فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱۷۱- ۱۸۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۳۱

تثبیت *باسیلوس* در بیدهای آلژینات کلسیم برای حذف فلز نیکل

سلمان احمدی اسب چین *: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، sahmadyas@yahoo.fr
ناصر جعفری: استادیار زیست شناسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، n.jafari@umz.ac.ir
حسنا مرادی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه ایلام، ایران، ho.moradi1990@yahoo.com

چکیده

مقدمه: تثبیت سلول به عنوان یک روش مناسب برای استفاده مجدد از میکروارگانیسم‌ها و محفوظ نگه‌داشتن آن‌ها از تغییرات مستقیم عوامل فیزیکی- شیمیایی محیط به حساب می‌آید.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، سلول‌های *باسیلوس* بر روی آلژینات کلسیم تثبیت شده است. از بین روش‌های تثبیت، از روش انتراپمنت و قطرک استفاده شد. همچنین، پس از تولید ریزدانه‌های حاوی آلژینات و *باسیلوس*، از رآکتور بستر فشرده برای حذف فلز نیکل استفاده شد.

نتایج: این پژوهش نشان داد میزان جذب فلز نیکل توسط باکتری تثبیت شده در آلژینات کلسیم، نسبت به باکتری آزاد و آلژینات کلسیم فاقد باکتری بیشتر است. درصد نیکل جذب شده از محلول به‌وسیله آلژینات کلسیم، *باسیلوس* آزاد و *باسیلوس* تثبیت شده در آلژینات کلسیم، به ترتیب ۱۷/۵، ۲۹/۵ و ۴۷/۵ درصد است.

بحث و نتیجه‌گیری: بادر نظر گرفتن این موضوع، که گروه‌های فعال سطح *باسیلوس*نقش اصلی در جذب فلزات سمی دارد و مهم‌ترین آن‌ها گروه‌های کربوکسیلیک است، می‌توان به سمت ارگانیسم‌های حاوی این گروه‌ها و یا استفاده مستقیم و آزاد از ماکرومولکول‌های حاوی این گروه‌ها رهنمون شد.

واژه‌های کلیدی: تثبیت، آلژینات کلسیم، نیکل، جذب زیستی، *باسیلوس*

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

فلزات سنگین سمی بیشتر در اثر فعالیت‌های صنعتی باعث آلودگی محیط زیست می‌شوند، هر چند که منابعی مانند پساب‌های کشاورزی نیز در این امر نقش دارند. این آلاینده‌ها وارد زیستگاه‌های آبی و خاکی شده و در محل ورود به محیط، تراکم‌های خیلی بالایی از آن‌ها دیده می‌شود. پساب‌های آلوده به مواد سمی و فلزات سنگین از قبیل کادمیوم، سزیم، نیکل و غیره حتی در حد مجاز، وقتی وارد محیط زیست شوند می‌توانند تحت تأثیر عوامل مختلف فیزیکی، شیمیایی و میکروبی متراکم شده و آب‌های سطحی و زیرزمینی را آلوده و آثار جبران ناپذیری بر محیط زیست وارد کنند (۱ و ۲). از این رو ضرورت مطالعه راه‌های رفع آلودگی آلاینده‌های پیچیده آب، خاک و هوا احساس می‌شود. در دهه‌های اخیر، پژوهش‌های گسترده‌ای روی اتصال فلزات توسط باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و جلبک‌ها انجام شده و فرآیندهای حذف، تثبیت و سم‌زدایی بیشتر فلزات سنگین از محیط‌های طبیعی با فعالیت میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود (۳ و ۴). باکتری‌ها واجد سیستم‌هایی برای جذب و سازگارشدن با غلظت‌های بالای فلزات در محیط هستند، در واقع خواص آنیونی سطح باکتری‌ها شبیه یک اسفنج عمل می‌کند و قادر به جذب یون‌های فلزی به خود است. بنابراین، از آنجا که اکثر فلزات سنگین سمی بوده و ورود آن‌ها از پساب‌های صنعتی به محیط زیست، به آلودگی محیط منجر می‌شود، دستیابی به روش مناسب برای حذف و بازیافت این فلزات امری ضروری است. نخستین کاتالیزورهای زیستی مورد استفاده در روش‌های صنعتی سلول‌های دست نخورده و سپس، آنزیم‌های محلول بودند، پس از آن از آنزیم‌های تثبیت شده و در نهایت، از سلول‌های تثبیت شده استفاده شد (۵). تثبیت سلولی امروزه در صنعت جای خود را باز کرده است. سلول‌های تثبیت شده سلول‌هایی هستند که با حفظ فعالیت کاتالیتیکی و امکان حفظ حیات، به طور فیزیکی محدود و یا در یک ناحیه تعریف شده مشخص از فضا مستقر شده‌اند و می‌توانند به طور پیوسته استفاده شوند. از رایج‌ترین روش‌های تثبیت سلولی که امروزه برای استفاده مجدد از میکروارگانیسم‌ها و محفوظ نگهداشتن آن‌ها از تغییرات مستقیم عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط به کار می‌رود، روش تثبیت سلولی به نام به‌دام انداختن است. در این روش، سلول‌ها در فضای داخل یک شبکه پلیمری محصور و در فضای بین خلل و فرج شبکه پلیمری قرار می‌گیرند، در نتیجه تغییرات فیزیولوژیکی خاصی انجام نگرفته و فعالیت سلول‌ها و آنزیم‌ها تغییر نمی‌کند (۶- ۸). از انواع حامل‌هایی که در تثبیت سلول و آنزیم استفاده می‌شود می‌توان به حامل‌های زیر اشاره کرد: آگار و آگاروز، کیتوزان، صمغ ژلان، پلی وینیل الکل، سلولز و آلژینات. در این پژوهش، از آلژینات در تثبیت سلول استفاده شد که در ساختار آن سه نوع پلیمر مختلف وجود دارد که عبارتند از:

۱- فقط واجد واحدهای مانورونیک اسید (MM)،
۲- فقط واجد واحدهای گلوکورونیک اسید (GG)،
۳- به طور متناوب واجد هر دو اسید گلوکورونیک و مانورونیک (MG).

یکی از روش‌های محصورکردن سلول در آلژینات روش قطرک است. دراین روش محلول ۲ تا ۳ درصد آلژینات سدیم پیش از افزودن سوسپانسیون سلولی به

وسیله فیلترکردن سترون می‌شود. ریزدانه‌های ژلی با انداختن سوسپانسیون سلولی/ پلیمر از خلال سرنگ به طور آزادانه به داخل محلول سفت کننده ۱۵ تا ۲۰درصد کلسیم کلرید ایجاد می‌شود (۹- ۱۱). فاصله سرسوزن تا محلول سفت کننده حدود ۲۰ سانتی‌متر است. در فرآیند تثبیت از بیو- رآکتورها نیز استفاده می‌شود. بیو- رآکتورها یا رآکتورهای زیستی دستگاه‌هایی هستند که می‌توانند محیطی را که از نظر زیستی فعال است در شرایط آزمایشگاهی به وجود آورند. در این محیط‌ها از نقش کاتالیتیکی ویژه آنزیم‌ها و اندامک‌های سلول یا خود سلول‌ها در تبدیل و تولید مواد بهره‌گیری می‌شود. این رآکتورها انواع مختلفی دارند: ۱- رآکتور مخزنی همزن‌دار (رآکتور مخزنی پیوسته در حال به هم خوردن): محتویات درون این رآکتور پیوسته توسط پره‌های همزنی که بر روی یک محور در حال چرخش است به هم می‌خورد و باعث مخلوط کردن کامل آن‌ها می‌شود. ۲- رآکتور بستر سیال: ستونی که در آن ذرات بیوکاتالیت توسط جریان پیوسته از سر بستر در حال شناور معلق نگه داشته می‌شود (۱۲). ۳- رآکتور بستر فشرده: رآکتور بستر فشرده با آکنده ذرات بیوکاتالیت در داخل ستون ریخته می‌شود و محلول سوبسترا از آن عبور داده می‌شود. ۴- رآکتور هوا خواسته: این رآکتور حباب‌های گاز مایع را حمل می‌کند که به کاهش چگالی مایع منجر می‌شود.

هدف از این پژوهش، پی بردن به توانایی گونه باکتری *باسیلوس* برای جذب فلز نیکل به شکل تثبیت شده در روی آلژینات کلسیم و بهینه‌سازی شرایط جذب است.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایش‌های جذب فلز نیکل توسط *باسیلوس* میله‌ای شکل، گرم مثبت و اسپوردار از مواد و محیط کشت‌های زیر استفاده شد.

میکروارگانیسم‌ها: تمام آزمایش‌ها بر روی گونه باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت اسپوردار *Bacillus* Sp Strain MGL75 جدا شده از پساب کارخانه ذوب فلزات جنوب شهر تهران انجام شد (۱۳). باکتری بر روی آلژینات کلسیم تثبیت شده مطالعه شد.

مواد و محیط‌های کشت: در انجام این پژوهش از آلژینات سدیم شرکت بی دی اچ انگلیس[1]، و محیط کشت معدنی[2] استفاده شد. همچنین، نیکل به شکل محلول نمکی کلرید نیکل شش آبه[3] استفاده شد.

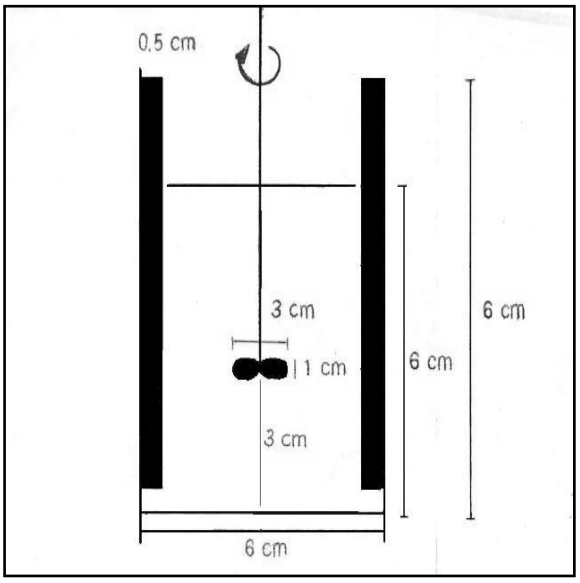
اندازه گیری فلز نیکل: برای اندازه گیری و تحلیل فلز نیکل قبل و بعد از هر آزمایش از دستگاه جذب اتمی[4] استفاده شد.

بررسی میزان جذب فلز نیکل توسط باکتری *باسیلوس*: باکتری *باسیلوس* در محیط نمکی معدنی[5] گلوکز تلقیح، در شیکر با دور ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بیومس باکتری یاد شده با سانتریفیوژ[6] ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، جدا شده و یک گرم وزن تر باکتری یاد شده با ۵۰ میلی‌لیتر محلول فلزی حاوی نیکل کلرید ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲ ساعت در دمای بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر با دور ۱۰۰ دور در دقیقه مجاورت داده شد. پس از گذشت این مدت نمونه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، بیومس رسوب شده، پس از شستشو با آب مقطر استریل بدون یون، ۲ بار تقطیر شده در دمای ۱۰۰ درجه

سانتی‌گراد فر، به مدت یک شب خشک شد. پس از هیدرولیز اسیدی، محلول رویی بیومس هضم شده بعد از تهیه رقت‌های مناسب با استفاده از دستگاه جذب اتمی تحلیل شد (۱۳).

تثبیت سلوهای باکتریایی بر روی آلژینات کلسیم:

مطابق شکل ۱ رآکتوری تهیه شد و با استفاده از آن تولید ریزدانه‌های آلژینات کلسیم حاوی باکتری انجام شد. این رآکتور با اندازه طول و عرض مشخص و کناره‌های خاص خود به گونه‌ای طراحی شده که ریزدانه‌های تولیدی به بهترین و ایده‌آل‌ترین شرایط مهیا شود. طراحی اولیه بیورآکتور به‌وسیله دکتر مفیدی و همکاران در مرکز پژوهش‌های بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران انجام شد. در ابتدای کار، از محلول آلژینات سدیم جامد شرکت ب د اچ انگلستان، محلول ژله‌ای آلژینات سدیم ۳ درصد تهیه شد. پژوهشگران نشان داده‌اند که اگر به میزان ۱/۴ حجم آلژینات سدیم، بوتانول[۷] به آن اضافه شود در حلالیت و تهیه آلژینات سدیم ۳ درصد نقش مناسبی خواهد داشت. به این آلژینات، سوسپانسیون میکروبی حاوی $۲*۱۰^{۱۰}$ سلول باکتری بر میلی‌لیتر اضافه شد و به طور اختصاصی با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری از فاصله ۲۰ سانتی‌متر به داخل رآکتور حاوی ۱۵میلی‌لیتر آب مقطر و۲ گرم کلرید کلسیم[۸] که واجد مگنت برای مخلوط کردن آن می‌باشد، چکانده شد. انتخاب سرنگ ۲ میلی‌لیتری برای تولید بیدهای آلژینات در مناسب‌ترین حالت است. با ورود آلژینات حاوی باکتری به داخل محلول کلرید کلسیم یک تبادل یونی انجام می‌شود، که در نهایت، آلژینات کلسیم حاوی باکتری را خواهیم داشت. مهره‌ها بعد از ۲ساعت، جدا و چندین بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. بار دیگر این مراحل تکرار، با این تفاوت که به آن سوسپانسیون باکتری *باسیلوس* اضافه نشد. تعداد ۲۰۰ تا ۲۵۰ عدد از بیدها یا مهره‌ها در دکآنتور ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی فلز قرار داده شد. مشابه همین به شاهد فاقد باکتری اضافه شد. این سلول‌های تثبیت شده در آلژینات با سلول‌های باکتریایی نرمال و از طرفی با شاهد فاقد باکتری مقایسه شد. همه آزمایش‌ها در شرایط کاملاً یکسان انجام شد. بنابراین، تمام شرایط یکسان خواهد بود و تنها متغیری که وجود دارد این است که از یک طرف که ما ریزدانه‌های حاوی *باسیلوس* تثبیت شده را داریم، از طرف دیگر مهره‌های حاوی آلژینات کلسیم فاقد باکتری به عنوان شاهد را خواهیم داشت. همچنین، برای برطرف کردن و حل مشکل به محلول زیرین به میزان ۱۵ میلی‌لیتر اتانول و ۱ میلی‌لیتر اسیداستیک اضافه شد.



شکل ۱- بیورآکتور طراحی شده برای تولید ریز دانه‌های آلژینات کلیسم حاوی باکتری (۱۴)

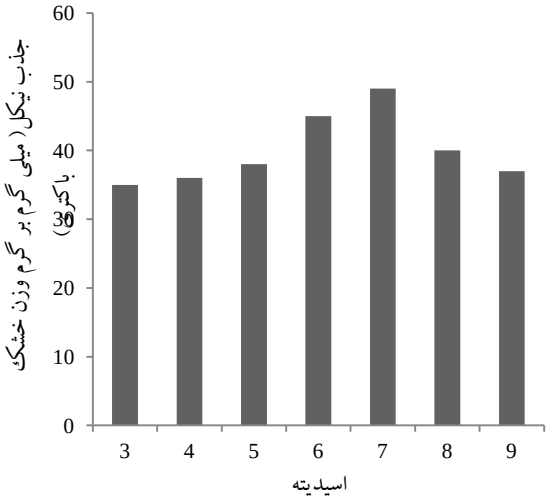
بررسی میزان جذب فلز نیکل در باکتری *باسیلوس* تثبیت شده در آلژینات کلسیم: میزان ۱۰ میلی‌لیتر آلژینات سدیم به علاوه ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری از ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری در داخل محلول کلرور کلسیم وارد شد. از دکآنتور ۱۰۰ میلی‌لیتر واجد شیر تخلیه استفاده شد. مشابه چنین آزمایشی برای آلژینات کلسیم بدون سلول انجام گرفت. همه آزمایش‌های یاد شده در شرایط یکسان اسیدیته انجام شد. از محلول فلزی حاوی ۵۰ میلی‌لیتر کلرید نیکل ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر که روی اسیدیته حدود ۷ تنظیم شد بود و از سرنگ ۲ میلی‌لیتر نیز استفاده شد. مدت زمان انکوباسیون مورد استفاده ۱۶ساعت بود که پس از این مدت نمونه‌های محلول رویی از شیر پایینی خارج و برای بررسی میزان نیکل آن توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (۱۴).

بررسی اثر زمان تماس برای جذب نیکل توسط *باسیلوس* تثبیت شده در آلژینات کلسیم: بر اساس روش‌های قبلی باکتری تثبیت شده در آلژینات کلسیم، بدون سلول وارد دکآنتور ۱۰۰ میلی‌لیتری و دکآنتور ۵۰ میلی‌لیتر محلول فلزی نیکل ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر شد. پس از گذشت مدت زمان ۸، ۱۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت، محلول رویی از دکآنتور جدا شد و برای بررسی میزان فلز نیکل در آن با استفاده از دستگاه جذب اتمی تحلیل شد.

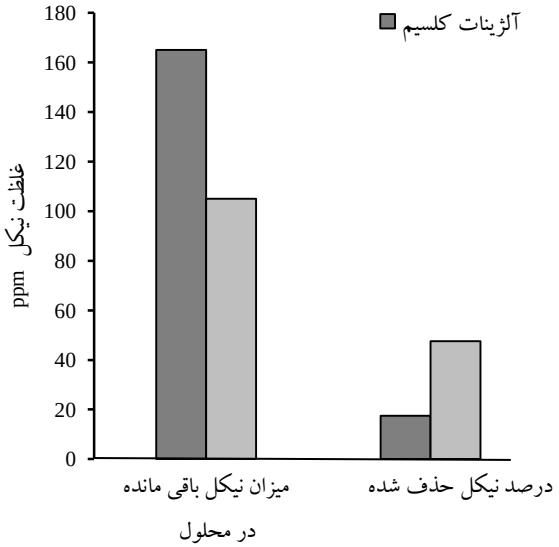
بررسی تاثیر قطر ریز دانه‌ها بر میزان جذب فلز نیکل به‌وسیله *باسیلوس* تثبیت شده در آلژینات کلسیم: از نکات قابل توجه در این آزمایش، اندازه و تعداد مهره‌های تشکیل شده در دکآنتورهای محلول فلزی نیکل است. اگر چه اطلاعات کمی در مورد انتشار مولکولی و اندازه خلل و فرج پلیمر آلژینات کلسیم وجود دارد، ولی عبور مولکول‌های کوچکی مانند اتانول و گلوکز در آن اثبات شده است و همچنین در عبور مولکول‌های بزرگ مثل پروتئین‌ها اشکال ایجاد می‌شود. در این مرحله توسط سرنگ‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتری، قطرهای متفاوت از ریزدانه‌ها به ترتیب حدود ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌متر تشکیل شد (۱۴).

میزان جذب فلز نیکل به وسیله باسیلوس بدون تثبیت: همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، *باسیلوس* مورد آزمایش در اسیدیته مختلف اسیدی، خنثی و قلیایی توان قابل قبولی در جذب فلز نیکل دارد. بیشینه میزان جذب فلز نیکل توسط باکتری مورد مطالعه در اسیدیته خنثی بوده است، این میزان در حدود ۴۸ میلی‌گرم در گرم وزن خشک بیومس است.

اثر تثبیت باکتری MGL-75 روی دانه‌های آلژینات کلسیم و مقایسه آن با آلژینات کلسیم بدون سلول: همان‌طور که در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است، درصد جذب فلز نیکل توسط باکتری تثبیت شده در آلژینات کلسیم نسبت به آلژینات کلسیم بدون سلول بسیار بیشتر بوده و میزان جذب نیکل توسط آلژینات کلسیم فاقد سلول ناچیز است.

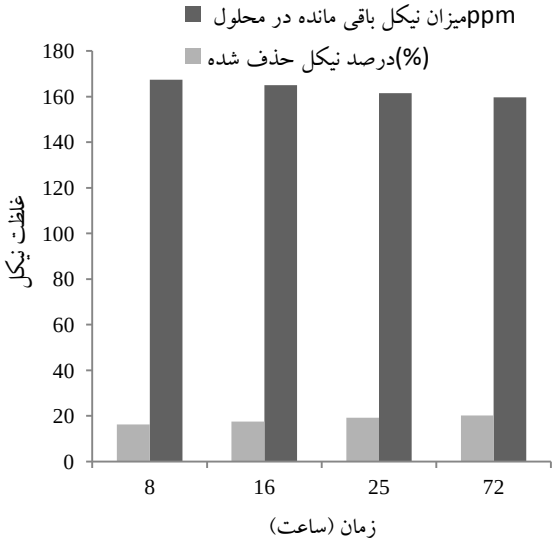


شکل ۲- جذب نیکل به‌وسیله باکتری در اسیدیته مختلف (درجه حرارت ۲۸، زمان تماس ۱۲۰ دقیقه، غلظت نیکل در محلول ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)

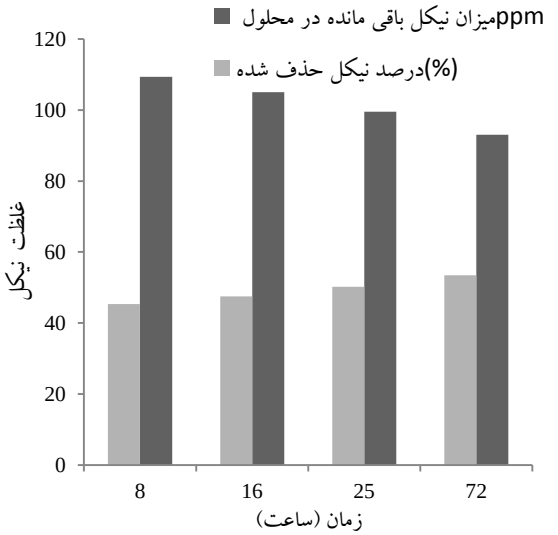


شکل ۳- اثر تثبیت باکتری *باسیلوس* بر روی آلژینات و آلژینات بدون باسیلوس در جذب نیکل از محلول

اثر زمان تماس برای جذب فلز نیکل توسط *باسیلوس* تثبیت شده در آلژینات کلسیم: همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است، با بررسی و مشاهده باکتری تثبیت شده به این نتیجه رسیدیم که افزایش جذب در *باسیلوس* تثبیت شده به آرامی باعث افزایش جذب فلز نیکل می‌شود. به طوری که در زمان ۷۲ ساعت افزایش ۱۰ درصدی در میزان جذب را شاهد هستیم. احتمالاً با گذشت زمان ورود محلول فلزی نیکل به داخل ریزدانه‌های حاوی باکتری بیشتر می‌شود، که خود باعث افزایش روند جذب می‌شود. در مورد شاهد، آلژینات کلسیم خود به شکل یک شبکه عمل می‌کند و باعث به دام انداختن فلز می‌شود. نتایج به دست آمده نشان داد مناسب‌ترین زمان برای استفاده از باکتری تثبیت شده در صنعت، ۱۶ ساعت تماس است. زیرا هم زمان کمابیش کوتاه است و هم درصد جذب فلز در آن زمان مناسب است.



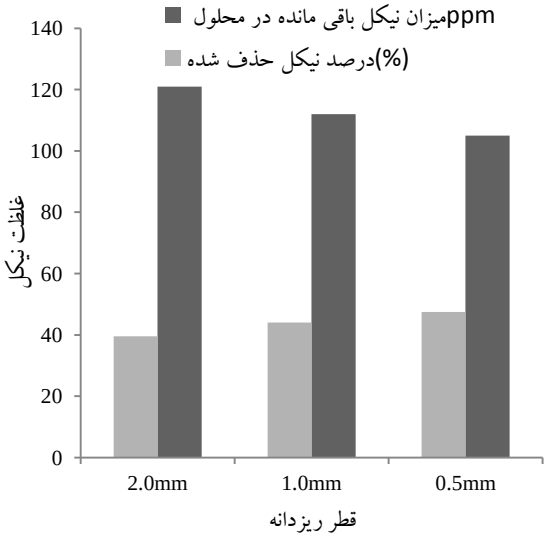
شکل ۴- اثر آلژینات کلسیم بدون باکتری در جذب نیکل در زمان‌های مختلف



شکل ۵- اثر زمان تماس در جذب نیکل به‌وسیله باکتری تثبیت شده در آلژینات کلسیم

تأثیر قطر بیدهای آلژینات کلسیم در جذب فلز سدیم به وسیله *باسیلوس*: در این آزمایش همه شرایط به جز اختلاف در سرنگ یعنی اختلاف در قطر، یکسان بوده است و همچنین، اسیدیته محلول فلز نیکل در حدود۷ تنظیم شد. میزان باکتری مورد استفاده در آلژینات کلسیم برابر، تعداد مهره‌های مورد استفاده

یکسان و زمان تماس برای همه ۱۶ ساعت در نظر گرفته شد. نتایج به‌دست آمده در شکل ۶ نشان داده که سرنگ ۲ میلی‌لیتری بهترین و مناسب‌ترین مهره‌ها را تولید می‌کند. مهره‌های حاصل از سرنگ ۲میلی‌لیتر پایداری بیشتری نسبت به مهره‌های حاصل از سرنگ ۵ میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌لیتر داشته ودر دوره‌های بیشتری قابل استفاده است.



شکل ۶- تأثیر قطر ریزدانه‌های آلژینات کلسیم در جذب نیکل به‌وسیله باکتری

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از باکتری تثبیت شده می‌تواند به علت استفاده مداوم در فرآیندهای صنعتی جایگزین استفاده از باکتری آزاد شود. باکتری *باسیلوس* مورد استفاده یک گونه باکتری میله‌ای شکل، گرم مثبت اسپوردار است که در محیط نوترینت آگار، کلونی‌های درشت، لعاب‌دار، برآمده و لزج شبیه قطرات شبنم ایجاد می‌کند که سرشار از پلیمرهای خارج سلولی است. برای دست‌یابی به میزان زیاد باکتری از محیط نمک معدنی گلوکز استفاده شد. مشخص شد که این باکتری ضمن رشد سریع، ماده لزج پلیمر خارج سلولی فراوانی تولید می‌کند به طوری‌که باعث افزایش ویسکوزیته محیط می‌شود و یک حالت ژله‌ای شکل خمیر مانندی به خود می‌گیرد. نتایج به دست آمده نشان داده که اگزوپلیمرهای ترشح شده از باکتری *باسیلوس* در افزایش میزان جذب فلز نیکل نقش مهمی دارد. باکتری مورد مطالعه دارای بیشینه جذب برای فلز نیکل برابر ۴۸ میلی‌گرم در گرم وزن خشک سلول است. در سطح باکتری و سطح آلژینیک اسید، حضور گروه‌های کربوکسیلیک به وسیله روش تحلیل اسپکتروسکوپی مادون قرمز[۹] در جذب فلز مشخص شد. با این روش باکتری بدون فلز و باکتری بعد از جذب فلز با تغییرات گروه‌های سطحی، نقش آن گروه‌ها را در جذب مشخص می‌کنند (۱۷). پژوهشگران دیگری نیز به نقش گروه‌های کربوکسیلیک به عنوان کلیدی‌ترین گروه در جذب فلز به‌وسیله باکتری‌ها اشاره کردند. از جمله هونگ و لیو[۱۰]، به جذب فلزات کادمیوم و سرب به وسیله باکتری *سودوموناس* و نقش اصلی گروه‌های کربوکسیلیک سطح دیواره آن اشاره کردند. این گروه‌ها با از دست دادن یک هیدروژن به شکل COO^- در می‌آیند و کاتیون‌ها از جمله کادمیوم، نیکل و سرب به آن‌ها متصل می‌شوند (۱۸).

مطالعه پژوهشگران نشان داد، جذب نیکل به وسیله باکتری آزاد جداسازی شده از تالاب انزی در حدود ۵ درصد است و در مقایسه با سلول‌های باکتریایی *سودوموناس* تثبیت شده کمتر است (۱۹). بررسی جاذب‌های زیستی دیگر نشان می‌دهد، میکروارگانیسمی مانند *ساکارومیسس سرویزیه* تثبیت شده با حامل‌های مختلف مانند آگار، آلژینات کلسیم و پلی آکریل آمید برای تثبیت سرب بیشتر از *ساکارومیسس سرویزیه* آزاد عمل می‌کند (۱۸- ۲۰). نقش اگزوپلیمرها ازجمله

اگزوپلی ساکاریدها در جذب فلزات سمی و سنگین بررسی و مشخص شد، بسیاری از اگزوپلیمرهای میکروبی در شرایط طبیعی به شکل پلی آنیون عمل می‌کنند. زیرا واجد گروه‌های آنیونی فراوانی هستند که میل ترکیبی بالایی با کاتیون‌های فلزی دارند. بنابراین، امروزه از آن‌ها برای جذب فلزات سمی و سنگین از محیط زیست استفاده می‌شود. اگزوپلیمر باکتریایی در جذب فلز نقش دارد، بطوری که اگزوپلیمر ریزوبیوم و ازتوباکتر در جذب فلز سرب مشخص شد (۲۰). همچنین، میزان جذب نیکل به وسیله باکتری تثبیت شده، بیشتر از میزان جذب آن به وسیله *باسیلوس* آزاد است. در تولید بیدها، برای تولید بید در بهترین حالت به محلول زیرین به میزان ۱۵ میلی‌لیتر اتانول و ۱ میلی‌لیتر اسیداستیک اضافه می‌شود. با استفاده از این ترکیبات که به محلول زیری اضافه می‌شود، ریزدانه‌ها واجد ویژگی‌های زیر می‌شوند:

الف- چسبندگی سلول‌ها به حداقل می‌رسد، به طوری که همانند دانه‌های تسبیح خیلی راحت از هم جدا می‌شوند؛ ب- ریزدانه‌های آلژیناتی ایجاد شده واجد شفافیت بیشتر می‌شود.

البته پژوهش‌های بیشتر و دقیقی در این زمینه باید انجام شود تا زوایای پنهان این پژوهش مشخص شود (۱۹ و ۲۰). از جمله مطالعات با میکروسکوپ الکترونی[11] نگاره، برای بررسی ساختار سطحی و درونی آلژینات شاهد و آلژینات کلسیم واجد باکتری لازم است (۲۰). باید روشی استفاده شود تا توزیع همگن و مناسب باکتری در آلژینات ایجاد شود. در حال حاضر روش توزیع تصادفی باکتری در بیدهای آلژیناتی مورد استفاده است. این نوع آرایش باکتری در آلژینات به شکل اتفاقی است. همچنین، نیاز است علاوه بر آلژینات از ناقل‌های دیگر تثبیت مانند آگار، ژل پلی آکریل آمید و کیتوزان استفاده کرد و معایب و مزایای آن‌ها با آلژینات مقایسه شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Anil Kumar A., Harjinder S. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 2007; 18 (5): 240- 51.

(2) Begley M., Cormac G. M. Gahan., Colin Hill. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 2005; 29 (4): 625- 51.

(3) Klein J., Stock J., Vorlop K. D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate Biocatalysts. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology* 1983; 18 (2): 86- 91.

(4) Murata Y., Toniwa S., Miyamoto E., Kawashima S. Preparation of alginate gel beads containing chitosan salt and their function. *International Journal of Pharmaceutic*s 1999; 176 (2): 265- 68.

(5) Martinsen A., Skjak-Braek C., Smidsrod O. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 1989; 33 (1): 79- 89.

(6) Smidsrod O., Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 1990; 8 (3): 71- 8.

(7) Trau D., Rrnneberg R. Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer by layer film: immobilization and biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* 2003; 18 (2): 1491- 9.

(8) Scott C D. Immobilized cells: a review of recent literature. *Enzyme and Microbial Technology* 1987; 9 (2): 66- 73.

(9) Witter L. Immobilized microbial cells. In: Baianu IC., Pessen H., Kumosinski TF., editors. *Physical chemistry of food processes*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1996: 475- 86.

(10) Vassilev N., Vassileva M., Azcon R., Medina A. Application of free and Ca-alginate entrapped Glomus deserticola and Yarowia lipolytica in soil- plant system. *Journal of Biotechnology* 2001; 91 (2): 237-42.

(11) Park JK., Chang HN. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances* 2000; 18 (4): 303-19.

(12) Bickerstaff G. F. *Immobilization of Enzymes & Cells. Totawa*. NJ: Humana Press Inc; 1997.

(13) Ahmady-Asbchin S., Jafari N., Pourbabaei AA. Mechanism of Biosorption of Nickel Ions from Polluted effluent by *Bacillus* sp. Strain MGL-75. *Journal of Water and Wastewater* 2013; 2: 103- 9. (In Persian).

(14) Mofidi N., Aghai- Moghadam., Sarboluki M. N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry* 20003; 5 (9): 885- 8.

(15) Samuel J., Pulimi M., Paul L. M., Maurya A., Chandrasekaran N., Mukherjee A. Bath and continuous flow studies of adsorptive removal of Cr (II) by adapted bacterial consortia immobilized in alginate beads. *Bioresource Technology* 2013; 128: 423- 30.

(16) Ashengroph M. Isolation and characterization of a native strain of *Aspergillus niger* ZRS14 with capability of high resistance to zinc and its supernatant application towards extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (7): 29-45.

(17) Moon E. M., Peacock C. L. Adsorption of Cu (II) to ferrihydrite and ferrihydrite-bacteria composites: Importance of carboxyl group for Cu mobility in natural environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2012; 92 (1): 203- 19.

(18) Huang W., Liu Z. Biosorption of Cd (II) / Pb (II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies. *Colloids and Surfacess: B: Biointerfaces* 2013; 105: 113- 9.

(19) Khanafari A., Shirdam R., Tabatabaee A. Determination & isolation of bacteria with capacity of Cd, Ni and V heavy metals decrease from Anzali Wetland in order to do bioremediation. *Science and Environmental Engineering* 2007; 44: 27- 36 (In Persian).

(20) Soltaninezhad S., Emtiazi G., Mokhtari T. S. Uptake of heavy metals (lead and zinc) by bacterial extracellular polymers, *Microbial Biotechnology* 2011; 2 (7): 23- 8. (In Persian).

---

[1]- BDH Company
[2]- Glucose mineral salt (GMS)
[3]- $NiCl_26H_2O$
[4]- Atomic absorption Spectrometer (Chem. , Tech, Analytical CTA 2000 (
[5]- GMS (Glucose Mineral Salt)
[6]- Centrifuge model HERNLE Germany
[7]- n-Butanol
[8]- $CaCl_2$
[9]- Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)
[10]- Huang W, Liu Z
[11]- Scanning Electron Microscopy

Immobilization of *Bacillus* in calcium alginate beads for biosorption of nickel

Salman Ahmady-asbchin *
Associate Professor of Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, sahmadyas@yahoo.fr
Naser Jafari
Assistant Professor of Biology, Mazandaran University, Babolsar, Iran, n.jafari@umz.ac.ir
Hosna Moradi
M.Sc. Student of Microbiology. Ilam University, Ilam, Iran, ho.moradi1990@yahoo.com

Abstract

Introduction: Today the cells immobilization is a suitable method for reusing microorganisms and protecting them from direct changes in the physico-chemical factors in the environment.

Materials and methods: In this study, *Bacillus* cells were immobilized on calcium alginate. Among the methods immobilization ways, entrapment was used and on the other hand the drop method was used from the immobilization ways. Also, after producing fine *Bacillus* containing alginate, a *packed bed reactor*, was used to remove the metal nickel.

Results: This study showed that uptake of Nickel by *Bacillus* fixing calcium alginate was more compared with free *Bacillus* cell and bacteria-free calcium alginate. The percentage of the nickel uptake from the solution by calcium alginate, free bacillus and calcium alginate containing *Bacillus* are respectively 17.5, 29.5 and 47.5 percent.

Discussion and conclusion: By accepting that active groups of *Bacillus* have a major role in the uptake of toxic metals and most notably are the alginate carboxylic groups and the organisms containing these groups or used directly free of macromolecules containing these groups can be used.

Key words: Immobilization, Calcium alginate, Nickel, Biosorption, *Bacillus*

* Corresponding author
Received: July 22, 2013 / **Accepted:** December 11, 2013