علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره سیزدهم، شماره دو، تابستان ۹۰

جذب زیستی سرب توسط باکتری های جداشده از پساب های صنایع پتروشیمی

بیتا کریم سلمانی[۱]

محمد علی آموزگار[۲]*

amozegar@khayam.ut.ac.ir

جواد حامدی [۲]

تاریخ دریافت:۸۶/۱۱/۲۰ **تاریخ پذیرش:۸۷/۷/۳**

چکیده

جذب زیستی جایگزین مناسبی برای روش های فیزیکی و شیمیایی مرسوم برای حذف فلزات سمی از آب های زیرزمینی و پساب ها است. در این تحقیق، ۹۹ سویه باکتری از ۳ نمونه پساب از یکی از صنایع پتروشیمی ایران جداسازی شد. بررسی توان این جدایه ها برای تحمل سرب با استفاده از محیط کشت PYT agar حاوی غلظت های مختلف از ۴ تا ۱۵ میلی مول از $Pb(NO_3)_2$ انجام گرفت. جدایه های KAH1، KAH2 و KAH3 قادر به تحمل به ترتیب ۱۵، ۶/۵ و ۶/۵ میلی مول نیترات سرب بودند. این سویه های با تحمل بالا برگزیده شده و توانایی جذب زیستی سرب آن ها با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب اتمی بررسی شد. بیشترین توان در سویه KAH1 دیده شد و این سویه بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت به ترتیب غلظت سرب را از ۸۰ mg/l به ۴۸/۲ و ۴۴/۴ mg/l کاهش داد. نتایج آزمایش ها نشان دادند که جذب سرب تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله pH، غلظت اولیه محلول سرب و زمان تماس است. بر اساس ویژگی های ریخت شناسی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی سویه و مقایسه آن با صفات سویه های معتبر، این سویه به طور موقت درجنس sp. strain Bacillus KAH1 قرارداده شد. حداکثر ظرفیت جذب زیستی سرب جدایه KAH1 برابر با ۴۸/۲۵ mg/g(۹۷/۶۷٪) در pH ۴، با غلظت ۱۵۰ mg/l در زمان تعادل ۴ ساعت بوده است.

واژه های کلیدی: *Bacillus* sp.، پساب پتروشیمی، جذب زیستی، سرب.

۱- دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲-دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران (مسئول مکاتبات)

مقدمه

پیشرفت روزافزون صنایع در دهه اخیر مهم ترین عامل آلودگی محیط زیست بوده و پساب های آلوده صنایع مختلف مانند چرم سازی، استخراج معادن و پتروشیمی باعث ورود مقدار زیادی فلزات سنگین مانند کروم، کادمیوم، نیکل، کبالت، روی و سرب به محیط زیست می گردد. حضور تراکم های سمی فلزات در محیط، اثرات زیانباری در سلامت انسان و حیوانات داشته و موجب بر هم خوردن تعادل و نظم اکوسیستم می شود (۱). از این رو مطالعه راه های حذف این آلاینده ها بسیار ضروری است. بررسی‌ها نشان داده که روش های شیمیایی و فیزیکی مانند اکسیداسیون-احیاء، رسوب دادن شیمیایی، فیلتراسیون، تیمارالکتروشیمیایی، تبخیر، تبادل یونی و فرآیند اسمزمعکوس محدودیت هایی دارند و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیستند. اولاً این روش ها برای پساب های حاوی مواد آلی پیچیده مناسب نیست و ثانیاً این روش ها برای غلظت های بالای فلزات سنگین کاربرد دارند. همچنین بازیافت فلزات از آن ها نسبت به روش های دیگر دشوار است. به نظر می رسد تصفیه زیستی، جانشین و یا دست کم مکمل مناسبی برای دیگر روش ها باشد و در همین رابطه بسیاری از میکروارگانیسم ها می توانند برای حذف فلزات سنگین از سیستم های پساب مفید باشند(۱).

در فرآیند جذب زیستی توسط میکروارگانیسم ها، بهره مندی از میکروارگانیسم های مقاوم به فلزات سنگین بهتر است. پژوهش های اخیر نشان داده که سویه های (باکتریایی، مخمری و قارچی) جدا شده از مکان های آلوده، توانایی بالایی برای فلزپالایی دارند. بعضی از سویه های باکتریایی تحمل بالا برای فلزات گوناگون داشته ومی توانند برای حذف هم زمان این فلزات از پساب در نظر گرفته شوند. جذب سرب در گونه های *Pseudomonas sp.* ، (۱) *Bacillus subtilis* *Citrobacter* . ، (۳) S*accharomyces cervisiae*،(۲) *sp* (۴) *Bacillus firmus* ، (۵) *Chryseomonas* *Pseudomonas* ،(۶) *luteola* MGF-48 *aeuroginosa* (۷) ، باکتری گرمادوست *Anoxybacillus* *flavithermus* (۸)، *Bacillus pumilus* *sp*.،(۷) *Sinorhizobium* (۹) ، *Klebsiella pneumoniae* (۱۰)، *B .sphearicus*، *Bacillus megaterium* و *B. cereus*(۱۱) مشاهده شده است.

با توجه به این که حدود ۱٪ از میکروارگانیسم های کره زمین شناخته شده است، امکان جداسازی و یافتن سویه های با توان بالا از محیط وجود دارد. هدف پژوهش کنونی نیز، جداسازی باکتری های جذب کننده فلز سرب و انتخاب انواع گونه های دارای توان جذب بالا از پساب های پتروشیمی حاوی غلظت زیاد این فلز است.

مواد و روش ها

ǻʒʜʏƐ\ ǴĨŃƵ

از ۳ خروجی مختلف پساب صنایع پتروشیمی دارای سرب نمونه برداری شد. به منظور جمع آوری نمونه ها، از لوله های شیشه‌ای درپیچ دار سترون استفاده شد و pH نمونه ها اندازه گیری شد.

جداسازی باکتری ها از نمونه های پساب

نمونه های پساب جمع آوری شده در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی و رسوب حاصل، به لوله های حاوی محیط کشت نوترینت برات با pH معادل ۷ افزوده و در دمای ۳۴ $^{\circ}$ C به مدت یک هفته گرماگذاری شد. باکتری های غنی شده به دست آمده با استفاده از محیط کشت نوترینت آگار، جدا و خالص شد.

kƐs Ǵ\ ǻƐ♯žř ǨǰƬ℣ ǰ℠

حساسیت سویه ها به Pb^{2+} به روش سنجش مهار رشد تعیین شد. به این منظور از محیط PYT agar (دارای g ۱۰ پپتون،g ۲ عصاره مخمر،g ۰/۸ تریپتون، g ۱۵ آگار در هر لیتر و بافر MES به غلظت ۱۰mM، با pH ۷) استفاده شد. پس از اتوکلاو به این محیط، غلظت های مختلف (۴، ۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۲و ۱۵mM) نیترات سرب سترون شده

با صافی ۰/۴۵ µm افزوده شد (۱۲). سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی دارای حدود $1/5\times10^{6}$ c.f.u. ml^{-1} به صورت لکه گذاری تلقیح و در ۳۴°C به مدت ۵ -۲ روز نگه داری و حداقل غلظت مهار رشد سرب (MIC) تعیین شد.

سنجش میزان حذف سرب

میزان جذب فلز توسط ۳ سویه برتر دارای توانایی بالای تحمل سرب سنجیده شد. به این منظور، ۱٪ از سوسپانسیون باکتریایی دارای حدود $1/5\times10^{6}$ c.f.u. ml^{-1} در فلاسک های ml ۱۰۰ دارای ml ۲۰ محیط کشت PYT برات با pH ۶/۵ دارای mg/l ۸۰ سرب تلقیح شد. و فلاسک ها در ۱۵۰rpm و درجه حرارت ۳۴°C به مدت ۴۸ و۹۶ ساعت گرما گذاری شدند. در زمان های ۴۸ و ۹۶ ساعت، نمونه برداری شد و نمونه ها در ۵۰۰۰rpm و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان سرب باقی مانده در محلول رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری جذب اتمی (AAS) سنجیده شد(۱۳). به این منظور از دستگاه اسپکتروفتومتری جذب اتمی شعله ای (مدل۲۰۰ .Varian-SpectrAA ، Canada) با سوخت استیلن-هوا استفاده شد. با استفاده از محلول ذخیره mg/l ۱۰۰۰سرب، محلول های استاندارد (۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰mg/l) سرب با آب دیونیزه تهیه شد و محاسبات بر اساس منحنی کالیبراسیون انجام گرفت. لازم به ذکر است که همه آزمایش های جذب اتمی با دوبار تکرار انجام گرفت و در نهایت میانگین آن ها به صورت عدد نهایی جذب گزارش گردید. خطاهای آزمایش تعیین و به صورت خطای معیار (error bar) در بخش نتایج نمایش داده شد. برای محاسبه میزان جذب فلز توسط بیومس موجود، از فرمول $q=V(C_i-C_f) / S$ استفاده شد. پارامتر q معرف میزان جذب فلز توسط بیومس (ظرفیت جذب زیستی) است که با واحد میلی گرم فلز جذب شده درهر گرم وزن خشک باکتری(mg/gdw) گزارش شده است. پارامتر V معرف حجم محلول مجاورسازی بر حسب لیتر، C_i غلظت اولیه محلول فلزی بر حسب mg/l ، C_f غلظت فلز پس از مجاورسازی بر حسب mg/l و پارامتر S وزن خشک بیومس با واحدگرم می باشد(۱۴). درصد جذب از اختلاف میزان سرب اولیه و باقی مانده در محلول نسبت به میزان سرب اولیه محاسبه شد.

سنجش وزن تر و خشک باکتریایی

از سوسپانسیون باکتریایی دارای حدود c.f.u. ml^{-} $1/5\times10^{61}$ به محیط PYT broth فاقد سرب تلقیح شد و به مدت ۴۸ ساعت در شیکر با دور ۱۵۰rpmو درجه حرارت ۳۴°C گرما گذاری گردید. کشت حاصل در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب به دست آمده دوبار با آب دیونیزه شسته شد و پس از سانتریفوژ، با ترازوی دیجیتالی با دقت g ۰/۰۰۱ توزین و میزان بیومس تر سلولی محاسبه شد. برای سنجش وزن خشک سلولی، مقدار معینی از بیومس تر در بشرهای شیشه ای با درپوش آلومینیومی از قبل وزن شده ریخته شد. نمونه ها به مدت ۱۶ ساعت در آون C ° ۸۰ قرار داده شد و بعد از گذشت زمان مربوطه از اختلاف وزن، وزن خشک بیومس تعیین گشت(۱۳).

بررسی عوامل مؤثر در حذف سرب

بررسی اثر pH محیط در میزان جذب سرب

به منظور تعیین اثر pH در جذب سرب توسط سویه منتخب، ابتدا محلول فلزی نیترات سرب حاوی ۱۰۰mg/l سرب به طور جداگانه دارای مقادیر pH مختلف از ۶-۲ با فاصله ۱ واحد تهیه گردید (در مقادیر pH بالاتر از ۶، رسوب سرب مشاهده شد به همین دلیل آزمایش ها در این محدوده انجام شد). برای تنظیم pH از HCl و NaOH ۱ نرمال استفاده شد. سپس به هر کدام از فلاسک های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ml ۲۵ محلول سرب، به میزان ۰/۵ گرم بیومس تر سویه منتخب KAH1 تلقیح شد(۲٪). سپس به مدت ۹۰ دقیقه در شیکر با دور ۱۵۰rpmو درجه حرارت C ° ۳۴ گرما گذاری گردید.

بررسی اثر غلظت سرب در میزان جذب

به منظور بررسی اثر غلظت اولیه محلول فلزی در جذب سرب، غلظت های مختلف محلول فلزی سرب(۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰mg/l) با pH ۴(pH بهینه) بر حذف سرب توسط

بیومس باکتری KAH1 مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از گذشت زمان ۹۰ دقیقه گرماگذاری در C ° ۳۴ و ۱۵۰rpm، میزان جذب محاسبه شد.

بررسی اثر زمان مواجهه سویه با سرب در میزان جذب

اثر زمان مجاورسازی بیومس باکتری با محلول فلزی سرب با غلظت mg/l ۱۵۰(غلظت بهینه) و pH معادل ۴ در میزان جذب سنجیده شد. به این منظور به فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ml ۷۵ از محلول نیترات سرب با غلظت mg/l ۱۵۰ سرب و pH معادل ۴، میزان ۲٪ از بیومس تر باکتری تلقیح شد و در شیکر با دور ۱۵۰rpmو درجه حرارت C ° ۳۴ گرما گذاری گردید و بعد از گذشت زمان های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۳۰۰، ۳۶۰ دقیقه از فلاسک مربوطه به میزان ۱۰ml نمونه برداری صورت گرفت. میزان سرب جذب شده سنجیده شد(۱۳).

بررسی ویژگی های فیزیولوژیک و ریخت شناسی

شناسایی سویه برتر از دیدگاه ریخت شناسی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار گرفت.

ریخت شناسی کلنی برروی محیط نوترینت آگار بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شد. رنگ آمیزی گرم به روش Burke انجام یافت و به وسیله تست KOH تأیید گردید(۱۵). تست حرکت با استفاده از روش قطره معلق انجام گرفت (۱۶). فعالیت کاتالاز به وسیله تولید حباب در محلول ۳٪ هیدروژن پراکسید مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت اکسیدازی به وسیله اکسیده کردن P-آمینو دی متیل آلانین اگزالات ۱٪ و با استفاده از دیسک های آماده اکسیداز(شرکت پادتن طب) تعیین گشت (۱۷). فعالیت اوره آز، آمیلاز، لسیتیناز،کازئیناز، ژلاتیناز، DNase، فنیل آلانین دآمیناز، استفاده از سیترات، احیای نیترات، هیدرولیز اسکولین، همولیز، VP، MR و تولیدH_2S- اندول (بر اساس روش Simbert وKrieg ۱۹۹۴) (۱۷)، هیدرولیز Tween 80 (بر طبق روش Harrigan و McCance ۱۹۷۶)(۱۸) ، استفاده از کربوهیدرات های گوناگون (۱۹) و تولید اسید (۲۰) تعیین گشت. رشد در درجه حرارت های مختلف (۴، ۲۵، ۲۸، ۳۴ و C°۳۷) تعیین شد. همچنین محدوده pH برای رشد باکتری تعیین شد و pH نهایی بین ۳-۱۱ تنظیم گشت. همچنین تحمل پذیری نمک (۲-۱۰%) بررسی شد.

نتایج

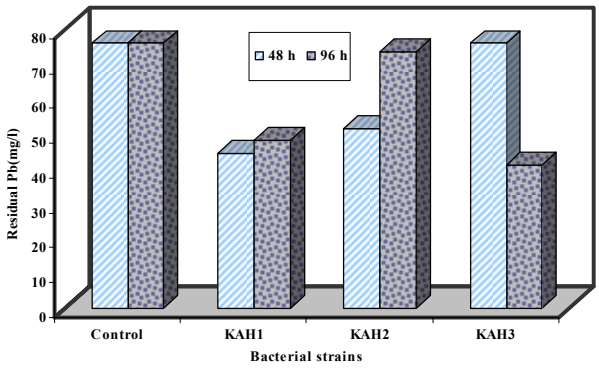
غربالگری سویه های باکتریایی مقاوم به سرب

در این پژوهش ۹۹ جدایه باکتریایی شامل ۸۱ جدایه گرم مثبت و ۱۸ جدایه گرم منفی از ۳ نمونه پساب پتروشیمی به دست آمد.

نتایج آزمایش های بررسی مقاومت به سرب نشان داد که ۶۳، ۲۹، ۳، ۲،۲ و۱ ٪ جدایه ها به ترتیب به کمتر از ۴، ۴ ، ۵، ۶، ۶/۵ و ۱۵ mM از سرب مقاوم بودند. سویه های KAH1 (قادر به رشد در ۱۵ mM از نیترات سرب)، KAH2 (قادر به رشد در ۶/۵ mM از نیترات سرب) و KAH3 (قادر به رشد در ۶/۵ mM از نیترات سرب) به دلیل داشتن بالاترین مقاومت به سرب برای آزمایش های فراتر انتخاب شدند.

مقایسه جذب بین سویه های مقاوم

مقایسه نتایج جذب، نشان داد که باکتری KAH1 هم در کشت های ۴۸ ساعته و هم در کشت های ۹۶ ساعته دارای جذب بالایی است و همچنین باکتری KAH2 در کشت های ۴۸ ساعته نسبت به ۹۶ ساعته دارای جذب بالاتری است ولی باکتری KAH3 در کشت های ۴۸ ساعته فاقد جذب و در کشت های ۹۶ ساعته دارای جذب بالایی است. به همین دلیل باکتری KAH1 که مقاوم ترین جدایه نسبت به سرب بود، برای آزمایش های فراتر انتخاب شد (نمودار۱).



نمودار ۱- مقایسه توانایی جذب سرب در سه سویه دارای بیشترین مقاومت به سرب در محیط PYT broth حاوی ۸۰ mg/l سرب

بر اساس ویژگی های ریخت شناسی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی سویه منتخب و در مقایسه با مطالعات دیگر، سویه به طور موقت درجنس *Bacillus* sp. strain KAH1 قرارداده شد (جدول ۱).

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی و ریخت شناسی جدایه KAH1

ویژگی ها	نتایج	ویژگی ها		نتایج
شکل میکروسکوپی	میله ای+G اسپوردار	رشد در نمک	٪۲	+
طول سلول قطر سلول	۲/۹µm ۰/۷µm		٪۵	+
موقعیت اسپور	مرکزی و نزدیک به انتهای سلول بیضی شکل بزرگتر از سلول		٪۷	+
کاتالاز	-		٪۱۰	-
اکسیداز رشد بی هوازی	+ +	تولید اسید از	گلوکز(هوازی) گاز(هوازی) گلوکز(بی هوازی) گاز(بی هوازی)	+ - + -
حرکت در لام مرطوب	+		گزیلوز	-
ژلاتیناز	+		آرابینوز	-
اوره آز	-		مانیتول	-
DNase	-		سوکروز	+
استفاده از سیترات	-		ترهالوز	+
لسیتیناز	+		مالتوز	+
کازئیناز	+		لاکتوز	-
آمیلاز	-	استفاده از	L-لیزین	-
احیاء نیترات	+		L-فنیل آلانین	-
رشد در دمای ۲۵-۳۷	+		L-هیستیدین	-
رشد در دمای ۴ (بعد از زمان ۲ هفته)	+		L-آرژنین	-
رشد در pH ۴-۳	-		D-گلوتامیک اسید	-
رش در pH ۱۱-۵	+		بنزوئیک اسید	-
MR	+		پیرویک اسید	-
VP	-		فرمیک اسید	-
همولیز	کامل β		D(-)مانیتول	-
SIM			گزیلوز	-

حرکت	+			
اندول	-		D(+)گلوکز	-
تولید H_2S	-		L-آرابینوز	-
فنیل آلانین دآمیناز	-		فومارات	-
هیدرولیز اسکولین	+		پروپیونیک اسید	-
هیدرولیزTween 80	-		لاکتیک اسید	-

تأثیرعوامل مختلف در جذب سرب

بررسی اثر pH محیط در جذب سرب

بررسی نتایج اثر pH های مختلف محیط در جذب سرب توسط بیومس تر سویه نشان می دهد که در pH معادل ۲ جذبی توسط بیومس باکتری منتخب مشاهده نشد، همچنین میزان جذب سرب در محدوده pH معادل۳ تا ۶ تفاوت معنی داری نداشته است(جدول۲).

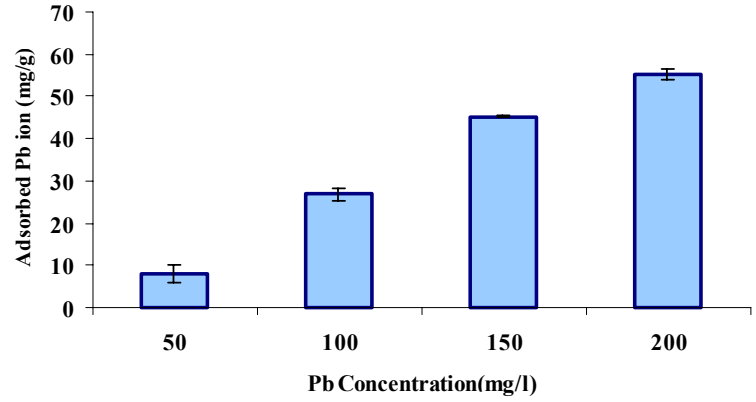
جدول ۲- اثر pH در جذب سرب توسط بیومس جدایه KAH1

(غلظت اولیه سرب: ۱۰۰mg/l،غلظت جذب کننده: ۲٪، زمان تماس ۹۰ دقیقه)

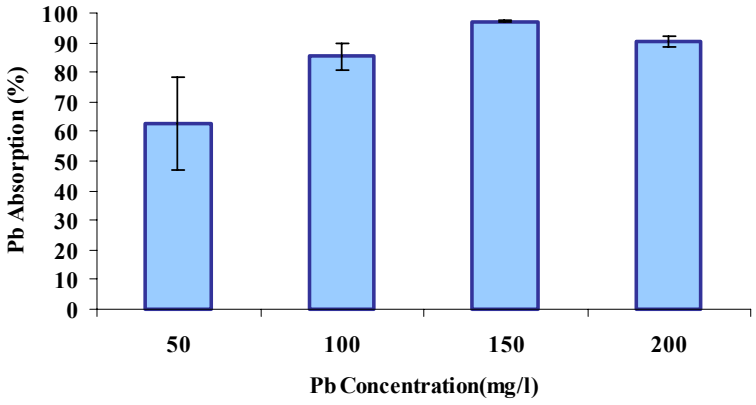
pH / جذب	۲	۳	۴	۵	۶
درصد(٪)	۰	۹۳/۱۶	۹۳/۲۰	۹۲/۲۹	۹۰/۹۱
ظرفیت ویژه (mg/g)	۰	۳۲/۳۸	۳۲/۴۰	۳۲/۰۸	۳۱/۶۰

بررسی اثر غلظت سرب در میزان جذب

در نمودار۲ نتایج میزان جذب سرب توسط سویه KAH1 در غلظت های مختلف ۵۰ تا ۲۰۰ mg/l به صورت ظرفیت جذب زیستی یا q (نمودار a-۲) و در صد جذب (نمودار b-۲) نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می شود با افزایش غلظت سرب اولیه از۵۰ تا ۲۰۰mg/l، به میزان سرب جذب شده در هر واحد توده جذب کننده زیستی افزوده شده است، ولی در غلظت ۱۵۰ نسبت به ۲۰۰mg/l، درصد بالاتری از جذب مشاهده شده است.



a -۲ شکل

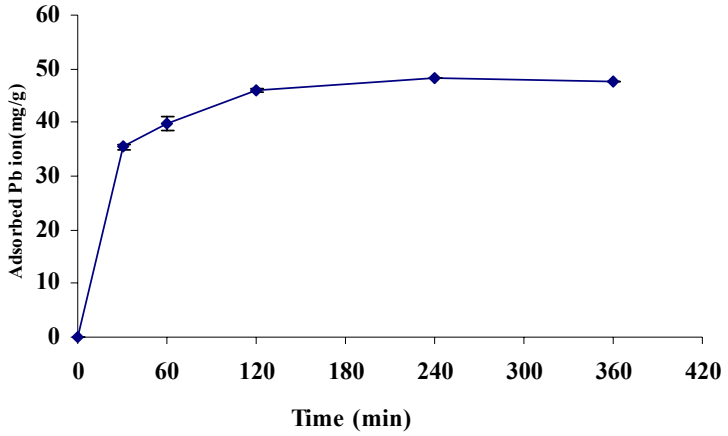


b- ۲شکل

نمودار۲- اثر غلظت اولیه سرب در جذب توسط بیومس جدایه KAH1 (pH:۴،غلظت جذب کننده: ۲٪، زمان تماس: ۹۰ دقیقه) شکل a -۲: ظرفیت جذب ، شکل b-۲ : درصد جذب

k£s kzΣ £\ ĠHıΣĦÑǫ ǯĸǫ£ £ĮĦ ÆsƷ£

نتایج به دست آمده از بررسی اثر زمان مواجهه بیومس جدایه KAH1 بامحلول ۱۵۰mg/l سرب در نمودار ۳ نشان داده است. همان گونه که مشاهده می شود در ۳۰ دقیقه اول مجاورسازی، ۷۲٪ (۳۵/۴۱ mg/g) از سرب موجود در محلول به سرعت جذب شد و بعد ازآن تا ۲ ساعت از سرعت جذب کاسته شد و در ایـن زمـــان میـــــزان جــذب به ۹۳٪ (۴۵/۹۸mg/g) رسید و آهسته تر شد و در ۴ ساعت به حد نهایی خود یعنی ۹۷/۶۷٪ (۴۸/۲۵ mg/g) رسید. و بعد از این زمان تقریباً ثابت ماند. بنابراین حداکثر ظرفیت جــذب زیستی ســـــرب جـدایه KAH1 برابر با ۴۸ /۲۵ mg/g در pH ۴، با غلظت ۱۵۰ mg/l طی۴ ساعت بوده است.



نمودار۳- اثر زمان تماس مجاورسازی در جذب سرب توسط بایومس ترجدایه KAH1 (غلظت اولیه سرب :mg/l ۱۵۰، pH:۴، غلظت جذب کننده: ۲٪) انحراف معیار به صورت خطای معیار نشان داده شده است. در مواردی که خطای معیار وجود ندارد، میزان انحراف معیار ناچیز بوده است.

بحث

محیط های آلوده شده با فلزات خطرات جدی برای سلامت انسان و سایر موجودات محسوب می شوند. پساب های صنعتی دارای فلزات سنگین یک منبع عمده آلودگی به این آلاینده ها را تشکیل می دهند. توانایی جذب فلزات سنگین و سمی توسط میکروارگانیسم ها، منجر به توجه خاص پژوهشگران به مطالعه توانایی انواع قارچ ها، مخمرها، جلبک ها و باکتری های مختلف در حذف این فلزات از محیط زیست به خصوص پساب های کارخانجات صنعتی و رودخانه ها و فاضلاب های آلوده به این گونه فلزات گردیده است. باکتری ها با داشتن ویژگی های آنیونی سطح آن ها، تولید پلیمرخارج سلولی و جذب آنزیمی دارای توانایی های صنعتی زیادی جهت تغلیظ زیستی و بازیافت فلزات هستند. سرب از عناصر سمی است که به روش های مختلف وارد محیط شده و برای سیستم های زیستی، به ویژه برای انسان، حیوان و گیاهان زیان آور است. به همین خاطر حذف آن از محیط بسیار حائز اهمیت و ضروی خواهد بود (۲۱). با توجه به رابطه ویژه بین میزان انباشته شدن فلزات سنگین توسط میکروارگانیسم ها و مقاومت آن ها در برابر این فلزات (۲۲، ۲۳)، در این پژوهش ابتدا مقاومت سویه های جداشده از یکی از پساب های پتروشیمی ایران سنجیده شده و از بین ۹۹ سویه باکتریایی جداشده، ۳ سویه دارای بیشترین مقاومت (۱۵، ۶/۵ و ۶/۵mM)، انتخاب و توانایی جذب سرب توسط آن ها سنجیده شد. هر سه سویه منتخب باکتری های میله ای شکل گرم مثبت بودند، باکتری KAH1 و KAH2 بر طبق خصوصیات بیوشیمیایی متعلق به جنس *Bcillus sp.* بوده و دارای اسپور هستند، بیشترین جذب سرب در ساعت ۴۸ بوده و پس از آن کاهش جذب مشاهده شد. علت کاهش جذب سرب توسط این دو سویه بعد از ۴۸ ساعت شاید به دلیل ایجاد اسپور باشد. در این پژوهش بالاترین حد MIC سرب برابر با ۱۵ mMدر باکتری KAH1 مشاهده شد که در مقایسه با تحقیقات دیگر در این زمینه مقدار بالایی است (جدول۳).

ه۵ll ۹ƙ٦ℓ# ΘƘÉ٤ÉƮ۰ρ ǯÑüƘ℃Ñü å۸ǵ üƐ٩₺Ƙ٨ ȝY ƙƐ5 MIC ƨ#Ƙ٩ Ǵ$#ƘÉ٩ -ΗǧρƧΣ

باکتری	مقدار MIC سرب	پژوهشگران	منابع
گزارش نشده	۱۰۰-۸۰۰ mg/l (۰/۵- ۴mM)	Raja et al.(۲۰۰۵)	(۲۴)
Bacillus spp. CPB4	۴۰۰ mg/l (۲mM)	Kim et al.(۲۰۰۷)	(۲۵)
Pseudomonadaceae. Vibrionaceae	۱۰۰۰ mg/l (۵mM)	Afrasayab et al. (۲۰۰۲)	(۲۶)
coli.Escherichia	۵ mM	Mergeay et al(۱۹۸۵)	(۲۷)
گزارش نشده	۱۶۰۰mg/l (۸ mM)	Malik & Ansari(۲۰۰۷)	(۲۸)
گزارش نشده	۲۴۰۰ mg/l (۱۲mM)	Malik et al.(۲۰۰۲)	(۲۸)
Bacillus sp. (KAH1)	۳۰۰۰ mg/l (۱۵mM)	مؤلفین کنونی	این مقاله

pH عامل مهمی است که فرآیند جذب زیستی را تحت تأثیر قرار می دهد. میانکنش کاتیون های فلزی با گروه های عملکردی غنی از الکترون قرار گرفته در بیومس به شدت به مقدار pH محیط حساس است. pH محلول رونشینی حلالیت یون های فلزی و موقعیت یونیزاسیون گروه های عملکردی در دیواره سلولی جذب کننده زیستی را تحت تأثیر قرار می دهد. به نظر می رسد pH، جذب یون های فلزی را تغییر می دهد و این ممکن است با نوع جذب کننده (بیوماس) و جذب شونده (یون های فلزی) تغییر کند.[۱۷] در مقادیرpH بالا (pH>۶)، یون های Pb^{2+} به علت افزایش غلظت یون های OH^- موجود در محلول و ترکیب این یون ها با سرب، به شکل $Pb(OH)_2$ رسوب می کنند و در نتیجه میزان سرب در دسترس باکتری ها کاهش می یابد. در pH های پایین (pH ۲و کمتر) به علت افزایش دانسیته بار مثبت مکان های اتصال، دسترسی یون های فلزی به این مکان ها کاهش می یابد. با افزایش pH از ۲ به ۳، به علت دپروتونه شدن مکان های اتصال، گروه های عملکردی در سطح سلول با بارمنفی افزایش می یابند در نتیجه به میزان جذب سرب افزوده می شود(۱۳).

با افزایش غلظت سرب (تا ۲۰۰mg/l)، میزان جذب فلز در هر واحد توده جذب کننده زیستی (q) افزایش می یابد. این افزایش می تواند به علت افزایش در میان کنش های الکترواستاتیک (وابسته به میان کنش های کووالانسی) باشد. ولی میزان جذب در غلظت ۲۰۰ mg/l سرب نسبت به جذب در غلظت ۱۵۰ mg/l، حدود ۷٪ کاهش داشته است و این کاهش می تواند ناشی از اشباع سریع مکان های اتصال فلزی جذب کننده زیستی باشد (۱۴).

زمان تماس با آلاینده نیز تاثیر زیادی بر میزان کارآیی حذف دارد. نتایج به دست آمده نشان داد که ۷۲٪ از جذب در ۳۰ دقیقه اول تماس فلز مشاهده شد و میزان جذب بعد از ۴ ساعت ثابت شده است که می تواند به علت اشباع مکان های اتصال سرب باشد. در پژوهشی که توسط Ray و همکاران انجام گرفت، در ۱۰ دقیقه اول تماس *Bacillus cereus* M^1_{16} با سرب، ۹۵٪ از جب مشاهده شد و بعد از ۳۰ دقیقه به تعادل رسید (۱۳) و جذب سرب توسط *Bacillus sp.*(ATS-1) مورد مطالعه Tunali و همکاران در زمان ۱۵ دقیقه به تعادل رسید (۱۴). و این تاخیر در زمان تعادل توسط باکتری KAH1 می تواند به دلیل جذب فعال باکتری باشد که به مدت زمان طولانی تری احتیاج دارد.

با مقایسه نتایج به دست آمده در گزارش های مختلف، استنتاج می شود که pH، غلظت یون فلزی و زمان تماس که در آن میزان جذب زیستی به حداکثر می رسد، در جذب کننده های مختلف متفاوت است و این می تواند به تفاوت در ساختار و مکان های اتصال یون های فلزی موجود در سطح سلول های این جذب کننده ها مربوط باشد.

می توان ذکر کرد که توانایی جذب زیستی سرب توسط میکروارگانیسم های مختلف متفاوت است و بعضی از میکروارگانیسم ها به طور بالقوه برای تصفیه زیستی پساب های آلوده به فلزات سنگین گزینه بهتری هستند. آزمایش های

محققین مختلف در شرایط گوناگون از نظر غلظت اولیه محلول فلزی، میزان توده زیستی تلقیح شده، pH، زمان تماس، دمای مجاورسازی، دور شیکر، ترکیبات محیط کشت، انجام شده و همگی این عوامل می توانند میزان ظرفیت رونشینی را تغییر دهند. بنابراین به طور کلی مقایسه میان میکروارگانیسم های مختلف تا زمانی که همگی آن ها در یک شرایط و محدوده مشخص از موارد ذکر شده بررسی نشوند، نمی تواند دقیق باشد.

در مقام مقایسه بیشترین درصد جذب سرب درسویه KAH1 جداسازی شده در این پژوهش که متعلق به جنس باسیلوس می باشد، معادل ۹۷/۶۷٪ (۴۸/۲۵ mg/g) در غلظت ۱۵۰ mg/l بود. در حالی که Tunali و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که سویه جاذب سرب جداشده توسط آن ها که متعلق به جنس *Bacillus* بوده است، دارای حداکثر ظرفیت جذب سرب برابر با ۹۲/۲۷ mg/g در غلظت اولیه ۲۵۰mg/l ، اپتیمم pH معـــادل ۳ و در ۱۵ دقیقـــه بـــوده (۵۵ mg/g) جذب در غلظت اولیه سرب ۱۵۰ mg/l)(۱۴). همچنین Ray و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی جذب سرب توسط باکتری *Bacillus cereus* M^{l}_{16} پرداختند و آن ها نشان دادند که جذب در ابتدا سریع بوده و بعد از ۳۰ دقیقه تعادل حاصل شد. همچنین میزان رونشینی با افزایش در pH در رنج ۶-۳ افزایش یافته و با افزایش غلظت محلول فلزی، مقدار سرب جذب شده در هر گرم از وزن باکتری افزایش یافت ولی درصد جذب کاهش یافت. در نهایت بالاترین مقدار جذب سرب توسط باکتری آن ها برابر با ۹۶٪ با میزان ۱٪ تلقیح بیومس تر در محلول حاوی ۵۰ mg/l از یون سرب حاصل شد (۶۲mg/g جذب در غلظت اولیه سرب ۱۵۰ mg/l) (۱۳). همچنین باکتری متعلق به جنس باسیلوس جداسازی شده از پساب های صنعتی توسط Nourbakhsh و همکاران در سال ۲۰۰۲، نیز در pH ۴/۵ و غلظت اولیه سرب ۲۰۰mg/l دارای بالاترین میزان جذب سرب معادل ۸۸ mg/g است (۶۱ mg/g جذب در غلظت اولیه سرب ۱۵۰ mg/l) (۲۹). این مقایسات نشان می دهد که نتایج آزمایش های ما با آزمایش های دیگر در این زمینه مطابقت دارد و اختلافی که در اپتیمم pH برای جذب سرب در سویه های مختلف وجود دارد، می تواند به دلیل تفاوت در ساختار آن ها باشد (جدول ۴).

می توان امیدوار بود که این باکتری نامزد مناسبی در جهت تولید Biosorbent به منظور حذف سرب از پساب های آلوده باشد و در تصفیه پساب های صنعتی آلوده به فلزات سنگین مورد استفاده قرار گیرد.

جدول۴- جدب زیستی توسط باکتری های جذب کننده سرب متعلق به جنس *Bacillus sp.*

پژوهشگران	شرایط بهینه برای جذب زیستی					ظرفیت جذب زیستی (mg/g)	سویه جاذب
	بیومس(g/l)	دما(°C)	زمان تماس (min)	غلظت سرب (mg/l)	pH		
Tunali etal. (۲۰۰۶)	۲	۲۵	۱۵	۲۵۰	۳/۰	۹۲/۲۷	*Bacillus sp.(ATS-1)*
Ray et al. (۲۰۰۵)	۱/۸	۳۰	۳۰	۵۰	۶/۰	۲۵	*Bacillus Cereus M116*
Nourbakhsh et al. (۲۰۰۲)	۲۰ (wet cells)	۲۷	-	۲۰۰	۴/۵	۸۸	*Bacillus sp.(OGUB 001)*
در این بررسی	۳ (۲۰g wet cells)	۳۴	۲۴۰	۱۵۰	۴/۰	۴۸/۲۵	*Bacillus sp. (KAH1)*

سپاسگزاری

این مطالعه به وسیله صندوق حمایت از پژوهشگران کشور مورد حمایت قرار گرفت.

منابع

1. Malik,A., (2004) Metal bioremediation through gowing cells. Environment International. 30:261-278
2. Shumatell, G., Strandberg, W.,(1996). Accumulation of metals by microbiol cells. Comperhansive biotechnology chepter, 13: 235-241.
3. Strandberg, G.W., Shumate, S.E. and Parrot, J.R.(1981) Microbial cells as biosorbents for heavy metals:Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa* . Applied and Environmental Microbiology. 41:237-245
4. Macaskie, L.E. and Dean, A.C.R.,(1984) Cadmium accumulation by a *citrobacter sp.* Journal of General Microbiology.130:53-62
5. Salehizadeh, H., Shojaosadati, S.A. (2003) Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus* . Water Research. 37:4231-4235
6. Malekzadeh, F., Farazmand, A., Ghafourian, H., Shahamat, M., Levin, M., Gin, C., and clowell, R.R., (2002) Accumulation of heavy metals by a bacterium isolated from electroplating effluent. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18:295-300
7. Chang, J.S., Law, R., and Chang, C.C.(1997) Biosorption of lead, Copper and Cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. Water Research. 31:1651-1658
8. Burnett, G., Handly, K., Peak, D.(2007) Divalent metal adsorption by

the thermophile *Anoxybacillus flavithermus* in single and multi-metal systems. Chemical Geology. 244:493-506

9. Jensen-Spaulding, A., L-Shuler, M., W,Lion, L.(2004) Mobilization of adsorbed copper and lead from naturally aged soil by bacterial extracellular polymers. Water Research. 38:1121-1128
10. Garni, S.M.Al.(2005) Biosorption of lead by gram-ve capsulated and non-capsulated bacteria. Water SA. 31:345-350
11. Selenska-Pobell, S., Panak, P., Miteva, V., Boudakov, I., Bernhard, G., Nitsche, H.(1999) Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B.cereus, B.megaterium and B.sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile, FEMS Microbiology Ecology . 29:59-67
12. Konopka, A., Zakharova, T.,(1999)Quantification of bacterial lead resistance via activity assays, Journal of Microbiological Methods.37:17-22
13. Ray, L., Paul, S., Beara, D., and Chattopadhyay, P., (2005) Bioaccumulation of Pb(II) from aqueous solutions by *Bacillus cereus* M116 , Journal for Hazardous Substance Research. 5:1-21
14. Tunali,S., Cabuk, A, Akar,T., (2006) Removal of lead and copper ions from aqueos solutions by bacterial strain isolated from soil , Chemical Engineering Journal. 115:203-211
15. Baron, E. J. & Fingold, S. M. (1990).Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology .8 th edn, St. Louis: Mosby.
16. Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. & Robinow, C. F. (1994).Determinative and cytological light microscopy. In Methods for General and Molecular Bacterioligy, pp. 21-41. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
17. Simbert, R. M. & Krieg, N. R. (1994). Phenotypic characterization. In Methods for General and Molecular Bacteriology, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
18. Harrigan, W. F. & McCance, M. E. (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Mocrobiology. London: Academic press.
19. Atlas, R. M. (1997). Handbook of Microbiological Media, 2 nd edn. Boca Raton, FL: CRC press.
20. Parry, J. M., Turnbull, P. C. B. & Gibson, J. R. (1988). A Colour Atlas of Bacillus Species. London: Wolfe Medical publications.
21. Benyehuda, G., Coombs, J., Ward, P.L, Balk Will, D. and Barkay, T. (2003) Metal resistance among aerobic chemoheterotrophic bacteria from the deep terrestrial subsurface. Canadian Journal of Microbiology. 49:151-156
22. JiG, Silver S. (1998) Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. Journal Industrial Microbiology. 2:67-75
23. R.Bruins, M., Kapil, S., and w.Oehme, Frederick., (2000) Review Microbial resistance to metals in the

environment. Ecotoxicology and Environmental safety. 45:198-207

24. Edward Raja, Ch., Anbazhagan, K., and Sadasivam Selvam, G., (2006) Isolation and Characterization of A Metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain, World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22: 577-585
25. Kim, S.U., Cheong, Y.H. , Seo, D.C., Hur, J.S., Heo, J.S. and Cho, J.S.(2007) Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4(*Bacillus spp*.), Water Science & Technology. 55: 105–111
26. Afrasayab, S., Yasmin, A. and Hasnain, S. (2002) Characterization of Some Indigenous Mercury Resistant Bacteria from Polluted Environment, Pakistan Journal of Biological Sciences. 5: 792-797
27. Mergeay M., Nies D., Schlegel H. G., Gerits J., Charles P., van Gijsegem F. (1985)
28. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. Journal of Bacteriology. 162: 328-334.
29. Ansari, M. I., Malik, A., (2007). Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrialwastewater. . Bioresource Technology. 98: 3149–3153
30. Nurba¸s Nourbakhsh, M., Kiliçarslan, S., Ilhan, S., Ozdag, H. (2002) Biosorption of Cr6+, Pb2+ and Cu2+ ions in industrial waste water on *Bacillus sp.* Chemical Engineering Journal. 85:351-355