



Biological Journal of Microorganism

11 Year, No.43, Autumn 2022

Received: 2021-11-03

Accepted: 2022-01-25

(Research Paper)

Lead Biosorption and Biosynthesis of Lead Nanoparticles by *Bacillus Tropicus* Isolated from Soils Containing Electronic Wastes in Isfahan

Fateme Moeini

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, f.moeini2040@gmail.com

Monir Doudi*

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, monirdoudi@yahoo.com

Zarrindokht Emami Karvani

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, zarrindokht20@gmail.com

Masoud Fouladgar

Department of Chemistry, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, fouladgar@gmail.com

Abstract

Introduction: Electronic wastes are the remnants of electronic devices buried in the soil without processing and contain toxic substances such as heavy metals. Lead is one of the heavy metals in many electronic goods that, if not properly processed, can cause toxicity in the soil and may harm living things in very low concentrations. Therefore, the aim of the present study was to investigate the biosorption of lead metal by *Bacillus tropicus* isolated from soils containing electronic wastes in Isfahan.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, sampling of contaminated soils in several areas of the Zainal Pass hills of Isfahan, which is the landfill of electronic wastes, was performed. After measuring the temperature, pH, TOC, and the amount of metals in the soil sample, lead-resistant bacteria were isolated. The growth rate of bacteria was evaluated at

* Corresponding author



concentrations of 5 to 35 mM of lead. Then, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. The morphology, antibiogram, and molecular identification of the bacteria were performed by colony-polymerase chain reaction method and bioabsorption of bacteria was evaluated by ICP-OES. Finally, XRD, SEM images, and EDS were evaluated to investigate the fabrication of lead nanoparticles. The raw data were analyzed by SPSS software, using an independent t-test.

Results: Based on the findings of this study, the pH of the evaluated soil was 9.4, its temperature was 27.8 ° C, the TOC of the sample was 1.8%, and the amount of soil lead was measured at 658.4 ppm based on ICP-OES analysis. It was significantly higher than normal. The lead-resistant bacterial strain isolated to lead had 99/69% genetic affinity with *Bacillus tropicus*, which had a high biological removal potential (56.35%) of lead metal. The XRD, SEM, and EDS results showed the conversion of adsorbed lead metal to nanoparticles.

Discussion and Conclusion: Considering that *Bacillus tropicus* showed high resistance and adsorption to lead metal, it can be a suitable option for the bio-removal of lead from electronic and other industrial wastes in the future after the removal of antibiotic resistance genes.

Key words: Lead-resistant Bacteria, Nanoparticle Biosynthesis, Electronic Waste, Biosorption



فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال یازدهم، شماره ۴۳، پاییز ۱۴۰۱، صفحه: ۴۵ - ۶۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵

مقاله پژوهشی

جذب زیستی و بیوستنز نانوذرات سرب توسط باسیلوس ترورپیکوس جداشده از خاک‌های حاوی پسماندهای الکترونیکی در اصفهان

فاطمه معینی: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، f.moeini2040@gmail.com

منیر دودی*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، monirdoudi@yahoo.com

زرین‌دخت امامی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، zarindokht20@gmail.com

مسعود فولادگر: دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، fouladgar@gmail.com

چکیده

مقدمه: پسماندهای الکترونیکی به بقایای دستگاه‌های الکترونیکی گفته می‌شود که بدون پردازش در خاک دفن می‌شوند و حاوی مواد سمی مانند فلزات سنگین هستند. سرب، یکی از فلزات سنگین موجود در بسیاری از کالاهای الکترونیکی است که در صورت عدم پردازش صحیح کالاهای، در خاک جمع می‌شود و سمیت ایجاد می‌کند و ممکن است در غلظت‌های بسیار کم به موجودات زنده آسیب برساند؛ بنابراین هدف از این مطالعه بررسی جذب زیستی سرب توسط باسیلوس ترورپیکوس جداشده از خاک‌های حاوی پسماندهای الکترونیکی در اصفهان بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، نمونه‌گیری از خاک‌های آلوده چندین منطقه از تپه‌های گردنه زینل اصفهان انجام شد که محل دفن پسماندهای الکترونیکی است و پس از اندازه‌گیری دما، pH، TOC و میزان فلزات در نمونه خاک‌ها، جداسازی باکتری‌های مقاوم به سرب، انجام و میزان رشد باکتری‌ها در غلظت‌های ۵ تا ۳۵ میلی‌مولار سرب بررسی شد. سپس حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. بررسی مورفولوژی، آنتی‌بیوگرام و شناسایی مولکولی باکتری مدنظر به روش کلنی - واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، انجام و جذب

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.131079.1423](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.131079.1423)



[20.1001.1.23225173.1401.11.43.5.6](https://doi.org/10.1001.1.23225173.1401.11.43.5.6)

زیستی باکتری با ICP-OES ارزیابی شد؛ در نهایت، به منظور ارزیابی ساخت نانوذرات سرب الگوی XRD، تصاویر SEM و EDS سنجش شدند. داده‌های خام حاصل با نرم‌افزار SPSS، آزمون آماری Independent t-test شد.

نتایج: براساس یافته‌های این پژوهش، pH خاک مورد ارزیابی ۹/۴، دمای آن ۲۷/۸ درجه سانتی‌گراد، TOC نمونه ۱/۸ درصد و میزان سرب خاک براساس آنالیز ICP-OES برابر ۶۵۸/۴ ppm سنجش شد که به‌طور چشمگیری بالاتر از حد طبیعی بود. سوبه باکتریایی جداسازی و شناسایی شده دارای ۹۹/۶۹ درصد قرابت ژنتیکی با *باسیلوس ترئوپیکوس* بود که توان بالایی در حذف زیستی سرب (۵۶/۳۵ درصد) داشت. نتایج الگوی XRD، SEM و EDS نشان‌دهنده تبدیل فلز سرب جذب‌شده به نانوذره بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه *باسیلوس ترئوپیکوس* جداسازی شده در این پژوهش، مقاومت و جذب بالایی را نسبت به سرب از خود نشان داد، در آینده پس از حذف ژن‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان از این سوبه به‌عنوان گزینه مناسبی برای حذف زیستی این فلز از پسماندهای الکترونیکی و سایر پسماندهای صنعتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: باکتری مقاوم به سرب، بیوسنتز نانوذره، پسماندهای الکترونیکی، جذب زیستی

مقدمه

آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین، همراه با پیشرفت صنعتی در سراسر جهان در حال گسترش است. سرب، مس، کروم، کادمیوم و نیکل به‌عنوان متداول‌ترین فلزات سنگین استفاده می‌شوند و گسترش‌یافته‌ترین آلاینده‌های محیط زیست شناخته شده‌اند (۱). شناسایی این فلزات سنگین به‌عنوان کوفاکتورهای واکنش‌های آنزیمی ضروری است؛ اما مقادیر زیاد آنها به‌دلیل مهار واکنش‌های متابولیکی ممکن است باعث سمیت شدید در موجودات زنده شود. میکروارگانیسم‌ها با چندین فرایند از جمله انتقال از طریق غشای سلولی، جذب زیستی از دیواره‌های سلولی و به دام انداختن فلز در کپسول‌های خارج سلولی، رسوب فلز در غشا و دیواره سلولی و واکنش‌های اکسید و احیا به این فلزات سنگین پاسخ می‌دهند (۲). در سال‌های اخیر، تصفیه زیستی فلزات سنگین با استفاده از میکروارگانیسم‌ها، هم به‌عنوان یک نوآوری علمی و هم به‌دلیل کاربرد بالقوه آن در صنعت، بسیار شایان توجه محققان قرار گرفته است. به‌طور کلی از میان روش‌های زیستی، تجمع زیستی و جذب زیستی

به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها کارایی زیادی در دفع فلزات دارند. تجمع زیستی روشی است که در آن از سلول‌ها و میکروارگانیسم‌های زنده به‌منظور جذب فلزات سنگین استفاده می‌شود و جذب زیستی روشی است که در آن از میکروارگانیسم‌های غیرفعال برای دفع فلزات سنگین از محیط استفاده می‌شود (۳، ۴).

پسماندهای الکترونیکی شامل تجهیزات فرسوده الکترونیکی تجاری و خانگی مانند صفحه‌های نمایشگر رایانه‌ها، موبایل، بی‌سیم و بسیاری از وسایل برقی مانند یخچال، تلویزیون، فریزر، ماشین‌های ظرفشویی و لباسشویی و ... هستند (۵). برخی از ترکیبات استفاده‌شده در اجزای الکترونیکی برای انسان سمی‌اند؛ برای مثال، سرب معمولاً در لحیم‌کاری صنایع برق و الکترونیک، باتری‌های اسیدی، اجزای الکترونیکی، روکش سیم‌ها، شیشه‌های لامپ اشعه‌های کاتدی و ... استفاده می‌شود. تماس کوتاه‌مدت با مقادیر بالای سرب می‌تواند باعث ایجاد عوارضی در انسان مانند استفراغ، اسهال، تشنج، کما یا حتی مرگ شود. علائم دیگر آن کاهش اشتها، درد شکم، یبوست، خستگی، بی‌خوابی، تحریک‌پذیری و

سرگرد است. قرار گرفتن در معرض بیش از حد سرب، مانند یک محیط صنعتی، بر کلیه‌ها تأثیر می‌گذارد و این موضوع به‌طور ویژه برای کودکان خردسال خطرناک است؛ زیرا به اعصاب آسیب می‌رساند و باعث اختلالات در خون و مغز می‌شود (۶، ۷).

رزین‌های تبادل یونی^۱ و کربن‌های فعال مدت‌هاست به‌عنوان جاذب‌های تجاری مؤثر برای تصفیه فاضلاب‌های صنعتی حاوی آلاینده‌ها شناخته شده‌اند؛ اما هزینه بالا و کارایی پایین آنها باعث ایجاد محدودیت استفاده تجاری در برنامه‌های حذف صنعتی آنها شده است (۴). توانایی میکروارگانیزم‌ها برای جذب فلزات از محلول‌های آبی از اوایل قرن ۱۸ بررسی شده است؛ اما در سه دهه گذشته استفاده از میکروارگانیزم‌ها به‌عنوان جاذب برای حذف و بازیابی فلزات از محلول‌های آبی درخور توجه بوده است (۸). بسیاری از میکروارگانیزم‌ها مانند باکتری‌ها، مخمرها و جلبک‌ها می‌توانند فلزات محلول را از محیط اطراف به جسم سلولی خود منتقل کنند و برای حذف موفقیت‌آمیز یون‌های فلزات سنگین استفاده شوند. از مزایای عمده جذب زیستی نسبت به روش‌های صنعتی می‌توان به کم هزینه بودن، کارایی بالا، به حداقل رساندن آلودگی‌های شیمیایی، استفاده مجدد از جاذب زیستی و امکان بازیابی فلز اشاره کرد (۹). با توجه به مزایای استفاده از باکتری‌ها به‌منظور کاهش آلودگی فلزات سنگین، هدف از این مطالعه بررسی جذب زیستی سرب توسط باکتری باسیلوس تروپیکوس^۲ جداسازی شده از خاک‌های حاوی پسماندهای الکترونیکی در شهر اصفهان بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در مطالعه حاضر، جمع‌آوری نمونه به‌صورت میدانی و در ظرف استریل درپوش‌دار از

خاک‌های چندین منطقه تپه‌های گردنه زینل واقع در ۳۶ کیلومتری جنوب شرقی شهر اصفهان به مختصات جغرافیایی 36°53'N 51°47'39'E انجام شد که محل دفن پسماندهای الکترونیکی است. اندازه‌گیری دمای خاک در محل جمع‌آوری نمونه، اندازه‌گیری pH آن با نسبت خاک به آب ۱:۲/۵ و میزان کل کربن آلی (TOC^۳) نمونه خاک براساس روش Walkley-Black به‌عنوان روش مرجع با استفاده از دی‌کرومات‌پتاسیم (K₂Cr₂O₇) و H₂SO₄ غلیظ به‌ترتیب با استفاده از دماسنج جیوه‌ای، دستگاه‌های pH متر (Metrohm 827, Swiss) و ANATOC SGETM Series II) TOC analyzer (استرالیا) انجام شد (۱۰، ۱۱). غلظت فلزات با روش طیف‌سنجی انتشار نوری پلاسما به روش القایی (ICP-^۴ OES) (Nikon, Japan) تعیین شد. برای اندازه‌گیری میزان سرب در نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده، ابتدا ۱ گرم نمونه خاک به بشر ۲۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ، ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک و چند قطره اسید سولفوریک غلیظ (همگی با مولاریته ۰/۵) به آن اضافه و روی هیتز (پارس آزما، ایران) قرار داده شد تا به آرامی تبخیر و به‌طور کامل خشک شود. پس از آن، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول EDTA^۵ ۰/۰۱ درصد به آن اضافه و از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ عبور داده شد. محلول باقی‌مانده حاوی یون‌های فلزی بود که با دستگاه ICP سنسجش شد (۱۲).

جداسازی باکتری‌های مقاوم به سرب از نمونه خاک‌های بررسی‌شده: برای اجرای این مرحله از روش انتشار در آگار به‌منظور جداسازی باکتری‌های مقاوم به سرب استفاده شد. در این روش از محیط کشت PHG II آگار حاوی ۴ گرم پیتون، ۱ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار استفاده شد که در یک لیتر آب

مقطر حل و استریل شد. پس از رسیدن دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی‌گراد محلول حاوی نمک نیترات سرب^۶ (مرک، آلمان) با غلظت ۵ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و پس از اختلاط کامل، pH آن روی ۷ تنظیم شد. سپس درون پلیت‌های استریل توزیع شد (۱۲). در ادامه، به‌منظور شمارش تعداد باکتری‌های هتروتروف و مقاوم و برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به سرب، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه‌شده از نمونه خاک به‌ترتیب روی محیط کشت PHG II آگار بدون سرب و PHG II آگار حاوی نمک نیترات سرب با غلظت ۵ میلی‌مولار، به‌صورت چمنی کشت داده شد. پلیت‌ها ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، انکوبه و سپس باکتری‌های هتروتروف و مقاوم به سرب شمارش شدند. در ادامه، باکتری‌های مقاوم به نیترات سرب، به‌منظور غنی‌سازی، انتخاب و در محیط کشت PHG II براث حاوی نیترات سرب با غلظت اولیه کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مرحله خالص‌سازی باکتری‌ها روی محیط کشت PHG II آگار صورت گرفت و به‌منظور نگهداری باکتری‌ها، از محیط کشت PHG II حاوی فلز به‌صورت شیب‌دار استفاده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و رشد باکتری‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۲، ۱۳).

تعیین مقاومت باکتری جداشده نسبت به سرب: برای اجرای این مرحله، مقاومت باکتری‌های جداشده نسبت به غلظت‌های مختلف نیترات سرب (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ میلی‌مولار) روی محیط کشت جامد سنجیده شد تا ضمن مقایسه میزان مقاومت سویه‌ها به غلظت‌های مختلف سرب، حدود غلظت برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده

رشد^۷ (MIC) و حداقل غلظت کشنده^۸ (MBC) برای هر سویه تعیین شود. در ادامه، از روش انتشار از چاهک در آگار برای بررسی مقاومت جدایه‌های منتخب مقاوم نسبت به سرب استفاده شد. در این روش ابتدا از باکتری‌های مدنظر با غلظت معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ cfu/ml) روی پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار (شارلو، اسپانیا) تلقیح شد. سپس چاهک‌هایی در داخل پلیت، تعبیه و داخل هر چاهک ۹۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌مولار نیترات سرب به‌طور جداگانه اضافه شد. از سرم فیزیولوژی استریل برای کنترل منفی و از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و عملیات مذکور برای هر غلظت سه بار تکرار شد. پس از آن، میزان مقاومت باکتری مدنظر در برابر غلظت‌های مختلف فلز سرب در محیط جامد ارزیابی شد (۱۲).

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) سرب روی باکتری جداشده: برای تعیین میزان MIC و MBC با در نظر گرفتن نتایج به‌دست آمده از رشد سویه‌ها در غلظت‌های مختلف سرب روی محیط جامد، با توجه به نوع سویه از روش کمی سری رقت لوله‌ای^۹ حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ میلی‌مولار نیترات سرب در سه تکرار مستقل استفاده شد. به تمامی لوله‌های دارای محیط کشت لوریا برتانی براث^{۱۰} (شارلو، اسپانیا) حاوی غلظت‌های مختلف سرب، سوسپانسیون باکتریایی با غلظتی معادل نیم مک فارلند تلقیح شد. دو لوله به‌عنوان کنترل منفی (محیط کشت فاقد باکتری) و کنترل مثبت (محیط کشت دارای باکتری) در نظر گرفته شدند. لوله‌ها

به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از آن، حداقل غلظتی از فلز که مانع رشد باکتری‌ها شد، MIC و غلظتی که هیچ رشدی در آن مشاهده نشد، MBC در نظر گرفته شد. با توجه به نامحلول بودن نیترا ت سرب در محیط مایع، برای اطمینان و تأیید مقادیر MIC و MBC، از کشت چمنی تمام لوله‌ها روی محیط کشت لوریا برتانی آگار (شارلو، اسپانیا) در سه تکرار مستقل از هم استفاده شد. پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بررسی شدند و تعداد کلنی باکتری‌ها شمارش شد (۱۴).

ارزیابی میزان رشد باکتری جداسازی شده مقاوم به سرب:
به منظور ارزیابی رشد باکتری جداسازی شده در محیط کشت لوریا برتانی برات دارای نمک نیترا ت سرب نسبت به محیط کشت حاوی باکتری و فاقد فلز (گروه کنترل)، ابتدا سوسپانسیون باکتریایی با غلظت معادل نیم مک فارلند از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت لوریا برتانی برات (شارلو، اسپانیا) تهیه شد. سپس سه ارلن حاوی محیط کشت لوریا برتانی برات با غلظت‌های نیترا ت سرب صفر (گروه کنترل)، ۵ و ۱۰ میلی مولار (غلظت‌های کمتر از MIC) تهیه شدند. درون ارلن‌ها ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تلقیح شد، به مدت ۳۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و با دور ۱۵۰ rpm، انکوبه و منحنی رشد باکتری ترسیم شد (۱۴).

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از ۲۴ دیسک آنتی‌بیوتیک رایج کشور،

محصول شرکت پادتن طب ایران و محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده شد. برای این منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری مدنظر، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند، تهیه و آزمون آنتی‌بیوگرام برای هر نمونه به روش استاندارد دیسک دیفیوژن (کربی بائر^{۱۱}) انجام شد (۱۵، ۱۶).

بررسی مورفولوژی جدایه مطالعه شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): به منظور مشاهده تغییرات مورفولوژی سطح سلول جدایه باکتریایی مدنظر، قبل و بعد از جذب نمک نیترا ت سرب، کشت باکتری در دو محیط کشت لوریا برتانی آگار فاقد نمک فلز (گروه کنترل) و محیط کشت لوریا برتانی آگار دارای نمک نیترا ت سرب در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت با گلو تار آلدهید، تثبیت و سپس با درصد‌های مختلف اتانول (۳۰ تا ۹۸ درصد، هر کدام ۲۰-۱۵ دقیقه) آبگیری شدند. در ادامه، نمونه‌ها با دستگاه فریز درایر^{۱۳} (Labconco، آمریکا)، خشک و با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (ZEISS، آلمان) بررسی شدند (۱۷، ۱۸).

شناسایی مولکولی جدایه باکتریایی مقاوم به سرب:
شناسایی مولکولی باکتری منتخب با استفاده از تکنیک Colony-PCR و تعیین توالی ژن *16S rDNA* مطابق با دستورالعمل جدول ۳ و سیکل حرارتی جدول ۲ انجام شد (۱۹). در این مطالعه از آغازگرهای عمومی ساخت شرکت رویان زیست ژن تهران برای تکثیر نواحی حفاظت شده از ژن *16S rDNA* استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای عمومی انتخاب شده برای تکثیر ژنوم باکتری‌ها در این مطالعه (۲۰)

نام آغازگر	توالی آغازگر	نوع آغازگر	طول قطعه محصول (bp)
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	رفت	۱۵۰۰
1492R	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	برگشت	

جدول ۲- سیکل حرارتی استفاده شده برای انجام واکنش Colony-PCR

مرحله	واکنش	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
۱	واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۲	۱
۲	واسرشت‌سازی	۹۴	۱	۳۵
	اتصال آغازگر	۵۵	۱	
	تکثیر اختصاصی قطعه	۷۲	۱	
۳	طویل‌سازی نهایی	۷۲	۱۰	۱

جدول ۳- دستورالعمل بهینه شده برای انجام آزمایش Colony-PCR

مواد	غلظت اولیه	غلظت نهایی	حجم استفاده شده (μl)
بافر PCR	۱۰ X	۱ X	۲/۵
کلرید منیزیم (MgCl ₂)	۵۰ mM	۲ mM	۰/۷۵
dNTP	۱۰ mM	۰/۲ mM	۰/۵
آغازگر پیشرو (27F)	۱۰ μM	۰/۴ μM/l	۱
آغازگر معکوس (1492R)	۱۰ μM	۰/۴ μM/l	۱
Taq پلیمرز	۵ U/μl	۱/۲۵ U/μl	۰/۲۵
آب مقطر تزریقی	-	-	۱۹/۰۵
مجموع	-	-	۲۵

پس از اتمام واکنش، محصول PCR توسط الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱ درصد بررسی و سپس تعیین توالی شد. توالی‌های به دست آمده در پایگاه جهانی ژن NCBI، بررسی و با استفاده از BLAST میزان قرابت ژنی توالی باکتری جداسازی شده با دیگر توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مقایسه شدند. همچنین، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA 7 ترسیم شد (۱۲).

جذب و حذف زیستی فلز سرب: به منظور مطالعه میزان جذب زیستی فلز سرب توسط جدایه منتخب که بیشترین مقاومت نسبت به سرب را نشان داده بود، ابتدا باکتری جداسازی شده در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث در یک ارلن، تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۵۰

قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت مجدداً به نسبت ۱ درصد حجمی - حجمی، در ۱۰۰ میلی لیتر محیط LB براث حاوی نیترات سرب ۱۵ میلی مولار، تلقیح و با شرایط کشت قبل به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. در این مرحله از نمونه کشت‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته روی محیط LB آگار حاوی نیترات سرب کشت داده شد تا از زنده بودن باکتری‌ها اطمینان حاصل شود. بعد از رشد باکتری‌ها در ارلن، ۱ میلی لیتر از این محلول به میکروتیوپ استریل انتقال داده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۰,۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی برای سنجش کاهش فلز سرب نسبت به مقدار اولیه (حذف زیستی فلز از محیط کشت) به دقت جدا و رسوب باقی مانده در سرم فیزیولوژی استریل دو بار شستشو داده شد. در هر مرحله مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ شامل

محیط کشت اولیه و سرم فیزیولوژی در مرحله شستشو جمع‌آوری و رسوب باکتری در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت در فور خشک شد. برای اندازه‌گیری مقدار فلز موجود در رسوب باکتری، ۱ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ نیم مولار به رسوب، اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه، در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس با آب مقطر دوبار تقطیر، حجم نهایی به ۵ میلی‌لیتر رسانده و برای تعیین میزان جذب فلز توسط باکتری، از طیف‌سنجی نوری پلاسما به روش القایی (ICP-OES) (Nikon, Japan) استفاده شد (۱۲). ظرفیت جذب زیستی سوئ منتخب (مقدار فلز در هر گرم زیست جاذب) با استفاده از رابطه زیر (فرمول ۱) محاسبه شد (۲۱):

$$V(m) = (C_0 - C_e) \times V / m$$
 که در آن C_0 : غلظت اولیه فلز (mg/L)، C_e : غلظت نهایی فلز (mg/L)، V : حجم محلول (L) و m : جرم جاذب زیستی یا بیومس (g) بود (۲۱).

برای اندازه‌گیری میزان حذف فلز در محیط مایع، از مایع رویی جمع‌آوری شده در هریک از مراحل جداسازی رسوب باکتری از محیط کشت و دو بار شستشوی آن در سرم فیزیولوژی استفاده شد. به ازای هر ۱ میلی‌لیتر مایع رویی، ۱ میکرولیتر اسید نیتریک، اضافه و مشابه بخش قبل، غلظت فلز توسط ICP-OES اندازه‌گیری شد. برای محاسبه مقدار حذف زیستی فلز سرب از رابطه زیر (فرمول ۲) استفاده شد (۲۱):

$$C_0 / (C_0 - C_e) \times 100 = \text{درصد حذف زیستی فلز}$$
 که در آن C_0 : غلظت اولیه فلز (mg/L) و C_e : غلظت نهایی فلز (mg/L) بود (۲۱). آزمون‌ها همگی با سه تکرار انجام شدند.

بررسی توانایی جدایه در تولید نانوذره سرب: برای

بررسی توانایی تولید نانوذره سرب، تک کلنی‌های باکتری باسیلوس تروپیکوس در محیط کشت LB برات فاقد فلز سرب به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، باکتری درحال رشد به نسبت ۱ درصد حجمی - حجمی در محیط کشت LB برات حاوی نیترات سرب ۱۵ میلی‌مولار، تلقیح و به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ rpm انکوبه شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. برای شستشو خالص‌سازی زیست‌توده باکتری، رسوب باکتری سه مرتبه در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه، حل و مراحل سانتریفیوژ و تخلیه مایع رویی تکرار شد. در ادامه، برای لیز کردن باکتری، ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه به توده زیستی باکتری اضافه و توسط ورتکس به خوبی مخلوط شد و ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مشابه شرایط بالا، سانتریفیوژ و محلول رویی کاملاً دور ریخته و اجازه داده شد تا رسوب باکتری خشک شود (۲۲).

به منظور بررسی سنتز نانوذرات سرب توسط باکتری مدنظر، علاوه بر مشاهده ایجاد تغییرات ظاهری در رنگ محیط کشت، سنتز آن در مراحل بعدی با سه روش الگوی پراش اشعه ایکس (^{14}XRD) (Asenware AW-DX300، انگلیس)، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (^{15}EDS) (Tescan mirall، چک) و تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (ZEISS، آلمان) صورت گرفت. به منظور شناسایی و تعیین ماهیت بلور نانوذرات سرب سنتز شده توسط باکتری باسیلوس تروپیکوس، از روش الگوی پراش اشعه ایکس (^{16}XRD) (Asenware AW-DX300، انگلیس) با دامنه زاویه 2θ از ۱۰ تا ۹۰ استفاده شد. اندازه بلورهای نانوذرات سرب با

استفاده از رابطه دبای شرر (فرمول ۳) محاسبه شد.

$$D = k\lambda / (\beta \cos \theta) \quad \text{فرمول ۳}$$

در این رابطه، D : اندازه بلورهای نانوذرات، K : ثابت شرر (۰/۹ تا ۱)، λ : طول موج منبع تابش اشعه ایکس، β : پهنای پیک‌ها در نصف ارتفاع ماکزیمم و θ : زاویه بین پرتو تابش و بازتابش است (۷).

نمونه‌ها پس از تأیید در آزمون‌های اولیه از نظر تولید نانوذرات سرب، با میکروسکوپ الکترونی روبشی انتخاب شدند و سپس برای تجزیه و تحلیل خصوصیات شیمیایی نانوذره از EDS استفاده شد (۲۳).

آنالیز آماری داده‌ها: برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و برای مقایسه نتایج و تعیین فاصله اطمینان توافقی با خطای استاندارد از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

خصوصیات خاک حاوی پسماندهای الکترونیکی: در پژوهش حاضر فاکتورهای فیزیکوشیمیایی و زیستی و نیز غلظت فلزات در خاک حاوی پسماندهای الکترونیکی تپه‌های گردنه زینل اصفهان بررسی شدند. pH خاک مورد ارزیابی ۹/۴، دمای آن ۲۷/۸ درجه سانتی‌گراد و TOC نمونه برابر ۱/۸ درصد سنجیده شد. میزان سرب موجود در خاک براساس آنالیز نمونه به روش ICP-OES برابر ۶۵۸/۴ ppm بود. میزان فلزات و شبه‌فلزات موجود در یکی از تپه‌های آلوده به پسماندهای الکترونیکی واقع در گردنه زینل اصفهان در جدول ۴ نشان داده شده است.

جداسازی و شمارش باکتری‌های هتروتروف و مقاوم

به سرب: با توجه به نتایج ICP نمونه خاک مطالعه‌شده (جدول ۴) و بالا بودن غلظت سرب در آن، احتمال حضور باکتری‌های مقاوم به این فلز وجود داشت که برای رشد در این شرایط سازگاری یافته‌اند. مقایسه تعداد باکتری‌های هتروتروف روی محیط کشت بدون سرب و محیط کشت حاوی نیترات سرب ۵ میلی‌مولار در شکل ۱ ارائه شده است. تعداد باکتری‌های موجود در یکی از آلوده‌ترین خاک‌های حاوی پسماند الکترونیکی در محیط کشت فاقد سرب ($10^4 \pm 530 \times \text{CFU/ml}$) (۷۹۷۰) به‌طور معناداری بیشتر از تعداد باکتری‌ها در محیط دارای سرب ($10^4 \pm 40 \times \text{CFU/ml}$) (۱۰۷۰) بود ($P < 0.005$).

میزان مقاومت جدایه میکروبی منتخب در برابر سرب: براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، سویه FM3 مقاوم‌ترین سویه باکتریایی نسبت به سرب بود که از تپه‌های آلوده به پسماندهای الکترونیکی واقع در گردنه زینل اصفهان جداسازی شد. از جدایه حاصل، کشت ۲۴ ساعته در حضور غلظت‌های ۵ تا ۳۵ میلی‌مولار $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به عمل آمد و قادر به رشد تا غلظت ۲۵ میلی‌مولار از نیترات سرب بود. همچنین مقاومت جدایه FM3 نسبت به غلظت‌های مختلف سرب با روش انتشار از چاهک در آگار بررسی شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت چمنی جدایه در محیط کشت مولر هینتون آگار، نتایج ارزیابی شدند. نتایج نشان دادند باکتری تا غلظت ۲۰ میلی‌مولار کاملاً نسبت به سرب مقاوم است و هاله عدم رشد از غلظت ۲۵ میلی‌مولار در اطراف چاهک مشاهده شد (شکل ۲).

جدول ۴- میزان فلزات و شبه‌فلزات موجود در یکی از تپه‌های آلوده به پسماندهای الکترونیکی واقع در گردنه زینل اصفهان (آنالیز نمونه به

روش (ICP-OES)

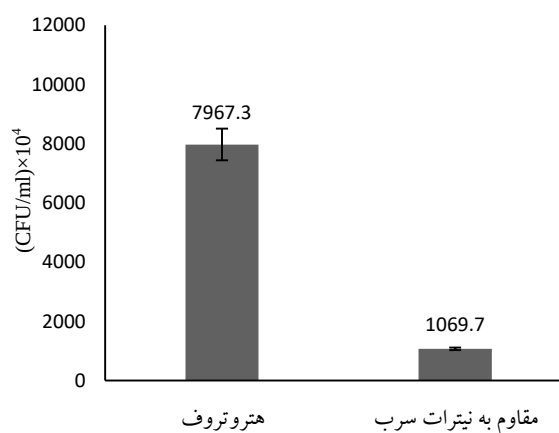
فلز	Er (ppm)	Dy (ppm)	Cu (%)	Cr (ppm)	Co (ppm)	Ce (ppm)	Cd (ppm)	Ca (%)	Bi (ppm)	Be (ppm)	Ba (ppm)	As (ppm)	Al (%)	Ag (ppm)
غلظت فلز در نمونه	0.11	0.20	19.8	126.1	9.00	6.00	1.24	3.54	2.30	0.20	44.3	5.3	35.0	95.4
فلز	Mn (ppm)	Mg (%)	Lu (ppm)	Li (ppm)	Cs (ppm)	La (ppm)	K (%)	Ho (ppm)	Hg (ppm)	Hf (ppm)	Gd (ppm)	Ga (ppm)	Fe (%)	Eu (ppm)
غلظت فلز در نمونه	131.4	0.11	0.09	4.00	0.18	2.20	0.10	0.05	1.10	0.05	0.40	42.0	1.25	0.05
فلز	Sm (ppm)	Se (ppm)	Sc (ppm)	Sb (ppm)	S (%)	Rb (ppm)	Pr (ppm)	Pb (ppm)	P (%)	Ni (ppm)	Nd (ppm)	Nb (ppm)	Na (%)	Mo (ppm)
غلظت فلز در نمونه	0.40	0.60	0.40	13.84	0.10	1.76	0.60	658.4	0.16	112.4	2.30	0.60	0.22	16.0
فلز	Zr (ppm)	Zn (ppm)	Yb (ppm)	Y (ppm)	W (ppm)	V (ppm)	U (ppm)	Tl (ppm)	Ti (%)	Th (ppm)	Tb (ppm)	Ta (ppm)	Sr (ppm)	Sn (ppm)
غلظت فلز در نمونه	3.20	5774	0.10	1.60	107.5	60.7	0.60	0.07	0.01	0.30	0.09	0.09	84.1	135.0



شکل ۲- نمایش مقاومت جدایه FM3 نسبت به غلظت‌های مختلف نیترات سرب با روش چاهک گذاری در آگار (روی محیط کشت مولر هینتون آگار، انکوباسیون ۲۴ ساعته و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد)

میزان MIC و MBC سرب روی باکتری جدا شده:

حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) نیترات سرب روی باکتری جدا شده با روش سری رقت لوله‌ای اندازه گیری شد. میانگین مقادیر

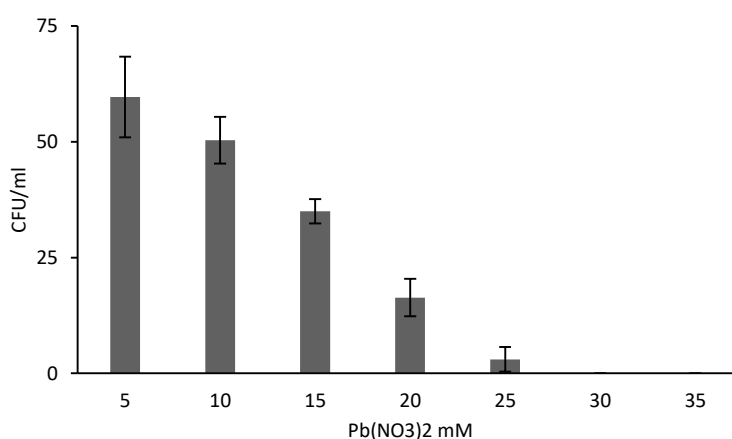


شکل ۱- مقایسه میانگین شمارش باکتری‌های هتروتروف روی دو محیط کشت فاقد سرب و حاوی سرب ۵ میلی مولار (روی محیط کشت PHG II آگار، انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد)

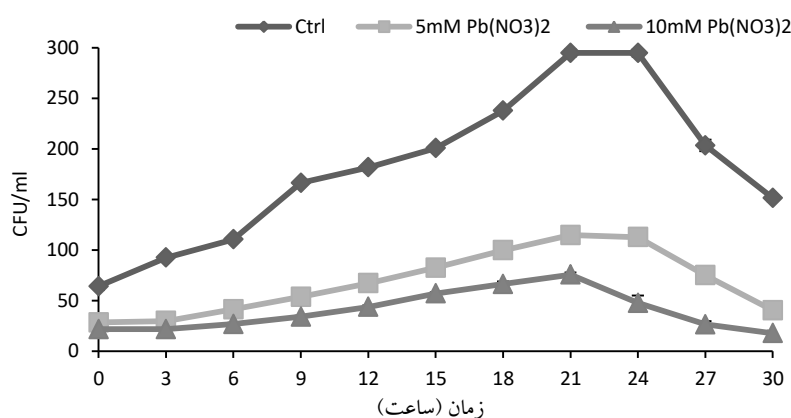
بود (شکل ۳).

منحنی رشد جدایه مطالعه شده: منحنی رشد باکتری منتخب در حضور دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌مولار به عنوان غلظت‌های کمتر از MIC و MBC در مقایسه با محیط فاقد نیترات سرب در محیط کشت LB برای مدت زمان انکوباسیون ۳۰ ساعت و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

MIC و MBC برای این جدایه مورد مطالعه به ترتیب برابر با $24/3 \pm 0/9$ و $28/3 \pm 2/3$ میلی‌مولار بود. همان‌طور که در قسمت روش کار ذکر شد، برای اطمینان و تأیید مقادیر MIC و MBC، از کشت چمنی لوله‌های حاوی غلظت‌های متفاوت نیترات سرب و سوسپانسیون باکتری در سه تکرار استفاده شد که شمارش تعداد کلنی باکتری‌ها نتایج مشابهی را نشان داد. تعداد کلنی‌ها حاکی از مهار رشد وابسته به غلظت فلز



شکل ۳- تعداد کلنی‌های جدایه FM3 براساس غلظت‌های مختلف $Pb(NO_3)_2$ (روی محیط کشت لوریا برتانی آگار، انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد)



شکل ۴- منحنی رشد جدایه FM3 در محیط کشت لوریا برتانی برای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (*) در این منحنی کنترل [ctrl] نشان‌دهنده رشد باکتری در محیط فاقد نیترات سرب است

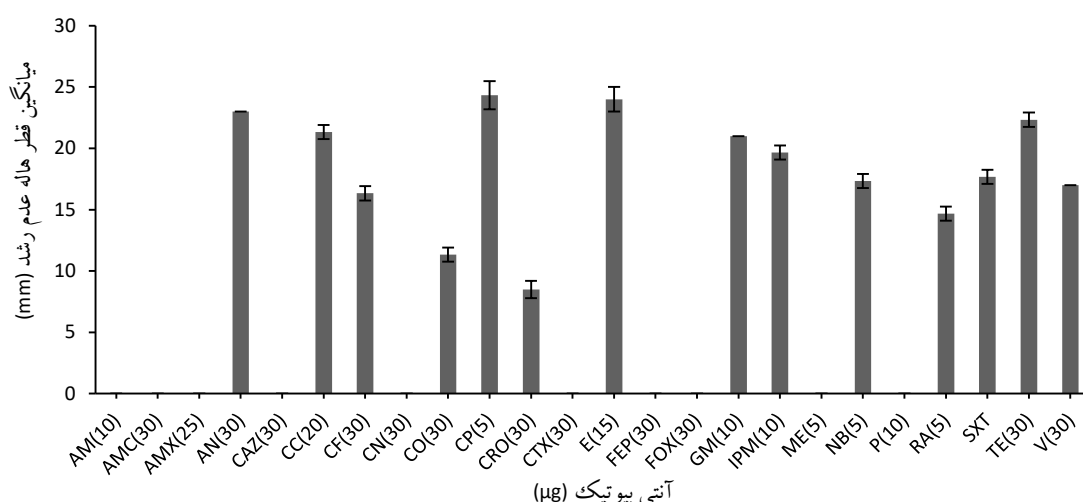
کاهش می‌یابد و این کاهش میزان رشد وابسته به غلظت سرب است. مشاهدات نشان دادند با افزایش غلظت

منحنی رشد جدایه FM3، مطابق شکل ۴، نشان داد با افزایش غلظت سرب، رشد باکتری به صورت چشمگیری

سرب، مرحله تأخیری رشد افزایش یافته و فاز لگاریتمی رشد باکتری نیز با شیب کمتر و تأخیر بیشتر نسبت به گروه کنترل همراه بوده است. فاز لگاریتمی رشد باکتری در عدم حضور فلز سرب پس از ۱ ساعت شروع شده بود؛ در حالی که شروع فاز رشد لگاریتمی باکتری در حضور فلز تا حداقل ۴ ساعت به تأخیر افتاده بود (شکل ۴).

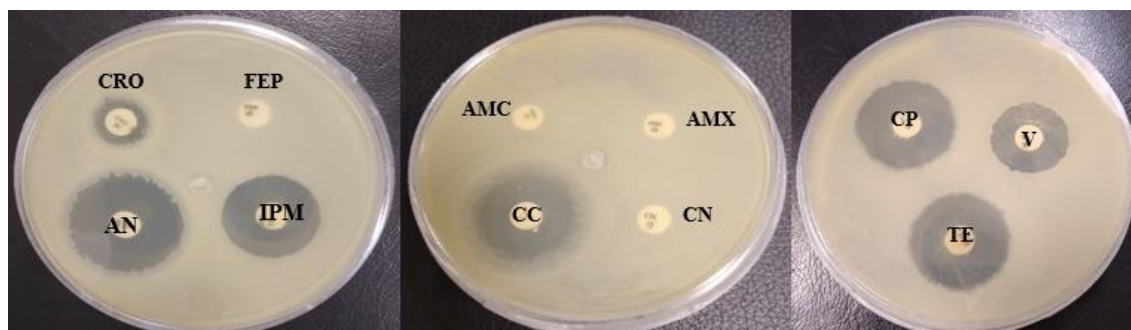
نتایج آنتی‌بیوگرام جدایه مطالعه شده: آزمون تعیین حساسیت باکتری منتخب در برابر ۲۴ آنتی‌بیوتیک رایج

کشور براساس روش دیسک دیفیوژن (کربی - بائر) و تست آنتی‌بیوگرام برای جدایه مقاوم به سرب انجام شد. نتایج این بررسی نشان دادند باکتری جداسازی شده در مجاورت با برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، آموکسی‌کلاو، سفنازیدیم، سفالکسین، سفوتاکسیم، سفپیم، سفوکسیتین، متی‌سیلین و پنی‌سیلین مقاوم بود و در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیمه‌حساس تا حساس بود. تمام آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شدند (شکل ۵ و ۶).



شکل ۵- نتایج آنتی‌بیوگرام جدایه FM3 در برابر ۲۴ آنتی‌بیوتیک رایج

AM: Ampicilin, AMC: amoxicillin, AMX: amoxiclov, AN: Amikacin, CAZ: ceftazidime, CC: Clindamycin, CF: Cefalotin, CN: cephalixin, CO: Chloramphenicol, CP: ciprofloxacin, CRO: Ceftriaxone, CTX: Cefotaxime, E: Erythromycin, FEP: Cefepime, FOX: Cefoxitin, GM: Gentamycin, IPM: Imipenem, ME: Methicillin, NB: Novobiocin, P: Penicillin, RA: Rifampin, SXT: Trimethoprim-sulphamethoxazole, TE: Tetracycline, V: Vancomycin



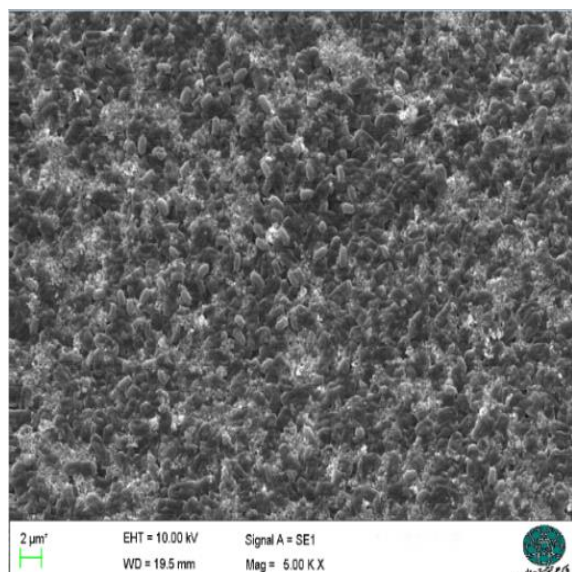
شکل ۶- تصاویر آزمون آنتی‌بیوگرام جدایه FM3 نسبت به برخی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک رایج کشور

براساس تصاویر SEM: مورفولوژی سطح این باکتری با

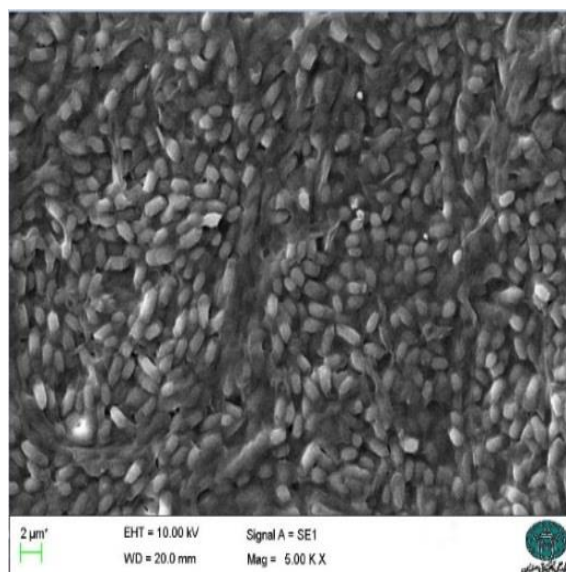
تغییرات مورفولوژی سطح جدایه مطالعه شده

میکروسکوپ الکترونی روبشی قبل و بعد از تیمار با نمک نترات سرب تجزیه و تحلیل شد. همان‌طور که در شکل ۷ الف مشاهده می‌شود، سلول‌های FM3 قبل از قرار گرفتن در معرض سرب، صاف و کشیده‌اند؛ در حالی که در مجاورت سرب، مورفولوژی باکتری

کاملاً تغییر می‌کند، دیواره سلول‌های باکتری در حال تخریب دیده می‌شود و تغییراتی مانند تورم و کوتاه‌تر شدن سلول باکتری و نامنظمی زیاد و چین و چروک در سلول‌ها مشاهده می‌شود (شکل ۷ ب).



(ب)



(الف)

شکل ۷- تصویر SEM از FM3 در عدم حضور (الف) و حضور نترات سرب (ب)

شناسایی مولکولی جدایه مطالعه‌شده: پس از جداسازی، خالص‌سازی و تعیین مقاومت سویه منتخب نسبت به فلز سرب و آنتی‌بیوتیک‌ها، مراحل شناسایی مولکولی این سویه انجام شد. بررسی مورفولوژی این جدایه به کمک رنگ‌آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ نوری نشان داد باکتری جداشده، باسیل گرم مثبت و دارای آرایش زنجیره‌ای بود (شکل ۸ الف). برای شناسایی مولکولی سویه، ابتدا تکثیر ژن *16S rDNA* توسط آغازگرهای عمومی (27F و 1492R) و تکنیک کلنی-PCR، انجام و محصول آن روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. باند مدنظر با طول ۱۵۰۰ جفت‌باز

مشاهده شد (شکل ۸ ب).

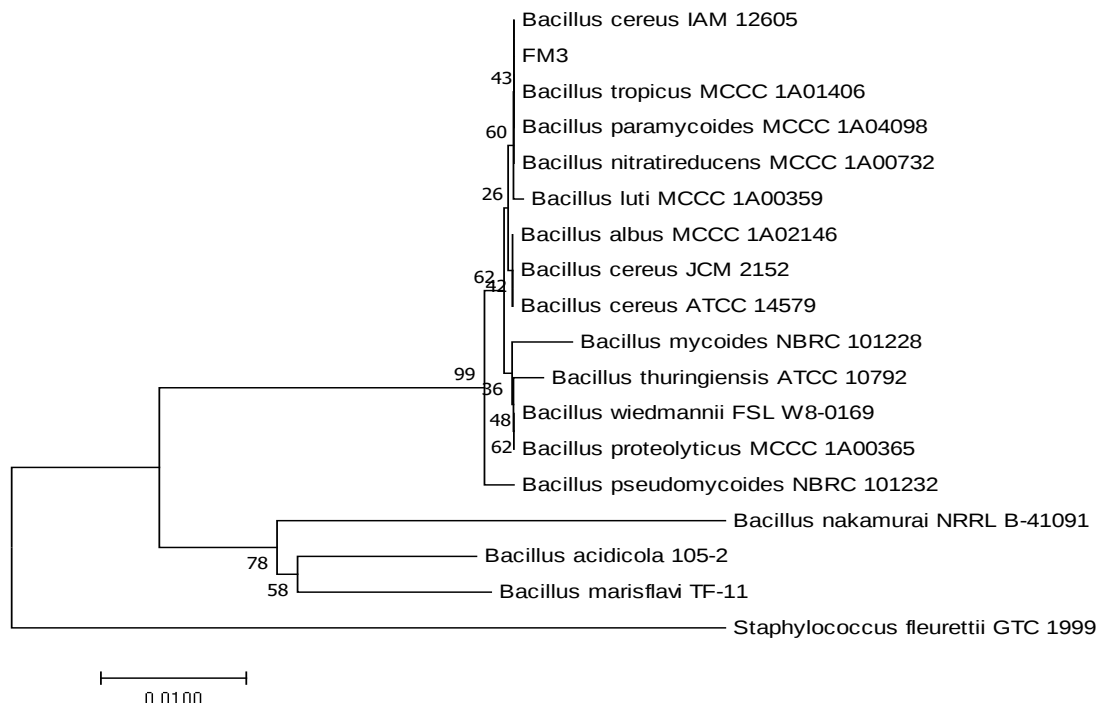
تعیین توالی تکثیرشده از ژن مدنظر با روش سنگر توسط شرکت رویان زیست ژن تهران، انجام و در ادامه با استفاده از نرم‌افزار وب بلاست (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) بانک جهانی ژن (NCBI) شناسایی شد. مقایسه توالی‌ها با استفاده از سرور بلاست نشان داد سویه FM3، با ۹۹/۶۹ درصد شباهت، سویه‌ای از *باسیلوس ترئوپیکوس* است. درخت فیلوژنی این سویه براساس توالی ژن *16S rDNA* و روش Neighbor- Joining با نرم‌افزار MEGA 7 رسم و مشخص شد جایگاه سویه FM3 در میان

ترئوپیکوس را تأیید کرد. این سویه با شماره دسترسی MZ292029 در پایگاه NCBI ثبت شد.

گونه‌های خانواده باسیلاسه است (شکل ۹). اطلاعات درخت فیلوژنی نیز تشابه ژنتیکی بالای FM3 با باسیلوس



شکل ۸- الف) تصویر میکروسکوپی سویه FM3 ب) الکتروفورز محصول PCR سویه FM3 روی ژل آگارز با آغازگرهای عمومی 27F و 1492R و مشاهده باند 1500 bp (ستون‌ها از چپ به راست به ترتیب مربوط به Ladder، سویه FM3، کنترل مثبت [یک *Bacillus* sp.] و کنترل منفی است)

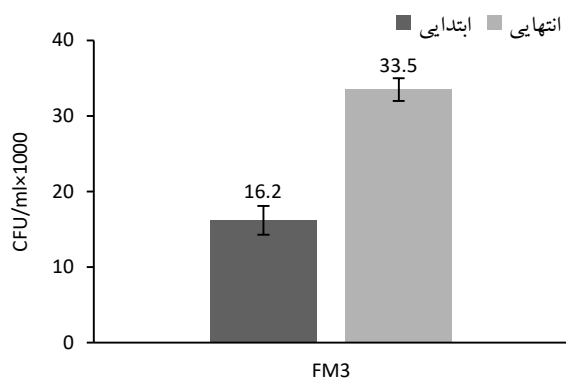


شکل ۹- درخت فیلوژنی سویه FM3 براساس توالی 16S rDNA با روش Neighbourjoining. مقادیر Bootstrap مبتنی بر ۱۰۰۰ تکرار است که در کنار گره‌ها نشان داده شده است. توالی *Staphylococcus fleurettii* GTC 1919 به عنوان خارج از گروه در نظر گرفته شده است.

باسیلوس تروپیکوس: شمارش باکتری‌ها به منظور بررسی

جذب و حذف زیستی فلز سرب توسط باکتری

است.



شکل ۱۰- شمارش باکتری باسیلوس تروپیکوس بر حسب CFU/ml در دو مرحله ابتدا و انتهای جذب زیستی

جدول ۵- حذف زیستی فلز سرب توسط باسیلوس تروپیکوس

مقدار اولیه فلز (mg/L)	مقدار فلز مایع رویی (mg/L)	مقدار فلز توده زیستی (mg/L)	درصد حذف فلز سرب
۱۶۸/۱	۷۳/۳۷	۹۳/۵۷	۵۶/۳۵

زنده‌بودن و قدرت رشد و تکثیر طی مرحله جذب زیستی، در زمان اولیه و نهایی در شکل ۱۰ ارائه شده است. نتایج نشان دادند این باکتری در شرایط آزمایشگاهی به عنوان جاذب زیستی عمل می‌کند و تعداد باکتری‌ها در مرحله جذب زیستی در حال افزایش بود.

بررسی حذف زیستی فلز سرب با روش ICP-OES در جدایه مطالعه شده با استفاده از فرمول ۲ در بخش مواد و روش‌ها نشان داد باکتری جدا شده توانایی بالایی در حذف فلز سرب (۵۶/۳۵ درصد) داشت. نتایج این بررسی در جدول ۵ ارائه شده‌اند.

بررسی توانایی و تأیید تولید نانوذرات سرب توسط

باسیلوس تروپیکوس: همان‌طور که اشاره شد، نشانه اولیه تولید نانوذرات سرب بر اساس تغییر رنگ محیط کشت باکتری پس از کشت پنج روزه به دلیل تغییر ماهیت فلز به صورت نانوذره بود که در شکل ۱۱ به وضوح مشخص



(ج)



(ب)

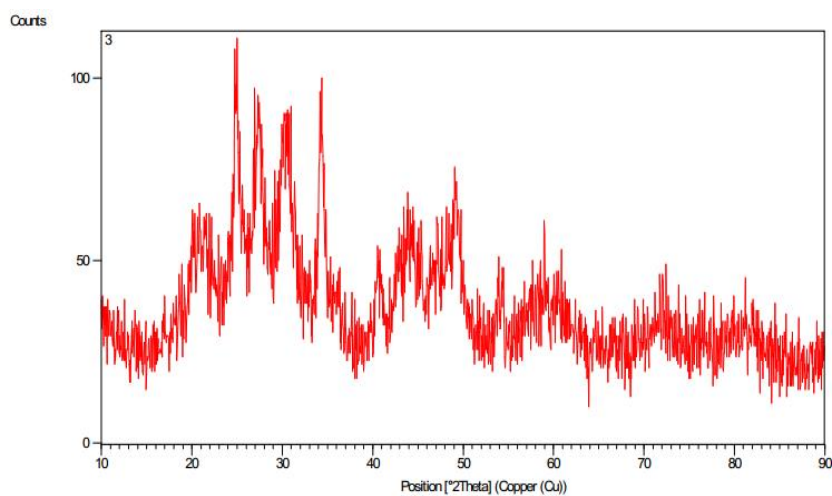
(الف)

شکل ۱۱- تغییر رنگ محیط کشت حاوی فلز سرب از شفاف (الف) به کدر، (ب) طی سنتز نانوذره توسط باسیلوس تروپیکوس، (ج) رسوب محیط کشت

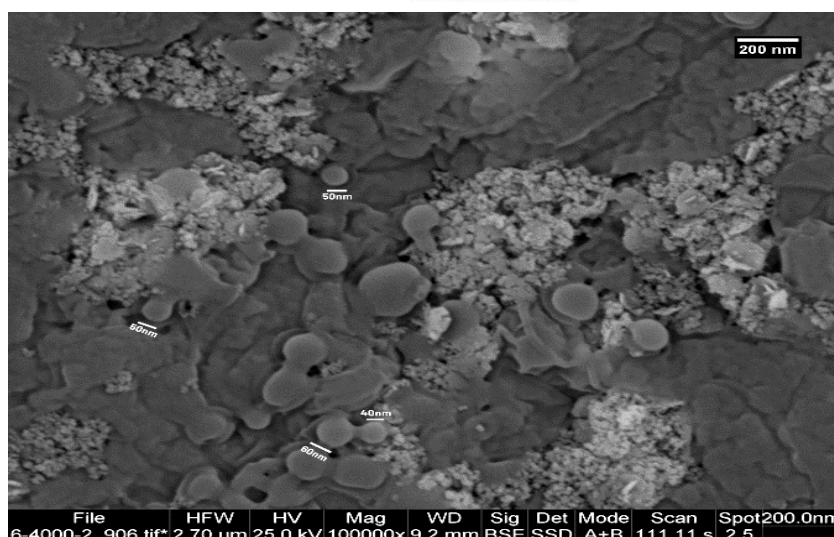
۱۲ الگوی XRD ساختارهای نانوذرات سنتز شده توسط باسیلوس تروپیکوس را نشان می‌دهد.

برای اطمینان از تولید و بررسی خصوصیات شیمیایی این نانوذرات، آنالیز XRD انجام شد. شکل

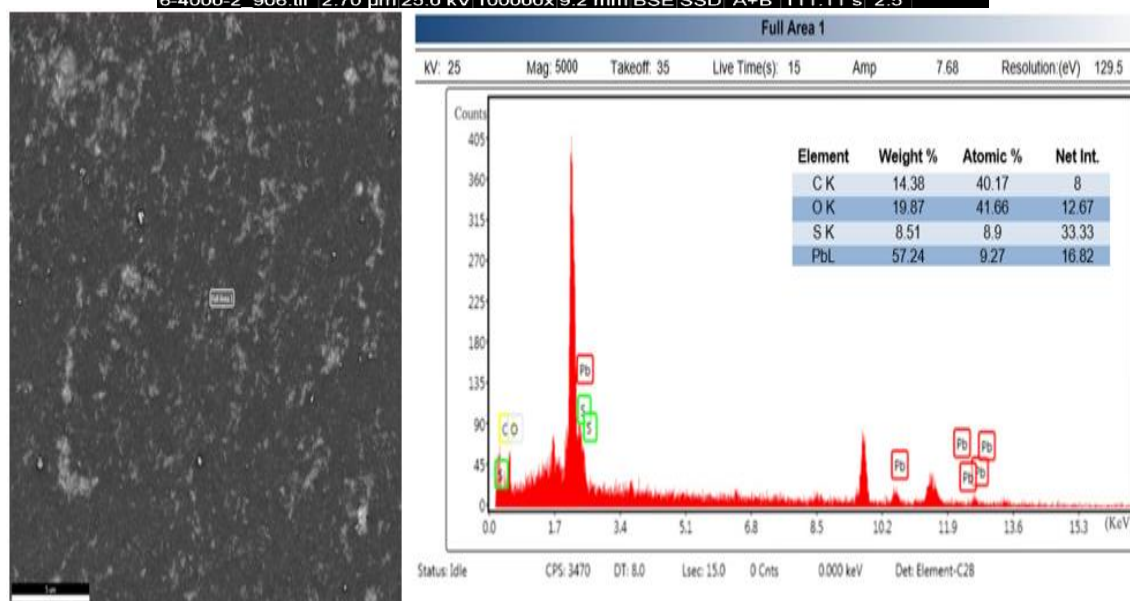
(الف)



(ب)



(ج)



شکل ۱۲- الف) تصویر XRD برای نانوذرات سرب سنتز شده، ب) تصویر SEM نانوذرات سرب سنتز شده، ج) آنالیز عنصری نانوذرات سرب سنتز شده با تکنیک EDS

بحث و نتیجه‌گیری

پسماندهای الکترونیکی جزء زباله‌های درحال رشد در جهان‌اند که به دلیل صحیح نبودن تکنیک‌های فرآوری در خاک تجمع می‌یابند. مطالعات پیشین نشان می‌دهند باکتری‌هایی مانند *تیوباسیلوس*^{۱۷} ها و قارچ‌هایی مانند *آسپرژیلوس نایجر*^{۱۸} و *پنسیلیوم سیمپلیسیموم*^{۱۹} در تجمع فلزات از ضایعات الکترونیکی و الکتریکی نقش دارند (۲۵). تحقیقات برخی از محققان نشان داده است از *باسیلوس سابیلیس*^{۲۰} و *باسیلوس سرئوس*^{۲۱} به دلیل داشتن ظرفیت بالای جذب سرب استفاده شده است (۶). سلول‌ها ممکن است با فرایندی که به عنوان تجمع زیستی شناخته می‌شوند و برای بسیاری از فلزات از جمله سرب گزارش شده‌اند، یون‌های فلزی را بگیرند و آنها را روی سطح یا درون سلول خود رسوب دهند. باکتری‌های مقاوم به سرب از مکانیزم‌های مقاومت مختلفی مانند مکانیزم تجزیه خارج سلولی، جذب زیستی، ته‌نشینی، تغییر در مورفولوژی سلول، تولید سیدروفور و تجمع زیستی سرب درون سلولی استفاده می‌کنند (۲۶). میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها، کپک‌ها، مخمرها و جلبک‌ها با جذب روی سطح سلول یا تجمع و پیچیده شدن درون سلول، یون‌های فلزی سمی را به حالت غیرسمی کاهش می‌دهند (۴). با توجه به خطرات زیست محیطی فلزات، حذف آنها به ویژه به روش‌های زیستی اهمیت دارد که بیشترین سازگاری را با محیط زیست دارند. جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلز سرب با قابلیت جذب و حذف زیستی از پسماندهای الکترونیکی در شهر اصفهان از اهداف این پژوهش بود.

نتایج پراش اشعه ایکس حضور ساختار بلوری نانوذرات سرب را تأیید کرد. این الگوی پراش دارای پیک‌هایی در زوایای 2θ $^{\circ}$ ۲۵، ۲۴/۸۵، ۲۰/۹۰، ۲۷/۳۰، ۳۰/۴۵، ۳۴/۳۵، ۴۰/۶۰، ۴۴، ۴۹ و ۵۹ به ترتیب مربوط به سطوح ۵۰، ۹۲، ۱۱۳، ۹۷، ۸۰، ۱۰۲، ۴۹، ۵۸ و ۵۷ بود که نشان‌دهنده تشکیل کریستال سرب با دو ترکیب $2PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$ و $Pb_4(SO_4)(CO_3)_2(OH)_2$ است. این نتایج با داده‌های مرجع نانوکریستال‌های سرب - JCPDS NO.00-001-0687 و JCPDS NO.01-085-1422 همخوانی داشت (۲۴). تجزیه و تحلیل XRD برای تولید نانوذرات سرب شناسایی شده حاکی از آن بود که شدیدترین پیک در $2\theta = 34.4^{\circ}$ و پهنای نصف ارتفاع حداکثری (FWHM) $\beta = 0.467^{\circ}$ معادل قرار داشت که با توجه به رابطه دبای شرر در فرمول ۳ در بخش روش‌ها، اندازه کریستال‌های نانوذرات سرب به طور تقریبی ۱۸ نانومتر به دست آمد (شکل ۱۲ الف). بررسی تصاویر SEM حضور نانوذرات سرب را در توده سلولی باکتری تأیید کرد. تصاویر به دست آمده نشان داد ذرات به طور عمده به شکل کروی و در برخی نواحی به صورت انباشته یا پراکنده کنار هم قرار داشتند و با توجه به مقیاس تصویر، قطر متوسط آنها ۵۰ نانومتر برآورد شد (شکل ۱۲ ب). برای آنالیز عنصری میکروسکوپی، به طور تصادفی ذرات، انتخاب و با تکنیک EDS آنالیز شدند. عناصر سرب، گوگرد، کربن و اکسیژن در نمونه شناسایی شدند که با ترکیبات شناسایی شده در XRD مطابقت داشتند. میزان سرب شناسایی شده، بیش از دیگر عناصر و برابر ۵۷/۲ درصد وزنی بود (شکل ۱۲ ج).

همان‌طور که در جدول ۴ اندازه‌گیری اولیه فلزات و شبه فلزات نمونه‌های جمع‌آوری شده از خاک‌های آلوده تپه‌های گردنه زینل اصفهان نشان می‌دهد، میزان سرب موجود در یکی از آلوده‌ترین خاک‌های واجد پسماندهای الکترونیکی براساس آنالیز ICP-OES برابر $658/4 \text{ ppm}$ بود؛ درحالی که مطابق استاندارد جهانی غلظت سرب برای خاک‌های سطحی به‌طور متوسط 32 ppm و از $67-10 \text{ ppm}$ متغیر است (۲۷) و این بدان معناست که میزان سرب در نمونه جمع‌آوری شده بیش از ۲۰ برابر میانگین سرب در خاک‌های جهانی است که دفن پسماند الکترونیکی در آن منطقه را توجیه می‌کند. جداسازی باکتری باسیلوس تروپیکوس از این خاک با مطالعات مشابه مطابقت داشت و وجود باکتری جداسازی شده در این خاک با فلز سرب بالا، نشان‌دهنده سازگاری زیستی و مقاومت بالای آن به فلز سرب است. ژانگ و همکاران^{۲۲} نیز در تحقیقات خود به جدایه‌های تحمل‌کننده سرب از جمله باکتری‌های آسینتوباکتر^{۲۳}، رالستونیا^{۲۴}، کوماموناس^{۲۵} و کرایزوباکتریوم^{۲۶} در خاک‌های حاوی پسماندهای الکتریکی و الکترونیکی اشاره کرده‌اند (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر سجادیان و همکاران^{۲۷} باکتری‌های مقاوم به سرب مانند پروتئوس میرابیلیس^{۲۸}، باسیلوس سرئوس، باسیلوس فانیکولوس^{۲۹} و زنوره‌آب‌دوس^{۳۰} را از خاک‌های آلوده به نفت جداسازی و شناسایی مولکولی کردند (۱۲). از دیگر مناطق آلوده به سرب، جایگاه‌های سوختگیری (پمپ بنزین‌ها) است که کفیل‌زاده و همکاران^{۳۱} باکتری‌های مقاوم به سرب شامل باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس^{۳۲}، کورینه باکتریوم^{۳۳}، استافیلوکوکوس^{۳۴} و اشریشیا کلی^{۳۵} را از چنین مکان‌هایی جداسازی و شناسایی کردند (۲۹). از

دیگر منابع تولید و توزیع آلودگی‌های فلز سرب، پساب کارخانجات صنعتی است که ابراهیمی و آهنی‌آذری^{۳۶} در مطالعه‌ای ویژگی‌های هشت جدایه مقاوم به سرب جداسازی شده از پساب کارخانجات شهرک صنعتی آق‌قلا را بررسی کردند (۱۵).

در مطالعه حاضر میانگین مقادیر MIC و MBC برای باکتری منتخب باسیلوس تروپیکوس با استفاده از روش کمی سری رقت لوله‌ای به ترتیب برابر با $24/3 \pm 0/9$ و $28/3 \pm 2/3$ میلی‌مولار به دست آمد (۱۶). راجا و همکاران^{۳۷} در سال ۲۰۰۶ سویه‌هایی را به‌عنوان مقاوم در نظر گرفته بودند که از رشد آنها در غلظت $0/1$ میلی‌مولار فلز سرب ممانعت نشده بود (۳۰). کفیل‌زاده و همکاران نیز گزارش دادند مقاوم‌ترین باکتری‌های جداسازی شده دارای MIC برابر با $12/5$ میلی‌مولار استات سرب بودند (۲۹). مالیک و همکاران^{۳۸} گزارش دادند سویه‌های باکتریایی جداسازی شده از خاک‌های صنعتی قادر به تحمل غلظت سرب تا حد $7/23$ میلی‌مولار بودند (۳۱). نمونه‌های باکتریایی جداسازی شده از خاک‌های آلوده به فلزات سنگین گزارش شده توسط ابوشناب و همکارانش^{۳۹} تا غلظت 15 میلی‌مولار به سرب مقاوم بودند (۳۲). سلمانی و همکاران^{۴۰} سه جدایه باکتریایی متعلق به جنس باسیلوس را جداسازی کردند که قادر به تحمل غلظت نیترات سرب تا 15 میلی‌مولار بودند (۳۳). کوهی دهکردی و همکاران^{۴۱} با بررسی باکتری‌های ریزوسفری در معدن سرب و روی بامادر منطقه ایرانکوه استان اصفهان نشان دادند از بین پنج گونه باسیلوس شناسایی شده، باسیلوس سرئوس بیشترین میزان مقاومت (با MIC معادل $5/09$ میلی‌مولار) را نشان داد و پس از آن، باسیلوس آمیلولیکتی‌فاسینس^{۴۲}

قرار گرفت (۳۴). محسنی و همکاران^{۴۳} با شناسایی ده جدایه از پساب کارخانجات چرم ورامین، غلظت سرب قابل رشد را ۲ تا ۹ میلی‌مولار سرب گزارش کردند (۳۵). عباسی و همکاران^{۴۴} با جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به سرب از پساب شهری اهواز، حداقل غلظت بازدارنده سرب توسط باسیلوس لاتروسپروس^{۴۵} و یرسینیا سودوتوبریکلوزیس^{۴۶} را ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش دادند (۱۴). آلبوغیش و همکاران^{۴۷} نیز با مطالعه پساب فاضلاب شهری و پساب کارگاه مسگری شاهین شهر اصفهان سه جدایه کلبسیلا اکسی‌توکا^{۴۸}، رنی باکتریوم سالموناریوم^{۴۹} و رودوکوکوس اکوئی^{۵۰} را از پساب مسگری جدا کردند که MIC برای هر سه باکتری معادل ۴ میلی‌مولار محاسبه شد. همچنین، باکتری‌های آسینتوباکتر جونئی^{۵۱}، نایسریا موكوزا^{۵۲} و اشریشیا کلی از تصفیه‌خانه فاضلاب جداسازی شدند که MIC آنها نسبت به فلز سرب به ترتیب ۸، ۱۲ و ۴ میلی‌مولار بود (۳۶). افه و همکاران^{۵۳} در سال ۲۰۲۰ با ۸ گونه باکتری از جنس باسیلوس دریافتند باسیلوس تروپیکوس بیشترین مقاومت را نسبت به فلز مس با MIC معادل ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داده بود (۳۷). مقادیر بالاتر MIC در پژوهش حاضر نسبت به سایر مطالعات مشابه حاکی از مقاومت بیشتر سویه مطالعه‌شده نسبت به فلز سرب است. براساس منحنی رشد این سویه در شکل ۴، افزایش غلظت فلز سرب، رشد باکتری را به صورت وابسته به غلظت کاهش داد و سبب کندشدن مرحله تأخیری شد. این نتایج با مقایسه شمارش باکتری در محیط حاوی نیترات سرب نسبت به محیط کشت فاقد این فلز در شکل ۱ و حاوی غلظت‌های مختلف نیترات سرب در شکل ۳ مطابقت داشت. فلز سرب

باعث ایجاد سمیت و کاهش رشد در باکتری می‌شود؛ اما همان‌طور که در دو شکل ۴ و ۱۰ نشان داده شده است، رشد باسیلوس تروپیکوس جداسازی‌شده در حضور فلز سرب نشان‌دهنده سازگاری زیستی و تحمل سمیت آن است. کاهش تعداد باکتری‌ها در محیط دارای فلز سرب نسبت به محیط کشت فاقد فلز سرب (گروه کنترل) در منحنی رشد (شکل ۴) به علت سمیت فلز سرب بود که امری طبیعی و قابل انتظار است؛ کفیل‌زاده و همکاران نیز چنین نتایجی را گزارش کرده‌اند (۲۹). در تحقیق اسمکالوا و همکاران^{۵۴} تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی سرب بسیار کمتر از تعداد باکتری‌ها در محیط کشت کنترل گزارش شده است (۳۸). نتایج مربوط به رشد باکتری در حضور سرب در این پژوهش نیز نشان‌دهنده رشد باکتری مقاوم به سرب با وجود سمیت فلز است (شکل ۴).

در پژوهش حاضر، براساس شکل ۸-الف با تصاویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ نوری مشخص شد جدایه FM3 باسیل گرم مثبت است و در شناسایی مولکولی، همان‌طور که در شکل ۹ مشخص است، قراردادشتن جایگاه سویه FM3 در میان گونه‌های خانواده باسیلاسه ثابت شد. تصاویر SEM در شکل ۷، تغییرات مورفولوژیکی باکتری پس از مجاورت با فلز سرب از جمله تورم، کوتاه و نامنظم شدن دیواره سلولی باکتری را نشان می‌دهد. مطابق با تحقیقات محققان، این تغییرات مورفولوژیکی سطح باکتری ممکن است به دلیل رسوب سرب در اطراف سطح سلول و مرتبط با گروه‌های عملکردی آنها باشد. همچنین، برخی از محققان اشاره کرده‌اند این تغییرات احتمالاً هنگامی رخ می‌دهد که نمونه‌ها در معرض محلول فلزات سنگین قرار گرفته باشند و یون‌های این فلزات ممکن

۹۹/۶۹ درصدی) با باسیلوس تروپیکوس (MCCC 1A01406) را تأیید کرد.

جذب زیستی فلزات و انباشت آن در بیومس باکتری و حذف فلزات از محیط کشت باکتری، قدرت زیست پالایی میکروارگانیزم را بیان می‌کند و شایان توجه پژوهشگران این حوزه است. همان‌گونه که در شکل ۱۰ مشخص است، بررسی پتاسیل جذب زیستی فلز سرب توسط باکتری باسیلوس تروپیکوس جداسازی شده از پسماندهای الکترونیکی از تپه‌های زینل در شهر اصفهان نشان داد این باکتری در محیط کشت حاوی نیتрат سرب می‌تواند به رشد خود به صورت فعال ادامه دهد و به عنوان یک جاذب زیستی عمل کند. نتایج خوانده شده توسط دستگاه ICP-OES نشان دادند این باکتری توانایی حذف فلز سرب را تا ۵۶/۳۵ درصد نسبت به مقدار اولیه دارد که در جدول ۵ آمده‌اند. برای تعیین ماهیت فلز تجمع یافته در باکتری طی فرایند جذب زیستی، بررسی سه پارامتر تغییرات کدورت محیط کشت، آنالیز XRD و تصاویر SEM در کشت پنج روزه در حضور نمک نیترات سرب ۱۵ میلی مولار انجام شد. مشاهده کدورت قابل توجه در کشت پنج روزه در مطالعات، نشانه اولیه تولید نانوذرات براساس تغییر رنگ محیط کشت است و دلیل آن تغییر ماهیت مواد به صورت نانوذره مطرح می‌شود (۴۳، ۴۴) که این کدورت در شکل ۱۱ مشاهده می‌شود. شکل ۱۲-الف، آنالیز XRD ساختارهای کریستالی نانوذرات سنتز شده توسط باسیلوس تروپیکوس را نشان داد و تشکیل کریستال سرب با دو ترکیب $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ و $\text{Pb}_4(\text{SO}_4)(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$ منطبق بر داده‌های مرجع نانو کریستال‌های سرب با اندازه تقریبی کریستال‌های

است جایگزین برخی از کاتیون‌های موجود در ماتریکس دیواره سلولی باکتری‌ها شده باشند و پیوند متقابل قوی تری را ایجاد کنند؛ در نتیجه، به دلیل مکانیسم تبادلات یونی، یون‌های فلزات سنگین مکان‌های اتصال آزاد موجود را اشغال می‌کنند (۱۷، ۳۹، ۴۰). مطالعه گایاتری و همکاران^{۵۵} نیز به این موضوع اشاره دارد. آنها تغییرات مورفولوژیکی باسیلوس لیکنی فرمیس^{۵۶} جداسازی شده از خاک حاوی پسماند الکترونیکی را قبل و بعد از قرار گرفتن در معرض سرب بررسی کردند و اظهار داشتند اندازه سلول‌های باکتریایی در حضور سرب کاهش می‌یابد (۴۱) که با تغییرات مورفولوژیکی باسیلوس تروپیکوس جداسازی شده از خاک حاوی پسماند الکترونیکی در پژوهش حاضر، پس از مجاورت با فلز سرب مطابقت دارد (شکل ۷).

در تحقیق لوگاسکاس و همکاران^{۵۷}، باسیلوس‌ها به عنوان فراوان‌ترین باکتری‌های گرم مثبت در خاک‌های آلوده به سرب شناسایی شدند که نشان‌دهنده مقاومت این جنس نسبت به فلز سرب بود. همچنین، ادعا شده بود باکتری‌های مقاوم به سرب با یک فسفاتاز و پروتئین انتقال‌دهنده قادرند در مناطق آلوده به این فلز سنگین بقا یابند. در واقع باسیلوس‌ها یون‌های سرب را به صورت رسوب نمک فسفات تحمل می‌کنند (۴۲). در پژوهش حاضر نیز براساس شناسایی مولکولی، مقاوم‌ترین باکتری جداسازی شده در برابر سرب از جنس باسیلوس‌ها بود. درخت فیلوژنی این سویه براساس توالی ژن 16S rDNA و روش Neighbor- Joining با نرم افزار MEGA 7 رسم و مشخص شد جایگاه سویه FM3 در میان گونه‌های خانواده باسیلاسه است (شکل ۹). اطلاعات درخت فیلوژنی نیز تشابه ژنتیکی بالای FM3 (قربت

نانوذرات ۱۸ نانومتر را تأیید کرد. نتایج تصاویر SEM نیز حضور نانوذرات سرب را با قطر متوسط ۵۰ نانومتر تأیید کرد که در شکل ۱۲-ب مشاهده می‌شود. همچنین، در آنالیز عنصری میکروسکوپی، با تکنیک EDS عناصر سرب، گوگرد، کربن و اکسیژن در نمونه شناسایی شدند که با ترکیبات شناسایی شده در XRD مطابقت داشتند و میزان سرب شناسایی شده ۵۷/۲ درصد وزنی مشخص شد که در شکل ۱۲-ج نشان داده شده است. در تعدادی از مطالعات محققان اشاره شده است که حذف زیستی فلزات سنگین بالاتر از ۵۰ درصد توسط انواع میکروارگانیسم‌ها درخور توجه است (۳۷، ۴۵) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر (جدول ۵) مطابقت دارد. عباسی و همکاران با مطالعه روی باکتری‌های مقاوم به سرب و حذف این فلز از پساب شهری گزارش دادند باکتری‌های *باسیلوس لائروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبریکولوزیس* به عنوان باکتری‌های مقاوم از پساب شهری جداسازی و شناسایی شدند که درصد حذف فلز سرب از پساب غنی شده با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سرب توسط باکتری‌های *باسیلوس لائروسپروس* و *یرسینیا سودوتوبریکولوزیس* به ترتیب ۵۰/۶۰ و ۴۵/۷۰ درصد محاسبه شده بود (۱۴). تونالی و همکاران^{۵۸} در سال ۲۰۰۵ نشان دادند سویه جاذب سرب جداشده توسط آنها متعلق به جنس *باسیلوس* بوده و دارای حداکثر ظرفیت جذب سرب برابر با ۲۷/۹۲ میلی گرم بر گرم در غلظت اولیه ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر بوده است (۴۶). رای و همکاران^{۵۹} نیز جذب سرب توسط باکتری *باسیلوس سرئوس* را بررسی کردند و نشان دادند با افزایش غلظت محلول فلزی، درصد جذب سرب کاهش یافته بود. درنهایت، بالاترین مقدار جذب سرب توسط این

باسیلوس برابر با ۹۶ درصد با میزان ۱ درصد تلقیح بیومس تر در محلول حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر از یون سرب حاصل شده بود (۴۷). سید و چیتالا^{۶۰} جذب زیستی سرب توسط سه باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس*، *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* از نمونه خاک را به ترتیب ۷۸/۹، ۸۷ و ۸۵/۵ درصد گزارش کردند که تجزیه و تحلیل SEM-EDS در این تحقیق جذب فلز سرب را تأیید کرده بود (۴۸). گایاتری و همکاران در تحقیق خود نشان دادند *باسیلوس لیکنی فورمیس* جداشده از خاک پسماند الکترونیکی دارای قابلیت جذب زیستی سرب است و با افزایش غلظت سرب از ۱۰ ppm به ۲۵ ppm، درصد جذب سرب توسط باکتری از ۷۴/۹۴ درصد به ۸۹/۳۹ درصد افزایش یافت (۴۱). پیی و همکاران^{۶۱} نیز با مطالعه *باسیلوس* جداشده از رسوبات رودخانه سارنو در خلیج ناپل ایتالیا نشان دادند این جدایه نسبت به سرب با حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) ۴/۸ میلی مولار مقاوم است. همچنین، آنالیز ICP نشان داد پس از تلقیح سرب به محیط کشت با غلظت‌های ۰/۴۸ و ۱/۲ میلی مولار، بازدهی حذف باکتری به ترتیب ۳۱/۰۲ و ۲۸/۲۱ درصد محاسبه شد. بررسی SEM-EDS نیز جذب زیستی فعال این فلز توسط سلول‌های باکتریایی را تأیید کرد (۴۹). چیتالاپودی و همکاران^{۶۲} نیز در تحقیق خود نتایج مشابه با نتایج پژوهش حاضر را داشتند و با بررسی جذب زیستی فلز سرب و تشکیل ساختارهای نانوذره توسط باکتری استاندارد *باسیلوس سابتیلیس*، نشان دادند *باسیلوس سابتیلیس* ۶۰ درصد پتانسیل جذب زیستی داشت. آنها تولید نانوذره را با طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و ICP بررسی

نتایج این پژوهش نشان دادند باکتری جداسازی شده از خاک‌های پسماندهای الکترونیکی تپه‌های زینل واقع در جنوب شرقی اصفهان مقاوم به فلز سرب بوده و از پتانسیل بالایی برای حذف این فلز برخوردار است. با توجه به اینکه فلز سنگین سرب عمده آلودگی ایجاد شده توسط پسماندهای الکترونیکی است، می‌توان پیشنهاد داد پس از حذف ژن‌های مقاومت در باکتری باسیلوس تروپیکوس، این باکتری در آینده گزینه مناسبی برای جذب و حذف زیستی سرب از پسماندهای الکترونیکی و سایر پسماندهای صنعتی خواهد بود. جذب فلزات سنگین از انواع پسماندها توسط انواع میکروارگانیسم‌های مقاوم به انواع فلزات سنگین می‌تواند راه حل مفیدی برای رفع مشکل زیست محیطی ناشی از انواع فلزات سنگین سمی باشد که با فراهم کردن بستر و شرایط مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌های مذکور، می‌توان از آنها برای سمیت‌زدایی و حذف این فلزات از محیط زیست استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری با کد ۱۷۲۴۸۱۲۸۲۳۵۰۰۵۱۶۲۲۸۵۰۶۲ است که در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انجام شده است. نویسندگان این مقاله از مسئولان محترم دانشکده علوم زیستی و آزمایشگاه تحقیقاتی این دانشگاه به دلیل همکاری‌های لازم و حمایت‌های اجرایی کمال تشکر و امتنان را دارند.

References

- (1) Dixit R, Malaviya D, Pandiyan K, Singh UB, Sahu A, Shukla R, et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*. 2015; 7 (2): 2189-2212.

و تأیید کردند. نتایج EDS نشان دادند بیشترین عنصر در نانوذرات جذب شده با ۴۱/۷ درصد وزنی مربوط به سرب بوده است (۲۳). در پژوهش حاضر نیز براساس آنالیز عنصری میکروسکوپی با EDS در شکل ۱۲-ج مشخص شد میزان سرب شناسایی شده، بیش از دیگر عناصر و برابر ۵۷/۲ درصد وزنی بود. مطالعات نشان می‌دهد جذب سرب در طول فرایند جذب زیستی از طریق تبادل یونی، پیچیده شدن و زیست معدنی شدن صورت می‌گیرد (۵۰). در مطالعات میر و همکاران^{۶۳} مشخص شد Pb^{2+} توسط ویبریو هاروی^{۶۴} به $PbHPO_4$ ، $Pb_9(PO_4)_6$ یا PbS تبدیل شده است (۵۱). کیانو و همکاران^{۶۵} در مطالعه‌ای جذب زیستی سرب توسط زیست توده باسیلوس سابتیلیس جداسازی شده از خاک معدن سرب در چین را بررسی کردند که با به کارگیری روش‌های SEM-EDS و XRD تشکیل نانوذرات سرب را تأیید و محصولات متعدد زیست معدنی $Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ، $Pb_2Pb_5(PO_4)_3OH$ و $Pb_5(PO_4)_3Cl$ را گزارش کردند (۵۲). نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نیز با این مطالعات مطابقت دارند و با بررسی توسط SEM، XRD و EDS مشخص شد Pb^{2+} توسط سویه باسیلوس تروپیکوس جداسازی شده از خاک‌های حاوی پسماند الکترونیکی به $Pb_4(SO_4)(CO_3)_2(OH)_2$ و $2PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$ تبدیل شد. این نتایج در شکل ۱۲ نشان داده شده‌اند و با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه مطابقت دارند؛ زیرا گروه‌های عاملی دیواره سلولی باکتری‌ها همچون گروه‌های هیدروکسیل، سولفیدریل، کربوکسیل و فسفات که بار منفی دارند، می‌توانند با کاتیون‌های فلزی مانند Pb^{2+} واکنش دهند و این مکانیسم در جذب زیستی فلزات توسط میکروارگانیسم‌ها مؤثر است (۵۳).

- (2) Macaskie L, Dean A. Microbiol metabolism, desolubilisation and deposition of heavy metal: Metal uptake by immobilized cells and application to detoxification of liquid wastes. *Advances in biotechnology processes, biological waste treatment*, New York. 1989; 201.
- (3) Clausen CA. Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. *Waste management & research*. 2000; 18 (3): 264-268.
- (4) Vijayaraghavan K, Yun Y-S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*. 2008; 26 (3): 266-291.
- (5) Yuan CY, Zhang HC, McKenna G, Korzeniewski C, Li J. Experimental studies on cryogenic recycling of printed circuit board. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*. 2007; 34 (7-8): 657-666.
- (6) Singh PP, Chopra A. Removal of Zn^{2+} and Pb^{2+} using new isolates of *Bacillus* spp. PPS03 and *Bacillus subtilis* PPS04 from paper mill effluents using indigenously designed Bench-top Bioreactor. *Journal of Applied and Natural Science*. 2014; 6 (1): 47-56.
- (7) Khalil AT, Ovais M, Ullah I, Ali M, Jan SA, Shinwari ZK, et al. Bioinspired synthesis of pure massicot phase lead oxide nanoparticles and assessment of their biocompatibility, cytotoxicity and in-vitro biological properties. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020; 13 (1): 916-931.
- (8) Qayyum S, Khan I, Meng K, Zhao Y, Peng C. A review on remediation technologies for heavy metals contaminated soil. *Central Asian Journal of Environmental Science and Technology Innovation*. 2020; 1 (1): 21-29.
- (9) Michalak I, Chojnacka K, Witek-Krowiak A. State of the art for the biosorption process—a review. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2013; 170 (6): 1389-1416.
- (10) Weber J, Jamroz E, Kocowicz A, Debicka M, Bekier J, Ćwieląg-Piasecka I, et al. Optimized isolation method of humin fraction from mineral soil material. *Environmental Geochemistry and Health*. 2021; 1-10.
- (11) Schumacher BA. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments; 2002.
- (12) Sajadian M, Doudi M, Shirmardi A. Isolation and molecular identification of resistant bacteria Pb from soils oil contaminated in area C-branch Masjed Soleiman city in Khuzestan. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2018; 8 (30): 71-78.
- (13) Yektamanesh H, Doudi M, Emami Z. Isolation, Molecular Identification, and Bioremediation Activity of Chromium-Resistant Bacteria Collected from Waste Waters in Leather Tanning Plants of Khuzestan, Iran. *Biological Journal of Microorganisms*. 2021; 10 (38): 71-84.
- (14) Abbasi S, Chorom M, Enayatizamir N, Motamedi H. Isolation and Identification of Cadmium and Lead Resistant Bacteria and their Bacterial Removal from Wastewater. *Journal of Water and Wastewater; Ab va Fazilab*. 2017; 27 (6): 59-68.
- (15) Ebrahimi M, Ahani Azari A. Study on lead biosorption by lead resistant bacteria isolated from industrial wastewater of plants in AqQala industrial park. *Journal of Microbial World*. 2016; 9 (3): 257-267.
- (16) Balouiri M, Sadiki M, Koraichi I, Ibsouda S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016; 6: 72-78.
- (17) Michalak I, Chojnacka K, Marycz K. Using ICP-OES and SEM-EDX in biosorption studies. *Microchimica Acta*. 2011; 172 (1): 65-74.
- (18) Tsai P-J, Tsai T-H, Ho S-C. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food chemistry*. 2007; 105 (1): 311-316.
- (19) Packeiser H, Lim C, Balagurunathan B, Wu J, Zhao H. An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae. *Applied*

- biochemistry and biotechnology*. 2013; 169 (2): 695-700.
- (20) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*. 1991; 173 (2): 697-703.
- (21) Hashim M, Chu K. Biosorption of cadmium by brown, green, and red seaweeds. *Chemical Engineering Journal*. 2004; 97 (2-3): 249-255.
- (22) Amirpoor Z, Doudi M, Amiri GR. Biosynthesis of copper nanoparticles by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Microbial World*. 2018; 11 (1): 73-87.
- (23) Chintalapudi VK, Kanamarlapudi RKS, Mallu UR, Muddada S. Effect of pretreatment of *Bacillus subtilis* biomass on biosorption and its real time application. *Polish Journal of Chemical Technology*. 2021; 23 (1): 16-24.
- (24) Je M, Jung HJ, Koutavarapu R, Lee SJ, Lee SH, Kim SK, et al. Pulsed laser irradiation synthesis of lead selenide quantum dots from lead and selenium salts in various surfactants. *Materials Chemistry and Physics*. 2018; 217: 427-436.
- (25) Brandl H, Bosshard R, Wegmann M. Computer-munching microbes: metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. *Hydrometallurgy*. 2001; 59 (2-3): 319-326.
- (26) Gayatri Y, Shailaja R. Molecular characterization of Bacteria isolated from E-waste dumping yards at Hyderabad, Telangana, India. *European Journal of Experimental Biology*. 2016; 6: 1-5.
- (27) Kinuthia GK, Ngure V, Beti D, Lugalia R, Wangila A, Kamau L. Levels of heavy metals in wastewater and soil samples from open drainage channels in Nairobi, Kenya: Community health implication. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1): 1-13.
- (28) Zhang H-B, Yang M-X, Shi W, Zheng Y, Sha T, Zhao Z-W. Bacterial diversity in mine tailings compared by cultivation and cultivation-independent methods and their resistance to lead and cadmium. *Microbial ecology*. 2007; 54 (4): 705-712.
- (29) Kafilzadeh F, Afrough R, Mojoodi N. Isolation and identification of lead resistant bacteria from contaminated soils near gas stations in Jahrom city. *Journal of Health*. 2013; 4 (2): 110-121.
- (30) Raja CE, Selvam G, Omine K, editors. Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. *Int Joint Symp on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia*. 2009: 205-211.
- (31) Malik A, Khan IF, Aleem A. Plasmid incidence in bacteria from agricultural and industrial soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2002; 18 (9): 827-833.
- (32) Abou-Shanab R, Delorme T, Angle J, Chaney R, Ghanem K, Moawad H, et al. Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *International Journal of Phytoremediation*. 2003; 5 (4): 367-379.
- (33) Karim Salmani B, Amouzegar M, Hamed J. Biosorption of lead by bacteria isolated from biological wastewater petrochemical industry. *Journal of Environmental Science and Technology*. 2011; 13: 42-54.
- (34) Koochi Dehkordi M, Yousefzadeh M, Hemmati R, Danesh Shahraki A. Molecular identification of lead-resistant plant growth promoting *Bacillus* species isolated from lead-contaminated soil. *Biological Journal of Microorganisms*. 2019; 8 (30): 55-67.
- (35) Mohseni M, Khosravi F, Mohadjerani M, Chaichi M. Biosorption of lead and copper by heavy metal resistance bacterium using Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR). *Medical Laboratory Journal*. 2014; 8 (3): 30-39.
- (36) Alboghobeysh H, Tahmourespour A, Doudi M. Antibiotic resistance in isolated bacteria from urban sewage and copper smeltery industrial wastewater. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 2013; 15 (1): 95-102.
- (37) Efe D. Potential plant growth-promoting bacteria with heavy metal resistance. *Current Microbiology*. 2020; 77 (12): 3861-

- 3868.
- (38) Smejkalova M, Mikanova O, Boruvka L. Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. *Plant Soil and Environment*. 2003; 49 (7): 321-326.
- (39) Saravanan S, Nethala S, Pattnaik S, Tripathi A, Moorthi A, Selvamurugan N. Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*. 2011; 49 (2): 188-193.
- (40) Huang F, Wang Z-H, Cai Y-X, Chen S-H, Tian J-H, Cai K-Z. Heavy metal bioaccumulation and cation release by growing *Bacillus cereus* RC-1 under culture conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2018; 157: 216-226.
- (41) Gayatri Y, Shailaja Raj M, Vijayalakshmi B. Biosorption of lead by *Bacillus licheniformis* isolated from E-waste landfill, Hyderabad, Telangana, India. *International Journal of Bioassays*. 2017; 13 (1): 5240-5244.
- (42) Lugauskas A, Levinskaitė L, Pečiulytė D, Repeškienė J, Motuzas A, Vaisvalavičius R, et al. Effect of copper, zinc and lead acetates on microorganisms in soil. *Ekologija*. 2005; 1: 61-69.
- (43) Hoseynzadeh A, Khaleghi M, Sasan H. Investigating the Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Synthesized by Bacteria Isolated From Agricultural Soils of Kerman, Iran. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2017; 11 (5): 136-148.
- (44) Levard Cm, Mitra S, Yang T, Jew AD, Badireddy AR, Lowry GV, et al. Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*. *Environmental science & technology*. 2013; 47 (11): 5738-5745.
- (45) Mohapatra RK, Parhi PK, Pandey S, Bindhani BK, Thatoi H, Panda CR. Active and passive biosorption of Pb (II) using live and dead biomass of marine bacterium *Bacillus xiamenensis* PbRPSD202: Kinetics and isotherm studies. *Journal of environmental management*. 2019; 247: 121-134.
- (46) Tunalı S, Çabuk A, Akar T. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal*. 2006; 115 (3): 203-211.
- (47) Ray L, Paul S, Bera D, Chattopadhyay P. Bioaccumulation of Pb (II) from aqueous solutions by *Bacillus cereus* M1 16. *Journal of Hazardous Substance Research*. 2006; 5 (1): 1-24.
- (48) Syed S, Chinthala P. Heavy metal detoxification by different *Bacillus species* isolated from solar salterns. *Scientifica*. 2015; 3: 1-8.
- (49) Pepi M, Borra M, Tamburrino S, Saggiomo M, Viola A, Biffali E, et al. A *Bacillus* sp. isolated from sediments of the Sarno River mouth, Gulf of Naples (Italy) produces a biofilm biosorbing Pb (II). *Science of the Total Environment*. 2016; 562: 588-595.
- (50) Cao J-S, Wang C, Fang F, Lin J-X. Removal of heavy metal Cu (II) in simulated aquaculture wastewater by modified palygorskite. *Environmental Pollution*. 2016; 219: 924-931.
- (51) Mire CE, Tourjee JA, O'Brien WF, Ramanujachary KV, Hecht GB. Lead precipitation by *Vibrio harveyi*: evidence for novel quorum-sensing interactions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70 (2): 855-864.
- (52) Qiao W, Zhang Y, Xia H, Luo Y, Liu S, Wang S, et al. Bioimmobilization of lead by *Bacillus subtilis* X3 biomass isolated from lead mine soil under promotion of multiple adsorption mechanisms. *Royal Society open science*. 2019; 6 (2): 181701.
- (53) Cho DH, Kim EY. Characterization of Pb²⁺ biosorption from aqueous solution by *Rhodotorula glutinis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2003; 25 (5): 271-277.

- 1- Ion Exchange Resins
- 2- *Bacillus tropicus*
- 3- Total Organic Carbon
- 4- Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry
- 5- Ethylenediaminetetraacetic acid
- 6- $Pb(NO_3)_2$
- 7- Minimum Inhibitory Concentration
- 8- Minimum Bactericidal Concentration
- 9- Macrodilution
- 10- Luria Bertani broth (LB broth)
- 11- Disk diffusion (Kirby bauer)
- 12- Scanning Electron Microscopy
- 13- Freeze dryer
- 14- X-ray diffraction
- 15- Energy-dispersive X-ray spectroscopy
- 16- Full-Width at Half-Maximum
- 17- *Thiobacillus*
- 18- *Aspergillus niger*
- 19- *Penicillium simplicissimum*
- 20- *Bacillus subtilis*
- 21- *Bacillus cereus*
- 22- Zhang *et al.*
- 23- *Acinetobacter*
- 24- *Ralstonia*
- 25- *Comamonas*
- 26- *Chryseobacterium*
- 27- Saadian *et al.*
- 28- *Proteus mirabilis*
- 29- *Bacillus funiculus*
- 30- *Xenorhabdus*
- 31- Kafilzadeh *et al.*
- 32- *Pseudomonas*
- 33- *Corynebacterium*
- 34- *Staphylococcus*
- 35- *Escherichia coli*
- 36- Ebrahimi and Ahani Azari
- 37- Raja *et al.*
- 38- Malik *et al.*
- 39- Abou-Shanab *et al.*
- 40- Salmani *et al.*
- 41- Koohi Dehkordi *et al.*
- 42- *Bacillus amyloliquefaciens*
- 43- Mohseni *et al.*
- 44- Abbasi *et al.*
- 45- *Bacillus laterosporus*
- 46- *Yersinia pseudotuberculosis*
- 47- Alboghobeysh *et al.*
- 48- *Klebsiella oxytoca*
- 49- *Renibacterium salmoninarum*
- 50- *Rhodococcus equi*
- 51- *Acinetobacter junii*
- 52- *Neisseria mucosa*
- 53- Efe *et al.*
- 54- Smejkalova *et al.*
- 55- Gayatri *et al.*
- 56- *Bacillus licheniformis*
- 57- Lugaskas *et al.*
- 58- Tunalı *et al.*
- 59- Ray *et al.*
- 60- Syed and Chinthala
- 61- Pepi *et al.*
- 62- Chintalapudi *et al.*
- 63- Mire *et al.*
- 64- *Vibrio harveyi*
- 65- Qiao *et al.*