جداسازی و بررسی تاثیر باکتری های موجود در خاک و پساب صنایع نساجی در رنگ زدایی از رنگ های صنعتی

لیلا درویشی*، عزیزاله ابراهیمی[۱]، محمدرضا محزونیه[۱]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه شهر کرد، شهر کرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

چکیده

مقدمه: رنگ های آزو از متداول ترین رنگ های به کار رفته در صنایع نساجی می باشد. این رنگ ها از جمله مواد آلوده کننده محیط زیست به شمار می آید. رنگ های فوق همراه با پساب کارخانجات صنعتی وارد محیط شده و باعث آلودگی اکوسیستم می شود. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده رنگ های روبین دیپرسی و متیل رد از پساب رنگرزی بوده است.

مواد و روش ها: در این بررسی از نمونه خاک و دو نمونه پساب کارگاه های رنگرزی و استفاده شد. نمونه ها بر روی محیط نوترینت آگار(N.A) حاوی رنگ های مورد نظر کشت و پس از بررسی، تعدادی از کلنی باکتری ها جداسازی شد. پس از خالص سازی، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک باکتری ها به محیط حاوی نوترینت براث(N.B) با pH=7 و رنگ های مورد نظر با غلظت ppm ۲۰۰ تلقیح شد. انکوباسیون نمونه ها تحت دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷-۶ روز انجام شد. نمونه های مورد نظر جدا و پس از سانتریفیوژ در طول موج مناسب برای هر رنگ(nm ۴۵۰ برای روبین دیپرسی و nm ۴۹۰ برای متیل رد)، OD نمونه ها بررسی شد. رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه ها نیز انجام شد.

یافته های پژوهش: ۸ جدایه کوکسی و کوکوباسیل گرم مثبت بیشترین توانایی را در تجزیه رنگ های مورد آزمایش نشان دادند. بیشترین رنگ زدایی توسط O3 با ۴۶/۸۰ درصد برای رنگ روبین دیپرسی و برای متیل رد ۸۰ درصد توسط Y4 مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که از جدایه های بومی تحت شرایط قابل اجرا می توان برای رنگ زدایی بیولوژیکی از رنگ های صنعتی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: رنگ زدایی، پساب، باکتری، روبین دیپرسی، متیل رد

* نویسنده مسئول: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه شهر کرد، شهر کرد، ایران

Email: Leila.darvishi68@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

مقدمه

فاضلاب های صنعتی یکی از منابع مهم آلاینده محیط زیست اند، به طوری که گاهی غلظت COD (Chemical Oxygen Demand) و BOD (Biological Oxygen Demand) و یا غلظت ترکیبات موجود در آن ها به ده ها هزار میلی گرم در لیتر می رسد(۱). امروزه رنگ ها از مهم ترین آلاینده های زیست محیطی در صنایع مختلف از جمله نساجی محسوب می شوند. رنگ ها به میزان فراوانی در صنایع نساجی، چاپ، غذایی، دارویی و آرایشی استفاده می شود(۲). ۷۰-۶۰ درصد از این رنگ ها را رنگ های آزو تشکیل می دهد. به طور معمول در حین تولید و استفاده حدود ۱۵-۱۰ درصد از این رنگ ها به محیط وارد می شود(۳). رنگینه های آزو یکی از مهم ترین رنگینه های صنعت نساجی بوده که به طور وسیعی برای رنگرزی کالای نساجی مورد استفاده قرار می گیرند. مشخصه بارز این رنگینه ها حضور یک یا بیشتر گروه(-N=N-) متصل به اتم های کربن با هیبرید sp^2 است. رنگینه های آزو از قدرت رنگزایی بالایی برخوردار بوده و بسته به انتخاب نوع ساختمان دقیق مولکول می توان رنگینه هایی با فام های زرد، نارنجی، قرمز، آبی یا حتی سبزها را سنتز نمود. این رنگینه ها خود از نظر ساختاری بر حسب تعداد گروه های آزو به رنگینه های مونوآزو، دیس آزو، تریس آزو و پلی آزو تقسیم می شوند(۴). رنگ های موجود در پساب در مقابل روش های معمول تصفیه مقاوم هستند و دلیل این امر پیوند شدید الکترون کشنده آزو به اکسیژنازها(۵) و هم چنین گروه های آروماتیک بزرگی است که به پیوند آزو متصل هستند(۶). عموماً روش های تصفیه در سه دسته اصلی تقسیم بندی می شوند: روش های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی(۷). گاهی نیز روش های صوتی، تابشی و الکتریکی نیز در یک دسته جداگانه طبقه بندی می شوند(۸). تصفیه بیولوژیکی در مقایسه با دو روش دیگر را می توان اقتصادی ترین روش عنوان کرد(۹). روش های زیستی به دلیل سازگاری با طبیعت، عدم نیاز به مواد شیمیایی، راهبری آسان و هزینه کمتر جهت حذف مواد رنگی از پساب های صنعتی حائز اهمیت هستند. فرآیندهای بیولوژیکی برای تصفیه پساب های رنگی به صورت هوازی، بی هوازی و یا ترکیبی از این دو روش انجام می گیرد. چون رنگ های آزو قابل احیا شدن هستند، هنگامی که در زنجیره انتقال الکترون ریز موجودات به عنوان گیرنده الکترون عمل می کنند، بی رنگ می شوند(۱۰). تصفیه شیمیایی که طیف گسترده ای از روش ها نظیر ترسیب و لخته سازی و غیره را شامل می شود، می تواند در حذف رنگ از پساب بسیار کمک کننده باشد زیرا برای اهداف تصفیه ای، کارایی بسیار بالایی دارد اما باید توجه داشت که هزینه بالای این روش ها که احتمالاً در نتیجه مصرف زیاد واکنشگرها و انرژی ورودی است. همراه با این مشکلات حذف لجن باقی مانده از فرآیند تصفیه ممکن است امکان استفاده از آن ها را محدود نماید. از جمله مهم ترین روش های مبتنی بر حذف فیزیکی می توان به روش های فیلتراسیون و جذب اشاره نمود. اشکالات اصلی فرآیندهای فیلتراسیون عمر مفید محدود، گرفتگی و هزینه بالای آن ها است(۱۱). در مقابل جذب یک فرآیند موثر، متعادل و باصرفه برای حذف رنگ و کنترل BOD پساب ها است(۱۲). در حال حاضر سیستم های تصفیه متداول برای حذف رنگ ها در دسترس است، که به طور اولیه وابسته به اصول فیزیکی و شیمیایی می باشد. در این روش ها به دلیل به کار بردن مقادیر بالای مواد شیمیایی، میزان زیادی لجن تولید می شود و رنگ ها به طور کامل از بین نمی رود و از لحاظ اجرایی نیز سخت و پرهزینه است(۱۳). رنگ زدایی میکروبی علاوه بر این که از نظر اقتصادی بسیار به صرفه می باشد، از لحاظ کمک به سلامت محیط زیست نیز بسیار با ارزش است(۱۴). میکروارگانیسم های متفاوت از جمله قارچ ها، باکتری های بی هوازی اختیاری و اجباری و باکتری های هوازی توانایی تجزیه انواع رنگ های آزو را دارند(۱۵). تجزیه بیولوژیک آلوده کننده ها در اکوسیستم های طبیعی توسط عوامل مختلف محیطی مانند pH، دما، اکسیژن و غیره تحت تاثیر قرار

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

می گیرد(۱۶). این پژوهش با هدف بررسی و جداسازی باکتری های تجزیه کننده رنگ از پساب رنگرزی انجام شد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: در مهرماه سال ۱۳۹۵ دو نمونه از لجن و از چاه کارگاه های رنگرزی در منطقه سورشجان شهرکرد با استفاده از ظروف پلاستیکی جمع آوری استریل، صورت گرفت. بر روی ظرف هر یک از نمونه ها تاریخ نمونه برداری، محل و منبع نمونه ثبت گردید. سپس نمونه ها به منظور انجام آزمایش های بعدی به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه ساتنی گراد نگهداری شدند. دو سری نمونه خاک باغچه نیز از خاک اطراف درختان موجود در دانشگاه شهر کرد جمع آوری شد.

آماده سازی نمونه ها و محیط کشت انتخابی آن ها: محیط های کشت برای هر دو نمونه هم فاضلاب و خاک باغچه، محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar) (N.A) (Micromedia, LOT: 16080302, EU) بود. در این مرحله رنگ های متیل رد(Shimi saraye zakaria)(Methyl Red Standard Fluka, LOT: 32654) و روبین دیپرسی (کره ای سانکرون Sun color (Red 73- را به صورت مخلوط با محیط نوترینت آگار تهیه شد. برای ساخت محیط کشت مربوطه طبق پروتکل پودر وزن کرده و به نیم لیتر آب اضافه شد و روی شعله قرار داده شد. پس از حدود ده دقیقه از هر کدام از رنگ ها با غلظت ppm ۲۰۰، که gr ۰/۱ برای نیم لیتر آب محاسبه شد، به محلول محیط کشت مورد نظر اضافه شد. دلیل استفاده از این غلظت از رنگ، مبتنی بر نتایج کسب شده در پژوهش های انجام شده توسط نوحی و همکاران در سال ۱۳۸۷ که ۱۰۰ درصد رنگزدایی در غلظت ppm ۲۰۰ توسط سویه های جداسازی شده بومی مشاهده شد، بود. سپس محلول روی شعله را بررسی کرده و پس از آماده شدن و اتوکلاو کردن و سرد شدن، پلیت گذاری شد. نمونه های خاک نیز از اطراف درختان موجود در محوطه دانشگاه شهر کرد مقداری خاک جمع آوری و سپس نمونه های خاک به آزمایشگاه منتقل شد و سپس آماده سازی شد. لازم به ذکر است که روش های آماده سازی نمونه های خاک بر طبق تجربیات استاد راهنما انجام شد. با توجه به این که تاکنون مطالعاتی در زمینه رنگزدایی توسط نمونه های جداسازی شده از خاک صورت نگرفته، در این تحقیق بر آن شدیم که از نمونه خاک نیز بررسی های لازم صورت پذیرد.

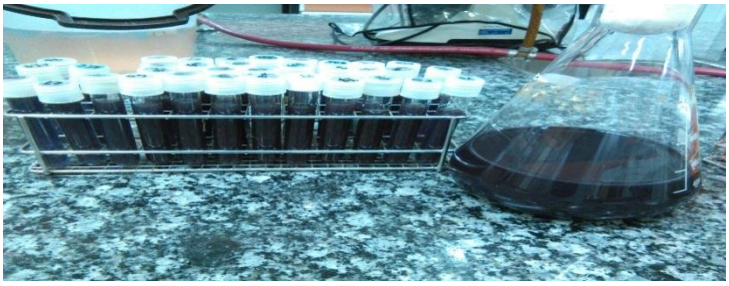
کشت نمونه ها روی محیط نوترینت آگار: از نمونه های فاضلاب و خاک، به صورت مستقیم کشت استریک روی پلیت های حاوی نوترینت آگار و رنگ های مورد نظر انجام شد. از هر کدام از نمونه ها دو سری کشت انجام شد. یکسری در دمای اتاق و یکسری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داخل انکوباتور به مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شد. لازم به ذکر است با توجه به این که از نمونه های محیطی استفاده شد انجام این قسمت بر اساس نظر و تجربیات استاد راهنما انجام داده شد دو سری کشت در دو دمای مختلف تهیه و سپس بررسی های لازم انجام شد.

بررسی نمونه ها: بعد از ۲۴ ساعت نمونه ها بررسی شد. رشد کلنی ها در دمای اتاق و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت موثر نبود. بنا بر این ۲۴ ساعت دیگر برای دو سری کشت در دمای اتاق و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون ادامه داشت. پس از مدت ۷۲ ساعت نمونه ها بررسی شد. رشد موثر در تعدادی از پلیت ها مشاهده شد. هاله تجزیه رنگ اطراف آن ها مشاهده شد. تعدادی از کشت ها نیز به زمان بیشتری برای رشد کلنی نیاز داشتند. از کلنی هایی که هاله تجزیه رنگ اطراف آن ها مشاهده شده بود، ساب کاچر در محیط TSB (Triptose soy broth)(Merck, Germany) تهیه و در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه شدن، کلنی های جداسازی شده در محیط نوترینت براث (Nutrient broth)(Micromedia, LOT: 16080302, EU) تلقیح شد. قابل ذکر است ml ۳ از محیط نوترینت براثی که قبلا ساخته شده و هم چنین اتوکلاو شده بود را داخل لوله های آزمایش در پیچ دار و استریل ریخته و سپس کلنی های مورد نظر در لوله ها تلقیح و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد درجه انکوباسیون انجام شد. رشد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

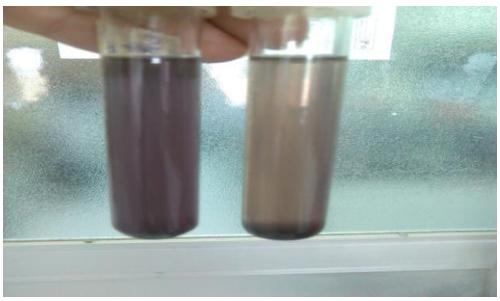
[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

تعدادی از نمونه ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مشاهده شد. برخی از نمونه ها نیز به زمان بیشتری برای رشد نیاز داشتند بنا بر این ۲۴ ساعت دیگر انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام شد. در نهایت نمونه های مورد نظر جداسازی و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد درجه نگهداری شد. دلیل استفاده از این روش کار، مبتنی بر روش کار و نتایج مثبت کسب شده در پژوهش های انجام شده توسط نوحی و همکاران در سال ۱۳۸۷ که ۱۰۰ درصد رنگ زدایی توسط سویه های جداسازی شده بومی مشاهده شد، بود(شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. تلقیح باکتری ها در محیط کشت نوترینت براث حاوی رنگ روبین دیپرسی

تلقیح کلنی های جداسازی شده در محیط حاوی نوترینت براث و رنگ های مورد نظر: محیط حاوی نوترینت براث و رنگ های متیل رد و روبین دیپرسی ساخته شد. این محیط حاوی ۹ ml محیط نوترینت براث و ۱ ml از هر کدام از رنگ ها با غلظت ۲۰۰ ppm با pH=7 بود. از استوک باکتری هایی(هم باکتری های فاضلاب و هم باکتری های خاک) که موثر در رنگ زدایی بودند، ۱۰۰ μ l به محیط های حاوی نوترینت براث و رنگ های مورد نظر اضافه شد. قابل ذکر است که برای هر رنگ یک کنترل در نظر گرفته شد(کنترل حاوی رنگ و بدون باکتری). سپس به مدت ۵ روز انکوباسیون نمونه ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از ۵ روز یکسری از نمونه ها اثرات رنگ زدایی قابل توجهی نشان دادند. تعدادی نیز به انکوباسیون بیشتر نیاز داشتند بنا بر این انکوباسیون نمونه های مثبت ضعیف تا ۷ روز ادامه داشت. پس از ۷ روز نمونه های انکوبه شده بررسی شد، چند نمونه اثرات رنگ زدایی قابل قبولی نشان دادند و بقیه نمونه های دارای نتایج ضعیف و منفی از نظر رنگ زدایی، دور ریخته شد. لازم به ذکر است روش کار بر اساس چند بار تکرار و آزمون و خطا و بر اساس نظر و تجربیات استاد راهنما انجام داده شد(شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲. رنگ زدایی از رنگ روبین دیپرسی توسط جدایه های جداشده از پساب

سانتریفیوژ نمونه ها و خواندن OD آن ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر: از هر کدام از نمونه های حاوی نتایج مثبت رنگ زدایی ۳ ml جداسازی و به لوله های استریل منتقل شد. سپس در دور ۲۸۰۰ به مدت ۱۵

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

دقیقه سانتریفیوژ آن ها انجام شد. پس از انجام سانتریفیوژ مایع رویی نمونه ها که شفاف تر بود جداسازی شد. نمونه های شفاف جداسازی شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های متناسب با رنگ های به کار رفته(۴۵۰ nm برای رنگ روبین دیپرسی که بنفش رنگ بود و ۴۹۰ nm برای رنگ متیل رد که متمایل به زرد بود) OD (جذب نوری) آن ها خوانده شد. بدین صورت که ابتدا دستگاه را روی طول موج های معین تنظیم کرده و سپس با یک مایع مثل آب مقطر که مقدار معینی داخل کوت قرار داده شده، دستگاه را صفر کرده و از مایع سانتریفیوژ شده استوک باکتری ها به مقدار لازم داخل کوت قرار داده و سپس درون دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و سپس OD آن ها خوانده و ثبت شد. دلیل استفاده از بخشی از این روش کار، مبتنی بر روش کار و نتایج مثبت کسب شده در پژوهش های انجام شده توسط نوحی و همکاران در سال ۱۳۸۷ که ۱۰۰ درصد رنگزدایی توسط سویه های جداسازی شده بومی مشاهده شد، بود.

سنجش فعالیت رنگ زدایی: برای سنجش فعالیت رنگ زدایی ml ۳ از محیط نوترینت براث حاوی رنگ و باکتری های مورد نظر، به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۸۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی برداشته شد و OD آن ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج مناسب در محدوده رنگ های مورد نظر بررسی شد. در مراحل قبلی تلقیح نمونه ها در محیط نوترینت براث و رنگ های مورد نظر، برای هر رنگ یک کنترل در نظر گرفته شد. که هدف، بررسی OD نمونه ها قبل و بعد از رنگ زدایی توسط جدایه های مورد نظر بود. با خواندن OD نمونه ها و مقایسه آن ها با کنترل تاثیر دقیق جدایه ها در رنگ زدایی مشاهده و بررسی شد.

فرمول درصد رنگ زدایی:

$$\%Decolorization=\frac{\text{Initial absorbance} - \text{absorved after Incubation}}{\text{Initial absorbance}}\times 100$$

بر طبق این فرمول عدد به دست آمده از OD کنترل بدون باکتری از OD نمونه حاوی باکتری و رنگ کسر شده سپس تقسیم بر OD کنترل بدون باکتری می شود و در نهایت در ۱۰۰ ضرب می شود. عدد به دست آمده درصد رنگ زدایی نمونه های مورد نظر خواهد بود.

خالص سازی باکتری ها، انجام رنگ آمیزی گرم و انجام تست کاتالاز و OF: در جهت شناسایی جدایه های مورد نظر ابتدا آن ها را روی محیط نوترینت آگار، LB آگار(LB agar)(LOT: UK, Quelab, 095728) و بلاد آگار(Blood agar) (Micromedia, LOT: 16080302, EU) برده و کشت ایزوله از آن ها انجام شد. در صورت عدم خالص بودن، خالص سازی انجام شد و در صورت خالص بودن از روی کشت ۲۴ ساعته آن ها رنگ آمیزی گرم انجام شد. بر اساس نتایج رنگ آمیزی گرم تست های دیگری از جمله تست کاتالاز و تست OF نیز انجام شد.

هدف از کشت بر روی محیط نوترینت آگار حاوی رنگ های مورد نظر، بررسی و مشاهده اثر باکتری های موجود در فاضلاب و خاک بود. سپس از کلنی جدایه های دارای نتایج مثبت رنگ زدایی، ساب کالچر تهیه شد و در دمای ۴ درجه برای انجام مراحل بعدی در یخچال نگهداری شد. بعد از کشت بر روی محیط نوترینت آگار و بررسی اثر کلنی های مورد نظر، اثر آن ها در محیط حاوی نوترینت براث و رنگ های مورد نظر بررسی گردید. پس از مشاهده نتایج مثبت رنگ زدایی توسط یکسری از جدایه ها، شناسایی و خالص سازی آن ها روی محیط بلاد آگار خالص سازی آن ها انجام شد.

روش انجام تست کاتالاز بدین صورت است که ابتدا مقداری از کلنی جدایه های مورد نظر را هر کدام در یک قطره سرم فیزیولوژی روی اسلاید حل کرده به طوری که شیرابه یکنواختی ایجاد شد. سپس به هر کدام از اسلایدها یک قطره H_20_2 اضافه شد. در صورت تشکیل حباب نتیجه مثبت گزارش می شود.

تست OF آزمایشی برای تشخیص هوازی یا بی هوازی بودن جدایه ها است. هوازی اجباری اگر در محیط اکسیژن نباشد خواهند مرد. بی هوازی اجباری اگر در محیط اکسیژن باشد خواهند مرد. بی هوازی اختیاری در حضور اکسیژن به واسطه تنفس و در عدم حضور O_2 به وسیله تخمیر انرژی کسب می کنند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

روش انجام این تست بدین صورت است که ابتدا محیط OF را تهیه کرده و سپس محیط ها را به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش بن ماری قرار داده تا بجوشد. لازم به ذکر است لوله های در پیچ دار را در حالت نیمه باز قرار داده و بعد می جوشانیم. پس از این که دمای محیط های مورد نظر اندکی سرد شد، باکتری های مورد نظر را در محیط ها تلقیح کرده سپس در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون آن ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انجام شد. لازم به ذکر است برای هر یک از باکتری ها دو لوله محیط در نظر می گیریم. بعد از تلقیح نمونه ها به درون هر دو لوله، روی یکی از لوله ها به اندازه یک سانت پارافین ذوب شده قرار می دهیم. پارافین ذوب شده شرایط رشد بی هوازی را فراهم می آورد. پس از مدت زمان انکوباسیون بررسی های لازم انجام شد. اگر لوله بدون پارافین زرد و لوله دارای پارافین سبز بود یعنی نمونه هوازی اجباری است. اگر لوله بدون پارافین سبز و لوله دارای پارافین زرد بود، نمونه بی هوازی اجباری است. و اگر هر دو لوله زرد بودند، نمونه بی هوازی اختیاری است.

یافته های پژوهش

الف-جداسازی باکتری های تجزیه کننده رنگ: به طور کلی با روش کشت استریک نمونه های فاضلاب کارگاه های رنگرزی و نمونه های خاک بر روی محیط نوترینت آگار، نوترینت براث و بلاد آگار، ۸ جدایه به دست آمد. ۲ جدایه باکتریایی از نمونه های خاک و ۶ جدایه از نمونه های فاضلاب به دست آمد. ۲ عدد از کلنی های مورد نظر در ۲۴ ساعت اول بهترین نتایج رنگ زدایی را نشان دادند اما ۶ عدد از کلنی های جداسازی شده در ۲۴ ساعت دوم و سوم نتایج قابل قبولی نشان دادند.

ب-مورفولوزی جدایه های تجزیه کننده: ۸ جدایه تجزیه کننده بر روی محیط نوترینت آگار به مدت ۷۲-۲۴ ساعت کشت داده شدند. کلنی هایی مدور و پهن و تعدادی از آن ها گرد با حاشیه ناصاف و بعضی صاف حاصل شدند. این کلنی ها هوازی و توانایی رشد در دمای اتاق و دمای بالاتر از آن را نیز دارا بودند ولی بهینه رشد آن ها در دمای اتاق مشاهده شد.

پ-نتایج رنگ آمیزی گرم و تست‌های کاتالاز و OF: نتایج رنگ آمیزی نشان داد که هر ۸ جدایه کوکوباسیل و کوکسی گرم مثبت با آرایش متنوع می باشند. نتایج تست OF برای ۸ جدایه تجزیه کننده رنگ های مورد نظر در جدول شماره ۱ آمده است. در باکتری های گرم مثبت ساختار شیمیایی اصلی دیواره یعنی پپتیدوگلیکان لایه ای ضخیم است و پس از متراکم شدن در اثر آبگیری با حلال نفوذناپذیر شده و مانع از خروج کمپلکس کریستال ویوله-ید از سلول می شود. در دیواره باکتری های گرم منفی پپتیدوگلیکان لایه ظریفی از دیواره را تشکیل می دهد و بقیه دیواره از جنس چربی ها است که در حلال حل شده و از بین می رود. بدین دلایل گرم مثبت ها در رنگ آمیزی گرم به رنگ بنفش مشاهده می شوند اما گرم منفی ها در مرحله پایانی رنگ آمیزی، به رنگ قرمز سافرانین یا فوشین مشاهده می شوند. در کل باکتری های مشاهده شده گرم مثبت تشخیص داده شد. نتایج تست کاتالاز برای تمام جدایه ها مثبت شد (جدول شماره ۲).

در تست OF نیز بر طبق نتایج مندرج در جدول شماره ۳ تمامی جدایه های مورد نظر هم در شرایط هوازی و هم بی هوازی قادر به رشد هستند. قابل ذکر می باشد شناسایی سویه های جداسازی شده در حد رنگ آمیزی گرم، گرم مثبت و منفی بودن و هوازی یا بی هوازی بودن انجام شد و با توجه به کمبود زمان و عدم امکانات لازم، از انجام تست های تشخیصی بیشتر و تکنیک PCR برای تشخیص دقیق سویه ها خودداری شد(جدول شماره ۴).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

جدول شماره ۱. رنگ زدایی از روبین دیپرسی توسط جدایه های باکتریایی جدا شده

درصد رنگ زدایی از رنگ روبین دیپرسی	شماره و نوع جدایه باکتری
۱۰/۶	(O9) کوکوباسیل گرم مثبت مشکوک به گروه کورینه
۱۹/۱۴	(O7) کوکو باسیل گرم مثبت
۲۵/۵۳	(G2) کوکسی گرم مثبت با آرایش متنوع
۲۱/۲۷	(Y4) کوکسی گرم مثبت با آرایش تنوع
۴۶/۸۰	(O3) کوکسی گرم مثبت با آرایش متنوع
۱۲/۳	(Sy6) کوکسی گرم مثبت با آرایش متنوع
۱۲/۷۹	(Sy7) کوکسی گرم مثبت
۲/۷۹	(Y7) کوکسی گرم مثبت

جدول شماره ۲. رنگ زدایی از متیل رد توسط جدایه های باکتریایی جدا شده

درصد رنگ زدایی از رنگ متیل رد	شماره و نوع جدایه باکتری
رنگ زدایی مشاهده نشد	(O9) کوکوباسیل گرم مثبت مشکوک به گروه کورینه
۲۰	(O7) کوکو باسیل گرم مثبت
رنگزدایی مشاهده نشد	(G2) کوکسی گرم مثبت با آرایش متنوع
۸۰	(Y4) کوکسی گرم مثبت باآرایش تنوع
۲۰	(O3) کوکسی گرم مثبت با آرایش متنوع
رنگزدایی مشاهده نشد	(Sy6) کوکسی گرم مثبت با آرایش متنوع
۶۰	(Sy7) کوکسی گرم مثبت
رنگزدایی مشاهده نشد	(Y7) کوکسی گرم مثبت

از بین جدایه های بررسی شده، O3 (کوکسی گرم مثبت با اشکال متنوع) با ۴۶/۸۰ درصد بیشترین اثر رنگ زدایی را از رنگ روبین دیپرسی داشت و Y4 (کوکسی گرم مثبت با اشکال متنوع) با ۸۰ درصد بیشترین اثر رنگ زدایی از رنگ متیل رد را داشت.

جدول شماره ۳. تفسیر تست OF طبق تغییر رنگ

باکتری	لوله بدون پارافین	لوله با پارافین
هوازی اجباری	زرد	سبز
بی هوازی اجباری	سبز	زرد
بی هوازی اختیاری	زرد	زرد

جدول شماره ٤. نتایج تست OF

باکتری	O	F	نتیجه
O9	مثبت ضعیف	مثبت ضعیف	اکسیداتیو، فرمنتیتیو منفی
O7	مثبت	مثبت	فرمنتیتیو مثبت
G2	مثبت	مثبت	فرمنتیتیو مثبت
Y4	مثبت	مثبت	فرمنتیتیو مثبت
O3	مثبت	مثبت	فرمنتیتیو مثبت
SY6	مثبت	مثبت	فرمنتیتیو مثبت
Y4	مثبت	مثبت	فرمنتیتیو مثبت
SY7	مثبت	مثبت	فرمنتیتیو مثبت
Y7	مثبت	مثبت	فرمنتیتیو مثبت

بحث و نتیجه گیری

رنگ های سنتتیک در صنایع نساجی، کاغذ، مواد غذایی، مواد آرایشی و بهداشتی استفاده می شوند(۱۷). صنعت نساجی مصرف کننده دو سوم از این مقدار رنگ است. این گروه از رنگ ها عمدتاً ماکرومولکول هایی هستند که به راحتی شکسته نمی شوند و بعـــضی از آن ها حتی برای گیاهان و جانوران سمی هستند(۱۸). رنگ های آزو با پیوند دوگانه نیتروژن–نیتروژن متصل به گروه های آروماتیک، شناخته می شوند و از پرمصرف ترین رنگ ها در صنعت نساجی می باشند. عدم کارایی در فرآیند رنگرزی باعـــث می شود که ۱۵–۱۰ درصد از رنگ به کار رفته، بسته به ساختار

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

رنگ، وارد پساب شود. روش های شیمیایی و فیزیکو شیمیایی تصفیه پساب عموماً هزینه بر، دارای کارایی کم و محدود هستند و مقدار زیادی مواد دفعی ایجاد می کنند که از بین بردن این این مواد خود مشکل جدیدی می باشد(۱۹). در ضمن رنگ های آزو به دلیل مقاوم بودن پیوند، در طی روش های تصفیه معمول پساب از بین نمـــی روند(۲۰). در حـــــالی که میکروارگانیسم ها به دلیل تنوع زنتیکی و متابولیکی، گزینه ای مناســـب برای تصفیه آلاینده ها از جمله رنگ های آزو می باشند. بسیاری از میکروارگانیسم ها مانند انواع باکتری های گرم مثبت و منفی(۲۱،۲۲)، قارچ ها(۲۳) و غیره توانایی رنگبری رنگ های آزو را از خود نشان می دهند. بنا بر این پاکسازی زیستی به دلیل کم هزینه بودن، عدم آسیب رسانی به طبیعت و تولید مقدار کم مواد دفعی، از اهمیت بالایی برخوردار است(۲۴). از این رو هدف ما در پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری هایی بود که توانایی تجزیه رنگ های روبین دیپرسی و متیل رد را در محدوده دمایی دمـــای اتاق و دمـــای ۳۰ درجه سانتی گراد بر روی محیط نوترینت آگار و نوترینت براث را دارا هستند. رنگ های مورد نظر که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت، رنگ های روبین دیپرسی و متیل رد بودند که جدایه های استخراج شده از خاک و فاضـــلاب کارگاه رنگرزی توانستند در محدوده دمای اتاق و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد از ۷۲-۲۴ ساعت درصدهای رنگ زدایی قابل توجهی را نشان دادند که از بین جدایه های بررسی شده، O3 (کوکسی گرم مثبت با اشکال متنوع) با ۴۶/۸۰ درصد بیشترین اثر رنگ زدایی را از رنگ روبین دیپرسی داشت. و Y4 (کوکسی گرم مثبت با اشکال متنوع) با ۸۰ درصد بیشترین اثر رنگ زدایی از رنگ متیل رد را داشت. اردو زاده(Ordouzadeh) و همکاران در سال ۱۳۸۵ اثر رنگ زدایی یکسری از سویه های باکتریایی گرم مثبت و منفی را بر روی رنگ های RB5 (ریمازول بلک)، Reactive Red 141 , Reactive Yellow 81, Reactive Blue mr, Reactive Red 120 بررسی کردند که در بین سویه های فوق، سویه باسیل گرم منفی Shewanella putre faciens توانایی رنگ زدایی کامل ۹۰ درصد رنگ RB5 را در مدت زمان کمتر از ۲۴ ساعت، تحت دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور همزن ۱۵۰ rpm را نشان داد. هم چنین سویه یاد شده قادر بود ۸۹ درصد رنگ R-Red 141 و R-Red 120 را در مدت سه روز تجزیه نماید(۲۵). در این پژوهش حاضر نیز در شرایط زمانی و دمایی مشابه از چندین نمونه فاضلاب کارگاه رنگرزی و خاک، ۸ سویه باکتری گرم مثبت جداسازی و نتایج مثبت رنگ زدایی از آن ها مشاهده شد. محمد علی آموزگار(Amouzgar) و همکاران در سال ۱۳۸۵ اثر فاکتورهای مختلف بر رنگبری از رنگ های آزو توسط باکتری های نمک دوست را بررسی کردند. آن ها دریافتند از ۲۷ سویه نمک دوست جدا شده از پساب کارخانجات نساجی، ۳ سویه(D2, Gb, A3) توانایی رنگبری در محدوده وسیعی از نمک(۲۰ درصد) و pH (۱۱-۶) پس از ۴ روز تلقیح و گرماگذاری در شرایط ایستا و توانایی رنگبری از مخلوط ۷ رنگ آزو را نیز دارا بودند(۲۶). امامی میبدی و همکاران در سال ۱۳۹۰ کاربرد فرآیند پرتودهی الکترونی در حذف رنگ های راکتیو Sun fix Navy Blue , Rem yellow GR, Sun fix red SPD, Wijlen black WXHT از فاضلاب سنتتیک نساجی را بررسی کردند و نشان دادند که میزان رنگبری همه رنگ های راکتیو رفتار نسبتاً مشابهی از تابعیـــت غلظـــت و دز پرتودهی را نشان می دهند و در غلظت های پایین رنگ و دزهای پرتودهی بالا این اختلاف کمتر است(۲۷). در سال ۲۰۰۴ بررسی پیرامون تجزیه زیستی رنگ های آزو، به وسیله محیط های کشت میکروبی تثبیت شده در بسترهای آلژینات(Alginate beds) صورت گرفت. معمولاً تجزیه میکروبی رنگ های آزو با یک فرآیند تجزیه کاهشی(احیاء) پیوند آزو در شرایط بی هوازی شروع شده و با یک مرحله هوازی مورد نیاز برای تجزیه آمیـــن های آروماتیک تشکیل شده، دنبال می شود. از آن جا که برخی از فرآیندهای کاهش در حضور اکسیژن مولکولی اتفاق می افتند، فرآیند تک مرحله ای تجزیه رنگ های آزو مورد مطالعه قرار گرفت. در این راستا از مخلوطی میکروبی برای تجزیه Ethyl orang در شرایط هوازی استفاده گردید

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

که در بسترهای آلژینات پوشیده شده با رزین Polyacrylamide تثبیت شده بود. به منظور تعیین بهترین شرایط تجزیه میکروبی، غلظت های مختلفی از Ethyl orang در حضور ۱ درصد گلوکز به عنوان کو-سوبسترا در بسترهای آماده شده به روش های مختلف، مورد تجزیه قرار گرفت. در نهایت سه محیط کشت خالص از بقیه متمایز شدند(۲۸). در پژوهش حاضر نیز رنگ زدایی باکتری های جداسازی شده در شرایط هوازی بر روی دو نمونه از رنگ های صنعت نساجی بررسی گردید هم در محیط آگارز و هم در محیط براث نتایج مثبت رنگ زدایی مشاهده شد. Madamwar و همکاران در سال ۲۰۰۵، گزارش نمودند که با افزایش دما از ۲۰ درجه سانتی گراد تا ۳۰ درجه سانتی گراد میزان رنگ زدایی رنگ Reactive 5 Violet توسط کنسرسیوم باکتریایی RVM 11.1 افزایش می یابد و افزایش بیشتر دما باعث کاهش میزان رنگ زدایی می شود. در این پژوهش انجام شده, رنگ زدایی بیشتر جدایه ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد مشاهده و در دمای بالاتر و پایین تر میزان رنگ زدایی کاهش می یافت که با نتایج پژوهش بالا هم خوانی دارد(۲۹). Lin و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر رنگ زدایی Pseudomonas. Sp بر روی رنگ Reactive Blue 13 ($200mg/l^{-1}$) در شرایط pH=7 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بررسی کردند و ۸۳/۲ درصد رنگ زدایی توسط باکتری مورد نظر مشاهده شد. شرایط pH=7 در این پژوهش اخیر با تحقیق بالا هم خوانی دارد که در این pH نتایج مثبت رنگ زدایی مشاهده شد. Saratale و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثر رنگ زدایی Micrococcus. glutamicus NCIM2168 را بر روی رنگ Reactive Green 19A ($50mgL^{-1}$) تحت شرایط pH=6.8 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بررسی کردند و ۱۰۰ درصد رنگزدایی توسط باکتری مورد نظر مشاهده شد. Wang و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثر رنگ زدایی Enterobacter. EC3 را روی رنگ ReactiveBlack5 ($1g/L^{-1}$) تحت شرایط pH=7 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بررسی کردند و ۹۲/۵۶ درصد رنگ زدایی توسط باکتری مورد نظر مشاهده شد(۳۰). بر طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه حاضر جدایه های O3 (کوکسی گرم مثبت با اشکال متنوع) با ۴۶/۸۰ درصد بیشترین اثر رنگ زدایی را از رنگ روبین دیپرسی و Y4 (کوکسی گرم مثبت با اشکال متنوع) با ۸۰ درصد بیشترین اثر رنگ زدایی را بر روی رنگ زدایی متیل رد را در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و pH متمایل به اسیدی از خود نشان داد. جدایه های مورد نظر از نمونه های پساب کارگاه رنگرزی و خاک جداسازی شدند. با توجه به نتایج مثبت رنگ زدایی حاصل در این پژوهش پیشنهاد می شود در تحقیقات آینده بر روی باکتری ها و قارچ های موجود در فاضلاب و پساب تمرکز و اثر آن ها بر رنگ رزدایی بر رنگ های موجود در پساب بررسی شود و سپس تشخصیص قطعی و نهایی جدایه ها با انجام تست های بیوشیمیایی و PCR انجام شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی، سرکار خانم شراره لطفعلیان و حمایت های مادی و معنوی دانشگاه شهرکرد کمال امتنان را دارند. این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۵ است که با حمایت دانشگاه شهرکرد اجرا شده است.

Refrences

1.Merouani S, Hamdaoui O, Saoudi F, Chiha M. Sonochemical degradation of Rhodamine B in aqueous phase effects of additives. Chem Ing J 2010; 158:550-7. doi: 10.1016/j.cej.2010.01.048

2.Akbary A, Bamoniri A, Shayanfar A. Synthesis of azo dyestuffs by using a nanosilica chromic acid substrate. JCST 2011; 5: 29-34.

3. Barragan BE, Costa C, Marquez MC. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. Dyes Pig 2007; 75:73-81. doi: 10.1016/j.dyepig.2006.05.014

4.Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 56:69-80. doi: 10.1007/s002530100686

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

5.Nigam P, Banat IM, Singh D, Marchant R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. Proce Biochem 1996; 31:435-42. doi: 10.1016/0032-9592(95)00085-2

6.Entezari GH, Ottadi M, Amiri R. Investigating the ability to decolorization the color of Azo beta naftol orange. Oil Res J 2015; 85:76-87.

7. Robinson T, Mcmullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technol2001; 77:247-55. doi: 10.1016/S0960-8524(00)00080-8

8. Gupta VK. Application of low cost adsorbents for dye removal. Environ Manage J2009; 90:2313-42. doi: 10.1016/j.jenvman.2008.11.017

9. Bhattacharyya KG, Sarma A. Adsorption characteristics of the dye brilliant green on neem leaf powder. Dyes Pig J2003; 57:211-22. doi: 10.1016/S0143-7208(03)00009-3

10.Delee W, Oneill C, Hawkes FR, Pinheiro HM. Anaerobic treatment of textile effluents a review. J Chem Technol Biotechnol1998; 73:323-35. doi: 10.1016/j.jhazmat.2004.12.006

11.Namane A, Mekarzia A, Benrachedi K, Belhaneche N, Hellal A. Determination of the adsorption capacity of activated carbon made from coffee grounds by chemical activation with ZnCl 2 and H3PO4. J Hazard Mate 2005; 119:189-94. doi: 10.1016/j.jhazmat.2004.12.006

12. Salmani MH, Ehrampoush MH, Aboueianjahromi M, Askarishahi M. Comparison between Ag I and Ni II removal from synthetic nuclear power plant coolant water by iron oxide nanoparticles. J Environ Health Sci Eng2013; 11:21.doi: 10.1186/2052-336X-11-21

13.Coughlin MF, Kinkle BK, Tepper A, Bishop PL. Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. Water Sci Technol1997; 36:215-20. doi: 10.1016/S0273-1223(97)00327-2

14. Pandey A, Singh P, Iyengar L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. Int Biodeter Biodegr 2007; 59:73-84. doi: 10.1016/j.ibiod.2006.08.006

15.Ramalho PA, Scholze H, Cardoso MH, Ramalho MT, Oliveira-Campos AM. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by Candida zeylanoides. Enzyme Microb Technol 2002; 31:848-54. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00189-8

16. Chen KC, Wu JY, Liou DJ, Hwang SC. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. J Biotechnol2003; 101:57-68. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00303-6

17. Tony BD, Goyal D, Khanna S. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. International Biodeter Biodegr2009; 63:462-9. doi: 10.1016/j.ibiod.2009.01.003

18. Fu Y, Viraraghavan T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. Bioresource Technol 2001; 79:251-62. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00028-1

19.Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents a review. Bioresource Technol1996; 58:217-27. doi: 10.1016/S0960-8524(96)00113-7

20.Kodam KM, Soojhawon I, Lokhande PD, Gawai KR. Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. World J Microbiol Biotechnol 2005; 21:367-70. doi: 0.1007/s11274-004-5957-z

21.Vanderzee FP, Villaverde S. Combined anaerobic aerobic treatment of azo dyes a short review of bioreactor studies. Water Res2005; 39:1425-40. doi: 10.1016/j.watres.2005.03.007

22.Sani RK, Banerjee UC. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by Kurthia sp. Enzyme Microbiol Technol 1999; 24:433-7. doi: 10.1016/S0141-0229(98)00159-8

23.Balan DS, Monteiro RT. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. J Biotechnol2001; 89:141-5. doi: 10.1016/S0168-1656(01)00304-2

24. Verma P, Madamwar D. Decolorization of azo dyes using Basidiomycete strain PV 002. World J Microbiol Biotechnol2005; 21:481-5. doi: 10.1007/s11274-004-2047-1

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

25..Noohi A, Emtiazjoo M, Ordouzadeh N. Decolorization of reactive black 5 by separated native strains from wastewater of textile factories in Tehran. Environ Sci Technol 2008; 10:19-27.

26.Asad S, Amouzgar M, Sarbolouki M, Pourbabaei A, Dastgheib M. The effect of different factors on decolorization of azo dyes by Halophile bacteria. Iran Biol J2008; 21:5-16.

27.Emami meibodi M, Parsaeian M, Ghaneian M, Banaei M, Kheirkhah M, Kazeraninezhad M. Aplication of electron radiation in removing reactive dyes from textile wastewater. Nucl Soc Iran 2012; 598-603.

28.Hejri Z. Biodegration of azo dyes in the industrial wastewater by fungus. 1th Con on Waste Manag Oil Ene Ind Tehran Iran 2010; 1-13.

29.Moosvi S, Keharia H, Madamwar D. Decolourization of textile dye reactive violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. World J Microbiol Biotechnol 2005; 21:667-72. doi: 0.1007/s11274-004-3612-3

30.Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes a review. J Taiwan Ins Chem Eng2011; 42:138-57. doi: 10.1016/j.jtice.2010.06.006

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]

Isolation and Investigation of the Effect of Soil and Textile Wastewater Bacteria on Decolorization of Industrial Dyes

Darvishi L[1], Ebrahimi A[1], Mahzounieh M[1]*

(Received: August 19, 2017 Accepted: March 11, 2018)

Abstract

Introduction: Azo dyes are the most commonly used colors in textile industry. These colors are among the pollutant materials in the environment. Moreover, they are discharged into the environment in combination with industrial wastewater and pollute the ecosystem. The purpose of this study was to isolate and detect bacteria biodegrading Methyl Red and Rubin Dyprsy colors from dye waste water.

Materials & Methods: The soil samples and wastewaters from textile dyeing workshops, were utilized in this study. The samples were cultivated on a nutrient agar (N.A) medium containing the desired colors, and some of them were isolated from bacterial colonies after checking. After purification, 100 µl of bacterial stocks and colors at a concentration of 200 ppm were inoculated into the medium containing nutrient broth (N.B) with pH=7. Subsequently, the samples were incubated at 30° C for 6-7 days. The samples were separated and optical density of samples was measured using spectrophotometer after centrifugation in appropriate wavelength for each color (450 nm for Rubin Dyprsy and 490 nm for Methyl Red). Moreover, Gram staining and biochemical tests were carried out to identify strains.

Findings: According to the results, 8 Gram-positive cocci and coccobacilli strains showed the most capability to degrade evaluated colors. The highest rates of decolorization by O3 and Y4 were observed for Rubin Dyprsy (46.80%) and Methyl Red (80%), respectively.

Discussion & Conclusions: The results showed that indigenous strains can be used for biodegradation of industrial dyes under applicable conditions.

Keywords: Bacteria, Decolorization, Methyl Red, Rubin Dyprsy, Wastewater

1. Dept of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
**Corresponding author email: Leila.darvishi68@yahoo.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.32]