

## بررسی توانایی سیانوباکتری *Nostoc sp. ISC62* در حذف فلز سنگین نیکل

زهرا مهدی پور<sup>۱\*</sup>، مهروز دزفولیان<sup>۲</sup>، ندا سلطانی<sup>۳</sup>، افشین رجیبی خرمی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج

<sup>۲</sup> استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج

<sup>۳</sup> دانشیار پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

<sup>۴</sup> دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۸

### چکیده

برخی از فرایندهای صنعتی منجر به رهاسازی فلزات سنگین و ایجاد آلودگی‌های محیطی می‌گردد. از جمله این فلزات سنگین می‌توان از نیکل نام برد که فلزی سمی می‌باشد. در این مطالعه توانایی سلول‌های زنده و کشته شده سیانوباکتری *Nostoc sp. ISC62* در جذب نیکل نشان داده شد. *Nostoc sp. ISC62* از مناطق نفت خیز جنوب ایران جدا شده و در محیط BG110 رشد داده شد. این سلول‌ها در محیط کشت BG110 تغییر یافته حاوی غلظت‌های متفاوت نیکل (۳، ۵، ۸، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) به صورت  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  به مدت ۶۰ دقیقه در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و نور مداوم انکوبه گردیدند. در مرحله بعد، کشت‌ها سانتریفوژ گردید و از مایع رویی برای تعیین غلظت یون  $\text{Ni}^{2+}$  بوسیله اسپکترومتری جذب اتمی استفاده شد. فاکتورهای اساسی در این بررسی که در میزان جذب مؤثر بودند شامل pH، غلظت زیست توده، غلظت اولیه فلز، تیمار با  $\text{NaOH}$  0.1 M و حضور ترکیب یون‌ها در محلول بود. علاوه بر این اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر روی مقدار کلروفیل a و محتوای پروتئینی کل سلول مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد این میکروارگانیسم قادر است مقادیر بالا از یون نیکل موجود در محلول را جذب کند. تیمار سلول‌ها با  $\text{NaOH}$  سطح جذب را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. این میکروارگانیسم در pH بهینه  $8 \pm 0.2$  قادر به جذب مقدار بالایی از نیکل به ازای هر گرم وزن توده زیستی شد و با افزایش غلظت نیکل میزان کلروفیل سلول کاهش یافته و تغییرات قابل توجهی در پروفایل پروتئینی سلول مشاهده شد.

واژگان کلیدی: پلی ساکارید، جذب زیستی، هیدروکسید سدیم، یون نیکل، *Nostoc sp. ISC62*

### مقدمه

به حیات موجودات آبی می‌شود، علاوه بر آن یافته‌ها نشان می‌دهد که این فلزات در حین تیمار بیولوژیکی قادر به کشتن برخی میکروارگانیسم‌ها در طی مراحل تصفیه آب نیز می‌باشند (Nasir et al., 2007). نیکل یک فلز سمی موجود در فاضلاب‌ها است. بیش از ۴۰ درصد نیکل تولید شده در کارخانجات استیل، باطری‌های نیکلی و کارخانجات تولید برخی آلیاژها

رهاسازی فلزات سنگین به محیط زیست که اخیراً در حال افزایش می‌باشد، در نتیجه گسترش فعالیت‌های صنعتی و تکنولوژیکی انسانی است. حضور فلزات سنگین در محیط‌های آبی باعث آسیب

\*نویسنده مسئول: zahra.mehdipoor@gmail.com

سویه‌های بومی کشور در برداشت فلزات سنگین، مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

**تهیه و کشت ریزجلبک:** نمونه نوستوک مورد نظر در این پژوهش به شماره ISC62 از مرکز ویژه کشت و تکثیر ریزجلبک‌ها واقع در جهاد دانشگاهی واحد شهید بهشتی فراهم آمد که به صورت کشت خالص شده تهیه گردید. محل جمع آوری نوستوک مورد استفاده این مرکز برای جداسازی، شهرستان مسجد سلیمان منطقه مسیل نمره دو بود. محیط کشت اختصاصی برای نوستوک، BG11<sub>0</sub> بدون منبع ازت ( $\text{NaNO}_3$ ) بود. کشت در شرایط دمای  $26 \pm 2$  درجه سلسیوس، شدت نور ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس و هوادهی با پمپ آکوارיום صورت گرفت.

**شاخص جذب:** محلول نمک فلزات در تمامی آزمایشات از رقیق کردن یک استوک کاری صورت گرفت. بر این اساس ۱۰۰۰ میلی‌لیتر استوک ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام از این نمک‌ها تهیه گردید. برای این منظور ۴/۰۵ گرم  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۳/۹۳ گرم  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۴/۸۴ گرم  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۲/۷۶ گرم  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  در یک لیتر آب مقطر حل شد. به‌طورکلی غلظت‌های فلزات سنگین مورد استفاده در این مطالعه بر مبنای دامنه آلودگی و فراوانی آن در منطقه جداسازی سویه مورد نظر بوده و جهت سنجش ظرفیت کلی جذب و مقاومت این ریزجلبک از غلظت‌های بالاتر استفاده گردید. غلظت زیست توده ۰/۰۲۰ گرم در حجم ۱۵ میلی لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. جهت پیش تیمار با  $\text{NaOH}$ ، سلول‌های زنده سیانوباکتری، سلول‌های کشته شده با حرارت و پلی‌ساکارید استخراج شده از آنها، به‌صورت جداگانه در مجاورت ۱۰ میلی‌لیتر محلول حاوی  $\text{NaOH}$  ۰/۱

است که باعث افزایش محتوای نیکل در اکوسیستم می‌شود (Ajmal et al., 2000). بسیاری از روش‌های مرسوم شامل اکسیداسیون، فیلتراسیون غشایی، کوآگولاسیون، اسمز معکوس، جذب غیرزیستی، تعویض یون و رسوب‌گذاری جهت حذف فلزات سنگین در مقالات گزارش شده است. این روش‌ها اغلب یا کارآمد نیستند و یا بسیار هزینه بر می‌باشند بخصوص زمانی که غلظت پایینی از فلز در حجم بزرگی از محلول (۱۰۰-۱ میلی‌گرم بر لیتر) موجود باشد (Chowdhury et al., 2011). در دهه اخیر زیست توده‌های مختلفی از جمله باکتری، قارچ و جلبک به‌طور گسترده با هدف شناسایی جاذب‌های زیستی فلزات با کارایی بالا از محیط زیست جداسازی و مطالعه گردیده است (Wael, 2011). از بین جاذب‌های زیستی جلبکی، سیانوباکتری‌ها به‌دلیل گستردگی بیشتر در طبیعت و داشتن توانایی بالا در جذب فلزات از توجه خاصی برخوردارند (Baptista and Vasconcelos, 2006; Jin and DaYong, 2012). فرایند جذب به دو صورت جذب زیستی و تجمع زیستی رخ می‌دهد (De Philippis et al., 2011). جذب زیستی یک پروسه ساده فیزیوشیمیایی و غیرفعال است که ممکن است با تعویض یونی همراه باشد. تجمع زیستی شامل دو مرحله است، مرحله اول جذب سطحی و مرحله دوم در ارتباط با سیستم انتقال فعال می‌باشد که آلاینده به درون سلول انتقال یافته و در این حالت مکان‌های اتصال بیشتری وجود دارد (Chojnacka, 2010).

اگرچه پتانسیل بالای چندین نوع زیست توده تاکنون گزارش شده است ولی هنوز توانایی تعداد بسیار زیادی از انواع جلبک‌ها در برداشت فلزات سنگین مورد سنجش قرار نگرفته است. از این رو در این مطالعه توانایی جنس نوستوک جدا شده از

بود. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ و مایع رویی جهت سنجش با دستگاه جذب اتمی جدا گردید.

**جذب نیکل توسط پلی ساکارید طبیعی و تیمار شده با NaOH:** آگزوپلی ساکارید محلول در محیط کشت و پلی ساکارید غشایی که پلی ساکارید کپسولی نیز نامیده می‌شود طبق روش Haegi و Del Gallo (1990) استخراج گردید. سپس پلی ساکارید استخراج شده بدون تیمار و تیمار شده با NaOH در معرض محیط کشت حاوی کلرید نیکل در غلظت‌های ۳ تا ۲۰ پی‌پی‌ام و با pH بهینه جذب ( $8 \pm 0.2$ ) و زمان ۶۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از آن نمونه‌ها سانتریفیوژ و مایع رویی جهت سنجش با دستگاه جذب اتمی جدا گردید.

**اثر یون‌های همراه بر جذب نیکل:** نمونه زنده که به صورت تیمار شده با NaOH بود به صورت جداگانه در مجاورت محیط کشت حاوی کلرید نیکل، کلرید آهن، سولفات روی و سولفات مس در غلظت‌های ۳ تا ۲۰ پی‌پی‌ام و با pH بهینه جذب ( $8 \pm 0.2$ ) و زمان ۶۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از آن نمونه‌ها سانتریفیوژ و مایع رویی جهت سنجش میزان هر کدام از یون‌های موجود با دستگاه جذب اتمی جدا گردید.

**ظرفیت جذب نیکل در غلظت‌های بالا:** نمونه‌های زنده تیمار شده با NaOH، در مجاورت محیط کشت حاوی کلرید نیکل در غلظت‌های ۵۰ تا ۹۰۰ پی‌پی‌ام و با pH بهینه جذب ( $8 \pm 0.2$ ) و زمان ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از آن نمونه‌ها سانتریفیوژ و مایع رویی جهت سنجش با دستگاه جذب اتمی جدا گردید.

**محاسبه LD<sub>50</sub> نیکل بر اساس محتوای کلروفیلی ریزجلیک:** سلول‌های زنده در مجاورت محیط کشت حاوی کلرید نیکل در غلظت‌های ۵ تا ۶۰۰ پی‌پی‌ام و با pH بهینه جذب ( $8 \pm 0.2$ ) قرار داده شد. بعد از ۶۰

مولار به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد (Nagase and Inthorn, 1997). پس از آن نمونه‌ها سانتریفیوژ (g 6000x، 10min) و مایع رویی دور ریخته شد. میزان جذب فلز بر گرم سیانوباکتری از طریق معادله (۱) گزارش شد:

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{M} \quad (1)$$

Q میزان جذب فلز بر گرم سیانوباکتری (mg/g)، C<sub>i</sub> غلظت اولیه فلز قبل از جذب (mg/L)، C<sub>f</sub> غلظت فلز باقی مانده در محلول بعد از جذب (mg/L)، V حجم محلول (L)، M وزن زیست توده (g).

**اثر pH بر روی جذب:** جهت محاسبه pH بهینه، محیط کشت حاوی ۸ پی‌پی‌ام کلرید نیکل تهیه گردید که این غلظت، میانگین غلظت‌های در نظر گرفته شده برای آزمایش جذب بود. از این محیط کشت pH های مختلف ۳ تا ۹ تهیه گردید و برای تنظیم pH های مختلف از NaOH و HCl یک نرمال استفاده شد. سپس میزان ۰/۰۲۰ گرم از زیست توده در تماس با ۱۵ میلی‌لیتر از این محیط کشت در دمای ۲۲ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از ۶۰ دقیقه نمونه‌ها سانتریفیوژ و مایع رویی جهت سنجش با دستگاه جذب اتمی جدا گردید.

**جذب نیکل توسط سویه‌های زنده و کشته شده بدون تیمار و تیمار شده با NaOH:** برای سویه‌های کشته شده، از سلول‌های مورد آزمایش نمونه برداری شد و در فور دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شد (Cain and Vannela, 2008). سپس نمونه‌های زنده و کشته شده بدون تیمار و تیمار شده با NaOH در مجاورت محیط کشت حاوی کلرید نیکل در غلظت‌های ۳ تا ۲۰ پی‌پی‌ام و به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. pH بهینه برای جذب  $8 \pm 0.2$  در نظر گرفته شد که از آزمایش قبل به دست آمده

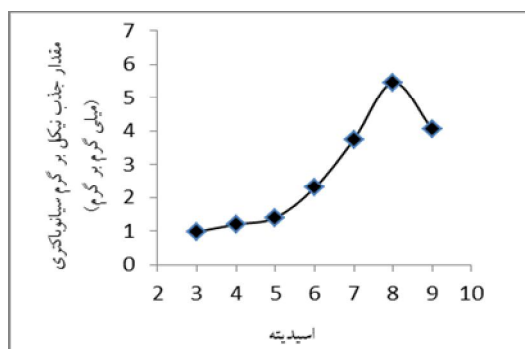
زنده *Nostoc sp. ISC62* که به مدت سه روز در محیط کشت حاوی ۲۰ پی‌پی‌ام نیکل کشت داده شده بود به همراه نمونه‌های زنده بدون تیمار استفاده گردید. جهت آماده سازی نمونه‌ها برای عکس برداری از روش Surosz و Palinska (2004) استفاده شد.

### نتایج

نتایج حاصل از اثر تغییرات pH بر جذب نشان داد که در دامنه ۷ تا ۹ حدود ۷۵ درصد یون‌های نیکل موجود در محلول جذب شدند در حالیکه در دامنه pH ۳ تا ۵ جذب نسبتاً پایین بود. از pH حدود ۷ به بعد گروه‌های فسفات شروع به در پروتونه شدن می‌کنند که این احتمالاً در جذب  $Ni^{2+}$  مؤثر می‌باشد (شکل ۱). بهترین جذب در اسیدیته ۸ مشاهده شد که برای سویه *Nostoc sp. ISC62* برابر ۵/۴۵ میلی‌گرم بر گرم بود.

طبق شکل ۲ که مقایسه بین جذب  $Ni^{2+}$  در نمونه‌های زنده، کشته شده با حرارت و پلی‌ساکارید استخراج شده از آن‌ها را در حالت طبیعی و تیمار شده با NaOH نشان می‌دهد، مشاهده شد با افزایش غلظت  $Ni^{2+}$  میزان جذب نیز بالاتر رفت، به عنوان مثال در *Nostoc sp. ISC62* در حالت زنده و تیمار شده، در غلظت‌های ۳، ۵، ۸، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ پی‌پی‌ام شاخص جذب یعنی Q به ترتیب معادل ۱/۵، ۲/۷، ۴/۸، ۶/۲، ۹/۸ و ۱۳/۷ میلی‌گرم بر گرم بود که یک روند افزایشی را نشان داد.

دقیقه نمونه‌ها سانتریفوژ و رسوب زیرین جهت استخراج کلروفیل به میکروتیوب انتقال داده شد. ۱ میلی لیتر متانول به آن‌ها اضافه و کاملاً هموزن شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری گردید. بعد از آن نمونه‌ها سانتریفوژ و مایع رویی جهت سنجش میزان کلروفیل با دستگاه اسپکتروفتومتر جدا گردید. جذب در طول موج ۶۶۵ nm خوانده شد.

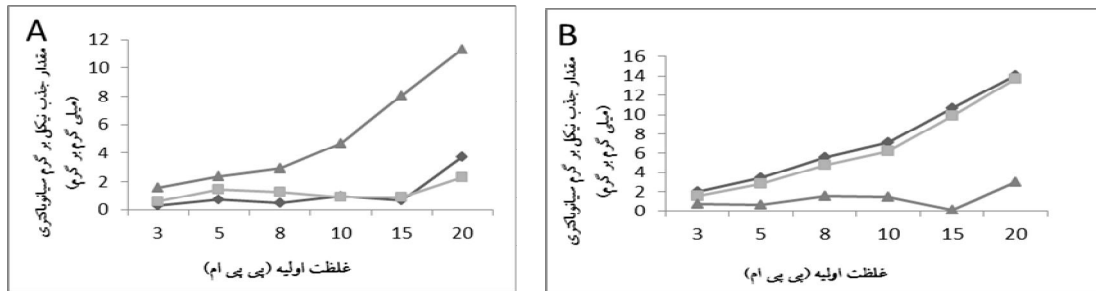


شکل ۱. اثر pH بر جذب نیکل توسط *Nostoc sp. ISC62* در غلظت اولیه ۸ پی‌پی‌ام، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه.

**SDS-PAGE<sup>۲</sup> تیمار ۲۴ ساعته جهت بررسی**  
 پروفایل پروتئینی کل سلول: جهت استخراج پروتئین کل سلول، ۳۰۰ میکرو لیتر از بافر لیزکننده پروتئین به سلول‌ها اضافه شد. سپس با فریز کردن و دادن شوک حرارتی سلول‌ها لیز شد و مایع رویی حاوی پروتئین‌های سلولی جهت استخراج سانتریفوژ گردید. SDS-PAGE بر اساس روش Laemmli (1970) و با استفاده از ژل متراکم کننده ۵ درصد و ژل جداکننده ۱۲ درصد صورت گرفت.

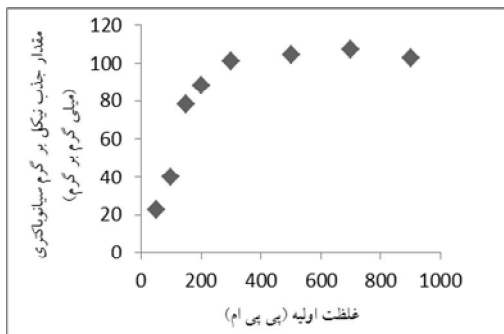
بررسی تغییرات مورفولوژیکی ریزجلبک در حضور نیکل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM<sup>۳</sup>): به منظور عکس برداری با SEM از سویه

1- Sodium Dodecyl Sulfate  
 2- Scanning Electron Microscopy



شکل ۲. جذب نیکل بوسیله *Nostoc sp. ISC62* به صورت زنده (□) و کشته شده با حرارت (Δ) و پلی ساکارید استخراج شده از آن (◇) در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد، اسیدیته ۸ و زمان ۶۰ دقیقه در حالت بدون تیمار (A) و تیمار شده با NaOH ۰/۱ مولار (B).

جذب قابل ملاحظه‌ای نداشت در واقع میزان  $Q_{max}$  در این نقطه حدود ۱۰۱/۳۷ میلی گرم بر گرم مشاهده شد.



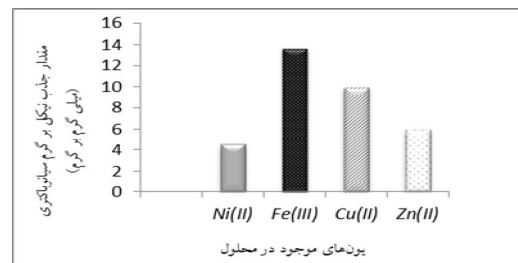
شکل ۴. ظرفیت کلی برای جذب توسط *Nostoc sp. ISC62* به صورت زنده و تیمار شده با NaOH ۰/۱ مولار، در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد، اسیدیته ۸، در غلظت‌های مختلف نیکل و در زمان ۲۴ ساعت.

ارتباط بین غلظت فلز و میزان جذب آن به صورت دقیق‌تر به کمک مدل فرندلیچ ( Freundlich model) تعیین می‌گردد. این مدل بر مبنای تمایل متفاوت جاذب‌های زیستی قرار دارد. که در معادله (۲) نمایش داده شده است:

$$q = bC_f^{1/n} \quad (2)$$

$q$ : میلی گرم ماده جذب شده بر گرم ماده جاذب (mg/g)،  $C_f$ : غلظت محلول (mg/L)،  $b$ : یک ثابت تجربی می‌باشد که شاخص ظرفیت جذب برای سلول زنده و خشک شده می‌باشد،  $1/n$ : نیز یک ثابت

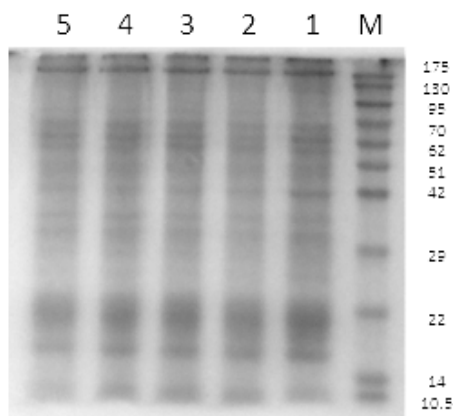
برای بررسی اثر یون‌های همراه با  $Ni^{2+}$  در محیط اطراف بر روی جذب، سنجش در حضور سه یون دیگر Zn، Cu و Fe صورت گرفت. برای نمونه زنده *Nostoc sp. ISC62* مشاهده شد که میزان جذب نیکل در حضور سایر یون‌ها در مقایسه با نیکل به تنهایی کاهش یافت (شکل ۳). اگرچه میزان جذب در سه یون دیگر به صورت قابل توجهی بالا بود. به عنوان مثال، جذب  $Fe^{3+}$  در زمان ۶۰ دقیقه برای این نمونه به میزان ۱۳/۶۲ میلی گرم بر گرم مشاهده شد.



شکل ۳. اثر یون‌های همراه بر جذب نیکل توسط *Nostoc sp. ISC62* به صورت زنده و تیمار شده با NaOH ۰/۱ مولار، در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد، اسیدیته ۸، زمان ۶۰ دقیقه و غلظت اولیه ۲۰ پی پی ام.

به منظور دست‌یابی به  $Q_{max}$  مطابق شکل ۴ غلظت اولیه  $Ni^{2+}$  از ۵۰ به ۹۰۰ پی پی ام رسانیده شد و مشاهده گردید که میزان جذب در غلظت حدود ۲۵۰ پی پی ام به میزان ثابتی رسید و بعد از این غلظت شاهد

آنالیز SDS-PAGE برای محتوای پروتئینی کل سلول، قبل و بعد از در معرض قرار گرفتن سویه *Nostoc sp. ISC62* در غلظت‌های مختلف نیکل در شکل ۷ نشان داده شده است، تقریباً بیشتر باندها با افزایش غلظت فلز یک کاهش تدریجی را در محتوای پروتئینی نشان دادند. باندهای موجود در ناحیه ۱۴ تا ۲۲ کیلو دالتون و نیز باند ۳۰ و ۴۲ کیلو دالتون نشان داد که به تدریج محتوای پروتئینی کاهش یافت و بالعکس در ناحیه ۸۰ کیلو دالتون با افزایش غلظت نیکل یک باند نازک مشاهده شد.



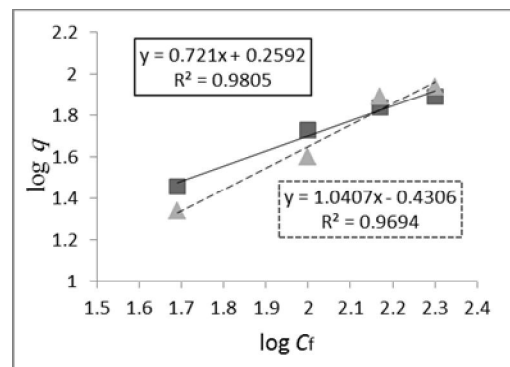
شکل ۷. ژل SDS-PAGE برای کل محتوای پروتئینی نمونه *Nostoc sp. ISC62*، M: مارکر اندازه پروتئین، ۱: پروفایل پروتئینی کل سلول در حالت طبیعی ۲: در غلظت ۵ پی‌پی‌ام نیکل ۳: در غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام نیکل ۴: در غلظت ۲۰ پی‌پی‌ام نیکل ۵: در غلظت ۴۰ پی‌پی‌ام نیکل.

مطابق تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) در شکل ۸ مشاهده می‌شود که تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۰ پی‌پی‌ام نیکل باعث تغییرات ساختاری و مورفولوژیکی قابل رؤیتی نسبت به سلول‌های طبیعی شد، مثلاً ساختار رشته‌ای و فیلامنتی سلول‌های نوستوک در برخی موارد از هم گسسته شد. برخی سلول‌ها در سطح به حالت چروکیده قابل مشاهده بودند.

تجربی است که شاخص تمایل جذب می‌باشد. معادله (۳) مدل فرندلیچ را در شکل خطی نشان می‌دهد (Mohamed, 2001):

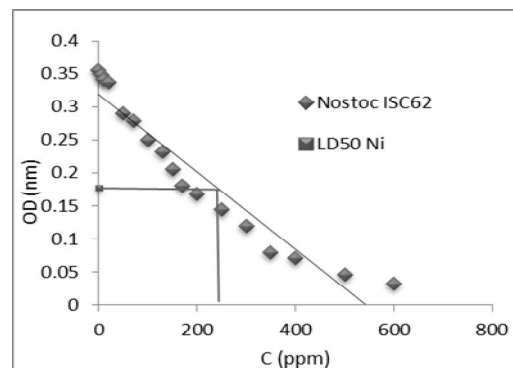
$$\log q = \log b + \frac{1}{n} \log C_f \quad (3)$$

مطابق شکل ۵ مقادیر ثابت  $n$  و  $b$  به ترتیب برای نمونه زنده *Nostoc sp. ISC62* میزان ۲/۶ و ۱۰/۲۳ بود و برای پلی ساکارید استخراج شده از آن میزان ۲/۶ و ۱۱/۴۸ محاسبه شد.

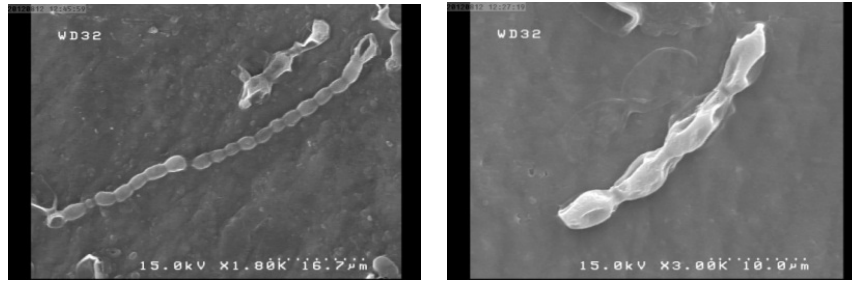


شکل ۵. ایزوترم‌های فرندلیچ برای جذب نیکل توسط *Nostoc sp. ISC62* به صورت زنده (□) و پلی ساکارید استخراج شده از آن (Δ).

در ادامه جهت بررسی میزان تحمل و ماندگاری سویه مورد استفاده در این مطالعه، غلظتی از نیکل که باعث کشته شدن ۵۰ درصد سلول‌ها می‌گردد ( $LD_{50}$ )، به کمک سنجش محتوای کلروفیل آن مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد محتوای کلروفیلی تا غلظت حدوداً ۲۲۰ پی‌پی‌ام به نصف میزان اولیه رسید (شکل ۶).



شکل ۶. محاسبه  $LD_{50}$  نیکل بر اساس محتوای کلروفیلی در *Nostoc sp. ISC62*.



شکل ۸. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سویه *Nostoc sp. ISC62* در حالت طبیعی (چپ) و زمانی که در معرض ۲۰ پی‌پی‌ام نیکل قرار گرفت (راست).

## بحث

Chojnacki (2005) نشان دادند زمانی که گروه‌های کربوکسیل و فسفات استری می‌شوند پروسه حذف کروم (II) بوسیله *Spirulina* متوقف می‌شود که این نشان‌دهنده نقش مهم این گروه‌ها در فرآیند حذف زیستی می‌باشد. Doshi و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از مقایسه طیف مادون قرمز سلول‌های *Spirulina* قبل و بعد از تیمار فلزی، متوجه شدند که نقش اصلی به دام اندازی فلزات توسط گروه‌های کربوکسیل، آمین و آمید انجام می‌شود.

از گزارشات بالا این چنین می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌های شیمیایی درگیر در فرایند حذف فلزات توسط سیانوباکتری‌های تولیدکننده پلی‌ساکارید خارج سلولی از یک سویه به سویه دیگر متفاوت است، اگرچه گروه‌های کربوکسیل به نظر می‌رسد که همیشه در جذب فلزات حضور دارند و از طرف دیگر گروه‌های آمینو یا سولفات نقش کم‌رنگ تری در این رابطه دارند.

میزان  $Q_{max}$  برای سویه *Nostoc sp. ISC62* حدود ۱۰۱ میلی‌گرم بر گرم بود که در مقایسه با بسیاری از نمونه‌های گزارش شده، جذب بسیار خوبی را نشان می‌دهد. Micheletti و همکاران (2008)، برای جذب نیکل توسط سویه *Cyanospyra 16som2* میزان ۵۱ میلی‌گرم بر گرم و برای *Cyanospyra VII3* میزان ۲۱/۶ میلی‌گرم بر گرم را گزارش دادند.

میکروارگانسیم‌ها قادرند با مکانیسم‌های مختلفی فلزات را از محیط اطراف حذف کنند. این مکانیسم‌ها یا شامل فرآیندهای متابولیکی می‌باشند و یا به صورت جذب غیرفعال فلزات توسط ماکرومولکول‌های باردار در سطح سلول‌ها صورت می‌پذیرند. به دلیل حضور بار منفی بالا بر روی لایه‌های خارجی سلول، سیانوباکتری‌های تولیدکننده پلی‌ساکارید خارج سلولی، مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند، این‌ها عوامل کلات‌کننده برای حذف یون‌های فلزی با بار مثبت از محلول‌های آبی هستند. پلی‌ساکارید خارج سلولی سیانوباکتری‌ها دارای دو ویژگی است که آن را از سایر پلیمرهای سنتز شده توسط دیگر باکتری‌ها متمایز می‌کند: (۱) بیشتر از ۹۰ درصد پلی‌ساکارید خارج سلولی شناخته شده یک ویژگی آنیونی قوی را نشان می‌دهد که به دلیل وجود یک یا دو نوع اسید اورونیک می‌باشد. (۲) این ترکیبات هتروپلی ساکاریدهای پیچیده‌ای هستند که حدود ۷۵ درصد آن‌ها حضور شش نوع مختلف مونوساکارید و یا بیشتر از آن را نشان می‌دهند (Pereira et al., 2009).

Tien (2002) گزارش داد *Oscillatoria limnetica* با وجود اینکه مقدار زیادی مواد موسیلاژی تولید نمی‌کند در مقایسه با *Anabaena sprioides* ظرفیت جذب بالاتری را برای سرب و مس در واحد حجم مواد موسیلاژی نشان می‌دهد. Chojnacka و

شایع‌ترین پاسخ سلول‌های سیانوباکتریایی زمانی که در معرض غلظت‌های متفاوتی از فلزات سنگین قرار می‌گیرند به شکل افزایش در تعداد و اندازه گرانول‌های پلی‌فسفات می‌باشد، Jensen و همکاران (۱۹۸۲) نشان دادند که افزایش فلز سنگین باعث تجمع آن‌ها در گرانول‌های پلی‌فسفات در *Plectonema boryanum* می‌شود. در واقع به این شیوه سیانوباکتری قادر به مقاومت در برابر مقادیر مشخصی از فلزات سنگین خواهد بود. همانطور که در این مطالعه مطابق اشکال ۶ و ۸ ما تغییرات ساختاری و مورفولوژیکی اندکی در سلول‌ها مشاهده شد. تنش‌های محیطی بر فعالیت‌های فیزیولوژیک در موجودات زنده تاثیر می‌گذارد. در واقع تنش عملکرد بعضی از پروتئین‌ها را مهار می‌کند یا سبب تخریب آن‌ها می‌گردد و سایر پروتئین‌ها را افزایش می‌دهد. بالارفتن غلظت فلزات سبب ایجاد اکسیژن فعال می‌گردد به دنبال آن تخریب اکسیداتیو رخ می‌دهد که سبب تخریب برخی پروتئین‌ها می‌گردد که در مطالعه حاضر نیز ما شاهد کاهش باندهای SDS Page مشاهده شد. سیانوباکتری‌ها دارای پرومتر های قابل القا بوسیله یون‌ها فلزی هستند نظیر پرومتر nrsB که قابل القا بوسیله نیکل است که در حضور نیکل روشن و در فقدان آن خاموش می‌شود (Lopez-Maury et al., 2002). وجود این پرومتر خاص سبب بیان شدن برخی پروتئین‌های جدید می‌گردد که در مطالعه حاضر نیز بیان باند ۸۰ کیلو دالتون در مواجهه با نیکل مشاهده شد.

#### نتیجه‌گیری نهایی

در این مطالعه سلول‌های زنده و نیز پلی‌ساکارید استخراج شده از سیانوباکتری *Nostoc sp. ISC62* در حالت تیمار شده با NaOH ۰/۱ مولار، جذب قابل توجهی را برای یون نیکل نشان دادند. در دمای اتاق و pH بهینه  $0.2 \pm 8$  و غلظت‌های بالای نیکل میزان

Mecarozzi و Colica (2010) نیز برای جذب نیکل توسط *Cyanospyra capsulate* میزان ۵۰/۴ میلی‌گرم بر گرم، توسط *Cyanospyra CE4* میزان ۶۹/۶ میلی‌گرم بر گرم، توسط *Cyanospyra ET5* میزان ۷۵/۴ میلی‌گرم بر گرم، توسط *Cyanospyra PE14* میزان ۶۷/۹۶ میلی‌گرم بر گرم و توسط *Cyanospyra VI22* میزان ۲۹/۵ میلی‌گرم بر گرم را گزارش دادند.

نتایج نشان داد که در pH های بالا محلولیت یون‌ها به دلیل تشکیل هیدروکسیدهای فلزی کاهش می‌یابد و از آنجا که  $pK_a$  برای گروه‌های آمینو بالاست، این گروه نقش کم رنگ‌تری را در pH برابر ۹ تا ۱۰ دارد زیرا در این محدوده میزان در دسترس بودن یون‌های فلزی کمتر است (Pavasant et al., 2006). در ارتباط با نقش پیش تیمار نمونه‌ها با NaOH می‌توان گفت که تیمارهای قلیایی باعث گسیختگی دیواره سلولی شده و گروه‌های عاملی مهم در سطح قرار می‌گیرند و همچنین باعث انحلال بیشتر لیپیدها تا حدود ۱۰ درصد می‌گردد. اگر چه مهمترین اثر تیمار NaOH در واقع د پروتونه شدن بیشتر گروه‌های عاملی در سایت‌های اتصال یون‌های فلزی می‌باشد که با د پروتونه شدن آن‌ها ابتدا یون سدیم جایگزین می‌شود سپس در حضور یون فلزی، سدیم حذف و یون فلزی جایگزین می‌شود (Nagase and Inthorn, 1997).

نتایج حاصل از SDS-PAGE در این تحقیق (شکل ۷) بوسیله داده‌های منتشر شده توسط Rai و Atri (۲۰۰۳) تأیید گردید، آن‌ها اثبات کردند که با افزایش غلظت فلز سنگین بکار رفته بیان برخی پروتئین‌های سلولی از جمله فیکوسیانین و پروتئین‌های سیستم کاروتنوئیدی به شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرد. و نیز نشان دادند که محتوای کلروفیل a با افزایش غلظت فلز سنگین کاهش می‌یابد.



- Baptista, M.S. and Vasconcelos, M. (2006).** Cyanobacteria metal interactions: Requirements, toxicity and ecological implications. *Critical Reviews in Microbiology*. 32: 127-137.
- Cain, A. and Vannela, R. (2008).** Cyanobacteria as a biosorbent for mercuric ion. *Bioresource Technology*. 99 (14): 6578-6586.
- Chojnacka, K. (2010).** Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environment International*. 36: 299-307.
- Chojnacka, K. and Chojnacki, A. (2005).** Biosorption of  $Cr^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  by blue-green algae *Spirulina sp.* kinetics, equilibrium and ions the mechanism of the process. *Chemosphere*. 59:75-84.
- Chowdhury, Z.Z., Zain, S.M., Atta Khan, R. and Ahmed, A.A. (2011).** Equilibrium kinetics and isotherm studies of Cu (II) adsorption from waste water onto alkali activated oil palm Ash. *American Journal of Applied Sciences*. 8: 230-237.
- Colica, G. and Mecarozzi, P.C. (2010).** Treatment of Cr (VI)-containing wastewaters with exopolysaccharide-producing cyanobacteria in pilot flow through and batch systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(5): 1953-1961.
- De Philippis, R., Colica, G. and Micheletti, E. (2011).** Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92: 697-708.
- Del Gallo, M. and Haegi, A. (1990).** Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis*. 9:155-161.
- Doshi, H., Ray, A. and Kothari, I.L. (2007).** Bioremediation potential of live and dead *Spirulina*: spectroscopic, kinetics and SEM studies. *Biotechnology and Bioengineering*. 96:1051-1063.
- Jin, Z. and DaYong, Z. (2012).** Comparison of heavy metal accumulation by a bloom-forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Chemistry*. 28: 3790-3797.
- Jensen, T.E., Baxter, M., Rachlin, J.W. and Warkentine, B. (1982).** Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy
- $Q_{max}$  حدود ۱۰۱ mg/g مشاهده شد. و نیز میزان مقاومت این سویه به یون نیکل از طریق محاسبه  $LD_{50}$  نیکل بر اساس محتوای کلروفیلی صورت گرفت؛ که نتایج نشان می‌دهد این سویه ساختار سلولی خود را تا غلظت حدوداً ۲۲۰ ppm به خوبی حفظ می‌کند. از طرف دیگر مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز نشان می‌دهد که در معرض قرار گرفتن این سیانوباکتری در غلظت ۲۰ ppm نیکل به مدت ۳ روز، تغییرات ساختاری زیادی را ایجاد نمی‌کند. میزان جذب یون نیکل در حضور سه یون دیگر Zn، Cu و Fe نیز صورت گرفت. مشاهده شد که اگر چه میزان جذب نیکل در حضور سایر یونها در مقایسه با نیکل به تنهایی کاهش یافت ولی توانایی این سویه در جذب سه یون دیگر به صورت قابل توجهی بالا بود. آنالیز SDS-PAGE برای محتوای پروتئینی کل سلول، قبل و بعد از در معرض قرار گرفتن این سویه در غلظت‌های مختلف نیکل نشان می‌دهد که در برخی نقاط بر روی ژل به تدریج محتوای پروتئینی کاهش یافته است یعنی حضور یون نیکل در بیان برخی ژنها و ساخت برخی پروتئین‌های سلولی مؤثر می‌باشد.
- سیاسگزاری**
- بدین‌وسیله از ریاست محترم پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی جهت در اختیار گذاشتن سویه مورد مطالعه و نیز از سرکار خانم اشرفی کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی تجزیه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.
- منابع**
- Ajmal, M., Ahmad, R. and Ahmad, J. (2000).** Adsorption studies on citrus reticulate: removal and recovery of Ni (II) from electroplating wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 79: 117-131.

- dispersive study. *Environmental Pollution*. 27: 119-127.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lopez-Maury, L., Garcia-Dominguez, M., Florencio, F.J., and Reyes, J.C. (2002).** A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 43: 247–256.
- Micheletti, E., Pereira, S., Mannelli, F., Moradas-Ferreira, P. and Tamagnini, P. (2008).** Sheathless mutant of the cyanobacterium *Gloethece* sp. PCC 6909 with increased capacity to remove copper ions from aqueous solutions. *Applied and Environmental Microbiology*. 174: 2797–2804.
- Mohamed, Z.A. (2001).** Removal of cadmium and manganese by a non-toxic strain of the freshwater cyanobacterium *Gloethece magna*. *Water research*. 35(18): 4405-4409.
- Nagase, H. and Inthorn, D. (1997).** Selective cadmium removal from hard water using NaOH-treated cells of the cyanobacterium *Tolypothrix tenuis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84(2): 151-154.
- Nasir, M.H., Nadeem, R., Akhtar, K., Hanif, M.A. and Khaild, A.M. (2007).** Efficacy of modified distillation sludge of rose (*Rosa centifolia*) petals for lead (II) and Zn (II) removal from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*. 147: 1006-1014.
- Pavasant, P., Apiratikul, R., Sungkhum, V., Suthiparinyanont, P., Wattanachira, S. and Marhab, T.F. (2006).** Biosorption of  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  using dried marine macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Bioresource Technology*. 97: 2321–2329.
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R. and Tamagnini, P. (2009).** Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Reviews*. 33: 917–941.
- Surosz, W. and Palinska, K. (2004).** Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 48(1): 40-48.
- Tien, C. (2002).** Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochemistry*. 38: 605–613.
- Wael, M. (2011).** Biosorption of heavy metal ions from aqueous solution by red macroalgae. *Journal of Hazardous Materials*. 192: 1827– 1835.