



## حذف نیکل به وسیله باکتری ویرجی باسیلوس جدا شده از چشمه باداب سورت و بهینه سازی مؤلفه های جذب

سلمان احمدی اسبچین

دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران

پیام نگار: sahmadyas@yahoo.fr

### چکیده

اساس این تحقیق بر نمونه برداری از بخش های مختلف چشمه باداب سورت ساری، شامل آب، خاک و لجن استوار است. تأثیر مؤلفه هایی نظیر pH، زمان تماس، مقدار زیست توده باکتریایی و غلظت اولیه یون فلزی نیکل بر میزان جذب بررسی شد. زمان تعادل نهایی در این آزمایش برابر هشت ساعت بوده؛ اما در نیم ساعت اولیه بیشترین جذب انجام گرفته و pH بهینه در حدود هشت بوده است. همدمایی حذف یون از معادله مدل لانگمویر تبعیت کرده و بیشینه ظرفیت جذب یون فلزی مذکور به مقدار ۰/۵۱ میلی مول بر گرم وزن خشک سلول، ثابت لانگمویر ۴۹/۰۱،  $R^2$  در حدود ۰/۹۹۴ بوده است. با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) زیست توده باکتریایی به تنهایی و زیست توده به همراه فلز مشخص شد، گروه های کربوکسیل، هیدروکسیل و آمین، گروه های اصلی درگیر در فرایند جذب هستند. سویه باکتری مورد مطالعه، میله ای شکل، رشته ای، گرم مثبت، دارای آنزیم کاتالاز، نامتحرک و بر اساس آنالیز ژن 16S rDNA به جنس ویرجی باسیلوس تعلق دارد. بیشترین میزان جذب یون نیکل در زمان های اولیه رخ داده است؛ بنابراین به نظر می رسد که باکتری جدا سازی شده برای استفاده در سطح صنعتی و همچنین برای مقاصد زیست فناوری مناسب خواهد بود. جذب در زمان های اولیه غیر فعال بوده، آن گاه با گذشت زمان جذب به آرامی و آهستگی به صورت فعال ادامه یافته است. باکتری به دو شکل زنده و مرده دارای کارایی جذب مناسبی بوده است.

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۰۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۲۸

شماره صفحات: ۶ تا ۲۱

### کلیدواژه ها: باکتری

ویرجی باسیلوس، نیکل، ایزوترم،

گروه های سطحی، جذب زیستی

### ۱. مقدمه

فلزات سمی و سنگین جزئی مهم از آلاینده های تهدید کننده محیط های آبی و زیست بوم های طبیعی قلمداد می شوند، که در گروه آلاینده های شیمیایی قرار می گیرند [۱]. ورود این آلاینده ها به محیط زیست بعد از انقلاب صنعتی و به ویژه در کشورهای توسعه یافته، به طرز محسوسی افزایش یافته است. نگرانی محققان و

پژوهشگران وقتی بیشتر می شود که بدانیم، این آلاینده های سمی متأسفانه حتی در غلظت های پایین نیز آسیب زا هستند [۲]. مطالعات نشان داده است که پساب های شهری، کشاورزی و صناعی مانند صنعت فلزکاری، آب کاری، دباغی، تولید مواد شیمیایی، زهکشی معادن، تولید باتری و صنعت نفت و پتروشیمی از جمله منابع اصلی تخلیه این آلاینده ها به محیط زیست آبی هستند. از طرفی این آلاینده ها به دلیل پایدار بودن و تجمع در زنجیره غذایی زیست بوم ها،

\* باپلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه

سلامت جاندارن زیست‌بوم و در نهایت سلامت انسان را به خطر می‌اندازند[۱].

از میان یون‌های فلزی سمی و سنگین می‌توان به‌طور ویژه به نیکل، کادمیوم، کروم، جیوه و سرب اشاره کرد که باعث نگرانی در جوامع علمی شده است؛ به‌ویژه وقتی که بدانیم، این فلزات از فاضلاب‌های شهری و پساب‌های صنایع به‌طور کامل تصفیه نمی‌شوند[۳]. مطالعات مربوط به زیست‌بوم‌های آبی نشان داده است که برخی از فلزات به‌صورت یونی، جزئی از اجزای آن را تشکیل می‌دهند. البته باید متذکر شده‌ایم از یون‌ها می‌توانند برای بقای موجودات زنده به‌ویژه انسان‌ها نقش مؤثری ایفا کنند[۴].

بررسی‌ها نشان داده است که مخرب‌ترین و بیشترین تأثیر مسمومیت را یون‌های فلزی سمی و سنگین بر انسان در مراحل رشد و نمو ایجاد می‌کنند. وجود فلزات سنگین در آب نوشیدنی اطفال و نوزادان شیرخوار می‌تواند باعث کندذهنی، اختلال‌های حافظه‌ای و یادگیری، صدمات به سیستم عصبی، اختلالات حرکتی مانند تشنج و یا بیش‌فعالی آن‌ها شود. در شرایط حادتر، فلزات سنگین می‌توانند لطمه‌های سنگینی بر سیستم اعصاب مرکزی وارد کنند؛ همانند بسیاری از بیماری‌های باکتریایی و مسمومیت‌های غذایی، نوزادان و خردسالان در مقایسه با بزرگسالان در برابر آسیب‌ها و صدمات ناشی از حضور فلزات سمی و سنگین حساسیت بیشتری دارند[۵].

حذف فلزات سمی و سنگین از محیط، کاری طاقت‌فرسا و بسیارسنگین و مشکل است؛ زیرا برخلاف سایر آلاینده‌ها، فلزات مذکور چه از راه شیمیایی و چه به‌وسیله روش زیستی قابل تجزیه نیستند. البته این فلزات می‌توانند با مواد آلی تشکیل هم‌تافت دهند و یا اکسید و احیا شوند. راه و روش‌های مرسوم و رایج برای حذف این دسته از آلاینده‌ها در گروه بزرگ فیزیکی و شیمیایی قرار دارند که شامل: فرایند استفاده از فیلتر، استفاده از فرایند الکتروشیمیایی، اسمز معکوس، تیمار شیمیایی، انعقاد یا لختگی، تیمار الکتروشیمیایی، تعویض یونی، رسوب به‌وسیله کربنات سدیم هستند. امروزه مهم‌ترین روش‌های مورد استفاده در حذف نیکل به‌صورت غیرزیستی شامل تشکیل رسوب نیکل هیدرواکسید و هم‌چنین رسوب‌دهی با استفاده از نمک کربنات سدیم است. روش‌های مرسوم بالا کاستی‌هایی مانند بهره‌وری اندک، وقت‌گیر بودن فرایند و به‌ویژه

بازتولید آلاینده‌های دیگر دارند؛ لذا دیدگاه پژوهشگران در سه دهه اخیر، به سمت استفاده از روش‌های جایگزین مانند راه و روش زیستی تغییر پیدا کرده است[۸-۶].

حذف یا جذب زیستی یون‌های فلزی سمی و سنگین از محیط‌های آلوده و مخازن و منابع‌های آبی، روشی با تأثیر بالا و سازش‌یافته با محیط زیست است؛ بنا بر نظر محققان دلیل این امر می‌تواند بازدهی بالای حذف، هزینه اندک فرایند و در نهایت به امکان تولید مقادیر زیاد جذب زیستی در مقیاس وسیع باشد[۹]. بررسی‌ها نشان داده است که روند حذف زیستی این یون‌های سمی به‌وسیله جانداران زنده، شامل زیست‌توده باکتریایی، کپک‌ها، مخمرها، تک سلولی‌ها، پروتوزواها و جلبک‌های به‌ویژه قهوه‌ای انجام می‌شود[۱۰-۱۲].

امروزه از ریزاندام‌ها با دو فرایند و پدیده جذب زیستی و تجمع زیستی برای تیمار فاضلاب‌های دارای یون‌های فلزی سمی و سنگین استفاده می‌شود؛ زیرا هم مقرون به صرفه و هم در رقت‌ها و غلظت‌های اندک حتی در حد میکروگرم بر لیتر مؤثر است[۱۲].

نتایج تحقیق دانش‌پژوهان بر روی جذب یون‌های نیکل به‌وسیله زیست‌توده باکتریایی باسیلوس و سودوموناس معین کرد، جنبش‌شناسی جذب، دو مرحله‌ای و بیشینه جذب نیکل به‌وسیله باکتری‌های فوق به‌ترتیب ۰/۷۱ و ۰/۱۲ میلی‌مول بر گرم وزن خشک سلول است و زمان تعادل جذب نیکل به‌وسیله باکتری‌های مذکور به‌ترتیب ۱۰ و ۵ دقیقه، گزارش شده است. هم‌چنین در مطالعه‌ای که روی حذف زیستی دو فلز سمی و سنگین نیکل، سرب به‌وسیله ریزاندام گرم مثبت خاکزی از خانواده میکروباکتریاسه، *Curtobacterium sp. FM01* انجام گرفته است، معین شد که جذب یون‌های بالا نخست سریع بوده و آنگاه در گام بعدی جذب با سرعت و شتاب کم‌تری انجام گرفته است[۱۰].

تحقیقی دیگر در خصوص بررسی جنبش‌شناسی جذب یون فلزی نیکل به‌وسیله باکتری میله‌ای شکل، اسپوردار، *Bacillus laterosporus* (MTCC 1628) نشان داد، علاوه بر دو مرحله‌ای و دوفازی بودن این فرایند، سرعت جذب در ده دقیقه نخست آزمایش بسیار قابل ملاحظه و بالا بوده است[۱۱].

در تحقیق پیش رو علاوه بر بررسی مباحث معمول و مرسوم در جذب زیستی شامل مطالعه مؤلفه‌های تأثیرگذار مانند، هم‌دمایی و جنبش‌شناسی جذب، چند مؤلفه دیگر مانند تعیین گروه‌های

سطحی روی باکتری و مطالعه میکروسکوپ الکترونی زیست‌توده‌ها نیز مطالعه شد. هم‌چنین این تحقیق واجد چند نوآوری شامل استفاده از باکتری غیر معمول هالوفیل، مطالعه نوع جذب از منظر وابسته به متابولیسم و غیروابسته به متابولیسم بودن، و افزودن آزمایش‌های روش پاسخ سطح است. از اهداف اصلی این تحقیق جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست و یا مقاوم به نمک است؛ از این رو زمان نمونه‌گیری در فصل بهار تعیین شد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲-۱ جداسازی جاذب زیستی و ویژگی‌های آن

از چشمه آب شور باداب سورت نمونه‌گیری شد؛ برای غربالگری باکتری‌های مورد نظر دو نوع سبک استفاده شده است؛ در غربالگری اولیه در محیط از نمک نیکل استفاده شده تا باکتری‌های مقاوم به این نمک رشد کنند و جداسازی شوند. در غربالگری ثانویه از غلظت‌های مختلف نمک نیکل برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست و یا مقاوم به نمک استفاده شد.

چشمه باداب سورت کیاسر در شرق استان مازندران در موقعیت جغرافیایی N362119 E 535123 و در ارتفاع ۱۸۴۱ متری از سطح دریا و در محدوده روستای اروست قرار دارد. علت انتخاب منطقه به این دلیل است که آب و خاک و چشمه‌های شور دارد؛ به‌گونه‌ای که نمک‌ها به‌صورت نامحلول و به شکل گلوله و دانه در آب‌های شور منطقه قابل مشاهده است. چشمه‌های متعددی در اطراف این روستا وجود دارند، که از نظر نمک‌ها و بو و مزه کاملاً با هم متفاوت هستند. زمین‌شناسان معتقدند که چشمه‌های مذکور در دوران چهارم زمین‌شناسی تشکیل شده‌اند و جزئی از چین‌خوردگی واپسین در رشته کوه البرز مرکزی و از گونه ژئوپارک هستند. به‌دلیل شوری زیاد و حضور املاح و مواد معدنی بسیار، جزء چشمه‌هایی به‌شمار می‌روند که حتی در فصل‌های سرد سال نیز یخ نمی‌بندند؛ لذا مکان و جایگاه‌های مناسبی برای بررسی ریزاندام‌های نمک‌دوست هستند [۱۱].

نمونه‌های آب نخست سانتریفیوژ و از رسوب انتهایی لوله‌ها به‌صورت

مستقیم برای کشت روی محیط‌های کشت اختصاصی استفاده شده است؛ در خصوص نمونه‌های خاک و رسوب، ابتدا رقت‌های متوالی تا  $10^{-4}$  از آویزش میکروبی تهیه شد و در نهایت نمونه لجن نیز به‌صورت مستقیم به محیط کشت تلقیح شد. در مدت زمان یک هفته گرم‌خانه‌گذاری در  $37^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس تمامی محیط‌های کشت تلقیح شده از جمله آب، رسوب و لجن انجام گرفت. کشت‌های دوباره و مجدد از کلنی‌های باکتریایی در محیط آگار در فواصل زمانی یک روزه برای جداسازی باکتری‌های تند رشد و کند رشد لازم است.

### ۲-۲ جنبش‌شناسی جذب فلز نیکل به‌وسیله

#### ویرجی‌باسیلوس (جد/به 10-A)

برای مطالعات جنبش‌شناسی واکنش، در سه ظرف (ارلن) جداگانه هزار میلی‌لیتر واجد یون فلزی نیکل دارای غلظتی معادل هشت میلی‌گرم بر لیتر اضافه شده، زیست‌توده باکتریایی مورد استفاده  $0.15$ ،  $0.1$  و  $0.05$  گرم نیز به محیط افزوده شد. برای انجام فرایند جنبش‌شناسی در وقت‌های صفر، پنج،  $15$ ،  $30$ ،  $45$ ،  $60$ ،  $120$ ،  $240$ ،  $480$ ،  $720$  و  $1440$  دقیقه به میزان پنج میلی‌لیتر از ارلن برداشته و آن‌گاه از فیلتر غشایی سرسرنگی  $0.45$  میکرومتری برای گذراندن نمونه‌ها استفاده شد. سپس میزان فلز نیکل در محلول در زمان‌های مختلف با استفاده از دستگاه جذب اتمی<sup>۱</sup> اندازه‌گیری و تجزیه شد [۱۴-۱۲]. لازم به یادآوری است که برای تهیه محلول یون فلزی نیکل از نمک  $\text{NiCl}_2\text{H}_2\text{O}$  استفاده شد.

### ۲-۳ هم‌دمایی جذب فلز نیکل به‌وسیله ویرجی‌باسیلوس

برای بررسی فرایند هم‌دمایی جذب فلز نیکل، غلظت ابتدایی مورد استفاده مابین  $0.4$  الی هشت میلی‌گرم بر لیتر بوده است. غلظت‌های فوق متغیر بود ولی برای میزان زیست‌توده باکتریایی غلظت ثابت نیم گرم و دمای ثابت برای همه نمونه‌ها  $37^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس بود و مراحل گرم‌خانه‌گذاری  $150$  دور در دقیقه به‌مدت  $120$  دقیقه انجام گرفت. در ادامه آزمایش نمونه‌ها با فیلتر سرسرنگی عبور داده و تجزیه شدند [۱۴-۱۲].

1. Atomic Absorption Spectrometer (AAS = AA240FS Varain)

تعیین میزان بازده حذف فلز در شرایط اکتیو و غیر اکتیو باکتریایی است؛ برای نیل به این هدف، یعنی غیرفعال کردن باکتری‌ها، زیست‌توده باکتریایی زنده و سالم ویرجی باسیلوس به مدت ۱۲۰ دقیقه در محیط حاوی بافر تریس به صورت مستقل واجد دو ترکیب کشنده سدیم آزید و دو و چهار دی نیتروفلن گذاشته و بعد از این مدت زیست‌توده مذکور با بافر تریس شستشو داده شد. عموماً میزان و درصد کشنده‌گی ترکیبات فوق قابل ملاحظه نیست و باکتری به طور قطعی کشته نمی‌شود؛ از این رو از دو روش نگهداری در اتوکلاو و قراردادن در انکوباتور برای کشتن قطعی باکتری استفاده شد. باکتری در اتوکلاو قرار داده شده بعد از اتمام فرایند و هم‌چنین در دمای ۶۰ درجه سلسیوس حدود دو شب قرار داده و خشک شد و این دو زیست‌توده به صورت مستقل استفاده شد. برای تشخیص اثر ترکیبات و روش‌های بالا به منظور غیرفعال کردن کشتن باکتری از کشت باکتری در محیط کشت جامد نوترینت آگار به صورت خطی استفاده شد. در ادامه برای بررسی جذب فلز به وسیله باکتری‌های شاهد و باکتری‌های تحت تأثیر قرار گرفته، آن‌ها را به مدت ۱۲۰ دقیقه در ارلن‌های دارای یون نیکل در انکوباتور قرار داده‌ایم. این نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس داخل یک گرم‌خانه شیکردار با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند.

## ۲-۷ تشخیص سطوح فعال در فرایند جذب با استفاده از FT-IR و ویژگی‌های سطحی باکتری به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره (SEM)

تشخیص گروه‌های سطحی درگیر در جذب فلز و ساختار سطحی باکتریایی به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره از آزمایش‌های مهم برای شناسایی سازوکار جذب محسوب می‌شود. در این روش ابتدا باید میزان قابل توجهی زیست‌توده باکتریایی تهیه شود. برای رسیدن به این هدف باکتری را از محیط نوترینت آگار وارد محیط مایع نوترینت برات در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری کرده، اجازه داده می‌شود تا به مدت دو تا سه شبانه روز گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گیرد، آن‌گاه بعد از گذشت این زمان با سانتریفیوژ زیست‌توده باکتریایی را از سوپرناتانت جدا می‌شود. برای تکمیل فرایند برای ورود به مرحله جذب، باکتری را با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده می‌شود تا باکتری خالص مهیا شود.

## ۲-۴ تأثیر pH محلول فلزی و غلظت جاذب باکتریایی بر جذب فلز نیکل

pHهای مورد مطالعه در این تحقیق از دو تا دوازده بوده است؛ مشابه آزمایش‌های قبلی غلظت یون نیکل در ارلن هشت میلی‌گرم بر لیتر، و تراکم زیست‌توده باکتریایی بین سه تراکم ۰/۵، ۱/۵ و ۲ بوده است. برای اندازه‌گیری pHهای نمونه از دستگاه pH متر مدل ۳۵۱۰ ساخت شرکت جنوای انگلستان استفاده شد. زمان مورد نیاز برای تماس زیست‌توده باکتریایی و محلول حاوی فلز حدود ۱۲۰ دقیقه بوده و هم‌چنین نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته‌اند. بعد از گذشت این زمان نمونه‌ها برای به دست آوردن آیت‌م‌هایی مانند کارایی جذب<sup>۱</sup> و ظرفیت جذب<sup>۲</sup> تجزیه شدند [۱۴ و ۲].

در خصوص به دست آوردن بهینه میزان زیست‌توده باکتریایی ویرجی باسیلوس، مقادیر زیر از غلظت باکتریایی بر واحد گرم در لیتر تعیین شد: ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ و ۶. مشابه آزمایش‌های سابق، میزان محلول نیکل هشت میلی‌گرم بر لیتر بوده، مدت زمان (زمان گرم‌خانه‌گذاری) و دمای فرایند نیز به ترتیب دو ساعت و ۳۷ درجه سلسیوس بوده است.

## ۲-۵ تأثیر درجه حرارت بر میزان جذب فلز نیکل به وسیله ویرجی باسیلوس

از آنجایی که مؤلفه دما بر فرایند جذب و تجمع زیستی فلزات به وسیله باکتری‌ها مؤثر بوده این آزمایش مهیا شده است. دماهای مورد مطالعه در این آزمایش به قرار زیر بوده است: ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰. دلیل انتخاب این دماها این است که عموماً به دمای ۳۷ درجه سلسیوس که در علم میکروبیولوژی دمای بهینه باکتری‌های سرمدوست است، همین حدود اضافه و کم شد؛ یعنی بین عدد ۵ تا ۶۰ مطالعه شده است. مدت زمان تماس برای باکتری و فلز همان ۱۲۰ دقیقه لحاظ و غلظت فلز نیز مشابه آزمایش‌های اولیه هشت میلی‌گرم بر لیتر حساب شد [۱۶-۱۴].

## ۲-۶ تفریق جذب وابسته به متابولیسم و غیر وابسته به متابولیسم باکتریایی

از جمله آزمایش‌های کلیدی و مهم در فرایند جذب و تجمع زیستی،

1. Jenway
2. Removal Efficiency
3. Removal Capacity

پاسخ در ایجاد مدل‌های تجربی است که به‌وسیله دست‌های از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در این روش ابتدا مؤلفه‌هایی که تأثیری اساسی در آزمایش ندارند، شناسایی و محدوده آزمایش بدین وسیله کم می‌شود؛ لذا در ادامه تست‌های قابل اجرا و گام‌های بعدی آزمایش‌ها تعریف شد؛ به بیانی دیگر مدلی ریاضی و هم‌چنین آماری رابطه‌های مابین متغیرهای وابسته و غیروابسته را نمایش می‌دهد. در این سبک بر خلاف روش‌های سنتی و مرسوم آزمایشگاهی نمودارها و منحنی‌های سه بعدی به ما می‌دهد که برای درک و تحلیل و تجزیه داده‌ها به ما کمک بیشتری می‌کند. از جمله کاستی‌های روش‌های مرسوم و معمول آزمایشگاهی آن است که برای بررسی تأثیر یک مؤلفه به‌عنوان مثال در فرایند جذب زیستی باید مابقی مؤلفه‌ها ثابت نگه داشته شوند، بنابراین تأثیر متقابل شاخصه‌ها هرگز در نظر گرفته نمی‌شوند، به‌علاوه در این سبک به مدت زمان کمتری نیاز است. بنابراین روش بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ در برابر روش‌های سنتی از ارجحیت بیشتری برخوردار است [۲۰-۱۷].

در این تحقیق بر اساس آزمایش‌های اولیه سه شاخصه که اثر بیشتری بر فرایند جذب فلز از خود نشان داده‌اند، انتخاب شدند؛ این شاخصه‌ها عبارت‌اند از: زمان، غلظت بیومس باکتریایی و pH، که از آن‌ها به‌عنوان متغیرهای مستقل  $X_1$ ،  $X_2$  و  $X_3$  یاد شده است. در جدول (۱) این متغیرها بیان شدند هم‌چنین برآورد خطا در این آزمایش نیز لحاظ شد. بر اساس آنچه در جدول (۲) نشان داده شده است، برای انجام صحیح و دقیق این آزمایش‌ها بر اساس نرم‌افزار Design Expert طراحی مناسبی انجام شد و تعداد شانزده آزمایش برای پیدا کردن خطوط بهینه برای فرایند جذب فلز به‌وسیله زیست‌توده باکتریایی مشخص شد.

در مرحله بعدی آزمایش از ارلن‌های یک لیتری که دارای ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه هشت میلی‌گرم یون فلزی نیکل بوده است استفاده شد. مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری حدود ۱۲۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بوده است. در پایان آزمایش محلول سانتریفیوژ شد و رسوب برای ادامه فرایند انتخاب شد، رسوب برای خشک‌شدن و از دست‌دادن آب در آن به‌مدت دو شبانه‌روز در دمای چهل درجه سلسیوس قرار گرفت. زیست‌توده باکتریایی خشک شده را به‌صورت پودر درآورده، با استفاده از دستگاه FT-IR گروه‌های سطحی آن‌ها به‌دست آمد. همه این آزمایش‌ها بدون حضور فلز نیز انجام شده است؛ تا مقایسه‌ای بین سطوح باکتری دارای فلز و بدون فلز انجام گیرد.

در ادامه برای آزمایش بررسی باکتری به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره، نخست مشابه حالت بالا زیست‌توده باکتریایی به میزان کافی مهیا شد. باکتری از محیط جامد وارد محیط براث شد و اجازه داده شده تا در مدت زمان دو شبانه‌روز میزان آن افزایش یابد. رسوب در این فرایند شستشو و وارد محیط واجد و فاقد فلز شده است. مدت زمان تماس محلول فلزی حاوی نیکل و باکتری ۱۲۰ دقیقه بوده است. (محلول فلزی نیکل با غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر، زیست‌توده باکتری ۰/۵ گرم) زیست‌توده باکتریایی واجد فلز و فاقد فلز خشک شد و برای استفاده از عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی مهیا شد.

## ۲-۸ طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ (RSM)

روش سطح پاسخ یا روش رویه پاسخ از سبک‌های مدل‌سازی تجربی و طراحی آزمایش‌ها قلمداد می‌شود. سبک‌شناسی روش پاسخ به‌عنوان دسته‌ای از روش‌های آماری است که هدف آن بهینه‌سازی

جدول ۱. متغیرهای مستقل، محدوده و سطوح آن‌ها (محدوده متغیرهای فلز نیکل).

کد و سطح متغیر			نماد ریاضی	متغیرهای مستقل
-۱	۰	+۱		
۷	۸	۹	$X_1$	pH
۳۵	۴۵	۵۵	$X_2$	دما (درجه سلسیوس)
۰/۵	۱/۵	۲/۵	$X_3$	غلظت زیست‌توده باکتری (گرم بر لیتر)

جدول ۲. داده‌های تجربی بررسی روش سطح پاسخ بر اساس سه متغیر.

ظرفیت جذب (میلی‌گرم بر گرم)	غلظت اولیه نیکل (گرم بر لیتر)	دما (درجه) سلسیوس)	pH	X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	آزمایش
۰/۳۶	۲/۵	۵۵	۹	۱	۱	۱	۱
۰/۳۸	۲/۵	۳۵	۹	۱	-۱	۱	۲
۰/۳۶	۰/۵	۳۵	۷	-۱	-۱	-۱	۳
۰/۴۵	۱/۵	۳۵	۸	۰	-۱	۰	۴
۰/۴۸	۱/۵	۴۵	۸	۰	۰	۰	۵
۰/۳۸	۲/۵	۵۵	۷	۱	۱	-۱	۶
۰/۳۷	۰/۵	۳۵	۹	-۱	-۱	۱	۷
۰/۴۲	۰/۵	۴۵	۸	-۱	۰	۰	۸
۰/۳۹	۲/۵	۴۵	۸	۱	۰	۰	۹
۰/۳۴	۰/۵	۵۵	۷	-۱	۱	-۱	۱۰
۰/۴۱	۱/۵	۴۵	۷	۰	۰	-۱	۱۱
۰/۴۳	۰/۵	۵۵	۹	-۱	۱	۱	۱۲
۰/۳۸	۱/۵	۴۵	۹	۰	۰	۱	۱۴
۰/۴۰	۲/۵	۳۵	۷	۱	-۱	-۱	۱۵
۰/۴۸	۱/۵	۴۵	۸	۰	۰	۰	۱۶

## ۳. نتایج

## ۳-۱ بررسی و شناسایی نوع باکتری بر اساس کلیدهای

مولکولی و تحلیل توالی ژن *16S rDNA*

شناسایی مولکولی باکتری بعد از شناسایی بیوشیمیایی و ریخت‌شناختی که انجام ساده‌تری داشت، انجام شد؛ روش PCR به وسیله دستگاه ترمال سایکلر برای تشخیص مولکولار زیست‌توده باکتریایی بر اساس تکثیر ژن *16S rDNA* انجام شد. با استفاده از

الکتروفورز ژل آگارز یک درصد محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) قطعه ژن *16S rDNA* بررسی شد. تعداد نوکلئوتید برای این فرایند PCR برای ژن *16S rDNA* در حدود ۱۵۰۰ بوده است. برای تجزیه و شناسایی باکتری، توالی ژن *16S rDNA* به وسیله شرکت ماکروژن در کشور کره جنوبی شناسایی و برای مقایسه با باکتری‌های دیگر در بانک اطلاعاتی EzTaxon مقایسه شد. یافته‌های BLAST نشان داد که باکتری مورد نظر به ویرجی باسیلوس نزدیکی دارد.

## ۲-۳ جنبش‌شناسی جذب فلز نیکل

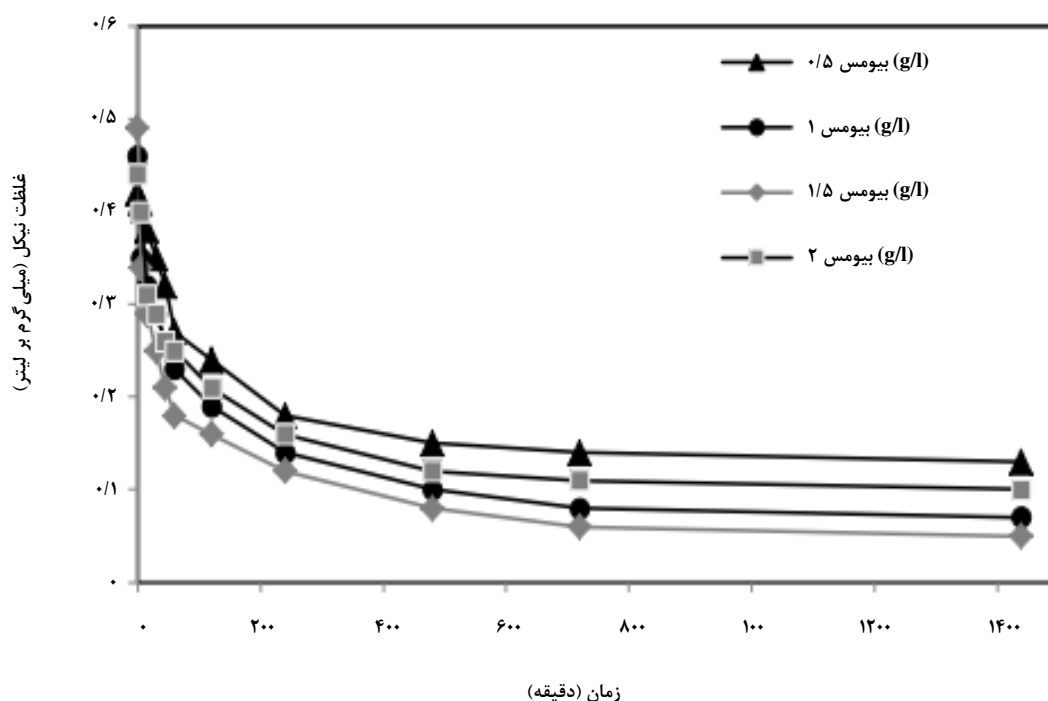
یافته‌های جنبش‌شناسی جذب یون فلزی نیکل به‌وسیله ویرجی‌باسیلوس در شکل (۱) نشان داده شده است؛ بر این اساس مشخص شد که بیشترین میزان جذب فلز در نیم ساعت نخست روی می‌دهد و بعد از رسیدن به زمان تعادلی جذب، مقدار و ظرفیت جذب فلز به‌صورت بطئی و آرام کم می‌شود. شاید این دلیلی باشد بر مدل جذب فلز نیکل که به‌صورت سطحی انجام گرفته است. احتمالاً در دو مرحله جذب سریع غیر وابسته به متابولیسم و بخشی دارای جذب آرام و بطئی که بیان‌کننده جذب وابسته به متابولیسم بوده است، بنابراین از لحظاتی به بعد با گذشت زمان، دیگر افزایشی در ظرفیت جذب دیده نمی‌شود. بررسی و یافته‌ها نشان داده است که این افزایش جذب تا زمانی حدود ۴۸۰ دقیقه بعد از آن به‌صورت تقریبی به یک تعادل جامع و کامل رسیده است. در استفاده‌های صنعتی از جاذب اگر زمان تعادل در حدود چند ساعت باشد، مهم و بارز است. از طرفی ارتباط بین مقدار زیست‌توده باکتریایی در این فرایند نشان‌دهنده آن است که بیشترین میزان جذب به‌وسیله ارلن حاوی زیست‌توده باکتریایی ۰/۵ گرم بر لیتر رخ داده و این

قضیه یعنی استفاده از میزان کم زیست‌توده در شرایط حقیقی حذف فلز با اهمیت تلقی می‌شود، زیرا به زیست‌توده کمتری برای حذف فلز نیاز است.

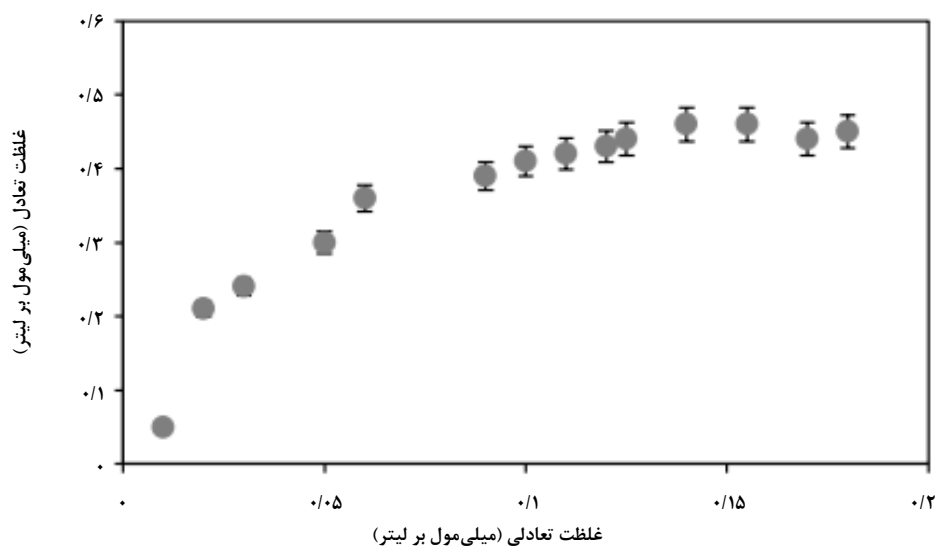
## ۳-۳ یافته‌های مربوط به هم‌دمایی بر میزان حذف یون مذکور به‌وسیله ویرجی‌باسیلوس

گروه‌های سطحی زیست‌توده باکتری ویرجی‌باسیلوس که درگیر در فرایند جذب یون‌های فلزی هستند با زیاد شدن تراکم و میزان فلز در محلول مورد بحث به سمت اشباع شدن می‌روند؛ لذا روند افزایش جذب تا حدودی با میزان جذب رابطه مستقیمی دارد. در شکل (۲)، مؤلفه‌های غلظت تعادلی ( $C_e$ ) و ظرفیت جذب ( $Q_e$ ) به نمایش در آمده که مبحث فوق را با دلیل نشان داده است.

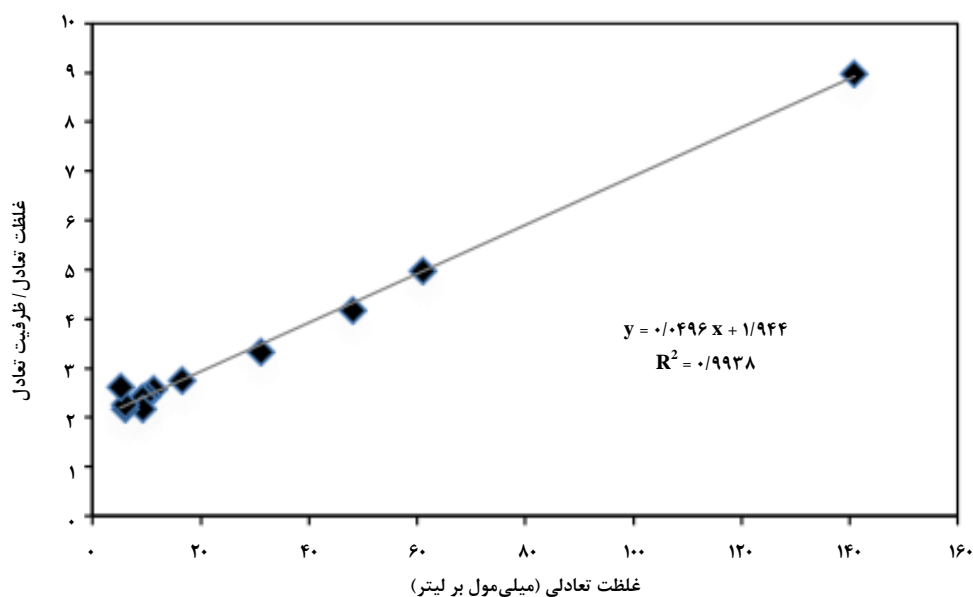
برای رسیدن به عدد دقیق بیشینه حذف یون مذکور به‌وسیله باکتری از معادله خطی لانگمویر استفاده شده و نمودار شماره سه به‌دست آمده است (شکل (۳)). یافته‌های این شکل نشان داده است که میزان بالاترین حد جذب یون فلزی نیکل دقیقاً برابر ۰/۵۱ میلی‌مول بر گرم وزن زیست‌توده باکتریایی است.



شکل ۱. بررسی مؤلفه مدت زمان در مقدار حذف یون نیکل به‌وسیله باکتری ویرجی‌باسیلوس.



شکل ۲. نمودار تأثیر غلظت اولیه یون فلزی نیکل بر میزان جذب آن به وسیله ویرجی باسیلوس.



شکل ۳. رابطه خطی همدمایی لانگمویر جذب یون فلزی نیکل به وسیله ویرجی باسیلوس.

در دسترس است. [۲۰-۱۷]. شکل خطی مدل لانگمویر در معادله (۱) نشان داده شده است [۲۰].

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{1}{q_{\max} b} + \frac{c_e}{q_{\max}} \quad (1)$$

بررسی همدمایی جذب فلز به وسیله مدل لانگمویر بررسی شد. در مدل لانگمویر فرض می شود که سطح باکتری به عنوان یک جذب کننده یک دست است و از طرفی دیگر هرگز واکنشی بین باکتری و فلز رخ نمی دهد؛ به علاوه انتقال انرژی به یون فلزی جذب شده رخ نداده و میزان سطح انرژی به صورت مساوی و برابر



در pHهای بسیار بالا و هم‌چنین بسیار پایین، در میزان جذب و حذف یون فلزی مذکور کاهش قابل ملاحظه رخ می‌دهد. این یافته‌ها در شکل (۴) به نمایش درآمده است. در اسیدیته کمتر از شش، میزان و مقدار حذف فلز دچار کاهش و سیر نزولی می‌شود، به نظر می‌رسد که این کاهش جذب به رقابت بین فلز مورد مطالعه از یک طرف و یون‌های موجود در محلول از طرفی دیگر مربوط باشد. البته با فزونی یافتن pH ظرفیت حذف یون فلزی مذکور رو به بالا می‌رود. این روند افزایشی ادامه می‌یابد تا به حداکثر خود در عدد هشت برسد، ولی آن‌گاه روند کاهشی آن شروع می‌شود. شاید یکی از دلایل کاهش جذب فلز نیکل در pHهای بالا به این دلیل باشد که فلز نیکل از حالت آزاد به حالت‌های رسوبی مانند هیدرواکسید رسیده و میزان آن در محلول کاهش یافته است. این فرایند در غلظت‌های مختلف باکتری انجام گرفته که میزان غلظت زیست‌توده یک‌ونیم بالاترین بازده را نشان داده است.

در معادله فوق  $q_e$  میزان یون فلزی جذب‌شده بر روی باکتری بر واحد میلی‌گرم یا میلی‌مول بر گرم وزن زیست‌توده، و  $q_{max}$  بیشینه جذب فلز، و  $b$  نماینده عدد ثابت لانگمویر است و بر واحد لیتر بر میلی‌گرم تعریف شده است و نماینده قدرت اتصال بین فلز و باکتری است و میزان و علاقه‌مندی میزان جذب و انرژی اتصال بین دو عامل را نشان می‌دهد [۲۰].

برای شفاف‌شدن بررسی جاذب‌ها، در جدول (۴) مقایسه‌ای بین جاذب‌های زیستی که نیکل را جذب می‌کنند نشان داده و با جاذب مورد مطالعه در این تحقیق مقایسه شده است.

### ۳-۴ تأثیر pH محلول فلزی و غلظت جاذب بر جذب فلز

#### نیکل به‌وسیله ویرجی‌باسیلوس

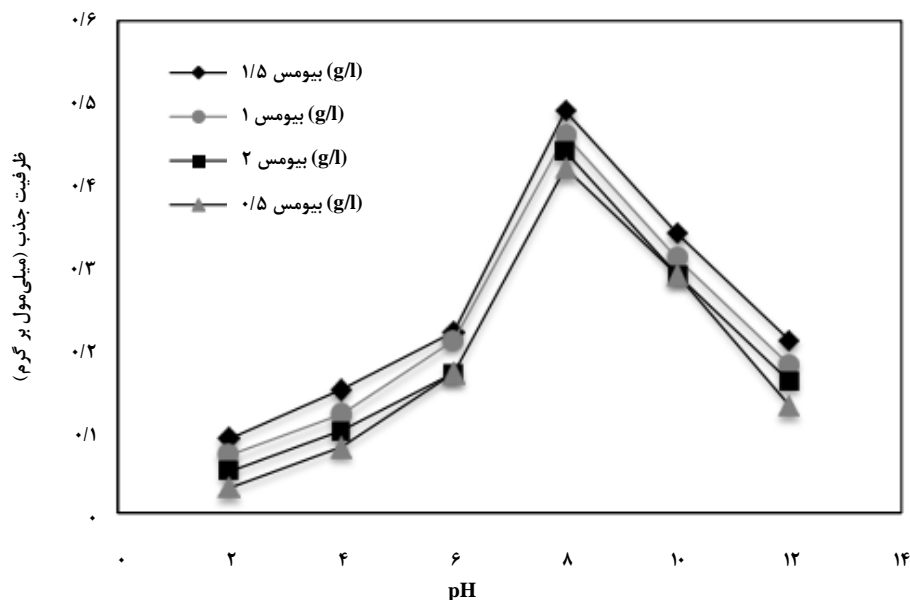
مؤلفه pH در پدیده‌های جذب فلزات سمی و سنگین به‌وسیله عموم جاذب‌های زیستی و غیرزیستی مهم است، این تحقیق دریافت که

جدول ۳. مدل خطی هم‌دمایی لانگمویر و فروندلیچ برای حذف یون فلزی نیکل به‌وسیله ویرجی‌باسیلوس.

هم‌دمایی فروندلیچ			هم‌دمایی لانگمویر			جاذب	فلز
$R^2$	n	$K_F$	$R^2$	$b_L$ لیتر بر میلی‌مول	$q_m$ میلی‌مول بر گرم		
۰/۹۵۲	۱/۳۴۱	۰/۵۲۳	۰/۹۹۴	۴۹/۰۱۲	۰/۵۱۳	باکتری	یون نیکل

جدول ۴. مقایسه میزان جذب فلز نیکل به‌وسیله جاذب‌های زیستی متفاوت.

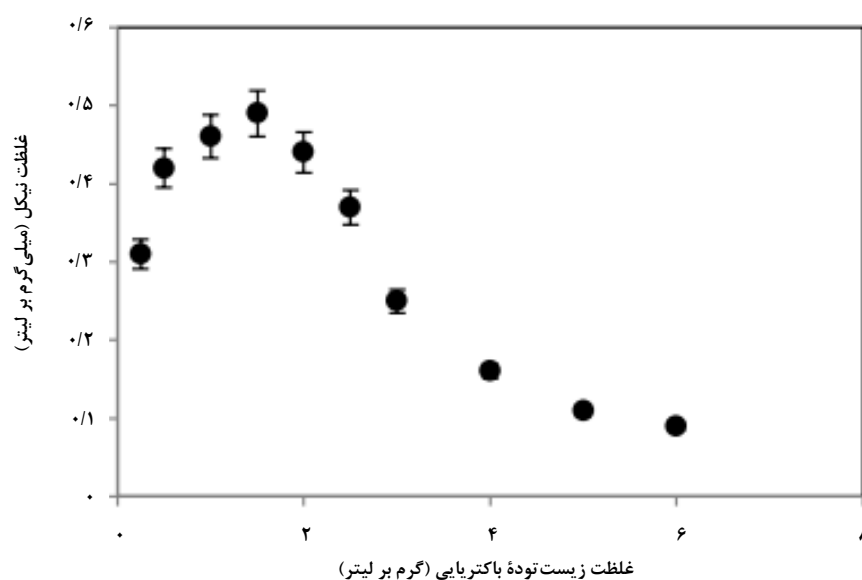
مرجع	pH	بیشینه جذب (میلی‌مول بر گرم)	جاذب زیستی
[۲۳]	۳/۵	۰/۳۹	فوکوس وزیکولوسوس
[۲۴]	۶/۷	۰/۶۳	کندروس کریسپوس
[۲۳]	۶/۰	۰/۲۲	کدیوم ورمیلارا
[۲۴]	۶/۵	۰/۲۵	باسیلوس لیکنی‌فرمیس
این مطالعه	۸/۰	۰/۵۱	ویرجی‌باسیلوس



شکل ۴. مؤلفه pH و اثر مستقیم آن بر ظرفیت حذف یون فلزی نیکل به وسیله ویرجی باسیلوس.

و میزان زیست توده خیلی بیشتر می شود، دیگر این افزایش سطح نمی تواند منجر به افزایش ظرفیت شود؛ چنان که در نمودار کاهش جذب ملاحظه می شود؛ لذا قابل ذکر است که مقدار زیست توده نیم گرم در لیتر برای فرایند جذب مناسب بوده است.

در شکل (۵) اثر مؤلفه غلظت زیست توده باکتریایی و تأثیر آن بر میزان جذب نشان داده شده است. همان گونه که تفسیر می شود، هرگاه غلظت زیست توده بیشتر شود، تعداد جایگاه های سطحی باکتری بیشتر در معرض یون فلزی قرار می گیرد و به صورت نرمال میزان و ظرفیت جذب افزایش می یابد؛ اما از طرفی دیگر وقتی تعداد

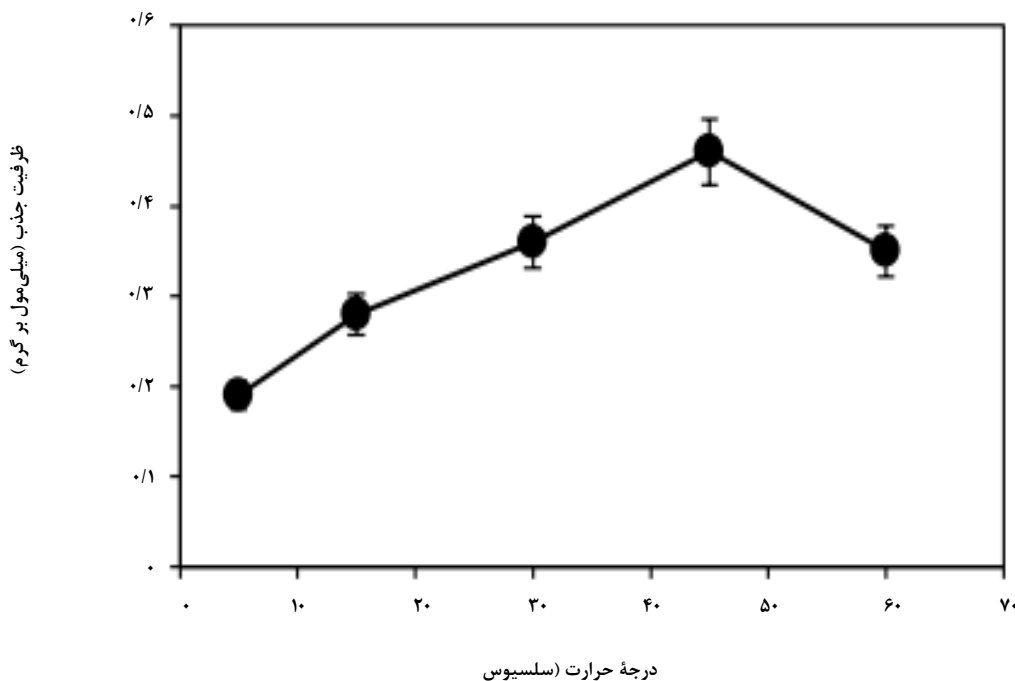


شکل ۵. تأثیر مقدار جاذب زیست توده ویرجی باسیلوس بر میزان جذب فلز نیکل.

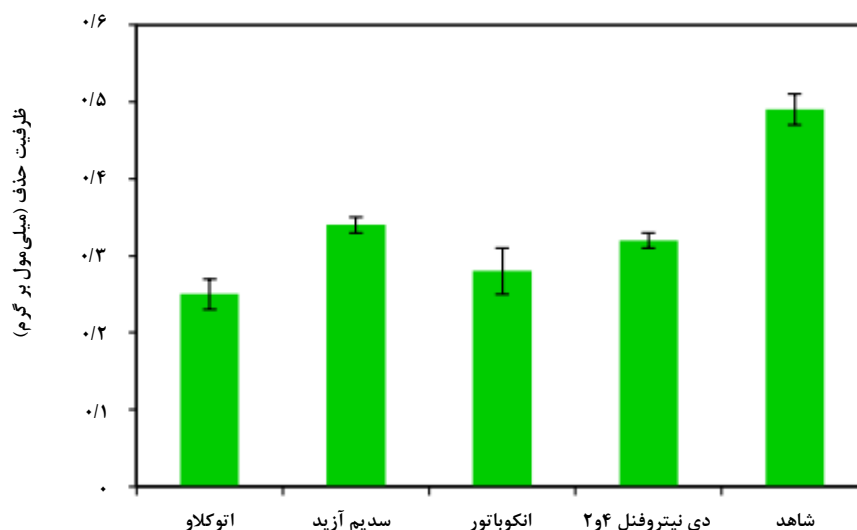
خوب و مناسبی برای حذف فلز نیکل از محلول آبی حتی به صورت غیرفعال و مرده است. آن گونه که در شکل (۷) نمایان است، سلول‌های باکتریایی که به وسیله دو ترکیب غیرفعال کننده سدیم آزید و دی نیتروفنول تیمار شده‌اند، در برابر باکتری شاهدهی که هیچ تیماری روی آن انجام نگرفته است، دچار کاهش در ظرفیت جذب فلز شده است؛ اما اثر اتوکلاو به عنوان یک تیمار تأثیرگذار بر باکتری در میزان جذب فلز نمایان تر و اثر کاهشی بیشتری از خود نشان داده است. اثر بیشتر تیمار اتوکلاو در مقایسه با سدیم آزید و دی نیتروفنول به این دلیل است که اتوکلاو هم ساختار دیواره و سطح سلول باکتریایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تا اندازه‌ای آن را تخریب می‌کند، همچنین باکتری عملاً مرده است، پس بنابراین هرگز جذب وابسته به متابولیسم در آن رخ نخواهد داد. لذا کاهش جذب در زیست توده‌ای که با اتوکلاو تیمار شده است در مقایسه با دیگر تیمارها بیشتر است.

**۳-۵ بررسی تأثیر درجه حرارت و اثر آن بر ظرفیت جذب**  
از آنجای یکه خود باکتری در حرارت میانه دارای بهینه رشد است، در دماهای میانه نیز بیشترین میزان جذب فلز نیکل به وسیله باکتری مذکور مشاهده شد. به طوری که در شکل (۶) نشان داده شده بیشترین میزان و ظرفیت جذب در درجه حرارت ۴۵ سلسیوس بیان شده و دماهای مابین ۲۵ تا عدد ۴۵ مناسب برای این فرایند بوده است. از دلایل مهم برای این یافته آن است که نیروی جنبشی بین یون فلزی نیکل و سطوح درگیر در این فرایند در سطح باکتری افزایش یافته است.

**۳-۶ تعیین نوع و گونه جذب وابسته به متابولیسم یا غیروابسته به متابولیسم به وسیله ویرجی باسیلوس**  
زیست توده باکتری ویرجی باسیلوس هم به صورت فعال و زنده و هم به صورت غیرفعال یعنی غیر وابسته به متابولیسم دارای بازده بالایی در جذب و حذف فلز نیکل بوده است؛ از این رو این باکتری نامزد



شکل ۶. اثر مؤلفه درجه حرارت بر ظرفیت جذب و حذف فلز نیکل به وسیله ویرجی باسیلوس.



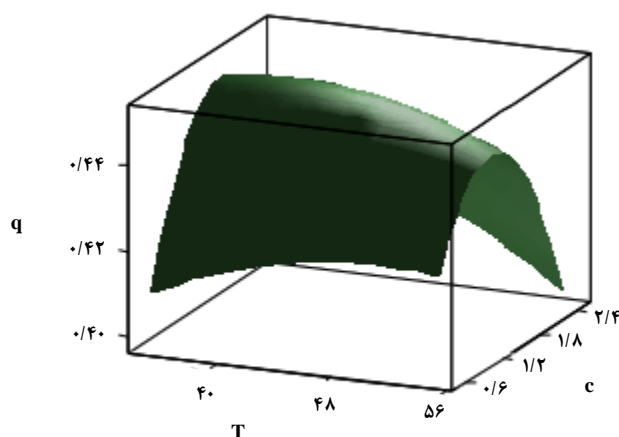
شکل ۷. ارزیابی جذب فعال یا غیر فعال (اتوکلاو، انکوباتور، سدیم آزید و دی نیتروفنل) فلز نیکل به وسیله ویرجی باسیلوس.

معدنی و آلی به علاوه احیا، ته نشینی و تغییرات اشکال املاح یون فلزی نقش داشته است. با افزایش pH ظرفیت جذب افزایش یافته است؛ لذا در نمودار مقایسه دما با غلظت باکتری، دمای بهینه و غلظت مناسب به ترتیب ۴۴ درجه سلسیوس و غلظت بهینه ۱/۶ نشان داده شده است.

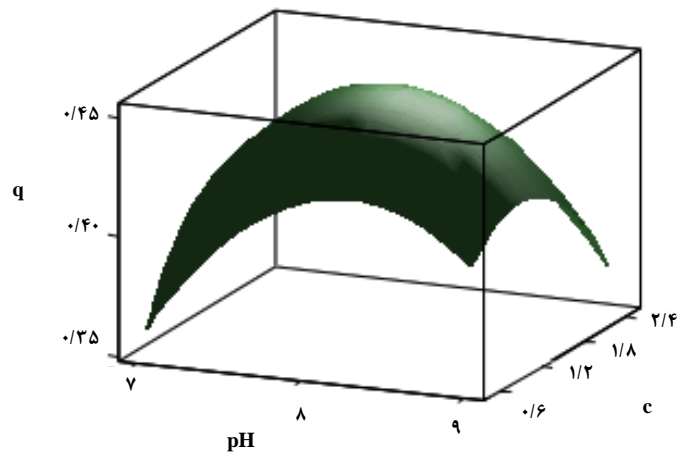
مقایسه نمودار pH و غلظت نشان داده که pH بهینه حدود ۸ و غلظت هم چنان در حدود ۱/۶ بوده است. همین مقایسه بین pH و دما، صحت آزمایش های تجربی را نشان داده است.

### ۳-۷ طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ (RSM)

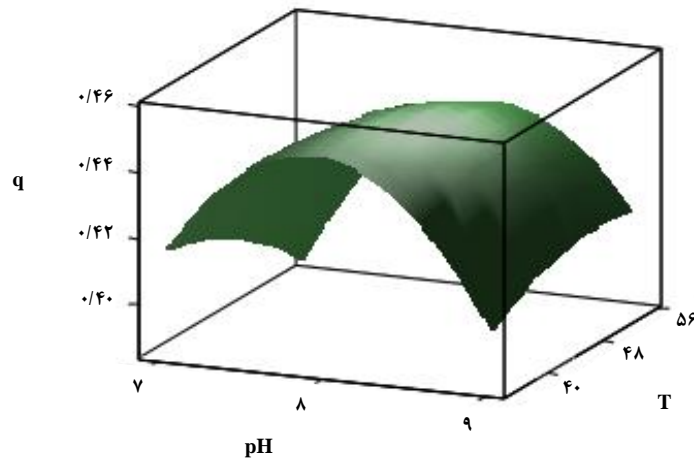
در این پژوهش از روش سطح پاسخ با بررسی سه مؤلفه متغیر شامل زمان، غلظت زیست توده باکتریایی و pH (شامل مؤلفه های  $X_1$ ،  $X_2$  و  $X_3$ ) میزان جذب نیکل مطالعه شد. در این آزمایش تکرار شش گانه مرکزی برای برآورد درصد خطای تست انجام گرفته است. نتایج نشان داد که بر اساس روش پاسخ سطحی مؤلفه pH دارای نقش های چندگانه در فرایند جذب نیکل به وسیله باکتری بازی است. از جمله این نقش ها فعال کردن جایگاه های جذب نیکل در سطح باکتری، از دیدگاه شیمیایی نیز در ایجاد مجموعه لیگاند های



شکل ۸. تأثیر درجه حرارت و غلظت زیست توده باکتریایی بر جذب یون فلزی نیکل به وسیله ویرجی باسیلوس.



شکل ۹. مطالعه اثر هم‌زمان pH و غلظت زیست‌توده باکتریایی بر جذب یون فلزی نیکل به وسیلهٔ ویرجی باسیلوس.



شکل ۱۰. بررسی اثر pH و درجه حرارت و تأثیر آن بر جذب یون فلزی نیکل به وسیلهٔ ویرجی باسیلوس.

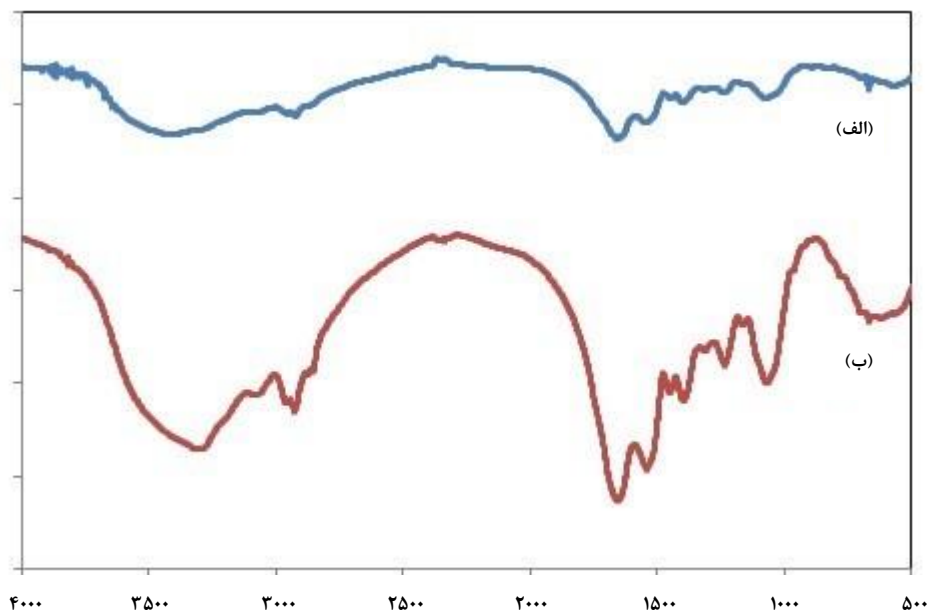
است و یون فلزی نیکل به آن وصل می‌شود [۳۰]. مهم‌ترین نقش در باکتری برای اتصال به یون‌های فلزی عبارت‌اند از موکوپپتید دیوارهٔ سلولی که نقش مهم آن با این آزمایش تأیید شد، به طوری که طیف‌های ۳۲۹۸ که نمایندهٔ گروه عاملی N-H است و طیف بین ۲۸۰۰ تا ۳۰۰۰ مخصوص گروه C-H است، که در ساختار موکوپپتید دیوارهٔ سلولی نقشی مهم دارد. در طیف‌های ۲۹۲۶ که ارتباط با R-CH<sub>2</sub> داشته و بسیار واضح و مشخص است. گروه‌های آمین، کربونیل، سیانو-گروپ در ناحیهٔ ۱۶۵۲ دیده شده‌اند. در ناحیهٔ ۱۰۹۶ گروه ویژهٔ C-O-C دیده شده است [۳۱]. از این رو این طیف‌های مختلف نشان‌دهندهٔ اتصال آن‌ها با یون فلزی نیکل است.

### ۳-۸ شناسایی سطح اکتیو باکتری با استفاده از طیف سنج

#### مادون قرمز (FT-IR)

در این روش، هدف طیف‌سنجی جذبی فروسرخ، شناسایی سطح رویی باکتری است و عوامل درگیر در فرایند جذب‌زیستی مشخص شد و در هر دو حالت حضور و عدم حضور فلز تجزیه شد و به بیانی دیگر اطلاعات کیفی و کمی بدون تخریب باکتری به دست آمده است [۱۹].

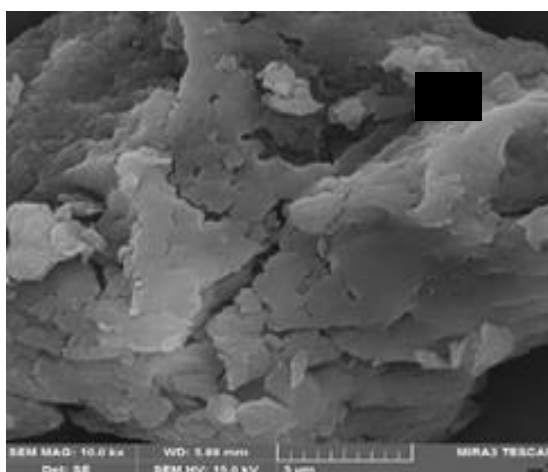
همان‌گونه که در شکل (۱۱) نشان داده شده است، طیف‌های اصلی و مهم در سطح باکتری عبارت‌اند از: طیف در منطقهٔ ۵۲۲ مربوط به باند Ni-O و طیف ۶۱۸ با واحد عکس سانتی‌متر مربوط به عامل Ni-O-H. این دو گروه از مهم‌ترین عوامل اتصالی در سطح باکتری



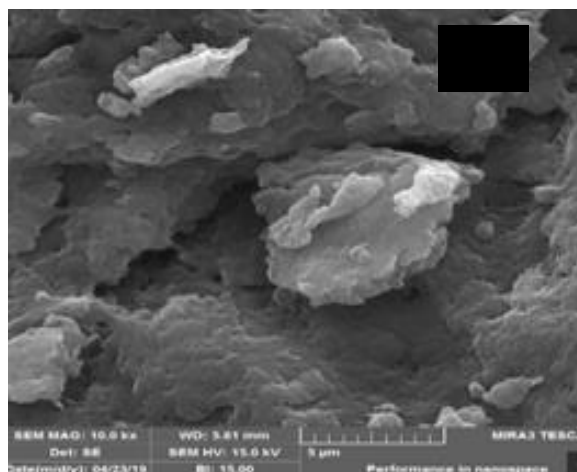
شکل ۱۱. تصویر طیف‌های سطحی باکتریایی، به دست آمده از دستگاه طیف سنج تبدیل فوریه فرسرخ (الف) سطح باکتری بدون تماس با یون فلزی نیکل، (ب) سطح باکتری در تماس با یون فلزی.

در شکل (۱۲) نشان داده شده است. این تصاویر نشان‌دهنده اتصال فلز به سطح باکتری بر اساس میان‌کنش بین فلز و باکتری است. سطح باکتری بعد از اتصال فلز دچار تغییراتی شده که جذب یون فلزی را معین می‌کند.

۹-۳ ویژگی‌های سطحی باکتری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح باکتری زمانی که فلز به آن وصل شد و در حالتی که سطح باکتری بدون حضور فلز باشد



(ب)



(الف)

شکل ۱۲. تصویر SEM (الف) باکتری قبل از مجاورت با فلز نیکل، (ب) باکتری بعد از مجاورت با فلز نیکل.

## ۴. بحث و نتیجه‌گیری

امروزه زیست‌فناوری بررسی جذب و حذف فلزات سمی و سنگین به‌وسیله ریزاندام‌ها به‌ویژه باکتری‌ها، که مقرون به صرفه و دارای بازده مناسب و قابل قبولی است به‌طور جدی مطالعه شده است؛ به‌ویژه مطالعات عمیق و وسیعی در سه دهه اخیر بر روی سازوکار حذف فلزات سمی به‌خصوص به‌وسیله باکتری‌ها و قارچ‌ها انجام گرفته است. برای درک صحیح و عمیق این مسأله به بررسی ژنتیک و سازوکارهای مقاومت در ریزاندام‌ها نیاز است، تا نقش اساسی این فلزات در واکنش‌های بیوشیمیایی بین آن‌ها و سطوح باکتری مشخص شود. آیا نقش آنزیم‌ها و حضور ژن‌های خاص در ژنوم باکتری و قارچ و حتی میزان اندازه ژنوم آن‌ها در پدیده حذف این فلزات تأثیر دارد؟

یافته‌های این تحقیق نشان داد که باکتری مورد مطالعه دارای کارایی مناسبی برای حذف یون نیکل است که با معادله خطی لانگمویر حدود  $0/51$  میلی‌مول بر گرم و مؤلفه ثابت لانگمویر عدد  $49/01$  و در این فرایند دارای  $R^2$  نزدیک به یک ( $0/994$ ) داشته است. با توجه به این عدد  $R^2$  و واکنش از هم‌دمایی لانگمویر پیروی کرده است. نقش جایگاه‌های سطحی باکتری در فرایند جذب زیستی دارای اهمیت دوچندان است [۱۹].

یافته‌های این تحقیق از منظر جنبش‌شناسی، هم‌دمایی، فرایند جذب وابسته و غیر وابسته به متابولیسم و آزمایش‌های مربوط به تعیین گروه‌های سطحی نشان داد که جاذب زیستی مورد بحث دارای بازده و کارایی مناسبی برای حذف و جذب یون فلزی نیکل است و می‌تواند نامزد مناسبی برای استفاده‌های نیمه‌صنعتی و در نهایت سطح صنعتی و محیط‌های حقیقی باشد. البته در این راستا نیازمند تلاش‌های بیشتری برای شفاف‌شدن نقاط تاریک این تحقیق است؛ از جمله استفاده در بیوراکتورها یا تخمیرکننده‌های صنعتی.

## ۵. تشکر و قدردانی

این تحقیق با کمک صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، معاونت علمی و فناوری به شماره طرح  $97022415$  و با عنوان طرح "طراحی بیوراکتور برای حذف زیستی فلز نیکل به‌وسیله باکتری جدید جداشده از باداب سورت ساری و بهینه‌سازی جذب به‌وسیله RSM" به انجام رسیده است؛ بنابراین از آن نهاد محترم تقدیر و تشکر می‌شود.

## مراجع

- [1] Abd El-Latif, M. M., Ibrahim, A. M., "Adsorption, kinetic and equilibrium studies on removal of basic dye from aqueous solutions using hydrolyzed oak sawdust", *Desalination and Water Treatment*, 6: pp. 252-268, (2009).
- [2] qSayyadi, S., Ahmady-Asbchin, S., Kamali, K., Tavakoli, N., "Thermodynamic, equilibrium and kinetic studies on biosorption of  $Pb^{2+}$  from aqueous solution by *Bacillus pumilus* sp. AS1 isolated from soil at abandoned lead mine", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 80: pp. 701-708, (2017).
- [3] Fomina, M., Gadd, G. M., "Biosorption: current perspectives on concept, definition and application", *Bioresource Technology*, 160: pp. 3-14, (2014).
- [4] Demirak, A., "Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey", *Chemosphere*, 63: pp. 1451-1458, (2006).
- [5] Ahmady-asbchin, S., Rostamzad, A., Jafari, N. "Saccharomyces carlsbergensis yeast biomass using active and passive for biological uptake of lead", *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 21: pp. 153-161, (2014).
- [6] Amini, M, Younesi, H, Bahramifar, N., "Biosorption of nickel (II) from aqueous solution by *Aspergillus Niger*: Response surface methodology and isotherm study", *Chemosphere*, 75: pp. 1483-1491, (2009).
- [7] Sajadi, F., Sayadi, M. H., Hajiani, M., "Optimization study of adsorption process of Cadmium by synthesized silver nanoparticles using *Chlorella vulgaris*", *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 23: pp. 119-129, (2016).
- [8] Arsiya, F., Sayadi, M. H., Sobhani, S. "Green synthesis of palladium nanoparticles using *Chlorella vulgaris*", *Materials Letters*, 186: pp. 113-115, (2017).
- [9] Flouty, R. Estephane, G., "Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems", *Journal of Environmental Management*, 11: pp. 106-114, (2012).
- [10] Masoumi, F., Khadivinia, E., Alidoust, L., Mansourinejad, Z., Shahryari, S., Safaei, M., Noghabi, K. A., "Nickel and lead biosorption by *Curtobacterium* sp. FM01, an indigenous bacterium isolated from farmland soils of northeast Iran", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4: pp. 950-957, (2016).
- [11] Kulkarni, R. M., Shetty, K. V., Srinikethan, G., "Cadmium (II) and nickel (II) biosorption by *Bacillus laterosporus* (MTCC 1628)", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45: pp. 1628-1635, (2014).

- [12] Tabaraki R., Nateghia A., Ahmady-Asbchin S., "Biosorption of lead (II) ions on *Sargassum ilicifolium*: Application of response surface methodology", *International Biodeterioration and Biodegradation*. 93: pp. 145-152, (2014).
- [13] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.", *Molecular biology and evolution*, 30: pp. 2725-2729, (2013).
- [14] Marqués, A. M., Roca, X., Simon-Pujol, M. D., Fuste, MC., Congregado, F., "Uranium accumulation by *Pseudomonas* sp. EPS-5028", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35: pp. 406-410, (1991)
- [15] Amoozegar, M. A., Fatemi, A. Z., Karbalaee-Heidari, H. R., Razavi, M. R., "Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004", *Microbiological Research* 162: pp. 365-377, (2007).
- [16] Zhao, B., Liu, A., Wu, G., Li, D., Guan, Y., "Characterization of heavy metal desorption from road-deposited sediment under acid rain scenarios", *Journal of Environmental Sciences*, 51: pp. 284-293, (2017).
- [17] Ahmady-Asbchin, S., Mohammadi, M., "Biosorption of copper ions by marine brown alga *Fucus vesiculosus*", *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5: pp. 121-127, (2011).
- [18] Ghosal, A., Manna, A., "Response surface method-based optimization of ytterbium fiber laser parameter during machining of Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-MMC", *Optics and Laser Technology*, 46: pp. 67-76, (2013).
- [19] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry", *Talanta*, 76: pp. 965-977, (2008).
- [20] Sibi, G., "Biosorption of chromium from electroplating and galvanizing industrial effluents under extreme conditions using *Chlorella vulgaris*", *Green Energy and Environment*. 1: pp. 172-177, (2016).
- [21] Muñoz, A. J., Espínola, F., Ruiz, E., "Biosorption of Ag(I) from aqueous solutions by *Klebsiella* sp.3S1", *Journal of Hazardous Materials*.329: pp. 166-177, (2017).
- [22] Huang, Y., Chen, Q., Deng, M., Japenga, J., Li, T., Yang, X., He, Z., "Heavy metal pollution and health risk assessment of agricultural soils in a typical peri-urban area in southeast China", *Journal of Environmental Management*.207: pp. 159-168, (2018).
- [23] Holan, Z. R., Volesky, B., "Biosorption of marine algae", *Biotechnology and bioengineering*. 43: pp. 1001-1009, (1994).
- [24] Volesky, B., "Advances in biosorption of metals: selection of biomass types", *FEMS Microbiology Reviews*. 14: pp. 291-302, (1994).