علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و یکم، شماره پنج ، مردادماه ۹۸

تاثیر فاکتورهای نیتروژن، فسفر وکادمیوم در جذب زیستی توسط باکتری *Halomonas elongata IBRC-M10433*

زهرا کهراریان [۱]*

Zahra.kahrarian@gmail.com

مجتبی تاران [۲]

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱ **تاریخ پذیرش:۹۵/۱۰/۲۹**

چکیده

زمینه و هدف: پساب های صنعتی به عنوان مهم ترین آلاینده های محیط زیستی محسوب می شوند که حاوی مقـادیر فـراوان از فلـزات سنگین وتراکم بالای نمک می باشند .بیو تکنولوژی حذف فلزات سنگین از پساب های صنعتی با بکارگیری توانایی میکروارگانیسم هـا بـه عنوان روشی مناسب و بهینه دراین زمینه در حال توسعه است. شناسایی باکتری های مقاوم به فلزات سمی و استفاده آن هـا در فرآینـد حذف زیستی تکنیکی پیچیده و مفید است. در این مطالعه توانایی سویه باکتری*Halomonas elongata IBRC-M10433* جداشده از رسوبات دریاچه ارومیه در حذف فلز کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعـه بهینـه سـازی شـرایط محیطـی حـذف فلـز کادمیوم توسط باکتری*Halomonas elongata IBRC- M10433* بود.

روش بررسی : طراحی آزمایش به روش تاگوچی به منظور تعیین شرایط بهینه نسبی فاکتورهای محیطی مانند کلریدآمونیوم (NH_4Cl) به عنوان منبع نیتروژن، فسفات پتاسیم (K_2HPo_4) به عنوان منبع فسفرو غلظت کادمیوم در حذف زیسـتی کـادمیوم توسـط بـاکتری *Halomonas elongata IBRC- M10433* مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزارکـامپیوتری Qualitek-4 انجام شد و اهمیت نسبی هریک از عوامل تعیین گردید.

یافته ها : شرایط بهینه جذب در غلظت فسفات پتاسیم ۰/۳ گرم بر لیتر، کادمیوم۱۰۰میلی گرم بر لیتروکلریـدآمونیوم ۲گـرم بـر لیتـردر دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH ۷ تعیین شد. سطح ۱ فسفات پتاسیم یعنی ۰/۳ گرم بر لیترموثرترین فاکتور درجذب زیستی بود.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به هزینه بالا و مشکلات محیط زیستی روش های مرسوم حذف فلزات سنگین، حذف زیستی تکنیکی موثر و مقرون به صرفه می باشد. استفاده از باکتری های نمک دوست نسبی در پالایش زیستی با قدرت بالای جذب فلزات سنگین مفید می باشد.

واژه های کلیدی : حذف زیستی، کادمیوم، تاگوچی، دریاچه شور،*Halomonas elongata IBRC-M10433*

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران *(مسوول مکاتبات).

۲- دانشیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

J. Env. Sci. Tech., Vol 21, No.5, July, 2019

The effect of nitrogen, phosphorus and cadmium on biological uptake by bacteria *Halomonas elongata IBRC-M10433*

Zahra Kahrarian[1*]
Zahra.kahrarian@gmail.com
Mojtaba Taran[2]

Admission Date: January 18, 2017 Date Received: October 22, 2016

Abstract

Background and Objective: Industrial waste is considered as the most important environmental pollutants that contain significant amounts of heavy metals are high salt density.Biotechnology removal of heavy metals from industrial wastewater Babkargyry proved the ability of microorganisms developing in this field as an appropriate and efficient.In this study, the ability of strains of bacteria isolated from sediments of Lake Urmia Halomonas longate IBRC-M10433 for the removal of cadmium was investigated. The aim of this study was to optimize the removal of cadmium by bacterial environment was Halomonas longate IBRC- M10433.

Method: Design of Experiments Taguchi method to determine the optimum conditions relative to environmental factors such as Ammonium chloride (NH_4Cl) as a source of nitrogen, and phosphate potassium (K_2HPO_4) as a source of phosphorus and cadmium concentrations in biological removal of cadmium was studied by the bacterium Halomonas longata IBRC- M10433.

Findings: The optimum conditions for absorption of potassium phosphate at a concentration of 3.0 g/L, cadmium 100 mg/L, Ammonium chloride 2 g/L, at 37 °C and pH 7, respectively. Level 1 means that 3.0 g of potassium phosphate absorption biological factors.

Discussion and Conclusion: Due to high costs and environmental problems conventional methods to remove heavy metals, biological removal technique is effective and affordable. Use halophilic bacteria in biological treatment with high power absorption of heavy metals are useful.

Keywords: Biological removal, cadmium, Taguchi, Salt Lake, *Halomonas elongata IBRC-M10433*

1- M.Sc. Razi University, Department of Biology, Faculty of Science Kermanshah, Iran. *(Corresponding Authours)
2- Associate Prof., Razi University, Department of Biology, Faculty of Science Kermanshah, Iran.

مقدمه

با توسعه صنعت شرایط زندگی بهبود یافته است اما به دلیل انتشار مقادیر زیادی از آلاینده ها به محیط زیست که از طریق هوا، آب و خاک صورت گرفته است، زندگی را تحت تاثیر قرار داده است (۱). استفاده فراوان از فلزات سنگین باعث انتشار مواد سمی به محیط زیست شده است (۲). در غلظت های پایین، فلزات اغلب به عنوان اجزای مهم در فرآیندهای زیستی عملکردهای مهم در تولید آنزیم دارند. اما در غلظت های بالاتر از حد خاص، می توانند سمی باشند(۳). خطر اصلی فلزات به علت خاصیت پایداری و عدم تجزیه در محیط زیست و تجمع پذیری آنها در بدن موجودات زنده است که وارد زنجیره غذایی شده و در کل اکوسیستم به گردش در آمده و به مواد سمی و خطرناک که خاصیت سرطان زایی دارند تبدیل خواهند شد (۴). فلزات سنگین جایگزین فلزات ضروری موجود درجایگاه های اتصال می شوند و از این طریق باعث تخریب DNA و RNA، مهار سنتز پروتئین ها، مانع فرآیندهای آنزیمی و مهار تقسیم سلولی و فرآیندهای سلولی می شوند (۵).کادمیوم ازجمله فلزات سمی می باشد که نقش زیستی اندکی در موجودات زنده داردو به دلیل پایداری ، محیط زیست را به طور گسترده ای آلوده می کند (۶).کادمیوم باعث بیماری های حاد و مزمنی مانند سرطان، ناراحتی کلیوی ،ریوی، کاهش وزن، آسیب کلیه، ناراحتی گوارشی و استخوان می شود(۷). جذب کادمیوم دارای مکانیسم مشابه ای باجذب کلسیم وآهن بوده و بنابراین جایگزین یک عنصرضروری شده وجذب می شود، ازاین رو باعث تشدیدکمبودآهن می شود(۸). روش های مرسوم حذف فلزات سنگین مانند ته نشینی شیمیایی، تعویض یونی، تصفیه شیمیایی، تکنولوژی غشایی، اسمز معکوس و تبخیر به دلیل گرانی، کارایی پایین،تولید لجن وتولید ترکیبات شیمیایی ثانویه دارای محدودیت می باشند(۹). به دلیل هزینه بالای روش های رایج حذف فلزات سنگین نیاز به توسعه روش های نوین ،کارآمدتر و اقتصادی می- باشد(۱۰).پاک سازی زیستی فرایندی است که در آن از اجزای سلولی یا فعالیت های متابولیکی میکروارگانیسم ها می توان جهت حذف مواد سمی از محیط و تبدیل آن ها به مواد غیر سمی و بی -خطر استفاده کرد(۱۱) . فرآیندجذب بیولوژیکی کم هزینه، سازگار با محیط زیست و دارای راندمان بالا در جذب است این روش کار آمد جهت رفع آلودگی از محیط آبی در حال توسعه است. باکتری‌ها به علت دارا بودن رشد سریع و ظرفیت جذب بالا و سازگاری به اکثر شرایط محیطی به عنوان یک جاذب بیولوژیکی موثر بکار گرفته می شوند(۱۲) .مکانیسم های مختلف مقاومت میکروبی به فلزات شامل تجمیع زیستی[1]، جذب زیستی[2]،فروشویی زیستی[3]،تبدیل زیستی[4]ومعدنی سازی زیستی[5] می باشند(۱۳،۱۴). این مکانیسم ها سبب تسهیل عملکرد پاک سازی زیستی توسط میکروب ها می شوند، لذا می تواند مارا به استفاده عملی ازآن ها قادر سازد (۱۵) . باکتری های نمک دوست نسبی، درمحیط کشت حاوی ۱۵-۳درصد نمک دارای رشد بهینه می باشند .این باکتری ها دارای آنزیم هایی فعال در شوری بالا هستند و به دلیل داشتن رشد سریع، نیاز غذایی کم و عدم ایجاد آلودگی در محیط زیست در فرایندهای صنعتی استفاده فراوان دارند (۱۶) . باکتری های نمک دوست نسبی دارای پتانسیل بالایی در بیوتکنولوژی و نانو بیوتکنولوژی هستندو بسیاری از آن ها ترکیبات صنعتی مفیدی نظیر آنزیم ها، پلیمرها، پیگمان و غیره را تولید می کنند(۱۷). اغلب فرایندهای صنعتی در شرایط خاص فیزیکی و شیمیایی انجام می شوند افزایش غلظت نمک می تواند برای میکروارگانیسم ها کشنده باشد. این در حالی است که مقاومت در باکتری های نمک دوست به یون های سدیم و پتاسیم بستگی دارد و برای رشد و فعالیت آنزیم ها و پمپ ها ضروری هستند (۱۸). فاکتورهای محیطی در رشد و عملکرد میکروارگانیسم ها در حذف فلزات سنگین بسیار موثراست لذا به بررسی نقش عوامل محیطی پرداخته شده. حذف فلزات به وسیله میکروارگانیسم ها

1- Bioaccumulation
2- Biosorption
3- Bioleaching
4- Biotransformation
5- Biomineralization

به فاکتورهای محیطی مانندpH ، دما، غلظت فلز، مقدار بیومس توده زیستی و همچنین زمان تعادل بستگی دارد(۱۹) . شرایط محیطی بهینه از نظر عوامل مؤثردررشد باعث می شوندکه باکتری ها حداکثر رشد و تکثیررا داشته باشندو محیط نامساعد باعث کاهش رشدآن ها میشود(۲۰). هدف از این تحقیق بررسی تاثیر فاکتورهای محیطی در حذف فلزسنگین کادمیوم از محلول آبی توسط باکتری-*Halomonas elongata IBRC-M10433* است. در این مطالعه با روش تاگوچی ارتباط بین فاکتورهای موثر بر روی فرآیند جذب زیستی به دست آمد که با استفاده از آن شرایط بهینه فاکتورها تعیین شد. بهینه سازی شرایط محیطی باعث افزایش راندمان می شود. محدوده دمایی مورد مطالعه دمای طبیعی است که در مقیاس صنعتی نیاز به هزینه های سرمایشی و گرمایشی ندارد. با کم ترین مقدار جاذب مصرفی بیش ترین مقدار ظرفیت جذب به دست آمدکه از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است.

مواد و روش ها

کشت میکروارگانیسم باکتری *Halomonas elongata IBRC-M10433* از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران خریداری شد. برای رشد باکتری از محیط کشت نمکی حاوی نمک های (مرک) زیر در حجم یک لیتر استفاده گردید.

۱- سولفات منیزیم $Mg\ So_4 + 5\ H_2o$ ۱/۵ گرم برلیتر

۲- کلریدآمونیوم، NH_4Cl ۲/۱،۲،۵/۵ گرم برلیتر

۳-فسفات پتاسیم، K_2HPo_4 ۰/۰،۶/۳ ،۰/۹گرم برلیتر

۴-سولفات آهن، $Fe\ So_4 + 5\ H_2o$ ۰/۰۰۵گرم برلیتر

۵- گلوکز Glucose ۱۰ گرم بر لیتر

۶- کلریدسدیم NaCl ۱۵۰گرم بر لیتر

۷-آب مقطر

برای رشد میکروارگانیسم از محیط کشت حاوی نمک های فوق و همچنین از کلرید آمونیوم (NH_4Cl) به عنوان منبع نیتروژن و فسفات پتاسیم (K_2HPo_4) به عنوان منبع فسفر استفاده شد. به دلیل دسترسی آسان و استفاده صنعتی این مواد انتخاب شدند.

طراحی آزمایش

طراحی آزمایش باروش تاگوچی صورت گرفت. در این روش ابتدا فاکتورهای تاثیر گذار در فرایند جذب زیستی انتخاب شدند. طراحی شامل سه فاکتورو درسه سطح مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهایی مانند غلظت اولیه فلزکادمیوم و غلظت کلرید آمونیوم و فسفات پتاسیم در جذب زیستی مورد بررسی قرار گرفت. درجدول (۱) فاکتورهای مورد مطالعه و سطوح آن ها نشان داده شده است.

جدول ۱- فاکتورها و سطوح انتخابی فاکتورها

Table 1. Selected factors and factor levels

فاکتورها	سطح ۱	سطح۲	سطح۳
کلرید آمونیوم (گرم بر لیتر)	۵/۱	۲	۵/۲
فسفات پتاسیم (گرم بر لیتر)	۳/۰	۶/۰	۹/۰
کادمیوم(میلی گرم بر لیتر)	۵۰	۱۰۰	۲۰۰

به محیط کشت مطابق طراحی تاگوچی فاکتورهای کلرید آمونیوم(NH_4Cl) با غلظت های ۱/۵، ۲، ۲/۵ گرم بر لیتر و فسفات پتاسیم(K_2HPo_4) با غلظت های۰/۳، ۰/۶، ۰/۹گرم بر لیتر اضافه شد. جدول (۲)

طراحی آزمایش به روش تاگوچی در این تحقیق شامل ۹ آزمایش است. به این منظور از ۹ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر حاوی ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت استفاده شد. pH محیط کشت خنثی ۷ در نظر گرفته شد.

جدول ۲-آزمایشات طراحی شده به روش تاگوچی

Table 2. Experimental design Taguchi

آزمایش	کلرید آمونیوم (گرم بر لیتر)	فسفات پتاسیم (گرم بر لیتر)	کادمیوم (میلی گرم برلیتر)
۱	۱/۵	۰/۳	۵۰
۲	۱/۵	۰/۶	۱۰۰
۳	۱/۵	۰/۹	۲۰۰
۴	۲	۰/۳	۱۰۰
۵	۲	۰/۶	۲۰۰
۶	۲	۰/۹	۵۰
۷	۲/۵	۰/۳	۲۰۰
۸	۲/۵	۰/۶	۵۰
۹	۲/۵	۰/۹	۱۰۰

بعد از استریل کردن محیط کشت با اتوکلاو باکتری با غلظت 10^{7}CFU/ml(معادل۰/۵ لوله مک فارلند) به محیط کشت به نسبت ۵ درصد آلودگی یعنی ۱ میلی لیتر تلقیح شدو به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دور rpm ۱۲۰در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد.آن گاه غلظت های کادمیوم(۵۰،۱۰۰،۲۰۰) میلی گرم بر لیتراکه با رقیق سازی از استوک اولیه ۵۰۰۰ میلی گرم کلرید کادمیوم تهیه شده به محیط کشت حاوی باکتری اضافه شد ودر انکوباتور بادور rpm ۱۲۰در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. بعد از مدت زمان طی شده سانتریفیوژ دردورrpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و ۱ میلی لیتر از مایع سوپرناتانت، فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ توسط دستگاه جذب اتمی Atomic Absorption Inc.Varian (Spectr AA220) به منظور بررسی میزان جذب کادمیوم، مورد سنجش قرار گرفت(۲۱) .

توانایی باکتری در حذف کادمیوم از محلول فلزی با کسر میزان کادمیوم اندازه گیری شده توسط دستگاه جذب اتمی از غلظت اولیه فلزکادمیوم طبق رابطه زیر به دست آمد.میزان جذب برحسب میلی گرم بر لیتر و به صورت درصدی محاسبه شد.

$$R=[1-(Cp/ Cf)]\times 100$$

R میزان جذب فلز توسط بیومس

Cp غلظت کادمیوم اندازه گیری شده توسط دستگاه جذب اتمی

Cf غلظت اولیه کادمیوم

تخمین ظرفیت جذب زیستی کادمیوم

ستون آخرجدول (۳) نشان دهنده حداکثر بازده جذب فلز کادمیوم ۸۰٪ می باشدکه در سطح ۱ غلظت کادمیوم یعنی ۵۰ میلی گرم بر لیتر،در سطح ۱ کلریدآمونیوم یعنی۱/۵ گرم بر لیتر و فسفات پتاسیم ۰/۳ گرم بر لیتردر pH ۷ و دمای ۳۷ درجه است وحداقل مقدار جذب ۳۵٪ می باشدکه در سطح ۳ غلظت کادمیوم یعنی ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر،در سطح ۱ کلریدآمونیوم یعنی۱/۵ گرم بر لیتر وسطح ۳ فسفات پتاسیم یعنی ۰/۹ گرم بر لیتراست.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

نتایج با استفاده از نرم افزارکامپیوتری (Qualitek-4 (V. 14.5, Nutek Inc., MI, USA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از تحلیل واریانس آنووا (ANOVA) برای آنالیز داده ها و اهمیت نسبی هریک از عوامل استفاده شد.

جدول ۳- ظرفیت جذب زیستی فلز کادمیوم

Table 3. Bioabsorption capacity of cadmium

آزمایش	کلرید آمونیوم (گرم بر لیتر)	فسفات پتاسیم (گرم بر لیتر)	کادمیوم میلی (گرم بر لیتر)	جذب(%)
۱	۱/۵	۰/۳	۵۰	۸۰
۲	۱/۵	۰/۶	۱۰۰	۷۴
۳	۱/۵	۰/۹	۲۰۰	۳۵
۴	۲	۰/۳	۱۰۰	۶۹/۵۰
۵	۲	۰/۶	۲۰۰	۷۷/۵۰
۶	۲	۰/۹	۵۰	۵۹
۷	۲/۵	۰/۳	۲۰۰	۶۳/۵۰
۸	۲/۵	۰/۶	۵۰	۶۰/۷۵
۹	۲/۵	۰/۹	۱۰۰	۶۰/۵۰

نتایج تاثیرعوامل موثر بر جذب زیستی

درجدول (۴) موثرترین سطوح فاکتورها در جذب زیستی شامل سطح ۱غلظت فسفات پتاسیم یعنی۰/۳گرم بر لیتر، سطح ۲ غلظت کادمیوم یعنی۱۰۰میلی گرم بر لیتر و سطح ۲ غلظت کلریدآمونیوم یعنی ۲ گرم بر لیترنشان داده شده است. بیش ترین تاثیر در جذب زیستی مربوط به سطح ۱غلظت فسفات پتاسیم یعنی۰/۳گرم بر لیتر است. این نتایج به کمک نرم افزارکامپیوتری Qualitek-4 آنالیزشد.

جدول۴- نتایج ومیانگین داده ها

Table 4. The results mean data

فاکتورها	سطح	تکرار۱	تکرار۲	تکرار۳	x±SD
کلریدآمونیوم (گرم بر لیتر)	۱/۵	۸۰	۷۴	۳۵	۶۴/۶±۴۱۶/۴۸۱
	۲	۶۹/۵	۷۷/۵	۵۹	
	۲/۵	۶۳/۵	۶۰/۷۵	۶۰/۵	
فسفات پتاسیم (گرم بر لیتر)	۰/۳	۸۰	۶۹/۵	۶۳/۵	۶۴/۱۹±۴۱۶/۳۷۶
	۰/۶	۷۴	۷۷/۵	۶۰/۷۵	
	۰/۹	۳۵	۵۹	۶۰/۵	
کادمیوم (میلی گرم بر لیتر)	۵۰	۸۰	۵۹	۶۰/۷۵	۶۴/۸±۴۱۶/۷۸
	۱۰۰	۷۴	۶۹/۵	۶۰/۵	
	۲۰۰	۳۵	۶۹/۵	۶۳/۵	

اختلاف سطوح فاکتورهـای موثربرجـذب در جـدول (۵) نشـان داده شده است. به طوری که درفاکتور کلریدآمونیوم با افـزایش سطوح جذب کاهش یافت یعنی افزایش سطح تاثیر معنی داری بر میزان جذب زیستی نداشـته اسـت .در فسـفات پتاسـیم بـا افزایش سطح تاثیر کاهشی برمیزان جذب زیستی داشته است. یعنی افزایش سطح تاثیر معنا داری بـر میـزان جـذب زیسـتی نداشته است.

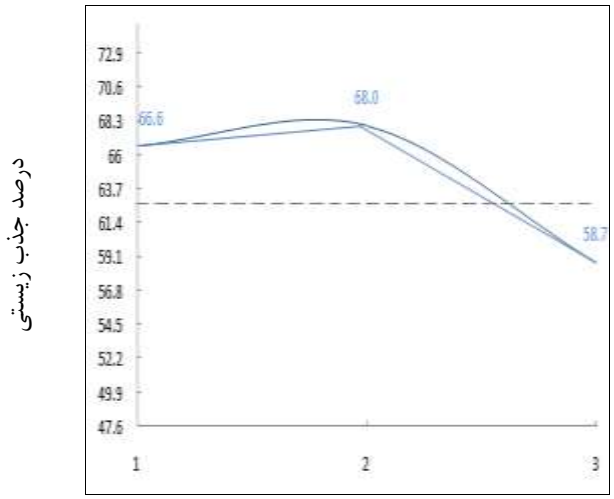
جدول۵- اختلاف سطوح فاکتورهای موثر بر میزان جذب زیستی

Table5-Different levels of biological factors affecting

فاکتورها	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۲- سطح ۱
کلریدآمونیوم (گرم بر لیتر)	۶۳	۶۶/۶۸	۵۸/۶۱	۶۶/۵
فسفات پتاسیم (گرم بر لیتر)	۷۱	۷۵/۷۰	۵/۵۱	۲۵/-۰
کادمیوم (میلی گرم بر لیتر)	۶۶/۵۸	۶۸	۶۶/۵۸	۴۱۷/۱

نتایج تاثیر غلظت کادمیوم برمیزان جذب زیستی

مطالعه میزان جذب کادمیوم در غلظت های ۵۰، ۱۰۰و۲۰۰ میلی گرم برلیتر کادمیوم نشان داد با افزایش غلظت کادمیوم ابتدادر سطوح ۱و ۲غلظت کادمیوم یعنی۵۰و۱۰۰ میلی گرم بر لیتر جذب زیستی افزایش داشت ولی با افزایش سطوح کادمیوم به ۲۰۰ میلی گرم جذب زیستی کاهش یافت . افزایش سطوح کادمیوم تاثیر معنا داری برمیزان جذب زیستی نداشته است. این نتیجه نشان دادکه باکتری قادر به رشد در محیط حاوی کادمیوم است که با افزایش سطح کادمیوم درصد جذب توسط توده سلولی کاهش یافت. این امر می تواند به علت غلظت بالای کادمیوم وتولید سمیت ناشی ازآن باشدکه مانع از رشد و فعالیت باکتری شده است. نمودار (۱).



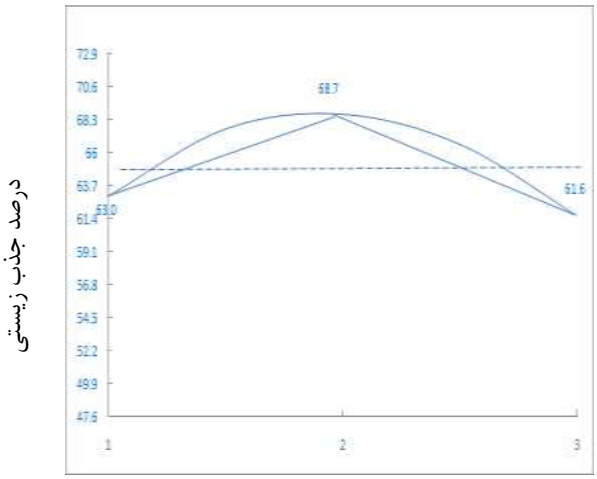
نمودار۱-میانگین غلظت کادمیوم برروی جذب زیستی

Figure 1. Average Concentration as cadmium on Biosorption

نتایج تاثیر غلظت کلریدآمونیوم برمیزان جذب زیستی

مطالعه میزان جذب کادمیوم در غلظت های ۱/۵، ۲و ۲/۵ گـرم بر لیتر کلرید آمونیوم نشان داد با افزایش غلظت کلریدآمونیوم ابتـدادر سـطح ۱و ۲ یعنـی غلظـت۱/۵و ۲ گـرم برلیتـر کلریـد آمونیوم جذب زیستی افزایش یافت که بـیش تـرین جـذب در سطح ۲ گرم بر لیترمشاهده شد. سپس با فزایش غلظت به ۲/۵ گرم بر لیتر جذب کاهش یافت. افـزایش سـطوح کلریـدآمونیوم

تاثیر معناداری بر میزان جذب زیستی نداشته است. این امر می تواند به علت کاهش رشد باکتری باشد. نمودار (۲).



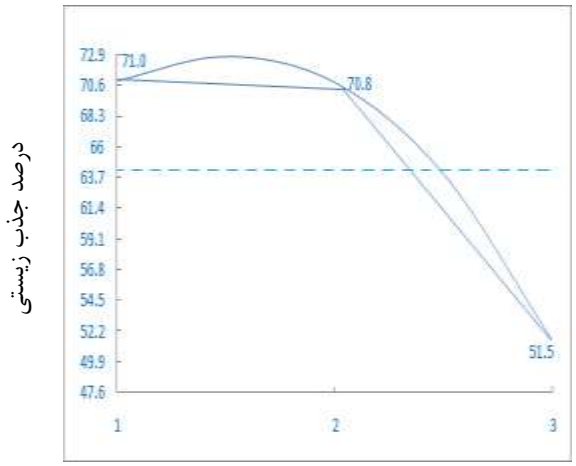
کلریدآمونیوم (گرم بر لیتر)

نمودار۲- میانگین غلظت کلریدآمونیوم برروی جذب زیستی

Figure 2. Average Concentration as Ammonium chloride (NH_4Cl) on Biosorption

تاثیر غلظت فسفات پتاسیم برمیزان جذب زیستی

مطالعه میزان جذب کادمیوم در غلظت های ۰/۳، ۰/۶و ۰/۹ گرم بر لیتر فسفات پتاسیم نشان داد با افزایش غلظت فسفات پتاسیم ابتدادرسطح ۱ فسفات پتاسیم یعنی ۰/۳ گرم بر لیتر جذب زیستی افزایش یافت که با افزایش سطح در سطح ۳یعنی ۰/۹ گرم برلیتر کاهش جذب مشاهده شد. این نتیجه می تواند به علت کاهش فعالیت و تکثیر باکتری باشد. باکتری ها در غلظت های خاصی از فسفات پتاسیم به عنوان منبع فسفر رشد و فعالیت دارند که اگردر محدوده بهینه رشد آن ها نباشد باکتری رشد نخواهد کردوفعالیت باکتری متوقف می شود. نمودار (۳).



فسفات پتاسیم(گرم بر لیتر)

نمودار۳- میانگین غلظت فسفات پتاسیم برروی جذب زیستی

Figure 3. Average Concentration as phosphate potassium (K_2HPO_4) on Biosorption

تاثیرات متقابل فاکتورهای کلریدآمونیوم، فسفات پتاسیم و کادمیوم برمیزان جذب زیستی

این تاثیرات متقابل براساس شاخص میزان بین دو فاکتورانتخابی اندازه گیری می شودکه ازتا ۱۵/۵۵تا ۲۶/۳۸ تغییر می کند. شدت تاثیرات متقابل بین فاکتورهاکه کم ترین

تاثیر رادر جذب کادمیوم داشته است مربوط به اثر متقابل کلریدآمونیوم × فسفات پتاسیم است. بیش ترین تاثیر مربوط به اثر متقابلفسفات پتاسیم ×کادمیوم است . بین فاکتورهای غلظت فسفات پتاسیم و کادمیوم اثر متقابل معنی داری وجود دارد.اثر مقایسه شدت تاثیرمتقابل بین فاکتورها نشان می دهد که تاثیر یک فاکتور در جذب زیستی وابسته به شرایط فاکتورهای دیگر است. جدول (۶).

جدول ۶- تاثیرات متقابل فاکتورهای موثربر میزان جذب زیستی

Table 6: interaction of environmental factors influencing uptak

شرایط بهینه	ستون	شدت تاثیرات متقابل(%)	ستون	تاثیر جفت فاکتورها بر اساسSI
[۱,۱]	۱	۳۸/۲۶	۲× ۳	فسفات پتاسیم× کادمیوم
[۱,۱]	۲	۳۳/۱۸	۱× ۳	کلریدآمونیوم× کادمیوم
[۱,۱]	۳	۵۵/۱۵	۱× ۲	کلریدآمونیوم× فسفات پتاسیم

تحلیل واریانس نتایج

در این بررسی از تحلیل واریانس آنووا برای تعیین سهم هرفاکتور،تاثیرسطوح هر فاکتور و تغییرات آن در جذب زیستی استفاده شد. آنالیز آماری نشان داد که فاکتور فسفات پتاسیم دارای بیش ترین درصد تاثیر می باشد برعکس فاکتورهای کلرید آمونیوم و کادمیوم با درصد صفر تاثیر معنا داری بر جذب زیستی نداشتند.جدول (۷).

جدول ۷- آنالیزواریانس نتایج

Table 7- Analysis of Results

سهم (%)	سطح	فاکتورها
۲۴۹/۴	۲	کلریدآمونیوم (گرم بر لیتر)
۵۸۳/۶	۱	فسفات پتاسیم (گرم بر لیتر)
۵۸۳/۳	۲	کادمیوم(میلی گرم بر لیتر)
جمع سهم فاکتورها		۱۴/۴۱۴
میانگین پاسخ های فعلی درآزمایش های انجام شده		۶۴/۴۱۶
نتیجه قابل انتظار در شرایط بهینه		۷۸/۸۳۱

شرایط بهینه نسبی فاکتورهای موثربرجذب زیستی

موثرترین پارامتر در جذب زیستی دراین بررسی سطح ۱ فسفریعنی۰/۳ گرم بر لیتراست و حداکثر راندمان جذب زیستی فلز کادمیوم درشرایط بهینه محیطی شامل سطح ۱فسفات پتاسیم یعنی۰/۳گرم بر لیتر، سطح ۲کادمیوم یعنی ۱۰۰ میلی گرم بر لیترو سطح ۲کلریدآمونیوم یعنی ۲ گرم بر لیتر در pH۷ ودمای ۳۷ درجه است . با توجه به نتایج می توان شرایط بهینه نسبی برای رسیدن به حداکثر میزان جذب زیستی کادمیوم نسبت به سه سطح هرعامل برآورد نمود.که با اعمال شرایط بهینه پاسخی نزدیک ۷۸/۸۳۱ به دست خواهدآمد. جدول(۸).

جدول۸-شرایط بهینه نسبی فاکتورهای موثربرجذب زیستی

Table 8. Optimal conditions relative biological factors

فاکتورها	درجه آزادی(f)	جمع مربعات	واریانس (V)	مجموع مربعات خالص(S)	درصد(%)P
کلریدآمونیوم (گرم بر لیتر)	۲	۲۹/۸۴	۴۲/۰۱۴۵	۰	۰
فسفات پتاسیم (گرم بر لیتر)	۲	۸۷۵/۷۵۰	۴۳۷/۳۷۵	۸۳۳/۲۸۱	۳۵۶/۱۹
کادمیوم(میلی گرم بر لیتر)	۲	۷۹۳/۱۵۱	۸۹۶/۷۵	۰	۰
خطا	۲	۰۴۱/۴۶۹	۵۲/۲۳۴		۶۴۴/۸۰
جمع	۸	۱۴۵۶			%۰۰/۱۰۰

بحث

باافزایش غلظت یون های فلزی اولیه،تعدادبرخورد یون های فلزی وجاذب را افزایش می دهدکه این امر باعث افزایش روندجذب می شود البته این روند تا زمانی ادامه دارد که سایت ها از فلز اشباع شوند(۲۲و۲۳). در این مطالعه با افزایش غلظت کادمیوم ابتدا جذب افزایش یافت. بیش ترین جذب در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر وکم ترین در غلظت ۲۰۰ میلی گرم برلیتر مشاهده شد. با افزایش سطح کادمیوم درصد جذب توسط توده سلولی کاهش یافت. مطالعات مشابه توسط Patel و همکاران (۲۰۰۶) انجام شده در باکتری *Halomonas seurihalina* مقاوم به کادمیوم که جذب زیستی در سطوح بالا غلظت کادمیوم کاهش داشت(۲۴). در مطالعه ای شریعت(۱۳۸۲) بررسی حذف کادمیوم از آب توسط توده باکتری انجام شد. درابتدای فرآیند سرعت جذب بالا بود که مربوط به سطح آماده جاذب در شروع فرآیند و سایت های فعال جذب بود که به سرعت کادمیم را جذب کرد.به تدریج با افزایش زمان فرآیند و افزایش تعداد یونهای کادمیم سرعت جذب کاهش یافت. که این نتایج با مطالعه حاضر هم خوانی دارد(۲۵). درفاکتور کلریدآمونیوم ابتدادر سطح ۱ یعنی غلظت ۱/۵گرم برلیترو سطح ۲ یعنی غلظت ۲ گرم برلیتر جذب زیستی افزایش داشت ولی با افزایش سطح کاهش یافت. به دلیل این که باکتری ها در غلظت- های خاصی از نیتروژن رشد می کنند که اگر در محدوده رشدشان نباشد فعالیت و تکثیرشان متوقف می- شود. اضافه کردن کلرید آمونیوم در غلظت های خاصی باعث افزایش رشد باکتری وتسهیل جذب فلز می شود. میزان تجزیه زیستی درطبیعت تحت تاثیر منبع نیتروژن و فسفر می باشد .علاوه بر غلظت منبع نیتروژن و فسفر نوع منبع نیتروژن و فسفر نیز در روند تجزیه زیستی بسیار تاثیرگذار است. Sendstatein (۱۹۷۶) عنوان کرد که افزودن نیتروژن و فسفات معدنی، باعث افزایش فرایند تجزیه زیستی می گردد ولی بر میزان کمی تجزیه زیستی تاثیری ندارد (۲۶). منابع کربن و ازت و نسبت آنها در محیط کشت از جمله عواملی محسوب می شوند که روی محیط کشت اثر می گذارند. افزودن مواد مغذی به محیط کشت سبب دریافت انرژی توسط میکروارگانیسم خواهد شد. درمقایسه با این تحقیق طبق مطالعات انجام شده املاح موجود در محیط کشت اختصاصی نمک دوست ها باعث بهبود و افزایش رشد آن ها می شود(۲۷). ماناسی و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقی بیان داشتند در باکتری *Halomonas BVR 1* حداکثر ظرفیت جذب کادمیوم ۱۲/۰۲۳ میلی گرم ودر غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر می‌باشد. این باکتری دارای ظرفیت بالای جذب کادمیوم است و جذب وابسته به pH، دما و زمان تماس می باشدو بستگی به غلظت بالای نمک دارد(۲۸). میزان حذف فلز سنگین تحت تاثیرترکیب محیط غذایی به ویژه از نظر نوع و نسبت کربن و ازت می باشدوترکیب محیط غذایی بهینه براساس نیاز هر سویه است. طبق بررسی های انجام شده در بسیاری از

فرآیندهای بیولوژیکی اغلب باکتری ها و قارچ ها در PH نزدیک به خنثی رشد می کنند.بنابراین بهترینPH محیط، همان شرایط خنثی است که معمولا برابر ۷ تا۸ می باشد(۲۹). مطالعه حاضر در شرایط PHخنثی ودمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شده است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از روش تـاگوچی جهـت بهینه سازی فاکتورهای محیطی موثر برجذب زیستی مفید بود. شرایط بهینه فاکتورهای محیطی در غلظت فسفات پتاسیم ۰/۳ گرم بر لیتر، کادمیوم ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر و کلریدآمونیوم ۲ گرم بر لیتردر دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ تعیین شـد. فسفات پتاسیم موثرترین فاکتور در جذب زیستی بود. بـاکتری *H. elongata IBRC- M10433* توانایی مناسبی درجهـت حذف زیستی کادمیوم دارد و می توان به عنوان ابـزاری جهـت مطالعات بیش تر در زمینه حذف فلزات سنگین از محلول هـای آبی و پساب های صنعتی استفاده نمود.

Reference

1. Ansari, M. I. andMalik, A., 2007. Biosorption of nickel and cadmium metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated within dustrial waste water, J. Bioresour. Technol, vol. 98, pp.3149–3153.
2. Desguin, B., Goffin, P., Viaene, E., Kleerebezem, M., Martin-Diaconescu, V., Maroney, M.J., Declercq, J. P., Soumillion, P. & Hols, P., 2014.Lactate racemase is a nickel-dependent enzyme activated by a widespread maturation system. Nat. Commun. Vol. 5, pp. 3615.
3. Gasemi, S. ,2006. Biosorption of copper from waste water by activated carbon preparealge sargssum spand gracilaria, J. corticata, vol. 11, pp.3-
4. Benavides, M.P. Gallego, S.M. Tomaro, M. L, 2005.ACADMIUM toxicity in plants Braz.J. of plant physiol, vol .171, pp.21-34.
5. Mair, R.M. Papper, L.L., Gebra, C. P,. 2000.EnviromentalMicrobiology. ACADEMICPress, chpter17,403-423.
6. Hetzer, A., Daughney, C.J. and Morgan, H.W. ,2006. Cadmium ion Biosorpation by thermophilic bacteria Geobacillus stear other mophilusand G. therm ocatenulatus. J. Appl. Environ. Microbiol, vol .72, pp.4020-4027.
7. Allun, H.K., Rond, S. R., Settalluri, V.S., Bondili, J.S. and Venkateshwar, S.V., 2007.Biosorption Aneco friendly alternative forheavymetal removal, African.J. Biotecchnol, Vol. 6, pp.2924-2931.
8. Rainbow, P. S. and White, S.L., ,1989. Comparative strategies of heavy metalaccumulation by crustaceans: zinc, copperand cadmium in adecapod. an amphipodandabarnacle. J. Hydrobiolo, Vol.174, pp.245-262.
9. Quintelas, C., Fernandes, B., Castro J., Figueiredo, H., TavaresT., 2008.Biosorption of Cr(VI) by a *Bacillus coagulans*biofilm supported on granular activated carbon. J. Chem.Engineer, Vol.136, pp.195–203.
10. Mahrasbi, M.R., Farahmsndkia Z., 2002.Heavy Metal Removal from Aqueous Solution by Adsorptionon Modified Banana Shell. J. Health and Environ.1: (In Persian).
11. Kuiper, I., Lagendij, EL., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg BJJ, 2004. Rhizoremediation: Abeneficial plant-microbe interaction. J. MolPlant-Microbe Int1.vol.7(1), pp. 6-15.

12. Quintelas, C., Fonseca, B., Silva, B., Figueiredo, H., Tavares, T.,2009. Treatment of chromium(VI) solutions in a pilot-scale bioreactor through a biofilm of Arthrobacterviscosus supported on GAC. J. Bioresour. Technolo., vol.100, pp. 220–226.
13. Dixit R, Malaviya D, Pandiyan K, Singh UB, Sahu A, Shukla R, et al., 2015. Bioremediation of heavy metals from soiland aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. Sustainability, Vol.7(2), pp.2189-1292.
14. Kelly, DJ., Budd, K., and Lefebvre, DD., 2006.The biotransformation of mercury in pH statcultures of microfungi.J. Botany, vol.84(2), pp. 60-254.
15. Suresh Kumar, K., Dahms H-U, Won E-J., Lee J-S., and Shin K-H., 2015.Microalgae promising tool for heavy metalremediation. J. Ecotoxicol. Environ. Safety, vol.113, pp.52-329.
16. Sanchez-porro, C., Martin, S., Mellado, E., and Ventosa, A., 2003. Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes, J. Appl. Microbiol., vol.94, pp.295-300
17. Margesin R. and Schinner F., 2001.Potential of halotolerant and halophilic Microorgnisms for biotechnology. J. Extremophile., vol.5, pp. 73-83.
18. Ventosa, A., Nieto, J. and Oren J. (1998). A Biology of moderately halophilic aerobic bcteria. Microbiol, J. Mol. Biol., vol. 62, pp.504-544.
19. Vijayaraghavan, K., and Yun, Y. ,2008. Bacterial biosorbents and biosorption. J. Bioethanol.Adv., vol, 26(1), pp. 266-291.
20. Pradhan, S and L.C., Rai., 2001. Biotechnological potential of *Microcystis sp.* In Cu, Zn and Cd biosorption from nsingle and multimetallic systemes. J. Biometals, vol.14, pp: 67-74.
21. Iyer A., Mody, K. and Jha, B.,2005. Biosorption of heavy metals by a moderately halophiliceubacteria, Appl. Environ. Microbiol., vol.55, pp.2385-2390.
22. Azza, A.A., Wesam, A.H. Hedayat, M.S., Ghada, A.A.F., 2009.Biosorpationof some heavy metal ions using bacterial species isolated from agriculture waste water drains in Egypt. J. Appl. Sci. Research, vol.5(4), pp.372-383.
23. Abbas, S., Ismail, I., Mostafa, T., and Sulaymon, A. (2014). Biosorption of Heavy Metals: A Review. J.Chem. Sci. Technolo., vol.4, pp.74- 102.
24. Wang, J. and Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal andtheir future, J. Biotechnol. Adv. Vol.27, pp.195-226.
25. Patel, J.S., Patel, PC., and Kalia K. (2006). Isolation and characterization of nickel uptake by nickel resistant bacterial isolate. J.Bi. Environ. Sci, vol., 19(4), pp.297-301.
26. Sendstatein, S. wanell, P.J, LeeK. R., and Mcdonagh, M., Field evaluation fmarineoil spillbioremediation, J. Microbiol. Rev. 1982, vol. 60, pp, 342-365.
27. Ventosa, A., Nieto, J. and Oren, J.,1998, ABiology of moderately *halophilic aerobic bcteriaMicrobiol*, J. Mol. Biol., vol. 62, pp.504-544.

28. Manasi, A., Rajesh, V., Krishna Kumar, A. and Rajesh, N. ,2014). Biosorption of cadmium using anovel bacterium isolated from an electronic industry effluent, J. Chem. Eng., vol.235, pp.176–185.
29. Alinajafi, S., and Rahimpour, F. TPH Bioremediation by Microbial Consortium Isolated from Oil Contami-nated Soil", 6th International Chemical Engineering Con-gress & Exhibition.2009.