بررسی الگوی مقاومت و جذب فلزات سنگین نیکل و وانادیوم در باکتری‌های جداسازی شده از سواحل جزیره خارک به منظور پاکسازی زیستی فلزات

- **سجاد صفرقلی تبار مرزونی*:** گروه کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه پیام نور، واحد هادی‌شهر
- **مژگان امتیازجو:** دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، صندوق‌پستی: ۱۹۷۳۵-۱۸۱
- **مریم تاج‌آبادی ابراهیمی:** دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، صندوق‌پستی: ۷٦۸- ۱۳۱۸۵
- **محمدحسین گرجیان عربی:** دانشکده شیلات و محیط‌زیست دانشگاه علوم و کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، صندوق‌پستی: ۱۵۷۳۹-٤۹۱۳۸
- **فلور مظهر:** دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، صندوق‌پستی: ۱۸۱-۱۹۷۳۵

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۲

چکیده

امروزه پاک‌سازی زیستی آلاینده‌های محیطی، بر پایه به‌کارگیری میکروارگانیسم‌ها کاربرد وسیعی پیدا کرده است. با توجه به تنوع متابولیکی میکروارگانیسم‌ها و توان استفاده آن‌ها از آلاینده‌های محیطی به‌عنوان منبع غذایی و توانایی تبدیل آن‌ها به فرمی با پایداری بیش‌تر و سمیت کم‌تر، با یک انتخاب مناسب می‌توان از آن‌ها در تجزیه، جذب و حذف آلاینده‌های مختلف سود برد. به‌منظور جداسازی باکتری‌های دریازی کاهش دهنده فلزات سنگین نیکل و وانادیوم، نمونه‌های آب و رسوب از هفت ایستگاه در منطقه بین جزرو مدی سواحل جزیره خارک تعیین و برداشت شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت‌های مایع نوترینت آگار نمک‌دار و محیط کشت آب دریای غنی شده کشت داده شدند. برای سنجش مقاومت و جذب باکتریایی نسبت فلزات سنگین نیکل و وانادیوم به دو روش کیفی و کمی به همراه تلقیح در محیط مایع BHI Broth، سنجش شد. میزان رشد سویه‌ها در غلظت ppm ۳۰۰ در حضور نیکل و ppm ۲۵۰ در حضور وانادیوم توسط دستگاه اسپکتوفتومتر UV و میزان سنجش جذب فلزات نیکل و وانادیوم توسط سویه‌ها با دستگاه جذب اتمی سنجش شد. در مرحله بعد با استفاده از تست بیوشیمیایی دو سویه مقاوم *Bacillus sp.* PGS۴ و *Bacillus sp.* PGS۱۰ شناسایی شدند. میزان جذب ppm ۳۰۰ از نیکل برای سویه‌های *Bacillus sp.* PGS۴ و *Bacillus sp.* PGS۱۰ به‌ترتیب ۸۰/٦۱ ٪ و ۷۷/۹۹٪ و میزان جذب ppm ۲۵۰ از وانادیوم برای سویه‌های فوق به‌ترتیب ۷۰/۸۰٪ و ٦۷/۵۸٪ بوده است.

کلمات کلیدی: پاکسازی زیستی، فلزات سنگین، نیکل، وانادیوم، خارک، خلیج فارس

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: gholitabar۱۱۷@hotmail.com

مقدمه

توسعه تکنولوژی و رشد روز افزون فعالیت‌های صنعتی از یک سو و رعایت نکردن قوانین زیست‌محیطی از سوی دیگر، سبب شده است تا طی چند دهه اخیر مقادیر زیادی از آلاینده‌ها وارد محیط‌زیست شوند (Vijayagharan و همکاران، ۲۰۰۸). از نقطه نظر اکولوژیکی، آلاینده‌ها به دو نوع آلاینده‌های قابل تجزیه و غیرقابل تجزیه تقسیم می‌شوند. آلاینده‌های غیرقابل تجزیه نظیر ترکیبات و نمک‌های فلزات سنگین هستند که از سمی‌ترین آلاینده در محیط‌زیست به‌شمار می‌روند (Dabiri، ۲۰۰۸؛ Hussein و همکاران، ۲۰۰۵). حضور فلزات سنگین و ترکیبات آن در غلظت‌های بیش از حد مجاز عوارض سوء متعددی، هم برای انسان و هم برای دیگر جانداران ایجاد کرده و آلودگی زیست‌محیطی را به همراه دارد با توجه به موارد ذکر شده حذف این ترکیبات مطابق استانداردها از اهمیت بسیاری برخوردار است (Alluri، ۲۰۰۷؛ Camargo، ۲۰۰۵). یکی از روش‌هایی که برای حذف زیستی این ترکیبات در محیط زیست مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش تصفیه بیولوژیکی است. این روش به‌دلیل توانایی اثبات شده گروهی از میکروارگانیسم‌ها در تجزیه فلزات سنگین و ترکیبات آن، در بسیاری از موارد نسبت به سایر روش‌های تصفیه و حذف این ترکیبات برتر است (Iddou، ۲۰۰۸). هر چند تکنولوژی‌های مرسوم فیزیکوشیمیایی مثل ته‌نشینی، فیلتراسیون، اسمز معکوس، اکسیداسیون احیاء و جداسازی توسط غشاء، برای برداشت آلودگی‌های عمده فلزی از پساب‌های صنعتی مناسب بوده، اما به‌دلیل عدم کاهش غلظت‌های فلزات سنگین، به حد استانداردهای قانونی مورد قبول (Zhaohui و همکاران، ۲۰۰۲)، هزینه زیاد، تشکیل مواد حدواسط سمی (Paul و همکاران، ۲۰۰۵)، عدم استفاده دائمی و طولانی مدت، مشکلات در جمع‌آوری پساب‌های جامد تولید شده و ایجاد اتصالات فلزی غیر اختصاصی نامناسب می‌باشند (Hussein و همکاران، ۲۰۰۵). از این رو در سال‌های اخیر دستاوردهای بیوتکنولوژی و استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یک ابزار متفاوت، به‌منظور حذف فلزات سنگین و ترکیبات آن‌ها به‌مقدار زیادی مورد توجه قرار گرفته است (Cabrera و همکاران، ۲۰۰۵). جذب زیستی روشی ساده و کم‌هزینه است که طی واکنش‌های تعادلی و از طریق باند کردن و جذب فلزات روی گروه‌های عاملی سطح سلول، فلزات را از محیط استخراج می‌کنند (Chojnacka و همکاران، ۲۰۰۵).

براساس تحقیقات مختلف، به‌دلیل سمی بودن و حضور گسترده فلزات در محیط زیست، میکروب‌ها راه‌های عجیب و بی‌مانندی برای مقابله با فلزات سنگین ایجاد می‌کنند و انواع مختلف سازو کارهای مقاومتی در حضور فلزات سنگین از خود نشان می‌دهند. فلزات به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم بر رشد و متابولیسم میکروب‌ها اثر می‌گذارند به‌طوری‌که در حضور این آلاینده‌ها، میکروارگانیسم‌ها آن‌ها را به‌طور فعال (جذب زیستی) و یا به‌صورت غیرفعال (تجمع زیستی) جذب می‌کنند (Nies، ۲۰۰۳). باکتری‌ها زمانی‌که برای مدت طولانی در شرایط غیرطبیعی از نظر عوامل محیطی قرار می‌گیرند، از طریق توانایی‌های جدیدی که می‌توانند منشاء ژنتیکی و یا ساختاری داشته باشند، خود را با شرایط موجود وفق می‌دهند (Pradhan و همکاران، ۲۰۰۱). بر حسب میزان آلودگی ممکن است ظرفیت پلاسمیدی یا ساختار سلولی آن‌ها تغییر یابد تا آن‌جا که قدرت تحمل غلظت‌های بالاتر ترکیبات سمی را داشته باشند و به عبارت دیگر با غلظت‌های بالاتر نیز سازگاری پیدا کنند. از طرف دیگر باکتری‌های مقاوم قادرند با انتقال عناصر ژنتیکی به سویه‌های دیگر سبب گسترش مقاومت گردند (Verma و همکاران، ۲۰۰۱؛ Sabri و همکاران، ۱۹۹۷). مطالعات گسترده‌ای درخصوص حذف زیستی فلزات سنگین مطرح شده است که در این خصوص می‌توان به بررسی انجام شده توسط خنافری و همکاران (۱۳۸۶) در خصوص جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی با توانایی کاهش سه فلز کادمیوم، وانادیوم و نیکل از تالاب انزلی به منظور پاکسازی زیستی اشاره کرد و همین‌طور Pradhan و همکاران (۲۰۰۷) میزان جذب کروم، نیکل و آهن را بررسی کردند و مشخص شده که در محیط آزمایشگاهی میکرواورگانیسم Microcystis توانایی جذب این فلزات را در محدوده ۷۰ تا ۸۰ درصد دارد. هدف از این تحقیق جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه‌ها و همین‌طور بررسی پتانسیل حذف فلزات مذکور توسط میکرواورگانیسم‌ها و در نهایت انتخاب بهترین سویه حذف کننده فلزات نیکل و وانادیوم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در مرداد ماه سال ۱۳۸۹ از سواحل بین جزرومدی جزیره خارک انجام شد. براساس داده‌های اولیه و

هم‌چنین بازدید منطقه‌ای در پیرامون جزیره هفت ایستگاه جهت نمونه‌برداری از آب و رسوب تعیین و برداشت شد.

جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها

برای رشد میکروارگانیسم‌ها عناصر مختلفی شامل عناصر اصلی نظیر منبع کربن، نیتروژن، فسفر و عناصر فرعی نظیر کلسیم، منیزیم و عناصر جزئی مثل کروم، روی و غیره باید تامین گردد. به این لحاظ از محیط کشت معدنی آب دریا Sea Water Medium BrothSWMB استفاده گردید (Talaie و همکاران، ۲۰۰۸؛ امتیازجو، ۱۳۷۴). برای تهیه محیط کشت فوق از ۳۰ گرم در لیتر نمک طعام دریایی، ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۵ گرم در لیتر KNO۳، ۲/۵ گرم در لیتر KH۲PO۴، ۲/۵ گرم در لیتر K۲HPO۴ با pH=۷/۲ استفاده شد (standard method، ۲۰۰۵؛ امتیازجو، ۱۳۷۴).

پس از تلقیح نمونه‌ها به محیط کشت کلیه ارلن‌ها در یک انکوباتور شیکردار با ۱۶۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده تا میکروارگانیسم‌ها به‌خوبی رشد کنند. سپس با استفاده از روش‌های مختلف نظیر تکنیک‌های مختلف کشت و به‌کارگیری برخی مواد شیمیایی نمونه‌ها خالص گردید. تست‌های مرفولوژیک به‌لحاظ پلی‌مورف بودن نمونه‌های دریایی کفایت نمی‌نمود بدین منظور از تست‌های بیوشیمیایی نیز استفاده گردید (Li و همکاران، ۲۰۰۵). از هر نمونه، تعدادی زیرمجموعه کشت خالص تهیه گردید. برای نگهداری طولانی مدت هر چهار ماه یک‌بار میکروارگانیسم‌ها تجدید کشت گردید (Talaie و همکاران، ۲۰۰۸).

تعیین مقاومت و انتخاب بهترین میکروارگانیسم‌ها

برای سنجش مقاومت باکتری‌ها و انتخاب بهترین سویه جذب‌کننده فلزات نیکل و وانادیوم از دو روش کیفی و کمی استفاده شد. برای انجام هر یک از مراحل فوق، ابتدا محلول استوک فلز و سوسپانسیون باکتریایی مناسب تهیه گردید.

۱- روش کیفی (آزمون چاهک‌گذاری و سنجش قطر منطقه ممانعتی)

برای مطالعه اثر غلظت‌های مختلف محلول‌های فلزی نیکل و وانادیوم بر جذب فلزات توسط باکتری‌ها از روش چاهک در محیط نوترینت آگار استفاده شد. برای این منظور بر روی محیط کشت نوترینت آگار با پیپت پاستورهای استریل با فاصله ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر از لبه پلیت سوراخ‌هایی ایجاد شد. در مرحله بعدی با سوآپ‌های استریل که آغشته به سوسپانسیون باکتریایی مورد نظر بودند کشت فشرده بر روی محیط کشت انجام شد. سپس محلول ذخیره فلز سنگین مورد نظر که طبق استاندارد ساخته شد را با غلظت و حجم‌های مورد نظر به چاهک‌ها توسط سمپلر تزریق شد. در نهایت پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله با خط‌کش مخصوص سنجش شد (یارکه‌سلخوری، ۱۳۸۸؛ اشرفی، ۱۳۸۵؛ Pumpel، ۱۹۹۵).

۲- روش کمی (بااستفاده از سنجش OD=Optical density و MIC= Minimum inhibitory concenteration):

در این روش ۱۳ لوله که هر کدام حاوی محیط کشت مولر براث همراه با نمک سه درصد بودند و هم‌چنین غلظت‌های متفاوتی از فلزات سنگین نیکل و وانادیوم شامل (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ ppm) و در نهایت سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند به میزان ۱ درصد به محیط تلقیح شدند. سپس لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت، رشد باکتری در لوله‌ها به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتریUV در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد (Ajay Babu و همکاران، ۲۰۰۹؛ Hussein و همکاران، ۲۰۰۵).

بررسی پتانسیل باکتری‌ها در جذب فلزات نیکل و وانادیوم

برای این بررسی از محیط BHI Broth استفاده شد. جهت تنظیم pH=۷/۲، از هیدروکسیدسدیم استفاده شد. میکروارگانیسم‌ها را با غلظت یکسان طبق کدورت ۰/۵ مک‌فارلند به میزان ۱ درصد به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، تلقیح شدند و غلظت‌های (۳۰۰ و۳۵۰ ppm) از فلزات سنگین نیکل و وانادیوم جداگانه به محیط کشت اضافه شدند. به‌عنوان شاهد، محیط بدون فلز همراه با باکتری مورد نظر نیز تلقیح شد، تا منحنی رشد باکتری‌ها در حضور فلزات و عدم حضور فلزات بررسی گردد (نمک فلزات به‌کار رفته در تحقیق از نوع کلرید نیکل و کلرید وانادیوم بود).

در تهیه محلول فلزات برای سهولت و دقت بیش‌تر محلول اصلی تهیه می‌شود که با این روش، اندازه‌گیری جرمی فلزات دقیق‌تر انجام می‌شود. در تهیه این محلول به حلالیت و هم‌چنین به درجه خلوص نمونه توجه شد. ارلن‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر با شدت ۱۶۰ دور در دقیقه، هوادهی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از زمان تلقیح تا ۴۸ ساعت، هر دو ساعت، میزان رشد باکتری‌ها، با دستگاه اسپکتوفتومتریUV در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. بعد از قرائت میزان رشد باکتری‌ها، نمونه‌ها برای سنجش جذب یون‌های فلزی با دستگاه

جذب اتمی در ابتدا توسط فیلترهای سلولزی که دارای منفذهایی با سایز ۰/۴۵ میکرومتر بودند صاف گردیدند، سپس جذب یون‌های فلزی نیکل و وانادیوم توسط دستگاه جذب اتمی در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت قرائت شد (Hussein و همکاران، ۲۰۰۵؛ Lyer و همکاران، ۲۰۰۴).

شناسایی میکروارگانیسم‌های جدا شده

پس از انجام مراحل فوق، شناسایی ۲ جدایه باکتریایی موثر در جذب فلزات نیکل و وانادیوم، براساس تست‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی شامل ریخت‌شناسی کلنی و سلولی نظیر ابعاد سلولی، تحرک، گرم مثبت یا منفی بودن، کاتالاز، استفاده از قندهای مختلف نظیر گلوکز، گالاکتوز، رابینوز و غیره انجام شد (Bergey و همکاران، ۲۰۰۵).

نتایج

در این مطالعه ۲۱ باکتری از نمونه‌های آب و رسوب جداسازی و خالص سازی گردید، اغلب باکتری‌های جدا شده مربوط به رسوب بود.

نتایج روش کیفی(چاهک گذاری)

در اطراف اکثر سویه‌های جداسازی شده که توانایی رشد در حضور نیکل و وانادیوم را داشتند هاله تشکیل نشد و در آن‌هایی که توانایی نداشتند هاله‌هایی با قطرهای مختلف شکل گرفت که در جداول زیر نتایج بررسی ۱۲ کلنی از بهترین نمونه‌ها ارائه شده است. لازم به‌ذکر است که برای نام‌گذاری باکتری‌های جدا شده از آب از کد PGW (Persian Gulf Water) و برای باکتری‌های جدا شده از رسوب از کد PGS (Persian Gulf Sediment) استفاده شد.

جدول ۱: نتایج چاهک‌گذاری باکتری‌های جدا سازی شده در غلظت ppm ۳۰۰ از فلز نیکل برحسب میلی‌متر

باکتری کد	محل جدا سازی	قطر منطقه ممانعتی بر حسب میلی‌متر			
		۱۰میکرولیتر	۲۰میکرولیتر	۳۰میکرولیتر	۵۰میکرولیتر
PGW۱	آب	۱۹	۲۳	۲۷	۲۹
PGW۲	آب	۱۲	۱۴	۱۸	۲۱
PGS۳	رسوب	۰	۰	۰	۷
PGS۴	رسوب	۰	۰	۰	۰
PGW۵	آب	۶	۱۰	۱۴	۱۶
PGS۶	رسوب	۰	۰	۵	۸
PGW۷	آب	۲	۵	۷	۱۲
PGS۸	رسوب	۰	۴	۶	۹
PGW۹	آب	۲۱	۲۳	۲۷	۳۲
PGS۱۰	رسوب	۰	۰	۰	۰
PGW۱۱	آب	۲	۵	۷	۱۱
PGW۱۲	آب	۰	۰	۷	۱۳

در بررسی اثر بازدارندگی نیکل با تست چاهک‌گذاری، در منطقه ۵۰ میکرولیتر بزرگ‌ترین قطر هاله متعلق به باکتری شماره PGW۹ و کم‌ترین قطر هاله از آن باکتری شماره PGS۳ بوده است. باکتری‌های شماره (PGS۱۰ و PGS۴) فاقد هاله بودند و قادر به رشد کامل در برابر فلز نیکل بودند.

جدول ۲: نتایج چاهک‌گذاری باکتری‌های جداسازی شده در غلظت ppm ۲۵۰ از فلزوانادیوم بر حسب میلی‌متر

باکتری کد	محل جدا سازی	قطر منطقه ممانعتی بر حسب میلی‌متر			
		۱۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۳۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
PGW۱	آب	۲	۶	۸	۱۳
PGW۲	آب	۴	۹	۱۳	۱۹
PGS۳	رسوب	۰	۴	۱۰	۱۴
PGS۴	رسوب	۰	۰	۰	۰
PGW۵	آب	۱۲	۱۶	۲۱	۲۵
PGS۶	رسوب	۸	۱۱	۱۴	۱۹
PGW۷	آب	۶	۹	۱۳	۱۸
PGS۸	رسوب	۰	۰	۰	۶
PGW۹	آب	۴	۶	۱۲	۱۷
PGS۱۰	رسوب	۰	۰	۰	۰
PGW۱۱	آب	۷	۱۳	۱۹	۲۳
PGW۱۲	آب	۰	۰	۳	۸

در آزمایش اثر بازدارندگی وانادیوم در منطقه ۵۰ میکرولیتر بیش‌ترین قطر هاله متعلق به باکتری شماره PGW۵ و کم‌ترین قطر از آن باکتری شماره PGS۸ بود، عدم تشکیل هاله در باکتری‌های شماره (PGS۱۰ و PGS۴) مشاهده شده است.

همان‌طورکه در جداول ۱ و ۲ ذکر شده است در روش چاهک‌گذاری فقط ۲ عدد از این باکتری‌ها به‌صورت مشترک توان رشد در حضور فلز نیکل در غلظت ppm۳۰۰ و در برابر فلز وانادیوم در غلظت ppm۲۵۰ با حجم ۵۰ میکرولیتر را داشتند و بدون هاله بودند اما بقیه باکتری‌ها در حضور فلزات سنگین با هاله همراه بودند.

نتایج روش کمی

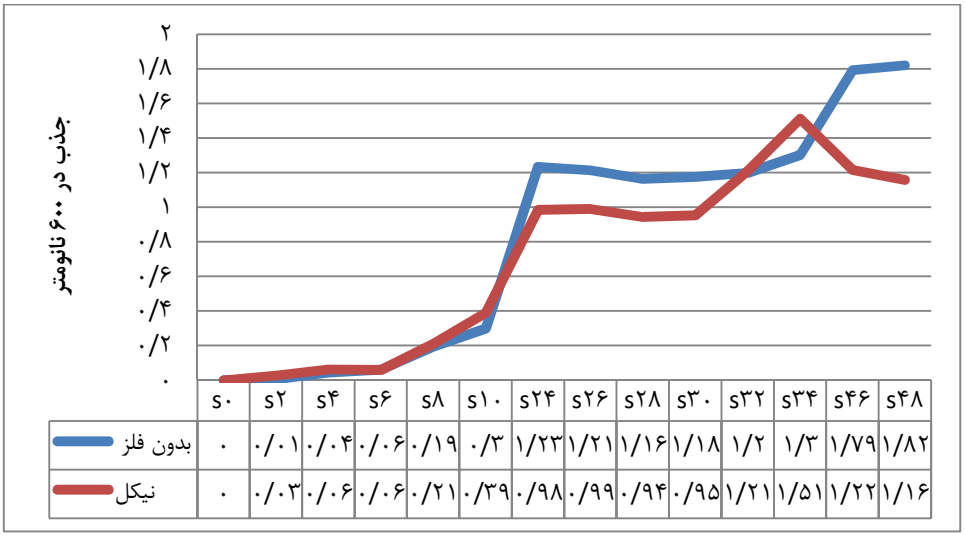
غلظت‌های متفاوتی از فلزات نیکل و وانادیوم به‌طور مجزا که شامل (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ ppm) بودند، انتخاب گردیدند، که تمامی غلظت‌ها به‌طور جداگانه برای باکتری‌ها تکرار و مورد تست قرار گرفتند. نتایج تست برای فلزات سنگین نیکل و وانادیوم به‌طور مشترک در ۱۲ نمونه جدا شده در ذیل ذکر شده است :

به‌طور مشترک برای هر دو فلز، در غلظت ppm۳۵۰ در لوله اول، در هیچ یک از باکتری‌ها و در غلظت ppm۳۰۰ یک باکتری توان رشد در حضور فلز نیکل را در تمامی لوله‌ها را داشتند. و در غلظت ppm۲۵۰ در دو باکتری و در غلظت ppm ۲۰۰ در چهار باکتری و در غلظت ppm۱۵۰در چهار باکتری و در ppm۱۰۰ و ppm۵۰ در پنج باکتری در تمامی لوله‌ها رشد مشاهده شد.

باکتری‌های PGS۴ و PGS۱۰ در غلظت ppm ۳۰۰ برای فلز نیکل و غلظت ppm ۲۵۰ برای فلز وانادیوم توان رشد را داشتند. این باکتری‌ها که نمونه‌های جدا شده از رسوب بودند توان رشد بالایی در حضور فلزات سنگین را داشتند.

نتایج بررسی پتانسیل باکتری‌ها در جذب فلزات نیکل و وانادیوم

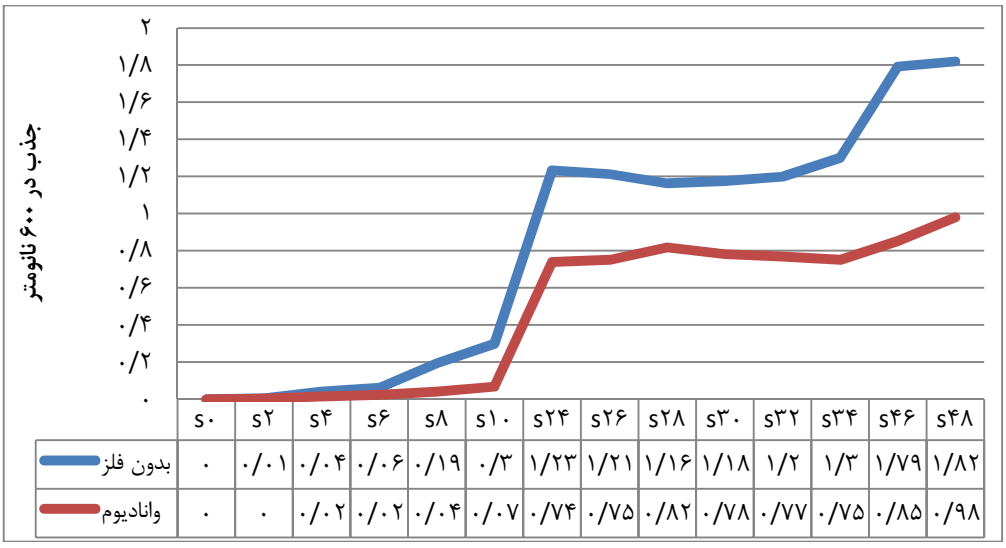
در این روش با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر UV در طول موج ۶۰۰ نانومتر با فاصله هر دو ساعت رشد باکتری‌ها در حضور و عدم‌حضور فلزات سنگین نیکل و وانادیوم، در محیط مایع سنجش شد. منحنی سنتیک رشد باکتری طی ۴۸ ساعت در حضور فلزات سنگین و عدم حضور فلزات در شکل‌های ۱، ۲، ۳و ۴ بررسی و لحاظ شد. همین‌طور جذب فلزات توسط باکتری‌ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی بررسی و نتایج مربوط در جداول ۳، ۴ و ۵ ذکر شده است.



	s۰	s۲	s۴	s۶	s۸	s۱۰	s۲۴	s۲۶	s۲۸	s۳۰	s۳۲	s۳۴	s۴۶	s۴۸
بدون فلز	۰	۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۱۹	۰/۳	۱/۲۳	۱/۲۱	۱/۱۶	۱/۱۸	۱/۲	۱/۳	۱/۷۹	۱/۸۲
نیکل	۰	۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۲۱	۰/۳۹	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۹۴	۰/۹۵	۱/۲۱	۱/۵۱	۱/۲۲	۱/۱۶

شکل ۱: نمودار سنتیک رشد سویه PGS۴ در حضور و عدم حضور فلز نیکل در بازه‌های زمانی مختلف با غلظت ۳۰۰ppm

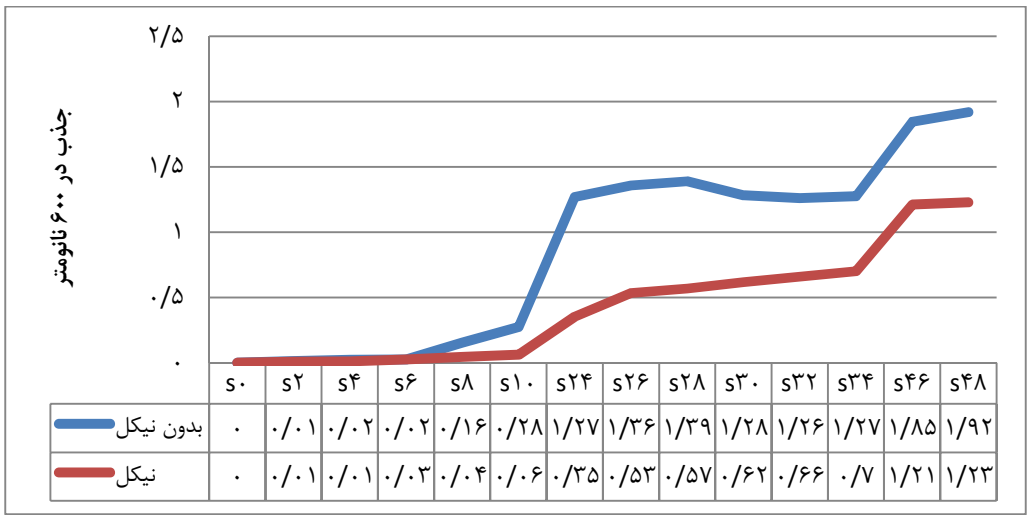
در شکل ۱ در هر دو حالت (در حضور نیکل و بدون حضور فلز نیکل) سویه PGS۴ تا ساعت ۱۰ رشد خیلی کمی داشت، اما از ساعت ۱۰ تا ۲۴ رشد لگاریتمی بود، ولی از ساعت ۲۴ تا ساعت ۳۴ در محیطی که بدون فلز بود رشد باکتری خیلی کم و تقریباً متوقف شد، و سپس از ساعت ۳۴ تا ۴۶ باکتری رشد لگاریتمی داشت و بعد از آن رشد متوقف و ثابت شد. اما در محیطی که دارای فلز نیکل بود از ساعت ۲۴ تا ۳۰ رشد در حد کم و ثابت ماند ولی از ساعت ۳۰ رشد لگاریتمی شروع و تا ساعت ۳۴ ادامه پیدا کرد و بعد از آن رشد متوقف و از تعداد باکتری‌ها کاسته شد.



	s۰	s۲	s۴	s۶	s۸	s۱۰	s۲۴	s۲۶	s۲۸	s۳۰	s۳۲	s۳۴	s۴۶	s۴۸
بدون فلز	۰	۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۱۹	۰/۳	۱/۲۳	۱/۲۱	۱/۱۶	۱/۱۸	۱/۲	۱/۳	۱/۷۹	۱/۸۲
وانادیوم	۰	۰	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۷۴	۰/۷۵	۰/۸۲	۰/۷۸	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۹۸

شکل ۲: نمودار سنتیک رشد سویه PGS۴ در حضور و عدم حضور فلز وانادیوم در بازه‌های زمانی با غلظت ۲۵۰ppm

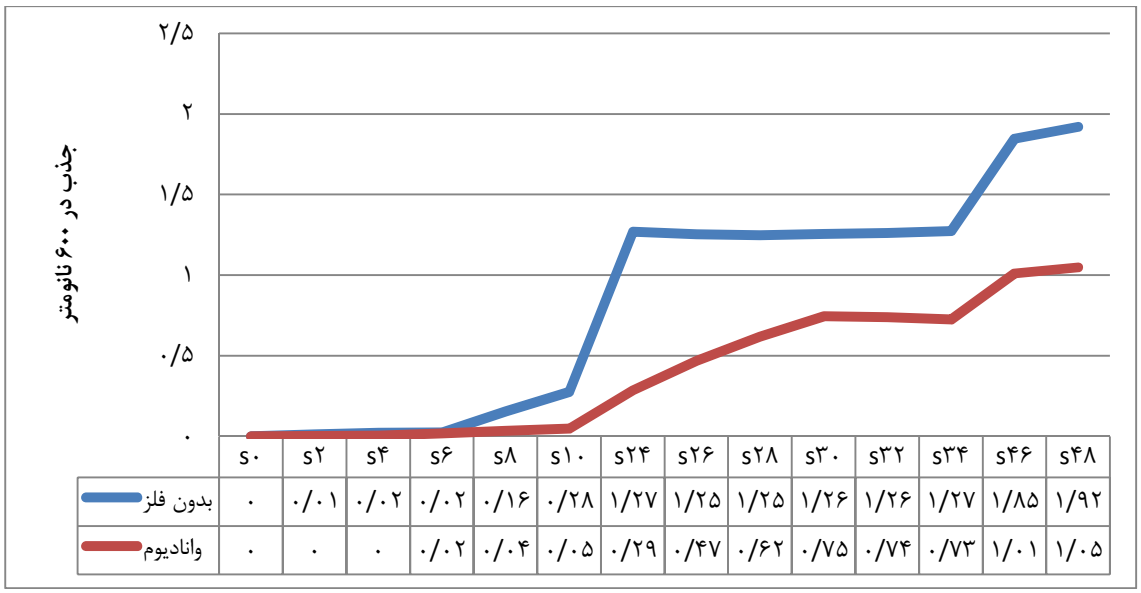
در شکل ۲ زمانی که محیط دارای فلز وانادیوم و بدون فلز بود تا ساعت ۱۰ رشد کمی داشتند ولی از ساعت ۱۰ تا ۲۴ رشد لگاریتمی باکتری ادامه پیدا کرد. درساعت ۲۴ رشد متوقف و تا ساعت ۳۴ ادامه پیدا کرد، و سپس از ساعت ۳۴ تا ۴۶ در محیط بدون فلز باکتری رشد لگاریتمی داشت و بعد از آن رشد متوقف و ثابت شد، اما در محیطی که همراه با فلز بود از ساعت ۳۴ تا ۴۸ رشد کمی داشت.



	s۰	s۲	s۴	s۶	s۸	s۱۰	s۲۴	s۲۶	s۲۸	s۳۰	s۳۲	s۳۴	s۴۶	s۴۸
بدون نیکل	۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۱۶	۰/۲۸	۱/۲۷	۱/۳۶	۱/۳۹	۱/۲۸	۱/۲۶	۱/۲۷	۱/۸۵	۱/۹۲
نیکل	۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۳۵	۰/۵۳	۰/۵۷	۰/۶۲	۰/۶۶	۰/۷	۱/۲۱	۱/۲۳

شکل ۳: نمودار سنتیک رشد باکتری PGS۱۰ در حضور و عدم حضور فلز نیکل در بازه‌های زمانی با غلظت ۳۰۰ppm

در شکل ۳ در حضور فلز نیکل و بدون حضور نیکل باکتری PGS۱۰ تا ساعت ۱۰ رشد خیلی کمی داشتند و از ساعت ۱۰ تا ۲۴ در محیطی که خالی از فلز نیکل بود رشد باکتری لگاریتمی بود و پس از آن تا ساعت ۳۴ رشد کم و متوقف شد ولی از ساعت ۳۴ تا ۴۶ رشد لگاریتمی داشت و از ۴۶ به بعد رشد متوقف و ثابت شد. اما در محیطی که دارای فلز نیکل بود از ساعت ۱۰ تا ساعت ۲۶ رشد لگاریتمی داشت و بعد از آن تا ساعت ۳۴ رشد کمی داشت و رشد لگاریتمی دیگری از ساعت ۳۴ تا ۴۶ داشت و بعد از این ساعت رشد ثابت شد.



	s۰	s۲	s۴	s۶	s۸	s۱۰	s۲۴	s۲۶	s۲۸	s۳۰	s۳۲	s۳۴	s۴۶	s۴۸
بدون فلز	۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۱۶	۰/۲۸	۱/۲۷	۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۶	۱/۲۶	۱/۲۷	۱/۸۵	۱/۹۲
وانادیوم	۰	۰	۰	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۲۹	۰/۴۷	۰/۶۲	۰/۷۵	۰/۷۴	۰/۷۳	۱/۰۱	۱/۰۵

شکل ۴: نمودار سنتیک رشد باکتری PGS۱۰ در حضور و عدم حضور فلز وانادیوم در بازه‌های زمانی با غلظت ۲۵۰ppm

در شکل ۴ زمانی که محیط دارای فلز وانادیوم و بدون فلز بود تا ساعت ۱۰ رشد کمی داشتند ولی در محیطی که بدون فلز وانادیوم بود از ساعت ۱۰ تا ۲۴ رشد لگاریتمی باکتری داشت و درساعت ۲۴ رشد متوقف و تا ساعت ۳۴ ادامه پیدا کرد، و سپس از ساعت ۳۴ تا ۴۶ باکتری رشد لگاریتمی داشت و بعد از آن رشد متوقف و ثابت شد، اما در محیطی که همراه با

فلز بود از ساعت ۱۰ تا ۳۰ رشد لگاریتمی بود و از ساعت ۳۰ تا ساعت ۳۴ رشد باکتری کم و ثابت شد ولی از ساعت ۳۴ تا ۴۶ رشد لگاریتمی داشت و پس از آن رشد ثابت شد.

نتایج حاصل از سنجش غلظت فلزات سنگین نیکل و وانادیوم باقی مانده در محیط کشت مایع

جدول ۳: غلظت فلز نیکل و وانادیوم باقیمانده بر حسب ppm در مجاورت سوش‌های باکتریایی جدا شده از خارک- خلیج فارس

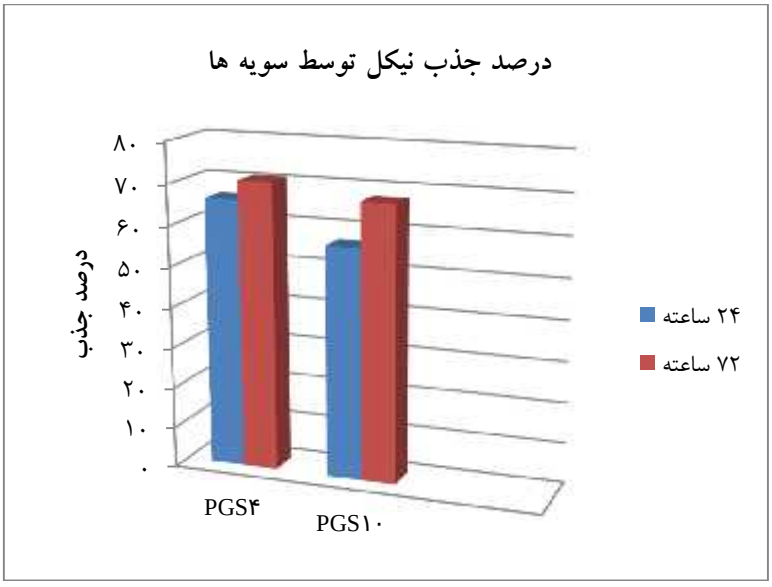
باکتری		PGS۴		PGS۱۰	
فلز	بازه زمانی	۲۴ ساعته	۷۲ساعته	۲۴ ساعته	۷۲ساعته
نیکل		۷۴/۵۴	۵۸/۱۶	۸۶/۳۹	۶۶/۰۱
وانادیوم		۸۴/۷۵	۷۳	۱۰۸/۲۳	۸۱/۰۴

در بین دو سویه باکتریایی، سویه PGS۴ در ۲۴ و ۷۲ ساعت کم‌ترین غلظت از نیکل و سویه PGS۱۰ در دو بازه زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت بیش‌ترین غلظت نیکل را در محیط کشت داشتند و همین‌طور به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین غلظت وانادیوم در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت متعلق به سویه‌های PGS۴ و PGS۱۰ بود.

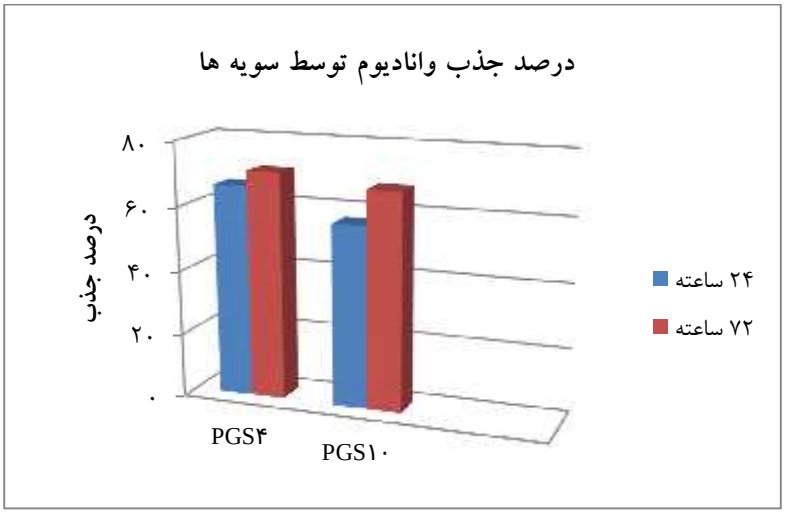
جدول ۴: درصد جذب فلزات نیکل و وانادیوم توسط سوش‌های باکتریایی در محیط کشت مایع

باکتری		PGS۴		PGS۱۰	
فلز	بازه زمانی	۲۴ ساعته	۷۲ساعته	۲۴ ساعته	۷۲ساعته
نیکل		۷۵/۱۵	۸۰/۶۱	۷۱/۲۰	۷۷/۹۹
وانادیوم		۶۶/۰۸	۷۰/۸۰	۵۶/۷۰	۶۷/۵۸

بیش‌ترین جذب فلز نیکل و وانادیوم در ۲۴ و ۷۲ ساعت متعلق به سویه PGS۴ بود.(شکل‌های۵ و۶)



شکل ۵: نمودار درصد جذب نیکل در ۲۴ و ۷۲ ساعت توسط سویه‌های باکتریایی جدا شده از رسوب



شکل ۶: نمودار درصد جذب وانادیوم در ۲۴ و ۷۲ ساعت توسط سویه‌های باکتریایی جدا شده از رسوب

نتایج مربوط به تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های جداشده

جدول ۵: مشخصات بیوشیمیایی سویه‌های جدا شده از رسوب

تست	سویه	PGS۴	PGS۱۰
تخم مرغ		-	+
S-citrat		-	+
MR		-	-
VP		-	-
تولید اندول		-	-
رشد در ۷٪ نمک		-	+
نشاسته		+	+
کازئین		+	+
ژلاتین		+	+
اوره آز		-	-
گلوکز		+	+
مانیتول		+	-
گزیلوز		+	-
آرابینوز		+	-

نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی بیانگر آن است که سوش‌های باکتریایی PGS۴ و PGS۱۰ متعلق به خانواده *Bacillus sp.* می‌باشند.

بحث

منطقه خارک در خلیج فارس به‌دلیل موقعیت استثنایی خود که محل احداث تعداد بسیار زیادی پالایشگاه‌های نفت و کارخانجات پتروشیمی است، به‌طور مستقیم و غیرمستقیم درمعرض ورود آلاینده‌های مختلف آلی و معدنی قرار دارد.

یکی از روش‌هایی که برای بررسی حذف مواد سمی و فلزات سنگین کاربرد دارد حذف زیستی است. شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات سنگین نقش مهمی در رابطه با آلودگی محیط و نهایتاً تیمار این محیط‌ها ایفا می‌کنند. با توجه به سطوح غلظت بسیار بالای برخی از فلزات در پساب‌ها و به‌طورکلی در محیط‌های آلوده به فلز، باکتری‌ها مکانیسم‌های

مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی می‌شوند. معمولاً این میکروارگانیسم‌ها در نتیجه تماس با محیط‌های آلوده، به فلز ظاهر می‌شوند که محیط‌های آلوده به‌طور اتفاقی می‌توانند باعث انتخاب هم‌زمان فاکتورهای مقاومت با تحول و دگرگونی در ساختار ژنتیکی باکتری یا تغییر در عملکرد باکتری شوند. بر حسب میزان آلودگی ممکن است ظرفیت پلاسمیدی یا ساختار سلولی آن‌ها تغییر یابد تا آن‌جا که قدرت تحمل غلظت‌های بالاتر ترکیبات سمی را داشته باشند و به‌عبارت دیگر با غلظت‌های بالاتر نیز سازگاری پیدا کنند. از طرف دیگر باکتری‌های مقاوم قادرند با انتقال عناصر ژنتیکی به سویه‌های دیگر سبب گسترش مقاومت گردند (Verma و همکاران، ۲۰۰۱؛ Sabri و همکاران، ۱۹۹۷).

در این مطالعه همان‌طور که نتایج آزمایش تعبیه چاهک نشان می‌دهد بیش‌تر تعداد باکتری‌های جداسازی شده، توانایی رشد در اطراف چاهک حاوی فلزات سنگین نیکل و وانادیوم در غلظت‌های خیلی بالاتر از حد استاندارد را از خود نشان دادند. شاخص رشد یعنی عدم تشکیل هاله و ایجاد کدورت در اطراف چاهک حاوی فلز سنگین، به‌عنوان نمادی از توان استفاده از باکتری‌های جداسازی شده است. بنابراین می‌توان میکروارگانیسم‌های رشد یافته در اطراف چاهک‌ها را به‌عنوان میکروارگانیسم‌های جذب کننده نیکل و وانادیوم در نظر گرفت. Pumpel و همکاران (۱۹۹۵) برای ایزوله باکتری‌های جذب‌کننده نقره از روش کیفی استفاده کردند که اطراف چاهک باکتری‌هایی که توانایی جذب فلز را داشتند هاله ایجاد نشد.

از ۱۲ جدایه باکتریایی به‌دست آمده در مرحله چاهک‌گذاری که بهترین رشد را داشتند برای انجام تست MIC انتخاب شده بودند. از میان نمونه‌های مذکور فقط یک سویه قادر به رشد در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر از فلز نیکل و در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر در دو باکتری، در تمامی لوله‌ها رشد مشاهده شد. بالاترین گزارشی که در این خصوص اعلام شد توسط Selatnia و همکاران (۲۰۰۲) بود که عنوان کردند که باکتری *Streptomyces rimousus* پیش تیمار شده با NAOH، در دمای محیط و غلظت اولیه محلول فلزی نیکل ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر با زیست توده معادل با ۳ گرم در لیتر بوده است و همین‌طور Abu-Shanab و همکاران (۲۰۰۷) مقدار جذب وانادیوم توسط *Staphylococcus aureus* را تا ۲۵ میلی‌گرم در لیتر اعلام کردند. تحقیقی که بر روی یک خاک آلوده با نیکل انجام شد، ۵۵/۵ درصد از باکتری‌های مقاوم به فلز نیکل میانگین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد برابر ۱۵ میلی‌مول بر لیتر داشت.

در سال‌های اخیر، تنوعی از گونه‌های باکتریایی که در تجمع فلزات مختلف نقش دارند توسط محققین شرح داده شد. Hussein و همکاران (۲۰۰۵) گونه‌هایی از جنس سودوموناس را از پساب جدا کردند که گروهی از آن‌ها نسبت به Cr و Cu به‌میزان ۳ میلی‌مول بر لیتر ، Ni به‌میزان ۵ میلی‌مول بر لیتر و هم‌چنین Cd به‌میزان ۱۰ میلی‌مول بر لیتر مقاوم بودند و همین‌طور خنافری و همکاران (۱۳۸۶) از جنس *Bacillus putida* با ضریب تجمع Ni (۶-۵٪) و کادمیوم (۴۰٪-۵۰) در غلظت ppm ۵۰ و*Bacillus cereus* با ضریب تجمع V(۱۲-۱۰٪) در غلظت ppm ۴۰ ایزوله شده و یک سویه *Pseudoal Kaligenes p.* با ضریب جذب هر سه فلز (۳۲٪ V و۱۷٪ Ni و۶۰٪Ca) در غلظت ppm ۱۰۰ جداسازی و شناسایی شد، ولی در این تحقیق دو سویه *Bacillus sp.* PGS۴ و *Bacillus sp.* PGS۱۰ در غلظت ppm ۳۰۰ از فلز نیکل به ترتیب توانایی جذب ۸۰/۶۱ ٪ و۷۷/۹۹٪ و در غلظت ppm ۲۵۰ از فلز وانادیوم به‌ترتیب مقدار جذب ۷۰/۸۰٪ و۶۷/۵۸٪ را دارا بودند، جداسازی و شناسایی شد که این میزان جذب با نتایج محققین فوق غیرقابل قیاس می‌باشد. علت مقاومت بیش از حد باکتری‌ها، مربوط به محل جداسازی آن‌ها است که نتایج بیانگر این موضوع است که، باکتری‌ها با گذشت زمان با ایجاد جهش مقاومت و سازگاری لازم با غلظت‌های بالایی از فلزات را پیدا کرده‌اند. همین‌طور خاصیت اسپورزایی شان، باعث ماندگاری این خانواده از باکتری‌ها در شرایط سخت و با آلودگی زیاد شده است و با توجه به نمک دوست بودن این باکتری‌ها و نیاز طبیعی‌شان به غلظت‌های بالایی از آنیون و کاتیون برای رشد و خصوصیت گرم مثبت بودن و دارا بودن غشای سلولی ساده، باعث نفوذپذیری بیش‌تری از فلزات سنگین و آلاینده‌های معدنی به داخل غشاء سلولی در این خانواده شده است. عموماً در میکروبیولوژی به‌منظور یافتن میکروارگانیسمی با فعالیت خاص، مکان‌هایی مد نظر قرار می‌گیرند که با داشتن شرایط محیطی ویژه، القاء این فعالیت خاص را موجب گردند (Korda و همکاران، ۱۹۹۷). اهمیت این تحقیق در مقایسه با مطالعات انجام یافته دیگر، جداسازی گونه‌هایی از خانواده *Bacillus* از نمونه‌های رسوب با توانایی کاهش همزمان غلظت‌های بالایی از نیکل و وانادیوم بود.

باکتری‌های جدا شده در این تحقیق از مقاومت بالایی نسبت به فلزات سنگین برخوردارند. چنین سازگاری و

مقاومتی به‌دلیل زیست در محیط‌های دارای فلزات سنگین و آلاینده‌های معدنی می‌باشد، به‌طوری که حضور فلزات به‌عنوان یک عامل انتخابی عمل کرده و باعث حذف باکتری‌های حساس به فلز و رشد و افزایش باکتری‌های مقاوم شده است.

با بررسی‌ها و مطالعه‌های بیش‌تر باکتری‌های مقاوم به فلز می‌توان از چنین باکتری‌هایی در تصفیه زیستی پساب‌ها و کاهش COD آن‌ها استفاده نمود.

منابع:

۱. **امتیازجو، م.، ۱۳۷۴.** جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت دریای خزر. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال. ۱۴۵ صفحه.

۲. **اشرفی، ف.، ۱۳۸۵.** میکروب شناسی عملی، انتشارات احسن. ۴۰۰ صفحه.

۳. **خنافری، الف.؛ شیردم، ر. و طباطبایی، الف.، ۱۳۸۶.** جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی با توانایی کاهش سه فلز کادمیوم، وانادیوم و نیکل از تالاب انزلی به‌منظور پاکسازی زیستی. فصلنامه محیط زیست، شماره ۴۴.

۴. **یارکه‌سلخوری، ر.، ۱۳۸۸،** حذف زیستی فلزات سنگین با استفاده از سویه‌های سارکروماسیس سرویزیه تثبیت شده و یا سویه‌هایی با سرعت ته‌نشینی زیاد، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۳۷ صفحه.

۵. **Ajay Babu, P.; Srinivas Kumar, P.; Padmaja, P.; Khageswara Rao. T. and Chitti, S., ۲۰۰۹.** MIC database: A collection of antimicrobial compounds from literature. Translational Research Institute of Molecular Sciences. ۲: ۳۵-۷۲.

۶. **Abou-Shanab, R.A.I.; Berkum, P.V. and Angle, J.S., ۲۰۰۷.** Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria presenting Ni-rich Serpentine soil and in the rhizosphere of Alyssum murale. Chemosphere. ۶۸: ۳۶۰-۳۶۷.

۷. **Korda, A.; Santas, P.; Tenente, A. and Santas, R., ۱۹۹۷.** Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commerical microorganisms currently used. Appl. Microbiol. Biotechnol. ۴۸: ۶۷۷-۶۸۶.

۸. **Camargo, F.A.O.; Okeke, B.C.; Bento. F.M. and Frankenberger, W.T., ۲۰۰۵.** Diversity of chromium resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. Applied Soil Ecology. ۲۹: ۱۹۳-۲۰۲.

۹. **Cabrera, G.; Gomez, J.M. and Cantero, D., ۲۰۰۵.** oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions. Enzyme and microbial Technology. ۳۶: ۳۰۱-۳۰۶.

۱۰. **Dabiri, M., ۲۰۰۸.** Environmental pollution, Air, Water, Soil and Noise ۶th Ed, Tehran: etehad. PP. ۲۸۱-۲۸۹.

۱۱. **Hussein, H.; Farag, S.; Kandeel, K. and Moawad, H., ۲۰۰۵.** Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas sp*. Electronic Journal of Biotechnology. Vol. ۷, ۱, ۷۱۱-۷۱۴.

۱۲. **Li, Q.; Kang, C. and Zhang, C., ۲۰۰۵.** Waste water produced from an oilfield and continuous treatment with and oil-degrading bacterium. Process Biochem. ۴۰: ۸۷۳-۸۷۷.

۱۳. **Paul, D.; Pandey, G.; Pandey, J. and Rakesh, K., ۲۰۰۵.** Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. Trends in Biotechnology. ۲۳: ۱۳۵-۱۴۲.

۱۴. **Sabry, S.A.; Ghozian, H.A. and Abou-zeid, D.M., ۱۹۹۷.** Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. J. Appl. Microb. ۸۲: ۲۴۵-۲۵۲.

۱۵. **Singleton, P. and Sainsbury, D., ۱۹۹۵.** Dictionary of microbiology and molecular biology. Microbial Rev. ۶۴: ۵۲۴-۵۳۱.

۱۶. **Selatnia, A.; Boukazoula, A.; Kechid, N.; Bakhti, M.Z.; Chergui, A. and Kerchich, Y., ۲۰۰۲.** Solution by a Bacteria Dead *Streptomyces* Biomass. Biochemiclal Engineering jornal. ۱۹: ۱۲۷-۱۳۵.

۱۷. **Talaie, A.R.; Jafarzadeh, N. and Talaie, M.R., ۲۰۰۸.** Optimization biodegradation of floating diesel fuel contaminated wastewater using the tagochi method. Journal of Water & Wastewater. ۲۰: ۵۷-۶۸.

۱۸. **Vijayaraghavan, K. and Yun, Y., ۲۰۰۸.** Bacterial Boisorbents and Biosorption. Jornal of Biotechnology Advances. ۲۶: ۲۶۶-۲۹۱.

۱۹. **Verma, T.; Srinath, T.; Gadpayle, R.U.; Ramteke, P.W. and Hans, R.K., ۲۰۰۱.** Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. Bioresource Technology. ۷۸: ۳۱-۳۵.

۲۰. **Zhaohui, X.U.; Weon, B.; Mulchandani, A.; Rajesh, K. and Chen, W., ۲۰۰۲.** Heavy metal

removal by novel CBD-EC۲۰ sorbents immobilized on cellulose. Biomacromolecules. ۳۴: ۶۲-۴۶۵.

۲۱. **Pumpel, T.; B.Pernfub, B.; Pigher, L. and Schinner, F., ۱۹۹۵.** Arapid screening method for the isolation of metal – accumulating microogranisms. Journal of industrial Microbiology. ۱۴: ۲۱۳-۲۱۷.

۲۲. **Lyer, A.; Mody, K. and Bhavanath, J., ۲۰۰۴.** Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. Marine Pollution Bulletin. ۵۰: ۳۴۰-۳۴۳.

۲۳. **Bergey, D.H.; Staleey, T.J.; King, R.N.; Brenner, D. and Bergey, S., ۲۰۰۵.** Manual of Systematic Bacteriology. ۶th Ed. New York: Springer.

۲۴. **Alluri, H.K., ۲۰۰۷**. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. African Journal of Biotechnology. Vol. ۶, No. ۲۵, PP. ۲۹۲۴-۲۹۳۱.

۲۵. **Iddou, A. and Oualib, M.S., ۲۰۰۸**. Waste-activated sludge (WAS) as Cr (III) sorbent biosolid from wastewater effluent. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. ۶۶: ۲۴۰–۲۴۵.

۲۶. **Chojnacka, K.; Chojnacki, A. and Gorecka, H., ۲۰۰۵**. Biosorption of Cr۲+, Cr۳+ and Cu۲+ ions by blue۲ green algae *spirulina sp*: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. Chemosphere. ۵۹: ۷۵-۸۴.

۲۷. **Ilhan, S., ۲۰۰۴.** Removal of chromium, lead and copper ions from industrial wastewaters by *S. Sarpophiticus*. Turkish electronic jurnal & biltechnology J. Chem. Technol. Biotechnol. ۶۲: ۲۷۹-۲۸۸.

۲۸. **Nies, D.H., ۲۰۰۳.** Efflux-medital heavy metal resistance in prokaryotes. FEMES Microbiol. ۲۲: ۳۱۳-۳۳۹.

۲۹. **Pradhan,S.andRai,L.C.,۲۰۰۱**. Biotechnological potential of *Microcystis sp*. In Cu, Zn and Cd biosorption from nsingle and multimetallic systemes. Biometals. ۱۴: ۶۷-۷۴.

۳۰. **Ventosa, A.; Nieto, J.J. and Oren, A., ۱۹۹۸.** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Review. ۶۲: ۵۰۴-۵۴۴.