كفاءة استخدام بعض انواع البكتيريا لتحطيم صبغة Direct Blue في المياه
Efficiency of some bacteria to degrade direct Blue Dye in water

خالد فالح حسن شيماء فخري جاسم
دائرة بحوث وتكنولوجيا البيئة والمياه / وزارة العلوم والتكنولوجيا
Khalid Falih Hassan Shaima Fakhry Jasime
Water & Environmental Technology Researches Dep\ Ministry of Science & Technology

المستخلص

استخدمت بكتيريا *Bacillus sp.* و *Lampropedia hyaline* و *Azotobacter chroococcum* لتحطيم الصبغة الزرقاء Direct Blue المستخدمة في الصناعات النسيجية لتاثيراتها السامة والمسرطنة في المياه بالتراكيز(0.005،0.01،0.03)غرام/لتر في المختبر بدلالة الامتصاصية (Abs) و النفاذية T% ولفترة معاملة 24 ساعة ولكثافة نمو (3500 خلية/مليلتر) و (17500 خلية/5مليلتر) و (175000 خلية/10مليلتر) لكل بكتيريا ، اذ اظهرت بكتيريا *Azotobacter* و *Bacillus* كفاءة كبيرة على خفض تراكيز الصبغة 0.005 و 0.01 غرام/لتر وبنسبة 50-80% و 30-60% على التوالي خلال 24 ساعة معاملة فيما أظهرت بكتيريا *Lampropedia* كفاءة اقل في خفض الصبغة وبنسبة 2-20% لنفس فترة المعاملة ولكل التراكيز ، واظهرت بكتيريا *Azotobacter* و *Bacillus* كفاءة اقل لخفض تركيز 0.03 غرام/لتر وبنسبة 20-50% و 15-40% على التوالي .

Abstract

Bacteria *Bacillus sp.*, *Lampropedia hyaline* and *Azotobacter chroococcum* were used to degrade Direct Blue dye which is use in textile factories due of its toxic effect from water in concentrations (0.005, 0.01, 0.03) gm\L in laboratory by measuring Absorbance (Abs), Transmition T% for 24 hr period treatment with bacterial growth density of (3500 cell\ml), (17500 cell\5ml) and (175000 cell\10ml) for each bacteria. *Azotobacter* and *Bacillus* showed high ability to reduce dye concentrations of 0.005 and 0.01 gm\L by 50-80% and 30-60% in 24 hr treatment. While, *Lampropedia* showed less ability to reduce all dye concentrations by 2-20%. *Bacillus* and *Azotobacter* showed less ability to reduce concentration of 0.03 gm\L by 20-50% and 15-40%.

المقدمة

تعد الاصباغ ذات أستخدامات واسعة في الصناعات المختلفة إلا انها ذات تاثيرات سلبية على البيئة لسميتها العالية و تاثيراتها المسرطنة [1] والصناعات النسيجية إحدى الصناعات التي تطلق كميات كبيرة من مياه الفضلات التي تحوي الكثير من الملوثات الصبغية واللونية وبتراكيز عالية [2] اذ أن 50% من تلك الاصباغ يستغل فعليا في عمليات صبغ المنسوجات وان 10-25% تكون غير مستخدمة في تلك الصناعة وتذهب مع مياه الفضلات المصرفة الى الانهر [3] . أن مياه فضلات الصناعات النسيجية تحوي على مواد عضوية ولا عضوية والكثير من المواد المعقدة والسامة مثل Aromatics, Metals, Phenol اضافة الى الاصباغ مختلفة الأنواع والألوان [4] .

ان صبغة direct blue و صبغة Reactive red من اكثر الصبغات استخداما في الصناعات النسيجية ولها تاثيرات ضارة على البيئة المائية فيما لو صرفت مع مياه المخلفات الى المسطحات المائية لسميتها العالية وتاثيراتها السلبية على الاحياء المائية ومواصفات المياه الطبيعية [5] .

تمتلك الاحياء المجهرية كالبكتيريا القابلية على إختزال الملوثات اللونية بفعل انزيماتها المحللة ففي دراسة [6] اثبتوا قدرة البكتيريا *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp. and *Pseudomonas* sp. على خفض الالوان التي تتسبب من خلال تصريف الملوثات العائدة الى اصباغ مختلفة منها الصبغة البرتقالية في

ظروف مختبرية وتحطيم الصبغة بنسبة 85% , كذلك اثبت [7] في دراسته قدرة بكتيريا *Bacillus* و *Azotobacter* على خفض تراكيز الصبغات النسيجية بنسب عالية ولفترة معاملة اربعة أيام .

تهدف الدراسة الحالية لاختبار كفاءة البكتيريا *Bacillus sp.* و *Lampropedia hyaline* و *Azotobacter chroococcum* لتحطيم وخفض تراكيز الصبغة الزرقاء Direct blue في المياه في ظروف المختبر .

المواد وطرائق العمل

- **الاوساط الزرعية المستخدمة:** Nutrient agar, Nutrient broth, Pseudomonas agar, Blood agar , base, Simmon citrate agar, Nitrate broth, Peptone water, Trypton soy broth, Starch agar, Casein agar, Nutrient gelatin, Urea agar, Brain heart infusion agar, Glucose – Phosphate broth .
- **جمع العينات:** جمع 1 كيلو غرام من التراب بالقرب من مولد ديزل كهربائي لتلوثه بالزيوت ومخلفات وقود الديزل اذ تعتبر بيئة مناسبة لنمو الكثير من الاجناس البكتيرية المحطمة للمواد العضوية و نقلت العينات الى المختبر لغرض عزل وتشخيص الاجناس البكتيرية.
- **عزل وتنمية البكتيريا:** وزن واحد غرام من نموذج التربة ووضع في انبوب اختبار زجاجي معقم حاوي على تسعة مليلتر من الماء المقطر المعقم بواقع تخفيف 10^{-1} وتكمل التخافيف الى 10^{-2} و 10^{-3} ، وضعت الانابيب في حمام مائي بحرارة 80ºم لفترة 20 دقيقة لقتل الخلايا البكتيرية الخضرية غير المكونة للسبور (spore) . أخذ 0.1 مليلتر من كل تخفيف و نشر على طبق زجاجي معقم يحوي وسط Nutrient agar وحضنت الاطباق بحرارة 30ºم لمدة سبعة ايام . بعد ظهور المستعمرات تم عمل المسحات وصبغها بصبغة كرام لتشخيص الخلايا البكتيرية الخضرية والسبورات وموقعها بالخلية البكتيرية بالمجهر الضوئي المركب, تم تنقية المستعمرات بعمل مزارع ثانوية و نقلها الى وسط Nutrient agar وبطريقة التخطيط وكررت العملية للحصول على مستعمرات نقية للبكتيريا و حفضت المستعمرات النقية بانابيب زجاجية معقمة وبشكل Slant على وسط Nutrient agar وبحرارة 10ºم وجددت العزلات كل اسبوعين [8،9] .
- **تشخيص البكتيريا:** شخصت بكتيريا *Lampropedia* و *Azotobacter* حسب طريقة [10] و شخصت بكتيريا *Bacillus* باستخدام الاختبارات البايوكيميائية وفقا لما وصف من قبل [11]: L V (egg yolk reaction) Growth ,Indol production , Nitrate reaction , V-P reaction , Citrate utilization 7% NaCl , Starch hydrolysis , Casein hydrolysis , Gelatin hydrolysis , Urease activity , Heamolysis (Blood agar)
- **حساب عدد الخلايا البكترية:**

حسبت اعداد الخلايا البكتيرية في واحد مليلتر من العالق البكتيري باستخدام طريقة Hemocytometer (counting chumber) [12] و حسب المعادلة:

- عدد البكتيريا (خلية/مليلتر) = عدد الخلايا في 4 مربعات× 4 × 10
- **الاصباغ الصناعية المستخدمة:** تم جلب صبغة direct blue الزرقاء المستخدمة في الدراسة من الشركة العامة للصناعات القطنية في الكاظمية وبواسطة كتاب التعاون العلمي معهم حيث تستخدم هذه الاصباغ في صبغ الملابس والنسيج وغيرها ورمزها الكيميائي ($C_{32}H_{20}N_6Na_4O_{14}S_4$) .
- **قياس الامتصاصية للنموذج الصبغي:**

تم تحديد الامتصاصية القصوى (λ_{max}) لصبغة direct blue بواسطة عمل مسح كامل في المنطقة المرئية لتراكيز الصبغة المحضرة مختبريا في جهاز المطياف الضوئي (Schimazu UV/VIS spectrophotometer) وكانت 570 نانوميتر [13] . حضر محلول الخزين للصبغة بتركيز 1غم/لتر بالماء المقطر ومنها حضرت التراكيز المستخدمة في التجربة(0.005, 0.01 و 0.03)غرام/لتر اذ تم استخدام هذه التراكيز حسب المستخرج من المصنع بعد صبغ النسيج وغسله ، قيست تراكيز الصبغة بدلالة الامتصاصية Absorbance (Abs) والنفاذية Transmition (T%).

- **كفاءة ازالة الاصباغ بواسطة العزلات البكتيرية المستخدمة:** تم تحضير محلول خزين مائي لصبغة direct blue بتركيز 1غم/ لتر ومنه حضرت التراكيز المستخدمة في التجربة (0.005،0.01،0.03) غرام/لتر وبطريقة التخافيف باستخدام الوسط الملحي المغذي والمعقم (KH_2PO_4 0.7g, NH_4NO_3 1g, K_2HPO_4 0.7g,

$MgSO_4.7H_2O$ 0.7g, NaCl 0.005g, Water 1L) وبحجم 100 مليلتر لكل تركيز باستخدام دوارق زجاجية معقمة ، زرعت الدوارق بالبكتيريا *Bacillus laterosporus* و *Lampropedia hyaline* و *Azotobacter chroococcum* وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز وبكثافة نمو 3500± 50 خلية/ مليلتر لكل بكتيريا بحجم (1، 5، 10) مليلتر واستخدمت تراكيز الصبغة بدون البكتيريا واعتبرت كمجموعة سيطرة وحضنت الدوارق بحرارة 25 °م في حاضنة هوائية نوع Binder مع تهوية الدوارق باستخدام مضخة هواء Air pump وتم قياس الامتصاصية والنفاذية بعد 24 ساعة من المعاملة وذلك بأخذ 20 مل من كل دورق حاوي على تراكيز الصبغة المختلفة ورشحت خلال اوراق ترشيح Whatmann1 بحجم ثقوب 0.45 مايكرون . قيست كفاءة ازالة الصبغة بواسطة الاحياء المستخدمة بقياس نسبة الخفض للصبغة بدلالة الامتصاصية للراشح وحسب [14] باستخدام القانون الاتي:

$$\frac{\text{الامتصاصية الاولية – الامتصاصية بعد 24 ساعة}}{\text{الامتصاصية الاولية}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

توضح جداول (1،3) كفاءة البكتريا *Bacillus laterosporus* و *Lampropedia hyaline* و *Azotobacter chroococcum* على خفض تراكيز صبغة direct blue بدلالة الامتصاصية Absorbance و نفاذية الضوء خلال الصبغة Transmition اذ انخفض تركيز الصبغة 0.005 غرام/لتر من 0.22 قبل المعاملة بالبكتيريا الى 0.096, 0.175 و 0.04 خلال 24 ساعة معاملة باستخدام بكتيريا *B. laterosporus* و *L. hyaline* و *A. chroococcum* على التوالي فيما زادت نفاذية الضوء خلال الصبغة من 53.6% قبل المعاملة الى 88.2, 69.6 و 98.7% لنفس التركيز على التوالي ، كذلك اظهرت الصبغة بتركيز 0.01 غرام/لتر انخفاضا واضحا ولنفس فترة المعاملة اذ انخفضت الامتصاصية من 0.325 الى 0.147، 0.274 ، 0.095 بفعل بكتيريا *B. laterosporus* و *L. hyaline* و *A. chroococcum* وزيادة نفاذية الضوء خلال الصبغة من 45.3% الى 71.6, 60.5 و 90.2% على التوالي ، فيما انخفض تركيز الصبغة 0.03 غرام/لتر من 0.454 الى 0.244 ، 0.409 ، 0.208 بفعل البكتيريا المنتخبة وزيادة النفاذية من 36.5% الى 52.5، 48.4 ، 68.2% على التوالي وبنفس فترة المعاملة.

جدول (1): امتصاصية ونفاذية الصبغة الزرقاء بالتركيز 0.005 غم/لتر قبل المعاملة وبعد 24 ساعة معاملة بالبكتيريا

ت	البكتيريا	الامتصاصية قبل المعاملة	الامتصاصية بعد 24 ساعة معاملة	النفاذية قبل المعاملة	النفاذية بعد 24 ساعة معاملة
1	***Bacillus laterosporus***	**0.22**	**0.096**	**53.6**	**88.2**
2	***Lampropedia hyaline***	**0.22**	**0.175**	**53.6**	**69.6**
3	***Azotobacter chroococcum***	**0.22**	**0.04**	**53.6**	**98.7**

جدول (2): امتصاصية ونفاذية الصبغة الزرقاء بالتركيز 0.01 غرام/لتر قبل المعاملة وبعد 24 ساعة معاملة بالبكتيريا

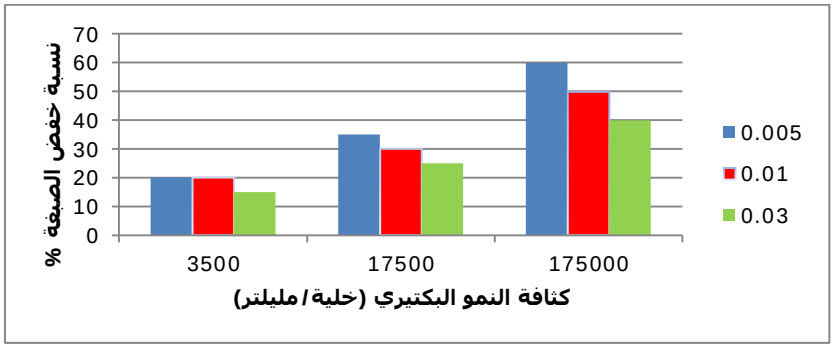
ت	البكتيريا	الامتصاصية قبل المعاملة	الامتصاصية بعد 24 ساعة معاملة	النفاذية قبل المعاملة	النفاذية بعد 24 ساعة معاملة
1	***Bacillus laterosporus***	**0.325**	**0.147**	**45.3**	**71.6**
2	***Lampropedia hyaline***	**0.325**	**0.274**	**45.3**	**56.5**
3	***Azotobacter chroococcum***	**0.325**	**0.095**	**45.3**	**90.2**

جدول (3): امتصاصية ونفاذية الصبغة الزرقاء بالتركيز 0.03 غم/لتر قبل المعاملة وبعد 24 ساعة معاملة بالبكتيريا

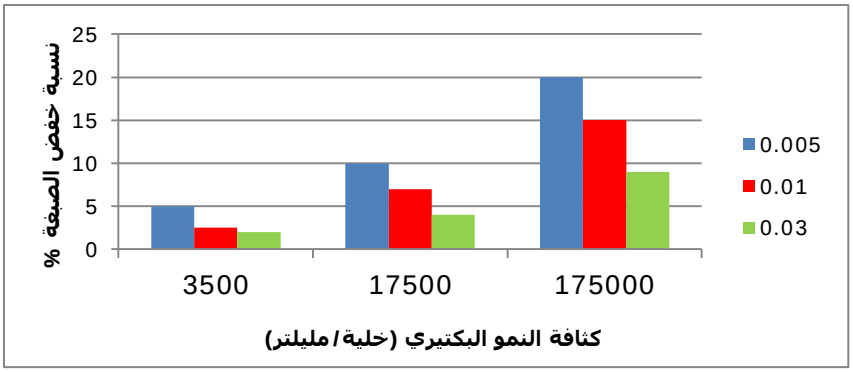
ت	البكتيريا	الامتصاصية قبل المعاملة	الامتصاصية بعد 24 ساعة معاملة	النفاذية قبل المعاملة	النفاذية بعد 24 ساعة معاملة
1	***Bacillus laterosporus***	**0.454**	**0.244**	**36.5**	**52.5**
2	***Lampropedia hyaline***	**0.454**	**0.409**	**36.5**	**47.4**
3	***Azotobacter chroococcum***	**0.454**	**0.208**	**36.5**	**68.2**

توضح الاشكال (1-3) العلاقة بين زيادة كثافة النمو البكتيري ونسبة خفض الصبغة للتراكيز 0.005, 0.01 و 0.03 غرام/لتر اذ كانت نسبة خفض الصبغة بالتركيز 0.005 غرام/لتر هي 20% لكثافة النمو 3500 خلية/مل

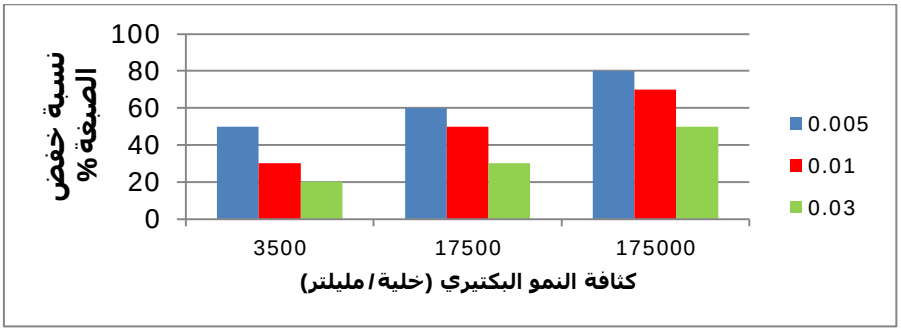
لبكتيريا *Bacillus* و 50% لبكتيريا *Azotobacter* فيما كانت 5% فقط لبكتيريا *Lampropedia* وكانت نسبة الخفض للتركيز 0.01 غرام/لتر هي (20 ، 30) % لبكتيريا *Bacillus* و *Azotobacter* على التوالي و 2.5% لبكتيريا *Lampropedia* ، ولتركيز 0.03 غرام/لتر كانت (15، 20 ، 2)% للبكتيريا على التوالي فيما ازداد تحطيم الصبغة عند اضافة 5 مليلتر من العالق البكتيري (17500 خلية/5مل) اذ كانت نسبة الخفض للتركيز 0.005 غرام/لتر هي(35، 60 ،10) % لبكتيريا *Bacillus* و *Azotobacter* و *Lampropedia* على التوالي وللتركيز 0.01 غم/لتر كانت (30،50، 7) % للبكتيريا على التوالي وللتركيز 0.03 غرام/لتر كانت نسبة الخفض (25، 30 ،4)% على التوالي ، وازداد تحطيم الصبغة بنسب كبيرة عند زيادة العالق البكتيري وبحجم 10 مليلتر (175000 خلية/10مل) اذ بلغت نسبة تحطيم الصبغة(80،70، 50) % للتراكيز (0.005، 0.01، 0.03) غرام/لتر باستخدام بكتيريا *Azotobacter* و لبكتيريا *Bacillus* (60،50،40)% للتراكيز على التوالي فيما كانت لبكتيريا *Lampropedia*(20، 15 ، 9)% للتراكيز على التوالي .



شكل (1): نسبة خفض صبغة Direct blue باستخدام بكتيريا *Bacillus* بكثافة نمو مختلفة



شكل (2): نسبة خفض صبغة Direct blue باستخدام بكتيريا *Lampropedia* بكثافة نمو مختلفة



شكل (3): نسبة خفض صبغة Direct blue باستخدام بكتيريا *Azotobacter* بكثافة نمو مختلفة

أظهرت النتائج القدرة العالية لبكتيريا *A. chroococcum* على تحطيم الصبغة للتراكيز 0.005، 0.01، 0.03) غم/لتر ويرجع السبب الى فاعليتها الانزيمية اذ لها القدرة على افراز انزيمي Nitrogenase و nitrate reductase اللذان يعملان على تحطيم البروتينات ومركبات النتروجين وتحويلها الى مركبات ابسط للاستفادة

منها في عمليات النمو والتكاثر [15،16] كذلك تقوم هذه البكتيريا بانتاج انزيم Hydrogenase الذي يعمل على اكسدة مركبات الكبريت والمواد الهيدروكاربونية [17] ، ومن ملاحظة التركيب الكيميائي لصبغة direct blue ($C_{32}H_{20}N_6Na_4O_{14}S_4$) نجد تواجد عنصر الكبريت والنتروجين كذلك الكاربون والهيدروجين ، واظهرت بكتيريا *B. laterosporus* قدرة على تحطيم تراكيز الصبغة الزرقاء ففي دراسة [18] اثبت قدرة بكتيريا *Bacillus* على انتاج انزيم hydrogenase الذي يعمل على تحطيم المواد الهيدروكاربونية كذلك ان لهذه البكتيريا القدرة على افراز انزيمي Catalase و Protease اللذان يعملان على تحطيم الكثير من المواد الهيدروكاربونية والملوثات اللونية [19] ، فيما اظهرت بكتيريا *L. hyaline* كفاءة اقل لخفض تراكيز الصبغة وقد يرجع السبب لعدم كفاءتها الانزيمية اذ ان هذه البكتيريا غير قادرة على افراز انزيم hydrogenase لكن لها القدرة على انتاج انزيم Protease المحطم للكثير من المواد العضوية [20] . توافقت النتائج مع دراسة [21] اذ بين قدرة بكتيريا *A. chroococcum* و *Bacillus* على تحطيم الصبغات العضوية المستخدمة في الصناعات النسيجية وبالاخص Azo Dyes ذات التاثيرات السامة والمسرطنة ومنها الصبغات الزرقاء ، كذلك بين [22] في دراستهما كفاءة البكتيريا ذات الفاعلية لانتاج انزيم hydrogenase على تحطيم صبغتي Orange II و Direct Blue وبنسبة (50-70)% ، وتوافقت النتائج مع [23] اذ اثبتو في دراستهم قدرة بكتيريا *Bacillus* على تحطيم صبغة Direct Blue وبنسبة 65% خلال 16 ساعة معاملة .

اظهرت النتائج ان زيادة كثافة النمو البكتيري له دور فاعل في تسريع عملية تحطيم الصبغة وذلك لزيادة التدفق الانزيمي بفعل البكتيريا وتحليل الصبغة والاستفادة منها بعمليات النمو والتكاثر من قبل البكتيريا وقد استخدم الوسط الملحي في تحضير تراكيز الصبغة لاضافة بعض المغذيات لزيادة كفاءة البكتيريا في عملية تحطيم الصبغة اذ اثبت [24] ان عملية ازالة الاصباغ تكون اكثر كفاءة في حالة تواجد الاملاح المغذية حيث تصل نسبة كفاءة ازالة تراكيز الصبغة الى 97% ، وقد ازيل المصدر الكاربوني المتمثل بسكر الكلوكوز من الوسط الملحي لجعل البكتيريا تعتمد على الصبغة كمصدر كاربوني وقد توافقت النتائج مع [25] في دراستهم على مجموعة من العزلات البكتيرية منها *Bacillus* و *Azotobacter* و *Pseudomonas* اذ اثبتو قدرة هذه الاجناس البكتيرية على استغلال الصبغات النسيجية Azo dyes كمصدر كاربوني وتحطيم الصبغة بفعل انزيماتها المحللة والاستفادة منها في عمليات النمو والتكاثر .

يلاحظ من النتائج ان كفاءة البكتيريا لخفض تراكيز الصبغة تقل بزيادة التركيز وخاصة للتركيز 0.03 غم/لتر اذ يعتبر من التراكيز العالية جدا والتي تحتاج الى فترة معالجة اكثر من 24 ساعة حتى تتمكن البكتيريا من تحطيم الصبغة فيما اثبتت بكتيريا *Azotobacter* و *Bacillus* قدرة على تحطيم تراكيز الصبغة للتركيزين 0.005 و 0.01 غرام/لتر بنسب عالية خلال 24 ساعة وقد بين [26] ان ناتج الصبغة والمتخلف من عمليات الصناعات النسيجية كان تركيزها يتراوح 0.004-0.025 غرام/لتر وبصورة متفاوتة حسب انتاجية المصنع و بين [27] في دراستهم ان البكتيريا الهوائية تكون ذات فاعلية كبيرة لتحطيم الصبغات ذات التراكيز اقل من 0.02 غم/لتر في زمن معالجة 18-24 ساعة فيما يكون تحطيمها للتراكيز العالية اكثر من 0.025 غرام/لتر اقل فاعلية وتحتاج الى زمن معالجة اطول .

المصادر

1. Fazli, M.M., A. R. Mesdaghinia, K. Naddafi, S. Nesseri, M. Yunesian, M.M. Assadi, S. Rezaie and H. Hamzehei. (2010). Optimization of reactive Blue 19 decolorization by *Bacillus* using response surface methodology. J. Environ. Health. Sci. Eng. Vol. 7: No. (1) 35-42.
2. Sapari, N. (1996). Treatment and reuse of textile waste water by over land flow, Desalination, 106: 179-182.
3. Moreira, M.T., C. Viacava and G. Vidal (2004). Fed-batch Decolorization of Poly R-478 by *Trametes versicolor*. Brazil, Vol. 47(2): pp. 179-183.
4. Daneshvar, N.M., A.R. Khatae and M. Pourhassan. (2007). Biological decolourization of dye solution containing Malachite green by Microalage *Cosmarium sp*, Bioresource Technology. 98: 1-7

5. Sharma, P., L. Singh and N. Dilbahi. (2009). Biodegradation of Orange Dye by *Phanerochaete chrysosporium* in simulated water. Journal of Scientific and Industrial Research. V (68):157-161.

6. Ponraj, M., K. Gokila and V. Zambare. (2011). Bacterial Decolorization of textile Dye- Orange 3R. International Journal of Advanced Biotechnology and Research. Vol 2, Issue 1, : 168-177

7. Husseiny, Sh. M. (2008). Biodegradation of the Reactive and Direct Dyes Using Egyptian Isolates. Journal of Applied Sciences Research. 4(6): 599-606.

8. Mortimer, P. S., S. Heinz, G. T. Hans, and B. Asbeuth. (1981). The Prokaryotes. Handbook on Habitats, Isolation and identification of Bacteria. Vol. 3. Berlin Heidelberg, New York. USA.

9. Reva, O. N., I. B. Sorokulova and V. V. Smirnov. (2006). Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming and anaerobic bacteria. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51, 1361–1371.

10. Michael, H. Gerardi. (2006). Soil Bacteria. Williamsport, Pennsylvania USA. Pp. 78 – 95.

11. Jennifer, M. P., P. C. Turnbull and J. R. Gibson. (1983). A colour Atlas of Bacillus species. Wolfe Medical Publication. London.

12. Santhini, K., J. Myla, S. Sajani and G. Usharani. (2009). Screening of *Micrococcus sp*. from Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation & Active Account. Botany Research International. Vol. (4): 248-252.

13. Saleh, S. M. A.A. (2005). HPLC determination of four textile dyes and studying their degradation using spectrophotometric technique. M.Sc. thesis. An- Najah National University. Nablus, Palestine.

14. Ozsoy, H.D., A. Unyayar, M.A. Mazmanci. (2005). Decolourisation of reactive textile dyes Drimarene Blue X3LR and Remazol Brilhant Blue R by *Funalia trogii* ATCC 200800. Biodegradation. 16, 195-204.

15. Aleem, A., J. Isar and A. Malik. (2003). Impact of long-term application on industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter* isolation from rhizospheric soil. Bioresource Techno, 86(1) 7-13.

16. Yoram, B. and J. VAN Rijn. (2000). Atypical Polyphosphate Accumulation by the Denitrifying Bacterium *Azotobacter*. Appl. and Environmental Microbiology. Vol. 66, No. 3 p. 1209–1212.

17. Kakuno, T., N. 0. Kaplan And M. D. Kamen. (2005). *Azotobacter* hydrogenase. W.A.J. Biol. Appl. Biochem. Vol. 74, No. 3, pp. 861-863.

18. James, T. S. (2006). Incidence of Prosthecate Bacteria in a Polluted Stream. Appl. Microbiology. Vol. 22, p. 496-502.

19. Graumann, P. (2007). Bacillus: Cellular and Molecular Biology 1st ed. Caister Academic Press. Pp. 322-330.

20. Michael, H. Gerardi. (2006). Wastewater Bacteria. Williamsport, Pennsylvania USA. Pp. 78 – 95.

21. Maio, Y. (2005). Biological Remediation of Dye in Textile Effluent: A Review on current Treatment Technologies. Journal of Scientific and Industrial Researches, Vol. (68):157-161.

22. Oranusi, N. A. and C. J. Ogugbue. (2005). Effect of pH and Nutrient Starvation on Biodegradation of Azo Dyes by *Bacteria*. J. Appl. Sci. Environ. Vol. 9 1: 39 – 43.

23. Kalme, S.D., G.K. Parshetti, S.U. Jadhav, and S.P. Govindwar. (2006). Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by *Bacillus* NCIM 2112. Journal of Bioresource Technology. Vol. 65: 144 – 152.

24. Amaral, P. F. F., D. L. A. Fernandes, A. P. M. Tavares, A. B. M. R. Xavier, M. C. Cammarota, J. A. P. Coutinho and M. A. Z. Coelho. (2004). Decolorization of dyes from textile wastewater by Trametes versicolor. Environ. Technol., vol. 25, 2004, pp. 1313-1320.

25. Rani, C., A. K. Jana and A. Bansal. (2011). Studies on the Biodegradation of Azo Dyes by Bacterial strains in the Absence of External Carbon Source. Journal of Bioresource Technology. Vol. 73: 203 – 214.

26. Bell, J., J.J. Plumb, C.A. Buckley and D.C. Stuckey. (2010). Treatment and decolourization of dyes in anaerobic baffled reactor. Journal of Environ. Eng., 126, No. 11. pp 1026 – 1032.

27. Yoo, E. S., J. Libra and L. Adrain. (2001). Mechanism of decolourization of azo dyes in aerobic mixed culture. Journal of Environ. Eng. 127, No. 9, pp. 844 – 849.