مقاله تحقیقی

حذف کبالت از پساب صنعتی شرکت .D.M.T اصفهان با کمک بیومس میکروبی

سید منصور میبدی [۱]، فرنوش امیری [۱،*]، احمدرضا شیردره [۲]، آیت‌الله نصرالهی [۱]، بابک صادقی [۳]، جواد نکویی [۲]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه زیست‌شناسی، تنکابن، ایران
۲. شرکت تولید مواد اولیه الیاف مصنوعی، اصفهان، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه شیمی، تنکابن، ایران

* **مسؤول مکاتبات:** فرنوش امیری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه زیست‌شناسی، تنکابن، مازندران، ایران، تلفن: ۹۸۱۹۲۴۲۷۱۱۰۵، پست الکترونیکی: farnooshamiri@gmail.com

محل انجام تحقیق: شرکت تولید مواد اولیه الیاف مصنوعی (.D.M.T) اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۲۲

چکیده

فلزات سنگین و سمی، از جمله کبالت، به وفور در پساب‌های صنایعی مانند کارخانجات احیای فلزات، کارخانجات تغییر و تبدیل فلزات، آبکاری، باطری‌سازی، تولید قطعات الکترونیک و شابلون‌سازی و یا کارخانجات چرم، دباغی و تولید ماده اولیه الیاف مصنوعی دیده می‌شوند. این مواد، حلالیت بالایی داشته و وارد محیط زیست و آب‌های زیرزمینی می‌شوند. مواد یادشده ابتدا توسط فیتوپلانکتون‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و ارگانیسم‌های کوچک دیگر جذب، و سپس به‌ترتیب توسط موجودات بزرگ‌تر، خورده شده، نهایتاً وارد بدن انسان و حیوانات می‌شوند و با ایجاد آسیب بر ریه، کلیه، استخوان، کبد، قلب، جنین و... اثرات زیان‌آور و جبران‌ناپذیری بر سلامتی انسان‌ها و حیوانات وارد می‌کنند. هدف از این مطالعه، جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به کبالت از پساب صنعتی شرکت .D.M.T اصفهان، جهت حذف کبالت از پساب صنعتی کارخانه متبوع است. در این مطالعه نمونه‌گیری از پنج حوضچه مختلف پساب صنعتی کارخانه انجام گرفت و برای جداسازی سویه‌های مقاوم به کبالت، از محیط-های کشت نوتریت آگار، مالت اکستراکت آگار و سابورودکستروز آگار استفاده شد. در نهایت مشخص شد که از ۵۶ سویه جدا شده از پساب صنعتی این شرکت، ۱۷ سویه، توانایی رشد در برابر ppm ۲ کبالت را در محیط‌های آزمایشگاهی دارند و از آن بین، سویه $C_{3\text{-}3}$ با بیومس زنده در pH = ۶ طی مدت دو روز، ۷۲/۵ درصد کبالت را از پساب یاد شده حذف نمود و نسبت به سایر سویه‌ها کارآیی بالاتری در حذف زیستی کبالت نشان داد. نتایج یاد شده با کمک یک آزمون فاکتوریل سه عاملی (pH، نوع بیومس و زمان) و با کمک نرم‌افزار SPSS16 با General Linear Model تأیید شد. آزمون در شرایط سرعت تکان ۲۰۰rpm با دانسیته سلولی ۲ درصد تحت دمای ۳۰ درجه سلسیوس به جریان افتاد. ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و آنالیز ژنتیکی 16SrDNA این باکتری انجام شد و سویه یاد شده از نوع *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii str. ICPB 10535* تعیین گردید. این باکتری در مقایسه با سایر باکتری‌ها در کمترین زمان، بیشترین میزان حذف را نشان داد که این امر با تکنیک اسپکتروسکوپی جذب اتمی، تأیید شد. این سویه می‌تواند در مجامع بین‌المللی، انتخاب مناسبی برای حذف فلز سمی کبالت از محیط زیست باشد.

واژه‌های کلیدی: کبالت، پساب صنعتی، بیومس میکروبی

مقدمه

با پیشرفت صنعت و فناوری، آلودگی محیط زیست نیز رو به افزایش است. پساب‌های آلوده به مواد سمی و فلزات سنگین (حتی در حد مجاز) از قبیل جیوه، کادمیوم، اورانیم، ارسنیک و سرب وقتی وارد محیط زیست شوند، می‌توانند تحت‌تاثیر عوامل مختلف فیزیکی، شیمیایی و میکروبی، تغلیظ شده و با آلوده کردن آب‌های سطحی و زیرزمینی، اثرات جبران‌ناپذیری بر محیط زیست وارد کنند (۱).

فلزات سنگین، فلزاتی هستند که وزن‌حجمی آن‌ها بیش از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب است. مراکز مختلف صنعتی، کارخانه‌ها و کارگاه‌هایی از قبیل ذوب فلزات، ذوب روی، باطری‌سازی، تولید قطعات الکترونیک، آبکاری و شابلون‌سازی، از مهمترین واحدهای تولیدکننده فاضلاب‌های صنعتی حاوی فلزات سنگین و سمی به‌شمار می‌آیند (۲).

شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات، نقش مهمی را در رابطه با آلودگی محیط و نهایتاً تیمار این محیط‌ها ایفاء می‌کند. با توجه به سطوح غلظت بسیار بالای برخی از فلزات در پساب‌ها و به‌طور کلی در محیط‌های آلوده به فلز، باکتری‌ها مکانیسم‌های مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی می‌شوند. محیط‌های آلوده به‌طور اتفاقی می‌توانند باعث انتخاب هم‌زمان فاکتورهای مقاومت با تحول و دگرگونی در ساختار ژنتیکی باکتری یا تغییر در عملکرد باکتری شوند. بر حسب میزان آلودگی، ممکن است ظرفیت پلاسمیدی یا ساختار سلولی آن‌ها تغییر یابد، تا آن‌جایی که قدرت تحمل غلظت‌های بالاتر ترکیبات سمی را نیز داشته باشند (۳،۴).

وجود فلزات سنگین در یک منطقه آلوده، سلامت انسان را به‌خطر می‌اندازد. مواد سمی در صورت ورود به منابع آب، باعث مسمومیت و مرگ جانداران آبزی شده و اگر آب آلوده به این مواد توسط انسان مصرف شود، مسمومیت، حساسیت شدید، ضایعات کروموزومی، عقب‌افتادگی ذهنی، فراموشی، پارکینسون، سنگ کلیه، نرمی استخوان و گاهی هم سرطان‌های کشنده ایجاد می‌کند (۷-۵).

کبالت، فلز سنگینی است که می‌تواند از راه پساب‌های صنعتی، وارد محیط زیست شود. مقادیر کم آن برای بسیاری از موجودات زنده از جمله انسان ضروری است (میزان کبالت مورد نیاز انسان در حدود ۱ تا ۳ میکروگرم در روز است). این عنصر، جزو اصلی ویتامین B_{12} است و در ساخت هموگلوبین و گلبول‌های قرمز به‌شکل شرکت در ساختمان اریتروپویتین، نقش دارد، اما غلظت‌های بیشتر از حد مجاز آن دارای اثرات سمی است (حد استاندارد زیست‌محیطی کبالت، کمتر از ppm ۰/۰۵ است). از جمله اثرات سمی کبالت بر انسان می‌توان التهاب ریه، خس‌خس‌کردن سینه، تهوع و استفراغ، مشکلات جدی قلبی و ایجاد مشکلاتی برای جنین را نام برد. کبالت اگر وارد عضله شود یا زیر پوست قرار گیرد، می‌تواند باعث بروز سرطان شود (۸،۹).

فاضلاب‌های صنعتی و پساب ناشی از کارخانه‌ها با توجه به نوع فرآورده‌های تولیدی، متفاوتند. وفور ترکیبات شیمیایی سمی در فاضلاب کارخانه‌ها در مقایسه با فاضلاب‌های خانگی و همچنین برخورداری از شرایط قلیایی و اسیدی، محیط را برای موجودات زنده، نامساعد می‌کند و این امر باعث شده است ضرورت عدم تخلیه فاضلاب‌های صنعتی به آب‌های سطحی و منابع آب زیرزمینی و تصفیه این فاضلاب‌ها بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد. در این بین می‌توان با روش‌های مختلف زیستی که از روش‌های استاندارد و قابل قبول در سطح جهان است، انواع پساب‌های حاوی فلزات سنگین را تصفیه نمود (۱۰).

باکتری‌ها می‌توانند با کاهش غلظت فلز در محیط، باعث کاهش نقش مسموم‌کننده آن برای موجودات زنده شوند. برخی از باکتری‌ها، فلز را برای ساختن مواد ساختاری خود ذخیره می‌نمایند. این موجودات ذره‌بینی به جز جذب فلز در جدار خود، با راسب‌کردن یا فرّارکردن آن، محیط را برای ادامه حیات مساعد می‌کنند. امروزه فرآیند تصفیه با استفاده از میکروارگانیسم‌ها حتی در غلظت‌های بسیار پایین به‌خوبی صورت می‌گیرد (۱۰).

کارخانه تولید مواد اولیه الیاف مصنوعی اصفهان (D.M.T.) که متعلق به بانک صنعت و معدن بوده

و تولیدکننده دی‌متیل‌ترفتالات مورد مصرف در کارخانه پلی‌اکریل است، بدون شک از جمله کارخانه‌هایی است که در صنعت کشور، نقش موثر و کلیدی دارد. حفظ محیط زیست و آلوده‌نشدن آن توسط ضایعات احتمالی این کارخانه، از جمله اهدافی است که به‌طور جدی و مستمر توسط مسئولین این کارخانه، پیگیری و دنبال می‌شود. به‌علاوه، مطالعه و بررسی روی فاضلاب‌های کارخانه نیز در چهارچوب اهداف فوق‌الذکر قرار گرفته است (۱۱).

هدف ما در این پژوهش که از نوع تجربی است، جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به کبالت از پساب صنعتی شرکت .D.M.T و ایجاد بیومس زنده و غیرزنده از سویه‌های یاد شده و پاک‌سازی و حذف کبالت از پساب این شرکت با کمک توده زیستی ایجاد شده و رساندن میزان آن به حد استاندارد زیست‌محیطی (کمتر از ppm ۰/۰۵) است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از پنج حوضچه مختلف پساب صنعتی کارخانه، نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌برداری در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتری از پساب با استفاده از ظروف مخصوص نمونه‌برداری شیشه‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری سترون طی روزهای مختلف و ساعت‌های مختلف صورت گرفت. برای هر نمونه، شناسنامه‌ای شامل تاریخ برداشت، دمای محل، pH، محل نمونه‌برداری و نوع نمونه تعیین شد و نمونه‌های جمع‌آوری‌شده، فوراً به آزمایشگاه منتقل شدند تا مراحل مختلف کار روی آن‌ها انجام گیرد.

جداسازی و تخلیص سویه‌ها

برای جداسازی سویه‌های مناسب مقاوم به کبالت، از محیط‌های کشت میکروبیولوژیک شامل نوترینت آگار، مالت اکستراکت آگار و سابورودکستروز آگاراستفاده شد (مرک آلمان). در این مرحله، از هر نمونه همگن‌شده، ۱۰ میلی‌لیتر در شرایط کاملا سترون، برداشته شد و در ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون رقیق گردید و برای تهیه رقت‌های بعدی، ۱ میلی‌لیتر از رقت یک‌دهم به لوله آزمایش محتوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون انتقال داده‌شد تا رقت‌های متوالی 10^{-1} تا 10^{-6} در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون تهیه شود. از رقت‌های پایین (رقت‌های 10^{-6} و 10^{-5}) به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر، برداشت گردید و در محیط‌های استاندارد یاد شده با استفاده از روش کشت متراکم جهت بازیافت جمعیت میکروبی، تلقیح و با میله شیشه‌ای سترون کشت شدند. ریخت‌شناسی پرگنه‌ها بعد از ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. پلیت‌هایی که میزان کافی و مناسبی پرگنه با اشکال ماکروسکپی مختلف داشتند (حدود۲۰ تا ۳۰ کلنی) انتخاب و برای تفکیک انواع پرگنه‌ها از روش خالص‌سازی کشت خطی استفاده شد. از سویه‌های جدا‌شده، رنگ‌آمیزی گرم روی لام میکروبیولوژیک به عمل آمد تا شکل میکروسکوپی و واکنش گرم آن‌ها تعیین شود.

سازش سویه‌ها به کبالت و تعیین سویه‌های مقاوم به کبالت

در این مرحله، محیط‌های کشت محتوی فلز کبالت (به میزان ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱، و ۲ قسمت در میلیون فلز کبالت) با استفاده از کلرید کبالت ۶ آبه $CoCl_2(H_2O)_6$ تهیه شد. پس از کشت سویه‌های تخلیص‌شده، سویه‌های مقاوم به کبالت انتخاب گردید و بهترین سویه‌ها برای مرحله بعدی آزمون انتخاب شد. برای این منظور، همه سویه‌های میکروبی به‌دست آمده روی محیط‌های کشت دارای کبالت کشت شدند و مقاومت آن‌ها به کبالت بررسی گردید.

تهیه بیومس سلولی

برای ایجاد بیومس سلولی از محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion) استفاده شد. ابتدا یک پرگنه از سویه مورد نظر، به ۵ سی‌سی محیط BHI در لوله آزمایش انتقال داده‌شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس برای ایجاد بیومس بیشتر، محتوای لوله

قبلی پس از اختلاط کامل، به ارلن مگنت‌دار محتوی ۴۵ سی‌سی محیط کشت BHI افزوده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی هم‌زن مغناطیسی با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۲ روز نگهداری شد. حجم یاد شده نهایتاً به ارلن مگنت‌دار محتوی ۴۵۰ سی‌سی محیط BHI نهایی برده‌شد. پس از گذشت دوره گرمخانه‌گذاری (۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۳ تا ۷ روز در تکان ۲۰۰ دور در دقیقه) توده باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه جدا شد. این توده در طی سه مرحله با سرم فیزیولوژی سترون، شستشو و سپس جدا گردید. برای تهیه بیومس کشته‌شده، بخشی از توده‌های تهیه‌شده به روش بالا به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

حذف زیستی کبالت در فلاسک لرزان

برای انجام عملیات حذف، ۱۰۰ میلی‌لیتر پساب حوضچه‌های صنعتی شرکت .D.M.T در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری، جمع‌آوری شد. سپس بیومس میکروبی به دو صورت زنده وکشته‌شده، با دانسیته تلقیحی ۲ درصد و در pH=۶ و pH=۷، در فلاسک-های حاوی پساب به‌کار رفت. برای رسیدن به بهترین نتیجه، بررسی و مقایسه نتایج بیومس میکروبی زنده و کشته‌شده صورت گرفت. چون در برخی پژوهش-های انجام‌شده در سال‌های قبل بیومس کشته‌شده، نتایج مثبت و کاربردی در حذف فلزات سنگین نشان داده است، به‌طور مثال، نشان داده شده در بیومس سلولی کشته‌شده با حرارت، گرانول‌های خالی ایجاد می‌شود که باعث جذب بیشتر فلزات خواهد شد (۱۲). این نمونه‌ها در کنار نمونه بدون باکتری (شاهد) ظرف مدت ۳ روز در سرعت تکان ۲۰۰rpm و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ارزیابی میزان کبالت موجود در نمونه، هر روز از فلاسک‌های یادشده، نمونه‌گیری به‌عمل آمد و با دستگاه اسپکتروسکوپی جذب اتمی میزان این فلز سنجش شد. روش آنالیز کبالت شامل سه مرحله آماده‌سازی نمونه، رقیق‌سازی و خواندن نمونه با استاندارد مناسب است که به‌طور خلاصه در روش آماده‌سازی نمونه را به پایه کبالت می‌رسانند. اگر نمونه دارای ماده آلی باشد، در ظرف پلاتینی، سوزانده‌شده و کربن آن در کوره الکتریکی از بین برده می‌شود و در نهایت، کبالت باقی‌مانده به نسبت حجم به حجم، با اسید کلریدریک حرارت داده می-شود و کبالت در اسید حل شده و به‌صورت محلولی از کبالت، آماده خواندن می‌شود. اگر مقدار کبالت از ماکزیمم استاندارد (ppm ۴-۱) آن بیشتر باشد، باید نمونه آن‌قدر رقیق شود تا در محدوده خطی استاندارد قرار گیرد. در مرحله خواندن نمونه با استاندارد مناسب، استاندارد ppm ۴-۱ به دستگاه داده‌شده که دستگاه، منحنی جذب آن را رسم می-کند و سپس نمونه مورد نظر به دستگاه داده‌شده که در نهایت، غلظت نمونه بر حسب ppm و بر اساس جذب نمونه، خوانده خواهد شد.

شناسایی سویه‌های برتر

برای تعیین هویت دقیق سویه یا سویه‌های برتر جداشده از پساب صنعتی شرکت .D.M.T اصفهان، روش شناسایی بیوشیمیایی و ژنتیکی انجام گرفت.

شناسایی بیوشیمیایی

برای شناسایی بیوشیمیایی سویه‌های برتر، از آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، تخمیر قندها، تولید گاز کربنیک، تولید گاز سولفید هیدروژن، مصرف سیترات، تجزیه اوره، حرکت سلولی، اندول‌زایی، واکنش متیل‌رد و وژزپرسکوئر استفاده شد.

شناسایی ژنتیکی

برای شناسایی سویه‌های برتر، از آزمون تعیین توالی 16SrDNA استفاده شد که در موسسه پیشگامان زیستی پارسه انجام گرفت. در این مرحله، ماده ژنتیکی باکتری با روش فنل‌کلروفرم استخراج شد و برای انجام آزمون .P.C.R از پرایمر یونیورسال 16SrDNA استفاده شد و در نهایت، با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر ۳۵ سیکل، تکثیر ماده ژنتیکی انجام گرفت.

نتایج

در مجموع از کشت نمونه‌های مربوط به حوضچه‌های شماره ۲، شماره ۵، 4A و 4B و لاگون شماره ۱، ۵۶ سویه میکروبی بر اساس شکل پرگنه مربوطه، جدا و تخلیص شد که تعداد ۵۱ عدد آن، شامل سویه‌های باکتریایی و تعداد ۵ عدد آن، شامل سویه‌های کپکی بود. از این تعداد، ۱۶ گونه باکتریایی و یک گونه کپکی نهایتاً توانایی رشد در حضور ppm ۲ کبالت را داشتند که برای آزمون‌های حذف، استفاده شدند. برای این منظور، تأثیر سه عامل pH، نوع توده سلولی (زنده، کشته شده با حرارت) و زمان بر عملکرد سویه میکروبی، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مربوط به تأثیر توده سلولی با کمک آزمون T نمونه‌های مستقل ارزیابی شد که در قالب جدول ۱، خلاصه شده است.

جدول ۱- آزمون T نمونه‌های مستقل برای بررسی معنی‌داربودن تأثیر نوع بیومس در توانایی میکروارگانیزم‌ها برای حذف کبالت ($p<0.05$).

سویه		میانگین	انحراف معیار	t	p
D_{4-3}	توده زنده	1.7458	0.16011	-3.414	0.001
	توده مرده	1.8812	0.11015		
A_2	توده زنده	1.9604	0.10732	2.683	0.010
	توده مرده	1.8333	0.20572		
C_{2-8}	توده زنده	1.6208	0.23953	-1.227	0.226
	توده مرده	1.7000	0.20642		
D_{3-6}	توده زنده	1.4958	0.35199	-0.437	0.664
	توده مرده	1.5375	0.30760		
B_2	توده زنده	1.6000	0.27187	-1.060	0.295
	توده مرده	1.6771	0.23030		
D_{3-5}	توده زنده	1.0588	0.56293	-0.772	0.444
	توده مرده	1.1771	0.49672		
D_{4-4}	توده زنده	1.1792	0.52439	-1.305	0.199
	توده مرده	1.3562	0.40895		
C_{3-3}	توده زنده	1.2521	0.57265	-1.629	0.110
	توده مرده	1.4792	0.37181		
D_{2-5}	توده زنده	1.3929	0.37623	-1.259	0.214
	توده مرده	1.5167	0.30024		
C_{3-2}	توده زنده	1.3188	0.42677	-1.267	0.212
	توده مرده	1.4583	0.33057		
C_{2-1}	توده زنده	1.8200	0.12297	-0.626	0.534
	توده مرده	1.8417	0.11672		
Mold	توده زنده	1.5458	0.35137	-1.782	0.081
	توده مرده	1.7029	0.25106		
C_{1-1}	توده زنده	1.9771	0.04658	0.572	0.570
	توده مرده	1.9667	0.07614		
D_{2-2}	توده زنده	1.7333	0.19035	-4.703	0.000
	توده مرده	1.9313	0.07914		
D_{4-7}	توده زنده	1.5625	0.33207	-2.239	0.030
	توده مرده	1.7438	0.21685		
D_{3-4}	توده زنده	1.6021	0.29284	-2.317	0.025
	توده مرده	1.7708	0.20372		
D_{4-1}	توده زنده	1.5125	0.30226	-2.889	0.006
	توده مرده	1.7292	0.20899		

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، نوع توده سلولی، بر عمل سویه‌های D_{4-3}، A_2 ، D_{2-2}، D_{4-7}، D_{3-4} و D_{4-1}، تأثیر معنی‌داری داشته است که با $p<0.05$ تأیید می‌شود. نتایج مربوط به تأثیر pH با کمک آزمون T نمونه‌های مستقل ارزیابی شد که در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول ۲- آزمون T نمونه‌های مستقل برای بررسی معنی‌داربودن تأثیر pH در توانایی میکروارگانیزم برای حذف کبالت ($p<0.05$).

سویه	میانگین		انحراف معیار	t	*p*
D_{4-3}	pH 6	1.7812	0.16004	-1.489	0.143
	pH 7	1.8458	0.13981		
A_2	pH 6	1.9062	0.13538	0.369	0.714
	pH 7	1.8875	0.20917		
C_{2-8}	pH 6	1.6708	0.22933	0.318	0.752
	pH 7	1.6500	0.22458		
D_{3-6}	pH 6	1.5417	0.34505	0.524	0.602
	pH 7	1.4917	0.31473		
B_2	pH 6	1.5958	0.26289	-1.178	0.245
	pH 7	1.6813	0.23903		
D_{3-5}	pH 6	1.0667	0.56080	-0.668	0.508
	pH 7	1.1692	0.50095		
D_{4-4}	pH 6	1.1458	0.53302	-1.826	0.074
	pH 7	1.3896	0.37878		
C_{3-3}	pH 6	1.1562	0.56228	-3.237	0.002
	pH 7	1.5750	0.29229		
D_{2-5}	pH 6	1.4083	.37639	-0.939	0.353
	pH 7	1.5012	.30580		
C_{3-2}	pH 6	1.3313	.41672	-1.034	0.307
	pH 7	1.4458	.34795		
C_{2-1}	pH 6	1.7929	.13000	-2.304	0.026
	pH 7	1.8687	.09534		
Mold	pH 6	1.5292	.36173	-2.196	0.033
	pH 7	1.7196	.22270		
C_{1-1}	pH 6	1.9604	.07369	-1.275	0.209
	pH 7	1.9833	.04815		
D_{2-2}	pH 6	1.8000	.19111	-1.284	0.206
	pH 7	1.8646	.15567		
D_{4-7}	pH 6	1.5604	.33524	-2.296	0.026
	pH 7	1.7458	.21003		
D_{3-4}	pH 6	1.6125	.31077	-2.004	0.051
	pH 7	1.7604	.18473		
D_{4-1}	pH 6	1.5646	.29506	-1.409	0.165
	pH 7	1.6771	.25664		

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، عامل pH، بر عمل سویه‌های C_{3-3} ، C_{2-1} ، Mold ،D_{4-7} و D_{3-4}، تأثیر معنی‌داری داشته است که با $p<0.05$ تأیید می‌شود.

جدول ۳، میزان معنی‌داری عامل زمان را در ۱۷ سویه مورد آزمایش نشان می‌دهد. همان‌گونه مشاهده می‌شود، سویه‌های ردیف ۴، ۵، ۸، ۱۱، ۱۲ و ۱۴ در سطح $p<0.05$ به صورت معنی‌داری باعث تغییر میزان کبالت شده‌اند.

جدول ۳- میزان معنی‌داری عامل زمان روی حذف کبالت (ANOVA).

سویه	D_{4-3}	A_2	C_{2-8}	D_{3-6}	B_2	D_{3-5}	D_{4-4}	C_{3-3}	D_{2-5}	C_{3-2}	C_{2-1}	Mold	C_{1-1}	D_{2-2}	D_{4-7}	D_{3-4}	D_{4-1}
Sig	۰/۷۴۹	۰/۵۸۶	۰/۳۹۸	۰/۰۱۵	۰/۰۰۰	۰/۶۳۳	۰/۱۱۹	۰/۰۰۰	۰/۲۵۵	۰/۳۳۲	۰/۰۰۳	۰/۰۲۵	۰/۱۴۴	۰/۰۲۴	۰/۸۷۹	۰/۱۲۷	۰/۳۰۶

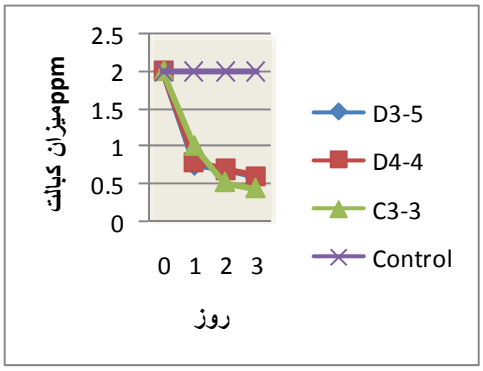
برای بررسی تأثیر همه عوامل بر کارآیی سویه‌های هفده‌گانه، یک آزمون مدل خطی عمومی (G.L.M.) انجام گرفت که نتایج آن در جدول ۴ خلاصه شده است.

جدول ۴- آزمون تأثیر همه‌ی عوامل (pH، نوع توده‌ی سلولی و زمان) روی عمل باکتری برای حذف کبالت (GLM).

مؤلفه	سویه	Mean square	F	Adjusted R Squared	Sig
a	D4_3	.069	44.318	.933	.000
b	A2	.092	51.778	.942	.000
c	C2_8	.152	52.148	.942	.000
d	D3_6	.330	105.529	.971	.000
e	B2	.196	129.892	.976	.000
f	D3_5	.870	313.099	.990	.000
g	D4_4	.696	219.190	.986	.000
H	C3_3	.734	71.181	.957	.000
I	D2_5	.360	100.192	.969	.000
J	C3_2	.458	244.487	.987	.000
K	C2_1	.043	53.431	.944	.000
l	Mold	.297	73.346	.958	.000
M	C1_1	.006	1.870	.217	.067
N	D2_2	.092	49.331	.939	.000
O	D4_7	.259	65.438	.954	.000
P	D3_4	.209	49.520	.939	.000
Q	D4_1	.233	42.596	.930	.000

پس از بررسی معنی‌داری اثر همه عوامل و معنی‌دار شدن همه آن‌ها در سطح ۰/۰۱، همان‌گونه که در جدول ۴ دیده می‌شود، ضریب تعیین خطی مدل (R Square) به جز مؤلفه m (۰/۲۱۷) مقادیر بسیار بالایی را نشان می‌دهد که این اعداد، حکایت از اعتبار بسیار بالای این مدل دارد. در این بین، سویه D_{3-5}، C_{3-2}، D_{4-4} به ترتیب با ۰/۹۹۰، ۰/۹۸۷ و ۰/۹۸۶، بیشترین تأثیر را در همه سطوح عوامل برای حذف کبالت نشان دادند. در مجموع، سویه‌هایی که پس از ۲۴ ساعت، توانایی حذف ۵۰ درصد و بیشتر، کبالت را از پساب مربوطه داشتند، به ترتیب D_{3-5} (۶۲/۵ درصد)، D_{4-4} (۶۰ درصد) و C_{3-3} (۵۰ درصد) بودند و سویه C_{3-3} پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، بیشترین میزان حذف را به ترتیب با ۷۴/۱۶ درصد و ۷۸/۳۴ درصد نشان داد.

منحنی تغییرات کبالت مربوط به سویه‌های یاد شده که در pH 6، با توده سلولی زنده صورت گرفت در کنار شاهد در نمودار ۱ مشاهده می‌شود.



نمودار ۱- تغییرات کبالت طی مدت سه روز توسط سویه‌های برتر در کنار شاهد بدون باکتری (دمای ۳۰°C، دانسیته‌ی سلولی ۲٪ ، تکان ۲۰۰ rpm ،pH 6 ، توده‌ی سلولی زنده).

برای شناسایی چهار سویه برتر، آزمون‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی صورت پذیرفت. نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی برای تشخیص چهار سویه باکتریایی که بیشترین کاهش را در میزان کبالت پساب کارخانه D.M.T. اعمال کردند، در قالب جدول ۵ خلاصه شده است. سویه‌های یاد شده

در مطالعه میکروسکوپی به‌ترتیب به‌صورت کوکوباسیل گرم منفی، باسیل گرم منفی، کوکوباسیل گرم منفی و باسیل گرم منفی مشاهده شدند.

جدول ۵- نتایج مربوط به آزمایش‌های بیوشیمیایی برای تشخیص چهار سویه‌ی برتر.

نام سویه	VP	MR	اندول	حرکت	SH_2	گاز (Co_2)	گلوکز	لاکتوز	اوره	سیترات	اکسیداز	کاتالاز
C_{3-3}	+	_	_	+	_	_	+	+	_	+	+	+
C_{3-2}	+	_	_	+	_	_	+	+	W	+	_	+
D_{4-4}	+	_	_	+	W	+	+	+	+	+	_	+
D_{3-5}	_	+	+	+	_	+	+	+	_	_	_	+

نتایج به‌دست آمده در آزمون ژنتیکی تعیین توالی 16SrDNA ریبوزومی سویه‌های *C3-2*، *D3-5*، *C3-3* و *D4-4*، به ترتیب *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047، *Escherichia coli* MS 57-2 ، *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* str. ICPB 10535 و *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316 تشخیص داده شد.

بحث

این مطالعه روی پساب کارخانه D.M.T اصفهان که دارای فلز کبالت است، صورت گرفت و از روش به‌کارگیری توده زیستی برای حذف این فلز از پساب خروجی آن استفاده شد. حضور فلزات سنگین با ایجاد مقاومت در محیط ارتباط دارد، به‌طوری که میکروارگانیسم‌ها در حضور فلزات، مکانیسم‌های مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب هم-زمان گونه‌های مقاوم با قابلیت تحمل فلزی می‌شود. میزان فلز کبالت در پساب صنعتی مورد مطالعه در این تحقیق، بیش از استانداردهای بین‌المللی (زیر ppm ۰/۰۵) گزارش شد. در مطالعاتی که توسط A.Rajbashi در سال ۲۰۰۸ (۱۳) روی باکتری-های مقاوم به فلز سنگین در کارخانه تصفیه فاضلاب Geheswori صورت گرفت، ۱۰ باکتری مقاوم به فلز سنگین از حوضچه هوازی تصفیه فاضلاب جدا شدند که شامل *Staphylococcus*، *E.coli* و *Klebsiella* مقاوم به کروم، *Acinetobacter*، *Flavobacterium* و *Citrobacter* مقاوم به کادمیوم، *Staphylococcus* و *Bacillus* مقاوم به نیکل، *Pseudomonas* مقاوم به مس و *Methylobacterium* مقاوم به کبالت بود و همه این باکتری‌ها مقاومت بالایی را به فلزات سنگین با حداقل غلظت مهارکننده (MIC) در محدوده ۵۰۰-۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان دادند. آزمایش تحمل فلز سنگین در نمونه حوضچه هوازی، بیشترین تحمل میکروبی را به کروم و کمترین تحمل میکروبی را به نیکل نشان داد. همچنین نشان داده‌شد که با افزایش غلظت فلزات سنگین، بار میکروبی نیز کم می‌شود که نشان‌دهنده اثر سمی فلزات سنگین بر رشد میکروارگانیسم‌ها است. در مطالعه انجام‌شده بر روی پساب شرکت DMT، چهار سویه برتر، کوکوباسیل یا باسیل‌های گرم‌منفی بودند که مقاومت باکتری‌های گرم‌منفی به فلزات سنگین را نشان می-دهد. در پژوهش انجام‌شده باکتری‌ای که در مقایسه با سایر باکتری‌ها در کمترین زمان بیشترین مقدار حذف را انجام داد *Xanthomonas fuscans subsp aurantifolii str ICPB 10535* بود که یک باکتری میله‌ای گرم‌منفی است.

در مطالعه‌ای که توسط فرشید قربانی و حبیب‌الله یونسی در سال ۱۳۸۷ در مورد جذب سطحی کادمیوم توسط بیومس ساکارومایسس سرویزیه انجام گرفت، نشان داده‌شد که میزان جذب سلول‌های مخمر ساکارومایسس سرویزیه در مراحل مختلف رشد، یکسان نیست و در پایان فاز رشد نمایی، بیشترین میزان جذب را از خود نشان می‌دهد. فاز رشد نمایی، پس از حدود ۴ ساعت شروع شد و در طی ۱۶ ساعت سلول‌ها به حداکثر رشد خود رسیدند.

پس می‌توان نتیجه گرفت که برای به‌دست آوردن حجم بالا و قابلیت جذب بیشتر، لازم است سلول‌ها پس از ۱۶ ساعت جداسازی شوند. البته استفاده از سلول‌های غیرزنده نسبت به سلول‌های زنده، از برخی مزایا برخوردار است؛ از جمله این‌که سلول‌های مرده، مدت زمان طولانی در دمای اتاق ذخیره می‌شوند و تحت تاثیر سمیت فلزات و مواد دیگر قرار نمی‌گیرند و نیاز به مواد غذایی برای رشد ندارند. به‌علاوه، تصفیه اولیه و کشتن سلول‌ها به روش‌های فیزیکی و شیمیایی، باعث افزایش ظرفیت جذب آن‌ها نسبت به سلول‌های زنده می‌شود. عیب سلول‌های کشته‌شده در مقایسه با سلول‌های زنده، محدودیت ظرفیت جذب است (۱۴). در مطالعه Johncy Rani, M در سال ۲۰۱۰، مقایسه‌ای برای حذف فلزات سنگین توسط سلول‌های مرده و زنده ثابت‌شده انجام گرفت. در بخشی از این مطالعه که برای جذب سطحی توسط سلول‌های زنده بی‌حرکت انجام گرفت، *Bacillus* sp در حدود ۶۹/۳۴ درصد از فلز Cu، *Pseudomonas* sp در حدود ۹۰/۴۱ درصد از Cd و *Micrococcus* sp در حدود ۸۴/۲۷ درصد از Pb را حذف کرد در حالی‌که سلول‌های مرده *Bacillus* sp، *Pseudomonas* sp و *Micrococcus* sp به‌ترتیب به میزان ۴۴/۷۳ درصد از Cu و ۸۸/۶۶ درصد از Cd و ۷۹/۲۲ درصد از Pb را حذف کردند. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که همه سویه‌های زنده تثبیت‌شده نسبت به سلول‌های مرده باکتریایی، دارای توانایی بالقوه‌ای برای حذف Pb, Cd, Cu از فاضلاب‌های صنعتی بودند. در محدوده pH استفاده شده (۵ تا ۹)، همه سویه‌های باکتریایی مقاوم به فلز سنگین رشد کرده بودند. فرایند جذب سطحی به pH حساس است و جایگاه‌های اتصال به فلز در سطح سلول توسط pH تحت‌تاثیر قرار می‌گیرد. در pH کم، جایگاه‌های سطح سلولی به یون‌های H^+ متصل شده و از این راه، ساختمان آن‌ها برای کاتیون‌های دیگر، غیرقابل دسترس می‌شود و افزایش pH می‌تواند باعث افزایش لیگاندهای با بار منفی شود که موجب افزایش اتصال کاتیون‌ها می‌شود. *Bacillus* sp، *Pseudomonas* sp و *Micrococcus* sp دارای توانایی جذب سطحی ماکزیمم برای فلزات Pb, Cd, Cu به‌ترتیب در pH برابر با ۷، ۶ و ۶ بودند و بالاترین میزان جذب در محدوده ۴ تا ۸ اتفاق می‌افتاد که در این محدوده از pH تقریبا همه انواع بیومس به‌طور وسیعی می‌توانستند باعث حذف فلزات شوند. در این مطالعه، در مقایسه‌ای که بین جذب سطحی فلز سنگین توسط سلول‌های باکتریایی مرده و سلول‌های باکتریایی بی‌حرکت انجام گرفت، مشاهده شد که سلول‌های مرده *Bacillus* sp، *Pseudomonas* sp و *Micrococcus* sp به ترتیب ۴۴/۷۳ درصد از Cu، ۸۶/۶۶ درصد از Cd و ۷۹/۲۲ درصد از Pb را می‌توانند حذف کنند؛ در حالی‌که سلول‌های زنده بی‌حرکت *Bacillus* sp، *Pseudomonas* sp و *Micrococcus* sp، به‌ترتیب باعث حذف ۶۹/۳۴ درصد از Cu ۹۰/۴۱ درصد از Cd و ۸۴/۲۷ درصد از Pb می‌شدند. بنابراین، همه این نتایج نشان داد که توانایی جذب سطحی سلول‌های زنده تثبیت شده، به مراتب بیشتر از سلول‌های باکتریایی مرده است. علت این پدیده می‌تواند آن باشد که سلول‌های باکتریایی مرده دارای ذرات کوچک با چگالی، نیروی مکانیکی و استحکام کم هستند. در مطالعه انجام‌شده بر روی پساب شرکت D.M.T، بیومس زنده، نتایج بهتری نسبت به توده کشته‌شده با حرارت نشان داد (۱۵).

در مطالعه قربانی و یونسی نشان داده‌شده که میزان جذب یون‌های فلز کادمیوم در آب، با بیشتر شدن غلظت بیومس ساکارومایسس سرویزیه افزایش می‌یابد که این ازدیاد جذب با افزایش غلظت بیومس می‌تواند ناشی از افزایش موقعیت‌های فعال روی دیواره سلولی باشد. در پژوهش انجام‌شده، غلظت ۲ درصد برای توده سلولی انتخاب گردید. صرف‌نظر از مقادیر متفاوت جذب، در مطالعه قربانی و یونسی تقریبا در همه pHها جذب صورت گرفته و یون‌های فلزی از محلول حذف می‌شدند که این مسأله می‌تواند بیانگر کاربرد روش‌های زیستی حذف فلزات سنگین در pHهای مختلف پساب‌های صنعتی باشد. از این رو، اثر سه pH مختلف ۱/۳ و ۵ و ۸/۷ روی میزان جذب یون‌های کادمیوم توسط مخمر بررسی شده است که در pH برابر ۱/۳، میزان جذب کم

بوده و با افزایش pH به ۵، میزان جذب افزایش می-یابد. همچنین میزان جذب در pH برابر ۷/۸، کمتر از pH برابر ۵ است. تحقیقی در سال ۲۰۰۳ توسط Vasudevan و همکاران صورت گرفت که نشان داد ظرفیت جذب مخمر ساکارومایسس سرویزیه با فلز کادمیوم، همراه با افزایش pH، بیشتر می‌شود. مقدار ماکزیمم ظرفیت جذب در pH معادل ۶/۵ گزارش شده بود. با این حال افزایش بیشتر pH محلول، باعث کاهش ظرفیت جذب شد (۱۶). در مطالعه دیگر، که توسط Mulaba-Bafubiandi, و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت، جذب سطحی کبالت و مس از محلول‌های هیدرومتالوژی توسط *Pseudomonas* spp بررسی شد. در این مطالعه، جذب سطحی این باکتری برای حذف مس و کبالت از محلول‌های سنتتیک آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی متفاوت از نظر pH، دما، زمان، غلظت و حجم فلز، بررسی شد. در این مطالعه، جذب سطحی برای مس برابر با ۴۵ درصد در pH=6 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در طی ۲۴ ساعت بود و برای کبالت برابر با ۴۰ درصد در pH=6 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در طی ۲۴ ساعت از محلول‌هایی با غلظت‌های کم (۰/۰۷مولار) بود. همچنین ماکزیمم میزان بازیافت مس و کبالت از نمونه‌های آب معدنی مشتق‌شده از فاضلاب به‌ترتیب برابر با ۷۳ درصد و ۶۵ درصد می باشد (۱۷). در پژوهش انجام‌شده روی پساب شرکت .D.M.T بهترین حذف توسط سویه-ها در pH=6 مشاهده شد که با نتایج پژوهشگران یادشده همخوانی دارد.

تقدیر و تشکر

از مدیریت شرکت تولید مواد اولیه الیاف مصنوعی اصفهان (.D.M.T)، جناب آقای مهندس محمدرضا حقایق و پرسنل محترم آن شرکت خصوصاً آقای مهندس ضیغمی و آقایان ممتاز و پارسایی و جناب آقای دکتر محمدرضا قمی عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، کمال تشکر و امتنان را داریم.

منابع مورد استفاده

۱. امور مهندسی و کنترل کیفی پروژه، گزارش توجیهی طرح تصفیه خانه مشترک فاضلاب ها و آبهای آلوده کارخانه .D.M.T، آبان ماه ۱۳۶۹، فصل های ۱ و ۲، ص ۴۶-۱.

۲. رودباری، ع.ا، کلاته جاری، م. ۱۳۸۳. فلزات سنگین و بهداشت روانی، فصلنامه اصول بهداشت روانی، ویژه‌نامه اینترنتی شماره ۱، ص ۱۰۲-۹۸.

۳. فرازمند، ع.۱۳۷۷. نقش و کاربرد میکروارگانیسم‌ها در حذف فلزات سمی از پساب‌های صنعتی. ۱۳۷۷، فصلنامه آب و فاضلاب، شماره ۲۷ ،ص ۳۳-۲۷.

۴. قربانی.ف ،.یونسی.ح. ۱۳۸۷.جذب زیستی یونهای کادمیوم از محلول‌های آبی با استفاده از بیومس ساکارومایسس سرویزیه، فصلنامه آب و فاضلاب. شماره ۶۸. ص۹۳-۳۳.

5. Ahalya, N., Ramachanndra, T. V., Kanamadi, R. D., 2003. Biosorption of heavy metals. Reasearch Journal of Chemistry and Environment 7: 71-79.
6. Bermond, W., 1998. Heavy metals in the hydrological cycle. Stepper publishing house, London.
7. Diels, L., Spaans, P. H., Van Roy, S., Hooyberghs, L., Ryngaert, A., Wouters, H., Walter, E., Winters, J., Macaskie, L., Finlay, J., Pernfuss, B., Woebking, H., Pumpel, T., Tsezos, M., 2003. Heavy metals removal by sand filters inoculated with metal sorbing and precipitating bacteria. Hydrometallurgy 71: 235–241.
8. Diels, L., De Smet, M., Hooyberghs, L., Corbisier, P., 1999. Heavy metal bioremediation of soil. Mol Biotechnology 12: 149-158.
9. Gadd, G., 1996. Mixed sulfate–reducing bacterial culture for bioprecipitation of toxic metals. Microbiology 142: 2197-2205.
10. Johncy Rani, M., Hemambika, B., Hemapriya, J., Rajesh Kannan, V., 2010. Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: A biosorption approach. African Journal of Environmental Science and Technology 4: 77-83.
11. Katblee, M., Sylviascott, S., 1996. Krauses food and nutrition and diet therapy. 9th ed. USA: Sunders; 154: 106-108.

12. Mulaba- Bafubiandi, A. F., Dlamini, N. P., Mamba, B. B., 2009. Biosorption of cobalt and copper from hydrometallurgical solutions mediated by *Pseudomonas* spp. Hydrometallurgy Conference. The Southern African Institute of Mining and Metallurgy, P: 101-110
13. Nies, D. H., Silver, S., 1999. Microbial heavy metal resistance. Appl Microbiol Biotech 6: 123-129.
14. Rajbanshi, A., 2008. Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. Our Nature 6:52-57.
15. Sabry, S. A., Ghozian, H. A., Abou-zeid, D. M., 1997. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. J. Appl. Microb 82: 245-252.
16. Vasudevan, P., Padmavathy, V., Dhingra, S. C., 2003. Kinetics of biosorption of cadmium on baker's yeast. Bioresource Technology 89: 281-287.
17. Verma, T., Srinath, T., Gadpayle, R. U., Ramteke, P. W., Hans, R. K., 2001. Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. Bioresource Tech 78: 31-35.