جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به سرب و کادمیم و حذف این فلزات از پساب شهری

ساناز عباسی[1]، مصطفی چرم[2]، نعیمه عنایتی‌ضمیر[3]، حسین معتمدی[4]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز (نویسنده مسئول) n.enayatizamir@scu.ac.ir
۴- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

(دریافت ۹٤/۱/٤ پذیرش ۹٤/۱۰/۳۰)

چکیده

فلزات سنگین در بیشتر نقاط دنیا در فرم‌های فیزیکی و شیمیایی گوناگون و در غلظت‌های متفاوت به‌عنوان آلاینده محیط زیست، از طریق تخلیه پساب‌های متعدد ازجمله پساب‌های شهری و صنعتی، وارد محیط می‌شوند. امروزه استفاده از روش‌های بیولوژیکی در تصفیه و حذف فلزات سنگین از پساب‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته است. به این منظور در مطالعه حاضر باکتری‌هایی با مقاومت نسبی به فلزات سنگین کادمیم و سرب از پساب شهری جدا و خالص سازی شدند. باکتری‌های خالص‌سازی شده با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی و میزان حداقل غلظت بازدارنده آن‌ها تعیین شد. حداقل غلظت بازدارنده باکتری‌ها در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵،۱۰۰، ۱۵۰ ، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر سرب و کادمیم به‌دست آمد. سپس توانایی باکتری‌های برتر با جمعیت ۱۰۸ CFU/ml به‌منظور حذف سرب و کادمیم از پساب شهری غنی شده با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سرب و کادمیم مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* به‌عنوان باکتری‌های مقاوم از پساب شهری جداسازی و شناسایی شدند. حداقل غلظت بازدارنده سرب و کادمیم توسط *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* به ترتیب ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و همچنین حداکثر درصد حذف فلز سرب از پساب غنی شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سرب توسط باکتری‌های *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* به ترتیب ۵۰/٦۰ و ٤۵/۷ درصد و در مورد کادمیم ۳٦/۱۸ و ۲۱/٤۱ درصد در پساب غنی شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سرب و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیم به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس لاتروسپروس*، پساب شهری، حداقل غلظت بازدارنده، فلز سنگین، *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس*

۱- مقدمه

رابطه انسان عصر حاضر با محیط زیست دستخوش بحران است. این بحران در اثر دخالت و بهره‌برداری نامعقول و تخریب سودجویانه در محیط زیست ایجاد شده که اثرات زیانباری برای انسان و محیط اطراف او به همراه دارد. با بزرگ شدن شهرها و افزایش جمعیت آن‌ها از یک سو و گسترش صنایع و کارخانه‌ها از سوی دیگر مسئله آلودگی محیط زیست روز به روز اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. وجود فاضلاب‌های شهری و صنعتی یکی از عوامل آلودگی محیط زیست می‌باشد بنابراین لازم است آن‌ها را جمع‌آوری، پالایش و تصفیه نمود و سپس آن را به طبیعت برگرداند[۱، ۲ و ۳].

یکی از محدودیت‌های استفاده مجدد از پساب‌ها، وجود فلزات سنگین است که در بیشتر نقاط دنیا در فرم‌های فیزیکی و شیمیایی گوناگون و در غلظت‌های متفاوت به‌عنوان آلاینده محیط زیست، از طریق تخلیه پساب‌های متعدد از جمله پساب‌های شهری و صنعتی، وارد محیط می‌شوند. در میان فلزات سنگین سمی، جیوه، سرب و کادمیم که سه عنصر بزرگ[1] نامیده می‌شوند، به‌دلیل اثرهای مضر بر محیط زیست قابل توجه هستند [۲ و ۳].

به‌طور طبیعی سالانه حدود ۲۵۰۰۰ تن کادمیم وارد محیط زیست می‌شود. آتش سوزی جنگل‌ها و آتش‌فشان‌ها، فعالیت بشری مانند تولید شیرابه زباله‌های صنعتی مانند صنایع نساجی و

[1] Big Three

ذوب فلز، کودهای فسفاته، آفت‌کش‌ها، باتری‌های حاوی کادمیم، سوخت‌های فسیلی و آلودگی ناشی از صنایع سیمان‌سازی از عوامل منتشر کننده کادمیم می‌باشند[۴]. در اکوسیستم آبی، کادمیم در صدف‌های رودخانه‌ای، میگوها، خرچنگ‌ها و ماهی‌ها تجمع می‌یابد. از اثرات کادمیم بر انسان می‌توان به افزایش فشار خون، بیماری‌های کبدی و صدمات مغزی و نخاعی و بیماری ایتای ایتای اشاره کرد [۵].حداکثر غلظت مجاز کادمیم در آب آشامیدنی، بر مبنای متوسط روزانه آب آشامیدنی معادل با ۵/۲ لیتر، برای انسانی به وزن ۷۰ کیلوگرم،۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر است[۶].

سرب یکی از فلزاتی است که عوارض زیادی برای انسان دارد. اختلال در بیوسنتز هموگلوبین و کم‌خونی، افزایش فشار خون، آسیب به کلیه، سقط جنین و نارسی نوزاد، اختلال سیستم عصبی، آسیب به مغز، ناباروری مردان، کاهش قدرت یادگیری و اختلالات رفتاری در کودکان از عوارض منفی افزایش سرب در بدن است. حداکثر غلظت مجاز سرب در آب آشامیدنی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر است[۷].

نصر آزادانی و همکاران غلظت سرب و کادمیم را در سه مورد پساب صنعتی به‌ترتیب ۳۰ تا ۱۴۰ و ۱۲ تا ۱۸ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند [۸]. در برخی منابع این غلظت به ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیز رسیده است.

بنابراین حذف و یا کاهش میزان فلزات سنگین در پساب‌ها قبل از ورود به آب‌های زیرزمینی و یا آب‌هایی که در کشاورزی استفاده می‌شود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. روش‌های مرسوم برای حذف فلزات از فاضلاب عبارت‌اند از: رسوب شیمیایی، اکسیداسیون و یا کاهش شیمیایی، تبادل یونی، تیمار الکتروشیمیایی، اسمز معکوس و فیلتر کردن [۹]. این روش‌ها ممکن است چندان مؤثر نبوده و یا بسیار گران قیمت باشد، بنابراین توسعه روشی کم هزینه و سازگار با محیط زیست برای حذف فلزات سنگین از آب و فاضلاب اهمیت دارد. امروزه استفاده از روش‌های بیولوژیکی به‌عنوان روش کم هزینه و مؤثر در تصفیه و حذف فلزات سنگین از آب و خاک مورد توجه زیادی قرار گرفته است[۱۰، ۱۱ و ۱۲]. طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها از قبیل باکتری‌ها، مخمر، جلبک‌ها، تک‌یاخته‌ها و قارچ‌ها در پساب‌های صنعتی و شهری وجود دارند. غلظت‌های بالای فلزات سنگین از طریق بازدارندگی فعالیت‌های متابولیکی باعث کاهش یا جلوگیری از حضور جمعیت میکربی در محیط می‌شود و یا اینکه ریزموجودات مکانیسم‌های مقاومت در برابر غلظت‌های بالای فلزات سنگین را توسعه می‌دهند. شایان ذکر است عموماً تحمل غلظت‌های بالا از خصوصیات ذاتی ریزموجودات مقاوم است [۱۳]. از جمله مکانسیم‌های مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر مسمومیت با فلزات سنگین مثل سرب و کادمیم شامل دفع سلولی، ترسیب خارج سلولی، جذب زیستی، رسوب، تغییر شکل ظاهری سلول، افزایش تولید سیدروفور و تجمع درون سلولی است[۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷].

از بین روش‌های مختلف بیولوژیکی، تجمع و جذب فلز توسط باکتری‌ها دارای پتانسیل خوبی برای جایگزینی روش‌های متعارف برای حذف فلزات هستند. در ادبیات غالب در مورد استفاده از اصطلاحات " تجمع " و " جذب " از زیست توده، سردرگمی وجود دارد. فرایند تجمع با استفاده از سلول‌های زنده بوده و وابسته به سوخت و ساز حاصل از انرژی میکروارگانیسم هاست، در حالی که، مکانیسم جذب با استفاده از زیست توده مرده بوده و نیاز به صرف انرژی توسط میکروارگانیسم ندارد [۱۸]. عواملی مانند نوع زیست توده، اسیدیته، دما و حضور سایر یون‌های رقیب بر جذب زیستی تأثیرگذار است[۱۹]. جذب عناصر فلزی به دیواره سلولی باکتری ناشی از خاصیت آنیونی دیواره سلولی است که قادر به جذب کاتیون‌های فلزی است. کاتیون‌های فلزی موجود در محلول از طریق اتصال به گروه‌های عاملی سطح سلول باکتری مانند کربوکسیل، آمین، هیدروکسیل، تیواتر جذب زیست توده باکتری می‌شوند[۲۰]. در فرایند تجمع زیستی آلاینده به داخل سلول منتقل شده و به پروتئین‌های حاوی گروه‌های تیول بنام متالوتیونین که در پاسخ به حضور فلزات سمی موجود در محیط ساخته می‌شوند، متصل می‌شوند [۲۱]. تغییر در مورفولوژی و فیزیولوژی سلول با افزایش غلظت آلاینده در فرایند تجمع گزارش شده است[۲۲].

تجمع فلزات سنگین در بسیاری از باکتری‌ها مانند: *سیتروباکتر*[1] (سرب و کادمیم)، *تیوباسیلوس فرواکسیدانس*[2](نقره)، *باسیلوس سرئوس*[3] (کادمیم)، *باسیلوس سوبتیلیس*[4] (کروم)، *سودوموناس آئروجینوزا*[5] (اورانیوم) گزارش شده است[۱۰،۲۳،۱۱].

استفاده مستقیم از سلول‌های در حال رشد برای حذف زیستی ساده‌تر و کم هزینه‌تر بوده و فاقد بسیاری از مراحل تولید زیست‌توده شامل تکثیر، جمع‌آوری سلول‌های تکثیر شده، خشک کردن و سایر فرایندهای قبل از استفاده است. در روش تجمع زیستی رشد سلول و حذف فلز سنگین همزمان صورت می‌گیرد [۲۴ و ۲۵]. فردا و همکاران تأثیر اسیدیته محلول، غلظت اولیه فلز، زمان تماس و میزان زیست توده را بر جذب فلز سرب توسط باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس پومیلوس* بررسی کردند

[1] *Citrobacter*
[2] *Thiobacillus Ferrooxidans*
[3] *Bacillus Cereus*
[4] *Bacillus Subtilis*
[5] *Pseudomonas Aeruginosa*

[۲۶]. نتایج آنها نشان دهنده مقاومت هر دو گونه در برابر فلز سرب بود. میزان جذب سرب توسط باکتری *باسیلوس سرئوس* ۲۲/۱ میلی‌گرم در گرم و برای باکتری *باسیلوس پومیلوس* ۲۸/۰۶ میلی‌گرم در گرم گزارش شد. طی مطالعه‌ای میزان جذب سرب و کادمیم توسط باکتری *بیفیدوباکتریوم لانگوم* ۴۶[1] به‌ترتیب ۵۴/۷ و ۱۷۵/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک زیست توده باکتری به‌دست آمد [۲۷].

ویجایاراگان و همکاران[2] در سال ۲۰۰۸ باکتری *ژئوباسیلوس*[3] را از رودخانه دامور هند جداسازی و از زیست توده مرده باکتری برای تصفیه فاضلاب صنعتی استفاده نمودند. نتایج آنها حاکی از تأثیر غلظت اولیه فلز کادمیم و pH محیط بر جذب فلز توسط زیست توده باکتری بود [۲۰]. آزا و همکاران[4] در پژوهش خود باکتری‌های موجود در پساب کشاورزی را جدا نمودند و بیان داشتند که دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH برابر با ۷ شرایط بهینه برای جذب سرب و کادمیم توسط دو باکتری *سودوموناس* و *کریستوموناس لاتئولا*[6] است [۲۸]. ابراهیمی‌پور و همکاران طی پژوهشی اعلام کردند که با غربال‌سازی باکتری‌های جاذب فلز سرب از میان دیگر ریزموجودات می‌توان تصفیه بیولوژیکی پساب‌های صنعتی حاوی سرب را انجام داد [۲۹]. آن‌ها از توده زنده و غیر زنده باکتری برای پالایش استفاده کردند و در نهایت نتایج آنها نشان داد که میزان جذب در نمونه فعال از نظر متابولیسمی بیشتر از نمونه‌های غیرفعال است.

پژوهش حاضر به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به کادمیم و سرب از پساب شهری غرب اهواز و بررسی امکان حذف این عناصر از پساب انجام گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری

تعدادی نمونه آب(۱۰ نمونه) از پساب تصفیه‌خانه غرب اهواز در مهرماه سال ۱۳۹۲در ظروف استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. برخی از خصوصیات پساب شامل BOD، COD و pH تعیین شد.

میزان BOD و COD پساب با روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد [۳۰]. غلظت دو فلز سرب و کادمیم آن‌ها با افزودن چند قطره اسید نیتریک یک به یک بر اساس روش استاندارد برای آزمایش آب و پساب با دستگاه جذب اتمی مدل آنالیتیک جنا[7] تعیین شد.

۲-۲- جداسازی باکتری‌های مقاوم به سرب و کادمیم

برای این منظور مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از پساب شهری به ارلن حاوی ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک (۰/۸ درصد کلرور سدیم) اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. سپس ۱ میلی لیتر از این محلول به لوله‌ی حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی انتقال (رقت 10^{-2}) و رقیق‌سازی تا 10^{-8} ادامه یافت. پس از آن از هرکدام از رقت‌ها مقدار ۱۰۰میکرولیتر برداشته و به پلیت‌های حاوی آگار مغذی و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مخلوط دو فلز سرب و کادمیم (برای جداسازی باکتری‌های با مقاومت نسبی به فلزات مذکور) اضافه شد و بر سطح پلیت پخش شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند و رشد باکتری‌ها تا ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت [۳۱].

۲-۳- شناسایی باکتری‌ها

شناسایی باکتری‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی (آزمون گرم، کاتالاز، اکسیداز، متیل رد و غیره) بر مبنای طبقه‌بندی باکتریولوژی برگی انجام شد [۳۲].

۲-۴- حداقل غلظت مهار کننده از رشد[8] (MIC)

حداقل غلظت مهار کننده از رشد، کمترین غلظتی از فلز است که رشد باکتری در آن مهار می‌شود. برای محاسبه میزان MIC از روش رقت‌سازی فلزات کادمیم و سرب در محیط کشت مایع مغذی استفاده شد [۳۱]. در آغاز، باکتری‌های جداسازی شده به‌مدت یک شب در محیط کشت مایع مغذی رشد داده شدند. از مرحله رشد نمایی باکتری‌ها به میزان ده درصد حجمی به‌طوری که تعداد یکسانی از هر کدام از باکتری‌ها (با توجه به منحنی رشد و جمعیت باکتری‌ها) برداشت شود، به ارلن‌های حاوی محیط مایع مغذی به همراه غلظت‌های مختلف دو فلز سرب و کادمیم (صفر، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر) اضافه شد. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت تکانش ۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری و چگالی نوری باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (APELL) قرائت و منحنی رشدی باکتری‌ها رسم شد. همچنین بعد از تهیه سری‌های رقت از هر کدام از ارلن‌های حاوی غلظت‌های

1 *Bifidobacterium Longum 46*
2 Vijayaraghavan et al.
3 *Geobacillus*
4 Azza et al.
5 *Pseudomonas Mendocina*
6 *Chryseomonas Luteola*
7 SavantAA _ Analytic Jena Vario 6
8 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

مختلف فلز به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت‌های آگار مغذی کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها به گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انتقال یافت و جمعیت باکتری در پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۵- تعیین میزان حذف کادمیم و سرب توسط باکتری‌ها

به‌منظور تعیین توانایی باکتری در حذف فلزات سنگین کادمیم و سرب از پساب شهری، به میزان ده درصد حجمی از مرحله رشد نمایی هر یک از باکتری‌های شناسایی شده به ارلن‌های حاوی فاضلاب شهری غنی شده با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیم و سرب تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با سرعت تکانش ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. همچنین یک ارلن حاوی فاضلاب شهری تلقیح شده با باکتری و بدون غنی‌سازی با دو فلز کادمیم و سرب و ارلن دیگر حاوی فاضلاب شهری بدون تلقیح با باکتری به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت پساب حاوی باکتری‌ها در دور ۹۰۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد. غلظت کادمیم و سرب باقیمانده در محلول توسط دستگاه جذب اتمی تعیین شد[۱ و ۳۳]. سپس درصد حذف فلز با استفاده از رابطه ۱ تعیین شد

$$\%\,\mathrm{Removal} = \frac{C_f - C_i}{C_i} \times 100 \qquad (۱)$$

که در آن

C_i غلظت اولیه فلز مربوطه و C_f غلظت ثانویه فلز است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حذف سرب و کادمیم به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و نمودارها با نرم‌افزار اکسل ترسیم شدند. فاکتورهای آزمایش شامل باکتری در دو سطح تلقیح با *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس*، *تلقیح با باسیلوس لاتروسپروس* و غلظت های مختلف کادمیم ۰، ۵۰، ۲۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سرب ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خصوصیات پساب مورد استفاده

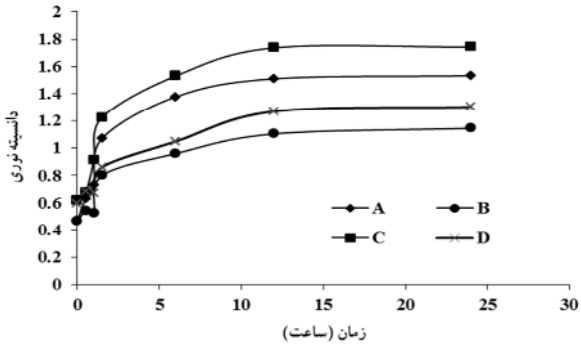
جدول ۱ خصوصیات پساب مورد مطالعه را نشان می‌دهد. مقدار pH برابر با ۷/۷۸ بود که محدودیتی برای رشد باکتری ایجاد نکرد. از جمله پارامترهای مهم برای تعیین میزان بار آلودگی آب و فاضلاب COD و BOD می‌باشد. میزان BOD برابر ۱۸۰ و COD برابر با ۴۰۰ آلودگی‌های متوسطی را ایجاد می‌کند و در دسته فاضلاب خانگی متوسط قرار می‌گیرد[۳۰]. مقدار کادمیم و سرب در پساب شهری به‌ترتیب ۰/۳ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر بودند که برای استفاده به‌عنوان آب آشامیدنی سمیت دارد. استفاده مکرر از این پساب‌ها برای مصارف دیگری چون آبیاری زمین‌های کشاورزی به‌مدت زیاد باعث افزایش فلزات سنگین در این زمین‌ها می‌شود.

۳-۲- شمارش، جداسازی و شناسایی باکتری

تعداد کل باکتری‌های رشد یافته بر روی پلیت‌های اگار مغذی بدون افزودن کادمیم و سرب $۴/۲ \times ۱۰^{۹}$ cfu/ml بود. تعداد باکتری‌ها بر روی پلیت‌های حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فلز کادمیم و سرب به $۷/۲ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml کاهش یافت. در نهایت تعداد ۴ نوع باکتری بر اساس تفاوت در شکل و رنگ کلنی‌ها برای شناسایی بیشتر انتخاب شدند (جدول ۲). جدایه A با توجه به داشتن اسپور بیضوی مرکزی، عدم رشد در محیط بی‌هوازی، عدم توانایی هیدرولیز نشاسته، توانایی مصرف سیترات و توانایی تخمیر گلوکز جزء گروه *باسیلوس لاتروسپروس*[1] قرار گرفت. جدایه‌های B و C نیز جزء همین گروه قرار داشتند. آزمون بیوشیمیایی نمی‌تواند جزئیات و بیوتیپ‌ها را مشخص کند، به همین دلیل احتمال می‌رود جدایه‌های A، B و C از یک گونه اما از بیوتیپ‌های متفاوت باشند. جدایه D احتمالاً مربوط به گونه *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس*[2] است. این جدایه گرم منفی و غیر متحرک بوده و توانایی مصرف سیترات و تخمیر و اکسیداسیون قند را دارد.

۳-۳- منحنی رشد باکتری‌ها

شکل ۱ منحنی رشد باکتری‌ها را در محیط مایع مغذی نشان می‌دهد.



شکل ۱- منحنی رشد باکتری‌های جداسازی شده از پساب

[1] *Bacillus laterosporous*

[2] *Yersinia pseudotuberculosis*

جدول ۱- خصوصیات اولیه پساب شهری منطقه غرب اهواز

خصوصیت / نوع پساب	pH	EC(dS/m)	BOD	COD	Pb (mg/L)	Cd
پساب شهری	۷/۷۸	۳/۵۶	۱۸۰	۴۰۰	۰/۳	۰/۴

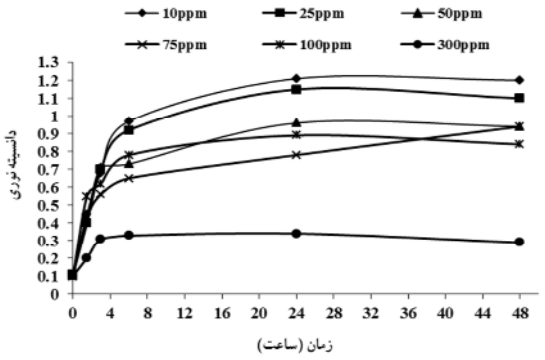
جدول ۲- آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی باکتری

آزمون‌ها	A	B	C	D
رنگ آمیزی گرم	باسیل کوتاه منظم	باسیل کوتاه منظم	باسیل کوتاه منظم	باسیل کوتاه منظم
واکنش گرم	+	+	+	–
مشاهده اسپور	بیضوی مرکزی	بیضوی مرکزی	بیضوی مرکزی	ندارد
اکسیداز	–	+	–	_
ژلاتیناز	–	–	–	–
مصرف سیترات	+	+	+	+
TSI	تخمیرگلوکز	تخمیرگلوکز	تخمیرگلوکزبا تولید گاز	تخمیرگلوکزبا تولید گاز
تولیدسولفید هیدروژن	–	–	–	–
اندول در SIM	–	–	+	_
حرکت در SIM	–	–	–	–
نشاسته	–	–	–	–
آزمون‌ها	A	B	C	D
OF	تخمیر و اکسیداسیون قند+	تخمیر و اکسیداسیون قند+	_	تخمیر و اکسیداسیون قند+
MR	–	–	–	–
VP	–	–	–	–
دنیتریفیکاسیون	+	+	+	+
وره آز	_	_	_	_
نتیجه آزمون	*باسیلوس لاتروسپروس*	*باسیلوس لاتروسپروس*	*باسیلوس لاتروسپروس*	*یرسینیا سودوتوبرکولوسیس*

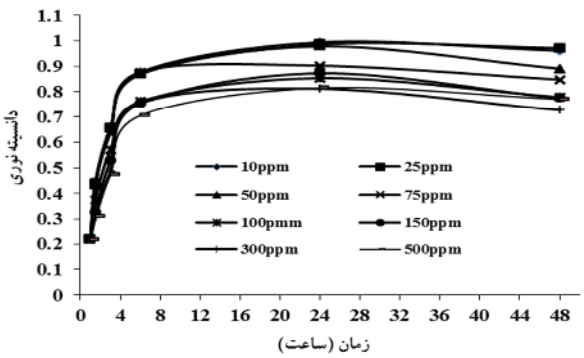
رشد جدایه‌ها تا ۴۸ ساعت با اندازه‌گیری دانسیته نوری در ۶۰۰ نانومتر نشان داد جدایه‌های باکتری قادر به رشد در مدت ۴۸ ساعت هستند. جدایه‌ها تقریباً ۶ ساعت بعد از تلقیح به مرحله رشد ایستایی خود رسیدند، فاز ایستایی رشد تا ۴۸ ساعت بعد از تلقیح ادامه داشت و پس از آن رشد کاهش یافت و وارد فاز مرگ شدند.

۳-۳-۱- الگوی رشد باکتری در برابر غلظت‌های مختلف کادمیم و سرب و میزان حداقل غلظت بازدارنده کادمیم و سرب

از ابتدای مرحله رشد نمایی باکتری‌ها (۱۰۶ cfu/ ml ×۷ معادل دانسیته نوری ۰/۶) به ارلن‌های حاوی غلظت‌های مختلف، دو فلز کادمیم و سرب تلقیح شد به نحوی که دانسیته اولیه جدایه‌ها در زمان تلقیح به ارلن‌ها یکسان باشد. با توجه به شکل ۲ رشد جدایه‌های *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکلوسیس* با افزایش غلظت کادمیم و سرب با گذشت زمان کاهش یافت. بیشینه رشد باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر کادمیم و سرب در زمان ۲۴ ساعت و باکتری *یرسینیا سودوتوبرکلوسیس* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و در زمان ۲۴ ساعت بعد از تلقیح به‌دست آمد. باکتری *یرسینیا سودوتوبرکلوسیس* مقاومت بیشتری در برابر غلظت‌های مختلف دو فلز کادمیم و سرب نسبت به باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* نشان داد. الگوی رشد باکتری‌های *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکلوسیس* در شکل‌های ۲ و ۳ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت کادمیم و سرب در محیط به تدریج منحنی رشد کاهش یافته است. در مورد باکتری *باسیلوس* این کاهش در منحنی رشد مشخص‌تر است. در



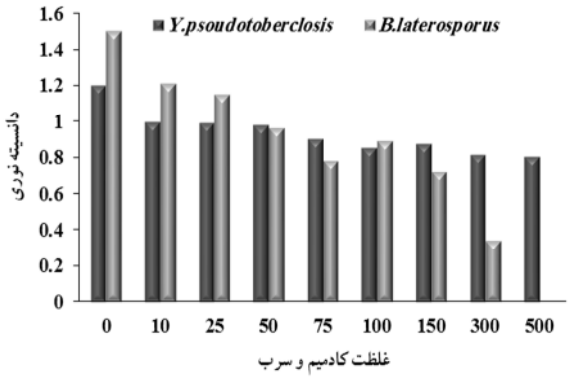
شکل ۲- الگوی رشد باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* در غلظت‌های مختلف کادمیم و سرب



شکل ۳- الگوی رشد باکتری *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* در غلظت‌های مختلف کادمیم و سرب

غلظت‌های بیشتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، باکتری‌ها رسوب کردند و چگالی نوری باکتری‌ها بسیار ناچیز بود و به صفر رسید. مقدار حداقل غلظت بازدارنده کادمیم و سرب بعد از ۲۴ ساعت رشد باکتری در محیط مایع مغذی حاوی غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر دو فلز در مورد باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و برای باکتری *یرسینیاسودوتوبرکلوسیس* ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (شکل۴). نظر به اینکه باکتری‌ها از پساب شهری که حاوی مقدار کمی از فلزات سنگین کادمیم و سرب بود، جدا شدند، این مقدار MIC به‌دست آمده در مقایسه با باکتری‌های سایر پژوهش‌ها که از پساب صنعتی جدا شده‌اند، نسبتاً بالا به نظر می‌رسد. نصرآزادانی و همکاران در تحقیقاتشان بر روی میزان مقاومت باکتری‌های جدا شده از سه پساب صنعتی مختلف به سه فلز روی، کادمیم و سرب مشخص کردند که میزان مقاومت سویه‌های جدا شده از پساب‌های مختلف کاملاً متفاوت است و علاوه بر نوع باکتری، به منبع جداسازی نمونه‌ها بستگی دارد [۸]. در این بررسی مقاوم‌ترین جدایه به فلز سرب دارای MIC برابر با ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود که نسبت به MIC باکتری‌های جدا شده از فاضلاب شهری بیشتر بود و این نشان می‌دهد که باکتری‌های موجود در پساب صنعتی دارای مقاومت بیشتری نسبت به باکتری‌های موجود در پساب شهری هستند. اختلاف بین MIC باکتری‌های جدا شده از پساب صنعتی در مقابل پساب شهری برای فلزات سنگین در تحقیقات مختلف بیشتر است. این ممکن است به این خاطر باشد که فلزات سنگین در پساب‌های صنعتی بسیار بیشتر از پساب شهری است و باکتری‌ها دارای مکانیسم‌های مقاومت توسعه‌یافته‌تری در برابر غلظت‌های بالای فلزات سنگین هستند[۱۳].

آزا و همکاران بیان داشتند که حداکثر MIC باکتری‌های جدا شده از فاضلاب کشاورزی برای سرب و کادمیم به ترتیب ۲۰۰ و ۵ میلی‌گرم در لیتر بود، که نسبت به MIC باکتری‌های تحقیق حاضر کمتر بود [۲۸]. راجش و همکاران[1] در سال ۲۰۱۴ باکتری *هالوموناس*[2] را با حداقل غلظت بازدارنده کادمیم ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر از پساب صنایع الکترونیکی جداسازی کردند [۳۴]. حداقل غلظت بازدارنده کادمیم برای باسیلوس سرئوس جداسازی شده از خاک اطراف معدن روی در تایلند ۱میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد[۱۳]. طهمورث‌پور و کرمانشاهی میزان MIC سرب برای باکتری‌های جداسازی شده از پساب اکریلیک + انسانی و پساب اکریلیک خام به‌ترتیب ۱۲/۸ و ۱۵/۲ میلی‌مول در لیتر گزارش کردند [۳۵]. این در حالی بود که غلظت فلز سرب در این پساب‌ها به‌ترتیب ۱۵۷۵ و ۶۵۰ میکروگرم در لیتر بود که حصول چنین MIC بالایی، طبیعی به نظر می‌رسد. پژوهش رحمان و همکاران نشان داد که باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* جداسازی شده از پساب صنعتی دارای MIC برابر ۶۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب برای کادمیم و سرب است [۳۶].



شکل ۴- MIC باکتری‌های *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* در غلظت‌های مختلف کادمیم و سرب

۳-۴- میزان حذف فلزات سنگین کادمیم و سرب توسط باکتری‌ها

بررسی اثر غلظت‌های مختلف کادمیم و سرب تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد بر روی حذف این دو فلز توسط باکتری‌ها نشان داد. همچنین تأثیر باکتری‌ها نیز بر میزان حذف کادمیم و سرب معنی‌دار بود (جدول ۳).

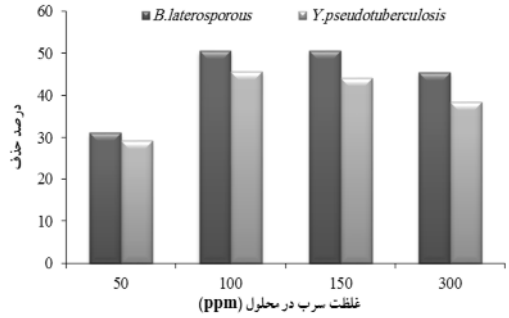
شکل‌های۵ و ۶ میزان حذف سرب و کادمیم را توسط دو باکتری نشان می‌دهد. با افزایش غلظت فلزات در محلول تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان تجمع آنها توسط هر دو باکتری افزایش نشان داد و میزان حذف به بالاترین مقدار خود رسید. لیکن با

[1] Rajesh et al.
[2] *Halomonas BVR1 sp*

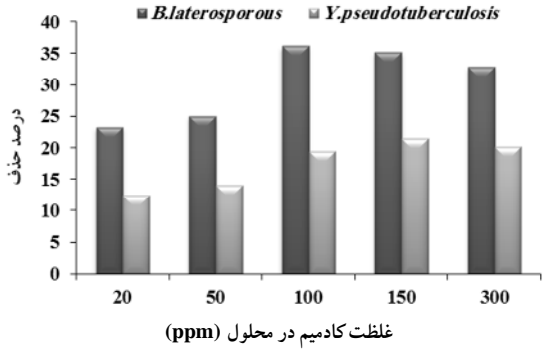
جدول ۳- میانگین مربعات اثر تیمارها برحذف کادمیم و سرب

منبع تغییرات	میانگین مربعات	
	کادمیم	سرب
غلظت فلز	۱۴۶/۳۲**	۴۰۹/۸۶**
باکتری	۱۲۷۱/۱۷**	۱۵۳/۰۶**
باکتری× غلظت فلز	۸/۸۴**	۸/۰۰**
خطا	۰/۱	۰/۴

**معنی‌داری در سطح ۱ درصد



شکل ۵- میزان حذف سرب توسط باکتری‌های *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* در غلظت‌های مختلف سرب



شکل ۶- میزان حذف کادمیم توسط باکتری‌های *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* غلظت‌های مختلف کادمیم

افزایش غلظت فلزات تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان حذف کاهش یافت. افزایش میزان جذب با افزایش غلظت اولیه فلز می‌تواند ناشی از قابلیت دسترسی بیشتر یون‌های فلزی برای جذب و تجمع باشد [۳۷]. حسین و آنانتاران[1] در سال ۲۰۰۶ نشان دادند باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* قادر به حذف ۹۷ درصد سرب از محلول حاوی ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر سرب است [۳۸].

پژوهش طهمورث‌پور و کرمانشاهی نشان داد، باکتری‌های جدا شده از پساب صنعتی ۳۰ درصد (معادل ۴/۸ میلی مول بر لیتر) از کادمیم را از محیط حذف کردند [۳۵]. قابل ذکر است با افزایش غلظت سرب و کادمیم از ۱۰۰ تا ۳۰۰ میلی گرم در لیتر میزان حذف آن توسط هر دو باکتری کاهش نشان داد. این نتایج با یافته‌های وانگ و همکاران[2] در سال ۲۰۱۲ که کاهش تجمع زیستی کادمیم را توسط *ساکارومیسس سرویسیه*، با افزایش غلظت فلز گزارش کردند، همسو است [۳۹]. تجمع زیستی فرایند پیچیده‌ای است که ممکن است در این فرایند یون‌های فلزی به داخل اندامک‌های ویژه‌ای منتقل شود، یا تحت تأثیر واکنش‌های آنزیمی قرار گرفته و توسط پمپ به بیرون انتشار یابند [۴۰].

طبق نتایج هانگ و همکاران[3] در سال ۲۰۱۴ در غلظت‌های پایین‌تر از ۲۰ میلی‌گرم در لیتر ابتدا فلز به سطح سلول باکتری *باسیلوس سرئوس* جذب شده و سپس برخی یون‌های فلزی به داخل سلول منتقل شده و در سیتوپلاسم ترسیب می‌شوند. در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بعد از انتقال فلز به داخل سیتوپلاسم، سلول‌های در حال رشد با مکانیسم انتشار فلز به خارج سلول که مکانیسمی نیازمند انرژی است، مقادیر اضافی یون‌های کادمیم را از سیتوپلاسم خارج نموده و سلول را از سمیت مقادیر بالای فلز حفظ می‌کنند [۳۷]. میزان حذف سرب نسبت به میزان حذف کادمیم توسط هر دو باکتری بالاتر بود که نشان دهنده مقاومت بیشتر باکتری‌ها در برابر غلظت‌های بالاتر سرب است. این مسئله می‌تواند به‌دلیل تفاوت در اندازه وضخامت یون‌های کادمیم و سرب باشد. شعاع یونی سرب بیشتر از کادمیم است و در نتیجه شعاع هیدراته سرب کوچک‌تر از کادمیم خواهد بود. شعاع هیدراته کوچک‌تر سرب باعث جذب بهتر این فلز در باکتری می‌شود. شعاع یونی سرب و کادمیم به ترتیب ۱/۱۹، ۰/۹۷ است. راجسواری و همکاران[4] میزان جذب نیکل توسط باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* را بررسی کردند و مشاهده نمودند که این باکتری توانایی حضور در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل را داراست [۴۱]. این باکتری دارای راندمان بالاتر جذب کادمیم و سرب در مقایسه با نیکل بود، که دلیل این تفاوت را به شعاع یونی و هیدراته این فلزات نسبت دادند. شعاع هیدراته نیکل بیشتر از کادمیم و سرب است، در نتیجه جذب نیکل کمتر صورت می‌گیرد. نتایج چانگ و همکاران[5] در سال ۱۹۹۸ بر روی جذب همزمان سرب، کادمیم و مس بر روی *سودوموناس آئروجینوزا* نشان داد که سرب و مس از جذب کادمیم جلوگیری می‌کند در حالی که اثر کادمیم بر جذب سرب و مس محدود بود [۴۲]. طبق نتایج فردا و همکاران در سال ۲۰۱۱

[1] Hossain and Anantharaman

[2] Wang et al.
[3] Huang et al.
[4] Rajeswari et al.
[5] Chang et al.

مقاومت باکتری‌های *باسیلوس پومیلوس* و *باسیلوس سرئوس* در برابر فلز سرب بیشتر از کادمیم بوده و میزان جذب سرب توسط هر دو باکتری بیشتر بود[۲۶]. بیشینه حذف سرب و کادمیم توسط باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* به‌ترتیب ۵۰/۶ و ۳۶/۱۸ درصد به‌دست آمد، که نشان داد *باسیلوس لاتروسپروس* توانایی بیشتری نسبت به باکتری *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* در جذب کادمیم و سرب دارد.

باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* گرم مثبت و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* گرم منفی است. تفاوت در جذب به دلیل تفاوت‌های ساختاری و ترکیبات شیمیایی مختلف دیواره سلولی دو باکتری است که در نتیجه موجب تفاوت در میزان تحمل آن‌ها در برابر یون‌های فلزی می‌شود. دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت دارای تیکوئیک اسید است که باعث ایجاد بار منفی در دیواره سلولی باکتری شده و عامل اتصال به کاتیون‌های فلزی است[۴۳] در حالی که در باکتری‌های گرم منفی با دیواره نازک سلولی، لیپوپلی ساکاریدهایی که روی لایه پپتیدوگلیکان قرار دارند، عامل اتصال کاتیون‌های فلزی به دیواره سلولی باکتری هستند. در مجموع میزان بار منفی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بوده و در نتیجه مکان‌های اتصال بیشتری برای کاتیون‌های فلزی فراهم می‌کند[۴۴ و ۴۵].

۴- نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر برخلاف سایر مطالعات پیشین از ترکیب دو فلز به‌صورت همزمان در محیط پساب شهری استفاده شد. طی این مطالعه دو باکتری *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* به‌عنوان باکتری‌های برتر از نظر مقاومت به کادمیم و سرب از پساب شهری جداسازی و شناسایی شدند. نتایج حداقل غلظت بازدارنده سرب و کادمیم و همچنین میزان حذف این فلزات از محلول نشان داد باکتری‌های *باسیلوس لاتروسپروس* توانایی بیشتری در حذف سرب و کادمیم نسبت به باکتری *یریسینیا سودوتوبرکلوسیس* دارا است. باکتری‌هایی مورد استفاده در پژوهش حاضر توانایی بالاتری در حذف سرب نسبت به کادمیم داشتند. حداکثر درصد حذف فلز سرب از پساب غنی شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سرب توسط باکتری‌های *باسیلوس لاتروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبرکولوسیس* به‌ترتیب ۵۰/۶۰ و ۴۵/۷ درصد و در مورد کادمیم ۳۶/۱۸ و ۲۱/۴۱ درصد در پساب غنی شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سرب و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیم به‌دست آمد.

۵- قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل تأمین منابع مالی انجام این پروژه در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد قدردانی می‌کنند.

۶- مراجع

1. Masoudzadeh, N., Zakeri, F., Bagheri, T., Sharafi, H., Zahiri, H., Ahmadian, G.H., and Akbari Noghabi, K. (2011). "Biosorption of cadmium by Brevundimonas sp. ZF12 strain, a novel biosorbentisolated from hot-spring waters in high background radiation areas." *Journal of Hazardous Materials*, 197, 190-199.
2. Reddy Yadanaparthi, S.K., Graybill, D., and Wandruszk, R.V. (2009). "Adsorbents for the removal of arsenic, cadmium, and lead from contaminated waters." *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 1-15
3. El-Gendy, A.S., Biswas, N., and Bewtra, J.K. (2005). "A floating aquatic system employing water hyacinth for municipal landfill leachate treatment: Effect of leachate characteristics on the plant growth." *Journal of Environmental Engineering and Science*, 4(4), 227-240.
4. Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X., and Matis, K.A. (2004). "Biosorption of toxic metal from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils." *Process Biochemistry*, 39, 909-916.
5. Aksu Z., and Donmez, G. (2006). "Binary biosorption of cadmium (II) and nickel (II) onto dried Chlorella vulgaris: co-ion effect on mono-component isotherm parameters." *Process Biochemistry*, 41, 860-868.
6. WHO. (2004). *Guidelines for drinking water quality*, Vol. 1, 3rd Ed., Geneva.
7. Watt, G.C.M., Britton, A., Gilmour, H.G., Moore, M.R., Murray,G.D., and Robertson, S.J.(2000). "Public health implications of new guidelines for lead in drinking water: A case study in an area with historically high water lead levels." *Food and Chemical Toxicology*, 38, 73-79.
8. Nasrazadani, A., Tahmourespour, A., and Hoodaji, M. (2011). "Determination of bacteria resistance threshold to lead, zinc and cadmium in three Industrial wastewater samples." *Int. J. Environ Stud*, 36(56), 25-27.

9. Ahluwalia, S., and Goyal, D. (2007). "Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater." *Biores. Technol.*, 98, 2243-2257.
10. Ahemad, M., and Malik, A. (2011). "Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater." *Bacteriol. J.*, 2, 12-21.
11. Brady, D., and Duncan, J.R. (1994). "Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of S. cerevisiae." *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 297-302.
12. Veglio, F., Biolchini, F., and Gasparro, H.(1997). "Biosorption of toxic heavy metals: An equilibrium study using free cells of Arthrobacter sp." *Process Biochem.*, 32 (2), 99-105.
13. Ahemad, M., and Kirbert, M. (2013). "Recent trends in microbial biosorption of heavy metals: A review." *BMB*, 1(1),19-26.
14. Naik, M. M., and Dubey, S.K. (2011). "Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant Pseudomonas aeruginosa strain 4EA." *Current Microbiology*, 62, 409-414.
15. Naik, M.M., Pandey, A., and Dubey, S.K. (2012). "Pseudomonas aeruginosa strain WI-1 from Mandovi Estuary possesses metallothionein to alleviate lead toxicity and promotes plant growth." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79,129-133.
16. Naik, M.M., Pandey, A., and Dubey, S.K. (2012). "Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant Enterobacter cloacae strain P2B." *Biodegradation*, 23,775-783.
17. Ramaiah, D.J., and Vardayan, L. (2008). "Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury." *Marine Biotechnology*, 10, 471-477.
18. Chojnacka, K. (2010). "Biosorption and bioaccumulation–the prospects for practical applications" *Environment International*, 36, 299-307.
19. Naja, G. M., and Volesky, B. (2010). "Treatment of metal-bearing effluents: Removal and recovery." Wang, L. K., Chen, J.P., Hung, Y.T., and Shammas, N.K., (Eds.) *Handbook on heavy metals in the environment*, Taylor and Franci and CRC Press, Boca Raton, FL.
20. Vijayaraghavan, K., and Yun, Y.S. (2008). "Bacterial biosorbents and biosorption." *Biotechnol.Avdan*, 26, 266-291.
21. Martin-Gonzalez, A., and Diaz, S., Borniquel, S., Gallego, A., and Gutierrez, J.C. (2006). "Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants." *Res. Microbiol.*, 157, 108-118.
22. deSiloniz, M-I., Balsalobre, L., Alba, C., Valderrama, M-J., and Peina do, J.M. (2002). "Feasibility of copper uptake by the yeast Pichia guilliermondii isolated from sewage sludge." *Res Microbiol.*, 153(3), 173-180.
23. Huang, F., Dang, Z., Guo, C.L., Lu, G.N., Gu, R.R., Liu, H.J., and Zhang, H. (2013). "Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of Bacillus cereus RC-1 isolated from cadmium contaminated soil." *Colloid Surf. B*, 117, 11-18.
24. Malik, A. (2004). "Metal bioremediation through growing cells." *Environ. Int.*, 30, 261-278.
25. Chojnacka, K. (2010). "Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications." *Environ. Int.*, 36, 299-307.
26. Ferdaˇg, O., Atar, N., Yazıcıoˇglua, D., and Olgun, A. (2011). "Biosorption of lead from aqueous solutions by Bacillus strains possessing heavy-metal resistance." *Chemical Engineering Journal*, 173, 422-428.
27. Halttunena, T., Salminen, S., and Tahvonen, R. (2007). "Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria." *International Journal of Food Microbiology*, 114, 30-35.
28. Azza, A., Zeid, A., Wesam, A., Salama, M., Ghada, A., and Fahd, A. (2009). "Biosorption of some heavy metal ions using bacterial species isolated from agriculture waste water drains in Egypt." *J. Appl Sci Res.*, 5(4), 372-383.

29. Ibrahimipour, Gh., Foladi, J., TaliDaliri, S., and Tafakori, V. (2005). "Screening and selection of the best lead absorbant bacteria." *J. Environ Sci*., 7, 1-12.
30. Mohit, B. (2011). *Water and wastewater experiments*, Ab Shahr Press, Tehran. (In Persian)
31. Limcharoensuk, T., Sook Sawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., and Auesukaree, C. (2015). "Bioaccumulation and biosorption of Cd and Zn by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 322-330.
32. Cappicino and James. (1992). *Microbiology: A laboratory manual*, The Benjamin Cummings publishinig company, INC.39. Bridge parkway Redwood City, California, 94065.
33. Pan, R.X., Liu, R. X., and Tang, H.X. (2007). "Surface reaction of Bacillus cereus biomass and its biosorption for lead and copper ions PAN Jian-hua, LIU." *Journal of Environmental Sciences*, 19, 403-408.
34. Rajesh., M.V., Santhana Krishna Kumar, A., and Rajesh, N. (2014). "Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent." *Chemical Engineering Journal*, 235(1), 176-185.
35. Tahmourespour, A., and Kermanshahi, R. (2010). "Determination the consistency of heavy metals in bacteria isolated from industrial wastewater." *J. Water and Wastewater*, Vol. 18 No.1 (61), 54-59. (In Persian)
36. Rehman, A., Ashfaq, A., Muneer, B., and Shakoori, A. R. (2007). Resistance and biosorption of mercury by bacteria isolated from industrial effluents." *Pakistan Journal of Zoology*, 39(3), 137-146.
37. Huang, F., Guo, C.L., Lu, G., Yi, X.Y., Zhu, L.D., and Dang, Z. (2014). "Bioaccumulation characterization of cadmium by growing Bacillus cereus RC-1 and its mechanism." *Chemosphere*, 109, 134-142.
38. Hossain, S.M., and Anantharaman, N. (2006). "Studies on bacterial growth and lead biosoption using Bacillus subtilis." *Indian Journal of Chemical Technology*, 13, 591-596.
39. Wang, H., McCarthney, A., Qiu, X., and Zhao, R. (2012). "Cd^{2+} impact on metabolic cells of Saccharomyces cerevisiae over an extended period and implications for bioremediation." *J. Geomicrobiol*, 29, 199-205.
40. Silver, S., and Phung, L.T.(2005). "A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 32, 587-605.
41. Rajeswari, M., Vidya Shetty, K., and Srinikethan, G. (2014). "Cadmium (II) and nickel (II) biosorption by Bacillus laterosporus (MTCC 1628)." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*m, 45, 1628-1635.
42. Chang, J.S., and Chen, C. (1998). "Quantitative analysis and equilibrium models of selective adsorption in multimetal systems using a bacterial biosorbent." *Sep. Sci. Technol.*, 33, 611-632.
43. Beveridge, T.J. (1981). "Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial wall." *Int Rev Cytol*., 72, 229- 317.
44. Matyar, F., Kaya, A., and Dinc, S. (2008). "Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey." *Sci. Total Environ*., 407, 279-285.
45. Rho, J., and Kim, J. (2002). "Heavy metal biosorption and its significance to metal tolerance of streptomycetes." Journal of Microbiology, 40, 51-54.