Biological Removal of Mercury and Cadmium by Iron Oxidizing Bacteria Isolated from Aqueous Media

Sareh Farahani
Department of Microbiology, Faculty of Biology, Islamic Azad University- North Tehran Branch, Tehran, Iran, sare.farahani@gmail.com
Abbas Akhavanesepahi*
Department of Microbiology, Faculty of Biology, Islamic Azad University- North Tehran Branch, Tehran, Iran, akhavansepahy@gmail.com
Sayed Abbas Shojaosadati
Biotechnology Group, Chemical Engineering Department, Tarbiat Modarres University, P.O. Box 14155-4838, Tehran, Iran, shoja_sa@modares.ac.ir
Farzaneh Hosseini
Department of Microbiology, Faculty of Biology, Islamic Azad University- North Tehran Branch, Tehran, Iran, farzaneh953@yahoo.com

Abstract

Introduction: Due to the increasing trend of industrial development and also the industrial production, the presence of heavy metals along with industrial wastewater is undeniable. Despite the various ways to remove heavy metals, choosing biological methods can be the best way to control them. Using bacteria in this field can be very useful and inexpensive with less harm.

Materials and Methods: In the present study, various aquatic environments including rivers, ponds, industrial effluents, and activated sludge were sampled. Bacteria were identified based on the growth in iron-specific culture medium in terms of shape and 16S rRNA gene. These bacteria were cultured in specific culture media for iron-oxidizing bacteria, Luria-Bertoni (LB) and PHG II, containing 2 ppm of mercury chloride and cadmium chloride. The samples were then examined for the reduction or non-change of mercury and cadmium concentrations by atomic absorption spectrometry.

Results: The results of the present study showed that the isolated bacteria were rod-shaped and chemoorganotrophic belonging to the genus Bacillus. The average percentages of mercury and cadmium removal by the isolated bacteria were about 95% and 40%, respectively. The highest percentage of the removal of both heavy metals was observed in the effluent sample of iron factory wastewater.

Discussion and Conclusion: Iron oxidizing bacteria were identified as reducing agents of heavy metals in the laboratory environment. These bacteria grew in both LB medium and iron-specific culture medium. The highest percentage of the removal of both heavy metals was observed in the effluent sample of the iron processing plant. Based on the results, it can be said that the bacteria of each environment have adapted to the compounds of that place and are the best option to remove compounds such as heavy metals.

Key words: Biological Removal, Heavy Metals, Iron Oxidizing Bacteria, *Bacillus* Genus.

* Corresponding author
Received: July 29, 2020 / **Accepted:** December 11, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال یازدهم، شماره ۴۱، بهار ۱۴۰۱، صفحه ۳۱ - ۲۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۱
Doi: 10.22108/BJM.2020.123929.1308

حذف زیستی جیوه و کادمیوم توسط باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن جداشده از محیط‌های آبی

ساره فراهانی: دکتری میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، sare.farahani@gmail.com
عباس اخوان سپهی*: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، akhavansepahy@gmail.com
سید عباس شجاع‌السادات: استاد گروه بیوتکنولوژی، دپارتمان مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، shoja_sa@modares.ac.ir
فرزانه حسینی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، farzaneh953@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باتوجه‌به روند روزافزون پیشرفت صنایع و همچنین افزایش تولیدات صنعتی، تولید فلزهای سنگین همراه با فاضلاب‌های صنعتی، امری انکارناپذیر است و باوجود راه‌های مختلف برای حذف فلزهای سنگین، انتخاب روش‌های زیستی بهترین راه کنترل آنهاست؛ استفاده از باکتری‌ها در این زمینه بسیار مفید و کم‌هزینه است و مضرات کمتری دارد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، نمونه‌برداری از محیط‌های مختلف آبی شامل رودخانه، برکه، پساب صنعتی و لجن فعال انجام شد. باکتری‌ها بر اساس رشد در محیط‌کشت اختصاصی آهن و ازنظر شکل و ژن *16S rRNA* شناسایی شدند. باکتری‌های جداشده در محیط‌کشت‌های مایع اختصاصی آهن، لوریا-برتونی (LB) و پی‌اچ‌جی۲ (PHG II) حاوی غلظت 2ppm کلریدجیوه و کادمیوم کشت شدند؛ سپس نمونه‌ها از نظر کاهش یا تغییرنکردن غلظت جیوه و کادمیوم با دستگاه جذب اتمی بررسی شدند.

نتایج: باکتری‌های جداشده میله‌ای‌شکل و کموارگانوتروف اختیاری بودند و به جنس *باسیلوس* تعلق داشتند. میانگین درصد حذف جیوه و کادمیوم توسط باکتری‌های جداشده به‌ترتیب حدود ۹۵ و ۴۰ درصد بود. بیشترین درصد حذف هر دو فلز سنگین در نمونهٔ پساب کارخانهٔ فراوری آهن مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن به‌عنوان عوامل کاهش‌دهندهٔ فلزهای سنگین در محیط آزمایشگاهی شناسایی شدند. این باکتری‌ها در دو محیط LB و محیط‌کشت اختصاصی آهن رشد کردند. بیشترین درصد حذف هر دو فلز سنگین در نمونه پساب کارخانهٔ فراوری آهن مشاهده شد. بر اساس نتایج، باکتری‌های هر محیط با ترکیبات آن محل سازش یافته‌اند و بهترین گزینه برای حذف ترکیباتی همچون فلزهای سنگین هستند.

واژه‌های کلیدی: حذف زیستی، فلزهای سنگین، باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن، جنس *باسیلوس*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

مقدمه

باتوجه‌به روند روزافزون پیشرفت صنایع و افزایش محصولات صنعتی، تولید فلزهای سنگین و ورود آنها به پساب صنعتی، امری انکارناپذیر است (۱)؛ این ترکیبات، سمی و تجزیه‌ناپذیر هستند (۲). فلزهای سنگین همچون آرسنیک در مقادیر بسیار اندک نیز سمی هستند (۳). ذوب فلزها، فعالیت‌های صنعتی، کشاورزی، داروسازی و فاضلاب‌های خانگی از منابع تولیدکنندهٔ فلزهای سنگین هستند (۶-۴). پدیده‌هایی مانند فرسایش خاک، خردشدن سنگ‌ها و فوران آتشفشان از عوامل طبیعی افزایش فلزهای سنگین هستند (۸-۴). فلزهای سنگین، عناصر کمیاب در نظر گرفته می‌شوند؛ زیرا در غلظت‌های بسیار کم (ppb[1] تا کمتر از ۱۰ppm[2]) در محیط وجود دارند (۹). وجود فلزهای سنگین به‌ویژه در پساب کارخانه‌های صنعتی و نبود تصفیهٔ مناسب سبب ورود آنها به محیط‌زیست می‌شود. گزارش‌های متعددی مبنی بر تأثیر فلزهای سنگین روی سیستم‌های زیستی منتشر شده‌اند (۱۰). باتوجه‌به تأثیر این ترکیبات روی محیط‌زیست و سلامتی موجودات زنده، روش‌های مختلفی برای حذف آنها استفاده شده‌اند. فناوری‌های صنعتی مانند اسمز معکوس، تبخیر، تعویض یون و رسوب‌دهی شیمیایی اغلب پرهزینه و نامناسب هستند؛ بنابراین، جایگزینی فناوری‌های صنعتی با روش‌های مناسب و ارزان مانند جذب یا حذف زیستی فلزهای سنگین بسیار جالب توجه است (۱۱). جیوه و کادمیوم از فلزهای سنگین بسیار سمی هستند. مقادیر اندک جیوه برای تمام موجودات زنده سمی و خطرناک است. برخی از باکتری‌های ساکن مناطق آلوده به‌علت تماس زیاد با غلظت سمی جیوه طی پدیدهٔ هم‌یوغی و انتقال ترانسپوزون بین یکدیگر در برابر آثار سمی جیوه مقاوم می‌شوند (۱۲). در باکتری‌ها، مقاومت در برابر جیوه به‌واسطهٔ اپرون mer ایجاد می‌شود. منابع اصلی کادمیوم رهاشده در فاضلاب عبارتند از: ساخت پلاستیک، تولید کود، باطری‌سازی و لعاب‌کاری (۱۳). استفاده از باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها، گیاهان و آبزیان برای حذف زیستی فلزهای سنگین مدنظر پژوهشگران است. پژوهشگران در بین موجودات زنده، بارها نقش باکتری‌ها را در حذف یا جذب فلزهای سنگین بررسی کرده‌اند. لیو[3] و همکاران مقاومت به آرسنیک توسط باکتری‌های جداشده از شیر آب و لوله‌های آهنی زنگ‌زده را بررسی کردند؛ باکتری‌های شناسایی‌شده به جنس *سودوموناس* تعلق داشتند (۱۴). یوآنیس[4] و همکاران (۲۰۰۶) حذف توأم آرسنیک از آب‌های زیرزمینی را با استفاده از باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن-منگنز انجام دادند؛ این باکتری‌ها، *Gallionella ferruginea* و *Leptothrix ochracea* بودند که به‌شکل کاتالیزور، سرعت تبدیل آرسنیک III به V را افزایش می‌دهند (۱۵). شامیر[5] و چینتالا[6] حذف مس، سرب و کادمیوم به‌وسیلهٔ گونهٔ *باسیلوس* را بررسی کردند (۱۶). حذف جیوه به کمک باکتری‌های رودخانهٔ کر شامل *E. coli*، *Serratia marcescens*، *Pseudomonas* sp. و *Bacillus* sp. انجام شده است (۱۷). محمدزاده[7] و همکاران (۲۰۱۴) جذب زیستی کادمیوم و نیکل توسط باکتری‌های جداشده از خاک آلوده به لجن فاضلاب را بررسی کردند. باکتری‌های جداشده، جنس‌های *باسیلوس*، *استافیلوکوکوس* و *اکتینومیسس* بودند (۱۸). در پژوهش‌های گوناگون، باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن بررسی شده‌اند و قابلیت‌های مختلف آنها در پالایش زیستی (۱۹)، فروشویی زیستی (۲۰) و حذف فلزهای سنگین (۱۴) اثبات شده است.

هدف پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های دارای ویژگی اکسیداسیون آهن و استفاده از آنها برای حذف فلزهای جیوه و کادمیوم است. باکتری‌های مدنظر از محیط‌های آبی شامل رودخانه، برکه و پساب صنعتی جدا شدند؛ این باکتری‌ها تحت‌تأثیر 2ppm دی‌اکسیدجیوه و دی‌اکسیدکادمیوم در محیط‌های کشت مایع اختصاصی آهن، LB و PHG II قرار گرفتند و میزان حذف ترکیبات یادشده با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. به‌منظور شناسایی دقیق آنها، ژن *16S rRNA* نمونه‌های مناسب شامل پساب کارخانهٔ فراوری آهن و پساب صنعتی تصفیه‌شده بررسی شدند و درخت فیلوژنتیکی مربوط به آنها رسم شد.

مواد و روش‌ها

مواد: تمام مواد استفاده‌شده در پژوهش حاضر به شرکت مرک[۸] آلمان تعلق داشتند.

جمع‌آوری نمونه‌های آب: نمونه‌های آب همراه با رسوب از رودخانه‌ها، لجن فعال، کارخانهٔ آهن، پساب صنعتی تصفیه‌شده و برکه جمع‌آوری شدند (شکل ۱). نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و تا زمان کشت، در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. ویژگی‌های نمونه‌ها در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

شکل ۱- تصاویر محل‌های نمونه‌برداری

جدول ۱- نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف ایران

منابع	تاریخ	مکان جغرافیایی	اسیدیته	دما (درجهٔ سانتی‌گراد)
لجن فعال	۲۰۱۷/۵/۸	51°28′35″N, 35°49′13″E	۷	۲۰
رودخانهٔ گردو	۲۰۱۷/۱/۵	49°41′26″N, 34°41′9″E	۶	۱۰
رودخانهٔ جادهٔ هراز	۲۰۱۷/۲/۲۱	52°31′58″N, 13°23′8″E	۸	۹
پساب کارخانهٔ فراوری آهن	۲۰۱۷/۲/۵	34° 8′ 22″ N, 50° 3′ 35″ E	۷	۱۲
برکهٔ محلات	۲۰۱۷/۱/۲۰	33°58′44″N, 58°33′36″E	۷	۱۲
پساب صنعتی تصفیه‌شده	۲۰۱۷/۲/۳	50°13′7″N, 34°59′13″E	۷	۲۰

کشت و تلقیح میکروبی: به‌منظور کشت باکتری‌ها از محیط‌کشت اکسیدکنندهٔ آهن استفاده شد؛ این محیط در حجم یک لیتر به‌شکل ۷۰۰ میلی‌لیتر حاوی ترکیبات ۳ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵ گرم K_2HPO_4، ۰/۵ گرم $MgSO_4{\cdot}7H_2O$، ۰/۱ گرم KCl، ۰/۰۱ گرم $Ca(NO_3)_2$ و ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ تهیه شد. به‌منظور آماده‌کردن محلول سولفات‌آهن، مقدار ۴۴/۲۲ گرم $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ استفاده شد. محیط‌کشت PHG II در

حجم یک لیتر حاوی ۴ گرم پپتون، ۲ گرم گلوکز و ۱ گرم عصارهٔ مخمر تهیه شد. محیط‌کشت LB نیز تهیه شد. تمام محیط‌های کشت به‌شکل مایع و جامد ساخته شدند (به‌منظور آماده‌کردن محیط‌های جامد، ۱۵ گرم‌درلیتر آگار اضافه شد) و اسیدیتهٔ آنها روی ۷ تنظیم شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. پس‌از استریل‌کردن محیط‌کشت و به‌منظور کشت باکتری، نمونه‌های آب به مقدار ۱ میلی‌لیتر درون محیط اختصاصی آهن تلقیح شدند. پس‌از تلقیح، محیط‌های کشت به‌مدت دو هفته درون شیکر- انکوباتور با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دوردردقیقه (کی‌اس۴۰۰۰آی کنترل، ایکا، آلمان) نگهداری شدند (شکل ۲). پس‌از دو هفته، مقدار ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های درون محیط مایع برداشت و درون پلیت (محیط جامد) کشت شد.

مشاهده با میکروسکوپ: باکتری‌ها پس‌از رنگ‌آمیزی گرم و نکروزین با میکروسکوپ نوری (نیکون آلفافوتو-۲ وای اس۲) مشاهده شدند. به‌منظور بررسی باکتری‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (ZEISS, SIGMA VP-500)، محیط‌های مایع حاوی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن با دستگاه فریز درایر جامد شدند.

واکنش با پتاسیم‌فروسیانید: به‌منظور بررسی وجود آهن فریک در باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن از ترکیب پتاسیم‌فروسیانید استفاده شد؛ به این منظور، کلنی باکتری‌های یادشده روی فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری پخش و در دمای اتاق خشک شد. فیلتر همراه با باکتری‌ها به محلول پتاسیم‌فروسیانید ۵ درصد آغشته و به‌مدت ۱۰ دقیقه گرماگذاری شد؛ پس‌ازآن، کاغذ فیلتر پاکیزه روی نمونه‌ها قرار داده شد و سپس هیدروکلریک‌اسید (HCl) ۵ درصد روی آن ریخته شد. ظاهرشدن رسوب آبی‌رنگ پتاسیم نشان‌دهندهٔ حضور یون فریک بود. هیدروکلریک‌اسید سبب القای انحلال یون فریک می‌شود (۲۱).

فلزهای سنگین: به‌منظور بررسی تأثیر جیوه وکادمیوم از محیط‌کشت‌های حاوی آهن، LB و PHG II استفاده شد. محیط‌های یادشده در حجم ۱۰ میلی‌لیتر درون فلاسک تهیه شدند. درون هر فلاسک، مقدار 2ppm کلریدکادمیوم و کلریدجیوه به‌طور جداگانه اضافه شد. پس‌از تلقیح ۵ نمونه درون محیط‌های حاوی کادمیوم و جیوه، آنها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰ دوردردقیقه گرماگذاری شدند. پس‌از ۱۰ روز از کشت، میزان فلزهای یادشده با دستگاه جذب اتمی (YOUNGLIN AAS 8020) اندازه‌گیری شد.

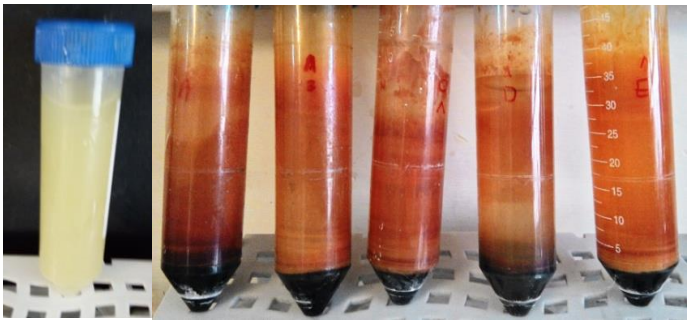
بررسی مولکولی *16S rRNA*: باتوجه‌به شباهت ویژگی‌ها و مشخصات کلنی‌ها، ۲ نمونهٔ مربوط به پساب صنعتی تصفیه‌شده و پساب کارخانهٔ فراوری آهن برای شناسایی ژن *16S rRNA* بررسی شدند؛ DNA این باکتری‌ها طبق روش مارمور[9] (۱۹۶۱) استخراج و خالص شد (۲۲). ژن‌های *16S rRNA* بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگر عمومی باکتری‌ها 27F (۵AGAGTTTGATCMTGGCTCAG۳) و 1492R (۵GGTTAMLTTGTTACGACTT۳) تکثیر شدند. مرکز ذخایر زیستی ایران (IBRC) تمام مراحل استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و توالی‌یابی را انجام داد. شرکت بایونیر کشور کره (Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers Sequencing) این ژن را بر اساس روش سانجر[10] توالی‌یابی کرد. توالی‌ها در سایت Ezbiocloud.net بلاست شدند و در پایان، درخت فیلوژنتیکی برای آنها رسم شد.

نتایج

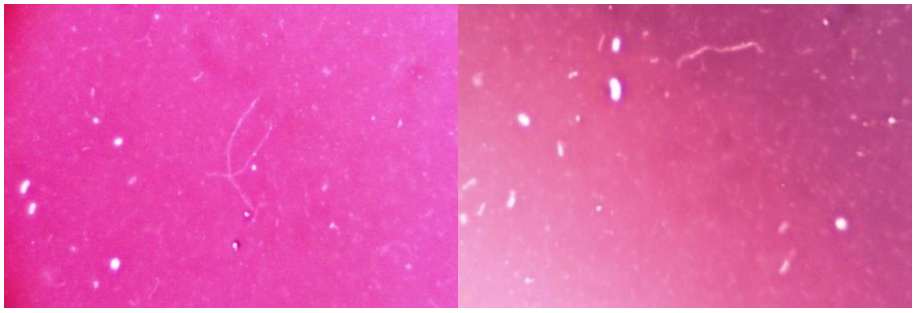
در پژوهش حاضر، اثر باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن روی فلزهای سنگین جیوه و کادمیوم بررسی شد. این باکتری‌ها از اکوسیستم‌های آبی گوناگون شامل رودخانه، پساب کارخانهٔ آهن، برکه (شهر محلات) و پساب صنعتی تصفیه‌شده جدا و خالص شدند. باکتری‌های جداشده به‌طور جداگانه به محیط‌های حاوی 2ppm کادمیوم و جیوه تلقیح شدند. محیط‌های حاوی کادمیوم و جیوه شامل LB، PHGII و محیط اختصاصی آهن بودند. میزان حذف فلزهای یادشده توسط باکتری‌ها با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد.

پس‌از دو هفته، باکتری‌های آهن با تغییر رنگ محیط‌کشت، واکنش اکسیدآهن را نشان دادند (شکل ۲)؛ این تغییر رنگ نشان‌دهندهٔ رشد آنها نیز بود.

مشاهده‌های میکروسکوپی: رنگ‌آمیزی با نگروزین، شکل میله‌ای را در باکتری‌های پساب کارخانهٔ آهن و فاضلاب صنعتی تیمارشده نشان داد (شکل ۳).

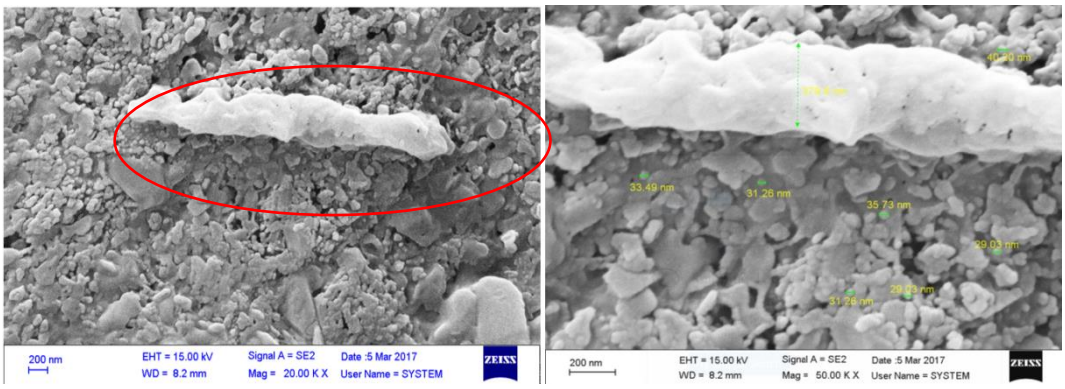


شکل ۲- نمونه‌های تلقیح‌شده در محیط مایع پس‌از دو هفته گرماگذاری؛ تغییررنگ محیط‌کشت بیان‌کنندهٔ انجام واکنش اکسیداسیون آهن محیط توسط باکتری‌های آهن است. شکل سمت راست، محیط‌کشت بدون باکتری را نشان می دهد و میزان تغییر رنگ نشان‌دهندهٔ واکنش باکتری در محیط است.



شکل ۳- تصویر مربوط به رنگ‌آمیزی نگروزین؛ نمونهٔ جداشده از فاضلاب صنعتی تیمارشده (سمت راست) و پساب کارخانهٔ فراوری آهن (سمت چپ)

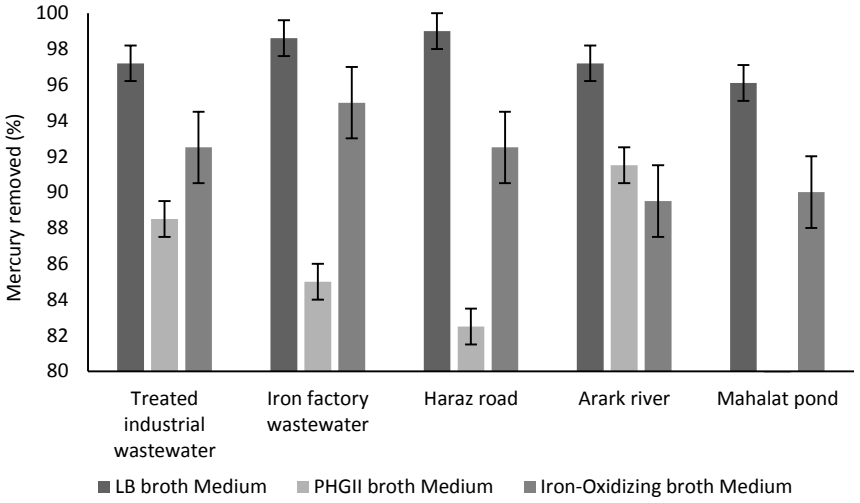
میکروسکوپ الکترونی روبشی: در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، میله‌ای‌بودن باکتری‌ها و سنتز نانوذرات توسط آنها مشاهده شد. در شکل ۴، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به باکتری جداشده از پساب فراوری آهن نشان داده شده است.



شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونهٔ جداشده از پساب فراوری آهن

فلزهای سنگین

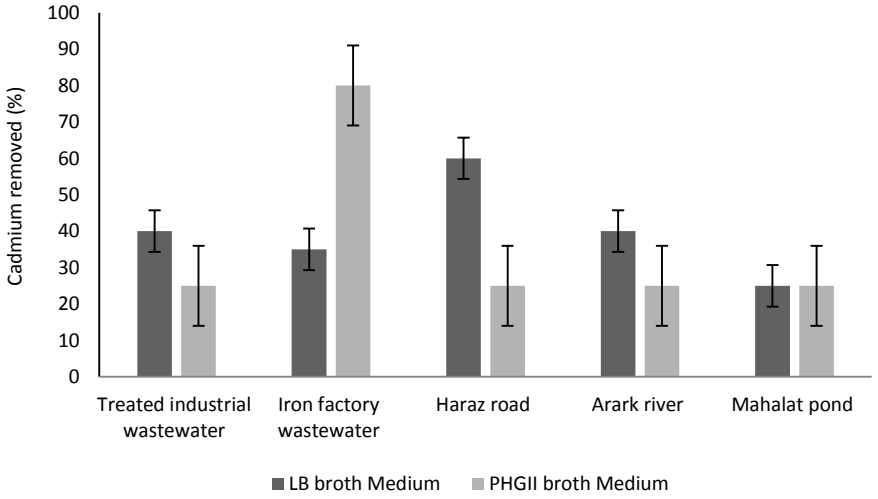
نمودار مربوط به فلز جیوه: شکل ۵ نشان می‌دهد باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن مربوط به پنج ناحیهٔ نمونه‌برداری در سه محیط‌کشت LB، IOM و PHGII در کاهش جیوهٔ اضافه‌شده به محیط‌های کشت نقش داشته‌اند و کاهش جیوه در محیط‌کشت‌های LB، IOM و PHGII به‌ترتیب ۱۰۰-۹۰، ۱۰۰-۹۰ و ۹۰-۸۰ درصد بوده است. بررسی محیط‌کشت‌های مربوط به پنج ناحیهٔ نمونه‌برداری در حذف جیوه (شکل ۵) را می‌توان به شرح زیر بیان کرد: باکتری‌های هر پنج ناحیه بیشترین درصد حذف جیوه را به‌ترتیب در محیط‌های LB، IOM و PHGII نشان دادند؛ البته در نمونهٔ باکتری‌های رودخانهٔ شهر اراک، درصد حذف جیوه در محیط PHGII بیشتر از IOM بود. باتوجه‌به این تفاسیر، بیشترین درصد حذف جیوه به باکتری‌های جداشده از پساب کارخانهٔ فراوری آهن مربوط است که به‌طور متوسط، حدود ۹۵ درصد از جیوهٔ موجود در محیط‌کشت را حذف کرده‌اند. گفتی است میزان حذف جیوه توسط باکتری‌های هر پنج ناحیه در محیط‌کشت LB نسبت به دو محیط‌کشت دیگر بیشتر است.



شکل ۵- نمودار حذف فلز جیوه توسط ۵ نمونه باکتری جداشده از پنج محل نمونه‌برداری

نمودار مربوط به فلز کادمیوم: باتوجه‌به شکل ۶، باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن مربوط به پنج ناحیهٔ نمونه‌برداری در دو محیط‌کشت LB و PHGII در کاهش کادمیوم اضافه‌شده به محیط نقش داشته‌اند و کاهش کادمیوم در محیط‌کشت‌های LB، IOM و PHGII به‌ترتیب ۶۰-۲۰، بدون تغییر و ۸۰-۲۰ بوده است. بررسی محیط‌کشت‌های مربوط به پنج ناحیهٔ نمونه‌برداری در حذف کادمیوم (شکل ۶) را می‌توان به شرح زیر بیان کرد: برکهٔ محلات، هر دو محیط LB و PHGII به‌طور یکسان و پساب کارخانهٔ فراوری آهن، محیط PHGII بیشتر از LB و رودخانهٔ شهر اراک، رودخانهٔ واقع در جادهٔ هراز و پساب صنعتی تصفیه‌شده، محیط LB بیشتر از PHGII است. باتوجه‌به این تفاسیر، بیشترین درصد حذف کادمیوم به باکتری‌های جداشده از پساب کارخانهٔ فراوری آهن مربوط است. گفتنی است در سایر نمونه‌ها، میزان حذف کادمیوم در محیط PHGII یکسان و حدود ۲۰ درصد است. بررسی نمودار نشان می‌دهد درصد تقریبی حذف کادمیوم در محیط‌های LB و PHGII به‌ترتیب ۴۰ و ۳۰ درصد است؛ بر اساس این، درصد حذف کادمیوم در محیط LB بیشتر است.

نتایج توالی‌یابی *16S rRNA*: باکتری‌های شناسایی‌شده، محل جداسازی و نتایج بلاست آنها در جدول ۲ ذکر شده است.

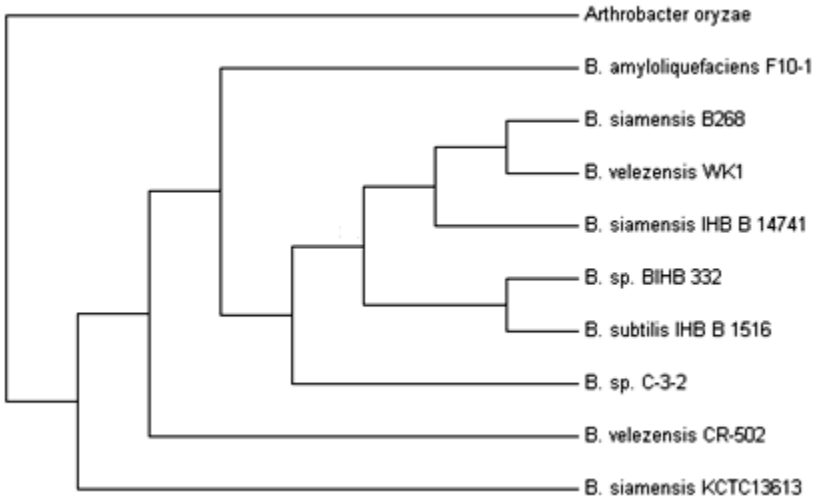


شکل ۶- نمودار حذف فلز کادمیوم توسط ۵ نمونه باکتری جداشده از پنج محل نمونه‌برداری

جدول ۲- باکتری‌های شناسایی‌شده بر اساس توالی‌یابی ژن *16S rRNA*

محل جداسازی	سویه	درصد تشابه	شماره دسترسی
فاضلاب صنعتی تیمارشده	*Bacillus siamensisKCTC13613(T)*	۹۹/۶	AY603658
پساب کارخانهٔ فراوری آهن	*Bacillus velezensisCR-502(T)*	۹۹/۸	AJVF0100004300043

درخت فیلوژنتیکی: درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده با برنامهٔ مگا ۷ (شکل ۷) به باکتری‌های *Bacillus siamensis* KCTC 13613(T) و *Bacillus velezensis* CR-502(T) جداشده از فاضلاب صنعتی تیمارشده و پساب کارخانهٔ فراوری آهن مربوط است.



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده با نرم‌افزار مگا ۷ مربوط به دو باکتری *Bacillus siamensis* KCTC 13613(T) و *Bacillus velezensis* CR-502(T) با ویرایش neighbor-joining phylogenetic tree of *16S rRNA*

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش فلزهای سنگین، هشداری برای حیات انسان و جانداران است. باتوجه‌به روند روزافزون پیشرفت صنایع و همچنین افزایش تولیدات صنعتی، وجود فلزهای سنگین همراه با فاضلاب‌های صنعتی، امری انکارناپذیر است. باتوجه‌به وجود راه‌های مختلف برای حذف فلزهای سنگین، انتخاب روش‌های زیستی بهترین راهکار کنترل آنها به شمار می‌آید؛ روش‌های زیستی شامل استفاده از ریزموجودات است. استفاده از باکتری‌ها در این زمینه بسیار مفید وکم‌هزینه است و مضرات کمتری دارد.

در پژوهش حاضر، باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن به‌عنوان عوامل کاهندهٔ فلزهای سنگین بررسی شدند. باکتری‌های مدنظر از محیط‌های آبی مختلف جدا شدند. باکتری‌های جداشده در پژوهش حاضر، در دو محیط LB و محیط‌کشت اختصاصی آهن کشت شدند و در هر دو محیط رشد کردند. مقایسهٔ محیط‌کشت‌ها نشان داد باکتری‌ها در هر دو نوع محیط‌کشت آلی و معدنی قابلیت رشد دارند؛ ازاین‌رو می‌توان نتیجه گرفت این باکتری‌ها کموارگانوتروف اختیاری هستند. باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن به اکسیژن وابسته هستند و رشد این باکتری‌ها در محیط‌کشت اختصاصی آهن بسیار درخور توجه است؛ مبارک[11] و همکاران (۲۰۱۶) و لیو و همکاران (۲۰۱۷) تنها از این محیط برای جداسازی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن استفاده کرده‌اند (۲۴ و ۲۵). طبق نتایج فیلوژنتیکی به‌دست‌آمده، این باکتری‌ها از گروه پروتئوباکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن، لیتوتروف و نوتروفیل هستند (۲۶). در پژوهش حاضر مشابه پژوهش لیو و همکاران (۲۰۱۳)، باکتری‌های شناسایی‌شده ویژگی‌های متنوعی را نشان دادند (۲۶). باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن که تاکنون شناسایی شده‌اند، رشته‌ای یا میله‌ای هستند (۱۴ و ۱۵). در پژوهش حاضر مشابه پژوهش شامیر و چینتالا (۲۰۱۵)، باکتری‌های جداشده میله‌ای‌شکل و به *باسیلوس*ها متعلق بودند. سویه‌های جداشده *Bacillus velezensis* CR-502(T) و *Bacillus siamensis*

KCTC 13613(T) بودند و به‌ترتیب از فاضلاب صنعتی تصفیه‌شده و پساب کارخانهٔ فراوری آهن جدا شدند. در پژوهش قربان‌زاده[۱۲] و همکاران (۲۰۱۳)، ۳ باکتری از باکتری‌های جداشده از خاک‌های آهکی انتخاب شدند و ژن *16S rRNA* آنها مشخصه‌یابی شد. بر اساس نتایج آنها، تمام سویه‌های جداشده به جنس *باسیلوس* متعلق بودند و توانستند Fe^{3+} را به Fe^{2+} کاهش دهند (۲۳). در پژوهش حاضر نیز *باسیلوس*‌های جداشده در محیط اختصاصی آهن رشد کردند (۲۳). این باکتری‌ها را می‌توان از محیط‌های مختلف مانند منابع آبی، معادن و خاک جدا کرد (۱۴، ۱۶، ۲۳ و ۲۴). در پژوهش حاضر، باکتری‌های آهن از انواع محیط‌های آبی شامل رودخانه، فاضلاب صنعتی تصفیه‌شده، برکه (آب راکد) و پساب کارخانه جدا شدند؛ این باکتری‌ها از نمونهٔ لجن فعال جدا نشدند.

باکتری‌های بررسی‌شده واکنش قابل‌قبولی نسبت به جیوه وکادمیوم داشتند. در سه نوع محیط‌کشت متفاوت شامل LB، PHG II و محیط اختصاصی آهن، مقدار یکسانی جیوه (2ppm) اضافه شد و باتوجه‌به شکل ۵، بیشترین و کمترین درصد حذف به‌ترتیب به محیط‌های LB و PHG II تعلق داشت. حذف بیشینه در محیط LB براث ممکن است به‌علت غنی‌بودن این محیط باشد. باتوجه‌به شکل‌های ۵ و ۶ می‌توان گفت محیط انتخابی برای باکتری‌های یادشده به‌منظور حذف فلزهای جیوه و کادمیوم، محیط LB براث است. کادمیوم هم به مقدار 2ppm به محیط‌های یادشده اضافه شد. بیشترین درصد حذف کادمیوم به محیط PHG II مربوط بود و در محیط اختصاصی آهن، تغییری در مقدار کادمیوم مشاهده نشد و صفر در نظر گرفته شد. کفیل‌زاده[۱۳] و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تأثیر حذف جیوه توسط باکتری‌های رودخانهٔ کر از محیط PHGII استفاده کردند (۱۷).

باتوجه‌به حذف چشمگیر جیوه توسط این باکتری‌ها، توانایی رشد آنها در محیط حاوی جیوه درخور توجه است؛ زیرا در محیط‌کشت حاوی جیوه، کلنی‌های باکتری مشاهده شدند. در پژوهش حاضر، پتانسیل باکتری‌های جداشده در حذف جیوه و کادمیوم بسیار چشمگیر بود. در پژوهش‌های مشابه، لیو و همکاران (۲۰۱۳) حذف آرسنیک توسط *سودوموناس* (۱۴) و شامیر و چینتالا (۲۰۱۵) حذف مس، سرب و کادمیوم توسط گونهٔ *باسیلوس* (۱۶) را بررسی کردند .

حذف فلزهای سنگین جیوه و کادمیوم به کمک باکتری‌های ساکن همان محیط از دیگر مزایای پژوهش حاضر است؛ زیرا محیط‌هایی مانند فاضلاب کارخانه یا فاضلاب صنعتی مقادیر زیادی از انواع فلزهای سنگین دارند و وجود این باکتری‌ها به‌طور طبیعی در چنین محیط‌هایی سبب پاک‌سازی زیستی آنها می‌شود؛ بنابراین می توان نتیجه گرفت بهترین و آسان‌ترین روش برای حذف ترکیبات مضر از چنین محیط‌هایی، استفاده از پتانسیل اکولوژیکی همان محیط است. باتوجه‌به نتایج، نمونهٔ فاضلاب صنعتی (IW) نسبت به سایر نمونه‌های بررسی‌شده، باکتری‌های توانمندی در حذف جیوه دارد و می‌توان گفت باکتری‌های هر محیط باتوجه‌به ترکیبات آن محل سازش و افزایش می‌یابند تا تعادل اکولوژیکی آن محیط حفظ شود؛ علاوه‌براین، بهترین گزینه برای حذف ترکیباتی همچون فلزهای سنگین، استفاده از باکتری‌های همان محیط است.

باکتری‌های جداشده در پژوهش حاضر از جنس *باسیلوس* بودند. باتوجه‌به قابلیت‌های متعدد این باکتری‌ها در زمینهٔ زیست‌فناوری و همچنین کشت و تکثیر آسان

آنها، کاربرد این باکتری‌ها در حذف انواع فلزهای سنگین باید مدنظر پژوهشگران قرار گیرد؛ باتوجه‌به نتایج، بیشترین تأثیر این باکتری‌ها روی جیوه به دست آمد. تمام باکتری‌های جدا شده از محیط‌های مختلف سبب کاهش مقدار کادمیوم شدند؛ علاوه‌براین، میزان کاهش کادمیوم در محیط LB بیشتر از محیط حاوی آهن بود و بر اساس این، باکتری‌های جداشده کموارگانوتروف اختیاری هستند. بر اساس توالی‌یابی ژن‌های *16S rRNA*، باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن که از محیط‌های (نمونه‌های) فاضلاب صنعتی تصفیه‌شده و فاضلاب کارخانهٔ آهن جدا شدند، به‌ترتیب به *Bacillus siamensis* KCTC 13613(T) و *Bacillus velezensis* CR-502(T) تعلق دارند. مطالعهٔ تأثیر حذف فلزهای سنگین توسط باکتری‌ها در محیط‌های متنوع وجه تمایز پژوهش حاضر نسبت به سایر پژوهش‌های مشابه است؛ علاوه‌براین، استفاده از *باسیلوس*‌های اکسیدکنندهٔ آهن برای حذف فلزهای مضری همچون کادمیوم از محیط‌زیست بسیار اهمیت دارد.

References

(1) Wu B., Wang G., Wu J., Fu Q., Liu C. Sources of heavy metals in surface sediments and an ecological risk assessment from two adjacent plateau reservoirs. *PLoS ONE* 2014; 9(7): e102101.

(2) Balkhair KS., Ashraf MA. Field accumulation risks of heavy metals in soil and vegetable crop irrigated with sewage water in western region of Saudi Arabia. Saudi *Journal of Biological Sciences* 2016; 23(1): 32-44.

(3) Duffus JH. Heavy metals-a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry* 2002; 74(5): 793-807.

(4) Fergusson JE. *The heavy elements: Chemistry, environmental impact and health effects*. 1st ed. Oxford: Pergamon Press; 1990.

(5) Bradl H. *Heavy metals in the environment: Origin, interaction and remediation*. 1st ed. London: Academic Press; 2005.

(6) He ZL., Yang XE., Stoffella PJ. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2005; 19(2–3): 125-140.

(7) Shallari S., Schwartz C., Hasko A., Morel JL. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Science of the Total Environment* 1998; 19209: 133-142.

(8) Nriagu JO. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 1989; 338: 47-49.

(9) Kabata- Pendia A., Pendias H. *Trace elements in soils and plants*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001.

(10) Wang S., Shi X. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2001; 222: 3-9.

(11) Gavrilescu M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences* 2004; 4(3): 219-232.

(12) Nascimento AMA., Chartone Souza E. Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research* 2003; 2(1): 92-101.

(13) Kefala M., Zouboulis A., Matis K. Biosorption of cadmium ions by Actinomycetes and separation by flotation. *Environmental Pollution* 1999; 104(2): 283-293.

(14) Liu Q., Guo H., Li Y., Xiang H. Amllimation of arsenic-resistant Fe(II)-oxidizing bacteria in aqueous environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013; 76: 86-91.

(15) Katsoyiannis IA., Zouboulis AI. Use of iron-and manganese-oxidizing bacteria for the combined removal of iron, manganese and arsenic from contaminated groundwater. *Water Quality Research Journal* 2006; 41(2): 117-129.

(16) Syed S., Chinthala P. Heavy metal detoxification by different *Bacillus* species isolated from solar salterns. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica* 2015; https://doi.org/10.1155/2015/319760.

(17) Kafilzadeh F., Mirzaei N., Kargar M., Kargar M. Evaluation of biological removal efficiencies of mercury by the Kor river bacteria. International Journal of Environmental Science and Technology 2009; 40.

(18) Mohammadzadeh Karkaragh R., Chorom M., Motamedi H., Mohabat A., Biosorption and bioamlumulation of Cd and Ni in competitive solution by three bacteria isolated from polluted soils to sewage sludge. *Journal of Microbial World*2014; 7(3): 241-251.

(19) Richmond WR., Loan M., Morton J., Parkinson GM. Arsenic removal from aqueous solution via ferrihydrite crystallization control. *Environmental Science and Technology* 2004; 38: 2368-2372.

(20) Rawlings DE. Relevance of cell physiology and genetic adaptability of biomining microorganisms to industrial processes. In: Rawlings DE., Johnson DB., editors. *Biomining*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2007: 177-198.

(21) Qureshi M., Varshney KG. Selective determination of iron by potassium cyanide-potassium ferrocyanide reagent. *American Chemical Society Publications* 1967; 39(8): 10341035.

(22) Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of Molecular Biology 1961; 3: 208-218.

(23) Ghorbanzadeh N., Lakzian A., Haghnia GH., Karimi, AR. Isolation and identification of ferric reducing bacteria and evaluation of their roles in iron availability in two calcareous soils. *Journal of Eurasian Soil Science* 2014; 47: 1266-1273.

(24)Mubarok, M.Z., Winarko, R, Chaerun S.K., Rizki, I.N., Ichlas, Z.T., 2016. Improving gold recovery from refractory gold ores through biooxidation using iron-sulfur-oxidizing/sulfur-oxidizing mixotrophic bacteria. Journal of Hydrometallurgy, online at http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.10.018.

(25)Liu, H., Gu, T., Asif, M., Zhang, G., Liu, H., 2017. The corrosion behavior and mechanism of carbon steel induced by extracellular polymeric substances of iron-oxidizing bacteria. Journal of Corrosion Science 114, 102–111

(26) Emerson, D., Fleming, E.J. & McBeth, J.M., 2010. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. Journal of Annual Review of Microbiology 64, 561-583.

---

[1]- parts-per-billion (ppb, 10^{-9})
[2]- parts-per-million (ppm, 10^{-6})
[3]- Liu
[4]- Ioannis
[5]- Shameer
[6]- Chinthala
[7]- Mohammadzadeh
[8]- Merck
[9]- Marmur
[10]- Sanger sequencing
[11]- Mubarok
[12]- Ghorbanzadeh
[13]- Kafilzadeh