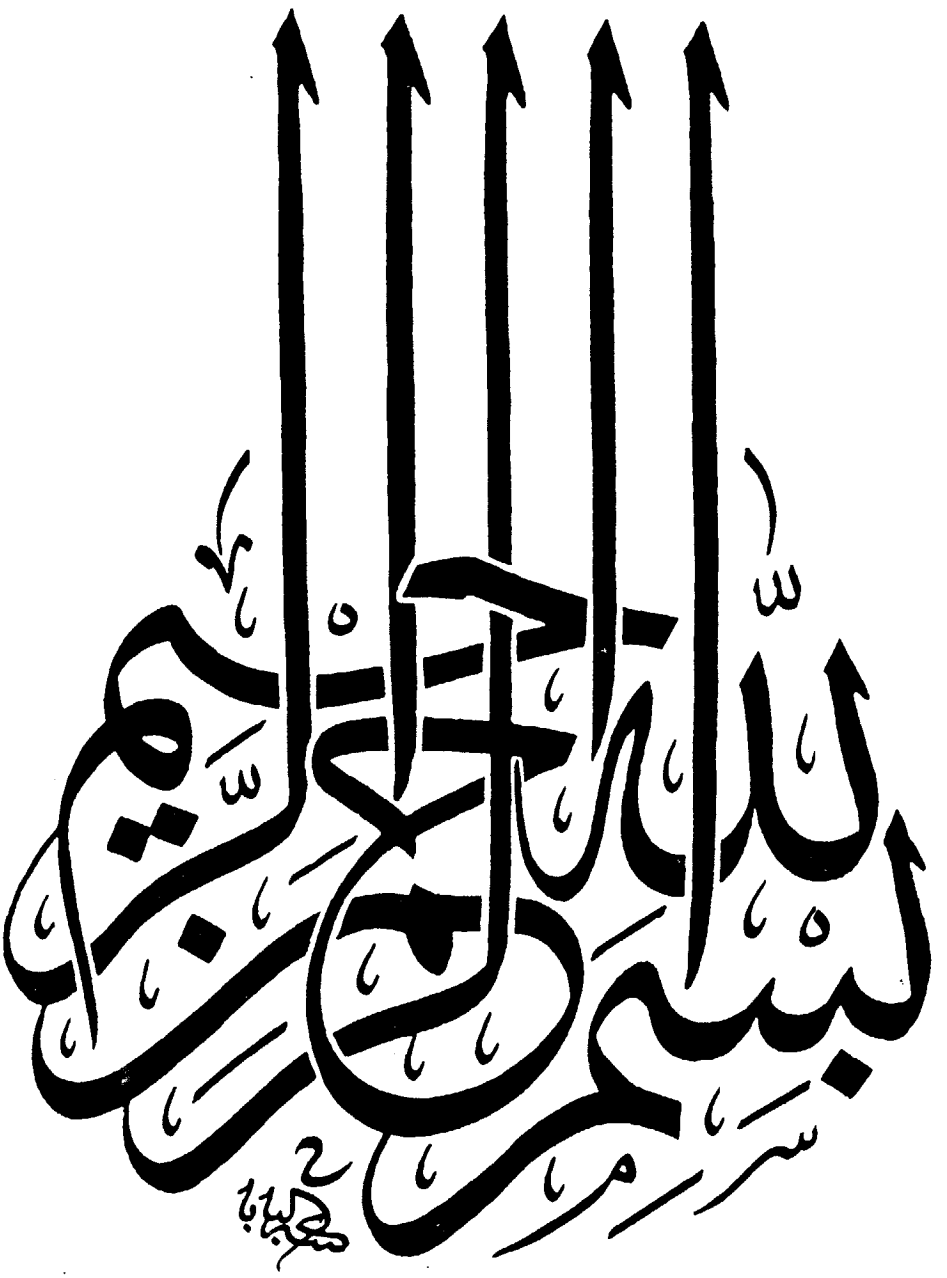
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهراء (س)

دانشکدهٔ علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد

رشتهٔ میکروبیولوژی

عنوان:

غربال‌سازی ، جداسازی و شناسایی باکتری جاذب فلز سرب از پساب‌های صنعتی و بهینه‌سازی شرایط جذب

اساتید راهنما:

آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور

آقای دکتر جمشید فولادی

۱۳۸۲ /۸/ ۲۰

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

استاد مشاور:

آقای دکتر محمد رضا صعودی

نگارش:

ساراتلی دلیر

شهریور ۱۳۸۲

٤٧٨٤

شماره .....
تاریخ .....
پیوست .....

جمهوری اسلامی ایران

دانشگاه الزهرا

۷۹-۸

بسمه تعالی

بموجب نامه شماره ...۵/۷۸۸۱... مورخ ...۸۲/۷/۱۶... جلسه دفاع از پایان نامه
خانم ...سارا بن دلیم... دانشجوی رشته ...مهندسی برق... دانشکده ...فنی و مهندسی...
شماره دانشجویی ..... درروز ...سه شنبه... مورخ ۸۲/۷/۱۶ تحت عنوان ...بررسی پایداری گذرای سیستم قدرت با استفاده از کنترل کننده های FACTS...
در اطاق ...سمینار برق... برگزار گردید.
ابتدا خانم ...سارا بن دلیم... درمورد موضوع ونتایج پایان نامه صحبت نمودند وسپس به سئوالات اعضاء حاضر در جلسه پاسخ دادند.هیات داوران طی جلسه ای که همزمان تشکیل گردید پس از مشورت نمره دانشجو را ...۱۹/۷۰... وبا امتیاز ...عالی... تعیین ومورد قبول قرارگرفت.

هیات داوران:

۱. استاد راهنما
۲. استاد مشاور
۳. داور
۴. داور

نام ونام خانوادگی مدیر گروه ... امضاء

نام ونام خانوادگی رئیس دانشکده ... امضاء
یا نماینده دانشکده در شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه

۸۲/۷/۲۱

آدرس: تهران - ونک - دانشگاه الزهرا تلفن: ۹-۲۲۶۱۰۵۱

تقدیم به

سرزمینم

ایران

تقدیم به پدرم

مادرم

برادرم

به پاس تمامی محبت‌ها، فداکاری‌ها و
زحمات بی‌دریغشان

تشکر و قدردانی :

با تشکر از کلیهٔ کسانی که در طول مسیر دشوار کسب دانش مرا تنها نگذاشته و همراهم بودند. کسانی که صادقانه و عاشقانه معلومات خویش را در اختیارم نهادند.

کمال تشکر و امتنان خویش را به حضور اساتید راهنمای ارجمند، آقایان دکتر غلامحسین ابراهیمی‌پور و جمشید فولادی به پاس تمامی زحمات و حمایت‌های ایشان ابراز می‌دارم.

بهره‌گیری از رهنمودهای استاد مشاور محترم، جناب آقای دکتر محمدرضا صعودی در خور تقدیر بوده، سپاسگزاری خویش را به محضر ایشان به پاس تمامی مساعدت‌ها تقدیم می‌دارم.

سرکار خانم دکتر شایسته سپهر، دلسوزی‌ها و پشتیبانی‌های شما شایستهٔ تقدیر و تشکر است. از اینکه افتخار شاگردی در محضر شما را داشتم، بسیار خرسندم و موافقت شما در قبول زحمت قضاوت این پایان‌نامه، برای من مایهٔ مباهات است. سلامتی و شادکامی شما را صمیمانه آرزومندم.

از جناب آقای دکتر حسین غفوریان از مرکز تحقیقات هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران که بزرگواری نموده و زحمت داوری خارج این پایان‌نامه را بر خود هموار نمودند، بسیار ممنونم.

از کلیهٔ اساتید محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه الزهراء (س) سپاسگزارم.

از جناب آقای نوروزی و سرکار خانم فلاحی کارشناسان آزمایشگاه میکروبیولوژی کاربردی سپاسگزاری می‌نمایم.

از سرکار خانم‌ها دکتر عبدی و غروی به جهت راهنمایی و همکاری‌های خالصانه و بی‌دریغشان کمال تشکر را دارم. همچنین از همکاری‌های سرکار خانم‌ها نریمان، لندرانی، اردکانی و کیارستمی سپاسگزارم.

از مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی دانشگاه شهید بهشتی، سرکار خانم دکتر مشکوری و جناب آقای دکتر قاسم‌پور به جهت همکاری در زمینهٔ در اختیار نهادن دستگاه

اسپکتروفتومتر جذب اتمی و اپراتور مربوطه سرکار خانم شاکری بسیار سپاسگزارم.
همچنین از جناب آقای جلالی راد به جهت همکاری هایشان در این زمینه از سازمان انرژی اتمی ایران تشکر می‌کنم.

از زحمات جناب آقای دکتر خواصی از گروه شیمی دانشگاه شهیدبهشتی به جهت همکاری در زمینهٔ اندازه‌گیری درصد مول گوانین - سیتوزین DNA توسط دستگاه HPLC سپاسگزاری می‌شود.

اندازه‌گیری میزان خاکستر نمونهٔ ملاس توسط خانم دکتر برنارد از گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی صورت گرفته است. بدین وسیله از ایشان قدردانی می‌شود.

از جناب آقای فلاح از مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران که در نهایت دقت و حوصله عکس‌های مربوط به نتایج مراحل مختلف این تحقیق را تهیه می‌نمودند، قدردانی می‌شود.

همکاری‌های جناب آقای مهندس رجایی از شرکت شیمیایی پرسوژن به جهت تهیهٔ بخشی از وسال عمدهٔ این پژوهش، در خور تقدیر و تشکر است.

از جناب آقای مشایخی از کارخانهٔ صنایع شویندهٔ پاکسان به جهت اندازه‌گیری میزان ویسکوزیتهٔ نمونهٔ ملاس قدردانی می‌گردد.

از بابت هرگونه زحمتی که منشی محترم گروه زیست‌شناسی جناب آقای بهمنی متحمل گردیدند، قدردانی می‌شود.

از خانم‌ها صمدی، ندرلو، خانم و آقای فخرایی و نهایتاً کلیهٔ کسانی که به نحوی در انجام امور این پژوهش چه از لحاظ مادّی و چه از لحاظ معنوی مرا یاری نمودند، کمال سپاسگزاری خویش را اظهار می‌دارم.

چکیده

فعالیت‌های صنعتی صنایع مختلف، سبب تولید پساب‌هایی می‌شود که اکثراً در قالب مواد سمی و آلاینده وارد محیط گشته و موجب بالا رفتن میزان آلودگی در اکوسیستم‌های گوناگون محیطی به طور مستقیم و یا غیر مستقیم می‌گردند. از جمله این عوامل آلوده کننده، فلز سرب است که در اثر فعالیت‌های ناشی از صنایع گوناگون همچون باتری‌سازی، آبکاری، ذوب و تصفیهٔ فلزات، صنایع رنگ و رزین، شیشه و کریستال و غیره وارد محیط زیست گشته، منجر به ایجاد مسمومیت‌های شدید در انسان و دیگر موجودات زنده می‌گردد. این پژوهش با غربال‌سازی(Screening) باکتری‌های جاذب فلز سرب از میان دیگر میکروارگانیسم‌ها آغاز گردید و از این میان در نهایت، یکی از سویه‌های باکتریایی که ماکزیمم توان جذب فلز سرب را از خود نشان می‌داد، انتخاب شده، مورد شناسایی قرار گرفت و بهینه‌سازی شرایط جذب آن انجام شد. از ابتدا گزینش و جمع‌آوری نمونه‌ها تا حد امکان از مراکز و کارخانه‌هایی صورت گرفت که قسمت عمدهٔ پساب آنها را فلز سرب تشکیل می‌داد. این پژوهش در مجموع دارای دو بخش مشخص در غربال‌سازی بوده که به ترتیب عبارتند از: انتخاب سویه‌های مقاوم به تراکم‌های بالای سرب و گزینش سویه‌های دارای قابلیت جذب فلز. با اجرای بخش اول غربال‌سازی، ۳۵ سویهٔ باکتریایی مقاوم به سرب بدست آمد که شامل طیفی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بودند. لازم به ذکر است که تمامی این سویه‌ها قادر به تحمل غلظت mM ۵ از فلز سرب در محیط کشت اختصاصی حاوی این فلز بودند. جهت دستیابی به هدف بخش دوم غربال‌سازی از روش به کار گرفته شده توسط پومپل و همکاران (۱۹۹۵) استفاده شد. با فراهم آوردن امکان مجاورسازی کلنی‌های آغشته به سرب با گاز سولفید هیدروژن(H_2S)، به جهت عدم تشکیل رسوب سیاه سولفیدسرب (PbS) در اطراف آن دسته از کلنی‌هایی که قادر به جذب فلز بودند، هاله‌هایی باریک و شفاف در اطراف این دسته از کلنی‌ها ظاهر می‌گشت. بدین ترتیب از این میان، ۸ سویه که دارای هاله‌های تیپیک جذب فلز بودند، جداسازی شده و بیومس حاصل از آنها با محلول فلزی مجاورسازی شد و در نهایت میزان محتوی فلزی در فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ هر یک از این نمونه‌ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی مورد سنجش قرار گرفت. بدین ترتیب نمونه‌ای که ماکزیمم کاهش درصد فلز را در فاز رویی نشان می‌دهد، معرف ماکزیمم جذب فلز توسط سویهٔ مربوطه می‌باشد. این باکتری به کمک روش های مورفولوژیک و آزمون‌های گوناگون بیوشیمیایی و نیز تعیین درصد مول گوانین- سیتوزین DNA با بهره‌گیری از تکنیک HPLC مورد شناسایی قرار گرفت و احتمالاً جنس سودوموناس تشخیص داده می‌شود. بهینه‌سازی شرایط جذب تا حد امکان با در نظر گرفتن و لحاظ نمودن جنبه‌های اقتصادی در تولید بیومس میکروبی در طی ۹ مرحله انجام شد. جهت دستیابی به این هدف از ملاس چغندرقند به عنوان محیطی غنی و ارزان قیمت که به آن درصد مشخصی از عصارهٔ مخمر صنعتی نیز اضافه شده بود، استفاده شد. توان جذبی این باکتری با در نظر گرفتن کلیهٔ شرایط ایده‌آل، شامل گرسنه نگاه داشتن باکتری به مدت یک ساعت و مجاورت ۰/۴۵ گرم بیومس تر باکتری در دمای ۳۰°C با سرعت دورانی معادل rpm ۲۰۰ و مدت ۲ ساعت با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ppm ۵۰۰ سرب با pH معادل ۴/۵ در حدود mg/gdw ۱۷۲ می‌باشد. در آزمایش تعیین نوع فرایند جذب سرب، نتایج نشان داد که میزان جذب در نمونهٔ فعال از نظر متابولیسمی بیشتر از نمونه‌های غیرفعال می‌باشد. امکان بازیابی فلز جذب شده توسط محلول‌های مختلف مورد آزمایش قرار گرفت و ماکزیمم راندمان بازیافت به کمک محلول ۰/۱M از EDTA به میزان ۶۴/۸ درصد حاصل آمد.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

● فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱ - مقدمه ۱

۱-۲ - کلیات پژوهش ۲

۱-۲-۱ - تاریخچهٔ فلز سرب ۲

۱-۲-۲ - موقعیت فلز سرب در میان عناصر جدول تناوبی ۳

۱-۲-۳ - خواص فیزیکی سرب ۳

۱-۲-۴ - خواص شیمیایی سرب ۵

۱-۲-۵ - ترکیبات سرب ۶

۱-۲-۶ - سرب در طبیعت ۱۰

۱-۲-۶-۱ - سرب در سنگ‌ها ۱۰

۱-۲-۶-۲ - سرب در خاک ۱۰

۱-۲-۶-۳ - سرب در آب ۱۱

۱-۲-۶-۴ - سرب در هوا ۱۱

۱-۲-۶-۵ - سرب در گیاهان ۱۱

۱-۲-۷ - موارد کاربرد سرب ۱۲

۱-۲-۸ - منابع آلوده کنندهٔ سربی ۱۳

۱-۲-۹ - راه‌های ورود و جذب سرب در بدن انسان ۱۶

۱-۲-۹-۱ - جذب از طریق دستگاه تنفس ۱۶

۱-۲-۹-۲ - جذب از طریق دستگاه گوارش ۱۶

۱-۲-۹-۳ - جذب از طریق پوست و مخاط ۱۶

۱-۲-۱۰ - عوارض و مسمومیت‌های ناشی از سرب ۱۷

۱۱-۲-۱ - سرب و آسیب‌پذیری اختصاصی در کودکان ۱۸
۱۲-۲-۱ - حذف سرب از پساب‌های آلوده ۱۸
۱-۱۲-۲-۱ - روش‌های شیمیایی ۱۸
۲-۱۲-۲-۱ - روش‌های فیزیکی ۲۰
۳-۱۲-۲-۱ - روش‌های بیولوژیکی ۲۱
۱۳-۲-۱ - مقایسهٔ روش‌های تصفیهٔ فیزیکوشیمیایی با تصفیهٔ زیستی ۲۱
۱۴-۲-۱ - اندرکنش فلزات با میکروارگانیسم‌ها ۲۲
۱۵-۲-۱ - انواع واکنش‌های متقابل فلزات با میکروارگانیسم‌ها ۲۲
۱۶-۲-۱ - سطوح مختلف واکنش‌های متقابل فلز و میکروب ۲۴
۱-۱۶-۲-۱ - سطح واکنش متابولیکی / آنزیمی ۲۴
۲-۱۶-۲-۱ - سطح واکنش متابولیکی / غیرآنزیمی ۲۴
۱۷-۲-۱ - جذب فلزات سنگین توسط میکروارگانیسم‌ها ۲۵
۱-۱۷-۲-۱ - جذب غیر وابسته به متابولیسم ۲۵
۱-۱-۱۷-۲-۱ - جذب در باکتری‌های گرم مثبت ۲۶
۲-۱-۱۷-۲-۱ - جذب در باکتری‌های گرم منفی ۲۷
۲-۱۷-۲-۱ - جذب وابسته به متابولیسم ۲۷
۱۸-۲-۱ - ویژگی‌های اگزوپلیمرهای باکتریایی مربوط به اتصال فلزی ۲۸
۱۹-۲-۱ - اندرکنش یون‌های فلزی با اگزوپلیمرهای باکتریایی ۲۸
۲۰-۲-۱ - اثرات فلزات سنگین بر اکوسیستم میکروبی ۲۹
۲۱-۲-۱ - مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به فلزات سنگین ۲۹
۲۲-۲-۱ - بازیابی فلز از بیومس میکروبی ۳۱
۲۳-۲-۱ - فاکتورهای مؤثر از نظر کاربرد صنعتی ۳۲

• فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ - وسایل، ابزار، دستگاه‌ها، مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده ۳۴

۲-۱-۱ - وسایل، ابزار و دستگاه‌های مورد استفاده ۳۴

۲-۱-۲ - مواد و ترکیبات شیمیایی مورد استفاده ۳۵

۲-۱-۳ - محیط‌های کشت مورد استفاده ۳۷

۲-۲ - برداشت نمونه‌ها ۳۹

۲-۲-۱ - انتخاب محل‌های برداشت نمونه ۳۹

۲-۲-۲ - نحوهٔ نمونه‌برداری ۴۰

۲-۳ - غربال‌سازی ۴۰

۲-۳-۱ - انتخاب سویه‌های باکتریایی مقاوم به تراکم‌های بالای سرب ۴۰

۲-۳-۱-۱ - ترکیب محیط کشت LBA m ۴۱

۲-۳-۲ - گزینش سویه‌های دارای قابلیت جذب فلز ۴۱

۲-۴ - روش بدست آوردن میزان کمّی جذب فلز ۴۲

۲-۵ - منحنی استاندارد جذب فلز سرب ۴۳

۲-۶ - محاسبهٔ میزان جذب فلز ۴۳

۲-۷ - طریقهٔ نگهداری باکتری ۴۴

۲-۸ - شناسایی باکتری بدست آمده ۴۴

۲-۸-۱ - مشخصات مورفولوژیک کلنی باکتری بدست آمده ۴۴

۲-۸-۲ - رنگ‌آمیزی گرم ۴۴

۲-۸-۳ - بررسی توانایی رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم ۴۵

۲-۸-۴ - بررسی توانایی رشد باکتری در دامنه‌های متفاوت pH از صفر تا چهارده ۴۵

۲-۸-۵ - آزمایش کاتالاز ۴۶

۲-۸-۶ - آزمایش اکسیداز ۴۶

۲-۸-۷ - آزمایش SIM ۴۶

۲-۸-۸ - آزمایش MRVP ۴۷
۲-۸-۹ - آزمایش TSI ۴۸
۲-۸-۱۰ - آزمایش OF ۴۸
۲-۸-۱۱ - آزمایش احیا نیترات ۴۹
۲-۸-۱۲ - آزمایش اوره‌آز ۵۰
۲-۸-۱۳ - آزمایش هیدرولیز نشاسته ۵۰
۲-۸-۱۴ - آزمایش هیدرولیز ژلاتین ۵۱
۲-۸-۱۵ - آزمایش هیدرولیز توییین ۸۰ ..... ۵۱
۲-۸-۱۶ - آزمایش هیدرولیز اسکولین ۵۱
۲-۸-۱۷ - آزمایش‌های دکربوکسیلاز (آرژینین - اُرنی‌تین) ۵۲
۲-۸-۱۸ - آزمایش فنیل آلانین دآمیناز ۵۲
۲-۸-۱۹ - آزمایش سیترات ۵۲
۲-۸-۲۰ - آزمایش لیزین دکربوکسیلاز ۵۳
۲-۸-۲۱ - بررسی امکان رشد باکتری در محیط مکانکی آگار ۵۳
۲-۸-۲۲ - رنگ‌آمیزی کپسول ۵۳
۲-۸-۲۳ - رنگ‌آمیزی تاژه ۵۴
۲-۸-۲۴ - تعیین درصد مول گوانین - سیتوزین DNA ۵۵
۲-۸-۲۴-۱ - استخراج DNA ۵۵
۲-۸-۲۴-۲ - تعیین میزان خلوص مولکول DNA استخراج شده ۵۶
۲-۸-۲۴-۳ - اندازه‌گیری درصد مول گوانین - سیتوزین DNA به کمک HPLC ۵۷
۲-۹ - ویژگی‌های ملاس مورد استفاده در پژوهش ۵۸
۲-۱۰ - بهینه‌سازی فرایند جذب سرب ۶۰
۲-۱۰-۱ - بهینه‌سازی درصد ملاس ۶۱
۲-۱۰-۲ - بررسی اثر اضافه نمودن عصارهٔ مخمر بر میزان جذب فلز ۶۱

۲-۱۰-۳ - بهینه‌سازی مدت زمان مجاورسازی ۶۲
۲-۱۰-۴ - بهینه‌سازی وزن تر بیومس باکتریایی ۶۲
۲-۱۰-۵ - بهینه‌سازی دمای مجاورسازی و تأثیر آن بر میزان جذب سرب ۶۳
۲-۱۰-۶ - بررسی اثر شدت همزنی بر میزان جذب فلز ۶۳
۲-۱۰-۷ - بررسی تراکم سرب بر میزان جذب ۶۳
۲-۱۰-۸ - بهینه‌سازی pH ۶۳
۲-۱۰-۹ - بررسی اثر گرسنگی بر میزان جذب سرب ۶۴
۲-۱۱ - بررسی چگونگی جذب توسط باکتری ۶۴
۲-۱۲ - بازیافت سرب ۶۵

● فصل سوم: نتایج پژوهش

۳-۱ - نتایج مرحلهٔ غربال‌سازی ۶۶
۳-۱-۱ - نتایج حاصل از انتخاب سویه‌های باکتریایی مقاوم به تراکم‌های بالای سرب ۶۶
۳-۱-۲ - نتایج حاصل از گزینش سویه‌های دارای قابلیت جذب فلز ۶۶
۳-۲ - نتایج حاصل از بدست آوردن میزان کمی جذب فلز ۶۹
۳-۳ - نتایج مربوط به شناسایی باکتری ۷۰
۳-۳-۱ - نتایج مربوط به مشخصات مورفولوژیک کلنی باکتری ۷۰
۳-۳-۲ - نتیجهٔ مربوط به رنگ‌آمیزی گرم ۷۰
۳-۲-۳ - نتیجهٔ بررسی توانایی رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم ۷۱
۳-۲-۴ - نتیجهٔ بررسی توانایی رشد باکتری در دامنه‌های متفاوت pH از صفر تا چهارده ۷۲
۳-۴ - نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشیمیایی در شناسایی باکتری ۷۳
۳-۵ - نتیجهٔ حاصل از اندازه‌گیری درصد مول گوانین - سیتوزین DNA به کمک HPLC ۷۳
۳-۶ - نتیجهٔ حاصل از بدست آوردن میزان خلوص DNA باکتری ۷۳
۳-۷ - بهینه‌سازی فرایند جذب سرب ۷۴

۳-۷-۱ - نتایج مربوط به بهینه‌سازی درصد ملاس ۷۴
۳-۷-۲ - نتایج حاصل از اثر اضافه نمودن عصارهٔ مخمر بر میزان جذب فلز ۷۶
۳-۷-۳ - نتایج حاصل از بهینه‌سازی مدت زمان مجاورسازی ۸۰
۳-۷-۴ - نتایج حاصل از بهینه‌سازی وزن تر بیومس باکتریایی ۸۱
۳-۷-۵ - نتایج حاصل از بهینه‌سازی دمای مجاورسازی و تأثیر آن بر میزان جذب ۸۲
۳-۷-۶ - نتایج حاصل از بررسی اثر شدت همزنی بر میزان جذب فلز ۸۳
۳-۷-۷ - نتایج حاصل از بررسی تراکم سرب بر میزان جذب ۸۵
۳-۷-۸ - نتایج حاصل از بهینه‌سازی pH ۸۶
۳-۷-۹ - نتایج حاصل از بررسی اثر گرسنگی بر میزان جذب سرب ۸۷
۳-۸ - نتایج حاصل از بررسی چگونگی جذب سرب توسط باکتری ۸۸
۳-۹ - بررسی نتیجهٔ حاصل از بازیافت سرب از بیومس باکتری ۹۰

• فصل چهارم: بحث و پیشنهادات

بحث ۹۲
پیشنهادات ۱۱۶
فهرست منابع و مآخذ .....
چکیدهٔ انگلیسی .....

فصل اول

مقدمه و کلیات پژوهش