توانایی حذف فلزات سنگین توسط سویه‌های سیانوباکتری جدا شده از آب‌های شور استان گلستان

مرضیه قدیرلی[۱]، ستاره حقیقت[۱]، بهاره نوروزی[۲]*

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۲۷

چکیده

سیانوباکتری‌ها در هر محیط اکولوژیک از آب شور گرفته تا محیط های خشک آلوده به فلز یافت می‌شوند. بیشتر سویه‌های این باکتری ها قادر به تولید مواد پلیمری خارج سلولی از جنس پلی ساکاریدهای طبیعی هستند که بار منفی مواد پلیمری خارج سلولی (EPS) سیانوباکتری ها برای جداسازی کاتیون های فلزی که با غلظت کم در محیط اطراف سلول هستند، کاربرد زیادی دارد. هدف از این مطالعه، مقایسه توانایی بیست و پنج سویه سیانوباکتری در حذف فلزات سنگین بود. تعداد ۲۵ سویه سیانوباکتری جدا شده از آب‌های شور استان گلستان، پس از کشت و خالص سازی، با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل، مس و کروم کشت گردیدند. بعد از ۲۴ ساعت، میزان حذف فلزات از محلول با تفاوت در غلظت فلز در قبل و بعد از تماس با کشت سیانوباکتری اندازه گیری شد. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین ها با آزمون توکی انجام گردید. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری نشان داد که هر ۲۵ سویه سیانوباکتری مقاوم به شوری به راحتی قابلیت حذف فلزات سنگین را داشتند و این نشان از توانایی نشات گرفته از محیط زندگی آنها است. با این حال، سویه N3 (وزن خشک ۵۱۳ میلی گرم) که متعلق به راسته Nostocales از سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار است، با اختلاف معناداری، بیشترین قابلیت را در حذف فلزات نیکل، کرم و مس در مقایسه با دیگر سویه‌ها داشت. سویه‌های سیانوباکتری جدا شده از آب‌های شور استان گلستان توانایی حذف معنی‌دار فلزات سنگین را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: سویه، سیانوباکتری، فلزات سنگین

مقدمه

آلودگی منابع آب با فلزات سنگین در نتیجهٔ فعالیت‌های صنعتی، حیات تمامی موجودات زنده را تهدید می‌کند؛ بنابراین حذف آن‌ها از پساب‌ها قبل از ورود به محیط زیست امری ضروری می نماید (Shrestha و همکاران ۲۰۲۱). روش‌های مختلف فیزیکوشیمیایی مانند جذب سطحی، رسوب دهی شیمیایی، استخراج با حلال، استفاده از روش‌های تعویض یونی و غیره، ممکن است در جداسازی فلزات سنگین استفاده شوند (Sheth و همکاران، ۲۰۲۱، Qasem و همکاران، ۲۰۲۱)، اما هر کدام دارای معایبی هستند که از آن جمله می‌توان به جداسازی ناکامل فلزات، نیاز به تجهیزات گران قیمت و سیستم‌های مونیتورینگ، مصرف زیاد انرژی و برجای گذاشتن باقی‌مانده‌های آلوده کننده که باید حذف گردند، اشاره نمود. از طرف دیگر، روش‌های فوق هنگامی که غلظت یون‌های فلزی در محدودهٔ ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باشند به اندازهٔ کافی توانایی حذف فلزات

* نویسندهٔ مسئول: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir

سنگین را ندارند. استفاده از روش‌های زیستی در حذف فلزات از پساب‌ها میتواند برخی از محدودیت ها و مشکلات مربوط به روش های فیزیکیوشیمیایی را برطرف نماید و راه حل اقتصادی‌تری محسوب می‌شود (Volesky ، ۲۰۰۱).

در سال‌های اخیر، استفاده از توده‌های زیستی مختلف برای حذف فلزات سنگین از پساب‌ها مورد توجه قرارگرفته است. در این میان، استفاده از میکروارگانیسم هایی مانند ریز جلبک ها که توانایی بالقوه ای جهت حذف فلزات سنگین دارند جایگاه ویژه ای پیداکرده است (Yun و همکاران در سال ۲۰۰۱). استفاده از EPS تولیدی میکروارگانیسم ها (یا به صورت ایزوله شده) جایگزین مناسبی برای روش‌های مرسوم شیمیایی و فیزیکوشیمیایی در حذف کاتیون‌های فلزی از آب‌های آلوده می‌باشد (Volesky ، ۲۰۰۱).

از مزایای این تکنولوژی جدید می توان به مواردی چون استفاده از منابع طبیعی و تجدید پذیر، کاهش هزینه‌ها، سرعت سریع حذف فلزات، توانایی حذف یون‌های فلزی در غلظت‌های کم، تصفیه آب‌های آلوده به طور خود به خود با وجود یون‌های فلزی متفاوت و احیاء فلزات ارزشمند از طریق جذب زیستی اشاره کرد (De Philippis و همکاران در سال ۲۰۰۳).

در واقع EPS تولیدی سیانوباکتری به علت خصوصیات منحصر به فرد پوشش پلی ساکاریدی، می تواند به عنوان کاندید امیدبخشی مطرح باشد (De Philippis و همکاران در سال ۲۰۰۳). بطورکلی سیانوباکتری‌ها یا جلبک‌های سبز آبی پروکاریوت‌های فتوسنتزی اکسیژنیک هستند که دارای ویژگی های مشابه با باکتری ها (پروکاریوت ها) و جلبک ها (یوکاریوت ها) هستند و از نظر ساختمان سلولی مشابه با سلول های پروکاریوتی است، چرا که فاقد هسته و اندامک‌های مشخص مانند میتوکندری، ضمائم گلژی، شبکه آندوپلاسمی و واکوئل هستند. غشای خارجی و لیپوپلی ساکاریدهای دیوارهٔ سیانوباکتری ها مشابه با باکتری های گرم منفی است و با داشتن لایه ضخیم پپتیدو گلیکانی، مشابه با باکتری های گرم مثبت هستند. از طرف دیگر نوع تغذیه، تولید اکسیژن و شیوه فتوسنتز آن ها مشابه دیگر جلبک‌ها و گیاهان عالی است (Cepoi و همکاران، ۲۰۲۱، Mota و همکاران، ۲۰۲۲).

بلوم های سیانوباکتریایی تشکیل شده توسط گونه‌های پلانکتونی یا سیانوباکتری های زیر دریایی، تاثیرات شدیدی را بر عملکرد اکوسیستم، مانند اختلال در روابط میان ارگانیسم‌ها، تغییرات تنوع زیستی، شرایط نور یا غلظت اکسیژن دارد. افزایش جمعیت سیانوباکتری می‌تواند باعث ایجاد مشکل قابل توجه در کیفیت آب شود، به خصوص به این دلیل که بسیاری از گونه‌های سیانوباکتر قادر به سنتز طیف گسترده‌ای از بوها، ترکیبات مضر یا سموم قوی هستند (Bergi و همکاران، ۲۰۲۰).

سیانوباکتری ها از لحاظ تولید اکسیژن در آب های شیرین و شور و همچنین از لحاظ تثبیت نیتروژن هوا، به ویژه در آب های کم نیتروژن اهمیت زیادی دارند. نیتروژن حاصل از فعالیت سیانوباکتری ها نقش مهمی در چرخه پروتئین سازی اکوسیستم ها دارد. سیانوباکتری ها در محیط هایی با pH خنثی و قلیائی رشد می کنند و در محیط هایی با pH اسیدی رشد محدود دارند (Khuram و همکاران، ۲۰۲۱). بنابراین سیانوباکتری ها را کمتر می توان در اطراف چشمه های آب معدنی گوگرد دار مشاهده کرد. آن ها می توانند شوری را تحمل نمایند و در دریاچه‌های آب شور نیز مشاهده می شوند. اگر اکسیژن محیط زیاد باشد، تثبیت نیتروژن درون سلول های اختصاص یافته‌ای به نام هتروسیست انجام می‌شود ولی در غیاب اکسیژن نیز سلول های رویشی معمولی هم ممکن است نیتروژن را

تثبیت کنند. آنزیم نیتروژناز تثبیت نیتروژن را سریع‌تر کرده و می‌تواند استیلن را به اتیلن تبدیل کند و با استفاده از واکنش تبدیل استیلن به اتیلن می توان تثبیت نیتروژن توسط سیانوباکتری‌ها را تخمین زد (Bernard و همکاران، ۲۰۱۹).

سه دسته از جلبک‌های سبز- آبی قادرند ازت گازی را تثبیت کنند و بنابراین به منابع نیتروژن غیروابسته هستند. گروه اول: جلبک‌های ریسه‌ای دارای هتروسیت مانند نوستوک، آنابنا، آنابنوپسیس، سیلیندروسپرموم، کالوتریکس و سیتونما هستند.این گونه‌ها قادر به تثبیت ازت گازی هستند. در محیط فاقد نیتروژن معدنی هتروسیست‌ها رشد کرده و از ازت گازی استفاده می‌کنند. هتروسیست‌ها سلول‌های بزرگ توخالی حاوی تیلاکوئیدهای لایه‌ای و دایره‌ای شکل با سیتوپلاسم متراکم و همگن هستند که دارای کاروتنوئید بیشتر و کلروفیل و فیکوبیلین کمتری می‌باشند و به رنگ زرد مشاهده شدند . به دلیل نبود فیکوبیلین‌ها و کلروفیل a تثبیت CO_2 یا تولید O_2 در هتروسیست‌ها وجود ندارد. در این ساختارها تیلاکوئیدها به هم فشرده بوده، حاوی گلیکولیپید و آسیل لیپید هستند و در آن ها میکروپلاسمودسم نیز یافت می شود که موجب انتقال آمونیوم تثبیت شده به صورت گلوتامین از هتروسیست‌ها به سلول‌های مجاور می‌شود. دیواره سلولی آنها شامل لایه لیفی بیرونی، لایه همگن میانی و لایه تیغه‌ای درونی است. ضخامت دو لایه اخیر در انتهای قطبی سلول بیشتر است (Cellamare و همکاران، ۲۰۱۸).

در مطالعاتی در زمینه کاربرد سیانوباکتری‌ها در حذف فلزات سنگین صورت گرفته است توانایی گونه ای از سیانوباکتری جنس اوسیلاتوریا برای جذب زیستی یونهای فلزی سنگین مانند کبالت و کادمیوم بررسی شده است، مقایسه ظرفیت جذب یونهای کبالت و کادمیوم توسط جرم زیستی خشک شده با طبیعی اوسیلاتوریا نشان داد جرم زیستی خشک شده ظرفیت جذب بالاتری را داراست (Chakdar و همکاران، ۲۰۲۲). همچنین در مطالعات بر روی تصفیه فاضلاب‌ها توسط جلبک‌ها، چنین گزارش شده است که گونه هایی از جلبک ها و سیانوباکتری ها قادر به حذف مواد مغذی از جمله فسفر و نیتروژن می باشند مانند *Aphanocapsa* ،*Oscillatoria, Phormidium* (Bon و همکاران، ۲۰۲۱).

در تحقیقات صورت گرفته، بر روی عملکرد زیست توده مرده جلبک فوکوس سراتوس برای جذب زیستی همزمان کادمیوم و نیکل از محیط آبی زمان تعادل ۳۰۰ دقیقه بود و همچنین ایزوترم جذب با استفاده از معادله لانگموییر تفسیر شد و بیشینه جذب برای فلزات کادمیوم و نیکل به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۹۵ میلی مول بر گرم گزارش شد. در تحقیقاتی که بر روی حذف فلزات سنگین در محیط آبی با استفاده از فناوری زیست پالایی انجام گرفت گزارش شده است که به منظور انجام موثر آلودگی زدایی توسط فناوری زیست پالایی، می بایست کارایی این فرآیند با توجه به دامنه غلظت متفاوت یونهای فلزی تامین گردد، همچنین باید در انتخاب ارگانیسم هایی که در مطالعات بهترین عملکرد را در زیست پالایی فلزات مختلف و ترکیبات ان داشته اند صورت پذیرد (Sadvakasova و همکاران، ۲۰۲۱، Ahmad، ۲۰۲۲; Iqbal و همکاران، ۲۰۲۲).

برخی ویژگی ها، سیانوباکتری ها را به گزینه ای عالی برای حذف فلزات سنگین تبدیل می کند. به عنوان مثال، ویژگی های دیواره سلولی، سامانه های انتقال مختلف و انتشار EPS. گونه‌های مختلف سیانوباکتری گزارش شده‌اند که یون‌های فلزات سنگین را از طریق جذب زیستی یا تجمع زیستی و در بسیاری از موارد از هر دو طریق جدا می‌کنند. برای مثال برخی از گونه‌ها یون‌های فلزات سنگین را با

جـذب زیســـتی از طریق EPS جدا می‌کنند. به عنوان مثال سویه های *Anabaena doliolum*، *Tolypothrix ceytonica*، *Scenedesmus quadricauda*، *Nostoc* PCC7936، *Cyanospira capsulate*، *Cyanothece*، *Cyanospiracapsulata* ATCC43193، *Limnococcus* sp.، *Nostoc* PCC7936، *Microcystis* sp.، *Synechococcus* sp.، *Spirulinam platensis* در این امر بسیار کارامد هستند (Hoiczyk و Hansel، درسال ۲۰۰۰، Mohamed در سال ۲۰۰۱، De Philippis در سـال ۲۰۰۳، Rai and Tripathi در سـال ۲۰۰۷، Goswami و همکاران در سـال ۲۰۱۵، Palaniswamy و Veluchamy در سال ۲۰۱۷، Sen و همکاران در سال ۲۰۱۸).

مطـالعات مختلف گروه‌های عملکردی متفاوتی را در EPS سـیانوباکتری پیدا کردند که مسـئول جذب یون‌هـای فلزی هسـتنـد. محققـان دریافتند که گروه کربوکسـیل و آمید مسئول اتصال مس با *Gloeothece* sp. هسـتند. گروه های هیدروکسیل، آمید، کربوکسیل، سـولفات و کربونیل *Anabaena doliolum* به جذب بیولوژیکی کـادمیوم از آب کمک می کنند. کروم (iii) و کروم (vi) توسـط گروه هیدروکسـیل و آمید کلرلا مینیات و هم چنین توسـط گروه عاملی هیدروکسیل و آمید *Synechocystis* sp. PCC6803. جذب شـدند. Chojnacka و همکـاران دریـافتنـد کـه حتی در مورد سـلول‌هایی از گونه‌های سـیانوباکتری مشابه، که تحت شـرایط مختلف شـدت نور و غلظت گلوکز کشـت شـونـد، ویژگی‌هـای جذب زیسـتی متفاوتی دارند (Chojnacka و همکـاران در سـال ۲۰۰۵، Han و همکـاران در سـال ۲۰۰۸، Goswami و همکاران در سـال ۲۰۱۵، Shen و همکـاران در سـال ۲۰۱۸، Muthukumaran و همکاران در سال ۲۰۲۱).

مطالعات نشـان داده اسـت که در مقایسـه با سایر سـیـانوباکتری‌های مورد مطالعه، کشـت *A. oryzae* رانـدمان حذف بالایی برای Cd^{2+} و به دنبال آن برای Pb^{2+}، Zn^{2+}، Fe^{2+}، Cu^{2+} و Mn^{2+} نشان داد. هم چنین گونه های سـیانوباکتری که فلزات سنگین را در داخل سـلول از طریق تجمع زیسـتی جذب می کند، شـامل *Synechococcus* sp. PCC 7942، *Nostoc muscorum*، *Spirulina fusiformis*، *Limnococcus* sp هسـتند (Zada و همکاران، ۲۰۲۲). علاوه بر این، بسـیاری از گونه ها فلز را با هر دو فرآیند از آب جدا مـی کـننـد. برای مثـال، *Limnococcus* sp. (sen)، *Synechococcus* sp. PCC 7942. گزینـه هـای بهتر برای حـذف فلزات سـنگین ممکن اسـت شـامل *Limnococcus* sp.، *Nostoc muscorum* و *Synechococcus* sp. PCC 7942 باشد. تاکنون در بین این گونـه ها، *Synechococcus* sp. PCC 7942 برای جداسـازی حداکثر انواع یون‌های فلزات سنگین، یعنی Cu (ii)، Ni (ii)، سرب (ii)، Cd (ii)، کروم (iii)، کروم (vi)، روی، Co، Hg یافت می‌شـود. محققان نشـان دادنـد که در شـرایط ایده آل، *Synechococcus* sp. PCC 7942 سـرعت رشـد بالایی دارد و یون های فلزات سـنگین را می توانند بلافاصله پس از تماس با محلول فلزی به دیواره سـلولی آن متصل کنند (Pandi و همکـاران در سـال ۲۰۰۹، Martin-Betancor و همکاران در سال ۲۰۱۵، Fawzy و Mohamed در سال ۲۰۱۷؛ Sen و همکاران در سال ۲۰۱۸).

با توجه به اهمیت نقش سـیانوباکتری‌ها در حذف فلزات سنگین و مطالعات اندک صورت گرفته در این زمینـه، هـدف از این تحقیق بررسـی توانـایی حذف فلزات سنگین توسط سویه‌های سیانوباکتری جدا شده از آب‌های شور استان گلستان بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه های سـیانوباکتری : سـویه های سـیانوباکتری از دانشـگاه آزاد اسـلامی واحد علوم

تحقیقات قسمت هرباریوم البرزگرفته شد که این سویه ها قبلاً از آب های شور استان گلستان، پس از جمع‌آوری، کشت داده شده بودند و از خالص بودن سویه ها بعد از کشت های متوالی اطمینان حاصل شده بود (Nowruzi et al., 2022). مواد لازم جهت تهیه محیط کشت اختصاصی سیانوباکتری‌ها (BG11) در جدول ۱ آورده شده است:

جدول ۱: اجزای تشکیل دهنده محیط کشت برای رشد سیانوباکتری های هتروسیست دار (ماکرو و میکرو المان ها) (Stanier و همکاران، ۱۹۷۱).

مقدار لازم برای تهیه ۱ لیتر	عناصر مورد نیاز	مقدار لازم برای تهیه ۱ لیتر	عناصر مورد نیاز
۲/۸۶ گرم	H_2BO_3	۰/۰۴ گرم	K2Hpo4
۱/۸۱ گرم	$MnCl_2\ 4H_2O$	۰/۰۷۵ گرم	MgSo4
۰/۲۲۲ گرم	$ZnSO_4\ 7H_2O$	۰/۰۳۶ گرم	Ca Cl2
۰/۳۹ گرم	$NaMOO_4$	۰/۰۰۶ گرم	اسید سیتریک
۰/۰۷۹ گرم	$CuSO_4\ 5H_2O$	۰/۰۰۱ گرم	EDTA
۴/۴۹ میلی گرم	$COSO_4\ 7H_2O$	۰/۰۲ گرم	Na2Co3
به حجم ۱ لیتر می رسانیم	آب مقطر	۱۰ میلی لیتر	محلول عناصر کمیاب
		به حجم ۱ لیتر می رسانیم	آب مقطر

محیط کشت اختصاصی مایع سیانوباکتری ها (BG11): ابتدا ۲ عدد ارلن ۲۰۰۰ میلی لیتر و ۱ عدد ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتر، به وسیله آب مقطر شستشو داده شد. سپس، داخل هر ارلن یک مگنت انداخته و مقداری آب مقطر داخل آن ریخته شد و روی هیتر گذاشته و حرارت روی ۵۰ درجه سیلسیوس تنظیم شد. ارلن به صورتی قرار داده شد که مواد خوب مخلوط گردند. در ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری محلول عناصر کمیاب تهیه گردید. با توجه به مقداری که در جدول (۱) ذکر شده است مواد داخل ارلن ریخته شد تا مخلوط شوند، بعد از رساندن به حجم ۱ لیتر، pH آن اندازه گیری گردید و روی ۷/۱-۷/۲ تنظیم شد. پس از استریل شدن داخل یخچال ۴ درجه سانتیگراد برای مصارف بعدی نگهداری شد. در ادامه کار، در ارلن ۲۰۰۰ میلی لیتری محیط کشت ماکروالمان را مطابق با جدول (۱) تهیه شد و بعد از رساندن به حجم ۱ لیتر، pH آن مانند محیط کشت مرحله قبل روی ۷/۱-۷/۲ تنظیم گردید. جهت کشت نمونه‌ها از فالکون ۵۰ میلی‌لیتری استریل، استفاده شد به طوری که مقداری از محیط کشت مایع را داخل آن ریخته و نمونه‌ها داخل آن ها اضافه شد (Rippka وهمکاران، ۱۹۷۹)

محیط کشت اختصاصی جامد سیانوباکتری ها: برای تهیه محیط کشت آگاردار (جامد) تمامی مراحل جهت تهیه محیط کشت ماکروالمان را انجام داده و قبل از استریل کردن، در حالی که روی هیتر قرار دارد به آن ۱۰ گرم پودر آگار آگار اضافه شد و تا زمانی که محلول شفاف شد، روی هیتر استیرر قرار گرفت. سپس pH ان را تنظیم و استریل شد. پس از توزیع محیط کشت داخل پلیت‌های ۸ سانتی متری استریل، سیانوباکتری‌ها توسط اسکالپر داخل پلیت‌ها قرار داده شده و در معرض نور سفید و دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی گراد (دمای محیط آزمایشگاه)، نگهداری گردید. نمونه ها در طول دوره رشد چندین مرتبه به صورت

دستی تکان داده شدند تا هوادهی آن‌ها تامین گردد. پس از تقریباً یک ماه، جهت پیدا کردن نمونه ای که بیشترین جذب فلزات سنگین را دارد، نمونه از محیط کشت جامد به محیط کشت مایع انتقال داده شد (Rippka وهمکاران، ۱۹۷۹).

آماده سازی محلول های فلزی مس-کروم-نیکل: ابتدا محلول های ۱۰ میلی گرم بر لیتر مس-کروم و نیکل را آماده کرده و به صورت جداگانه در ۱ لیتر آب مقطر دیونیزه ریخته شد. سپس به وسیله دستگاه طیف سنج اتمی[1]، جذب اتمی نمونه ها قرائت شد. برای این مرحله ابتدا به وسیله دستگاه طیف سنج اتمی، ۵۰ میلی لیتر آب مقطر در ۴۹۰ میلی لیتر از نمونه فلزات سنگین (۱۰ میلی گرم بر لیتر)، به عنوان بلانک خوانش شد. در ادامه محیط کشت مایع در کیسه دیالیز ریخته شده و ۴۰ دقیقه درون محلول ۱ مولار HCL قرار داده شد تا یون‌های فلزی که ممکن است با بار منفی پوشش سلول های سیانوباکتری باند شده باشد را حذف کند (Al-Amin و همکاران، ۲۰۲۱).

کیسه دیالیز حاوی محیط کشت ۱ شبانه روز درون آب مقطر قرار داده شد تا HCL اضافی آن حذف گردد، سپس ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت، از کیسه دیالیز بیرون آورده شده و داخل ۴۹۰ میلی لیتر از محلول فلز ۱۰ میلی گرم بر لیتر با چرخش مداوم به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از آن با استفاده از کاغذ واتمن (فیلتراسیون) محیط کشت را جدا کرده و پس از خشک کردن، محلول با فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میلی‌متری برای خوانش جذب اتمی صاف شد. در این مرحله محیط کشت های جدا شده، خشک و وزن گردید. جذب محلول های صاف شده به وسیله دستگاه طیف سنج قرائت شده و با جذب بلانک مقایسه شد (De Philippis و همکاران در سال ۲۰۰۳). در نهایت تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام گردید.

نتایج

محیط های کشت طبق پروتکل شرح داده شده آماده و کشت سیانوباکتری روی آن انجام شد شکل ۱ نشان دهنده سیانوباکتری رشد کرده روی محیط کشت مایع (b) و محیط کشت جامد (a) می‌باشد. در شکل های دو، سه و چهار، نتایج حاصل از حذف فلزات سنگین Cu، Cr و Ni آورده شده است. مقایسه میانگین میزان حذف فلزات سنگین Cu، Cr و Ni با ۲۵ سویه‌های مختلف سیانو باکتری راسته Nostocales اختلاف معناداری را در سویه های مختلف با سطح اطمینان ($p<۰/۰۵$)نشان می‌دهد.

در رابطه با حذف Cu مشخص شد که بالاترین میانگین به میزان (mg Cu(II) (g dry weight)$^{-1}$) ۱۴/۴۳ به سویه N3 اختصاص داشت و سویه S29 نیز به میزان (mg Cu(II) (g dry weight)$^{-1}$) ۱۴/۰۰ در رتبه بعدی قرار داشت که در گروه آماری مجزایی نسبت به سایر سویه‌ها قرار گرفت. کمترین میانگین نیز به سویه N27 به میزان (mg Cu(II) (g dry weight)$^{-1}$) ۱۰/۱۳ اختصاص داشت که با سویه‌های A2 و Salt S در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل دو).

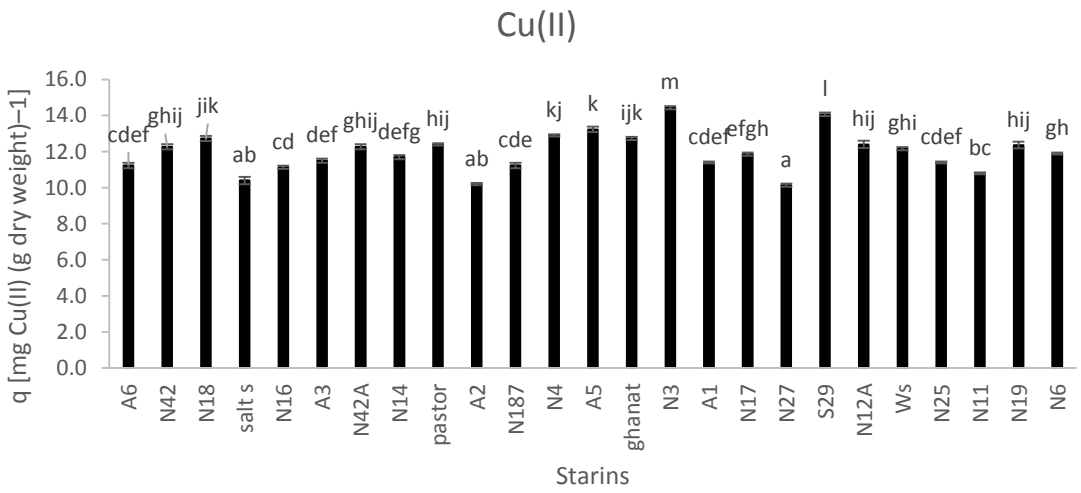
در ارتباط با فلز سنگین کروم نیز مشخص شد که سویه‌های N3 و A3 به ترتیب با مقادیر (mg Cr(II) (g dry weight)$^{-1}$) ۱۴/۹۳ و ۸/۷ بیشترین و کمترین میانگین را نشان دادند، لازم به ذکر است که سویه Salt S با سویه A3 در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل سه). بررسی و مقایسه میانگین فلز نیکل نیز نشان داد که بالاترین و کمترین میانگین به میزان (mg Ni(II) (g dry weight)$^{-1}$) ۱۶/۱ و ۹/۴ به ترتیب

[1] Atomic Absorption

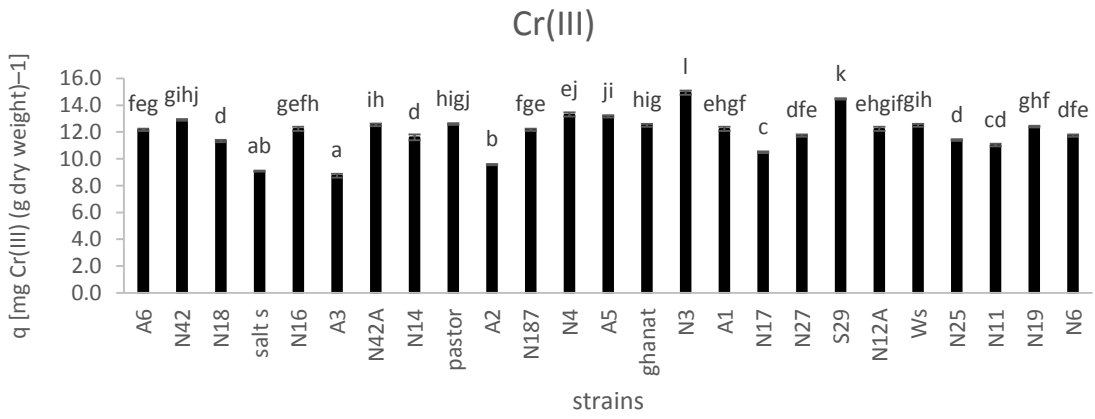
به ســـویه‌های N3 و N27 مربوط بود که در گروه‌های آماری مجزایی قرار گرفتند (شکل چهار).

(c) (b) (a)

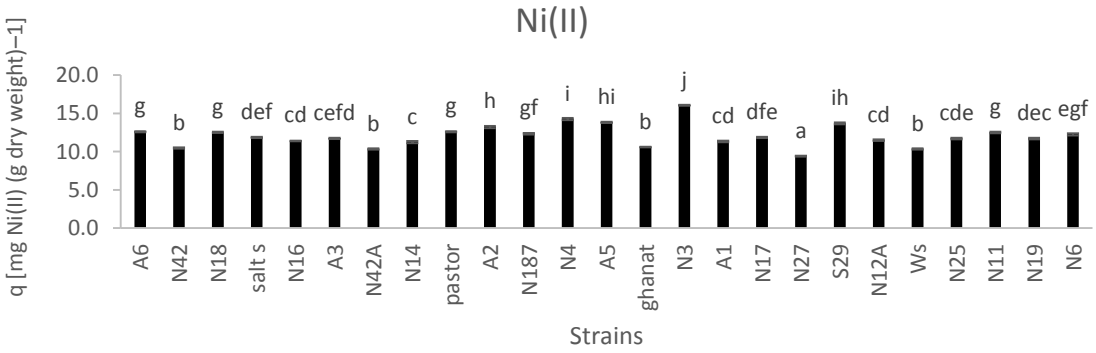
شکل ۱: a: سیانوباکتری رشد کرده روی محیط کشت جامد، b: سیانوباکتری رشد کرده روی محیط کشت مایع، c: سیانوباکتری N3 در محیط کشت اختصاصی BG11



شکل ۲: مقایسه میانگین میزان حذف فلز سنگین Cu با ۲۵ سویه مختلف سیانو باکتری راسته Nostocales (میانگین با حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد (توکی) می‌باشد)



شکل ۳: مقایسه میانگین میزان حذف فلز سنگین Cr با ۲۵ سویه مختلف سیانو باکتری راسته Nostocales
(میانگین با حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد (توکی) می‌باشد)



شکل ۴: مقایسه میانگین میزان حذف فلز سنگین Ni با ۲۵ سویه مختلف سیانو باکتری راسته Nostocales
(میانگین با حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد (توکی) می‌باشد).

بحث

جذب زیستی فلزات سنگین یکی از موثرترین فناوری‌ها در انتقال فلزات سنگین از مکان های آلوده بوده که در دهه اخیر استفاده شده است. جمعیت و فعالیت میکربی در آبهای آلوده با فلزات سنگین تغییر یافته و کاهش می‌یابد. از طرف دیگر میکروارگانیسم‌های مقاوم به این آلاینده‌ها، سازوکارهای مقاومتی را ایجاد می کنند که منجر به ایجاد گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمی بودن فلزی می‌شوند. به منظور انجام موثر آلودگی زدایی توسط فنآوری زیست پالایی، می بایست کارایی این فرآیند با توجه به دامنه غلظت متفاوت یون های فلزی تعیین گردد. همچنین می بایست در انتخاب ارگانیسمهایی که در مطالعات، بهترین عملکرد را در زیست پالایی فلزات مختلف و ترکیبات آن را داشته اند، صورت پذیرد (Bloch و Ghosh، ۲۰۲۲).

از میان روش‌های میکروبی مختلف، جذب زیستی در مقایسه با فرآیند تجمیع زیستی در کاربردهای مقیاس کامل، عملی تر می باشد. زیرا در تجمیع زیستی نیازمند افزودن نوترینتها جهت جذب فعال فلزات سنگین است (Ghorbani et al., 2022).

در تحقیقی که به منظور حذف فلز سنگین مس توسط ریز جلبک *Spirulina platensis* انجام گرفت مشخص شد میزان وزنی جلبک *Spirulina platensis* برابر ۰/۶ گرم بر لیتر و غلظت فلز ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر می‌باشد (Cepoi و همکاران، ۲۰۲۰). نتایج بدست آمده چنین ثابت کرد که زیست توده *Spirulina platensis* برای توسعه جاذب‌های اقتصادی و کارآمد جهت حذف فلزات سنگین از محیط آبی مناسب است. گزارش شده است که به منظور انجام موثر آلودگی زدایی توسط فناوری زیست پالایی، می بایست کارایی این فرآیند با توجه به دامنه غلظت متفاوت یون های فلزی تامین گردد، همچنین باید در انتخاب ارگانیسم هایی که در مطالعات بهترین عملکرد را در زیست پالایی فلزات مختلف و ترکیبات آن داشته اند صورت پذیرد. تصفیه زیستی تنها در مواردی امکان پذیر است که شرایط محیطی اجازه رشد و فعالیت میکروبی را بدهند. کاربرد آناغلب شامل دستکاری پارامترهای محیطی است تا رشد و تخریب

میکروبی را با سرعت بیشتری انجام دهد (Akbarnezhad و همکاران، ۲۰۲۰)

در بررسی توانایی سیانوباکتری *Nostoc* در حذف فلز سنگین نیکل مشخص شد این میکروارگانیسم قادر است مقادیر بالا از یون نیکل موجود در محلول را جذب کند. این میکروارگانیسم در pH بهینه ۸ قادر به جذب مقدار بالایی از نیکل به ازای هرگرم توده زیستی شد و با افزایش غلظت نیکل میزان کلروفیل سلول کاهش یافته و تغییرات قابل توجهی در پروفایل پروتئینی سلول مشاهده شد (Ramadan و همکاران، ۲۰۲۱).

در مطالعات مشابه، بررسی رفتارفیزیولوژیک سیانوباکتری کلوتریکس (*Calothrix* sp) در معرض فلز سنگین نیکل مشخص شد بیشترین میزان جذب نیکل بین ۵۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده است و تیماردهی بیومس با عوامل شیمیایی و فیزیکی مختلف در قالب-های مختلفی نظیر تثبیت و یا استفاده از متابولیت‌های آن، روند جذب را تسریع و تسهیل نموده و پتانسیل استفاده از این ریزجلبک را در سیستم‌های پالایش بعدی هموار می نماید (Singh، ۲۰۲۰).

در بررسی عوامل مؤثر و سازوکار مولکولی زیست‌پالایی فلزات سنگین توسط سیانوباکتری‌ها اذعان داشتند که عوامل مختلفی مانند غلظت فلزات سنگین، pH، دما، میزان زیست‌توده سلولی و حضور یون‌های مختلف می‌توانند بر کارایی زیست‌پالایی سیانوباکتری‌ها در حذف فلزات سنگین مؤثر باشند.

جمع بندی نهایی

استفاده از فرآیندهای زیست پالایی توسط باکتری‌ها برای تصفیه فاضلابهای حاوی فلزات سنگین، بسیاری از محدودیتهای بزرگ سایر روشهای فیزیک وشیمیایی را نداشته و از نظر اقتصادی نیز مطلوبتر است. با این حال مطالعات بیشتری جهت برطرف نمودن محدودیتهای کنونی این فنآوری برای استفاده در مقیاس عملی مورد نیاز است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که هر ۲۵ سویه سیانوباکتری مقاوم به شوری به راحتی قابلیت حذف فلزات سنگین را داشتند و این نشان از توانایی نشات گرفته از محیط زندگی آنها است. با این حال، سویهN3 (وزن خشک ۵۱۳ میلی‌گرم) که متعلق به راسته Nostocales از سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار است، با اختلاف معناداری، بیشترین قابلیت را در حذف فلزات نیکل، کرم و مس در مقایسه با دیگر سویه‌ها داشت.

منابع

Ahmad, I.Z., 2022. The usage of Cyanobacteria in wastewater treatment: prospects and limitations. Letters in Applied Microbiology 75(4), 718-730.

Akbarnezhad, M., Shamsaie Mehrgan, M., Kamali, A., Javaheri Baboli, M., 2020. Effects of microelements (Fe, Cu, Zn) on growth and pigment contents of *Arthrospira* (Spirulina) *platensis*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 19(2), 653-668.

Al-Amin, A., Parvin, F., Chakraborty, J., Kim, Y.I., 2021. Cyanobacteria mediated heavy metal removal: a review on mechanism, biosynthesis, and removal capability. Environmental Technology Reviews 10(1), 44-57.

Bergi, J., Trivedi, R., 2020. Bioremediation of saline soil by cyanobacteria. Microbial Bioremediation & Biodegradation 447-465.

Bernard, C., Escalas, A., Villeriot, N., Agogué, H., Hugoni, M., Duval, C., Carré, C., Got, P., Sarazin, G., Jézéquel, D., Leboulanger, C., 2019. Very low phytoplankton diversity in a

tropical saline-alkaline lake, with co-dominance of *Arthrospira fusiformis* (Cyanobacteria) and *Picocystis salinarum* (Chlorophyta). Microbial Ecology 78(3), 603-617.

Bloch, K., Ghosh, S., 2022. Cyanobacteria mediated toxic metal removal as complementary and alternative wastewater treatment strategy. In Integrated Environmental Technologies for Wastewater Treatment and Sustainable Development (pp. 533-548). Elsevier.

Bon, I.C., Salvatierra, L.M., Lario, L.D., Morató, J., Pérez, L.M., 2021. Prospects in cadmium-contaminated water management using free-living cyanobacteria (*Oscillatoria* sp.). Water, 13(4), p.542.

Cellamare, M., Duval, C., Drelin, Y., Djediat, C., Touibi, N., Agogué, H., Leboulanger, C., Ader, M., Bernard, C., 2018. Characterization of phototrophic microorganisms and description of new cyanobacteria isolated from the saline-alkaline crater-lake Dziani Dzaha (Mayotte, Indian Ocean). FEMS microbiology Ecology 94(8), p.fiy108.

Cepoi, L., Zinicovscaia, I., Valuta, A., Codreanu, L., Rudi, L., Chiriac, T., Yushin, N., Grozdov, D., Peshkova, A., 2021. Bioremediation capacity of edaphic cyanobacteria Nostoc linckia for chromium in association with other heavy-metals-contaminated soils. Environments *9*(1), p.1.

Cepoi, L., Zinicovscaia, I., Rudi, L., Chiriac, T., Miscu, V., Djur, S., Strelkova, L., Vergel, K., Nekhoroshkov, P., 2020. Growth and heavy metals accumulation by Spirulina platensis biomass from multicomponent copper containing synthetic effluents during repeated cultivation cycles. Ecological Engineering 142, p.105637.

Chakdar, H., Thapa, S., Srivastava, A., Shukla, P., 2022. Genomic and proteomic insights into the heavy metal bioremediation by cyanobacteria. Journal of Hazardous Materials 424, p.127609.

Chojnacka, K., Chojnacki, A., Gorecka, H., 2005. Biosorption of Cr3+, Cd2+ and Cu2+ ions by blue–green algae Spirulina sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. Chemosphere 59(1), 75-84.

De Philippis, R., Paperi, R., Sili, C., Vincenzini, M., 2003. Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria, Cyanospira capsulata and Nostoc PCC7936. Journal of Applied Phycology 15, 155-161.

Fawzy, M.A., Mohamed, A.K.S., 2017. Bioremediation of heavy metals from municipal sewage by cyanobacteria and its effects on growth and some metabolites of Beta vulgaris. Journal of Plant Nutrition 40(18), 2550-2561.

Ghorbani, E., Nowruzi, B., Nezhadali, M. and Hekmat, A., 2022. Metal removal capability of two cyanobacterial species in autotrophic and mixotrophic mode of nutrition. BMC Microbiology 22(1), 1-15.

Goswami, S., Syiem, M.B., Pakshirajan, K., 2015. Cadmium removal by Anabaena doliolum Ind1 isolated from a coal mining area in Meghalaya, India: associated structural and physiological alterations. Environmental Engineering Research 20(1), 41-50.

Han, X., Wong, Y.S., Wong, M.H., Tam, N.F.Y., 2008. Feasibility of using microalgal biomass cultured in domestic wastewater for the removal of chromium pollutants. Water Environment Research 80(7), 647-653.

Hoiczyk, E., Hansel, A., 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. Journal of Bacteriology, 182(5), 1191-1199.

Iqbal, J., Javed, A., Baig, M.A., 2022. Heavy metals removal from dumpsite leachate by algae and cyanobacteria. Bioremediation Journal 26(1), 31-40.

Khuram, I., Ahmad, N., Solak, C.N., Barinova, S., 2021. Assessment of Water Quality by Bioindication of Algae and Cyanobacteria in the Peshawar Valley, Pakistan. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 22(3).

Nowruzi, B., Hutárová, L., Absalón, I.B. and Liu, L., 2022. A new strain of Neowestiellopsis (Hapalosiphonaceae): first observation of toxic soil cyanobacteria from agricultural fields in Iran. *BMC microbiology*, *22*(1), pp.1-13.

Mohamed, Z.A., 2001. Removal of cadmium and manganese by a non-toxic strain of the freshwater cyanobacterium Gloeothece magna. Water Research 35(18), 4405-4409.

Mota, R., Flores, C., Tamagnini, P., 2022. Cyanobacterial Extracellular Polymeric Substances (EPS). In *Polysaccharides of Microbial Origin: Biomedical Applications* (pp. 139-165). Cham: Springer International Publishing.

Muthukumaran, P., Aravind, J., Kamaraj, M., Ramachandran, K.K., 2021. Recent Trends in Application of Bacterial Polymers to Mitigate Organic and Inorganic Pollutants. Strategies and Tools for Pollutant Mitigation: Avenues to a Cleaner Environment 137-149.

Palaniswamy, R., Veluchamy, C., 2017. Removal of chromium from effluent by biosorption using *Spirulina platensis*. International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research 4 (8), 2712-2714, A

Pandi, M., Shashirekha, V., Swamy, M., 2009. Bioabsorption of chromium from retan chrome liquor by cyanobacteria. Microbiological Research 164(4), 420-428.

Qasem, N.A., Mohammed, R.H., Lawal, D.U., 2021. Removal of heavy metal ions from wastewater: A comprehensive and critical review. Npj Clean Water 4(1), 1-15.

Rai, P.K., Tripathi, B.D., 2007. Removal of heavy metals by the nuisance cyanobacteria Microcystis in continuous cultures: an eco-sustainable technology. Environmental Sciences 4(1), 53-59.

Ramadan, K.M., El-Beltagi, H.S., Shanab, S.M., El-fayoumy, E.A., Shalaby, E.A., Bendary, E.S., 2021. Potential antioxidant and anticancer activities of secondary metabolites of *Nostoc linckia* cultivated under Zn and Cu stress conditions. Processes 9(11), p.1972.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology 111(1), 1-61.

Sadvakasova, A.K., Kossalbayev, B.D., Zayadan, B.K., Kirbayeva, D.K., Alwasel, S., Allakhverdiev, S.I., 2021. Potential of Cyanobacteria in the Conversion of Wastewater to Biofuels. World Journal of Microbiology and Biotechnology 37(8), 1-22

Sen, G., Sen, S., Thakurta, S.G., Chakrabarty, J., Dutta, S., 2018. Bioremediation of Cr (VI) using live cyanobacteria: experimentation and kinetic modeling. Journal of Environmental Engineering 144(9), p.04018089.

Shen, L., Li, Z., Wang, J., Liu, A., Li, Z., Yu, R., Wu, X., Liu, Y., Li, J., Zeng, W., 2018. Characterization of extracellular polysaccharide/protein contents during the adsorption of Cd (II) by Synechocystis sp. PCC6803. Environmental Science and Pollution Research 25, 20713-20722.

Sheth, Y., Dharaskar, S., Khalid, M., Sonawane, S., 2021. An environment friendly approach for heavy metal removal from industrial wastewater using chitosan based biosorbent: A review. Sustainable Energy Technologies and Assessments 43, p.100951.

Shrestha, R., Ban, S., Devkota, S., Sharma, S., Joshi, R., Tiwari, A.P., Kim, H.Y., Joshi, M.K., 2021. Technological trends in heavy metals removal from industrial wastewater: A review. Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(4), p.105688.

Singh, S., 2020. Biosorption of heavy metals by cyanobacteria: potential of live and dead cells in bioremediation. In Microbial bioremediation & biodegradation (pp. 409-423). Springer, Singapore.

Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M.C.B.G., Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriological Reviews 35(2), 171-205.

Volesky, B., 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. Hydrometallurgy 59(2-3), 203-216.

Yun, Y.S., Park, D., Park, J.M., Volesky, B., 2001. Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass. Environmental Science & Technology 35(21), 4353-4358.

Zada, S., Raza, S., Khan, S., Iqbal, A., Kai, Z., Ahmad, A., Ullah, M., Kakar, M., Fu, P., Dong, H., Xueji, Z., 2022. Microalgal and cyanobacterial strains used for the bio sorption of copper ions from soil and wastewater and their relative study. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 105, 463-472.

Journal of New Technologies in Aquaculture Development, Azadshahr Branch, Islamic Azad University Vol. 17, No. 1, Spring 2023

Ability to remove heavy metals by cyanobacterial strains isolated from saline waters of Golestan province

M. Ghadiri[1], S. Haghighat[1], B. Nowruzi[2*]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[2] Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Abstract

Cyanobacteria are found in every ecological environment from saline to dry metal-contaminated environments. Most strains of these bacteria are capable of producing extracellular polymeric materials from natural polysaccharides. Negative Charge of Extracellular Polymeric Materials (EPS) Cyanobacteria are widely used to isolate low-concentration metal cations around the cell. The aim of this study was to compare the ability of twenty-five strains of cyanobacteria to remove heavy metals. The twenty-five strains of cyanobacteria isolated from saline waters of Golestan province were cultured after cultivation and purification, with a concentration of 10 mg / l nickel, copper and chromium Became. After twenty-four hours, the rate of metal removal from the solution was measured with differences in metal concentrations before and after contact with cyanobacterial culture. The results were analyzed using SPSS and mean comparision were prtformed with Tukey test. The results of statistical analysis showed that all twenty-five strains of salinity-resistant cyanobacteria were able to easily remove heavy metals, and this indicates the ability of their environment. However, strain N3 (dry weight 513 mg) belonging to the order Nostocales of heterocystic cyanobacteria, with a significant difference, had the highest ability to remove nickel, chromium and copper metals compared to other strains. The results of this study can be an important step towards the introduction of salinity-resistant cyanobacterial strains in the removal of heavy metals.

***Keywords*:** Cyanobacteria, Heavy Metal, Strain

[*]- Corresponding authors; bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir