

بررسی توانایی رنگبری رنگ آزو بتا نفتول نارنجی توسط باکتری نمک دوست Halomonaz Strain Gb و بهینه‌سازی فاکتورهای دما، pH و غلظت

غزاله انتظاری^{۱*}، مریم اوتادی^۲ و راهبه امیری^۳

۱- گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد، ایران

۲- گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی، ایران

۳- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۴

چکیده

در این پژوهش توانایی رنگبری رنگ آزو بتا نفتول نارنجی توسط باکتری نمک دوست (Halomonaz Strain Gb) و اثر فاکتور غلظت، pH و دما بر رنگبری بررسی می‌شود. با استفاده از ثابت نگهداشتن یک عامل و تغییر عوامل دیگر شرایط بهینه رنگبری، حاصل می‌شود. بالاترین درصد رنگبری ۸۸٪ است که در غلظت ۴۰ ppm و دمای ۳۸°C و pH=۹ پس از ۶ روز گرماگذاری به دست آمد. غلظت در محدوده وسیع ۱۵-۱۲۵ ppm بررسی شد و به همین دلیل توانایی باکتری در رنگبری در دو بخش غلظت‌های کمتر و بیشتر از ۴۰ ppm تحلیل شد. اثرگذارترین فاکتور، pH بود و با افزایش pH در محدوده ۶-۹، رنگبری به‌طور چشمگیری افزایش یافت. فاکتور دما در محدوده ۳۵-۴۰°C تاثیر چندانی بر رنگبری نداشت. مقایسه طیف‌های حاصل از HPLC و UV-Vis قبل و بعد از رنگبری و همچنین مشاهده پدیده توتومری در طیف‌های حاصل از IR موید رنگبری قابل توجه می‌باشد. به‌علت اینکه باکتری مذکور نمک دوست و تحمل‌پذیر نمک است، در تمامی مراحل آزمایش (W/V) ۵٪ کلرید سدیم در نظر گرفته شده است.

کلمات کلیدی: باکتری نمک دوست و تحمل‌پذیر نمک Halomonaz Strain Gb، رنگبری، رنگ آزو بتا نفتول نارنجی، رنگ آزو

مقدمه

نفت و پتروشیمی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱ و ۲]. این رنگ‌ها از مواد آلوده کننده طبیعت به شمار می‌آیند که همراه با پساب کارخانجات صنعتی وارد محیط زیست می‌شوند.

علاوه بر اثر رنگی مشهود و ایجاد ظاهر نامناسب و افزایش شاخص‌های آلاینده‌گی نظیر COD، بسیاری

رنگ‌های سنتزی به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان عناصر رنگ‌کننده در صنایع نساجی، غذایی، کاغذسازی، آرایشی، دارویی، چاپ و نیز صنایع

سازگاری با طبیعت (عدم نیاز به مواد شیمیایی)، راهبری آسان و هزینه کمتر جهت حذف این مواد از پساب‌های صنعتی حائز اهمیت هستند. فرآیندهای بیولوژیکی برای تصفیه پساب‌های رنگی به صورت هوازی، بی‌هوازی و یا ترکیبی از این دو روش یعنی بی‌هوازی-هوازی انجام می‌گیرد. چون رنگ‌های آزو قابل احیا شدن هستند هنگامی که در زنجیره انتقال الکترون ریزموجودات، به‌عنوان الکترون گیرنده عمل می‌کنند بی‌رنگ می‌شوند [۸].

رنگبری رنگ‌های آزو توسط باکتری‌ها با شکستن (احیاء) بی‌هوازی باند آزو که منجر به تشکیل آروماتیک آمین‌های سازنده رنگ می‌شود انجام می‌گیرد. عدم کارایی مناسب در فرآیندهای رنگبری باعث می‌شود که ۳۰-۷۰٪ از رنگ به کار رفته وارد پساب شود [۱]. همچنین در مراحل از رنگبری در صنایع نساجی برای بالا بردن کارایی از نمک‌های محلول مانند کلرید سدیم یا کلرید پتاسیم استفاده می‌شود [۲]. در نتیجه از آنجا که باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌پذیر نمک، تحمل‌پذیری بالایی نسبت به شرایط سخت محیطی مانند وجود مقدار بالای نمک و مواد آلاینده مانند فلزات سنگین و اکسی‌انیون‌ها از خود نشان می‌دهند، انتخاب بسیار مناسبی برای پساب‌های حاوی فلزات سمی و کمپلکس فلزی رنگ‌ها به نظر می‌آیند.

در این تحقیق از میان باکتری‌های نمک دوستی که توانایی خوبی در رنگبری دارند [۳]، یکی از سویه‌ها انتخاب شده و مشخصاً توانایی رنگبری آن سویه جهت رنگبری یکی از رنگ‌های آزو محلول در آب که در صنعت پرمصرف می‌باشد، و میزان اثر سه فاکتور موثر بر رنگبری، بررسی و بهینه‌سازی انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم مورد استفاده

باکتری نمک دوست Halomonas strain G₀ به‌منظور رنگبری از دو کارخانه نساجی موجود در قم و کاشان که هر

از رنگ‌های مصنوعی سمی، جهش‌زا، سرطان‌زا و مقاوم به تجزیه می‌باشند [۲]. متداول‌ترین رنگ‌های مصنوعی به کار رفته در صنعت و بزرگ‌ترین گروه رنگ‌های سنتزی که حدود ۷۰٪ آنها رنگ‌های آزو می‌باشند که با پیوند دوگانه نیتروژن-نیتروژن متصل به آمین‌های آروماتیک شناخته می‌شوند. این رنگ‌ها طوری طراحی شده‌اند که نسبت به نور و مواد شیمیایی مقاوم بوده و به راحتی تجزیه نمی‌شوند. همچنین بسیاری از این ترکیبات، سمی، جهش‌زا (موتازن) و سرطان‌زا بوده و به دلایل ذکر شده، رها شدن آنها در محیط زیست و آب‌های آزاد و زیرزمینی، آلودگی‌ها و خطرات زیست محیطی جدی می‌آفریند. [۳ و ۴].

رنگ‌های آزو موجود در پساب در مقابل روش‌های معمول تصفیه مقاوم هستند و دلیل این امر مقاوم بودن پیوند شدیداً الکترون کشنده آزو به اکسیژن‌نازها [۵] و همچنین گروه‌های آروماتیک بزرگی است که پیوند آزو متصلند [۳].

روش‌های مختلفی برای تصفیه پساب‌های صنعتی حاوی رنگ‌های سنتزی وجود دارد. این روش‌ها در سه گروه فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی طبقه‌بندی می‌شوند [۳].

از نمونه روش‌های شیمیایی و فیزیکی می‌توان به جذب سطحی اکسیداسیون، لخته‌سازی و فرآیندهای غشایی اشاره نمود. این روش‌ها با وجود اینکه معمولاً سرعت عمل بالا و قابلیت بالای حذف رنگ‌ها را دارا هستند [۳]، اما به دلایلی همچون هزینه عملیاتی بالا، بازدهی پایین، عدم کارایی برای طیف گسترده‌ای از رنگ‌ها، تولید محصولات جانبی که سمی بوده و نیاز به تصفیه و پاکسازی مجدد دارند و تولید لجن غلیظ، برای استفاده در تصفیه و رنگبری پساب‌های رنگی، راه حل موفق و مناسبی نیستند [۶]، به علاوه BOD و COD بالا، بالا بودن دما، pH و حضور یون‌های فلزی در این پساب‌ها از دلایل دیگر ناکارآمد ساختن این روش‌ها است [۱]. روش‌های زیستی به دلیل

حلالیت رنگ در محیط رنگبری در غلظت (w/v) ۰/۲۵٪ از بتا نفتول نارنجی مشاهده شد و در مقادیر بالاتر و پایین‌تر، حلالیت دچار افت شد. کاهش حلالیت در مقادیر بالاتر از (w/v) ۰/۲۵٪، می‌تواند به نیروهای کشش سطحی مرتبط باشد. در بحث رنگبری، اولین قدم حل شدن رنگ محیط رنگبری است. به همین دلیل ترکیب درصد (w/v) ۰/۲۵٪، به‌عنوان مقداری ثابت در تمامی مراحل آزمایش در نظر گرفته شد. در این مطالعه خود رنگ به‌عنوان منبع کربن و انرژی جهت مصرف میکروارگانیسم‌ها است.

روش آماده‌سازی محیط رنگبری :

محیط Minimal medium به‌همراه (w/v) ۰/۵٪ نمک کلرید سدیم:

محلول A: ترکیبات در ۴۱۰ ml آب مقطر

۲/۵ g : KNO₃

۰/۵ g : (NH₄)₂SO₄

۰/۴۳ g : K₂HPO₄.3H₂O

۰/۲۷ g : KH₂PO₄

محلول B: ترکیبات در ۵۰ ml آب مقطر

۱ g : MgSO₄.7H₂O

محلول C: ترکیبات در ۵۰ ml آب مقطر

۰/۱ g : CaCl₂.2H₂O

۰/۰۵ g : FeSO₄.7H₂O

۰/۰۲۵ g : MnSO₄.H₂O

محلول D: NaCl (w/v) ۰/۵٪ در ۸۰ ml آب مقطر

محلول‌های A، B، C و D هر یک جداگانه استریل شده و پس از خنک شدن تا دمای محیط، محلول A با ۵ ml از محلول B و ۵ ml از محلول C و محلول D تا رسیدن به حجم نهایی ۵۰۰ ml در شرایط استریل مخلوط شدند (درصد نمک با توجه به حجم نهایی ۱۰۰۰ ml محاسبه می‌شود) و سپس میزان pH با NaOH یک نرمال تنظیم شد.

روش انجام آزمایشات رنگبری

بعد از آماده‌سازی محیط پایه رنگبری، محلول NaOH یک نرمال استریل شده را جهت تنظیم pH

دو در مناطق دارای آب شور کشور قرار دارند، توسط گروه پژوهشی دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه تهران جداسازی و شناسایی شده است. [۱ و ۷]. (شماره دستیابی، DQ ۳۸۲۹۰۹ و در سایت NCBI ثبت شده است).

محیط کشت نگهداری باکتری‌ها

محیط Nutrient agar حاوی (w/v) ۰/۷٪ نمک کلرید سدیم است. pH محیط قبل از اتوکلاو کردن توسط NaOH یک نرمال روی ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گشت. نمونه‌ها پس از کشت دادن در محیط به مدت ۷ روز در انکوباتور در دمای ۳۵°C جهت رشد گرماگذاری شده و سپس در دمای ۴°C در یخچال نگهداری و هر دو هفته یک بار واگشت شدند.

محیط کشت رنگبری

به محیط Minimal medium for denitrifying bacteria (ria) به دلیل نمک دوست بودن باکتری به میزان (w/v) ۰/۱۰-۰/۲۵٪ نمک کلرید سدیم اضافه شده و از خود رنگ به‌عنوان منبع کربن استفاده گشت. تمام مواد تشکیل دهنده محیط رنگبری از شرکت (Darmstadt, Germany) و رنگ از شرکت Merck خریداری شدند.

رنگ مورد استفاده

بتا نفتول نارنجی (color index 12120) (β -NapHtol orange) که در لابراتوار شیمی دانشگاه آزاد واحد تهران مرکز سنتز شده است. رنگ از پیگمنت‌های دی آزوی محلول در آب بوده، با فرمول شیمیایی C₆H₁₁N₂SO₄Na و وزن مولکولی ۳۵۰ g/mol می‌باشد. همچنین از NaOH یک نرمال جهت تنظیم pH، استفاده شده است.

روش آماده‌سازی استوک رنگ: پودر رنگ دی نفتول نارنجی که محلول در آب می‌باشد را به میزان (w/v) ۰/۲۵٪ و به مدت ۱۵ min در حمام اولتراسونیک (Ultrasonic bath) قرار داده، سپس اتوکلاو شد. در تعیین مقدار بتا نفتول نارنجی، مقادیر (w/v) ۰/۱۰٪، ۰/۲۵٪، ۰/۴۵٪ و ۰/۵۰٪ به استوک رنگ افزوده شدند. بالاترین

در مدت ۱۲ روز، هر ۴۸ hr از نظر رنگبری مورد سنجش قرار گرفتند. آنالیزهای UV-Vis و HPLC و IR در شرایط بهینه به دست آمده برای سویه بررسی شد.

روش سنجش رنگبری

به منظور به دست آوردن درصد رنگبری از روش طیف سنجی در طول موج حداکثر جذب استفاده شد. از لوله‌های گرماگذاری شده در زمان مورد نظر ۱ ml نمونه گرفته شده و نمونه‌ها به مدت ۵ min در یک سانتریفوژ یخچالی (Hettich, Micro 200R, Germany) که روی ۲۰°C تنظیم شد، با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. لوله‌ها قبل از نمونه‌گیری، توسط صفحه لرزان^۲ کاملاً هم زده شدند تا محلول مورد نمونه‌گیری قبل از این کار کاملاً یکنواخت گردد. میزان جذب هر یک از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Varian Cary 100, USA) در طول موج ماکزیمم رنگ (۴۸۰ nm) خوانده شده و در مقایسه با محیط شاهد (محیط رنگبری حاوی رنگ بدون تلقیح باکتری)، درصد رنگزدایی طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$D \% = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (1)$$

D = درصد رنگبری

A_0 = جذب اولیه (شاهد) در طول موج ماکزیمم

A = جذب محیط کشت بعد از رنگزدایی در طول موج ماکزیمم

در تمامی زمان‌های نمونه‌گیری، هم میزان جذب نمونه‌های رنگبری شده و هم شاهد در محدود ۸۰۰-۲۰۰ nm اسکن شدند تا امکان مقایسه آنها وجود داشته باشد. در تمامی مراحل انجام تحقیق و آنالیزهای انجام گرفته، به منظور حذف خطای ناشی از تغییر تدریجی رنگ در اثر دما، محیط‌های شاهد به همراه نمونه‌ها گرماگذاری شد. این مسئله به‌ویژه در اندازه‌گیری درصد رنگبری اهمیت داشت.

به محیط پایه اضافه می‌شود تا به pH مورد نظر برسد. ۱۵ ml از محیط رنگبری درون لوله‌های ۳۰ ml (سایز بزرگ) توزیع شده و سپس به هر لوله آزمایش یک لوپ کلنی خالص تلقیح شد. بعد از تلقیح، لوله‌ها به مدت ۱۲ روز در دمای ۳۵°C در شرایط استاتیک گرماگذاری شدند تا عمل رنگبری صورت گیرد.

روش بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رنگبری

در این پژوهش تاثیر سه عامل دما، غلظت و pH بر رنگبری بررسی می‌شود و با تغییر یک عامل در هر آزمایش و ثابت نگه داشتن دیگر عوامل^۱ بهینه‌سازی انجام شد؛ که به اختصار این روش را OFAT می‌نامیم.

در هر آزمایش، فقط یک عامل تغییر داده شده و سایر عوامل به‌عنوان عوامل پایه ثابت نگهداشته شدند و نتیجه به دست آمده در هر مرحله، در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت. شرایط بهینه با تغییر پارامترهای غلظت رنگ، pH، و دمای انکوباسیون تعیین شد. به‌علت نمک دوست بودن این باکتری‌ها غلظت NaCl (w/v) در همه آزمایش‌ها ۵٪ و رنگ به‌عنوان منبع کربن و انرژی است. شرایط پایه برای شروع اپیتم‌ساز pH=6 دمای انکوباسیون ۳۵°C و غلظت NaCl (w/v) ۵٪ است.

لوله‌های آزمایش پس از تلقیح باکتری به مدت ۱۲ روز در دمای ۳۵°C (دمای پایه) انکوبه شدند. بهینه غلظت به دست آمده در این مرحله، به‌عنوان عامل ثابت در مرحله بعد در نظر گرفته شد. در بررسی اثر pH، محیط رنگبری با NaCl (w/v) ۵٪ با غلظت بهینه حاصل از مرحله قبل در pHهای مختلف (۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰) ساخته شده و به مدت ۱۲ روز در دمای ۳۵°C گرماگذاری انجام شد. در آخرین مرحله، اثر دما بر محیط پایه رنگبری با غلظت و pH مراحل قبلی بررسی شد، بدین‌صورت که پس از تلقیح باکتری‌ها در دماهای مختلف (۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰°C) گرماگذاری انجام پذیرفت. برای بررسی عوامل مختلف همه نمونه‌ها

1. One Factor at a Time Method

2. Shaker

روش‌های بررسی مکانیسم رنگبری

مقایسه طیف ماورا بنفش - مرئی (UV-Vis)

هر ۴۸ hr یک‌بار از نمونه‌های گرفته شده قبل و بعد از رنگبری در بازه طول موج ۲۰۰-۸۰۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اسکن جذب گرفته شد، با مقایسه پیک‌های مربوط به نمونه‌های شاهد (محیط قبل از رنگبری) و محیط رنگبری شده مکانیسم رنگبری مورد بحث قرار گرفت.

تهیه کروماتوگرام HPLC

آماده‌سازی نمونه‌ها برای انجام آنالیز HPLC به این ترتیب که پس از ۱۲ روز گرماگذاری، از محیط‌های شاهد و رنگبری شده در شرایط بهینه، نمونه گرفته شده و نمونه با فیلتر تفلونی ۰/۴۵ میکرونی صاف شد تا هیچ ذره معلق‌ی وارد ستون نشود. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های صاف شده در دمای محیط به دستگاه HPLC تزریق شدند. ستون دستگاه HPLC از نوع C₁₈ (Symmetry) به طول ۴۰۶ mm و قطر ۲۵۰ mm بود. فاز متحرک شامل ۵۰٪ متانول، ۴۹/۷٪ آب و ۰/۳٪ اسید فرمیک با دبی ۰/۵ ml/min استفاده شد. طول موج دتکتور uv برابر با ۴۸۰ nm و دمای تزریق به دستگاه، دمای محیط است. و از دستگاه Knauer مدل ۲۵۰۰ k مجهز به دتکتور uv مدل ساخت کشور آلمان استفاده شد. کروماتوگرام HPLC نمونه‌های قبل و بعد از رنگبری در مدت زمان ۱۱/۱۹ min به دست آمده و نتایج با هم مقایسه شدند. مکانیسم رنگبری از تفاوت ارتفاع پیک‌های موجود در کروماتوگرام نمونه‌های شاهد (محیط رنگبری بدون تلقیح باکتری) و رنگبری شده مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه طیف‌های IR

دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز جهت شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات مختلف آلی و معدنی به کار می‌رود. با استفاده از KBr مخصوص اسپکتروسکوپی نمونه را به صورت قرص شفاف در آورده و در داخل سل مخصوص دستگاه گذاشته شد

و سپس طیف‌های حاصل از دستگاه IR بررسی شد.

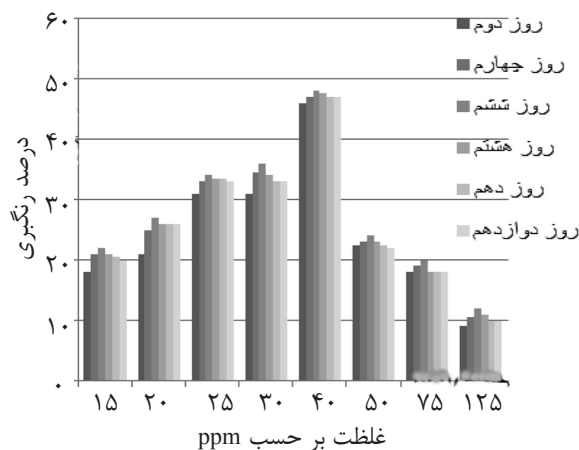
نتایج حاصل از بهینه‌سازی شرایط رنگبری:

تأثیر غلظت بر رنگ‌دایی

اولین عامل مورد بررسی غلظت است. هدف از انجام این مرحله به دست آوردن بهترین غلظت رنگ، برای داشتن بیشترین رنگبری است. در این مرحله، شرایط پایه محیط رنگبری با ۵٪ (w/v) نمک سدیم کلراید، دمای ۳۵ °C و pH=6 از استوک رنگ، غلظت‌های (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۷۵ ppm) تهیه شده و به مدت ۱۲ روز در دمای ۳۵°C (دمای پایه)، انکوباسیون انجام گرفت.

از لوله‌های انکوبه شده در فاصله‌های زمانی مشخص نمونه‌گیری شده و سپس توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان جذب نمونه‌های رنگ حاوی باکتری و نمونه شاهد (محیط کشت حاوی رنگ بدون تلقیح باکتری) در طول موج حداکثر جذب رنگ مورد نظر (۴۸۰ nm)، خوانده شده و رابطه درصد رنگبری محاسبه شد. نتایج مربوط به درصد رنگبری غلظت‌های متفاوت توسط باکتری G₀ در فاصله زمانی هر ۴۸ ساعت یک بار در شکل‌ها آمده‌اند.

با توجه به شکل ۱، سویه G₀، در این مرحله بهینه‌سازی، بالاترین درصد رنگ بری (۴۸٪) را در غلظت ۴۰ ppm از خود نشان داده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود در محدوده (۱۵ تا ۴۰ ppm) درصد رنگبری رو به افزایش است و در محدوده (۴۰ تا ۱۲۵ ppm) این روند رو به کاهش است و پایین‌ترین رنگبری متعلق به غلظت ۱۲۵ ppm و میزان ۱۲٪ می‌باشد. در بررسی اثر غلظت می‌توان گفت که در غلظت‌های بالاتر از ۴۰ ppm، با افزایش غلظت رنگبری کاهش می‌یابد. زیرا با افزایش میزان غلظت اولیه رنگ آزو، سرعت و مقدار رنگبری کاهش می‌یابد و توجیه این روند نیز تجمع محصولات حاصل از رنگبری و آروماتیک آمین‌هایی است که سمی بوده و برای میکروارگانیزم ایجاد بازدارندگی می‌کنند [۸].



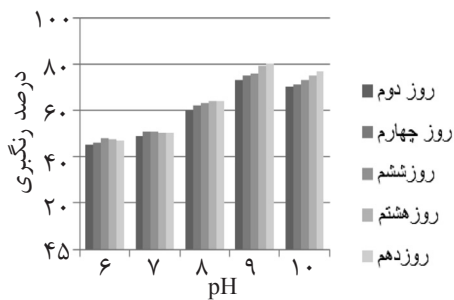
شکل ۱- بهینه‌سازی غلظت رنگ توسط باکتری G_p

منظور، محلول‌های رنگی با غلظت بهینه به دست آمده در مرحله قبل را در pHهای مختلف تهیه کرده و پس از تلقیح باکتری‌ها، به مدت ۱۰ روز در دمای 35°C گرماگذاری انجام شد. در مرحله بهینه‌سازی غلظت، بازه زمانی ۱۲ روزه در نظر گرفته شد و همچنان که در مرحله قبل مشاهده شد مقادیر به دست آمده در روز دهم و دوازدهم یکسان و یا بسیار نزدیک بود و در مورد pH و دما نیز همین‌طور بود، به همین دلیل در بهینه‌سازی pH و دما، نتایج ده روز ارائه شده است؛ چون نتایج روز دهم و دوازدهم یکسان بود. pH محیط رنگ بری آماده شده ۶ می‌باشد و بالا بردن pH با کمک NaOH یک نرمال از پیش اتوکلاو شده، انجام گرفت. نتایج نمونه‌گیری در روزهای دوم، چهارم، ششم، هشتم و دهم به منظور بهینه‌سازی pH، در شکل ۳ آمده‌اند و شکل ۴ عملکرد باکتری در $\text{pH}=9$ و غلظت ۴۰ ppm (بهینه)، است. با توجه به یافته‌ها، سویه مورد نظر در محدوده وسیعی از pH، [۶-۱۰] دارای رنگبری قابل قبولی می‌باشد. این قابلیت، برای استفاده از این باکتری در فرآیندهای رنگبری، امتیازی است که به ندرت در باکتری‌های دیگر مشاهده شده است [۱۱ و ۱۲]. در این مرحله، بیشترین مقدار رنگبری در این سویه ۸۰٪، در غلظت ۴۰ ppm و $\text{pH}=9$ و پس از ۱۰ روز گرماگذاری حاصل شد.

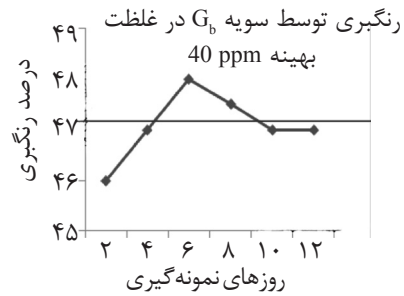
همچنین در برخی موارد افزایش غلظت رنگ منجر به بلوکه شدن مناطق فعال^۱ آنزیم آزورداکتاز و در نتیجه کاهش میزان رنگبری می‌گردد [۹ و ۱۰]. همچنین رنگها سنتز اسیدهای نوکلئیک و همچنین رشد سلول را مهار می‌کنند [۱]. اما در غلظت‌های کمتر از ۴۰ ppm، به دلیل آنکه رنگ به عنوان منبع غذایی محسوب شده است و از رنگ به عنوان منبع کربنی استفاده می‌شود، با افزایش غلظت، رنگ بری افزایش یافته است. یعنی تا قبل از غلظت ۴۰ ppm، ارزش غذایی رنگ بر اثر سمی آن غالب است. دریافت دیگری که می‌توان از روی شکل ۱ داشت این است که G_p بیشترین رنگبری را در تمامی غلظت‌ها، در سومین بار نمونه‌گیری داشته است (پس از ۶ روز) و بعد از آن در نمونه‌گیری‌های بعدی اندکی از مقدار آن کاسته شده است. از آنجایی که رنگبری توسط سلول‌ها به میزان رشد آنها بستگی دارد در روزهای اول تا ششم، باکتری از منبع کربنی رنگ استفاده کرده و رشد یافته و میزان رنگبری افزایش یافته و از روز ششم به بعد بر اثر کاهش رشد رنگبری کاهش یافته است. عملکرد سویه G_p در دوازده روز متوالی در غلظت ۴۰ ppm (غلظت بهینه) در شکل ۲ رسم شده است.

تاثیر pH بر رنگ‌زدایی

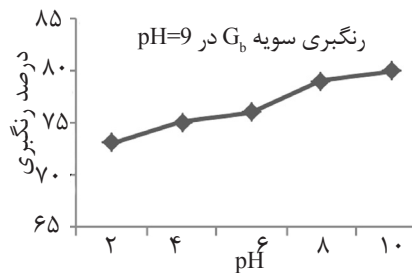
در این مرحله، فاکتور متغیر pH است و هدف به دست آوردن pH بهینه جهت حذف رنگ است. به این



شکل ۳- بهینه‌سازی pH رنگ توسط باکتری G_b



شکل ۲- عملکرد سویه G_b در رنگبری رنگ با غلظت ۴۰ ppm



شکل ۴- رنگبری در pH بهینه

pH پارامتری مهم در بحث رنگبری بیولوژیکی است چرا که این امر قابلیت میکروارگانیزم مورد مطالعه را در زیست پالایی پساب‌های رنگی که به دلیل حضور یون‌های فلزی دارای نوسانات pH هستند، نشان می‌دهد [۹ و ۱۳]. بالاترین میزان رنگبری سویه G_b در این مرحله با ۸۰٪ حذف رنگ است. و این مقدار پس از ۱۰ روز حاصل شد. با توجه به نتیجه حاصل از بهینه‌سازی pH در تحقیق حاضر، برای pH=۹ سویه G_b به عنوان pH بهینه در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تأثیر دما

برای بررسی تأثیر دماهای مختلف و به دست آوردن بهترین دما، برای بالاترین رنگبری، نتایج بهینه‌سازی مراحل قبلی ثابت نگهداشته شده و فاکتور متغیر، دما است. به این منظور محیط رنگبری با غلظت NaCl (w/v) ۵٪ و pH=۹ و غلظت ۴۰ ppm و تلقیح باکتری‌های G_b، دماهای مختلف (۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹ و ۴۰°C) گرم‌گذاری شدند.

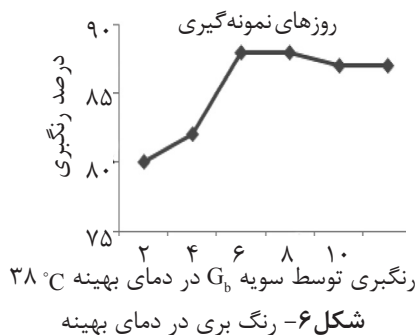
در سویه‌های G_b با افزایش pH، زمان مورد نیاز برای رسیدن به بیشترین مقدار رنگبری افزایش یافت و در هر بار نمونه‌گیری در مقایسه با ۴۸ hr قبل، افزایش چشمگیری داشت. در pH=۱۰ و در روز هشتم به بالاترین رنگبری رسیده و آن مقدار در روز دوازدهم ثابت ماند که بنا به دلایل گفته شده اطلاعات روز دوازدهم تکرار نشده است.

نکته جالب توجه دیگر در این تحقیق این است که pH اثر گذارترین فاکتور بهینه‌سازی است، تا آنجا که در سویه G_b با افزایش pH از ۶ تا ۹، ۳۲٪ رنگبری افزایش یافته است. این افزایش رنگبری را می‌توان به افزایش رشد باکتری‌ها، با افزایش pH و یا افزایش فعالیت آنزیم‌های مسئول رنگبری نسبت داد [۷]. تأثیر pH به تأثیر آن در انتقال مولکول رنگ به غشای سلول‌های میکروارگانیزم مرتبط است که به نظر می‌رسد مرحله محدود کننده در رنگبری است [۹]. نتایج بهینه‌سازی pH نشان می‌دهند، سویه مورد بررسی در مورد رنگ دی‌نفتول نارنجی قابلیت رنگبری در محدوده pH [۶-۱۰] را دارند. توانایی رنگبری در محدوده وسیعی از

کاهش یافت. این می‌تواند به دلیل کاهش فعالیت زیستی باکتری‌ها یا دناتورده شدن آنزیم آزورداکتاز باشد [۹]. بالاترین رنگ بری، در روز ششم و به میزان ۸۸٪ بود. آنالیزهای بعدی شامل IR, HPLC, UV-Vis در شرایط بهینه به دست آمده، برای بالاترین مقادیر رنگبری انجام پذیرفتند.

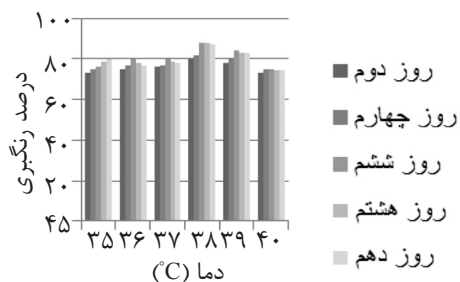
بررسی مکانیسم‌های رنگبری

بررسی طیف UV-Vis (ماوراء بنفش- مرئی) محیط قبل و بعد از رنگبری: روش اسپکفوتومتری روش کیفی مناسبی برای تشخیص مکانیسم رنگبری می‌باشد. دو پیک در تمامی شکل‌های UV-Vis محیط نمونه دیده می‌شود؛ اسکن‌های محیط‌های شاهد (قبل از رنگبری) و محیط‌های بعد از رنگبری مربوط به روزی هستند که بیشترین درصد رنگبری در آن مشاهده شد (روز ششم) یک پیک در محدوده نامرئی (۲۹۰ nm) و یک پیک در محدوده مرئی (۵۰۰ nm)، البته، واضح است که ارتفاع این پیک‌ها در محیط‌های نمونه به شدت کم شده و این کاهش ارتفاع، دلیل قطعی بر رنگبری است. همچنین لازم توجه است که پیک ناحیه مرئی که از اهمیت بیشتری برخوردار است، به شدت کاهش یافته است. شکل اسکن‌های محیط‌های شاهد (قبل از رنگبری) و محیط‌های بعد از رنگبری مربوط به روزی هستند که بیشترین درصد رنگبری در آن مشاهده شد سوپه G_0 ، روز ششم بیشینه جذب بتا نفتول نارنجی در ناحیه مرئی در ۴۸۰ nm اتفاق می‌افتد که محیط شاهد و محیط رنگبری شده را در شکل ۷ و شکل ۸ می‌توان مقایسه کرد.

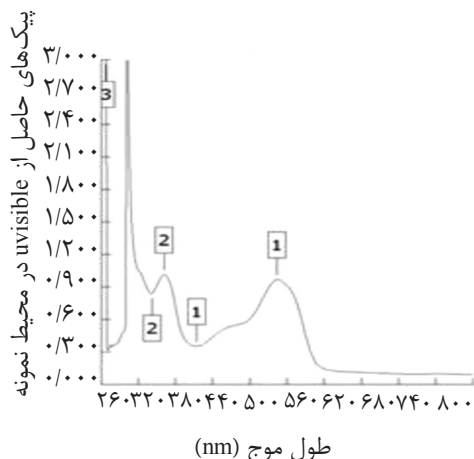


در این پژوهش، بنا به دلایلی که در مبحث غلظت ذکر شد، محدوده وسیعی برای بررسی غلظت در نظر گرفته شد؛ اما دما، فقط در محدوده $35-40^{\circ}\text{C}$ بررسی می‌شود؛ زیرا: مطالعات نشان می‌دهند که افزایش دما در تسریع فرآیند رنگبری نیز مؤثر است و افزایش دما موجب سرعت بخشیدن به فرآیند بیولوژیکی است [۱۳]، ولی این افزایش تا حد مشخصی برای رسیدن به نتیجه مطلوب کارایی دارد چرا که افزایش دما بیشتر از میزان بهینه، بر فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها اثر منفی دارد [۳]. پایین‌ترین دمای مفید برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها 35°C و بالاترین دمای مؤثر، 40°C یا 42°C می‌باشد؛ به همین دلیل در این پژوهش، به بررسی فاکتور دما در بازه $35-40^{\circ}\text{C}$ پرداخته شده است [۳ و ۹ و ۷]. با نمونه‌گیری در زمان‌های منظم و خواندن جذب در طول موج ماکزیم رنگ و درصد رنگبری محاسبه شده و نتایج، در شکل ۵ آورده شده است. رنگبری در شرایط بهینه در شکل ۶ آخرین مرحله بهینه‌سازی است که توانای باکتری G_0 را در شرایط بهینه نشان می‌دهد.

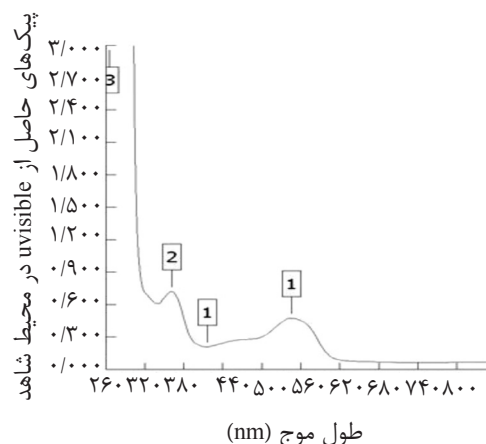
با توجه به شکل‌ها، افزایش دما از 35°C تا 40°C در مقایسه با تاثیر فاکتور غلظت و pH، اثر افزایش بر رنگبری سوپه نداشت. شاید به همین دلیل در برخی از پژوهش‌ها، دما ثابت نگه داشته شده است [۱۴]. در بازه دمایی $35-38^{\circ}\text{C}$ تغییر محسوسی در رنگبری مشاهده نشد و افزایش رنگبری با افزایش دما بسیار اندک بود، در دمای 38°C باکتری G_0 ، ۸٪ افزایش رنگبری نسبت به مرحله قبل داشتند و بعد از آن، یعنی در دماهای 39°C و 40°C رنگبری



شکل ۵- بهینه‌سازی دما



شکل ۸- (محیط نمونه): ۴۰ ppm بتا نفتول نارنجی، NaCl (محیط شاهد)؛ ۵٪، pH=9 و T=۳۸ °C در همان شرایط، البته در حضور باکتری G_p (محیط‌های رنگبری شده).



شکل ۷- (محیط شاهد) ۴۰ ppm بتا نفتول نارنجی، NaCl (w/v)؛ ۵٪، pH=9 و T=۳۸ °C و اسکن‌های محیط‌های شاهد (قبل از رنگبری) مربوط به روز ششم است. دو پیک در تمامی شکل‌های UV-Vis محیط‌های شاهد دیده می‌شود؛ یک پیک در محدوده نامرئی (۲۹۰ nm) و یک پیک در محدوده مرئی (۵۰۰ nm).

(شکل‌های ۹ و ۱۰). این پیک‌های کوچک می‌تواند ناشی از رشد و یا خود اجزای محیط کشت باشند.

بررسی مکانیسم رنگبری با استفاده از IR

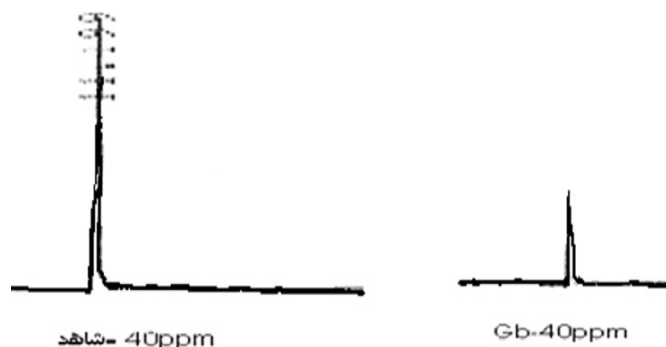
علت رنگی دیدن اشیاء، جذب در ناحیه Vis است. در شکل‌های IR، هنگامی که در بیشتر از 3000 cm^{-1} ، جذبی دیده می‌شود، مربوط به انتقال الکترون از تراز π به π^* است. در مورد بتا نفتول نارنجی این انتقال مربوط به $(N=N)$ می‌باشد. وقتی جذبی در ناحیه دیده نشود، نشان‌دهنده عدم حضور گروه‌هایی است که در آنها انتقال π به π^* انجام نمی‌شود، یعنی در مورد ترکیبات دی آزو این انتقال الکترون وجود ندارد. و در صورتی که جذب انتقال سریع هیدروژن در داخل یک ملکول، مثل رزونانس یک عامل جذب نور UV است و عاملی است که باعث می‌شود ترکیبات علاوه بر جذب UV در ناحیه Vis هم جذب داشته باشند و رنگی دیده شوند شدت کربونیل نشان‌دهنده رزونانس مطلوب و توتومری مطلوب در یک ترکیب است بنابراین در رنگ مورد مطالعه، شدت پیک کربونیل در IR که در حدود 1638 cm^{-1} می‌باشد، می‌تواند به دلیل توتومری باشد و کاهش شدت جذب در G_p ، در حدود 1638 cm^{-1} می‌تواند به دلیل قطع توتومری باشد.

دو پیک در تمامی شکل‌های UV-Vis محیط‌های شاهد دیده می‌شود؛ یک پیک در محدوده نامرئی (۲۹۰ nm) و یک پیک در محدوده مرئی (۵۰۰ nm) و در مقایسه این پیک‌ها و پیک‌های محیط نمونه، واضح است که ارتفاع این پیک‌ها در محیط‌های نمونه به شدت کم شده و این کاهش ارتفاع، دلیل قطعی بر رنگبری است. همچنین لازم توجه است که پیک ناحیه مرئی که از اهمیت بیشتری برخوردار است، به شدت کاهش یافته است.

کروماتوگرام HPLC

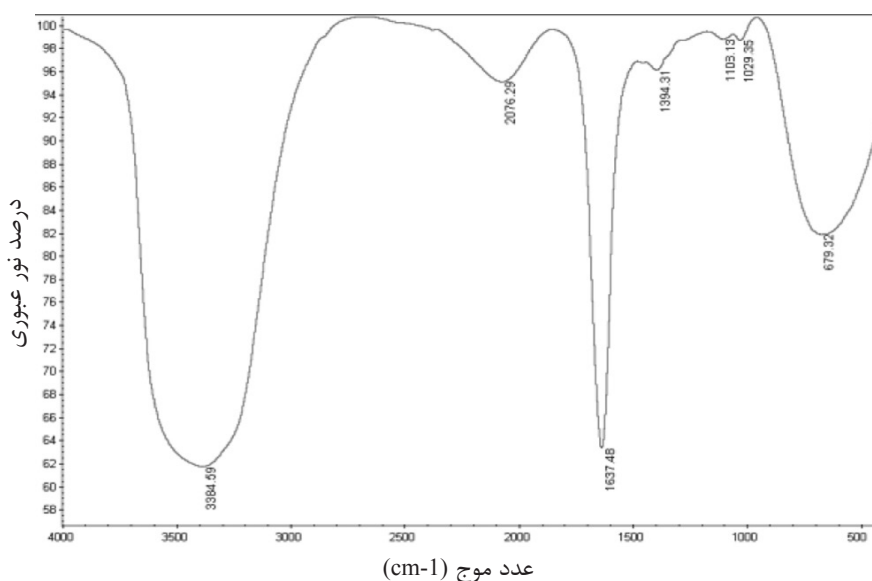
این روش مانند روش اسپکفوتومتری روش کیفی مناسبی برای تشخیص مکانیسم رنگبری می‌باشد. در این روش ارتفاع پیک‌ها قبل و بعد از رنگبری بررسی می‌شود، پایین آمدن ارتفاع پیک‌ها، به این معنی است که رنگبری انجام شده است.

کروماتوگرام محیط پایه رنگبری، پیک‌های بلندی را اندکی پس از ۱۱ و ۱۹ min نشان می‌دهد که پیک حاصل از حضور خود رنگ است. اسکن محیط‌های شاهد (قبل از رنگبری) و محیط بعد از رنگبری مربوط به رنگبری در روز ششم، در شرایط بهینه است که بیشترین درصد رنگبری در آن مشاهده شده است (۰.۸۸). پیک‌های بسیار کوچکی در محیط‌های رنگبری شده دیده می‌شود که در محیط شاهد رنگی وجود ندارد

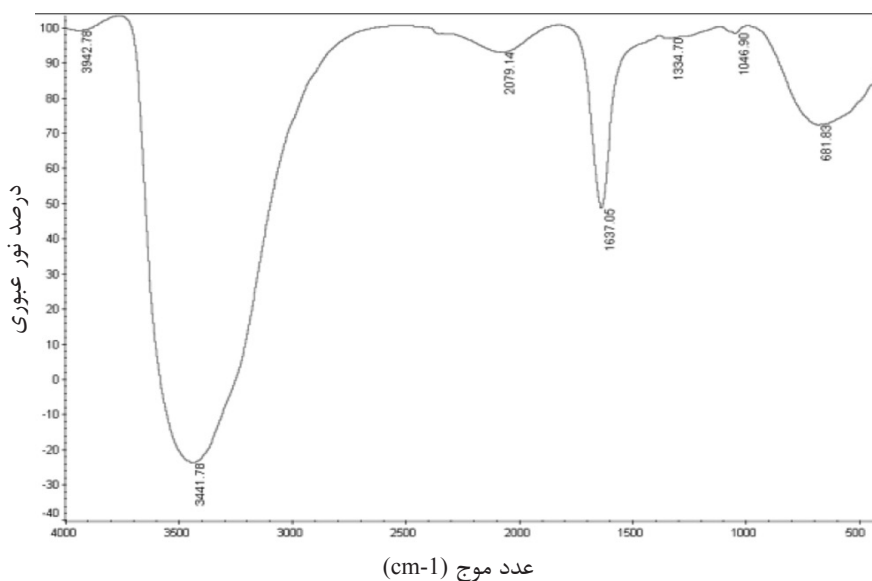


شکل ۱۰ - (پیک HPLC محیط رنگبری شده): در همان شرایط، البته در حضور باکتری G_b که منجر به رنگبری شده است.

شکل ۹ - (پیک HPLC محیط شاهد): پیک حاصل از HPLC بعد از ۱۱/۹۹۹ دقیقه در غلظت ۴۰ ppm بتا نفتول نارنجی، $T=38^{\circ}C$ و $pH=9$ ، 5% (w/v) NaCl.



شکل ۱۱ - پیک‌های حاصل از طیف‌های IR است که در شرایط عبارت از ۴۰ ppm بتا نفتول نارنجی، $T=38^{\circ}C$ و $pH=9$ ، 5% (w/v) NaCl ایجاد شده‌اند.



شکل ۱۲ - پیک‌های حاصل از طیف‌های IR در همان شرایط البته در حضور باکتری G_b است، که منجر به رنگبری شده‌اند.

نتیجه‌گیری

ششم به بعد بر اثر کاهش رشد، رنگبری کاهش یافته است.

۴- سویه G_b در محدوده وسیعی از pH (۶ الی ۱۰) دارای رنگبری قابل قبولی است که این قابلیت امتیازی است که به ندرت در باکتری‌های دیگر یافت می‌شود [۱۲ و ۱۱].

۵- با افزایش pH زمان مورد نیاز برای رسیدن به بیشترین مقدار رنگبری افزایش می‌یابد. و در هر بار نمونه‌گیری در مقایسه با ۴۸ hr قبل افزایش چشمگیری دارد. این افزایش رنگبری را می‌توان به افزایش رشد باکتری‌ها و یا افزایش فعالیت آنزیم‌های موثر در رنگبری نسبت داد [۷].

۶- pH اثر گذارترین فاکتور در بهینه‌سازی است به‌طوری‌که در این سویه با افزایش pH از ۶ تا ۹، ۳۲٪ رنگبری افزایش می‌یابد.

۷- با توجه به پژوهش‌هایی که به بررسی اثر دما پرداخته‌اند پایین‌ترین دمای مفید برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها 35°C و بالاترین دمای موثر 40°C می‌باشد. (۳، ۶، ۹ و ۱۵) به همین دلیل دمای 35°C تا 40°C بررسی شد اما با افزایش دما تغییر قابل ملاحظه‌ای ایجاد نشد. با افزایش دما از 35°C تا 38°C رنگبری فقط ۸ درجه افزایش یافت و از دمای 38°C تا 40°C رنگبری کاهش یافت.

۱- سویه G_b تحت شرایط بهینه (NaCl ، pH=۹) (w/v) ۵٪ و $T=38^{\circ}\text{C}$ و غلظت ۴۰ ppm، ۸۸٪ قابلیت رنگبری از رنگ بتا نفتول نارنجی دارد و طیف‌های حاصل از IR, UN-Vis, HPLC موید این رنگبری قوی می‌باشد.

۲- غلظت دو بخش غلظت‌های کمتر ۴۰ ppm و بیشتر از ۴۰ ppm انجام شد. در محدوده قبل از ۴۰ ppm با افزایش غلظت، رنگبری افزایش و در غلظت‌های بالای ۴۰ ppm با افزایش غلظت، رنگبری کاهش یافت. یعنی در غلظت‌های کمتر از ۴۰ با افزایش غلظت رنگ، اثر غذایی و منبع کربنی بودن غالب است و در غلظت‌های بالاتر از ۴۰ با افزایش غلظت، اثر سمی بودن رنگ غالب می‌شود و موجب مهار فعالیت متابولیکی، سنتز اسیدهای نوکلئیک و رشد باکتری‌ها می‌شود. کم‌ترین رنگبری متعلق به ۱۲۵ ppm و بیشترین رنگبری متعلق به ۴۰ ppm می‌باشد.

۳- در تمامی غلظت‌های مورد بررسی بالاترین رنگبری در روز ششم (سومین بار نمونه‌گیری) اتفاق افتاده است. از آنجایی که رنگبری توسط سلول‌ها، به میزان رشد آنها بستگی دارد؛ در روزهای اول تا ششم باکتری از منبع کربنی رنگ استفاده کرده و رشد یافته و میزان رنگبری افزایش یافته و از روز

مراجع

- [۱]. اسد ص.، آموزگار م. ع.، "ارزیابی رنگ‌زدایی زیستی ترکیبات رنگی از توسط باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌پذیر نمک جدا شده از پساب کارخانجات نساجی"، پروژه کارشناسی ارشد، ۱۳۸۵.
- [۲]. اسد ص.، آموزگار م. ع.، پوربابایی ا. ع.، دستغیب س. م.، "اثر فاکتورهای مختلف بر رنگبری از رنگ‌های آزو توسط باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک"، ۱۳۸۶.
- [۳]. استخر ز.، هنرور ب.، ش. نصرالله، آرام ف.، "جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت از مخازن نفتی گچساران و بهینه‌سازی شرایط رشد آنها"، پژوهش نفت، ۱۳۹۱

[5]. Nigam P., Banat I. M., Singh D., and Marchant R., "Microbial process of fast decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes," *Process of Biochemistry*, Vol. 31, p. 435, 1996.

- [6]. Jain K., Shah V., Chapla D., and Madamwar D., "Decolorization and degradation of azo dye – Reactive Violet 5R by an acclimatized indigenous bacterial mixed cultures-SB4 isolated from anthropogenic dye contaminated soil," *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 213-214, pp. 378-386, 30 April 2012.
- [7]. Asad S., Amoozegar M. A., Pourbabaee A. A., Sarbolouki M. N., and Dastgheib S. M. M., "Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria," *Bioresour. Technol.*, Vol. 98, pp. 2082–2088, 2007.
- [8]. Delee W., O'Neil C., Hawkes F. R., Pinheiro H. M., "Anaerobic treatment of textile effluents: A review," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Vol. 73, pp. 323-335, 1998.
- [9]. Saratale R. G., Saratale G. D., Chang J. S., Govindwar S. P., "Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review," *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Vol. 42, pp. 138–157, 2011.
- [10]. Tony B. D., Goyal D., and Khanna S., "Decolorization of direct red 28 by mixed bacterial culture in an up-flow immobilized bioreactor," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 36, 39, 2009.
- [11]. Dong X., Zhou J., and Liu Y., "Peptone-induced biodecolorization of reactive Brilliant blue (KN-R) by *Rhodococcus gelatinosus* XL-1," *Process Biochem.*, 39: 89–94, 2003.
- [12]. Moosvi S., Kehaira H., and Madamwar D., "Decolorization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1," *World J. Microb. Biot.*, Vol. 21, pp. 667–672, 2005.
- [13]. Fu L. Y., Wen X. H., Lu Q. L., and Qian Y., "Treatment of dyeing waste water in two SBR systems," *Process Biochemistry*, Vol. 36, No. 11, pp. 1111-1118, 2001.
- [14]. Mohanty S., Dafale N., and Neti Rao N., "Microbial decolorization of reactive black 5 in a two stage anaerobic/aerobic reactor using acclimatized activated textile sludge," *Biodegradation*, Vol. 17, No. 5, 403-413, 2006.
- [15]. Wang H., Su J. Q., Zheng X. W., Tian Y., Xiong X. J., and Zheng T. L., "Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Citrobacter* sp., CK3," *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 63, pp. 395–399, 2009.