Kharazmi University

Nova Biologica Reperta

Print ISSN: 2423-6330
Online ISSN: 2476-7115

Homepage: https://nbr.khu.ac.ir/

Isolation and Screening of a Bacillus Isolate Capable of Adsorbing the Azo Dye Basic Red 46

Arman Far, Mohammad Hossein[1], Papiran, Reyhaneh[2]✉, Abani, Ali [3] , Azin, Ehsan[4]

1. Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: mharmanfar@gmail.com
2. Corresponding author, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: papiran@khu.ac.ir
3. Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: aliarani278@gmail.com
4. Researcher in Aran Danesh Azma Laboratory, Tehran, Iran. E-mail: Ehsanazin@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 31 December 2025
Received in revised form 31 July 2026
Accepted 09 September 2026
Available online 22 September 2026

Keywords:
Biosorption
Azo dye
Biomass
Isolation
Molecular identification

ABSTRACT

Objective: Azo dyes are group of chemical dyes widely used in various industries. When released into the environment, these dyes cause environmental toxicity and reduce processes such as photosynthesis in aquatic ecosystems. Therefore, the treatment of such wastewater is of great importance. The aim of this study was to isolate a microbial strain capable of removing pollutant compounds.

Method: For this purpose, 18 soil samples were collected from different areas of Behshahr forests. Microbial isolation was then performed, and the obtained isolates were screened for dye removal efficiency in dye-containing solutions.

Results: Among the nine isolates obtained, isolate number 6 was selected as the most efficient strain, achieving 79% dye removal. Molecular identification showed 100% sequence similarity to *Bacillus tropicus* LM1212-W3. Investigation of the effects of dye concentration and adsorbent dosage revealed that increasing both parameters led to an increase in dye removal efficiency. Evaluation of the adsorption capacity of autoclaved biomass showed a significant decrease in dye removal, indicating that dye removal is dependent on the cellular metabolism of *Bacillus* sp. A1.

Conclusions: Based on these results, the studied bacterial biomass is introduced as an effective dye-removal agent, which can be considered promising candidate for the removal of environmental pollutants.

Cite this article: Arman Far, M.H., Papiran, R., Abani,A & Azin, E. (2026). Isolation and Screening of a Bacillus Isolate Capable of Adsorbing the Azo Dye Basic Red 46. *Nova Biologica Reperta*, *13* (2), 1-16. https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132138.0

© The Author(s).
Publisher: Kharazmi University.
DOI: https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132138.0

Introduction

Global industrial expansion and accelerated demographic growth have caused substantial volumes of hazardous wastewater to be discharged into aquatic ecosystems. Among diverse industrial sectors, textile manufacturing operations stand out as leading contributors to water pollution, consuming an estimated 80% of global synthetic colorants. During commercial dyeing, 10% to 15% of the dyestuff fails to bind chemically to synthetic or natural fabric fibers and is subsequently discarded in process effluents. Unprocessed textile wastewater routinely exhibits residual dye concentrations ranging from 100 to 500 mg/L. Beyond aesthetic deterioration, trace amounts of azo compounds impair light penetration in natural water bodies, arresting algal and macrophytic photosynthetic activity. Furthermore, bioaccumulation and metabolic cleavage of the azo linkage under anaerobic conditions generate toxic, mutagenic, and carcinogenic aromatic amines. Discharge of these effluents induces sharp elevations in chemical oxygen demand (COD) and biochemical oxygen demand (BOD), while skewing natural ambient pH equilibria.

To mitigate these environmental risks, conventional physicochemical treatment methods have been widely tested. Nevertheless, extensive industrial deployment remains constrained by inherent operational bottlenecks including rapid membrane fouling, high operating pressures, and frequent filter membrane replacement cycles. Consequently, microbial biosorption and bioaccumulation have gained momentum as sustainable, cost-effective, and environmentally benign alternatives. Unlike pure catalytic biodegradation—which often requires prolonged cultivation, co-metabolic organic carbon inputs, and precisely maintained aeration cascades—biosorption utilizes microbial biomass to bind and concentrate dyes via physicochemical cellular interactions. While various agro-industrial wastes, fungal biomass (*Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*), and microalgae have been explored, bacteria offer distinct operational advantages: rapid growth kinetics, robust mechanical stability, and adaptable cell-wall surface chemistries. Identifying native, autochthonous bacterial isolates from untouched ecological niches provides a viable route to discovering novel environmental remediation strains. In this context, this study details the targeted isolation, taxonomic characterization, and mechanistic biosorption assessment of a premier *Bacillus* strain sourced from northern Iranian forest soils against the recalcitrant commercial azo dye Basic Red 46 (BR46).

Materials and Methods

Autochthonous soil microflora were collected from a depth of 20 cm across 18 undisturbed geographic stations located within the forest regions of Behshahr, Mazandaran Province, Northern Iran. Recovered soil cores were cleared of visible detritus, homogenized through sterile sieves, and dehydrated in a convection oven at 50 °C for 2 h.

Enrichment cultures were established by suspending 1.0% (w/v) dried soil into 250 mL Erlenmeyer flasks containing sterile International Streptomyces Project 2 (ISP2) broth supplemented with fluconazole and nystatin to suppress fungal growth. The cationic azo colorant Basic Red 46 (BR46, commercial textile dye procured from Aran and Bidgol, Isfahan Province, Iran) was introduced at an initial concentration of 100 mg/L. Flasks were agitated in an orbital shaker-incubator at 100 rpm and 28 °C for 48 h. Aliquots displaying marked visual decolorization were serially diluted in sterile 0.9% physiological saline. Spread plating (30 µL) was conducted onto solid ISP2 agar containing antifungal agents, and colonies were incubated aerobically at 28 °C for 24 h to secure pure clonal morphotypes.

Purified bacterial strains were propagated in 250 mL of ISP2 liquid medium (4.0 g/L yeast extract, 10.0 g/L malt extract, and 4.0 g/L D-glucose) at 28 °C and 100 rpm. Microbial biomass was harvested by centrifugation at 4,000 rpm for 10 min, washed twice with sterile physiological saline, and weighed. For the primary biosorption screen, 0.18 g of wet cell biomass from each distinct isolate was introduced into 20 mL of aqueous BR46 solution (C_0 = 100 mg/L) and agitated at 100 rpm and 28 °C for 60 min. Cell-free supernatant was isolated by centrifugation at 4,000 rpm, and residual dye optical density was quantified at λ_{max} = 550nm using a UV-Vis spectrophotometer. Color removal efficiency (R, %) and equilibrium adsorption capacity (q_e, mg/g) were calculated according to:

$$R(\%) = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100$$

$$q_e = \frac{(C_0 - C_t) \times V}{m}$$

where C_0 and C_t represent initial and liquid-phase dye concentrations at contact time t (min), V is solution volume (L), and m is wet biomass mass (g).

Genomic DNA of the superior performing strain was isolated with the Pouya Gene Bacterial DNA Extraction Kit [S1]. The 16S rRNA gene region was amplified by PCR using universal bacterial primers 27F (5'-AAGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). Sanger sequencing was executed by Codon Biotech, aligned via BLASTn against NCBI GenBank, and phylogenetically constructed using Neighbor-Joining in MEGA-X. Operational variables were examined by testing wet biomass dosages from 6.0 to 21.5 g/L and initial dye loadings from 100 to 500 mg/L. Viability dependence was established by comparing vegetative cells against autoclaved biomass (121 °C, 20 min) and cell-free broths. Surface binding functional groups were characterized by FTIR spectroscopy (4,000–400 cm^{-1}) on dry KBr pellets.

Results and Discussion

Isolation across 18 forest soil stations yielded nine distinct bacterial isolates. Screening under standardized biosorption conditions (0.18 g wet biomass in 20 mL of 100 mg/L BR46, 60 min contact) revealed marked differences in decolorization performance (Table 2). Isolate #6 achieved an outstanding dye removal of 79.12±1.31, significantly outperforming all other strains (29.49% to 65.73%), and was selected for detailed polyphasic characterization.

Nucleotide sequence alignment of the amplified 16S rRNA gene revealed 100% identity to Bacillus tropicus strain LM1212-W3. The resulting MEGA-X phylogenetic tree confirmed monophyletic clustering within the genus Bacillus. The sequence was accessioned in NCBI GenBank as Bacillus sp. strain A1 under accession number PX475024. Biochemical and morphological profiling showed that cells were Gram-positive, endospore-forming, motile rods positive for catalase, oxidase, nitrate reduction, and Voges-Proskauer, and negative for indole, methyl red, and H_2S.

Parametric biosorption experiments showed significant dependence on operational variables. Elevating wet biomass from 6.0 g/L to 21.5 g/L increased BR46 removal efficiency from 15.68% to 92.06%. This rise stems directly from greater surface area and higher density of unoccupied functional ligands. Increasing dye concentration from 100 to 500 mg/L at 9.0 g/L biomass resulted in maximum percentage removal at 200 mg/L (83.8%). Equilibrium uptake capacity (q_e) expanded progressively to reach 21.5 mg/g at 500 mg/L, driven by higher trans-boundary mass transfer gradients.

Spectrophotometric scans (400–700 nm) showed collapse of the 550 nm peak without metabolite byproducts. Mechanistic trials revealed that thermally denatured (autoclaved) cells retained only 10.37% removal efficiency compared to 74.44% for viable cells, while cell-free broths showed zero activity. Thus, rapid decolorization requires vegetative cell integrity rather than extracellular enzymatic cleavage.

FTIR spectral deconvolution confirmed functional shifts across hydroxyl, amide, carboxyl, and phosphodiester regions without novel covalent bands, proving that uptake is dominated by multi-ligand physical coordination.

Conclusion

This extended study establishes *Bacillus* sp. strain A1 (NCBI GenBank Accession No. PX475024), isolated from native forest soils of northern Iran, as an effective biosorbent for remediating water contaminated with the commercial textile azo dye Basic Red 46. Unlike conventional bacterial systems that require multi-day aerobic/anaerobic catabolic incubation cycles or supplementary carbon feeding, *Bacillus* sp. strain A1 accomplishes rapid, high-capacity biosorptive dye sequestration within 60 minutes in non-nutrient aqueous environments.

Experimental data verified that color removal is strictly dependent upon vegetative cell viability, achieving up to 92.06% removal at 21.5 g/L biomass dosage, alongside an adsorption capacity of 21.5 mg/g at 500 mg/L dye loading. Spectroscopic FTIR evidence confirmed that uptake is governed by multi-ligand physical interactions—notably electrostatic attraction between the cationic dye molecules and negatively charged carboxylate and phosphodiester surface moieties, combined with extensive hydrogen bonding involving hydroxyl and amine networks.

یافته‌های نوین در علوم زیستی
Homepage: https://nbr.khu.ac.ir/
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۶۳۳۰
شاپا الکترونیکی: ۲۴۷۶-۷۱۱۵
دانشگاه خوارزمی

جداسازی و غربالگری یک جدایه باکتری *Bacillus* توانمند در جذب رنگ آزو Basic Red 46

آرمان‌فر، محمد حسین[۱]، پاپیران، ریحانه[۲]✉، آبانی، علی[۳]، و آذین، احسان[۴]

۱. گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: mharmanfar@gmail.com
۲. گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: papiran@khu.ac.ir
۳. گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: aliarani278@gmail.com
۴. آزمایشگاه آران دانش آزما، تهران، ایران. رایانامه: ehsanazin@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۵/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۱۸
تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۳۱

کلیدواژه‌ها:
جذب زیستی
رنگ آزو
زیست‌توده
جداسازی
شناسایی مولکولی

چکیده

رنگ‌های آزو گروهی از رنگ‌های شیمیایی پر کاربرد در صنایع مختلف هستند. این رنگ‌ها با ورود به محیط زیست موجب ایجاد سمیت در محیط و کاهش فرآیندهای زیستی از قبیل فتوسنتز در محیط‌های آبی می‌شوند. از این رو تصفیه این پساب‌ها از اهمیتی بالایی برخوردار است. هدف از این مطالعه جداسازی سویه میکروبی توانمند در حذف رنگ‌های آزو آلاینده محیط زیست می‌باشد. از این رو ۱۸ نمونه خاک از مناطق مختلف جنگل‌های بهشهر جمع‌آوری شد. در ادامه جداسازی میکروبی انجام و غربالگری جدایه‌های به‌دست آمده در محلول‌های رنگی مورد بررسی قرار گرفت. در در میان ۹ جدایه به دست آمده، جدایه شماره ۶ به عنوان جدایه منتخب با ۷۹٪ حذف رنگ انتخاب شد. شناسایی مولکولی جدایه *Bacillus* sp. strain A1 در این تحقیق تشابه ۱۰۰ درصد آن را به سویه باکتریایی *Bacillus tropicus* strain LM1212-W3 نشان داد. بررسی اثر غلظت رنگ و مقدار زیست‌توده استفاده شده نشان داد که افزایش غلظت رنگ و مقدار زیست‌توده موجب افزایش میزان حذف رنگ از محلول می‌شود. بررسی توان زیست‌توده اتوکلاو شده کاهش قابل توجه در حذف رنگ را نشان داد که این نشان از وابستگی حذف رنگ به متابولیسم سلولی باکتری دارد. با توجه به این نتایج زیست‌توده باکتریایی *Bacillus* sp. strain A1 به عنوان عامل حذف کننده موثری در حذف رنگ Basic Red 46 معرفی می‌شود که می‌تواند کاندیدی مناسب برای حذف آلاینده‌های معرفی شود.

استناد: آرمان فر، محمدحسین؛ پاپیران، ریحانه؛ آبانی، علی و آذین، احسان (۱۴۰۵). جداسازی و غربالگری یک جدایه باکتری Bacillus توانمند در جذب رنگ آزو Basic Red 46، *یافته‌های نوین در علوم زیستی*، ۱۳ (۲)، ۱۶-۱.
https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132138.0

ناشر: دانشگاه خوارزمی.
© نویسندگان.

مقدمه

افزایش روز افزون جمعیت جهان و صنعتی شدن زندگی انسان موجب افزایش تولید پساب‌های حاوی ترکیبات آلاینده شده است. تصفیه پساب‌های حاوی رنگ‌های آزو یکی از چالش‌های صنایع محسوب می‌شود. رنگ‌های آزو بیش از ۷۰ درصد رنگ‌های صنعتی را شامل می‌شوند و حاوی گروه عاملی (–N=N–) هستند. بیش از ۱۰۰ هزار نوع رنگ، به مقدار ۷۰۰ هزار تن در سال تولید و در صنایع مختلف استفاده می‌شوند. در میان صنایع مختلف، صنایع نساجی با مصرف حدود ۸۰٪ از این رنگ‌ها بیشترین میزان استفاده را دارند. حدود ۱۵-۱۰٪ از رنگ‌های مورد استفاده در صنعت نساجی بدون اتصال به الیاف پارچه وارد پساب‌های این صنایع می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده است که غلظت رنگ موجود در پساب‌های صنایع نساجی ۱۰۰-۵۰۰ mg/L می‌باشد (۱, ۲).

از جمله اثرات زیست محیطی این رنگ‌ها می‌توان به جهش‌زایی و سرطان‌زایی، ایجاد آلودگی محیط‌های آبی، به خطر انداختن جان آبزیان، افزایش COD، BOD و تغییر pH آب اشاره کرد (۳, ۴). از این رو استفاده از روش‌های مناسب جهت تصفیه پساب‌ها پیش از رهاسازی به محیط حائز اهمیت است. تاکنون از روش‌های مختلفی جهت حذف ترکیبات آلاینده از پساب‌ها استفاده شده است. از جمله روش‌های فیزیکی و شیمیایی مورد استفاده در حال حاضر برای تصفیه پساب صنایع رنگرزی می‌توان به اولترافیلتراسیون، نانوفیلتراسیون، اسمز معکوس، انعقاد، رسوب‌گذاری، فرآیندهای اکسیداسیون پیشرفته از جمله اوزوناسیون و تبادل یون اشاره کرد (۵). با این حال علی رغم تنوع این روش‌ها اثرگذاری در طیف محدود، پیچیدگی بالا، هزینه بالا، نیمه عمر کوتاه و گرفتگی غشاء در روش‌های فیلتراسیون از جمله معایب این روش‌ها می‌باشد (۴, ۶). در مطالعات اخیر، روش‌های زیستی از جمله جذب زیستی، تجمع زیستی و زیست‌پالایی به عنوان جایگزینی موثر، سازگار با محیط زیست و مقرون به صرفه برای حذف رنگ‌ها پیشنهاد شده است (۷, ۸). جذب زیستی فرآیندی است که در آن رنگ‌ها از محیط اطراف به سطح سلول متصل شده و گاهی با ورود به سلول در ساختارهای درون سلولی انباشته و منجر به افزایش غلظت داخلی ماده می‌شود. این فرآیند نه تنها به حذف رنگ از محیط کمک می‌کند، بلکه می‌تواند در حذف ترکیبات مقاوم به تجزیه نیز عملکرد مناسبی داشته باشد (۹). تاکنون از ساختارهای زیستی متعددی شامل پسماند کشاورزی، پسماندهای صنعتی و مواد طبیعی از جمله پوست گریپ فروت، صدف‌های دریایی و پوست نارگیل به‌عنوان جاذب استفاده شده است (۱۰-۱۳). علاوه بر این تاکنون از گونه‌های قارچی نظیر *Saccharomyce scerevisiae* و *Aspergillus fumigatus* به عنوان منابع سلولی جهت حذف زیستی استفاده شده‌اند (۱۴, ۱۵). باکتری‌ها به علت سرعت رشد بالا و توانمندی در حذف آلاینده‌های مختلف از محیط زیست، میکروارگانیسم‌های توانمندی برای استفاده جهت حذف ترکیبات رنگی موجود در پساب هستند. تاکنون مطالعات متعددی در زمینه استفاده از باکتری‌ها در زمینه حذف انواع مختلفی از آلاینده‌ها صورت گرفته است. با این حال شناسایی گونه‌های میکروبی جدید جهت استفاده برای حذف رنگ‌های آزو از پساب‌های صنایع نساجی بسیار پر اهمیت است. از این رو هدف از این مطالعه جداسازی و غربالگری جدایه‌های میکروبی بومی توانمند در حذف رنگ‌های آزو از پساب نساجی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های میکروبی

جهت جداسازی جدایه‌های میکروبی توانمند در حذف رنگ‌های آزو، نمونه‌های خاک از عمق ۲۰ سانتی‌متری از ۱۸ مکان مختلف در جنگل‌های بهشهر واقع در استان مازندران جمع‌آوری شد (جدول ۱). در ادامه نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده به صورت چشمی از هرگونه ضایعات، پاک‌سازی و جهت یک دست شدن ذرات، الک شدند. خاک‌ها جهت خشک شدن درون آون با دمای ۵۰ ℃ به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. سپس، از نمونه‌های خاک به میزان ۱٪ وزنی-حجمی در محیط کشت broth ISP2 حاوی آنتی‌بیوتیک‌های فلوکونازول و نیستاتین و رنگ Basic Red 46 با غلظت ۱۰۰ mg/L، اضافه و ارلن‌ها به مدت ۴۸

ساعت درون شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ rpm قرار داده شدند. در نهایت از ارلن‌هایی که رنگبری در آن‌ها مشاهده شد، با استفاده از سرم فیزیولوژی رقیق‌سازی انجام شد. برای کشت باکتری‌ها از محیط کشت ISP2 حاوی آنتی‌بیوتیک‌های فلوکونازول و نیستاتین استفاده گردید. در هر پلیت، ۳۰ μL از محیط رنگبری شده رقیق شده به صورت چمنی کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور در دمای ۲۸ ℃ قرار گرفت.

جدول ۱: موقعیت مکانی نمونه‌های خاک تهیه شده جهت جداسازی باکتری‌ها.

Table 1. Location of soil samples collected for bacterial isolation.

شماره نمونه	طول و عرض جغرافیایی	شماره نمونه	طول و عرض جغرافیایی	شماره نمونه	طول و عرض جغرافیایی
۱	36°46'56.5"N 53°32'40.0"E	۷	36°40'11.4"N 53°35'49.9"E	۱۳	36°45'66.1"N 53°39'90.9"E
۲	36°47'24.5"N 53°32'47.6"E	۸	36°40'56.7"N 53°34'06.1"E	۱۴	36°47'38.5"N 53°43'56.5"E
۳	36°39'47.0"N 53°35'28.6"E	۹	36°40'15.5"N 53°37'43.2"E	۱۵	36°47'41.1"N 53°43'98.8"E
۴	36°40'58.5"N 53°34'01.4"E	۱۰	36°40'56.7"N 53°34'06.1"E	۱۶	36°43'90.2"N 53°31'56.8"E
۵	36°07'45.5"N 52°57'56.1"E	۱۱	36°40'09.9"N 53°36'89.1"E	۱۷	36°43'98.7"N 53°29'24.3"E
۶	36°43'42.4"N 53°31'19.8"E	۱۲	36°46'59.2"N 53°40'06.6"E	۱۸	36°37'89.6"N 53°36'62.1"E

غربالگری جدایه‌های میکروبی

برای تهیه زیست‌توده میکروبی، هر یک از جدایه‌های میکروبی در ۲۵۰ mL محیط کشت ISP2 حاوی ۴ g/L عصاره مخمر، ۱۰ g/L عصاره مالت و ۴ g/L گلوکز منتقل شد و در ادامه ارلن‌ها به درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ ℃ منتقل شد. در ادامه محتویات فلاسک‌ها در ۴۰۰۰ rpm، سانتریفیوژ و زیست توده حاصل با استفاده از سرم فیزیولوژی دو مرتبه شست و شو داده شد. به منظور بررسی قابلیت جدایه‌های مختلف در جذب رنگ، از رنگ Basic Red 46 استفاده شد. رنگ Basic Red 46 یکی از رنگ‌های پر مصرف در صنایع رنگرزی کشور می‌باشد و از کارگاه رنگرزی در استان اصفهان، شهر آران و بیدگل تهیه شد. به این منظور ۰/۱۸ g زیست توده تهیه شده از هر یک از جدایه‌ها در ارلن مایرهای حاوی ۲۰ mL محلول رنگ با غلظت ۱۰۰ mg/L منتقل شد. در ادامه فلاسک‌ها به شیکر انکوباتور با ۱۰۰ rpm و دمای ۲۸ ℃ منتقل شد. در نهایت پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۴۰۰۰ rpm جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ nm مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی درصد حذف رنگ از رابطه زیر استفاده شد.

$$\text{حذف رنگ (٪)} = \frac{\text{(جذب نوری نمونه تیمار شده − جذب نوری نمونه شاهد)}}{\text{جذب نوری نمونه شاهد}} \times ۱۰۰$$

جهت محاسبه میزان رنگ حذف شده به ازای هر گرم زیست توده از رابطه زیر استفاده شد.

$$\text{ظرفیت جذب (mg/g)} = \frac{\text{(غلظت رنگ نهایی - غلظت رنگ اولیه)}}{\text{جرم زیست توده}} \times \text{حجم محلول}$$

شناسایی مولکولی جدایه میکروبی منتخب

جهت شناسایی مولکولی جدایه منتخب، استخراج DNA جدایه میکروبی با استفاده از کیت شرکت Pouya Gene انجام، و سپس با استفاده از پرایمرهای 5’-AAGAGTTTGATCATGGCTCAG-3’ و 5’-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3’ مربوط به ژن *16srRNA*، PCR انجام شد. در ادامه قطعه تکثیر شده جهت توالی‌یابی به شرکت کدون ارسال شد. در نهایت با استفاده از دیتابیس NCBI شناسایی جدایه انجام و درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X انجام شد.

جهت بررسی ویژگی‌های موفولوژیکی، رنگ آمیزی گرم برای جدایه منتخب انجام شد. علاوه بر این تست‌های بیوشیمیایی شامل اکسیداز، کاتالاز، نیترات، اندول برای میکروارگانیسم منتخب انجام شد.

بررسی مقدار بهینه زیست‌توده میکروبی منتخب در حذف رنگ

برای تعیین مقدار بهینه زیست‌توده میکروبی در حذف رنگ از محلول رنگی، مقادیر ۶-۲۱/۵ g/L زیست‌توده تر به ارلن‌های حاوی ۲۰ mL محلول رنگی Basic Red 46 با غلظت ۲۰۰ mg/L اضافه و سپس به انکوباتور شیکردار با ۱۰۰ rpm و دمای ۲۸ ℃ منتقل شد. پس از یک ساعت، جذب نوری هر نمونه در طول موج ۵۵۰ nm خوانده شد و درصد حذف رنگ محاسبه شد.

بررسی اثر غلظت رنگ بر میزان جذب توسط زیست‌توده میکروبی

برای تعیین اثر غلظت رنگ بر میزان حذف، مقادیر ۹ g/L از زیست‌توده تر به ارلن‌های حاوی ۲۰ mL محلول رنگی Basic Red 46 با غلظت ۱۰۰-۵۰۰ mg/L اضافه و سپس به انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ rpm و دمای ۲۸ ℃ منتقل شد و بعد از یک ساعت جذب نوری هر نمونه در طول موج ۵۵۰ nm خوانده شد و درصد حذف رنگ محاسبه شد.

به‌منظور بررسی تغییرات طیف جذبی رنگ Basic Red 46 پس از تیمار با زیست‌توده باکتریایی، محلول رنگ با غلظت اولیه ۲۰۰ mg/L تهیه شد. سپس مقدار ۹ g/L از زیست‌توده باکتریایی به ۲۰ mL از محلول رنگ افزوده شد و مخلوط حاصل به انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ rpm و دمای ۲۸ ℃ منتقل شد. نمونه کنترل نیز تحت همان شرایط، اما بدون افزودن زیست‌توده، آماده شد. پس از یک ساعت تماس، نمونه‌ها به‌منظور جداسازی زیست‌توده از محلول، با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس جذب نوری محلول شفاف به‌دست‌آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis در محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. طیف جذب نمونه کنترل و نمونه تیمارشده با یکدیگر مقایسه گردید تا میزان تغییر در شدت جذب و کاهش پیک اصلی رنگ مشخص شود. کاهش شدت جذب در نمونه تیمارشده نسبت به نمونه کنترل، به‌عنوان شاخصی از حذف رنگ توسط زیست‌توده باکتریایی در نظر گرفته شد.

بررسی مکانیسم حذف رنگ

جهت بررسی مکانیسم حذف، غلظت ۹ g/L از زیست‌توده میکروبی، تهیه و در دمای ۱۲۱ ℃ و فشار ۱ اتمسفر برای ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد تا زیست‌توده مرده به دست آید. در ادامه، زیست‌توده مرده پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه به ارلن حاوی ۲۰ mL محلول رنگی Basic Red 46 با غلظت ۲۰۰ mg/L منتقل شد و پس از گذشت یک ساعت از انکوباسیون در انکوباتور شیکردار با ۱۰۰ rpm و دمای ۲۸ ℃ جذب نوری در طول موج ۵۵۰ nm خوانش شد. علاوه بر این، برای بررسی نقش گروه‌های عاملی سطح زیست‌توده در جذب احتمالی ترکیبات رنگی، زیست توده بدون رنگ و زیست توده پس از جذب رنگ پس از خشک شدن در آون با دمای ۵۰ ℃ به مدت ۲۴ ساعت جهت انجام آنالیز FTIR مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

جداسازی و غربالگری جدایه‌های میکروبی

در نتیجه جداسازی میکروبی از ۱۸ نمونه خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های بهشهر استان مازندران، ۹ جدایه میکروبی به دست آمد. بر این اساس، نتایج حاصل از بررسی توانمندی این جدایه‌ها در حذف ترکیبات رنگی نشان داد که جدایه شماره ۶

بیشترین میزان جذب رنگ با مقدار ۷۹٪ را بعد از ۶۰ دقیقه نشان داد (جدول ۲). بر این اساس جدایه شماره ۶ به عنوان جدایه منتخب برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

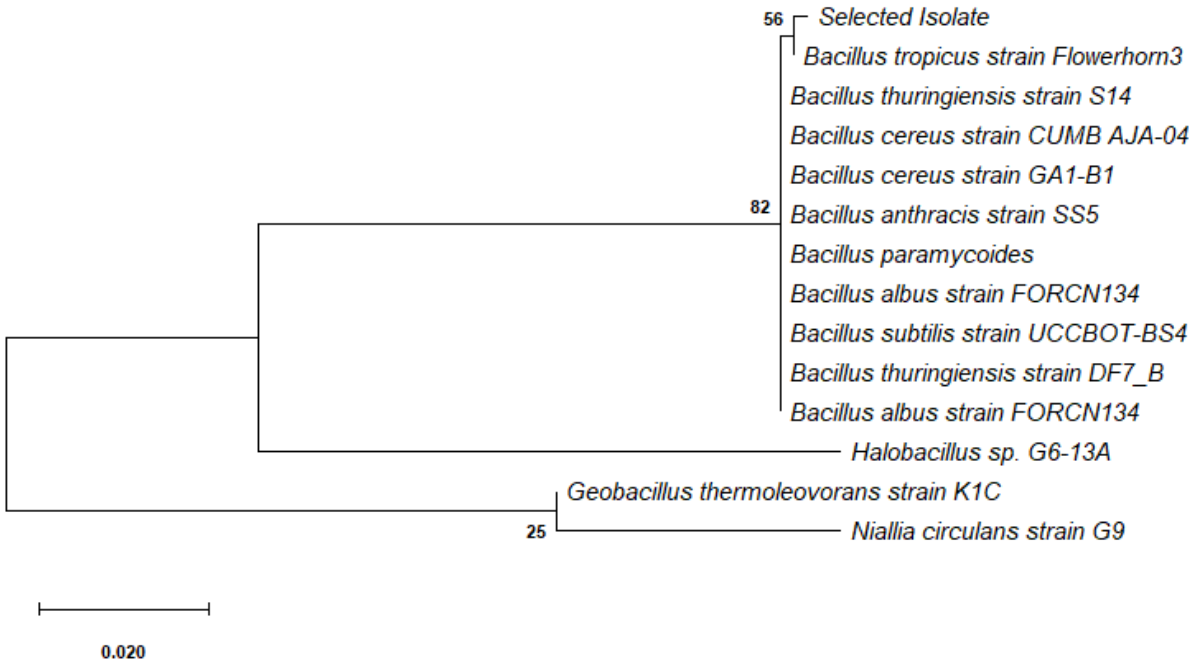
جدول ۲: مقدار حذف رنگ توسط جدایه‌های میکروبی به دست آمده از نمونه‌های خاک.

Table 2. Amount of dye removal by microbial isolates obtained from soil samples.

سویه	ریخت‌شناسی	حذف رنگ (٪)	سویه	ریخت‌شناسی	حذف رنگ (٪)	سویه	ریخت‌شناسی	حذف رنگ (٪)
۱	میله‌ای گرم مثبت	۴۵/۲۳ ± ۵/۲۱	۴	کروی گرم منفی	۶۱/۷۴ ± ۵/۴۲	۷	کروی گرم مثبت	۳۰/۵۶ ± ۷/۲۸
۲	کروی گرم منفی	۳۲/۶۱ ± ۲/۹۱	۵	میله‌ای گرم مثبت	۴۳/۱۹ ± ۴/۶۵	۸	میله‌ای گرم مثبت	۶۵/۷۳ ± ۳/۸۷
۳	میله‌ای گرم منفی	۵۵/۲۸ ± ۷/۸۹	۶	میله‌ای گرم مثبت	۷۹/۱۲ ± ۱/۳۱	۹	میله‌ای گرم مثبت	۲۹/۴۹ ± ۶/۷۹

شناسایی مولکولی جدایه میکروبی منتخب

نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن 16S rRNA و بررسی هم‌ترازی ژن در پایگاه داده NCBI نشان داد که سویه جداسازی شده به میزان ۱۰۰٪ مشابهت ژنتیکی با *Bacillus tropicus* strain LM1212-W3 دارد. بر این اساس درخت فیلوژنی مربوط به جدایه منتخب بیشترین تشابه را به *B. tropicus* strain LM1212-W3 نشان داد (شکل ۱). توالی نوکلئوتیدی جدایه به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با کد دسترسی PX475024 به عنوان *Bacillus* sp. strain A1 ثبت شد.



شکل ۱: درخت فیلوژنتیک جدایه منتخب *Bacillus* sp. strain A1 که با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X، الگوریتم اتصال همسایگی و مقدار Bootstrap برابر با ۱۰۰۰ ترسیم شده است.

Figure 1. Phylogenetic tree of the selected isolate *Bacillus* sp. strain A1, constructed using MEGA-X software via the Neighbor-Joining algorithm with a bootstrap value of 1000.

ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی *Bacillus* sp. strain A1 جهت تأیید هویت مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که این ایزوله، یک باکتری میله‌ای گرم مثبت و واجد توانایی تولید اندوسپور است. نتایج تست‌های بیوشیمیایی حاکی از مثبت بودن واکنش‌های کاتالاز و اکسیداز بود. در بررسی مسیرهای متابولیک، سویه مذکور در تست‌های تولید اندول و متیل‌رد نتیجه منفی و در تست ووگس-پروسکوئر نتیجه مثبت را نشان داد. همچنین، این سویه دارای تحرک بوده و توانایی احیای نیترات را دارا می‌باشد. در محیط بلاد آگار، همولیز کامل از نوع بتا مشاهده گردید و تولید گاز H_2S نیز منفی گزارش شد (جدول ۳).

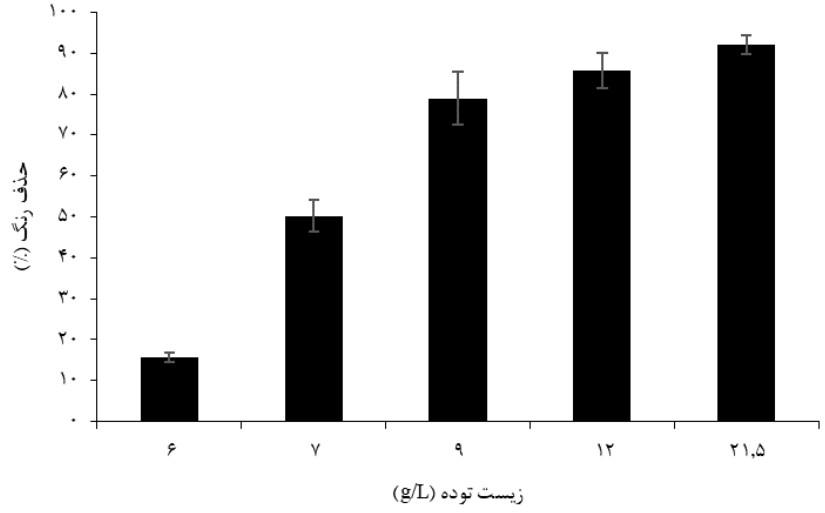
جدول ۳: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای *Bacillus* sp. strain A1.

Table 3. Results of biochemical tests for *Bacillus* sp. strain A1.

ردیف	نام تست	نتیجه	ردیف	نام تست	نتیجه
۱	واکنش گرم	مثبت	۷	اکسیداز	مثبت
۲	ریخت شناسی	میله‌ای	۸	تحرک	مثبت
۳	وجود اندوسپور	مثبت	۹	اندول	منفی
۴	کاتالاز	مثبت	۱۰	تولید H_2S	منفی
۵	احیای نیترات	مثبت	۱۱	ووگس-پروسکوئر	مثبت
۶	همولیز	بتا	۱۲	متیل‌رد	منفی

بررسی مقدار بهینه زیست‌توده میکروبی *Bacillus* sp. strain A1 در حذف رنگ

نتایج حاصل از بررسی مقدار بهینه زیست توده میکروبی در حذف رنگ نشان داد که رابطه مستقیمی میان مقدار زیست‌توده و میزان حذف رنگ وجود دارد. بر این اساس، با افزایش مقدار جاذب میزان حذف رنگ از محلول رنگی افزایش می‌یابد. میزان حذف رنگ محاسبه شده با استفاده از غلظت زیست توده g/L ۶ و g/L ۲۱/۵ به ترتیب، ۱۵/۶۸ و ۹۲/۰۶٪ محاسبه شد (شکل ۲).

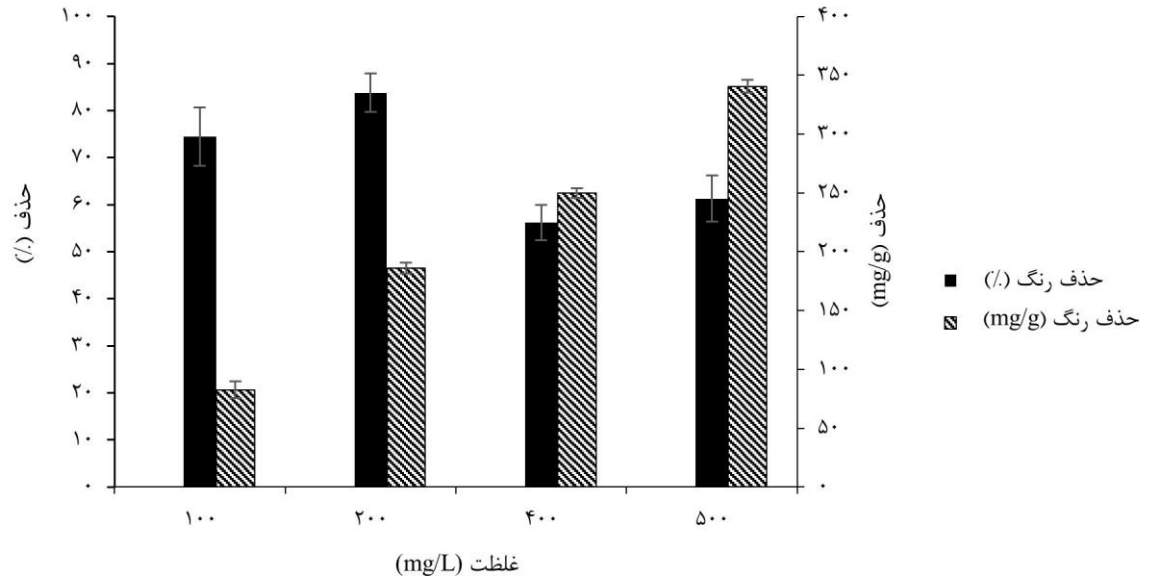


شکل ۲: مقدار حذف رنگ Basic Red 46 در غلظت mg/L ۱۰۰ با استفاده از مقادیر مختلف زیست توده تر میکروبی در شیکر انکوباتور rpm ۱۰۰ و دمای ۲۸ ℃.

Figure 2. Removal amount of Basic Red 46 dye at a concentration of 100 mg/L using various amounts of wet microbial biomass in a shaker incubator at 100 rpm and a temperature of 28 °C.

بررسی اثر غلظت رنگ بر میزان حذف توسط زیست‌توده میکروبی

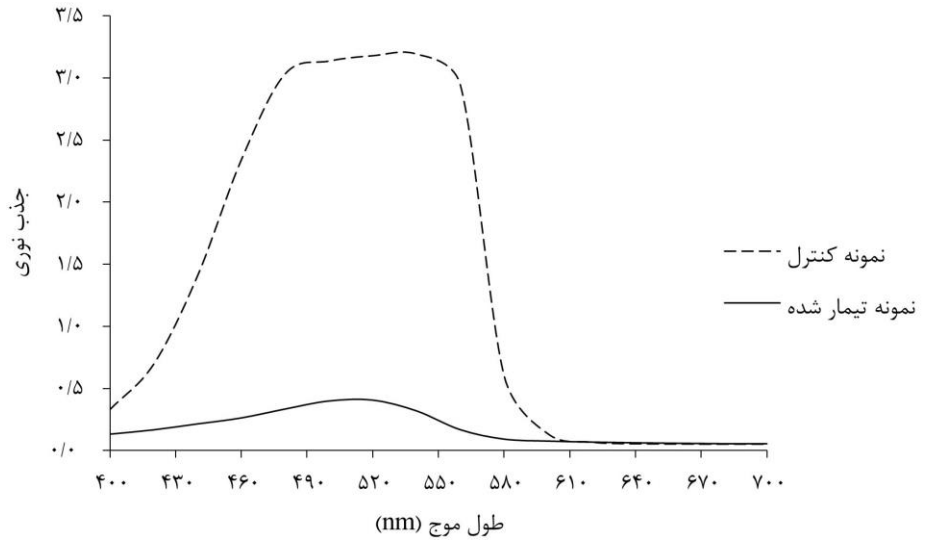
در بررسی اثر غلظت رنگ بر میزان حذف رنگ بیشترین درصد حذف رنگ در نمونه با غلظت ۲۰۰ mg/L با ۸۳٪/۸ حذف رنگ مشاهده شد. با این حال محاسبه مقدار رنگ حذف شده به ازای هر گرم از زیست توده میکروبی نشان داد که بیشترین جذب مربوط به غلظت رنگ ۵۰۰ mg/L با جذب ۲۱/۵ mg/g می‌باشد (شکل ۳). این یافته نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اولیه رنگ، گرادیان غلظت، افزایش یافته و نیروی محرکه بیشتری برای ورود رنگ به درون سلول‌های باکتریایی فراهم می‌شود.



شکل ۳: اثر غلظت رنگ (mg/L ۵۰۰-۱۰۰) بر میزان حذف رنگ توسط g/L ۹ از زیست توده میکروبی در طی ۶۰ دقیقه، دمای ℃ ۲۸ و شیکر rpm ۱۰۰ با سه بار تکرار.

Figure 3. Effect of dye concentration (100–500 mg/L) on the dye removal rate by 9 g/L of microbial biomass within 60 minutes, at a temperature of 28 °C and 100 rpm in a shaker, with three replicates.

بررسی طیف جذب Basic Red 46 در محدوده ۷۰۰–۴۰۰ nm نشان داد که نمونه کنترل دارای بیشینه جذب مشخصی در ناحیه مرئی، در حدود ۵۵۰–۵۲۰ نانومتر، است. در حالی‌که در نمونه تیمارشده با زیست‌توده *Bacillus* sp. strain A1، شدت جذب در کل بازه طیفی به‌طور چشمگیری کاهش یافت و پیک اصلی جذب نیز به‌صورت قابل ملاحظه‌ای تضعیف شد (شکل ۴). این نتایج بیانگر کاهش غلظت رنگ در محلول پس از تیمار و حاکی از کارایی مناسب زیست‌توده باکتریایی در حذف زیستی رنگ Basic Red 46 است.



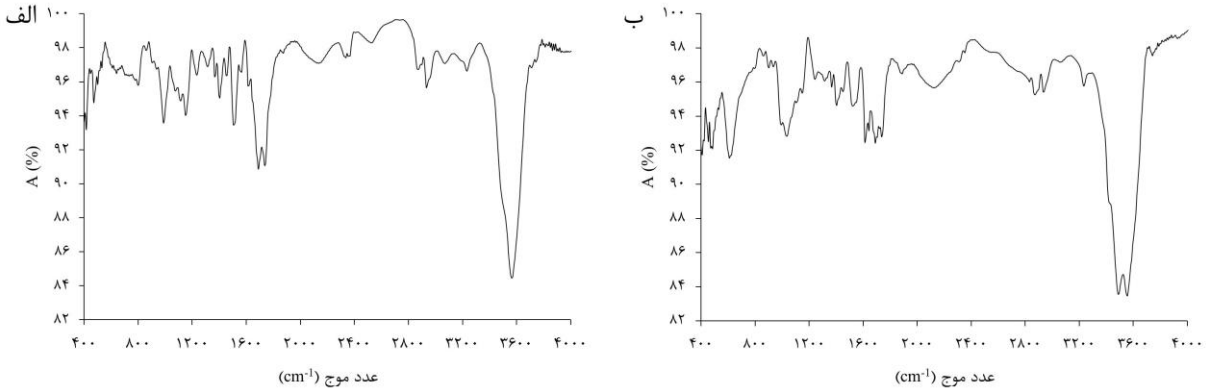
شکل ۴: طیف‌سنجی جذب مرئی رنگ Basic Red 46 قبل و بعد از تیمار با زیست‌توده *Bacillus* sp. strain A1 در محدوده طول موج ۷۰۰ nm–۴۰۰.

Figure 4. UV-Vis absorption spectra of Basic Red 46 dye before and after treatment with *Bacillus* sp. strain A1 biomass in the wavelength range of 400–700 nm.

بررسی مکانیسم حذف رنگ

به منظور بررسی مکانیسم حذف رنگ و وابستگی یا عدم وابستگی فرآیند حذف به حیات میکروارگانیسم، از دو زیست توده زنده و اتوکلاو شده جهت بررسی حذف رنگ استفاده شد. بررسی نتایج این بخش نشان داد که زیست توده اتوکلاو شده تنها قادر به حذف ۱۰/۳۷٪ از رنگ موجود در محلول رنگی است. این درحالی است که زیست توده زنده قادر به حذف ۷۴/۴۴ ٪ از ترکیب رنگی موجود در محلول می‌باشد. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که فرآیند حذف رنگ در کمترین زمان ممکن رخ داده و وابسته به سلول زنده می‌باشد. بررسی اثر مایه تخمیر حاصل از رشد *Bacillus* sp. strain A1 در حذف رنگ اثری بر تجزیه رنگ را نشان نداد. از این رو احتمال حذف رنگ به طریق آنزیمی در این مرحله رد شد.

آنالیز FTIR زیست‌توده قبل و بعد از جذب رنگ Basic Red 46 به‌منظور شناسایی گروه‌های عاملی درگیر در فرآیند جذب انجام شد. مقایسه طیف‌ها نشان داد که پس از جذب رنگ، تغییرات محسوسی در شدت و تا حدودی جابه‌جایی برخی از پیک‌های شاخص مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۵: آنالیز FTIR الف: زیست توده باکتری *Bacillus* sp. strain A1 و ب: زیست توده باکتری پس از جذب رنگ Basic Red 46.

Figure 5. FTIR analysis of (a) *Bacillus* sp. strain A1 bacterial biomass and (b) bacterial biomass after Basic Red 46 dye adsorption.

مهم‌ترین تغییرات مربوط به باند پهن حدود $3450\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های هیدروکسیل و آمینی، ناحیه $1620-1690\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی C=O در گروه آمید I، ناحیه $1520-1540\ cm^{-1}$ مربوط به آمید II، باند cm^{-1}

۱۴۰۰ مربوط به گروه‌های کربوکسیلات و ناحیه ۱۰۳۰–۱۰۵۰ cm^{-1} مربوط به ارتعاش C–O و C–O–C پلی‌ساکاریدها بود (جدول ۴). کاهش شدت و جابه‌جایی این باندها نشان می‌دهد که گروه‌های هیدروکسیل، آمینی، کربوکسیل و فسفات موجود در دیواره سلولی و ترکیبات خارج‌سلولی زیست‌توده در فرآیند جذب رنگ مشارکت داشته‌اند. همچنین عدم ظهور پیک جدید پس از جذب بیانگر آن است که فرآیند حذف رنگ از طریق برهم‌کنش‌های فیزیکی و الکترواستاتیکی، شامل پیوند هیدروژنی و جاذبه بین گروه‌های عاملی سطح زیست‌توده و مولکول رنگ، انجام شده و شواهدی از تشکیل پیوندهای کووالانسی جدید مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که گروه‌های عاملی سطح زیست‌توده نقش اساسی در جذب رنگ Basic Red 46 ایفا کرده و مکانیسم جذب عمدتاً وابسته به برهم‌کنش‌های سطحی است.

جدول ۴: نتایج مربوط به بررسی گروه‌های عاملی دخیل در جذب رنگ توسط زیست توده میکروبی از طریق آنالیز FTIR.

Table 4. Results of the investigation of functional groups involved in dye adsorption by microbial biomass via FTIR analysis.

عدد موج		تغییر مشاهده شده	گروه عاملی	تفسیر
قبل از جذب رنگ	بعد از جذب رنگ			
۳۵۶۴	۳۴۷۹	کاهش شدت و جابه‌جایی جزئی	O–H / N–H	مشارکت گروه‌های هیدروکسیل و آمینی در اتصال رنگ از طریق پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش الکترواستاتیکی
۱۶۸۹	۱۶۲۰-۱۶۳۰	جابه‌جایی محسوس	آمید I (C=O)	درگیری گروه‌های پروتئینی سطح سلول در فرآیند جذب
۱۵۲۰-۱۵۴۰	۱۵۱۰-۱۵۳۰	کاهش شدت	آمید II (N–H و C–N)	تغییر ساختار پروتئین‌های غشایی پس از جذب رنگ
۱۴۰۴	۱۴۱۲	جابه‌جایی اندک	COO^-	مشارکت گروه‌های کربوکسیلات در اتصال رنگ کاتیونی
۱۲۴۰-۱۲۵۰	۱۲۳۰-۱۲۴۰	کاهش شدت	P=O و C–O	دخالت فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلئیک در جذب
۱۰۴۰-۱۰۵۰	۱۰۲۵-۱۰۳۵	کاهش شدت و جابه‌جایی	C–O و C–O–C پلی‌ساکاریدها	مهم‌ترین تغییر مربوط به پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی
۶۰۰-۶۲۰	۵۹۰-۶۱۰	تغییر جزئی	ارتعاشات خارج از صفحه C–H	ایجاد برهم‌کنش با مولکول رنگ

بحث

در حال حاضر مطالعات متعددی بر روی جذب، حذف و تجمع رنگ‌های آزو توسط محققین مختلف انجام شده است. در این مطالعات انواع مختلفی از باکتری‌ها نظیر *Rhodococcus globulus*، *Proteus vulgaris*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus fexus*، *Bacillus pumilus* و *Streptomyces* sp. و انواعی از قارچ‌ها شامل *Neosartorya* sp.، و *Mucor circinelloides* مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶-۱۸).

تاکنون در مطالعات متعددی گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* به عنوان میکروارگانیسم‌های توانمند در جذب و تجمع فلزات سنگین مختلف از جمله نیکل، سرب، اورانیوم و کروم معرفی شده‌اند (۱۲, ۱۴, ۱۵). با این حال توجه کمی به توانمندی این میکروگانیسم در حذف آلاینده‌های رنگی از طریق فرآیند جذب زیستی شده است. در مطالعه حاضر در میان ۹ جدایه به

دست آمده، *Bacillus* sp. strain A1 با حدود ۷۹٪ حذف به عنوان توانمندترین جدایه شناسایی شد. در مطالعه Ren و همکاران در سال ۲۰۲۴، سویه *Bacillus cereus* ST14 از چشمه آب گرم جداسازی شد. در این مطالعه بیشترین ظرفیت جذب زیستی به‌ترتیب ۱۰۰/۷۹ و ۸۷/۹۶ میلی‌گرم فلز به ازای هر گرم باکتری خشک شده در ۲۴ ساعت و غلظت mg/L ۱۲/۵ برای فلزات اورانیوم و توریم مشاهده شد (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۵ از *Bacillus* sp. PZ-1 جهت جذب زیستی فلز سرب استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که *Bacillus* sp. PZ-1 قادر به جذب ۹۳/۰۱٪ از یون سرب از محلول با غلظت mg/L ۴۰۰ می‌باشد (۲۰).

در مطالعه Ramos و همکاران در سال ۲۰۲۶، جداسازی باکتری‌های *Bacillus* از نمونه‌های خاک انجام شد. در این مطالعه ۳ جدایه با بالاترین درصد رنگبری در شرایط ایستا به دست آمد. شناسایی مولکولی جدایه‌های به دست آمده نشان داد که دو جدایه مربوط به گونه *B. cereus* و یک جدایه مربوط به *Bacillus velezensis* می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که این جدایه‌ها دارای ژن‌های مربوط به آنزیم آزوردوکتاز هستند. همچنین بررسی‌ها نشان داد که *B. velezensis* دارای ژن‌های لاکاز و پراکسیداز می‌باشد (۲۱).

در مطالعه Ajaz و همکاران در سال ۲۰۲۵ نیز نشان داده شد که سویه میکروبی *Bacillus sp.* 2p قادر به رنگبری ۷۰٪ از ترکیب رنگی بعد از ۸ روز می‌باشد. در این مطالعه نشان داده شد که بعد از تجزیه رنگ ترکیباتی شامل پیرول، پیرازین-۱،۴-دیون، ۳-آمینوبوتانوئیک اسید و پالمیتیک اسید تولید می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که آب تصفیه شده هیچ اثر منفی بر رشد گیاه *Vigna radiata* ندارد (۲۲).

در مطالعه Uppala و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثر غلظت زیست‌توده از g/L ۶۰۰-۱۰۰ بر حذف رنگ‌های Eriochrome Black T و Amido Black 10B پرداخته است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت زیست‌توده، میزان حذف رنگ افزایش می‌یابد. بیشترین میزان حذف برای رنگ EBT توسط *B. cereus* RC1 با غلظت زیست‌توده mg/L ۲۰۰ به میزان ۷۲/۶۶ ٪ و برای رنگ AB توسط RC3 با غلظت mg/L ۳۰۰ به میزان ۹۱/۲۷٪ به دست آمد. با توجه به این نتایج افزایش مقدار زیست توده اثری مستقیم بر میزان حذف رنگ دارد که مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۲۳).

در مطالعه Adenan و همکاران در سال ۲۰۲۱ از باکتری *Nocardiopsis* sp. به منظور حذف رنگ‌های تری فنیل متان استفاده شد. بر اساس نتایج این مطالعه نیز با افزایش مقدار زیست‌توده، راندمان حذف رنگ افزایش می‌یابد (۲۴).

در مطالعه Keskin و همکاران در سال ۲۰۲۵، جذب زیستی Acid Violet 90 و Direct Blue 86 توسط زیست توده *Penicillium funiculosum* مورد بررسی قرار گرفت. در فرآیند جذب زیستی، اثر غلظت‌های مختلف رنگ مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اولیه رنگ، راندمان حذف تغییر می‌کند. با این حال، در شرایط بهینه با غلظت mg/L ۱۰۰ بازده حذف برای هر دو رنگ به ۱۰۰-۹۹٪ رسید. در این مطالعه افزایش غلظت رنگ اثر قابل توجهی بر بازده حذف نداشت و با افزایش غلظت، درصد قابل توجهی از رنگ حذف می‌شود (۲۵).

نتایج بررسی اثر مقدار زیست توده بر حذف رنگ نشان داد که با افزایش مقدار زیست توده، میزان حذف ترکیب رنگی نیز افزایش می‌یابد. نتایج این بخش را می‌توان به افزایش سلول‌ها و درنتیجه افزایش ظرفیت سلولی بر میزان حذف آلاینده رنگی از محلول نسبت داد. بررسی اثر غلظت رنگ بر میزان حذف رنگ نیز نشان داد که میزان میلی‌گرم رنگ حذف شده از محلول با افزایش غلظت رنگ افزایش می‌یابد که در دسترس بودن مقادیر بیشتر رنگ در مجاورت سطح سلول می‌تواند دلیلی بر افزایش میزان حذف رنگ باشد.

با توجه به عدم استفاده از محیط کشت برای حذف رنگ و حذف رنگ در مدت زمان کوتاه، مکانیسم حذف رنگ، احتمالا یکی از روش‌های جذب زیستی بوده است. تیمار حرارتی زیست توده باکتریایی موجب کاهش درصد حذف رنگ از محلول رنگی شد. بر این اساس با توجه به اینکه بازده حذف رنگ توسط زیست توده مرده بسیار کاهش یافته است، بنابراین مکانیسم حذف وابسته به متابولیسم میکروبی می‌باشد. از این رو جذب زیستی محتمل‌ترین مکانیسم در حذف رنگ می‌باشد. اگرچه در این پژوهش توانایی باکتری *Bacillus* sp. در حذف رنگ مورد نظر تحت شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی بررسی شد، اما پساب‌های واقعی صنایع رنگرزی معمولاً دارای ترکیب پیچیده‌ای از رنگ‌های مختلف و آلاینده‌های همراه مانند ترکیبات فنلی،

سورفکتانت‌ها، نمک‌ها و فلزات سنگین هستند. حضور این ترکیبات می‌تواند بر فعالیت باکتری، ظرفیت جذب و کارایی حذف رنگ تأثیرگذار باشد. بنابراین، نتایج این مطالعه باید به عنوان یک ارزیابی مقدماتی در یک سیستم مدل در نظر گرفته شود. با این حال، استفاده از زیست‌توده باکتریایی به عنوان یک روش زیستی می‌تواند از نظر زیست‌محیطی و اقتصادی نسبت به برخی روش‌های فیزیکوشیمیایی مزایایی مانند هزینه عملیاتی کمتر، مصرف کمتر مواد شیمیایی و تولید لجن کمتر داشته باشد. با این وجود، کاربرد عملی این روش نیازمند بررسی‌های بیشتری از جمله ارزیابی در پساب واقعی، بررسی عملکرد در حضور مخلوطی از رنگ‌ها و آلاینده‌هایی مانند فنل و فلزات سنگین، و همچنین بررسی قابلیت بازیابی و استفاده مجدد از زیست‌توده است.

نتیجه‌گیری

رنگ‌ها ترکیبات سمی هستند که ورود آن‌ها به محیط زیست موجب ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی فراوان می‌شود. تصفیه پساب‌های حاوی این ترکیبات با روش‌های زیستی، موجب کاهش ورود آلاینده‌ها به محیط زیست و کاهش هزینه‌های تصفیه پساب می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی سویه باکتریایی بومی با کارایی بالا در حذف رنگ‌های آزو از پساب بود. در این پژوهش، از میان ۹ جدایه میکروبی حاصل از نمونه‌های خاک جنگل‌های بهشهر، جدایه شماره ۶ با بیشترین میزان حذف رنگ (۷۹٪ در ۶۰ دقیقه) به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. شناسایی مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن *16S rRNA*، این جدایه را با ۱۰۰٪ شباهت به گونه *Bacillus tropicus* strain LM1212-W3 مرتبط دانست و توالی آن با نام *Bacillus* sp. strain A1 در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شد. بررسی پارامترهای عملیاتی نشان داد که افزایش مقدار زیست‌توده باکتریایی تأثیر مستقیم و مثبتی بر راندمان حذف رنگ دارد، به گونه‌ای که با افزایش غلظت زیست‌توده از ۶ g/L به ۲۱/۵ g/L، میزان حذف رنگ از ۱۵/۶۸٪ به ۹۲/۰۶٪ افزایش یافت. همچنین، اگرچه بالاترین درصد حذف رنگ در غلظت‌های میانی رنگ مشاهده شد، اما بیشترین ظرفیت جذب مربوط به غلظت ۵۰۰ mg/L به عنوان بالاترین غلظت رنگ مورد آزمایش بود که نشان‌دهنده پتانسیل بالای این زیست‌توده برای مقابله با آلودگی‌های غلیظ است. کاهش چشمگیر کارایی حذف توسط زیست‌توده اتوکلاو شده (۱۰/۳۷٪) در مقایسه با زیست‌توده زنده (۷۴/۴۴٪)، به وضوح نشان داد که فرآیند حذف رنگ توسط *Bacillus* sp. strain A1 عمدتاً وابسته به متابولیسم فعال سلولی است و با توجه به سرعت بالای حذف رنگ، مکانیسم اصلی در اینجا جذب زیستی می‌باشد. در مجموع با توجه به یافته‌های این پژوهش، *Bacillus* sp. strain A1 به عنوان یک کاندیدای امیدوار کننده و کارآمد برای حذف رنگ Basic Red 46 معرفی می‌شود. سرعت حذف و بازده بالا از جمله مزایای این سویه باکتریایی بومی است که آن را برای توسعه فرآیندهای زیستی مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط زیست در مقیاس صنعتی، مناسب می‌سازد.

سپاسگزاری

از مجموعه آزمایشگاهی آران دانش آزما و جناب آقای دکتر احد منافی که همکاری لازم در اجرای پژوهش حاضر داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

مشارکت نویسندگان

جمع‌آوری داده‌ها: محمد حسین آرمان فر، علی آبانی؛
تهیه گزارش پژوهش: محمد حسین آرمان فر، علی آبانی؛
تحلیل داده‌ها: محمد حسین آرمان فر، ریحانه پاپیران، علی آبانی، احسان آذین؛

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

منابع

Parida S, Mandal AK, Behera AK, Patra S, Nayak R, Behera C, et al. A comprehensive review on phycoremediation of azo dye to combat industrial wastewater pollution. Journal of Water Process Engineering. 2025;70:107088. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107088

Aranda-Figueroa MG, Romero RJ, Rodríguez M, Rodríguez-Torres A, Rodríguez A, Bolio-López GI, et al. Removal of azo dyes from water on a large scale using a low-cost and eco-friendly adsorbent. Sustainability. 2025;17(11):4816. https://doi.org/10.3390/su17114816

Benkhaya S, M'rabet S, El Harfi A. Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. Heliyon. 2020;6(1). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03271

N Lotha T, Sorhie V, Bharali P, Jamir L. Advancement in sustainable wastewater treatment: A multifaceted approach to textile dye removal through physical, biological and chemical techniques. ChemistrySelect. 2024;9(11):e202304093. https://doi.org/10.1002/slct.202304093

Beroigui O, El Ghadraoui L, Errachidi F. Isolation of competent actinomycetes strains from soil planted with three species of mint irrigated with olive mill wastewater. International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture. 2024;13(2).

Adane T, Adugna AT, Alemayehu E. Textile industry effluent treatment techniques. Journal of Chemistry. 2021;2021(1):5314404. https://doi.org/10.1155/2021/5314404

Devanshi S, Shah KR, Arora S, Saxena S. Actinomycetes as an environmental scrubber. Crude oil-new technologies and recent approaches: IntechOpen; 2021. https://doi.org/10.5772/intechopen.99187

Sintakindi A, Ankamwar B. Fungal biosorption as an alternative for the treatment of dyes in waste waters: a review. Environmental Technology Reviews. 2021;10(1):26-43. https://doi.org/10.1080/21622515.2020.1869322

Dailin DJ, Nordin N, Tan L, Ramli S, Chuah L, Sapawe N, et al. State of the art Bioremediation of textile dye in wastewater: a review. Biosci Res. 2022;19(2):914-24.

Aksu Z. Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. Process biochemistry. 2003;38(10):1437-44. https://doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00034-7

Wang B, Hu Y, Xie L, Peng K. Bioaccumulation of azo dye using immobilised beads of *Aspergillus fumigatus*. International Journal of Environment and Pollution. 2009;37(2-3):327-38. https://doi.org/10.1504/ijep.2009.025136

Naskar A, Majumder R, Goswami M. Bioaccumulation of Ni (II) on growing cells of *Bacillus* sp.: response surface modeling and mechanistic insight. Environmental Technology & Innovation. 2020;20:101057. https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101057

Yagub MT, Sen TK, Afroze S, Ang HM. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. Advances in colloid and interface science. 2014;209:172-84. https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.04.002

Sharma B, Shukla P. Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters. Journal of Hazardous Materials. 2021;401:123285. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123285

Wang S-S, Ye S-L, Han Y-H, Shi X-X, Chen D-L, Li M. Biosorption and bioaccumulation of chromate from aqueous solution by a newly isolated *Bacillus mycoides* strain 200AsB1. RSC advances. 2016;6(103):101153-61. https://doi.org/10.1039/c6ra23879c

Azin E, Moghimi H. The biosorption of Congo red azo dye by fungus *Mucor circinelloides* and its application in the decolorization of textile industry wastewater. Nova Biologica Reperta. 2020;7(3):322-30. https://doi.org/10.52547/nbr.7.3.322

Bakhti A, Maleki Rad M, Azin E, Moghimi H. Assessment of azo-based dyes biosorption capacity by *Ganoderma lucidum* from textile industries: mechanism and adsorption equilibrium. Bioremediation Journal. 2025:1-14. https://doi.org/10.1080/10889868.2025.2505782

Moghimi H, Azin E, Heidarytabar R. Isolation and Identification of Fungus Isolated *Neosartorya* sp. as Congo Red Biosorbent. 2016.

Ozdemir S, Acer O, Kılınç E. Bioaccumulation, tolerance, and removal of U (VI) and Th (IV) by a novel thermophilic *Bacillus cereus* ST14 isolated from hot spring mud samples in Afyonkarahisar, Turkey. Biomass Conversion and Biorefinery. 2024;14(3):4341-53. https://doi.org/10.1007/s13399-022-02645-4

Ren G, Jin Y, Zhang C, Gu H, Qu J. Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb (II). Ecotoxicology and environmental safety. 2015;117:141-8. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.033

Ramos J, Guimarães J, Paz MM, Simão da Rosa L, Cabral AdS, Pereira Rangel L, et al. Degradation of azo dyes by Bacillus species: isolation and selection of new strains exhibiting enzymatic diversity with potential application in wastewater treatment. Bioremediation Journal. 2026:1-17. https://doi.org/10.1080/10889868.2026.2613690

Ajaz M, Ali E, Bukhari DA, Wadood HZ, Hussain SZ, Rehman A. Assessment of azo dyes degradation potential of *Bacillus* sp. 2p and *Alcaligenes faecalis* 3d: a sustainable and eco-friendly alternative for dyes waste management. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2025:103729. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103729

Uppala R, Sundar K, Muthukumaran A. Decolorization of azo dyes using dried biomass of *Bacillus cereus* RC1 and *Kocuria kristinae* RC3. Journal Pure Application Microbiology. 2019;13:1969-76. https://doi.org/10.22207/jpam.13.4.08

Adenan NH, Lim YY, Ting ASY. Nocardiopsis sp. for the removal of triphenylmethane dyes: Decolorization and optimization studies. Water, Air, & Soil Pollution. 2021;232(10):414. https://doi.org/10.1007/s11270-021-05377-9

Yılmazer Keskin S, Demir N, Keskin CS, Avcı A. Bioacumulation and biosorption properties of *Penicillium funiculosum* against textile dyes. Applied Water Science. 2025;15(11):269. https://doi.org/10.1007/s13201-025-02629-5