساختگی شامل ۱۰ گرم در لیتر گلوکز و ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر مورد سنجش قرار گرفت. رشد در دماهای مختلف در محیط نوترینت برات یا نوترینت

بعد به محیط‌ها افزوده شدند. از بین نه سویه جدا شده، سه سویه بر اساس میزان و سرعت رنگبری انتخاب شد.

برای بررسی توان رنگبری سویه‌ها، هر یک از سویه‌ها و کنسرسیون از سه سویه برتر در محیط کشت حاوی سه رنگ مختلف دیسپرس قرمز ۶۰، دیسپرس آبی ۵۶ و دیسپرس زرد ۵۴ و پساب (پساب واقعی از همان محل نمونه‌گیری) مورد بررسی قرار گرفت.

برای انتخاب سویه‌های نهایی موارد زیر مورد آزمایش قرار گرفت:

(۱) بررسی رشد و رنگ‌دایی پساب واقعی و پساب

ساختگی با سه رنگ پرمصرف ذکر شده در صنعت نساجی و تعیین میزان رنگ حذف شده از محیط در یک هفته با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری با دستگاه اسپکتروفوتومتر WPA

(۲) تعیین میزان رنگبری در pH های مختلف

(۳) رنگبری در غلظت‌های مختلف رنگ‌های ذکر شده در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm

(۴) استفاده از رنگ به‌عنوان تنها منبع کربن

(۵) بررسی توانایی رنگبری از پساب ساختگی با مخلوط سه رنگ

تمام آزمایش‌های فوق در شرایط پایه‌ی دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۴ و غلظت ۵۰ ppm رنگ انجام گرفت.

شرایط مختلف هوادهی با استفاده از سه نوع

محیط کشت:

(۱) شرایط هوازی: محیط‌های رنگبری در ازلن‌های ۵۰ میلی‌لیتر تهیه و روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm گرمخانه گذاری شد.

(۲) شرایط بی‌هوازی: محیط‌های کشت در لوله‌های با اندازه متوسط تهیه و در جار بی‌هوازی، همراه gaspack در انکوباتور گرماگذاری شد.

(۳) شرایط آنوکسیک: لوله‌های حاوی محیط کشت مستقیم درون انکوباتور گرماگذاری شد.

کوکوباسیل گرم منفی می باشد و برای شناسایی به کلکسیون منطقه ای میکروارگانیسم های صنعتی ایران در سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (PTCC) ارسال شد. قطعه های DNA تکثیر داده شده با پرایمرهای عمومی ژن RNA ریبوزومی 16s مورد توالی یابی قرار گرفت. توالی استخراج شده این باکتری با استفاده از پایگاه داده های بیوانفورماتیک EzTaxon مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پرایمرهای عمومی (GAACGCTGGCGGCGTGCCTA) مورد استفاده قرار گرفت.

داده ها هم چنین افزایش رنگبری سویه ها را با افزایش میزان عصاره مخمر در محیط کشت نشان می دهند ولی این افزایش رنگبری از میزان ۰/۵ تا ۱ درصد عصاره مخمر در محیط با شیب ملایمی افزایش می یابد، در نتیجه به دلایل اقتصادی از ۰/۵ درصد عصاره مخمر در آزمایش های بعدی استفاده شد.

منابع کربن مختلف غیر از یک یا دو مورد که در رنگبری سویه های مختلف اثر منفی داشتند، بقیه تأثیر معنی داری بر رنگبری هیچ یک از سویه ها نداشتند. این نتیجه به توانایی های متابولیسمی باکتری های مختلف در استفاده از منابع کربن متفاوت مربوط می شود. غلظت های مختلف گلوکز هم در محیط رنگبری تأثیر معنی داری بر رنگبری هیچ یک از سویه ها نداشت.

از بین نمک های مختلف، کلرید سدیم بیشترین اثر را بر رنگبری از خود نشان داد. به نظر می رسد حضور این نمک برای رشد و فعالیت باکتری های تحمل کننده نمک ضروری است. افزایش مقدار کلرید سدیم در محیط تا حدی سبب افزایش رنگبری و سپس سبب کاهش آن در سویه مطلوب شد؛ که این اثر نیز به بارهای سطحی آنزیم مؤثر در رنگبری و فعالیت آن در غلظت های مختلف نمک، مرتبط است (۱۰).

تفاوت در رنگبری رنگ های مختلف ممکن است به ساختار و پیچیدگی رنگ های مختلف، به ویژه به گروه های عاملی

آگار در دماهای ۳۰، ۳۴، ۳۸، ۴۲، ۴۶، ۵۰ و ۵۴ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. محدوده pH برای رشد با تنظیم pH نهایی محیط با HCl و NaOH یک نرمال بین ۳ تا ۱۴ تعیین شد (۹).

تعیین توالی 16S rDNA و آنالیز فیلوژنی:

این بخش از آزمایش ها تنها در مورد سه سویه SN5، SN2، SN10 تشکیل دهنده کنسرسیون انجام شد. از سویه های مورد نظر کشت تازه تهیه کرده و سویه های مورد نظر رنگ آمیزی گرم تهیه و مشخص شد که باکتری ها، شامل یک باسیل گرم مثبت اسپور دار و دو

بحث:

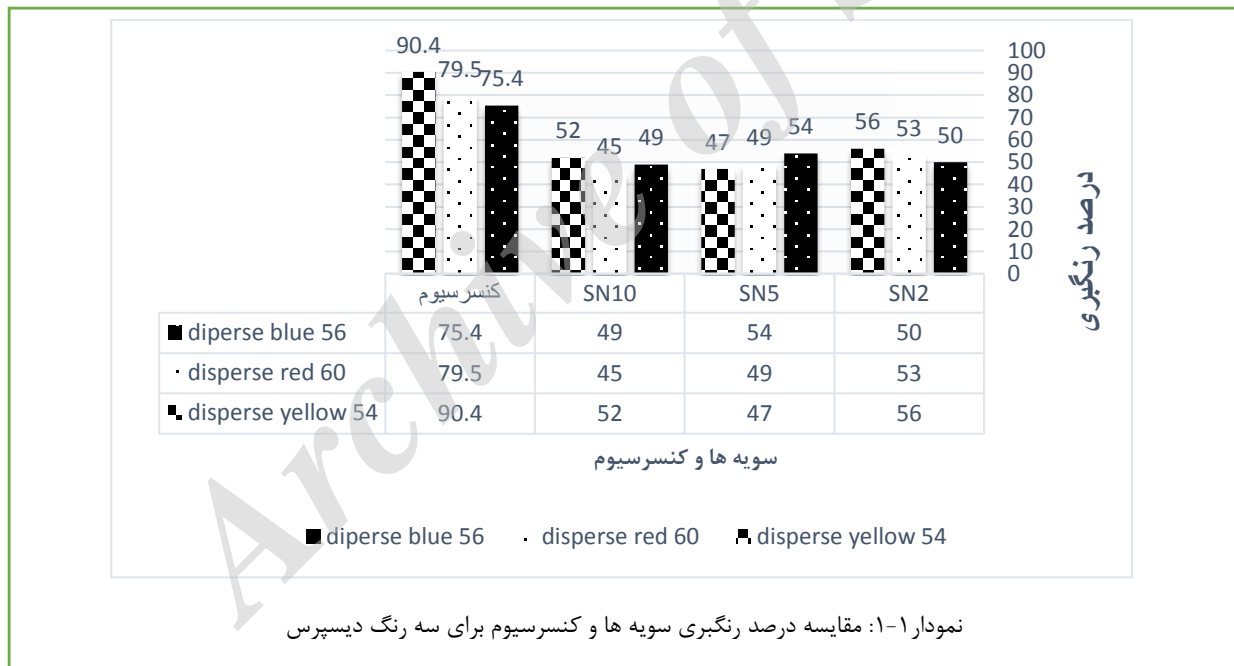
برای بررسی توان سویه ها در رنگبری از رنگ های مورد استفاده در کارخانه نساجی، با استفاده از سه سویه جداسازی شده و کنسرسیومی از این سویه ها مقدار رنگبری برای سه نوع رنگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد که کنسرسیون سه باکتری جدا شده از توان رنگبری بالاتری نسبت به حالت رنگبری توسط هریک از سویه منفرد را دارا می باشند. P. Joshi؛ و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در تجزیه بیولوژیکی از رنگ با استفاده از کنسرسیومی متشکل از باکتری جدا شده از پساب نساجی دریافتند که کنسرسیومی از باکتری سودوموناس و اکتینوباکتر ها توانایی رنگبری از پساب نساجی را تا ۹۶ درصد دارا هستند. سویه های جدا شده توسط بررسی های انجام شده به دلیل توان ترموفیل بودن نسبت به سویه های ذکر شده در آزمایش های سال ۲۰۱۵ Josh و همکاران برای تصفیه خانه ها نساجی که به دلیل بالا بودن دمای خروجی پساب، کارایی بالاتری را دارا می باشند (۱۴).

از بین منابع نیتروژن آلی و معدنی، منابع آلی بهترین اثر و از بین همین منابع آلی، عصاره مخمر مؤثرترین نقش را بر رنگبری سویه مطلوب داشت. گزارش های دیگر نیز نتایج مشابه را نشان می دهند. به نظر می رسد متابولیسم عصاره مخمر برای تولید دوباره NADH که الکترون دهنده برای احیای پیوند آزو محسوب می شود لازم است.

توانایی استفاده از رنگ به عنوان منبع کربن و انرژی در محیط از دیگر صفاتی است که میکروارگانیسم های محدودی این توانایی را دارند. سویه های جدا شده از پساب نساجی توانایی استفاده از رنگ به عنوان منبع کربن را به تنهایی ندارد ولی هر سه سویه در کنسرسیوم انتخابی در محیطی شامل یک درصد (w/v) از رنگ به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن رشد کردند. برای اطمینان از عدم استفاده از عصاره مخمر به عنوان منبع کربن و نیتروژن در آزمایش دیگری از منبع نیتروژن معدنی به جای عصاره مخمر استفاده شد، که رشد سویه های منتخب در این محیط نیز مشاهده گردید (۱) ، (۱۲).

آزمایش ها نشان داد که توانایی رنگبری سویه ها در کنسرسیوم باکتریایی به مراتب بالاتر از توانایی رنگبری

متصل به حلقه های آروماتیک و برهم کنش فضایی آن ها با پیوند آزو موجود در ساختار رنگ های دیسپرس مربوط باشد. لزوم بررسی رنگبری سویه ها از رنگ های مختلف به این دلیل است که در یک پساب نساجی طیف وسیعی از رنگ ها با ساختارهای مختلف و حتی انواع مختلفی از رنگ های با یک ساختار وجود دارد. رنگ های گوناگون هر چند از یک خانواده برای مثال دیسپرس باشند ولی گروه های جانمایی مختلفی در ساختارشان موجود است که بر رنگبری آن ها تأثیر می گذارد. بنابراین سویه هایی که تعداد بیشتری از رنگ ها را بتوانند بی رنگ کنند و توانایی رنگبری از مخلوط رنگ ها را نیز داشته باشند، از ارزش و اهمیت بالاتری برخوردارند. قابل ذکر است که این قابلیت در سه سویه منتخب وجود داشت. در نمودار بالا نشان داده شده است که توان رنگبری کنسرسیوم سه باکتری منتخب، بسیار بالاتر نسبت به حالت استفاده از تک سویه



سویه ها در حالت تک در محیط ساختگی و محیط پساب استریل می باشد.

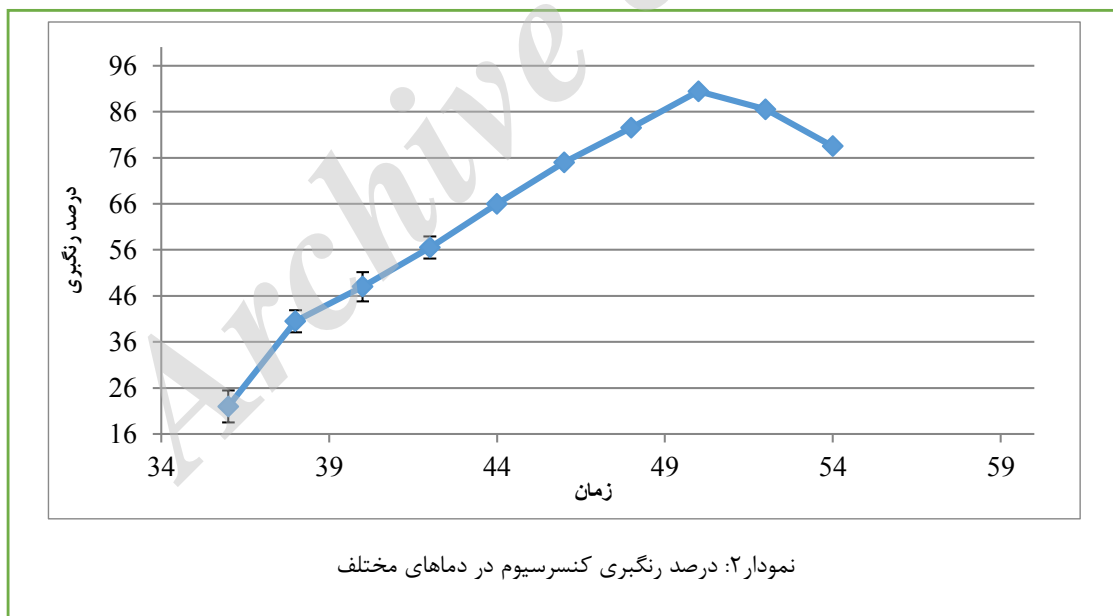
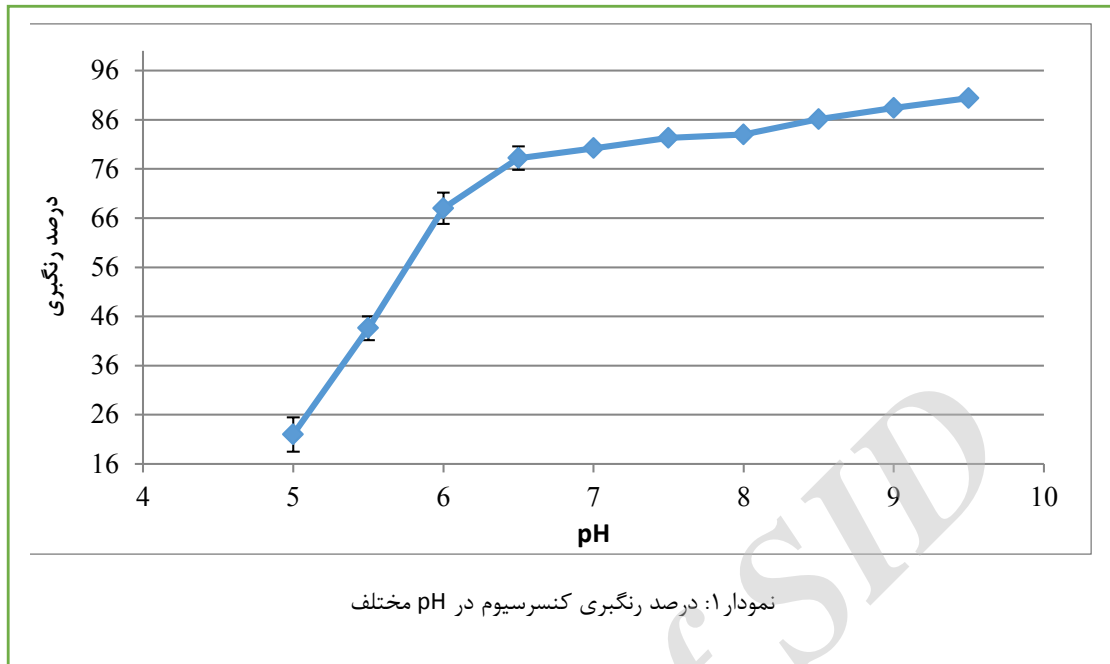
اثر فاکتورهای مختلف بر رنگبری این کنسرسیوم نیز بررسی شد. چنانچه هر سه سویه و کنسرسیوم در محدوده وسیعی از pH رنگبری بالایی دارند، که از قابلیت های دیگری است که کم تر در مورد باکتری هایی با توانایی رنگبری ذکر می شود ولی با افزایش pH میزان رنگبری

در رنگبری بود.

توان رنگبری از غلظت های مختلف رنگ توسط سویه ها، نشان دهنده ای مناسب بودن سویه برای آزمایش های رنگبری می باشد. سویه های منتخب دارای توان رنگبری تا ۵۰۰ ppm می باشند. توان رنگبری در غلظت بالا در کنسرسیوم باکتریایی بسیار مشهودتر و درصد بالاتری نشان داد (۷).

سویه‌ها جدا شد حدود ۷ و دمای آن ۵۴ درجه سانتی‌گراد بود (۸، ۱۳).

افزایش می‌یابد. افزایش رنگبری با افزایش pH ممکن است به دلیل افزایش رشد باکتری‌ها در pH های بالاتر باشد. لازم به ذکر است که pH پسایی که از آن این



نیاز به بررسی‌های بیشتر در دماهای بالاتر دارد که بتوان گفت آیا کنسرسیوم توان رشدی دارد یا نه نمودار نشان دهنده کاهش رشد بعد از دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. ولی برای نظر قطعی نیاز به بازه بیشتری می‌باشد که نیاز به طراحی انکوباتورهای شیکرداری با تحمل دمای بالا می‌باشد (۱۱).

درصد رنگبری کنسرسیوم در نمودار pH های مختلف در دمای ۵۰ درجه می‌باشد که نشان دهنده بالا رفتن درصد رنگبری همراه با افزایش pH می‌باشد. درصد رنگبری کنسرسیوم در نمودار دماهای مختلف در pH ۸ می‌باشد که نشان دهنده بالا رفتن درصد رنگبری همراه با افزایش دما می‌باشد. البته توان رنگبری کنسرسیوم در دمای بالا

شد:

- فاکتورهای بررسی شده در نمودارها به صورت جدول زیر برای کنسرسیون باکتریایی گزارش

جدول ۱: محدوده شرایط محیطی مناسب برای رنگبری توسط کنسرسیون سه باکتری SN2، SN5 و SN10 از پساب واقعی

محدوده pH	دمای قابل رشد (درجه سانتی‌گراد)	شرایط هوادهی	میزان نمک (درصد)
۹/۵ تا ۵/۵	۳۶ تا ۵۱	هوادهی - انوکسیک	۰ تا ۷

نتیجه گیری:

سپس با تأمین شرایط انوکسیک امکان حذف حداکثری رنگ فراهم گردید. نتایج نشان می‌دهد که مجموعه‌ای از عوامل مختلف بر رنگبری و در نتیجه تولید آنزیم ایفا کننده نقش اصلی مؤثر در رنگبری، مؤثر است. مقدار رنگبری نهایی که توسط کنسرسیون باکتریایی برای پساب واقعی به ثبت رسید ۹۰/۴ درصد می‌باشد. سویه‌های جدا شده و مورد بررسی در این آزمایش‌ها باسیل گرم مثبت اسپوردار و دو کوکوباسیل گرم منفی می‌باشد. کوکوباسیل ها و باسیل ذکر شده از گونه باسیلوس می‌باشند.

به صورت تنها داشت. در بررسی روش دو مرحله‌ای، مشاهده گردید که رنگبری توسط اختلاط باکتریایی از سه سویه منتخب بسیار متفاوت با حالت استفاده از سویه‌ها به صورت منفرد می‌باشد. همان‌طور که در جدول بالا نشان داده شده است، اختلاط در حالت دو مرحله‌ای درصد رنگبری بالایی به صورت حذف رنگ از محیط نشان می‌دهد. نتایج نشان‌دهنده این است که کنسرسیون کارایی بالاتری برای حوضچه‌های تصفیه‌خانه دارد.

در شرایط هوادهی رشد باکتری‌های مورد بحث حداکثر است، ولی بیش‌ترین میزان رنگبری در شرایط بی‌هوایی با کم‌ترین رشد قابل مشاهده صورت می‌گیرد. از این رو استفاده از شرایط رشد دو مرحله‌ای هوایی - انوکسیک برای رشد باکتری‌ها و رنگبری با استفاده از اختلاط سه باکتری SN2، SN5، SN10 به دست آمد. در شرایط هوایی حداکثر میزان رشد باکتری‌ها حاصل گردید و

جدول ۲: بررسی مقدار رنگبری از پساب توسط سه سویه منتخب و کنسرسیون سه سویه

مکانیسم رنگبری	میزان درصد رنگبری از پساب			سویه باکتری
	بی‌هوایی	انوکسیک (ایستا)	هوایی	
حذف	۴۵	۴۸	۵۳/۲	SN2
جذب	۳۸	۴۲	۴۸/۳	SN5
حذف	۴۰	۳۹	۶۳/۵	SN10
کنسرسیون باکتری	۴۶/۴	۸۲	۹۰/۴	کنسرسیون باکتری

سپاسگزاری:

از همکاری مجموعه پرسنل پژوهشکده زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و نیز همکاری آقای سید محمدرضا نجاتی تشکر می‌گردد.

در جدول فوق مقایسه رنگبری سویه‌ها نشان داده می‌شود که اختلاط برتری محسوسی از خود نشان می‌دهد. با توجه به حالت‌های مختلف مورد آزمایش برای تجزیه رنگ، بهترین شکل برای حذف رنگ، ایجاد شرایط رشد دو مرحله‌ای بود. در این روش دو مرحله‌ای، توان بالایی از باکتری برای رشد و رنگبری حاصل گردید.

در این روش ابتدا سویه‌ها و یا اختلاط حاصل از سویه‌ها را در حالت هوایی (شیکر انکوباتور) برای حداکثر رشد باکتری قرار داده شد و سپس در حالت حداکثری رشد باکتری یا کنسرسیون، وارد حالت ایستا (انوکسیک) گردید. با انجام این روش میزان درصد رنگبری، افزایش قابل توجهی نسبت به حالت هوایی، بی‌هوایی و انوکسیک

منابع:

1. Asad, S., M. A. Amoozegar, A. A. Pourbabaee, M. N. Sarbolouki and S. M. M. Dastgheib (2007). "Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria." *Bioresource technology* 98(11): 2082-2088
2. Ghaly, A. E., R. Ananthashankar, M. Alhattab and V. V. Ramakrishnan (2014). "Production, characterization and treatment of textile effluents: A critical review." *JCEPT journal* 5: 182.
3. Hashemi, T., S. M. Baseri and N. Bahador (2014). "Isolation of Halophilic Bacteria from Maharlu salt Lake-Iran and their evaluation for the production of bioactive compounds." 365-370.
4. Josh P. A, Biodegradation of dyes using consortium of bacterial strains isolated from textile effluent, *EJEBAU journal*, 2015, 5(7):36-40
5. Kalyani, D. C., A. A. Telke, R. S. Dhanve and J. P. Jadhav (2009). "Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1." *Journal of HM* 163(2): 735-742
6. Murray RGE, Doetsch RN, Robinow CF (1994) Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NA *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM journal.
7. Paraschiv, D., C. Tudor and R. Petrariu (2015). "The Textile Industry and Sustainable Development: A Holt-Winters Forecasting Investigation for the Eastern European Area." *Sustainability* 7(2): 1280-1291.
8. Piszczek, J. C. (2005). "An Evaluation of Anoxic/Aerobic Treatment for the Removal of Chemical Oxygen Demand and Fiber Reactive Azo Dye Color."
9. San Miguel, G., S. D. Lambert and N. J. D. Graham (2006). "A practical review of the performance of organic and inorganic adsorbents for the treatment of contaminated waters." *JCTB journal* 81(10): 1685-1696
10. Sharma S. , Isolation and Identification of a novel Endophyte from a plant *Amaranthus spinosus* *International Journal of CMAS* ISSN: 2319-7706 Volume4Number2(2015)pp.785-798.
11. Verma, A. and P. Shirkot (2014). "Research Article Purification and Characterization of Thermostable Laccase from Thermophilic *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 and its applications in removal of Textile Dyes. *SAJB journal*: 479-485.
12. Viswanath, B., B. Rajesh, A. Janardhan, A. P. Kumar and G. Narasimha (2014). "Fungal laccases and their applications in bioremediation." *Enzyme research* 2014.
13. Yu, S., M. Liu, M. Ma, M. Qi, Z. Lü and C. Gao (2010). "Impacts of membrane properties on reactive dye removal from dye/salt mixtures by asymmetric cellulose acetate and composite polyamide nanofiltration membranes." *JMS journal* 350(1): 83-91.
14. Josh P. A, Biodegradation of dyes using consortium of bacterial strains isolated from textile effluent, *European Journal of Experimental Biology*, 2015, 5(7):36-40