شیمی نساجی

روش بیولوژیکی جهت بی‌رنگ‌سازی رنگزای آزو: فناوری پاک برای کاهش بار آلودگی در پساب رنگزا

مترجم: عباس حاجی پور

چکیده

باکتری منفرد و شناخته شده با عنوان باسیلوس سرئوس (B. cereus) از پساب خروجی دباغی برای بی رنگ کردن رنگزای آزو مورد استفاده قرار گرفت. این نژاد به سرعت نمونه رنگزای سیاه اسیدی که متعلق به دسته رنگزاهای آزو می‌باشد را بی رنگ می-کند. فعالیت بهینه باسیلوس سرئوس در pH ۷/۳، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در طول ٤ روز بدست آورده شد. سرعت بی رنگ کردن بدست آورده شده برای شرایط متلاطم و ساکن ۸۰ و ۹٦٪ بود. آنالیز طیف‌های UV-vis نشان داد که پیک‌های موجود در منطقه مرئی رنگزای تصفیه شده، از بین می‌رود که بی رنگ شدن کامل رنگزا را نشان می‌دهد. آنالیز FT-IR برای نمونه‌های تصفیه شده با B. cereus، انتقال پیوند آزو داخل N2 یا NH3 یا مخلوط آنها را به داخل زیست توده کامل را نشان داد. حضور آمین آروماتیک در نمونه بی رنگ شده، وجود فعالیت آزو ردوکتاز را نشان داد. آنالیز طیف‌های وزنی، تبدیل رنگزای آزو به متابولیت‌های میانی جدید از قبیل p-نیترو آنیلین، ۸،۲ دی آمین، ٦،۳ دی تیو ۱- نفتانول و ۸،۲ دی آمینو-۱- نپ تالول با وزن مولکولی به ترتیب ۱۳۹، ۲٤۰ و ۱۷٤ را نشان داد. مقادیر COD و TOC نمونه عمل شده با B. cereus به ترتیب کاهش ۸۵ و ۸۷ درصدی در طول ۱۲۰ ساعت نشان داد.

مقدمه

از وقتی که بشر بوجود آمد، مردم برای نقاشی و رنگرزی اطراف خود، پوست‌ها و لباس‌ها، رنگ ها استفاده کرده است. پیگمنت‌های غیرآلی از قبیل دوده، اکسید منگنز، سنگ آهن، و خاک سرخ برای رنگی کردن وسایل مورد استفاده قرار گرفت. رنگزاهای مختلف استفاده می‌شوند و در بین اینها، رنگزاهای آزو نقش مهمی در صنعت چرم به دلیل آفینیته قوی اتصال به الیاف کلاژن بازی می کنند اما تجزیه رنگزاهای آزو آسان نیست و به عنوان عوامل سرطان‌زا شناخته می‌شوند.

رنگزاهای آزو، بزرگترین گروه از رنگزاهای سنتزی و پیگمنت‌ها با کاربرد صنعتی، به دلیل سنتز نسبتا ساده آنها و تعداد و انواع تقریبا نا محدود گروه ها استخلافی، می‌باشند. رنگزاهای آزویی که ترکیبات آروماتیک هستند و گروه‌های –N=N– دارند، مهمترین و بزرگترین دسته از رنگزاهای سنتزی استفاده شده در کاربردهای تجاری می‌باشند. آنها به عنوان ترکیبات زنوبیوتیک مورد توجه هستند که به فرآیندهای تجزیه طبیعی بسیار مقاوم هستند. آنها بزرگترین و متنوع‌ترین دسته از رنگزاها هستند و به صورت وسیع در صنایع چرم استفاده می‌شود. گروه‌های آزو عموما به حلقه‌های بنزنی و نقتالین متصل می‌باشند اما همچنین می‌تواند به گروه‌های هیتروسیکلیک آروماتیک و آلیفاتیک متصل شوند. ساختار اصلی مولکول رنگزای آزو می‌تواند Ar–N=N–R باشد. رنگزاهای آزو استفاده شده در صنعت چرم تنها سبب مشکلات آلودگی نمی‌شوند، بلکه برای زندگی‌های طبیعی موجود در آب نیز سمی هستند. از این رو حذف رنگزا از امری ضروری است.

تکنیک‌های فیزیک و شیمیایی شامل فیلتراسیون غشائی، انعقاد و لخته سازی، رسوب کردن، شناورسازی، جذب، تبادل یون، استخراج جفت یون، معدنی شدن فرا صوت (اولتراسونیک)، الکترولیز، اکسیداسیون پیشرفته (کلر زنی، سفیدگری، ازناسیون، اکسیداسیون فنتون، اکسیداسون فوتوکاتالیتی)، و کاهش شیمیایی می‌باشد. در این میان، تجزیه رنگزا با استفاده از مواد بیولوژیکی، دوست دار طبیعت است و مزایایی نسبت به سیستم‌های دیگر دارد. انتظار می‌رود که کاربرد سیستم بیولوژیکی برای تخریب رنگزا مناسب باشد زیرا از انتقال آلودگی از یک بخش محیط زیست به دیگر بخش‌ها جلوگیری می‌کند. مطالب در دسترس درباره بی رنگ کردن رنگزاها با استفاده از باکتری توسط افراد مختلف گزارش شده است. بی رنگ کردن میکروبی دوست دار محیط زیست است و از نظر هزینه با روش‌های تجزیه شیمیایی قابل مقایسه می‌باشد. در این بررسی یکی از رنگزاهای معروف

آزو مـورد اسـتفاده در عملیـات عمـل‌آوری چـرم کـه عمومـا از پسـاب رنگـرزی جـدا می‌شـود، بـا اسـتفاده از باسـیلوس سـرئوس بـی رنـگ شـد.

مواد و روش‌ها

مواد

رنگزای Acid Black 20470 (سـیاه اسـیدی) از Indo Colortex Ltd، Chennai، هنـد تهیـه شـد. B.cereus از پسـاب رنگـرزی در CLRI جـدا شـد. دی کرومـات پتاسـیم، اسـید سـولفوریک، سـولفات آمونیوم آهن، اسـتونیتریل، برمید پتاسـیم از درجه AR از Sigma تهیـه شـدند.

نژاد باکتری

باکتـری کـه بـا اسـم B. cereus شـناخته می‌شـود از پسـاب دباغـی، جمـع شـده در CLRI Chennai، جـدا شـد. میکروارگانیسـم‌ها بـر روی صفحـات با چندیـن رنگزای چـرم بـه عنـوان منبـع کربـن واحد، کشـت شـدند.

سـپس نژادهـای جداشـده بـه محیـط کشـت پایـه تلقیـح شـد و بـه صـورت عادی در دمـای ۳۷ درجـه سـانتیگراد در محیـط بوشـنل و هـاس (BHM) کـه حـاوی $MgSo_4$ 0.2، $Cacl_2$ 02.0، $KH2PO_4$ 1.0، NH_4No_3 1.0، $FeCl_3$ 0.05، گلوکـز ۰/۹، عصـاره مخمـر ۰/۹ گـرم بـر لیتـر بـود در pH ۷ رشـد داده شـد.

فعالیت باسیلوس سرئوس

فعالیـت باسـیلوس سـرئوس در pH، زمـان تکثیـر، دمـا، و شـرایط باکتـری بـر روی بـی رنـگ کـردن رنگـزا مـورد بررسـی قـرار گرفـت. در هـر آزمایـش شـرایط بهینـه بدسـت آمـده از نتایـج قبلـی در نظـر گرفتـه شـدند. محدوده‌هـای pH از ۵/۵ تـا ۹/۵، محـدوده دمـا از ۲۰ تـا ۵۰ درجـه سـانتیگراد، زمـان تکثیـر از ۲۴ تـا ۱۴۴ سـاعت و انـدازه باکتـری از ۵ تـا ۳۰ بـرای مطالعـه فعالیـت انتخـاب شـدند. در هـر آزمایـش شـرایط بهینـه بدسـت آمـده از آزمایشـات قبـل در نظـر گرفتـه شـدند.

سنجش آنزیم

سـنجش تمـام آنزیم‌هـا (آزوردوکتـاز) در کـووت کوارتـز بـا حجـم نهایـی واکنـش ۱ ml انجـام شـد. فعالیـت آنزیـم بوسـیله اندازه‌گیـری کاهـش در چگالـی نـوری بـرای رنگـزای آزو (۴۳۰ نانومتـر بـرای Acid Black) بوسـیله اسـپکتروفتومتر، UV–vis، Shimadzu UV—1601PC بررسـی شـد.

۱ ml مخلـوط واکنـش حـاوی ۲۵ mM بافـر فسـفات پتاسـیم pH ۷، غلظت‌هـای مختلـف رنگـزای آزو Acid Black (۱۷ و ۳۱ µM)، غلظت‌هـای مختلـف NADH (۰/۱ mM، ۰/۵ mM) و کشـت ۱۰۰ µl بـرای ارزیابـی مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. آنزیـم دناتـوره شـده توسـط جـوش و اضافـه کـردن چنـد قطـره از HCl بـه عنـوان شـاهد بـرای تمـام آزمایشـات سـنجش آنزیـم مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. یـک واحـد فعالیـت آنزیـم بـه صـورت مقـدار آنزیـم کـه بـی رنـگ کـردن ۱ µM از رنگـزای آزو بـر دقیقـه را سـرعت می‌بخشـد، تعریـف می‌شـود. واکنش‌هـای آنزیـم بـه صـورت هـوازی در دمـای اتـاق انجـام شـدند و واکنش‌هـا بـا اضافـه کـردن آنزیـم شـروع شـدند. تمـام واکنش‌هـا ۳ بـار انجـام شـدند. آزمایـش دوره زمانـی بـرای ۲ متـر انجـام شـد و بررسـی‌ها هـر چنـد ثانیـه انجـام می‌شـد.

بی رنگ کردن Acid Black

ارزیابی‌هـا در ارلـن مایـر ۱۰۰ ml حـاوی ۵۰ ml مـاده مایـع انجـام شـدند. سـلول هـای B. cereus جمـع آوری شـده از صفحـات آگار (BHM، آگار، Acid Black) بـه صـورت جداگانـه و مخلـوط شـده بـه مـاده تلقیـح شـدند. کشـت‌ها در دمـای بهینـه در ۳۷ درجـه سـانتیگراد تحـت همـزن مغناطیسـی در دور ۱۵۰ rpm تکثیـر شـدند. نمونـه شـاهد بـدون عملیـات باکتریایـی انجـام شـد. درصـد بـی رنـگ کرن بدسـت آورده شـده بوسـیله اسـپکتروفتومتر UV–vis بوسـیله پایـش چگالـی نوری در ۶۰۰ nm تعییـن شـد و سـپس طبـق رابطـه زیـر محاسـبه شـد:

$$\text{Reduction}\% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \qquad (۱)$$

بطوریکه، C_0 جذب اولیه؛ C_1 جذب نهایی

اسپکترومتری جرمی

تمـام طیف‌هـای جرمـی بـا اسـتفاده از اسـپکترومتر جرمـی زمـان پـرواز (time–of–flight mass spectrometer) ۲ متـر خطـی دسـت سـاز بدسـت آورده شـدند. تجزیـه و یونیزاسـیون نمونه‌هـا بـا اسـتفاده از خروجـی ۳۳۷ nm از لیـزر نیتـروژن پالسـی (مـدل VSL-337 ND–T، Franklin.Laser Science Inc، MA) انجـام شـد.

لیـزر نیتـروژن بـر روی سـطح نمونـه بـه شـکل نقطـه بیضـی شـکل ۰/۲ mm × ۰/۱ متمرکـز شـد. انرژی‌هـای پالـس لیـزر در محـدوده ۶۰ µJ–۲۰ مـورد اسـتفاده قـرار گرفتنـد. بـرای اسـتخراج یـون، پتانسـیل شـتاب دهنـده ۲۵ kV در منبـع اسـتفاده شـد.

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

محلـول رویـی آزاد سـلول رنگـزای بـی رنـگ شـده و رنگـزای اصلـی ۲ بـار بوسـیله حجـم برابـر از n– بوتانـول اسـتخراج شـدند. عصاره‌هـای مخلـوط در روی تبخیـر کننـده خـلاء چرخشـی (Buchii RII4، سـوئیس) غلیـظ شـدند. نمونه‌هـای غلیـظ شـده، بـر روی صفحـات سـیلیکا ژل TCL HF_{254} بـا اسـتفاده از هگزان/اسـتات اتسـل/متانول (۲:۳:۵ v/v) بـه عنـوان حـلال پیشـرفته، دوبـاره حـل شـدند. کروماتوگرام‌هـای دوبـاره حـل شـده تحـت نـور UV (۲۵۴ nm) و بوسـیله تمـاس بـا بخـارات یـد، مشـاهده شـدند.

آنالیز UV–vis

آنالیـز محلول‌هـای آزاد سـلول (۵ ml) خروجـی نمونه‌هـای بـی رنـگ شـده در محدوده ۸۰۰–۲۰۰ nm با اسـتفاده از اسـپکتروفتومتر UV 1601 (Shimadzu، ژاپـن) بـرای مشـاهده تغییـرات طیـف بـه دلیـل انتقـال زیسـتی رنگـزا پویـش شد ند .

آنالیز FT-IR

شـاهدها و نمونه‌هـا خشـک شـدند و بـا KBr (۱:۲۰۰؛ ۰/۰۲ از نمونـه بـا KBr در وزن کل ۰/۴) مخلـوط شـدند. نمونه‌هـا سـپس پهـن شـدند، در دمـای ۶۰ درجـه سـانتیگراد بـرای مـدت ۲۴ سـاعت جـدا شـدند و بـرای بدسـت آوردن صفحـات شـفاف IR پـرس شـدند. طیف‌هـای جذبـی FT–IR نمونه‌هـا بـا اسـتفاده از

طیف FT-IR اسپکتروفتومتر Perkin-Elmer 2000 ثبت شدند. طیف‌ها در محدوده پویش cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ ذخیره شدند. FT-IR در ابتدا برای پویش سیگنال پس زمینه، با نمونه شاهد KBr خالص کالیبره شد و سپس نمونه آزمایش پویش شد.

اندازه‌گیری اکسیژن مورد نیاز شیمیایی (COD) و کل کربن آلی (TOC)

اکسیژن مورد نیاز شیمیایی بوسیله روش استاندارد دی کرومات پتاسیم اندازه‌گیری شدند.

وجود کربن آلی در نمونه با استفاده از آنالیزور TOC (Shimadzu 5000) با تزریق اتوماتیک نمونه بر طبق روش استاندارد بدست آورده شدند.

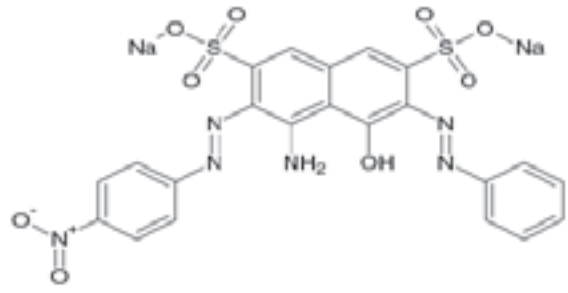
نتایج و بحث

باسیلوس سرئوس در بی رنگ کردن Acid Black بسیار موثر بود. باکتری متعلق به تشکیل قارچ، می‌توانست حرکت کند و در محیط به سرعت رشد کند و برای بی رنگ کردن Acid Black استفاده شد. رنگزاهای آزو در فرآیند رنگرزی به دلیل پیوندهای –N=N– که به بهره مند شدن ماده به خواص خوب رنگرزی کمک می‌کند، نقش مهمی بازی می‌کنند. اشکال رنگزای آزو مشکل بودن شکستن پیوند دوگانه پیوندهای –N=N– می‌باشد. برای شکستن پیوندهای –N=N–، باکتری مناسب برای بی رنگ کردن رنگزا باید استفاده شود. در این بررسی، Acid Black که متعلق به دسته آزو می‌باشد، در نظر گرفته شد و بی رنگ کردن موثر آن با استفاده از نژاد جدا شده B. cereus مورد بررسی قرار گرفت.

بی رنگ کردن Acid Black

در این بررسی، B. cereus برای بی رنگ کردن Acid Black، یکی از رنگزاهای اصلی مورد استفاده در فرآیند رنگرزی، استفاده شد. ساختار رنگزا و وزن مولکول در شکل ۱ ارائه شده است.

وزن مولکولی رنگزا ۵۷۰ است و ترکیب مولکولی، C= ۵۶/۷۹، H= ۸/۱۴، N= ۱۹/۳۱، و O= ۱۵/۷۶٪ می‌باشد. N=N گروه اصلی شیمیایی است که گروه آزو در رنگزا را ارائه می‌دهد و اتصال دوگانه بین N و N بسیار قوی است و مواد شیمیایی قوی یا باکتری یا آنزیم برای شکستن اتصال مورد



شکل ۱. ساختار شیمیایی رنگزای Acid Black 20470 (سدیم (Z ۶)-۳-(۲-(۴-نیتروفنیل)-۶-(۲-فنیل دیازنیل)-۴-آمینو-۵-هیدروکسی نفتالین-۲، ۷-دی سولفونات)، وزن مولکولی ۵۷۰.

نیاز است. ساختارهای شیمیایی رنگزا به مقدار زیادی سرعت بی رنگ کردن را تحت تاثیر قرار می‌دهد و بازده بی رنگ کردن به ساختارهای رنگزا آزو محدود می‌باشد. رنگزا با ساختاررهای ساده و وزن‌های مولکولی پایین معمولا سرعت‌های زیاد در حذف رنگ نشان می‌دهند، در حالیکه حذف رنگ با استخلافات زیاد؛ وزن مولکولی بالاتر رنگزاها، بسیار سخت است.

شرایط رشد باسیلوس سرئوس

بی‌رنگ کردن رنگزا بوسیله B. cereus در pH، دما، مدت رشد، و شرایطهای باکتری مختلف انجام شد و در شکل S_1–S_4 ارائه شده است. از شکل مشاهده می‌گردد که سرعت بی رنگ کردن با افزایش در pH از ۵/۰ تا ۷/۳ افزایش می‌یابد. فعالیت بهینه B. cereus در pH ۷/۳ می‌باشد. کشت باکتری عموما سرعت بی رنگ کردن بالاتر در pH نزدیک به ۷ را نشان می‌دهد و این مطالعه نیز همین مشابهت را دارد. مشخص شده است که هم Escherichia coil و هم Pseudomonas luteola سرعت بی رنگ کردن بهتر در pH ۷ با سرعت بی رنگ کردن ثابت تا pH ۹/۵ نشان داده اند. فعالیت برحسب سرعت بی رنگ کردن، روند نزولی در هر دو حمام با pH بهینه داشت و نتایج به وضوح نشان می‌دهد که رشد بهتر باکتری معمولا در pH ۹-۷ برای بعضی محیطها به وقوع می‌پیوندد. فعالیت در محدوده دمایی از ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتیگراد افزایش می‌یابد و حداکثر سرعت بی رنگ کردن در ۳۷ درجه ساتیگراد بدست آورده شد. اگر دما بیشتر افزایش یابد؛ سبب کاهش فعالیت بی رنگ کردن می‌شود و این ممکن است به این دلیل باشد که کشت باکتری به دما بسیار حساس است. سرعت بی رنگ کردن Acid Black، mgl^{-1} h^{-1} ۱/۵ برای دمای بهینه بدست آورده شد. کاهش فعالیت بی رنگ کردن در دمای بالاتر می‌تواند به از دست دادن فعالیت سلول یا دناتوراسیون آنزیم آزوردوکتاز نسبت داده شود. از شکل S_3 به وضوح مشخص است که حداکثر فعالیت B. Cereus در مدت ۴ روز مشاهده شده است و فعالیت پس از مدت ۴ روز کاهش یافته است. این نتایج مشابه بعضی از قارچهای sp مشاهده شده توسط دیگر محققان است. این نژادهای قارچ حداکثر درصد کاهش رنگزا بعد از ۴ روز دوره رشد در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد برای بی رنگ کردن رنگزای راکتیو و مستقیم نشان دادند. B. cereus سرعت بی رنگ کردن بهتر در اندازه ۲۰ باکتری (٪) نشان داد و سرعت بی رنگ کردن برای باکتری‌های مخصوص mgl^{-1} h^{-1} ۱/۸ بود. علت سرعت بی رنگ کردن بهتر در باکتری‌های مخصوص، فضا برای تکثیر و تولید شدن در اندازه باکتری بزرگتر، می‌باشد. کاهش سرعت بی رنگ کردن در اندازه بزرگتر باکتری‌ها، به دلیل غلظت بیشتر باکتری‌ها و نبود فضای آزاد برای تکثیر کلنی‌ها می‌باشد. کشت B. cereus آنزیم آزوردکتاز تولید می‌کند. فعالیت آزوردکتاز $U\ mg^{-1}$ ۱۱ در حالت خام بدست آورده شد.

سرعت بی رنگ کردن

جدول ۱ سرعت بی رنگ کردن رنگزا بوسیله B. cereus در غلظت‌های مختلف رنگزا بوسیله شرایط ساکن و متلاطم را نشان می‌دهد. از جدول

مشاهده می‌شود که با استفاده از غلظت mg ۱ رنگزا، درصد سرعت بی‌رنگ کردن به ترتیب ۸۰ و ۹۶٪ برای شرایط متلاطم و ساکن می‌باشد. به طور مشابه استفاده از غلظت رنگزا در اندازه ۴ و mg ۵، درصد سرعت بی رنگ کردن برای شرایط متلاطم و ساکن به ترتیب ۷۵؛ ۷۳، ۹۰ و ۸۸٪ می‌باشد. می‌توان دریافت که برای بی رنگ کردن، شرایط ساکن موثرتر از شرایط متلاطم می‌باشد.

نمونه‌های رنگزایی که محلول شفاف نشان می‌دهند به ترتیب از غلظت‌های اولیه ۱ و mg ۲ بودند. این نتایج مشابه با نتایج بدست آمده از دیگر دانشمندان با استفاده از انواع دیگر میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. این نتایج نشان می‌دهند که سرعت بالای همزدن، رشد باکتری و فعالیت بعضی از بسترهای بیولوژیکی از قبیل آنزیم‌ها که نقش مهمی در بی رنگ کردن رنگزا بازی می‌کنند را کاهش می‌دهد. مشخص شده است که با استفاده از B. cereus، رنگزای آزو در سطح بهتری در مقایسه با ارگانیسم‌های دیگر بی رنگ شده است.

محققان بر روی نژادهای باکتری‌ها که قادر به بی رنگ کردن رنگزاهای آزو هستند، گزارشاتی داده‌اند. Kerstersia sp،Xenophylus azovorans KF46F. نژاد VKY1، Xenophaga BN6، .Clostridium spEubacterium sp.، .Butyrvibrio sp یا .Bacteriodes sp به طور وسیعی برای بی رنگ کردن رنگزای آزو مورد بررسی قرار گرفته است. بی رنگ کردن میکروبی رنگزای آزو، موثرتر و سریع‌تر است و در بعضی مواقع منجر به تشکیل آمین آروماتیک می‌شود و این ترکیبات برای انسان سمی هستند. که می‌تواند توسط مرحله اکسایشی بعدی به منظور تجزیه آنها تصحیح شود. در این زمینه، عملیات‌های ترکیبی هوازی و غیرهوازی پساب رنگزا بوسیله کنسرسیوم میکروبی در مقالات رایج می‌باشد.

آنالیز COD و TOC

آنالیز COD و TOC نمونه‌های رنگزا مورد آزمایش مکانیزم غیر مستقیم بی رنگ کردن را بدست می‌دهد و از اینرو آنالیز COD انجام شد و در جدول ۲ و۳ ارائه شد. این جداول حذف رنگ از رنگزا را از صفر تا ۱۲۰ ساعت را نشان می‌دهند. از جداول مشخص است که کاهش COD برای رنگزا ۸۵/۵٪ در مدت ۱۲۰ ساعت بود.

به طور مشابه مقادیر TOC نیز تا ۸۷/۱٪ در مدت ۱۲۰ ساعت کاهش می‌یابند. سرعت کاهش مقادیر COD و TOC رنگزا بوسیله عملیات B. cereus، قابل توجه می‌باشد. این نتایج مطابق با جدول ۱ می‌باشند و نشان

جدول ۱. بی رنگ کردن Acid Black 1 بوسیله B. cereus در غلظت‌های مختلف رنگزا

S. No.	Dye concentration (mg/100 ml)	% of dye degradation	
		Agitation	Static
1.	1	80	96
2.	2	78	93
3.	3	76	92
4.	4	75	90
5.	5	73	88

جدول ۲. کاهش COD پس از عملیات

Dye concentration (mg)	Time duration (h)	COD reduction (in ppm)	% reduction of COD
2	0	1100	0
	24	710	36.5
	48	590	47.3
	72	380	66.2
	96	210	81.1
	120	160	85.5

می‌دهند که حذف رنگزا و سرعت بی رنگ کردن بوسیله B. cereus برای بی رنگ کردن رنگزا، بیشتر از ۸۰٪ است.

آنالیز TLC

مطالعه بی رنگ کردن رنگزا بوسیله B. cereus توسط آنالیز TLC بیشتر تایید شد (شکل ۲). کروماتوگرافی نمونه‌های n-بوتانول استخراج شده رنگزای بی رنگ شده، محو شدن باند مربوط به رنگزای اصلی (مقدار Rf: ۰/۰۴) در خروجی رنگزای بی رنگ شده (مقادیر Rf:۰/۵۱، ۰/۶۰) نشان داد. باندهای مشاهده شده در رنگزای بی رنگ شده نشان دهنده تشکیل واسطهای متابولیک می‌باشد که از رنگزای اصلی متفاوت هستند.

آنالیز طیف‌های جرمی

آنالیز طیف‌های جرمی نمونه‌های رنگزا، قبل و بعد از بی رنگ کردن در شکل ۳ و ۴ ارائه شده است. در طی آنالیز طیف‌های جرمی رنگزا، سه ترکیب تشخیص داده شد و شناسایی گردید.

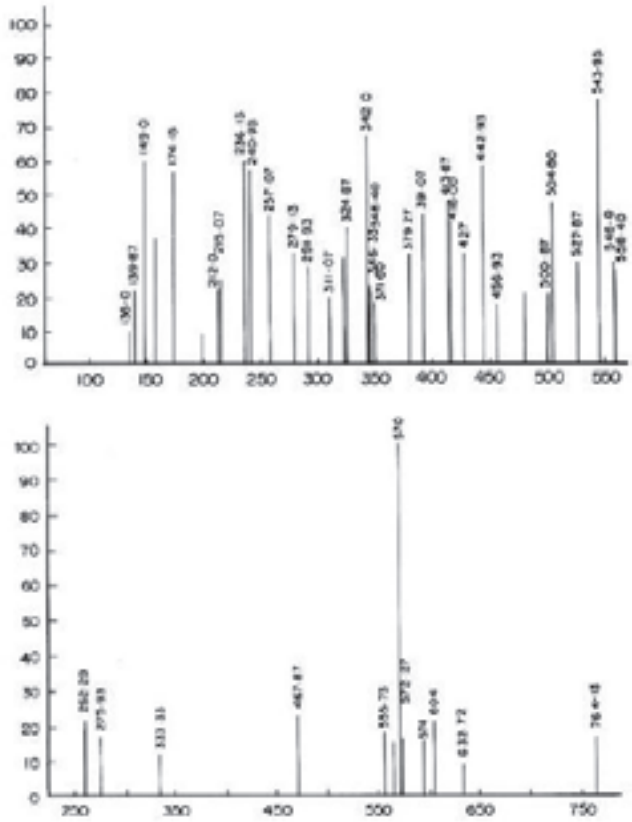
ترکیب‌های شناسایی شده، محصولات گسسته شدن اتصال N–C در مولکول رنگزا و همچنین محصولات پلیمری از اتصال این محصولات با مولکول رنگزای تجزیه شده می‌باشند. نام شیمیایی رنگزای اصلی (سدیم (۶Z)-۳- (۲-(۴-نیتروفنیل)-۶-(۲-فنیل دیازنیل)-۴- آمینو-۵- هیدروکسی نفتالین-۲،۷-دی سولفونات) می‌باشد.

در طول بی رنگ کردن رنگزا با B. cereus، تقریبا ۷ ترکیب یونی پایدار شکل گرفت و از این تعداد سه ترکیب p- نیتروآنیلین، ۲،۸ دی آمین،۶،۳ دی تیو ۱-نفتانول و ۸،۲ دی آمینو-۱- نفتالول شناسایی شدند و در شکل ۴ ارائه شده است.

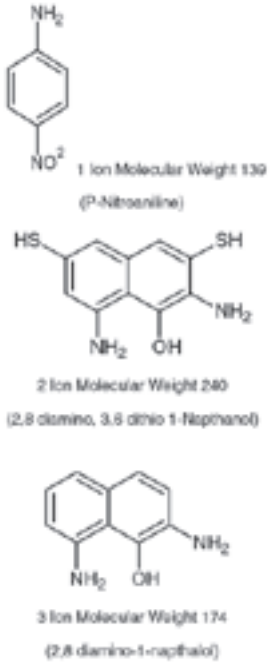
جدول ۳. کاهش TOC پس از عملیات

Dye concentration (mg)	Time duration (h)	TOC reduction (in ppm)	% reduction of TOC
2	0	620	0
	24	405	35.7
	48	290	64.3
	72	175	72.8
	96	120	81.7
	120	80	87.1

شکل ۲. TLC برای نمونه قبل از تخریب شدن و بعد از تخریب شدن (Rf A رنگزای اصلی: ۰/۰۴، Rf B رنگزای بی رنگ شده: ۰/۵۱، ۰/۶۰)



شکل ۳. طیف جرمی رنگزا قبل از بی رنگ کردن و بعد از بی رنگ کردن m/z در محور X و فراوانی نسبی در محور Y (شکل بالا رنگزا را بعد از بی رنگ کردن نشان می‌دهد و شکل پایین رنگزا را قبل از بی رنگ کردن نشان می‌دهد.



شکل ٤. ساختارهای متابولیت‌های واسط (نمونه بی‌رنگ شده)

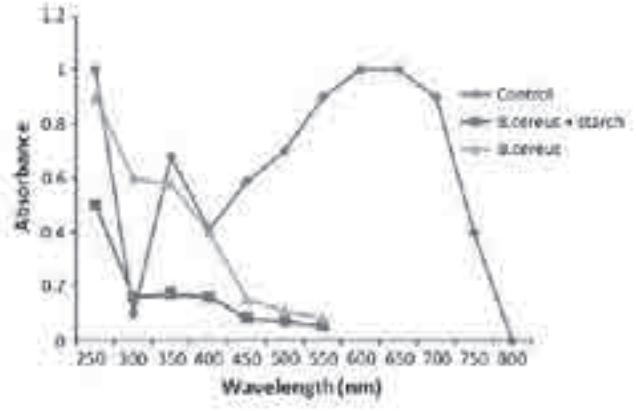
وزن مولکولی این ترکیبات ۱۳۹، ۲۴۰ و ۱۷۴ به ترتیب برای p- نیتروآنیلین، ۲،۸ دی آمین،۶،۳ دی تیو ۱-نفتانول و ۸،۲ دی آمینو-۱- نفتالول بود.

آنالیز UV–visible بی رنگ کردن رنگزا

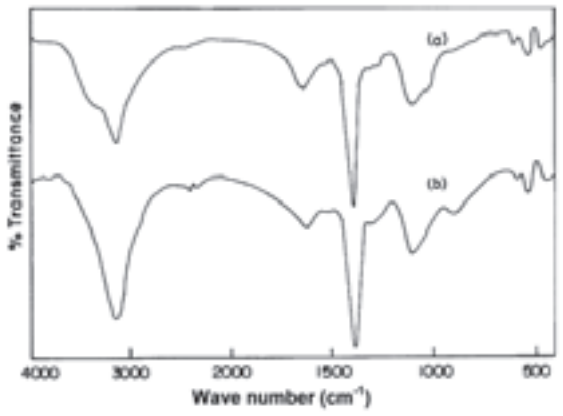
بی رنگ کردن رنگزا بوسیله B.cereus با استاده از آنالیز UV–Vis بررسی شد و در شکل ۵ ارائه شده است. دو پیک در ۳۰۰ و ۶۰۰ nm برای رنگزای تصفیه نشده وجود دارد. به طور مشابه برای رنگزای تصفیه شده با B.cereus، پیک‌های جذبی در منطقه مرئی محو شده است که نشان دهنده بی رنگ شدن کامل می‌باشد. در طیف UV، کاهش در جذب پیک‌ها در ۲۲۰ و ۳۲۰ nm به ترتیب مربوط به حلقه‌های بنزن و نفتالین می‌باشد و تشکیل پیک جدید در ۳۱۰ nm نشان داد که تخریب کاهشی ساختار مزدوج آزو چند پیک باریک از حلقه‌های آروماتیک در طیف‌ها ایجاد می‌کند. علاوه بر آن، مشاهده شده است که این واکنش، با کاهش در جذب پیک مرئی در مرحله اول عملیات، یک فرآیند چند مرحله ای است و جذب با توجه به زمان در تمام طیف‌های UV–vis به علت بی رنگ کردن B.cereus بیشتر کاهش می‌یابد. محو شدن دو پیک در نمونه مورد آزمایش، تقریبا بی رنگ کردن کامل رنگزا با شکستن اتصال آزو را نشان می‌دهد.

مکانیزم حذف رنگ

آنزیمی که عامل بی رنگ کردن رنگزاهای آزو است، مورد بررسی قرار گرفت. رنگزاهای آزو، بعضی از آنها سرطان زا هستند، عموما توسط باکتری‌ها، بوسیله آزردوکتازها که کاهش NAD(P)H وابسته را تسریع می‌کنند، به آمین‌های بی رنگ آروماتیک تغییر می کنند. آمین‌های حاصل بیشتر به صورت هوازی بوسیله باکتری‌ها تخریب شده اند. بعضی از باکتری‌ها قابلیت تخریب رنگزاهای آزو هم به صورت هوازی و هم



شکل ۵. مطالعه اسپکتروفتومتری UV–vis بی‌رنگ کردن رنگزا



شکل ۶. نمونه‌های FT–IR رنگزا، قبل و بعد از بی رنگ کردن

به صورت غیر هوازی را دارند. تخریب کننده گیاهی قارچ پوسیدگی سفید می‌تواند رنگزاهای آزو را با استفاده از تعدادی از اکسیدازها تجزیه کند که در کاهش خارج سلولی رنگزاهای آزو شرکت می‌کند.

Staphylococcus sp. جدا شده از خاک در تصفیه پساب نساجی، قادر به بی رنگ کردن رنگزای آزو سولفونه شده Congo red بود. آزردوکتاز یک آنزیم مهم معتبر برای تخریب کاهشی رنگزای آزو در بین گونه‌های باکتری می‌باشد. از آنجایی که تنفس هوازی می تواند بر استفاده از NADH غالب شود، و بنابراین از انتقال الکترون از NADH به اتصالات آزو جلوگیری می کند، حضور اکسیژن عموما مانع فعالیت کاهشی اتصال آزو می شود. بعلاوه، مدل‌های مختلف برای کاهش های غیر خاص رنگزاهای آزو یا فلاوین‌های کاهش یافته از طریق غشاء سلول، یا کاهش خارج سلولی رنگزاهای آزو بوسیله باکتری‌های غیرهوازی، اخیرا پیشنهاد شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که کاهش رنگزای آزو یک مکانیزم نژادی خاص است که می‌تواند بوسیله یک آنزیم آزردوکتاز انجام شود.

آنالیز FT-IR

آنالیز طیف‌های FT-IR در شناسایی ترکیبات که از اتصالات آزو به زیست توده انتقال می‌یابند، بسیار مفید است. شکل ۶ طیف‌های FT-IR رنگزا که با B. cereus تصفیه شده اند و عمل نشده اند، را نشان می‌دهد. باندهای قرار گرفته در محدوده ۱۶۳۰ cm-1–۱۶۱۰ و ۱۳۱۲ cm-1 به ترتیب به علت اتصالات آزو N=N– در ساختار آروماتیک و کششی –N=N– در ترکیبات استخلافی α می‌باشند. این پیک ها در طول عمل B. cereus کاهش می یابند که نتایج قبلی UV–vis درباره شکستن اتصالات آزو را تایید می کند (شکل ۶). پیک مشاهده شده در $1642\ cm^{-1}$ به علت ترکیب گروه‌های C=C و C=O است که نشان می دهد که این پیک می تواند به گروه کربونیل در اسید کربوکسیلیک، کتون، استر یا گروه‌های متصل شده آلدئید متصل به یک حلقه آروماتیک متعلق باشد. در واقع هیچ پیک جدیدی بین ۳۳۰۰ و ۳۵۰۰ cm-1 که مربوط به اتصالات آزو و گروه‌های OH در موقعیت α نسبت به پیوند آزو باشد، ظاهر نشده است (شکل ۶). به طور مشابه هیچ پیکی در محدوده بین ۱۳۴۰ و $1250\ cm^{-1}$ (شکل ۶) که مربوط به NH_2– ظاهر نشده است که نشان می دهد که پیوند آزو می تواند به N_2 یا NH_3 منتقل شده باشد یا در زیست توده شرکت کرده باشد. حضور آمین آروماتیک در نمونه بی رنگ شده، وجود فعالیت آزردوکتاز را نشان می‌دهد. گزارش شده است که ترکیبات آزو با گروه‌های هیدروکسیل یا آمین بیشتر از گروه‌های متیل، متوکسی، سولفو یا نیترو احتمال دارد تجزیه شوند. معمولا، حضور سولفونات‌ها در ساختارهای رنگزای راکتیو سبب مقدار کم حذف رنگ می‌شود. با این حال، برای رنگزاهای مستقیم که معمولا مقدار بالاتری از حذف رنگ غیر وابسته از تعداد گروه‌های سولفونات در ساختار رنگزا را نشان می دهند، کاربرد ندارد، و این ایده که ممانعت فضایی و تعداد اتصالات آزو برای زمان‌های مختلف بی رنگ کردن مهم می‌باشند را تقویت می کند.

نتیجه‌گیری

بی رنگ کردن رنگزای آزو به دلیل سرطان زا بودن و تجزیه‌پذیری، بسیار مهم است. حضور رنگزا در پساب برای سلامتی مضر است، بنابراین این مطالعه برای تلاش به منظور جدا کردن یک میکروارگانیسم که به صورت موثر رنگزای آزو را بی رنگ کند، انجام شد. فعالیت بهینه B. cereus در pH ۷/۳، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، و رشد به مدت ۴ روز بدست آورده شد.

سرعت بی رنگ کردن رنگزا که با B. cereus عمل شده بود، ۹۶٪ برای حالت ساکن و ۸۰٪ برای حالت متلاطم نشان داد. که این به علت فعالیت بهینه B. cereus و ترشح آنزیم بود که نقش مهمی در بی رنگ کردن رنگزای آزو بازی می‌کند. مقادیر COD و TOC به ترتیب تا مقدار مناسب ۸۵ و ۸۷٪ در مدت ۱۲۰ ساعت کاهش یافت. آنالیز طیف‌های جرمی، تبدیل رنگزای آزو به متابولیت واسط از قبیل p–نیترو آنیلین، ۸،۲ دی آمین، ۶،۳ دی تیو ۱– نفتانول، و ۸،۲ دی آمینو–۱– نپ تالول با وزن مولکولی به ترتیب ۱۳۹، ۲۴۰ و ۱۷۴ را نشان داد. آنالیز طیف‌های UV–vis نشان داد که پیک‌های موجود در ناحیه مرئی در رنگزای تصفیه نشده، در رنگزای تصفیه شده محو شدند، که نشان دهنده بی رنگ کردن کامل است. آنالیز FT-IR نشان داد که پیک‌های مرتبط به اتصالات آزو پس از بی رنگ کردن به N_2 یا NH_3 منتقل شده بودند یا در زیست توده شرکت کرده بودند. تمامی نتایج نشان می دهند که با استفاده از B. cereus، رنگزا می تواند در سطح بهتری بی رنگ شود تا مشکلات آلودگی که ناشی از رنگزا می‌باشند، کاهش یابند.