مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره سوم (پیاپی ۲۰) پاییز ۱۳۹۳
صفحات ۲۵۱-۲۴۱

Original Article

جذب زیستی و تجمع زیستی کادمیم و نیکل در محلول رقابتی توسط سه جدایه باکتری از خاک آلوده به لجن فاضلاب

رحیم محمدزاده کرکرق[۱]، مصطفی چرم[۲]، حسین معتمدی[۳]، علی محبت[۴*]

[۱]دانشجوی دکتری، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه علوم خاک، [۲]دانشیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه علوم خاک، [۳]دانشیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه زیست شناسی، [۴]دانشجوی دکتری، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه پاتوبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: توده زیستی میکروبی توانایی زیادی برای پالایش فلزات سنگین در محلول های آلوده دارند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های مقاوم به کادمیوم و نیکل از خاک آلوده به فلزات سنگین و ارزیابی میزان تجمع زیستی و جذب زیستی کادمیوم و نیکل توسط این باکتری ها در محلول های رقابتی حاوی غلظت های مختلف کادمیوم و نیکل انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی، از خاک آلوده به لجن فاضلاب مزارع مجاور تصفیه خانه غرب اهواز نمونه برداری گردید. باکتری های مقاوم به کادمیم و نیکل جداسازی و با آزمون های بیوشیمیایی شناسایی گردیدند. حداقل غلظت بازدارنده کادمیم و نیکل برای این باکتری ها تعیین شد. به منظور بررسی میزان تجمع زیستی و جذب زیستی کادمیم و نیکل، پس از آماده سازی باکتری های زنده یا غیرفعال و نیز محلول های حاوی غلظت مساوی از کادمیم و نیکل، مقادیر این فلزات سنگین به وسیله دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد.

یافته ها: در این مطالعه باکتری های جداسازی شده به جنس های *باسیلوس*، *استافیلوکوکوس* و *اکتینومیست* تعلق داشتند. از این میان *اکتینومیست* بیشترین مقدار تجمع زیستی را برای هر دو فلز نشان داد. در غلظت های کمتر مقدار تجمع زیستی کادمیم و نیکل بیشتر از جذب زیستی بود. اما در سطوح آلودگی بالا مقدار جذب زیستی بیشتر بود. در هر دو روش زیست پالایی، باکتری ها توانایی بیشتری برای پالایش کادمیم نسبت به نیکل داشتند.

نتیجه‌گیری: باکتری های موجود در خاک های آلوده به فلزات سنگین مقاومت زیادی در برابر غلظت زیاد این عناصر پیدا می کنند. هر دو روش تجمع زیستی و جذب زیستی پتانسیل بالایی برای پالایش محیط های آبی دارند. با این تفاوت که تجمع زیستی در غلظت های کم و جذب زیستی در غلظت های بالای فلزات کارایی بیشتری دارند.

واژگان کلیدی: جذب زیستی، تجمع زیستی، کادمیم، نیکل، باکتری های خاک.

دریافت مقاله: خرداد ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۳

مقدمه

با پیشرفت سریع صنایع مختلف، فلزات سنگین موجود در پساب این صنایع به طور مستقیم و غیر مستقیم وارد محیط زیست می شوند. آلودگی اکوسیستم در اثر فلزات سنگین خطرات زیادی را برای سلامتی انسان و سایر موجودات ایجاد می نماید (۱). کادمیم و نیکل جزو سمی ترین فلزات سنگین می باشند که خطرات بالقوه ای را برای سلامتی انسان و سایر موجودات زنده در بر دارند. منابع اصلی کادمیم رها شده در فاضلاب شامل ساخت پلاستیک، تولید کود، باطری سازی و

*) آدرس برای مکاتبه: اهواز-دانشگاه شهید چمران اهواز،دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی.
تلفن: ۰۹۱۴۱۸۷۶۱۰۹ پست الکترونیک: a-mohabat@phdstu.scu.ac.ir

لعاب کاری بوده و منابع اصلی نیکل تولید فولاد و سایر محصولات فلزی است (۲ و ۳). بر خلاف سایر آلاینده ها، حذف فلزات سنگین از محیط بسیار مشکل می باشد. زیرا این فلزات به صورت شیمیایی یا زیستی تجزیه نمی شوند. اما می توانند به وسیله مواد آلی تشکیل کمپلکس دهند و یا اکسید و احیا شوند.

روش های فیزیکوشیمیایی متداول مانند تبادل یونی، رسوب، اسمز معکوس، تبخیر و اکسیداسیون و احیا به منظور دفع فلزات سنگین از فاضلاب گران و هزینه بر بوده و کارایی زیادی ندارند. به همین دلیل در سال های اخیر تصفیه فلزات سنگین با استفاده از روش های زیستی مورد توجه زیادی قرار گرفته است (٤). از مزایای اصلی استفاده از روش های زیستی به منظور دفع آلاینده ها از محیط می توان به بکارگیری این روش ها به صورت درجا در مکان های آلوده، بی خطر بودن برای محیط زیست، کارایی زیاد و هزینه کم آن اشاره نمود (۵).

از میان روش های زیستی، تجمع زیستی (Bioaccumaulation) و جذب زیستی (Biosorption) به وسیله میکروارگانیسم ها به دلیل کارایی زیادی که در دفع فلزات دارند جایگزین روش های دیگر شده اند. تجمع زیستی روشی است که در آن از سلول ها و میکروارگانیسم های زنده به منظور جذب فلزات سنگین استفاده می شود. این مکانیسم بر اساس جذب باکتری در درون سلول و همچنین تولید متابولیت های پیوندی انجام می گیرد. جذب زیستی روشی است که در آن از میکروارگانیسم های غیر فعال برای دفع فلزات سنگین از محیط استفاده می شود. این روش بر مبنای جذب خارج سلولی فلزات می باشد (٦). سلول های زنده و مرده میکروبی، کارایی زیادی در پالایش فلزات سنگین از محیط دارند. اکثر میکروارگانیسم ها نسبت سطح به حجم زیادی دارند. بنابراین سطح تماس زیادی را برای برهم کنش با فلزات ایجاد می کنند (۷). همچنین سطح میکروارگانیسم ها غنی از گروه های عاملی است. این گروه ها به دلیل بار منفی که دارند، مواضع اصلی برای جذب کاتیون های فلزی می باشند (۸).

در جذب زیستی و تجمع زیستی فلزات سنگین، از میکروارگانیسم های مختلف شامل انواع باکتری ها (مانند *سودوموناس* و *باسیلوس*)، قارچ ها (مانند *آسپرژیلوس* و *پنیسیلیوم*) و مخمّرها (مانند *ساکرومیسس سرویزیه*) استفاده می شود (۹).

در محیط های آلوده به فلزات سنگین، میکروارگانیسم ها نیز دچار سمیت می شوند، اما برخی از آن ها در دراز مدت به این فلزات سنگین مقاومت پیدا می کنند (۱۰). باکتری های موجود در خاک هایی که به مدت طولانی با فاضلاب صنایع آبیاری شده اند به غلظت زیاد فلزات سنگین مقاوم می شوند (۱۱).

در اکثر موارد مقاومت به فلزات سنگین به وسیله پلاسمیدها ایجاد می گردد که می توانند برای ایجاد سویه های میکروبی با فعالیت ضد سمی زیاد در برابر فلزات سنگین استفاده شوند (۱۲). مکانیسم هایی مانند جذب فلز بر روی سطح سلول، تغییر شکل سمی فلز به فرم با سمیت کمتر، کاهش نفوذپذیری غشا و تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی نیز از جمله دلایل اصلی مقاومت باکتری ها به فلزات سنگین می باشند (۱۳).

دفع کاتیون های فلزی به وسیله میکروارگانیسم ها به ویژگی های محیط اطراف مانند pH، دما، غلظت فلز، مقدار بیومس (توده زیستی) و همچنین زمان تعادل بستگی دارد (۵).

جباری نژاد (Jabbarinejad) و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشاهده کردند که باکتری *سودوموناس آئروجینوسا در محلول* حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیتر کادمیم قادر به تجمع زیستی بیش از ۹٤/۷ درصد از کادمیم موجود در محلول می باشد (١٤). مارلین (Marlin) و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه ای با جداسازی و شناسایی باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلا* (*Stenotrophomonas maltophilia*) به عنوان مقاوم ترین باکتری موجود در آب رودخانه موگ پاگ فیلیپین، مقدار تجمع زیستی کادمیم موجود در محلول را توسط این باکتری حدود ۲۲ درصد اندازه گیری نمودند. این یافته نشان دهنده توانایی بالای این باکتری در دفع کادمیم از محلول می باشد (۱۵).

در سال ۲۰۱۲ داس (Das) در مطالعه ای حداکثر ظرفیت جذب

زیستی نیکل توسط توده زیستی غیرفعال سیانوباکتر *اوسیلاتوریا لاتویرنس* (*Oscillatoria laete-virens*) را ۸٤/۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم اعلام نمود (١٦).

با وجود پژوهش های گسترده بر روی فرآیندهای جذب زیستی و تجمع زیستی، اما اکثر این تحقیقات تنها بر روی یکی از روش های یاد شده و عمدتاً در محلول غیر رقابتی متمرکز شده اند. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری های مقاوم به کادمیوم و نیکل از خاک آلوده به فلزات سنگین و ارزیابی میزان تجمع زیستی و جذب زیستی کادمیوم و نیکل توسط این باکتری ها در محلول های رقابتی حاوی غلظت های مختلف کادمیوم و نیکل بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری از خاک و شناسایی باکتری های مقاوم: در این مطالعه از عمق ۰-۳۰ سانتی متری (به دلیل تراکم بیشتر باکتری ها در این عمق) مزارع مجاور تصفیه خانه غرب اهواز که به مدت طولانی با لجن فاضلاب مخلوط شده بودند نمونه برداری خاک صورت گرفت. نمونه ها در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. در ابتدا نمونه خاک از الک ۲ میلیمتری رد شد. مقدار فلزات سنگین آن با استفاده از عصاره گیر DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) و به کمک دستگاه جذب اتمی مدل UNICAM 939 (ساخت کشور آلمان) اندازه گیری گردید. در ادامه ۱۰ گرم از نمونه خاک در ۹۰ میلی لیتر محلول نمکی استریل (۸/۵ گرم NaCl در ۱ لیتر آب مقطر) به مدت ۲ ساعت با دور ۱۵۰ g مخلوط شد. از محلول حاصل رقت 10^{-3} تهیه گردید. ۰/۱ میلی لیتر از این عصاره به پلیت های حاوی محیط کشت نوترینت آگار منتقل شد. پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت گرماگذاری شدند. سپس باکتری هایی که بیشترین فراوانی را در محیط کشت داشتند (شامل ۳ باکتری) انتخاب و خالص گردیدند (۱۷). در ادامه باکتری های انتخاب شده با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و آزمون های بیوشیمیایی افتراقی به روش مرجع باکتری شناسی برگی مورد شناسایی قرار گرفتند.

ب) تعیین حداقل غلظت بازدارنده فلزات سنگین: برای این منظور از روش الیم (Aleem) و همکاران در سال ۲۰۰۳ استفاده شد (۱۲). فلزات نیکل و کادمیوم به صورت $NiCl_2$ و $CdCl_2$ در غلظت های مختلف از ۵۰ تا ۸۵۰ ppm استفاده شدند. این غلظت های مختلف فلزات سنگین پس از استریل شدن در اتوکلاو به محیط کشت نوترینت آگار اضافه شدند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول حاوی باکتری های جداسازی شده بر روی محیط یاد شده کشت داده شدند. نمونه ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ °C گرماگذاری شدند.

حداقل غلظتی از فلز که مانع رشد باکتری ها شود به عنوان حداقل غلظت آن فلز برای آن باکتری در نظر گرفته شد. باکتری هایی که بیشترین مقاومت را به کادمیوم و نیکل نشان دادند به منظور انجام آزمون های جذب و تجمع زیستی انتخاب گردیدند.

ج) تهیه سلول های زنده و غیر زنده: هر یک از باکتری ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ °C در محیط کشت مایع TSB و در pH نهایی۷/۳ بر روی انکوباتور شیکر دار با دور ۱۵۰ g قرار گرفتند. سپس محیط های کشت حاوی باکتری به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند. پس از ۵ بار شستشو با آب مقطر به منظور استفاده های بعدی حداکثر به مدت یک هفته در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شدند. مقدار توده زیستی در سوسپانسیون های سلولی با خشک کردن بخشی از سوسپانسیون در ظرف آلومینیومی دارای وزن ثابت، در دمای ۸۰ درجه سلسیوس اندازه گیری گردید.

به منظور آماده سازی سلول های غیرزنده، باکتری ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰° C اتوکلاو شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند. عمل شستشو ۵ بار با محلول NaCl ۰/۱ مولار انجام شد. پس از هر بار شستشو سانتریفیوژ مجدداً انجام گرفت. سپس سلول های رسوب یافته در دمای ۸۰ درجه سلسیوس خشک و با استفاده از هاون کوبیده شدند (۱۷).

د) تهیه محلول های فلزی: محلول پایه برای کادمیوم و نیکل با استفاده از نمک های کلرید آن ها یعنی $CdCl_2$ و $NiCl_2$ به

صورت ppm ۱۰۰۰ تهیه شد. برای این منظور مقدار مشخصی از نمک های یاد شده در آب مقطر دیونیزه حل شدند. سپس حجم مساوی از محلول های ppm ۵۰ کادمیوم با ppm ۵۰ نیکل، ppm ۱۰۰ کادمیوم با ppm ۱۰۰ نیکل، ppm ۲۰۰ کادمیوم با ppm ۲۰۰ نیکل و در نهایت ppm ٤۰۰ کادمیوم با ppm ٤۰۰ نیکل تهیه شدند. به منظور تعیین غلظت دقیق محلول های نمکی از دستگاه جذب اتمی استفاده شد.

ه) ارزیابی جذب زیستی و تجمع زیستی: برای این منظور از روش توصیف شده به وسیله هوانگ (Huang) و همکاران در سال ۲۰۰۵ استفاده شد (۷).

ابتدا ۰/۰۱ گرم از باکتری های زنده در لوله های ۱۰ میلی لیتری استریل ریخته شدند. ۱۰ میلی لیتر از محلول های حاوی غلظت و حجم مساوی از محلول های کادمیوم و نیکل (به عنوان نمونه ۵ میلی لیتر محلول ppm ۵۰ کادمیوم +۵ میلی لیتر محلول ppm ۵۰ نیکل) به آن ها اضافه گردید. سپس در دمای ثابت ۳۰ °C به مدت ۲ ساعت (زمان تعادل) مخلوط شدند. در ادامه این لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۷۵۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. محلول بالایی از باکتری های رسوب یافته جدا شد. سپس مقدار کادمیوم و نیکل در محلول به وسیله دستگاه جذب اتمی قرائت گردید. فرآیندهای بالا برای باکتری های غیرفعال نیز انجام شد. این آزمایشات با سه تکرار انجام گرفت و مقادیر میانگین آن ها در آنالیزهای آماری استفاده شدند.

مقدار کادمیوم و نیکل جذب شده در حالت تعادل به کمک معادله $Q = (C_o - C_v/m)V$ محاسبه گردید (۱۸). در این معادله Q میلی گرم عنصر جذب شده بر گرم باکتری، C_o و C_v به ترتیب غلظت اولیه و ثانویه فلز، m وزن باکتری بر حسب گرم و V حجم مخلوط واکنش می باشد. دما (۳۰ °C)، pH (۷) و مقدار توده زیستی (۱ گرم) در طول این آزمایش ثابت نگه داشته شدند.

و) آنالیز آماری: این پژوهش در غالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. به منظور مقایسه مقادیر جذب زیستی و تجمع زیستی و همچنین مقایسه باکتری ها و تاثیر غلظت های مختلف کادمیوم و نیکل بر روی تجمع و جذب زیستی و مقایسه کادمیوم و نیکل از نسخه شانزدهم نرم افزار *SPSS* استفاده گردید.

جدول ۱: حداقل غلظت بازدارنده کادمیوم و نیکل برای باکتری های مقاوم.

حداقل غلظت بازدارنده عنصر (ppm)	*اکتینومیست*	*استافیلوکوکوس*	*باسیلوس*
کادمیوم	٤۰۰	٤۰۰	۳۵۰
نیکل	۵۰۰	۳۵۰	٤۵۰

جدول ۲: درصد تجمع زیستی و جذب زیستی کادمیوم و نیکل در چهار سطح آلودگی توسط باکتری ها.

سطح آلودگی	فلز	تجمع زیستی (ppm)				جذب زیستی (ppm)			
		۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
باسیلوس	کادمیوم	۸/۸۸	۸/۹٦	۷/٦۸	۵/۲۲	۸/۵۸	۷/۰۹	۸/۵٤	٦/۸
	نیکل	۱۰/۱٤	۹/۸۳	۸/۱٤	۵/۰۲	۹/٤۲	۸/۲۵	۹/٤۳	۷/۳
اکتینومیست	کادمیوم	۹/۱۸	۹/۱۱	۷/۹۵	۵/۰۹	۸/۷	۷/۱۲	۸/۷۹	٦/۵۳
	نیکل	۱۱/۵٦	۱۰/۳۱	۸/٦۹	۵/۳۵	۹/۵۸	۸/۱۷	۹/٤٦	۷/۳۳
استافیلوکوکوس	کادمیوم	۹/۰٦	۸/٦۷	٦/۱٤	٤/٦۸	۸/٦٦	۷/۲۲	۸/٦٦	٦/۷۷
	نیکل	۱۰/۲٤	۹/۳٤	۷/۳۹	٤/۹۸	۹/۵۸	۸/۱۷	۹/٤٦	۷/۳۳

جدول ۳: جدول تجزیه واریانس تجمع زیستی فلزات سنگین توسط باکتری ها.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F ارزش
تکرار	۲	۰/۰۹۷	۰/۰٤۹	**۸۲/۷۲۰
باکتری	۲	۰/۱۸۵	۰/۰۹۲	**۱٥٦/۷۹۸
سطح آلودگی	۳	٦۲۰۲/۳٦۳	۲۰٦۷/٤٥٤	**۳/٥۱٤
عنصر	۱	۳۲/۹٥٤	۳۲/۹٥٤	**٥/٦۰۱
باکتری*سطح آلودگی	٦	۱/٦٥۸	۰/۲۷٦	**٤٦۹/٥٦٥
باکتری*عنصر	۲	۰/۱٥۱	۰/۰۷٦	**۱۲۸/٤۷۰
سطح آلودگی*عنصر	۳	۹/۱٦۸	۳/۰٤۹	**٥/۱۸۳
باکتری*سطح آلودگی*عنصر	٦	۱/۸۷٤	۰/۳۱۲	**٥۳۰/۸٤۸
خطای آزمایشی		۰/۰۲۷	۰/۰۰۱	

** معنی داری در سطح ۱٪ n.s. غیر معنی دار

یافته ها

آنالیزهای طیف سنجی جذب اتمی فلزات سنگین در خاک مخلوط شده با لجن فاضلاب نشان دهنده غلظت نسبتاً زیاد این عناصر در خاک بود. روی و آهن به ترتیب با غلظت ۲۹/٤ و ۲٤/٤۷٥ میلی گرم بر کیلوگرم بیشترین فراوانی را داشتند. غلظت کادمیوم و نیکل نیز به ترتیب برابر ۰/۰۸۷ و ۰/۸۸ میلی گرم بر کیلوگرم بود.

بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، آزمون های بیوشیمیایی و با استفاده از دستورالعمل طبقه بندی برگی باکتری های جداسازی شده در این مطالعه به جنس های *باسیلوس*، *استافیلوکوکوس* و *اکتینومیست* تعلق داشتند. جدول ۱ مقدار حداقل غلظت بازدارنده کادمیوم و نیکل را نشان می دهد. نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارنده در هر سه جنس یاد شده برای نیکل بیشتر از کادمیوم می باشد. نتایج تجزیه واریانس تجمع زیستی و جذب زیستی توسط باکتری ها در سطوح مختلف کادمیوم و نیکل و همچنین اثرات متقابل بین تیمارهای مختلف در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. بررسی تجمع زیستی کادمیوم و نیکل توسط این باکتری ها نشان می دهد که *اکتینومیست* نسبت به دو باکتری دیگر توانایی بیشتری برای تجمع کادمیوم و نیکل دارند. توالی تجمع زیستی کادمیوم و نیکل توسط باکتری ها به این صورت بود:

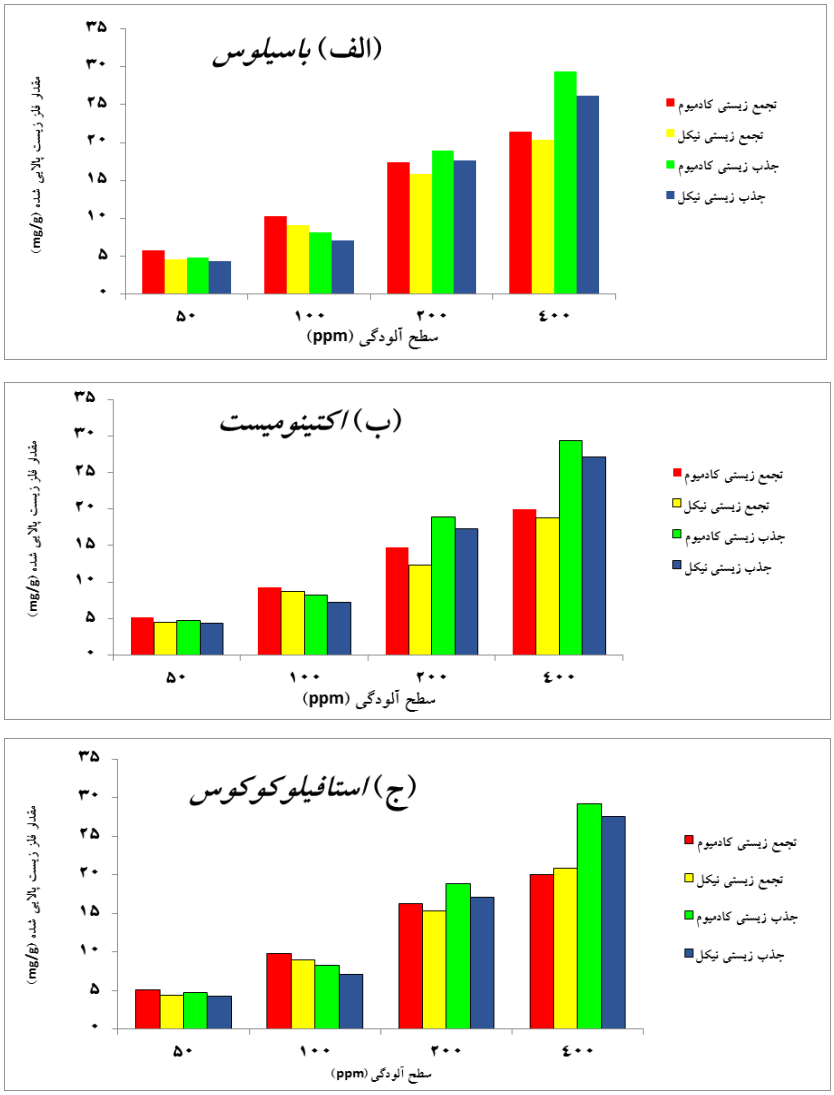
اکتینومیست > *استافیلوکوکوس* > *باسیلوس*

اختلاف مقدار تجمع زیستی این فلزات در سه باکتری نسبت به یکدیگر در سطح ۱ درصد معنی دار بود. همچنین در تمامی تیمارهای باکتریایی با افزایش غلظت فلزات سنگین مقدار تجمع زیستی نیز افزایش یافت. کمترین و بیشترین مقدار تجمع زیستی

جدول ٤: جدول تجزیه واریانس جذب زیستی فلزات سنگین توسط باکتری ها

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F ارزش
تکرار	۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	ns۰/۹٤
باکتری	۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	ns۱/۳۰۷
سطح آلودگی	۳	٦۲٥۳/۹۳۰	۲۰۸٤/٦٤۳	**۲/٥٥۱
عنصر	۱	۳۱/٤٦٥	۳۱/٥٤٦	**۳/۸٤۹
باکتری*سطح آلودگی	٦	۰/۰۱۰	۰/۰۰۲	ns۲/۰٦٦
باکتری*عنصر	۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	ns۰/۲۳٦
سطح آلودگی*عنصر	۳	۸/۲۱٤	۲/۷۳۸	**۳/۳٥
باکتری*سطح آلودگی*عنصر	٦	۰/۰۱٦	۰/۰۰۳	**۳/۲۱۱
خطای آزمایشی		۰/۰۳۸	۰/۰۰۱	

** معنی داری در سطح ۱٪ n.s. غیر معنی دار



نمودار ۱: مقدار تجمع زیستی و جذب زیستی کادمیوم و نیکل توسط (الف) *باسیلوس*، (ب) *اکتینومیست* و (ج) *استافیلوکوکوس*.

هر دو عنصر در هر سه باکتری به ترتیب در سطوح آلودگی ۵۰ و ۴۰۰ ppm مشاهده گردید (نمودار ۱). بیشترین درصد تجمع کادمیوم و نیکل در هر سه باکتری در سطح آلودگی ۵۰ ppm صورت گرفت (جدول ۲). به طوری که با افزایش غلظت عناصر، با وجود افزایش مقدار تجمع زیستی، درصد تجمع زیستی با کاهش همراه بود.

بحث

در این مطالعه جذب رقابتی دو فلز کادمیم و نیکل توسط توده زیستی زنده و غیر فعال شده سه باکتری جدا شده از خاک مخلوط شده با لجن فاضلاب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی باکتری های جدا شده از خاک های آلوده به لجن فاضلاب گرم مثبت بودند. این یافته نشان می دهد که باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی مقاومت بیشتری نسبت به فلزات سنگین دارند. گوردون (Gourdons) و همکاران در سال ۱۹۹۰ در مطالعه ای با مقایسه جذب زیستی کادمیوم به وسیله باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده نمودند که مقدار جذب کادمیوم در باکتری های گرم مثبت تقریباً ۲۰ برابر بیشتر از باکتری های گرم منفی است. به همین دلیل آنها گزارش کردند که مقاومت باکتری های گرم

مثبت در مقابل این کاتیون ها بیشتر از باکتری های گرم منفی می باشد (۱۹). تمایل زیاد باکتری های گرم مثبت برای جذب کاتیون های فلزی به دلیل غلظت زیاد پپتیدوگلیکان و تیکوئیک اسید در دیواره سلولی آن ها است. تقریباً ۹۰ درصد دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت از پپتیدوگلیکان ساخته شده است. در حالی که این مقدار در باکتری های گرم منفی حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد می باشد (۲۰). پپتیدوگلیکان محتوی گروه های عاملی فعالی مانند کربوکسیل و آمین ها است. این ترکیبات به دلیل بار منفی خود، نقش مهمی در جذب فلزات سنگین دارند.

تقریباً ۷۵ درصد فلزات، جذب دیواره سلولی و حدود ۲۵ درصد آن ها از طریق سایر روش ها مانند تجمع در سیتوپلاسم جذب می شوند (۵). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان می دهد که مقدار حداقل غلظت بازدارنده در هر سه باکتری برای نیکل بیشتر از کادمیوم می باشد. بنابراین می توان چنین گفت که کادمیوم خاصیت بازدارندگی و سمیت بیشتری در مقایسه با نیکل دارد. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه انصاری (Ansari) و مالیک (Malik) در سال ۲۰۰۷ هم خوانی دارد (۱۷).

در این پژوهش با مقایسه دو روش جذب زیستی و تجمع زیستی می توان مشاهده کرد که پالایش فلزات سنگین در سطوح آلودگی اول یعنی سطح آلودگی ppm ۵۰ و ppm ۱۰۰ توسط باکتری های زنده و فعال تا حدی بیشتر از باکتری های غیرفعال است. اما با افزایش غلظت کادمیوم و نیکل در محیط، مقدار پالایش فلزات توسط باکتری های مرده و غیرفعال با افزایش همراه بوده است. همان گونه که در نمودار ۱ مشاهده می شود با افزایش سطح آلودگی، کارایی روش جذب زیستی افزایش می یابد. به طوری که در سطوح آلودگی ۲۰۰ و ppm ٤٠٠ مقدار جذب زیستی بیشتر از مقدار تجمع زیستی می شود. در واقع افزایش سطح آلودگی موجب کاهش فعالیت میکروارگانیسم ها می شود. به همین دلیل با افزایش غلظت کادمیوم و نیکل میزان فعالیت باکتری ها در محیط محلول کاهش می یابد. بنابراین مقدار پالایش این عناصر نیز کاهش می یابد (۲۱). از آنجایی که در روش جذب زیستی میکروارگانیسم ها قبلاً غیر فعال شده اند، بنابراین افزایش غلظت عناصر سنگین نه تنها بر روی آنها تاثیری ندارد بلکه موجب افزایش برهم کنش های الکترواستاتیک بین عناصر و سطح سلول ها نیز می گردد. در حقیقت سطوح آلودگی ۲۰۰ و ppm ٤٠٠ به دلیل سمیت بسیار زیاد باعث کاهش فعالیت و تکثیر باکتری ها می شوند. به عبارت دیگر غلظت عناصر تاثیر معنی داری بر روی تجمع زیستی فلزات سنگین دارد.

کورک (Kurek) و همکاران در آزمایشی مقدار جذب زیستی و تجمع زیستی کادمیوم در محیط محلول توسط میکروارگانیسم های مقاوم جدا شده از خاک، به صورت فعال و غیر فعال، را با مقدار جذب کادمیوم توسط اجزای غیر زنده خاک شامل رس و شن مقایسه کردند. نتایج آنها نشان داد که بیشترین مقدار جذب کادمیوم توسط میکروارگانیسم های مرده صورت می گیرد. پس از میکروارگانیسم های مرده به ترتیب میکروارگانیسم های زنده، مونت موریلونیت و شن در رده های بعدی قرار داشتند.

در مطالعه آن ها تفاوت معنی داری بین انواع مختلف میکروارگانیسم ها شامل باکتری ها و قارچ ها مشاهده نگردید (۲۲). در پژوهش حاضر نیز با افزایش غلظت عناصر کادمیم و نیکل، با وجود افزایش مقدار تجمع زیستی، درصد تجمع زیستی کاهش یافته است. این کاهش درصد تجمع به کاهش فعالیت میکروارگانیسم ها در شرایط با آلودگی بیشتر نسبت داده می شود. افزایش غلظت فلزات سنگین در محیط زیست موجب کاهش جمعیت میکروبی، تغییرات مورفولوژیکی و ممانعت از فرآیندهای بیوشیمیایی میکروارگانیسم ها می گردد (۲۱).

اوزدمیر (Ozdemir) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز در مطالعه خود مشاهده کردند که با افزایش سطح آلودگی عناصر سنگین، با وجود افزایش مقدار زیست پالایی توسط سلول های باکتریایی، درصد پالایش زیستی کاهش می یابد (۸).

از طرف دیگر بررسی جذب زیستی کادمیوم و نیکل توسط باکتری های مورد مطالعه در این پژوهش نشان می دهد که بر خلاف تجمع زیستی که در آن مقدار زیست پالایی توسط

اکتینومیست بیشتر از *استافیلوکوکوس* و *باسیلوس* بود، اما تفاوت معنی داری در مقدار جذب زیستی باکتری ها وجود ندارد. این پدیده را در اینجا می توان به گرم مثبت بودن هر سه باکتری نسبت داد (۱۹).

در حقیقت فرآیند جذب زیستی فرآیندی مستقل از متابولیسم است و تنها مکانیسمی که در آن دخالت دارد جذب فلزات بر روی دیواره سلولی باکتری است؛ بنابراین مقدار و نوع گروه های عاملی موجود در سطح باکتری ها مقدار جذب زیستی را تعیین می نماید. به دلیل گرم مثبت بودن باکتری های مورد مطالعه در این پژوهش و داشتن ساختار دیواره سلولی مشابه، میزان جذب فلزات آنها تفاوت معنی داری نداشت.

ولاسکوز (Velásquez) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز در مطالعه ای با مقایسه میزان جذب زیستی و تجمع زیستی فلزات سنگین در سلول های مرده و زنده *باسیلوس اسفاریکوس* مشاهده کردند که باکتری های زنده حدود ۲۵ درصد و باکتری های غیر زنده ٤٤ درصد فلزات سنگین از جمله نیکل را جذب کردند. آنها جذب بیشتر فلزات سنگین توسط باکتری های غیرفعال را به نداشتن متابولیسم فعال و سازگاری با pH نسبت دادند (٦).

علاوه بر این با مقایسه مقدار زیست پالایی دو عنصر مورد مطالعه مشاهده شد که در هر دو روش جذب و تجمع زیستی، کارایی باکتری های مورد مطالعه در دفع کادمیم بیشتر از نیکل بود. پورانیک (Puranik) و پاکنیکار (Paknikar) نیز مشاهده کردند زمانی که توده زیستی *سیتروباکتر* در معرض محلول رقابتی حاوی فلزات مختلف قرار می گیرد، جذب فلزات به ترتیب زیر انجام می شود:

Co < Ni < Cd < Cu < Zn <Pb (۲۳). مقدار بیشتر جذب کادمیوم به وسیله پراشار (Prashar) و همکاران در سال ۲۰۰٤ نیز گزارش گردید. آنها دلیل این امر را به شعاع یونی کوچک تر نیکل (A ۰/٦۹) در مقایسه با کادمیوم (A ۰/۹٦) نسبت دادند. مولکول هایی که شعاع یونی کوچکتری دارند بیشتر از مولکول های دارای شعاع یونی بزرگتر جذب می گردند (۲٤).

نتیجه گیری

یافته های به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که باکتری های جدا شده از خاک مخلوط شده با لجن فاضلاب، مقاومت زیادی نسبت به غلظت های بالای کادمیم و نیکل در محیط دارند. در غلظت های کم آلاینده، روش تجمع زیستی یا توده زیستی زنده کارایی بیشتری نسبت به روش جذب زیستی یا توده زیستی غیر زنده دارد. اما با افزایش غلظت آلاینده در محیط کارایی روش تجمع زیستی نسبت به جذب زیستی کاهش می یابد. همچنین نتایج نشان دادند که باکتری های انتخاب شده قابلیت انتخاب یا ترجیح پذیری بیشتری برای دفع کادمیوم از محلول دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Ahmad S, Ahmad F. Heavy metal biosorption potential of *Aspergillusand rhizopus* sp. isolated from waste water treated soil. Appl Sci Environ. 2005; 9(1): 123-126.
2. Kefala M, Zouboulis A, Matis K. Biosorption of cadmium ions by *Actinomycetes* and separation by flotation. Environ Poll. 1999; 104(2): 283-293.
3. Sarı M, Tuzen R. Kinetic and equilibrium studies of biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution by macrofungus (*Amanita rubescens*) biomass. Hazardous Materials. 2009; 164(1): 1004-1011.

4. Amini M, Younesi H, Bahramifar N. Biosorption of nickel (II) from aqueous solution by *Aspergillus niger*: Response surface methodology and isotherm study. Chemosphere. 2009; 75(4): 1483-1491.

5. Vijayaraghavan K, Yun Y. Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnol Adv. 2008; 26 (1): 266-291.

6. Velásquez L, Dussan J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. Hazardous Materials. 2009; 167(3): 713-716.

7. Huang Q, Chen W, Xu L. Adsorption of copper and cadmium by Cu- and Cd-resistant bacteria and their composites with soil colloids and kaolinite. Geomicrobiol. 2005; 22(2): 227-236.

8. Ozdemir S, Kilinc E, Poli A, Nicolaus B, Guve K. Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillustoebiisub decanicus* sp. and *Geobacillus thermoleovoranssub* sp. stromboliensis: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. Chem Eng. 2009; 14(6): 1-47.

9. Hawari A, Mulligan C. Biosorption of lead (II), cadmium (II), copper (II) and nickel (II) by anaerobic granular biomass. Bioresource Technol. 2006; 97(5): 692-700.

10. Deeb B, Altalhi A. Degradative plasmid and heavy metal resistance plasmid naturally coexist in phenol and cyanide assimilating bacteria. Am J Biochem Biotech. 2009; 5(1): 84-93.

11. Trevors J, Oddie K, Belliveau B. Metal resistance in bacteria. FEMS Microbiol. 1985; 32(2): 39-54.

12. Aleem J, Isar A, Malik A. Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil. Bioresource Technol. 2003; 86 (1): 7-13.

13. Zafar S, Aqi F, Ahmad I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. Bioresource Technol. 2007; 98: 2557-2561.

14. Jabbari Nezhad Kermani A, Faezi M, Khosravan A, Farahmand A, Shakibaei M. Cadmium bioremediation by metal-resistant mutated bacteria isolated from active sludge of industrial effluent. Iran J Environ Health Sci Eng. 2010; 7(4): 279-286.

15. Marlin M, Tacata S, Ray G, Trinidad C. Biosorption of copper, cadmium and lead by copper resistant bacteria isolated from Mogpog river, Marinduque. Philipine J Sci. 2007; 136(2): 155-165.

16. Das, S. Biosorption of chromium and nickel by dried biomass of *Cyanobacterium oscillatoria laete-virens*. Int J Environ Sci. 2012; 3(1): 341-352.

17. Ansari M, Malik A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. Bioresource Technol. 2007; 98(3): 3149-3153.

18. Chatterjee S, Bhattacharjee I, Chandra G. Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. J Hazard Mater. 2010; 175: 117-125.

19. Gourdons R, Bhende S, Rus E, Sofer S. Comparision of Cd biosorption by bacteria from activated sludge. Biotechnol Lett. 1990; 22(1): 839-842.

20. Violante A, Huang P, Gadd G. Biophysico-chemical processes of heavy metals and metalloids in soil environments. Jhon Willey Publication. 2007.

21. Akmal M, Wang H, Wu J, Xu J, Xu D. Changes in enzymes activity, substrate utilization pattern and diversity of soilmicrobial communities under cadmium pollution. Environ Sci. 2005; 17: 802-807.

22. Kurek E, Czaban J, Bollag J. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other Soil constituentst. Appl and Environ Microbiol. 1982; 43(1): 1011-1015.

23. Puranik P, Paknikar K. Biosorption of lead, cadmium and Zinc by *Citrobacterstrain* MCM B-181: characterization studies. Biotechnol.1999; 15(9): 228-237.

24. Prashar S, Beaugeard M, Hawari J, Bera P, Patel R, Kim S. Biosorption of heavy metals by red algae (*Palmariapalmata*). Environ Technol. 2004; 25(5): 1097-1106.

25. Jankowska K, Olańczuk-Neyman K, Kulbat E. The sensitivity of bacteria to heavy metals in the presence of mineral shipmotor oil in coastal marine sediments and waters. Environ Study. 2006; 15(3): 935-941.

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 3, October 2014

Original Article

Biosorption and bioaccumulation of Cd and Ni in competitive solution by three bacteria isolated from polluted soils to sewage sludge

Rahim Mohammadzadeh Karkaragh[1], Mostafa Chorom[2], Hossein Motamedi[3], Ali Mohabat[4]

[1]PhD Student, Department of Soil Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Soil Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
[4]PhD Student, Department of Pathobiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Microbial biomass show high capacity for the remediation of heavy metals in contaminated solutions. This study aimed to isolate and identify the Cd and Ni resistant bacteria from the soils polluted to heavy metals and to evaluate the biosorption & bioaccumulation of these metals in competitive solution.

Materials & Methods: In this descriptive study, samples were taken from the soils polluted to waste water of farms nearby the water refinery in west of Ahvaz. The Ca and Ni resistant bacteria were isolated and their identity were clarified using biochemical tests. Next, minimum inhibitory concentration (MIC) of Cd and Ni determined for these bacteria. Following preparation of alive and deactivated bacteria and solutions containing equal amounts of N and Ca, the levels of Ni and Ca were determined using atomic adsorption system to evaluate the levels of biosorption and bioaccumulation.

Results: The microorganisms isolated in this study belonged to *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. and *Actinomycete* sp. Among them, *Actinomycete s*p. showed the highest absorption activity for these elements. The bioaccumulation was higher than biosorption at low concentrations of the metals but the biosorption was dominant at high pollution levels. In both systems, the bacteria showed higher ability for remediation of Cd in comparison to Ni.

Conclusion: The bacteria in the soils polluted to heavy metals showed intensive resistance activity to high concentrations of the elements. Both bioaccumulation and biosorption methods were suitable enough to remediate these metals in aquatic environments. However, the bioaccumulation was more powerful than the second method at low concentrations of the metals whereas biosorption showed more ability at high concentrations of the metals.

Keywords: Biosorption, Bioaccumulation, Cadmium, Nickel, Soil bacteria.

Correspondence to: Ali Mohabat

Tel: +989141876109

E-mail: a-mohabat@phdstu.scu.ac.ir

Journal of Microbial World 2014, 7(3): 241-251.