

محور مقاله: آلودگی زیست‌بوم، سلامت انسان و زیست‌پالایی خاک

حذف سرب از محلول آلوده با روش رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم

ریحانه شوکتی مرزدشتی^۱، نسرين قربان‌زاده^{۲*}، محمد باقر فرهنگی^۳^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان^۲ و ^۳ استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی حذف سرب از محلول‌های آلوده به روش رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم از مسیر هیدرولیز اوره با باکتری اسپورسارسینا پاستوری انجام شد. کمترین غلظت بازدارنده سرب که توانست از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند، غلظت ۱ میلی‌مولار بود که از طریق شمارش کلنی بر روی پلیت پس از گذشت ۴۸ ساعت به دست آمد. جذب نوری در همه محیط‌های دارای غلظت‌های مختلف سرب نسبت به شاهد (غلظت صفر) کمتر بود و پس از ۲۴ ساعت به مقدار ثابتی رسید. حذف سرب از محلول آلوده با فرایند رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم در چهار غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ میلی‌مولار سرب به ترتیب ۹۹/۴۶، ۹۹/۶۱، ۹۴/۷۳ و ۹۲/۵۱ درصد بود. مقدار pH محلول نیز پس از گذشت ۴۸ ساعت در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار سرب نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. فرایند معدنی شدن زیستی می‌تواند در حذف فلزهای سنگین از پساب‌های آلوده مفید باشد.

کلمات کلیدی: اوره‌آز، اسپورسارسینا پاستوری، معدنی‌شدن زیستی، کلسیت

مقدمه

افزایش روزافزون جمعیت، نیاز به مصرف انرژی را بالا برده است و در نتیجه به واسطه فعالیت‌های انسان برای تامین انرژی، آلودگی‌های زیست محیطی نیز رو به افزایش است. فعالیت‌های صنعتی متعددی مانند فلزکاری، گالوانیزه کردن، استخراج و پردازش مواد معدنی، تولید باتری، تولید کاغذ و ساخت آفت‌کش‌ها سبب تولید انواع آلاینده‌ها می‌شوند (Fu و همکاران ۲۰۱۱). به‌طور کلی آلاینده‌ها به دو دسته معدنی و آلی تقسیم می‌شوند. آلاینده‌های معدنی به دلیل غیرقابل تجزیه بودن و پیامدهای زیان‌بار فیزیولوژیکی آن‌ها بر جانداران در غلظت‌های کم نیز دارای اهمیت ویژه هستند (Guimaraes و همکاران ۲۰۱۰). این آلاینده‌ها که شامل فلزهای سمی مانند مس، کروم، کادمیم، جیوه، سرب، کبالت، روی و غیره می‌باشند، از جمله عوامل ایجاد اختلال در زیست‌بوم به شمار می‌آیند. سرب یک فلز سمی است که به سبب آبیاری با آب آلوده، استفاده از آفت‌کش‌ها، فعالیت معادن و غیره، موجب آلودگی آب و خاک و به خطر انداختن سلامت انسان می‌شود. روش‌های زیستی متفاوتی نیز برای رفع آلودگی وجود دارد که دوست‌دار محیط زیست بوده و مزایای بیشتری را نیز نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی دارا می‌باشند. معدنی‌شدن زیستی یکی از این روش‌ها است. در این فرایند، ریزجانداران کانی‌هایی را تولید می‌کنند که در محیط رسوب می‌کند. از میان تمام کانی‌هایی که به روش معدنی شدن زیستی ایجاد می‌شوند، کربنات‌ها مهم‌ترین هستند. رسوب کربنات کلسیم تحریک شده میکروبی (MICCP) به عنوان شاخه‌ای از معدنی‌شدن زیستی است که بر مبنای هیدرولیز میکروبی اوره و توسط باکتری‌های هتروتروف تولید کننده آنزیم اوره‌آز^۳ انجام می‌شود (Mahanty و همکاران ۲۰۱۳). در فرایند هیدرولیز میکروبی اوره دو فرآورده آمونیاک و اسید کربنیک تولید می‌شود که در محیط آب، اسید کربنیک به بی‌کربنات و آمونیاک به آمونیم و یون هیدروکسید تبدیل می‌شود. یون هیدروکسید سبب افزایش pH شده و تعادل بی‌کربنات را تغییر می‌دهد و سبب تشکیل یون‌های کربنات می‌شود. یون کربنات نیز می‌تواند سبب رسوب یون‌های فلزی در محیط شود (Hammes و همکاران ۲۰۰۳). به این ترتیب یون فلزهای سمی نیز می‌توانند به شکل کربنات‌های نامحلول در محیط آب رسوب کنند (Li و همکاران ۲۰۱۳).

* ایمیل نویسنده مسئول: nasrin.ghorbanzadeh@gmail.com

¹ Biom mineralization² Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation³ Ureolytic



Li و همکاران (۲۰۱۵) گزارش نمودند که مایه زنی باکتری *Terrabacter tumescens* A12 به محلول آلوده به سرب توانست، ۹۹٪ از سرب را از فاز محلول در طول ۴۸ ساعت انکوباسیون با فرایند MICCP حذف کند. از آنجا که امروزه آلودگی منابع آب به فلزهای سنگین یک مشکل جدی زیست محیطی است که به سبب توسعه صنعتی به سرعت نیز رو به افزایش است، و باتوجه به پتانسیل میکروپها در کاهش آلودگی آبها، این پژوهش با هدف بررسی کارایی روش MICCP در زیست‌پالایی محلول آلوده به سرب انجام شده است.

مواد و روش‌ها

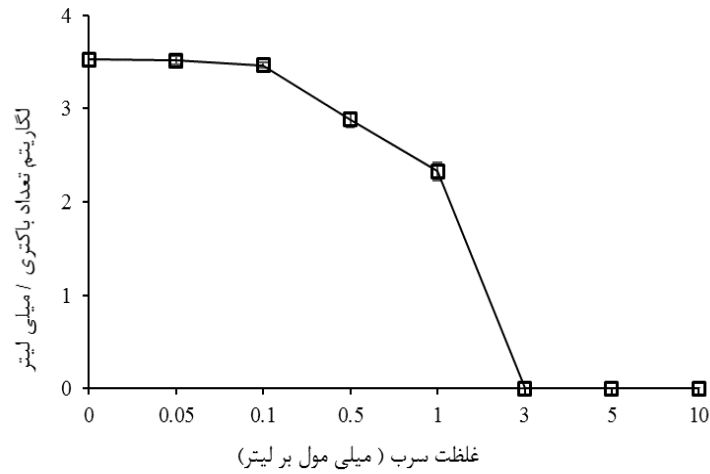
باکتری اسپورسارسینا پاستئوری (*Sporosarcina pasteurii*) PTCC1645 از بانک میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) تهیه شد و بر روی پلیت‌های دارای محیط کشت NA (نوترینت آگار) بازکشت شد. سپس باکتری به محیط کشت NBU (محیط کشت نوترینت برات همراه با ۱ درصد وزنی به حجمی اوره با غلظت ۳۳۳ میلی‌مولار و کلرید کلسیم ۲۵ میلی‌مولار) منتقل شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با هوادهی دائمی بر روی شیکری با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه تا زمان رسیدن باکتری به فاز انتهایی رشد نمایی به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. محلول مادر (۱۰۰ میلی‌مولار) از نمک نیترات سرب $Pb(NO_3)_2$ تهیه شد. غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار با رقیق‌سازی از محلول مادر، آماده و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند. کمترین غلظت بازدارنده (MIC) سرب که از رشد باکتری جلوگیری می‌کند، به روش شمارش کلنی‌های زنده باکتری (CFU) در پلیت نوترینت آگار تعیین شد. هم‌زمان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز یادداشت شد (Kang و همکاران ۲۰۱۵). با توجه به کمترین غلظت بازدارنده سرب به دست آمده از مرحله پیش، غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار سرب به محیط کشت NBU به همراه باکتری منتقل شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت سانتریفوژ شده و غلظت سرب در محلول رویی با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل VARIAN 220 اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری pH محلول رویی نیز پس از ۴۸ ساعت توسط دستگاه pH متر مدل 420A انجام شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

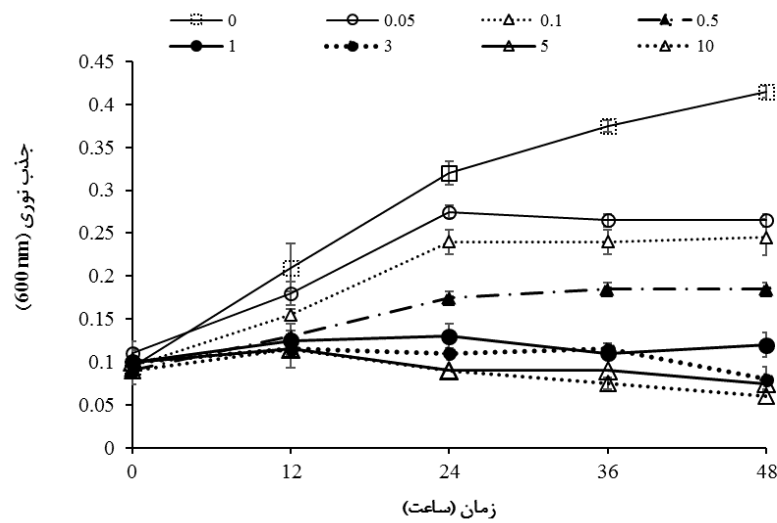
نتایج رشد باکتری در غلظت‌های مختلف سرب پس از گذشت ۴۸ ساعت نشان داد که، کمترین غلظتی از سرب که از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کند، غلظت ۱ میلی‌مولار آن است (شکل ۱). این نتیجه با مطالعات Mugwar (۲۰۱۶) در مورد غلظت بازدارنده سرب مطابقت دارد. جذب نوری محیط کشت باکتری در همه غلظت‌های سرب نسبت به غلظت صفر (شاهد) کاهش پیدا کرد و پس از ۲۴ ساعت به مقدار ثابتی رسید. در صورتی که در غلظت صفر سرب، روند افزایشی در جذب نوری تا پایان ۴۸ ساعت دیده شد (شکل ۲). در شکل ۳ نیز کاهش رشد باکتری با افزایش غلظت سرب نشان داده شده است. با افزایش غلظت سرب، محلول شفاف‌تر نیز در ارلن‌ها مشاهده شد. غلظت سرب در محلول‌های با غلظت اولیه ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ میلی‌مولار سرب (۰/۳۶، ۰/۷۲، ۱/۰۳/۶، ۲/۰۷/۲ میلی‌گرم بر لیتر سرب) به ترتیب به ۰/۰۵، ۰/۰۸، ۰/۰۹ و ۰/۷ میلی‌گرم بر لیتر رسید، که به ترتیب معادل ۹۹/۴۶، ۹۹/۶۱، ۹۴/۷۳ و ۹۲/۵۱ درصد نسبت به غلظت‌های اولیه کاهش پیدا کرد (شکل ۴). بیشترین مقدار حذف سرب در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار بود. در این محلول‌ها با افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز، مقدار کربنات کلسیم تولید شده توسط باکتری اسپورسارسینا پاستئوری نیز افزایش پیدا کرده و سبب رسوب سرب و حذف آن از فاز محلول شده است. عامل اول توانایی باکتری برای تحمل سمیت فلزهای سنگین در حضور اوره و کلسیم است که منجر به شروع ته‌نشینی کربنات کلسیم می‌شود و عامل دوم احتمال برهمکنش فلز- $CaCO_3$ است که می‌تواند سبب رسوب دائمی یون‌های فلزی از محلول شود. در این حالت یون‌های فلزی می‌توانند جایگزین کلسیم اکتاهدرال در ساختار کریستالی کربنات کلسیم شوند. یون‌های سرب نیز به شدت جذب کربنات کلسیم شده و رسوب می‌کنند، هرچند که تا حدودی سبب تغییر شکل شبکه کریستالی آن نیز می‌شوند (Mugwar، ۲۰۱۵).

⁴ Minimal Inhibitory Concentration

⁵ Colony Forming Unit



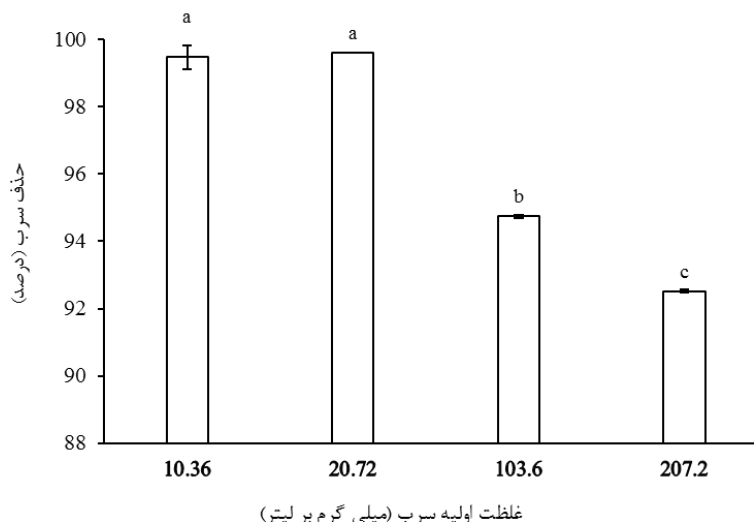
شکل ۱- تعداد سلول‌های باکتری اسپورسارسینا پاستوری در غلظت‌های مختلف سرب پس از ۴۸ ساعت. نوارهای خطا (Error Bars) در تمامی شکل‌ها انحراف از معیار می‌باشد (n=3).



شکل ۲- تغییرات جذب نوری باکتری اسپورسارسینا پاستوری در غلظت‌های مختلف سرب در طول ۴۸ ساعت انکوباسیون

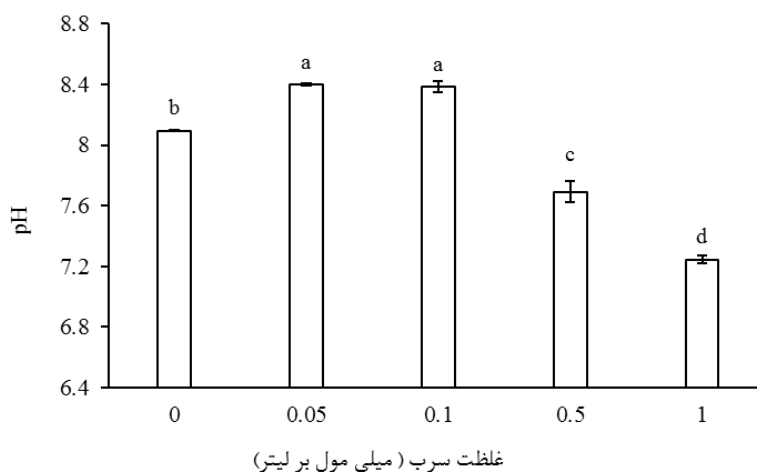


شکل ۳- کاهش رشد باکتری در محیط کشت با غلظت‌های مختلف سرب پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون



شکل ۴- مقدار حذف سرب از محلول آلوده توسط باکتری *اسپورسارسینا پاستئوری* پس از گذشت ۴۸ ساعت. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Li و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی حذف سرب از محلول آلوده توسط باکتری *Sporosarcina koreensis* با فرایند MICCP را بررسی کردند. آنها گزارش نمودند که در ۴۸ ساعت انکوباسیون، ۹۹ درصد از سرب با رسوب بر روی کلسیت از محلول آلوده حذف شد. Kang و همکاران (۲۰۱۵)، مقدار حذف سرب از محلول آلوده توسط سویه‌های KJ-46 و KJ-47 باکتری *Enterobacter cloacae* از غلظت‌های اولیه دارای ۷/۲ و ۵/۹ میلی‌گرم بر لیتر سرب را به ترتیب ۶۸/۱ و ۵۴/۲ درصد در فرایند MICCP گزارش کردند که بیانگر این بود که هر دو سویه به طور متوسط مانند هم عمل کردند. مقدار pH در غلظت‌های مختلف سرب در حضور باکتری *اسپورسارسینا پاستئوری*، پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در شکل ۵ نشان داده شده است. بیشترین مقدار pH در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار سرب دیده شد، که با سایر غلظت‌های سرب تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. به نظر می‌رسد در غلظت‌های پایین سرب (۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار)، به دلیل تنش وارد شده به سلول‌های باکتری و فعالیت بیشتر برای زنده‌مانی نسبت به غلظت صفر، افزایش pH مشاهده می‌شود. ولی در غلظت‌های بالاتر سرب (۱ و ۰/۵ میلی‌مولار)، امکان فعالیت برای سلول‌های باکتری به دلیل تنش بیشتر سرب فراهم نبوده و فعالیت باکتری نیز کاهش پیدا کرده است. در نتیجه مقدار pH نیز کمتر شده است که با نتایج بدست آمده در شکل ۱ در رابطه با تعداد سلول‌های باکتری در غلظت‌های مختلف سرب هم راستا می‌باشد. از آنجا که با افزایش غلظت فلزهای سنگین میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز کاهش پیدا می‌کند (Begum و همکاران ۲۰۰۹) با افزایش غلظت سرب نیز، میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز کاهش پیدا کرده، در نتیجه تولید یون‌های هیدروکسید و آمونیوم در محلول کاهش یافته و به دنبال آن pH نیز کم شده است.



شکل ۵- مقدار pH در غلظت‌های مختلف سرب در حضور باکتری اسپورسارسیینا پاستوری پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که فرایند MICCP قادر به حذف بالای ۹۰ درصد سرب در محدوده‌ی نسبتاً گسترده‌ای از غلظت‌های این فلز در محلول‌های آلوده است. بنابراین به نظر می‌رسد این روش برای حذف آلودگی فلزهای سنگین از پساب‌ها و فاضلاب‌های آلوده‌ی مناسب و کارآمد باشد.

منابع:

- Begum, A., Harikrishna, S and Khan, I. 2009. Analysis of heavy metals in water, sediments and fish samples of Madivala lakes of Bangalore, Karnataka. *International Journal of Chemistry and Technology*, 1, 245–249.
- Guimarães, B.C., Arends, J.B., D, der Ha Van., Van de Wiele, T., Boon, N and Verstraete, W. 2010. Microbial services and their management: recent progresses in soil bioremediation technology. *Applied Soil Ecology*, 46, 157-167.
- Hammes, F., Boon, N., Villiers, J.de., Verstraete, W and Siciliano, S. D. 2003. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:4901–4909.
- Kang, C. H., Oh, S. J., Shin, Y. J., Han, S. H., Nam, I. H and So, J. S. 2015. Bioremediation of lead by ureolytic biocteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. *Ecological Engineering*, 24, 402-407.
- Li, M., Cheng, X and Guo, H. 2013. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76, 81-85.
- Li, M., Cheng, X., Guo, H and Yang, Z. 2015. Biomineralization of carbonate by *Terrabacter Tumescens* for heavy metal removal and biogrouting applications. *American Society of Civil Engineers*, 142, 1-5.
- Mahanty, B., Kim, S and Kim, C. H. G. 2013. Assessment of biostimulated or bioaugmented calcification system with *Bacillus pasteurii* in a simulated soil environment. *Microbial Ecology*, 65, 679-688.
- Mugwar, A. J. 2015. Bioprecipitation of Heavy Metals and Radionuclides with Calcium Carbonate in Aqueous Solutions and Particulate Media. PhD thesis, 195-200
- Mugwar, A. J. 2016. Toxicity effects on metal sequestration by microbially-induced carbonate precipitation. *Journal of Hazardous Materials*, 314, 237–248
- Fu, F., Wang, Q. 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92, 407–418.



Topic for submission: Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation

Removal of lead from contaminated solution by bioprecipitation of calcium carbonate

R., Shokati Marzdashti¹, N., Ghorbanzadeh^{2*}, M.B., Farhangi³

¹ M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Guilan, Iran

^{2,3} Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Guilan, Iran

Abstract

Contamination by Pb is a significant environmental problem. Microbially induced carbonate calcium precipitation (MICCP) is an emerging and promising bioremediation technology to restore the environment contaminated by heavy metals. This experiment was conducted for the removal of lead from contaminated solutions by MICCP based on urea hydrolysis pathway with *sporosarcina pasteurii*. The minimum inhibitory concentration of lead for bacteria growth was 1 mM as determined by colony counting after 48 hours of incubation. Optical density in all media containing different Pb levels was less than control and became almost constant after 24 hours. Lead removal from solutions containing 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mM of lead by MICCP process was 99.46, 99.61, 94.37 and 92.51%, respectively. The pH value in solutions was also increased significantly in 0.05 and 0.1 mM lead compared to control. In conclusion, it has been proved that MICCP showed extraordinary potential for Pb-contaminated water, So, MICCP can be useful in removing heavy metals from contaminated wastewaters.

Keywords: Urease, *Sporosarcina pasteurii*, biomineralization, calcite

* Corresponding author, Email: nasrin.ghorbanzadeh@gmail.com