نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۲، خرداد– تیر ۱۳۹۵، ص. ۶۰۴-۵۹۴

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 2, May.-Jun. 2016, p. 594-604

جذب سرب توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا (p168)* و کمپوزیت‌های این باکتری با رس‌های پالیگورسکیت و سپیولیت از محلول‌های آبی

مرضیه توانایی[1*]– سمیه بختیاری[2]– مهران شیروانی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۱۲

چکیده

امروزه آلودگی محیط زیست به انواع فلزات سنگین در اثر توسعه صنایع به یک تهدید جدی تبدیل شده است. سرب از جمله این فلزات است که اثرات نابهنجاری بر محیط زیست و سلامتی موجودات دارد. هزینه زیاد و مشکلات تکنیکی روش‌های معمول حذف فلزات سنگین باعث شده روش حذف بیولوژیکی بوسیله باکتری‌ها به‌عنوان گزینه‌ای اقتصادی و سازگار با محیط زیست مورد توجه قرار گیرد. برای انجام این آزمایش، باکتری‌ها در محیط کشت NB کشت شدند و با استفاده از روش چگالی نوری و میکروسکوپ نوری جمعیت آن‌ها تعیین گردید. میزان جذب سرب تهیه شده از محلول نیترات سرب توسط بیومس خشک باکتری اندازه‌گیری شد. برای تعیین همدمای جذب سرب توسط کمپوزیت‌های رس– باکتری، نسبت‌های مختلف باکتری– رس با استفاده از نیترات پتاسیم ۰/۰۱ مولار تهیه و با محلول ۰/۵ میلی‌مولار سرب مخلوط گردید. نتایج جذب سرب در غلظت‌های ۷/۵ تا ۵۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر توسط باکتری *سودوموناس* نشان داد که حدود ۳۱/۵ تا ۷۸/۴ درصد از غلظت‌های اولیه سرب توسط این باکتری جذب می‌شود. حداکثر ظرفیت جذب سرب (q_{max}) توسط *سودوموناس پوتیدا* ۵۸۲/۴ میلی‌گرم بر گرم به‌دست آمد. بر اساس آزمون LSD تمامی نسبت‌های مختلف کمپوزیت‌ها در سطح احتمال آماری ۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌داری با باکتری منفرد در جذب سرب داشتند. نتایج نشان داد که باکتری *سودوموناس پوتیدا* و کمپوزیت‌های این باکتری با رس‌های پالیگورسکیت و سپیولیت پتانسیل زیادی برای حذف سرب از محلول‌های آبی دارند.

واژه‌های کلیدی: فلزات سنگین، جذب زیستی، رس‌های رشته‌ای، همدمای جذب

مقدمه

آلودگی محیط زیست یکی از معضلات زیانباری است که عمدتاً در جریان بهره‌برداری از منابع طبیعی و استفاده از سوخت‌های فسیلی ایجاد می‌شود. این پدیده با صنعتی شدن و تحول جوامع بشری شدت بیشتری یافته است. منظور از آلودگی محیط زیست تغییرات نامطلوب در مشخصات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی منابع اصلی حیات یعنی آب، هوا و خاک به مقداری است که بقاء و سلامت انسان و دیگر موجودات زنده را به خطر انداخته و یا فعالیت آن‌ها را محدود سازد (۱۸). فلزات سنگین گروهی از آلاینده‌های پایدار غیر قابل تجزیه بیولوژیک هستند که به‌وسیله فرآیندهای طبیعی و یا فعالیت‌های انسانی در محیط زیست رها شده، به‌طور خود به خود و طبیعی تخریب پذیر نبوده و به شدت برای گیاهان، حیوانات و انسان‌ها سمی هستند (۱۴). سرب یکی ازخطرناک ترین فلزات سنگین محسوب می‌شود که اگر غلظت آن از حد مجاز تجاوز کند می‌تواند سلامتی انسان را به خطر اندازد. این عنصر از طریق فرآیندهای طبیعی همچون هوازدگی کانی‌ها و انتقال محصولات ناشی از آن، فرونشست حاصل از طوفان ریزگردها، انفجار آتش‌فشان‌ها و آتش‌سوزی جنگل‌ها و فعالیت‌های انسانی همانند استخراج معادن، صنایع ذوب فلزات، سوخت بنزین سرب‌دار، تخلیه فاضلاب‌های صنعتی و شهری، و استفاده مستمر از کودها و آفت‌کش‌ها وارد محیط زیست می‌شود (۱۸). سرب اغلب در فاضلاب‌های صنعتی وجود دارد و یکی از فلزات سنگینی است که توسط آژانس حفاظت محیط زیست ایالت متحده (USEP) [4] در زمره آلاینده‌های اولویت‌دار طبقه‌بندی شده است (۲).

روش‌های معمول جهت حذف فلزات سنگین از پساب‌ها، رسوب- دهی شیمیایی به شکل هیدروکسید و یا سولفید و یا تعویض یونی می‌باشد. این روش‌ها معمولاً دارای هزینه زیاد و مشکلات تکنیکی

۱ و ۳– دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
(*- نویسنده مسئول: Email: Marzieh_tavanaei@of.iut.ac.ir)
۲– دانش آموخته دکتری، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان و استادیار گروه عمران، دانشکده عمران، دانشگاه صنعتی سیرجان

4- US Environmental Protection Agency

هستند. امروزه روش‌های حذف بیولوژیکی فلزات سنگین به‌عنوان گزینه‌ای اقتصادی و سازگار با محیط زیست مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷). جذب بیولوژیکی فلزات سمی موضوع مهمی در حفظ محیط زیست است. کارایی قابل توجه سلول‌های باکتریایی در تجمع فلزات، به سطح ویژه زیاد آن‌ها مربوط می‌شود. سطوح سلولی تمام باکتری‌ها به‌دلیل ساختارهای مختلف آنیونی دارای بار منفی است. بر این اساس، دیواره سلول باکتریایی تمایل شدیدی برای جذب کاتیون‌های فلزی دارد. همچنین سلول‌های باکتریایی زنده، غیر زنده و محصولات آن‌ها دارای کارایی زیادی برای تجمع اشکال محلول فلزات هستند (۶). در چند سال اخیر مطالعات زیادی در زمینه جذب بیولوژیکی فلزات سنگین توسط جاذب‌های بیولوژیکی مانند باکتری‌ها انجام پذیرفته است. برای نمونه لوپز و همکاران (۲۰۰۰) تمایل باکتری‌های *B. cereus*، *B. subtilis*، *E. coli* و *P. aeruginosa* را برای جذب کاتیون‌های فلزی به ترتیب زیر گزارش کردند (۱۱):

Ni>>Hg>U>>As>Cu>Cd>Co>Cr>Pb

سودوموناس پوتیدا ریزجانداری است که گرایش زیادی به برخی ترکیبات آروماتیک از جمله آلاینده‌های زیست محیطی دارد، به همین دلیل سویه‌های آن به‌عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده آلاینده‌های آلی شناخته شده‌اند (۵). چن و همکاران (۲۰۰۵) جذب مس و روی را توسط *سودوموناس پوتیدا* (*CZ1*) بررسی کرده و گزارش نمودند که ظرفیت جذب سلول‌های زنده این باکتری بیشتر از سلول‌های غیر زنده است (۸).

کانی‌های رسی نیز به‌دلیل داشتن سطح ویژه و گنجایش تبادل کاتیونی زیاد، بار خالص منفی، پایداری شیمیایی و ساختار لایه‌ای از عمده‌ترین جاذب‌های فلزات هستند. پالیگورسکیت و سپیولیت از رس‌های فیبری هستند که به دلیل داشتن ساختار و مورفولوژی خاصشان دارای سطح ویژه و ظرفیت جذب زیاد برای فلزات سنگین هستند (۱۶). سلول‌های باکتریایی می‌توانند پس از جذب‌شدن بر روی سطوح کانی‌ها، فلزات را جذب کرده و آن‌ها را به اشکال با تحرک و زیست‌فراهمی کم تبدیل کنند. باکتری‌ها به‌صورت تک‌سلولی و یا چندسلولی روی سطوح ذرات رس جذب شده و کمپوزیت‌هایی را تشکیل می‌دهند. این کمپوزیت‌ها نقش مهمی در جذب و اتصال فلزات سمّی ایفا می‌کنند. تاکنون مطالعاتی در زمینه جذب فلزات سنگین توسط کمپوزیت‌های باکتری- رس انجام شده است. به‌عنوان نمونه چن و همکاران (۲۰۰۹) توان کمپوزیت گئوتیت- *سودوموناس پوتیدا* (*CZ1*) را در جذب روی و مس بررسی کردند و دریافتند که میزان جذب فلزات با افزایش جزء سلول‌های زنده باکتری در کمپوزیت افزایش می‌یابد (۲). ژئو و همکاران (۲۰۱۰) نیز جذب مس وکروم را توسط گئوتیت و کمپلکس گئوتیت- باکتری *Bacillus thuringiensis* بررسی کردند و مشاهده نمودندکه ظرفیت جذب مس وکروم توسط باکتری خالص بیشتر از مقدار جذب شده توسط گئوتیت خالص بود. آن‌ها همچنین مشاهده کردندکه مقدار بیشتری از این فلزات بر روی کمپلکس باکتری- گئوتیت نسبت به گئوتیت خالص جذب شد (۲۲).

از آنجا که سرب یکی از آلاینده‌های خطرناک در پساب‌های صنعتی بوده و با توجه به مشکلات و هزینه زیاد روش‌های معمول حذف فلزات سنگین از پساب‌ها این مطالعه با هدف ارزیابی همدماهای جذب سرب توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا* و کمپوزیت این باکتری با رس‌های پایگورسکیت و سپیولیت انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی

در این پژوهش از پالیگورسکیت فلوریدا از مخزن کانی‌های رسی در دانشگاه پوردو و سپیولیت یزد استفاده شد. باکتری *سودوموناس پوتیدا* (*P168*) خریداری شده از موسسه تحقیقات خاک و آب تهران به‌عنوان باکتری مدل مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر و کشت این باکتری در محیط کشت Nutrient Broth (NB) انجام گرفت (۲۱ و ۳). نیترات سرب و نیترات پتاسیم نیز از شرکت مرک خریداری و مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی رس‌ها

نمونه رس‌های مورد استفاده آسیاب و از الک ۰/۰۵ میلی‌متر عبور داده شدند. نمونه‌های پودری پس از شستشو با آب مقطر، به‌وسیله محلول ۰/۵ مولار کلرید کلسیم اشباع شدند. در نهایت نمونه‌های اشباع‌شده با آب مقطر شسته شدند تا زمانی که عاری از یون کلر گردند. عدم حضور یون کلر به‌وسیله $AgNO_3$ تایید گردید. پس از این مرحله، نمونه‌ها هواخشک شده و مجدداً از الک ۰/۰۵ میلی‌متر عبور داده شدند.

کشت، شمارش و اندازه‌گیری جرم باکتری

باکتری‌ها در محیط کشت مایع با استفاده از NB کشت شدند و شمارش مستقیم آن‌ها بوسیله میکروسکوپ نوری انجام گرفت. همچنین چگالی نوری نمونه‌های شاهد از سوسپانسیون باکتری که طی چند مرحله سانتریفیوژ و شستشو بوسیله آب استریل فاقد محتوای محیط کشت شده‌اند توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر (OD[1]410) قرائت شد و نهایتا نمودار کالیبراسیون بین عدد جذب شده در این طول موج و جمعیت باکتری ترسیم گردید (۱۵ و ۳).

سوسپانسون‌های شاهد از باکتری در ۳۰۰۰ دور در ۲۰ دقیقه

1- Optical density

سانتریفیوژ شدند (این دور سانتریفیوژی بعنوان مناسب‌ترین دور در آزمایشات اولیه تعیین گردید، که در آن تمامی سلول‌های باکتری ته‌نشین شد و طی آن محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ هیچ گونه جذبی در طول موج ۴۱۰ نانومتر نشان نداد). بعد از سانتریفیوژ باکتری‌های ته‌نشست شده در شرایط کاملا استریل انجماد خشک[1] شدند و نهایتا با استفاده از ترازوهای ۴ رقم اعشار و دارای دقت بسیار بالا جرم نمونه‌ها در سوسپانسیون توزین گردید.

جذب سرب توسط باکتری

آزمایش جذب سرب توسط *سودوموناس پوتیدا* با استفاده از محلول‌های سرب با غلظت‌های ۷/۵ تا ۵۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر از نمک نیترات سرب انجام شد. بدین منظور، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت ($7/24\times10^{7}$ cells ml^{-1}) و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول سرب (۱۱۰–۱۵ mg L^{-1}) مخلوط و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد تکان داده و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. نهایتاً محلول‌های رویی استخراج و سرب باقی‌مانده در محلول‌ها توسط دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی اندازه‌گیری شد. اختلاف بین مقدار سرب اولیه و باقی‌مانده بیان‌گر سرب جذب شده توسط *سودوموناس* بود. درصد جذب سرب توسط جمعیت ذکر شده *سودوموناس پوتیدا* محاسبه گردید (۳).

جذب سرب توسط کمپوزیت‌های رس و باکتری

به‌منظور بررسی جذب سرب توسط کمپوزیت‌های مختلف، ابتدا سوسپانسیون‌های ۱٪ از رس‌ها به‌کمک دستگاه التراسونیک و با استفاده از الکترولیت ۰/۰۱ مولار نیترات پتاسیم و سوسپانسیونی از باکتری *سودوموناس پوتیدا* با جمعیت ($0/34\times10^{7}$(cells ml^{-1}) با استفاده از الکترولیت ۰/۰۱ مولار نیترات پتاسیم تهیه گردید. سپس نسبت‌های حجمی ۱۰۰:۰، ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۲۵:۷۵ و ۰:۱۰۰ (سوسپانسیون‌های باکتری: رس) به‌همراه ۲/۰۷۲ میلی‌لیتر از محلول ۱۰۰۰ mg L^{-1} نیترات سرب در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از تکان‌دادن به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰، سانتریفیوژ شدند. نهایتاً محلول رویی استخراج شده و سرب باقی‌مانده در آن‌ها توسط دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی اندازه‌گیری شد. اختلاف مقدار سرب اولیه و باقی‌مانده بیان‌گر سرب جذب شده توسط کمپوزیت‌ها بود. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از جذب سرب با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مولار توسط کمپوزیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت (۲).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برازش مدل‌های تعادلی بر داده‌های هم‌دمای جذب به روش رگرسیون غیرخطی به‌کمک نرم افزار Graph Pad Prism 5 انجام پذیرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS و طرح آماری فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

جهت توصیف فرآیند جذب سرب از مدل‌های لانگمویر و فروندلیچ استفاده شد. مدل لانگمویر به صورت زیر بیان می‌شود:

$$q_e = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \qquad (۱)$$

در این معادله، q_e میزان سرب جذب‌شده به ازاء واحد جرم جاذب، C_e غلظت تعادلی سرب در محلول و q_{max} ظرفیت جذب را نشان می‌دهند. K_L ثابت معادله لانگمویر و نشان‌دهنده قدرت بر هم‌کنش بین جاذب و ماده جذب شده است. بر اساس فاکتور K_L و میزان غلظت اولیه جذب شونده (C_0) می‌توان فاکتور جداسازی (R_L) را محاسبه کرد. بر اساس این ضریب می‌توان مطلوب بودن جذب را مشخص نمود. این شاخص بر اساس معادله زیر محاسبه می‌شود (۱۰).

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \qquad (۲)$$

معادله فروندلیچ به‌صورت زیر است:

$$q_e = K_F C_e^N \qquad (۳)$$

که در آن، q_e میزان سرب جذب شده به ازاء واحد جرم جاذب، C_e غلظت تعادلی سرب و K_F و N ثابت‌های مدل هستند که به‌ترتیب بیانگر توان جذب و قدرت پیوند بین سرب و جاذب می‌باشند (۱۲).

نتایج و بحث

جذب سرب توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا*

در شکل ۱، هم‌دمای جذب سرب توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا* همراه با مدل‌های لانگمویر و فروندلیچ برازش‌یافته بر آن‌ها ارائه گردیده است. مطابق تقسیم‌بندی گیلز و همکاران (۱۹۷۴) شکل هم‌دمای جذب سرب توسط *سودوموناس پوتیدا* در کلاس L قرار گرفت که تمایل نسبتاً زیاد باکتری برای جذب سرب را نشان می‌دهد (۸).

پارامترهای مربوط به مدل‌های لانگمویر و فروندلیچ برای توصیف جذب سرب توسط این باکتری در جدول ۱ ارائه گردیده است. مدل فروندلیچ در توصیف فرایند جذب موفق‌تر از لانگمویر بود. پارامتر q_{max} لانگمویر که حداکثر توان جذب سرب توسط *سودوموناس پوتیدا* را نشان می‌دهد ۵۸۲/۴ mg g^{-1} و ثابت K_L لانگمویر که نشان‌دهنده تمایل جذب است ۰/۱۱ L mg^{-1} به‌دست آمد.

کالکان و همکاران (۲۰۱۳) داده‌های حاصل از جذب کادمیوم

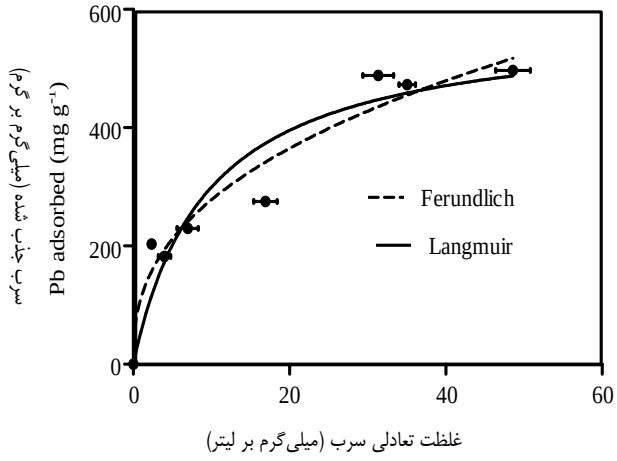
1- Freeze dry

توسط باکتری‌های *Staphylococous cohnii GC* را با استفاده از مدل‌های لانگمویر و فروندلیچ برازش داده و گزارش کردند که بیشترین توان جذب کادمیوم توسط این باکتری‌ها (پارامتر q_{max} لانگمویر) برابر ۸۳/۰۳۴ میلی‌گرم بر گرم است (۹). مرندی و همکاران (۱۳۸۶) جذب بیولوژیکی Pb(II) و Zn(II) را توسط بیومس غیرزنده *P. chrysosporium* بررسی کرده و گزارش کردند که حداکثر یون‌های فلزی جذب شده برای سرب و روی به‌ترتیب ۹۰ و ۶۳mg g^{-1} می‌باشد (۱۳).

چن و همکاران (۲۰۰۵) نیز جذب مس و روی را توسط *سودوموناس پوتیدا* (*CZ1*) بررسی کرده و نشان دادند که مدل لانگمویر مدل مناسبی برای توصیف داده‌های جذب می‌باشد. این محققین پارامتر q_{max} برای جذب مس توسط سلول‌های زنده و غیر-زنده این باکتری را به‌ترتیب ۲۲/۹ و ۱۵/۸ میلی‌گرم بر گرم و برای جذب روی به‌ترتیب ۲۷/۴ و ۱۷/۷ میلی‌گرم بر گرم گزارش نمودند.

همچنین کولاک و همکاران (۲۰۱۱) جذب سرب را توسط باکتری-های *باسیلوس* بررسی نموده و گزارش کردند که بیشترین میزان جذب این فلز توسط سویه‌های *B. cereus* و *B. pumilus* به‌ترتیب به‌میزان ۲۳/۲۵ و ۲۹/۵ میلی‌گرم بر گرم است.

پارامتر K_L لانگمویر نیز برای جذب مس و روی توسط سلول-های زنده *سودوموناس پوتیدا* (*CZ1*) به‌ترتیب ۰/۰۸۷ و ۰/۰۷۸ لیتر بر میلی‌گرم و برای جذب این فلزات توسط سلول‌های غیرزنده به-ترتیب ۰/۰۳۶ و ۰/۰۳۲ لیتر بر میلی‌گرم گزارش شد که نشان می‌دهد تمایل سلول‌های زنده این باکتری برای جذب فلزات مس و روی بیشتر از سلول‌های غیرزنده است. در پژوهش حاضر پارامتر K_L لانگمویر ۰/۱۱ لیتر بر میلی‌گرم بدست آمد (جدول ۱) که تمایل زیاد مکان‌های موجود در مجموع سلول‌های زنده و غیرزنده باکتری *P. putida (P168)* برای جذب فلز سرب را نشان می‌دهد (۴ و ۲۷).



شکل ۱- هم‌دماهای جذب سرب توسط *سودوموناس پوتیدا* برازش یافته با مدل‌های لانگمویر و فروندلیچ
Figure 1- Adsorption isotherms of Pb sorption by *P. putida* fitted by Langmuir and ferundlich models

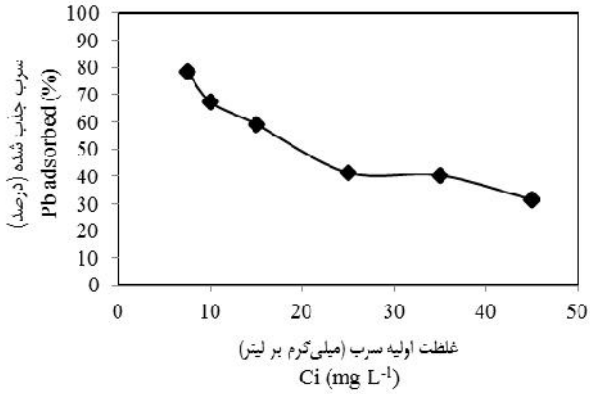
جدول 1- پارامترهای مدل‌های لانگمویر و فروندلیچ برازش یافته بر داده‌های هم‌دمای جذب سرب توسط *سودوموناس پوتیدا*
Table 1- Langmuir and Ferundlich parameters fitted to Pb adsorption isotherm data by *P. putida*

مدل لانگمویر Langmuir model			مدل فروندلیچ Ferundlich model		
q_{max} (mg g^{-1})	K_L (L mg^{-1})	R^2	K_F	N	R^2
582.4	0.11	0.91***	112.4	0.3931	0.95***

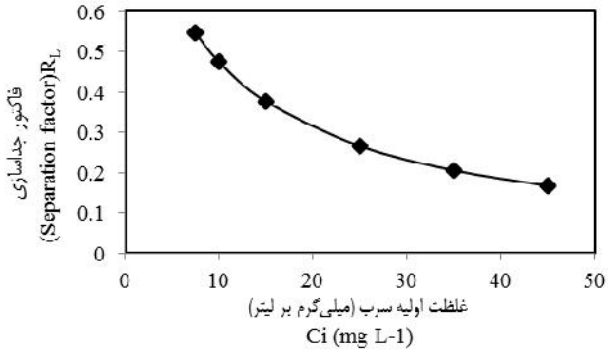
*** معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۰/۰۰۱
*** Significant at (p<0.001)

در شکل ۲، درصد جذب سرب توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا* به‌عنوان تابعی از غلظت تعادلی این فلز ارائه گردیده است. سلول‌های این باکتری، توان جذب سرب از محلول‌های با غلظت تعادلی ۲/۳۵ تا ۴۸/۶ میلی‌گرم بر لیتر را به‌میزان ۳۱/۴ تا ۷۸/۴ درصد داشته و می‌توانند جاذب موثری برای حذف این فلز سنگین باشند.

پارامتر R_L برای جذب سرب توسط *سودوموناس پوتیدا* در دامنه ۰/۱۷ تا ۰/۵۵ به‌دست آمد که در دامنه صفر تا یک قرار گرفته و نشان‌دهنده جذب مطلوب این فلز توسط باکتری است (شکل ۳).



شکل ۲- درصد جذب سرب توسط *سودوموناس پوتیدا* به‌عنوان تابعی از غلظت اولیه
Figure 2- The percentage of Pb sorption by *P. putida* as a function of initial concentration



شکل ۳- ضریب R_L جذب سرب توسط *سودوموناس پوتیدا* به‌عنوان تابعی از غلظت اولیه
Figure 3- Separation factor (R_L) of Pb sorption by *P. putida* as a function of initial concentration

جذب سرب توسط کمپوزیت‌های *سودوموناس پوتیدا* – پالیگورسکیت/ سپیولیت

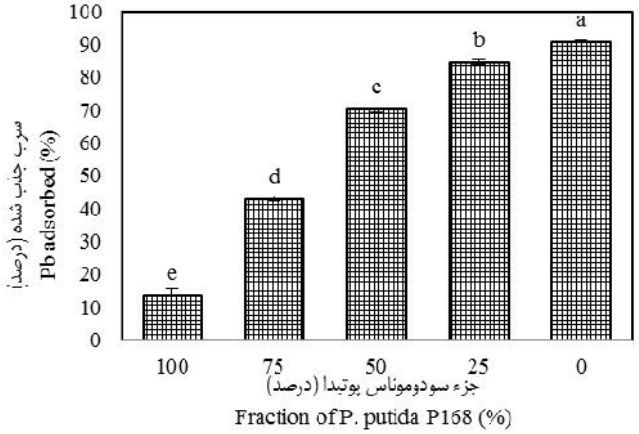
در شکل‌های ۳ و ۴، تاثیر کمپوزیت‌های مختلف کانی- باکتری بر درصد جذب سرب نشان داده شده است. با توجه به جداول تجزیه واریانس ۲ و ۳ تمامی نسبت‌های مختلف کمپوزیت سپیولیت- *سودوموناس پوتیدا* و پالیگورسکیت- *سودوموناس پوتیدا* در سطح احتمال آماری ۰/۰۰۱ درصد تفاوت معنی‌داری با باکتری منفرد در جذب سرب داشتند.

بر اساس آزمون LSD بین تمامی نسبت‌های باکتری: پالیگورسکیت اختلاف معنی‌دار در جذب سرب وجود داشت، ولی تفاوت معنی‌داری بین نسبت‌های ۰:۱۰۰، ۲۵:۷۵ و ۵۰:۵۰ باکتری: سپیولیت از نظر جذب سرب دیده نشد (شکل‌های ۴ و ۵). احتمالاً با توجه به قدرت جذب قابل توجه کانی سپیولیت، تاثیر نسبت‌های مختلف باکتری بر میزان جذب سرب نمایان نشده است.

تمپلتن و همکاران (۲۰۰۳) جذب سرب را توسط کمپوزیت گئوتیت- بیوفیلم *Burkholderia cepacia* و اجزاء منفرد تشکیل‌دهنده کمپوزیت بررسی کرده و گزارش کردند که در pH کمتر از ۵/۵، حداقل ۵۰٪ از کل سرب جذب شده مرتبط با بیوفیلم ذکر شده است، در حالی‌که در pH بزرگ‌تر از ۶، بیش از ۷۰٪ کل جذب مربوط به گئوتیت می‌باشد (۲۰).

موون و همکاران (۲۰۱۲) جذب مس را توسط فری‌هیدریت و

کمپوزیت فری‌هیدریت- *Bacillus subtilis* به‌عنوان تابعی از pH و نسبت فری‌هیدریت: باکتری بررسی کردند و گزارش کردند که جذب مس توسط جزء باکتری در کمپوزیت، توسط گروه‌های عامل موجود در سطح باکتری با تشکیل کمپلکس کربوکسیل- مس انجام می‌شود. ولی جذب این فلز توسط جزء گئوتیت در کمپوزیت، به‌دلیل تشکیل کمپلکس‌های درون‌کره‌ای است (۱۹).



شکل ٤- درصد جذب سرب توسط کمپوزیت‌های *سودوموناس پوتیدا*-پالیگورسکیت با نسبت‌های مختلف

Figure 4- The percentage of Pb sorption by *P. putida*-palygorskite composites with different ratios

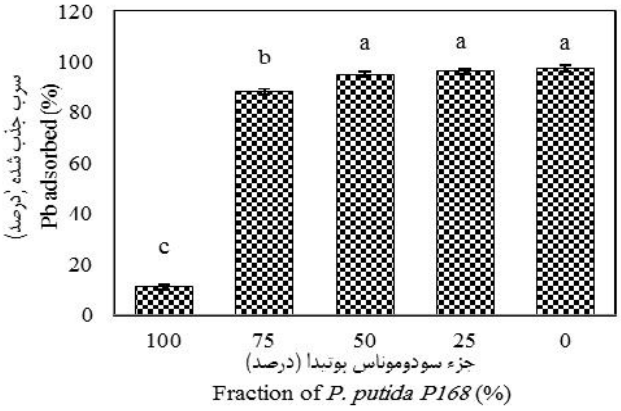
جدول ۲- تجزیه واریانس جذب سرب توسط کمپوزیت‌های *سودوموناس پوتیدا*-پالیگورسکیت با نسبت‌های مختلف

Table 2- Analysis of variance for Pb sorption by *P. putida*-palygorskite composites with different ratios

منابع تغییر Sources of variation	میانگین مربعات Mean square	درجه آزادی Degrees of freedom
تیمار Treatment	3076.16***	4
خطا Error	1.08	10
کل Total		14

*** معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۰/۰۰۱

*** Significant at ($p<0.001$)



شکل ٥- درصد جذب سرب توسط کمپوزیت‌های *سودوموناس پوتیدا*-سپیولیت با نسبت‌های مختلف

Figure 5- The percentage of Pb sorption by *P. putida*-sepiolite composites with different ratios

جدول ۳- تجزیه واریانس جذب سرب توسط کمپوزیت‌های *سودوموناس پوتیدا*-سپیولیت با نسبت‌های مختلف

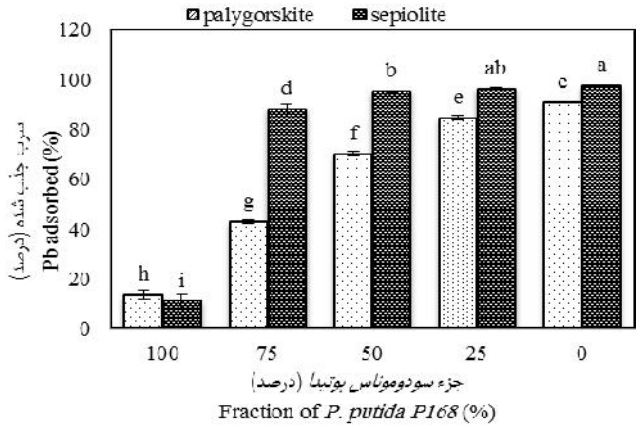
Table 3- Analysis of variance for Pb sorption by *P. putida*-sepiolite composites with different ratios

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات Mean square
تیمار Treatment	4	4188.59***
خطا Error	10	2.53
کل Total	14	

*** معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۰/۰۰۱

*** Significant at (p<0.001)

در شکل ۶، مقایسه تاثیر کمپوزیت‌های مختلف کانی- باکتری بر درصد جذب سرب نشان داده شده است. همان‌گونه‌که دیده می‌شود کمپوزیت‌های باکتری– سپیولیت در نسبت‌های متناظر موثرتر از کمپوزیت‌های باکتری- پالیگورسکیت در جذب سرب عمل کردند.



شکل ٦- مقایسه کمپوزیت‌های *سودوموناس پوتیدا*-پالیگورسکیت/سپیولیت در جذب سرب

Figure 6- The comparation of *P. putida*-palygorskite/sepiolite composites in Pb sorption

جدول ٤- تجزیه واریانس جذب سرب توسط کمپوزیت‌های *سودوموناس پوتیدا*- پالیگورسکیت/سپیولیت

Table 4- Analysis of variance for Pb sorption by *P. putida*-palygorskite/sepiolite composites

منابع تغییر **Sources of variation**	**درجه آزادی** **Degrees of freedom**	**میانگین مربعات** **Mean square**
نوع رس Type of clay	1	2213.44***
نسبت Ratio	4	6747.87
نوع رس*نسبت Type of clay*Ratio	4	516.88
خطا Error	20	1.8
کل Total	29	

*** معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۰/۰۰۱

*** Significant at p<0.001

با توجه به بزرگ‌تر بودن ابعاد کانال‌های سپیولیت نسبت به پالیگورسکیت و بیشتربودن سطح و گروه‌های عامل سپیولیت، درصد جذب سرب بیشتری توسط کمپوزیت‌های سپیولیت صورت گرفته است.

نتیجه‌گیری

داده‌های جذب سرب نشان دادند که باکتری *سودوموناس پوتیدا* جاذب موثری برای جذب فلز سنگین سرب می‌باشد. حداکثر جذب سرب بوسیله جرم خشک این باکتری ۵۸۲/۴ میلی‌گرم بر گرم محاسبه شد. بر اساس آزمون LSD، تفاوت معنی‌داری بین نسبت‌های مختلف باکتری: سپیولیت از نظر جذب سرب دیده نشد. با توجه به قدرت جذب قابل توجه کانی‌های سپیولیت و پالیگورسکیت در کمپوزیت‌ها، تاثیر نسبت‌های مختلف باکتری بر میزان جذب سرب نمایان نشده‌است. با افزایش نسبت باکتری در کمپوزیت باکتری-رس میزان جذب سرب کاهش می‌یابد که این امر ممکن است به‌دلیل پوشیده شدن گروه های عامل و اشغال مکان‌های جذبی موجود در سطوح رس‌ها و یا کانال‌ها و ریبون‌های خاص این رس‌های رشته‌ای توسط باکتری‌ها باشد. کمپوزیت‌های باکتری- سپیولیت موثرتر از کمپوزیت‌های باکتری- پالیگورسکیت در جذب سرب عمل کردند. لازم به ذکر است از آنجایی که باکتری‌ها فلزات سنگین را بصورت درون سلولی و برون سلولی جذب می‌کنند، اندازه‌گیری میزان واجذب این فلزات از باکتری‌ها نیز در تعیین کلی بازده باکتری در حذف فلزات سنگین از پساب‌ها بسیار حائز اهمیت است.

منابع

1- Bremner J.M., and Mulvaney C.S. 1982. Methods of soil analysis. Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. (ed.), Chemical and microbiological properties, American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, WI.

2- Chen X., Hu S., Shen C., Dou C., Shi J., and Chen Y. 2009. Interaction of *Pseudomonas putida CZ1* with clays and ability of the composite to immobilize copper and zinc from solution. Bioresource Technology, 100: 330-337.

3- Chen X.C., Wang, Y.P., Qi Lin J.Y.S., Wu W.X., and Chen Y.X. 2005. Biosorption of copper (II) and zinc(II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida CZ1*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 46: 101–107.

4- Colak F., Atarb N., Yazıcıoglu D., and Olgun A. 2011. Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance. Chemical Engineering Journal, 173: 422- 428.

5- Dapaah S.Y., and Hill G.A. 1992. Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida.* Biotechnology and Bioengineering, 40: 1353-1358

6- Fooladifar R., Kamani H., and Khaefi M. 2003. Removal of heavy metals from aqueous solutions by biosorption. 3417-3425. 9th National Congress of Chemical Engineering. 23-25 Nov. 2003. University of Science and Technology Tehran, Iran. (in Persian)

7- Gadd G. M. 1992. Encyclopedia of Microbiology (ed. Lederberg. J.) Academic Press Inc. Harcourt Brace Javanovich Publishers., San Diego, 2: 351-360

8- Giles C. H., Smith D., and Huitson A. 1974. A general treatment and classification of the solout adsorption isotherm. Journal of Colloid and Interface Science, 47: 755-765.

9- Kalkan E., Nadaroglu H., Dikbas N., Tasgin E., and Celebi N. 2013. Bacteria-Modified Red Mud for adsorption of cadmium ions from aqueous soloutions. Polish Journal of Environmental Studies, 22: 417-429.

10- Langmuir I. 1918. The adsorption of gases on plane surface of glass, mica, and platinum. Journal of the American Chemical Society, 40: 1361-1382.

11- Lopez A., Lazaro N., and JM M. A. P. 2000. Effect of pH on the adsorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 24: 146-151.

12- Low M. J. D. 1960. Kineics of cheisorption of gases on solid. ChemicalL Reviews, 60: 267-312.

13- Marandi A., and Amyrafshar H. 2008. Biosorption of Pb (II) and Zn (II) by non-living biomass of *Phanerochaete chrysosporium.* Environmental Science and Technology, 10: 197-207. (in Persian)

14- Moon E. M., and Peacock C. L. 2012. Adsorption of Cu(II) to ferrihydrite and ferrihydrite–bacteria composites: Importance of the carboxyl group for Cu mobility in natural environments. Geochimica ET Cosmochimica Acta, 92: 203-219.

15- Rong X., Huang Q., Xiaomin H., Chen H., Cai P., and Liang w. 2008. Interaction of Pseudomonas putida with kaolinite and montmorillonite. A combination study by equilibrium adsorption, ITC, SEM and FTIR. 64: 49–55.

16- Shirvani M., Shariatmadari H., and Kalbasi M. 2007. Kinetics of cadmium desorption from fibrous silicate clay minerals: Influence of organic ligands and aging. Applied Clay Science, 37: 175-184.

17- Singh S., Ma P. L. Q., and Hendry M. J. 2006. Characterization of aqueous lead removal by phosphatic clay: Equilibrium and kinetic studies. Journal of Hazardous Materials, 136: 654-662.
18- Sparks D. L. 2003. Environmental Soil Chemistry, Academic Press, San Diego, California.
19- Stratton G. W. 1987. The effect of pesticides and heavy metals towards phototrophic microorganisms. Review in Environmental Toxicology, 3: 71-147.
20- Templeton A. S., Spormann A. M., and Brown J. G. E. 2003. Speciation of Pb(II) sorbed by Burkholderia cepacia/goethite composites. Environmental Technology Letters, 37: 2166-2172.
21- Vasiliadoua I. A., Papoulisb D., Chrysikopoulosa C. V., Panagiotarasc D., Karakostad E., Fardisd M., and Papavassilioud G. 2011. Attachment of *Pseudomonas putida* onto differently structured kaolinite minerals: A combined ATR-FTIR and 1H NMR study. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 84: 354–359.
22- Zhu J., Huang Q., Pigna M., and Violante A. 2012. Competitive sorption of Cu and Cr on goethite-bacteria complex. Chemical Engineering Journal, 179: 26-32.

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 2, May.-Jun. 2016, p. 594-604

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۵، ص. ۶۰۴-۵۹۴

Lead Sorption from Aqueous Solutions by *Pseudomonas putida (p168)* and its Composites with Palygorskite and Sepiolite Clays

M. Tavanaei[1*] - S. Bakhtiari[2]- M. Shirvani[3]

Received: 06-05-2015
Accepted: 03-11-2015

Introduction: Heavy metals contamination due to natural and anthropogenic sources is a global environmental concern. Lead (Pb) is one of the very toxic heavy metals. Industrial production processes and their emissions, mining operation, smelting, combustion sources and solid waste incinerators are the primary sources of lead. This heavy metal has aberrant effects on the environment and living organisms. Hence, proper treatment of lead from soil and industrial wastewaters is very important. In order to remove toxic heavy metals from contaminated water systems, conventional methods such as chemical precipitation, coagulation, ion exchange, solvent extraction and filtration, evaporation and membrane methods are being used. These conventional methods generally have high costs and technical problems. Therefore, biosorption processes, in which microorganisms are used as sorbents, have been considered as economical and environmentally friendly options for removal of heavy metals from aqueous solution. Clay minerals are another group of sorbents used in removal of heavy metals from polluted environments. Furthermore, bacterial cells can be attached on clay mineral surfaces and form bacteria-mineral composites. These composites adsorb heavy metals and convert them into forms with low mobility and bioavailability. *Pseudomonas putida* is a unique microorganism with a high tendency to sorb and/or degrade certain environmental pollutants. Palygorskite and sepiolite are the fibrous clay minerals of arid and semiarid regions; their structures consist of ribbons and channels. These fibrous minerals have various applications in industry and the environment because of its large surface area and high adsorption capacity. The present study was conducted in order to determine the ability of *Pseudomonas putida (P168),* and its composites with palygorskite and sepiolite in lead sorption.

Materials and Methods: The bacterial strain used in the present study was *Pseudomonas putida (P168)* grown and maintained on Nutrient Broth (NB). The population of living and non-viable bacteria in suspension was determined by an optical microscope. The minerals used in this study were palygorskite from Florida (the Source Clay Minerals Repository, Purdue University, IN) and sepiolite from Yazd (Iran). The clay samples were ground and passed through 0.05 mm (mesh #270) sieve. The clays were then saturated with calcium chloride (0.5 M) and washed free of salts. Batch experiments were performed to measure Pb sorption by *Pseudomonas putida*. For this purpose, 10-ml aliquots of bacterial suspension (7.24×10^7 cells ml^{-1}) were added to10 ml solutions containing Pb with concentration ranged from15-110 mg L^{-1}. The mixtures were gently shaken at 30 °C for 24 h and centrifuged at 3000 rpm for 20 min. The concentration of Pb in the supernatants was finally measured by atomic absorption spectrometer. The percentage of sorbed Pb was determined by subtracting the amount of unabsorbed Pb from that initially added. Various hybrids of *P. putida* and clays were also exposed to solution of 0.5 mM Pb in 0.01 M KNO_3 to determine the role of composites in sorption of Pb. Langmuir and Freundlich adsorption isotherms were chosen to describe the biosorption equilibrium data. GraphPad Prism 5.0 was used for determining the isothermal parameters using non-linear regression analysis. Data were analyzed with the Statistical Analysis System (SAS). Experimental design was factorial in form of complete randomized block.

Results and Discussion: *Pseudomonas putida* showed a considerable capacity to sorb Pb ions. Lead sorption isotherms were sufficiently fitted with the Langmuir and Freundlich models. The Pb sorption isotherms by *P. putida* were L-type showing a high affinity of *P. putida* for Pb ions. Lead sorption capacity (q_{max}) of *P. putida* was estimated to be 582.4 mg g^{-1} and its Langmuir constant (K_L) was found to be 0.11 mg L^{-1}. The experimental data of lead sorption (7.5-55.5 mg L^{-1} initial concentration) by *P.putida (P168)* demonstrated that about 31.5% to 78.4% of the intial concentration of Pb was taken up by these bacteria. Sorption of Pb decreased with the increase of bacteria

1 and 3- Former M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
(*- Corresponding Author Email: Marzieh_tavanaei@of.iut.ac.ir)
2- Former Ph.D. Student, Department of Soil Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Assistant Professor, Department of Civil Engineering, College of Civil Engineering, Sirjan University of Technology, Sirjan, Iran

in the bacteria-clay composites, which may be due to the occupation of adsorption sites on the clay surface by the bacteria. Composites of bacteria-sepiolite were more effective than bacteria-palygorskite in Pb sorption due to the larger channel dimensions, greater surface area, and more functional groups of sepiolite than palygorskite. LSD test showed that there were significant differences between the hybrid sorbents with different ratios and single bacterial cells in Pb sorption.

Conclusion: The results showed that *P. putida* and its composites with palygorskite and sepiolite clays exhibited a high potential for the removal of Pb from aqueous solutions.

Keywords: Adsorption Isotherm, Biosorption, Fibrus Clays, Heavy Metals