

صلاة الاضلاع



دانشکده معدن، نفت و ژئوفیزیک

رشته‌ی مهندسی معدن گرایش فرآوری مواد معدنی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

**استخراج بایولوژیک عناصر با استفاده از باکتری‌های برجا موجود در خاک**

**معدن با نگاهی ویژه بر بررسی مکانیسم حاکم بر فرآیند**

نگارنده:

امیر عیوض خانی

اساتید راهنما:

دکتر کیومرث سیف پناهی شعبانی

دکتر محمد جهانی چگنی

اساتید مشاور:

دکتر پرویز حیدری

دکتر امین ابراهیمی

بهمن ۱۳۹۷

## تقدیم به

پدر، مادر و برادر عزیزانم

که محظرات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، حسارت  
خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های یکتا و زیبای زندگیم را

مدیون حضور سبز آنها هستم.

تقدیم به همه کسانی که بر طایفه بعد انسانی و وجدانی خود را فراموش

نمی‌کنند و بر آستان گبران سنگ انسانیت سرفرودمی آورند و

انسان را با همه تفاوت‌هایش ارج می‌نهند.

## سپاسگزاری

در آغاز شکر و سپاس خدا را که بزرگ‌ترین امید و یاور در لحظه‌لحظه زندگیست.

بدین‌وسیله از راهنمایی‌های ارزنده و زحمات استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر کیومرث سیف پناهی شعبانی در کلیه مراحل پژوهش و تدوین این رساله کمال سپاسگزاری و تشکر را دارم، شاگردی ایشان افتخار بزرگی برای من بود.

از استاد راهنمای دوم و اساتید مشاور خود جناب آقای دکتر محمد جهانی چگنی، جناب آقای دکتر پرویز حیدری و جناب آقای دکتر امین ابراهیمی به دلیل یاری‌ها و راهنمایی‌های بی‌چشمداشتشان که بسیاری از سختی‌ها را برایم آسان‌تر نمودند تشکر می‌کنم.

از دوستان عزیز و مهربانم مهندسین محمد جعفری، فواد محمودی، عبدالرحیم دوستی، بابک عابدی، حسین ابراهیمی، بابک نظری و سرکار خانم طوبی محمدی که حق دوستی را بر من تمام کردند بسیار قدردان و سپاسگزارم.

## تعهدنامه

اینجانب **امیر عیوض خانی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته فرآوری مواد معدنی دانشکده معدن، نفت و ژئوفیزیک دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه با موضوع **استخراج بایولوژیک عناصر با استفاده از باکتری‌های برجا موجود در خاک معدن با نگاهی ویژه بر بررسی مکانیسم حاکم بر فرآیند تحت راهنمایی دکتر کیومرث سیف پناهی و دکتر محمد جهانی چگنی** متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورداستفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام **دانشگاه صنعتی شاهرود** و یا **Shahrood University of Technology** به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (بافت‌های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ:

امضاء دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات، مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

## چکیده

از مهمترین آلاینده‌های معدنی و سمی، یون‌های فلزی سنگین سرب و روی می‌باشند که در اثر انجام فعالیت‌های معدنی وارد محیط‌زیست شده، منجر به ایجاد مسمومیت‌های شدید در انسان و دیگر موجودات زنده می‌گردد. در این تحقیق نمونه‌های مربوط به خاک‌های آلوده معادن زغالسنگ (معدن دهملا) و بوکسیت (معدن جاجرم) تهیه شده است. در مرحله بعد در آزمایشگاه گونه‌های باکتریایی موجود در این خاک‌ها شناسایی و کشت داده شد. نتایج نشان داد که ۷ نوع باکتری هوازی شامل میکروباکتریوم اس پی، پلانومیکروباکتریوم اس پی، تالاسوسپیرا اس پی، هالومناس اس پی، اینتروباکت اس پی، برون‌دیموناسا اورانتیکا و میکروکوکایس باکتریوم در این خاک‌ها وجود دارد. بنابراین پتانسیل این ۷ باکتری به‌منظور حذف یون‌های فلزی سنگین از پساب در سیستم‌های تکی و دوتایی بررسی گردید. نتایج اولیه نشان داد که یون‌های سرب و روی به ترتیب توسط باکترهای تالاسوسپیرا اس پی و اینتروباکت اس پی با راندمان مناسب حذف می‌شوند. بهینه‌سازی پارامترهای عملیاتی شامل pH، غلظت اولیه آلاینده، زمان و دمای واکنش انجام شد و نتایج نشان داد که در سیستم تکی عناصر سرب و روی به ترتیب در pH=۶، غلظت اولیه آلاینده ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت باکتری ۲ سی-سی، زمان ۷۲ ساعت و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد دارای راندمان حذف ۹۱/۶ و ۸۹/۸۵ درصد می‌باشند. نتایج در سیستم دوتایی نشان داد که باکتری‌ها به شکل انتخابی عمل کرده و باکتری تالاسوسپیرا اس پی فقط یون سرب و باکتری اینتروباکت اس پی فقط یون روی را جذب می‌کند و در حضور باکتری مناسب یون دوم تاثیر ناچیزی بر جذب یون اول می‌گذارد. نتایج حاصل از بررسی مکانیسم فرآیند نشان داد که هر دو باکتری از طریق فرآیند احیای بیولوژیک و به صورت انتخابی قادر به حذف یون‌های سرب و روی می‌باشند.

**کلیدواژه:** یون‌های سرب و روی، تالاسوسپیرا اس پی و اینتروباکت اس پی، احیای بیولوژیک،

سیستم تکی و دوتایی

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه:

حذف فلزات سنگین به وسیله باکتری‌های برجا از پساب، دومین کنفرانس ملی کاربردهای نانو و بیوفناوری در علوم زمین و معدن، آبان ۱۳۹۷، شاهرود.

## فهرست مطالب

- ۱- فصل اول: کلیات ..... ۱
- ۱-۱- مقدمه ..... ۲
- ۲-۱- روش‌های شیمیایی - فیزیکی ..... ۵
- ۱-۲-۱- رسوب‌دهی شیمیایی ..... ۵
- ۲-۲-۱- الکترودیالیز ..... ۶
- ۳-۲-۱- تبادل یونی ..... ۶
- ۴-۲-۱- استخراج با حلال ..... ۷
- ۵-۲-۱- اسمز معکوس ..... ۷
- ۶-۲-۱- جذب سطحی ..... ۷
- ۷-۲-۱- روش بیولوژیکی ..... ۸
- ۳-۱- بیان مسئله ..... ۱۰
- ۴-۱- ضرورت انجام تحقیق ..... ۱۱
- ۵-۱- هدف از انجام تحقیق ..... ۱۲
- ۶-۱- جمع‌بندی ..... ۱۲
- ۲- فصل دوم: مروری بر تحقیقات گذشته ..... ۱۳
- ۱-۲- مقدمه ..... ۱۴
- ۲-۲- تاریخچه حذف آلودگی توسط میکروارگانیسم‌ها ..... ۱۴
- ۳-۲- جمع‌بندی ..... ۱۸

۱۹	فصل سوم: روش تحقیق
۲۰	۱-۳- مقدمه
۲۰	۲-۳- مواد مورد استفاده
۲۱	۳-۳- تجهیزات مورد استفاده
۲۲	۴-۳- روش‌های تجربی
۲۲	۱-۴-۳- نمونه‌برداری از خاک
۲۲	۲-۴-۳- جداسازی و شناسایی باکتری‌ها در پروفایل خاک
۲۵	۳-۴-۳- مراحل استخراج DNA
۲۵	۴-۴-۳- کشت باکتری در محیط جامد
۲۶	۵-۴-۳- کشت باکتری در محیط مایع
۲۷	۶-۴-۳- آلوده کردن محیط کشت
۲۸	۷-۴-۳- کشت باکتری در محیط‌های آلوده
۲۸	۸-۴-۳- اندازه‌گیری میزان حذف باکتری‌ها
۲۸	۵-۳- تست اولیه حذف بیولوژیکی برای تشخیص باکتری با قابلیت بالای حذف یون‌های سرب و روی
۳۰	۶-۳- منحنی رشد باکتری‌ها
۳۲	۷-۳- منحنی تغییرات pH در زمان‌های مختلف واکنش
۳۲	۸-۳- پارامترهای موثر بر حذف زیستی
۳۳	۱-۸-۳- تعیین pH بهینه

- ۳-۸-۲- تعیین بهینه غلظت آلاینده ..... ۳۴
- ۳-۸-۳- تعیین دمای بهینه ..... ۳۵
- ۳-۸-۴- تعیین زمان بهینه ..... ۳۶
- ۳-۹- تعیین غلظت بهینه یون‌های سرب و روی به صورت دوتایی ..... ۳۷
- ۳-۱۰- حذف بیولوژیکی آلاینده‌ها به صورت ترکیب دو آلاینده ..... ۳۹
- ۳-۱۱- مکانیسم حاکم بر فرآیند ..... ۴۰
- ۴- فصل چهارم: نتیجه‌گیری و پیشنهادها ..... ۴۵
- ۴-۱- مقدمه ..... ۴۶
- ۴-۲- نتیجه‌گیری ..... ۴۶
- ۴-۳- پیشنهادها ..... ۴۸
- منابع ..... ۴۹

## فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۳: فلوجارت مراحل آزمایشگاهی ..... ۲۰
- شکل ۲-۳: الف) باکتری گرم مثبت، ب) باکتری گرم منفی ..... ۲۳
- شکل ۳-۳: تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری عکسبرداری شده است، الف) باکتری *Thalassospira SP* و ب) باکتری *Enterobacter SP* ..... ۲۴
- شکل ۴-۳: باکتری‌های کشت شده در محیط کشت جامد، الف) باکتری *T-SP* و ب) باکتری *E-SP* ..... ۲۶
- شکل ۵-۳: الف) محیط کشت مایع، ب) محیط کشت آلوده شده به باکتری ..... ۲۷
- شکل ۶-۳: تست اولیه برای تعیین باکتری‌های مناسب با بیشترین حذف یون‌های سرب و روی ..... ۳۰
- شکل ۷-۳: منحنی رشد باکتری‌های *T-SP* و *E-SP* در حضور و عدم حضور یون‌های سرب و روی ..... ۳۱
- شکل ۸-۳: منحنی تغییرات pH در طول آزمایش ..... ۳۲
- شکل ۹-۳: تاثیر pH بر حذف یون‌های سرب و روی ..... ۳۴
- شکل ۱۰-۳: تاثیر غلظت اولیه فلز آلاینده بر حذف یون‌های سرب و روی ..... ۳۵
- شکل ۱۱-۳: تاثیر دما بر حذف یون‌های سرب و روی ..... ۳۶
- شکل ۱۲-۳: تعیین زمان بهینه برای حذف یون‌های سرب و روی ..... ۳۷
- شکل ۱۳-۳: حذف یون‌های سرب و روی به صورت ترکیبی ..... ۳۸
- شکل ۱۴-۳: حذف یون‌های سرب و روی به صورت ترکیبی در محلول ..... ۳۹
- شکل ۱۵-۳: مکانیسم حاکم بر فصل مشترک یک باکتری و یک عنصر فلزی در فازهای جامد یا مایع ..... ۴۰
- شکل ۱۶-۳: ویژگی مربوط به فرآیندهای خروج فلز از فاز مایع و پاک‌سازی آلودگی ..... ۴۲

شکل ۳-۱۷: فلوجارت مکانیسم فرآیند..... ۴۴

## فهرست جدول‌ها

- جدول ۱-۱: منابع تولید فلزات سنگین و اثرات نامطلوب آن بر سلامتی ..... ۴
- جدول ۲-۱: بالاترین سطح مجاز آلودگی برخی از فلزات سنگین ..... ۵
- جدول ۳-۱: مزایا و معایب روش‌های شیمیایی - فیزیکی حذف کاتیون‌های فلزی سنگین ..... ۸
- جدول ۱-۳: مشخصات باکتری‌های موجود در خاک ..... ۲۴
- جدول ۲-۳: غلظت یون‌های استفاده شده به صورت ترکیبی ..... ۳۸



## فصل اول

### کلیات

آلودگی فلزات سنگین یکی از مسائل زیست محیطی است که امروزه دغدغه‌ی بسیاری از جوامع بشری به شمار می‌رود. این فلزات علاوه بر اثرات زیانباری که بر عملکرد و کیفیت محصولات کشاورزی، می‌گذارند، باعث بیماری‌های مختلف مانند سرطان در انسان می‌شوند [۱]. افزایش غلظت عناصر سنگین در محیط که ناشی از فعالیت‌های انسانی مانند معدن‌کاری، فعالیت‌های صنعتی و استفاده از فاضلاب‌ها می‌باشد، می‌تواند صدمات جبران‌ناپذیری بر سلامت انسان‌ها به‌ویژه کودکان که در معرض مستقیم یا غیرمستقیم این مواد هستند، وارد کند [۲]. این فلزات برخلاف آلاینده‌های آلی، توسط عوامل زیستی قابل‌تجزیه نمی‌باشند و به همین علت، برای مدت طولانی در محیط باقی می‌مانند [۳].

روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی به منظور پاک‌سازی محیط‌زیست از انواع آلاینده‌ها، ابداع و به کار گرفته شده‌اند اما با توجه به هزینه‌های گزاف آنها تلاش زیادی برای دست یافتن به روش‌های ارزان‌تر و به‌صرفه‌تر صورت گرفته است [۴].

فلزات سنگین به عناصری گفته می‌شود که وزن اتمی آنها بین ۵/۶۳ و ۲۰۰/۶ بوده و چگالی ویژه‌ی آنها بزرگ‌تر از پنج گرم بر سانتی‌متر مکعب باشد که عمدتاً عبارتند از: کبالت، مس، وانادیوم، سلنیم، آهن، کروم، روی، سرب، آرسنیک، جیوه، کادمیوم، نیکل [۵]. برخی از این فلزات از قبیل جیوه، سرب و کروم (VI) به شدت سمی می‌باشند. برخی دیگر از قبیل مس، نیکل، کبالت و روی زیاد سمی نیستند، اما مقادیر بالای آنها می‌تواند مضر باشد. اورانیوم خطرات زیادی را حتی در کمترین غلظت می‌تواند داشته باشد [۶]. این آلاینده‌های کمیاب معدنی به‌واسطه طبیعت غیرقابل تجزیه هستند و به دلیل سمیت زیاد، اثرات تجمعی و سرطان‌زا بودن، مورد توجه می‌باشند [۷].

به طور کلی می‌توان گفت که فلزات سنگین در نتیجه فرسایش طبیعی خاک، فوران‌های آتشفشانی، بارش‌های اتمسفریک و تخلیه پساب حاصل از صنایع گوناگون از جمله ذوب فلزات، پلاستیک‌سازی، تولید و مصرف مواد حاوی فلزات، کاغذسازی، رنگ رزی و فرآیندهای متالورژیکی به

اکوسیستم آبی وارد می‌شوند. این فلزات زندگی کلیه‌ی موجودات زنده روی زمین را تهدید می‌کنند [۸].

یکی از شاخص‌ترین مسائل در ارتباط با فلزات سنگین عدم متابولیسم شدن آنها در بدن است. درواقع فلزات سنگین پس از ورود به بدن دیگر از بدن دفع نشده بلکه در بافت‌هایی مثل چربی، عضلات، استخوان‌ها و مفاصل رسوب کرده و انباشته می‌گردند که همین امر موجب بروز بیماری‌ها و عوارض متعددی در بدن می‌شود [۹].

حضور فلزات سنگین بیش از استانداردهای تعریف شده در محیط باعث بروز مشکلات و عوارض زیست محیطی برای ساکنان آن محل و اکوسیستم می‌گردد. تأثیرات فلزات سنگین بر روی انسان متفاوت بوده و عمده‌ترین آن مربوط به بروز اختلالات عصبی است [۱۰]. بیشتر اثر تخریبی فلزات سمی، ناشی از افزایش اکسید شدن رادیکال‌های آزاد توسط آنها است. یک رادیکال آزاد، یک مولکول فعال و پرنرژی است و یک الکترون جفت نشده دارد که یک الکترون از دیگر مولکول‌ها می‌گیرد تا به تعادل برسد. رادیکال‌های آزاد به‌طور طبیعی با اکسیژن واکنش می‌دهند، اما در حضور فلزات سمی یا کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها، به‌صورت کنترل‌شده‌ای تولید می‌شوند. رادیکال‌های آزاد می‌توانند باعث تخریب بافت در سراسر بدن شوند و بیماری‌های فساد بافتی را موجب شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها مثل ویتامین‌های A, C, E فعالیت رادیکال‌های آزاد را کم می‌کنند [۱۱].

فلزات سنگین می‌توانند اسیدیته‌ی خون را افزایش دهند و بدن برای حفظ pH مناسب خون، کلسیم را از استخوان‌ها بیرون می‌کشد. به‌علاوه فلزات سنگین شرایطی را ایجاد می‌کنند که منجر به التهاب در شریان و بافت‌ها می‌شوند که خود باعث خروج بیشتر کلسیم به سمت بافت‌ها به‌عنوان بافر می‌شود. فلزات سنگین همچنین جایگزین دیگر املاح و مواد معدنی مورد نیاز در بدن می‌گردند. برای مثال در صورت کمبود روی در مواد غذایی می‌توان کادمیوم را جایگزین آن کرد. به‌طورکلی اختلالات عصبی (پارکینسون، آلزایمر، افسردگی، اسکیزوفرنی)، انواع سرطان‌ها و فقر مواد مغذی از معضلات وجود آنها در بدن است [۹].

از طرفی خاصیت سمی و قابلیت تجمع زیستی فلزات سنگین در گیاهان و جانوران و نیز ورود آنها به زنجیره غذایی خطرات ناشی از آنها را دوچندان ساخته و تاثیرات اکولوژیکی زیادی را به وجود می‌آورد [۱۲]. از این رو، کنترل بار آلودگی و تصفیه پساب‌ها از دیدگاه سلامت و بهداشت عمومی، پیشگیری از نابودی آبزیان و جلوگیری از به هم خوردن زنجیره‌ی غذایی در اکوسیستم حائز اهمیت است. برخی از فلزات سنگین، منابع اصلی آلوده‌کننده و همچنین تاثیر آنها بر روی سلامتی انسان در جدول (۱-۱) آورده شده است.

جدول ۱-۱: منابع تولید فلزات سنگین و اثرات نامطلوب آن روی سلامتی [۱۳].

آلاینده	منبع تولیدکننده آلاینده	تاثیرات نامطلوب آلاینده
سرب	آبکاری فلزات، کارخانه‌های باتری‌سازی، مهمات، رنگ‌دانه‌ها، رنگ رزی، آفت‌کش‌ها، استعمال دخانیات، آگزوز اتومبیل‌ها، معدن کاری و سوخت زغال‌سنگ.	کم‌خونی، آسیب مغزی، کم‌اشتهایی، بی‌قراری، کاهش سطح هوشیاری، آسیب‌های کبد، کلیه و معده و روده، کم‌هوشی کودکان.
کادمیوم	آلیاژسازی، معدن کاری، پلاستیک‌سازی و رنگ رزی، جوشکاری، آبکاری فلزات، آفت-کش‌ها، کودهای شیمیایی، فرآیندهای تصفیه، باتری‌های کادمیوم - نیکل و شکافت هسته‌ای.	سرطان‌زا، ناراحتی کلیوی، نارسائی ریوی، آسیب استخوان، فشارخون، کاهش وزن، آسیب‌های کلیه، برونشیت، بیماری‌های معده‌ای و روده‌ای، بیماری‌های مغز استخوان
جیوه	فوران آتشفشان، آتش‌سوزی جنگل‌ها، نشر بیولوژیکی، تولید باتری، احتراق سوخت‌های فسیلی، ذوب‌آهن و معدن کاری، آفت‌کش‌ها و صنایع کاغذ.	اختلالات کلیوی، ناراحتی چشم و ماهیچه، آماس پوست، تاثیر بر روی سیستم عصبی و مسمومیت.
کروم	آبکاری فلزات، دباغی چرم، پارچه‌بافی، رنگرزی، محافظ‌های چوبی، صنایع قوطی‌سازی و ساخت استیل.	سرطان‌زا، ناراحتی معده، استفراغ، اسهال و ورم ریه
آرسنیک	ذوب‌کاری، معدن کاری، تولید انرژی از سوخت فسیلی، رسوب سنگ‌ها، آفت‌کش‌ها - قارچ‌کش‌ها.	درد معده و روده، اختلالات قلبی و سیستم عصبی، کاهش، رشد مغز استخوان، ورم کبد، برونشیت و آماس پوست
مس	صنایع تابلوسازی، کارخانه‌های الکترونیکی، جلا دادن مس، کارخانه‌های رنگ، محافظ چوب و عملیات چاپ.	مسمومیت شدید، اختلال اعصاب، سرگیجه، اسهال و عقیم شدن
نیکل	فرآیندهای معدنی، لعاب کاری ظروف چینی، صنایع الکتریکی، کارخانه سولفات مس، نیروگاه‌های برق‌آبی.	آماس شدید نایژه و سرطان ریه

همچنین بالاترین سطح آلودگی برخی از فلزات سنگین گزارش شده توسط سازمان محیط زیست آمریکا گزارش شده، در جدول (۲-۱) ارائه شده است [۱۳].

جدول ۲-۱: بالاترین سطح مجاز آلودگی برخی از فلزات سنگین [۱۴]

غلظت (میلی گرم در لیتر)	آلاینده	غلظت (میلی گرم در لیتر)	آلاینده
۰/۰۱	آرسنیک	۰/۰۱	سرب
۰/۰۰۲	جیوه	۵/۰۰	روی
۰/۰۰۳	کادمیوم	۱/۵۰	مس
۰/۳۰	آهن	۰/۰۵	نقره

روش‌های مختلفی برای حذف فلزات سنگین از محیط‌های آبی مورد بررسی قرار گرفته است. این روش‌ها به طور کلی به دو دسته‌ی شیمیایی - فیزیکی و بیولوژیکی تقسیم می‌شوند. برخی از این روش‌ها برای حذف فلزات سنگینی که توسط صنایع و سایر منابع دیگر در محیط آزاد می‌شوند، چندان اقتصادی و موثر نیست. در ادامه روش‌های متداول حذف فلزات سنگین از آب‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند.

### ۲-۱- روش‌های شیمیایی - فیزیکی

روش‌های شیمیایی - فیزیکی حذف عمده‌ترین روش‌هایی هستند که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند. مهم‌ترین آنها عبارت‌اند از: رسوب‌شیمیایی، الکترودیالیز، تبادل یونی، استخراج، اسمز معکوس و حذف سطحی که در ادامه به شرح هر یک از آنها پرداخته می‌شود.

#### ۱-۲-۱- رسوب‌دهی شیمیایی

رسوب‌دهی شیمیایی، تبدیل یون‌های فلزی سنگین درون هیدروکسیدهای نامحلول فلزی است که این فرآیند طبق واکنش زیر انجام می‌شود:



به طوری که  $Mn^{n+}$  به عنوان فلز سنگین و  $M(OH)_n$  به عنوان هیدروکسید نامحلول در واکنش حضور دارند. شرایط خاصی برای انجام چنین واکنشی مورد نیاز است. اغلب از یک عامل رسوب‌دهنده‌ی شیمیایی ارزان، مانند آهک و هیدروکسید کلسیم برای انجام واکنش استفاده می‌شود. این روش به دلیل سادگی کار و هزینه عملیاتی پایین، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این مزایا، دارای معایبی مانند عدم حذف کامل فلزات سنگین، مصرف بالای رسوب‌دهنده و تشکیل لجن می‌باشد [۱۵].

#### ۱-۲-۲- الکترودیالیز

روشی بر مبنای جداسازی غشایی است، به طوری که چندین غشاء با خواص کاتیونی و آنیونی در اتصال با پتانسیل الکتریکی قرار می‌گیرند. زمانی که محلول فاضلاب آبی در سل قرار می‌گیرد، آنیون‌ها به طرف غشای آندی و کاتیون‌ها (فلزات سنگین) به طرف غشای کاتدی حرکت می‌کنند و جداسازی بر این اساس انجام می‌شود [۱۶].

#### ۱-۲-۳- تبادل یونی

یک روش مناسب برای حذف فلزات سنگین از فاز آبی است. در فرآیند تبادل یونی یک رزین جامد نامحلول که شامل یون‌هایی با بار یکسان در یون‌های فلزات سنگین است، در محلول آبی قرار می‌گیرد. واکنش جایگزینی زمانی اتفاق می‌افتد که رزین، یون‌های فلزی سنگین را حذف می‌کند و یون‌هایی با بار یکسان را جایگزین آنها می‌کند. این فرآیند به دلیل توانایی بازیافت یون‌های فلزات سنگین از رزین مورد توجه قرار گرفته است. از معایب این روش می‌توان به فشار زیاد مورد نیاز جهت جداسازی اشاره کرد. از طرفی دیگر آلودگی محیط زیستی رزین‌ها بعد از پایان طول عمر مفیدشان است، زیرا اغلب از جنس پلیمر بوده و برای محیط زیست زباله محسوب می‌شوند [۱۷].

#### ۱-۲-۴- استخراج با حلال

استخراج به معنی انتقال یک ماده محلول از یک فاز به فاز دیگر بوده و فاز ترکیب، محلولی است که همه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی در سرتاسر آن یکسان بوده و به طور آشکارا از ترکیب و یا محلول دیگر قابل شناسایی باشد؛ به طور مثال آب و روغن شامل دو فاز مایع است (یکی فاز روغن و دیگری فاز آب) و یا مخلوط فوق اشباع آب قند شامل دو فاز است (یکی فاز مایع آب قند و دیگری فاز جامد قند ته نشین شده). در عمل استخراج، با اضافه شدن حلال مناسب و غیر قابل اختلاط به یک فاز (مخلوط)، ماده حل شده در مخلوط اولیه وارد فاز دوم می شود (حلال جدید) و از فاز اولیه جدا می شود؛ به شرط اینکه قابلیت انحلال ماده حل شده در فاز دوم بیشتر از فاز اول باشد [۱۸].

#### ۱-۲-۵- اسمز معکوس

یک روش جداسازی غشایی است که در این روش فشاری بیشتر از فشار اسمزی آب در خلاف جهت اسمز معمولی در محلول فاضلاب آبی به کار گرفته می شود که باعث می شود مولکول های آب به صورت انتخابی از درون غشا نفوذ کنند. این روش برای خالص سازی آب بسیار موثر است، اما عیب این روش این است که به فشاری بالا جهت جداسازی نیاز دارد و همچنین هزینه عملیاتی این روش بالا است [۱۹].

#### ۱-۲-۶- جذب سطحی

جذب سطحی یک فرآیند جداسازی است که در آن برخی از اجزاء فاز سیال به سطح یک جاذب سطحی جامد منتقل می شوند. معمولا ذرات ریز جاذب در بستر ثابتی نگه داشته می شوند و سیال به صورت پیوسته از میان بستر عبور داده می شود تا جامد تقریبا اشباع شود و دیگر قادر به جداسازی نباشد. جذب سطحی را می توان تمایل مولکول های فاز سیال برای چسبیدن به سطح جامد تعریف کرد. برای سیستم جذب سطحی از ذرات با تخلخل و منافذ زیاد استفاده می شود که این منافذ سطح بسیار زیادی را ایجاد می کنند؛ یعنی جدا از سطح خارجی، تخلخل نیز موثر است و هر قدر

سطح جاذب افزایش یابد، مقدار ظرفیت جذب نیز افزایش می‌یابد. در عملیات جذب از قابلیت بعضی از جامدات در حذف بعضی از مواد موجود در محلول روی سطح استفاده می‌شود. به این شکل اجزای یک محلول گازی یا مایع را می‌توان از هم جدا کرد. عامل اساسی در سیستم جذب، جاذب است. جاذب پدید آورنده فناوری جذب سطحی است. در گذشته استفاده از جاذب‌ها بر مبنای آزمون و خطا استوار بوده که با انجام آزمایش کیفیت آنها اندازه‌گیری می‌شد، اما امروزه در بررسی‌های انجام شده از لحاظ علمی ساختار منافذ و تخلخل و انرژی‌های سطحی و دیگر پارامترهای یک جاذب را از پیش تعیین می‌کنند و بر مبنای آن از جاذب استفاده می‌کنند. در ساختار مولکولی منظم مقدار جذب افزایش می‌یابد و میزان انتخاب‌پذیری نیز زیاد می‌شود. امروزه بشر قادر است مواد با ابعاد نانومتر را از هم جدا کند [۲۰]

#### ۱-۲-۷- روش بیولوژیکی

در سال‌های اخیر روند تحقیقات در جهت یافتن روش‌های ساده و دوستدار محیط‌زیست با کارایی بالا که از لحاظ اقتصادی به صرفه باشند، برای استفاده در تصفیه‌ی فاضلاب‌های آلوده، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که به دلیل مشکلات اقتصادی قادر به استفاده از روش‌های پر هزینه نیستند، می‌باشد. بویژه زمانی که با غلظت پایینی از فلزات سنگین مواجه هستیم، روش‌های ذکر شده مناسب نمی‌باشد [۲۱]. در جدول (۱-۳) برخی از مزایا و معایب روش‌های ذکر شده به اختصار آورده شده است.

جدول ۱-۳: مزایا و معایب روش‌های شیمیایی - فیزیکی حذف کاتیون‌های فلزی سنگین [۲۲].

فرآیند حذف آلودگی	مزایا	معایب
ترسیب شیمیایی	سادگی، هزینه‌های سرمایه‌گذاری و عملیاتی پایین و دسترسی به رسوب‌دهنده‌ها (آنیون)	مناسب برای غلظت‌های بالا مناسب، جداسازی مشکل، بازده پایین و تولید مواد زائد.
فرآیندهای الکتروشیمیایی	حذف گزینشی فلز و بازیابی فلز به صورت خالص.	مناسب برای غلظت‌های بالا، هزینه‌های سرمایه‌گذاری و عملیاتی بالا و

تولید گاز هیدروژن می‌کند.		
نیازمند فرآیند فیلتراسیون و بالا بودن هزینه‌های سرمایه‌گذاری و عملیاتی و محدود بودن سرعت جریان‌های پساب‌های آلوده.	تولید کم مواد مزاحم و زائد و مصرف پایین مواد شیمیایی، کم بودن فضای عملیاتی و حذف انتخابی فلز.	اسمز معکوس
آلودگی ناشی از تبادل یونی و نیاز به احیا، عدم تصفیه محلول‌های خیلی غلیظ با گذشت زمان.	دارای خاصیت انتخاب‌گری یونی و هزینه کم و دسترسی راحت به آن.	تبادل یونی
عملکرد به نوع جاذب بستگی دارد.	مورد استفاده برای آلاینده‌های مختلف، دارای ظرفیت بالا و سینتیک سریع و انتخاب‌گری احتمالی با توجه به نوع جاذب.	جذب سطحی
گران بودن حلال‌ها و تاسیسات جانبی بازیافت و محدودیت حلالیت نمک‌های فلزی در حلال‌های آلی	امکان بازیابی حلال استخراج‌کننده، گزینش پذیری و راندمان بالای بازیابی آلاینده.	استخراج با حلال

با توجه به اینکه روش‌های موجود برای حذف کاتیون‌های فلزات سنگین دارای برخی معایب از قبیل عدم حذف کامل، مصرف بالای مواد و انرژی، تولید مواد زائد جانبی و همچنین عدم بازده مناسب در غلظت‌های پایین می‌باشند، تحقیقات زیادی بر روی مواد بیولوژیکی از قبیل محصولات جانبی کشاورزی، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها و گیاهان آبی انجام شده است [۲۲].

این مواد بازده بالایی را برای حذف کاتیون‌های فلزی سنگین از محلول‌های آبی دارا هستند و می‌توان آنها را برای کاهش غلظت یون‌های فلزی از محدوده غلظتی  $10^{-3}$  تا  $1$  میلی‌گرم بر لیتر به کار برد. همچنین نسبت به سایر روش‌ها هزینه اندکی دارند. این مواد یون‌های فلزی را از محلول‌های رقیق پیچیده به طور موثر، با بازده بالا و سریع جدا می‌نمایند؛ بنابراین استفاده از این مواد یکی از روش‌های مفید و مهم برای حذف یون‌های فلزی از پساب‌های پیچیده می‌باشد. تحقیقات اصلی در زمینه حذف یون‌های فلزی سنگین توسط میکروارگانیسم‌ها اولین بار توسط بریرلی در سال ۱۹۹۰ انجام شد [۲۳].

استفاده از توده‌های زیستی زنده برای حذف کاتیون‌های فلزی سنگین را تجمع بیولوژیکی یا

حذف بیولوژیکی فعال می‌نامند. عملکرد این نوع جاذب‌ها به متابولیسم سلولی وابسته است. همچنین تحقیقات بیشتر نشان داده است که توده‌های زیستی غیرفعال نیز می‌توانند با یون‌های فلزی با استفاده از مکانیزم‌های مختلف پلی‌سیکلو شیمیایی پیوند داشته باشند؛ بنابراین تحقیقات بر روی حذف بیولوژیکی به صورت یکی از زمینه‌های فعال برای حذف یون‌های فلزی در آمده است. عملکرد حذف بیولوژیکی برای حذف یون‌های فلزی تابع ساختار شیمیایی سلول‌های میکروبی می‌باشد [۲۴].

مکانیزم حذف بیولوژیکی گرچه کاملاً شناخته شده نیست، ولی ممکن است یک یا ترکیبی از مکانیزم‌های تبادل یونی، تشکیل کمپلکس، حذف فیزیکی، برهم‌کنش الکترواستاتیکی و ترسیب شیمیایی در سایز میکرو باشد. همچنین واکنش اکسیداسیون و احیا نیز ممکن است در حذف بیولوژیکی روی دهد که درجه تغییرات آن بستگی به محیط محلول و نوع ارگانیزم دارد [۲۵].

از جمله جاذب‌های بیولوژیکی می‌توان به باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، انواع جلبک‌ها (سبز، قهوه‌ای، قرمز) و مواد پلی‌ساکاریدی اشاره کرد. ظرفیت حذف توده‌های گوناگون زیستی برای به دام انداختن یون‌های فلزات به عواملی چون نوع توده زیستی، مواد موجود در محلول، نحوه‌ی آماده‌سازی توده زیستی و فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی محیطی بستگی دارد [۲۶]. با وجود اینکه بسیاری از مواد بیولوژیکی می‌توانند با یون‌های فلزی پیوند برقرار نمایند، آنهایی که ظرفیت جذب و قابلیت انتخاب‌پذیری بالا دارند، برای فرآیندهای حذف بیولوژیکی در مقیاس کلان مناسب هستند. برتری روش‌های بیولوژیکی که توجهات زیادی را به سوی خود جلب کرده است عبارتند از: امکان استفاده از این روش در محل آلودگی، هزینه‌ی پایین و بجا نگذاشتن آلودگی ثانویه بعد از تصفیه [۲۷].

### ۱-۳- بیان مسئله

یکی از بهترین و کاراترین روش‌های بازیابی عناصر از خاک، استفاده از میکروارگانیزم‌های موجود در خاک است؛ از این رو در این تحقیق باکتری‌های موجود در خاک معدن توسط آنالیز توالی rDNA ۱۶s مورد شناسایی قرار می‌گیرند. این روش به منظور شناسایی گونه‌های باکتری‌ها استفاده می‌شود. در ابتدا از نمونه‌های خاک، عصاره‌هایی در غلظت‌های مختلف تهیه می‌گردد و سپس در

محیط مناسب کشت باکتری‌ها (LB Agar) کشت و توزیع می‌شوند. پس از رشد و شناسایی تک کلونی‌ها مجدداً باکتری‌ها واکشت داده شده و از جمعیت خالص باکتری (DNA) به روش گرما و سرما استخراج می‌گردد. با استفاده از پرایمرهای یونیورسال قسمتی از ناحیه ۱۶S توسط دستگاه PCR تکثیر شده و جهت توالی‌یابی و شناسایی مولکولی سویه‌های باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از شناسایی باکتری‌ها، عناصر در غلظت‌های مختلف به محیط کشت مایع (Broth Agar) اضافه شده و در نهایت میزان بازیابی عناصر مورد بررسی قرار خواهد گرفت. همچنین مکانیسم فرآیند بازیابی عنصر از فاز محلول بررسی خواهد شد. در این تحقیق باکتری‌های میکروباکتریوم اس پی<sup>۱</sup> (M-SP)، پلانومیکروباکتریوم اس پی<sup>۲</sup> (P-SP)، تالاسوسپیرا اس پی<sup>۳</sup> (T-SP)، هالومناس اس پی<sup>۴</sup> (H-SP)، اینتروباکت اس پی<sup>۵</sup> (E-SP)، برون‌دیموناس اورانتیکا<sup>۶</sup> (B-A) و میکروکوکایس باکتریوم<sup>۷</sup> (M-B) شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند.

#### ۱-۴- ضرورت انجام تحقیق

پیشرفت‌های بشر در اوایل قرن بیست و یکم، نیاز او را به استفاده از فلزات افزایش داده است. با رو به اتمام بودن قسمت‌های پر عیار و تقاضای زیاد بشر، نیاز به اکتشاف ذخایر جدید و استفاده از قسمت‌های کم‌عیار با کم‌ترین هزینه و بیشترین بازیابی می‌باشد. یکی از بهترین و کاراترین روش‌های بازیابی عناصر، استفاده از میکروارگانیسم‌های موجود در خاک است. به دلیل فراوانی این میکروارگانیسم‌ها در خاک، کشت آسان و سریع در ابعاد بزرگ مقیاس، عملکرد انتخابی و بازیابی بالا می‌باشد. با در نظر گرفتن این موارد در این مطالعه از روش استخراج بیولوژیک برای بهبود بازیابی عناصر معدنی استفاده می‌شود.

---

<sup>۱</sup> Microbacterium SP

<sup>۲</sup> Planomicrobium SP

<sup>۳</sup> Thalassospira SP

<sup>۴</sup> Halomonas SP

<sup>۵</sup> Enterobacte SP

<sup>۶</sup> Brevndimonas Aurantiaca

<sup>۷</sup> Micrococcaceae Bacterium

## ۱-۵- هدف از انجام تحقیق

هدف از مطالعه‌ی حاضر حذف بیولوژیکی یون‌های فلزی سنگین سرب و روی از محلول آبی به دلیل اثرات زیانباری است که این فلزات می‌توانند بر روی سلامتی انسان داشته باشند. همچنین، شرایط بهینه برای حذف بیولوژیکی این عناصر با استفاده از بهینه‌سازی پارامترهای موثر مانند pH، غلظت باکتری، غلظت فلز سنگین و غیره به دست خواهد آمد. مطالعات نیز در شرایط بهینه‌ی حاصل از مرحله قبل بررسی خواهد شد.

## ۱-۶- جمع‌بندی

در فصل اول به آلودگی، حذف آلودگی، روش‌های حذف آلودگی و به‌طور خاص استفاده از روش‌های بیولوژیک برای حذف فلزات سنگین اشاره شد. لذا با توجه به موضوع تحقیق آشنایی یا کلیات ذکر شده در فصل اول، در فصل دوم مرور منابع مربوط به حذف آلاینده آب با استفاده از روش‌های بیولوژیک انجام و ارائه خواهد شد.

## فصل دوم

### مروری بر تحقیقات گذشته

فرآیند بیولوژیک، روش مهمی برای بازیافت فلزات است. حذف زیستی یکی از روش‌های بیولوژیک در حال ظهور می‌باشد که مزیت‌هایی بر روش‌های معمول دارد. اجرای این عملیات آسان بوده و برای حذف آلاینده‌ها از محلول‌های بسیار رقیق، موثر است. همچنین این فرآیند لجن شیمیایی تولید نمی‌کند و استفاده از آن به صورت برجا از مهم‌ترین مزایای آن به شمار می‌رود. انگیزه‌ی اولیه برای توسعه پاک‌سازی زیستی در فرآیندهای صنعتی بایو، کم‌هزینه بودن، راندمان بالا برای حذف فلزات، تولید دوباره ارگانسیم، سینتیک فرآیند سریع و عدم تولید پسماندهای ثانویه خطرناک می‌باشد [۲۸].

## ۲-۲- تاریخچه حذف آلودگی توسط میکروارگانسیم‌ها

اوایل دهه‌ی ۱۹۸۰ مشاهده شد که بعضی از میکروارگانسیم‌ها قادر به حذف عناصر فلزی هستند. پژوهش‌های مختلفی از نقطه نظر سم‌شناسی گزارش داده شده است، اما آنها روی حذف و تجمع به دلیل متابولیسم فعال سلول‌های زنده، تاثیر فلزات روی فعالیت متابولیکی سلول‌های میکروبی و در نتیجه تجمع آنها در زنجیره‌ی غذایی تمرکز داشتند [۲۹].

مطالعات بسیاری در رابطه با استفاده از بیومس باکتریایی برای حذف فلزات سنگین انجام شده است. پارادو و همکاران (۲۰۰۳) از باکتری سودوموناس غیرفعال منجمد خشک شده برای حذف کادمیوم، مس، سرب و روی استفاده کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیش از ۸۰٪ از یون‌های فلزی در کمتر از ۵ دقیقه حذف شده و زمان تماس ۱۰ دقیقه برای رسیدن به تعادل کافی بوده است. همچنین نتایج آنها نشان داد که pH تاثیر مهمی روی حذف زیستی فلزات دارد و pH بهینه برای فلزات کادمیوم، مس، سرب و روی به ترتیب ۶، ۵-۶، ۶-۶/۵ و ۷-۷/۵ بوده است. آنها همچنین پیشنهاد کردند که این نوع باکتری می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای تغلیظ یا جداسازی فلزات مورد مطالعه در مقیاس صنعتی یا تحلیلی استفاده شود [۳۰].

حذف زیستی کروم سه‌ظرفیتی با استفاده از ۱۷ گونه مختلف از باکتری‌های جدا شده از چشمه

آب گرم رامسر، توسط ربانی و همکارانش (۲۰۰۵) انجام شده است. نتایج نشان داد که یک گونه‌ی جدید از باکتری گرم - مثبت کوکوباسیل برای حذف یون کروم بسیار موثر است [۳۱].

هو و همکاران (۲۰۰۷) با شناسایی HQ-1 جدا شده از یک سنگ معدن سرب و روی که یک نژاد جدید از باکتری باسیلوس است و دارای ظرفیت خوبی برای حذف کادمیوم و مقاومت بالایی دارد، بررسی کرده‌اند. این باکتری قادر به حذف کادمیوم با ظرفیت  $3/6 \times 10^{-4}$  مول بر گرم و با مکانیسم به دام انداختن روی سطح سلول و فعل‌وانفعال اکسایش - کاهش بوده است. نتایج آنها نشان داد که مزایایی مانند ظرفیت بالای حذف آلودگی و مقاومت بالا در برابر فلز، این گونه باکتری را به‌عنوان یک عامل موثر برای بازیابی و حذف کادمیوم از پساب آلوده معرفی می‌کند [۳۲].

در پژوهشی دیگر که توسط کونگوارم و همکاران (۲۰۰۷)، از قارچ و باکتری مقاوم به فلزات سنگین که از نمونه‌های خاک صنایع آبکاری فلزات جدا شده بودند، برای حذف کروم و نیکل از پساب صنعتی در مقیاس آزمایشگاهی استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که گونه‌های جدید ایجاد شده میکروکوکایس اس پی<sup>۱</sup> و اسپرژیلوس اس پی<sup>۲</sup>، پتانسیل بالایی برای حذف یون‌های کروم و نیکل از پساب صنعتی دارند [۳۳].

حذف زیستی فلزات سنگین کادمیوم، مس، نیکل، روی و منگنز با استفاده از دو باکتری گرمادوست در یک سیستم ناپیوسته توسط ازمیر و همکاران (۲۰۰۹) بررسی شد. همچنین آنها سینتیک حذف را با استفاده از مدل‌های شبه مرتبه اول و شبه مرتبه دوم بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان می‌دهد که سطح فعال بیومس اساساً شامل گروه‌های آمین، کربوکسیل و آروماتیک است. همچنین نتایج سینتیک نشان می‌دهد که فرآیند حذف شامل یک مرحله‌ی کنترل‌کننده‌ی سرعت است که مطابق با مدل شبه مرتبه دوم است [۳۴].

رانی در سال ۲۰۱۰ تفاوت میزان حذف فلزات مس، کادمیوم و سرب توسط باکتری‌های

---

<sup>۱</sup> Micrococcus sp

<sup>۲</sup> Aspergillus sp

بی‌تحرک و باکتری‌های مرده را بررسی کردند. نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد درحالی‌که باکتری‌های بی‌تحرک فلزات مس، کادمیوم و سرب را به ترتیب با درصد ۴۱/۳۴، ۹۰/۶۹ و ۸۴/۲۷ درصد حذف کرده‌اند باکتری‌های مرده همین فلزات را با درصد ۴۴/۷۳، ۸۶/۶۶ و ۷۹/۲۲ حذف کرده‌اند. این خود نشان دهنده‌ی میزان بالاتر حذف برای یک میکروارگانیزم زنده نسبت به هم‌نوع مرده یا غیرفعال خود بود [۳۵]. همچنین مطالعات ملتالی و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان می‌دهد که بخش اصلی حذف فلزات در ۱۰ دقیقه اول افزودن باکتری‌ها اتفاق افتاده است. همچنین فرآیند بازیابی فلزات سنگین از میکروارگانیزم‌ها در حالتی که از باکتری‌های مرده استفاده شده است بیشتر از حالتی است که از باکتری‌های زنده استفاده شده است [۳۶].

فیکو و همکاران (۲۰۱۲) از باکتری اسیدتیوباسیلوس فرو اکسیدان استفاده کردند و نتایج حاکی از آن بود که این باکتری برای بازیابی فلزات بارزش از زباله مناسب است [۳۷].

ژنو و همکاران (۲۰۱۴) مطالعاتی بر روی رودخانه‌ی ژیانگ جیانگ که با چندین فلز سنگین آلوده شده بود، انجام دادند. آنها فلزات چندگانه در رسوبات قلیایی را تا حد زیادی مهار کردند. روش بیولوژیک با استفاده از باکتری‌های اتوتروفیک مخلوط با باکتری‌های هتروتروف می‌تواند این مشکل را با موفقیت حل کنند. نتایج آزمایش نشان داد که روش بیولوژیکی راندمان قابل توجهی برای حذف عناصر Cu، Mn، Zn و Cd دارد [۳۸].

رد و همکاران (۲۰۱۴) کشت میکروبی برای تولید اسید آلی و ابزار بالقوه آنها برای شستشوی عناصر کمیاب حاکی از پودر فسفر رپتور و کاتالیزوری مایع مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق دو سوبه باکتریال و یک قارچ از مواد زیست محیطی و صنعتی حاوی عناصر نادر حاکی جدا شده و در مقایسه با باکتری‌های مهم صنعتی گلوکونوباکتر اکسیدان، جدا سازی شده است. نتایج نشان داد که میکروارگانیزم‌های تولید کننده گلوکونیک و دیگر اسیدهای ارگانیک می‌توانند موجب شسته شدن عناصر نادر حاکی از مواد زائد شوند و افزایش تولید اسید آلی بهبود می‌یابد [۳۹].

ژیان یانگ و همکاران (۲۰۱۶) از میکروارگانیزم‌ها برای حذف فلزات سنگین از خاک‌های آلوده

استفاده کردند. مطالعه ژیان در مورد یک سوبه تولید کننده بیوسورفکتانت با ظرفیت تولید قلیایی از لجن فاضلاب کابینت جدا شده و توانایی آن برای حذف Zn، Pb، Mn، Cd، Cu و As مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک با استفاده از توالی 16s rDNA تایید کرد، راندمان حذف ۴۴ برای Zn، ۳۲/۵ برای Pb، ۵۲/۲ برای Mn، ۳۷/۷ برای Cd، ۲۴/۱ برای Cu و ۳۱/۶ درصد برای As بود. Mn، Zn و Cd از خاک بیشتر از Cu، Pb و As حذف شد [۴۰].

در پژوهشی دیگر که فارارا و همکاران (۲۰۱۷) انجام دادند، فرآیند حذف فلزات سنگین منگنز، کادمیوم، کروم، روی و سرب به وسیله محیط حاوی باسیلوس، سودوموناس، استافیلوکوکوس و اسپرژیلوس بررسی شده است. نتایج این بررسی نشان داد که باکتری سودوموناس بهتر از سایر باکتری‌ها فلزات سنگین را حذف می‌کند. باکتری استافیلوکوکوس بیشتر از هر سه باکتری دیگر سرب را حذف کرده است [۴۱].

در پژوهش دیگری که توسط گونزالز و همکاران (۲۰۱۷) انجام شده است، آب حاوی فلزات سنگین نیمه اسیدی حاوی عناصر منیزیم، مس، روی، نیکل، آهن و آلومینیوم، آرسنیک و سولفات در یک راکتور پرشده با شن سیلیکا توسط باکتری احیا کننده سولفات بررسی شده است. بازده حذف فلزات مس، روی و نیکل ۷۹/۵ درصد و برای آهن ۸۲ بوده است. همچنین ۷۷/۵ درصد یون آرسنیک هم حذف شده اما غلظت یون‌های آلومینیوم و منگنز تغییری نکرده است [۴۲].

یی و همکاران (۲۰۱۷) اثر میکروارگانیسم‌های با مقادیر مختلف اولیه را بر روی کالکوپیریت مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که با استفاده از اکسیدکننده‌های بیشتر در دمای ۳۱ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد، میزان استخراج نهایی یون مس برابر ۱۹/۸ و ۶/۶ درصد بیشتر از اکسید کننده‌های معمول بوده است [۴۳].

لیوو و همکاران (۲۰۱۷) مطالعاتی برای حذف سرب طی فرآیند زیستی انجام دادند، این تحقیق ترکیبی از بیولیچینگ با استفاده از محلول آب نمک برای حذف فلزات سنگین بود. این مطالعه نشان داد که این روش برای حذف سرب که مشکل زیستی دارد افزایش می‌یابد [۴۴].

## ۲-۳- جمع‌بندی

در این فصل به بررسی تحقیقات گذشته پرداخته شده است و نشان داده شده که استفاده از میکروارگانیزم‌ها برای حذف بیولوژیکی بستر موثر بوده است. تحقیقات گذشته همچنین حاکی از این است که یون‌های فلزی سنگین نظیر سرب، روی، نیکل، کروم، کادمیوم، آرسنیک و غیره توسط باکتری‌های زنده، باکتری‌های مرده و دیگر میکروارگانیزم‌ها از محیط زیست حذف شده‌اند. نتایج نشان می‌دهد که واکنش حذف یون‌های فلزی سنگین توسط باکتری سریع صورت گرفته است و می‌توان از باکتری‌های برجای موجود در خاک‌ها و آب‌های آلوده برای حذف آزمایشگاهی فلزات سنگین سرب و روی استفاده شود.

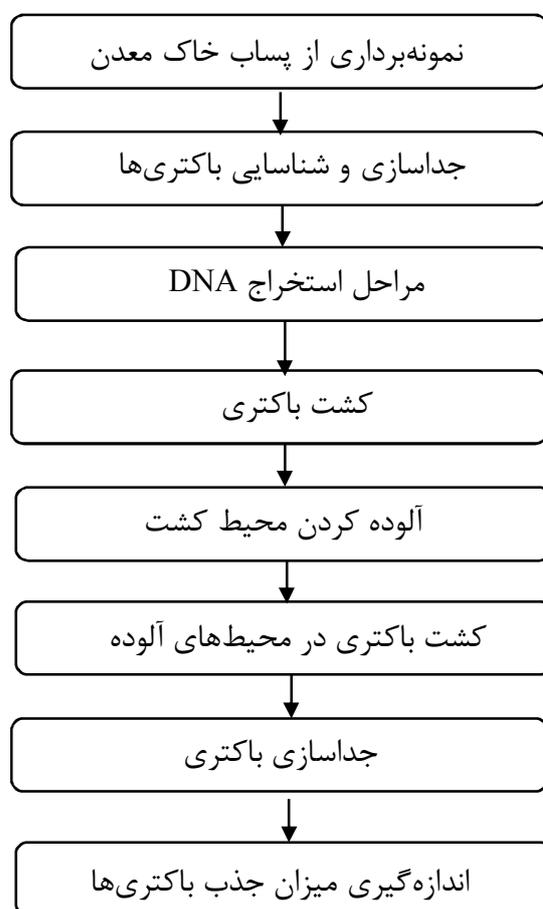
## فصل سوم

### روش تحقیق

### ۳-۱- مقدمه

در این فصل مطالعات آزمایشگاهی فرآیند جذب بیولوژیکی ارائه شده است. ابتدا به تهیه نمونه-هایی از پساب خاک معدن زغالسنگ دهملا و معدن بوکسیت جاجرم پرداخته شده است. در مرحله بعد به کشت باکتری در محیط کشت جامد و مایع، آلوده کردن محیط کشت، کشت باکتری در محیط آلوده پرداخته شده است.

تمامی مراحل کار آزمایشگاهی توسط فلوجارت در شکل (۳-۱) ارائه شده است.



شکل ۳-۱: فلوجارت مراحل آزمایشگاهی

### ۳-۲- مواد مورد استفاده

برای انجام آزمایش‌ها از مواد زیر استفاده شده است (تمامی مواد شیمیایی ساخت شرکت مرک

آلمان است):

- نیترات سرب  $Pb(NO_3)_2$
- کلرید روی  $ZnCl_2$
- محیط کشت جامد LB Agar
- محیط کشت مایع LB Broth
- هیدروکسید سدیم NaOH
- هیدروکلریک HCl

### ۳-۳- تجهیزات مورد استفاده

برای انجام مراحل آزمایشگاهی از تجهیزات زیر استفاده شده است.

- اتوکلاو
- ترازوی دیجیتالی
- شیکر انکوباتور<sup>۱</sup>
- هود میکروبی
- سمپلر
- پتری دیش<sup>۲</sup>
- سانتریفیوژ
- فالکن<sup>۳</sup>
- دستگاه جذب اتمی (Thermo Elemental)
- دستگاه pH متر
- دستگاه اسپکتوفتومتر

---

<sup>1</sup> Shaker incubator

<sup>2</sup> Petri dish

<sup>3</sup> Falcon

### ۳-۴- روش‌های تجربی

#### ۳-۴-۱- نمونه‌برداری از خاک

نمونه خاک‌های مورد آزمایش از قسمت‌های داخلی و بیرونی معادن آلومینا (واقع در جاجرم) و زغال‌سنگ (واقع در دهملا) شهرستان شاهرود جمع‌آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. به طوری که از قسمت داخلی معدن آلومینا و زغال‌سنگ نمونه‌برداری با دو عمق ۳۰-۴۰ سانتی‌متری و ۳۰-۴۰ سانتی‌متری و از قسمت خارجی معدن آلومینا و زغال‌سنگ نمونه‌برداری با دو عمق ۳۰-۴۰ سانتی‌متری و ۲۰-۴۰ سانتی‌متری صورت گرفت.

#### ۳-۴-۲- جداسازی و شناسایی باکتری‌ها در پروفایل خاک

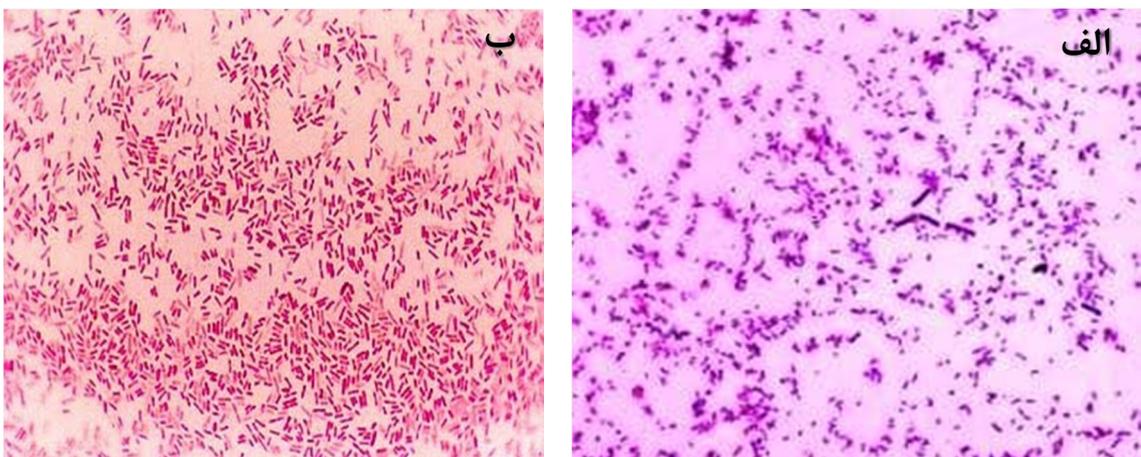
از همه‌ی نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده جهت جداسازی باکتری‌های موجود، سوسپانسیون-هایی با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۱ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره‌ی خاک تهیه گردید و سپس جهت کشت و شناسایی باکتری‌ها از محیط کشت جامد استفاده شد. محیط‌های کشت حاوی عصاره‌ی خاک در دستگاه اتاقتک رشد<sup>۱</sup> در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از گذشت ۴ روز تک کلونی‌های رشد یافته با توجه به رنگ و شکل کلونی جداسازی و در محیط جدید واکشت داده شدند. در روش رنگ‌آمیزی گرم ابتدا باید یک لام برداشته و آن را با پنبه و الکل تمیز کرده و سپس یک قطره آب مقطر روی لام ریخته شود. پس از آن با استفاده از لوپ یک کلونی باکتری برداشته و روی لام پخش کرد. حال لام و نمونه را روی شعله قرار داده تا آب و نمونه خشک شود و نمونه‌ی تثبیت شده به دست آید. در مرحله بعد از کریستال ویوله استفاده کرده و چند قطره از آن را روی نمونه ریخته و پس از یک دقیقه نمونه با آب مقطر شسته شود تا رنگ‌های اضافی آن از بین برود. سپس چند قطره از معرف رنگی لو گل روی نمونه ریخته می‌شود و پس از یک دقیقه شست‌وشو انجام گردد. سپس با استفاده از الکل رنگ‌بری انجام می‌گیرد که مدت‌زمان این مرحله ۱۵-۲۰ ثانیه

---

<sup>۱</sup> Germinator

می‌باشد. به موجب تثبیت رنگ توسط کریستال ویوله و لو گل و شست و شوی آن از الکل استفاده می‌شود. باکتری گرم منفی در این مرحله رنگ دیواره‌ی خود را از دست می‌دهد، زیرا این باکتری‌ها دارای لایه‌ی پیتیدوگلیکان محدود و غشای خارجی غنی از چربی هستند و حلال الکل باعث حذف این لایه‌ها و غشا شده و رنگ مراحل قبل از بین می‌رود. اما باکتری‌های گرم مثبت به علت ضخامت زیاد لایه پیتیدوگلیکانی و عدم وجود لیپید فراوان به همان رنگ باقی می‌مانند.

در مرحله بعد با آب مقطر دوباره نمونه را شست‌وشو داده و پس از شست‌وشو در گام بعد از رنگ سافرانین استفاده می‌شود و چند قطره از آن روی نمونه ریخته و به مدت ۳۰-۴۰ ثانیه نگهداری می‌شود. این یک معرف برای رنگ‌آمیزی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که در مرحله‌ی قبلی رنگ خود را از دست داده‌اند. سپس دوباره نمونه را شست‌وشو داده و حال نمونه را در مجاورت هوا قرار داده تا خشک شود و سپس یک لامل روی نمونه گذاشته و زیر میکروسکوپ گرم باکتری مشخص می‌شود. باکتری گرم مثبت به رنگ بنفش و باکتری گرم منفی به رنگ قرمز مشاهده می‌شود. در شکل (۲-۳) نمونه‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی آورده شده است.



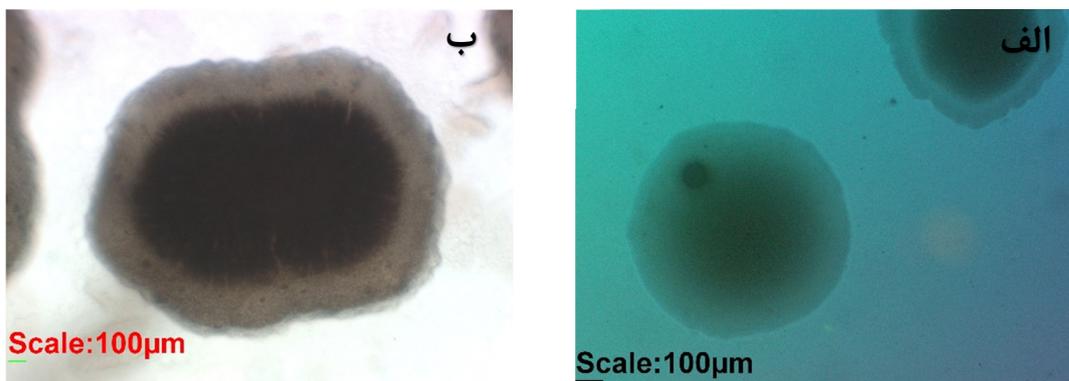
شکل ۲-۳: الف) باکتری گرم مثبت، ب) باکتری گرم منفی

همچنین جهت شناسایی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی به ترتیب از محیط مایع بدون پارافین و با پارافین استفاده گردید. در جدول (۱-۳) مشخصات باکتری‌ها آورده شده است.

جدول ۱-۳: مشخصات باکتری‌های موجود در خاک

نام باکتری	گرم مثبت و گرم منفی	هوازی و بی‌هوازی
Microbacterium SP (M-SP)	گرم مثبت	هوازی
Micrococcaceae Bacterium (M-B)	گرم مثبت	هوازی
Enterobacter SP (E-SP)	گرم منفی	هوازی
Planomicrobium SP (P-SP)	گرم مثبت	هوازی
Thalassospira SP (T-SP)	گرم مثبت	هوازی
Brevndimonas Aurantiaca (B-A)	گرم منفی	هوازی
Halomonas SP (H-SP)	گرم منفی	هوازی

در جدول (۱-۳) مشخصات باکتری‌های استفاده شده در این پایان‌نامه می‌باشد که همه باکتری‌ها به دلیل اینکه از روی سطح زمین جداسازی شده هوازی می‌باشند و همچنین ۴ گونه از این باکتری‌ها گرم مثبت و مابقی گرم منفی می‌باشند. همچنین در شکل (۳-۳) دو نمونه از باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق را آورده‌ایم.



شکل ۳-۳: تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شده است، الف) باکتری *Thalassospira SP* و ب) باکتری *Enterobacter SP*

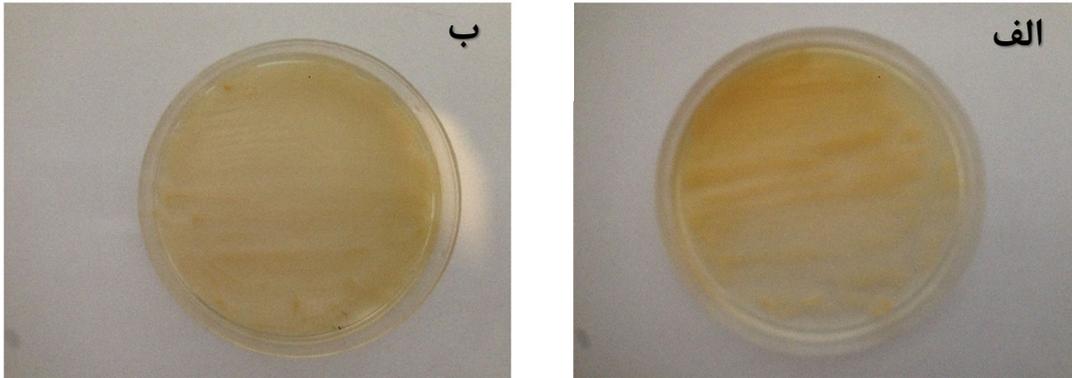
در تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری در شکل (۳-۳) دیده می‌شود که باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق به شکل گرد می‌باشد و تفاوت این نوع باکتری‌ها نسبت به باکتری‌های میله‌ای عبارت‌اند از: همه قسمت‌های باکتری به یک اندازه قدرت حذف یون را دارند بر خلاف باکتری‌های میله‌ای که در کنارهای باکتری میزان حذف بیشتری نسبت به قسمت میله‌ای خود دارند.

### ۳-۴-۳- مراحل استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش گرم و سرد استفاده شد، جهت اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA که یک مایکرو لیتر DNA استخراج شده به‌عنوان الگو درون دستگاه قرار گرفت، همچنین از ژل آگارز جهت بررسی کیفیت درون دستگاه قرار گرفت. سپس با پرایمرهای اختصاصی 16S واکنش PCR انجام گردید. محصول واکنش جهت شناسایی مولکولی باکتری مورد توالی‌یابی قرار گرفت و با استفاده از ابزار BLAST باکتری‌ها شناسایی شدند.

### ۳-۴-۴- کشت باکتری در محیط جامد

نحوه‌ی آماده‌سازی به این صورت است که مقدار ۲۰ گرم از محیط کشت جامد LB Agar را وزن کرده، درون یک لیتر آب مقطر ریخته و توسط اتوکلاو استریل شد. با روشن کردن اتوکلاو دما و فشار سیستم افزایش می‌یابد. محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد نگه داشته می‌شود. پس از تکمیل فرآیند استریل کردن، فشار سیستم کاهش یافته و زمانی که دمای سیستم به ۸۵ درجه سلسیوس رسید محیط کشت از اتوکلاو خارج می‌شود و در زیر هود بیولوژیکی تمیز شده با الکل درون پتری دیش ریخته شد. پس از سرد و ژله‌ای شدن محیط کشت درون پتری دیش‌ها، لوپ وارد ارلن حاوی خاک رقیق شده می‌شود و سپس روی محیط کشت درون پتری دیش کشیده شد. سپس پتری دیش به مدت سه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگه داشته شد. پس از سه روز باکتری‌ها روی سطح پتری دیش به طور کامل رشد کرده‌اند. سپس توسط لوپ یک کلونی از باکتری رشد کرده برداشته و به محیط جدید منتقل می‌شود تا واکشت داده شود. همان‌طور که در شکل نیز مشاهده می‌شود باکتری پس از چندین مرحله کشت برای خالص‌سازی به‌صورت کلونی‌های تک و خالص درآمده است. در شکل (۳-۴) دو نمونه از باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت جامد آورده شده است.



شکل ۳-۴: باکتری‌های کشت شده در محیط کشت جامد، الف) باکتری T-SP و ب) باکتری E-SP.

### ۳-۴-۵- کشت باکتری در محیط مایع

محیط کشت مایع مانند محیط کشت جامد تهیه می‌شود، با این تفاوت که در محیط کشت مایع آگار وجود ندارد چون آگار باعث ژله‌ای شدن محیط کشت می‌شود. برای این منظور از محیط کشت Lb-Broth (Merck) استفاده شد. برای تهیه آن ۲۰ گرم از نمونه را وزن کرده و به حجم یک لیتر رسانده شد، محیط تهیه شده را درون اتوکلاو قرار می‌گیرد تا استریل گردد سپس زیر هود استریل شده ۳۰ سی‌سی محیط کشت را درون ارلن‌های با حجم ۵۰ سی‌سی ریخته شد و با استفاده از لوپ که با شعله استریل گشته است باکتری از محیط کشت جامد برداشته و درون ارلن حاوی محیط کشت مایع ریخته و سر ارلن‌ها توسط پنبه استریل شده پوشانده شد و درون شیکر انکوباتور به مدت دو روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ دور در دقیقه قرار گرفت تا رشد کنند. در شکل (۳-۵) محیط کشت مایع و باکتری رشد کرده در محیط کشت را ملاحظه می‌کنید.



شکل ۳-۵: الف) محیط کشت مایع، ب) محیط کشت آلوده شده به باکتری.

### ۳-۴-۶- آلوده کردن محیط کشت

برای تهیه‌ی محیط‌های کشت میکروبی حاوی سرب و روی به طور جداگانه باید دانست که جرم مولکولی نیترات سرب برابر با  $331/2$  و جرم مولکولی کلرید روی برابر  $136/32$  و جرم اتمی سرب برابر با  $207/2$  و جرم اتمی روی برابر با  $65/38$  است. برای تهیه‌ی محلول  $1000$  میلی‌گرم بر لیتر سرب، با توجه به در نظر گرفتن جرم مولکولی سرب لازم است میزان  $1/60$  گرم از ماده یادشده برداشت شد و به حجم  $1000$  میلی‌لیتر برسد؛ بنابراین از محلول میلی‌گرم بر لیتر  $1000$  سرب می‌توان برای تهیه غلظت‌های مختلف استفاده کرد. برای تهیه محیط آلوده با غلظت‌های مشخص ابتدا یک محیط  $1000$  میلی‌گرم بر لیتر تهیه کرده که ما برای تهیه آن از نیترات سرب و کلرید روی

استفاده شد، پس از اتوکلاو کردن محیط کشت آلوده و محیط کشت بدون آلودگی محیط کشت‌های ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر را با استفاده از آنها تهیه شد برای این کار از فرمول  $C_1V_1=C_2V_2$  استفاده شد. مثلاً برای ساخت ۲۰۰ سی سی محیط کشت دارای ۵۰ میلی گرم بر لیتر فلز سرب به صورت  $V_1 \times 1000 = 50 \times 200$  عمل می‌شود پس برای ساخت ۲۰۰ سی سی محیط کشت حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر فلز سرب، ۵ سی سی از محلول ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به حجم ۲۰۰ می‌رسد. برای ساخت سایر محیط‌های دارای سرب و روی نیز از روش بالا استفاده می‌شود.

### ۳-۴-۷- کشت باکتری در محیط‌های آلوده

پس از تهیه محیط‌های آلوده به فلز سنگین سرب یا روی با غلظت‌های مشخص آنها را درون ارلن با حجم کلی ۵۰ سی سی که در هر ارلن ۳۰ سی سی محیط آلوده ریخته و با سمپلر ۲ سی سی از باکتری‌های کشت داده درون ارلن حاوی محیط کشت آلوده ریخته شد، سر آنها را با پنبه استریل شده پوشانده و درون انکوباتور شیکردار به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد تا رشد کنند.

### ۳-۴-۸- اندازه‌گیری میزان حذف باکتری‌ها

پس از رشد باکتری‌ها آنها را درون فالكون ریخته و سپس آنها را با دور ۴۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ کرده تا باکتری‌های آن ته‌نشین شوند، پس از آن با استفاده از دستگاه جذب اتمی میزان عنصر سرب و روی را درون محلول حاوی باکتری و شاهد (بدون باکتری) اندازه‌گیری کرده و میزان کاهش آن را محاسبه گردید.

### ۳-۵- تست اولیه حذف بیولوژیکی برای تشخیص باکتری باقابلیت بالای حذف یون‌های

#### سرب و روی

به‌منظور انجام این آزمایش محلول‌هایی با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر حاوی یون‌های سرب و روی به‌طور جداگانه،  $pH=7$  در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۲ سی سی از باکتری‌های مورد نظر به مدت ۷۲ ساعت درون شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ دور بر دقیقه تکان داده شد بعد از گذشت

۷۲ ساعت تکان دادن، pH محیط را به ۳/۵ رسانده شد تا فلز در محیط به صورت محلول بماند، باکتری‌های رشد کرده به وسیله سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۸ دقیقه جمع‌آوری شد و برای آنالیز مقدار باقیمانده فلز در محلول به وسیله دستگاه جذب اتمی استفاده گردید که نتایج آن در شکل (۳-۶) آمده است. لازم به ذکر است که از یک شاهد با شرایط مشابه بقیه موارد استفاده شد تنها اختلاف در عدم وجود زیست‌توده باکتریایی در نمونه شاهد می‌باشد تا اطمینان حاصل شود که در زمان انتقال نمونه‌ها هیچ‌گونه حذفی توسط باکتری‌های دیگر (آلودگی) صورت نمی‌گیرد. برای تعیین میزان سرب و روی حذف شده توسط باکتری در تمامی مراحل انجام این تحقیق از رابطه (۳-۱) محاسبه شد.

$$\text{Bioreduction} = 100 \times (C_i - C_f) / C_i \quad (1-3)$$

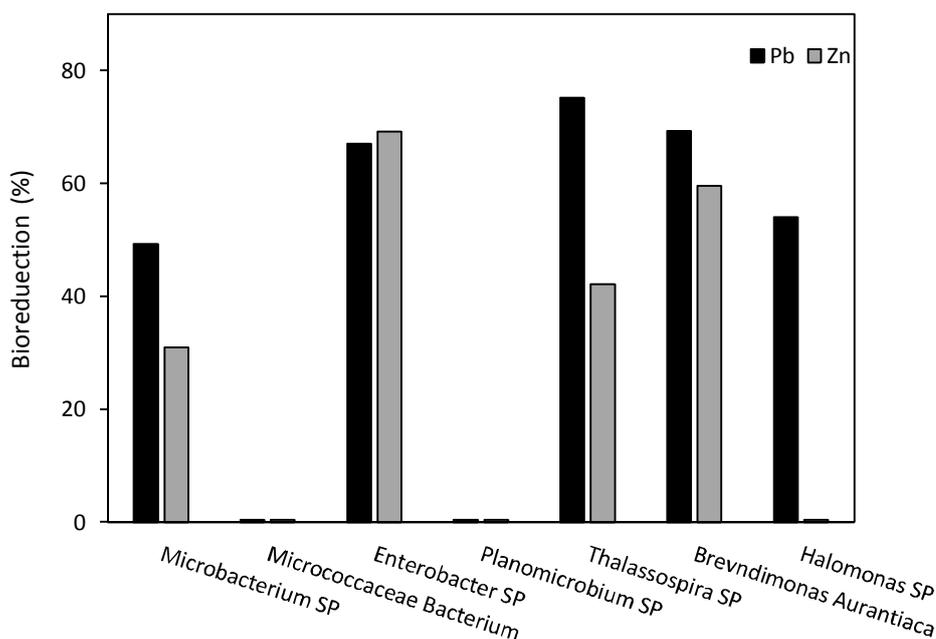
که در آن:

Bioreduction = درصد حذف فلز توسط باکتری است.

$C_i$  = غلظت اولیه سرب و روی قبل از انجام واکنش است.

$C_f$  = غلظت نهایی سرب و روی در محلول بعد از ۷۲ ساعت شیک دادن و فیلتر شدن می‌باشند

که توسط دستگاه جذب اتمی نشان داده می‌شود.



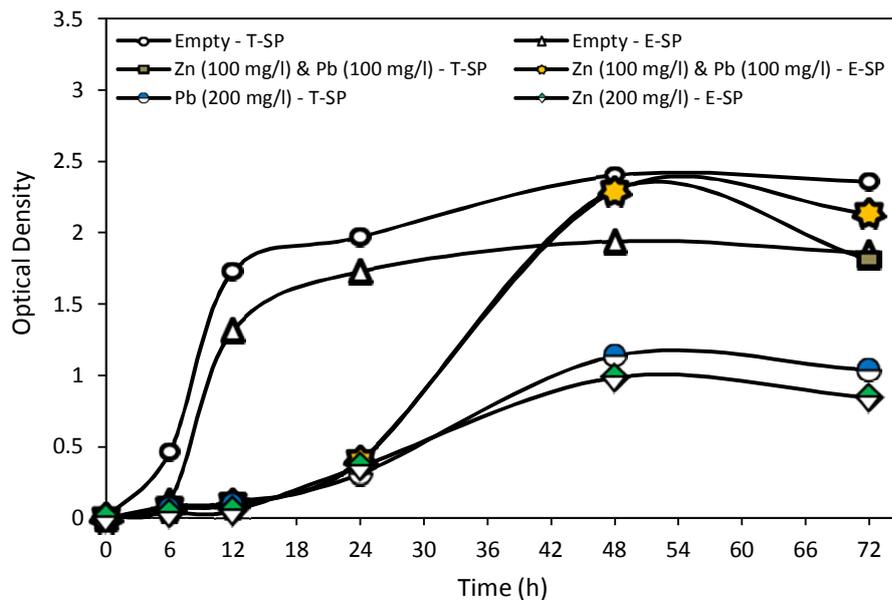
شکل ۳-۶: تست اولیه برای تعیین باکتری‌های مناسب با بیشترین حذف یون‌های سرب و روی.

همان‌طور که شکل (۳-۶) مشاهده می‌شود باکتری‌های M-B و P-SP هیچ‌گونه مقاومتی در برابر یون‌های سرب و روی ندارند و باکتری H-SP در برابر روی مقاوم نبوده و بیشترین حذف برای یون سرب توسط باکتری T-SP برابر با ۷۵/۲۶ درصد و برای یون روی نیز باکتری E-SP با ۶۹/۲۸ درصد حذف بود در ادامه برای بهینه کردن پارامترهای موثر در حذف زیستی برای یون‌های سرب و روی به ترتیب از باکتری‌های T-SP و E-SP استفاده شد.

### ۳-۶- منحنی رشد باکتری‌ها

رسم منحنی رشد باکتری‌ها جهت شناسایی مراحل رشد باکتری و تشخیص این‌که باکتری در چه زمانی پس از کشت در محیط کشت مایع به فاز لگاریتمی می‌رسد، این منحنی رسم می‌گردد. لازم به ذکر است که باکتری‌ها در میانه فاز لگاریتمی بیشترین حذف را دارند، به همین منظور تشخیص زمان رسیدن به این مرحله از مراحل رشد برای ادامه مطالعات ضروری به نظر می‌رسد به این منظور باکتری‌ها در یک ارلن مایر ۵۰ سی‌سی حاوی ۳۰ سی‌سی محیط کشت مایع آلوده به ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر یون‌های سرب و روی به‌طور جداگانه و ترکیب دو فلز که غلظت هر یون ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲ سی‌سی از باکتری‌های مورد نظر بودند در مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد و هر

۱۲ ساعت دانسیته نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است محیط کشت مایع حاوی باکتری‌های مورد نظر عاری از یون‌های سرب و روی به منظور تعیین رشد باکتری در زمان‌های مختلف مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج آن در شکل (۷-۳) آمده است.



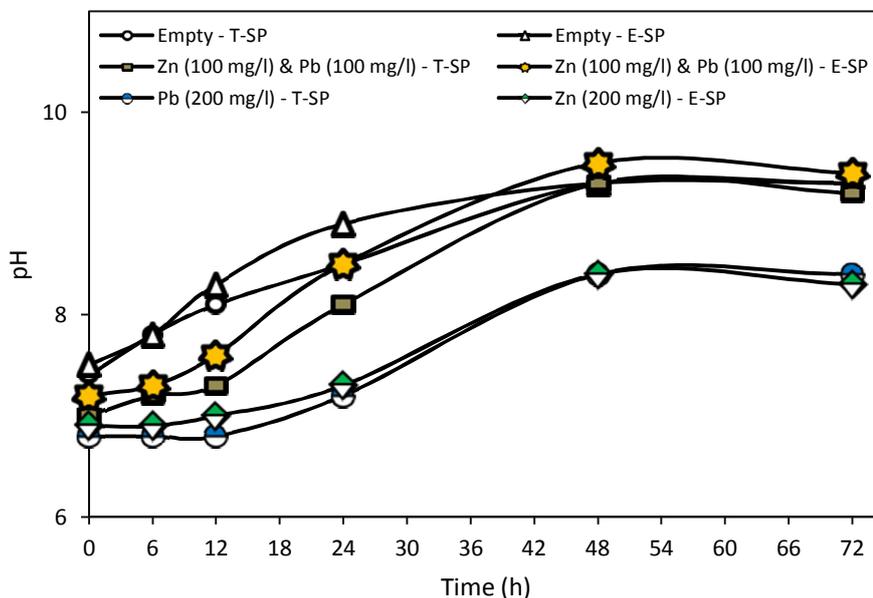
شکل ۷-۳: منحنی رشد باکتری‌های T-SP و E-SP در حضور و عدم حضور یون‌های سرب و روی.

همان‌طور که در شکل (۷-۳) مشاهده می‌شود، برای محیط‌های عاری از یون‌های سرب و روی در ۱۲ ساعت اولیه واکنش به مقدار اوپتیمم خود می‌رسند و دانسیته نوری یون سرب برابر  $1/73$  و برای یون روی برابر  $1/318$  می‌باشد و با گذشت زمان بیشتر دانسیته نوری این دو باکتری تغییر چندانی نمی‌کند اما با زیاد شدن غلظت یون‌های سرب و روی تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان دانسیته نوری یون‌های سرب و روی در ۱۲ ساعت اولیه به ترتیب به  $0/053$  و  $0/093$  کاهش یافته و زمان بهینه باکتری‌ها به ۴۸ ساعت افزایش می‌یابد و مقدار آنها به ترتیب برابر  $1/137$  و  $0/987$  است و در پایان زمانی که ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر یون‌های سرب و روی درون محیط ما باشند دانسیته نوری باکتری‌های مورد نظر در ۴۸ ساعت به نقطه بهینه می‌رسد. حتی مشاهده می‌شود در محیطی که ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر یون به صورت جفت وجود دارد، رشد باکتری T-SP و E-SP از حالت که

غلظت یون‌های سرب و روی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است بیشتر بوده و مقدار آنها به ترتیب برابر ۲/۳ و ۲/۲۹ است این موضوع نشانگر آن است که علاوه بر اینکه باکتری ما مقاوم به فلز سرب و روی است بلکه در غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان رشد باکتری بیشتر می‌شود [۴۵].

### ۷-۳- منحنی تغییرات pH در زمان‌های مختلف واکنش

به منظور بررسی تغییرات pH در بازه زمانی مورد آزمایش به‌وسیله دستگاه pH متر در طول آزمایش، pH محلول اندازه‌گیری می‌شود که نتایج آن در شکل (۳-۸) آمده است.



شکل ۳-۸: منحنی تغییرات pH در طول آزمایش.

همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، باگذشت زمان و رسیدن به زمان بهینه رشد باکتری‌ها (۴۸ ساعت) در محیط افزایش pH را رخ داد و این نشانگر آن است که باکتری‌های T-SP و E-SP عمل احیا را انجام داده و ضمن تکثیر بیشتر خود باعث قلیایی شدن محیط می‌شوند [۴۶].

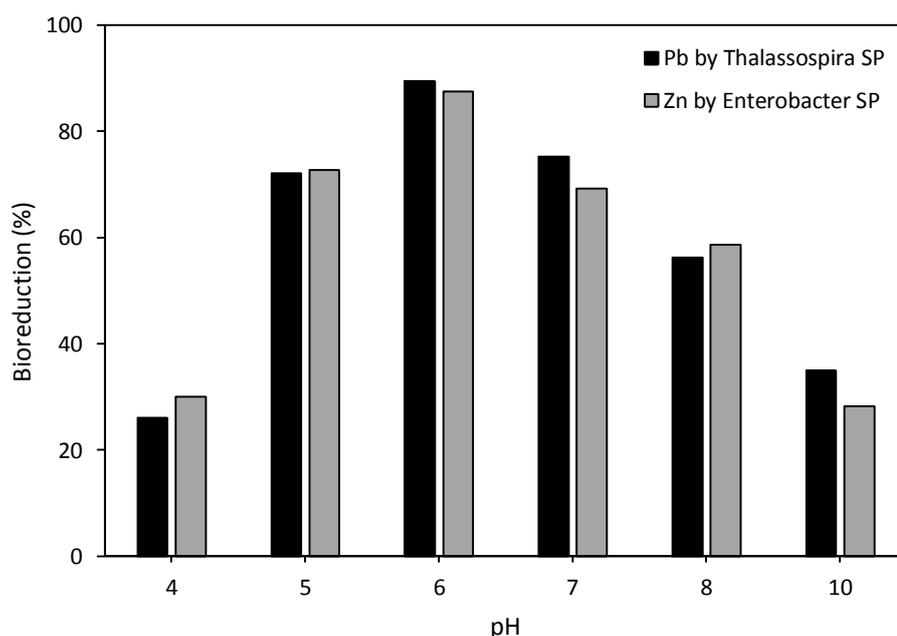
### ۸-۳- پارامترهای موثر بر حذف زیستی

به‌منظور بررسی عوامل مختلف موثر بر فرآیند حذف و بهبود حذف یون‌های سرب و روی توسط باکتری، پارامترهای مختلفی نظیر pH، دما، غلظت‌های مختلف یون‌های سرب و روی، غلظت‌های مختلف باکتری و زمان تماس مورد بررسی قرار گرفتند. انجام مراحل آزمایش‌ها با بهینه کردن مرحله

قبل صورت گرفته است.

### ۳-۸-۱- تعیین pH بهینه

بعد از شناسایی باکتری‌هایی با بیشترین حذف برای سرب و روی به بهینه کردن pH پرداخته شد. مقدار pH محلول مهم‌ترین عامل در حذف بیولوژیکی می‌باشد که در شیمی محلول‌های فلزی و عملکرد گروه‌های باکتریایی موثر است. به‌منظور تعیین pH که باکتری بیشترین میزان حذف را دارد، pH های ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ را با اضافه کردن اسید هیدروکلریک و هیدروکسید سدیم به محلول‌های حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر یون‌های سرب و روی به pH های مورد نظر رسانده شد. بعد از اتوکلاو کردن آنها ۳۰ سی‌سی از محیط کشت آلوده به یون‌های سرب و روی به‌طور جداگانه را در ارلن‌هایی با حجم ۵۰ سی‌سی ریخته شد و به هرکدام ۲ سی‌سی از باکتری مورد نظر اضافه کرده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ دور در دقیقه شیک داده شد بعد از گذشت این زمان pH محلول را به ۳/۵ رسانده شد سپس آن را درون فالكون ریخته و آنها را با دور ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شد بعد از جداسازی باکتری‌ها یون باقیمانده در محلول را با دستگاه جذب اتمی خوانده شد نتایج حاصل از این آزمایش در شکل (۳-۹) آمده است. لازم به ذکر است همه آزمایش‌ها به همین صورت انجام می‌شود و برای هر آزمایش حتما یک شاهد با شرایط مشابه بقیه موارد استفاده می‌شود. تنها اختلاف در عدم وجود زیست‌توده باکتریایی در نمونه شاهد می‌باشد تا اطمینان حاصل شود که در زمان انتقال نمونه‌ها هیچ‌گونه حذفی توسط باکتری‌های دیگر (آلودگی) صورت نمی‌گیرد.

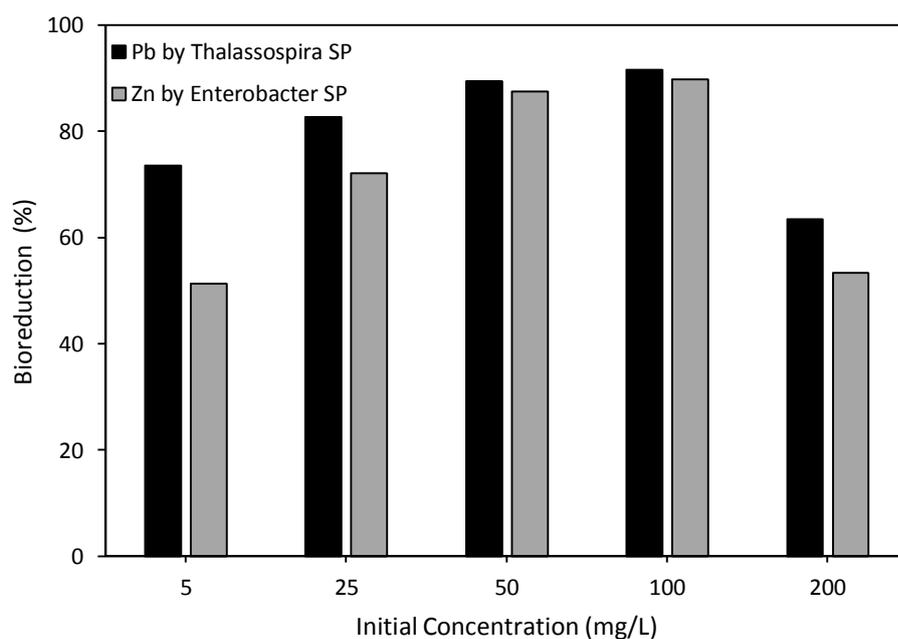


شکل ۳-۹: تاثیر pH بر حذف یون‌های سرب و روی.

نتیجه‌ی بررسی pH محلول بر حذف سرب به‌وسیله‌ی T-SP و حذف روی به‌وسیله‌ی E-SP در شکل (۳-۹) نشان داد که بیشترین میزان حذف در  $pH = 6$  می‌باشد. در pH های قلیایی کاتیون‌های فلزی تشکیل رسوب می‌دهند زیرا غلظت یون هیدروکسید افزایش می‌یابد و فلزات با آنها رسوب می‌دهند بنابراین ممکن است مقدار نادرستی از ظرفیت جذب را نشان دهند و در pH های پایین نیز باکتری فعالیت خود را از دست می‌دهد و باعث متلاشی شدن باکتری‌ها می‌شود [۴۷].

### ۳-۸-۲- تعیین بهینه غلظت آلاینده

برای سنجش غلظت بهینه سرب و روی ۳۰ سی‌سی از غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاوی یون‌های سرب و روی به‌صورت جداگانه داخل ارلن های ۵۰ سی‌سی ریخته و در شرایط آزمایش قبل (زمان واکنش ۷۲ ساعت، غلظت باکتری‌ها ۲ سی‌سی، دور همزنی ۱۶۰ دور بر دقیقه، دما واکنش ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه برابر ۶) این آزمایش انجام داده شد تا مقدار بهینه غلظت یون‌های سرب و روی به دست آید نتایج این آزمایش در شکل (۳-۱۰) آمده است.

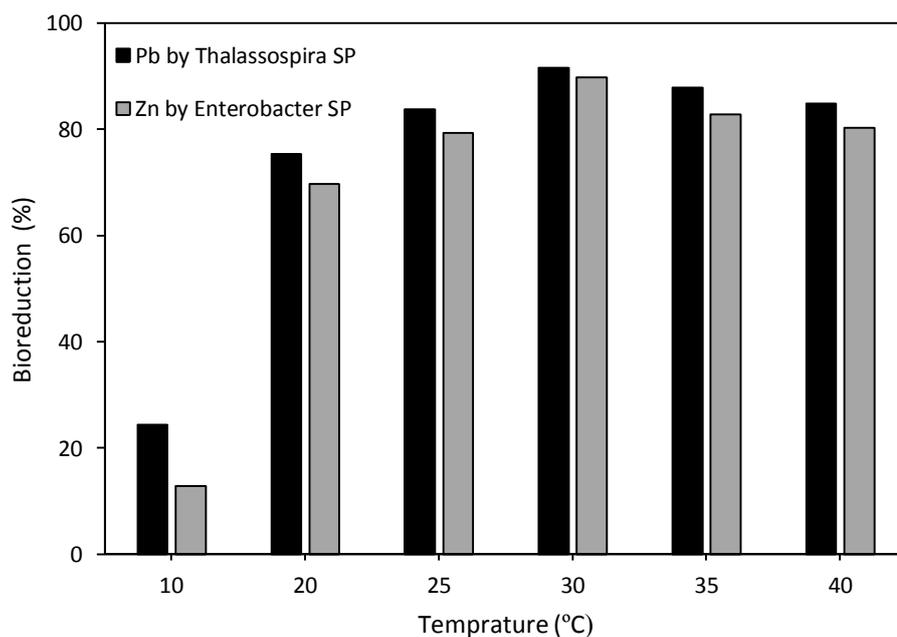


شکل ۳-۱۰: تاثیر غلظت اولیه فلز آلاینده بر حذف یون‌های سرب و روی.

همان‌طور که در شکل (۳-۱۰) مشاهده می‌شود بیشترین حذف یون‌های سرب و روی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است و با کاهش غلظت میزان حذف کاهش می‌یابد. زیرا در غلظت اولیه پایین نسبت مول‌های اولیه از محلول که در دسترس سطح قرار دارند کم می‌باشند. در غلظت‌های بالا جایگاه‌های در دسترس برای اتصال و حذف در محلول بیشترند، بنابراین حذف فلزات وابسته به غلظت اولیه محلول می‌باشد. شناسایی حداکثر پتانسیل اشباع از جاذب بیولوژیکی در هر آزمایش باید بالاترین غلظت اولیه محلول ممکن مرتبط باشد در غلظت‌های بسیار بالا نیز بر اثر سمیت زیاد محلول باکتری‌ها فعالیت خود را از دست می‌دهند. [۲۳].

### ۳-۸-۳- تعیین دمای بهینه

برای آزمایش دمای بهینه اثر دماهای مختلف ۱۰-۴۰ سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با دماهای مورد نظر، pH و غلظت آلاینده بهینه و شرایط آزمایش‌های قبل (زمان ۷۲ ساعت و مقدار غلظت باکتری ۲ سی‌سی) مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در شکل (۳-۱۱) آمده است.

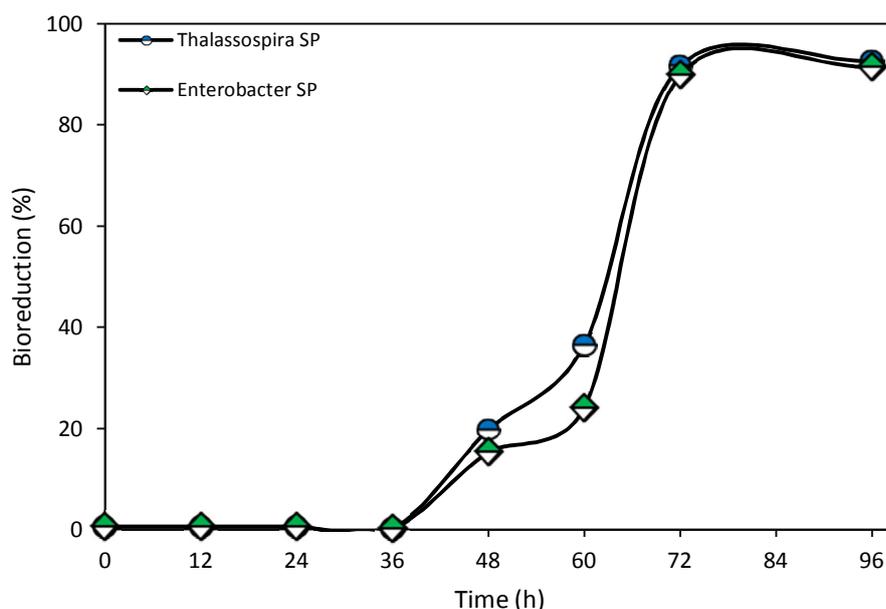


شکل ۳-۱۱: تاثیر دما بر حذف یون‌های سرب و روی.

همان‌طور که در شکل (۳-۱۱) مشاهده می‌شود بیشترین حذف را برای هر دو باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد به نظر می‌رسد دمای حذف بیولوژیکی را در گستره‌ی کمی از دمای ۲۰-۴۰ سانتی‌گراد تحت تاثیر قرار دهد. دمای بالاتر به علت افزایش سطح‌فعال میزان حذف را افزایش می‌دهد، البته آسیب فیزیکی به باکتری در دمای بالاتر قابل پیش‌بینی است. در فرآیندهای حذف با افزایش دما سبب کاهش قدرت حذف بایوژیکی توسط باکتری می‌شود. در دماهای پایین نیز باکتری فعالیت خود را از دست می‌دهد [۴۸].

#### ۳-۸-۴- تعیین زمان بهینه

به‌منظور تعیین زمان بهینه، بررسی در زمان‌های ۰ تا ۹۶ ساعت و با غلظت بهینه یون‌های سرب و روی، pH و دما که در آزمایش قبلی تعیین گردید، انجام گرفت نتایج حاصل از این آزمایش در شکل (۳-۱۲) آمده است.



شکل ۳-۱۲: تعیین زمان بهینه برای حذف یون‌های سرب و روی.

همان‌طور که در شکل (۳-۱۲) نشان داده شده است، حذف یون‌ها به وسیله‌ی باکتری‌ها در چندین ساعت اول فرآیند صورت نگرفته و بعد از گذشت ۴۸ ساعت حذف آلاینده مشاهده می‌شود که همان نقطه بهینه رشد باکتری می‌باشد. در ۷۶ ساعت حذف به نقطه بهینه خود رسیده و با گذشت زمان بیشتر، تغییر محسوسی در میزان و مشاهده نگردید. چنانچه با گذشت زمان همچنان جذب صورت گیرد، نشان‌دهنده‌ی تجمع زیستی فلزات در داخل باکتری خواهد بود از آنجائی که در این مطالعه، فرآیند حذف درون سلولی مدنظر است، بنابراین سرعت حذف در چندین ساعت اول صفر بوده و این به دلیل رشد باکتری‌ها در این زمان است و بعد از ۴۸ ساعت رشد باکتری، باکتری‌ها شروع به حذف آلاینده‌ها کرده‌اند [۲۷].

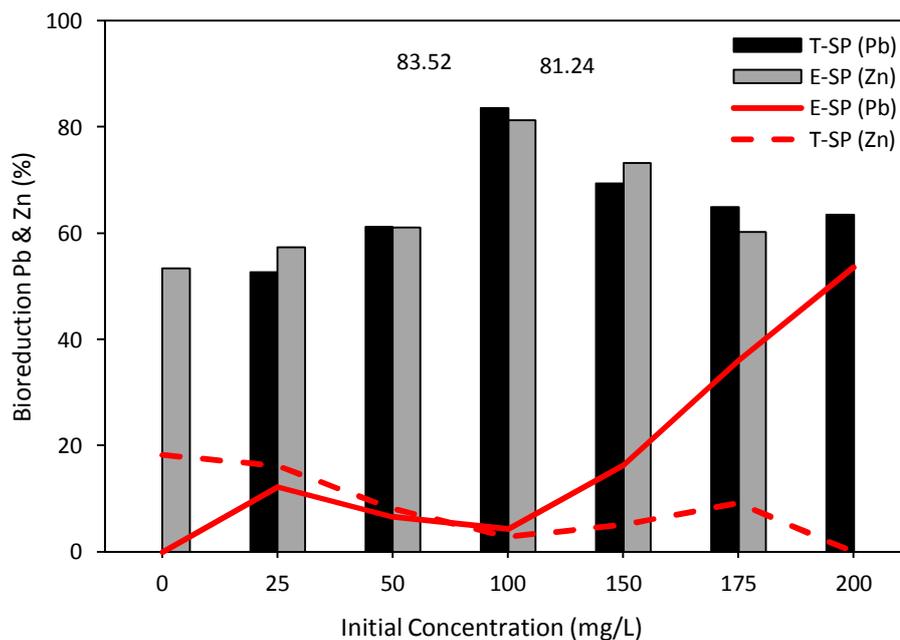
### ۳-۹- تعیین غلظت بهینه یون‌های سرب و روی به صورت دوتایی

برای انجام این آزمایش همه پارامترها در شرایط بهینه قرار دارند که در آزمایش‌های قبل به دست آمدند فقط لازم به ذکر است که آلاینده‌ها به غلظت‌های ترکیبی که در جدول (۳-۲) آمده است در این آزمایش استفاده شد و غلظت باکتری برابر ۲ سی‌سی از هر نوع باکتری به صورت جداگانه وارد محلول شده است که نتایج آن در شکل (۳-۱۳) آمده است.

جدول ۲-۳: غلظت یون‌های استفاده‌شده به صورت ترکیبی.

T-SP			E-SP		
غلظت یون‌ها (میلی گرم بر لیتر)			غلظت یون‌ها (میلی گرم بر لیتر)		
Zn	Pb	ردیف	Zn	Pb	ردیف
۲۰۰	۰	۱	۲۰۰	۰	۱
۱۷۵	۲۵	۲	۱۷۵	۲۵	۲
۱۵۰	۵۰	۳	۱۵۰	۵۰	۳
۱۰۰	۱۰۰	۴	۱۰۰	۱۰۰	۴
۵۰	۱۵۰	۵	۵۰	۱۵۰	۵
۲۵	۱۷۵	۶	۲۵	۱۷۵	۶
۰	۲۰۰	۷	۰	۲۰۰	۷

در جدول (۲-۳) غلظت‌های استفاده‌شده در این آزمایش با استفاده از هر باکتری آورده شده است. لازم به ذکر است که مجموع غلظت‌ها برابر ۲۰۰ می‌باشد.



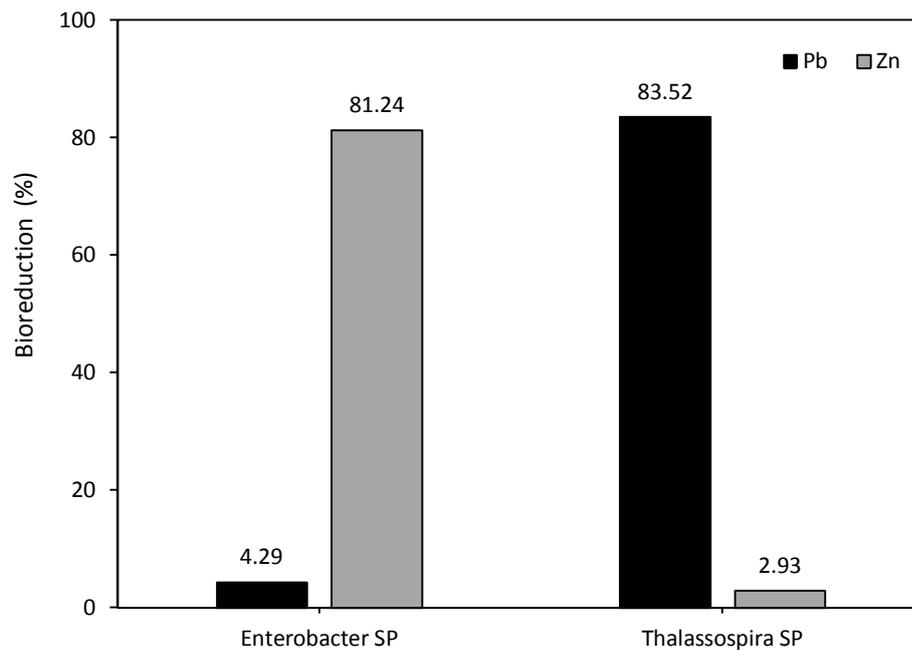
شکل ۳-۱۳: حذف یون‌های سرب و روی به صورت ترکیبی

همان‌طور که در شکل (۳-۱۳) مشاهده می‌شود بیشترین حذف یون‌های سرب و روی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هرکدام از یون‌ها است در حالی که باکتری T-SP برای یون سرب بیشترین حذف برابر ۸۳/۵۲ درصد را دارد در همین نقطه برای یون روی کمترین حذف برابر ۲/۹۳ درصد را دارد و برای باکتری E-SP که بیشترین حذف روی را در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دارد

برابر ۸۱/۲۴ درصد می‌باشد در همین نقطه کمترین حذف سرب برابر ۴/۲۹ درصد مشاهده شد و این نشانگر آن است که باکتری‌های T-SP و E-SP انتخابی عمل کرده، باکتری T-SP تمایل به حذف و مصرف سرب و باکتری E-SP تمایل بیشتری به حذف روی را داشته‌اند [۴۹].

### ۳-۱۰- حذف بیولوژیکی آلاینده‌ها به صورت ترکیب دو آلاینده

برای انجام این آزمایش همه پارامترها در شرایط بهینه قرار دارند که در آزمایش‌های قبل به دست آمدند فقط لازم به ذکر است که آلاینده‌ها به صورت ترکیبی به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر یون و مقدار ۲ سی‌سی از هر نوع باکتری به صورت جداگانه وارد محلول شده است که نتایج آن در شکل (۳-۱۴) آمده است.



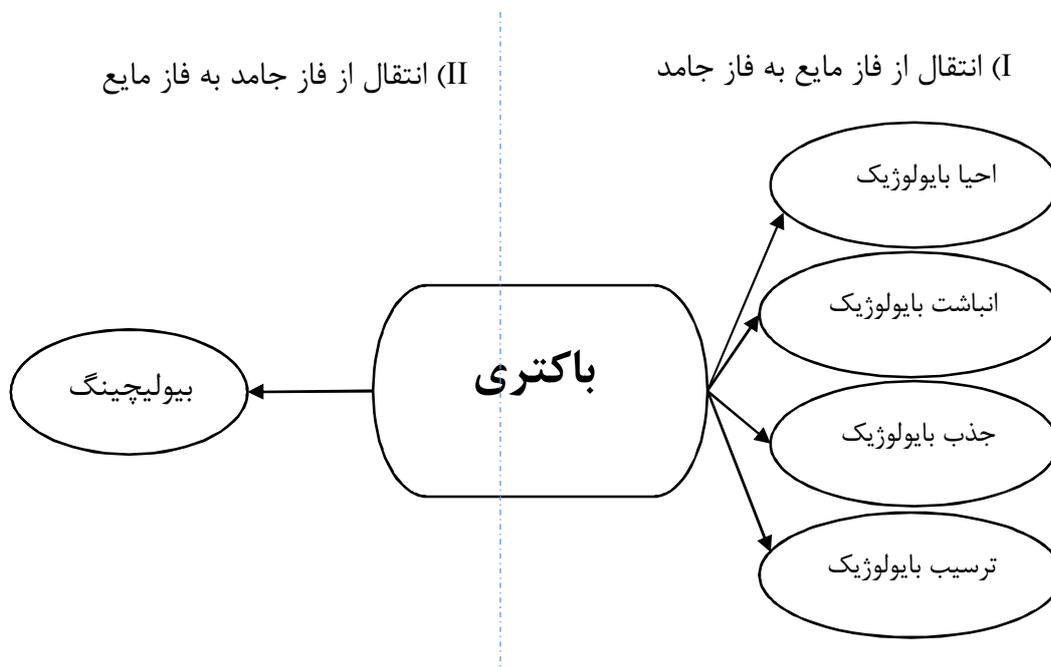
شکل ۳-۱۴: حذف یون‌های سرب و روی به صورت ترکیبی در محلول

در شکل (۳-۱۴) مقدار حذف یون‌های سرب و روی به صورت ترکیبی و با استفاده از هر دو باکتری T-SP و E-SP به صورت جداگانه در ارلن‌های متفاوت انجام شد نتایج حاکی از آن بود که باکتری T-SP، ۸۳/۵۲ درصد از یون سرب و ۲/۹۳ درصد از یون روی، باکتری E-SP، ۸۱/۲۴ درصد از یون روی و ۴/۲۹ درصد از یون سرب را از محیط حذف کردند. این رفتار نشانگر آن است که باکتری-

های T-SP و E-SP به صورت انتخابی عمل کرده و یونی را که به آن مقاومت و سازگاری بیشتری را داشته‌اند حذف کرده‌اند.

### ۳-۱۱- مکانیسم حاکم بر فرآیند

به طور کلی مکانیسم حاکم بر فصل مشترک یک باکتری و یک یون فلزی در فاز آبی می‌تواند به دو صورت باشد. مکانیسم اول عبارت است از رهاسازی عنصر از فاز جامد به فاز مایع در اثر حضور باکتری در محیطی که فاز به صورت جامد قرار دارد این نوع از مکانیسم رهاسازی، جداسازی و یا انحلال (Mobilization) نامیده می‌شود. مکانیسم دوم در جهت عکس مکانیسم اول انجام می‌شود و عبارت است از خروج یون فلزی از فاز مایع به فاز جامد در اثر حضور باکتری در محیطی که فلز به صورت یون محلول در آن قرار دارد. این نوع مکانیسم احیا، ترسیب، جذب، جذب سطحی یا انباشت (IMMobilization) نامیده می‌شود. در شکل (۳-۱۵) به صورت شماتیکی رویدادهایی که در فصل مشترک یک یون و یک باکتری رخ می‌دهد نشان داده شده است.



شکل ۳-۱۵: مکانیسم حاکم بر فصل مشترک یک باکتری و یک عنصر فلزی در فازهای جامد یا مایع

نمونه بارز مکانیسم (I) همان بیولیچینگ است؛ یعنی رهاسازی یون‌های فلزی توسط باکتری از

ماده معدنی به داخل فاز محلول. با توجه به موضوع این تحقیق مکانیسم (II) یعنی انتقال از فاز مایع به فاز جامد مورد بحث است. فرآیندهای که در مکانیسم (II) رخ می‌دهد عبارتند از: احیا بیولوژیک<sup>۱</sup>، انباشت بیولوژیک<sup>۲</sup>، جذب بیولوژیک<sup>۳</sup> و ترسیب بیولوژیک<sup>۴</sup> [۵۰].

احیا بیولوژیک عبارت است از خروج فلز از فاز محلول به فاز غیر محلول که این نوع از احیا باعث می‌شود که یون محلول در سطح باکتری و یا در داخل باکتری به جامد فلزی (در اثر جذب الکترون) تبدیل شود. عناصری مانند طلا، نقره، پالادیم، سلنیم، تلوریم و اورانیوم و ... در چنین فرآیندی می‌تواند احیاشده و از فاز محلول خارج می‌شود [۵۰].

ترسیب بیولوژیک عبارت است از واکنش میان یون‌های محلول فلزی با ساختار فسفاتی یا کربن آلی موجود در درون باکتری و تشکیل رسوباتی مانند فسفات، کربنات و یا سولفید فلزی نامحلول. عناصری مانند کلسیم، کادمیوم، روی، استرانسیوم و اورانیوم در حین فرآیند می‌توانند در واکنش ترسیب شرکت کرده و به صورت بیولوژیک رسوب کرده و از فاز آبی خارج شوند [۵۰]. جذب بیولوژیک عبارت است از جذب شیمیایی، فیزیکی، شیمی فیزیکی یا جذب سطحی یون محلول بر سطح باکتری در اثر برقراری پیوندهای شیمیایی با عامل‌های مانند  $\text{OH}$ ،  $\text{COOH}$ ،  $\text{HPO}_4^{-2}$  و  $\text{NH}_2$  یا پیوندهای فیزیکی در خلل و فرج میان توده باکتری‌ها و یا ترکیبی از دو حالت. این نوع از فرآیند به طور کامل در سطح باکتری رخ می‌دهد. عناصری مانند نقره، طلا و اورانیوم و نقره و غیره. در اثر چنین فرآیندی می‌تواند از فاز محلول خارج شوند [۵۰].

انباشت بیولوژیک عبارتست از عبور یون محلول از غشاهای سطحی باکتری و گیر افتادن آن در داخل باکتری. در واقع در انباشت بیولوژیک یون محلول از فاز آبی خارج شده به درون باکتری نفوذ کرده و درون باکتری به صورت محلول انباشته شده و تجمع می‌یابد. عناصری مانند اورانیوم و

---

<sup>1</sup> Bioreduction

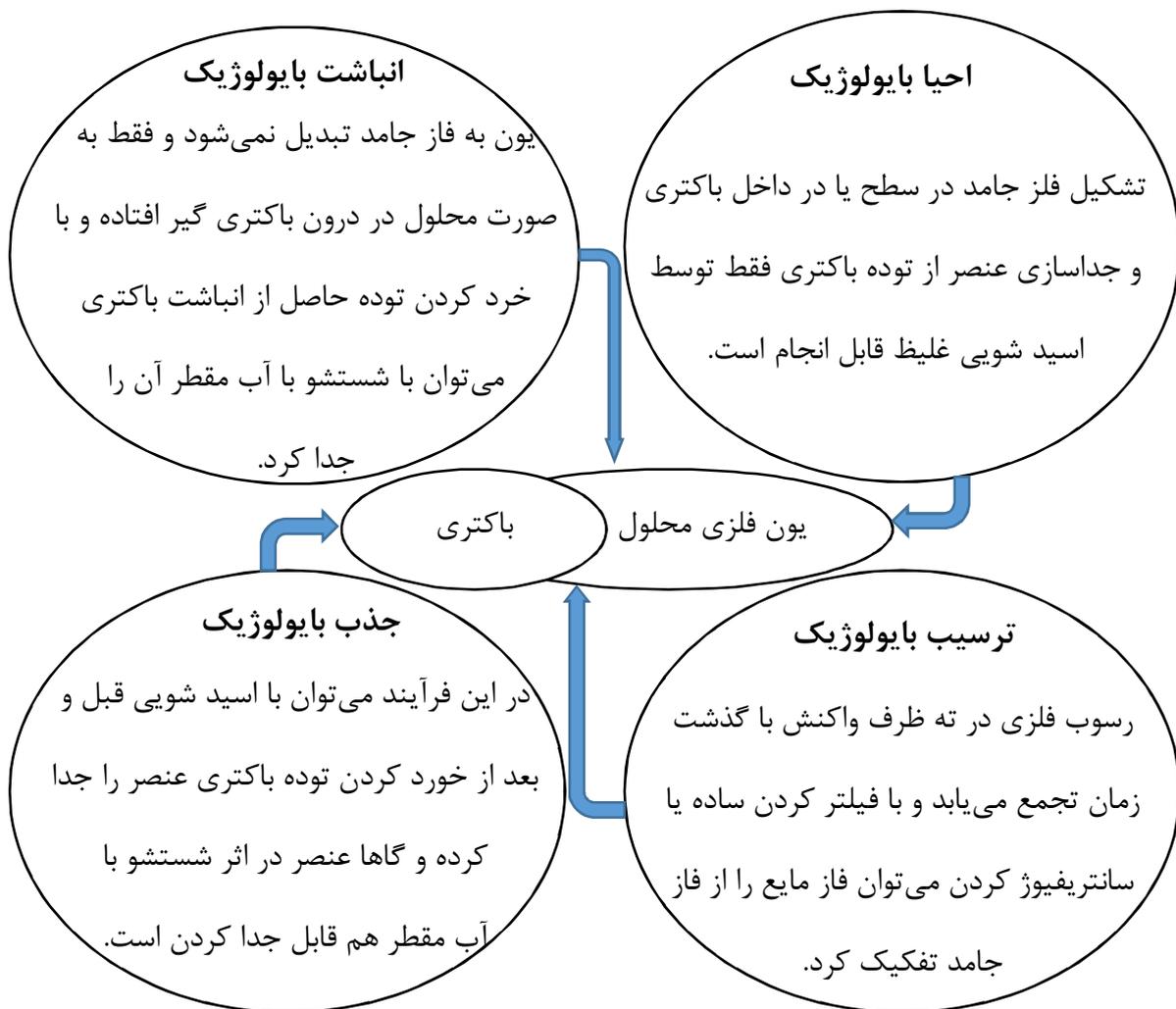
<sup>2</sup> Bioaccumulation

<sup>3</sup> Biosorption

<sup>4</sup> Bioprecipitation

استرانسیوم و غیره می‌توانند در اثر فرآیند انباشت بیولوژیک از فاز آبی خارج شوند [۵۰].

تفاوت‌ها و شباهت‌هایی میان چهار فرآیند انباشت بیولوژیک، احیا بیولوژیک، ترسیب بیولوژیک و جذب بیولوژیک وجود دارد. در شکل (۳-۱۶) ویژگی‌های مربوط به هر فرآیند به صورت شماتیکی آورده شده است.

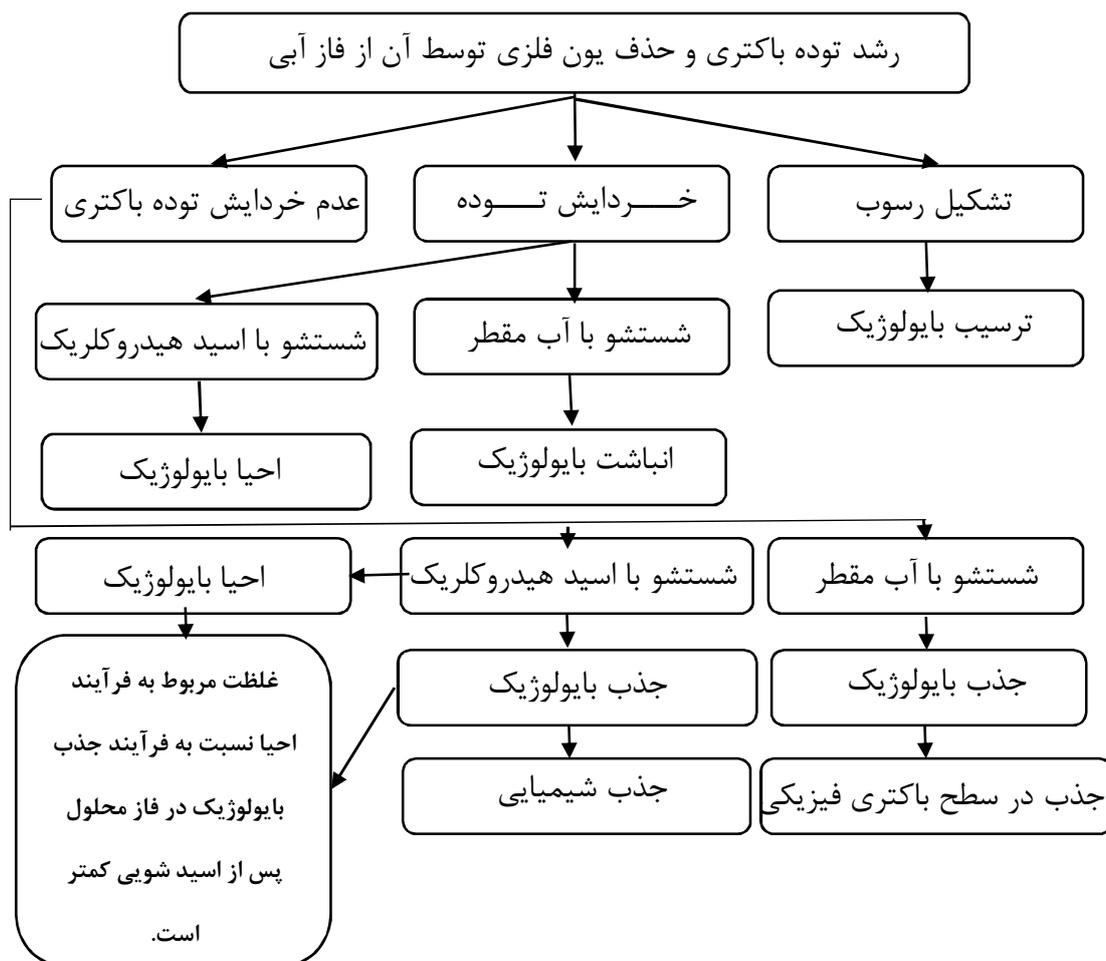


شکل ۳-۱۶: ویژگی‌های مربوط به فرآیندهای خروج فلز از فاز مایع و پاک‌سازی آلودگی.

با توجه به شکل (۳-۱۶) می‌توان ویژگی‌های هر فرآیند، نوع فرآیند و مکانیسمی که توسط آن یون از فاز آبی خارج شده را تعیین کرد. در صورتی که توده باکتری بدون هیچ‌گونه خردایش توسط آب

مقطر شسته شود و یون از توده باکتری دوباره به فاز محلول برگردد، مکانیسم به صورت جذب بیولوژیک می تواند باشد. اگر همراه با خردایش بتوان به کمک آب مقطر یون را به فاز محلول برگرداند، مکانیسم فرآیند از نوع انباشت بیولوژیک است. در صورتی که در ظرف واکنش رسوب جمع شود فرآیند از نوع ترسیب بیولوژیک است.

اگر بدون اینکه توده باکتری خرد شده و اسید شویی شود و فلز به فاز محلول برگردد، فرآیند می تواند از نوع احیا بیولوژیک یا جذب بیولوژیک باشد و معیاری که می توان تعیین کرد که آیا احیا بیولوژیک رخ داده یا جذب بیولوژیک، این است که در احیا بیولوژیک غلظت یون پس از اسید شویی بدون خردایش باکتری غلظت یون فلزی در فاز محلول بسیار کمتر از غلظت آن نسبت به حالت جذب بیولوژیک است. این مسئله به گیر افتادن بخش زیادی از فلز به صورت جامد و در درون باکتری برمی گردد. پس می توان توسط فلوچارت شکل (۳-۱۷) نوع مکانیسم بین یون و باکتری را تعیین کرد.



شکل ۳-۱۷: فلوجارت مکانیسم فرآیند

در این تحقیق بررسی‌های اولیه (بر اساس شکل ۳-۱۷)) نشان می‌دهد که مکانیسم حاکم بر فرآیند حذف یون‌های سرب و روی از پساب آلوده به این عناصر از نوع ترسیب بیولوژیک و انباشت بیولوژیک نمی‌باشد. بررسی‌های ثانویه نشان می‌دهد که مکانیسم جذب به صورت تلفیقی از دو فرآیند جذب بیولوژیک و احیا بیولوژیک برای هر دو باکتری می‌باشد؛ اما فرآیند احیا بیولوژیک به شکل غالب‌تری نسبت به جذب بیولوژیک توسط هر دو باکتری انجام‌شده و فرآیند حذف یون‌ها را از فاز محلول کنترل می‌کند.

## فصل چهارم

### نتیجه‌گیری و پیشنهادها

#### ۴-۱- مقدمه

در این تحقیق سعی شده است قابلیت حذف یون‌های فلزی سنگین سرب و روی به روش حذف بیولوژیکی بررسی شود. با توجه به اینکه هدف، مطالعات شناخت بهتر فرآیند و عوامل موثر بر آن و امکان بهینه‌سازی فرآیند بود، از این رو برای رسیدن به این هدف تهیه نمونه‌هایی از پساب خاک معدن زغالسنگ دهملا و معدن بوکسیت جاجرم، کشت باکتری در محیط کشت جامد و مایع، آلوده کردن محیط کشت، کشت باکتری در محیط آلوده پرداخته شده است که در ادامه به برخی نتایج حاصل از تحقیق پرداخته شده است.

#### ۴-۲- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل زیر از انجام آزمایش‌ها بر روی نمک‌های نیترات سرب و کلرید روی بدست آمده است:

۱- نتایج اولیه بر روی باکتری‌های جداسازی شده از پساب خاک معدن زغالسنگ دهملا و بوکسیت جاجرم نشان داد که باکتری‌های تالاسوسپیرا اس پی و اینتروباکت اس پی بیشترین حذف یون‌های سرب و روی را به ترتیب برابر ۷۵/۲۶ و ۶۹/۲۸ درصد داشته‌اند.

۲- بررسی و شناسایی پارامترهای مختلف امری ضروری است. با شناسایی این عوامل پارامترهای pH، غلظت اولیه آلاینده، دما و زمان به صورت تکی و غلظت آلاینده به صورت دوتایی مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

۳- نتایج بدست آمده از شکل (۳-۹) نشان می‌دهد در pH=۶ (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۷۲ ساعت، دور همزنی ۱۶۰ دور در دقیقه، غلظت اولیه آلاینده ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت هر نوع باکتری ۲ سی‌سی) بیشترین حذف یون‌های سرب و روی توسط باکتری-های تالاسوسپیرا اس پی و اینتروباکت اس پی به ترتیب برابر ۸۹/۴۴ و ۸۷/۵۴ درصد می‌باشد.

۴- مشاهدات بدست آمده از شکل (۳-۱۰) نشان می‌دهد غلظت اولیه آلاینده برابر ۱۰۰ میلی-

گرم بر لیتر (pH=۶) دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۷۲ ساعت، دور همزنی ۱۶۰ دور در دقیقه، و غلظت هر نوع باکتری ۲ سی‌سی) بیشترین حذف یون‌های سرب و روی به ترتیب برابر ۹۱/۶ و ۸۹/۸۵ درصد می‌باشد.

۵- شکل (۳-۱۱) نشان می‌دهد دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (pH=۶)، غلظت اولیه آلاینده ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، زمان ۷۲ ساعت، دور همزنی ۱۶۰ دور در دقیقه، و غلظت هر نوع باکتری ۲ سی‌سی) بیشترین حذف یون‌های سرب و روی را در بین دماهای دیگر داشته و به ترتیب برابر ۹۱/۶ و ۸۹/۸۵ درصد می‌باشد.

۶- نتایج حاصل از شکل (۳-۱۲) نشان می‌دهد در زمان ۹۶ ساعت (pH=۶)، غلظت اولیه آلاینده ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، دور همزنی ۱۶۰ دور در دقیقه، و غلظت هر نوع باکتری ۲ سی‌سی) در مقایسه با زمان ۷۲ ساعت تنها ۱ درصد افزایش درصد حذف را خواهیم داشت که با توجه به تغییر ناچیز این درصد تصمیم گرفته شد زمان ۷۲ ساعت به عنوان زمان بهینه در نظر گرفته شود.

۷- نتایج بدست آمده از شکل (۳-۱۳) نشان می‌دهد زمانی که یون‌های فلزی سرب و روی به صورت دوتایی در محلول حضور داشته باشند باکتری‌های انتخاب شده (باکتری تالاسوسپیرا اس و باکتری اینتروباکت اس) انتخابی عمل می‌کنند و در حضور باکتری مناسب یون دوم تاثیر ناچیزی بر جذب یون اول می‌گذارد که این نشان دهنده انتخاب باکتری‌های مناسب برای حذف یون‌های فلزی سنگین می‌باشد.

۸- نتایج حاصل از بررسی مکانیسم فرآیند بخش (۳-۱۱) نشان می‌دهد که هر دو باکتری از طریق فرآیند احیای بیولوژیک و به صورت انتخابی قادر به حذف یون‌های سرب و روی می‌باشد.

۱۰- بهینه‌سازی بدین مفهوم بود که مقدار عوامل در چه مقادیری تنظیم شود تا پاسخ آزمایش‌ها مطلوب‌تر شوند. مطلوبیت نتایج در این تحقیق به بیشینه کردن درصد حذف

یون‌های فلزی سنگین سرب و روی می‌باشد. بنابراین نتایج حاکی از آن است که در شرایط pH=۶، غلظت آلاینده ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت همزنی ۱۶۰ دور بر دقیقه، و در زمان ۷۲ ساعت بیشترین حذف یون‌های فلزی سنگین سرب و روی به ترتیب برابر با ۹۱/۶ و ۸۹/۸۵ درصد می‌باشند.

#### ۳-۴- پیشنهادها

- نکات زیر به عنوان پیشنهاد در تکمیل و بهینه‌سازی در فرآیند احیای بیولوژیک ارائه شده‌اند:
- ۱- افزایش میزان حذف یون‌های فلزی سنگین سرب و روی به وسیله باکتری مورد نظر از طریق تغییرات شیمیایی یا ژنتیکی مورد مطالعه قرار گیرد.
  - ۲- بررسی توانایی باکتری‌های مورد استفاده در حذف سایر آلاینده‌ها از جمله آلاینده‌های نفتی، رنگ، پساب بیمارستان‌ها و غیره.
  - ۳- مطالعه قابلیت حذف سایر گونه‌های فلزی سنگین توسط باکتری مورد مطالعه.
  - ۴- بررسی توانایی باکتری‌های مورد استفاده در حذف رنگ‌زها.
  - ۵- مدلسازی ریاضی واکنش‌های انجام شده و همچنین بررسی ایزوترم‌های تعادلی جذب، ترمودینامیک و سینتیک.

- [1] Wongsasuluk, P., Chotpantarat, S., Siriwong, W., & Robson, M. (2014). Heavy metal contamination and human health risk assessment in drinking water from shallow groundwater wells in an agricultural area in Ubon Ratchathani province, Thailand. *Environmental geochemistry and health*, 36(1), 169-182.
- [2] Ghosh, A., Mukherjee, K., Ghosh, S. K., & Saha, B. (2013). Sources and toxicity of fluoride in the environment. *Research on Chemical Intermediates*, 39(7), 2881-2915.
- [3] Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- [4] Shallan, A. I., Smejkal, P., Corban, M., Guijt, R. M., & Breadmore, M. C. (2014). Cost-effective three-dimensional printing of visibly transparent microchips within minutes. *Analytical chemistry*, 86(6), 3124-3130.
- [5] Tehrani, G. M. (2012). Evaluation of risk caused by wastewater discharges from the Petrochemical Special Economic Zone (PETZONE) to the Musa Bay (Persian Gulf-Iran) (Doctoral dissertation, University of Malaya).
- [6] Zhongming, Z., Wangqiang, Z., & Wei, L. (2017). Department of Biotechnology, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan.
- [7] Mudgal, V., Madaan, N., Mudgal, A., Singh, R. B., & Mishra, S. (2010). Effect of toxic metals on human health. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3(1), 94-99.
- [8] Gaur, N., Flora, G., Yadav, M., & Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(2), 180-193.
- [9] Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87.
- [10] Azizullah, A., Khattak, M. N. K., Richter, P., & Häder, D. P. (2011). Water pollution in Pakistan and its impact on public health—a review. *Environment*

- international, 37(2), 479-497.
- [11] Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.
- [12] Izatt, R. M., Izatt, S. R., Bruening, R. L., Izatt, N. E., & Moyer, B. A. (2014). Challenges to achievement of metal sustainability in our high-tech society. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2451-2475.
- [13] Alluri, H. K., Ronda, S. R., Settalluri, V. S., Bondili, J. S., Suryanarayana, V., & Venkateshwar, P. (2007). Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *African Journal of Biotechnology*, 6(25).
- [14] Rao, M. M., Ramesh, A., Rao, G. P. C., & Seshaiiah, K. (2006). Removal of copper and cadmium from the aqueous solutions by activated carbon derived from *Ceiba pentandra* hulls. *Journal of hazardous materials*, 129(1-3), 123-129.
- [15] Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of environmental management*, 92(3), 407-418.
- [16] Parmar, B., Rachuri, Y., Bisht, K. K., Laiya, R., & Suresh, E. (2017). Mechanochemical and conventional synthesis of Zn (II)/Cd (II) luminescent coordination polymers: Dual sensing probe for selective detection of chromate anions and TNP in aqueous phase. *Inorganic chemistry*, 56(5), 2627-2638.
- [17] Weerasundara, L., Amarasekara, R. W. K., Magana-Arachchi, D. N., Ziyath, A. M., Karunaratne, D. G. G. P., Goonetilleke, A., & Vithanage, M. (2017). Microorganisms and heavy metals associated with atmospheric deposition in a congested urban environment of a developing country: Sri Lanka. *Science of the Total Environment*, 584, 803-812.
- [18] Kurniawan, T. A., Chan, G. Y., Lo, W. H., & Babel, S. (2006). Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chemical engineering journal*, 118(1-2), 83-98.
- [19] Pöschl, U. (2005). Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(46), 7520-7540.

- [20] Gullinkala, T., Digman, B., Gorey, C., Hausman, R., & Escobar, I. C. (2010). Desalination: Reverse osmosis and membrane distillation. *Sustainability Science and Engineering*, 2, 65-93.
- [21] Kang, S. M., Rethinasabapathy, M., Hwang, S. K., Lee, G. W., Jang, S. C., Kwak, C. H., ... & Huh, Y. S. (2018). Microfluidic generation of Prussian blue-laden magnetic micro-adsorbents for cesium removal. *Chemical Engineering Journal*, 341, 218-226.
- [22] Shannon, M. A., Bohn, P. W., Elimelech, M., Georgiadis, J. G., Marinas, B. J., & Mayes, A. M. (2010). Science and technology for water purification in the coming decades. In *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals* (pp. 337-346).
- [23] Vijayaraghavan, K., & Yun, Y. S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, 26(3), 266-291.
- [24] Sud, D., Mahajan, G., & Kaur, M. P. (2008). Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions—A review. *Bioresource technology*, 99(14), 6017-6027.
- [25] Gavrilescu, M. (2004). Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences*, 4(3), 219-232.
- [26] Chen, L. F., Liang, H. W., Lu, Y., Cui, C. H., & Yu, S. H. (2011). Synthesis of an attapulgite clay@ carbon nanocomposite adsorbent by a hydrothermal carbonization process and their application in the removal of toxic metal ions from water. *Langmuir*, 27(14), 8998-9004.
- [27] Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 427-451.
- [28] Barmettler, F., Castelberg, C., Fabbri, C., & Brandl, H. (2016). Microbial mobilization of rare earth elements (REE) from mineral solids—A mini review. *AIMS Microbiology*, 2(2), 190-204. [29] B. Volesky, *Biosorbents for metal recovery I R* ,, - I, 5 (1987).
- [30] Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., & Vega, M. (2003). Biosorption of

- cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 376(1), 26-32.
- [31] Rabbani, M., Ghafourian, H., Sadeghi, S., & Nazeri, Y. (2005, February). Biosorption of chromium (III) by new bacterial strain (NRC-BT-2). In *International Congress Series* (Vol. 1276, pp. 268-269). Elsevier.
- [32] Hu, Q., Qi, H., Bai, Z., Dou, M., Zeng, J., Zhang, F., & Zhang, H. (2007). Biosorption of cadmium by a Cd<sup>2+</sup>-hyperresistant *Bacillus cereus* strain HQ-1 newly isolated from a lead and zinc mine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(7), 971-976.
- [33] Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., & Thamaraiselvi, K. (2007). Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of hazardous materials*, 146(1-2), 270-277.
- [34] Özdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., & Güven, K. (2009). Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub. sp. *decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* sub. sp. *stromboliensis*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 152(1), 195-206.
- [35] Rani, M. J., Hemambika, B., Hemapriya, J., & Kannan, V. R. (2010). Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: a biosorption approach. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 4(2).
- [36] B. Metali, C.I. Kich, W.P. *Pseudomonas*. (2010), *Heavy Metals Biosorption from Aqueous Solution*, 4, 1–5.
- [37] Fečko, P., Zechner, V., Guziurek, M., Lyčková, B., & Pertile, E. (2012). The Possibilities of Application of Bacterial Leaching in Retrieval of Valuable Metals From Mining Waste. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 11(2), 147-152.
- [38] Zhu, J. Y., Zhang, J. X., Qian, L. I., Tao, H. A. N., Hu, Y. H., Liu, X. D., ... & Qiu, G. Z. (2014). Bioleaching of heavy metals from contaminated alkaline sediment by auto-and heterotrophic bacteria in stirred tank reactor. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 24(9), 2969-2975.

- [39] Reed, D. W., Fujita, Y., Daubaras, D. L., Jiao, Y., & Thompson, V. S. (2016). Bioleaching of rare earth elements from waste phosphors and cracking catalysts. *Hydrometallurgy*, 166, 34-40.
- [40] Ma, L., Wang, X., Feng, X., Liang, Y., Xiao, Y., Hao, X., ... & Liu, X. (2017). Co-culture microorganisms with different initial proportions reveal the mechanism of chalcopyrite bioleaching coupling with microbial community succession. *Bioresource technology*, 223, 121-130.
- [41] Favara, P., & Gamlin, J. (2017). Utilization of waste materials, non-refined materials, and renewable energy in in situ remediation and their sustainability benefits. *Journal of environmental management*, 204, 730-737.
- [42] González, I., Vázquez, M. A., Romero-Baena, A. J., & Barba-Brioso, C. (2017). Stabilization of fly ash using cementing bacteria. Assessment of cementation and trace element mobilization. *Journal of hazardous materials*, 321, 316-325.
- [43] Ye, M., Yan, P., Sun, S., Han, D., Xiao, X., Zheng, L., ... & Zhuang, S. (2017). Bioleaching combined brine leaching of heavy metals from lead-zinc mine tailings: transformations during the leaching process. *Chemosphere*, 168, 1115-1125.
- [44] Liu, Z., Li, L., Li, Z., & Tian, X. (2018). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate-reducing bacteria in an expanded granular sludge bed reactor. *Environmental technology*, 39(14), 1814-1822.
- [45] Falagán, C., Grail, B. M., & Johnson, D. B. (2017). New approaches for extracting and recovering metals from mine tailings. *Minerals Engineering*, 106, 71-78.
- [46] Yilmaz, E. I. (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in Microbiology*, 154(6), 409-415.
- [47] Choi, J., Lee, J. Y., & Yang, J. S. (2009). Biosorption of heavy metals and uranium by starfish and *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials*, 161(1), 157-162.
- [48] Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their

future. *Biotechnology advances*, 27(2), 195-226.

- [49] Mollah, M. Y., Morkovsky, P., Gomes, J. A., Kesmez, M., Parga, J., & Cocke, D. L. (2004). Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation. *Journal of hazardous materials*, 114(1-3), 199-210.
- [50] Nancharaiah, Y. V., Mohan, S. V., & Lens, P. N. L. (2016). Biological and bioelectrochemical recovery of critical and scarce metals. *Trends in biotechnology*, 34(2), 137-155.

## **Abstract**

The most important minerals and toxic contaminants are heavy metal ions of lead and zinc, which have been introduced into the environment due to the introduction of mineral activity, resulting in severe poisoning in humans and other living organisms. In this research, examples of contaminated soils of coal mine (Dehmola) and bauxite mine (Jajarm) have been prepared. In the next step, the bacterial species found in these soils were identified and cultured. The results show that there are 7 types of aerobic bacteria including *Microbacterium* SP, *Planomicrobium* SP, *Thalassospira* SP, *Halomonas* SP, *Enterobacter* SP, *Brevndimonas aurantiaca* and *Micrococcaceae* bacterium in these soils. Therefore, the potential of these 7 bacteria was investigated to remove heavy metal ions from wastewater in single and double systems. The initial results indicate that lead and zinc ions are eliminated by *Thalassospira* SP and *Enterobacter* SP bacteria, respectively. Optimization of operating parameters including pH, initial concentration of contaminant, reaction time and temperature had done, and results showed that in the single system of lead and zinc elements at pH = 6, the initial concentration of the pollutant = 100 mg / l, the concentration of bacteria = 2 cc, time = 72 hours and temperature = 30 °C has a removal efficiency of 91.6 and 89.85%. The results in the binary system shows that the bacteria act selectively, and the *Thalassospira* SP bacterium only absorbs lead ion and *Enterobacter* SP bacteria only absorbs zinc ion, and in the presence of a suitable bacterium, second ion has little effect on the absorption of the first ion. The results of the mechanism of the process show that both bacteria can remove lead and zinc ions through a biologically and selective regenerative process.

**Keywords:** Lead and Zinc Ions, *Thalassospira* SP and *Enterobacter* SP, Biologic Regeneration, Single and Double System



**Shahrood University of Technology**

**Faculty of Mining, Petroleum & Geophysics Engineering**

**MSc Thesis Mineral processing of Engineering**

**Metal biological extraction by sin-genetic bacteria  
available in the mining soil with emphasis on the governing  
mechanism**

By:

Amir Eyvazkhani

Supervisor:

Dr. Kumars Seifpanahi-Shabani

Dr. Mohammad Jahani-Chegheni

Advisor:

Dr. Parviz Heidari

Dr. Amin Ebrahimi

January 2019