Journal of Water and Wastewater Science and Engineering (JWWSE)
Vol. 9, No. 3, PP. 29-41, Autumn 2024
DOI: 10.22112/jwwse.2024.420674.1377

نشریه علمی
علوم و مهندسی آب و فاضلاب
سال نهم، شماره ۳، صفحات ۲۹-۴۱، پاییز ۱۴۰۳

Research Paper

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

Fatemeh Alimohammadi[1], Zahra Ghobadi Nezhad[2*] and Seyyed Mehdi Borghei[3]

1- M.Sc. Student, Environment Group, Department 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- Professor, Environment Group, Department 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
© IWWA

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.

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی شرایط رنگ‌زدایی رنگ Reactive Red 194 از پساب سنتتیک توسط کپک بومی "*Trametes* species"

فاطمه علی‌محمدی[۱]، زهرا قبادی‌نژاد[۲*] و سید مهدی برقعی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه محیط‌زیست، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران.
۲- محقق، مرکز تحقیقات بیوشیمی و محیط‌زیست، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران.
۳- استاد گروه محیط‌زیست، 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
© انجمن آب و فاضلاب ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، حذف رنگ Reactive Red194 از پساب سنتتیک توسط کپک *Trametes* species به‌روش جذب بیولوژیکی و تخریب آنزیمی مطالعه و تاثیر منبع کربن، pH و غلظت اولیه رنگ بر میزان رنگ‌زدایی بررسی شد. بررسی منابع کربنی مختلف نشان‌داد رنگ‌زدایی با گلوکز به‌دلیل فعالیت بیشتر آنزیم لاکاز، ۹۱/۲۹٪ به‌دست آمد که ۱/۵ برابر بالاتر از حذف رنگ با ساکاروز و ملاس است. در pH برابر ۴ به‌دلیل رشد بیشتر کپک، بیشترین حذف رنگ (۹۳/۵۷٪) مشاهده شد. در غلظت اولیه رنگ ۵۰ mg/L میزان رنگ‌بری حدود ۹۴٪ به‌دست آمد، ولی با افزایش غلظت رنگ در حدود ۱۵۰ mg/L رنگ‌زدایی به عدد ۲۱٪ کاهش یافت که می‌تواند به افزایش سمیت رنگ و کاهش فعالیت آنزیم لاکاز نسبت داده شود. نتایج نشان‌دادند در شرایط بهینه، ۹۱/۹۵٪ حذف رنگ به‌دست آمد که ۶۸/۱۵٪ مربوط به تخریب آنزیمی و ۲۳/۸۰٪ مربوط به جذب است. بنابراین، رنگ‌زدایی به‌دلیل فعالیت شدید آنزیم لاکاز است. هم‌چنین پارامترهای COD و TOC به‌ترتیب ۸۵/۱۶٪ و ۷۴/۱۹ ٪ کاهش یافت که نشان‌گر کاهش آلاینده‌های آلی است. از این‌رو، کپک *Trametes* sp. به‌عنوان 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.

۱- مقدمه

رنگ‌زاها به‌طور کلی به حدود بیست و پنج گروه تقسیم و براساس ساختار شیمیایی کروموفور، از یکدیگر متمایز می‌شوند. در میان گروه‌های مختلف، رنگ‌های آزو به‌طور گسترده برای رنگرزی پارچه، چاپ کاغذ، رنگرزی چرم و به‌عنوان افزودنی فراورده‌های نفتی استفاده می‌شوند. رنگ‌های آزو شامل گروه‌های الکترون-جاذب[۱] هستند که منجر به خلاء الکترونی و مقاومت رنگ در برابر تجزیه می‌شود، از این‌رو، استفاده روزافزون از تنوع گسترده‌ی رنگ‌ها در صنایع و تخلیه مستقیم پساب‌های صنعتی حاوی رنگ به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه، منجر به آلودگی شدید محیط‌زیست شده است. علاوه‌بر این، بعضی از رنگ‌ها به‌عنوان آلودگی شیمیایی پایدار شناخته‌شده و باعث تأثیرات محیط‌زیستی 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 دور می‌کنند. به‌عبارت دیگر باعث تغییرات در طبیعت محیط‌های آبی و کاهش فتوسنتز گیاهان آبزی می‌شوند. دوم آن‌که رنگ‌های آزو دارای پایه های آلی هستند که باعث افزایش اکسیژن خواهی شیمیایی (COD) می‌شود و به ترکیباتی تجزیه می‌شوند که برای موجودات آبی، سمی و خطرناک است (جیحونی و طلاییان، ۱۳۹۹). مقادیر بیش از حد رنگ‌ها در آب سطوح اکسیژن را کاهش داده و فعالیت زیستی جانوران آبزی 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 به‌هم می‌زند. علاوه‌بر 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 رهاشدن به محیط‌زیست با استفاده از روش‌های کارآمد، حذف و تجزیه شود (Lellis et al., 2019).

از روش‌های متداول برای تصفیه پساب رنگی، روش‌های فیزیکی و شیمیایی است. در حالی‌که کشورهای توسعه‌یافته به‌طور معمول از روش‌های فیزیکی-شیمیایی برای تصفیه پساب رنگی استفاده می‌کنند، این روش‌ها به‌ندرت در کشورهای درحال 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 این‌حال، یک چالش قابل‌توجه با دفع جاذب‌های جامد پس از تصفیه به‌وجود می‌آید، زیرا آن‌ها رنگ‌های سمی را در سطح خود نگه می‌دارند. به‌طور مشابه، استفاده از روش‌های شیمیایی مانند ازوناسیون[۹]، اکسیداسیون فنتون[۱۰]، اکسیداسیون الکتروشیمیایی[۱۱] و اکسیداسیون تابشی[۱۲] به‌علت هزینه‌های بالا مربوط به تابش، برق و ازن کاربرد محدودی در تصفیه پساب رنگی دارد (Sharma et al., 2021).

روش‌های بیولوژیکی به‌عنوان روش‌های کم‌هزینه و سازگار با محیط‌زیست برای حذف نه تنها رنگ، بلکه هم‌چنین سایر آلاینده‌های آلی مضر موردتوجه قرارگرفته 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 به‌کار می‌رود. با آن‌که ملکول‌های رنگ تنوع بسیار زیادی در ساختارشان دارند، تنها توسط تعداد محدودی آنزیم تجزیه می‌شوند (دوست‌محمدی و گوانجی، ۱۳۹۰). قارچ‌ها به دو روش جذب فیزیکی و تجزیه آنزیمی و یا ترکیبی از دو روش قادر به حذف رنگ هستند. یک ویژگی متمایزکننده برای قارچ‌های ریسه سفید مقاومت آن‌ها به تاثیرات سمی رنگ و تجزیه رنگ‌ها به مواد غیرسمی است (Oke and Mohan, 2022). به‌طور تقریبی ۷۰ درصد از رنگ‌های راکتیو از نوع رنگ‌های آزو هستند. در شرایط بی‌هوازی اتصال آزو موجود در ساختار این رنگ‌ها (-N=N-)، تحت شرایط احیایی قرارگرفته 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 (نایبی و آیتی، ۱۳۹۰).

قارچ‌های ریسه سفید قارچ‌های چتری بوده و حاوی چندین جنس مهم مانند *Trametes*، *Pleurotus*، *Phanerochaete*، *Ganoderma*، *Lentinus* 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 ریسه سفید به‌دلیل تفاوت در خصوصیات فیزیولوژیکی آن‌ها، در پتانسیل رنگ‌زدایی رنگ متفاوت هستند (Zhuo and 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 به‌عنوان پذیرنده الکترون استفاده کرده و کوینون تولید می‌کند و به این دلیل جزء خانواده فنل اکسیداز است. این آنزیم طیف وسیعی از سوبستراهای آلی شامل مونو، دی و پلی‌فنل‌ها، آمین‌های آروماتیک، اسیدهای کربوکسیلیک و نیز سوبستراهای غیرفنلی و غیرآلی را اکسید می‌کند. البته تمایل آن به اکسیدکردن پارا دی‌فنول بیشتر است. این آنزیم به‌علت 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 فعال‌شدن 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 مهمی‌در 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 شده است که دیواره سلول قارچ دارای یک ساختار ماکرو مولکولی بسیار پیچیده حاوی کیتین، مانان، پروتئین، گلوکان به‌همراه 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 به‌دلیل تولید آنزیم‌های اصلاح کننده لیگنین، لاکاز، پراکسیداز منگنز (MnP) و لیگنین پراکسیداز (LiP) است. سهم نسبی LiP، MnP و لاکاز در رنگ‌زدایی رنگ‌ها ممکن است برای هر قارچ متفاوت باشد (Khan et al., 2023).

در بیشتر تحقیقات انجام‌گرفته با روش‌های بیولوژیکی با استفاده از قارچ، استفاده از قارچ زنده برای حذف رنگ انجام شده است. Harja et al., (2022) کارایی حذف رنگ کنگورد با استفاده از زیست‌توده قارچی تازه و خشک و کربن فعال را بررسی کردند. نتایج آزمایش نشان‌داد که زیست‌توده تازه نسبت به کربن‌فعال، عملکرد بهتری در حذف کنگورد از محیط آبی ارائه می‌دهد. این تحقیق نشان داد که زیست‌توده قارچی تازه یا خشک می‌تواند به‌عنوان یک روش ساده و مقرون به‌صرفه برای حذف رنگ‌های صنعتی مانند کنگورد استفاده شود و این نتایج می‌توانند در بهبود فرآیندهای حذف رنگ موثر باشند. علیشاهی و همکاران (۱۳۸۹) حذف رنگ Remozal Black 5 توسط قارچ *Trametes hirsute* را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان‌داد با گذشت زمان و افزایش زمان کشت، میزان حذف رنگ افزایش می‌یابد. 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. قیاسی و همکاران (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 نشان‌داد. این سویه هم‌چنین در طی مدت زمان ۱۴ روز محیط کشت حاوی رنگ کوماسی بلو را به‌طور تقریبا کامل پاکسازی کرد (قیاسی و همکاران, ۱۴۰۲).

در پژوهش Ortiz-Monsalve et al. (2019)، توانایی قارچ *Trametes villosa* در تصفیه پساب کارخانه رنگرزی چرم در مقیاس آزمایشگاهی بررسی شد. در این آزمایش سه شرایط کشت متفاوت و اکسیژن‌خواهی شیمیایی و بیولوژیکی و کربن آلی کل و سم‌زدایی زیستی پساب تصفیه شده و نشده مورد مطالعه قرارگرفت. نتایج نشان‌داد این تصفیه منجر به کاهش ۵۰-۷۰٪ رنگ می‌شود و ۴۰-۶۰٪ COD و TOC را بدون اضافه کردن مواد مغذی کاهش می‌دهد. با این‌حال، با افزایش مواد مغذی بیش از ۹۰ ٪ رنگ و ۸۰٪ کاهش COD و TOC به‌دست آمد. سنجش سمیت محیط‌زیستی با *Raphidocelis subcapitata* و *Vibrio 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.

با توجه به این‌که روش‌های بیولوژیکی، روش‌هایی کم‌هزینه، با سرعت نسبتا خوب و بدون تولید محصولات جانبی خطرناک بوده و هم‌چنین روش‌هایی برگرفته از عملکرد طبیعی محیط‌زیست برای تصفیه پساب‌ها و آب‌ها هستند، در این پژوهش عملکرد تصفیه و رنگ‌زدایی بیولوژیکی پساب سنتتیک رنگی با

استفاده از قارچ ریسه سفید بررسی می‌شود. براساس بررسی‌های به‌عمل آمده، تاکنون پژوهشی در مورد حذف رنگ راکتیو (ازجمله رنگ‌های گروه آزو) توسط قارچ *Trametes sp.* انجام نشده است. لذا در پژوهش حاضر، حذف رنگ، COD و TOC در پساب سنتتیک در مقیاس پایلوت آزمایشگاهی به‌منظور یافتن میزان کارایی قارچ *Trametes sp.* و هم‌چنین یافتن پارامترهای بهینه راهبری انجام می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد استفاده شده

مواد شیمیایی به‌کار رفته در این پژوهش محصول شرکت‌های Merck و Sigma است. 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	-
رنگ Reactive Red 194	$C_{27}H_{18}ClN_7Na_4O_{16}S_5$

۲-۲- اطلاعات دستگاهی

در این پژوهش، اندازه‌گیری اکسیژن خواهی شیمیایی (COD)[۱۳] برای پساب اولیه و پساب‌های تصفیه شده به‌روش کالریمتریک و با استفاده از راکتور ۲۵ خانه ای COD برند هک (Hach، آمریکا)، براساس کتاب استاندارد انجام شد (APHA, 2005). منظور از COD به‌صورت عام، COD کل است. پروتکل و محلول‌های هاضم شیمیایی مورد استفاده در استاندارد COD فوق‌الذکر که با پروتکل و مواد مورد توصیه شرکت هک برای استفاده از راکتور مذکور انطباق دارند، دارای توان اکسندگی کافی برای برآورد COD کل هستند. اندازه‌گیری کل کربن آلی (TOC)[۱۴] با دستگاه SGE ANATOC^TM SERIES II انجام شد. در این دستگاه از فرایند اکسیداسیون کاتالیتیک در حضور نور فرابنفش برای تبدیل کربن آلی به گاز دی اکسید کربن استفاده می‌شود. کاتالیست مورد استفاده در این دستگاه دی اکسید تیتانیوم است. برای اندازه‌گیری pH از دستگاه مترهم (Metrohm 827 pH lab، سویس) 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

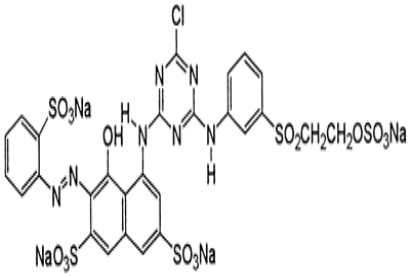
دراین پژوهش از کپک *Trametes* species M30336 خریداری‌شده از مرکز ذخایر ملی و ژنتیکی ایران استفاده شد. *Trametes* یک نوع قارچ ریسه سفید است که حدودا ۵۰ گونه دارد و تعداد زیادی از این گونه‌ها از جمله *Trametes gibbosa*، *Trametes hirsute* و *Trametes versicolor* برای کاربرد آنزیم‌های تجزیه کننده لیگنین (به ویژه لاکاز و منگنز پراکسیداز) برای علوم تحلیلی، صنعتی یا زیست‌محیطی مورد بررسی قرارگرفته‌اند. برای تکثیر قارچ مورد استفاده، از محیط کشت Potato Dextrose Agar استفاده شد. پس از کامل‌شدن دوره رشد (حدود ۱۰روز)، قارچ‌ها به‌صورت 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 Malt Extract Broth 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 اکسترکت	به‌ترتیب ۳ و ۱۷ گرم بر لیتر

نمونه‌ها پس از این مرحله به انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شوند و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه حرکت می‌کنند. نمونه‌ها پس از حدود ۲۴ ساعت به رشد بهینه قابل‌قبول می‌رسند. بعد از این مدت میسیلیوم‌های قارچ به‌خوبی رشد کرده بودند و شکل کاملا کروی (Pellet) را داشتند. از این محیط برای تلقیح به پساب استفاده می‌شد. رنگ استفاده شده در این تحقیق از دسته رنگزاهای ری‌اکتیو است که از کارخانه نساجی در شهر یزد تهیه شده است. مشخصات و ساختار شیمیایی این رنگ‌زا 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	

براساس غلظت رنگ موردنظر، میزان مناسب از پودر رنگ، وزن و به ۱۰۰ میلی لیتر پساب سنتتیک آماده شده، اضافه می‌شود و سپس درب ارلن‌ها با فویل و پنبه بسته شده، در دمای۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 شده‌است.

جدول ۴- مشخصات پساب سینتتیک

ترکیبات	میزان مورد استفاده (میلی‌گرم 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 ۱۰میلی‌لیتر از قارچها به ارلن‌های حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر پساب رنگی اضافه و در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه گذاشته شد. نمونه‌گیری از محیط به‌وسیله میکروپیپت انجام و ذرات جامد احتمالی باقی مانده به وسیله سانتریفیوژ حذف شده و جذب آن در طول موج ماکزیمم رنگ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. تمام مراحل عملیات در شرایط کاملا استریل انجام شد. یک نمونه بدون رنگ نیز به‌عنوان شاهد برای آزمایشات اسپکتروفتومتری و زمان ماند ۶ روز درنظر گرفته‌شد. بنابراین در روز صفرام و روز ۶ام، میزان جذب رنگ با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و درصد حذف رنگ گزارش شد. 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- بهینه‌سازی غلظت رنگ و pH مناسب

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

۲-۶- اندازه‌گیری میزان جذب زیست‌توده قارچی و تجزیه بیولوژیکی آنزیمی

با به‌دست آوردن حالت بهینه، آزمایشی طراحی شد تا در غلظت رنگ و pH بهینه، میزان جذب زیست‌توده قارچی و تجزیه بیولوژیکی اندازه‌گیری شود. در این آزمایش ۲ نمونه با سه بار تکرار درنظر گرفته‌شد. در نمونه اول، برای اندازه‌گیری جذب زیستی، فلاسک‌های حاوی پساب رنگی به‌علاوه قارچ در دستگاه اتوکلاو قرارگرفت تا از عدم فعالیت آنزیمی اطمینان حاصل شود. بنابراین 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 شده و در دستگاه سانتریفیوژ قرارگرفت. سپس مقدار جذب نمونه درطول موج ماکزیمم هر رنگ نسبت به پساب تلقیح شده بدون رنگ به‌عنوان شاهد خوانده می‌شود. میزان رنگ جذب شده از رابطه (۱) به‌دست می‌آید.

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

که A_0: بیانگر میزان جذب در روز صفرام (غلظت اولیه) و A_t: بیانگر میزان جذب رنگ در روز موردنظر هستند.

به‌منظور محاسبه میزان تجزیه بیولوژیکی صورت‌گرفته 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 سانتریفیوژ قرار داده می‌شود. سپس میزان جذب را در طول موج ماکزیمم هر رنگ نسبت به پساب بدون رنگ به‌عنوان شاهد خوانده می‌شود. میزان جذب در رابطه (۱) قرار می‌گیرد و میزان کلی حذف رنگ (تجزیه بیولوژیکی و جذب بیولوژیکی) به‌دست می‌آید. میزان جذب رنگ توسط زیست‌توده از مقدار کلی حذف رنگ کم شده تا میزان تجزیه بیولوژیکی آنزیمی به‌دست آید.

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 اسپکتروفوتومتر و از طریقِ اندازه‌گیریِ میزان جذب نور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. از محلول ۱۰ میلی مولار گوایاکول به‌عنوان شاخص استفاده شد. برای این منظور در دو لوله آزمایش تمیز ۳ میلی‌لیتر بافر استات (pH=۴/۵ با ۱۰ µm) و مقدار ۱ میلی‌لیتر از آنزیم لاکاز تولیدشده اضافه شد. به یکی از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر آب و به لوله دیگر ۱ میلی‌لیتر از محلول گوایاکول اضافه شد. به‌دلیل حساسیت شدید گوایاکول به هوا و نور، این مرحله باید به سرعت انجام شود. پس از مخلوط کردن مواد داخل لوله‌ها به‌کمک دستگاه ورتکس، لوله‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

در لوله حاوی آب، در واقع واکنشی صورت نمی‌گیرد و رنگ موجود، در واقع رنگ خود آنزیم است، بنابراین این لوله به‌عنوان محلول شاهد (Blank) درنظر گرفته‌شد. در لوله دیگر، واکنشی میان آنزیم لاکاز و گوایاکول 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) به‌دست آمد.

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

که $(A_t - A_0)$: 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 $\frac{1}{\mathrm{M\ cm}}$ است که در این‌جا مقدار آن برابر با $\frac{1}{\mathrm{M\ cm}}$ ۲۶۶۰ است (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 به‌صورت غیرمستقیم، به‌عنوان 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 اولیه رنگ ۵۰ ppm، بر میزان حذف رنگ توسط قارچ *Trametes* sp. بررسی شد نتایج در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

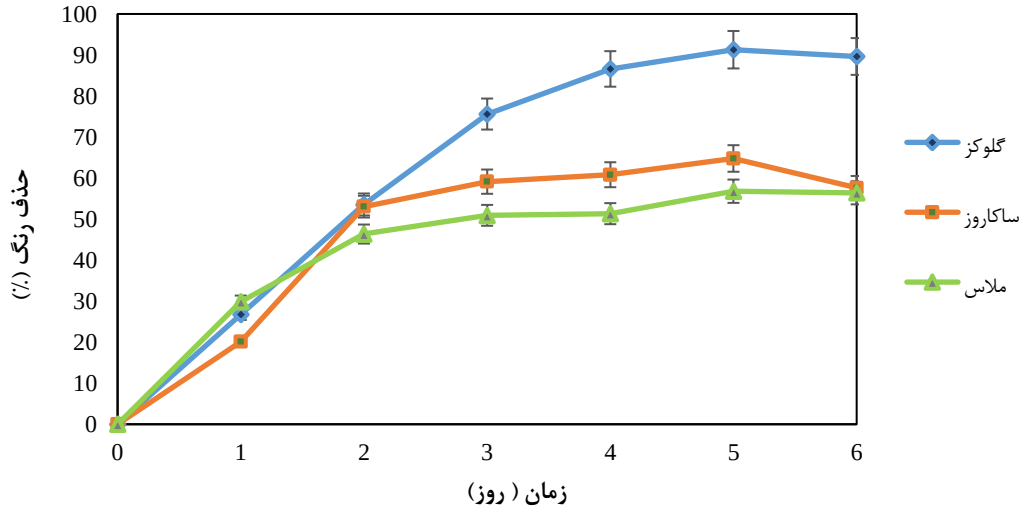
با توجه به نتایج، در حضور منبع گلوگز، فعالیت آنزیم لاکاز ۴۴/۱۱ U/mL به‌دست آمد که تقریبا ۲ برابر فعالیت آنزیم لاکاز در حضور منبع ساکاروز است (شکل ۲). هرآن‌چه میزان فعالیت آنزیم بیشتر، میزان تخریب بیولوژیکی بیشتر می‌شود که منجر به افزایش حذف رنگ می‌شود (شکل ۱). بنابراین بیشترین درصد رنگ‌زدایی پساب سنتتیک حاوی رنگ Reactive Red 194، ۹۱/۲۹ ٪ در حضور منبع گلوکز به‌دست آمد که تقریبا 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 به‌راحتی به‌عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه‌بر این، این فرضیه مطرح شد که وقتی گلوکز به‌عنوان 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 این‌حال، گزارش ما با این یافته‌ها در تضاد است و نشان می‌دهد که گلوکز به‌طور قابل‌توجهی فعالیت لاکاز و حذف رنگ‌های مصنوعی توسط *Trametes* sp. را افزایش می‌دهد. براساس پژوهش Riegas-Villalobos et al. (2020)، 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.

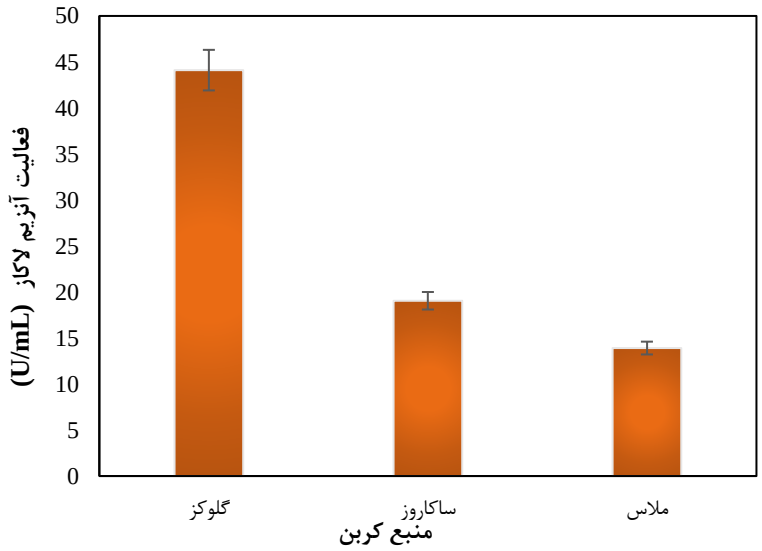
علاوه‌بر این مکمل گلوکز نه تنها باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌شود بلکه باعث افزایش تولید زیست‌توده قارچی شده و جذب سطحی رنگ‌های آزو را به‌دلیل دسترسی بیشتر به سایت‌های فعال افزایش می‌یابد. این نتایج با تحقیق Madhuri and Lakshmi (2014) مطابقت دارد که نشان‌داد حداکثر رنگ‌زدایی Trypan Blue توسط *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* زمانی اتفاق افتاد که محیط حاوی ۲٪ گلوکز و pH=4 است.

هم‌چنین سایر محققین نتایج مشابهی به لحاظ اهمیت انتخاب منبع کربن گزارش نموده‌اند. Singh and Dwivedi (2020) 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 براث، گلوکز را بهترین منبع کربن گزارش نمودند. Al-Tohamy et al. (2020) نشان دادند به‌جز ساکارز، که کمی از رنگ‌زدایی رنگ جلوگیری کرد، سایر منابع کربن اضافه شده (گلوکز، گالاکتوز، مالتوز، لاکتوز و نشاسته) می‌توانند به‌طور قابل‌توجهی 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 به‌دلیل متابولیسم آسان گلوکز است.

مطابق شکل ۱، بیشترین حذف رنگ به‌میزان ۹۱/۲۹٪ در روز ۵ام اتفاق افتاد و پس از آن در روز ۶ ام انکوباسیون، رنگ‌زدایی به‌تدریج کاهش یافت. نتیجه به‌دست‌آمده با نتایج Salem et al. (2019) 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 به‌تدریج کاهش یافته است، مطابقت دارد. هم‌چنین در تحقیقی دیگر Ortiz-Monsalve et al. (2017) 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. این کاهش ممکن است به‌دلیل خروج رنگ از سلول‌های قارچی اتفاق افتاده باشد. علاوه‌بر این، این پدیده را می‌توان به فعالیت تجزیه زیستی 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)

۳-۲- 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 به‌عنوان بهترین منبع کربن، با ثابت نگه‌داشتن 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 می‌شود. در محدوده 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 دوم، در pH=4، آنزیم لاکاز حداکثر فعالیت ۹۰ U/mL نشان می‌دهد. بنابراین، حداکثر رنگ‌زدایی نیز در pH پایین مشاهده می‌شود. نتایج به‌دست آمده با مشاهدات دیگران مطابقت دارد. Arıca and Bayramoğlu (2007) گزارش کردند که با کاهش pH، جذب زیستی Reactive Red 120 توسط زیست‌توده قارچی *L. sajor-caju* افزایش یافت.

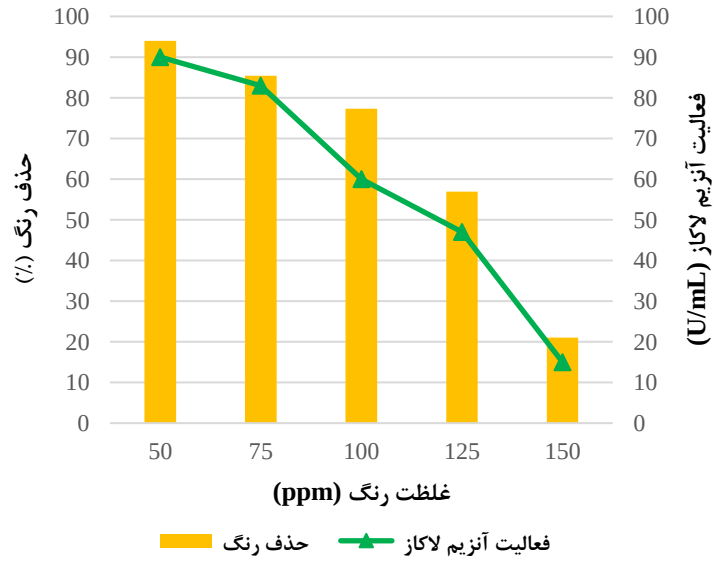
هم‌چنین بعد از اتمام آزمایش pH اندازه‌گیری شد و حدود ۱/۲–۵ واحد برای هر آزمایش میزان pH افزایش پیدا کرده بود که ممکن است به این علت باشد که کاهش بیولوژیکی پیوند آزو می‌تواند منجر به افزایش pH شود. این افزایش به‌دلیل تشکیل متابولیت‌های آمین‌های آروماتیک است، زیرا آمین‌های آروماتیک بازی‌تر از ترکیب اصلی آزو هستند. به‌طور کلی تغییر pH در محدوده ۷-۸ تأثیر بسیار کمی در روند رنگ‌زدایی دارد که نتایج آزمایش با پژوهش یاکوبا و همکاران مطابقت دارد. Dauda and Erkurt (2020) دریافتند که رنگ‌زدایی در مقادیر pH پایین (۲-۳) و بالاتر (۶-۷) مشاهده نشد و بهترین رنگ‌زدایی رنگ Reactive Blue 19 در pH=۴/۵ به میزان ۸۶٪ رخ داد. 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 ویژگی قلیایی دارند. اگرچه مقادیر پایین pH بهینه گزارش شده است، با توجه به ساختار رنگ، pH قلیایی نیز گزارش شده است. Mahmoud et al. (2017) نشان دادند قارچ *Aspergillus niger* رنگ قرمز را در pH بسیار بالا (۹) به بهترین وجه رنگ‌زدایی کرد.

پس از به‌دست آوردن pH بهینه، در ۵ آزمایش اثر غلظت رنگ ۵۰-۱۵۰ ppm در پساب سنتتیک با انتخاب گلوکز به‌عنوان منبع کربن و pH ۴ بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۴ آورده شده است، با افزایش غلظت اولیه رنگ میزان فعالیت آنزیم لاکاز به‌شدت کاهش می‌یابد که منجر به تجزیه‌زیستی کم‌تر می‌شود. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است با افزایش غلظت رنگ به‌صورت بصری کاهش چشم‌گیری در حذف رنگ رخ نمی‌دهد. هرچه رنگ بیشتری در محیط باشد *Trametes* sp. قادر به تجزیه درصد کمتری از آن است؛ به‌طوری‌که در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر میزان رنگ‌بری حدود ۹۴٪ ولی در غلظت حدود ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر این رنگ‌زدایی به عدد ۲۱٪ می‌رسد. زیرا با افزایش میزان غلظت اولیه رنگ به‌علت سمی‌بودن رنگ و تاثیر

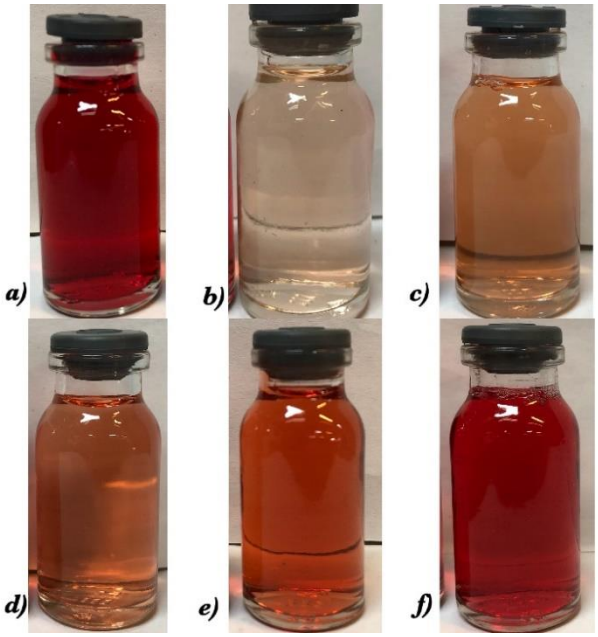
گذاشتن بر روی فعالیت آنزیم، بازده حذف رنگ کاهش می‌یابد. هم‌چنین تولید زیست‌توده با افزایش غلظت اولیه رنگ به‌علت سمیت کاهش می‌یابد که منجر به کاهش سایت‌های فعال جذب روی سطح جاذب می‌شود (Mahmoud et al., 2017) بنابراین اثر نامطلوب بر بازده رنگ‌زدایی ناشی از افزایش غلظت اولیه رنگ را می‌توان با این واقعیت توضیح داد که غلظت بالای رنگ آزو برای میکروارگانیسم‌ها سمی است و بر رشد میسیلیوم تأثیر می‌گذارد و فعالیت آنزیم لاکاز را مهار می‌کند. غلظت‌های بسیار متفاوت (۵۰-۷۵۰ میلی‌گرم 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 استفاده‌شده، ظرفیت کارخانه، نوع پارچه و رنگ بستگی دارد. نتایج به‌دست آمده با *Trametes* sp. با نتایج به‌دست آمده در غلظت های مشابه توسط سایر قارچ ها قابل مقایسه است. با این‌حال، مهم است که تاکید کنیم که کارایی رنگ‌آمیزی زیستی به کلاس رنگ مورد استفاده بستگی دارد (Ortiz-Monsalve et al., 2017).

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



شکل ۴- تاثیر غلظت اولیه رنگ برفعالیت آنزیم لاکاز و میزان رنگ‌زدایی Reactive Red 194 توسط *Trametes* sp.

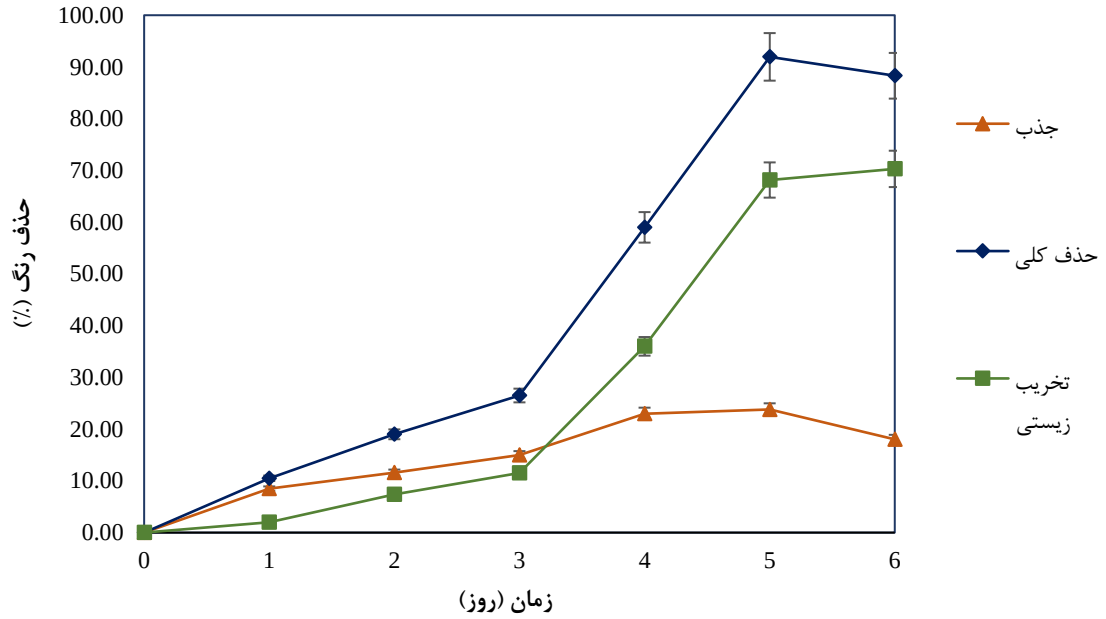


شکل ۵- مقایسه میزان رنگ‌زدایی Reactive Red 194 توسط *Trametes* sp. در غلظت‌های مختلف
a) Control; b) 50 ppm; c) 75 ppm; d) 100 ppm; e) 125 ppm; d) 150ppm)

۳-۳- بررسی مکانیزم جذب توسط زیست‌توده و تخریب آنزیمی

قارچ های ریسه سفید از طریق ترکیبی از مکانیسم‌ها از جمله جذب زیستی، تجزیه آنزیمی از طریق آنزیم‌های لیگنینولیتیک مانند پراکسیدازها و لاکازها و یا اثر مشترک هر دو فرآیند، در حذف رنگ از محلول‌های آبی شرکت می‌کنند. پس از به‌دست آوردن شرایط بهینه، میزان جذب زیست‌توده و تخریب بیولوژیکی آنزیمی در شرایط بهینه اندازه‌گیری شد و نتایج در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. در شکل ۷a جذب رنگ توسط قارچ غیرفعال شده، میزان جذب بیولوژیکی را نشان می‌دهد و در شکل ۷b جذب رنگ توسط قارچ زنده میزان جذب کلی را نشان می‌دهد. اختلاف این دو مقدار، درصد حذف رنگ در اثر تخریب بیولوژیکی را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۷، درصد کمی از رنگ توسط جذب بیولوژیکی حذف می‌شود و این نشان می‌دهد که رنگ‌زدایی پساب‌های رنگی به‌دلیل فعالیت شدید آنزیم‌های لیگنینولیتیک بوده است. مطابق شکل ۶، 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 زمان‌ماند، به‌علت افزایش فعالیت آنزیم نرخ رنگ‌زدایی در روزهای چهارم و پنجم افزایش یافت و از روز ۵ام به بعد واجذب اتفاق می‌افتد. میزان فعالیت آنزیم لاکاز در روز ۵ام به حداکثر مقدار خود برابر ۱۰۵/۰۳۶ U/mL می‌رسد. با توجه به شکل ۶، بیشترین میزان رنگ‌زدایی نیز در روز ۵ام اتفاق می‌افتد. لاکاز تنها آنزیمی بود که در رنگ‌زدایی 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 می‌دهند (De Paula et al., 2022). وجود لاکاز نشان‌داد که فرآیند رنگ‌زدایی نه تنها با فرآیند جذب توسط میسلیوم‌های قارچی، بلکه با فرآیند تجزیه زیستی توسط آنزیم انجام می‌شود. قابل‌توجه است که زمان ماند مناسب برای دستیابی به حداکثر رنگ‌زدایی توسط آنزیم لاکاز در این پژوهش کمتر از گزارش‌های قبلی توسط اکثر سویه‌های قارچ ریسه سفید است که معمولاً برای ۹۰ ٪ رنگ‌زدایی به ۱۰-۱۲ روز زمان نیاز دارند (Saratale et al., 2020). هم‌چنین در شرایط بهینه درصد کاهش COD و TOC به‌ترتیب ۸۵/۱۶ ٪ و ۷۴/۱۹ ٪ به‌دست آمد که این کاهش قابل‌توجه نشان می‌دهد که آنزیم لاکاز در تجزیه رنگ‌ها 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 قابل‌مقایسه را در رنگ‌زدایی رنگ‌های سنتتیک ارائه کرده‌اند (Heri et al., 2023). Singh et al. (2022) تاکید کردند که فرآیند جذب زیستی رنگ‌ها به‌حضور هتروپلی ساکاریدها و ترکیبات لیپیدی در دیواره سلولی بستگی دارد. این اجزا شامل گروه‌های عاملی باردار متنوعی مانند هیدروکسیل، کربوکسیل و فسفات هستند که برهمکنش‌های قوی بین دیواره‌های سلولی میکروبی و رنگ‌های آزو را، تقویت می‌کنند.



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؛ و b) قارچ زنده *Trametes* sp.

۴- نتیجه‌گیری

امروزه افزایش تولید پساب‌های رنگی به‌عنوان یک مشکل محیط‌زیستی مهم مطرح است. استفاده از قارچ‌ها به‌عنوان جاذب رنگ‌ها مناسب و مقرون به‌صرفه است. به‌منظور به حداکثر رساندن کارایی رنگ‌زدایی توسط قارچ‌ها، به‌دست آوردن شرایط بهینه امری ضروری است. در شرایط بهینه گلوکز به‌عنوان منبع کربن، pH برابر ۴ و غلظت اولیه رنگ برابر ۵۰ mg/L به‌دست آمد. در مطالعه انجام‌گرفته براساس نتایج، نشان داده‌شد 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 داد که هر دو روش جذب فیزیکی و تجزیه زیستی در حذف رنگ دخالت دارند. بنابراین براساس 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 حدودا ۲۴٪ هستند. تجزیه و تحلیل مکانیسم‌ها نشان‌داد 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 نتیجه‌گرفت *Trametes* sp. به‌دلیل سیستم آنزیمی کارآمد، پتانسیل قابل‌توجهی 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.

۵- تشکر و قدردانی

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

۶- پی‌نوشت‌ها

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

۷- مراجع

نایبی، ر.، و آیتی، ب.، (۱۳۹۰) ،"روش‌های نوین حذف رنگ از فاضلاب های صنعتی"، *پنجمین همایش ملی مهندسی محیط‌زیست*، تهران، https://civilica.com/doc/122605

جیحونی، ا.، و طلاییان، م.، (۱۳۹۹)، "مروری بر مطالعه حذف رنگ از پساب‌های صنعتی در محیط‌زیست"، *اولین کنفرانس بین‌المللی معماری، عمران، محیط‌زیست و کشاورزی*، https://civilica.com/doc/1170310

دوست‌محمدی، م.، و گوانجی، ش.، (۱۳۹۰)، "تجزیه آنزیمی رنگ‌های آزو"، *پنجمین همایش ملی مهندسی محیط‌زیست*، تهران، https://civilica.com/doc/121916

علیشاهی، ز.، ذکایی، م.، عشقی، ح.، و درودی، ا.، (۱۳۸۹)، "بررسی خاصیت رنگ‌بری قارچ *Trametes hirsuta* بر رنگ صنعتی Remazol Black 5"، *پنجمین همایش ملی مدیریت پسماند*، مشهد.

قیاسی، ن.، پورفخرایی، ا.، جلیلی، ح.، پارسا، م.، و سعیدی، س.، (۱۴۰۲)، "شناسایی سویه قارچ تجزیه‌کننده چوب مولد آنزیم‌های لیگنینولایتیک و قابلیت حذف رنگ کوماسی بلو"، *اولین همایش بین المللی زیست‌شناسی و علوم آزمایشگاهی*، همدان، https://civilica.com/doc/1716118

Al-Tohamy, R., Sun, J., Fareed, M.F., Kenawy, E.R., and 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., and 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, 137505, 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 Edition, Washington, D.C.

Arıca, M.Y., and 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., and 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, CW. I., and 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., and 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., and 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., and Bucur, D., (2022), "Recent advances in removal of Congo Red dye by adsorption

R.N., and 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 sSafety*, (pp. 135–167), Springer, https://doi.org/10.1007/978-981-13-1891-7_7.

Sharma, J., Sharma, S., and 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., and Gupta, V.K., (2022), "Biological remediation technologies for dyes and heavy metals in wastewater treatment: New insight", *Bioresource Technology*, 343(October 2021), 126154, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126154.

Singh, G., and Dwivedi, S.K., (2020), "*Environmental technology and innovation decolorization and degradation of Direct Blue-1 (Azo dye) by newly isolated fungus Aspergillus terreus GS28, from sludge of carpet industry*", *Environmental Technology & Tnnovation*, 18, 100751, https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100751.

Zhuo, R., and 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.

This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license.

using an industrial waste", *Scientific Reports*, 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., and Hung, Y., (2023), "Optimization of dye-contaminated wastewater treatment by fungal mycelial-light expanded clay aggregate composite", *Environmental Research*, 231, 231(May), 116207. https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116207.

Lellis, B., Fávaro-polonio, C.Z., Pamphile, J.A., and Polonio, J.C., (2019), "Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms", *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2), 275-290, https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001.

Madhuri, R.J., and 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).

Mahmoud, MS., Mostafa, M. K., Mohamed, S.A., Sobhy, N.A., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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.or/10.21608/ejchem.2019.11720.1747.

Saratale, R.G., Rajesh Banu, J., Shin, H.-S., Bharagava,