# پالایش کادمیوم از محلول آبی آلوده با روش رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم

سمیرا عبدالرحیمی[۱]، نسرین قربان‌زاده[۲]، اکبر فرقانی[۳] و محمدباقر فرهنگی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک- دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان، ۲ و ۴- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک- دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان، ۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک- دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان

## چکیده

این آزمایش با هدف بررسی حذف کادمیوم از محلول آلوده به وسیله‌ی رسوب‌گذاری کربنات کلسیم از مسیر هیدرولیز اوره با باکتری *اسپورسارسینا پاستئوری* انجام شد. به منظور ارزیابی تولید اوره‌آز توسط این باکتری مقدار آمونیاک تولید شده در محیط کشت باکتریایی در طی شش روز اندازه‌گیری شد. مقدار آمونیاک تولیدشده تا روز چهارم روند افزایشی داشت و پس از آن به مقدار ثابتی رسیده است. کمترین غلظت بازدارنده کادمیوم دو میلی‌مولار بود که ازطریق شمارش کلنی بر روی پلیت پس از گذشت ۴۸ ساعت به دست آمد. حذف کادمیوم از محلول آلوده در سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار کادمیوم در حضور باکتری به ترتیب ۸۴/۴، ۹۱/۹ و ۹۱/۳ درصد بود. نتایج این پژوهش نشان داد که جداسازی فلزات سنگین بر مبنای MICCP از طریق رسوب همزمان با کلسیت می‌تواند برای پالایش زیستی فلزهای سنگین سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: کلسیت، *اسپورسارسینا پاستئوری*، اوره‌آز، معدنی شدن زیستی

## مقدمه

آلودگی زیستگاه‌های طبیعی با فلزات سنگین از طریق فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی به دلیل سمیت این مواد و مشکلات موجود در پالایش آن‌ها، سلامت موجودات زنده و محیط زیست را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Kang et al., 2015). کادمیوم یکی از عناصر سمی است که از طریق طیف گسترده‌ای از انواع ضایعات شامل صنعت آب‌کاری، الکتریکی، باتری‌سازی، صنعت رنگ و پلاستیک، آفت‌کش‌ها و کودهای فسفر به زیست‌بوم‌های طبیعی وارد می‌شود (Kang et al., 2014). معدنی‌شدن زیستی[۱] فرایندی است که در آن ریزجانداران، کانی‌ها را تولید می‌کنند. ساخت کانی‌ها به وسیله پروکاریوت‌ها به طور کلی به دو بخش معدنی شدن کنترل شده زیستی[۲] (BCM) و معدنی شدن تحریک شده زیستی[۳] (BIM) طبقه‌بندی می‌شوند (Dhami et al., 2013). در میان تمام کانی‌هایی که با معدنی شدن زیستی ایجاد می‌شوند، کربنات‌ها بارزترین هستند. رسوب کربنات کلسیم تحریک شده میکروبی[۴] (MICCP) اغلب به عنوان شاخه‌ای از معدنی شدن زیستی در زمینه‌های گوناگون مانند بیوتکنولوژی، ژئوتکنولوژی و دیرین‌شناسی مورد مطالعه قرار گرفته است. در این فرایند، ریزجانداران به عنوان بخشی از سوخت و ساز پایه خود به طور طبیعی مواد غیرآلی تولید می‌کنند. در چند سال گذشته، روش MICCP به دلیل پتانسیل تثبیت دی‌اکسیدکربن اتمسفری به یک راه‌کار برای ترسیب کربن نیز تبدیل شده (Mitchell et al., 2010; Lee et al., 2010) و کاربرد آن در زیست پالایی آلاینده‌های غیرآلی توجه بیشتری را به خود معطوف داشته است (Achal et al., 2011; Pan, 2009). امروزه، افزون بر روش‌های معمول در زیست‌پالایی، استفاده از

[1]Biomineralization
[2]Biologically Controlled Mineralization
[3]Biologically Induced Mineralization
[4]Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation

فرایند MICCP برای حذف یون‌های فلزی نیز پیشنهاد شده است که در گروه روش‌های نوین زیست‌پالایی قرار می‌گیرد. اگر چه بیشتر پژوهش‌ها هنوز بر جذب سطحی یون‌های فلزی روی جاذب‌ها متمرکز شداند (Ryan et al., 2005)، اما معدنی شدن زیستی بر اساس تشکیل رسوب کربنات کلسیم زیستی یک روش نوید بخش را برای اصلاح فلزهای سمی در خاک‌های آلوده فراهم می‌کند که سودمندی بیشتری نسبت به سایر روش‌های معمول زیست پالایی نیز دارد (Achal et al., 2012a,b). هیدرولیز میکروبی اوره به وسیله باکتری‌های هتروتروف تولید کننده آنزیم اوره‌آز[1] در خاک‌ها رایج است و به طور گسترده‌ای نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (Mahanty et al., 2013). حذف فلزهای سنگین در فرایند MICCP از مسیر هیدرولیز اوره رخ می‌دهد که در آن باکتری‌های دارای توان تولید آنزیم اوره‌آز در فرایند هیدرولیز اوره شرکت می‌کنند. اوره‌آز (آمیدوهیدرولاز اوره) آنزیمی است که اوره را به یک مول کربنات و دو مول آمونیاک هیدرولیز می‌کند (Kang et al., 2014). بر این اساس، آزادسازی یون‌های کربنات ($CO_3^{2-}$) و آمونیوم ($NH_4^+$) با افزایش پی‌اچ درحضور یون‌های فلزی منجر به رسوب کربنات این یون‌ها می‌شود (Kang et al., 2015). کلسیت محصول معدنی شدن زیستی این فرایند است که فلزهای سنگین بر روی ساختار کریستالی آن رسوب کرده و از محلول خاک‌های آلوده حذف می‌شوند (Achal et al., 2012b). آچال و همکاران (Achal et al., 2012a) گزارش نمودند که رسوب کلسیتی که به وسیله ریزجانداران در فرایند MICCP ایجاد می‌شود، بهترین امکان را برای حذف سرب در خاک‌های آلوده فراهم می‌کند. آچال و همکاران (Achal et al., 2012b) گزارش نمودند که مایه‌زنی باکتری *Sporosarcina ginsengisoli* CR 5 به خاک آلوده به آرسنیک توانست ۹۶/۳٪ از آرسنیک سه ظرفیتی را از فاز محلول خاک در طول ۷ روز انکوباسیون حذف کند. این پژوهش‌گران گزارش نمودند که در این فرایند آرسنیک از بخش قابل تبادل و محلول به بخش کربناتی رفت. این روش زیست پالایی در حذف آلودگی فلزهای سنگین با وجود اهمیت آن کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی کارایی روش MICCP در زیست پالایی محلول آبی آلوده به کادمیوم انجام شده است.

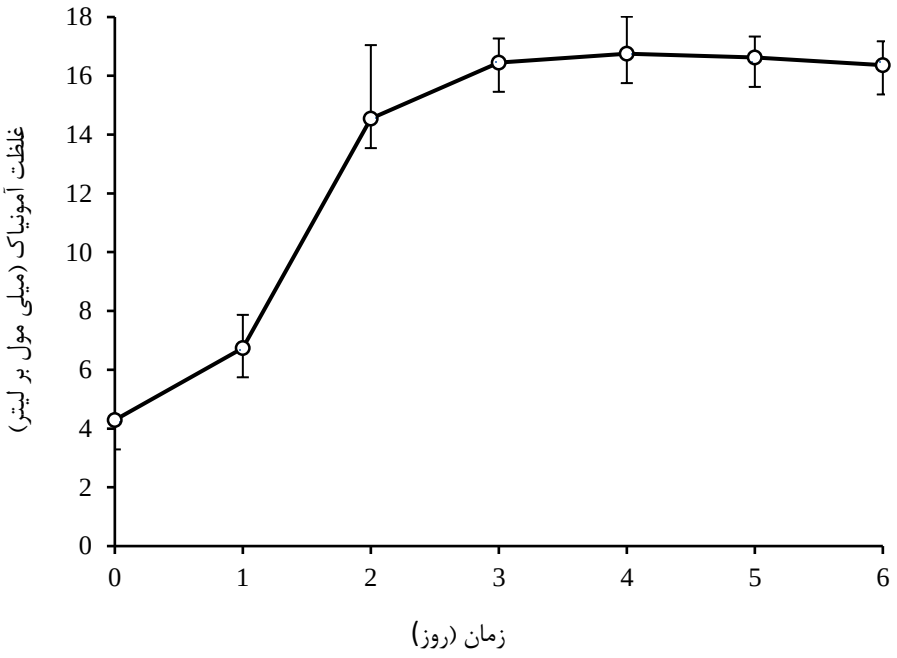
## مواد و روش

در این پژوهش باکتری *Sporosarcina pasteurii* (PTCC1645) از بانک میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) تهیه شد و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت NA بازکشت شد. سپس باکتری به محیط کشتNBU (محیط کشت نوترینت براث همراه با ۲٪ وزنی به حجمی اوره (۳۳۳ میلی‌مولار) و (۲۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم) منتقل و به منظور ارزیابی تولید اوره‌آز توسط این باکتری، مقدارآمونیاک آزاد شده با روش فنل-هیپوکلریت اندازه‌گیری شد (Achal et al., 2009). محلول مادر (۵۰۰ میلی‌مولار) کادمیوم از نمک $CdCl_2.5H_2O$ تهیه شد و در تاریکی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار کادمیوم با رقیق‌سازی از محلول مادر تهیه و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند. به منظور تعیین کمترین غلظتی از کادمیوم که از رشد باکتری جلوگیری به عمل می‌آورد، شمار یاخته‌های باکتریایی به روش پلیت[2] (CFU) تعیین و کمترین غلظتی از کادمیوم که از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرد به عنوان کمترین غلظت بازدارنده[3] (MIC) کادمیوم در نظر گرفته شد. هم‌زمان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز یادداشت شد. کمترین غلظت بازدارنده کادمیوم به دست آمده از مرحله پیش به محیط کشت NBU به همراه باکتری منتقل شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت سانتریفوژ شده و غلظت کادمیوم در محلول رویی با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری گردید.

[1]Ureolytic
[2]Colony Forming Unit
[3]Minimal Inhibitory Concentration

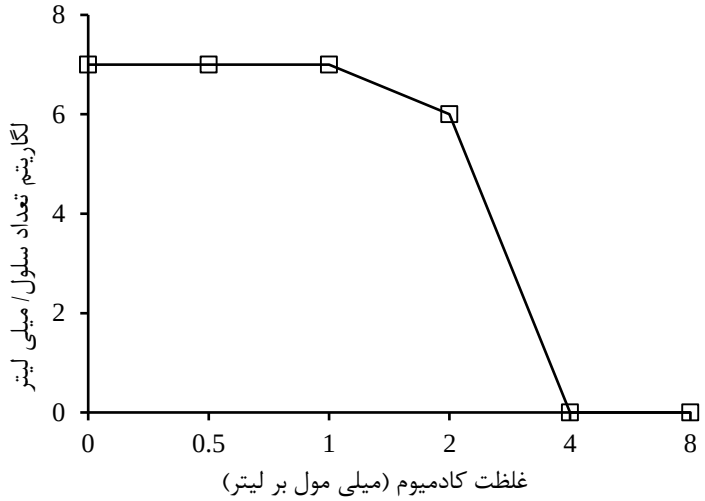
**نتایج وبحث**

مقدار آمونیاک حاصل از آنزیم اوره‌آز باکتری *اسپورسارسینا پاستئوری* در طی شش روز آزمایش تا روز چهارم روند افزایشی داشت و پس از آن به مقدار تقریباً ثابتی رسید (شکل ۱). آچال و همکاران (Achal et al., 2009) نیز بیشترین مقدار آمونیاک را در حضور سویه MTCC 1761 باکتری *Sporosarcina pasteurii* در روز پنجم گزارش نمودند. همچنین نتایج کانگ و همکاران (Kang et al., 2014) مشخص کرد که فعالیت اوره‌آز در حضور باکتری *Lysinibacillus sphaericus* CH-5 تا روزهای چهارم و پنجم افزایش داشته و پس از آن به گونه چشم‌گیری کاهش پیدا کرده است. این پژوهش‌گران بیان داشتند که بعد از پنج روز فعالیت آنزیم پروتئاز افزایش پیدا کرده و این آنزیم از طریق انباشت روی محیط کشت، بر روی فعالیت اوره‌آز تاثیر منفی گذاشته و سرانجام باعث کاهش تولید اوره‌آز شده است.

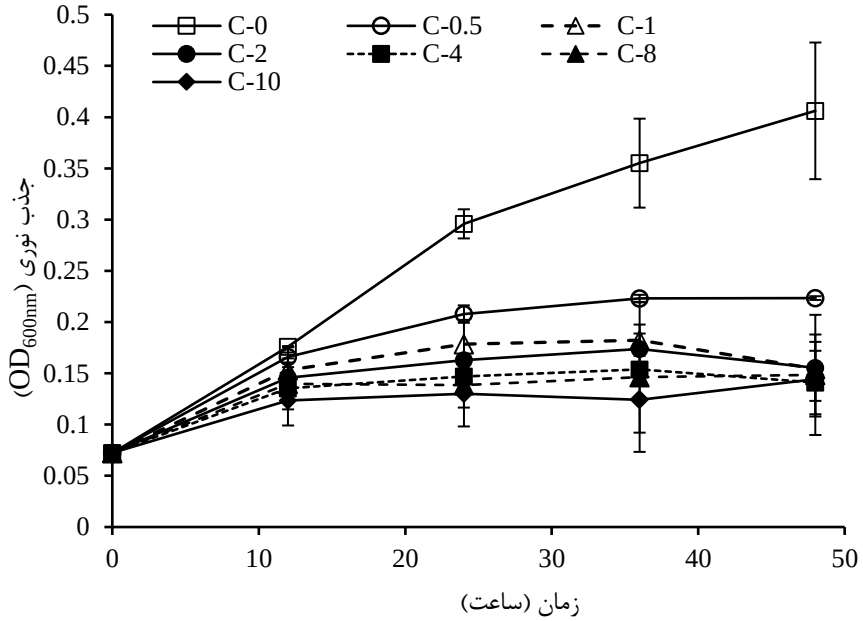



**شکل ۱- غلظت آمونیاک در طول شش روز آزمایش در حضور باکتری *اسپورسارسینا پاستئوری*. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می باشند (n=2).**

نتایج رشد باکتری در غلظت‌های مختلف کادمیوم (صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰میلی‌مولار) پس از گذشت ۴۸ ساعت از انجام آزمایش نشان داد که کمترین غلظتی از کادمیوم که از رشد باکتری جلوگیری می‌کند، غلظت ۲ میلی مولار است (شکل ۲) که با یافته‌های کانگ و همکاران (Kang et al., 2014) مطابقت دارد. این پژوهش‌گران در مقایسه رشد باکتری *L. sphaericus* CH-5 در محیط کشت بدون کادمیوم و با ۲ گرم بر لیتر کادمیوم، کاهش رشد باکتری در محیط دارای کادمیوم را گزارش نمودند. نتایج همچنین نشان داد که جذب نوری در غلظت‌های مختلف کادمیوم (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۰ میلی‌مولار) به ترتیب نسبت به غلظت صفر کادمیوم (شاهد) کاهش پیدا کرده است (شکل ۳). زیرا غلظت‌های بیش از حد آستانه فلزهای سنگین می‌توانند برای حیات میکروبی مضر باشد.



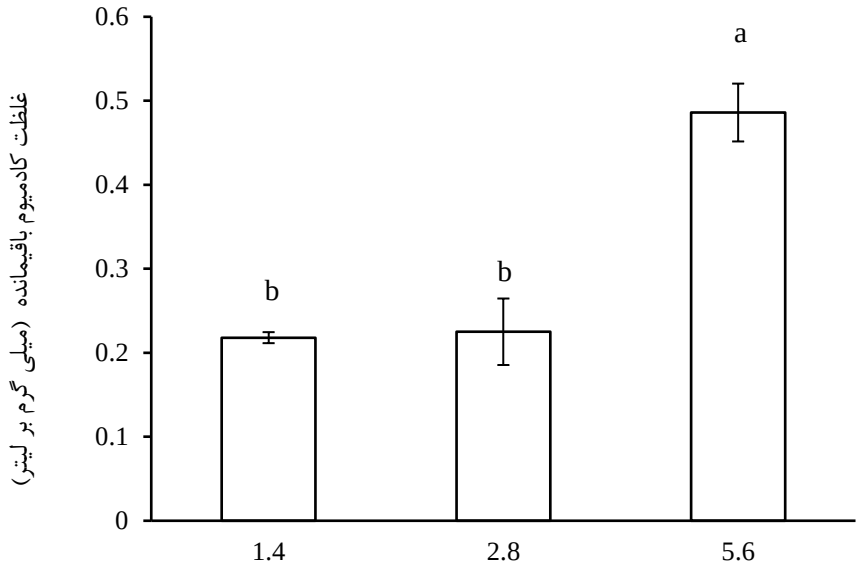

**شکل ۲- لگاریتم تعداد یاخته باکتری *اسپورسارسینا پاستئوری* در غلظت‌های مختلف کادمیوم پس از ۴۸ ساعت**




**شکل۳- جذب نوری در غلظت‌های مختلف کادمیوم در طول ۴۸ ساعت. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می باشند (n=2).**

غلظت کادمیوم در محلول آلوده از غلظت‌های اولیه ۱/۴، ۲/۸ و ۵/۶ میلی‌گرم بر لیتر (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) کادمیوم به ترتیب به ۰/۲۱۸، ۰/۲۲۵ و ۰/۴۸۶ میلی‌گرم بر لیتر کاهش پیدا کرد (شکل ۴) که به ترتیب برابر با ۸۴/۴، ۹۱/۹ و ۹۱/۳ درصد کاهش نسبت به غلظت اولیه می‌باشد. نکته جالب این است که با افزایش غلظت اولیه کادمیوم در محلول آلوده، مقدار رسوب و کاهش غلظت هم بیشتر بوده و تفاوت آن با دو تیمار دیگر چشم‌گیر نیز بوده است ($P\leq 0.05$). در پژوهش کانگ و همکاران (Kang et al., 2014) باکتری *L. sphaericus* CH-5 توانسته بود ۹۹/۹۵ درصد از کادمیوم را در محلول آلوده حذف کند. این پژوهش‌گران

(Kang et al., 2015) در آزمایشی دیگر نیز نشان دادن که سویه‌های KJ-47 و KJ-46 باکتری *Enterobacter cloaca* می‌تواند در حذف سرب از محلول آلوده موثر باشد. آن‌ها حذف سرب در حضور باکتری‌های KJ-46 وKJ-47 را به ترتیب ۶۸/۱ و ۵۴/۲ درصد گزارش کردند. هیدرولیز میکروبی اوره با تولید سریع کربنات در حضور یون کلسیم منجر به رسوب کلسیت شده که فلز کادمیوم بر روی ساختار کریستالی آن رسوب کرده و از محلول حذف می‌شود (Kang et al., 2015). بنابر نتیجه این پژوهش می‌توان از باکتری *اسپورسارسینا پاستئوری* در حذف کادمیوم از محلول‌های آلوده استفاده کرد.




**شکل ۳- مقدار حذف کادمیوم از محلول آلوده توسط باکتری *اسپورسارسینا پاستئوری* پس از گذشت ۴۸ ساعت. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می‌باشند** (n=3).

## منابع

Achal V., Mukherjee A., Basu P.C. and Sudhakara Reddy M. 2009. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. J Ind Microbiol Biotechnol. 36(7): 981–988.

Achal V., Pan X. and Zhang D. 2011. Remediation of copper contaminated soil by *Kocuria flava* CR1, based on microbially induced calcite precipitation. Ecol Eng. 37(10): 1601–1605.

Achal V., Pan X., Zhang D. and Fu Q. 2012a. Bioremediation of Pb-contaminated soil based on microbially induced calcite precipitation. J Microbiol Biotechnol. 22(2): 244–247.

Achal V., Pan X., Fu Q. and Zhang D. 2012b. Biomineralization based remediation of As(III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*. J Hazard Material. 201: 178-184.

Dhami N.K., Sudhakara Reddy M. and Mukherjee A. 2013. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. Front Microbiol. 4: 314.

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 bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. Ecol Eng. 74: 402-407.

Kang C.H., Han SH., Shin Y.J., Oh S.J. and So J.S. 2014. Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. Appl Biochem biotechnol. 172: 1929-1937.

Lee S.W., Park S.B. and Jeong S.K., Lim K.S., Lee S.H., and Trachtenberg M.C. 2010. Review on carbon dioxide storage based on biomineralization strategies. Micron. 41(4): 273-282.

Mahanty B., Kim S. and Gyung Kim C.H. 2012. Assessment of biostimulated or bioaugmented calcification system with *bacillus pasteurii* in a simulated soil environment. Microb Ecol. 65(3): 679-688.

Mitchell A.C., Dideriksen K., Spangler L.H., Cunningham A.B. and Gerlach R. 2010. Microbially enhanced carbon capture and storage by mineral-trapping and solubility-trapping. Environ Sci Technol. 44(13): 5270-5276.

Ryan R.D. and Dowling D. 2005. Multiple metal resistant transferable phenotypes in bacteria as indicators of soil contamination with heavy metals. J Soil Sediment. 5: 79–86.

Pan X.L .2009. Microbiologically induced carbonate precipitation as a promising way to in situ immobilize heavy metals in groundwater and sediment. Res J Chem Environ. 13: 3-4.

# Remediation of cadmium from contaminated solution by bioprecipitation of calcium carbonate

## Abstract

This experiment was conducted for the removal of cadmium from contaminated solutions by *sporosarcina pasteurii*. This bacterium can produce calcium carbonate through ureolysis pathway and may precipitate Cd from solution. In order to evaluate the production of urease by the bacterium, the amount of ammonia produced in bacterial culture medium were measured in six days. The amount of ammonia increased up to fourth day and then became almost constant. The minimum inhibitory concentration of cadmium for bacteria growth was 2 mM as determined by colony counting after 48 hours of incubation. Cadmium removal efficacy from solutions containing 0.5, 1 and 2 mM of cadmium was 84.4, 91.9 and 91.3%, respectively. The results showed that MICCP-based removal of soluble heavy metals via coprecipitation with calcite may be useful for toxic heavy metal bioremediation.

**Key word:** *Sporosarcina pasteurii*, urease, Calcite, Bioprecipitation