Evaluation of biodecolorization of the textile azo dye by halophilic archaea

Masoomeh Selseleh Hassan-Kiadehi
MSc of Microbiology, University of Tehran, Tehran, Iran, m.selseleh@ut.ac.ir
Mohammad Ali Amoozegar *
Professor of Microbiology, University of Tehran, Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
Sedigheh Asad
Assistant professor of Biotechnology, University of Tehran, Tehran, Iran, Asad@ut.ac.ir

Abstract

Introduction: Azo dyes are the biggest group of colors. One of the special characteristic of this group of dye is the presence of double bonds of Nitrogen (N=N). Several studies reported biodecolorization using microorganisms, so far. However, it is for the first time to our knowledge that decolorization by halophilic archaea have been reported.

Materials and methods: Among the 15 strains of archaea isolated from Qeshm saline cave and 7 type strains from Iranian biological resource center, 2 strains showed high ability in decolorization of azo dye. Effects of different factors including pH (5-9), temperature (30-50 °C), various salt concentrations (12.5-30%), different concentrations of dye (400-5000 mg/L), different carbon sources and several nitrogen sources and agitation have been measured after 4 days of incubation in static condition. Moreover, the toxicity tolerance of halo archaeal strains to dye, growth and decolorization rates were studied. Statistical significance was assessed by ANOVA Tukey's multiple comparison test.

Results: Strain A with 99.1 % similarity to *Halogeometricum borinquense* and strain B with 99.4 % similarity to *Haloferax mediterranei* were the best decolorizing strains. Both strains had their highest decolorization rate in the presence of NaCl (15-17.5 %), pH 7, microaerophilic condition and yeast extract as nitrogen source. *Halogeometricum borinquense* showed higher decolorization rate in the presence of saccharose and glucose as carbon sources at 45 ^{o}C temperature and for *Haloferax mediterranei* temperature of 40 ^{o}C and propionic acid as carbon source were best decolorizing conditions. These strains were able to decolorize dyes at 1000 mg/L concentration and tolerate dye concentrations to the highest level of 5000 mg/L.

Discussion and conclusion: In conclusion, our results indicate that halophilic archaea have very high potential to decolorize azo dyes. Regarding high amounts of salts in textile wastewaters, using such microorganisms which can tolerate the harsh environment in order to decolorize azo dyes, could be a new approach in this field.

Key words: Azo dyes, halophilic archaea, decolorization, *Haloferax mediterranei ,Halogeometricum borinquense*

* Corresponding author
Received: January 20, 2016 / **Accepted:** November 5, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۱۷- ۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵

ارزیابی رنگ‌زدایی زیستی ترکیبات رنگی آزو توسط آرکی‌های نمک‌دوست

معصومه سلسله حسن کیادهی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، m.selseleh@ut.ac.ir
محمد علی آموزگار *: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
صدیقه اسد: استادیار بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، asad@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: رنگ‌های آزو بزرگ‌ترین گروه رنگی را تشکیل می‌دهند که وجود پیوندهای N = N متصل به گروه‌های آروماتیک، از ویژگی‌های بارز این رنگ‌ها است. تاکنون مطالعات زیادی در رنگبری زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته است؛ اما مطالعهٔ رنگبری توسط آرکی‌های نمک‌دوست برای اولین بار گزارش شده است.

مواد و روش‌ها: از میان ۱۵ سویهٔ جداشده از غارنمکی قشم ایران و۷ سویهٔ تایپ نگهداری‌شده در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، ۲ سویه توانایی بالایی در رنگبری از رنگ‌های آزو را از خود نشان دادند. اثر فاکتورهای مختلف شامل pH (۹-۵ (، دمای (۵۰-۳۰)، غلظت نمک (۳۰-۱۲/۵درصد)، غلظت‌های مختلف رنگ (۵۰۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، منابع کربن و نیتروژن و هوادهی مختلف در این دو سویهٔ منتخب پس از چهار روز گرماگذاری در شرایط ایستا بررسی شد. همچنین اثر سمیت رنگ بر آرکی‌ها انجام شد. هم‌زمان با میزان رنگبری، رشد نیز سنجیده شد. از آزمون آماری آنوا به‌منظور مشخص‌کردن اختلاف معنادار استفاده شد.

نتایج: سویهٔ A با درصد شباهت ۹۹/۱ به *Halogeometricum borinquense* و سویهٔ B با درصد شباهت ۹۹/۴ به *Haloferax mediterranei* بهترین سویه‌های رنگبر بودند. هر دوی سویه‌ها در NaCl بین ۱۵ تا ۱۷/۵درصد، pH۷، شرایط ایستا و بهترین رنگبری را در حضور عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن داشتند. اگرچه بررسی‌ها در دمای ۴۵ درجه و منبع کربن ساکارز و گلوکز برای *Halogeometricum borinquense* بیشترین رنگبری را نشان می‌داد؛ *Haloferax mediterranei* بهترین رنگبری را در دمای ۴۰ درجه و منبع کربن‌پروپیونیک‌اسید داشت. هر دو سویه در غلظت‌های حدود ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر قابلیت رنگبری داشتند و تا غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رنگ را تحمل می‌کردند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که آرکی‌های نمک‌دوست توانایی زیادی در رنگبری دارند. با توجه به شوری پساب‌های نساجی، استفاده از این میکروارگانیسم‌ها مهم به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: رنگ‌های آزو، آرکی‌های نمک‌دوست، رنگبری، *Halogeometricum borinquense*، *Haloferax mediterranei*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

رنگ‌های آزو با پیوند دوگانهٔ نیتروژن متصل به گروه‌های آروماتیک، شناخته می‌شوند (۱). دست‌کم ۳۰۰۰ نوع رنگ آزو در صنایع نساجی، کاغذ، غذایی، آرایشی و دارویی استفاده می‌شوند. از میان کاربردهای متنوع رنگ‌های سنتتیک، سالیانه بیش از ۳۰۰۰۰ تن مواد رنگی مختلف در جهان تولید می‌شوند که در میان آنها رنگ‌های آزو بیش از ۶۰درصد رنگ‌ها را در کارخانه‌ها تشکیل می‌دهند (۲). رنگ‌ها براساس کاربرد و ساختار شیمیایی دسته‌بندی می‌شوند. آنها حاوی کروموفور و اگزوکروم هستند. کروموفورها به گروه‌هایی از اتم‌ها گفته می‌شود که عامل رنگی، رنگ‌ها هستند. اگزوکروم‌ها شامل یک الکترون کشنده و یک دهندهٔ الکترون هستند که موجب افزایش رنگ کروموفور می‌شوند. از مهم‌ترین کروموفورها، آزو (-N=N-)، کربونیل (-C=O)، متین (C=H)، نیترو ($-NO_2$) و رنگ‌های کوئینوئیدی می‌توان اشاره کرد و از مهم‌ترین اگزوکروم‌ها، آمین ($-NH_3$)، کربوکسیل (-COOH)، سولفونات ($-SO_3H$) و هیدروکسیل (-OH) هستند (۳). روزانه مقادیر زیادی از این رنگ‌ها درنتیجهٔ فعالیت‌های مختلف صنعتی (به‌ویژه کارخانه‌های نساجی) وارد پساب‌ها می‌شوند که این رنگ‌ها بر منابع آبی، خاک و ارگانیسم‌ها آثار مخرب می‌گذارند (۴). در طول فرآیند رنگرزی همهٔ رنگ‌ها به فیبرها وصل نمی‌شود و مقداری از رنگ‌ها در حمام رنگ باقی می‌ماند؛ به‌طوری که ۲۰درصد رنگ‌های اسیدی، ۳۰درصد رنگ‌های مستقیم و ۵۰درصد رنگ‌های راکتیو در پساب‌ها آزاد می‌شوند (۵). مقدار رنگی که استفاده شده ناچیز است؛ ولی مشکل اصلی پایداری این رنگ‌ها در پساب‌هاست که درنتیجه با داشتن یک یا چند گروه سولفونیک‌اسید در حلقهٔ آروماتیک آنها باعث مهار رشد یا مهار سنتز اسیدهای نوکلئوتید می‌شوند (۶). مقاومت رنگ‌های آزو به‌دلیل وجود پیوند شدیداً الکترون‌کشندهٔ آزو به اکسیژنازها و وجود گروه‌های آروماتیکی بزرگ متصل به پیوند آزو است (۱). میزان رنگ‌زدایی به نوع، وزن مولکولی و گروه‌های جانشین رنگ بستگی دارد. ترکیبات آزو با گروه‌های هیدروکسی و آمینو نسبت به متیل، متوکسی، سولفور و نیترو بیشتر تمایل به تخریب دارند (۷). روش‌های تیمار آنزیمی و میکروبی، به‌منظور رنگبری و تجزیهٔ رنگ‌ها، نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی، از امتیازات بالایی برخوردار است؛ از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱. قیمت پایین؛ ۲. تولید لجن با مقدار کم؛ ۳. تولید محصولات فاقد سمیت؛ ۴. سازگار با طبیعت؛ ۵. نیاز به آب کمتر در پاک‌سازی در مقایسه با روش‌های فیزیکی شیمیایی (۸). باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها، اکتینومیست‌ها، مخمرها و گیاهان، میکروارگانیسم‌هایی هستند که تاکنون رنگبری در آنها مطالعه شده است (۲). نمک‌های مختلفی در صنعت نساجی به کار می‌روند، به‌طور عمومی کارخانه‌های نساجی در استفاده از رنگ‌های راکتیو، غلظتی حدود ۱۰۰-۶۰ گرم بر لیتر نمک به کار می‌برند، درنتیجه میکروارگانیسم‌ها باید قابلیت تحمل این شرایط نمکی را به‌منظور فرآیند رنگبری داشته باشند (۹). نخستین مطالعات بر توانایی رنگبری در نمک‌دوست‌ها و تحمل‌کنندهٔ آن بر گونه‌های جنس *Halomonas* انجام گرفته است (۱۰). هدف این پژوهش، مطالعهٔ توانمندی آرکی‌های نمک‌دوست در رنگبری رنگ آزو به‌منظور استفاده از آنها در پاک‌سازی پساب‌های نساجی است.

مواد و روش‌ها

مـواد شـیمیایی اسـتفاده‌شـده: نمـک‌هـا و مـواد استفاده‌شده از شـرکت مـرک[1] خریـداری و رنـگ‌هـا از شرکت سیبا[2] تهیه شدند.

سویه‌های میکروبی، جداسـازی و خـالص‌سـازی: از مجموع ۲۲ سـویه، ۱۵ سـویه جداشـده از منـاطق پرشـور ایران و۷ سویه تایپ نگهداری‌شده در مرکز ملـی ذخـایر ژنتیکی ایران هستند.

بـه‌منظـور جداسـازی آرکـی‌هـای نمـک‌دوسـت، نمونه‌برداری از مناطق پرشور ایران صورت گرفت. برای غربـالگری تلقـیح نمونـهٔ آب بـه دو صـورت مسـتقیم و سانتریفوژشده و نمونه‌های رسوب و نمک با تهیهٔ سـریال رقت تا رقت$^{-7}$ ۱۰ بر محیط MGM بـا ۲۳درصـد نمـک (در یـک لیتـر آب مقطـر: NaCl ۱۸۳/۹گـرم؛ $MgCl_2$ ۲/۲۹ گـرم ؛ $MgSO_4$ ۲/۶۸ گـرم؛ KCl ۵/۳۶ گـرم؛ پپتون ۱گرم، عصارهٔ مخمر ۰/۲ گرم) انجام گرفـت. pH نمونه با Tris یک مولار روی ۷/۲ تنظیم و در انکوبـاتور با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد برای یـک مـاه گرماگـذاری شدند و بعد از یک مـاه بـه محـیط جدیـد MGM دارای ۲۳درصد نمک انتقال داده شد و تا خالص‌شدن آنها ایـن کار ادامه پیدا کرد.

شناسایی مولکـولی سـویه‌هـای میکروبـی: شناسـایی سـویه‌هـا، از طریـق تـوالی ژن *16S rRNA*، DNA کلنی‌های تازه‌رشدکرده بر محـیط MGM بـا اسـتفاده از روش تغییریافتـهٔ مـارمور[3]، اسـتخراج شـد (۱۱). تأییـد استخراج DNA، از طریق بارگذاری ۱۰درصـد از نمونـه همـراه بـا رنـگ (بـا نسـبت ۶ بـه ۱) بـر ژل آگـاروز (۰/۷درصد) در دستگاه الکتروفورز افقی انجام شد. برای انجـام واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز[4]، از پرایمرهـای 5' 20F 3' TCCGGTTGATCCTGCCG و 5' 1530R 3' AGGATCAAGTGTCCGGGTGCG برای آرکی‌ها استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمـراز در سویه‌های جداسازی‌شده، به ایـن روش صـورت گرفـت: واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجـه سانتیگراد انجام و سپس، مرحلهٔ تکثیر آغاز شد که شامل ۳۰ چرخهٔ تکرارشونده بـا دمـای دناتوراسـیون ۹۴ درجـه سـانتیگراد بـه‌مـدت ۱۵ ثانیـه، دمـای اتصـال ۵۱ درجـه سـانتیگراد بـه‌مـدت ۳۰ ثانیـه و دمـای سـنتز ۷۲ درجـه سانتیگراد به‌مدت ۵۲ ثانیه بود. درانتها، بـه‌منظـور تکمیـل نهایی ساختارهای تکثیرشده، یک مرحله سنتز به‌مـدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجـه سـانتیگراد، بـه مراحـل افـزوده شد. پس از تکثیر توالی موردنظر با استفاده از پرایمرهای استفاده‌شده، نمونهٔ محصول PCR بـرای تعیـین تـوالی بـه شـرکت Bioneer در کـره، فرسـتاده شـد و تـوالی‌هـای بـه‌دسـت‌آمـده بـا نـرم‌افـزار Chromas Pro بررسـی و بـا توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعات ژنومی EzTaxon مقایسه شـد و میـزان شـباهت آن بـا سـویه‌هـای مختلـف ثبت‌شده، تعیین و برای بررسی‌های بعدی ذخیره گردید.

بررسی اولیهٔ رنگبری: ابتدا رنگبری ۲۲ سویه بر رنگ Remazol black B انجام شد سپس بعد از انتخاب چهار سویه با بیشترین رنگبری، بررسی رنگبری بر رنـگ مونـو آزو Acid blue 161 انجام شـد و درنهایـت دوسـویه بـا بیشترین رنگبری انتخاب شدند. میزان رنگ حـذف‌شـده از محـیط طـی یـک هفتـه بـه‌روش اسـپکتروفتومتری شیمادزو بررسی شد.

هرکـدام از ۲۲ سـویهٔ آرکـی‌هـای نمـک‌دوسـت بـه لولـه‌هـای کشـت حـاوی ۱۰ میلـی‌لیتـر از محـیط کشـت رنگبـری MGM ۲۳درصـد (حـاوی ۱/۸۳ گـرم سـدیم‌کلرایـد، ۰/۲۲ گـرم منیـزیم‌کلرایـد، ۰/۲۶ گـرم منیزیم‌سولفات، ۰/۰۵۳ گـرم پتاسـیم‌کلرایـد، ۰/۰۲ گـرم

عصارهٔ مخمر و ۰/۱ گرم پپتون گوشت، pH توسط Tris یک مولار روی ۷ تنظیم شد)، با غلظت ۵درصد مایع تلقیح (از کدورت ۰/۵ مک‌فارلند آرکی معادل $۱۰^{۸}$ × ۱/۵) افزوده شدند و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. رنگ‌های آزو جدا از محیط کشت سترون شد سپس با مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط‌ها اضافه شد.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی آرکی‌های منتخب: ریخت‌شناسی کلنی‌ها در محیط MGM ۲۳درصد بعد از یک هفته بررسی شد. رنگ‌آمیزی گرم (۱۲) و آزمایش گرم در KOH ۳درصد تأیید شد (۱۳). حرکت آرکی‌ها ازطریق روش‌های لام مرطوب (۱۲) تعیین شد. فعالیت کاتالاز با تولید حباب در محلول ۳درصد هیدروژن‌پراکسید ارزیابی شد و فعالیت اکسیداز با استفاده از دیسک‌های آماده از شرکت Himedia تعیین شد. تحمل نمک سدیم‌کلرید در حضور تراکم ۵ تا ۳۰درصد در همان محیط پایهٔ ذکرشده سنجش شد. رشد در دماهای ۲۵ تا ۵۰درصد در محیط پایه بررسی شد و محدودهٔ pH برای رشد با تنظیم آن توسط Tris یک مولار بین ۴ تا ۹درصد تعیین شد.

بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رنگبری: اثر فاکتور مختلف با تغییر یک عامل در هر آزمایش در شرایط پایهٔ ذکرشده انجام شد و از رنگ Remazol black B به‌عنوان نمایندهٔ رنگ‌های آزو استفاده شد. اثر عوامل مختلف در روز چهارم بررسی گردید. همچنین هم‌زمان با بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رنگبری، رابطهٔ بین رشد آرکی‌ها و رنگبری در حضور همان فاکتور نیز سنجیده شده است. رشد آرکی‌ها ازطریق تراکم نوری (OD) و توسط اسپکتروفوتومتر شیمادزو بررسی شد. براساس آزمون آنوا معناداربودن همهٔ فاکتورها بررسی شد.

به‌منظور بررسی شرایط هوازی، دو حالت هوادهی با شیکر دور ۱۵۰ rpm و ایستا در انکوباتور آزمایش شد، محیط پایه در لوله‌ها در شیکر و انکوباتور گرماگذاری شدند. دما از فاکتور مهم در بررسی به شمار می‌رود که رنگبری در دماهای ۳۰-۳۵-۴۰-۴۵-۵۰ بررسی شد؛ همچنین برای سنجش pH با pH متر Sartorius مدل PB-11، رنگبری در pHهای مختلف ۹-۵ بررسی شد. غلظت‌های مختلف NaCl از ۱۲/۵ تا ۳۰درصد بررسی شد؛ سپس منابع کربن ساده گلوکز، ساکارز، لاکتوز، مالتوز و اسیدهای آلی شامل استات سدیم، اسیدسیتریک و پروپیونیک اسید با غلظت نهایی ۱درصد در محیط MGM بررسی شد. در ادامه از سه منبع نیتروژن آلی شامل عصارهٔ مخمر، عصاره سویا، پپتون و دو منبع نیتروژن معدنی شامل اوره و سولفات آمونیوم با غلظت نهایی ۰/۵درصد همراه با بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-Hcl استفاده شدند و برای بررسی تحمل‌پذیری غلظت‌های رنگ، غلظت‌های مختلفی از رنگ بررسی شد که این غلظت‌ها شامل ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد و محیط‌های رنگ‌دار تلقیح‌نشده به‌عنوان شاهد استفاده شدند.

برای به‌دست‌آوردن طیف جذبی هر رنگ ابتدا طیف جذبی هر رنگ از محدودهٔ ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر رسم شد تا حداکثر طول‌موج جذبی هر رنگ مشخص شود. از لوله‌های گرماگذاری‌شده در زمان ذکرشده ۱ میلی‌لیتر نمونه برداشت و با دور ۱۱۵۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. میزان جذب هر رنگ در حداکثر طول‌موج جذبی آن اندازه‌گیری شد.

درصد رنگبری طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$D (\%)= (A-A_o)/A\times100$

A= جذب در محیط، پس از رنگبری

A_o= جذب محیط شاهد (رنگی)

D= درصد رنگبری

به‌منظور بررسی میزان رشد باکتری بعد از رنگبری ابتدا ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها برداشته شد و تراکم نوری (OD) آنها با دستگاه اسپکتروفوتومتری شیمادزو در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر جذب آنها خوانده شد و بعد از سانتریفوژ با دور g ۱۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جذب آنها در همین طول‌موج خوانده شد. درنهایت با تفریق این داده‌ها میزان رشد در محیط رنگبری به دست آمد.

بررسی سمیت رنگ بر آرکی‌ها: پس از قرارگرفتن آرکی‌ها به‌مدت ۲۰ روز در محیط دارای رنگ، محیط مایع با استفاده از سانتریفوژ با دور g ۱۱۵۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه رسوب‌گذاری شد و رسوب حاصل، در محیط جامد کشت داده شد و رشد بعد از یک هفته بررسی شد.

نتایج

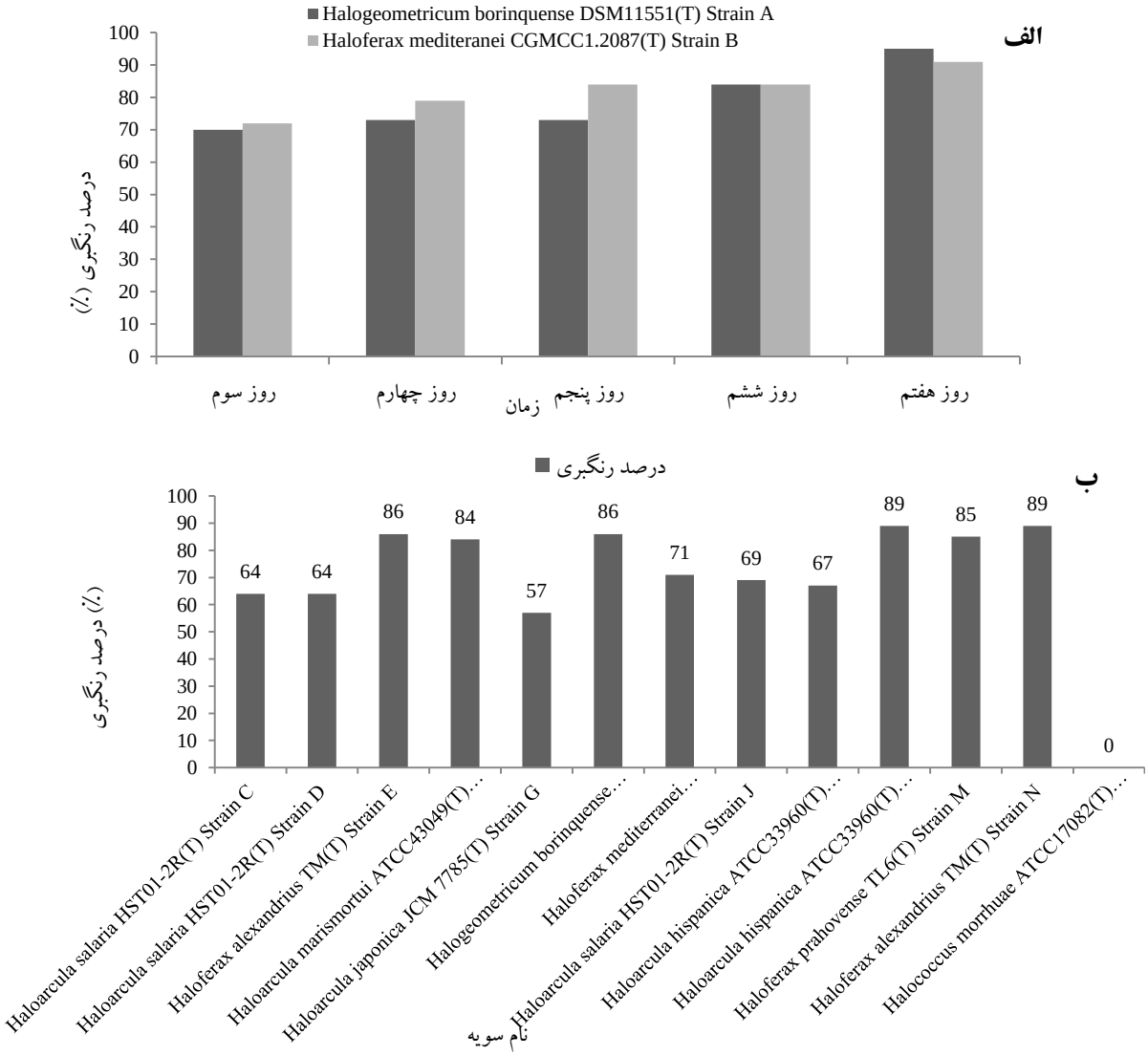
سویه‌های میکروبی و شناسایی سویه‌های جداشده: سویه‌های تایپ نگهداری‌شده در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران[5] شامل *Haloarchaeobius iranensis* IBRC-M 10013، *Halovivax limisalsi* IBRC-M 10022، *Halovivax certinus* IBRC-M 10256، *Halopenitus persicus* IBRC-M 10041، *Halorienticus persicus* IBRC-M 10043، *Halovenus aranensis* IBRC-M 10015 و *Halopenitus Malekzadehii* IBRC-M 10418 بودند.

بررسی‌های مولکولی از سویه‌های جداشده از مناطق مختلف پرشور ایران صورت گرفت و ۱۵ سویه آرکی‌های نمک‌دوست شناسایی شدند. آنها در محدودهٔ نمک ۱۲/۵ تا ۳۰درصد رشد می‌کنند. جدول ۱، نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های آرکی و میزان شباهت آنها با نزدیک‌ترین گونه‌های شناخته‌شده را نشان می‌دهد.

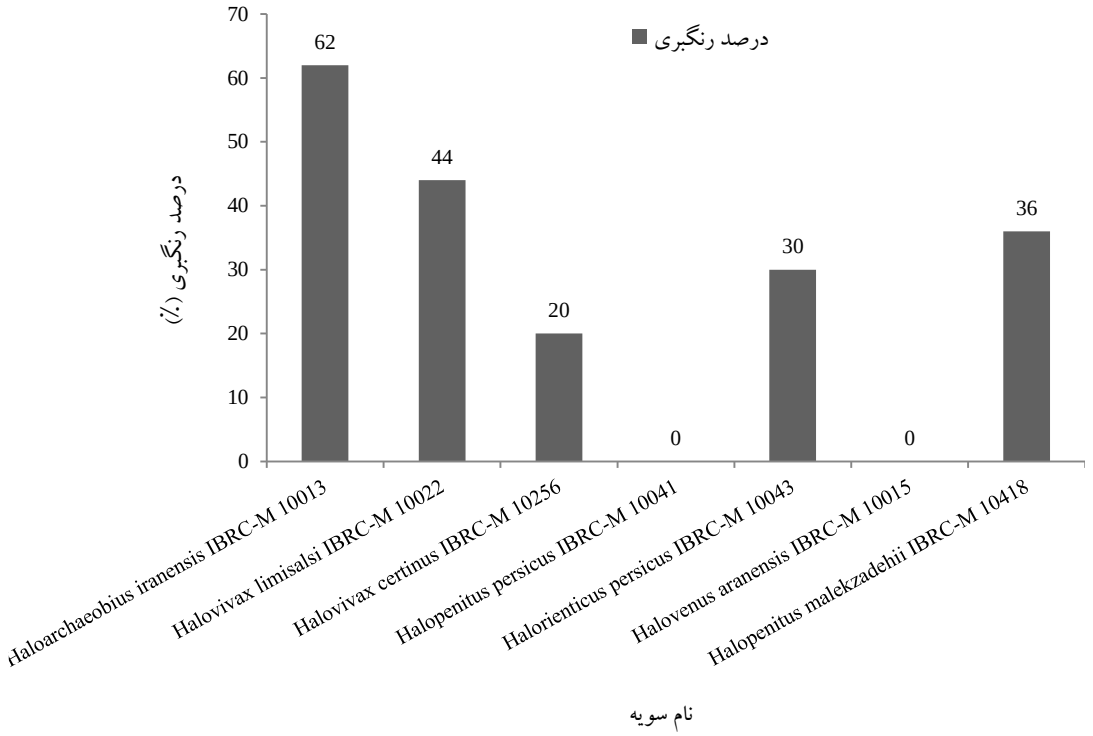
جدول ۱- مقایسهٔ توالی ژن *16S rRNA* سویه‌های آرکی‌های نمک‌دوست جداشده

ردیف	نام سویه	بیشترین میزان شباهت به گونه‌های تایپ	درصد شباهت براساس ژن *16S rRNA*
۱	A	*Halogeometricum borinquense* DSM11551 (T)	۹۹/۱
۲	B	*Haloferax mediteranei* CGMCC1.2087 (T)	۹۹/۴
۳	C	HST01-2R (T) *salaria Haloarcula*	۹۷/۴
۴	D	HST01-2R (T) *Haloarcula salaria*	۹۷/۱
۵	E	*Haloferax alexandrius* TM (T)	۹۹/۸
۶	F	*Haloarcula marismortui* ATCC43049 (T)	۹۷/۳
۷	G	*Haloarcula japonica* JCM 7785 (T)	۹۸/۷
۸	H	*Halogeometricum borinquense* DSM11551 (T)	۹۹
۹	I	*Haloferax mediterranei* CGMCC1.2087 (T)	۹۹/۳
۱۰	J	*Haloarcula salaria* HST01-2R (T)	۹۸
۱۱	K	*Haloarcula hispanica* ATCC33960 (T)	۹۷/۸
۱۲	L	*Haloarcula hispanica* ATCC33960 (T)	۹۹/۶
۱۳	M	*Haloferax prahovense* TL6 (T)	۱۰۰
۱۴	N	*Haloferax alexandrius* TM (T)	۹۹/۹
۱۵	O	*Halococcus morrhuae* ATCC17082 (T)	۹۸/۵

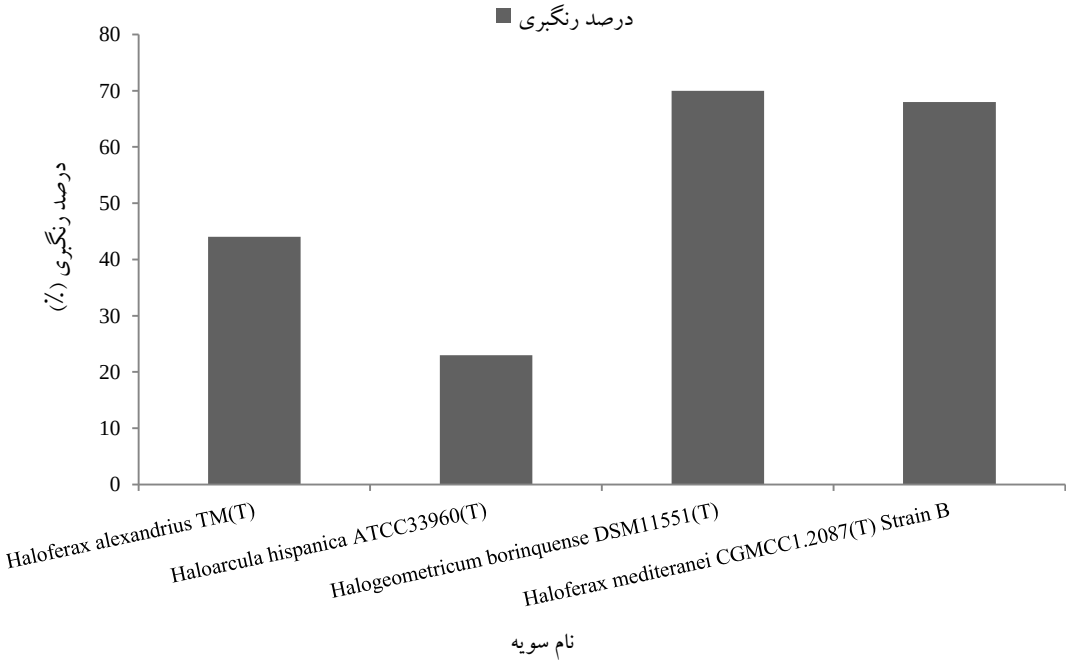
آزمون رنگبری: رنگبری رنگ‌های آزو در ۲۲ سویه بررسی شد و نتایج در شکل ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. از میان ۲۲ سویهٔ آرکی نمک‌دوست، چهار سویه به‌عنوان سویه‌های برتر در رنگبری رنگ دی آزو Remazol black B شناسایی شدند که شامل سویه‌های N با شباهت ۹۹/۹ به آرکی *Haloferax alexandrius*، سویهٔ L با شباهت ۹۹/۶ به آرکی نمک‌دوست *Haloarcula hispanica*، سویهٔ A با شباهت ۹۹/۱ به *Halogeometricum borinquense* وسویهٔ B با شباهت ۹۹/۴ به آرکی *Haloferax mediteranei* بودند. در مرحلهٔ بعد توانایی رنگبری چهار سویهٔ برتر بر رنگ مونو آزو Acid blue 161 بررسی شد که در شکل ۳ نشان داده شده است و درنهایت سویهٔ A و سویهٔ B به‌عنوان سویه‌های برتر انتخاب شدند. رنگبری دو سویهٔ برتر A و B را در شکل ۱ (الف)، ۳ و ۴ مشاهده می‌کنید.



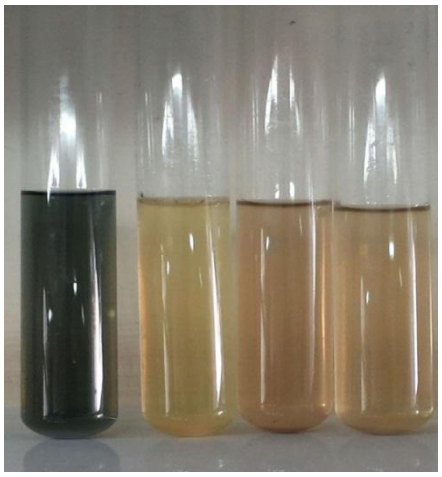
شکل ۱- بررسی اولیهٔ رنگبری آرکی‌های نمک‌دوست بر رنگ Remazol black B با اسپکتروفتومتری (حذف رنگ برحسب درصد)
الف.سویه‌های منتخب از روز سوم تا هفتم ب.سویه‌های جداشده از غارنمکی در روز هفتم



شکل ۲- بررسی اولیهٔ رنگبری آرکی‌های تایپ (از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران گرفته شد) بر رنگ Remazol black B در روزهفتم با اسپکتروفتومتری (حذف رنگ برحسب درصد)



شکل ۳- رنگبری چهار آرکی نمک‌دوست منتخب بر رنگ Acid blue ۱۶۱ در روزهفتم با روش اسپکتروفتومتری (حذف رنگ برحسب درصد)

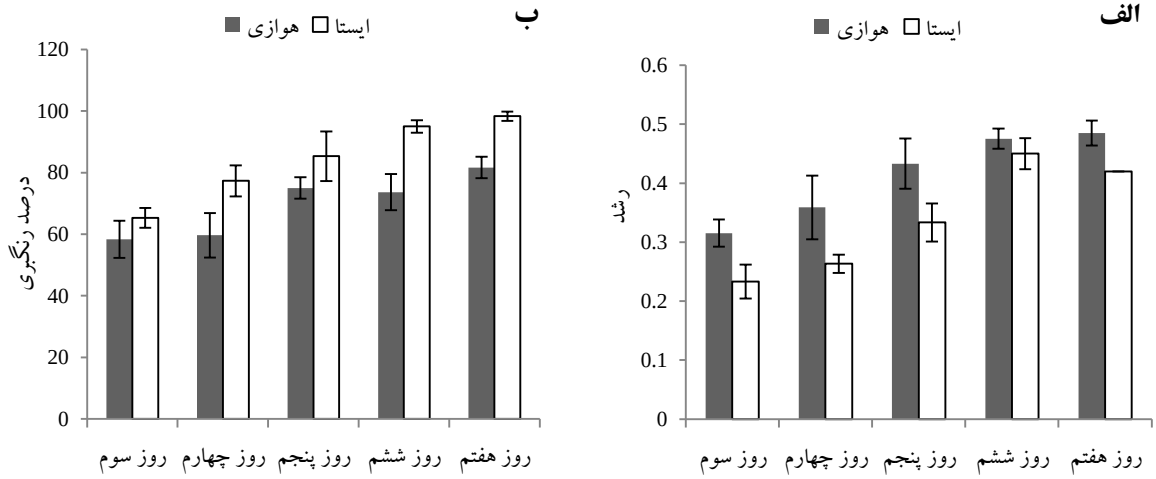


شکل ۴- رنگبری دوسویه آرکی برتر *Halogeometricum* strain A و *Haloferax mediterrane* strain B در محیط پایهٔ رنگبری با Remazol black B از چپ به راست به‌ترتیب: محیط شاهد حاوی Remazol black B (بدون تلقیح سویهٔ موردنظر)، محیط پایه بدون تلقیح سویه و رنگ، محیط حاوی رنگ Remazol Black B به‌همراه تلقیح *Haloferax mediterrane* strain B پس از ۴ روز، محیط حاوی رنگ Remazol Black B به‌همراه تلقیح strain A *Halogeometricum borinquense* پس از ۴ روز

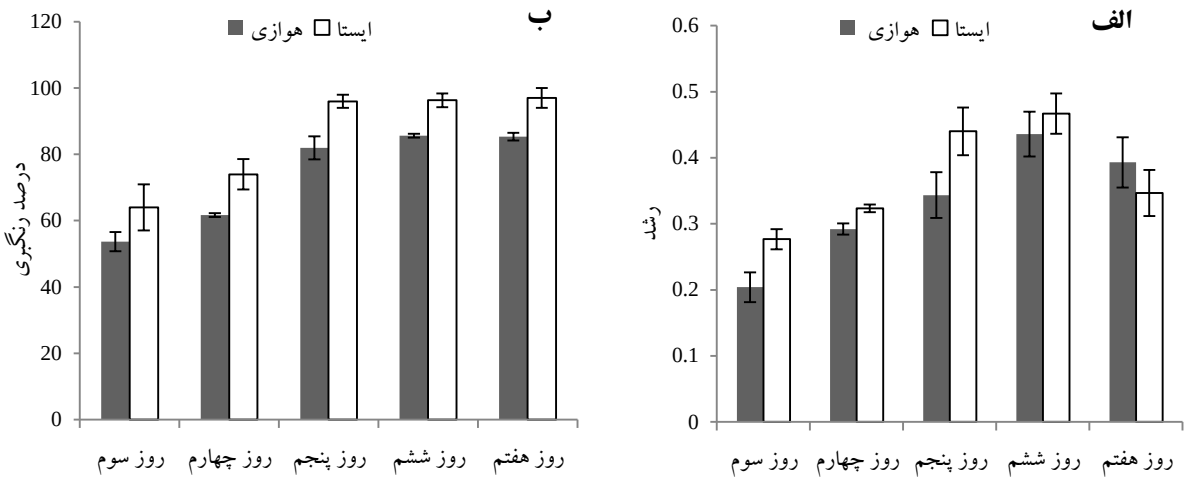
اثر فاکتورهای مختلف در سویه‌های منتخب

اثر هوادهی بر رنگبری: اثر هوادهی بر رنگ بری بررسی شد و نتایج در شکل ۵ و ۶ نشان داده شده است. رنگبری هم در شرایط ایستا و هم در شرایط هوادهی صورت می‌گیرد. در سویهٔ B در شرایط هوازی رشد بیشتری دارد اما در شرایط بی‌هوازی رنگبری بهتری نشان داده شده است. در سویهٔ A در شرایط ایستا هم رشد و هم رنگبری بهتری دیده شد.

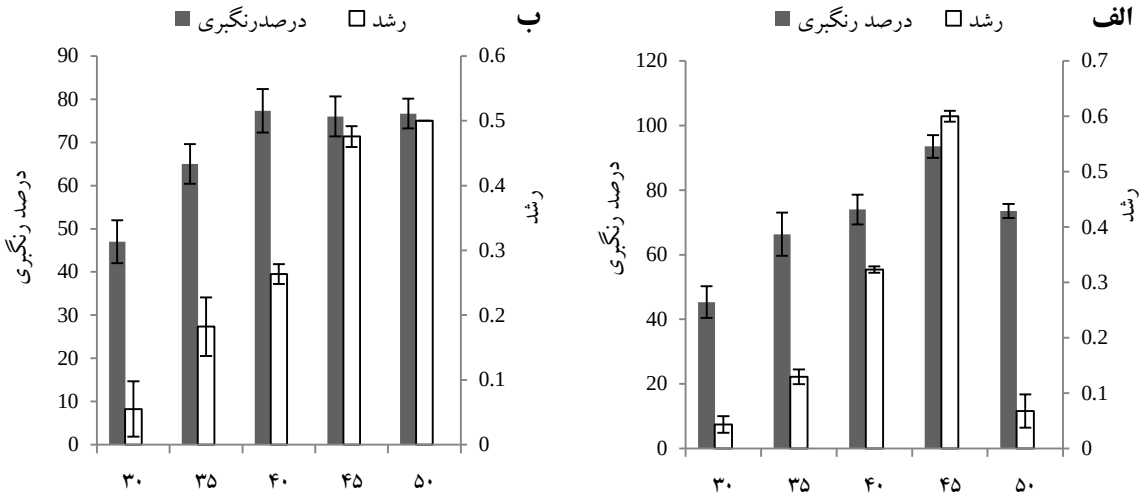
اثر دماهای مختلف بر رنگبری: اثر دما بر رنگبری در سویه‌های منتخب در شکل ۷ نشان داده شده است. بهترین دمای رنگبری در *Haloferax* strain B (در دمای ۴۰) با ۷۷درصد رنگبری گزارش شد. با توجه به آزمون آنوا ازنظر آماری تفاوت معناداری در رنگبری بین دماهای ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد وجود ندارد؛ اما تفاوت معناداری بین دمای ۴۰ با دماهای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد وجود دارد. ازآنجاکه در دمای ۴۰ میزان رشد کمتری نسبت به دمای ۴۵ و ۵۰ دارد، بهینهٔ رنگبری در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد. در آرکی *Halogeometricum* strain A در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد ۹۴درصد رنگبری مشاهده شد که تفاوت معناداری با بقیهٔ دماها داشت.



شکل ۵- مقایسهٔ رشد و رنگبری در شرایط هوازی و ایستا در *Haloferax* strain B الف. رشد ب. رنگبری



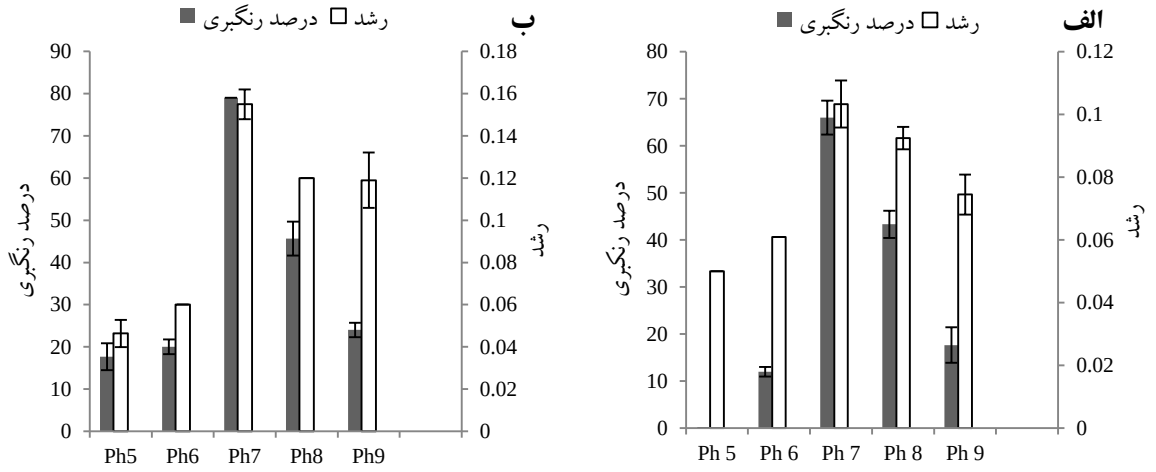
شکل ۶- مقایسهٔ رشد و رنگبری در شرایط هوازی و ایستا در *Halogeometricum* strain A الف. رشد ب. رنگبری



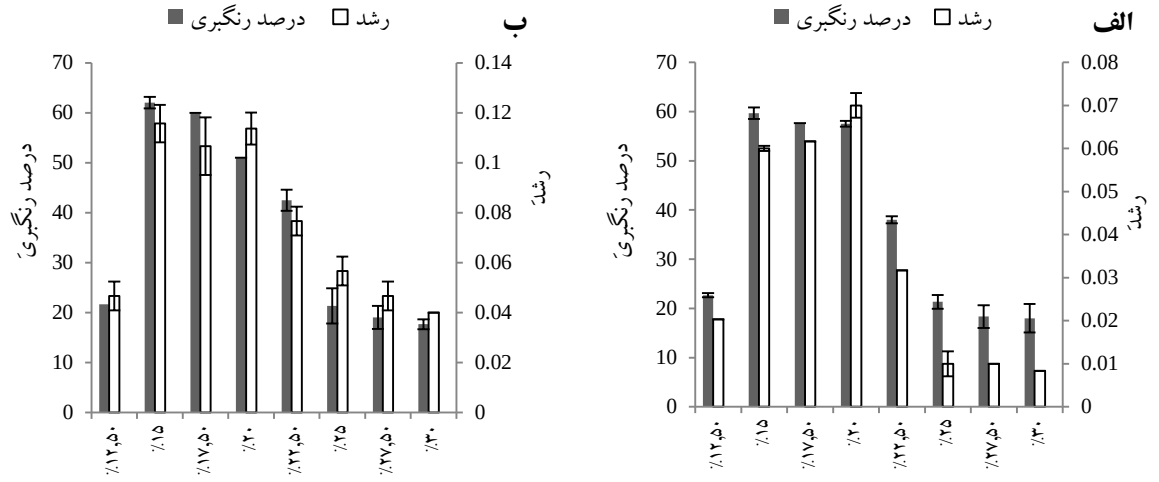
شکل ۷- رابطهٔ بین رشد و رنگبری در دماهای مختلف الف. در *Halogeometricum* strain A ب. *Haloferax* strain B

اثر pHهای مختلف بر رنگبری: اثر pH بر رنگبری در سویه‌های آرکی منتخب در شکل ۸ نشان داده شده است. در آرکی *Halogeometricum* strain A در pH ۷ بیشترین رنگبری و رشد میکروارگانیسم مشاهده شد و در آرکی منتخب *Haloferax* strain B نیز در همین pH بیشترین رنگبری دارد.

اثر غلظت‌های مختلف از NaCl: غلظت‌های مختلف NaCl از ۱۲/۵ تا ۳۰درصد بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۹ نیز ملاحظه می‌شود *Halogeometricum* strain A به‌دلیل اینکه تفاوت معنی‌داری بین ۱۵درصد با ۱۷/۵درصد نمک هم در رنگبری و هم در رشد ندارد و بهترین رنگبری و رشد در هردو درصدهای نمک است. در *Haloferax* strain B در غلظت نمک ۱۷/۵درصد بیشترین رنگبری و رشد دارد.

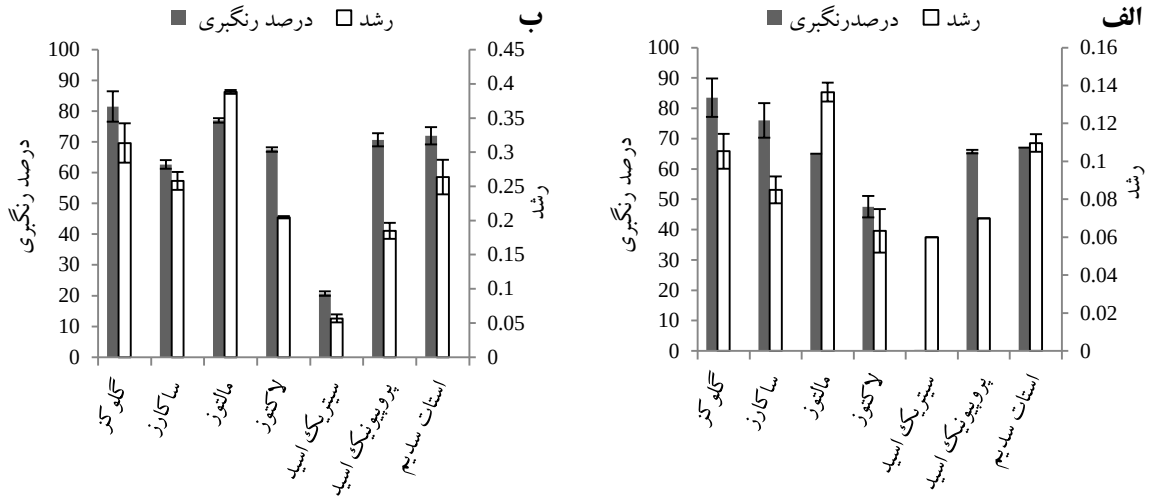


شکل ۸- نمودار اثر pH مختلف بر رنگبری الف.A strain *Halogeometricum* ب.B strain *Haloferax*



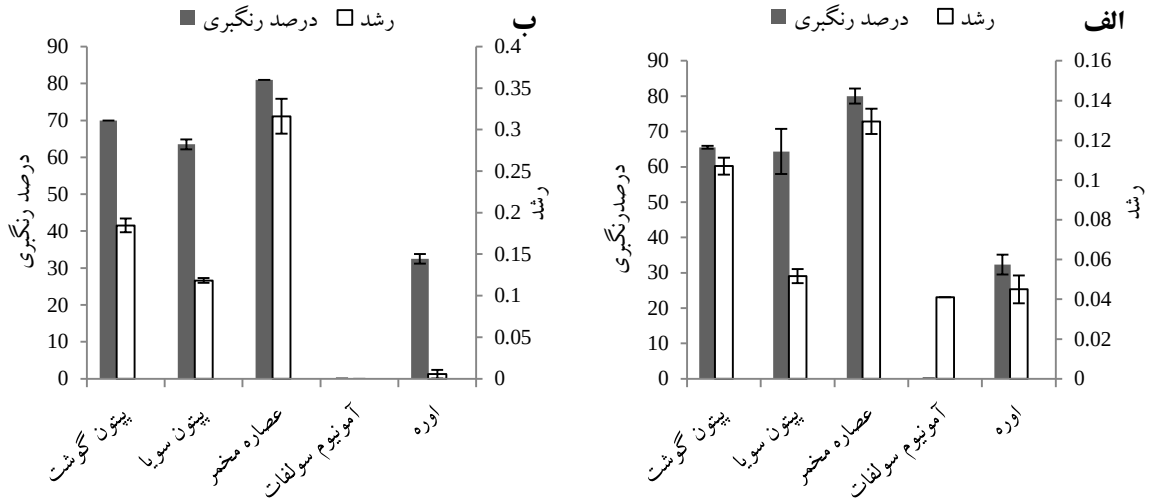
شکل ۹- نمودار اثر غلظت‌های مختلف نمک بر رنگبری الف.A strain *Halogeometricum* ب.B strain *Haloferax*

اثر منابع مختلف کربن بر رنگبری: اثر منابع مختلف کربنی بر رشد و رنگبری سویه‌های منتخب در شکل ۱۰ نشان داده شده است. در سویهٔ B strain *Haloferax* براساس آزمون آنوا تفاوت معناداری بین قندها در رنگبری به‌جز سیتریک‌اسید وجود ندارد؛ ولی با توجه به اینکه تفاوت معناداری در رشدشان دیده می‌شود، در حضور قند پروپیونیک‌اسید با داشتن کمترین رشد بهترین شرایط را به خود اختصاص می‌دهد. در سویهٔ A strain *Halogeometricum* ساکارز تفاوت معنی‌داری با گلوکز و استات‌سدیم در رنگبری ندارد و رشدش با استات‌سدیم تفاوت معنادار دارد؛ اما با گلوکز این‌گونه نیست؛ پس ساکارز و گلوکز هردو منبع کربن مناسب برای این سویه هستند.



شکل ۱۰- نمودار اثر منابع کربن مختلف بر رنگبری الف.*Halogeometricum* strain A ب.*Haloferax* strain B

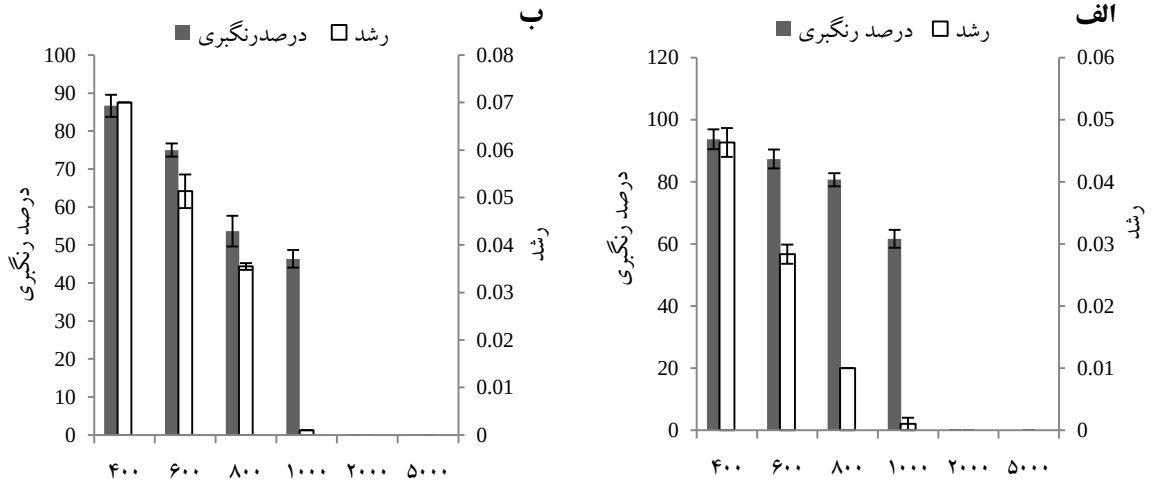
اثر منبع نیتروژن بر رنگبری: اثر منابع مختلف نیتروژن بر رشد و رنگبری رنگ ریمازول بلک توسط سویه‌های آرکی منتخب در شکل ۱۱ نشان داده شده است در این آزمایش از سه منبع نیتروژن آلی شامل عصاره مخمر، عصاره سویا، پپتون و دو منبع نیتروژن معدنی شامل اوره و سولفات آمونیوم همراه با بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-Hcl استفاده شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در حضور مخمر رشد و رنگبری بیشترین درصد را به خود اختصاص داده است. پس از مخمر، پپتون گوشت و پپتون سویا بیشترین میزان رنگبری را دارند. در حضور اوره رنگبری کاهش یافته و در حضور آمونیوم سولفات رنگبری دیده نشده است.



شکل ۱۱- نمودار اثر منابع نیتروژن متفاوت بر رنگبری الف.*Halogeometricum* strain A ب.*Haloferax* strain B

اثر غلظت‌های مختلف رنگ: رنگبری در غلظت‌های مختلف بررسی شد. این غلظت‌ها شامل ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است که در شکل ۱۲درصد رنگبری‌شان گزارش داده شده است. ازآنجاکه همهٔ فاکتورها در روز ۴ بررسی شده است، در بررسی غلظت رنگ، به‌دلیل اینکه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رنگبری در روز چهارم مشاهده نشد، در روز دهم بررسی‌ها صورت گرفته است. گفتنی است که در غلظت ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رنگبری در هیچ‌کدام از سویه‌ها مشاهده نشد.

بررسی سمیت رنگ بر آرکی‌ها: پس از ۲۰ روز که آرکی‌ها در محیط دارای رنگ قرار گرفت، با سانتریفوژ ۱۱۵۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه، رسوب در محیط جامد کشت داده شد و باگذشت دو هفته هر دو سویهٔ منتخب در غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد کردند.



شکل ۱۲- نمودار اثر غلظت‌های مختلف رنگ بر رنگبری الف. *Halogeometricum* strain A ب. *Haloferax* strain B

بحث و نتیجه‌گیری

سالانه میلیون‌ها تن از رنگ‌های آزو تولید می‌شود و ۱۰ تا ۱۵درصد آن وارد پساب‌ها و درنتیجه وارد محیط اطرافمان می‌شود و حیات موجودات و محیط‌زیست را با خطر جدی روبه‌رو می‌کند (۱۴).

مطالعاتی مبنی بر رنگبری توسط آرکی‌های غیرِنمک‌دوست صورت گرفته است از آن جمله در بررسی رنگبری آرکی‌های غیرِنمک‌دوست می‌توان به آرکی‌های متانوژنیک (در کنسرسیوم بی‌هوازی ترموفیل) اشاره کرد. این آرکی‌ها شامل *M.barkeri*، *Methanococcus voltaei* و *Methanospirillum hungat* JF1 بودند که اثر رنگبری آنها بر رنگ‌های راکتیو بررسی شد (۱۵). در مطالعات دیگر رنگبری رنگ‌های آزو توسط گروهی از آرکی‌ها با استفاده از راکتور ZVI-UASB صورت گرفته است، نام این آرکی‌ها ذکر نشده است اما از گروه متانوژن بودند (۱۶). در رابطه با میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست در باکتری‌های نمک‌دوست رنگبری گزارش شده است، نخستین بار اسد[۶] و همکارانش باکتری‌های نمک‌دوست *Halomonas* sp. D2، *Halomonas* sp. A3،

Halomonas sp. Gb را جداسازی کردند که قادر به رنگبری تا مقادیر بالای ۱۵درصد نمک NaCl بود (۱۰).

خلید[۷] و همکارانش، نشان دادند که *Shewanella putrefaciens* AS96 قادر به رنگبری رنگ‌های آزو تا ۱۰۰ درصد در مدت‌زمان ۸ ساعت در غلظت نمکی ۴درصد است (۱۷).

سالا[۸] و همکارانش، پاک‌سازی زیستی ازطریق *Gracilibacillus sp.* GTY. بر رنگ Acid red B در غلظت نمکی ۱۵درصد را بررسی کرده‌اند (۱۸).

مطالعاتی مبنی بر حضور آرکی‌های نمک‌دوست در تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های نفتی وجود دارد، از آن جمله به *Halobacterium sp* می‌توان اشاره کرد. از گزارش‌های دیگر سویه آرکی EH_4 است که قادر به متابولیزه‌کردن ترکیبات هیدروکربن‌های اشباع است. تعدادی از آرکی‌ها مثل *Haloferax sp.* هم قادر به تجزیهٔ اسیدهای آروماتیک هستند (۱۹). آرکی نمک‌دوست *Halorubrum* سویهٔ Ha25 آنزیم آمیلوپولولاناز خارج سلولی نمک‌دوست و مقاوم به حلال را در غلظت بالای نمک سدیم‌کلراید تولید می‌کند (۲۰).

در این پروژه بررسی رنگبری و اثر عوامل مختلف بر رنگبری رنگ‌های آزو (مهم‌ترین رنگ نساجی) در ۲۲ سویه آرکی‌های نمک‌دوست که دوسویه به‌عنوان سویهٔ برتر انتخاب شد. از میان ۲۲، دو سویهٔ A و B که براساس شباهت‌های فیلوژنی دارای بیشترین قرابت به گونه‌های آرکی *Haloferax mediterrane* و *Halogeometricum borinquense* دارند، انتخاب شدند. هم‌زمان با بررسی اثر عوامل مختلف با رنگبری، میزان رشد و رنگبری نیز به‌طور هم‌زمان برای هر عامل مطالعه شد. با استفاده از آزمون آماری آنوا معنی‌داربودن داده‌ها بررسی شد. در نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، شرایط هوادهی تفاوت چندانی با رنگبری در شرایط ایستا وجود ندارد اما باوجود رشد کمتر در شرایط ایستا، این شرایط مناسب‌تر در نظر گرفته شده است. رشد کمتر به این دلیل اهمیت دارد که جمعیت کمتری از این آرکی‌ها در پساب وجود دارند و راحت‌تر و با هزینهٔ کمتری از پساب‌ها، در مراحل انتهایی تصفیهٔ پساب، جمع‌آوری می‌شوند. ممکن است رنگبری در شرایط هوازی این سویه‌ها، به این دلیل باشد که آنزیم دخیل در رنگبری این آرکی‌های نمک‌دوست، فعالیتش در حضور اکسیژن مهار نشود. در بررسی منابع کربن مختلف، سیتریک‌اسید اثر کمی در رنگبری در *Haloferax* سویهٔ B بدون تأثیر در رنگبری *Halogeometricum* سویهٔ A داشته است، بقیهٔ منابع اثر قابل‌توجهی در رنگبری داشته‌اند. *Haloferax* سویهٔ B در حضور قند پروپیونیک‌اسید بهترین شرایط رنگبری را به خود اختصاص می‌دهد. در *Halogeometricum* سویهٔ A ساکارز و گلوکز هردو منبع کربن مناسب برای این سویه هستند. رنگبری در گلوکز بیشتر گزارش شده است. گلوکز با افزایش رشد و درنتیجه افزایش تنفس و مصرف اکسیژن از محیط، شرایط بی‌هوازی را برای رنگبری فراهم می‌کند (۲۱).

سویهٔ B در دمای ۴۰ و سویهٔ A در دمای ۴۵ درجه رنگبری بیشتری دارند. هردو سویه در دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه توانایی رنگبری دارند. بررسی اثر دما بر رنگبری نشان داد که افزایش دما و کاهش دما باعث کاهش رنگبری می‌شود و بهینه فعالیت آنزیم رنگبر در دماهای به‌دست‌آمده است. در مطالعات بر قارچ‌ها افزایش دما در ازبین‌رفتن سلول و تخریب آنزیم‌های آزوردوکتاز نقش دارد (۲۲). هرچند برخی از گزارش‌ها حاکی از وجود

آزوردوکتازهای پایدار در دمایی بالا هستند که قادر است تا دمای ۶۰ پایدار بماند (۲۳). با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده از آرکی‌های نمک‌دوست این گروه از میکروارگانیسم‌ها توانایی بسیاری در رنگبری در دماهای بالاتر از ۴۰ درجه دارند و این سویه‌ها بهترین رشد را در این دماها دارند. رنگبری در سویهٔ B تا دماهای ۵۰ درجه، بدون کاهش در درصد رنگبری صورت گرفت. با توجه به اینکه مطالعه بر آنزیم‌های رنگبری در آرکی‌های نمک‌دوست صورت نگرفته است، آنزیم موجود در این آرکی‌ها از پایداری بالایی در دماهای بالا برخوردار است و این با توجه به اینکه فرایند رنگریزی در صنایع نساجی در دماهای بالا صورت می‌گیرد یک مزیت به حساب می‌آید. همچنین با توجه به اینکه این سویه‌ها در غلظت‌های بالای ۱۵درصد توانایی رنگبری دارند و اینکه پساب‌های نساجی شوری بالایی دارند از دیگر مزایای استفاده از این آرکی‌ها است.

اگرچه بعضی از باکتری‌ها مثل هالوموناس‌ها (۱۰) توانایی زندگی در محیط‌های شور دارند و مطالعات زیادی مبنی بر رنگبری توسط آنها وجود دارد؛ اما گزارشی از رنگبری توسط آرکی‌ها موجود نیست با وجود اینکه آرکی‌ها در شرایط شور و سخت محیطی بر باکتری‌ها غالب هستند و شانس زنده‌ماندن آنها در این شرایط نسبت به باکتری‌ها بیشتر است (۲۴)

در بررسی pH در هردو سویه بیشترین رنگبری در شرایط خنثی بود و این حداکثر رنگبری هماهنگ با رشد بیشتر سویه‌ها در pH ۷ بود. طبق داده‌های به‌دست‌آمده آنزیم رنگبر و بیشترین مقدار رشد آرکی‌ها در pH خنثی است. با افزایش pH میزان رشد نیز کاهش می‌یافت. بیشترین رنگبری گزارش‌شده در باکتری‌ها در pH ۶-۱۰ و در قارچ‌ها pH خنثی و اسیدی گزارش شده است (۲۲).

در بررسی غلظت‌های مختلف نمک NaCl، بهترین رنگبری در غلظت ۱۵ تا ۱۷/۵درصد نمک مشاهده شد و این حداکثر رنگبری هماهنگ با رشد سویه‌های آرکیایی بود. افزایش بیشتر درصد نمک بر رشد سویه‌های آرکیایی اثر مثبت داشت؛ اما در فعالیت رنگبری کاهش نشان داد. درنتیجه غلظت‌های بالاتر بر رنگبری اثر مستقل از رشد میکروارگانیسم دارد. افزایش نمک بر بار سطحی آنزیم‌ها مؤثر است.

این سویه‌ها غلظت رنگ را تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را تحمل می‌کنند. همان‌طور که از داده‌های شکل ۱۲ مشاهده می‌شود این سویه‌ها در غلظت‌های ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باوجود رشد کم، درصد رنگبری بالای ۴۰ درصد دارند. در مطالعات صورت‌گرفته در رنگبری Direct red 81 در *Enterococcus faecalis* YZ 66 غلظت‌های موردبررسی تا ۷۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد (۲۵). در مطالعات مربوط به مجموعه‌ای از باکتری‌ها در یک محیط رنگبری گزارش شده که این مجموعه قادر به رنگبری حدود ۸۷درصد در حضور ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر رنگ است (۹) ولی با توجه به اینکه آرکی‌های بررسی‌شده در این پژوهش خود به‌تنهایی در حضور ۱۰۰۰ میلی‌گرم رنگ تا ۵۰درصد رنگبری می‌کنند، توانایی این میکروارگانیسم‌ها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها در غلظت‌های بالای رنگ نشان می‌دهد. توانایی رنگبری در غلظت‌های بالای رنگ از صفاتی است که کمتر در سویه‌هایی با این توانایی گزارش شده است (۲۶). کاهش رنگبری و رشد در غلظت‌های بالای رنگ ممکن است به‌دلیل سمی‌بودن رنگ برای آرکی‌ها و مهار فعالیت متابولیکی آنها باشد. همچنین رنگ‌ها سنتز نوکلئیک‌اسیدها را مهار می‌کنند

(۲۷). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در شکل ۱۰ در غلظت‌های بالای رنگ با کاهش رشد، رنگبری نیز کاهش می‌یابد. با توجه به مطالعات بر سایر میکروارگانیسم‌ها، عصارهٔ مخمر بهترین منبع نیتروژن است که منجر به تولید NADH می‌شود و به‌عنوان دهندهٔ الکترون عمل می‌کند و باعث کاهش رنگ آزو توسط میکروارگانیسم می‌شود (۲۲). براساس نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش‌های ما در آرکی‌های نمک‌دوست نیز عصارهٔ مخمر بهترین منبع نیتروژن در رنگبری است.

مقایسهٔ رشد و رنگبری نشان می‌دهد که با افزایش رشد، رنگبری نیز افزایش یافته اما همه‌جا صادق نیست مثلاً در شرایط هوازی و ایستا با وجود رشد بیشتر در شرایط هوازی رنگبری تقریباً برابر شرایط ایستا است چون فرایند رنگبری، فرآیندی بی‌هوازی است.

میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست و تحمل‌کنندهٔ نمک در بیوتکنولوژی دارای اهمیت هستند. ازآنجاکه کارخانه‌های نساجی از نمک استفاده می‌کنند (غلظتی حدود ۱۰۰-۶۰ گرم بر لیتر نمک (۹). استفاده از این میکروارگانیسم‌ها اهمیت دارد و به‌علاوه این میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل تنش‌های ناشی از فلزات سنگین و اکسی‌آنیون‌های سمی که معمولاً در پساب‌ها وجود دارند، هستند. براساس دانش کنونی ما تاکنون گزارشی از رنگبری رنگ‌های آزو توسط آرکی‌های نمک‌دوست منتشر نشده است. با توجه به اینکه آرکی‌ها در گروه‌های فیزیولوژیکی وسیعی تقسیم‌بندی می‌شوند (نمک‌دوست، گرمادوست، اسیددوست، متانوژن و مصرف‌کننده‌های نیتروژن) (۲۴) و هرکدام از این گروه‌ها در شرایط سخت توانایی زندگی دارند و همچنین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پروژه، این گروه از میکروارگانیسم‌ها در شرایط مشابه به صنایع نساجی دما، نمک بالا و دیگر شرایط سخت توانایی رنگبری دارند، شرایطی که برای میکروارگانیسم‌های دیگر غیرقابل‌تحمل است.

References

(1) Patil PS., Shedbalker UU., Kalyani DC., Jadhav JP. Biodegradation of Reactive Blue 59 by isolated bacterial consortium PMB11. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2008; 35 (10): 1181-1190.

(2) Madhuri M., Rijuta G., Ganesh D., Girish R. Decolorization and detoxification of sulfonated toxic diazo dye CI Direct Red 81 by Enterococcus faecalis YZ 66. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2014; 12 (1): 151.

(3) Dos Santos AB., Cervantes FJ., van Lier JB. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology* 2007; 98 (12): 2369-2385.

(4) Saratale RG., Saratale GD., Chang JS., Govindwar SP. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2011; 42 (1): 138-157.

(5) Rani C., Jana A., Bansal A. Potential of different white rot fungi to decolourize textile azo dyes in the absence of external carbon source. *Environmental technology* 2012; 33 (8): 887-896.

(6) Chen K., Wu J., Liou D., Hwang S. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology* 2003; 101 (1): 57-68.

(7) Nigam P., Banat IM., Singh D., Marchant R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochemistry* 1996; 31 (5): 435-442.

(8) Rathod JV. Cloning and heterologous expression of genes involved in azo dye decolorization and metabolic engineering for efficient bioremediation. [Dissertation]. India: University of Baroda; 2013.

(9) Balapure KH., Jain K Chattaraj S., Bhatt NS., Madamwar D. Co-metabolic degradation of diazo dye—Reactive blue 160 by enriched mixed cultures BDN. *Journal of hazardous materials* 2014; 279: 85-95.

(10) Asad S., Amoozegar MA., Pourbabaee AA., Sarboloki MN., Dastgheib SMM. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource technology* 2007; 98 (11): 2082-2088.

(11) Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of molecular biology* 1961; 3 (2): 208-218.

(12) Gerhardt P., Murray R., Wood WA., Krieg NR. *Methods for general and molecular bacteriolog*: American Society for Microbiology Washington, DC; 1994.

(13) Baron EJ., Finegold SM., Bailey, S. *Diagnostic Microbiology*. 8th ed. St.louis: Mosby; 1990.

(14) Kagalkar AN., Jagtab UM., Jadhav JP., Bapat VA., Govindwar SP. Biotechnological strategies for phytoremediation of the sulfonated azo dye Direct Red 5B using Blumea malcolmii Hook. *Bioresource technology* 2009; 100 (18) : 4104-4110.

(15) Dos Santos AB., De Madrid MP., De Bok FAM., Satms AJM., Van lier JB., Cervantes FJ. The contribution of fermentative bacteria and methanogenic archaea to azo dye reduction by a thermophilic anaerobic consortium. *Enzyme and microbial technology* 2006; 39 (1): 38-46.

(16) Zhang Y., Jing Y., Zhange Jingxin., Sun L., Quan X. Performance of a ZVI-UASB reactor for azo dye wastewater treatment. *Journal of chemical technology and biotechnology* 2011; 86 (2): 199-204.

(17) Khalid A., Arshad M., Crowley DE. Decolorization of azo dyes by Shewanella sp. under saline conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 79 (6): 1053-1059.

(18) Salah Uddin M., Zhou J., Qu Y., Guo J., Wang P., Zhao LH. Biodecolorization of azo dye acid red B under high salinity condition. *Bull Environ Contam Toxicol* 2007; 79 (4): 440-444.

(19) Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008; 15 (2): 74-92.

(20) Siroosi M., Amoozegar MA., Khajeh K., Habibi Rezaei M., Fazeli M. Purification and characterization of an extracellular halophilic and organic solvent-tolerant amylopullulanase from a haloarchaeon, Halorubrum sp. strain Ha25. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (7): 1-14.

(21) Dhanve R., Shedbalkar U., Jadhav J. Biodegradation of diazo reactive dye Navy Blue HE2R (Reactive Blue 172) by an isolated Exiguobacterium sp. RD3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2008. 13 (1): 53-60.

(22) Khan R., Bhawana P., Fulekar MH. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2013; 12 (1): 75-97.

(23) Pearce CI., Loyd JR., Guthrie JT. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: *a review. Dyes and pigments* 2003: 58 (3): 179-196.

(24) Valentine DL. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5 (4): 316-323.

(25) Sahasrabudhe MM., Salatale RG., Saratale GD., Pathade GR. Decolorization and detoxification of sulfonated toxic diazo dye CI Direct Red 81 by Enterococcus

faecalis YZ 66. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2014; 12 (1): 151.

(26) Moosvi S., Kehaira H., Madamwar D. Decolorization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; 21 (5): 667-672.

(27) Wuhrmann K., Mechsner KI., Kappeler Th. Investigation on rate determining factors in the microbial reduction of azo dyes.*European journal of applied microbiology and biotechnology* 1980; 9 (4): 325-338.

[1]- Merck
[2]- CIBA
[3]- Marmur
[4]- Polymerase Chain Reaction (PCR)
[5]- Iranian Biological Resource Center
[6]- Asad
[7]- Khalid
[8]- Salah