فصلنامه علوم‌محیطی، دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳

۵۹-٦٦

مطالعه کارایی باکتری *P. aeruginosa* در حذف فلز روی از محلول‌های آبی

راضیه لموچی[۱]*، علیرضا صفاهیه[۲]، نگین سلامات[۲] و هاجر آبیار[۱]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد آلودگی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

[۲] استادیار گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۵

چکیده

تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینه روش‌های پاک‌سازی محیط از فلزات‌سنگین صورت پذیرفته است که در این بین، استفاده از جاذب‌های زیستی در مقایسه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی گزینه مناسب‌تری محسوب می‌شود. در این مطالعه با استفاده از گرب ون وین از رسوبات سطحی (عمق کم‌تر از ۳ متر) بندر امام خمینی(ره) نمونه‌برداری و باکتری *P. aeruginosa* به‌عنوان گونه مقاوم به فلز روی جداسازی و شناسایی گردید. مطالعه رشد باکتری *P. aeruginosa* در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی نشان داد که با افزایش غلظت روی در محیط رشد باکتری کاهش می‌یابد. به‌گونه‌ای که حداکثر رشد باکتری در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر این فلز ۰/۹۳ اندازه‌گیری شد و با افزایش غلظت فلز در محیط به ۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، رشد باکتری به ۰/۳۷ کاهش یافت که اختلاف معنی‌داری با حداکثر رشد باکتری در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی را نشان می‌داد ($p<0/05$). بررسی توانایی جذب زیستی فلز روی توسط باکتری *P. aeruginosa* در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی نشان داد که با افزایش غلظت فلز در محیط، باکتری میزان فلز بیش‌تری را جذب خواهد کرد. *P. aeruginosa* قادر به حذف ۸۶درصدی فلز روی در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر این فلز می‌باشد.

کلمات‌کلیدی: فلزات‌سنگین، سرب، جذب زیستی، *Pseudomonas aeroginosa* ، خلیج فارس

Study of P.aeroginosa Capable of Removing Zn(II) from Aqueous Solution

Razieh Lamoochi,[1*] Alireza Safahieh,[2] Negin Salamat[2] & Hajar Abyar[1]

[1]MSc. in Marine Pollution, Faculty of Marine Science, Khorramshahr university of Marine Science and Technology.

[2]Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science., Khorramshahr University of Marine Science and Technology.

Abstract

A great number of studies have been conducted for removal of heavy metals from aqueous solution by using biological absorbents which are considered to be the most appropriate than the physical and chemical methods. For this aim, first, the sediment samples of Imam Khomeini port (depths less than 3 m) were collected by Van Veen Grab. Then the *P. aeroginosa* bacterium was isolated and identified as the resistor to zinc. The study of the growth of *P. aeroginosa* bacterium in the aqueous solution containing 20, 40, 80, 160, and 320 mg/L of zinc showed that the increase in zinc concentration caused the decrease in the bacterium growth. The maximum bacterium growth of 0.93 was obtained at 20 mg/L of zinc. With the increase in concentration of zinc to 320 mg/L, the bacterium growth decreased to 0.37 which showed the significant difference with the maximum bacterium growth in 20 mg/L concentration of zinc metal ($p<0.05$). Investigating the biosorption of zinc by *P. aeroginosa* bacterium in 25, 50, and 100 mg/L concentration showed that the bacterium absorbed more amounts of metal by incraseing the concentration of zinc in the environment. The *P. aeroginosa* is able to eliminate 86% of zinc in 25 mg/L concentration of zinc.

Keywords: Heavy metals, Zinc, Biosorption, *Pseudomonas aeroginosa,* Persian Gulf.

* Corresponding author. *E-mail Address*: Raziehlamoochi@yahoo.com

۱- مقدمه

فلزات‌سنگین عمدتا در اثر تخلیه پساب کارخانجات صنعتی نظیر صنایع آب‌کاری، نساجی، باطری‌سازی و استخراج معادن و فعالیت‌های کشاورزی به محیط‌زیست وارد شده و در صورت عدم تصفیه مناسب خطری برای سلامتی انسان و سایر موجودات محسوب می‌شوند. فلزات‌سنگین به‌واسطه پایداری و تجزیه‌ناپذیری از اهمیت خاصی برخوردارند و افزایش غلظت آن‌ها در محیط به بالاتر از استانداردهای زیست‌محیطی باعث بروز اثرات نامطلوبی بر آبزیان و انسان می‌گردد[۱]. در این میان برخی از یون‌های فلزی نظیر مس، روی و آهن بر خلاف فلزات غیر ضروری مانند جیوه، کادمیوم و سرب جز عناصر ضروری بوده که در مقادیر اندک در بسیاری از فرآیندهای زیستی نظیر تنفس و رشد نقش موثری ایفا می‌کنند و افزایش غلظت آن‌ها به بالاتر از حد مطلوب اثرات مخربی را بر جا می‌گذارد[۲].

بنابراین استفاده از روش‌هایی که به‌توان با بهره‌گیری از آن‌ها غلظت فلزات‌سنگین را در محیط کاهش داد و به میزان استانداردهای زیست‌محیطی رساند لازم و ضروری است. از جمله این روش‌ها استفاده از میکروارگانیسم‌ها و فرآیند جذب زیستی است. جذب زیستی یک فن‌آوری موثر برای حذف بهینه فلزات‌سنگین از اکوسیستم‌های آبی است که در مقایسه با روش‌های رایج درزمینه حذف فلزات‌سنگین از محیط نظیر روش‌های فیزیکی و شیمیایی از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده و از مزایایی نظیر، امکان بازیافت فلزات برخوردار است. از این‌رو شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که به‌توانند غلظت‌های بالای فلزات را در محیط تحمل کرده و آن‌ها را تا حد استانداردهای قابل قبول کاهش دهند لازم بوده و مطالعات زیادی نیز در زمینه بررسی توانایی انواع جاذب‌های زیستی نظیر قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و باکتری‌ها در حذف فلزات‌سنگین از محیط صورت گرفته است[۳]. در این بین باکتری‌ها به‌دلیل اندازه کوچک، نسبت بالای سطح به حجم، سرعت بالای رشد و تکثیر و برخودار بودن از سایت های فعال جذبی نظیر پپتیدوگلیکان ها برای فرایند جذب زیستی گزینه مناسب‌تری به‌شمار می‌آیند. از جمله مطالعات صورت گرفته در این زمینه در ایران و جهان می‌توان به جداسازی گونه‌های مقاوم به فلزات‌سنگین در جهان [۴،۵] و در ایران *Bacillus sp.* (KAH1) [۶] ، *Bcillus circulans* [۷] و *Pseudomonas putida* PTCC 1664 [۸] اشاره کرد. خلیج فارس یکی از اصلی‌ترین راه‌های انتقال انرژی و حمل و نقل کالاست که علی‌رغم این مزایا مدفن انواع آلاینده‌ها نیز می‌باشد. وجود منابع سرشار نفت در این منطقه عامل مهمی در افزایش جمعیت، گسترش مناطق شهری، توسعه صنعت و استفاده بیش از حد از منابع‌طبیعی است که به‌بروز انواع آلودگی‌های زیست‌محیطی از جمله آلودگی فلزات‌سنگین منجر شده است[۹]. فعالیت مجتمع پتروشیمی بندر امام خمینی(ره) به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین پتروشیمی‌های کشور در منطقه محصور شده خور موسی واقع در شمال غرب خلیج فارس علاوه بر تاثیر بر اکوسیستم این خور، ناخواسته بر سلامت ساکنان شهرهای اطراف آن نظیر بندر امام خمینی(ره) و بندر ماهشهر نیز اثرگذار می‌باشد. بررسی مطالعات صورت گرفته در زمینه استفاده از قابلیت میکروارگانیسم‌ها جهت حذف آلاینده‌ها به‌خصوص فلزات‌سنگین از محیط در منطقه دریایی جنوب کشور نشان داد که تعداد این مطالعات اندک بوده و کافی نمی‌باشد. از جمله مطالعات صورت گرفته در خلیج فارس Zolgharnein و همکاران(۲۰۱۰)، باکتری *Pseudomonas aeroginosa* strain MCCB 102 را از رسوبات خلیج فارس جداسازی و توانایی آن در حذف فلزات‌سنگین از محیط بررسی کردند. Abyar و همکاران (۲۰۱۱)، با جداسازی باکتری *Pseudomonas putida* از رسوبات خور موسی نشان دادند که این گونه قادر است ۵۹ درصد از فلز مس موجود در محلول فلزی را طی مدت زمان ۱۲۰ ساعت جذب نماید. هم‌چنین Safahieh و همکاران (۲۰۱۲)، باکتری *Pseudomonas* sp. را از رسوبات خورموسی جداسازی کردند و توانایی این باکتری در جذب زیستی فلز مس و تجزیه زیستی فنانترن مورد مطالعه قرار دادند[۱۰،۱۱،۱۲]. از این رو خلیج فارس به تحقیقات گسترده تری در زمینه شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات‌سنگین و تعیین کارایی آن‌ها جهت حذف این آلاینده‌ها از محیط نیاز دارد و هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی گونه باکتریایی بومی مقاوم به فلز روی از رسوبات بندر امام خمینی(ره) است. هم‌چنین در تحقیق حاضر به بررسی قابلیت رشد باکتری در غلظتهای مختلف فلز پرداخته و توانایی آن در حذف فلز روی از محلول فلزی مورد مطالعه قرارگرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری

عملیات نمونه‌برداری در مهر ماه ۱۳۹۰ از ۳ ایستگاه در خورموسی واقع در شمال غربی خلیج فارس و در مجاورت بندر امام خمینی(ره) انجام پذیرفت. نمونه‌برداری با استفاده از گرب ون وین از لایه های سطحی رسوبات با ۳ تکرار صورت گرفت. نمونه‌های مربوط به هر ایستگاه را در ظروف شیشه‌ای دربدار و از قبل استریل شده قرار داده و در ظرف نگهداری یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. هم‌چنین در محل نمونه‌برداری فاکتورهای محیطی نظیر pH، دما و میزان شوری نیز اندازه‌گیری گردید.

۲-۲- جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های رسوب و خالص‌سازی

نمونه‌های رسوب مربوط به هر ایستگاه در شرایط کاملا استریل با هم ترکیب، سپس یک گرم از آن به ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۸۵ درصد کلریدسدیم اضافه گردید. در ادامه یک میلی‌لیتر از محلول فوق با استفاده از آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و بدین شکل رقت 10^{-1} بدست آمد. عمل رقیق سازی تا رقت 10^{-3} ادامه یافت. در ادامه ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت روی محیط کشت نوترینت آگار[1] حاوی غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی ریخته و محیط کشت فاقد فلز به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. محیط کشت‌های مورد نظر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباتور به مدت ۳-۵ روز قرار گرفتند[۱۳].

بعد از جداسازی نمونه‌های باکتریایی از نمونه‌های رسوب، کلنی‌های ظاهر شده روی محیط کشت حاوی بالاترین غلظت فلز روی (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به این فلز، جهت خالص سازی انتخاب شدند.

۲-۳- شناسایی باکتری

شناسایی باکتری‌های خالص شده با استفاده از خصوصیات ماکروسکوپی[2] (رنگ و شکل کلنی) و میکروسکوپی[3] (مورفولوژی، رنگ‌آمیزی گرم و تایید آن با تست KOH)، آزمایش‌های بیوشیمیایی و کتاب راهنمای برجی انجام گردید[۱۴].

۲-۴- مطالعه رشد باکتری

به‌منظور تعیین میزان رشد باکتری، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری را به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB broth (باکتو تریپتون[4] ۱٪، مایع مخمر ۰/۵٪، NaCl ۱٪ و pH = ۷) حاوی غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی اضافه شد. نمونه‌های شاهد فاقد فلز(کنترل مثبت) نیز جهت مقایسه در نظر گرفته شدند. سپس نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۰/۶ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری در غلظت‌های مختلف فلز با ۲/۴ میلی‌لیتر محلول LB broth رقیق شده و ظرف حاوی محلول باکتری جهت اندازه‌گیری به دستگاه اسپکتروفتومتر داده شد. میزان جذب نوری باکتری در فواصل زمانی ۱۲ ساعت بمدت ۵ روز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. سنجش نمونه‌ها با ۳ تکرار صورت گرفت[۸].

۲-۵- سنجش توانایی باکتری در حذف فلز روی از محلول فلزی

۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فلز روی در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر این فلز در ارلن های ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه و pH محلول ها روی عدد ۶ تنظیم گردید. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به محلول‌های فوق تلقیح شد. ارلن ها در انکوباتور با دور rpm ۱۶۰ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سنجش میزان جذب فلز روی توسط باکتری در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه ای و به مدت ۱۵۰ دقیقه صورت پذیرفت. بدین ترتیب که در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه ای، ۵ میلی‌لیتر از محلول حاوی فلز و باکتری در مدت زمان ۱۰ دقیقه در دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در ادامه محلول رویی در بالون ژوژه‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد و با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل SavantaAA سنجش گردید. برای هر غلظت یک نمونه شاهد فلزی فاقد باکتری در نظر گرفته شد[۱۵، ۱۶].

۲-۶- ابزار تجزیه و تحلیل

نرمال بودن داده‌ها از لحاظ پراکنش با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی گردید. برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار در رشد باکتری در غلظت‌های متفاوت فلز از آنالیز

واریانس یکطرفه (One way ANOVA) استفاده شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، برای جدا کردن گروه‌های مختلف از پس آزمون توکی استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 صورت گرفت و نرم افزار Excel برای رسم نمودارها به‌کار رفت.

۳- نتایج و بحث

ورود فلزات‌سنگین به محیط به واسطه فعالیت‌های صنعتی و توسعه شهرنشینی به مراتب بیش‌تر از ورود طبیعی آن‌ها از طبیعت به محیط است. اکثر فلزات‌سنگین، کاتیون‌های فلزی هستند که به خاطر تشکیل ترکیبات پیچیده نقش اساسی در واکنش های بیوشیمیایی بدن داشته و در غلظت‌های بالا برای بدن سمی هستند و از آن‌جایی‌که روش‌های فیزیکی و شیمیایی حذف فلزات‌سنگین از اکوسیستم‌های آبی، اغلب مشکلاتی از قبیل حذف ناقص فلزات، مصرف بالای انرژی، تولید لجن و گل و لای سمی را به‌دنبال دارند و از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه نیستند در دهه‌های اخیر روش‌های زیستی جهت کنترل و حذف فلزات‌سنگین از محیط مورد توجه قرار گرفته است[۴].

در این پژوهش ابتدا از رسوبات سطحی بندر امام خمینی نمونه‌برداری و باکتری‌های مقاوم به فلز روی جداسازی و خالص سازی گردید. در کل ۴ کلنی متفاوت از باکتری‌های مقاوم به فلز روی جداسازی شد که در این بین مقاوم‌ترین باکتری که قادر به رشد بر سطح محیط کشت حاوی غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی بود با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید. نتایج مربوط به آزمایش‌های بیوشیمیایی، رنگ‌آمیزی گرم و تست KoH گونه مذکور نشان داد که گونه جداسازی شده یک باسیل گرم منفی است. با توجه به نتیجه آزمایش‌های بیوشیمیایی مندرج در جدول ۱، این باکتری *Pseudomonas. aeruginosa* تشخیص داده شد.

مطالعات صورت گرفته در زمینه توانایی جنس *Pseudomonas* در حذف آلاینده‌ها از محیط نشان می‌دهد که این باکتری از سازگاری بالایی نسبت به انواع ترکیبات آلی و معدنی سمی برخوردار است[۳].

Zolgharnein و همکاران در سال ۲۰۱۰ توانستند ۳۵ گونه باکتری مقاوم به فلزات سرب، روی، مس و کادمیوم را از رسوبات سطحی خلیج فارس جداسازی کنند.

جدول۱- نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی

تست بیوشیمیایی	نتیجه
رنگ‌آمیزی	-
شکل کلنی	میله‌ای
KoH	+
اکسیداز	+
کاتالاز	+
لاکتوز	-
اوره	-
حرکت	+
اندول	-
تولید گاز	-
TSI	+
سیترات	+
مکانکی	+
لایزین	-
MR	-
VP	-
PD	+
تشخیص	*P. aeruginosa*

نتایج حاصل از بررسی مولکولی باکتری‌ها نشان داد که اکثر گونه‌ها متعلق به جنس سودوموناس می‌باشند. هم‌چنین در همین راستا (Abyar و همکاران،۲۰۱۱) باکتری *Pseudomonas putida* و (Safahieh و همکاران، ۲۰۱۲) نیز باکتری *Pseudomonas* sp. از رسوبات بندر امام خمینی به‌عنوان گونه‌های مقاوم به فلزات‌سنگین و ترکیبات نفتی جداسازی نمودند[۱۰، ۱۱، ۱۲].

میزان رشد باکتری در حضور فلزات سمی، از جمله فاکتور های موثر بر توانایی میکروارگانیسم‌ها در جذب فلزات‌سنگین از محیط می‌باشد. هم‌چنین غلظت فلز و درجه سمیت آن نیز بر رشد باکتری و در نهایت بر توانایی آن در حذف فلزات سمی از محیط اثرگذار است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری رشد باکتری *P. aeruginosa* در غلظت‌های مختلف فلز روی در جدول۲ نشان داده شده است. بررسی رشد باکتری *P. aeruginosa* در غلظت‌های مختلف فلز روی نشان داد که با افزایش غلظت فلز در محیط رشد باکتری کاهش می‌یابد. به‌گونه‌ای که حداکثر رشد باکتری در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد و با افزایش غلظت روی در محیط به ۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. حداکثر جذب نوری در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر با میزان جذب در

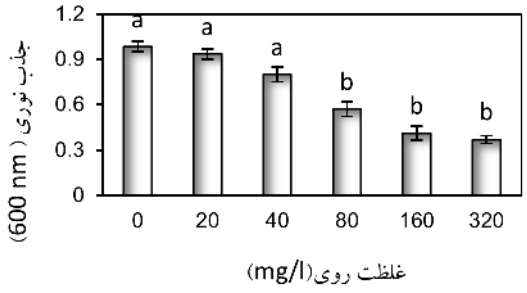
نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). حداکثر جذب نوری در این غلظت ۰/۹۳ و در نمونه شاهد ۰/۹۸ اندازه‌گیری شد. در حالی که کم‌ترین میزان رشد باکتری در غلظت۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی ۰/۳۷ بود که نسبت به نمونه شاهد ۰/۶۱ کاهش داشت ($p<0/05$). Andreoni و همکاران(۲۰۰۳) با جداسازی باکتری *P. putida* به‌عنوان گونه مقاوم به فلز روی به بررسی روند رشد باکتری در حضور و عدم حضور فلز روی پرداختند. نتایج نشان داد که رشد باکتری در حضور فلز روی کاهش می‌یابد[۱۷]. Edward raja و همکاران (۲۰۰۶) باکتری *P. aerogionsa* را از پساب آلوده به فلزات‌سنگین جداسازی نمودند و بررسی رشد آن در غلظت‌های مختلف فلزات سرب، کادمیوم، کروم، آرسنیک و جیوه نشان داد که با افزایش غلظت فلزات، سرعت رشد کاهش یافته و باکتری رشد خود را با تاخیر آغاز می‌کند[۱۸]. کاهش رشد باکتری در غلظت‌های بالای فلز می‌تواند به‌دلیل افزایش غلظت فلز در محیط و اثرات سمی آن بر باکتری‌ها باشد[۱۹].

باکتری *P. aeruginosa* در غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز بدون هیچ گونه تاخیری رشد خود را آغاز نموده و ۷۲ ساعت پس از تلقیح باکتری به حداکثر رشد خود رسید. درحالی‌که در غلظت ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی، باکتری با تاخیری ۱۲ ساعته وارد فاز لگاریتمی شده و ۸۴ ساعت بعد به حداکثر رشد خود رسید. بین حداکثر رشد باکتری در غلظت‌های ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر این فلز نیز تفاوت قابل توجهی وجود نداشت ($p>0/05$) (شکل۱). Abyar (۱۳۸۹)، گونه‌های *P. stutzeri* strain MZQ-JX02 و P. putida strain ۱۳۸۹ را از رسوبات خور موسی جداسازی نموده و به بررسی توانایی رشد آن‌ها در غلظت‌های ۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز مس پرداخت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فلز، رشد باکتری به کندی صورت گرفته و مدت زمان سازگار شدن باکتری در غلظت‌های بالای فلز طولانی تر می‌باشد که تاییدی بر نتایج مطالعه حاضر است[۲۰]. در غلظت‌های بالای فلز، جهت ترمیم آسیب‌های ناشی از مواجهه شدن با فلز و سازگاری با شرایط محیطی جدید، باکتری رشد خود را با تاخیر آغاز می‌کند[۲۱].

جدول۲- داده‌های مربوط به رشد باکتری P. aeruginosa در غلظت‌های مختلف فلز روی

زمان (ساعت)	شاهد	غلظت۲۰ (mg/l)	غلظت۴۰ (mg/l)	غلظت۸۰ (mg/l)	غلظت۱۶۰ (mg/l)	غلظت۳۲۰ (mg/l)
۰	۰/۳۰۵ ± ۰/۰۱۵	۰/۲۷۵ ± ۰/۰۲۵	۰/۲۶ ± ۰/۰۲	۰/۲۰۵±۰/۰۱۵	۰/۱۵۵± ۰/۰۳۵	۰/۱۵۵ ±۰/۰۳۵
۱۲	۰/۴۰۵ ±۰/۰۱۶	۰/۳۷۵ ± ۰/۰۲۵	۰/۳۲۵ ± ۰/۰۲۸	۰/۲۱۵ ± ۰/۰۱۵	۰/۱۷ ± ۰/۰۳	۰/۱۶۵± ۰/۰۱۹
۲۴	۰/۴۹۵ ± ۰/۰۰۶	۰/۰۲ ± ۰/۴۷	۰/۴۲۵ ±۰/۰۲۵	۰/۲۷۷± ۰/۰۰۸	۰/۲۵۹± ۰/۰۰۹	۰/۲۳±۰/۰۵
۳۶	۰/۶۰۴ ± ۰/۰۱۷	۰/۵۵۵ ± ۰/۰۴۵	۰/۵۱ ± ۰/۰۳	۰/۳۳۵ ± ۰/۰۱	۰/۳۱۲± ۰/۰۱۱	۰/۲۶۵± ۰/۰۲۵
۴۸	۰/۷۶۵±۰/۰۲	۰/۷ ± ۰/۰۳۵	۰/۵۴۵ ± ۰/۰۴۵	۰/۳۹۷ ± ۰/۰۰۹	۰/۳۶۶± ۰/۰۰۸	۰/۳۲۵± ۰/۰۲۵
۶۰	۰/۸۷۵ ± ۰/۰۱۹	۰/۸ ± ۰/۰۱۸	۰/۶۴ ± ۰/۰۴	۰/۴۷۱ ±۰/۰۰۶	۰/۴۳۶± ۰/۰۱۵	۰/۳۵ ±۰/۰۳۹
۷۲	۰/۹۸۴±۰/۰۳ ۶*	۰/۹۳±۰/۰۳۵ *	۰/۸ ± ۰/۰۴*	۰/۵۶۷± ۰/۰۲	۰/۴۵ ± ۰/۰۰۸	۰/۳۶ ± ۰/۰۴
۸۴	۰/۹۷۵ ± ۰/۰۱۱	۰/۸ ± ۰/۰۴	۰/۷۱ ± ۰/۰۳۱	۰/۶ ±۰/۰۲۵ *	۰/۴۹± ۰/۰۱۹ *	۰/۳۷ ±۰/۰۱۴*
۹۶	۰/۸۵۸ ± ۰/۰۱۳	۰/۷۵ ±۰/۰۱	۰/۴۹ ±۰/۰۱	۰/۴۳۸± ۰/۰۱۷	۰/۴۳۹ ± ۰/۰۲۸	۰/۳۲ ±۰/۰۴۶
۱۰۸	۰/۷۲۷ ± ۰/۰۱۵	۰/۵۴ ±۰/۰۴	۰/۴۲۵± ۰/۰۲۵	۰/۳۷۶± ۰/۰۱۸	۰/۳۵۲± ۰/۰۳۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۲

* : حداکثر رشد باکتری در غلظت‌های مختلف فلز روی



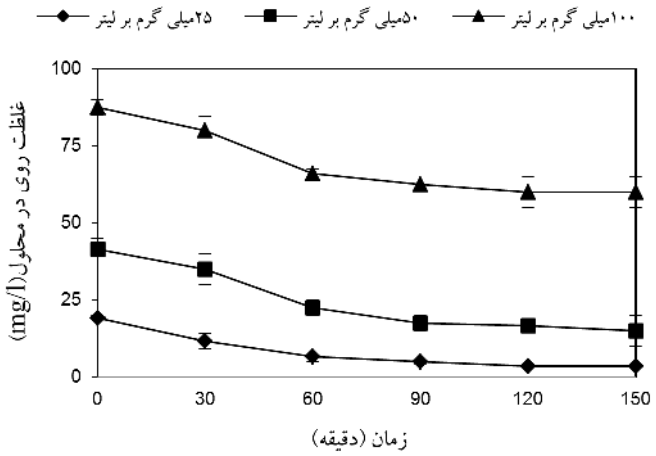
شکل ۱- مقایسه حداکثر رشد باکتری P. aeruginosa درغلظت‌های مختلف روی

۳-۱- اندازه‌گیری جذب زیستی

نتایج حاصل از بررسی جذب روی از محلول فلزی حاوی این فلز توسط باکتری *P. aeruginosa* در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاکی از آن بود که با افزایش غلظت فلز در محیط میزان جذب آن توسط باکتری افزایش می‌یابد به‌طوری که بالاترین میزان جذب توسط باکتری در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی به ثبت رسید. در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، مقدار فلز روی در محلول به ۴/۵ ± ۴۰ رسید. این در حالی است که کم‌ترین میزان جذب در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی ۲۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. در همین راستا Andreoni و همکاران (۲۰۰۳)، باکتری *P. putida* B14 را به‌عنوان یک گونه مقاوم به فلزات کادمیوم و روی جداسازی نمودند. باکتری *P. putida* B14 قادر به جذب ۱۰۰ درصدی فلز کادمیوم و کاهش ۸۰ درصدی فلز روی بود[۱۷].

بیش‌ترین میزان جذب فلز توسط باکتری *P. aeruginosa* در زمان‌های نخستین در معرض‌گذاری با فلز روی بود به‌گونه‌ای که باکتری از همان لحظات ابتدایی، جذب فلز را فعالانه آغاز کرده و در ۳۰ دقیقه آغازین در هر سه غلظت، میزان روی را به‌شکل قابل توجهی کاهش داده است. در دقایق انتهایی تغییر قابل توجهی در میزان روی در محلول فلزی مشاهده نشد (شکل۲). باکتری *P. aeruginosa* توانست میزان قابل توجهی از فلز روی را در ۳۰ دقیقه ابتدایی سنجش از محلول فلزی جذب کند. پس از آن سرعت جذب کاهش یافت و تغییر محسوسی در میزان جذب فلز توسط باکتری مشاهده نشد. Taranginiدر سال ۲۰۰۹ نیز نشان داد که *P. aerogionsa* قادر به حذف ۳۰/۴۷درصدی فلز کروم و ۹۹/۳درصدی فلز جیوه در دقایق ابتدایی سنجش می‌باشد[۲۲] . Wierzba(۲۰۱۰) با جداسازی باکتری *Pseudomonas* sp. G1 از پساب حاوی فلزات‌سنگین به مقایسه توانایی سلول های زنده و مرده این باکتری در حذف فلزات مس و روی از محیط پرداخت. نتایج نشان داد که حداکثر جذب فلز مس و روی توسط باکتری در ۱۰ دقیقه نخست اتفاق می‌افتد و پس از ۴۰ دقیقه تغییری در میزان جذب ایجاد نمی‌شود[۲۳]. Hussain و همکاران (۲۰۰۹) معتقدند که پس از جذب یون‌های فلز توسط جایگاه های اتصال در سطح سلول، نیروی دافعه بین یون‌های جذب شده بر سطح سلول و یون‌های فلزی محلول در محیط باعث توقف جذب بیش‌تر یون‌های فلزی می‌گردد[۲۴].

با توجه به جدول۳، با افزایش غلظت فلز در محلول، درصد جذب زیستی کاهش می‌یابد به‌طوری که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد جذب به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ثبت رسید. بالا بودن درصد جذب در غلظت‌های پایین‌تر فلز احتمالا به این دلیل است که در این غلظت‌ها تعداد یون‌های فلزی نسبت به سایت‌های جذبی موجود در سطح سلول کم‌تر می‌باشند از این‌رو درصد جذب بیش‌تر خواهد شد و با افزایش غلظت فلز و تعداد یون‌های فلزی و کاهش سایت‌های جذبی درصد جذب نیز کاهش می‌یابد[۲۵].



شکل۲- منحنی جذب روی از محلول توسط باکتری P. aeruginosa درانکوباتور با دور rpm ۱۶۰، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ، pH ۶

جدول۳- درصد جذب زیستی فلز توسط باکتری P. aeruginosa

زمان (دقیقه) / غلظت	لحظه تلقیح	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰
۲۵ میلی‌گرم بر لیتر	٪۲۴	٪۵۴	٪۷۴	٪۸۰	٪۸۶	٪۸۶
۵۰ میلی‌گرم بر لیتر	٪۱۸	٪۳۰	٪۵۵	٪۶۳	٪۶۴	٪۶۵
۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر	٪۱۲/۵	٪۲۰	٪۳۴	٪۳۷/۵	٪۴۰	٪۴۰

۴- نتیجه‌گیری

فرآیند جذب زیستی، روشی موثر در زمینه حذف فلزات‌سنگین براساس توانایی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. نمونه‌برداری از رسوبات آلوده در بندر امام خمینی منجر به جداسازی باکتری *P. aeroginosa* به‌عنوان گونه مقاوم به فلز روی گردید. نتایج حاصل از بررسی میزان رشد باکتری در حضور غلظت‌های مختلف فلز روی نشان داد که باکتری مذکور در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر فلز روی حداکثر رشد را دارد، با اینحال در غلظت‌های بالاتر این فلز (۳۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) نیز می‌تواند رشد کند. هم‌چنین مطالعه صورت گرفته در زمینه توانایی باکتری *P. aeroginosa* در حذف فلز روی از محیط نشان داد که این باکتری قادر به حذف ۸۶ درصدی این فلز در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر طی ۱۵۰ دقیقه می‌باشد.

پی‌نوشت‌ها

1- Nutrient agar
2- Macroscopic
3- Microscopic
4- Bacto tryptone

منابع

[1]Gopalakrishnan S, Thilagam H, Vivek Raja P. Comparison of heavy metal toxicity in life stages (spermiotoxicity, egg toxicity, embryotoxicity and larval toxicity) of Hydroid elegans. Chemosphere; 2008; 71: 515-528.

[2]Nomanbhay S.M. and Palanisamy K. Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. Electronic Journal Biotechnology; 2005; 8(1):142-150.

[3]Wang J.L. and Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnology; 2009; 27: 195–226.

[4]Alluri H.K, Ronda S.R, Settalluri, V.S, Bondili J.S, Suryanarayana, V. and Venkateshwar, P. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. African Journal of Biotechnology; 2007; 6(25): 2924-2931.

[5]Igwe J.C. and Abia A.A. A bioseparation process for removing heavy metals from waste water using biosorbrnts. African Journal of Biotechnology; 2006; 5(12): 1167-1179.

[6]Karim salmani B, Amozgar M. and Hamedi, J. Bisorption of lead by bacteria isolated from petrochemical wastewater. Environmental Science and Technology;1390;13(2): 41-54. [In Persian]

[7]Khanafari A, Eshghdoost S, Mashinchian A. Removal of lead and chromium from aqueous solution by *Bacillus circulans* biofilm. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering; 2008; 5(3): 195-200.

[8]Shirdam R, Khanafari A. and Tabatabaee A. Cadmium, nickel and vanadium accumulation by three strains of marine bacteria. Iranian Journal of Biotechnology; 2006; 4(3): 180-187.

[9]Lotfi H, Baghaei H, Mosavi S. and Khayambashi S. Persian Gulf and protect the environment. Human geography; 1389; 3 (1): 1-9. [In Persian]

[10]Zolgharnein H, Karami K, Mazaheri Assadi M. and Dadolahi S. Investigation of heavy metals biosorption on *pseudomonas aeroginosa* strain MCCB 102 isolated from the persian gulf. Asian Journal of Biotechnology; 2010; 5: 1-11.

[11]Abyar H, Mojodi F, Safahieh A, Zolgharnein H. and Zamani I. The role of *Pseudomonas putida* in bioremediation of naphthalene and copper. World Journal of Fish and Marine Sciences; 2011; 5: 444-449.

[12]Safahieh A, Abyar H, Roostan Z, Zolgharnein H. and Mojodi F. Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals and

poly aromatics hydrocarbons (PAHs) from Persian Gulf sediments. African Journal of Biotechnology; 2012; 11(19) 4418-4423.

[13]Dzairi F.Z, Zeroual Y, Moutaouakkil A, Taoufik J, Talbi M, Loutfi M, Lee K. and Blaghen M. Bacterial volatilization of mercury by immobilized bacteria in fixed and fluidized bed bioreactors. Annals of Microbiology; 2004; 54(4): 353-364.

[14]Bergey D.H, Staleey T.J, King R.N. and Brenner D. Bergey s Manual of Systematic Bacteriology. 6th ed. New York: Springer ; 2005; 1123-1129.

[15]Kim S.U, Cheong Y.H, Seo D.C, Hur J.S, Heo J.S. and Cho, J.S. Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus spp.*). Water Science and Technology; 2007; 55(1-2): 105-111.

[16]Azza A.A, Wesam A.H, Hedayat M.S. and Ghada A.A.F. Biosorption of some heavy metal ions using bacterial species isolated from agriculture waste water drains in Egypt. Journal of Applied Sciences Research; 2009; 4: 372-383

[17].Andreoni V, Colombo M, Colombo A, Vecchio A. and Finoli C. Cadmium and zinc removal by growing cells of *pseudomonas putida* strain B14 isolated from a metal-impacted soil. Annals of Microbiology; 2003; 53: 135-148.

[18]Edward Raja Ch, Anbazhagan K. and Sadasivam Selvam G. Isolation and Characterization of A Metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain, World Journal of Microbiology and Biotechnology; 2006 ; 22: 577-585.

[19]Mathivanan K., Balasubramanian V. and Rajaram R. Bacterial resistant to mercury pollution through genetic transformation. World Applied Sciences Journal; 2010; 8(4): 400-403.

[20]Abyar H. Isolation and Identification of Marine Aerobic Bacteria Resistant to cadmium and copper. in Imam Khomeini Port and Determination of Their Ability in Metal Biosorption from the Surrounding Medium. M.Sc. Thesis. Khorramshahr University of Marine Science and Technology;1389. p. 130. [In Persian]

[21]Gikas P, Sengor S.S, Ginn T, Meberly J. and Peyton B. The heavy metal and temperatur on microbial growth and lag. Global NEST Journal; 2009; 3: 325-332.

[22]Tarangini K. Biosorption of heavy metals using individual and mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. M.S. Thesis. Department of chemical engineering; 2009; 2-70.

[23]Wierzba S. and Latala A. Biosorption lead(II) and nikel(II) from an aqueous solution by bacterial biomass Pol. J. Chem. Technol; 2010; 12: 72–78.

[24]Hussain, M.A., Salleh, A., Milow, P.,. Charachterization of the adsorption of the lead(II) by the nonliving biomass Spirogyra neglecata (Hasall) Kutzing. American Jurnal of Biochemistry and Biotechnology. 2009. 2: pp. 75-83.

[25]King P, Rakesh N, Beenalahari S, Kumar Y.P. and Prasad V.S.R.K. Removal of lead from aqueous solution using *Syzgium cumini* L. equilibrium and kinetic studies. Environmental Pollution Control Engineeting;. 2006; 27: 340-347.