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/ ۱۰ (۱۳۹۵)، ۱۸۴-۱۷۷

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

جداسازی و شناسایی جدایه قارچی .Neosartorya sp به عنوان جاذب زیستی ماده رنگزا کنگو قرمز

حمید مقیمی*[۱]، احسان آذین[۲]، رضوان حیدری‌تبار[۳]

۱ـ استادیار، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

۲ـ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

۳ـ دانشجوی کارشناسی، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۵ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۵/۹/۲۰

چکیده

مواد رنگزای آزو گروهی از مواد رنگزای سخت تجزیه‌پذیر با پیوندهای آزو می‌باشند. هدف از این مطالعه جداسازی قارچ‌های توانمند در جذب مواد رنگزا آزو می‌باشد. در این مطالعه جداسازی قارچ‌های توانمند به‌طریق غنی‌سازی صورت گرفت. بررسی توانمندی جدایه منتخب در جذب ماده رنگزا نشان داد که بیشترین حذف ماده رنگزا بعد از ۵ روز در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به میزان ۹۰٪ می‌باشد. همچنین این ایزوله توانمندی رشد در ۱۰۰ گرم بر لیتر نمک را دارا می‌باشد. شناسایی مولکولی مشخص کرد که این ایزوله ۹۹٪ مشابه Neosartorya fischeri می‌باشد. بررسی واجذب ماده رنگزا نشان داد که استون بهترین حلال جهت واجذب می‌باشد. همچنین نشان داده شد که این جدایه توانمندی بالایی را در جذب مواد رنگزا از پساب نساجی دارا می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده .Neosartorya sp برای اولین بار جهت جذب مواد رنگزا آزو در محیط نمکی مورد استفاده قرار گرفته و می‌توان آن را به عنوان جاذب زیستی توانمند به‌منظور تیمار پساب صنایع نساجی معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: ماده رنگزا کنگو قرمز، پساب صنایع نساجی، جذب زیستی، .Neosartorya Sp.

Isolation and Identification of Fungus Isolated Neosartorya sp. as Congo Red Biosorbent

H. Moghimi*, E. Azin, R. heidarytabar

Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Microbial Technology and Products Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 24-09-2015 Accepted: 04-05-2016 Available online: 10-12-2016

Abstract

Azo dyes are a group of hardly degradable dyes characterized by existence of azo group in their structure. The purpose of present study is the isolation of capable fungi for azo dyes biosorption. Fungi strains isolation was performed by enrichment method. The ability of selected fungal isolate in bio-decolorization was examined using different concentrations of dye. The best dye removal with a rate of 90% at concentration of 1000 mg/l was achieved after 5 days. This fungal isolate is capable to grow in 100 g/L NaCl. Molecular identification revealed 99% similarity to Neosartorya fischeri. Investigation of dye desorption showed that acetone is the best solvent for desorption. It is worth mentioning that, this strain has high ability for biosorption of dyes from textile wastewater. To our knowledge, this is the first report regarding the biosorption potential of Neosartorya sp., and it can be a potent biological agent for treatment of textile effluent. J. Color Sci. Tech. 10(2016), 177-184©. Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Congo red dye, Textile effluent, Biosorption, Neosartorya sp.

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

۱ـ مقدمه

مواد رنگزای مصنوعی گروهی از ترکیبات آلی محلول در آب هستند که به‌طور گسترده‌ای در صنایع مختلف از جمله نساجی، کاغذسازی، چاپ، آرایشی و غذایی به کار می‌روند [۱]. در حال حاضر بیش از ده هزار نوع ماده رنگزای مصنوعی وجود دارد که سالانه حدود ۹×۱۰^{۵} - ۸×۱۰^{۵} تن از این مواد رنگزا در جهان تولید می‌شود. مواد رنگزای آزو گروه مهمی از این ترکیبات می‌باشند که نیمی از تولید سالانه مواد رنگزای مصنوعی را به خود اختصاص داده‌اند [۲، ۳]. مواد رنگزای آزو به دلیل تنوع و کارایی بالا، هزینه پایین، و کاربرد آسان در مقایسه با مواد رنگزای طبیعی در صنایع مختلف به‌طور گسترده‌ای به‌کاربرده می‌شوند. این مواد رنگزا به دلیل دارا بودن گروه عاملی آزو (–N=N–) متصل به یک یا تعداد بیشتری حلقه آروماتیک با این نام خوانده می‌شوند. این مواد رنگزا بر اساس تعداد پیوندهای آزو در ساختار شیمیایی خود به گروه‌های مونو، دی، تری و پلی آزو تقسیم می‌شوند. مواد رنگزای آزو به‌طورکلی به‌عنوان ترکیبات مقاوم به تجزیه در طبیعت شناخته می‌شوند [۴]. پساب‌های حاوی مواد رنگزا مصنوعی علاوه بر اینکه باعث ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی می‌شوند، برای سیستم‌های محیط‌زیست و سلامت عمومی نیز خطرناک می‌باشند [۸-۵]. مطالعات مختلف نشان داده است که بیشتر مواد رنگزای آزو سمی و سرطان‌زا می‌باشند و آلودگی‌های حاصل از آنها علاوه بر ایجاد چهره نامناسب برای محیط‌زیست، موجب تولید متابولیت‌های سمی مانند آمین‌های آروماتیک و بنزیدین‌ها در اثر تجزیه مواد رنگزا می‌شود [۹، ۱۰]. بنابراین تصفیه پساب‌های تولیدی نساجی قبل از تخلیه به محیط ضروری می‌باشد. در دهه‌های اخیر حضور پساب‌های رنگی تولیدی توسط کارخانجات در محیط‌های آبی موجب نگرانی‌های زیادی در زمینه تامین آب شرب ایجاد نموده است بنابراین تصفیه و کاهش سمیت این پساب‌ها مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. در این راستا روش‌های مرسوم تصفیه پساب‌های رنگی به دلیل هزینه‌های بالا، بازده پایین و تولید لجن فراوان ناکارآمد بوده و استفاده از روش‌هایی که ازلحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه و کارآمد باشد ضروری می‌باشد [۴]. امروزه مطالعات فراوانی در زمینه استفاده از روش‌های زیستی صورت گرفته است [۱۱] و میکروارگانیسم‌های متنوعی شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و جلبک‌ها شناخته‌شده‌اند که قادر به حذف این مواد رنگزا از پساب‌های تولیدی کارخانجات استفاده‌کننده از مواد رنگزا می‌باشند [۱۲]. تجزیه مواد رنگزای آزو به روش زیستی از طریق آنزیم‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد. این آنزیم‌ها از خانواده آنزیم‌های اکسیدردوکتازی می‌باشند. قارچ‌ها با تولید آنزیم‌های خارج سلولی‌ای شامل لاکاز، لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز میکروارگانیسم‌های توانمندی در تجزیه آلاینده‌هایی از قبیل مواد رنگزای آزو می‌باشند [۱۳]. علاوه بر اینکه میکروارگانیسم‌هایی توانمند در تجزیه مواد رنگزای آزو شناسایی شده است امروزه سویه‌های میکروبی متنوعی در جذب مواد رنگزا نیز شناخته شده‌اند که توانایی جذب مواد رنگزا از محیط را دارا می‌باشند. جذب زیستی مواد رنگزا می‌تواند با حذف مواد رنگزا از محیط و عدم تولید متابولیت‌های سمی روشی مناسب در حذف مواد رنگزای به‌کاربرده شده در صنایع محسوب شود. در میان میکروارگانیسم‌ها قارچ‌ها به دلیل دارا بودن سطح بالا میکروارگانیسم‌های توانمندی در جذب مواد رنگزای آزو می‌باشند. ازاین‌رو هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی جدایه قارچی توانمند در جذب ماده رنگزای دی آزو کنگو قرمز از محیط می‌باشد.

۲ـ بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد

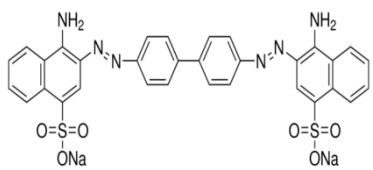
در این مطالعه ۱۰ نمونه خاک مربوط به اطراف محیط‌های آلوده به پساب صنایع نساجی کاشان جمع آوری شده و جهت جداسازی ایزوله‌های قارچی مورداستفاده قرار گرفت. بر این اساس قبل از استفاده، نمونه‌ها خاک به‌طور کامل در هاون کوبیده شدند و خاک کوبیده شده مورداستفاده قرار گرفت.

۲ـ۲ـ روش کار

۲ـ۲ـ۱ـ محیط کشت

در این پژوهش روش غنی‌سازی جهت جداسازی جدایه‌های قارچی توانمند در جذب مواد رنگزای آزو مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور از محیط کشت دارای ترکیباتی شامل (g/l) : گلوکز (۲۰)، عصاره مخمر (۰,۵)، KH_2PO_4 (۱)، $MgSO_4.H_2O$ (۰,۵)، $FeSO_4.7H_20$ (۰,۰۱)، Na_2HPO_4 (۰,۰۵)، $ZnSO_4.7H_2O$ (۰,۰۰۱)، $CaCl_2$ (۰,۰۱)، $MnSO_4.4H_2O$ (۰,۰۰۱)، $CuSO_4.5H_2O$ (۰,۰۰۲) در یک لیتر آب مقطر دیونیزه استفاده شد و pH محیط کشت در ۰,۲± ۷ تنظیم شد [۷]. در این مطالعه از ماده رنگزای دی‌آزو کنگو قرمز به‌عنوان ماده رنگزا مورد استفاده در مراحل مختلف آزمایش استفاده شد که ویژگی‌های آن در جدول ۱ نشان داده شده است [۱۴].

جدول ۱: ساختار و ویژگی‌های کنگو قرمز به‌عنوان نماینده‌ای از مواد رنگزای آزو.

ساختار ماده رنگزا	
فرمول شیمیایی	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$
وزن مولکولی	۶۹۶,۷ گرم بر مول
بیشینه جذب در طول‌موج	۵۰۰ نانومتر

۲ـ۲ـ۲ـ جداسازی ایزوله‌های قارچی

در این مرحله از روش غنی‌سازی جهت جداسازی سویه‌های قارچی از نمونه‌های خاک استفاده شد. بر این اساس در ابتدا محیط کشت مذکور همراه با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگزای کنگو رد اتوکلاو شد و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها به محیط کشت افزوده گشت. در ادامه g ۰,۱ از نمونه خاک همگن‌شده به محیط کشت موجود در هر فلاسک افزوده و فلاسک‌ها به شیکر انکوباتور با دمای ºC ۲۸ و دور rpm ۱۷۰ منتقل گردید. پس از مشاهده رنگ‌بری در فلاسک، ml ۱ از محیط رنگبری شده به فلاسک حاوی محیط کشت رنگی منتقل شد. این کار برای سه مرتبه تکرار شد [۱۵]. درنهایت از فلاسک سوم حاوی محیط غنی‌سازی شده به مقدار µl ۱۰۰ بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز اگار[1] دارای تتراسایکلین به‌صورت کشت گسترده[2] کشت داده شد و پلیت‌ها به انکوباتور ºC ۲۸ منتقل گردید. جدایه‌های به‌دست‌آمده در محیط‌های کشت PDA خالص‌سازی شدند و پس از یک هفته گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای نگهداری به سردخانه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

۲ـ۲ـ۳ـ انتخاب جدایه با بیشترین میزان جذب ماده رنگزا

انتخاب جدایه برتر از میان جدایه‌های قارچی خالص‌سازی شده براساس میزان حذف ماده رنگزا از محیط انجام شد. بر این اساس، هر یک از جدایه‌های خالص‌سازی شده در محیط کشت مایع حاوی ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگزای کنگو قرمز کشت داده شده و برای یک هفته به شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۷۰ و دمای ºC ۲۸ منتقل گردیدند. پس‌ازاین مدت محتوای فلاسک‌ها با دور ۴۰۰۰ برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب سوپرناتانت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت.

رابطه ۱ نحوه محاسبه میزان حذف ماده رنگزا با استفاده از خواندن جذب نمونه تیمار شده و نمونه شاهد را نشان می‌دهد [۱۶].

$$D = 100\left(\frac{Ci-Ct}{Ci}\right) \qquad (۱)$$

در این رابطه D برابر با درصد حذف ماده رنگزا، C_t برابر با میزان جذب بعد از رنگ‌بری و C_i برابر با میزان جذب اولیه ماده رنگزا می‌باشد.

1- Potato dextrose agar (PDA)
2- Spread plate

۲ـ۲ـ۴ـ شناسایی جدایه منتخب

به‌منظور شناسایی جدایه منتخب ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلنی قارچی در محیط کشت PDA مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اسلاید کالچر این جدایه قارچی تهیه و از طریق رنگ‌آمیزی با استفاده از لاکتوفنل کاتن بلو ساختار میسلیوم و شکل اسپورها با توجه به کلیدهای شناسایی مورد بررسی قرار گرفت [۱۷]. در ادامه جهت شناسایی مولکولی این جدایه، زیست‌توده قارچی در محیط کشت PDB تهیه و بعد از دو بار شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد. سپس زیست‌توده قارچی با استفاده از ازت مایع منجمد و در هاون کوبیده و DNA به روش استخراج با فنل-کلروفرم استخراج شد [۱۸]. در ادامه PCR ژن ITS با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 (ITS1: 5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′ و ITS4: 5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) برای DNA استخراج‌شده انجام شد و محصول PCR برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. درنهایت همردیفی قطعه ژن تعیین ترادف شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI انجام شد [۱۹] و درخت فیلوژنتیکی جدایه منتخب با استفاده از نرم‌افزارهای ClastulX، Bioedit و Mega5 رسم شد.

۲ـ۲ـ۵ـ سنجش میزان رنگ‌بری جدایه منتخب

پس از انتخاب و شناسایی جدایه برتر، توانمندی ایزوله منتخب در جذب غلظت‌های مختلف ماده رنگزای مورد آزمایش قرار گرفت. با توجه به اینکه غلظت مواد رنگزای موجود در پساب صنایع نساجی ۲۰۰-۲۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد جهت بررسی توانمندی ایزوله در جذب ماده رنگزا، محیط کشت همراه با غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از ماده رنگزا تهیه و قطعه‌ای به اندازه cm ۱×۱ از پلیت PDA یک هفته‌ای قارچ در هرکدام از فلاسک‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط رنگی تلقیح شد و فلاسک‌ها برای ۵ روز به شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۷۰ و دمای ºC ۲۸ منتقل گردید. آزمایش‌های انجام‌شده در این مرحله با ۳ مرتبه تکرار انجام شد. بعد از ۵ روز محتویات فلاسک‌ها در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و جذب سوپرناتانت با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت جهت بررسی سمیت ماده رنگزا بر روی رشد این جدایه قارچی، زیست توده تولیدی در غلظت های مختلف ماده رنگزا، برای یک شبانه روز در فور با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و میزان زیست توده تولید شده مورد وزن‌سنجی قرار گرفت.

۲ـ۲ـ۶ـ بررسی تحمل‌پذیری .Neosartorya sp در غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم

آزمایش‌های این مرحله جهت بررسی تحمل‌پذیری و رشد .*Neosartorya* sp در غلظت‌های مختلف نمک صورت گرفت. با توجه

به اینکه میزان غلظت نمک در پساب صنایع نساجی ۱۰۰-۴۰ گرم بر لیتر می‌باشد بدین منظور غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ گرم بر لیتر نمک کلرید سدیم در محیط کشت PDB در فلاسک‌های ارلن‌مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه گردید و در هر فلاسک حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت، یک قطعه به ابعاد یک سانتی‌متر مربع از پلیت قارچی *Neosartorya* sp. تلقیح گردید. سپس فلاسک‌ها برای یک هفته در انکوباتور شیکردار با دور ۱۷۰ rpm در ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از یک هفته با اندازه‌گیری میزان زیست‌توده خشک تولیدی در غلظت‌های مختلف و مقایسه آن‌ها باهم میزان تحمل‌پذیری قارچ در غلظت‌های مختلف نمک مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲ـ۲ـ۷ـ بررسی واجذب ماده رنگزا از زیست‌توده رنگی با استفاده از حلال‌های مختلف

در این مرحله به منظور بررسی واجذب ماده رنگزا از زیست‌توده رنگی، نمونه رنگی تهیه شده در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگزا کنگو قرمز، پس از جذب ماده رنگزا جهت بررسی واجذب، در محلول‌ها مختلف قرار داده شدند. بدین منظور ۰٫۱ گرم زیست‌توده رنگی در ۱۰ میلی‌لیتر از هر یک محلول‌ها شامل استون ۵۰ ٪، متانل ۵۰ ٪، HCl (۰٫۱، ۰٫۰۱ و ۰٫۰۰۱ مول بر لیتر) و NaOH (۰٫۱، ۰٫۰۱ و ۰٫۰۰۱ مول بر لیتر) قرار داده شدند و فلاسک‌ها به شیکر انکوباتور با دور ۱۷۰ rpm برای ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از این مدت زمان محتوای فلاسک‌ها در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و جذب روشناور واجذب شده با استفاده از روش طیف‌سنجی خوانده شد و درصد واجذب زیست‌توده قارچی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲ـ۲ـ۸ـ بررسی جذب ماده رنگزا از پساب واقعی صنایع نساجی توسط زیست‌توده قارچی

از آنجایی که پساب‌های صنایع نساجی حاوی انواع متفاوتی از مواد رنگزا و آلاینده‌های مختلف دیگری نیز می‌باشند از این رو جهت بررسی توانمندی ایزوله قارچی در جذب ماده رنگزا از این پساب‌ها، ۰٫۲ گرم از زیست‌توده در ۲۰ میلی‌لیتر از پساب واقعی صنایع نساجی اضافه شد و فلاسک‌ها به مدت ۱ ساعت به شیکر انکوباتور با دور ۱۷۰ rpm منتقل شد. پس از این مدت محتوای فلاسک در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و جذب روشناور بین طول‌موج‌های ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت و با جذب نمونه شاهد مقایسه شد.

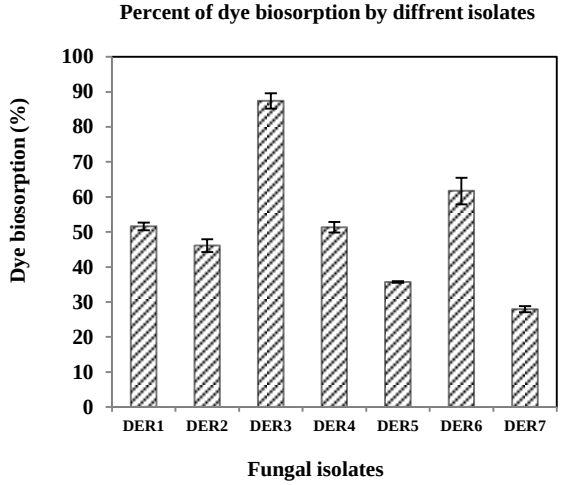
۳ـ نتایج و بحث

۳ـ۱ـ جداسازی، شناسایی و رسم درخت فیلوژنی جدایه منتخب

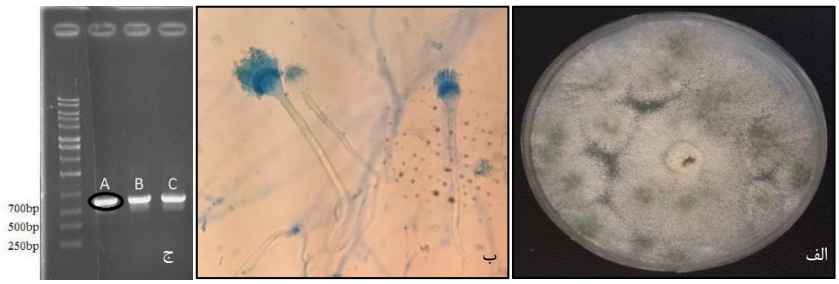
غنی‌سازی ۱۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده موجب دستیابی به ۲۶ جدایه قارچی متفاوت از لحاظ ریخت‌شناختی شد. بررسی‌های انجام‌گرفته نشان داد که از میان قارچ های جداسازی شده، ۷ جدایه قارچی توانمندی حذف ماده رنگزا در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را دارا می‌باشند. در ادامه و با محاسبه درصد حذف ماده رنگزا مشخص شد که جدایه DER3 با ۸۷ درصد حذف ماده رنگزا از محیط توانمندترین جدایه قارچی جداسازی شده بوده و به‌عنوان جدایه برتر برای انجام مراحل بعدی انتخاب شد (شکل ۱). بررسی‌های ریخت‌شناسی کلنی قارچ منتخب در محیط کشت PDA و بررسی اسلاید کالچر تهیه‌شده با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان از این داشت که این جدایه متعلق به جنس آسپرژیلوس می‌باشد (شکل ۲). نهایتاً شناسایی مولکولی از طریق ژن ITS نشان داد که این جدایه به میزان ۹۹ درصد مشابه با *Neosartorya ficheri* می‌باشد. شکل ۳ درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار مگا ۵ را برای این جدایه نشان می‌دهد.

۳ـ۲ـ سنجش میزان رنگ‌بری *Neosartorya* sp. در غلظت‌های مختلف ماده رنگزا

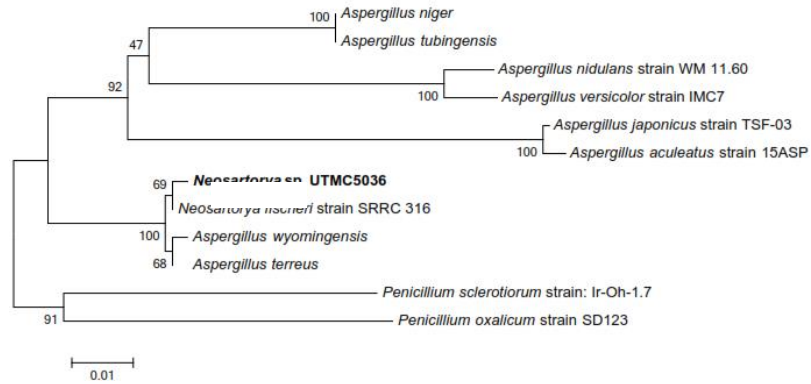
نتایج حاصل از بررسی توانمندی *Neosartorya* sp. در جذب غلظت‌های مختلف ماده رنگزا کنگو قرمز نشان داد که این جدایه قارچی توانایی جذب ماده رنگزا در غلظت‌های بالا را دارا می‌باشد (شکل۴-الف). در این راستا، به ترتیب کمترین و بیشترین میزان جذب ماده رنگزا در این مطالعه به میزان ۶۵ و ۹۰ درصد در غلظت ۱۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگزا مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت ماده رنگزا در محیط، میزان جذب ماده رنگزا توسط این جدایه نیز بیشتر می شود.



شکل ۱: بررسی توانمندی جدایه های قارچی در حذف ماده رنگزا کنگو قرمز با غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر.

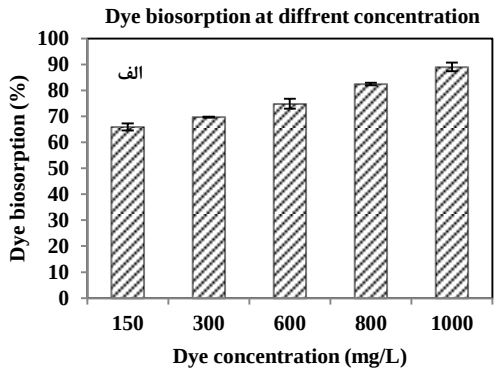


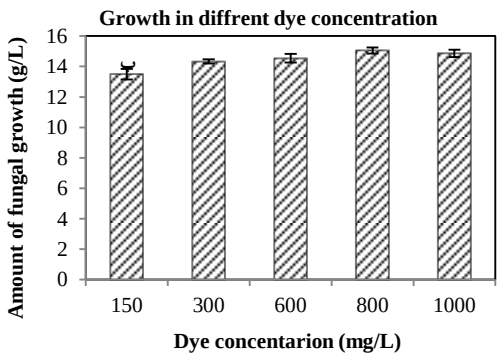
شکل ۲: الف) ریخت‌شناسی کلنی ایزوله قارچی در محیط کشت PDA، ب) تصویر میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن آبی) ج) قطعه ژن تکثیر شده ITS به طول ۷۰۰ نوکلئوتید روی ژل آگاروز



شکل ۳: درخت فیلوژنی رسم شده .*Neosartorya* sp با استفاده از قطعه ژن ITS، با الگوریتم Neighbor joining .

همچنین بررسی‌های انجام‌شده جهت تعیین میزان بیومس تولیدی در غلظت‌های مختلف ماده رنگزا نشان داد که این جدایه در غلظت‌های مختلف ماده رنگزا به مقدار برابری رشد می‌نماید و غلظت ماده رنگزا تاثیر چندانی بر رشد .*Neosartorya* sp نداشته است (شکل ۴- ب). نتایج حاصل از مطالعه سیواسامی و همکارش در سال ۲۰۱۱ بر روی قارچ‌های *Aspergillus niger* و .*Trichoderma* sp نشان داد که درصد جذب ماده رنگزا با افزایش غلظت ماده رنگزا در محیط کاهش می‌یابد [۲۰]. بر خلاف نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، مطالعه حاضر نشان داد که جدایه قارچی .*Neosartorya* ps قارچی توانمند در جذب مواد رنگزا آزو می‌باشد که با افزایش غلظت ماده رنگزا میزان جذب ماده رنگزا توسط این جدایه افزایش می‌یابد که علت احتمالی این را می‌توان افزایش میزان ماده رنگزا در دسترس زیست‌توده قارچی، در غلظت‌های بالا ماده رنگزا باشد. در مطالعه رانجوشاو و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بر روی قارچ *Aspergillus flavus* نشان داده شد که با افزایش غلظت ماده رنگزا میزان زیست توده تولیدی کاهش می‌یابد و این نشان از سمیت ماده رنگزا بر روی این سویه قارچی می‌باشد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که .*Neosartorya* sp قادر به رشد برابری در غلظت‌های مختلف ماده رنگزا می‌باشد که این را می‌توان نتیجه عدم سمیت ماده رنگزا و تحمل‌پذیری بالا این جدایه حتی در غلظت‌های بالای ماده رنگزا دانست.





شکل ۴: الف) میزان جذب .Neosartorya sp در غلظت‌های مختلف ماده رنگزا ب) مقدار رشد .Neosartorya sp در غلظت‌های مختلف ماده رنگزا.

۳ـ۳ـ بررسی تحمل‌پذیری *Neosartorya* sp. در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم

ازآنجایی‌که پساب‌های صنایع نساجی دارای ۱۰۰-۴۰ گرم بر لیتر نمک می‌باشند، بنابراین جداسازی و دستیابی به جدایه‌های توانمند در رشد، در این غلظت‌های نمک لازم و ضروری می‌باشد. بررسی‌های انجام‌گرفته نشان داد که *Neosartorya* sp. بیشترین میزان رشد را در عدم حضور نمک دارا می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که این جدایه قادر به رشد مناسبی تا غلظت ۱۰۰ گرم بر لیتر نمک می‌باشد. شکل ۵ میزان رشد این میکروارگانیسم را در غلظت‌های مختلف نمک نشان می‌دهد.

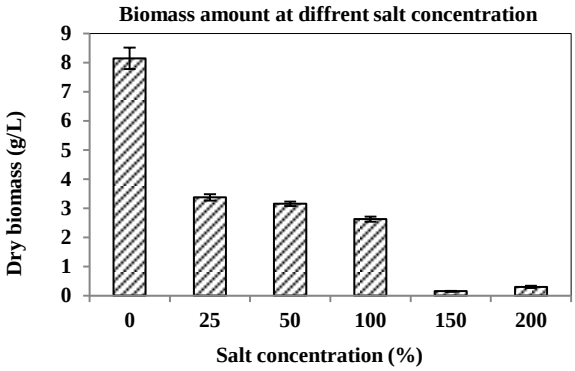
وجود نمک در پساب‌های صنایع نساجی و مطالعات اندک در زمینه شناسایی و بررسی توانمندی میکروارگانیسم‌ها در رشد در غلظت‌های بالا نمک و ماده رنگزا موجب بررسی توانمندی رشد *Neosartorya* sp. در غلظت‌های مختلف نمک شد. نتایج حاصل نشان داد که این جدایه رشد مناسبی را تا غلظت‌های ۱۰۰ گرم بر لیتر نمک دارا می‌باشد. بنابراین می‌توان این جدایه را به‌عنوان گزینه ای مناسب برای حذف مواد رنگزای آزو از پساب‌های شور صنایع نساجی معرفی نمود که برای اولین بار در این مطالعه در جهت حذف ماده رنگزای دی آزو کنگو قرمز مورد استفاده قرار گرفته است.

۳ـ۴ـ بررسی واجذب ماده رنگزا از زیست‌توده رنگی با استفاده از حلال‌های مختلف

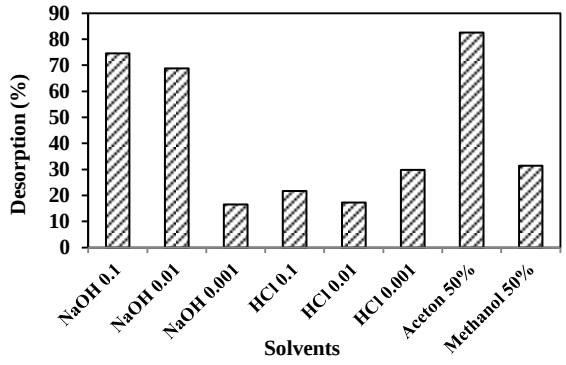
بررسی واجذب ماده رنگزای زیست‌توده رنگی نشان داد که استن با ۸۲ ٪ و هیدروکسید سدیم ۰،۰۰۱ مول بر لیتر با ۱۶ ٪ واجذب ماده رنگزا به ترتیب بیشترین و کمترین میزان واجذب از زیست‌توده رنگی را نشان دادند (شکل ۶). با توجه به نتایج نشان داده شده می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های بالا هیدروکسید سدیم و استن را می‌توان به عنوان موثرترین حلال‌ها در واجذب ماده رنگزا از زیست‌توده مورد استفاده قرار داد و استفاده از محلول‌های با pH اسیدی و حلال متانل روش مناسبی جهت واجذب ماده رنگزا نمی‌باشد.

۳ـ۵ـ بررسی جذب ماده رنگزا از پساب واقعی صنایع نساجی توسط *Neosartorya* sp.

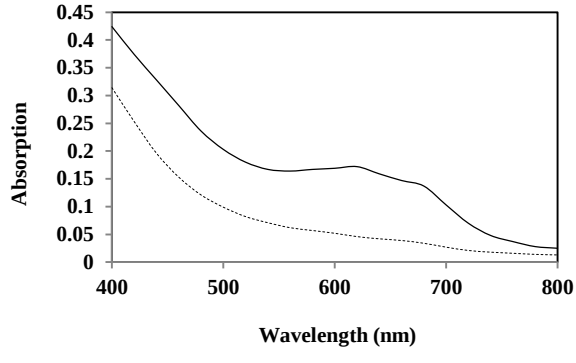
بررسی جذب ماده رنگزا توسط زیست‌توده قارچی *Neosartorya* sp. نشان داد که این سویه قادر به جذب مقدار قابل توجهی از ماده رنگزا از پساب واقعی کارگاه رنگرزی می‌باشد. طیف به‌دست آمده حاصل از نمونه شاهد و تیمار شده با زیست‌توده قارچی در شکل ۷ نشان داده شده است.



شکل ۵: بررسی میزان رشد و تولید زیست‌توده در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl).



شکل ۶: بررسی میزان واجذب ماده رنگزا زیست‌توده در حلال‌های مختلف.



شکل ۷: الف) نمونه پساب تیمار شده با زیست‌توده قارچی *Neosartorya* sp. ب) نمونه پساب شاهد بدون تیمار قارچی ج) منحنی خط کامل نشان دهنده جذب نمونه شاهد پساب واقعی نساجی و منحنی خط‌چین نشان‌دهنده نمونه تیمار شده با زیست‌توده قارچی.

تاکنون مطالعات متعددی بر روی جذب ماده رنگزا با استفاده از زغال فعال انجام شده است. همچنین امروزه استفاده از نانوذرات جهت جذب آلاینده‌های رنگی مورد توجه قرار گرفته است. از جمله معایب استفاده از این روش‌ها هزینه بالا جاذب‌های مورد استفاده می‌باشد. همچنین در این میان استفاده از جاذب‌های با هزینه‌های کمتر نیز مورد توجه قرار گرفته است که نقص استفاده از این روش‌ها ظرفیت جذب پایین این جاذب‌ها می‌باشد[۲۱]. در این میان استفاده از زیست‌توده میکروارگانیسم‌ها به خصوص قارچ‌ها به علت دارا بودن سطح بالا، روشی مناسب و مقرون به صرفه جهت جذب این آلاینده‌ها از پساب‌های رنگی کارخانه‌ها می‌باشد. همان‌طور که در این پژوهش نشان داده شده است استفاده از جاذب زیستی *Neosartorya* sp. نتایج قابل توجهی را در جذب این مواد رنگزا از پساب‌ها نشان داده است و می‌توان این جاذب را به عنوان جاذبی مناسب جهت استفاده برای حذف ماده رنگزا از پساب‌های آلوده به ماده رنگزا معرفی نمود.

۴ـ نتیجه‌گیری

با توجه به توانمندی‌های ذکر شده برای جدایه مورد نظر در حذف ماده رنگزا در غلظت‌های بالا تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگزای کنگو قرمز و توانایی این جدایه در رشد، در غلظت‌های بالای نمک تا ۱۰۰ گرم بر لیتر می‌توان *Neosartorya* sp. را به‌عنوان سویه‌ای توانمند در حذف مواد رنگزا آزو از پساب‌های حاصل از صنایع استفاده‌کننده از ماده رنگزا به ویژه تیمار پساب صنایع نساجی معرفی نمود. با توجه به نتایج می‌توان این گونه بیان نمود که استفاده از تیمارهایی از قبیل تیمار با استن زیست توده رنگی می‌تواند موجب واجذب بیش از ۸۰٪ از ماده رنگزا جذب شده شود و بنابراین از این جاذب زیستی جهت جذب مواد رنگزا چندین مرتبه استفاده کرد. بررسی توانایی این جدایه در جذب مواد رنگزا از پساب واقعی صنایع رنگرزی نیز نشان از توانایی بالا این سویه قارچی در جذب ماده رنگزا داشت؛ بنابراین می‌توان *Neosartorya* sp. را به عنوان جاذبی امیدوارکننده جهت استفاده در تیمار پساب‌های حاوی مواد رنگزا معرفی نمود.

۵ـ مراجع

۸. سلمان احمدی اسبچین، حسنا مرادی، رضا تبارکی، مطالعه تجزیه میکروبی ماده رنگزای ایندیگوکارمین توسط باکتری گرم منفی اسینتوباکتر لووفی، *نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ*، ۱۰(۱۳۹۵)، ۷۰-۶۵.

1. B. E. Taştan, S. Ertuğrul, G. Dönmez, Effective bioremoval of reactive dye and heavy metals by *Aspergillus versicolor*. *Bioresour. Technol.* 101(2010), 870-876.
2. M.-X. Wang, Q.-L. Zhang, S.-J. Yao, A novel biosorbent formed of marine-derived *Penicillium janthinellum* mycelial pellets for removing dyes from dye-containing wastewater. *Chem. Eng. J*. 259(2015), 837-844.
3. A. Porri, R. Baroncelli, L. Guglielminetti, S. Sarrocco, L. Guazzelli, M. Forti, G. Catelani, G. Valentini, A. Bazzichi, M. Franceschi, G. Vannacci, *Fusarium oxysporum* degradation and detoxification of a new textile-glycoconjugate azo dye (GAD). *Fungal. Biol.* 115(2011), 30-37.
4. H. S. Lade, T. R. Waghmode, A. A. Kadam, S. P. Govindwar, Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 72(2012), 94-107.
5. S.-S. Mirzadeh, S. M. Khezri, S. Rezaei, H. Forootanfar, A. H. Mahvi, M. A. Faramarzi, Decolorization of two synthetic dyes using the purified laccase of *Paraconiothyrium variabile* immobilized on porous silica beads. *J. Environ. Health Sci. Eng*. 12(2014), 6-14.
6. B.-E. Wang, Y.Y Hu, L. Xie, K. Peng, Biosorption behavior of azo dye by inactive CMC immobilized *Aspergillus fumigatus* beads. *Bioresour. Technol.* 99(2008), 794-800.
7. L. Ma, R. Zhuo, H. Liu, D. Yu, M. Jiang, X. Zhang, Y. Yang, Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin mountain in China. *Biochem. Eng. J*. 82(2014), 1-9.
9. E. Almeida, C. Corso, Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere*. 112(2014), 317-322.
10. E. P. Chagas, L.R. Durrant, Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme. Microb. Technol.* 29(2001), 473-477.
11. N. Jafari, R. K. Kermanshai, M. R. Soudi, Screening, identification and optimization of a yeast strain, *Candida palmioleophila* JKS4, capable of azo dye decolorization. *Iran. J. Microbiol.* 5(2013), 434-440.
12. V. Ranjusha, R. Pundir, K. Kumar, M. G. Dastidar, T. R. Sreekrishnan, Biosorption of Remazol Black B dye (Azo dye) by the growing *Aspergillus flavus*. *J. Environ. Sci. Heal. A.* 45(2010), 1256-1263.
13. C. Máximo, M. T. P. Amorim, M. Costa-Ferreira, Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. *Enzyme Microb Tech*. 32(2003), 145-151.
14. B. Acemioğlu, Adsorption of Congo red from aqueous solution onto calcium-rich fly ash. *J. Colloid. Interf. Sci.* 274(2004), 371-379.
15. P. Thavamani, M. Megharaj, R. Naidu, Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium. *Biodegradation*. 23(2012), 823-835.

16.A. K. Yadav, S. Jena, B. C. Acharya, B. K. Mishra, Removal of azo dye in innovative constructed wetlands: Influence of iron scrap and sulfate reducing bacterial enrichment. *Ecol. Eng.* 49(2012), 53-58.
17.T. Watanabe, Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC press. 2010.
18.J. Sambrook, D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.
19.N. Jafari, M. R. Soudi, R. Kasra-Kermanshahi, Biodecolorization of textile azo dyes by isolated yeast from activated sludge: *Issatchenkia orientalis* JKS6. *Ann. Microbiol.* 64(2014), 475-482.
20.A. Sivasamy, N. Sundarabal, Biosorption of an azo dye by *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. fungal biomasses. *Curr. Microbiol*. 62(2011), 351-357.
21.M. Wawrzkiewicz, Z. Hubicki, Anion exchange resins as effective sorbents for removal of acid, reactive, and direct dyes from textile wastewaters. *InTech.* 2015.