المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (9) العدد (1)
لسنة 2017

دراسة الظروف المثلى لازالة العناصر المعدنية الثقيلة من المحاليل المائية الملوثة باستعمال بكتريا *Bacillus subtilis* المعزولة محليا

محمد احمد طه*[1] ، أ.م.د. الهام اسماعيل الشمري[2]
[1]قسم علوم الاغذية ،كلية الزراعة ،جامعة بغداد ، بغداد ، العراق m_a_t_y_1992@yahoo.com
[2]قسم علوم الاغذية ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد ،بغداد ، العراق Elhamfadhil@yahoo.com

تاريخ استلام البحث: 2017/1/2 تاريخ قبول النشر: 2017/2/5

الخلاصة

درس تأثير بعض الظروف البيئية لازالة العناصر المعدنية الثقيلة من المحاليل المائية الملوثة Cd، Cu، Pb، Fe، Zn، Ni، Cr بأستعمال بكتريا *Bacillus subtilis* لتعين الظروف المثلى للازالة، اذ تراوحت افضل درجة حرارية لازالة العزلتين ما بين 30 الى 35م، في حين تراوح الاس الهيدروجيني لاعلى ازالة بين 6 الى 7،وافضل تركيز اولي للمعادن بلغ 100 ملغم/ لتر، في حين كان اعلى معدل ازالة لجميع العناصر تم الحصول عليه بعد 6 ساعات من وقت التماس،واعلى كفاءة ازالة تم الحصول عليها بعد 24 ساعة من التماس، واثبتت النتائج ان افضل تهوية لاعلى كفاءة ازالة تم الحصول عليها عند سرعة الدوران 150دورة/ دقيقة، في حين اعطى حجم لقاح 5 مل (يحوي المل الواحد على 10^6 خلية/ مل) افضل ازالة بالنسبة للعزلتين.

بلغت النسبة المئوية لكفاءة الازالة تحت الظروف المثلى المستحصل عليها في اعلاه باستعمال العزلة البكتيرية *B. subtiliis*1 (88.4، 91.9، 98.1، 96.7، 83.1، 94.8)% للعناصر Cd، Cu، Pb، Fe، Zn، Ni على التوالي، في حين كانت اعلى ازالة للـ Cr تحت الظروف المثلى 92.1% بأستعمال العزلة البكتيرية *B. subtilis*2. قدرت كفاءة الازالة للمعادن الثقيلة بأستعمال الكتلة الحيوية الحية والميتة

الكلمات المفتاحية: المعادن الثقيلة، *Bacillus subtilis*، التلوث، الامتزاز.

STUDY THE OPTIMUM CONDITIONS FOR THE REMOVAL OF HEAVY METAL ELEMENTS FROM AQUEOUS SOLUTIONS USING CONTAMINATED BACTERIA *Bacillus subtilis* LOCALLY ISOLATED

***D. Mohammed A. Taha*[1], *Elham I. Al-Shamary*[2].**
[1]Food Science Department, College of Agriculture, University of Bagdad ,Bagdad, Iraq, m_a_t_y_1992@yahoo.com
[2]Food Science Department, College of Agriculture, University of Bagdad ,Bagdad, Iraq, Elhamfadhil@yahoo.com

ABSTRACT

We studied the effect of certain environmental conditions for removing heavy metal elements from contaminated aqueous solutions (Cd, Cu, Pb, Fe, Zn, Ni, Cr) using the bacterium Bacillus subtilis to appoint the optimal conditions for removal ,The best optimum temperature range for two isolate was 30-35°C while the hydrogen number for the maximum mineral removal range was 6-7. The best primary mineral removal was 100 mg/L, while the maximum removal for all minerals was obtained after 6 hrs of Cu element time and the maximum removal efficiency was obtained after 24 hrs of Cu element. The results have proved that the best aeration for maximum removal was obtained at rotation speed of 150 rpm/minute. Inoculums of 5ml/100ml which contained 10^6 cell/ml showed maximum removal for two isolates. The removal efficiency was (%) under the obtained optimum conditions above using the bacterial isolate *Bacillus subtilis* 88.4, 91.9, 98.1, 96.7, 83.1, and 94.8 for the minerals Cd, Cu, Pb, Fe, Zn and Ni consequently. The maximum removal for Cr element under the optimum conditions was 92.1% by using *Bacillus subtilis* 2 isolate.

KeyWords: Heavy metals, *Bacillus subtilis*, Pollution, adsorption.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

المقدمة

يعد التلوث من المشاكل الكبيرة التي يواجهها الإنسان المعاصر ومن اهم التحديات التي تواجهها التقنية الحيوية والهندسة الوراثية، لا بل وأخطرها، وهي بحاجة إلى تظافر الجهود كافة لمعالجتها والحد منها، ومما يزيد المشكلة تعقيداً إن للإنسان نفسه الدور الواضح في زيادة خطورتها من خلال نشاطاته المختلفة التي أصبحت تهدد الحياة البشرية، فضلاً عن تأثيرها في الكائنات الحية الأخرى مما يحدث تغيرا في التوازن الطبيعي للبيئة ومكوناتها المختلفة الحية منها وغير الحية **(Khan *et al*., 2011)**، وتتداخل الجوانب الأيجابية والسلبية بين المعادن والتقنية الحيوية البيئية، فمن جهة فأن تراكم المعادن وخاصة الثقيلة منها تعد ذات مؤشرات سلبية على البيئة، في حين ان عمليات التعدين والاستخلاص يوفر فرص كبيرة في الحصول على المعادن التي لايمكن الحصول عليها بالطرق الغير حيوية **(Wang and Chen, 2006).**

يوجد اكثر من 109 عنصر والقائمة في ازدياد، 21 عنصر من المواد اللامعدنية و16 من المعادن الخفيفة، بينما 53 منها هي من العناصر الثقيلة والتي اغلبها من العناصر الانتقالية والمتمثلة بالمعادن التي تزيد كثافتها الكتلية عن 5غم/سم3 والتي يكون مدارها الخارجي غير ممتلأ بالالكترونات، مما يعطيها قابلية على تكوين الايونات الموجبة القادرة على تكوين الايونات المعقدة وفيما اذا كان العنصر فعال من حيث جهد الاكسدة والاختزال ام لا **Hill, 2010; Bose (and Hemantaronjan, 2005).**

توجد العديد من العوامل المؤثرة في عميلة الامتزاز الحيوي للعناصر المعدنية الثقيلة بواسطة الاحياء المجهرية منها درجة الحرارة والاس الهيدروجيني ومدة التماس وسرعة التحريك وحجم اللقاح وتركيز ايون المعدن، تؤثر درجة الحرارة في ذائبية العناصر ومن ثم في امتزازها، اذ تكون عملية الامتزاز في اغلب الاحيان عملية باعثة للحرارة مالم ترافقها عملية امتصاص او انتشار باتجاه داخل الخلية، لذا فان الزيادة في درجة الحرارة تؤدي الى نقصان في كمية الامتزاز، وذلك لان زيادة درجة الحرارة تعمل على زيادة الطاقة الحركية للجزئيات الممتزة على الخلية مما يزيد من احتمالية انفصالها ورجوعها الى المحلول اما اذا كانت عملية الامتزاز من النوع الماص للحرارة فسوف يلاحظ ان ارتفاع في درجة الحرارة يؤدي الى زيادة الألفة للمواقع الفعالة للأيونات وبالتالي سرعة اختراق المادة الممتزة بنسبة اكبر وزيادة سرعة انتشارها في الخلية **(Israa, 2010)**، ويلعب الاس الهيدروجيني دور مهم في عملية الامتزاز نظرا لتنافس كل من الخلية والمادة الممتزة والمذيب على ايونات الهيدروجين H والهيدروكسيل OH، مما ينعكس بشكل ايجابي او سلبي في عملية الامتزاز وسعة او كمية المادة الممتزة على السطح المركب الاخر **(Das *et al*., 2008)**، كم يؤثر الاس الهيدروجيني على الحالة الكيميائية للموقع الفعال او في نوعية الايون **(Volesky, 2004)**، في حين تؤدي زيادة تركيز المعدن المستخدم الى زيادة في التراكيز الممتزة من العناصر المعدنية لزيادة الجذب الكهربائي لايونات المعادن المتنافسة على المواقع الفعالة او الرابطة المتوافرة على سطوح الخلايا وصولا لحالة التشبع والتي يتوقف عندها الامتزاز **(Mahvi *et al*., 2007)**، **لذا فقد هدفت الدراسة الى تحديد الظروف المثلى لازالة العناصر المعدنية الثقيلة Cd ، Cu ، Pb ، Fe ، Zn ، Ni بأستعمال العزلة المحلية من بكتريا *B. subtilis*1 والمعدن Cr بأستعمال العزلة *B. subtilis*2.**

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على العزلتين البكترية *B. subtilis*1المقاومة للتراكيز العالية من المعادن Cd ، Cu ، Pb ، Fe ، Zn ، Ni والعزلة *B. subtils*2 المقاومة للتراكيز العالية من معدن Cr من مختبرات كلية الزراعة، في جامعة بغداد.وباستعمال الوسط المغذي السائل Nutriant broth الحاوي على تركيز 100ملغم/ لتر لجميع المعادن بأستثناء تجربة اختيار التركيز الامثل للمعادن الثقيلة.

حضنت الدوارق الحاوية على 100 مل من الوسط المغذي السائل المعقم والمضاف له جميع المعادن الثقيلة المعقمة تعقيما باردا بأستعمال وحدة التعقيم المايكروبية (0.45Mm) كلا على انفراد والملقحة ب 5 مل من المزارع البكتيرية المنشطة بحيث يحوي المل الواحد على10^6 خلية بدرجات حرارية مختلفة شملت 25 و30 و35 و40 و45 و50م في حاضنة هزازة بعدد دورات 150دورة /دقيقة مدة 24 ساعة **(Hietala and Roane, 2009)** لدراسة تأثير درجات الحرارة المثلى على امتزاز العناصر وحدد تأثير الاس الهيدروجيني على عملية المتزاز وذلك من خلال اوساط ذو قيم اس هيدروجيني مختلفة 2 و4 و6 و7 و8 و10 واعيدت نفس الخطوات في الفقرة اعلاه مع مراعاه الحضن على درجة الحرارة المثلى المستحصل عليها من التجربة السابقة **(Gourdon *et al*., 1990)** وحضرت تراكيز مختلفة من املاح المعادن الثقيلة Cd وCu وPb وFe وZn وNi وCr وشملت 100 و200 و400 و600 و800ملغم /لتر بوزن 400 ملغم/ لتر لكل 100 مل وعقمت بالطريقة الباردة واضيفت الى الوسط المغذي السائل واعيدت نفس الخطوات في الفقرة (اعلاه) مع الاخذ بنظر الاعتبار الظروف المثلى المستحصل عليها من التجارب السابقة لتحديد دور تركيز المعادن الثقيلة في عملية الامتزاز **(Kiran *et al*., 2005)** وحضنت الدوارق المحضرة بنفس الطريقة في التجارب اعلاه بأوقات مختلفة شملت 2 و4 و6 و8 و12 و24 و48 ساعة مع مراعاة الظروف المثلى المستحصل عليها من التجارب السابقة لتحديد المدة الزمنية المثلى لعملية الامتزاز، وكذلك استخدمت الحاضنة الهزازة بسرع مختلفة شملت 90 و120 و150 و180 و210 دورة/دقيقة مع

الاخذ بنظر الاعتبار الظروف المثلى المستحصل عليها من التجارب السابقة لتحديد الظروف المثلى للتهوية بعملية الامتزاز واختير حجم اللقاح المقاس بنفس الطريقة اعلاه وذلك من خلال اختيار احجام مختلفة شملت 1 و2.5 و5 و7.5 و10 مل وحضنت مع الاخذ بنظر الاعتبار الظروف المثلى المستحصل عليها من التجارب السابقة لتحديد اللقاح الامثل لعملية الامتزاز **(Gong *et al*., 2005)**.

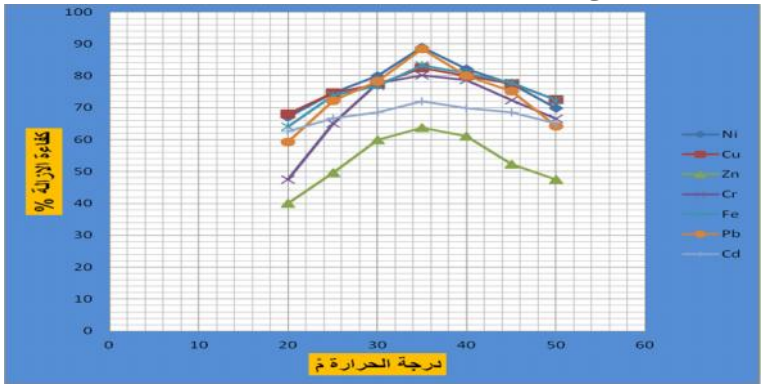
قدر التركيز المتبقي من المعادن الثقيلة في الوسط لجميع التجارب السابقة بأستعمال جهازمطياف الامتصاص الذري (وزارة العلوم والتكنولوجية) اذ تم اخذ 9 مل من النماذج ونبذت مركزيا بسرعة 3000/د لمدة 5 دقائق وهمل الجزء السفلي وخفف الجزء العلوي بمقدار 9 مل باستعمال الماء الخالي من الايونات وفحصت النماذج بجهاز مطياف الامتصاص الذري لمعرفة نسبة الازالة للمعادن الثقيلة.وقدرت النسبة المئوية للأزالة حسب المعادلة التالية **APHA, (1998) و Saxena(1998)** :

$$\text{النسبة المئوية للأزالة (\%)} = \frac{\text{تركيز العنصر قبل الأزالة - تركيز العنصر بعد الازالة}}{\text{تركيز العنصر قبل الازالة}} \times 100$$

النتائج والمنافشة

درجة الحرارة

تؤدي درجة الحرارة دورا كبيرا في عملية الامتزاز الحيوي للمعادن الثقيلة، لذلك تعد واحدة من المعايير المهمة جدا في ازالة المعادن الثقيلة من مياه الصرف الصحي **(Kamsonlian *et al*., 2011; Marandi *et al*., 2010; Kumar *et al*., 2009)**، ويوضح (الشكل، 1) ان افضل درجة حرارة لامتزاز معادن الكادميوم والرصاص والحديد والخارصين والنحاس والنيكل من قبل العزلة *B.subtilis*.1 والكروم من قبل العزلة *B. subtilis*.2 تراوح مابين 30 الى 35م مع ملاحظة افضلية درجة حرارة 35م اذ بلغت نسبة الازالة فيها 88.9 و82.5 و63.7 و80.1 و83.3 و88.4 و72% للمعادن الثقيلة Ni وCu وZn وCr وFe وPb وCd على التوالي، في حين تفاوت مقدار امتزاز العناصر من قبل العزلتين نفسها بالنسبة لدرجات الحرارة الاخرى والتي شملت 20 ,25 ,40 ,45 ,50م مع ملاحظة ان اقل امتزاز تم الحصول عليه بدرجة حرارة 20م من قبل كلا العزلتين، وتتفق النتائج المستحصل عليها مع ما توصل اليه كل من **Hietala and Roane (2009)** اللذين اشارا الى ان درجة الحرارة المثلى لازالة المعادن الثقيلة من قبل *B. subtilis*. تتراوح مابين30 الى 35م، كما اوضح **Goyal (2003)** ان افضل ازالة لعنصري الحديد والنيكل من قبل بكتريا *B. subtilis*. كانت 35م في حين كان هناك انخفاض في امتزاز هذه العناصر من قبل البكتيريا في المدى الحرارة 45 الى 50م وعزي السبب لاحتواء جدارها على طبقة سميكة من البيبتيدوكلايكان وحوامض Teichoic وTeichouronic.

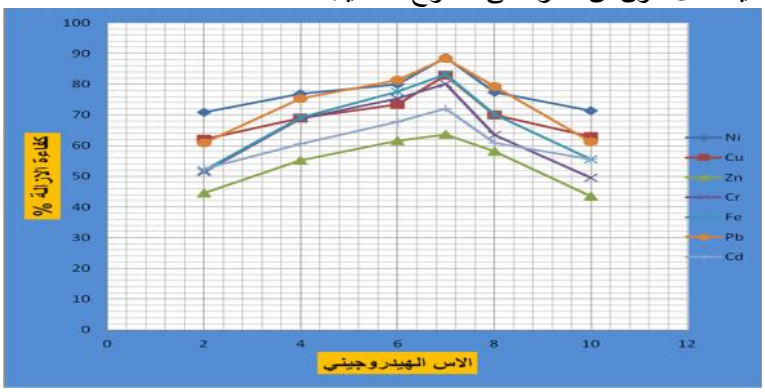


شكل (1): تأثير استعمال درجات حرارة مختلفة في كفاءة ازالة المعادن الثقيلة باستعمال العزلتين من بكتريا *B. subtilis*.1 و *B. subtilis*.2

الاس الهيدروجيني

يؤثر الاس الهيدروجيني للمحاليل على مواقع الارتباط الموجودة على سطح الكتلة الحيوية وكذلك على الحالة الكيميائية للمعادن في المحاليل **(Kiran *et al*., 2005)**، ويوضح (الشكل،2) ان اعلى ازالة تم الحصول عليها في مدى من قيم الاس الهيدروجيني تراوحت ما بين 6 الى 7 مع افضلية للقيمة المتعادلة لجميع المعادن قيد الدراسة، وملاحظة الانخفاض في قيم الازالة كلما ابتعدنا عن التعادل باتجاه الحامضية والقاعدية ويعود السبب في ذلك كما اوضحه **Pandit *et al*. (2013)** الى ان الانخفاض في الاس الهيدروجيني يؤدي الى زيادة ايونات الهيدروجين H^+ والتي ترتبط مع المواقع الفعالة على سطح الخلية وتجعلها غير متاحة للكاتيونات الاخرى وبذلك تقل نسبة الازالة اما في حالة ارتفاع الاس

الهيدروجيني نحو القاعدية فأن ذلك يؤدي الى ترسب المعادن بسبب التشكل اما عند الاس الهيدروجيني المتعادل تعمل ايونات الهيدرونيوم H_3O على الارتباط بشكل وثيق مع جدار الخلية وبالتالي تزداد الازالة او الارتباط للمعادن لاختلاف الشحنات، ويزداد الارتباط بوجود مجاميع الكاربوكسيل والفوسفات والاميدازول ومجموعة الامين على جدار الخلية، كما اشار **Dursn *et al*. (2006)** الى ترسب المعادن الثقيلة بأتجاه الاس الهيدروجيني لمحاليل المعادن الثقيلة نحو القاعدية لوفرة ايونات الهيدروكسيل OH^- دون ان تمتز على سطوح الخلايا.



شكل (2): تأثير استعمال قيم مختلفة من الاس الهيدروجيني في كفاءة ازالة المعادن الثقيلة بأستعمال العزلتين من بكتريا *B. subtilis.1* و *B. subtilis.2*.

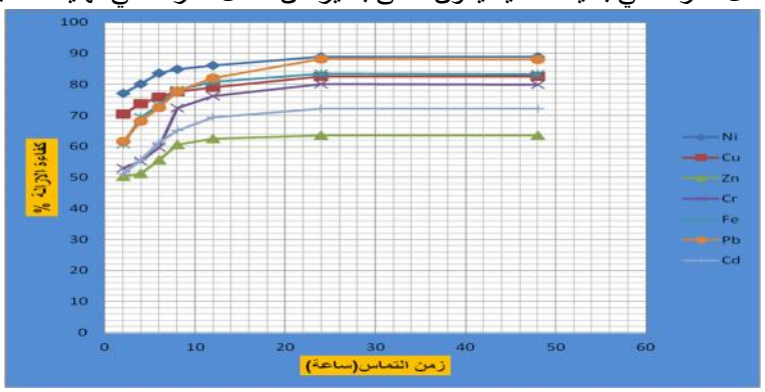
تراكيز المعادن الثقيلة

استعملت التراكيز 100 و200 و400 و600 و800 ملغم/ لتر من المعادن قيد الدراسة لتحديد تأثير تراكيز مختلفة من المعادن على كفاءة عملية الامتزاز من قبل العزلتين *B.subtilis*.1 و *B.subtilis*.2، اذ يوضح (الشكل، 3) انخفاض في كفاءة الامتزاز بزيادة تركيز المعادن في المحاليل مع ملاحظة الفرق في كفاءة الامتزاز لكل عنصر من العناصر في التراكيز المختلفة، اذ بلغت كفاءة الامتزاز 72.2 و88.4 و83.1 و80.2 و63.6 و82.4 و88.7% للمعادن الكادميوم والرصاص والحديد والكروم والخارصين والنحاس والنيكل على التوالي في تركيز 100 ملغم/ لتر والذي يعد اقل تركيز يتم استعماله في هذه التجربة في حين بلغت كفاءة الامتزاز عند التركيز 800 ملغم/ لتر والذي يعد اعلى تركيز مستعمل 48.6 و61.7 و45.6 و45.2 و38.2 و51 و61.5% للمعادن نفسها على التوالي من قبل العزلتين *B. subtilis*.1 بالنسبة للعناصر Ni وCu وZn وFe وPb وCd و *B.subtilis*.2 بالنسبة لعنصر Cr، ويعزى السبب في ذلك الى ان مواقع ارتباط العناصر المعدنية في التراكيز الواطئة تكون جاهزة للارتباط وهذا طبعا يعتمد ايضا على نوع المعدن وعلى الكائن المجهري المستعمل في عملية الازالة، كما ان كفاءة بكتريا *Bacillus* sp. في امتزاز بعض العناصر المعدنية الثقيلة مقارنة بالعناصر الاخرى يعود الى الحساسية العالية لهذه البكتريا تجاه سمية هذه المعادن وخواصها الفيزيائية والكيميائية، فضلا عن ما تمتلكه سطوح الخلايا من خواص كالشحنة والروابط التناسقية اضافة للبلازميدات المسؤولة عن قابلية التحمل لهذه العناصر **(Abyar *et al*., 2012)**، كما تمتلك بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus saprophyticus* الموجبتان لصبغة كرام قدرة على امتزاز بعض العناصر المعدنية بتراكيز مختلفة وبكفاءة عالية مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام وقد يعود السبب في ذلك الى اختلاف التركيب الكيميائي لجدار الخلية في كلا النوعين **(Ansari *et al*., 2016; Bhagat *et al*., 2016)**.

شكل (3): تأثير استعمال تراكيز مختلفة من المعادن المختلفة في كفاءة الازالة من قبل العزلتين *B. subtilis.1* و *B. subtilis.2*

زمن التماس

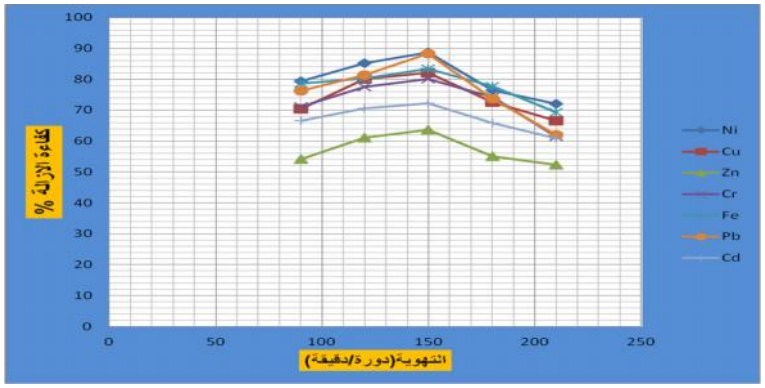
تعد مدة التماس بين الخلايا البكتيرية ومحاليل المعادن الثقيلة من العوامل المهمة المؤثرة في امتزاز المعادن، ويوضح (الشكل،4) النتائج المستحصل عليها من تعريض المعادن المختلفة وتحت الظروف المثلى للتجارب السابقة لمدد تماس مختلفة شملت 2 و 4 و6 و8 و12 و24 و48 ساعة، اذ يلاحظ ان اعلى معدل امتزاز تم الحصول عليها للرصاص Pb والحديد Fe والنيكل Ni بعد 6 ساعات، اذ بلغت نسبة الازالة 82.5 و85.3 و83.6 % على التوالي في حين يلاحظ ان اعلى نسبة ازالة للرصاص والحديد كانت بعد 12 ساعة، اذ بلغت نسبة الازالة 92.1 و90.8% باستعمال بكتريا *B.subtilis*.1 اما اعلى نسبة ازالة للحديد باستعمال بكتريا *B. subtilis*.2 فقد بلغت 88.1 % بعد 8 ساعات، مع ملاحظة ان افضل نسبة ازالة حصلت عليها جميع المعادن عند 24 ساعة، ويلاحظ بعدها حصول الانخفاض في نسب الازالة لجميع المعادن عند 48 ساعة والذي يعود سببه كما اوضحه **Tunila *et al*. (2006)** الى ان استقرار الامتزاز عند حد معين يعود الى عدم توفر مواقع ارتباط اضافية على سطح البكتريا مهما زادت مدة التماس في حين اشار **Abia *et al*. (2003);** **IIan *et al*.(2004)** الى ان اعلى ازالة للمعادن الثقيلة تتم خلال الساعات الاولى من الحضن وتثبيت النسبة بعد 24 ساعة حتى تصل الى 48 ساعة يتوقف الامتزاز، بينما وجد **Elsilk *et al*. (2014)** ان اعلى امتصاص للكادميوم والنحاس والخارصين من قبل بكتريا *Bacillus anthracis*ps 2010 كان بعد 24 ساعة في حين للكوبلت والرصاص كانت بعد 18 و48 ساعة على التوالي، كما لاحظ ان نسبة امتصاص الكوبلت تنخفض بزيادة مدة التماس مابين البكتريا والمعادن الى اكثر من 18 ساعة كما وجد ان نسبة ازالة الرصاص اعلى بكثير من نسبة ازالة النحاس من البكتريا نفسها وان هذا الاختلاف في نسب الازالة للمعادن المختلفة قد يعود الى اختلاف الية التحمل التي تتحملها البكتريا بأختلاف العناصر، واشار **Sabae *et al*, (2016)** الى ان وقت التماس يعد واحد من اهم العوامل التي تؤدي الى نجاح عملية الامتزاز الحيوي للمعادن وان معدل الازالة في بداية العملية يكون اعلى بكثير من معدل الازالة في نهاية العملية.



شكل (4): تأثير استعمال مدد تماس مختلفة في نسبة الازالة للمعادن الثقيلة بأستعمال العزلتين البكتيرية *B. subtilis.1* و *B. subtilis.2*.

التهوية

يبين (الشكل، 5) تأثير سرعة التهوية معبر عنها بعدد الدورات في الدقيقة الواحدة على كفاءة عملية الازالة للعناصر قيد الدراسة بأستعمال العزلتين *B. subtilis.1* و*B. subtilis.2*، اذ يوضح الشكل ان افضل ازالة تم الحصول عليها لجميع العناصر هي 150 دورة/ دقيقة مع ملاحظة التفاوت في نسبة الازالة لكل معدن من المعادن بنفس سرعة الدوران، وتقل نسبة الازالة بزيادة عدد الدورات وقد يعود السبب في ذلك كما اورده **Selatina *et al*. (2004);** **Vijayarghavan *et al*.,(2005)** الى ان التحريك الشديد قد يؤدي الى احداث اضطراب مابين الايونات المعدنية في محاليل المعالجة والخلايا مما يتسبب في انفصال مجموعة من هذه المعادن من سطوح تلك الخلايا مع احتمال ارتباط مجموعة اخرى محلها.



شكل (5): تأثير التهوية في كفاءة ازالة المعادن الثقيلة باستعمال العزلتين *B. subtilis.1* و*B. subtilis.2*.

حجم اللقاح

أن افضل نسبة ازالة تم الحصول عليها عند استعمال حجم لقاح بنسبة 5% (يحوي الملليتر الواحد على 10^6 خلية) والتي بلغت 72.6 و88.8 و80.5 و63.9 و82.6 و88.9 للعناصر Cd وPb وFe وCr وZn وCu وNi على التوالي في حين نلاحظ انخفاض في نسبة الازالة بزيادة حجم اللقاح (الشكل،6)، كما يلاحظ ان افضل ازالة تم الحصول عليها عند المقاومة من المعادن المدروسة عند حجم اللقاح هذا كانت الافضلية لمعدني الرصاص والنيكل مقارنة بالعناصر الاخرى وقد يعود السبب في ذلك الى حساسية البكتريا للمعادن الاخرى ودرجة سميتها ووفرة مواقع الارتباط من حيث الشحنات الموجبة والسالبة التي تتبادل مع الشحنات الموجودة على جدار البكتريا كي يتم الامتزاز بكفاءة، وقد اشار **Gong *et al*., (2005)** الى انه عند استعمال حجم لقاح قليل يؤدي الى انخفاض في عدد مواقع الارتباط وصغر المساحة السطحية ولكن عند استعمال جرعات اعلى سيؤدي الى زيادة في المساحة السطحية وبالتالي تزداد مواقع الربط وتسهل عملية الازالة.

شكل (6): تأثير استعمال احجام لقاح مختلفة في نسبة الازالة للمعادن الثقيلة بأستعمال العزلتين *B. subtilis.1* و *B. subtilis.2*.

المصادر

Abia, A. A., Horsfall, J. M. & Didi, O. (2003). The use of chemically modified and unmodifie cassava waste for removal of Cd, Cu and zn ions from aqueos solution. *Bioresource Technology*, 90, 345-348.

Abyar, H., Safahieh, A., Zolgharnein, H. & Zamani, I. (2012). Isolation and Identification of *Acromobacter denitrificans* and evaluation of its capacity in cadmium removal. *Journal of Environmental Studies*, 21(6), 1523-1527.

Ansari, R. A., Qureshi, A. A. & Ramteke, D. S. (2016). Isolation and characterization of heavy metal resistant microbes from industrial soil. *International Journal of Environmental Sciences*, 6(5), 670-680.

APHA (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.

Beveridge, C., Forsberg, W. & Doyle, J. (1982). Major sites of metal binding in *Bacillus Licheniformis* walls. *Journal of Bacteriology*, 150, 1438-1448.

Bose, B. & Hemantaranjan, A. (2005). *Developments in Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. New Delhi, India: New India Publishing Agency. p 105.

Bhagat, N., Vermani, M., & Bajwa, H. S. (2016). Characterization of heavy metal (cadmium and nickel) Toterant Gram negative enteric bacteria from polluted Yamuna River, Delhi. *African Journal of Microbiology Research*, 10(5), 127-137.

Conge evaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M. & Thamaraiselvi, K. (2007). Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungl and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 270-277.

Cybulski, Z., Dzuirla, E., Kaczorek, E. & Olszanowski, A. (2003). The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillacea strains. *Spill Science and Technology Bulletin*, 8, 503-507.

Das, N., Vimala, R. & Karthika, A. (2008). Biosorption of heavy metals: An overview. *India Journal of Biotechology*, 7, 159-169.

Dursun, A. Y. (2006). A comparative study on determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of biosorption of copper (II) and lead (II) ions on to pretreated *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 187-195.

Elsilk, S. E., EL-shanshoury, A. R. & Atey, A. P. S. (2014). Accumulation of some heavy metals by metal resistant avirulent *Bacillus anthracis* PS 2010 is olated from Egypt. *African Journal of Microbiology Research*, 8(12), 1266-1276.

Gadd, G. M. (2003). Interaction of fungi with toxic metals, *Newphytol*, 124, 25-60.

Goel, P. (2003). *Water Pollution*. New Delhi, India: New Age International. p. 1-2.

Gong, R. D., Liu, Y., Chen, Q. & Liu, S. (2005). Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. *Chemosphere*, 58, 125-130.

Gourdon, R., Bhande, S., Rus, E. & Sofer, S. S. (1990). Comparison of cadmium biosorption by gram positive and gram negative bacteria from activated sludge. *Biotechnology Lettles*, 12, 839-842.

Hietala, K. A. & Roane, T. M. (2009). *Microbial Remediation of Metals in Soils*: *In Advances in Applied Bioremediation, Soil Biology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 201-220.

Hill, M. (2010). *Understanding Environmental Pollution.* Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 9-22.

Ilhan, S., Nourbakhsh, M. N., Kilicarslan, S. & Ozdag, H. (2004). Removal of chromium, lead and copper ions form industrial wastewater by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish electronic Journul Biotechnology*, 2, 50-57.

Israa, G. Z. (2010). Biosorption of Cr (VI) from aqueous solution using new adsorbent equilibrium and thermodynamic study. *E-Journal of Chemistry*, 7(1), 488-494.

Kamsonlian, S., Balomajumder, C., Chand, S. & Suresh, S. (2011). Biosorption of Cd (II) and As (III) ions from aqueous solution by Tea waste biomass. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 5(1), 1-7.

Kankeu, E. F., Bafubiandi, A. F., Mamba, L. M. & Barnard, T. G. (2009). *Optimising the removal by B. subtilis and B. bacterium of metals found around mining areas: Evalution of the effect of physical and physiological parameters.* International Mine Water Conference 19^{th}-23^{rd}.

Khan, A. & Ghouri, A. (2011). Environmental pollution: its effects on life and its remedies. *Journal of Arts & Scienc*, 2, 276-285.

Kiran, I., Akar, T. & Tunali, S. (2005). Bio sorption of Pb (II) and Cu (II) from aqueous solution by pretreated biomase of Neuro spora crassa. *Process Biochemistry*, 40(11), 3550-3558.

Kumar, A. A. V., Naif, A. D. & Hilal, N. (2009). Study of various parameters in the biosorption of heavy metal on activated sludge. *World Applied Sciences Journal*, 5, 32-40.

Mahvi, A. H., Nabizadeh, R., Gholami, F. & Khaivi, A. (2007). Adsorption of chromium from waste water by *Platanus orientalis* leaves. *Iran Journul of Environmental & Health Science Enginerring*, 4, 191-196.

Marandi, R., Ardejani, F. D. & Afshar, H. A. (2010). Biosorption of lead (II) and zinc (II) Ions by pre treated biomass of phanerochaete chrysosporium. *Internatial Journal of Mining and Environmental*, 1(1), 9-16.

Pandit, R. J., Patel, B., Kunjadia, P. D. & Nagee, A. (2013). Isolation, characterigation and molecular identification of heavy metal resistant bacteria from industrial effluents. *Gujarat International Journal of Environmental Sciences*, 3(5), 1689-1699.

Sabae, S. Z., Refat, B. M. & Tahoun, U. M. (2016). Biosorption of copper and lead using bacterial biomass of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilus* isolated from EL-Manzala lake, *Egypt International Journal of Advanced Research*, 4(5), 263-274.

Samarth, D. P., Chandekar, C. J. & Bhadekar, R. K. (2012). Biosorption of heavy metals from aqueous solution using *Bacillus Licheniformis*, *International Journal Pure Appllied Scicens Technology*, 10(2), 12-19.

Saxena, M. M (1998). *Environmental Analysis Water, Soil and Air*. Agriculture Botanical Publishers.

Selatnia, A., Bakhti, M. Z., Madani, A., Kertous, L. & Mansouri, Y. (2004). Biosorption of Cd^{2+} from aqueous solution by a NaOH treated bacterial dead *Streptomyces rimosus* biomass. *Hydrometallurgy*, 75, 11-24.

Tunali, S., Cabuk, A. & Akar, T. (2006). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Jonural*, 115, 203-211.

Vijayaraghavan, K., Jean, J., Palanivelu, K. & Velan, M. (2005). Removal of nickel (II) ions from aqueous solution using crab shell particles in apacked bed up floe column. *Journal of Hazardous Material*, 113, 223-230.

Voleskey, B. (2004). Sorption and biosorption. Sorbex, *Biotechnology Progress* 36-103.

Wang, J. & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Advances*, 24, 427-451.