

## The Reduction of Azo Dye Carmoisine from Synthetic Desizing Stage Effluent by *Klebsiella quasipneumoniae* GT7

Iman Khakbaz<sup>1</sup>, Tayebe Bagheri Lotfabad<sup>\*2</sup>, Amir Heydarinasab<sup>1</sup>, Pedram Hasanvand<sup>2</sup>

1- Department of Chemical Engineering, Science and Research branch, Islamic Azad University, P.O. Box: 14515/775, Tehran, Iran.

2- Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), P.O. Box: 14965/161, Tehran, Iran.

### ARTICLE INFO

Article history:

Received: 06-08-2023

Accepted: 25-10-2023

Available online: 29-11-2023

Print ISSN: 1735-8779

Online ISSN: 2383-2169

**DOR: 20.1001.1.17358779.1402.17.3.6.9**

### Keywords:

Dye removal

*Klebsiella*

Carmoisine

Starch

Desizing

### ABSTRACT

The removal of the azo dye carmoisine from a synthetic dye wastewater medium, which contained starch and had a similar composition to the effluent from the desizing stage, was investigated by *Klebsiella quasipneumoniae* GT7. The measurements of dye concentration by spectrophotometry and starch concentration by the Anthrone method revealed that the anaerobic process at a temperature of 30 °C and pH 7, with an initial concentration of 50 mg/l of carmoisine, resulted in a decrease of approximately 96 % in the initial dye concentration within 48h. This was accompanied by a decrease of approximately 30 to 35 % in the initial starch concentration (1870 mg/l). Thin layer chromatography (TLC) showed that the bacteria degraded the carmoisine dye, which was removed during the anaerobic process, into its constituent aromatic amines. The continuation of the process under aerobic conditions, with and without re-inoculation of bacteria at the beginning of the aerobic stage, revealed that until day 23, aromatic amine molecules were not degraded and there was no significant reduction in the amount of dye or starch remaining from the anaerobic stage.

\*Corresponding author: \* [bagheril@nigeb.ac.ir](mailto:bagheril@nigeb.ac.ir)





## کاهش رنگزای آزوی کارموزین از پساب سنتزی مرحله آهارگیری توسط کلبسیلا کوازیپنومونیه GT7

ایمان خاکباز، طیبه باقری لطف‌آباد<sup>۱\*</sup>، امیر حیدری نسب<sup>۱</sup>، پدram حسونند<sup>۲</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵/۷۷۵.

۲- دانشیار، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱.

۳- دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵/۷۷۵.

۴- کارشناسی ارشد، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱.

### چکیده

حذف رنگزای آزوی کارموزین از محیط پساب سنتزی رنگی که حاوی نشاسته بوده و دارای ترکیبی مشابه با خروجی از مرحله آهارگیری بود، توسط باکتری کلبسیلا کوازیپنومونیه GT7 بررسی شد. سنجش غلظت رنگ توسط طیف‌سنجی و اندازه‌گیری غلظت نشاسته با استفاده از روش آنترون، نشان داد که انجام فرایند به صورت بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷، وقتی که غلظت اولیه کارموزین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد، طی ۴۸ ساعت منجر به کاهش حدود ۹۶ درصد از غلظت اولیه رنگ‌زا شده است. این، توام با کاهش ۳۰ تا ۳۵ درصد از غلظت اولیه نشاسته (۱۸۷۰ میلی‌گرم بر لیتر) بوده است. کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) نشان داد که باکتری‌ها، رنگ کارموزین حذف شده طی فرایند بی‌هوازی را به آمین‌های آروماتیکی سازنده آن تجزیه نموده‌اند. ادامه فرایند به صورت هوازی، با و بدون انجام تلقیح مجدد باکتری‌ها در آغاز مرحله هوازی، نشان داد که تا ۲۳ روز، شکست ملکول‌های آمین آروماتیکی صورت نگرفته و کاهش قابل توجهی در مقدار رنگ یا نشاسته باقی‌مانده از مرحله بی‌هوازی، ایجاد نشده است.

### اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۳

در دسترس به صورت الکترونیکی: ۱۴۰۲/۹/۸

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۸۷۷۹

شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۳-۲۱۶۹

DOR: 20.1001.1.17358779.1402.17.3.6.9

### واژه‌های کلیدی:

حذف رنگ

کلبسیلا

کارموزین

نشاسته

آهارگیری



## ۱- مقدمه

رشد چشمگیر صنایع نساجی به پیشرفت گسترده در اقتصاد جهان کمک کرده است. مجموعه گسترده‌ای از رنگ‌زاهای سنتزی برای تولید منسوجات مختلف نساجی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱). هر ساله مقدار زیادی رنگ‌زای نساجی (تقریباً ۱۰۰۰۰ رنگ‌زای مصنوعی؛  $10^7 \times 7$  تن)، در سراسر جهان تولید می‌شود (۲)، که بخش اعظم آن را رنگ‌زاهای آزو تشکیل داده‌اند. رنگ‌زاهای آزو، ترکیبات سنتزی با پایداری بالا هستند که دارای یک یا چند پیوند آزو ( $N=N$ ) می‌باشند و زمان بسیاری است که توسط صنایع متعددی از جمله صنایع نساجی، چاپ، غذایی، آرایشی-بهداشتی و غیره مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳). اما، پایداری بالای ساختار رنگ‌زاهای آزو، آن‌ها را به خطری جدی برای محیط‌زیست تبدیل کرده است. از این‌رو، لازم است پیش از تخلیه پساب‌های آلوده به این رنگ‌زاهای آب‌های پذیرنده، حذف رنگ طی فرایند تصفیه صورت پذیرد (۴). پساب صنایع نساجی از عمده‌ترین آلاینده‌های رنگی محیط‌زیست محسوب می‌شوند که عموماً، دمای بالایی دارند، دارای میزان بالایی از جامدات محلول می‌باشند، COD و BOD بالایی دارند و در پاره‌ای از مواقع به شدت قلیایی هستند. تخلیه پساب حاوی مواد رنگی به آب‌های پذیرنده از قبیل رودخانه‌ها و دریاچه‌ها موجب کاهش انتقال نور، کاهش میزان اکسیژن محلول (DO) و افزایش COD در این محیط‌ها شده و در نتیجه سبب اختلال در زندگی آبزیان می‌گردد (۵). بدون انجام تصفیه مناسب، این ترکیبات حاوی رنگ‌زاهای آزو قادرند برای مدت زمان بسیار طولانی به حالت پایدار در محیط باقی بمانند (۶). افزون بر این، گزارش‌هایی مبنی بر خاصیت کشندگی، سرطان‌زایی و جهش‌زایی رنگ‌زاهای مصنوعی موجود در پساب‌های نساجی ارائه شده است (۷) که نشان می‌دهند آلودگی متابولیت‌های سرطان‌زای حاصل از این رنگ‌زاهای باعث ایجاد مشکلات عدیده‌ای برای تمامی موجودات زنده می‌شود (۸). از آنجا که مواد رنگ‌زا، معمولاً دارای ساختار مولکولی آروماتیکی پیچیده‌ای هستند، بسیار پایداری دارند و در مقابل تجزیه‌پذیری مقاومت بالایی دارند (۹). از این‌رو، منبع مهم آلودگی آب به شمار می‌آیند و آثار زیان‌آوری بر سلامت موجودات زنده برجای می‌گذارند (۱۰). بنابراین، حذف این ترکیبات از پساب خروجی مورد توجه محققین بسیاری قرار گرفته است. روش‌های شیمیایی و فیزیکی-شیمیایی تصفیه پساب علاوه بر هزینه بودن، لجن و مواد دفعی زیادی را ایجاد می‌کنند که از بین بردن این مواد، مشکلات ثانویه دیگری را به همراه می‌آورد (۱۱). در سال‌های اخیر، به منظور حصول اطمینان از حذف موثر رنگ‌زاهای پساب صنایع مختلف از جمله صنایع نساجی، استفاده از روش‌های تصفیه زیستی به کمک میکروارگانیسم‌ها مورد توجه بسیاری از محققین، قرار گرفته است (۱۲). این روش‌ها، از مزایای مختلفی برخوردارند که از آن جمله می‌توان به مواردی، مانند سازگاری با محیط‌زیست، عدم نیاز به سرمایه‌گذاری قابل توجه در

تجهیزات و لوازم، تولید لجن و مواد دفعی کمتر، ایمن بودن و غیره اشاره کرد (۱۳). روش‌های زیستی جایگزین امیدوارکننده‌ای برای روش‌های سنتی و متداول مورد استفاده در تصفیه پساب‌های رنگی نشان داده شده‌اند (۱۴).

در دو دهه گذشته، کارهای قابل توجهی با هدف استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل کاهش دهنده آلودگی‌های محیطی حاصل از پساب‌های رنگی کارخانجات نساجی انجام گرفته است. لین و همکارانش طی پژوهشی، اثبات نمودند که باکتری *آئروموناس DH-6* می‌تواند تقریباً به میزان ۱۰۰ درصد از رنگ‌زای متیل اورانژ با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر را طی ۱۲ ساعت در شرایط دمایی ۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۳ تا ۷، حذف نماید (۱۵). مٹی‌وانان و همکارانش در تحقیقی، دریافتند که *ساکارومایسیس* قادر است در محیط پساب نساجی حاوی رنگ‌زا قرمز کنگو با غلظت اولیه ۴۰ میلی گرم بر لیتر، تقریباً به میزان ۹۰٫۷ درصد از رنگ‌زای اولیه را طی مدت زمان ۱۸ ساعت در شرایط دمای اتاق و در pH معادل ۴، حذف نماید (۱۶). تانگراج و همکارانش در پژوهشی، گزارش نمودند که *آئروباکتر* می‌تواند در محیط پساب نساجی حاوی رنگ‌زای ری‌اکتیو قرمز یا ری‌اکتیو زرد با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر، به میزان تقریباً ۹۸ درصد از رنگ‌زای اولیه را در شرایط میکرو-هوازی<sup>۱</sup> و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حذف کند (۱۷). مصطفی و همکارانش در تحقیقی، مشاهده نمودند که باکتری *کلسیلا پنومونیه* قادر است در محیط فاضلاب نساجی حاوی رنگ دیسپرس آبی با غلظت اولیه ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر، تقریباً ۹۵ درصد از رنگ‌زای اولیه را طی ۲۴ ساعت، در شرایط pH خنثی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حذف نماید (۱۸). دانگی و همکارانش طی پژوهشی، دریافتند که باکتری *باسیلوس آلبوس DD1* می‌تواند در محیط پساب نساجی حاوی رنگ‌زای ری‌اکتیو سیاه با غلظت اولیه ۵۰ میلی گرم بر لیتر، به میزان ۹۸ درصد از رنگ‌زای اولیه را طی مدت زمان ۳۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۷، تحت شرایط هوازی حذف کند (۱۹). بی‌جو و همکارانش با استفاده از کنسرسیومی از باکتری‌های نمک‌دوست شامل LBKVG1، LBKVG2، LBKVG3 و LBKVG4، حدود ۸۲ درصد رنگبری را از پساب نساجی، حاوی رنگ‌زاهای آزوی ری‌اکتیو قرمز، ری‌اکتیو قهوه‌ای و ری‌اکتیو سیاه با غلظت اولیه ۱۲۰۰ میلی گرم بر لیتر، در شرایط بی‌هوازی، pH ۸٫۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گزارش نمودند (۲۰).

به این ترتیب، تحقیقات پیشین، موفقیت‌آمیز بودن روش‌های زیستی برای حذف رنگ‌زاهای آزو را نشان می‌دهند، از طرفی، پساب مرحله آهارگیری<sup>۲</sup> که بخش عمده‌ای از کل پساب صنعت نساجی را

1- Microaerophilic

2- Desizing

کمیاب حاوی عصاره مخمر (۱ گرم بر لیتر)،  $H_3BO_3$  (۰,۰۵ گرم بر لیتر)،  $FeCl_3$  (۲ گرم بر لیتر)،  $MnSO_4$  (۰,۵ گرم بر لیتر)،  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (۲ گرم بر لیتر)،  $MnCl_2$  (۰,۲۵ گرم بر لیتر)،  $MgCl_2$  (۱ گرم بر لیتر)، EDTA (۰,۰۵ گرم بر لیتر) و HCl غلیظ (۱ میلی لیتر) (۲۴) بود.

محلول مادر رنگ‌زای کارموزین با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. محلول مادر در شرایط استریل به محیط SM اضافه گردید، به طوری که غلظت نهایی رنگ‌زا در آن ۵۰ میلی گرم در لیتر باشد. محیط حاصل که محتوایی شبیه به ترکیبات جریان خروجی مرحله آهارگیری در صنعت نساجی دارد، محیط کشت آهارگیری (dM) نامیده شد و با توجه به غلظت رنگ‌زای کارموزین موجود در آن با علامت اختصاری  $dM^{CS0}$  مشخص گردید

#### ۲-۴-۴ فرایند حذف زیستی رنگ‌زا

حذف زیستی رنگ‌زا در محیط کشت آهارگیری حاوی کارموزین با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر ( $dM^{CS0}$ ) انجام گرفت. برای این منظور، ۴ میلی لیتر از پیش کشت تهیه شده از سلول‌های باکتری کلبسیلا کوازینومونیه GT7 به شیشه‌های دوران ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۸۰ میلی لیتر از محیط  $dM^{CS0}$  تلقیح گردید. شیشه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به صورت ساکن گرماگذاری شدند. در زمان صفر آنکوباسیون و همچنین، در فواصل زمانی مشخص، نمونه‌گیری صورت گرفت، تا رشد سلول‌ها و نیز کاهش رنگ و غلظت نشاسته در آن‌ها اندازه‌گیری شود. پس از حذف کامل رنگ، برای مطالعه تاثیر شرایط هوازی بر پارامترهای مورد بررسی، دو سری آزمایش طراحی شد. در سری اول محیط درون شیشه‌ها به ارلن ۵۰۰ میلی لیتری استریل، منتقل گردید و در سری دوم، به منظور بررسی اثر تلقیح مجدد در شرایط هوازی مورد مطالعه، محیط درون شیشه‌ها به ارلن‌های ۵۰۰ میلی لیتری استریل، منتقل گردید و سپس سوسپانسیون باکتری به میزان ۴ میلی لیتر به آن تلقیح شد. در ادامه، ارلن‌ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و هوادهی ۱۸۰ دور در دقیقه آنکوبه گردیدند. در زمان صفر آنکوباسیون در شرایط هوازی و همچنین، در فواصل زمانی معین، نمونه‌گیری انجام گرفت. میزان رشد باکتری‌ها در هر نمونه با استفاده از اندازه‌گیری چگالی نوری ( $OD_{600nm}$ ) به کمک دستگاه طیف‌سنج (T80- UV/VIS spectrometer) سنجش گردید. سپس، سلول‌های باکتری با استفاده سانتریفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) در هر نمونه حذف شد. مایع رویی برای تعیین غلظت رنگ‌زا و غلظت نشاسته با استفاده از روش‌هایی

شامل می‌شود حاوی ترکیبات نشاسته بوده و سبب حضور نشاسته در پساب رنگی نساجی می‌گردد (۲۱). در حد اطلاع ما تاکنون تحقیقات قابل توجهی در خصوص حذف رنگ‌زاهای آزو از پساب‌های حاوی نشاسته صورت نگرفته است. بنابراین، در این تحقیق مورد نظر است تا حذف رنگ‌زای آزو به روش زیستی از محیط پساب رنگی حاوی نشاسته که دارای ترکیبی مشابه با خروجی از مرحله آهارگیری است، مورد ارزیابی قرار گیرد، و همچنین امکان حذف نشاسته توام با پیشرفت فرایند رنگبری در این محیط بررسی گردد. برای این منظور از باکتری کلبسیلا کوازینومونیه GT7 که در تحقیقات قبلی به طور موثری رنگ‌زای آزوی کارموزین را تجزیه زیستی نموده است (۲۳) (۲۲)، برای انجام فرایندهای حذف زیستی بهره گرفته می‌شود.

#### ۲- بخش تجربی

##### ۲-۱- مواد

تمام ترکیبات و مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک تهیه شدند. رنگ‌زای آزوی کارموزین<sup>۱</sup> از شرکت ویستارز دریافت گردید.

##### ۲-۲- میکروارگانسیم و محیط کشت

در این تحقیق، از باکتری کلبسیلا کوازینومونیه GT7 جداسازی شده در تحقیقات پیشین (۲۲) که از پنانسیل بالایی برای حذف کارموزین در شرایط مختلف و حتی سخت محیطی برخوردار است (۲۳) استفاده شد. محیط کشت YTS متشکل از عصاره مخمر (۱۰ گرم بر لیتر)، تریپتون (۲۰ گرم بر لیتر) و ساکارز (۲۰ گرم بر لیتر)، برای تهیه پیش کشت استفاده شد. برای این منظور، باکتری‌ها در محیط YTS کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و هم‌زدن ۱۸۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت آنکوبه گردیدند.

##### ۲-۳- مشابه سازی محلول با ترکیبات جریان خروجی مرحله

##### آهارگیری در صنعت نساجی

ابتدا محلول استوک نشاسته (۱۸,۷ گرم بر لیتر) با حرارت دادن به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. به این محلول ۲۸,۰۵ گرم بی‌کربنات سدیم اضافه گردید. با استفاده از این محلول استوک، محلولی شامل نشاسته (۱,۸۷ گرم بر لیتر)،  $NaHCO_3$  (۲,۸۰۵ گرم بر لیتر)،  $NH_4Cl$  (۰,۵۸ گرم بر لیتر) و  $KH_2PO_4$  (۰,۲۳ گرم بر لیتر) و عناصر کمیاب به میزان ۳ میلی لیتر بر لیتر، تهیه گردید و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. محیط حاضر با توجه به محتوای نشاسته‌ای موجود در آن، «محیط کشت نشاسته» (SM)<sup>۲</sup> نامیده شد. محلول عناصر

3- Desizing medium

1- Carmoisine  
2- Starch medium

ظرف یخ قرار گرفت. طیف جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (T80- UV/VIS spectrometer) اسکن و ارتفاع پیک مربوط به بیشینه جذب معرف آنترون ( $\lambda_{max} = 580 \text{ nm}$ ) ثبت گردید. سپس نمودار ارتفاع پیک جذب بر حسب غلظت نشاسته رسم شد و خط رگرسیون آن تعیین و معادله خط به دست آمد. به این ترتیب برای تعیین غلظت نشاسته در هر نمونه که ارتفاع پیک جذب آن در  $\lambda_{max}$  توسط طیف‌سنجی مشخص شده باشد، می‌توان از این رابطه استفاده کرد (۲۵).

#### ۲-۵-۴- سنجش غلظت نشاسته در نمونه‌ها

برای تعیین غلظت نشاسته در نمونه‌های عاری از سلول، از روش آنترون استفاده شد. همان‌طور که در بالا توضیح داده شد، مقدار مشخصی از معرف آنترون به هر نمونه اضافه شد و پس از طی کردن مراحل لازم، با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (T80- UV/VIS spectrometer) طیف جذب آن بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر اسکن گردید. ارتفاع پیک مربوط به معرف آنترون ( $\lambda_{max} = 580 \text{ nm}$ ) در طیف جذب هر نمونه، ثبت شد. سپس با استفاده از نمودار استاندارد جذب- غلظت مربوط به نشاسته، غلظت نشاسته در نمونه مورد نظر تعیین گردید (۲۶). درصد حذف نشاسته با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{غلظت نشاسته در زمان مورد نظر} - \text{غلظت اولیه نشاسته}}{\text{غلظت اولیه نشاسته}} = \text{درصد کاهش غلظت نشاسته} \quad (2)$$

#### ۲-۵-۵- آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک

نمونه‌های عاری از سلول، با استفاده از حلال آلی استخراج شد و سپس در تیخیرکننده چرخان خلا Eppendorf concentrator 5301 تغلیظ شد و مطابق روش ارائه شده توسط کیایی و همکارانش (۲۷) روی کاغذ کروماتوگرافی بارگذاری و داخل تانک حلال قرار داده شد، سپس در نور UV مشاهده و بررسی شد.

#### ۲-۵-۶- تحلیل داده‌ها

تمام آزمایشات حداقل سه بار تکرار گردید. نتایج و محاسبات صورت گرفته در این تحقیق، توسط Excel نسخه ۲۰۱۶ محاسبه شده است. نوارهای خطا نشان داده شده در نمودارها، نشان دهنده یک خطای استاندارد مثبت و منفی از میانگین هستند.

#### ۳- نتایج و بحث

##### ۳-۱- رشد باکتری‌ها در محیط رنگی حاوی نشاسته

رشد باکتری‌ها در محیط رنگی حاوی کارموزین با غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و نشاسته با غلظت اولیه ۱۸۷۰ میلی‌گرم بر لیتر

که در بخش روش‌های تحلیلی توضیح داده شده است مورد سنجش قرار گرفت. علاوه بر این، نمونه‌های عاری از سلول، برای بررسی تجزیه ملکول رنگزا با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### ۲-۵-۲- روش‌های تحلیلی

##### ۲-۵-۲-۱- تعیین غلظت و بازده حذف رنگزا با استفاده از روش

##### طیف‌سنجی

نمونه عاری از سلول با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (T80- UV/VIS spectrometer) بین ۲۰۰ nm تا ۸۰۰ nm اسکن گردید. ارتفاع پیک مربوط به کارموزین ( $\lambda_{max} = 515 \text{ nm}$ ) در طیف جذب هر نمونه، ثبت شد. سپس با استفاده از نمودار استاندارد جذب- غلظت مربوط به کارموزین، غلظت رنگزا در نمونه مورد نظر تعیین گردید. درصد حذف رنگزا با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{غلظت رنگزا در زمان مورد نظر} - \text{غلظت اولیه رنگزا}}{\text{غلظت اولیه رنگزا}} = \text{درصد حذف رنگزا} \quad (1)$$

##### ۲-۵-۲-۲- نمودار استاندارد سنجش غلظت کارموزین

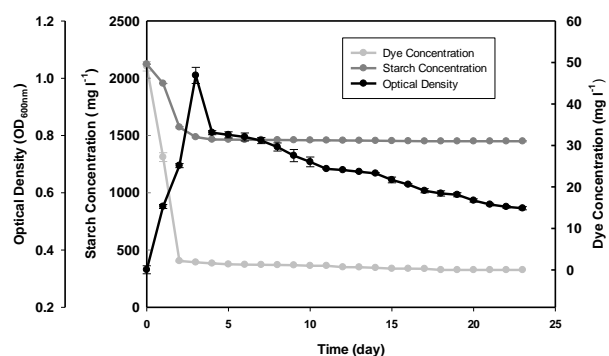
غلظت‌های مشخص از محلول رنگی کارموزین در محیط کشت SM (صفر تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) تهیه شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (T80-UV/VIS spectrometer)، طیف جذب آن‌ها اسکن و ارتفاع پیک مربوط به حداکثر جذب رنگ کارموزین ( $\lambda_{max} = 515 \text{ nm}$ ) ثبت گردید. سپس نمودار ارتفاع پیک جذب بر حسب غلظت کارموزین رسم شد و خط رگرسیون آن تعیین و معادله خط بدست آمد. به این ترتیب برای تعیین غلظت کارموزین در هر نمونه که ارتفاع پیک جذب آن در  $\lambda_{max}$  توسط طیف‌سنجی مشخص شده باشد، می‌توان از این رابطه استفاده کرد.

##### ۲-۵-۳- روش اندازه‌گیری نشاسته با استفاده از روش آنترون

##### و رسم نمودار استاندارد سنجش غلظت نشاسته

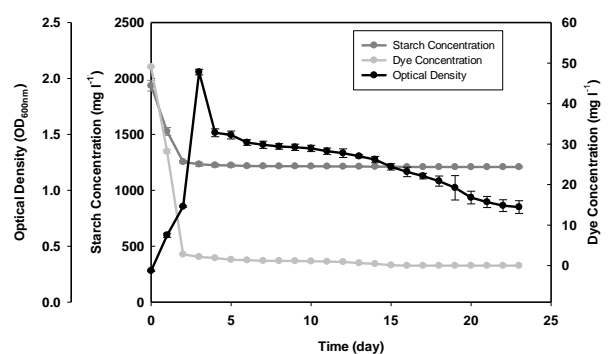
معرف آنترون با افزودن ۲ گرم آنترون در یک لیتر اسید سولفوریک غلیظ تهیه گردید. محلول استوک ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از نشاسته تهیه شد. این محلول، به منظور آبکافت نشاسته و تشکیل مولکول‌های گلوکز، به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۱۱۳ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. سپس، با استفاده از رقیق‌سازی محلول استوک نشاسته، محلول‌هایی با غلظت‌های مشخص از نشاسته (۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) تهیه گردید. مقدار مشخصی از معرف آنترون به هر ویال اضافه شد و هر ویال به مدت ۳۰ ثانیه به سرعت ورتکس گردید و بلافاصله در ظرف یخ قرار داده شد. سپس، ویال‌ها به حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و به مدت ۱۷ دقیقه انکوبه گردید. بعد از آن، ویال‌ها در

متوسط ۳۰ تا ۳۵ درصد از غلظت اولیه نشاسته کاهش یافته است. در ادامه با انجام فرایند هوازی، طی ۲۴ ساعت، غلظت نشاسته تنها یک درصد در شرایط عدم تلقیح مجدد باکتری‌ها در آغاز مرحله هوازی و دو درصد در شرایط انجام تلقیح مجدد باکتری‌ها در آغاز مرحله هوازی، کاهش یافته و پس از آن غلظت نشاسته تا ۲۳ روز انکوباسیون ثابت مانده است. مشاهدات مصرف نشاسته با نتایج مربوط به رشد باکتری‌ها که در بالا به آن اشاره شد مطابقت دارد، با این توضیح که طی ۲۴ ساعت از شروع مرحله هوازی، مصرف نشاسته سبب افزایش رشد باکتری‌ها شده است که به صورت افزایش جذب نمونه‌ها ملاحظه می‌شود، اما پس از آن، با ادامه فرایند، باکتری‌ها وارد فاز مرگ شده و رشد آن‌ها کاهش داشته است



شکل ۱: نمایش تغییرات چگالی نور، غلظت کارموزین و غلظت نشاسته طی فرایند بی‌هوازی-هوازی بدون انجام تلقیح مجدد در آغاز مرحله هوازی.

Figure 1: Showing the changes in optical density, carmosin, and starch concentrations during the anaerobic-aerobic process without re-inoculation at the beginning of the aerobic phase.



شکل ۲: نمایش تغییرات چگالی نور، غلظت کارموزین و غلظت نشاسته طی فرایند بی‌هوازی-هوازی با انجام تلقیح مجدد در آغاز مرحله هوازی.

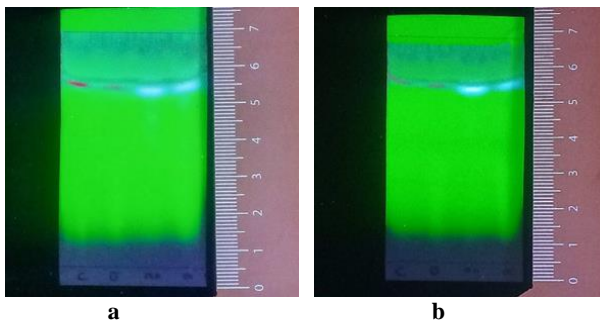
Figure 2: Showing the changes in optical density, carmosin, and starch concentrations during the anaerobic-aerobic process with re-inoculation at the beginning of the aerobic phase.

با استفاده از جذب نور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج موجود در شکل ۱ نشان می‌دهد که رشد باکتری‌های کلبسیلا کوازینومونیه GT7 در شرایط بی‌هوازی، طی ۴۸ ساعت منجر به جذب نور ۰٫۶۹۵۰ شد. در ادامه، با انجام فرایند به صورت هوازی، بعد از ۲۴ ساعت، رشد باکتری‌ها منجر به افزایش جذب نمونه‌ها به حدود ۱٫۰۱۰ گردید، و پس از آن، باکتری‌ها وارد فاز مرگ شده و رشد آنها کاهش داشت، به طوری که در روز ۲۳ از انکوباسیون، جذب نمونه‌ها به حدود ۰٫۵۴۶ رسید. همچنین، شکل ۲ نشان می‌دهد که وقتی رشد باکتری‌های کلبسیلا کوازینومونیه GT7 طی رشد بی‌هوازی منجر به جذب نور ۰٫۸۵۵ شد، با انجام تلقیح مجدد در آغاز مرحله هوازی، بعد از ۲۴ ساعت از شروع مرحله هوازی، رشد باکتری‌ها منجر به افزایش جذب نمونه‌ها به حدود ۲٫۰۵۷ گردید، و پس از آن، باکتری‌ها وارد فاز مرگ شده و رشد آن‌ها کاهش داشته است، به طوری که در روز ۲۳ از انکوباسیون، جذب نمونه‌ها به حدود ۰٫۸۵۰ رسید. به این ترتیب، در سیستم بی‌هوازی-هوازی بدون انجام تلقیح مجدد در آغاز مرحله هوازی، نسبت حداکثر رشد باکتری‌ها در مرحله هوازی به مرحله بی‌هوازی  $\frac{1.010}{0.695} = 1.45$  و همین نسبت برای سیستم بی‌هوازی-هوازی با انجام تلقیح مجدد در آغاز مرحله هوازی، معادل  $\frac{2.057}{0.855} = 2.40$  به دست آمد. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که تغییر سیستم از شرایط بی‌هوازی به شرایط هوازی، منجر به افزایش رشد باکتری‌ها شده است که این امر، مربوط می‌شود به اینکه در شرایط هوازی به دلیل حضور الکترون گیرنده اکسیژن در محیط رشد باکتری‌ها، انرژی بیشتری در واکنش‌های اکسایش-احیا مربوط به باکتری‌ها تولید می‌شود که منجر به افزایش بازده تولید زیست توده می‌گردد (۲۸). از طرفی، تلقیح مجدد باکتری‌های تازه به محیط، جمعیت سلولی اولیه را در آغاز مرحله هوازی، افزایش داده و لذا، می‌تواند منجر به افزایش جمعیت سلولی در محیط کشت و افزایش جذب نور نمونه‌ها در مقایسه با حالتی شود که تلقیح باکتری‌های جدید به محیط کشت در آغاز مرحله هوازی انجام نگرفته است.

### ۲-۳- بررسی کاهش نشاسته موجود در محیط رنگی

از آنجا که در تصفیه پساب، بطور کلی حذف کلیه ترکیباتی که سبب به وجود آمدن COD می‌شوند، مورد نظر قرار می‌گیرد، در اینجا، کاهش نشاسته در طول فرایند رنگبری در محیط رنگی  $dm^{C50}$  حاوی کارموزین با غلظت اولیه ۵۰ میلی گرم بر لیتر، نشاسته با غلظت اولیه ۱۸۷۰ میلی گرم بر لیتر، مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج موجود در شکل‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهند که در طی انجام فرایند بی‌هوازی باکتری کلبسیلا کوازینومونیه GT7 توانسته است همزمان با رشد، نشاسته را مصرف نماید و طی ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی بطور

قادر بود در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۷، طی کمتر از ۲۴ ساعت، رنگ‌زاهای آزو مختلف از نوع مونوسولفوناته، دی‌سولفوناته، تری‌سولفوناته با غلظت‌های اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را در حضور منبع کربن گلوکوز، به میزان بیش از ۹۵ درصد کاهش دهد (۳۳). دورلیکار و همکارانش نشان دادند که کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از نمونه‌های کلینیکی در محیط نوترینت برات با غلظت اولیه رنگ‌زای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، توانست طی ۱۲۰ ساعت، رنگ‌زاهای کونگو رد، متیل رد، متیل اورانژ و اریوکروم بلک T را به ترتیب میزان ۶۶،۴۵ درصد، ۸۸،۷۶ درصد، ۷ درصد و ۵۶ درصد کاهش دهد، در حالی که این مقادیر برای کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از نمونه‌های پساب رنگی صنعت نساجی، به ترتیب ۷۶،۳۸، ۸،۸۶، ۹۵،۴۵ و ۷۳،۱۸ درصد به دست آمد (۳۴). از طرفی، نتایج موجود در شکل‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد که ادامه فرایند به صورت هوازی تغییر قابل توجهی را در کاهش غلظت رنگ‌زا ایجاد نکرده است، زیرا اکسیژن به عنوان عامل محدود کننده آنزیم ردوکتاز عمل کرده و مانع از احیای مولکول‌های رنگ‌زا می‌گردد (۳۵). علاوه بر این، نتایج کروماتوگرافی لایه نازک (تصاویر شکل ۳)، نشان می‌دهد که بعد از ۴۸ ساعت، لکه رنگ حذف و بجای آن لکه درخشان ظاهر شده است. لکه‌های درخشان مربوط به آمین‌های آروماتیک سازنده رنگ‌زای آزو می‌باشند (۳۶). این امر، بیان می‌دارد که باکتری کلبسیلا توانسته است در محیط حاوی نشاسته، تحت شرایط بی‌هوازی طی فرایند انجام گرفته در این مطالعه، کارموزین را به آمین‌های آروماتیکی سازنده آن تجزیه نماید.



شکل ۳: نمایش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) نمونه‌های تهیه شده طی فرایند حذف رنگ در شرایط (الف) بدون انجام تلقیح مجدد در آغاز مرحله هوازی و (ب) با انجام تلقیح مجدد در آغاز مرحله هوازی. نقاط روی هر کاغذ از چپ به راست عبارتند از محیط  $dm^{CS0}$  قبل از تلقیح،  $dm^{CS0}$  تلقیح شده در لحظه تلقیح در آغاز مرحله بی‌هوازی، پس از ۴۸ ساعت آنکوباسیون در شرایط بی‌هوازی، پس از ۲۳ روز از آنکوباسیون در شرایط هوازی.

**Figure 3:** Thin layer chromatography (TLC) representation of dye removal samples in conditions (a) without re-inoculation at the start of the aerobic phase and (b) with re-inoculation at the start of the aerobic phase. Spot on each paper are  $dm^{CS0}$  medium before inoculation, inoculated  $dm^{CS0}$  at the time of inoculation at the beginning of the anaerobic phase, after 48 h of anaerobic incubation, and after 23 days of aerobic incubation.

که همین امر سبب عدم نشاسته در محیط بوده است. به این ترتیب، عمدتاً مصرف نشاسته در مرحله بی‌هوازی انجام گرفته است، زیرا، اصولاً در تصفیه پساب‌های دارای بار آلی بالا، باکتری‌ها در شرایط بی‌هوازی نسبت به غلظت‌های بالای مواد آلی مقاوم تر هستند (۲۸). مصرف نشاسته به عنوان بستر میکروبی، پیش‌تر از این نیز توسط محققین گزارش شده است. به عنوان مثال، می‌نو و همکارانش (۲۹) نشان داده‌اند که باکتری‌های *باسیلوس آمیلولیکویی فاشینز* و *آروموناس هیدروفیلا*، در شرایط بی‌هوازی-هوازی-انوکسیک در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۷، می‌توانند طی ۳ ساعت به ترتیب ۳۸۲ میلی‌گرم بر لیتر و ۳۷۹،۳ میلی‌گرم بر لیتر از نشاسته با غلظت اولیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را حذف نمایند. همچنین، خیراندیش و همکارانش (۳۰) گزارش نموده‌اند که باکتری *کستریدیوم/استوبوتیلیکوم* قادر است در شرایط بی‌هوازی، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۶،۸، طی ۹۴ ساعت با انجام یک واکنش تخمیری، نشاسته تصفیه شده با غلظت اولیه ۶۰ گرم بر لیتر را تقریباً بطور کامل مصرف نموده و ۵،۸۱ گرم بر لیتر بوتانل تولید کند.

### ۳-۳- حذف رنگ‌زا در محیط حاوی نشاسته

بررسی شکل‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد که باکتری کلبسیلا کوازینومونیه GT7 قادر بوده است که در طول ۴۸ ساعت آنکوباسیون بی‌هوازی، غلظت کارموزین را از غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور متوسط به حدود ۲ میلی‌گرم بر لیتر کاهش دهد، که این نتایج بیانگر حذف متوسط ۹۶  $\% = \frac{50-2}{50} \times 100$  است. درصد از کارموزین اولیه در محیط حاوی منبع کربن نشاسته است. پیش‌تر از این نیز، مصطفی و همکارانش گزارش نمودند که کلبسیلا پنومونیه GM-04، در محیط لوریا برتانی حاوی رنگ‌زای دیسپرس آبی-۲۸۴ با غلظت اولیه ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، تحت شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۷، قادر بود به میزان ۹۵ درصد از رنگ‌زای اولیه را طی ۲۴ ساعت کاهش دهد (۱۸). علاوه بر این، گزارش کویی و همکارانش، نشان دادند که سویه کلبسیلا Y3 از توانایی رنگبری خوبی در pH بازه ۴ تا ۹، دمای ۳۰ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد و شوری ۱ تا ۴ درصد برخوردار بود، به طوری که قادر بود متیل رد، کونگو رد، اورانژ I، و متیل اورانژ با غلظت‌های اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را در محیط حاوی منبع کربن مانیتول، طی ۴۸ ساعت به طور کامل از محیط حذف نماید (۳۱). وانگ و همکارانش، گزارش نمودند که کلبسیلا پنومونیه RS-13 قادر بود تحت شرایط بهینه در دمای ۲۳ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۶،۵ تا ۷، متیل رد با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را در محیط حاوی منبع کربن گلوکوز به طور کامل از محیط حذف نماید (۳۲). همچنین، دیکسیت و همکارانش، گزارش نمودند که کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از صنعت رنگ‌رزی محلی

تجزیه نماید (۳۳).

#### ۴- نتیجه‌گیری

فرایند میکروبی حذف رنگ از محیط پساب رنگی حاوی نشاسته که دارای ترکیبی مشابه با خروجی از مرحله آهارگیری است، توسط باکتری کلبسیلا کوازیپنومونیه GT7 مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این بررسی‌ها، غلظت اولیه کارموزین، در محیط‌ها معادل ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد. فرایند طی دو مرحله بی‌هوازی و هوازی انجام گرفت. نتایج آنالیزهای طیف‌سنجی و کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که حذف رنگ و تبدیل آن به آمین‌های آروماتیکی سازنده آن، تنها در مرحله بی‌هوازی صورت گرفته است، به طوری که طی ۴۸ ساعت از فرایند بی‌هوازی، به طور متوسط ۹۶ درصد از رنگ اولیه حذف شده است. در حالی که، در مرحله هوازی به دلیل حضور اکسیژن، آنزیم ردوکتاز مهار شده و کاهش کارموزین باقی‌مانده در محیط صورت نمی‌پذیرد. علاوه بر این، بررسی‌ها نشان داد که کاهش غلظت نشاسته نیز عمدتاً در شرایط بی‌هوازی صورت پذیرفته است، زیرا اصولاً در تصفیه پساب‌های دارای بار آلی بالا، باکتری‌ها در شرایط بی‌هوازی نسبت به غلظت‌های بالای مواد آلی مقاوم‌تر هستند. بنابراین، در پساب رنگی حاوی نشاسته، انجام فرایند به صورت بی‌هوازی برای کاهش رنگ و بستر بیشترین بازده را دارد و افزودن مرحله هوازی در ادامه فرایند، مزیت قابل‌توجهی را به عملکرد سیستم اضافه نمی‌نماید.

#### تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بابت فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

#### تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

پیش‌تر از این نیز، وانگ و همکارانش، با استفاده از آنالیز HPLC نشان دادند که کلبسیلا پنومونیه RS-13 قادر است در محیط حاوی منبع کربن گلوکوز، متیل رد را به آمین‌های آروماتیکی سازنده آن، یعنی ۲-آمینو بنزوئیک اسید و N'-N-دی‌متیل-پی-فنیلین دی‌آمین، تجزیه نماید (۳۲). همچنین، دیکسیت و همکارانش، با استفاده از آنالیز HPLC، نشان دادند که کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از صنعت رنگرزی محلی می‌تواند در محیط حاوی منبع کربن گلوکوز، متیل اورانژ را به آمین‌های آروماتیکی سازنده آن، یعنی ۴-آمینو بنزن سولفونیک اسید و N'-N-دی‌متیل-پی-فنیلین دی‌آمین، تجزیه نماید (۳۳).

پوراسداله و همکارانش و نیز کریم‌زاده و همکارانش با استفاده از آنالیزهای HPLC و TLC نشان دادند که کلبسیلا کوازیپنومونیه GT7 در محیط حاوی سوکروز قادر است کارموزین را به آمین‌های آروماتیکی سازنده آن، یعنی ۴-آمینو نفتالن-۱-اسید سولفونیک و ۱-آمینو-۲-هیدروکسی-۴-نفتالن اسید سولفونیک، تجزیه نماید (۲۲، ۲۳).

از طرفی، همان‌طور که نتایج کروماتوگرافی لایه نازک نشان می‌دهد بعد از ۲۱ روز انکوباسیون محیط حاوی آمین در شرایط هوازی، همچنان لکه مربوط به آمین در نمونه‌ها ظاهر شده است. بنابراین، کلبسیلا کوازیپنومونیه قادر به شکست مولکول‌های آمین‌های آروماتیکی نبوده است. همچنین، مشخص می‌شود که انجام تلقیح مجدد به محیط در آغاز مرحله هوازی نیز تاثیری بر شکست مولکول‌های آمین آروماتیکی نداشته است. در حالی که، وانگ و همکارانش گزارش کردند که کلبسیلا پنومونیه RS-13 قادر است N'-N-دی‌متیل-پی-فنیلین دی‌آمین، یکی از آمین‌های آروماتیکی حاصل از شکست متیل رد، را در شرایط هوازی، و در حضور سطوح پایین منابع کربن و نیتروژن در pH بازه ۶ تا ۸ به طور کامل تجزیه نماید (۳۲). همچنین، دیکسیت و همکارانش گزارش کرده‌اند که کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از صنعت رنگرزی محلی می‌تواند تحت شرایط هوازی تا حدودی ترکیب ۴-آمینو بنزن سولفونیک اسید، یکی از آمین‌های آروماتیکی حاصل از شکست متیل اورانژ، را

#### ۵- مراجع

- Ahmed DN, Naji LA, Faisal AAH, Al-Ansari N, Naushad Mu. Waste foundry sand/MgFe-layered double hydroxides composite material for efficient removal of Congo red dye from aqueous solution. *Sci Rep.* 2020; 10(1):2042. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58866-y>.
- Noori M, Tahmasebpour M. Simultaneous Removal of Methylene Blue and Crystal Violet Dyes from Aqueous Solutions Using Magnetic Granular Adsorbent Based on Clinoptilolite/Alginate. *J Color Sci Tech.* 2023; 17(1): 33-50. <https://dor.net/dor/20.1001.1.17358779.1402.17.1.3.2> [In Persian].
- Moradi O, Maraghe S, Arab-Salmanabadi S. Removal of Safranin Dye Using Graphene Oxide, Activated Carbon Nanocomposites, Aluminum Hydroxide and Oxide Graphene Nanoparticles, Activated Carbon and Cerium Oxide Nanoparticles. *J Color Sci Tech.* 2022; 16(1): 39-56. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.17358779.1401.16.1.4.6> [In Persian].
- Vatandoostarani S, Bagheri Lotfabad T, Heidarinassab A, Yaghmaei S. Degradation of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2017;125:62-72. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.08.009>.



5. Shi B, Li G, Wang D, Feng C, Tang H. Removal of direct dyes by coagulation: The performance of preformed polymeric aluminum species. *J Hazard Mater.* 2007;143(1-2):567-574. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.076>
6. Dos Santos AB, Cervantes FJ, Van Lier JB. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour Technol.* 2007;98(12):2369-85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.013>
7. Pourmoheb Hosseini SM, Chaibakhsh N. Effective Removal of Acid Blue 113 Dye from Industrial Effluents Using Natural Coagulant and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MnO<sub>2</sub> in Coagulation/Ozonation Combined Treatment System. *J Color Sci Tech.* 2022;16(3):211-223. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.17358779.1401.16.3.4.0> [In Persian].
8. Mishra S, Maiti A. Applicability of enzymes produced from different biotic species for biodegradation of textile dyes. *Clean Techn Environ Policy.* 2019;21(4):763-81. <https://doi.org/10.1007/s10098-019-01681-5>
9. Saberi Z, Sharifi S, Makhdoui A, Asadi E, Alizadeh K. Study of Bio-decolorization of Xanthene Dyes Using Spore Laccase Based on Laser Spectroscopy. *J Color Sci Tech.* 2021; 15(3): 205-214. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.17358779.1400.15.3.5.4> [In Persian].
10. Rai HS, Singh S, Cheema PPS, Bansal TK, Banerjee UC. Decolorization of triphenylmethane dye-bath effluent in an integrated two-stage anaerobic reactor. *J Environ Manag.* 2007;83(3):290-297. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.03.003>
11. Verma P, Baldrian P, Nerud F. Decolorization of structurally different synthetic dyes using cobalt(II) /ascorbic acid/hydrogen peroxide system. *Chemosphere.* 2003;50(8): 975-579. [https://doi.org/10.1016/s00456535\(02\)00705-1](https://doi.org/10.1016/s00456535(02)00705-1)
12. Ahmady-Asbchin S, Moradi H, Tabaraki R. Study of Microbial Decolorization of Indigo Carmine Dye by *Acinetobacter Lwoffii*. *J Color Sci Tech.* 2016; 10(1): 65-70. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.17358779.1395.10.1.7.7> [In Persian].
13. Abu Talha M, Goswami M, Giri BS, Sharma A, Rai BN, Singh RS. Bioremediation of Congo red dye in immobilized batch and continuous packed bed bioreactor by *Brevibacillus parabrevis* using coconut shell bio-char. *Bioresour Technol.* 2018;252:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.081>
14. Vikrant K, Giri BS, Raza N, Roy K, Kim KH, Rai BN, et al. Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. *Bioresour Technol.* 2018;253:355-367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.029>
15. Du LN, Li G, Zhao YH, Xu HK, Wang Y, Zhou Y, et al. Efficient metabolism of the azo dye methyl orange by *Aeromonas* sp. strain DH-6: Characteristics and partial mechanism. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2015;105:66-72. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.019>
16. Mathivanan MVP, Chinnaiiah SS, Sundaram Rs S. Dye Degradation using *Saccharomyces Cerevisiae*. *IJET.* 2018; 20;7(3.12):180. <https://doi.org/10.14419/ijet.v7i3.12.15915>
17. Thangaraj S, Bankole PO, Sadasivam SK. Microbial degradation of azo dyes by textile effluent adapted, *Enterobacter hormaechei* under microaerophilic condition. *Microbiol Res.* 2021;250:126805. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126805>
18. Mustafa G, Tariq Zahid M, Ali S, Zaghum Abbas S, Rafatullah M. Biodegradation and discoloration of disperse blue-284 textile dye by *Klebsiella pneumoniae* GM-04 bacterial isolate. *J King Saud University Sci.* 2021;33(4):101442. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101442>
19. Srivastava A, Dangi LK, Kumar S, Rani R. Microbial decolorization of Reactive Black 5 dye by *Bacillus albus* DD1 isolated from textile water effluent: kinetic, thermodynamics & decolorization mechanism. *Heliyon.* 2022;8(2):e08834. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08834>
20. Biju LM, Pooshana V, Kumar PS, Gayathri KV, Ansar S, Govindaraju S. Treatment of textile wastewater containing mixed toxic azo dye and chromium (VI) BY haloalkaliphilic bacterial consortium. *Chemosphere.* 2022;287:132280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132280>
21. Lin CY, Nguyen MLT, Lay CH. Starch-containing textile wastewater treatment for biogas and microalgae biomass production. *J Cleaner Prod.* 2017;168:331-337. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.036>
22. Poorasadollah D, Bagheri Lotfabad T, Heydarinasab A, Yaghmaei S, Mohseni FA. Biological activated carbon process for biotransformation of azo dye Carmoisine by *Klebsiella* spp. *Environ Technol.* 2022;43(18):2713-2729. <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1897167>
23. Karimzadeh M, Bagherilotfabad T, Heidarinassab A, Yaghmaei S. Biodecolourization of Azo Dye under Extreme Environmental Conditions via *Klebsiella Quasipneumoniae* GT7: Mechanism and Efficiency. *JEHSD.* 2022; 7(2):1660-75. <https://doi.org/10.18502/jehsd.v7i2.9789>
24. Willetts JRM, Ashbolt NJ, Moosbrugger RE, Aslam MR. The use of a thermophilic anaerobic system for pretreatment of textile dye wastewater. *Water Sci Technol.* 2000;42(5-6):309-316. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0529>
25. Plummer DT. An introduction to practical biochemistry. 3rd ed. London; New York: McGraw-Hill; 1987. 332 p.
26. Viles FJ, Silverman L. Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. *Anal Chem.* 1949 Aug 13;21(8):950-953. <https://doi.org/10.1021/ac60032a019>
27. Kiayi Z, Lotfabad TB, Heidarinassab A, Shahcheraghi F. Microbial degradation of azo dye carmoisine in aqueous medium using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. *J Hazard Mater.* 2019;373:608-619. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.111>

28. Tchobanoglous G, Stensel HD, Tsuchihashi R, Burton FL, Abu-Orf M, Bowden G, et al., editors. Wastewater engineering: treatment and resource recovery. Fifth edition. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2014. 1068–1070.
29. Mino T, Pedro DCS, Matsuo T. Estimation of the rate of slowly biodegradable COD (SBCOD) hydrolysis under anaerobic, anoxic and aerobic conditions by experiments using starch as model substrate. *Water Sci Technol*. 1995;31(2):95–103. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00183-N](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00183-N).
30. Kheyrandish M, Asadollahi MA, Jeyhanipour A, Karimi K, Rismani-Yazdi H. The use of non-treated starch for butanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biological J Microorganism*. 2015;4(14):1–8. <https://sid.ir/paper/237357/fa> [In Persian]
31. Cui D, Li G, Zhao M, Han S. Decolorization of azo dyes by a newly isolated *Klebsiella* sp. strain Y3, and effects of various factors on biodegradation. *Biotechnol Biotechnol Equipment*. 2014 4;28(3):478–86. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2014.926053>.
32. Wong PK, Yuen PY. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. *Water Res*. 1996;30(7):1736–44. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00067-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00067-X).
33. Dixit S, Garg S. Biodegradation of Environmentally Hazardous Azo Dyes and Aromatic Amines Using *Klebsiella pneumoniae*. *J Environ Eng*. 2018;144(6):04018035. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001353](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001353).
34. Dorlikar SR, Tumane PM, Wasnik DD, Kolte NA. Comparative study on biodegradation of azo dyes by *klebsiella pneumoniae* isolated from environmental and clinical samples. 2018;10(07):71010–5. <https://doi.org/10.24941/ijcr.31437.07.2018>.
35. Shabbir S, Faheem M, Ali N, Kerr PG, Wu Y. Evaluating role of immobilized periphyton in bioremediation of azo dye amaranth. *Bioresour Technol*. 2017;225:395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.115>.
36. Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Ecofriendly degradation of sulfonated diazo dye C.I. Reactive Green 19A using *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168. *Bioresour Technol*. 2009;100(17):3897–3905. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.051>.

**How to cite this article:**

Khakbaz I, Bagheri Lotfabad T, Heydarinasab A, Hasanvand P. The Reduction of Azo Dye Carmoisine from Synthetic Desizing Stage Effluent by *Klebsiella Quasipneumoniae* GT7. *J Color Sci Tech*. 2023;17(3):257-266. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.17358779.1402.17.3.6.9>[In Persian]