

## بررسی توانایی باکتری های جداسازی شده از لجن فعال در حذف ماده رنگزای ریمازول بلاک B از محیط آبی

پگاه بهمنی<sup>۱</sup>، روشنک رضایی کلانتری<sup>۲</sup>، میترا غلامی<sup>۳</sup>، احمد جنیدی جعفری<sup>۳</sup>، زهره جوادی<sup>۴</sup>

نویسنده مسئول: تهران، میدان آرژانتین، خیابان الوند، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت محیط. [rrkalantary@iums.ac.ir](mailto:rrkalantary@iums.ac.ir)

ac.ir

پذیرش: ۸۹/۰۹/۰۶

دریافت: ۸۹/۰۶/۰۹

### چکیده

**زمینه و هدف:** سمیت زیاد، سرطان زایی و جهش زایی از جمله مشکلاتی است که مواد رنگزای راکتیو برای پستان داران و موجودات آبی ایجاد می کنند. از جمله روش های متداول برای حذف مواد رنگزا می توان به روش های فیزیکی و شیمیایی نظیر جذب، انعقاد، ته نشینی، فیلتراسیون و... اشاره نمود. به دلیل محدودیت ها و مشکلات این روش ها، تصفیه زیستی که روشی اقتصادی و موثر برای پالایش و آلودگی زدایی از فاضلاب های آلوده به مواد رنگزاست ترجیح داده می شود، در این تحقیق توانایی حذف ماده رنگزای RB-B از محیط آبی توسط مخلوط باکتریایی در شرایط آنوکسیک مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** مخلوط باکتریایی از لجن فعال صنعت نساجی در محیط کشت لوریا برات حاوی ماده رنگزای RB-B به عنوان منبع کربن، غنی سازی شد. سپس با استفاده از مخلوط باکتریایی حاصل، تجزیه زیستی در فاضلاب سنتتیک در چهار راکتور ناپیوسته مورد بررسی قرار گرفت. میزان کاهش رنگ نمونه ها توسط اسپکتروفتومتر UV-vis و هم چنین میزان رشد جمعیت میکروبی بر اساس آزمایش MPN تعیین شد.

**یافته ها:** راندمان رنگزدایی توسط مخلوط باکتریایی در غلظت های ۵۰ و ۲۵۰ میلی گرم برلیتر در زمان های به ترتیب ۷۲ و ۱۴۴ ساعت (۳ و ۶ روز) بیش از ۹۹ درصد و برای غلظت ۵۰۰ میلی گرم برلیتر ۹۸/۱ درصد در طول زمان ۲۴۰ ساعت (۱۰ روز) به دست آمد. نرخ کاهش ماده رنگزا برای غلظت های ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم برلیتر پس از حذف کامل به ترتیب به حدود ۰/۶۹، ۱/۷۴ و ۲/۰۰ میلی گرم برلیتر در ساعت رسید.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد، باکتری های آلکالی ژنز دنیتروفتیکانس و آلکالی ژنز زایلواکسیدانس جدا شده از لجن فعال توانایی خوبی در حذف ماده رنگزای RB-B داشته و میزان حذف توسط این باکتری ها به غلظت اولیه رنگ بستگی دارد و با افزایش غلظت اولیه نرخ حذف ماده رنگزا افزایش می یابد.

**واژگان کلیدی:** صنایع نساجی، ماده رنگزای RB-B، مخلوط باکتریایی، تجزیه بیولوژیکی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دکترای عمران محیط زیست، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دکترای بهداشت محیط، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- کارشناس ارشد بهداشت محیط، مربی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## مقدمه

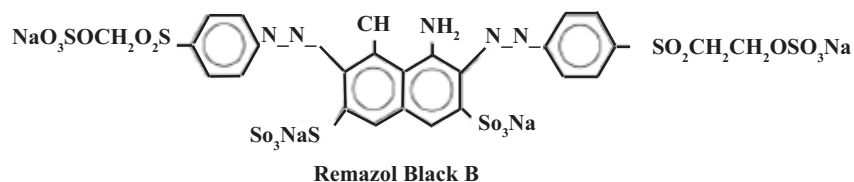
امروزه آلودگی محیط زیست از مسایل مهمی است که جوامع بشری با آن روبه رو می باشد، رشد روز افزون فعالیت های صنعتی از یک سو و عدم رعایت الزامات زیست محیطی از سوی دیگر سبب شده تا چند دهه اخیر مقادیر زیادی از آلاینده ها وارد محیط شوند. تجمع ترکیبات آلی در محیط تهدیدی جدی برای سلامت انسان، محیط زیست، موجودات زنده و اکوسیستم است (۲ و ۱). یک دسته از این آلاینده ها، مواد رنگ زای آزو هستند که بیش از ۶۰ درصد کل رنگ های تولیدی را شامل می شوند و از این مقدار حدود ۱۵-۱۰ درصد وارد فاضلاب صنایع مرتبط شده و بر اساس فعالیت های مختلف در محیط زیست تجمع می یابند (۶-۳). تخلیه پساب های رنگی به رودخانه ها و دریاچه ها منجر به کاهش کیفیت آب، کاهش انتقال اکسیژن به داخل آب و حلالیت گازها می شود (۷ و ۶). از جمله مشکلاتی که مواد رنگزای راکتیو دارای ساختار حلقوی آروماتیک برای پستان داران و موجودات آبرزی ایجاد می کنند، می توان به سمیت زیاد، سرطان زایی و جهش زایی آنان اشاره نمود (۴، ۵ و ۸). ماده رنگزای ریمازول بلاک B (RB-B) در صنایع نساجی، غذا، ساخت کاغذ، چاپ کاغذهای رنگی و چرم استفاده زیادی دارد و به عنوان یکی از آلاینده های مهم محیط زیست محسوب می شود (۸ و ۶). در کشورهای توسعه یافته برای تخلیه پساب های رنگی قوانین دولتی شدیدی برقرار است این قوانین برای کشورهای در حال توسعه در آینده نزدیک سختگیرانه تر می گردد (۱۱-۹).

برای حذف مواد رنگزا می توان از روش های فیزیکی و شیمیایی نظیر جذب، انعقاد، ته نشینی، فیلتراسیون و ... استفاده نمود. از محدودیت ها و مشکلات این روش ها، هزینه بالا، تولید مقدار زیاد لجن و در نهایت ایجاد آلودگی های ثانویه است (۲، ۱۲ و ۱۳). در سال های اخیر حذف رنگ به روش زیستی مورد توجه قرار گرفته است (۱۶-۱۳). روش های تصفیه زیستی، راه کارهای آسان، دایمی، ارزان و موثر برای پالایش و آلودگی زدایی از فاضلاب های آلوده به مواد رنگزاست. در این

روش ها از میکروارگانیسم ها برای تجزیه آلاینده ها استفاده می شود (۱۲، ۱۳ و ۱۷). بسیاری از این میکروارگانیسم ها شامل باکتری ها، قارچ ها، جلبک ها، اکتینومیسست ها توانایی حذف رنگ های آزوی راکتیو را دارند، سیکل رشد طولانی و میزان رنگ زدایی متوسط قارچ ها و جلبک ها کاربرد سیستم های رنگ زدایی توسط آنها را محدود می کند در مقابل رنگ زدایی توسط باکتری ها سرعت انجام می گیرد (۱۳ و ۱۸). از آنجا که روش های تصفیه هوازی قدرت رنگزدایی کامل مواد رنگ زای راکتیو را ندارند و باندهای آزو ( $-N=N-$ ) در مقابل باکتری ها با حضور اکسیژن مقاومت نشان می دهند لذا در اکثر تحقیقات انجام شده حذف مواد رنگزا توسط زنجیره های باکتریایی نظیر سودوموناس، آرترو باکتر، استینو باکتر، آکالی ژنز، میکروکوکوس، باسیلوس و غیره تحت شرایط آنوکسیک انجام شده است (۱ و ۲۰-۱۸). مطالعات فرایند زیستی را می توان در دو گروه دسته بندی کرد: ۱. بررسی فاکتورهای موثر بر مقدار ترکیبات تغییر شکل یافته در طی زمان ۲. بررسی انواع منحنی های توصیفی تغییر شکل ترکیبات و تعیین این که کدام یک از این منحنی ها برای تجزیه ترکیبات معین توسط کشت های میکروبی در مقیاس آزمایشگاهی و گاهی در مقیاس مکانی مناسب است (۲۱). هدف از این تحقیق، بررسی توانایی باکتری های جداسازی شده از لجن فعال در حذف ماده رنگ زای RB-B از محیط آبی در شرایط آنوکسیک است.

## مواد و روش ها

لجن فعال که حاوی باکتری های مستعد مصرف مواد رنگی بود از تصفیه خانه نیما نساج، رنگ دی آزوی سولفاناته RB-B (با اندکس رنگ ۲۰۵۰۵، فرمول شیمیایی  $C_{11}H_{11}N_5Na_4O_{14}S_6$  و وزن مولکولی ۹۹۱/۸۲ گرم بر مول) از شرکت الوان ثابت، نوترینت برات و نمک (NaCl) و مواد شیمیایی مربوط به محیط کشت معدنی و محیط کشت آیلوریا برات آگار از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. (شکل ۱ ساختار رنگ مورد استفاده را نشان می دهد).



شکل ۱: ساختار رنگ RB-B

جدا شده در حذف ماده رنگ زای RB-B، آزمایش های حذف رنگ در غلظت های مختلف ۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میلی گرم برلیتر در راکتورهای (ارلن مایر) ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۵۰ میلی لیتر محیط آلی لوریا براث با OD=۰/۱ (دانسیته نوری) در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد (۲۲). نمونه های S<sub>۱</sub>، S<sub>۲</sub>، S<sub>۳</sub> (حاوی محیط کشت، میکروارگانسیم و رنگ با غلظت های اولیه ۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰) در دمای ۳۰±۱ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شدند.

هم چنین جهت بررسی تغییرات جمعیت میکروبی، یک شاهد میکروبی حاوی محیط کشت لوریا براث و مخلوط باکتریایی بدون رنگ در شرایط مشابه قرار گرفت (آزمایش b) مطابق جدول ۱، تمامی راکتورها تحت شرایط آنوکسیک به صورت دوتایی (Duplicate) در دمای آنکوباسیون ۳۰±۱ درجه و pH=۹/۶-۳/۷ در ۴ راکتور ناپیوسته (دیواره خارجی و دهانه راکتورها با فویل پوشیده شده بود) قرار داده شدند، میزان رنگ زدایی نمونه ها در فواصل زمانی مختلف پس از ساتریفوژ نمودن به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه با اسپکتروفتومتر UV-vis CECIL (مدل ۷۱۰۰) در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجش شدند (۱۳، ۲۰ و ۲۴) و میزان رشد جمعیت میکروبی نیز در نمونه ها بر اساس آزمایش MPN مورد آنالیز قرار گرفت.

هم چنین به منظور بررسی روند کاهش ماده رنگ زای RB-B در فرایند زیستی و تعیین میزان حذف ساعتی مخلوط باکتریایی معادله های منحنی های حاصل نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جداسازی و شناسایی میکروارگانسیم ها: حدود ۱۰ گرم لجن فعال که از حوض تانک ته نشینی ثانویه تصفیه خانه نیما نساج تهیه شده بود به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی با ترکیبات ۶Na<sub>۲</sub>HPO<sub>۴</sub>، ۳KH<sub>۲</sub>PO<sub>۴</sub>، ۱NH<sub>۴</sub>Cl، ۰/۵ NaCl, g/Land ۱M MgSO<sub>۴</sub>، ۱ml/L اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد، سپس به منظور غنی سازی میکروبی، ۱۰ میلی لیتر از محلول رویی به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت آلی لوریا براث با ترکیبات Casein enzymic hydrolysat, ۵Yeast extract, ۵NaCl, g/L، حاوی غلظت های مختلف ماده رنگزای ۵NaCl, g/L اضافه شد (۲۲) و به مدت ۱۲ ساعت در B ریمازول بلاک شرایط مشابه (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه) بر روی شیکر گرماگذاری شد.

در نهایت از محلول تشکیل شده به بشقابک های حاوی محیط کشت لوریا براث آگار با ترکیبات Casein enzymic hydrolysat, ۵ Yeast extract, ۵ NaCl, ۱۵ agar, gr/L و رنگ به میزان ۱۰ میلی گرم برلیتر تلقیح گردید، بعد از ۲۴ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۰±۱ درجه سانتی گراد میکروارگانسیم هایی که توانایی تجزیه رنگ را داشتند به صورت کلنی های شفاف روی محیط کشت مشخص شدند (۲۲). پس از غنی سازی میکروبی، باکتری ها مورد شناسایی قرار گرفتند. برای شناسایی باکتری ها از تست های تشخیصی واکنش گرم، فنیل آلانین، لازین، اوره آز، سترات، ایندول، متیل رد و SIM استفاده شد (۲۳ و ۲۴).

رنگ زدایی: به منظور سنجش توانایی مخلوط باکتریایی

جدول ۱: مشخصات آزمایش های مختلف شامل نمونه ها و شاهد های شیمیایی و میکروبی

شماره آزمایش	نمونه ها	محیط لوریا برات	میکروارگانسیم	غلظت رنگ (mg/L)
۱	S <sub>1</sub>	+	+	۵۰
۲	S <sub>2</sub>	+	+	۲۵۰
۳	S <sub>3</sub>	+	+	۵۰۰
۴	b <sub>4</sub>	+	+	-

### یافته ها

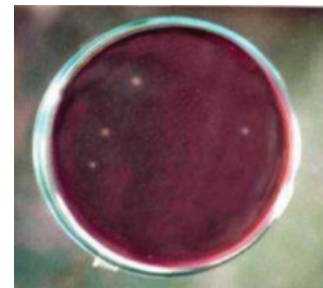
پس از تلقیح سوسپانسیون محیط حاوی لوریا برات و رنگ بر روی بشقابک لوریا برات آگار، میکروارگانسیم های حاصل به صورت کلنی های شفاف تشکیل شدند، این میکروارگانسیم ها در زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۴۰ در شکل ۲ نشان داده شده اند دو نوع باکتری به عنوان بیش ترین تجزیه کنندگان رنگ آزو جداسازی شدند، این باکتری ها کوکوباسیل های گرم منفی با

کلنی های ظاهری متفاوت بوده که متعلق به خانواده آلکالیژنز می باشند. نوع و گونه مخلوط باکتری های جدا شده در جدول ۲ ارایه شده است. نتایج حاصل از چگونگی رشد مخلوط باکتریایی و روند کاهش ماده رنگ زا RB-B با غلظت های (۵۰۰، ۲۵۰، ۵۰ mg/L) در فواصل زمانی مختلف در شکل ۳ ارایه شده است. غلظت ماده رنگی در محیط های ۵۰ و ۲۵۰ به ترتیب در ۷۲ و ۱۴۴ ساعت به صفر میلی گرم برلیتر و در محیط ۵۰۰ پس از حدود ۲۴۰ ساعت به ۹/۶۳ میلی گرم برلیتر رسید. روند کاهش ماده رنگزای RB-B با ۳ معادله منحنی خطی، نمایی و چند جمله ای درجه دو تطبیق داده شد نتایج در جدول ۲ نشان داده شده اند. معادله رگرسیون چند جمله ای درجه ۲ بهترین معادله برای غلظت های رنگ ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم برلیتر با ضرایب تبیین (R<sup>2</sup>) به ترتیب ۰/۹۸۷، ۰/۹۹۳ و ۰/۹۹۳ به دست آمد.

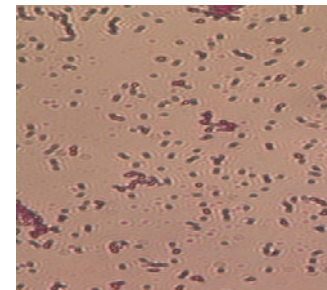
### بحث

با استفاده از تکنیک غنی سازی در محیط لوریا برات حاوی ماده رنگ زای RB-B جداسازی باکتری ها از لجن فعال انجام شد. کلنی های شفاف حاصل بر روی محیط کشت لوریا برات آگار حاوی RB-B بیانگر وجود میکروارگانسیم هایی با

الف.



ب.

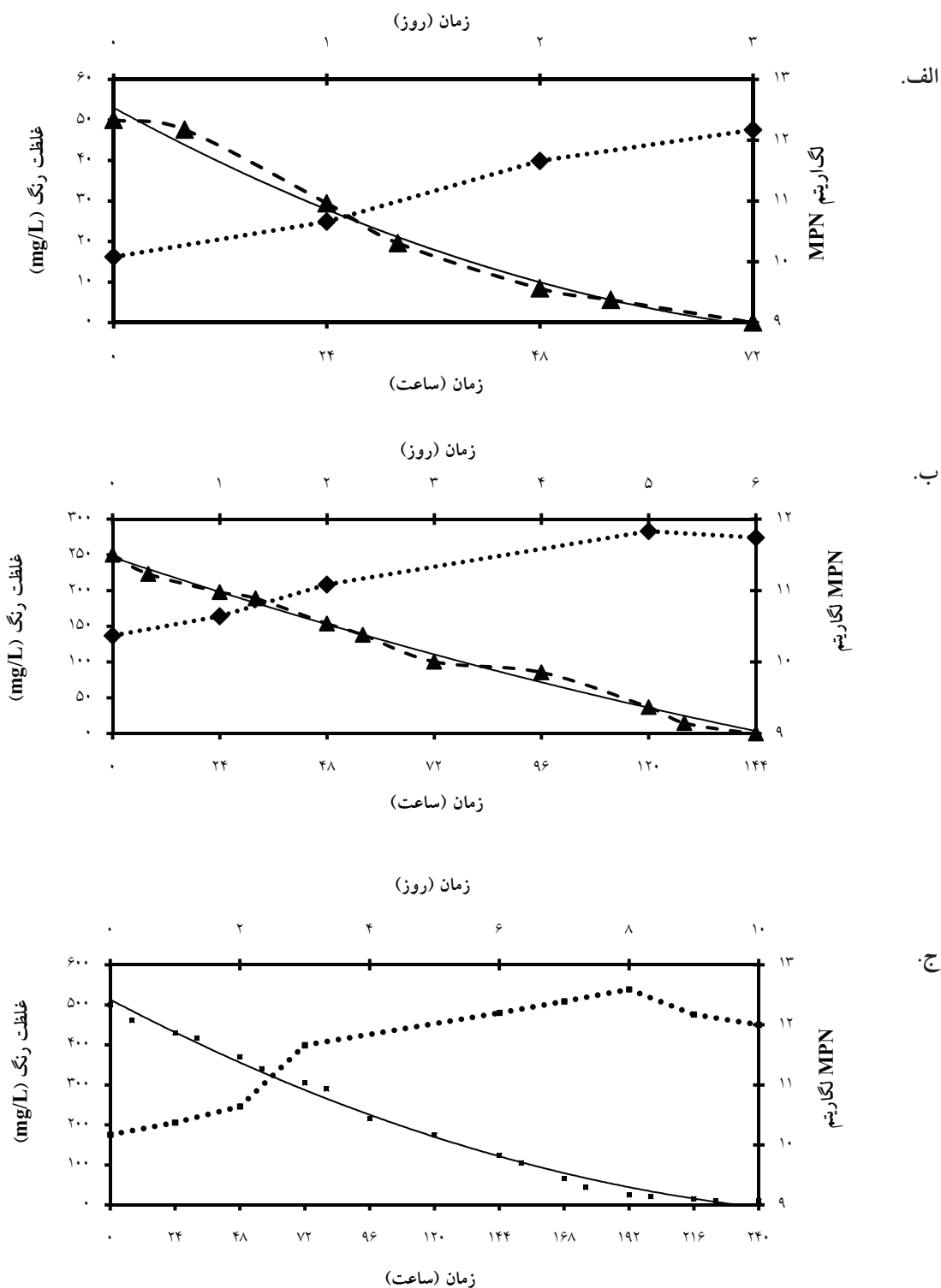


شکل ۲ الف: کلنی های شفاف مشاهده شده روی محیط کشت

ب: مخلوط باکتریایی جدا شده در زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۴۰

جدول ۲: نام و مشخصات باکتری شناسایی شده در تجزیه ماده رنگ زا

نام باکتری	باکتری زیر میکروسکوپ	آزمایش گرم	شکل کلنی یا رنگ ظاهری
Alcaligenes Xylooxidans	کوکو باسیل	منفی	کلنی مات و کوچک
Alcaligenes Denitrificans	کوکو باسیل	منفی	کلنی شیشه ایی و شفاف و درشت



شکل ۳: چگونگی رشد باکتری و روند کاهش ماده رنگزا توسط مخلوط باکتریایی با غلظت های اولیه الف) ۵۰، ب) ۲۵۰، ج) ۵۰۰ میلی گرم برلیتر

جدول ۳: معادله منحنی خط تجزیه ماده رنگزای RB-B توسط مخلوط باکتریایی

غلظت اولیه ۵۰ میلی گرم بر لیتر	غلظت اولیه ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر	غلظت اولیه ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر	نوع معادله
$Y = -0.758x + 48.93$ $R^2 = 0.958$	$Y = -1.660x + 237.5$ $R^2 = 0.989$	$Y = -2.121x + 461.2$ $R^2 = 0.964$	معادله خطی
$Y = 62.63e^{-0.04x}$ $R^2 = 0.964$	$Y = 321e^{-0.01x}$ $R^2 = 0.872$	$Y = 899.8e^{-0.01x}$ $R^2 = 0.922$	معادله نمایی
$Y = 0.006x^2 - 1.198x + 53.2$ $R^2 = 0.987$	$Y = 0.002x^2 - 2.086x + 246.6$ $R^2 = 0.993$	$Y = 0.005x^2 - 3.556x + 513.1$ $R^2 = 0.993$	معادله چند جمله ایی درجه دو

توانایی مصرف ماده رنگ زای RB-B بود، کلنی های مشابه نیز در تحقیق کومار و همکارانش مشاهده گردید (۲۰۰۷) که پس از غنی سازی و جداسازی باکتری ها شناسایی شدند (۲۲). مخلوط باکتریایی حاصل از این تحقیق شامل آلکالی ژنر دنیتروفیکانس و آلکالی ژنز زایلواکسیدانس بود که برای بررسی توانایی تجزیه زیستی RB-B در محیط آبی مورد استفاده قرار گرفتند. در چند دهه اخیر توانایی باکتری ها برای استفاده از مواد رنگ زا به عنوان سوبسترای رشد توسط مطالعات وسیع مستند شده است (۲۵). باکتری های جداسازی شده در تحقیقات سایر محققین شامل سودوموناس، اشرشیا، رودسودوموناس، اسنیتوباکتر بود که قادر به رشد در محیط حاوی ماده رنگ زا و تجزیه این ترکیبات تحت شرایط آنوکسیک بودند (۲۸-۲۶). در این تحقیق با توجه به راندمان بالای حذف ماده رنگزای RB-B می توان گفت که مخلوط باکتری های جدا شده از لجن فعال از باکتری هایی بودند که در فرایند تجزیه ترکیبات رنگی نقش موثری داشتند و توانستند ترکیبات رنگی را به عنوان منبع کربن و انرژی مورد استفاده قرار دهند (۲۹). تغییرات جمعیت باکتریایی در محیط های حاوی ماده رنگی نیز بیان گر این است که این گونه ها (دنیتروفیکانس و زایلواکسیدانس) و احتمالاً گونه های دیگری از خانواده آلکالی ژنز باکتری های مفیدی برای تصفیه فاضلاب آلوده به مواد رنگزا هستند. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده در محیط ۵۰ میلی گرم برلیتر روند رشد میکروبی را می توان به ۳ فاز تقسیم نمود، در

فاز اول (۲۴ ساعت اول پس از تلقیح) جمعیت رشد میکروبی به حدود ۳/۸ برابر جمعیت اولیه خود رسید که در طی آن میزان حذف به ۴۱/۱۴ درصد رسید. در فاز دوم و سوم (۴۸ و ۷۲ ساعت) با افزایش روند رشد، جمعیت میکروبی به ترتیب به حدود ۱۰ و ۳۲ برابر مراحل قبل رسید و میزان حذف به ترتیب ۸۳/۲ و ۱۰۰ درصد بود. اما در نمونه های شاهد (b<sub>p</sub>) به دلیل عدم وجود ماده رنگزا، رشد قابل توجهی مشاهده نشد. نرخ کاهش سوبسترا در این سه فاز به ترتیب در حدود ۰/۳۵، ۰/۸۶ و ۰/۸۸ میلی گرم برلیتر در ساعت بوده است. افزایش جمعیت باکتریایی به چند برابر مقدار اولیه نشان می دهد که ماده رنگزای RB-B سوبسترای مناسبی برای رشد باکتری های آلکالی ژنز است. خلید و همکاران در تحقیق خود نشان دادند احیا شدن و شکستگی باند آزوی مولکول رنگ (-N=N-) عامل اصلی رنگ زدایی در شرایط آنوکسیک است که بیان می کند زنجیره های باکتریایی دارای آنزیم های ویژه برای شکستن باندهای آزو هستند (۲۶). ضمن این که Yeast extract در محیط لوریا برات به عنوان سوبسترای کمکی و منبع نیتروژن برای باکتری ها مورد استفاده قرار می گیرد (۳۰ و ۲۵). بررسی تغییرات جمعیت میکروبی در محیط ۲۵۰ میلی گرم برلیتر نشان می دهد رشد میکروبی را می توان به ۴ فاز تقسیم نمود، در فاز اول (۲۴ ساعت) جمعیت رشد میکروبی به حدود ۱/۹ برابر جمعیت اولیه خود رسید و هم زمان میزان حذف به ۲۰/۸۴ درصد رسید، در فاز دوم و سوم (۴۸ و ۱۲۰ ساعت) جمعیت رشد میکروبی به بیش ترین مقدار خود یعنی به ترتیب حدود

با ضریب  $P^2=1$  تبیین ۱ بوده است که با استفاده از مدل مذکور نرخ حذف با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم برلیتر در حدود ۱/۰۳ میلی گرم برلیتر در ساعت برآورد می شود که نرخ حذف مناسبی است ضمن این که می توان نتیجه گرفت با افزایش غلظت اولیه نرخ حذف افزایش می یابد (۲۸، ۱۸ و ۳۱).

کولیکار و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند ماده رنگ زای DB79 تحت شرایط آنوکسیک با غلظت های اولیه ۲۵۰، ۵۰۰ میلی گرم برلیتر در فواصل زمانی به ترتیب ۱۸، ۲۸ ساعت توسط باسیلوس فوزیفوریم راندمان حذف ۹۰ درصدی داشت (۷). نتایج حاصل از تحقیق حاضر راندمان ۹۰ درصدی را در فواصل زمانی ۵۲ و ۱۲۰ ساعت را برای غلظت های به ترتیب ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم برلیتر نشان دادند. با افزایش تعداد باندهای آزو مقاومت در مقابل حذف رنگ افزایش می یابد (۸). با توجه به این که رنگ استفاده شده در تحقیق آنان دارای یک باند آزو و تحقیق حاضر دارای دو باند آزو می باشد که وجود دو باند می تواند منجر به طولانی شدن حذف گردد. هم چنین دلایل دیگری چون نوع باکتری های جداسازی شده، غلظت میکروب تلقیح شده و شرایط محیطی (pH و دما) نیز تاثیر مستقیمی بر میزان حذف ماده رنگ زا دارد.

نتایج حاصل نشان می دهد در غلظت اولیه ۵۰۰ میلی گرم برلیتر در حذف RB-B در روز هفتم بیش از ۹۰٪ بوده و بعد از آن غلظت RB-B تا روز دهم تقریباً ثابت مانده است و میزان کاهش آن در حدود ۸ درصد بوده است. احتمال دارد، این امر به دلیل تولید مواد واسطه ای باشد که ممکن است برخی از آنها برای میکروارگانیسم ها مفید نباشند (۱۳). نتایج حاصل از شکل ۳ نشان داد در غلظت های اولیه رنگ به میزان ۵۰ و ۲۵۰ میلی گرم برلیتر به ترتیب در روزهای ۳ و ۶ روز صد درصد حذف رنگ و در غلظت ۵۰۰ میلی گرم برلیتر پس از ۱۰ روز ۹۸٪ درصد حذف رنگ رخ می دهد که بیان کننده تاثیر مستقی غلظت رنگ بر روی راندمان رنگ زدایی است، به طوری که با افزایش غلظت رنگ به میزان ۱۰ برابر (از ۵۰ به ۵۰۰ میلی گرم برلیتر) زمان مورد نیاز برای حذف رنگ حدود ۳/۵

۱۵/۵ و ۵/۵ برابر مراحل قبل رسید که در طی این مدت میزان حذف به ۳۸/۴۳ و ۸۵/۲۲ درصد رسید و در فاز چهارم (۱۴۴ ساعت) جمعیت میکروبی به دلیل محدودیت منبع کربنی به ۰/۸ فاز سوم کاهش یافت که همزمان میزان سوبسترای محیط به صفر میلی گرم برلیتر رسید. در طی این مدت نرخ کاهش رنگ در محدوده ۲/۲-۱/۶ میلی گرم برلیتر در ساعت تقریباً یکنواخت بوده است. هم چنین در محیط ۵۰۰ میلی گرم برلیتر روند رشد میکروبی در ۴ فاز قابل بررسی است در فاز اول (۴۸ ساعت) جمعیت رشد میکروبی به حدود ۳ برابر تلقیح اولیه رسید در طی این مدت ۲۲ درصد از ماده رنگی حذف شد. در فاز دوم و سوم (۷۲ و ۱۹۲ ساعت) رشد میکروبی به بیش ترین مقدار یعنی حدود ۱۰/۵ و ۸/۵ برابر مراحل قبل رسید و هم زمان کاهش سوبسترای محیط در حدود ۴۰ درصد و ۹۵ درصد بوده است. این یافته ها نشان می دهد که هم زمان با افزایش روند رشد جمعیت میکروبی، غلظت ماده رنگ زا کاهش یافته است. نتایج حاصل از تحقیق ایسیک نیز نشان داد به طور هم زمان با افزایش غلظت جرم سلولی سودوموناس و اشرشیا کلی از ۱۰۰ تا ۱۱۰۰ میلی گرم برلیتر راندمان حذف رنگ های Direct Black ۳۸, Congo Red افزایش می یابد (۲۴). در فاز چهارم (۲۴۰ ساعت) میزان رشد میکروبی به دلیل کاهش منبع کربنی به حدود ۰/۲۵ برابر فاز سوم کاهش یافت که در طی این مدت نرخ کاهش سوبسترا ۰/۳۲ میلی گرم برلیتر در ساعت بود. نرخ کاهش سوبسترا در سه فاز اول در حدود ۲/۷-۲/۳ میلی گرم برلیتر در ساعت بود. نتایج حاصل از تحقیق دافالی و همکارانش (۲۰۰۸) نشان داد نرخ کاهش رنگ RB-B با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم برلیتر توسط *Pseudomonas aeruginosa* در شرایط آنوکسیک ۱/۱ میلی گرم برلیتر در ساعت بود (۶) این میزان در مطالعه حاضر برای حذف کامل در غلظت های ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم برلیتر به ترتیب در حدود ۰/۶۹، ۱/۷۴ و ۲/۰۰ میلی گرم برلیتر در ساعت به دست آمد و معادله تطبیق یافته با آن در محدوده غلظتی ۵۰ تا ۵۰۰ میلی گرم ماده رنگ زا برلیتر به صورت:

$$Y=9 \times 10^{-6} X^2 + 0.0081 X + 0.3106$$

برای پاک سازی محیط آلوده به این ترکیب رنگی استفاده کرد و در مقیاس آزمایشگاهی روند حذف با تقریب مناسبی قابل پیش بینی است. با توجه به داده ها می توان نتیجه گرفت که نرخ حذف ترکیبات رنگی به غلظت اولیه بستگی داشته و با افزایش آن نرخ حذف افزایش می یابد. به دلیل این که صنعت نساجی یکی از صنایع اصلی در ایران محسوب می شود و هر ساله مقادیر زیادی آلاینده های رنگی وارد محیط می گردد و به دلیل محدودیت ها و مشکلات تصفیه فیزیکی و شیمیایی، تصفیه زیستی روشی موثر و کم هزینه با راندمان بالا برای تصفیه آلاینده های رنگی است.

### تشکر و قدردانی

مراتب تشکر و قدردانی خود را از آقای فرامرز مسجدیان مربی گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی و مسئولین محترم آزمایشگاه های بهداشت محیط دانشکده بهداشت به خاطر همکاری در مراحل مختلف تحقیق ابراز می نمایم. تحقیق حاصل مربوط به بخشی از نتایج پایان نامه دوره کارشناسی ارشد گروه مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی ایران بوده و از کلیه حامیان این تحقیق سپاس گذاری به عمل می آید.

### منابع

1. Kalyani DC, Patil PS, Gadhav JP, Govindwar SP. Biodegradation of reactive textile dye RED BIL by an isolate bacterium *Pseudomonas* sp. SUK1. *Bioresource Technology*. 2008;99:4635-41.
2. Hessel C, Allegre C, Maisseu M, Charbit F, Moulin P. Guidelines and legislation for dye house effluents. *J Environmental Management*. 2007; 83:171-80.
3. Yu J, Wang X, Yue PL. Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *pseudomonas* strains. *J Pergamon*. 2001;15:3579-86.
4. Mohana S, Shrivastava Sh, Divecha J, Madamwar D. Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. *Bioresource Technology*. 2008;99:562-69.
5. Mansour HB, Corroler D, Barillier D, Ghedira K, Chekir L, Mosrati R. Evaluation of genotoxicity and pro-

برابر افزایش می یابد. نتایج تحقیق انجام گرفته توسط موهنتی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نیز نشان داد که با افزایش غلظت رنگ از ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی گرم برلیتر (به میزان ۴ برابر) زمان مورد نیاز برای تجزیه رنگ به میزان ۹ برابر افزایش یافت (۳۲). با وجود این که با افزایش درجه معادله، تطابق بین نتایج حاصل از آزمایش ها و معادله بیش تر می شود، اما ضرایب تبیین نشان می دهند که معادلات خطی نیز توانسته اند رگرسیون مناسبی را حاصل نمایند. نتایج نشان داد RB-B در محیط لوریا برات با تبیین مناسبی (بیش از ۹۰ درصد) از معادلات مذکور پیروی می کند که با افزایش درجه معادله، ضریب تبیین نیز افزایش می یابد (جدول ۲). این تبعیت در غلظت های بالاتر بیش تر مشهود است؛ به طوری که برای غلظت ۵۰۰ میلی گرم برلیتر می توان گفت روند کاهش از معادله درجه دوم پیروی می کند.

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد در لجن فعال کارخانه نساجی باکتری های بومی شناسایی شده آلکالی ژنز دنیتروفیکانس و آلکالی ژنز زایلواکسیدانس توانایی مناسبی در تجزیه مواد رنگی را دارند و می توان از این میکروارگانیسم ها

- oxidant effect of the azo dyes: Acids Yellow 17, violent 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. *J Food and Chemical Toxicology*. 2007;45:1670-77.
6. Dafale N, Wate S, Meshram S, Nandy T. Kinetic study approach of remazol black-B use for the development of two-stage anoxic-oxic reactor for decolorization/biodegradation of azo dyes by activated bacterial consortium. *J Hazardous Materials*. 2008;159:319-28.
7. Kolekar YM, Pawar SHP, Gawai KR, Lokhande PD, Shouche YS, Kodam KM. Decolorization and degradation of Disperse Blue 7 and Acid Orange 10, by *Bacillus fusiformis* KMK5 isolated from the textile dye contamination soil. *Bioresource Technology*. 2008;99:8999-9003.
8. Supaka N, Juntongjin K, Damronglerd S, Delia ML, Strehaiano P. Microbial decolorization of reactive azo



- dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Chemical Engineering Journal*. 2004;99:169-76.
9. Panizza M, Cerisola G. Electro-Fenton degradation of synthetic dyes. *Water Research*. 2009; 43:339-44.
  - 10-Lodha B, Chaudhari S. Optimization of Fenton-biological treatment scheme for the treatment of aqueous dye solutions. *J hazardous Materials*. 2007;148:459-66.
  11. Montano JG, Estrada LP, Oller I, Maldonado M, Torrades F, Peral J. Pilot plant scale reactive dyes degradation by solar photo-Fenton and biological processes. *J Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2008;195:205-14.
  12. Asad S, Amoozegar MA, Pourbabaee AA, Sarbolouki MN, Dastgheib SMM. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *J Biological Technology*. 2007; 98:2082-88.
  13. Kalyani DC, Telke AA, Dhanve RS, Jadhav JP. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 Textile dye by newly isolated *Pseudomonas* SP. *SUK1. J Hazardous Material*. 2009;163:735-42.
  14. Bafana A, Saravana Devi S, Krishnamurthi K, Chakrabarti T. Kinetics of decolourisation and biotransformation of direct black 38 by *C.hominis* and *P. stutzeri*. *J Microbiol Biotechnol*. 2007;74:1145-52.
  15. Ozdemir G, Pazarbasi B, Kocyigit A, Omeroglu EE, Yasa I, Karaboz I. Decolorization of Acid Black 210 by vibrio harvyi TEMS1, a newly isolated bioluminescent bacterium from Izmir Bay, Turkey. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 24:1375-81.
  16. Ikramullah NA, Lutfullah Gh, Hameed A, Ahmed S. Decolorization of Acid red 151 by *Aspergillus niger* SA1 under different physicochemical conditions. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 24:1099-1105.
  17. Tantak NP, Chaudhari S, Degradation of azo dyes by sequential Fentons Oxidation and aerobic biological treatment. *J Hazardous Materials*. 2006;136:698-705.
  18. Chang JSh, Chou Ch, Chen ShY. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry*. 2001;36:757-63.
  19. Chen KC, Huang WT, Houg JY. Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. *J Microbiol Biotechnol*. 1999;23:686-90.
  20. Barragan BE, Costa C, Marquez MC. Biodegradation of azo dye by bacteria inoculated on solid media. *J Dye and Pigments*. 2007;75:73-81.
  21. Rashid Ashmagh F, Rezaei Kalantary R, Farzadkia M, Joneidy Jafari A, Nbizadeh R. Survey of phenantherene Biodegradations model in contaminated soils by *Acinetobacter* SP. (In Persian) *J Health & Environ*. 2009;2:197-202.
  22. Kumar k, Saravana Devi S, Krishnamurthi k, Dutta D, Chakrabarti T. Decolonization and detoxification of Direct Blue-15 by a bacterial consortium. *Bioresource Technology*. 2007;98:3168-71.
  23. Sarayu K, Sandhya S. Aerobic biodegradation pathway for Remazol Orange by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160:1241-53.
  24. Isik M, Sponza DT. Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. And fate of aromatic amines. *Process Biochemistry*. 2003;38:1183-92.
  25. Moosvi S, Keharia H, Madamwar D. Decolourization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2005;21:667-72.
  26. Khalid A, Arshad M, Crowley DE. Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains. *J Microbiol Biotechnol*. 2008;78:361-69.
  27. Chang JS, Kuo TS. Kinetics of bacteria decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. *J Bioresorce Technol*. 2000;75:107-11.
  28. Chang JSH, Chou CH, Lin YCH, Lin PJ, Ho JY, Hu TL. Kinetic characteristics of bacterial Azo-Dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *J Pergamon*. 2001;35:2841-50.
  29. Ren S, Guo J, Zeng G, Sun G. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *J Microbiol Biotechnol*. 2006; 72:1316-21.
  30. Jia C, Ruijuan K, Zhang Y, Zhang Y, Cong W. Degradation and decolorization of monosodium glutamate wastewater with *Coriolus versicolor*. *Biodegradation*. 2007;18:551-57.
  31. Chen JP, Lin Ysh. Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate-silicate sol-gel beads. *Process Biochemistry*. 2007;42:934-42.
  32. Mohanty S, Dafale N, Neti Rao N. Microbial decolorization of Reactive Black 5 in a two-stage anaerobic-aerobic reactor using acclimatized activated textile sludge. *Biodegradation*. 2006;17:403-13.

## **Survey of Ability of Activated Sludge Isolated Bacteria in Removal of RB-B Dyestuff from Aqueous Medium**

**Bahmani P., \*Rezaei Kalantary R., Gholami M. , Jonidi Jafari A., Javadi Z.**

Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received; 31 August 2010 Accepted; 28 November 2010

### **ABSTRACT**

**Backgrounds and Objectives:** Reactive dyestuff has potential of toxicity, carcinogenesis and mutagenesis for mammals and aquatic organisms. The current physical and chemical methods such as adsorption, coagulation, precipitation, filtration and ... can be used for removing of dyestuff. Biological treatment which is effective and economic for decontamination of dyestuff wastewaters was preferred because of limitation and difficulty of physicochemical methods. In order to investigate the trend of pollution reduction of color compounds, ability of Remazol Black-B dyestuff removal from aqueous medium by bacterial consortium under anoxic conditions was studied.

**Materials and Methods:** The mix culture of bacteria from textile industries activated sludge was enriched in luria broth medium containing RB-B dyestuff as a carbon source. Then biodegradation was assessed in 4 batch reactors. Microbial population of bacterial and decolorization quantities of samples were detected by MPN and UV-Vis spectrophotometer.

**Results:** Decolorization efficiency by the bacterial consortium was obtained more than 99% for 50 and 250 mg/L concentrations in 72 and 144 h (3 and 6 days) respectively, while for the initial concentration of 500 mg/L was 98.1 in 240 h (10 days) of biodegradation period. Dyestuff reduction rate after completed removal was about 0.69, 1.74, 2 mg/L/h for initial concentration of 50, 250, 500 mg/L respectively.

**Conclusion:** Results showed that *Alcaligenes denitrificans* and *Alcaligenes xylooxidans* bacteria which were isolated from activated sludge have good potential of RB-B dyestuff removal and this removal is depending on primary concentration of dye. Removal efficiency increased as primary concentration went up.

**Key words:** Textile industry, RB-B dyestuff, Bacterial consortium, Biodegradation

---

\*Corresponding Author: [rrkalantary@iums.ac.ir](mailto:rrkalantary@iums.ac.ir)

Tel: +98 21 88779118 (249) Fax: +98 21 88779118