

مطالعه پارامترهای pH، دوز جاذب زیستی، بر جذب فلز کادمیوم بوسیله باکتری جداسازی شده از پساب صنعتی آبکاری غرب تهران

۱- احمد رضائی ۲- سلمان احمدی اسب چین

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی صنعتی، دانشگاه مازندران، بابلسر

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

a.rezaee@stu.umz.ac.ir

Sa.Ahmadi@umz.ac.ir

چکیده

آلودگی فلزات سنگین از خطرات جدی محیط زیست و سلامت انسان است. در این مطالعه از بین ۱۲ جدایه باکتری مقاوم به کادمیوم از خاک و پساب آلوده به فلزات سنگین جدایه MS2 با رشد نسبتاً بالاتر در محیطهای کشت حاوی کادمیوم برای مطالعه بیشتر انتخاب و حذف فلز در pHهای مختلف و مقدار جاذب بررسی شد. طبق نتایج pH بهینه ۶ و مقدار دوز جاذب ۱ (گرم بر لیتر) است. مقدار جذب به ۴۲/۷۸ درصد (۵۰ میلی گرم بر لیتر کادمیوم) رسید. جدایه منتخب می تواند در محیطهای آلوده به فلز زنده بماند و برای تصفیه پسابهای آلوده به فلز مفید باشد.

کلمات کلیدی: جذب زیستی، کادمیوم، باکتری، پساب صنعتی

۱. مقدمه

آب نقش مهمی در اقتصاد و صنعت دارا می باشد. آب مناسب برای مصرف انسان از آبهای شیرین بدست می آید که تقریباً ۷۰ درصد آب شیرین در کشاورزی مصرف می شود. این منبع طبیعی در بسیاری از نقاط جهان کمیاب شده است و در دسترس نبودن آن یک نگرانی عمده اجتماعی و اقتصادی است. اگرچه در چند دهه گذشته دسترسی به آب آشامیدنی سالم بهبود یافته است، اما تخمین زده می شود که پنج میلیون مرگ در سال به دلیل مصرف آب آشامیدنی آلوده یا خشکسالی ایجاد می شود [7].

با رشد صنعت، تخلیه پسماندهای صنعتی به محیط زیست به میزان قابل توجهی افزایش یافته است، به عنوان مثال مواد سمی در پسابها شامل، فلزات سنگین، داروها، آفت کشها، رنگها، سورفکتانتها و غیره هستند که منابع آب را آلوده کرده اند و از نظر اکولوژیکی برای افراد و موجودات خطرناک هستند. آلودگی آهسته فلزات سنگین نیز از طریق شستشو، جذب گیاه، فرسایش رخ می دهد. انتشار بی رویه فلزات سنگین به خاک و آب یک نگرانی عمده بهداشتی در سراسر جهان است، زیرا نمی توان آن ها را به

اشکال غیر سمی تجزیه کرد و بنابراین اثرات طولانی مدت بر اکوسیستم دارند. بسیاری از آن‌ها حتی در غلظت‌های بسیار پایین سمی هستند [11].

فلزات سنگین را می‌توان به سه دسته فلزات سمی، فلزات گران بها و رادیونوکلیدها تقسیم کرد. برخی از این فلزات سنگین شامل مس، کادمیوم، روی، کروم، آرسنیک، بور، کبالت، تیتانیوم، استرانسیم، قلع، وانادیوم، نیکل، مولیبدن، جیوه، سرب و غیره هستند. فلزات سنگین مانند مس، روی، نیکل، بور، آهن، مولیبدن از نیازهای اساسی رشد گیاهان هستند اما زمانی که غلظت آن‌ها از حد مجاز فراتر رود، برای موجودات و گیاهان مضر هستند. دیگر فلزات سنگین مانند سرب، جیوه، کادمیوم و آرسنیک برای رشد گیاهان و حیوانات ضروری نیستند [7]. این فلزات سنگین علاوه بر سمیت سلولی، ماهیت سرطان زا و جهش زایی نیز دارند [11].

فعالیت‌های انسانی ۳ تا ۱۰ برابر بیشتر از فعالیت‌های طبیعی باعث آلودگی محیط به کادمیوم می‌شوند. از آنجا که کادمیوم تجزیه پذیر نیست، خطر قرار گرفتن در معرض محیط زیست به دلیل انباشه شدن از طریق زنجیره غذایی به طور مداوم در حال افزایش است [11]. این منابع انسانی شامل تولید آلیاژ، رسوب اتمسفر، تولیدات باتری، جامدات زیستی^۱ (محصول فرعی اصلی فرآیند تصفیه فاضلاب هستند)، پوشش، تولید مواد منفجره، انباشت نادرست زباله‌های جامد صنعتی، صنایع چرم سازی، استخراج مواد معدنی، آفت کش‌ها، کود فسفات، مواد عکاسی، رنگ‌های چاپ، استفاده از پساب تصفیه شده یا نشده، ذوب سنگ‌های معدن، فولاد و صنایع آبکاری، نساجی و مواد نگهدارنده چوب هستند [3].

کادمیوم حتی در غلظت‌های بسیار کم خطراتی برای سلامتی انسان به دنبال دارد، زیرا فلز نمی‌تواند به گونه‌های کمتر سمی تخریب متابولیک شود و دفع آن ضعیف است. اندام‌های هدف برای سمیت کادمیوم در حیوانات شامل کبد، کلیه، ریه‌ها، بیضه‌ها، پروستات، قلب، سیستم اسکلتی، سیستم عصبی و سیستم ایمنی بدن است. همچنین می‌تواند باعث بیماری‌هایی همانند بیماری مرتبط با استخوان، فشار خون بالا، تائ تای^۲، بیماری‌های کلیوی و سرطان ریه و پروستات، شود [11]. حد مجاز مشخص شده توسط سازمان بهداشت جهانی^۳ ۰/۰۰۳ میلی گرم بر لیتر در آب آشامیدنی است [13].

روش‌های متعددی برای حذف فلزات سنگین از آب ایجاد شده است: فیلترهای غشایی، الکتروشیمیایی، الکترودیالیز، تبادل یونی، فتوکاتالیست، اکسیداسیون و جذب زیستی [4]. برای درمان موثر، چندین روش به صورت متوالی برای حذف فلزات سنگین استفاده می‌شود.

جذب زیستی یک روش جایگزین و مطمئن برای فرآیندهای رایج به دلیل جذب آسان، قابل انعطاف، طراحی ساده، هزینه کم بهره برداری و رسوب کم برای حذف فلزات سنگین از پساب است [12]. در دهه های اخیر، حذف یون‌های سمی فلزات سنگین از پساب با روش جذب به طور موثر استفاده شده است [6]. دو روش جذب سطحی برای حذف فلزات سنگین وجود دارد؛ جذب فیزیکی و جذب شیمیایی. جذب فیزیکی، جاذبه ضعیف واندروالس و جذب شیمیایی پیوند کووالانسی قوی بین جاذب و جذب شونده است [6]. در فرآیند جذب، جاذب‌ها می‌توانند توسط فرآیند بازیافت دوباره مورد استفاده قرار گیرند زیرا این روش برگشت پذیر است و جاذب بازسازی شده می‌تواند مجدداً استفاده شود. بر این اساس، فرآیند جذب به یکی از روش‌های اصلی در تصفیه پساب تبدیل شده است. انواع مختلف جاذب برای تصفیه فلزات سنگین از پساب تولید شده است. جنبه‌های اصلی مورد نیاز برای انتخاب جاذب‌ها مقرون به صرفه بودن و مناسب ترین جاذب برای این فناوری است. مساحت سطح زیاد، توزیع اندازه منافذ، گروه‌های عملکردی، قطبیت جاذب تعیین کننده کارایی فرآیند جذب است [12].

¹ Biosolids

² itai-itai

³ World Health Organization

برخی از جاذب‌های مورد مطالعه برای حذف فلزات سنگین عبارتند از: کربن فعال، جاذب‌های زیستی، نانولوله‌های کربنی، جاذب‌های مغناطیسی و نانومواد جدید. هر جاذب دارای ویژگی‌های منحصر به فرد و قابلیت‌های حذف متفاوت است. بازده حذف، علاوه بر ویژگی‌های جاذب، مستقیماً تحت تأثیر عواملی مانند pH، غلظت فلزات سنگین، دما، نسبت فلزات سنگین به سایر لیگاندها و قدرت یونی است. علاوه بر این، وجود ذرات معلق، روغن‌ها و گریس‌ها کارایی جذب را کاهش می‌دهد بنابراین، گاهی اوقات ممکن است نیاز به پیش تصفیه باشد [4].

هدف از این پژوهش جداسازی باکتری مقاوم به فلزات سنگین از پساب صنعتی و بررسی پارامترهای جذب زیستی، pH و مقدار زیست توده جاذب است به همین ترتیب تست‌ها انجام شده و کارایی جدایه باکتری مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

برای جمع آوری باکتری مقاوم به فلزات سنگین از جمله کادمیوم، تعدادی فالكون‌های با ظرفیت ۲۰ میلی لیتر اتوکلاو و برای نمونه برداری آماده شدند. نمونه‌ها از پساب کارگاه فلز کاری از تهران تهیه شدند که شامل خاک و پساب بود. پس از جمع آوری نمونه‌ها در فلاسک با دمای 2 ± 4 نگهداری و کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند.

به منظور کشت باکتری‌ها محیط کشت‌های نوترینت آگار تهیه شدند. نمونه‌ها با روش رقت سازی کشت داده شدند به این صورت که لوله‌ای با مقدار ۱۰ میلی لیتر از نمونه تهیه شد پس از آن ۷ لوله با مقادیر ۹ میلی لیتر از سرم نمکی ۰/۹ درصد استریل آماده گردید در ادامه با سمپلر ۱ میلی لیتر از پساب برداشته و در لوله اول ریخته شد به این ترتیب رقت 10^{-1} را تهیه شد، از این محیط ۱ میلی لیتر برداشته و به لوله دوم اضافه گردید به این ترتیب رقت 10^{-2} تهیه و همین طور تا 10^{-7} ادامه داده شد. سپس از لوله‌هایی با رقت 10^{-3} تا 10^{-6} مقدار ۱ میلی لیتر برداشته و هر کدام بر روی پلیت نوترینت آگار بوسیله لوله شیشه‌ای خمیده کشت سطحی صورت پذیرفت. در نمونه خاکی ۱۰ گرم از خاک در ۱۰۰ میلی لیتر سرم ۰/۹ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط شیک ۱۵۰ دور در دقیقه مخلوط شد سپس بعد از اتمام به مدت ۵ دقیقه در حالت سکون قرار گرفت تا فاز جامد از مایع تفکیک شود و در ادامه ۱ میلی لیتر از آن برداشته و رقت سازی تا 10^{-6} ادامه داده شد و محیط کشت‌ها به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند.

بعد از خالص سازی جدایه‌ها، از محلول استوک کلرید کادمیوم با غلظت ۱۰۰۰ ppm استفاده شد و غلظت‌های مختلف با رقیق سازی محلول استوک تهیه شد. به این ترتیب بر روی محیط کشت‌های نوترینت آگار که دارای غلظت ۱۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کادمیوم بودند به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. جدایه باکتری انتخاب و در آزمایشات بعدی از آن‌ها استفاده شدند.

در این آزمایش میزان جذب فلز کادمیوم در pHهای ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ و با ۳ تکرار بررسی گردید. شرح این آزمایش به این صورت است که ابتدا مقدار ۶۰۵ میلی لیتر از محلول کادمیوم با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر ساخته شد. سپس میزان ۵ میلی لیتر توسط سرنگ از محلول به عنوان شاهد برداشته شد. بقیه محلول به ۶ ارلن به طور مساوی تقسیم شد. پس از آن pH برای هر ارلن به کمک اسید کلریدریک (۰/۵ مولار) و هیدروکسید سدیم (۰/۵ مولار) تنظیم گردید. به نسبت ۱ گرم بر لیتر زیست توده باکتریایی به هر ارلن به صورت همزمان اضافه شد و در انکوباتور شیکر دار با دور همزن ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده

شد. پس از آن میزان جذب از هر ارلن توسط سرنگ ۵ میلی لیتر از محلول برداشته و بلافاصله از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. سپس مقدار کادمیوم جذب شده در نمونه‌ها همراه با نمونه شاهد توسط دستگاه جذب اتمی سنجیده شدند. در این آزمایش زیست توده‌های مورد بررسی شامل: ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ گرم بر لیتر انتخاب و با ۳ تکرار انجام گرفت. مقدار ۵۰۵ میلی لیتر محلول حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر غلظت از کادمیوم تهیه شد. مقدار ۵ میلی لیتر نمونه شاهد برداشته شد سپس pH بهینه تنظیم شد. بقیه محلول به ۵ ارلن ۲۵۰ میلی لیتری به طور مساوی تقسیم شد و پس از آن ارلن‌ها در انکوباتور قرار داده شدند تا به دمای بهینه برسند. مقادیر زیست توده مشخص شده به هر یک از ارلن‌ها اضافه شد و در انکوباتور با سرعت همزن ۱۵۰ دور در دقیقه نمونه‌گیری توسط سرنگ و فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری انجام شد و پس از آن مقدار کادمیوم توسط دستگاه جذب اتمی سنجیده شد.

کیفیت یک جاذب زیستی با توجه به میزان جذب آن، ارزیابی می‌شود. مقدار جذب توسط یک جاذب زیستی را می‌توان از اختلاف بین مقدار اولیه و ثانویه جذب شونده محاسبه کرد که با استفاده از معادله زیر حاصل می‌شود [1]:

$$q = \frac{V(C_i - C_e)}{M} \quad (1)$$

که q مقدار فلز جذب شده زیستی توسط زیست توده (میلی گرم در گرم) است. C_i غلظت اولیه فلز (میلی گرم در لیتر) است. C_e غلظت فلز (میلی گرم در لیتر) در تعادل است. V حجم محلول فلز (L) است. و M جرم جاذب (g) است.

برای بررسی درصد حذف زیستی فلز توسط باکتری از فرمول زیر استفاده می‌شود:

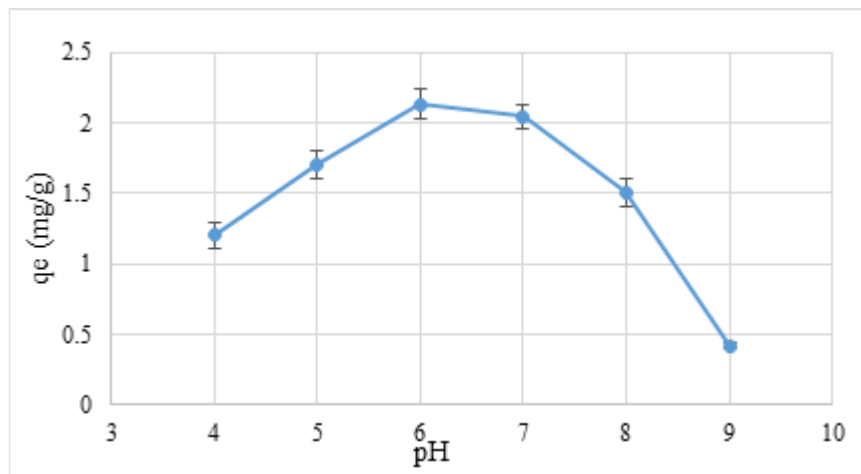
$$\% \text{ removal of metal} = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100 \quad (2)$$

که در آن C_e بر حسب میلی گرم بر لیتر مقدار غلظت فلز در ابتدا جذب و C_i میلی گرم بر لیتر غلظت فلز بعد از به تعادل رسیدن در محلول است.

۳. نتایج

در مجموع ۱۲ جدایه باکتریایی که بر اساس ریخت شناسی رشد کلونی از محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر کادمیوم در طول غربالگری اولیه، جدا شدند. در غربالگری دوم، ۱۰ جدایه را که توانایی رشد در محیط کشت با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کادمیوم نداشتند، حذف شدند. پس از یک دور دیگر از روش غربالگری در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر، جدایه (MS2) موفق به رشد و برای آزمون‌های دیگر انتخاب شد.

pH نقش مهمی در جذب بیولوژیکی فلزات سنگین ایفا می‌کند زیرا می‌تواند بر خواص شیمیایی فلزات سنگین و در دسترس بودن گروه‌های عاملی زیست توده تأثیر بگذارد. به طور کلی، محدوده pH ۴/۰ تا ۷/۰ برای جذب زیستی فلز کادمیوم توسط زیست توده باکتریایی مطلوب است [9]. اثر pH بر جذب زیستی کادمیوم در شکل (۱) ارائه شده است.



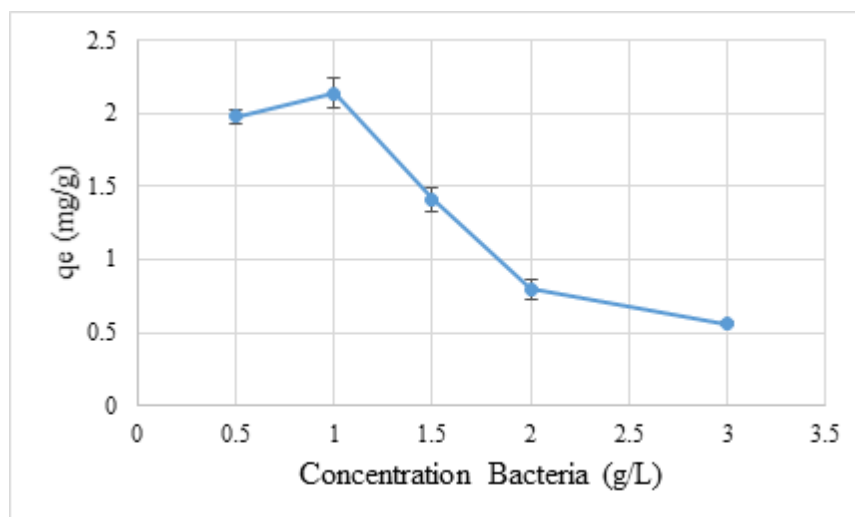
شکل (۱) تاثیر مقادیر مختلف pH بر جذب کادمیوم

نتایج نشان داد که ظرفیت جذب زیستی جدایه MS2 برای کادمیوم در بیشترین مقدار خود در pH ۶/۰ بود که تا رسیدن به این نقطه به طور قابل توجهی جذب افزایش یافت و سپس در مقادیر pH بالاتر از ۶ کاهش یافت. در جذب زیستی فلز کادمیوم بوسیله باکتری *شیوانالا پوترفاسینس*^۱ مشاهده شد که حداکثر ۶۱/۷ درصد در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر از کادمیوم) آستانه جذب در pH برابر ۶/۰ بود [14]. ظرفیت جذب زیستی کم در محدوده pH ۴ تا ۵ (شکل ۱) به دلیل وجود غلظت‌های بالا از یون‌های هیدروژن^۲ و هیدرونیوم^۳ در محلول است که باعث رقابت با یون‌های کادمیوم برای اتصال به جایگاه‌های جذب می‌شود. در pH‌های بالاتر از ۶/۰، از دست دادن ظرفیت جذب زیستی ممکن است به دلیل تشکیل رسوب هیدروکسید کادمیوم در شرایط قلیایی باشد [9]. بنابراین در این آزمایش pH بهینه ۶/۰ انتخاب شد. اثر مقدار جاذب زیستی بر جذب یون‌های کادمیوم با استفاده از دوزهای مختلف در محدوده ۰/۵ تا ۳/۰ گرم در لیتر همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است مورد مطالعه قرار گرفت.

¹ *Shewanella putrefaciens*

² H⁺

³ H₃O⁺



شکل (۲) تاثیر مقادیر مختلف زیست توده بر جذب کادمیوم

فرآیند جذب زیستی شامل تعدادی مکانیسم غیرفعال مانند جذب سطحی، لخته سازی، بارش و تبادل یونی است که مستقیماً به مقدار و نوع زیست توده بستگی دارد. غلظت زیست توده جاذب (زیست توده باکتریایی) و گروه‌های عملکردی آن عوامل مهمی در جذب هستند که به طور قابل توجهی بر ظرفیت جذب و سرعت فلز سنگین تأثیر می‌گذارند [10]. هنگامی که غلظت زیست توده جدایه MS2 از ۰/۵ تا ۱/۰ گرم در لیتر تغییر کرد، درصد جذب زیستی تا حدی افزایش یافت (از ۳۹/۶ به ۴۲/۷۸ درصد) (شکل ۲). بازده جذب زیستی بالا با افزایش دوز جاذب زیستی می‌تواند عواملی همانند؛ مساحت سطح جاذب و دسترسی بیشتر به جایگاه‌های جذب را افزایش دهد، در نتیجه آن بازده جذب بالا می‌رود [2]. در دوزهای بالاتر، جایگاه‌های فعال آزاد به دلیل همپوشانی یا تجمع زیست توده کاهش می‌یابد که منجر به کاهش ظرفیت جذب می‌شود. ا. به عبارت دیگر، هرچه تراکم و بر همکنش سلول‌ها نسبت به یک دیگر کم تر باشد (در دوز زیست توده کم)، جذب فلز افزایش می‌یابد [14]. نتایج آزمایش نشان داد که (شکل ۲) دوز جاذب بالا منجر به کاهش ظرفیت جذب در غلظت ثابت کادمیوم (۵۰ میلی گرم در لیتر) شد. در مطالعه دیگر جذب زیستی فلز کادمیوم بوسیله باکتری *Sodomonas Atrorhynosa* B237¹ مشخص شد که با افزایش مقدار زیست توده از ۰/۲۵ به ۱/۰ گرم بر لیتر مقدار جذب افزایش یافت و همچنین در طی افزایش مقدار زیست توده از ۱/۰ به ۵/۰ گرم بر لیتر جذب کاهش یافت که با نتایج این آزمایش همخوانی دارد و مقدار بهینه زیست توده ۱ گرم بر لیتر انتخاب شد [8]. بنابراین در این آزمایش دوز بهینه زیست توده ۱ گرم بر لیتر انتخاب شد.

۴. نتیجه گیری

¹ *Pseudomonas aeruginosa* B237

در این پژوهش باکتری‌های مقاوم به کادمیوم جداسازی شدند. توانایی جدایه MS2 برای تحمل غلظت‌های اولیه و مختلف کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت. جدایه MS2 ظرفیت جذب بالایی برای کادمیوم نشان داد. مقدار pH و دوز زیست توده بر جذب کادمیوم توسط جدایه MS2 مورد مطالعه قرار گرفت. اگرچه پارامترهای تجربی دیگر بر جذب زیستی تأثیر بسزایی دارند. با این حال، در بین عوامل موثر در جذب، pH مهمترین عامل در فرآیند جذب بود. حداکثر راندمان حذف کادمیوم توسط جدایه MS2 در pH برابر ۶ و مقدار زیست توده ۱ گرم بر لیتر بدست آمد. راندمان حذف کادمیوم ۴۲/۷۸ درصد برای مقدار ۵۰ میلی گرم بر لیتر کادمیوم بود. بنابراین جدایه MS2 در شرایط بهینه می‌تواند در آب و پساب به عنوان یک جاذب زیستی کارآمد یون‌های فلزی استفاده شود.

۵. مراجع

۱. Ahmady-Asbchin, S., Safari, M., & Tabaraki, R. (2015). Biosorption of Zn (II) by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a site contaminated with petroleum. *Desalination and Water Treatment*, 54(12), 3372-3379.
۲. Akar, T., Kaynak, Z., Ulusoy, S., Yuvaci, D., Ozsari, G., & Akar, S. T. (2009). Enhanced biosorption of nickel (II) ions by silica-gel-immobilized waste biomass: biosorption characteristics in batch and dynamic flow mode. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 1134-1141.
۳. Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International journal of environmental research and public health*, 14(1), 94.
۴. Carolin, C. F., Kumar, P. S., Saravanan, A., Joshiba, G. J., & Naushad, M. (2017). Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. *Journal of environmental chemical engineering*, 5(3), 2782-2799.
۵. Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., ... & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212.
۶. Haris, M., Shakeel, A., Hussain, T., Ahmad, G., & Khan, A. A. (2021). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater through microbes. *Removal of Emerging Contaminants Through Microbial Processes*, 183-205.
۷. Kanamarlapudi, S. L. R. K., Chintalpudi, V. K., & Muddada, S. (2018). Application of biosorption for removal of heavy metals from wastewater. *Biosorption*, 18, 69.
۸. Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., & Auesukaree, C. (2015). Bioaccumulation and biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 322-330.
۹. Long, J., Yu, M., Xu, H., Huang, S., Wang, Z., & Zhang, X. X. (2021). Characterization of cadmium biosorption by inactive biomass of two cadmium-tolerant endophytic bacteria *Microbacterium* sp. D2-2 and *Bacillus* sp. C9-3. *Ecotoxicology*, 30(7), 1419-1428.
۱۰. Ren, G., Jin, Y., Zhang, C., Gu, H., & Qu, J. (2015). Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb (II). *Ecotoxicology and environmental safety*, 117, 141-148.
۱۱. Sarkar, A., Ravindran, G., & Krishnamurthy, V. (2013). A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *Int J Biotechnol Res*, 3(1), 17-36.
۱۲. Villa-Gomez, D., Ababneh, H., Papirio, S., Rousseau, D. P. L., & Lens, P. N. L. (2011). Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inverted fluidized bed reactors. *Journal of hazardous materials*, 192(1), 200-207.
۱۳. World Health Organization. (2017). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating first addendum, 4th ed. *World Health Organization*. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
۱۴. Yuan, W., Cheng, J., Huang, H., Xiong, S., Gao, J., Zhang, J., & Feng, S. (2019). Optimization of cadmium biosorption by *Shewanella putrefaciens* using a Box-Behnken design. *Ecotoxicology and environmental safety*, 175, 138-147.