

بهینه‌سازی شرایط رنگ زدایی رنگ Reactive Red 194 از پساب سنتتیک توسط

کپک بومی "*Trametes species*"

فاطمه علی محمدی^۱، زهرا قبادی نژاد^{۲*}، سید مهدی برقی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه محیط زیست، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

۲- محقق، مرکز تحقیقات بیوشیمی و محیط زیست، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

۳- استاد گروه محیط زیست، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، ایمیل: z.ghobadi@sharif.edu

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۴

تاریخ اصلاح: ۱۴۰۲/۰۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۲

چکیده

در پژوهش حاضر، حذف رنگ Reactive Red 194 از پساب سنتتیک توسط کپک *Trametes species* به روش جذب بیولوژیکی و تخریب آنزیمی مطالعه گردید و تاثیر منبع کربن، pH و غلظت اولیه رنگ بر میزان رنگ زدایی بررسی شد. بررسی منابع کربنی مختلف نشان داد رنگ زدایی با گلوکز به دلیل فعالیت بیشتر آنزیم لاکاز، ۹۱/۲۹٪ به دست آمد که ۱/۵ برابر بالاتر از حذف رنگ با ساکاروز و ملاس است. در pH برابر ۴ به دلیل رشد بیشتر کپک، بیشترین حذف رنگ (۹۳/۵۷٪) مشاهده شد. در غلظت اولیه رنگ ۵۰ mg/L میزان رنگبری حدود ۹۴٪ بدست آمد ولی با افزایش غلظت رنگ در حدود ۱۵۰ mg/L رنگ زدایی به عدد ۲۱٪ کاهش یافت که می‌تواند به افزایش سمیت رنگ و کاهش فعالیت آنزیم لاکاز نسبت داده شود. نتایج نشان دادند در شرایط

بهینه، ۹۱/۹۵٪ حذف رنگ بدست آمد که ۶۸/۱۵٪ مربوط به تخریب آنزیمی و ۲۳/۸۰٪ مربوط به جذب است. بنابراین، رنگ‌زدایی به دلیل فعالیت شدید آنزیم لاکاز می‌باشد. همچنین پارامترهای COD و TOC به ترتیب ۸۵/۱۶٪ و ۷۴/۱۹٪ کاهش یافت که نشانگر کاهش آلاینده‌های آلی است. از این رو، کپک *Trametes sp.* به عنوان یک روش دوستدار محیط‌زیست در حذف رنگ آزو از پساب سنتتیک کارآمد و مؤثر است.

کلمات کلیدی: رنگ‌زدایی بیولوژیکی، رنگ آزو، کپک *Trametes sp.*، پساب سنتتیک، تخریب آنزیمی، جذب بیولوژیکی

پذیرفته شده / ویرایش نشده

Optimizing Conditions for the Decolorization of Reactive Red 194 in Synthetic Wastewater by Native Fungus *Trametes* species

F. Alimohammadi¹, Z. Ghobadi Nezhad^{2*}, S. M. Borghei³

¹MSc Student, Environment Group, Dept. of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

^{2*} Researcher, Biochemical and Bioenvironmental Research Center, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

³ Prof, Environment Group, Dept. of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: z.ghobadi@sharif.edu

Received: 16/10/2023

Revised: 16/12/2023

Accepted: 22/01/2024

Abstract

In this research, the removal of Reactive Red 194 dye from synthetic wastewater by *Trametes* species fungus through biological adsorption and enzymatic degradation was investigated, and the impact of carbon source, pH, and initial azo dye concentration on the amount of decolorization was examined. Examination of various carbon sources revealed that decolorization with glucose, due to its higher laccase enzyme activity, reached 91.29%, which is 1.5 times higher than color removal with sucrose and molasses. At pH 4, the maximum decolorization (93.57%) was observed due to the enhanced growth of the fungus. At an initial dye concentration of 50 mg/L, approximately 94% color removal was achieved, but at higher concentrations (150 mg/L), decolorization decreased by 21%, potentially attributed to increased dye toxicity and reduced laccase enzyme activity. Results indicated that under optimum conditions, 91/95% color removal occurred, with 68.15% attributed to enzymatic degradation and 23.80% to adsorption. Therefore, color removal is mainly due to the intense activity of the laccase enzyme. Additionally, COD and TOC parameters decreased by 16.85% and 19.74%, respectively, indicating a reduction in organic pollutants. Hence, *Trametes* sp. fungus proves to be an environmentally friendly and efficient method for the removal of azo dyes from synthetic wastewater.

Keywords: biodecolourization, Azo dye, *Trametes* sp., synthetic wastewater, enzymatic degradation, biosorption,

۱ مقدمه

رنگ‌ها به طور کلی به حدود بیست و پنج گروه تقسیم و بر اساس ساختار شیمیایی کروموفور، از یکدیگر متمایز می‌شوند. در میان گروه‌های مختلف، رنگ‌های آزو به طور گسترده برای رنگ‌رزی پارچه، چاپ کاغذ، رنگ‌رزی چرم و به عنوان افزودنی فرآورده‌های نفتی استفاده می‌شوند. رنگ‌های آزو شامل گروه‌های الکترون-جاذب^۱ هستند که منجر به خلاء الکترونی و مقاومت رنگ در برابر تجزیه می‌شود، از این رو، استفاده روزافزون از تنوع گسترده‌ی رنگ‌ها در صنایع و تخلیه مستقیم پساب‌های صنعتی حاوی رنگ به ویژه در کشورهای در حال توسعه، منجر به آلودگی شدید محیط‌زیست شده است. علاوه بر این، بعضی از رنگ‌ها به عنوان آلودگی شیمیایی پایدار شناخته شده و باعث تأثیرات زیست محیطی بلندمدت از جمله تهدیدات مستقیم یا غیرمستقیم برای سلامت جانوران زنده و بروز بیماری‌های خطرناک می‌شوند (Alam et al., 2023).

رنگ‌های رهاسازی شده در محیط‌های آبی از دو جنبه اساسی در زمره آلوده‌کننده‌های مهم محسوب می‌شوند. اول آنکه رنگ‌ها در غلظت‌های پایین قابل مشاهده هستند و جذب و بازتاب نور خورشید در آب با حضور رنگ‌ها به درستی صورت نمی‌گیرد زیرا رنگ‌ها نور را از منطقه فوتوتروفیک محیط آبی به دور می‌کنند. به عبارت دیگر باعث تغییرات در طبیعت محیط‌های آبی و کاهش فتوسنتز گیاهان آبی می‌شوند. دوما رنگ‌های آزو دارای پایه‌های آلی هستند که باعث افزایش اکسیژن خواهی شیمیایی (COD) می‌شود و به ترکیباتی تجزیه می‌شوند که برای موجودات آبی، سمی و خطرناک است (جیحونی، طلاییان، ۱۳۹۹). مقادیر بیش از حد رنگ‌ها در آب سطوح اکسیژن را کاهش داده و فعالیت زیستی جانوران آبی را مهار می‌کند. مقادیر عظیمی از رنگ‌ها در اقیانوس‌ها، رودخانه‌ها و دریاچه‌ها رهاسازی می‌شوند که بر روی رشد جلبک‌ها تأثیر منفی می‌گذارد زیرا پساب رنگی تعادل شیمیایی خاک را بهم می‌زند. علاوه بر این، ۶۰-۷۰٪ از رنگ‌ها سمی، سرطانزا و مقاوم در برابر تجزیه با استفاده از روش‌های تصفیه سنتی هستند بنابراین برای حل این مشکل، پساب حاوی رنگ باید قبل از رهاسدن به محیط‌زیست با استفاده از روش‌های کارآمد، حذف و تجزیه گردد (Lellis et al., 2019).

از روش‌های متداول برای تصفیه پساب رنگی، روش‌های فیزیکی و شیمیایی است. در حالی که کشورهای توسعه یافته به‌طور معمول از روش‌های فیزیکی-شیمیایی برای تصفیه پساب رنگی استفاده می‌کنند، این روش‌ها به ندرت در کشورهای در حال توسعه استفاده می‌شوند. روش‌های فیزیکی-شیمیایی^۲ شامل جاذب‌ها، منعقد کننده‌ها^۳ و روش‌های فیلتراسیون برای حذف رنگ از پساب است. جاذب‌ها، از جمله کربن فعال^۴، کیتوزان^۵، آلومینا^۶، ژل سیلیکا^۷، زئولیت^۸، خاک رس و خاکستر ذغال سنگ معمولاً برای حذف رنگ استفاده می‌شوند. با این حال، یک چالش قابل توجه با دفع جاذب‌های جامد پس از تصفیه بوجود

می‌آید، زیرا آن‌ها رنگ‌های سمی را در سطح خود نگه می‌دارند. به طور مشابه، استفاده از روش‌های شیمیایی مانند ازوناسیون^۹، اکسیداسیون فنتون^{۱۰}، اکسیداسیون الکتروشیمیایی^{۱۱} و اکسیداسیون تابشی^{۱۲} به علت هزینه‌های بالا مربوط به تابش، برق و ازون کاربرد محدودی در تصفیه پساب رنگی دارد (Sharma et al., 2021).

روش‌های بیولوژیکی به عنوان روش‌های کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست برای حذف نه تنها رنگ، بلکه همچنین سایر آلاینده‌های آلی مضر مورد توجه قرار گرفته است. میکروارگانیسم‌هایی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها قادر به رنگ‌زدایی هستند. این میکروارگانیسم‌های حاوی آنزیم‌های خارج سلولی هستند که تحت شرایط خاص برای رنگ‌زدایی و معدنی‌سازی رنگ‌های آزو به کار می‌رود. با آنکه ملکول‌های رنگ تنوع بسیار زیادی در ساختارشان دارند، تنها توسط تعداد محدودی آنزیم تجزیه می‌شوند (دوست محمدی، گوانجی، ۱۳۹۰). قارچ‌ها به دو روش جذب فیزیکی و تجزیه آنزیمی و یا ترکیبی از دو روش قادر به حذف رنگ می‌باشند. یک ویژگی متمایزکننده برای قارچ‌های ریشه سفید مقاومت آن‌ها به تاثیرات سمی رنگ و تجزیه رنگ‌ها به مواد غیرسمی است (Oke & Mohan, 2022). به طور تقریبی ۷۰ درصد از رنگ‌های راکتیو از نوع رنگ‌های آزو هستند و در شرایط بی‌هوازی اتصال آزو (-N=N-) موجود در ساختار این رنگ‌ها، تحت شرایط احیایی قرار گرفته و منجر به تشکیل آمین‌های آروماتیک بدون رنگ می‌شود. این ترکیبات آمینی، سوبسترای خوبی برای میکروارگانیسم‌های هوازی هستند و در طی یک مرحله هوازی مورد تصفیه قرار می‌گیرند (نایی، آیتی، ۱۳۹۰).

قارچ‌های ریشه سفید قارچ‌های چتری هستند و حاوی چندین جنس مهم مانند *Pleurotus*, *Trametes*, *Lentinus*, *Ganoderma*, *Phanerochaete* و ... هستند. این قارچ‌ها می‌توانند قسمت لیگنین گیاهان چوبی را تخریب کرده و منجر به سفید شدن چوب شوند. آن‌ها آنزیم‌هایی مانند لاکاز، لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز تولید می‌کنند که همگی در تخریب چوب و انواع مختلف رنگ‌ها مهم هستند. سویه‌های قارچی ریشه سفید به دلیل تفاوت در خصوصیات فیزیولوژیکی آن‌ها، در پتانسیل رنگ‌زدایی رنگ متفاوت هستند (Zhuo & Fan, 2021). از مهم‌ترین آنزیم‌هایی که در حذف مواد رنگزا موثرند، می‌توان به لاکازها اشاره کرد. لاکاز گروهی از آنزیم‌ها هستند که اکسیدازهای مس آبی نامیده می‌شوند. لاکاز از اکسیژن به عنوان پذیرنده الکترون استفاده کرده و کوبینون تولید می‌کند و به این دلیل جزء خانواده فنل اکسیداز می‌باشد. این آنزیم طیف وسیعی از سوبستراهای آلی شامل مونو، دی و پلی فنلها، آمین‌های آروماتیک، اسیدهای کربوکسیلیک و نیز سوبستراهای غیرفنلی و غیرآلی را اکسید می‌کند. البته تمایل آن به اکسید کردن پارادیفنول بیشتر است. این آنزیم به علت قدرت اکسیدکنندگی ترکیبات فنلی و غیرفنلی ترکیبات لیگنین می‌تواند ترکیبات مشابه که در طبیعت بسیار سخت تجزیه‌پذیر هستند را نیز تجزیه و در حذف آلاینده‌ها نقش داشته باشد. غیر فعال شدن تدریجی آنزیم‌ها باعث کاهش بازده کل فرایند رنگبری می‌شود. با طراحی محیط کشت مناسب تا حدودی این مشکل برطرف می‌شود بنابراین با بهینه‌سازی محیط کشت می‌توان تولید آنزیم را به حداکثر رساند (De Paula et al., 2022).

مکانیسم‌های جذب زیستی نقش مهمی در رنگ‌زدایی رنگ‌ها توسط قارچ‌های زنده دارند. برای سلول‌های مرده، تنها مکانیسم فعال، جذب بیولوژیکی است که شامل فعل و انفعالات فیزیکی-شیمیایی مانند جذب، رسوب و تبادل یونی است. اطلاعات محدودی در مورد فعل و انفعالات بین زیست توده قارچی مرده و انواع رنگ‌ها با ساختارهای مولکولی پیچیده در دسترس است. با تجزیه و تحلیل بیشتر مکانیسم جذب زیستی قارچ‌ها مشخص شده‌است که دیواره سلول قارچ دارای یک ساختار ماکرو مولکولی بسیار پیچیده حاوی کیتین، مانان، پروتئین، گلوکان به همراه لیپیدها، پلی ساکاریدها و رنگدانه‌ها مانند ملانین است. اجزای مختلف دیواره سلولی قارچ در حضور گروه‌های عاملی با درجات مختلف وجود دارد که جذب زیستی را تضمین می‌کند. برای سلول‌های زنده، مکانیسم اصلی برای رنگ‌زدایی تجزیه بیولوژیکی است که به دلیل تولید آنزیم‌های اصلاح کننده لیگنین، لاکاز، پراکسیداز منگنز (MnP) و لیگنین پراکسیداز (LiP) است. سهم نسبی MnP، LiP و لاکاز در رنگ‌زدایی رنگ‌ها ممکن است برای هر قارچ متفاوت باشد (Khan et al., 2023).

در بیشتر تحقیقات انجام گرفته با روش‌های بیولوژیکی با استفاده از قارچ، استفاده از قارچ زنده برای حذف رنگ انجام شده است. در سال ۲۰۲۱، دلیرا و همکاران به بررسی کارایی حذف رنگ کنگورد با استفاده از زیست‌توده قارچی تازه و خشک و کربن فعال پرداختند. نتایج آزمایش نشان داد که زیست‌توده تازه نسبت به کربن فعال، عملکرد بهتری در حذف کنگورد از محیط آبی ارائه می‌دهد. این تحقیق نشان داد که زیست‌توده قارچی تازه یا خشک می‌تواند به عنوان یک روش ساده و مقرون به صرفه برای حذف رنگ‌های صنعتی مانند کنگورد استفاده شود و این نتایج می‌تواند در بهبود فرآیندهای حذف رنگ موثر باشند (Harja et al., 2022). علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۹ به بررسی حذف رنگ Remozal Black 5 توسط قارچ *Trametes hirsute* پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد با گذشت زمان و افزایش زمان کشت، میزان حذف رنگ افزایش یافت. همچنین مشخص شد میزان حذف رنگ، توسط آنزیم‌های قارچی با افزایش غلظت رنگ کاهش می‌یابد زیرا افزایش غلظت باعث کاهش رشد میسلیوم قارچی می‌شود که نشان‌دهنده سمیت رنگ در غلظت‌های بالای این رنگ برای قارچ مورد نظر است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹). قیاسی و همکاران در سال ۱۴۰۲ در ابتدا قارچ‌های تجزیه‌کننده چوب را شناسایی و میزان حذف رنگ کوماسی بلو را بررسی کردند. نتایج نشان می‌دهد گونه شناسایی شده در این پژوهش متعلق به جنس *Trichoderma* بوده که بیشترین فعالیت آنزیمی را در بین سویه‌های تحت بررسی از خود نشان داد. این سویه هم‌چنین در طی مدت زمان ۱۴ روز محیط کشت حاوی رنگ کوماسی بلو را به طور تقریباً کامل پاکسازی کرد (قیاسی و همکاران، ۱۴۰۲).

در پژوهش اورتیز و همکاران در سال ۲۰۱۹، توانایی قارچ *Trametes villosa* در تصفیه پساب رنگرزی واقعی کارخانه چرم در مقیاس آزمایشگاهی بررسی شد. در این آزمایش سه شرایط کشت متفاوت و اکسیژن خواهی شیمیایی و بیولوژیکی و کربن آلی کل و سم‌زدایی زیستی پساب تصفیه شده و نشده مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد این تصفیه منجر به کاهش ۵۰-۷۰٪ رنگ و ۴۰-۶۰٪ در کاهش COD و TOC بدون اضافه کردن مواد مغذی می‌شود. با این حال، با افزایش مواد مغذی بیش از

۹۰٪ رنگ و ۸۰٪ کاهش COD و TOC به دست آمد. سنجش سمیت زیست محیطی با *Vibrio* و *Raphidocelis subcapitata* و *fisheri* نشان داد که تصفیه بیولوژیکی منجر به کاهش ۵۰-۷۰٪ سم‌زدایی زیستی می‌شود. این نتایج امیدوارکننده نشان می‌دهد که *Trametes villosa* برای تصفیه پساب حاصل از رنگرزی چرم مناسب است (Ortiz-Monsalve et al., 2019).

با توجه به اینکه روش‌های بیولوژیکی، روش‌هایی کم‌هزینه، با سرعت نسبتاً خوب و بدون تولید محصولات جانبی خطرناک هستند و همچنین روش‌هایی برگرفته از عملکرد طبیعی محیط‌زیست جهت تصفیه پساب‌ها و آب‌ها می‌باشند، تصمیم گرفته شد در این پژوهش عملکرد تصفیه و رنگ‌زدایی بیولوژیکی پساب سنتتیک رنگی با استفاده از قارچ ریشه سفید بررسی شود. بر اساس بررسی‌های به عمل آمده، تاکنون پژوهشی در مورد حذف رنگ راکتیو(از جمله رنگ‌های گروه آزو) توسط قارچ *Trametes sp.* انجام نشده است. لذا پژوهش حاضر، حذف رنگ، COD و TOC در پساب سنتتیک در مقیاس پایلوت آزمایشگاهی به منظور یافتن میزان کارایی قارچ *Trametes sp.* و همچنین یافتن پارامترهای بهینه راهبری انجام شد.

۲ مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد استفاده شده

مواد شیمیایی به کار رفته در این پژوهش محصول شرکت‌های Merck و Sigma می‌باشد. در جدول (۱)، فرمول شیمیایی مواد مورد نیاز در این تحقیق آمده است:

جدول ۱. فرمول شیمیایی موارد مورد نیاز در این تحقیق

نام ماده	فرمول / نماد شیمیایی
گوایاکول	$C_7H_8O_2$
دی فسفات آمونیوم	$(NH_4)_2HPO_4$
اوره	CH_4N_2O
گلوکز	$C_6H_{12}O_6$
ساکاروز	$C_{12}H_{22}O_{11}$
اسید سولفوریک	H_2SO_4
سولفات جیوه	$HgSO_4$
سولفات نقره	Ag_2SO_4
پتاسیم دی کرومات	$K_2Cr_2O_7$
سابورو دکستروز آگار	-

-	مالت اکستراکت
-	پپتون
-	ملاس
$C_{27}H_{18}ClN_7Na_4O_{16}S_5$	رنگ Reactive Red 194

۲-۲ اطلاعات دستگاهی

در این پژوهش، اندازه‌گیری اکسیژن خواهی شیمیایی (COD)^{۱۳} برای پساب اولیه و پساب‌های تصفیه شده به روش کالریمتریک و با استفاده از راکتور ۲۵ خانه ای COD برند هک (Hach، آمریکا)، براساس کتاب استاندارد انجام شد (APHA, 2005). منظور از COD به صورت عام، COD کل است. پروتکل و محلول‌های هاضم شیمیایی مورد استفاده در استاندارد COD فوق‌الذکر که با پروتکل و مواد مورد توصیه شرکت هک جهت استفاده از راکتور مذکور انطباق دارند، دارای توان اکسندگی کافی جهت برآورد COD کل هستند. اندازه‌گیری کل کربن آلی (TOC) ^{۱۴} با دستگاه SGE ANATOCTM SERIES II انجام شد. در این دستگاه از فرایند اکسیداسیون کاتالیتیک در حضور نور فرابنفش برای تبدیل کربن آلی به گاز دی‌اکسید کربن استفاده می‌شود. کاتالیست مورد استفاده در این دستگاه دی‌اکسید تیتانیوم می‌باشد. برای اندازه‌گیری pH از دستگاه مترهم (Metrohm 827 pH lab، سوئیس) با دقت ۰/۰۱ واحد pH استفاده شد. همچنین، برای وزن‌سنجی از ترازوی آنالیتیکال آزمایشگاهی ۰.۱ هزارم FA2204 (Shanghi Yoke، چین) استفاده شد.

۲-۳ کپک و رنگ مورد استفاده

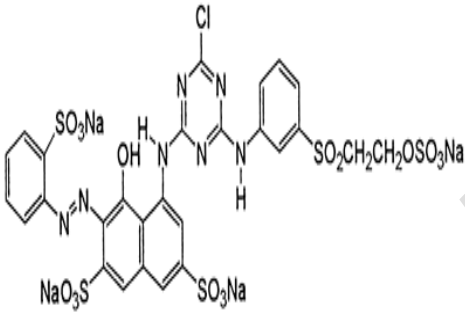
در این پژوهش از کپک *Trametes species M30336* خریداری شده از مرکز ذخایر ملی و ژنتیکی ایران استفاده شد. *Trametes* یک نوع قارچ ریشه سفید است که حدوداً ۵۰ گونه دارد و تعداد زیادی از این گونه‌ها از جمله *Trametes gibbosa*، *Trametes hirsute* و *Trametes versicolor* برای کاربرد آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین (به ویژه لاکاز و منگنز پراکسیداز) برای علوم تحلیلی، صنعتی یا زیست‌محیطی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. برای تکثیر قارچ مورد استفاده، از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار^{۱۵} استفاده شد. پس از کامل شدن دوره رشد (حدود ۱۰ روز)، قارچ‌ها به صورت هاله‌ای سفید رنگ کل سطح محیط را در بر می‌گیرد. سپس برای شروع آزمایش، ابتدا لازم است قارچ در محیط مایع به اندازه کافی رشد کند. در این پژوهش از محیط کشت مایع مالت اکستراکت برات^{۱۶} استفاده شد و ترکیبات آن در جدول ۲ ذکر شده‌است.

جدول ۲. محیط مورد استفاده به عنوان Pre-Culture

نام محیط کشت	ترکیبات	میزان مورد استفاده
MEB	پپتون و مالت اکستراکت	به ترتیب ۳ و ۱۷ گرم بر لیتر

نمونه‌ها پس از این مرحله به انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌گردند و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه حرکت می‌کنند. نمونه‌ها پس از حدود ۲۴ ساعت به رشد بهینه قابل قبول می‌رسند. بعد از این مدت میسیلیوم‌های قارچ به خوبی رشد کرده بودند و شکل کاملاً کروی (Pellet) را داشتند. از این محیط جهت تلقیح به پساب استفاده می‌شد. رنگ استفاده شده در این تحقیق از دسته رنگ‌های ری‌اکتیو است که از کارخانه نساجی در شهر یزد تهیه شده است. مشخصات و ساختار شیمیایی این رنگ‌ها در جدول ۳ ذکر شده است.

جدول ۳. مشخصات و ساختار شیمیایی رنگ استفاده شده

فام	کلاس شیمیایی	λ_{max} (نانومتر)	وزن مولکولی (دالتون)	نام علمی	ساختار شیمیایی
قرمز	ری‌اکتیو (آزو)	۵۱۳	۹۸۴/۲۱	C.I.Reactive Red 194	

بر اساس آزمایش و غلظت رنگ مورد نظر، میزان مناسب از پودر رنگ وزن و به ۱۰۰ میلی لیتر پساب سنتتیک آماده شده، اضافه می‌گردد و سپس درب ارلن‌ها با فویل و پنبه بسته شده، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، در اتوکلاو قرار می‌گیرد.

۲-۴ انتخاب منبع کربن مناسب

تحقیق حاضر از نوع تجربی بوده و تعداد نمونه‌ها بر اساس فاکتورهای موثر و بهینه‌سازی فرایند محاسبه شده است. در ابتدا ۳ آزمایش با سه منبع کربن ملاس، ساکاروز و گلوکز انجام شد. مشخصات پساب سنتتیک استفاده شده در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۵. مشخصات پساب سینتتیک

ترکیبات	میزان مورد استفاده (میلی گرم بر لیتر)
ملاس / گلوکز / ساکاروز	۱۰۰
دی فسفات آمونیوم	۶۰
اوره	۱۴
غلظت رنگ	۵۰

پس از رشد کامل قارچ در محیط مایع، تحت شرایط استریل میزان ۱۰ میلی لیتر از قارچ‌ها به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر پساب رنگی اضافه شد و در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه گذاشته شد. نمونه‌گیری از محیط به وسیله میکروپیپت انجام شد و ذرات جامد احتمالی باقی مانده به وسیله سانتریفیوژ حذف گردید و جذب آن در طول موج ماکزیمم رنگ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. تمام مراحل عملیات در شرایط کاملاً استریل انجام شد. یک نمونه‌ی بدون رنگ نیز به عنوان شاهد برای آزمایشات اسپکتروفتومتری در نظر گرفته شد. زمان ماند ۶ روز در نظر گرفته شد. بنابراین در روز صفرام و روز ۶ام، میزان جذب رنگ با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و درصد حذف رنگ گزارش گردید. تمامی آزمایش‌ها در دمای ۲۸ درجه سیلیسوس و pH برابر ۷ با سه بار تکرار انجام شد. نتایج براساس میانگین این تکرارها گزارش شد.

۲-۵ بهینه سازی غلظت رنگ و pH مناسب

به منظور ارزیابی اثر غلظت اولیه رنگ بر کارایی حذف رنگ Reactive Red 194 توسط قارچ ۵ آزمایش طراحی گردید. ابتدا مقدار ۱۰ میلی لیتر از توده زیستی قارچی در ۱۰۰ میلی لیتر از پساب رنگی با غلظت اولیه رنگ بین ۵۰-۱۵۰ mg/L (در بازه‌های ۲۵ mg/L) تلقیح شد و pH پساب (معادل ۴) تنظیم شد. همچنین برای بررسی اثر pH، ۵ آزمایش در pH ۷، ۶، ۵، ۴ و ۸ انجام شد و غلظت رنگ پساب ۵۰ mg/L در نظر گرفته شد. با استفاده از pH متر و محلول‌های سود ۰/۱ مولار و هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار pH پساب در هر آزمایش به مقدار مورد نظر تنظیم شد. محدوده‌ی ابتدایی و انتهایی متغیرها طوری در نظر گرفته شده‌است که احتمال قرار گرفتن حالت بهینه در آن‌ها با توجه به شرایط محیطی بالا باشد. بعد از گذشت ۶ روز نمونه‌گیری انجام شد و میزان تغییرات پارامتر COD, TOC و رنگ در ابتدا و انتهای آزمایش اندازه‌گیری شد.

۲-۶ اندازه‌گیری میزان جذب زیست توده قارچی و تجزیه بیولوژیکی آنزیمی

با به دست آوردن حالت بهینه، آزمایشی طراحی گردید تا در غلظت رنگ و pH بهینه، میزان جذب زیست توده قارچی و تجزیه بیولوژیکی اندازه‌گیری شود. در این آزمایش ۲ نمونه با سه بار تکرار در نظر گرفته شد. در نمونه اول، برای اندازه‌گیری جذب زیستی، فلاسک‌های حاوی پساب رنگی به علاوه قارچ در دستگاه اتوکلاو قرار گرفت تا از عدم فعالیت آنزیمی اطمینان حاصل شود. بنابراین هر آنچه که حذف شد مربوط به جذب فیزیکی است. برای محاسبه مقدار رنگ جذب شده بیولوژیکی توسط قارچ، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده می‌شود. در زمان‌های معین، مقداری محلول از فلاسک‌ها نمونه‌برداری کرده و آن را در دستگاه سانتیفریوژ قرار می‌دهیم. سپس مقدار جذب نمونه در طول موج ماکزیمم هر رنگ نسبت به پساب تلقیح شده بدون رنگ به عنوان شاهد خوانده می‌شود. میزان رنگ جذب شده از رابطه (۱) به دست می‌آید.

$$D = \left[\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right] \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

A_0 بیانگر میزان جذب در روز صفرام (غلظت اولیه) و A_t بیانگر میزان جذب رنگ در روز مورد نظر است.

به منظور محاسبه میزان تجزیه بیولوژیکی صورت گرفته توسط آنزیم‌های ترشح شده، نمونه دوم پساب رنگی و قارچ زنده در انکوباتور قرار می‌گیرد و در زمان‌های معین از فلاسک‌ها نمونه‌برداری شده و درون دستگاه سانتیفریوژ قرار داده می‌شود. سپس میزان جذب را در طول موج ماکزیمم هر رنگ نسبت به پساب بدون رنگ به عنوان شاهد خوانده می‌شود. میزان جذب در رابطه ۱ قرار می‌گیرد و میزان کلی حذف رنگ (تجزیه بیولوژیکی و جذب بیولوژیکی) بدست می‌آید. میزان جذب رنگ توسط زیست توده از مقدار کلی حذف رنگ کم شده تا میزان تجزیه بیولوژیکی آنزیمی به دست می‌آید.

۲-۷ اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم لاکاز

برای تایید حضور آنزیم لاکاز و تعیین میزان کارایی آن، فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و از طریق اندازه‌گیری میزان جذب نور در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای این منظور از محلول ۱۰ میلی مولار گویاکول به عنوان شاخص استفاده شد. برای این منظور در دو لوله آزمایش تمیز ۳ میلی‌لیتر بافر استات (۱۰ μm با ۴/۵ pH) و مقدار ۱ میلی‌لیتر از آنزیم لاکاز تولید شده اضافه شد. به یکی از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر آب و به لوله دیگر ۱ میلی‌لیتر از محلول گویاکول اضافه شد. به دلیل حساسیت شدید گویاکول به هوا و نور، این مرحله باید به سرعت انجام بگیرد. پس از مخلوط کردن مواد داخل لوله‌ها به کمک دستگاه ورتکس، لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

در لوله‌ی حاوی آب، در واقعی واکنشی صورت نمی‌گیرد و رنگ موجود، در واقع رنگ خود آنزیم می‌باشد، بنابراین این لوله به عنوان محلول شاهد (Blank) در نظر گرفته شد. در لوله‌ی دیگر، واکنشی میان آنزیم لاکاز و گویاکول صورت می‌گیرد که موجب

تولید رنگ می‌شود. پس از اتمام زمان واکنش (۱۵ دقیقه) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان جذب محلول‌های دو لوله توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم لاکاز از رابطه (۲) به دست آمد.

$$\text{Activity } \left(\frac{U}{L}\right) = \frac{(A_t - A_0) \times V_{\text{total}}(\text{ml})}{\epsilon_{\text{maks}} \times d(\text{cm}) \times V_{\text{enzyme}}(\text{ml}) \times t(\text{min})} \quad (\text{رابطه } ۲)$$

در این رابطه، $(A_t - A_0)$ تغییرات جذب نوری، V_{total} حجم کل مخلوط واکنش، V_{enzyme} حجم عصاره آنزیمی مورد استفاده، d فاصله مسیر عبور نور از محلول و ϵ_{max} با واحد $\frac{1}{\text{M cm}}$ است که در اینجا مقدار آن برابر با $\frac{1}{\text{M cm}}$ ۲۶۶۰ می‌باشد (Ghobadi Nejad et al., 2019).

۳ نتایج و بحث

۳-۱ منبع کربن مناسب

بالاترین رنگ‌زدایی و تجزیه بیولوژیکی رنگ‌های آزو معمولاً از طریق متابولیسم مشترک در حضور پشتیبانی مواد غذایی اضافی مانند گلوکز و عصاره مخمر حاصل می‌شود زیرا رنگ‌های آزو معمولاً دارای حداقل محتوای کربن هستند و تجزیه زیستی آن‌ها بدون منابع کربن یا نیتروژن دشوار است. منابع کربن به صورت غیرمستقیم، به عنوان اهداکننده الکترون برای فرآیند کاهش رنگ‌های آزو عمل می‌کنند و به جذب و رنگ‌زدایی آن‌ها کمک می‌کنند (Al-Tohamy et al., 2020). در این پژوهش اثر منابع کربن ملاس، ساکاروز و گلوکز طی ۶ روز، در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت اولیه‌ی رنگ ۵۰ ppm، بر میزان حذف رنگ توسط قارچ *Trametes sp.* بررسی شد و نتایج در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.

با توجه به نتایج، در حضور منبع گلوکز، فعالیت آنزیم لاکاز ۴۴/۱۱ U/mL به دست آمد که تقریباً ۲ برابر فعالیت آنزیم لاکاز در حضور منبع ساکاروز است (شکل ۲). هرآنچه میزان فعالیت آنزیم بیشتر، میزان تخریب بیولوژیکی بیشتر می‌شود که منجر به افزایش حذف رنگ می‌گردد (شکل ۱). بنابراین بیشترین درصد رنگ‌زدایی پساب سنتتیک حاوی رنگ Reactive Red 194، ۹۱/۲۹٪ در حضور منبع گلوکز به دست آمد که تقریباً ۱/۵ برابر حذف رنگ در حضور منبع کربن ساکاروز و ملاس است. این نتایج منطقی است زیرا متابولیسم گلوکز راحت‌تر از سایر قندها است و به راحتی به عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این، این فرضیه مطرح شد که وقتی گلوکز به عنوان منبع کربن استفاده می‌شود، میزان تشکیل نوکلئوتیدهای کاهش یافته مانند NADH و FADH افزایش می‌یابد و وجود این واسطه‌ها که در کاهش پیوند آزو نقش دارند و برای ارتقای بازده رنگ‌زدایی ضروری هستند (Maniyam et al., 2020). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که وجود گلوکز باعث مهار ژن‌های لاکاز و در نتیجه کاهش تجزیه رنگ‌های سنتتیک می‌شود (Eskandari et al., 2019). با این حال، گزارش ما با این یافته‌ها در تضاد

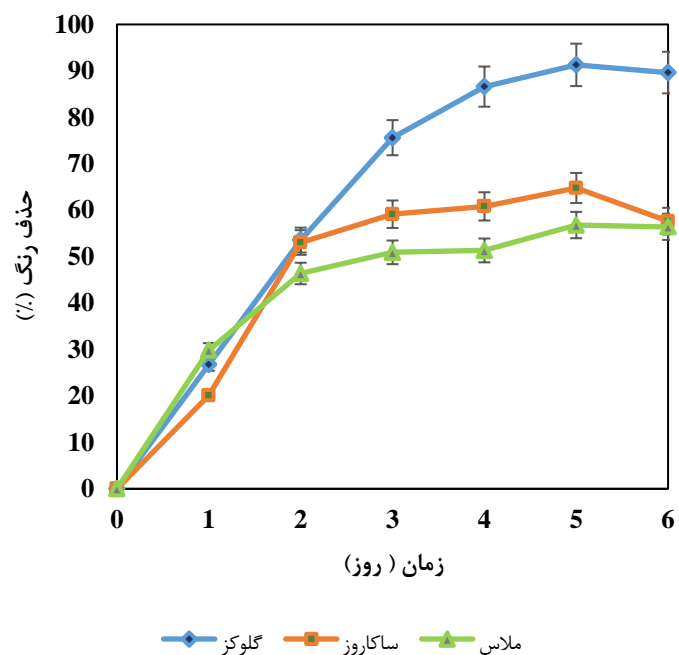
است و نشان می‌دهد که گلوکز به طور قابل توجهی فعالیت لاکاز و حذف رنگ‌های مصنوعی توسط *Trametes sp.* را افزایش می‌دهد. بر اساس پژوهش ریگاس ویالوبوس در سال ۲۰۲۰، میزان حذف رنگ در سویه‌های مختلف قارچی به دلیل تفاوت در مواد مغذی، نوع آنزیم غالب تولیدی و اختلاف در مشخصات ماده رنگی، تفاوت دارد (Riegas-Villalobos et al., 2020).

علاوه بر این مکمل گلوکز نه تنها باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌شود بلکه باعث افزایش تولید زیست‌توده قارچی می‌شود و جذب سطحی رنگ‌های آزو به دلیل دسترسی بیشتر به سایت‌های فعال افزایش می‌یابد. این نتایج با تحقیق ماده‌وری در سال ۲۰۱۴ مطابقت دارد که نشان داد حداکثر رنگ‌زدایی Trypan Blue توسط *A. flavus*، *A. niger*، *A. fumigatus* زمانی اتفاق افتاد که محیط حاوی ۲٪ گلوکز و pH=4 است (Madhuri & Lakshmi, 2014).

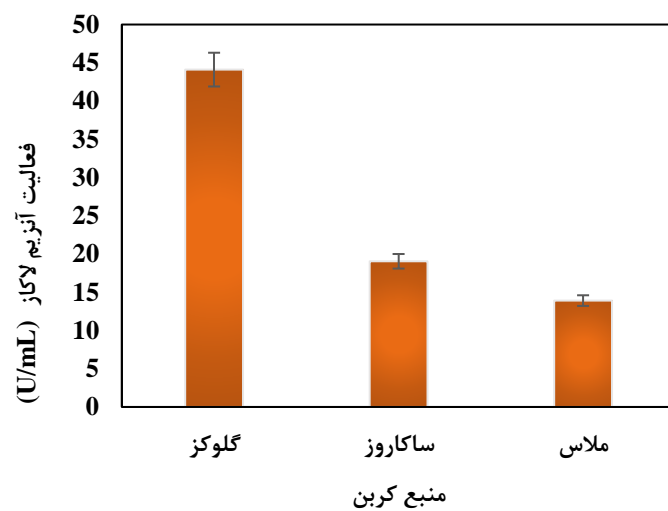
همچنین سایر محققین نتایج مشابهی به لحاظ اهمیت انتخاب منبع کربن گزارش نموده‌اند. سینگ و همکارانش در سال ۲۰۲۰ اثر نوع منبع کربن بر حذف رنگزای Direct Blue توسط قارچ *Aspergillus terreus* را مطالعه کردند و از میان چهار منبع مختلف شامل گلوکز، پپتون، عصاره گوشت و عصاره مخمر در محیط پتیتو دکسرو برات، گلوکز را بهترین منبع کربن گزارش نمودند (G. Singh & Dwivedi, 2020). آل-توهامی و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که جز ساکارز، که کمی از رنگ‌زدایی رنگ جلوگیری کرد، سایر منابع کربن اضافه شده (گلوکز، گالاکتوز، مالتوز، لاکتوز و نشاسته) می‌توانند به طور قابل توجهی رنگ‌زدایی Reactive Black 5 را توسط *S. halophilus* افزایش دهند. از این میان، گلوکز منبع کربن بهینه بود که رنگ‌زدایی کامل RB5 را پس از ۱۸ ساعت با حداکثر نرخ رنگ‌زدایی ۲/۷۸ میلی‌گرم در لیتر در ساعت نشان داد، که احتمالاً به دلیل متابولیسم آسان گلوکز است (Al-Tohamy et al., 2020).

مطابق شکل ۱، بیشترین حذف رنگ به میزان ۹۱/۲۹٪ در روز ۵ام اتفاق افتاد و پس از آن در روز ۶ام انکوباسیون، رنگ‌زدایی به تدریج کاهش یافت. نتیجه به دست آمده با نتایج سالم و همکارانش که گزارش داد حداکثر رنگ‌زدایی از رنگ Reactive yellow و Reactive Red توسط *Aspergillus niger* در ۷ روز به دست آمده و درصد رنگ‌زدایی پس از آن به تدریج کاهش یافته است، مطابقت دارد (Salem et al., 2019). همچنین در تحقیقی دیگر اورتیز و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند که بیشترین حذف رنگ با فعالیت لاکاز در ارتباط است. در رنگ‌زدایی از رنگ Acid Red 357 مشخص شد که سویه *T. villosa* در ۴۸ ساعت اول فقط ۱۵٪ از رنگ را حذف می‌کند اما پس از ۶ روز به بالای ۹۰٪ افزایش یافت. این رنگ‌زدایی شدید با افزایش فعالیت لاکاز مرتبط بود که سطوح بالاتری را بین ۷۲ تا ۹۶ ساعت نشان داد (Ortiz-Monsalve et al., 2017).

این کاهش ممکن است به دلیل خروج رنگ از سلول‌های قارچی اتفاق افتاده باشد. علاوه بر این، این پدیده را می‌توان به فعالیت تجزیه‌زیستی آنزیمی همراه با اتصال فیزیکی رنگ بر زیست‌توده قارچی نسبت داد زیرا تجمع محصولات رنگی مانع رشد و توانایی متابولیسم قارچ می‌شود.



شکل ۱- بررسی منابع کربن مختلف در رنگ‌زدایی رنگ Reactive Red 194 (پساب سینتتیک با غلظت اولیه رنگ ۵۰ ppm، غلظت منبع کربن ۱۰۰ ppm)

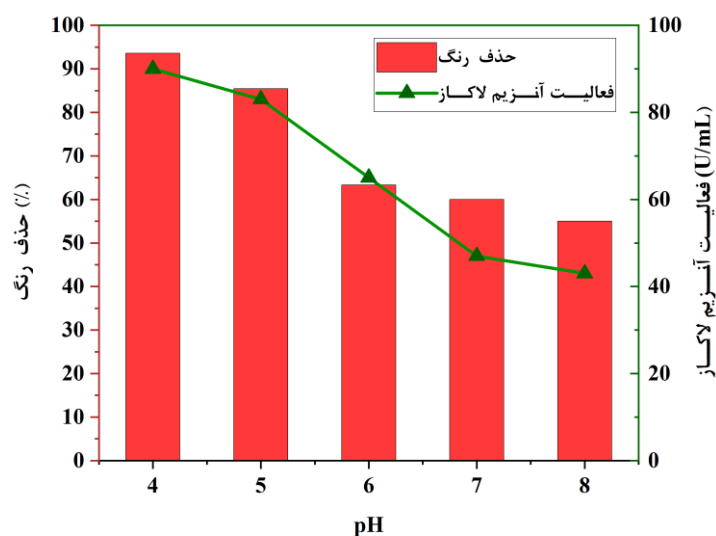


شکل ۲- فعالیت آنزیم لاکاز در رنگ‌زدایی رنگ Reactive Red 194 با منابع کربن مختلف در روز ۵ام (پساب سینتتیک با غلظت اولیه رنگ ۵۰ ppm، غلظت منبع کربن ۱۰۰ ppm)

۲-۳ بررسی اثر pH و غلظت رنگ

pH عامل مهمی برای رشد قارچ است و قارچ‌ها معمولاً در pH اسیدی رشد می‌کنند که معمولاً بین ۴ تا ۵ است. فرم یونی رنگ در محلول و بار الکتریکی سطحی زیست‌توده به pH محلول بستگی دارد. بنابراین، pH محلول بر محل‌های اتصال رنگ با سطح زیست‌توده قارچی و شیمی رنگ در محیط تأثیر می‌گذارد (Khan et al., 2023). پس از انتخاب گلوکز به عنوان بهترین منبع کربن، با ثابت نگه داشتن دیگر متغیرها، در ۵ آزمایش اثر pH در غلظت رنگ ۵۰ ppm بررسی شد و شکل ۳ نتایج حاصل از این آزمایشات را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۳، در شرایط بازی (pH=8) میزان حذف رنگ برابر ۵۵٪ است و هرچه pH اسیدی‌تر می‌شود رنگ بیشتری از محیط حذف می‌گردد. در محدود pH=4، بیشترین میزان حذف رنگ (۹۳/۵۷٪) رخ می‌دهد که به دو علت است: اول اینکه زیست‌توده قارچی در محیط اسیدی بهتر رشد می‌کند و دوماً در pH=4، آنزیم لاکاز حداکثر فعالیت ۹۰ U/mL نشان می‌دهد. بنابراین، حداکثر رنگ‌زدایی نیز در pH پایین مشاهده می‌شود. نتایج به دست آمده با مشاهدات دیگران مطابقت دارد. اریسا و بایراموگلو در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که با کاهش pH، جذب زیستی Reactive Red 120 توسط زیست‌توده قارچی *L. sajor-caju* افزایش یافت (Arıca & Bayramoğlu, 2007).

هم‌چنین بعد از اتمام آزمایش pH اندازه‌گیری گردید و حدود ۲-۱/۵ واحد برای هر آزمایش میزان pH افزایش پیدا کرده بود که ممکن است به این علت باشد که کاهش بیولوژیکی پیوند آزو می‌تواند منجر به افزایش pH شود که این افزایش به دلیل تشکیل متابولیت‌های آمین‌های آروماتیک است زیرا آمین‌های آروماتیک بازی‌تر از ترکیب اصلی آزو هستند. به طور کلی تغییر pH در محدوده ۸-۷ تأثیر بسیار کمی در روند رنگ‌زدایی دارد که نتایج آزمایش با پژوهش یاکوبا و همکاران مطابقت دارد. یاکوبا و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که رنگ‌زدایی در مقادیر pH پایین (۳-۲) و بالاتر (۶-۷) مشاهده نشد و بهترین رنگ‌زدایی رنگ Reactive Blue 19 در pH=۴/۵ به میزان ۸۶٪ رخ داد (Dauda & Erkurt, 2020). اگرچه بسیاری از نویسندگان نشان می‌دهند که قارچ‌ها در pH اسیدی یا خنثی رنگ‌آمیزی بهتری از خود نشان می‌دهند، اما این شرایط همیشه برای تصفیه پساب رنگرزی مناسب نیستند، زیرا معمولاً ویژگی‌های قلیایی دارند. اگرچه مقادیر پایین pH بهینه گزارش شده است، با توجه به ساختار رنگ، pH قلیایی نیز گزارش شده است؛ محمود و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند قارچ *Aspergillus niger* رنگ قرمز را در pH بسیار بالا (۹) به بهترین وجه رنگ‌زدایی کرد (Mahmoud et al., 2017).

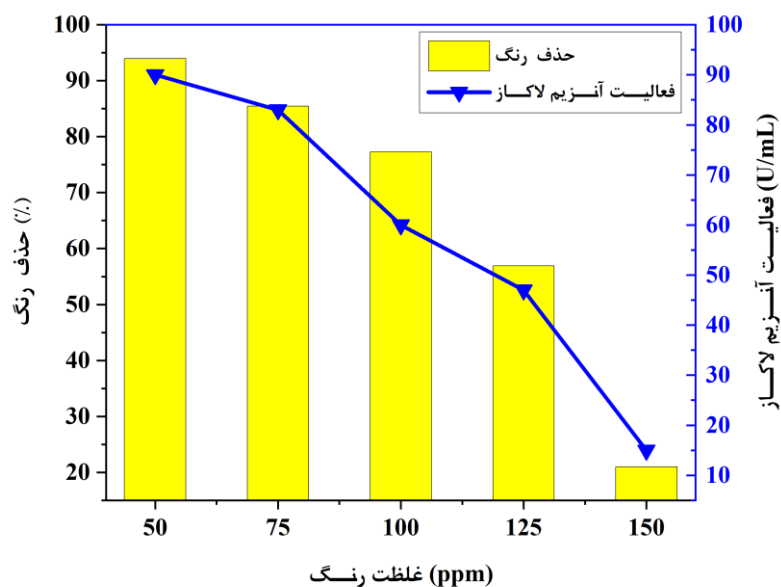


شکل ۳- تاثیر pH بر میزان فعالیت آنزیم لاکاز و رنگبری رنگ Reactive Red 194 توسط *Trametes sp.*

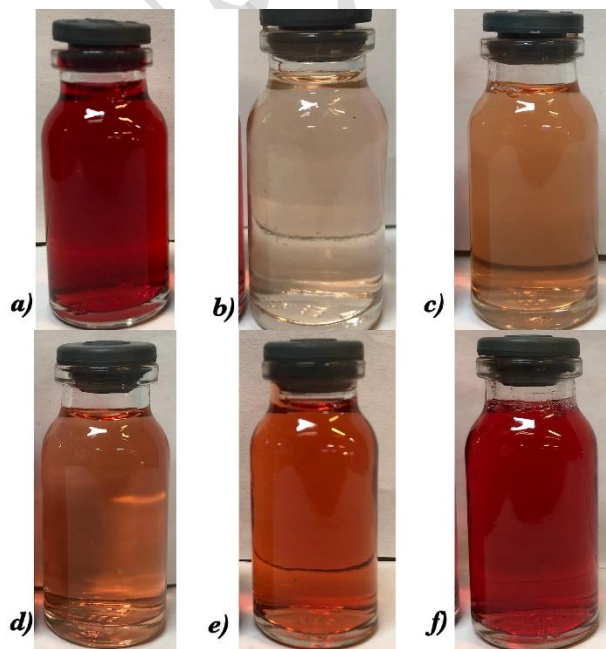
پس از به دست آوردن pH بهینه، در ۵ آزمایش اثر غلظت رنگ ۱۵۰-۵۰ ppm در پساب سنتتیک با انتخاب گلوکز به عنوان منبع کربن و pH ۴ بررسی گردید. همانطور که در شکل ۴ آورده شده است، با افزایش غلظت اولیه رنگ میزان فعالیت آنزیم لاکاز به شدت کاهش می‌یابد که منجر به تجزیه‌زیستی کم‌تر می‌شود و همانطور که در شکل ۵ مشخص است با افزایش غلظت رنگ به صورت بصری کاهش چشم‌گیری در حذف رنگ رخ نمی‌دهد. هرچه رنگ بیشتری در محیط باشد *Trametes sp.* قادر به تجزیه درصد کمتری از آن است؛ به طوری که در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر میزان رنگبری حدود ۹۴٪ ولی در غلظت حدود ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر این رنگ زدایی به عدد ۲۱٪ می‌رسد زیرا با افزایش میزان غلظت اولیه رنگ به علت سمی بودن رنگ و تاثیر گذاشتن بر روی فعالیت آنزیم، بازده حذف رنگ کاهش می‌یابد. همچنین تولید زیست‌توده با افزایش غلظت اولیه رنگ به علت سمیت کاهش می‌یابد که منجر به کاهش سایت‌های فعال جذب روی سطح جاذب می‌شود (Mahmoud et al., 2017) بنابراین اثر نامطلوب بر بازده رنگ‌زدایی ناشی از افزایش غلظت اولیه رنگ را می‌توان با این واقعیت توضیح داد که غلظت بالا رنگ آزو برای میکروارگانیسم‌ها سمی است و بر رشد میسیلیوم تأثیر می‌گذارد و فعالیت آنزیم لاکاز را مهار می‌کند. غلظت‌های بسیار متفاوت (۷۵۰-۵۰ میلی گرم بر لیتر) در مطالعات قبلی آزمایش شده است و تخریب کمتر از ۱۰٪ تا بیشتر از ۹۵٪ گزارش شده است. در غلظت‌های بالا، مهار رشد قارچ، غیرفعال شدن آنزیم و تجمع محصولات جانبی سمی باعث کاهش تخریب و حذف رنگ می‌شود (Ortiz-Monsalve et al., 2017).

بررسی توانایی قارچ‌ها در تصفیه پساب سنتتیک در غلظت‌های مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا غلظت رنگ در پساب واقعی کارخانجات نساجی و رنگرزی بسیار متغیر است و توانایی قارچ به چندین عامل مانند تکنولوژی استفاده شده، ظرفیت

کارخانه، نوع پارچه و رنگ بستگی دارد. نتایج به دست آمده با *Trametes sp.* با نتایج بدست آمده در غلظت های مشابه توسط سایر قارچ ها قابل مقایسه است. با این حال، مهم است که تاکید کنیم که کارایی رنگ آمیزی زیستی به کلاس رنگ مورد استفاده بستگی دارد (Ortiz-Monsalve et al., 2017).



شکل ۴- تاثیر غلظت اولیه رنگ بر فعالیت آنزیم لاکاز و میزان رنگ زدایی Reactive Red 194 توسط *Trametes sp.*



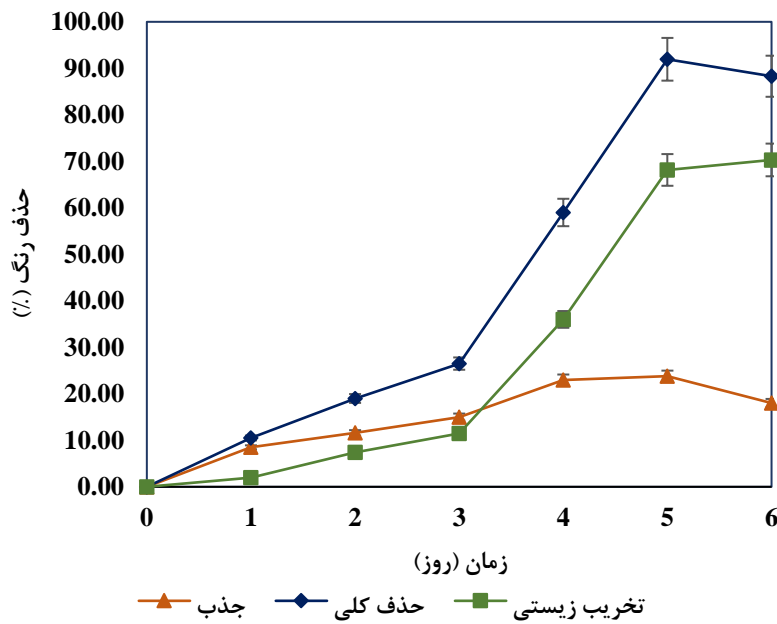
شکل ۵- مقایسه میزان رنگ زدایی Reactive Red 194 توسط *Trametes sp.* در غلظت های مختلف

(a) Control, b) 50ppm, c) 75 ppm, d) 100 ppm, e) 125 ppm, d) 150ppm)

۳-۳ بررسی مکانیزم جذب توسط زیست توده و تخریب آنزیمی

قارچ های ریشه سفید از طریق ترکیبی از مکانیسم ها از جمله جذب زیستی، تجزیه آنزیمی از طریق آنزیم های لیگنینولیتیک مانند پراکسیدازها و لاکازها و یا اثر مشترک هر دو فرآیند، در حذف رنگ از محلول های آبی شرکت می کنند. پس از به دست آوردن شرایط بهینه، میزان جذب زیست توده و تخریب بیولوژیکی آنزیمی در شرایط بهینه اندازه گیری گردید و نتایج در شکل ۶ و ۷ نشان داده شده است. در شکل 7a جذب رنگ توسط قارچ غیرفعال شده، میزان جذب بیولوژیکی را نشان می دهد و در شکل 7b جذب رنگ توسط قارچ زنده میزان جذب کلی را نشان می دهد که اختلاف این دو مقدار، میزان درصد حذف رنگ در اثر تخریب بیولوژیکی را نشان می دهد. با توجه به شکل ۷ درصد کمی از رنگ توسط جذب بیولوژیکی حذف می شود و این نشان می دهد که رنگ زدایی پساب های رنگی به دلیل فعالیت شدید آنزیم های لیگنینولیتیک بوده است. مطابق شکل ۶ میزان درصد حذف رنگ در روز ۵ام برابر ۹۱/۹۵٪ است که ۶۸/۱۵٪ مربوط به تخریب آنزیمی و ۲۳/۸۰٪ مربوط به جذب بایومس است. با افزایش زمان ماند، به علت افزایش فعالیت آنزیم نرخ رنگ زدایی در روز چهارم و پنجم افزایش یافت و از روز ۵ام به بعد واجذب اتفاق می افتد. میزان فعالیت آنزیم لاکاز در روز ۵ام به حداکثر مقدار خود برابر ۱۰۵/۰۳۶ U/mL می رسد که با توجه به شکل ۶، بیشترین میزان رنگ زدایی نیز در روز ۵ام اتفاق می افتد. لاکاز تنها آنزیمی بود که در رنگ زدایی نقش داشت زیرا هیچ آنزیم لیگنینولیتیک دیگری در محیط کشت وجود نداشت. لاکازها متالوآنزیم های حاوی یون مس هستند و با پذیرش الکترون، احیای مولکولی اکسیژن را انجام می دهند (De Paula et al., 2022). وجود لاکاز نشان داد که فرآیند رنگ زدایی نه تنها با فرآیند جذب توسط میسلیم های قارچی، بلکه با فرآیند تجزیه زیستی توسط آنزیم انجام می شود. قابل توجه است که زمان ماند مناسب برای دستیابی به حداکثر رنگ زدایی توسط آنزیم لاکاز در این پژوهش کمتر از گزارش های قبلی توسط اکثر سویه های قارچ ریشه سفید است که معمولاً برای ۹۰٪ رنگ زدایی به ۱۰-۱۲ روز زمان نیاز دارند (Saratale et al., 2020). هم چنین در شرایط بهینه درصد کاهش COD و TOC به ترتیب ۸۵/۱۶٪ و ۷۴/۱۹٪ به دست آمد که این کاهش قابل توجه نشان می دهد که آنزیم لاکاز در تجزیه رنگ ها کارآمد است.

ظرفیت جذب زیستی دیواره سلولی قارچ ارتباط نزدیکی با سطح و گروه های عملکردی روی سطح سلول دارد. کمپلکس شدن و برهمکنش های الکترواستاتیکی دو مکانیسم اصلی جذب زیستی هستند. محققان مختلف یک الگوی جذب قابل مقایسه را در رنگ زدایی رنگ های سنتتیک ارائه کرده اند (Heri et al., 2023). سینگ و پال در سال ۲۰۲۲ تاکید کردند که فرآیند جذب زیستی رنگ ها به حضور هتروپلی ساکاریدها و ترکیبات لیپیدی در دیواره سلولی بستگی دارد. این اجزاء شامل گروه های عاملی باردار متنوعی مانند هیدروکسیل، کربوکسیل و فسفات هستند که برهمکنش های قوی بین دیواره های سلولی میکروبی و رنگ های آزو را، تقویت می کنند (A. Singh et al., 2022).



شکل ۶- بررسی درصد حذف رنگ Reactive Red 194 طبق مکانیزم جذب و تخریب بیولوژیکی توسط قارچ *Trametes sp.*



شکل ۷- مقایسه جذب بیولوژیکی و حذف کل رنگ Reactive Red 194 توسط (a) قارچ غیرفعال شده (b) قارچ زنده *Trametes sp.*

۴ نتیجه گیری

امروزه افزایش تولید پساب‌های رنگی به عنوان یک مشکل زیست‌محیطی مهم مطرح است. استفاده از قارچ‌ها به عنوان جاذب رنگ‌ها مناسب و مقرون به صرفه است. به منظور به حداکثر رساندن کارایی رنگ‌زدایی توسط قارچ‌ها، به دست آوردن شرایط بهینه امری ضروری است. در شرایط بهینه گلوکز به عنوان منبع کربن، pH برابر ۴ و غلظت اولیه رنگ برابر ۵۰ mg/L به دست آمد. در مطالعه انجام‌گرفته بر اساس نتایج، نشان داده شد که گونه *Trametes sp.* در بهترین شرایط قادر به تجزیه ۹۴٪ از رنگ Reactive Red 194 است. آزمایشات انجام شده با استفاده از زیست‌توده قارچی زنده و مرده نشان از این است که هر دو

روش جذب فیزیکی و تجزیه زیستی در حذف رنگ دخالت دارند. بنابراین بر اساس این مشاهدات، یکی از مکانیسم‌های حذف رنگ از نوع جذب زیستی سطحی است و مستقل از متابولیسم قارچ است. گلوله‌های قارچ دارای قابلیت رنگ‌زدایی کارآمد با نرخ جذب حدوداً ۲۴ درصد هستند. تجزیه و تحلیل مکانیسم‌ها نشان داد که عملکرد رنگ‌آمیزی به گروه‌های فعال روی گلوله‌های قارچ و برهمکنش‌های الکترواستاتیکی، از جمله آنزیم‌های دخیل در تخریب دیواره سلولی بستگی دارد.

با مقایسه نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج مطالعات پیشین می‌توان نتیجه گرفت *Trametes sp.* به دلیل سیستم آنزیمی کارآمد، پتانسیل قابل توجهی برای رنگ‌زدایی پساب‌های رنگی دارد و می‌تواند برای حذف رنگ از صنایع، کاندید مناسبی باشد. با انجام تحقیقات بیشتر و مطالعات در سطح نیمه صنعتی، می‌توان از قارچ *Trametes sp.* برای حذف رنگ از پساب واقعی صنایع نساجی و یا رنگرزی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت بنیاد علم ایران (صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور) انجام شده است [INSF] شماره کمک مالی ۴۰۰۱۲۲۰]. نویسندگان همچنین از مرکز تحقیقات بیوشیمی و کنترل محیط زیست، دانشگاه صنعتی شریف برای کمک‌های ارزنده تشکر مینمایند.

1. Electron-accepting
2. Physical-chemical processes
3. Coagulants
4. Activated carbon
5. Chitosan
6. Alumina
7. Silica gel
8. Zeolites
9. Ozonation
10. Photooxidation
11. Electrochemical oxidation
12. Radiation oxidation
13. Chemical Oxygen Demand
14. Total Organic Carbon
15. Potato Dextrose Agar
16. Malt Extract Broth

پدیدارنده / ویرایش نشده

۶ منابع

نایی، ر.، آیتی، ب.، (۱۳۹۰)، "روش های نوین حذف رنگ از فاضلاب های صنعتی"، پنجمین همایش ملی مهندسی محیط

<https://civilica.com/doc/122605>

جیحونی، ا.، طلائیان، م.، (۱۳۹۹)، "مروری بر مطالعه حذف رنگ از پساب های صنعتی در محیط زیست"، اولین کنفرانس بین

<https://civilica.com/doc/1170310> المللی معماری، عمران، محیط زیست و کشاورزی،

دوست محمدی، م.، گوانجی، ش.، (۱۳۹۰)، "تجزیه آنزیمی رنگ های آزو"، پنجمین همایش ملی مهندسی محیط زیست، تهران،

<https://civilica.com/doc/121916>

علیشاهی، ز.، ذکایی، م.، عشقی، ح.، درودی، ا.، (۱۳۸۹)، "بررسی خاصیت رنگبری قارچ *Trametes hirsuta* بر رنگ صنعتی

Remazol Black 5"، پنجمین همایش ملی مدیریت پسماند

قیاسی، ن.، پورفخرایی، ا.، جلیلی، ح.، پارسا، م.، سعیدی، س.، (۱۴۰۲)، "شناسایی سوبه قارچ تجزیه کننده چوب مولد آنزیم های

لیگنینولایتیک و قابلیت حذف رنگ کوماسی بلو"، اولین همایش بین المللی زیست شناسی و علوم آزمایشگاهی، همدان،

<https://civilica.com/doc/1716118>

Al-Tohamy, R., Sun, J., Fareed, M. F., Kenawy, E. R., & Ali, S. S. (2020). Ecofriendly biodegradation of Reactive Black 5 by newly isolated *Sterigmatomyces halophilus* SSA1575, valued for textile azo dye wastewater processing and detoxification. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69304-4>

Alam, R., Mahmood, R. A., Islam, S., Ardiati, F. C., Solihat, N. N., Alam, M. B., Lee, S. H., Yanto, D. H. Y., & Kim, S. (2023). Understanding the biodegradation pathways of azo dyes by immobilized white-rot fungus, *Trametes hirsuta* D7, using UPLC-PDA-FTICR MS supported by in silico simulations and toxicity assessment. *Chemosphere*, 313(October 2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137505>

APHA. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. In *American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation* (21st Ed).

Arıca, M. Y., & Bayramoğlu, G. (2007). Biosorption of Reactive Red-120 dye from aqueous solution by native and modified fungus biomass preparations of *Lentinus sajor-caju*. *Journal of Hazardous Materials*, 149(2), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.021>

Dauda, M. Y., & Erkurt, E. A. (2020). Investigation of reactive Blue 19 biodegradation and

- byproducts toxicity assessment using crude laccase extract from *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 393, 121555. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121555>
- De Paula, N. M., da Silva, K., Brugnari, T., Haminiuk, C. W. I., & Maciel, G. M. (2022). Biotechnological potential of fungi from a mangrove ecosystem: Enzymes, salt tolerance and decolorization of a real textile effluent. *Microbiological Research*, 254, 126899. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126899>
- Eskandari, F., Shahnavaz, B., & Mashreghi, M. (2019). Optimization of complete RB-5 azo dye decolorization using novel cold-adapted and mesophilic bacterial consortia. *Journal of Environmental Management*, 241, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.125>
- Ghobadi Nejad, Z., Borghei, S. M., & Yaghmaei, S. (2019). Kinetic studies of Bisphenol A in aqueous solutions by enzymatic treatment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(2), 821–832. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1654-6>
- Harja, M., Buema, G., & Bucur, D. (2022). *Recent advances in removal of Congo Red dye by adsorption using an industrial waste. Sci Rep 12: 6087.* <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10093-3>
- Heri, D., Yanto, Y., Mishellia, R., Dwi, O., Dwi, B., Watanabe, T., Wibisono, Y., & Hung, Y. (2023). *Optimization of dye-contaminated wastewater treatment by fungal Mycelial-light expanded clay aggregate composite.* 231(May). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116207>
- Lellis, B., Fávaro-polonio, C. Z., Pamphile, J. A., & Polonio, J. C. (2019). *Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms.* = <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>
- Madhuri, R. J., & Lakshmi, G. V. (2014). Biodegradation of congo red azo dye by *Aspergillus* spp. isolated from dye contaminated soils. *Journal of Agricultural Science and Technology. A*, 4(5A). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.022>
- Mahmoud, M. S., Mostafa, M. K., Mohamed, S. A., Sobhy, N. A., & Nasr, M. (2017). Bioremediation of red azo dye from aqueous solutions by *Aspergillus niger* strain isolated from textile wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.12.030>
- Maniyam, M. N., Ibrahim, A. L., & Cass, A. E. G. (2020). Decolourization and biodegradation

of azo dye methyl red by Rhodococcus strain UCC 0016. *Environmental Technology*, 41(1), 71–85. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1491634>

Oke, N., & Mohan, S. (2022). Development of nanoporous textile sludge based adsorbent for the dye removal from industrial textile effluent. *Journal of Hazardous Materials*, 422, 126864. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126864>

Ortiz-Monsalve, S., Dornelles, J., Poll, E., Ramirez-Castrillón, M., Valente, P., & Gutterres, M. (2017). Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 437–451. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.04.028>

Ortiz-Monsalve, S., Valente, P., Poll, E., Jaramillo-García, V., Henriques, J. A. P., & Gutterres, M. (2019). Biodecolourization and biodetoxification of dye-containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain *Trametes villosa* SCS-10. *Biochemical Engineering Journal*, 141, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.10.002>

Riegas-Villalobos, A., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón, L., Bertrand, B., & Trejo-Hernández, M. R. (2020). Efficient removal of azo-dye Orange II by fungal biomass absorption and laccase enzymatic treatment. *3 Biotech*, 10(4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2150-5>

Salem, S. S., Mohamed, A., El-Gamal, M., Talat, M., & Fouda, A. (2019). Biological decolorization and degradation of azo dyes from textile wastewater effluent by *Aspergillus niger*. *Egyptian Journal of Chemistry*, 62(10), 1799–1813. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2019.11720.1747>

Saratale, R. G., Rajesh Banu, J., Shin, H.-S., Bharagava, R. N., & Saratale, G. D. (2020). Textile industry wastewaters as major sources of environmental contamination: bioremediation approaches for its degradation and detoxification. In *Bioremediation of industrial waste for environmental safety* (pp. 135–167). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1891-7_7

Sharma, J., Sharma, S., & Soni, V. (2021). Classification and impact of synthetic textile dyes on Aquatic Flora: A review. *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101802. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101802>

Singh, A., Pal, D. B., Mohammad, A., Alhazmi, A., Haque, S., Yoon, T., Srivastava, N., & Gupta, V. K. (2022). Biological remediation technologies for dyes and heavy metals in wastewater treatment: New insight. *Bioresource Technology*, 343(October 2021).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126154>

Singh, G., & Dwivedi, S. K. (2020). *Environmental Technology & Innovation Decolorization and degradation of Direct Blue-1 (Azo dye) by newly isolated fungus Aspergillus terreus GS28 , from sludge of carpet industry. 18.* <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100751>

Zhuo, R., & Fan, F. (2021). Science of the Total Environment A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. *Science of the Total Environment*, 778, 146132. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146132>

پدیدآورنده / ویرایش نشده