Research Article

Iranian Journal of Wood and Paper Industries
Vol. 16, No. 4, Page 563 - 576 (2026)

DOI: 10.22034/ijwp.2025.2070438.1726

Comparison of the Biodegradation Efficiency of the *Phaenerochaete chrysosporium* and the *Bacillus subtilis* in Kraft Black Liquor

Elmira faal shirkadeh[1], Mearaj sharari[2*], Farajollah HajiAlizadeh[3], Mohammad Ahmadi[2], Bita MoeziPour[4], Akbar Rostampour[2]

1- M.Sc. graduated of Wood Science and Technology department of natural resources Faculty of agriculture and natural resources University of Mohaghegh Ardabili Ardabil Iran
2- Corresponding authors, Associate prof. of Wood Science and Technology University of Mohaghegh Ardabili, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardabil, Iran. email: mearaj.sharari@gmail.com
3- M.Sc. Student of Wood Science and Technology department of natural resources Faculty of agriculture and natural resources University of Mohaghegh Ardabili Ardabil Iran
4- Assistant prof. of Wood Science and Technology department of natural resources Faculty of agriculture and natural resources University of Mohaghegh Ardabili Ardabil Iran

Received: September 2025 Accepted: N0vember 2025

Abstract

Problem definition and objectives: The black liquor generated from Kraft pulping of wheat straw contains high levels of lignin, phenolic compounds, sulfur-containing substances, silica, and both dissolved and suspended solids. Due to their complex structures and high stability, these compounds are highly resistant to degradation, leading to significant increases in COD, BOD, and other pollution indices. Conventional treatment methods such as evaporation, incineration, and chemical recovery are feasible in large-scale mills, but for small and medium-sized units they are not economically viable because of high silica content, excessive costs, high energy demand, and limited efficiency. In this context, biological processes and microorganisms have gained importance as cost-effective, efficient, and environmentally friendly alternatives. The objective of this study was to compare the efficiency of the *Phaenerochaete chrysosporium* and the *Bacillus subtilis* in their free-cell form for reducing COD, BOD, and TDS in Kraft black liquor derived from wheat straw pulping.

Methodology: Samples of black liquor were obtained from the Kraft process using wheat straw. To reduce toxicity and create suitable conditions for biological activity, the liquor was diluted ten fold. The microorganisms used included *P. chrysosporium* and *B. subtilis*, both cultured in standard media before being added to the effluent under laboratory conditions. Treatment was conducted at pH 7, temperature 30 °C, shaker speed 80 rpm, and a treatment duration of 14 days. Sampling was performed at days 0, 3, 7, 11, and 14. COD, BOD, and TDS were measured according to APHA standard methods. All experiments were carried out in triplicate, and data were analyzed using independent T-tests and ANOVA to assess the significance of differences among treatments.

Results: Both microorganisms were effective in reducing pollution indices of Kraft black liquor, but *P. chrysosporium* achieved higher reductions in COD, BOD, and TDS by the end of the 14-day treatment period compared to *B. subtilis*. Due to its shorter lag phase, the bacterium showed higher initial reductions in COD and BOD during the early days of treatment. However, from day 7 onward, enzymatic secretion by the fungus (lignin peroxidase, manganese peroxidase,

and laccase) enhanced degradation rates, allowing *P. chrysosporium* to outperform the bacterium. These findings indicate that in short-term treatments (approximately one week), *B. subtilis* may be more effective, while for longer and more sustainable pollutant removal, *P. chrysosporium* demonstrates superior performance. The observed slowdown in later stages of treatment was attributed to depletion of simple organic substrates, accumulation of inhibitory metabolites, nutrient limitation, and fungal autolysis.

Conclusion: This study demonstrated that both microorganisms hold considerable potential for the bioremediation of Kraft black liquor. However, *P. chrysosporium* owing to its strong ligninolytic enzyme system and ability to degrade recalcitrant compounds proved to be a more efficient and sustainable option for long-term pollutant reduction. The results indicated that at the end of the 14-day period, *P. chrysosporium* achieved significantly higher reductions in pollution indicators compared to *Bacillus subtilis*. Specifically, the reductions in COD and BOD for the fungus were 42.05% and 55.56%, respectively, while the corresponding values for the bacteria were 38.03% and 40.14%.

Keywords: Kraft black liquor, biological treatment, *Phaenerochaete chrysosporium*, *Bacillus subtilis*, COD, BOD

مقایسه نرخ موفقیت تخریب زیستی قارچ *Phaenerochaete chrysospporium* و باکتری *Bacillus subtilus* در مایع سیاه کرافت

المیرا فعال شیرکده[۱]، معراج شرری[۲*]، فرج‌اله حاجی‌علیزاده[۳]، بیتا معزی‌پور[۳]، محمد احمدی[۳]، اکبر رستم‌پور[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی صنایع چوب و فراورده¬های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.رایانه: mearaj.sharari@gmail.com
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی صنایع چوب و فراورده¬های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۴- استادیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۴ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۴

چکیده

بیان مساله و اهداف: مایع سیاه حاصل از پخت کرافت کاه گندم، حاوی مقادیر زیاد لیگنین، ترکیبات فنولی، مواد سولفوردار، سیلیس و جامدات محلول و معلق می‌باشد. این ترکیبات به‌دلیل ساختار پیچیده و پایداری بالا، به‌سختی تجزیه شده و موجب افزایش چشمگیر COD، BOD و سایر شاخص‌های آلایندگی می‌شوند. روش‌های متداول تصفیه مانند تبخیر، احتراق و بازیابی شیمیایی در واحدهای بزرگ قابل استفاده‌اند، اما برای واحدهای کوچک و متوسط به دلیل وجود سیلیس زیاد، هزینه بالا، مصرف انرژی زیاد و بازده محدود مقرون‌به‌صرفه نیستند. در این راستا، فرآیندهای زیستی و میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان روشی اقتصادی، کارآمد و سازگار با محیط زیست اهمیت یافته‌اند. هدف این پژوهش، مقایسه کارایی قارچ *Phaenerochaete chrysosporium* و باکتری *Bacillus subtilis* در حالت سلول آزاد برای کاهش COD، BOD و TDS مایع سیاه کرافت حاصل از خمیرسازی کاه گندم است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های مایع سیاه از فرآیند کرافت با استفاده از کاه گندم تهیه و به‌منظور کاهش سمیت و فراهم‌سازی شرایط مطلوب برای فعالیت زیستی، با نسبت ده برابر رقیق شدند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده شامل قارچ *P. chrysosporium* و باکتری *B. subtilis* بودند که در محیط‌های کشت استاندارد تکثیر و سپس در شرایط آزمایشگاهی به پساب افزوده شدند. شرایط تیمار شامل pH برابر ۷، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت شیکر ۸۰ دور در دقیقه و بازه زمانی ۱۴ روز در نظر گرفته شد. برای هر تیمار، نمونه‌برداری در روزهای ۰، ۳، ۷، ۱۱ و ۱۴ انجام شد و پارامترهایCOD ، BOD و TDS با روش‌های استاندارد APHA اندازه‌گیری گردید. کلیه آزمون‌ها با سه تکرار صورت گرفت و داده‌ها با استفاده از آزمون T مستقل و تحلیل واریانس جهت بررسی معناداری اختلافات تجزیه شدند.

نتایج: یافته‌ها نشان داد، هر دو میکروارگانیسم در کاهش شاخص‌های آلایندگی مایع سیاه کرافت مؤثر بودند، اما قارچ *P. chrysosporium* در پایان روز چهاردهم با کاهش بیشتری در COD ، BOD و TDS نسبت به باکتری B. Subtilis برتری یافت. باکتری به‌دلیل دوره نهفتگی کوتاه‌تر در روزهای ابتدایی کاهش بیشتری در COD و BOD داشت، ولی از روز هفتم به بعد با ترشح آنزیم‌های لیگنینولیتیک قارچ، سرعت و میزان کاهش آلاینده‌ها افزایش یافت. این نتایج نشان داد که در دوره های تیمار کوتاه (یک هفته ای)، تیمار با باکتری B. subtilis موثرتر از *P. chrysosporium* می‌باشد. کاهش سرعت روند در روزهای پایانی به کمبود مواد آلی ساده، تجمع متابولیت‌های بازدارنده، محدودیت مواد مغذی و اتولیز سلولی نسبت داده شد.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد که هر دو میکروارگانیسم پتانسیل مؤثری برای تصفیه زیستی مایع سیاه کرافت دارند، اما قارچ *P.chrysosporium* به‌دلیل توانایی ویژه در ترشح آنزیم‌های لیگنولیتیک و تجزیه ترکیبات سخت‌تجزیه، گزینه کارآمدتری برای کاهش پایدار آلاینده‌ها است. نتایج نشان داد که در پایان دوره ۱۴ روزه قارچ *P. chrysosporium* توانست به‌طور معناداری کاهش بیشتری در شاخص‌های آلایندگی نسبت به باکتری *B. subtilis*

ایجاد کند. به‌طوری‌که کاهش COD و BOD در قارچ به‌ترتیب ۴۲/۰۵٪ و ۵۶/۵۵٪ بود در حالی‌که این مقادیر برای باکتری به‌ترتیب ۳۸/۰۳٪ و ۴۰/۱۴٪ گزارش شد.

واژه های کلیدی: مایع سیاه کرافت، تیمار زیستی، *Phaenerochaete chrysosporium*، *Bacillus subtilis*، COD، BOD

مقدمه

کاه گندم یکی از مهم‌ترین منابع لیگنوسلولزی غیرچوبی در صنایع خمیر و کاغذ است که به دلیل فراوانی و هزینه پایین، مورد توجه قرار گرفته است [۱،۲]. با این حال، ترکیب شیمیایی ویژه این ماده به‌ویژه وجود مقادیر بالای سیلیس و خاکستر، مشکلات قابل‌توجهی را در فرآیندهای پخت و بازیابی مواد شیمیایی ایجاد می‌کند [۳]. در مایع سیاه حاصل از خمیرسازی قلیایی این ماده، بخش قابل‌توجهی از سیلیس به صورت محلول یا ذرات معلق وجود دارد که در مراحل تغلیظ، موجب افزایش ویسکوزیته، کلوخگی و رسوب در تجهیزات می‌شود [۴]. این مشکلات راندمان تبخیرکننده‌ها را کاهش داده و بهره‌برداری از واحدهای بازیابی را با چالش مواجه می‌سازد. در نتیجه، بسیاری از واحدهای کوچک و فاقد سیستم بازیابی کارآمد، مایع سیاه را بدون تصفیه مناسب تخلیه می‌کنند که این امر آثار زیست‌محیطی نامطلوبی به‌همراه دارد [۵].

مایع سیاه کرافت به دلیل وجود لیگنین متراکم و مشتقات سولفوردار، مقاومت شیمیایی و پایداری زیستی بالایی دارد [۶]. این ترکیبات آروماتیک پایدار، فنول‌ها و مواد گوگردی موجب افزایش چشمگیر شاخص‌های اکسیژن خواهی شیمیایی۱ (COD)، اکسیژن خواهی بیولوژیکی۲ (BOD) و مواد جامد حل شده۳ (TDS) می‌شوند [۷]. روش‌های متداول تصفیه مانند سوزاندن و بازیابی شیمیایی، هرچند در کارخانجات بزرگ کاربرد دارند، اما به دلیل نیاز به سرمایه‌گذاری بیشتر، مصرف زیاد انرژی و بازده محدود در مقیاس‌های کوچک و متوسط کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند [۸].

در این میان، تیمار زیستی با بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌ها به دلیل هزینه کم، سازگاری با محیط‌زیست و توانایی حذف ترکیبات پیچیده به‌عنوان یکی از گزینه‌های کارآمد در تصفیه مایع سیاه شناخته می‌شود [۹،۱۰]. از میان میکروارگانیسم‌های مؤثر، قارچ پوسیدگی سفید *Phaenerochaete chrysosporium* و باکتری *Bacillus subtilis* جایگاه ویژه‌ای دارند [۱۲، ۱۱]. *P. chrysosporium* با ترشح مجموعه‌ای از آنزیم‌های لیگنینولیتیک برون‌سلولی شامل لیگنین‌پراکسیداز (LiP)، منگنزپراکسیداز (MnP) و لاکاز (Lac)، قادر است ساختار پیچیده، آروماتیک و پیوندهای مقاوم موجود در لیگنین را شکسته و به ترکیبات ساده‌تر و قابل‌تجزیه تبدیل کند [۱۳،۱۴]. این قارچ به‌ویژه در حذف رنگ، کاهش COD و بهبود قابلیت تجزیه‌پذیری پساب عملکرد قابل‌توجهی دارد، اما محدودیت‌هایی همچون رشد نسبتاً کند، حساسیت به تغییرات شدید pH و دما و تأثیرپذیری از ترکیبات بازدارنده، کاربرد صنعتی آن را چالش‌برانگیز می‌سازد [۱۵]. در مقابل، *B. subtilis* یک باکتری گرم‌مثبت، هوازی و مقاوم می‌باشد که به دلیل سرعت رشد بالا، چرخه زیستی کوتاه و انعطاف‌پذیری در دامنه وسیع pH و دما، قابلیت استفاده در شرایط متغیر صنعتی را دارد [۱۶،۱۷]. این باکتری با ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک و اکسیداتیو، قادر به تجزیه بخش‌هایی از لیگنین و استفاده از مشتقات آن به‌عنوان منبع کربن می‌باشد [۱۸]. از مزایای آن می‌توان به مقاومت زیاد در برابر شوک‌های محیطی و نیاز کمتر به شرایط کنترل‌شده اشاره کرد هرچند که در حضور لیگنین متراکم و ترکیبات سولفوردار موجود در مایع سیاه کرافت، کارایی آن در مقایسه با قارچ کاهش می‌یابد [۶]. مقایسه این دو میکروارگانیسم نشان می‌دهد که قارچ به دلیل داشتن مجموعه‌ای از آنزیم‌های تخصصی، توانایی بیشتری در

[1] Chemical Oxygen Demand
[2] Biological Oxygen Demand
[3] Total Dissolved Solids

شکستن و تجزیه بخش‌هایی از لیگنین که ساختار پیچیده و مقاومت زیادی در برابر تجزیه دارند، دارد. در حالی که باکتری به‌دلیل رشد سریع و سازگاری بالا با تغییرات محیطی، می‌تواند در مراحل اولیه تیمار و همچنین در شرایط عملیاتی متغیر، مؤثرتر عمل کند [۱۶، ۱۱].

مطالعات متعددی بر قابلیت این میکروارگانیسم‌ها تأکید داشته‌اند. Chang و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که سویه‌های *Bacillus sp.* می‌توانند لیگنین قلیایی را تجزیه کرده و در ترکیب با سایر میکروارگانیسم‌ها راندمان تصفیه را افزایش دهند [۲]. Mir-Tutusaus .و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که قارچ‌های پوسیدگی سفید به‌ویژه *P. chrysosporium* در حذف رنگ و ترکیبات آلی پایدار از پساب‌های صنعتی بسیار مؤثرند [۳]. همچنین، Buraimoh و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که گونه‌های باکتریایی بومی توانایی تجزیه بخشی از لیگنین کرافت را دارند اما عملکرد آن‌ها به شرایط محیطی و منابع غذایی مکمل وابسته می‌باشد [۱].

با توجه به مزایا و محدودیت‌های هر دو میکروارگانیسم، این پژوهش با هدف مقایسه نرخ موفقیت تخریب زیستی قارچ *Phaenerochaete chrysosporium* و باکتری *Bacillus subtilis* در حالت سلول آزاد و در شرایط یکسان تیمار مایع سیاه کرافت حاصل از خمیرسازی کاه گندم طراحی شده است. در این تحقیق نوع پساب (پساب مایع سیاه کاه گندم) که به دلیل سیلیس زیاد، مشکلاتی را در فرآیند بازیابی مواد شیمیایی مورد استفاده ایجاد می‌کند، مورد بررسی قرار گرفت. از طرفی با مقایسه دو میکروارگانیسم از جنس باکتری و قارچ، امکان بررسی اثرات سینرژیک و آنتاگونیستی آن در تحقیقات بعدی در حالت استفاده توامان مهیا می‌گردد و در نهایت این مطالعه گامی در جهت آماده‌سازی شرایط برای تولید بیوگاز و تسهیل شرایط تصفیه لجن فعال می‌باشد. ارزیابی کاهش شاخص‌های کلیدی آلودگی COD، BOD و TDS در این مطالعه می‌تواند مبنایی علمی برای انتخاب کارآمدترین رویکرد زیستی و یا توسعه فرآیندهای ترکیبی در تصفیه پساب صنایع خمیر و کاغذ فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی مایع سیاه پخت

نمونه‌های مایع سیاه حاصل از پخت کاه‌گندم، در آزمایشگاه تخصصی صنایع سلولزی دانشگاه محقق اردبیلی تولید شدند. فرآیند پخت با بهره‌گیری از روش کرافت در شرایط کاملاً کنترل‌شده، بر روی ۵۰ گرم کاه‌گندم در دمای ۱۶۰ درجه سلسیوس و به مدت ۳۰ دقیقه با هر دو سطح قلیاییت و سولفیدیته برابر با ۱۶ درصد صورت پذیرفت. پس از فرآیند پخت، خمیر حاصل با استفاده از ۳ لیتر آب مقطر شست‌وشو داده شد و مایع سیاه تولیدشده با عبور از صافی مش ۲۰۰ جدا شد. برای حفظ ثبات خصوصیات فیزیکوشیمیایی پساب، نمونه‌ها در ظروف استریل و دربسته انتقال داده شده و تا زمان انجام آزمایش‌های تحلیلی، در دمای زیر ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. با استناد به نتایج مقدماتی و به‌منظور ارزیابی امکان‌پذیری تخریب زیستی در کاهش مؤلفه‌های آلاینده، مایع سیاه پخت با نسبت ده برابر با آب مقطر، رقیق شد.

میکروارگانیسم‌ها

قارچ پوسیدگی سفید *P. Chrysospporium* و باکتری *B. subtilis* مورد استفاده در این مطالعه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه و برای تصفیه پساب، مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت جامد و کشت میکروبی

برای تهیه محیط کشت جامد به‌منظور ایجاد بانک میکروبی و نگهداری کشت‌های پشتیبان، مقدار ۴۲ گرم محیط کشتPDA[4] در یک لیتر آب مقطر حل شد. محلول تحت حرارت ملایم و هم‌زدن مغناطیسی قرار گرفت تا شفاف گردد. پس از مشاهده اولین حباب‌های جوش، محلول فیلتر و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ تا ۱۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل شد. سپس با کاهش دما به حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد، محیط کشت به‌صورت استریل در پتری‌دیش‌های استریل ریخته شد.

[4] Potato Dextrose Agar

تمام مراحل کشت میکروبی در شرایط استریل و زیر هود لامینار انجام گردید. پلیت‌ها با اسکالپر استریل تلقیح شده و به مدت ده روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند تا زیست‌توده قارچ *Phaenerochaete chrysosporium* یا کلنی‌های *Bacillus subtilis* ظاهر شوند. برای دستیابی به کشت‌های تازه و فعال، این فرآیند هر ۲ تا ۳ هفته یک‌بار بر روی تعداد مناسب پلیت‌های کشت جامد تکرار شد.

کشت قارچ و باکتری در محیط مایع و افزودنی های مغذی به محیط پساب

برای تکثیر قارچ *Phaenerochaete chrysosporium*، ابتدا یک لیتر آب مقطر با ترکیب مواد مغذی ذکرشده در جدول ۱ مخلوط و به‌صورت محلول یکنواخت آماده شد. محلول تهیه‌شده پس از عبور از صافی جهت حذف ناخالصی‌های احتمالی، در حجم‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری به ارلن‌مایرهای ۲۵۰ سی‌سی منتقل شد. درب ارلن‌ها با گاز استریل و فویل آلومینیومی بسته شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ تا ۱۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل شد. پس از خنک شدن، عمل تلقیح قارچ در شرایط استریل و زیر هود لامینار انجام شد (شکل ۱). برای تکثیر باکتری *Bacillus subtilis*، مقدار ۴۲ گرم از محیط کشت Nutrient Broth (ساخت شرکت کیولب انگلستان) در یک لیتر آب مقطر حل شد. سپس ۲۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع تهیه‌شده به ارلن‌مایرهای ۵۰۰ سی‌سی منتقل و مشابه روش قارچ با گاز استریل و فویل آلومینیومی بسته شد. فرایند استریل‌سازی نیز به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ تا ۱۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو انجام شد. تلقیح باکتری از روی کشت‌های پشتیبان جامد، در شرایط استریل زیر هود لامینار انجام گرفت و ارلن‌های تلقیح‌شده در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۰ دور در دقیقه به مدت ۳ روز انکوبه شدند (شکل ۱).

تیمار مایع سیاه کرافت با قارچ و باکتری به صورت سلول آزاد

پس از پایان دوره انکوباسیون و رشد کامل میسلیوم‌های قارچ *Phaenerochaete chrysosporium* در محیط کشت مایع (۱۰ روز)، مایع کشت از توده‌های میسلیومی جدا شد. میسلیوم‌ها دو بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شده و سپس با استفاده از میکسر، همگن شد. به منظور انجام تیمار، ۵ میلی‌لیتر از بیومس قارچی همگن‌شده به همراه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی مواد مغذی کربن، نیتروژن و نمک‌های معدنی (مطابق جدول ۱) به ۱۰۰ میلی‌لیتر مایع سیاه کرافت با pH تنظیم‌شده در حد ۷ اضافه گردید.

جدول ۱- ترکیب محیط غذایی مایع مورد استفاده برای تکثیر قارچ

منبع نیتروژن (g/l)	منبع کربن(g/l)	(MSB)[1]	
		مقدار (g/l)	املاح
پپتون(P) ۵		۰/۵	MgSO4. 7H2O
		۰/۱	NH4Cl
	گلوکز(G) ۱۰	۰/۵	K2HPO4
		۰/۰۵	FeSO4. 7H2O
		۰/۱	CaCl2. 2H2O
		۲	KH2PO4

[1] Mineral Salt Broth

ب الف

شکل ۱- تصویر قارچ (الف) و باکتری (ب) کشت داده شده به‌صورت سلول آزاد

برای تیمار با باکتری *Bacillus subtilis*، ۵ میلی‌لیتر از کشت مایع فعال باکتری به همراه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی مواد مغذی کربن، نیتروژن و نمک‌های معدنی (مطابق جدول ۱) به ۱۰۰ میلی‌لیتر مایع سیاه کرافت با pH تنظیم‌شده در حد ۷ اضافه شد.

در هر دو تیمار، ارلن‌های حاوی مواد تیمار به انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۰ دور در دقیقه منتقل شدند. نمونه‌برداری در زمان‌های ۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱ و ۱۴ روزه انجام و شاخص‌های آلودگی COD، BOD و TDS مطابق روش‌های استاندارد (APHA)[1] اندازه‌گیری شد.

متغیرها و ثابت‌های تیمار

برخی شرایط شامل pH برابر ۷، دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت شیکر ۸۰ دور در دقیقه (تمامی شرایط بر اساس مطالعات مقدماتی و مرور منابع بعنوان شرایط بهینه می‌باشند.)، استفاده از سلول‌های آزاد قارچ *Phaenerochaete chrysosporium* و باکتری *Bacillus subtilis* (غیر تثبیت‌شده) و افزودن مواد مغذی به‌عنوان منابع کربن، نیتروژن و ریزمغذی‌ها بر اساس تحقیقات پیشین و آزمون‌های اولیه به‌صورت ثابت برای تمامی تیمارها انجام شد. برای بررسی مقایسه‌ای بین تیمارهای مختلف، متغیرهای تحقیق مطابق جدول ۲ تعیین شد. جهت اطمینان از دقت و پایایی داده‌ها، تمامی آزمون‌های میکروبی با سه تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های آلودگی پساب

اندازه گیری اکسیژن موردنیاز بیولوژیکی (BOD)

برای انجام آزمون BOD از سیستم OxiDirect (شکل ۲) استفاده شد. مکانیسم انجام این سیستم بر پایه‌ی اندازه‌گیری فشار با استفاده از سنسورهای الکترونیکی است. سیستم BOD متر متشکل از بطری و حسگر نمونه است که در قسمت بالای آن حجم مشخصی از هوا وجود دارد. جهت اندازه‌گیری BOD، ابتدا پساب به حجم ۵۶ سی‌سی در ظروف شیشه‌ای ریخته و به آن ۳ قطره محلول نیتریفیکاسیون و ۳ قطره محلول KOH (برای خنثی کردن گازجمع شده در بالای بطری) افزوده و آن را در یخچال انکوباتور به مدت ۵ روز قرار داده تا BOD خوانده شود.

جدول ۲- صفات ثابت و متغیر تحقیق و سطوح مختلف آن

میکروارگانیسم‌ها	مایع سیاه پخت	نوع سلول میکروبی	مدت تیمار
قارچ *P.Chrysospporium*	کرافت	آزاد	۰، ۱، ۳، ۷، ۱۱، ۱۴
باکتری *B. subtilis*			

[1] American Public Health Association

شکل ۲- دستگاهBOD متر

اندازه گیری اکسیژن موردنیاز شیمیایی (COD)

تعیین COD به روش APHA(۲۰۰۵) و با استفاده از روش فلاسک بسته حاوی کیت اکسیدکننده‌های قوی دی‌کرمات‌پتاسیم و اسید سولفوریک با توان اندازه‌گیری ۱۵۰۰-۰ میلی گرم بر لیتر (spectrophotometer Aqua) انجام گرفت. نمونه پساب‌های رقیق‌شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ کرده و بعد ۲ میلی لیتر از بخش صاف‌شده را در کیت مذکور اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت درون دایجستر COD Reactor CR 25 (شکل ۳) قرار داده تا عمل اکسیدشدن مواد کامل شود. و بعد از خنک شدن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر۷۱۰۰ (شکل ۳) به روش رنگ سنجی، اندازه‌گیری شد

شکل۳- دایجستر و اسپکتروفوتومتر مربوط به COD متر

اندازه گیری کل مواد جامد محلول (TDS)

برای اندازه‌گیری میزان TDS، ابتدا کاغذ صافی را به همراه بوته‌چینی در آون در دمای۱ ۱۰۳± درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت گذاشته شد تا کاملا خشک شوند و پس از آن به منظور رسیدن به دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه در داخل دسیکاتور قرار داده و در ادامه، وزن خشک اولیه هر یک اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمایش، ۳۰ میلی لیتر از پساب را از کاغذ صافی دارای تخلخل ۰/۴۵ میکرومتر با استفاده از پمپ خلا عبور داده و داخل بوته‌چینی که از قبل وزن شده بود ریخته و در آون با دمای۱ ۱۰۳± درجه سانتی گراد گذاشته شد تا کاملاً تبخیر شود. پس از اتمام کار مجدداً بوته چینی را وزن کرده و با استفاده از رابطه زیر، TDS مورد محاسبه قرار گرفت:

$$TDS = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 10^6 (mg/l) \qquad (۱)$$

W1: وزن اولیه بوته چینی،

W2: وزن بوته چینی به همراه ۳۰ میلی لیتر پساب صاف شده خشک

طرح آماری

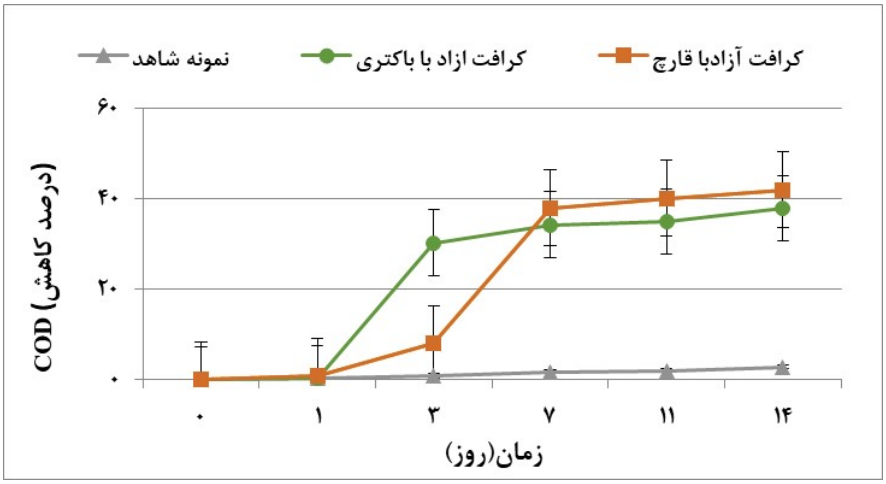
به منظور تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS استفاده شد و جهت مقایسه‌ی معناداری تاثیر هر یک از متغیرها بر شاخص‌های آلودگی بین دو گروه از آزمون T مستقل استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر تخریب‌زیستی نوع میکروارگانیسم (باکتری و قارچ) بر COD

بر اساس مطالعات پیشین، حضور ترکیبات گوگردی در فرآیند کرافت منجر به تشکیل لیگنوسولفونات‌ها می‌شود که ساختار مقاوم‌تری نسبت به سایر مشتقات لیگنین داشته و نقش بازدارندگی در تجزیه زیستی ایفا می‌کنند [۳، ۹]. بر اساس نتایج (شکل۴)، هر دو میکروارگانیسم در روز نخست، دوره سازگاری خود را طی کرده و کاهش COD کمتر از یک درصد مشاهده شد. با توجه به اینکه دوره نهفتگی باکتری B. subtilis حدود ۲۰ ساعت گزارش شده است [۱۲]، ورود این میکروارگانیسم به فاز رشد نمایی، سریع‌تر از قارچ اتفاق افتاد؛ به‌طوری‌که در روز سوم، کاهش COD توسط باکتری ۳۰/۳۳ درصد و توسط قارچ ۱۱/۸ درصد ثبت شد. این اختلاف نشان‌دهنده سرعت بالاتر رشد و فعالیت باکتری در مراحل ابتدایی تیمار است. در ادامه، با شروع ترشح آنزیم‌های لیگنینولیتیک توسط قارچ و سازگاری بهتر آن با محیط کرافت، روند تجزیه COD توسط *P. chrysosporium* شتاب گرفت و از روز هفتم به بعد میزان کاهش COD در قارچ از باکتری پیشی گرفت. نتایج آزمون t مستقل در روزهای ۷ تا ۱۴ نشان داد اختلاف کاهش COD بین دو تیمار از روز هفتم به بعد معنادار می‌باشد ($p<۰/۰۵$) و این برتری تا پایان دوره ادامه یافت. نهایتاً در روز چهاردهم، کاهش COD توسط قارچ ۴۲/۰۵ درصد و توسط باکتری ۳۸/۰۳ درصد بدست آمد. بنابراین، COD اولیه معادل ۱۲۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پس از ۱۴ روز تیمار به ۷۰۷۰ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار قارچی و به ۷۵۶۰ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار باکتریایی کاهش یافت. این میزان کاهش COD می‌تواند به‌عنوان یک مرحله پیش‌تیمار مؤثر پیش از فرآیند تصفیه بیولوژیکی لجن فعال یا تولید بایوگاز مورد استفاده قرار گیرد.

یکی از نکات قابل توجه، شیب کمتر کاهش COD در هر دو میکروارگانیسم در روزهای پایانی تیمار می‌باشد که احتمالاً ناشی از پدیده‌هایی مانند اتولیز سلولی، تجمع متابولیت‌های بازدارنده و کاهش اکسیژن محلول در محیط است که سبب محدودیت در فعالیت زیستی می‌شوند. بنابراین، هرچند قارچ در مقایسه با باکتری عملکرد پایدارتری داشت، اما پایداری بلندمدت تیمار زیستی نیازمند توجه به این عوامل بازدارنده است [۲۰]. از منظر کاربردی، این نتایج نشان می‌دهد که *B. subtilis* به دلیل رشد سریع و ورود زودهنگام به فاز نمایی، می‌تواند در فازهای ابتدایی تصفیه نقش مهمی داشته باشد، در حالی که *P. chrysosporium* به دلیل توانایی ویژه در ترشح آنزیم‌های لیگنینولیتیک و تخریب ترکیبات آروماتیک مقاوم، گزینه‌ای کارآمدتر برای دستیابی به کاهش پایدار COD در مقیاس صنعتی است. ترکیب این دو میکروارگانیسم یا استفاده متوالی از آن‌ها می‌تواند یک استراتژی مؤثر برای تصفیه زیستی مایع سیاه کرافت در صنایع خمیر و کاغذ باشد. Liu و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که B. subtilis با ترشح مجموعه‌ای از آنزیم‌های هیدرولیتیک و اکسیداتیو قادر است تجزیه لیگنین قلیایی را به‌سرعت آغاز کند و از طرفی دیگر، قارچ *P. chrysosporium* با وجود رشد کندتر در مراحل ابتدایی، در فاز ثانویه به دلیل ترشح آنزیم‌های لیگنینولیتیک قوی، عملکرد برتری در کاهش COD از خود نشان می‌دهد [۱۸]، موضوعی که با نتایج Sharari و همکاران (۲۰۱۱) نیز هم‌خوانی دارد [۲۰]. علاوه بر این، مطالعه Gu و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که مسیرهای آنزیمی باکتریایی و قارچی در تجزیه لیگنین متفاوت است و این تفاوت منجر به برتری قارچ در حذف ترکیبات آروماتیک مقاوم و کاهش COD پساب‌های لیگنوسلولزی می‌شود [۶].



شکل ۴- نمودار بررسی اثر مقایسه‌ای باکتری و قارچ آزاد بر COD مایع سیاه کرافت

اثر تخریب‌زیستی نوع میکروارگانیسم (باکتری و قارچ) بر BOD

یکی از شاخص‌های کلیدی در ارزیابی پتانسیل زیست‌تخریب‌پذیری پساب‌های صنعتی، نسبت BOD به COD است. در صورتی که این نسبت بیش از ۰/۷۵ باشد، قابلیت تجزیه زیستی بالا است، در حالی‌که مقادیر کمتر از ۰/۴، نشان‌دهنده دشواری فرآیند تصفیه است. در این پژوهش، مایع سیاه کرافت با COD اولیه ۱۲۲۰۰ و BOD معادل ۷۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، نسبت ۰/۵۸۲ را نشان داد که بیانگر وجود ترکیبات سمی و لیگنین‌های سولفوردار مقاوم است ولی با این تناسب، امکان تخریب زیستی برای مایع سیاه رقیق شده، فراهم است. نتایج نشان داد که کاهش BOD همانند COD محدود بوده، اما شدت آن کمی بیشتر بود. در نمونه شاهد، پس از ۱۴ روز کاهش BOD تنها ۱/۴ درصد مشاهده شد، در حالی‌که تیمار میکروبی، باعث کاهش قابل توجهی در این فاکتور شد. در روز سوم، *B. subtilis* به دلیل خروج سریع‌تر از فاز نهفتگی، توانست BOD را ۳۲/۲۵ درصد کاهش دهد، در حالی‌که در همان زمان قارچ تنها ۱۶/۹ درصد کاهش ایجاد کرده بود. بر طبق آزمون آماری t مستقل این اختلاف در سطح بسیار معنادار ارزیابی شد ($p<۰/۰۱$). با این حال، قارچ از روز هفتم به بعد با ترشح آنزیم‌های لیگنینولیتیک (LiP، MnP و Lac) و تخریب ترکیبات پیچیده‌تر، عقب‌ماندگی اولیه را جبران نمود به‌طوری‌که در روز یازدهم اختلاف کاهش BOD بین دو تیمار معنادار بود ($p<۰/۰۵$) و در پایان روز چهاردهم، کاهش BOD توسط قارچ ۵۶/۵۵ درصد و توسط باکتری ۴۰/۱۴ درصد ثبت شد که این اختلاف نیز در سطح بالایی معنادار بود ($p<۰/۰۱$) (شکل ۵).

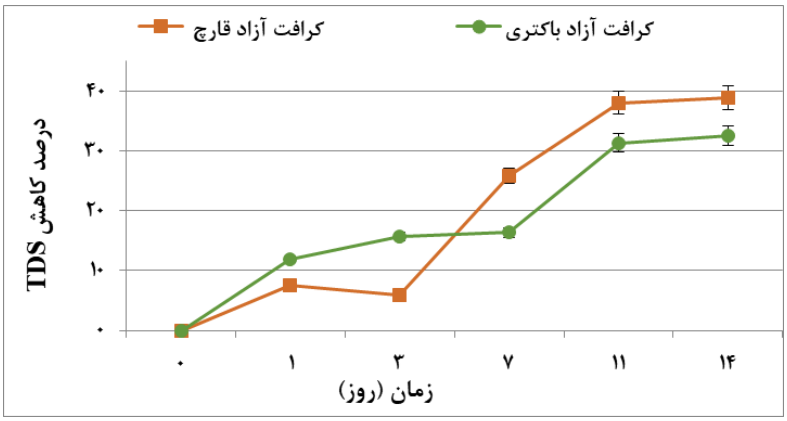
یکی از نکات مهم و قبل توجه اینکه از روز هفتم به بعد روند کاهش BOD با شیب کمتری ادامه یافت. این موضوع احتمالاً ناشی از کاهش ترکیبات زیست‌تخریب‌پذیر ساده، تجمع متابولیت‌های بازدارنده، کاهش اکسیژن محلول و آغاز اتولیز بخشی از سلول‌های میکروبی است[۲۰]. بنابراین، اگرچه قارچ در مقایسه با باکتری عملکرد پایدارتری نشان داد، اما برای پایداری بلندمدت تیمار زیستی باید به این عوامل محدودکننده توجه شود.از منظر کاربرد صنعتی، کاهش پایدار BOD اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا مستقیماً با کاهش بار آلودگی و تقاضای اکسیژن در محیط‌های آبی مرتبط است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که *P. chrysosporium* به دلیل توانایی در تجزیه ترکیبات آروماتیک و پایدار، گزینه‌ای کارآمد برای پیش‌تیمار مایع سیاه کرافت است. از سوی دیگر، *B. subtilis* با عملکرد سریع‌تر در مراحل اولیه می‌تواند در سامانه‌های ترکیبی به‌عنوان مکمل قارچ به تسریع فرآیند تصفیه کمک کند. این نتایج با مطالعه Liu و همکاران (۲۰۲۳) همسو می‌باشد؛ آن‌ها نشان دادند که *B. subtilis* با برخورداری از مجموعه‌ای از آنزیم‌های هیدرولیتیک و اکسیداتیو در مراحل ابتدایی تجزیه لیگنین فعالیت سریعی دارد و در ادامه نیز می‌تواند به تجزیه ترکیبات پیچیده لیگنوسلولزی کمک کند [۱۸]. در مقابل، یافته‌های حاضر مشابه با نتایج Mir-Tutusaus و

همکاران (۲۰۱۸) و Sharari و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد که برتری قارچ *P. chrysosporium* در کاهش بار آلی و BOD پساب‌های لیگنوسلولزی را تأیید کردند [۲۰، ۱۱]. همچنین، Gu و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که آنزیم‌های لیگنینولیتیک قارچ‌ها نسبت به آنزیم‌های باکتریایی توانایی بیشتری در تجزیه ترکیبات آروماتیک مقاوم داشته و این موضوع دلیل اصلی موفقیت قارچ در مقایسه با باکتری است [۶].

شکل ۵- نمودار بررسی اثر مقایسه‌ای باکتری و قارچ آزاد بر BOD مایع سیاه کرافت

اثر تخریب‌زیستی نوع میکروارگانیسم (باکتری و قارچ) بر TDS

در فرآیند تصفیه پساب، تصفیه اولیه عمدتاً معطوف به حذف TSS می‌باشد در حالی که تیمار ثانویه یا زیستی بر کاهش TDS تمرکز دارد. به همین دلیل، بررسی تغییرات TDS اهمیت ویژه‌ای در ارزیابی کارایی زیست‌تخریب‌پذیری دارد. کاهش TDS در هر دو میکروارگانیسم شامل دو فاز اصلی بود. در قارچ، فاز نخست از روز اول تا سوم مشاهده شد که عمدتاً ناشی از جذب ترکیبات رنگی و آلی ساده (نظیر کربوهیدرات‌ها، ۰/۵ درصد پپتون، ۱ درصد گلوکز و مقادیر ریزمغذی‌ها) توسط میسلیوم بود. طی این دوره، کاهش TDS تنها ۵/۹۳ درصد ثبت شد و به دلیل آزادسازی مجدد ترکیبات جذب‌شده [۲۰]، روند کاهش با شیب ملایم ادامه داشت. فاز دوم از روز سوم تا هفتم مقارن با رشد لگاریتمی و ترشح آنزیم‌های لیگنینولیتیک آغاز شد و در پایان روز هفتم کاهش TDS به ۲۵/۸۱ درصد رسید. پس از آن، روند کاهش کندتر شد و در پایان روز چهاردهم به ۳۸/۹۱ درصد رسید (شکل ۶). در باکتری *B. subtilis* به دلیل سازگاری سریع‌تر و ورود زود هنگام به فاز رشد نمایی، کاهش TDS در روز سوم به ۱۵/۶۷ درصد رسید که حدود ۱۰ درصد بیشتر از قارچ در همان زمان بود. در فاصله روز هفتم تا یازدهم، شدت کاهش TDS به‌وضوح مشاهده شد که احتمالاً به شروع رشد نمایی باکتری مربوط می‌شد. نهایتاً در پایان روز چهاردهم، میزان کاهش TDS در تیمار باکتری ۳۲/۴۹ درصد ثبت گردید. نتایج آزمون t مستقل نهایی (۱۴ روز) نشان داد که اختلاف بین دو تیمار در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنادار است ($p<0/05$). به‌طوری‌که قارچ *P. chrysosporium* با کاهش ۳۸/۹۱ درصدی TDS عملکرد بهتری نسبت به باکتری *B. subtilis* (۳۲/۴۹ درصد) داشته است. Jin و همکاران (۲۰۲۱) در تحقیقی، کاهش TDS و تجزیه ترکیبات محلول آلی توسط قارچ‌های پوسیدگی سفید را تأیید کردند [۱۳]. همچنین، Zhai و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که قارچ *P. chrysosporium* در شرایط ترکیبی توانایی بالاتری در تجزیه ترکیبات محلول لیگنینی و کاهش TDS دارد [۱۴]. از سوی دیگر، یافته‌های Liu و همکاران (۲۰۲۳) بیانگر آن است که *B. subtilis* اگرچه در مراحل ابتدایی فعالیت سریعی در کاهش TDS دارد، اما در مقایسه با قارچ در تخریب ترکیبات پایدار لیگنینی محدودیت بیشتری نشان می‌دهد [۱۸].



شکل ۶- تاثیر نوع میکروارگانسیم بصورت سلول آزاد بر TDS در مایع سیاه کرافت

نتیجه گیری

این پژوهش با هدف مقایسه کارایی دو میکروارگانیسم، قارچ *Phaenerochaete chrysosporium* و باکتری *Bacillus subtilis* در شرایط سلول آزاد بر روی مایع سیاه کرافت حاصل از خمیرسازی کاه گندم انجام شد. مایع سیاه کرافت به دلیل غلظت بالای لیگنین، ترکیبات فنولی و مشتقات سولفوردار از مهم‌ترین منابع آلودگی زیست‌محیطی در صنایع خمیر و کاغذ محسوب می‌شود.

نتایج نشان داد که هر دو میکروارگانیسم توانستند شاخص‌های آلایندگی شامل COD، BOD و TDS را کاهش دهند، اما میزان اثرگذاری آن‌ها متفاوت بود. قارچ *P. chrysosporium* باعث کاهش ۴۲/۰۵، ۵۶/۵۵و ۳۸/۹۱ درصدی به ترتیب در COD، BOD و TDS شد. در مقابل، باکتری *B. subtilis* نیز کاهش ۳۸/۰۳، ۴۰/۱۴ و ۳۲/۴۹ درصدی را به ترتیب در COD، BOD و TDS ایجاد کرد. این نتایج نشان داد که باکتری به دلیل خروج سریع‌تر از فاز نهفتگی و شروع زودهنگام رشد نمایی در روزهای ابتدایی تیمار (به‌ویژه روز سوم) عملکرد بهتری در کاهش COD و BOD داشت که در تیمارهای کوتاه مدت، موثرتر از این قارچ است؛ اما در ادامه، قارچ با بهره‌گیری از ترشح آنزیم‌های لیگنینولیتیک قوی‌تر، توانست کاهش پایدارتر و بیشتری در آلاینده‌ها ایجاد کند. یافته‌ها نشان می‌دهد که اگرچه B. subtilis به دلیل سرعت رشد و سازگاری بالا در مراحل اولیه تیمار می‌تواند نقش موثری داشته باشد ولی *P. chrysosporium* با توانایی اختصاصی در تجزیه ترکیبات آروماتیک و لیگنین متراکم، گزینه کارآمدتری برای کاهش بار آلودگی پساب کرافت در مقیاس بلندمدت می‌باشد. بر این اساس، اهمیت کار حاضر در این است که استفاده از قارچ *P. chrysosporium* می‌تواند به‌عنوان راهکاری زیستی مؤثر و سازگار با محیط‌زیست برای تصفیه اولیه مایع سیاه کرافت مدنظر قرار گیرد. در عین حال، حضور B. subtilis می‌تواند در سیستم‌های ترکیبی مکمل قارچ بوده و به تسریع مراحل ابتدایی تصفیه کمک کند. این نتایج مبنایی علمی برای توسعه سامانه‌های زیستی ترکیبی و کاهش اتکا به روش‌های پرهزینه شیمیایی و حرارتی در صنایع خمیر و کاغذ فراهم می‌آورد و در عین حال پیش تیماری موثر برای تصفیه لجن فعال و تولید سوختهای زیستی و بایوگاز باشد. نتایج نشان داد که در پایان دوره ۱۴ روزه، قارچ *P. chrysosporium* توانست به‌طور معناداری کاهش بیشتری در شاخص‌های آلایندگی نسبت به باکتری *B. subtilis* ایجاد کند، به‌طوری‌که کاهش COD و BOD در قارچ به‌ترتیب ۴۲/۰۵٪ و ۵۶/۵۵٪ بود، در حالی‌که این مقادیر برای باکتری به‌ترتیب ۴۸/۰۳٪ و ۴۰/۱۴٪ گزارش شد.

با این حال از محدودیت‌های این پژوهش آن است که فرآیند تخریب زیستی صرفاً در مقیاس آزمایشگاهی و تحت شرایط سلول آزاد مورد ارزیابی قرار گرفت. بنابراین، بررسی تأثیر پارامترهایی نظیر تثبیت سلولی، شدت و الگوی تهویه، نسبت تغذیه (C:N:P) و زمان ماند هیدرولیکی در مقیاس‌های نیمه‌صنعتی، ضروری به نظر می‌رسد تا کارایی واقعی سامانه زیستی در شرایط صنعتی

مشخص شود. در عین حال، محدودیتهای تکنولوژیکی برای رصد دائمی pH، DO و اندازه‌گیری روند تغییرات آنزیم‌های لیگنینولیتیک، همراه بوده و پیشنهاد می‌شود ضمن ارزیابی دائمی میزان قندهای تجزیه شونده و روند تغییرات گروهای عاملی، اثر کاهش احتمالیDO و استفاده تلفیقی و یا متوالی این دو میکروارگانیسم و یا مشابه آن ها برای بررسی رفتار سینرژیک و یا آنتاگونیستی در بهینه‌سازی تولید آنزیم‌های لیگنینولیتیک در کاهش آلاینده‌ها و تولید فرآورده‌های ارزشمند زیستی مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

[1] Buraimoh, O.M., Amund, O.O. and Ilori, M.O., 2015. Kraft lignin degradation by autochtonous streptomyces strains isolated from a tropical lagoon ecosystem. http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2015/16.5.3.248-253

[2] Chang, Y.C., Choi, D., Takamizawa, K. and Kikuchi, S., 2014. Isolation of Bacillus sp. strains capable of decomposing alkali lignin and their application in combination with lactic acid bacteria for enhancing cellulase performance. Bioresource technology, 152, pp.429-436. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.032

[3] Zhang, L., Chen, K. and Peng, L., 2017. Comparative research about wheat straw lignin from the black liquor after soda-oxygen and soda-AQ pulping: structural changes and pyrolysis behavior. Energy & Fuels, 31(10), pp.10916-10923. https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.energyfuels.7b01786

[4] Tutuş, A.H.M.E.T. and Eroğlu, H.Ü.D.A.V.E.R.D.I., 2003. A practical solution to silica problem in straw pulping. Appita Journal, 56(2), pp.111-115. https://www.researchgate.net/publication/279572437

[5] Kamali, M., Gameiro, T., Costa, M.E.V. and Capela, I., 2016. Anaerobic digestion of pulp and paper mill wastes–An overview of the developments and improvement opportunities. Chemical Engineering Journal, 298, pp.162-182. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.119

[6] Gu, J., Qiu, Q., Yu, Y., Sun, X., Tian, K., Chang, M., Wang, Y., Zhang, F. and Huo, H., 2024. Bacterial transformation of lignin: key enzymes and high-value products. Biotechnology for biofuels and bioproducts, 17(1), p.2. http://dx.doi.org/10.1186/s13068-023-02447-4

[7] van der Made, J.J., Landis, E.A., Deans, G.T., Lai, R.A. and Chandran, K., 2023. Synergistic lignin degradation between Phanerochaete chrysosporium and Fenton chemistry is mediated through iron cycling and ligninolytic enzyme induction. Science of the Total Environment, 905, p.166767. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166767

[8] Mahesh, S., Prasad, B., Mall, I.D. and Mishra, I.M., 2006. Electrochemical degradation of pulp and paper mill wastewater. Part 1. COD and color removal. Industrial & engineering chemistry research, 45(8), pp.2830-2839. https://doi.org/10.1021/ie0514096

[9] Lihong, M., Furong, L. and Jinli, W., 2009. Biological treatment of high-pH and high-concentration black liquor of cotton pulp by an immediate aerobic-anaerobic-aerobic process. Water Science and Technology, 60(12), pp.3275-3284. https://doi.org/10.2166/wst.2009.737

[10] Kumar, A., Kumar, J. and Bhaskar, T., 2020. Utilization of lignin: A sustainable and eco-friendly approach. Journal of the Energy Institute, 93(1), pp.235-271. https://doi.org/10.1016/j.joei.2019.03.005

[11] Mir-Tutusaus, J.A., Baccar, R., Caminal, G. and Sarrà, M., 2018. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. Water research, 138, pp.137-151. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056

[12] Abd-Elsalam, H.E. & El-Hanafy, A.A., 2009. Lignin biodegradation with lignolytic bacterial strain and comparison of Bacillus subtilis and Bacillus sp. isolated from Egyptian soil. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 5(1), pp.39–44. https://doi.org/10.1186/s43141-021-00284-2

[13] Jin, L., Zeng, G., Chen, H., Wang, L., Ji, H., Lin, S., Peng, R. and Sun, D., 2021. Mechanism of Lignin Degradation via White Rot Fungi Explored Using Spectral Analysis and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. BioResources, 16(3). http://dx.doi.org/10.55043/jaast.v7i3.186

[14] Zhai, S., Wang, K., Yu, F., Gao, Z., Yang, X., Cao, X., Shaghaleh, H. and Hamoud, Y.A., 2025. Effects of Trichoderma harzianum combined with Phanerochaete chrysosporium on lignin degradation and humification during chicken manure and rice husk composting. Frontiers in Microbiology, 16, p.1515931. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1515931

[15] Kumar, S., Haq, I., Prakash, J., Singh, S.K., Mishra, S. and Raj, A., 2017. Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from Bacillus amyloliquefaciens and its application in pre-bleaching of kraft pulp. 3 Biotech, 7(1), p.20. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0615-y

[16] Sumranwanich, T., Amosu, E., Chankhamhaengdecha, S., Phetruen, T., Loktumraks, W., Ounjai, P. and Harnvoravongchai, P., 2024. Evaluating lignin degradation under limited oxygen conditions by bacterial isolates from forest

soil. Scientific Reports, 14(1), p.13350. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-64237-8

[17] Dafinov, A., Font, J. and Garcia-Valls, R., 2005. Processing of black liquors by UF/NF ceramic membranes. Desalination, 173(1), pp.83-90. https://doi.org/10.1016/j.desal.2004.07.044

[18] Liu, G., Zhang, K., Gong, H., Yang, K., Wang, X., Zhou, G., Cui, W., Chen, Y. and Yang, Y., 2023. Whole genome sequencing and the lignocellulose degradation potential of Bacillus subtilis RLI2019 isolated from the intestine of termites. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 16(1), p.130. http://dx.doi.org/10.1186/s13068-023-02375-3

[19] Sharari, M., Roohani, M., Latibari, A.J., Guillet, A., Aurousseau, M. and Sharari, A., 2013. Treatment of bagasse preparation effluent by Phanerochaete chrysosporium immobilized on polyurethane foam: Enzyme production versus pollution removal. Industrial crops and products, 46, pp.226-233. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.001

[20] Sharari, M., Jahan Latibari, A., Guillet, A., Aurousseau, M., Mouhamadou, B., Rafeiee, G.H., Mirshokraei, A. and Parsapaghouh, D., 2011. Application of the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium in biotreatment of bagasse effluent. Biodegradation, 22(2), pp.421-430. https://doi.org/10.1007/s10532-010-9415-3