جذب زیستی یون سرب توسط *سودوموناس* جدا شده از پساب‌های آلوده نفتی خوزستان

سید منصور میبدی[1] هما خراسانی[2]

(دریافت ۹۲/۵/۲۷ پذیرش ۹۳/۳/۱۲)

چکیده

جذب زیستی یکی از فناوری‌های مؤثر در حذف فلزات سنگین است. هدف از این پژوهش، جداسازی *سودوموناس* مقاوم و تعیین شرایط بهینه رشد آن، تعیین حداقل غلظت بازدارنده و بررسی حذف زیستی سویه بود. برای انجام پژوهش، ۵ نمونه از پساب‌های نفتی مناطق خوزستان در شرایط سترون جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های همگن رقیق‌شده پساب، بر روی محیط لوریا برتانی آگار دارای ppm ۵ لید نیترات کشت داده شدند و پس از گذشت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، پرگنه سویه‌های مقاوم برای غربالگری روی محیط مکانکی آگار کشت داده شد. این باکتری‌ها با آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. در مجموع ۲٤ سویه *سودوموناس* جدا شد که ۱۰ سویه مقاوم به سرب بود. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد، برای غربالگری و جداسازی سویه‌های مقاوم از ۱۰۰ تا ppm ۲۱۰۰ انجام شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۲٤ ساعت نگهداری شدند و در این بین، سویه *Mso1* برای آزمایش‌های فراتر انتخاب شد. آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که سویه مربوطه نسبت به کلرامفنیکل به‌میزان ۳۰ میکروگرم و اریترومایسین به‌میزان ۱۵ میکروگرم مقاوم است. رشد بهینه باکتری در حضور سرب در دمای ٤۰ درجه سلسیوس، سرعت تکان rpm ۱۰۰ و pH برابر با ٦، با روش اسپکتروفتومتری در ٦۰۰ نانومتر تعیین شد. در این مطالعه سویه *Mso1* ظرف مدت ۲٤ ساعت، ۳۸/٤٥ درصد سرب را از محیط حذف کرد. این پژوهش، اهمیت استفاده از گونه‌های *سودوموناس* را در اصلاح زیستی پساب آلوده به سرب آشکار می‌کند.

واژه‌های کلیدی: جذب زیستی، سرب، *سودوموناس*، پساب‌های نفتی

Biosorption of Lead by *Pseudomonas sp* Isolated from Oil-Contaminated Wastewaters in Khuzestan

S.M. Meybodi [1] *H. Khorasani* [2]

(Received Aug. 18, 2013 Accepted June 2, 2014)

Abstract

Biosorption is a most effective technology for the removal of such toxic substances as heavy metals. The objective of this study was four-fold: 1) to isolate lead resistant *Pseudomonas* strains, 2) to determine the optimal conditions of their growth, 3) to obtain the minimum inhibitory concentration of lead, and 4) to evaluate the bioremoval of lead from culture solutions. For the purposes of this study, oil-contaminated wastewater samples were collected from Khuzestan region and transferred to laboratory where they were homogenized and serially diluted up to 10^{-10} with sterile saline before they were cultured in Luria Bertani agar medium containing 5ppm of lead nitrate. Resistant strains were then isolated at 37°C for 24h. The samples were subsequently cultured in Macconkey agar for isolation of appropriate gram negative strains. Biochemical tests were used to identify the bacteria, 10 strains of which were screened as lead resistant ones from all the 24 isolates. The bacterial colonies were selected and tested with different concentrations (100- 2100 ppm) of lead for their resistance. The plates were then incubated at 37ºC for 24h and *Mso1* was chosen from among the lead resistant colonies for further experiments. This strain showed resistance to chloramphenicol (30µg) and erythromycin (15µg) when subjected to the antimicrobial susceptibility test. Optimal growth conditions included a temperature of 40°C at 100 rpm and a pH level of 6 in the presence of lead by spectrophotometry at 600nm. Absorption tests showed that the *Mso1* strain had a metal removal efficiency of 38.45% from an aqueous solution containing 100 ppm of lead over 24h. The results confirmed the capability of *Pseudomonas*sp in the bioremediation of Pb-contaminated wastewaters.

Keywords: Biosorption, Lead, *Pseudomonas*, Oil-contaminated Wastewater.

۱- استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن
(نویسنده مسئول) ۳۲۲۵۳۲۲ (۰۳٤٥) homa_khorasani@yahoo.com

1. Assist. Prof. of Microbiology, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon
2. MSc in Microbiology, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon (Corresponding Author) (+98 345) 3225322 homa_khorasani@yahoo.com

۱- مقدمه

فلزات سنگین می‌توانند در پساب‌های حاصل از صنایع فلزی، آبکاری، استخراج معادن، نفت، کارخانه‌های تولید باتری، آلیاژسازی و ذوب فلز وجود داشته باشند و همراه با پساب این صنایع وارد محیط شده و خطرآفرینی کنند[۱]. فلزات به‌دلیل ماهیت سمّی، مثل مواد آلی در محیط پاکسازی نمی‌شوند و خصلت عنصری خود را حفظ کرده، در محیط باقی مانده و جایگزین فلزات ضروری موجود در جایگاه‌های اتصال می‌شوند. به این ترتیب از طریق تخریب RNA، DNA، مهار سنتز پروتئین، جلوگیری از فرایندهای آنزیمی و مهار تقسیم سلولی، به سلول و فرایندهای سلولی آسیب می‌رسانند[۲، ۳ و ۴].

از جمله این فلزات خطرناک، عنصر سرب است. این فلز سنگین و سمّی به پیوندهای عصبی به‌خصوص در اطفال آسیب رسانده و موجب بیماری‌های خونی و مغزی می‌شود. تماس طولانی با این فلز یا نمک‌های آن، مخصوصاً نمک‌های محلول یا اکسید غلیظ (PbO2)، می‌تواند باعث بیماری‌های کلیه و دردهای شکمی و همچنین عقب‌ماندگی ذهنی کودکان شود. این عنصر در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر خطرآفرین است[۵، ۶ و ۷]. فلز سرب به‌صورت ترکیبات متعددی وجود دارد و سمّی بودن این ترکیبات تا حدودی به عوامل و شرایط محیطی وابسته است. موارد متنوعی از جمله pH، دما و غیره بر جذب و سمّی بودن سرب اثر می‌گذارند[۴].

پساب بسیاری از صنایع مانند اتومبیل‌سازی، هوانوردی، پالایش نفت و غیره دارای مقادیر زیادی از سرب و سایر فلزات سنگین است. سرب به‌طور وسیعی برای تولید سوخت استفاده می‌شود. نشان داده شده که پساب‌های ایجاد شده از صنایع نفتی، ۰/۲ تا ۱۰ ppm سرب در ترکیب خود دارند. حد مجاز این ماده در آب آشامیدنی و پساب توسط سازمان حفاظت محیط زیست امریکا[1] به‌ترتیب ۰/۰۱۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شده است. همچنین سازمان بهداشت جهانی[2] میزان پذیرفته شده سرب را در آب ۰/۰۱ ppm می‌داند. سرب در رسوبات طبیعی وجود دارد و ممکن است از طریق سوراخ‌های تانکرهای زیرزمینی بنزین به خاک و منابع آب‌های زیرزمینی وارد شود. این فلز با تنفس و یا از طریق گوارش می‌تواند به‌سرعت به جریان خون وارد شده و روی سیستم عصبی مرکزی، سیستم قلبی عروقی، کلیه‌ها، کبد، دستگاه تولید مثل، خون‌سازی و سیستم ایمنی، اثرات سمّی خود را به‌جا بگذارد. بنابراین لازم است که این فلز سمّی از آب آشامیدنی و پساب‌های آلوده حذف شود[۸].

خوشبختانه میکروارگانیسم‌های مقاوم به این آلاینده‌ها، با مقاومت به آنها، توانایی تحمل سمیّت فلز را دارند و با فرایندهایی نظیر تبخیر، رسوب خارج سلولی و جلوگیری از ورود فلز یا اتصال در سطح سلول و تجزیه درون سلولی، جذب زیستی و غیره، سمیّت فلز را کم می‌کنند. جذب زیستی، توانایی توده زیستی در جمع‌آوری فلزات سنگین از پساب‌ها از طریق فعالیت‌های متابولیکی غیرمستقیم یا راه‌های فیزیکی و شیمیایی جذب است که فرایندی برگشت‌پذیر و سریع است[۲، ۴، ۹ و ۱۰]. این روش ساده و کم‌هزینه، فوایدی مانند کارایی بالا، امکان بازیافت فلز، امکان احیای جاذب، به حداقل رساندن فاضلاب شیمیایی و زیستی را داراست[۲، ۴ و ۱۱].

جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها توانایی جذب فلزات را دارند. در مطالعه ادوارد راجا، البسطاوی، پرز و چندین مطالعه دیگر نشان داده شده که گونه‌های جنس سودوموناس[3] می‌توانند در جذب زیستی سرب، نقش مؤثری داشته باشند[۸، ۱۲ و ۱۳]. در این پژوهش از باکتری جنس سودوموناس برای جذب فلزات استفاده شد؛ زیرا این باکتری همه جا یافت می‌شود و توانایی زیادی در تجزیه زیستی آلاینده‌ها و استفاده از ترکیبات معطر حلقوی موجود در پساب‌های نفتی دارد و بارها توسط پژوهشگران مختلف استفاده شده است[۱۲ و ۱۴]. این پژوهش با هدف جذب زیستی یون سرب توسط سودوموناس جدا شده از پساب‌های آلوده نفتی خوزستان انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌گیری

پنج نمونه ۱۰۰ گرمی از پساب‌های آلوده نفتی منطقه اهواز، مارون، مسجد سلیمان، زویر چوی و صلیعه ملاثانی در خوزستان توسط ظروف نمونه‌برداری مخصوص جمع‌آوری شد. برای همگن ساختن نمونه و برداشت آن، سر ظروف نمونه‌گیری تا سه سانتی‌متر خالی نگه داشته شد. نمونه‌ها سریعاً به جعبه یخ منتقل شدند تا در کمترین زمان ممکن، آزمایش‌های لازم روی آنها انجام شود[۱۳ و ۱۵].

۲-۲- جداسازی و تخلیص سویه‌ها

در شرایط کاملاً استریل، ۱۰ گرم پساب به فلاسک حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد سترون افزوده شد و به‌منظور همگن‌سازی و تهیه رقت ۰/۱ از پساب، به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی مخلوط شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این رقت با ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط و رقت‌های متوالی از 10^{-2} تا 10^{-10} میلی‌گرم در لیتر تهیه شد. از رقت‌های مختلف ۱۰۰

[1] United State Environmental Protection Agency (USEPA)
[2] World Health Organization (WHO)
[3] *Pseudomonas sp*

میکرولیتر برداشته و در محیط لوریا برتانی آگار، حاوی ۵ ppm لید نیترات محصول شرکت مرک[1] آلمان به‌صورت سطحی کشت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس کلنی‌های مقاوم خالص و برای غربالگری باکتری‌های گرم منفی روی محیط مک کانکی آگار به‌صورت خطی کشت شد.

۲-۳- شناسایی بیوشیمیایی

شناسایی سویه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد و رنگ‌آمیزی گرم، صورت گرفت. برای این منظور از پرگنه‌های این آزمون‌ها شامل کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات، متیل رد، وژزپرسکوئر استفاده شد. کشت در محیط TSI محصول شرکت مرک آلمان بود[۴، ۱۳ و ۱۶].

برای انجام آزمون کاتالاز، یک قطره پراکسید هیدروژن ۳ درصد روی لام اضافه و به‌کمک حلقه پلاتینی سترون مقداری از پرگنه میکربی به آن افزوده شد[۱۶ و ۱۷]. برای انجام آزمون اکسیداز از معرف تترامتیل پارا فنیلن دی‌آمین هیدروکلراید ۱ درصد آبکی استفاده شد. برای این منظور، پرگنه باکتری به پتری‌دیش محتوی کاغذ صافی آغشته به معرف اضافه شد [۱۶ و ۱۸]. برای انجام آزمون متیل رد و وژزپرسکوئر نمونه میکربی توسط حلقه پلاتینی سترون در محیط آبگوشت MRVP کشت داده و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس محیط یادشده به دو بخش تقسیم و برای سنجش آزمون‌های مورد نظر استفاده شد. در این آزمون از متیل رد به‌عنوان معرف pH برای بررسی آزمایش MR و از معرف باریت برای آزمون وژزپرسکوئر استفاده شد[۱۶ و ۱۷].

برای انجام آزمون احیای نیترات از محیط نیترات براث استفاده شد. بعد از تلقیح باکتری و رشد کامل، از دو محلول A با ۰/۵ گرم α نفتیل آمین در ۱۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۵ نرمال و محلول B با ۰/۸ گرم سولفانیلیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۵ نرمال، به‌نسبت مساوی در لوله ریخته شد. در موارد مشاهده جواب منفی کاذب، از پودر روی استفاده شد[۱۶ و ۱۸]. آزمون بررسی تخمیر قندهای گلوکز و لاکتوز، تولید دی اکسید کربن و سولفید هیدروژن برای تشخیص باسیل‌های گرم منفی نظیر سودوموناس به‌کار می‌رود. باکتری با سوزن پلاتینی در قسمت عمق و سطح محیط، کشت و بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نتایج بررسی شد[۱۶ و ۱۷]. همه محیط‌ها و معرف‌ها از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

۲-۴- تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد

پس از کشت سویه تخلیص‌شده قبلی، حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد سویه مورد نظر در قبال سرب سنجش شد. برای این منظور با کمک پلیت‌های لوریا برتانی آگار حاوی مقادیر مختلف لید نیترات از ۱۰۰ تا ۲۱۰۰ ppm، حداقل غلظت مهارکننده رشد با بررسی رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به‌مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط مربوطه تعیین و بهترین سویه مقاوم، برای انجام آزمون‌های حذف فلز انتخاب شد. در این آزمون از باکتری برابر کدورت نیم مک‌فارلند به‌میزان ۰/۱ میلی‌لیتر استفاده شد[۱۳]. برای ساخت ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت دارای ۱۰۰ppm سرب به‌صورت زیر عمل شد

$C_1V_1 = C_2V_2$ (1000ppm× V_1= 100 × 250) =25ml

۲۵ سی‌سی ذخیره فلز (۱۰۰۰ppm) + ۲۲۵ سی‌سی آب مقطر + ۸ گرم محیط کشت.

۲-۵- مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از ۱۰میکروگرم دیسک‌های آمپی‌سیلین، ۳۰ میکروگرم تتراسایکلین، ۳۰ میکروگرم کلرامفنیکل، ۱۵ میکروگرم اریترومایسین و ۳۰ میکروگرم کانامایسین، محصول شرکت پادتن طب استفاده شد. برای این منظور از کشت ۲۴ساعته، باکتری مورد نظر، در محیط تریپتیکاز سوی براث سوسپانسیونی متناسب با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد و با سواب استریل از هر نمونه برداشته شد و در محیط مولر هینتون آگار کشت سفره‌ای تهیه و دیسک‌های آنتی بیوتیک با فاصله‌های مشخص قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا از نظر قطر هاله عدم رشد ارزیابی شوند[۱۳، ۱۹ و ۲۰].

۲-۶- تعیین شرایط بهینه رشد

برای تعیین بهترین شرایط رشد باکتری‌ها در حضور فلز، عواملی مانند دما، سرعت تکان و pH بررسی شد. برای این منظور محیط‌های کشت لوریا برتانی مایع، در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ppm فلز سرب با رابطه $C_1V_1=C_2V_2$ ساخته و در ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. بعد از افزودن سوسپانسیون استاندارد باکتری به هر یک از آنها، طوری که نهایتاً پس از افزودن به محیط کشت برابر با کدورت نیم مک‌فارلند شود، ۲۴ ساعت در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۰ درجه سلسیوس، pHهای ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و سرعت تکان ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ rpm در گرمخانه همزن‌دار نگهداری شدند. حجم نهایی محیط‌ها در داخل فلاسک، ۵۰ میلی‌لیتر بود. بالاترین جذب در دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۶۰۰ نانومتر، بهترین شرایط رشد را مشخص کرد[۱۳ و ۱۹]. لازم به ذکر است همه آزمون‌ها سه بار تکرار شد.

[1] Merck

جدول۱- نتایج برخی از آزمون‌های بیوشیمیایی ۲۴ *سودوموناس* انتخابی

سویه	کاتالاز	اکسیداز	TSI	VP	MR	احیاء نیترات	واکنش گرم
همه ۲۴ سویه	+	+	R/R	−	−	+ (پس از افزودن روی)	−

۲-۷- حذف زیستی سرب

در این مرحله محیط کشت لوریا برتانی مایع، حاوی ۱۰۰ppm فلز سرب در فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتری ساخته شد و در ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد و پس از خنک شدن، سوسپانسیون استاندارد باکتری یعنی ۵ مک‌فارلند، به آن افزوده شد و در دما، سرعت تکان و pH بهینه که در مرحله قبل تعیین شده بود، نگهداری شد. کشت‌های ۳۰ میلی‌لیتری (نسبت محیط کشت لوریا برتانی مایع حاوی فلز با سوسپانسیون باکتری در آزمون‌های جذب فلز، برای رسیدن به کدورت نیم مک‌فارلند به‌ترتیب ۲۷، ۳ و حجم نهایی ۳۰ میلی‌لیتر شد) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط بهینه، نهایتاً به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای آنالیز اسپکتروسکوپی جذب اتمی استفاده شد. آزمون‌ها سه بار تکرار شد[۱۱ و ۱۳]. لازم به ذکر است که ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی مایع حاوی ۱۰۰ppm فلز سرب، در فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتری به‌عنوان شاهد در کنار نمونه مورد آزمایش، استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

نتیجه کشت نمونه‌های پساب، جداسازی ۵۰ سویه میکربی گرم منفی بود. در این بین، ۲۴ سویه *سودوموناس* با آزمون‌های بیوشیمیایی غربال شد (جدول ۱).

نهایتاً ۱۰ سویه مناسب مقاوم به سرب مشخص شد که از بین آنها، سویه *Mso1* تا ۲۰۰۰ppm سرب را در محیط خود تحمل کرد (جدول ۲).

جدول۲- حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد سرب، برای باکتری *Mso1* (اعداد برحسب ppm هستند)

MIC / سویه	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۸۰۰	۹۰۰	۱۰۰۰
Mso1	G	G	G	G	G	G
MIC / سویه	۱۲۰۰	۱۴۰۰	۱۶۰۰	۱۸۰۰	۲۰۰۰	۲۱۰۰
Mso1	G	G	G	G	G	N

G Growth, N Non growth

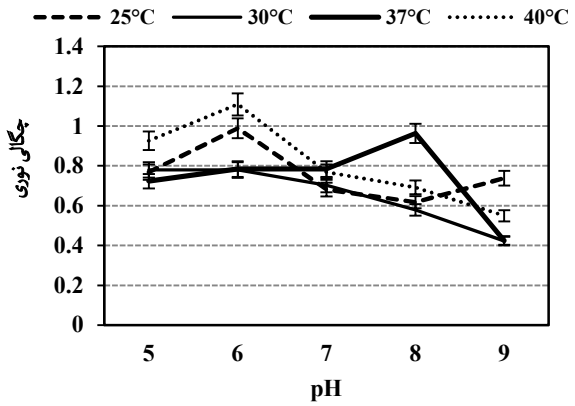
کلنی‌های مربوطه، به‌صورت گرد، کرم مایل به زرد، مضرس و براق بودند. آزمون تعیین حساسیت باکتری به دارو، در سویه انتخابی مقاوم به سرب، نشان داد که باکتری یاد شده نسبت به کلرامفنیکل و اریترومایسین مقاوم و در برابر سایر آنتی بیوتیک‌های استفاده شده حالت بینابینی دارد (جدول ۳).

جدول۳- نتایج آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی برای سویه *Mso1* در حضور سرب

سویه / آنتی‌بیوتیک (میکروگرم)	K(30)	TE(30)	E(15)	AM(10)	C(30)
Mso1	I	I	R	I	R

K Kanamycin, TE Tetracycline, E Erythromycin, AM Ampicillin, C Chloramphenicol
R Resistance, I Intermediate, S Sensitive

بهترین شرایط رشد باکتری *Mso1* در حضور ۱۰۰ppm فلز سرب در پنج سطح pH و چهار سطح دما، نشان می‌دهد که pH برابر با ۶ و دمای ۴۰ درجه سلسیوس، بیشترین تأثیر را بر رشد باکتری داشته و چگالی نوری سوسپانسیون باکتریایی در روش اسپکتروفتومتری ۱/۱۰۹ شد (شکل ۱).



شکل۱- تعیین بهترین شرایط رشد باکتری *Mso1* در حضور فلز سرب در پنج سطح pH و چهار سطح دما

به‌منظور بررسی آزمون‌های مختلف، برای رشد در حضور فلز سرب و آنالیز تأثیر فاکتورهای مختلف نظیر pH و دما، از مدل خطی عمومی استفاده شد. سنجش واریانس تک متغیری در جدول ۴ نشان می‌دهد که pH، دما و تأثیر متقابل این دو عامل،

به‌صورت معنی‌داری باعث رشد سلول‌های باکتریایی در حضور سرب شده است که در p<۰/۰۵ تأیید می‌شود.

جدول۴- تعیین بهترین شرایط رشد باکتری *Mso1* در حضور فلز سرب در پنج سطح pH، چهار سطح دما و تأثیر متقابل عوامل

فاکتور	مجموع مربعات	df	میانگین مربع	F	p
pH	۷/۷۹۴	۴	۱/۹۴۹	۳۶۸/۶۵۸	۰/۰۰۰
دما	۲/۷۹۱	۳	۰/۹۳۰	۱۷۶/۰۱۴	۰/۰۰۰
pH* دما	۲/۶۹۷	۱۲	۰/۲۲۵	۴۲/۵۲۹	۰/۰۰۰

R Squared = ۰/۹۸۴ (Adjusted R Squared =۰/۹۷۷)

آزمون دانکن نتایج مربوطه را تأیید کرد و نشان داد که pH برابر ۶ و دمای ۴۰ درجه سلسیوس، بالاترین اثر را در رشد سویه دارد (جدول‌های ۵ و ۶).

جدول۵- آزمون دانکن، تعیین بهترین pH برای رشد باکتری *Mso1* در حضور سرب

pH	تعداد آزمون	OD در ۶۰۰ نانومتر			
		۱	۲	۳	۴
۹	۱۲	[d]۰/۵۱۴۰	–	–	–
۸	۱۲	–	[c]۰/۹۷۰۲	–	–
۷	۱۲	–	[c]۱/۰۲۰۹	–	–
۵	۱۲	–	–	[b]۱/۳۷۱۸	–
۶	۱۲	–	–	–	[a]۱/۵۵۸۳

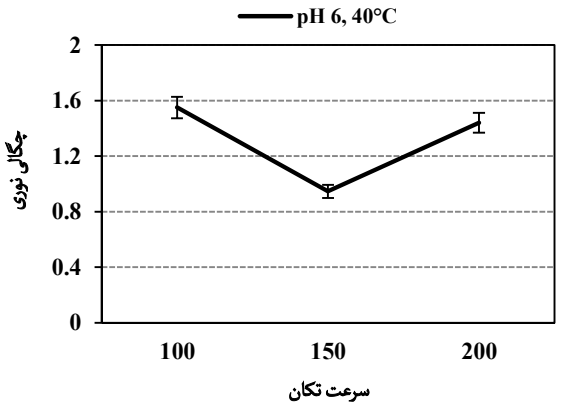
a بهترین حالت رشد است.

جدول۶- آزمون دانکن، تعیین بهترین دما برای رشد باکتری *Mso1* در حضور سرب

دما	تعداد آزمون	OD در ۶۰۰ نانومتر			
		۱	۲	۳	۴
۲۵	۱۵	[d]۰/۷۷۵۹	–	–	–
۳۰	۱۵	–	[c]۱/۰۵۴۹	–	–
۳۷	۱۵	–	–	[b]۱/۲۰۰۱	–
۴۰	۱۵	–	–	–	[a]۱/۳۳۷۲

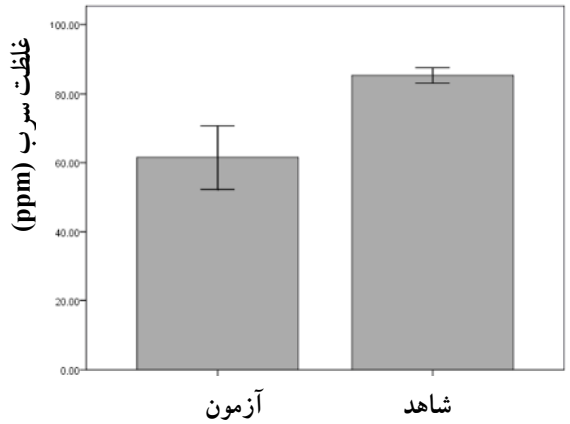
a بهترین حالت رشد است.

بهترین شرایط رشد باکتری *Mso1* در حضور فلز سرب، در سه سطح سرعت تکان در pH و دمای بهینه نشان داد که سرعت تکان ۱۰۰ rpm، بیشترین اثر را در رشد باکتری در حضور ۱۰۰ppm سرب داشته است و همچنین چگالی نوری سوسپانسیون باکتریایی در روش اسپکتروفتومتری، برابر ۱/۵۵ به‌دست آمد (شکل ۲).



شکل۲- تعیین بهترین شرایط رشد باکتری *Mso1* در حضور فلز سرب در سه سطح سرعت تکان در pH و دمای بهینه

در شکل ۳ و جدول ۷ نتایج مربوط به میزان حذف فلز سرب، توسط سویه مورد آزمایش در مقابل شاهد، آمده است.



شکل۳- میزان حذف سرب برحسب ppm در نمونه تست (*Mso1*) در مقابل شاهد بدون باکتری

جدول۷- نتایج جذب اتمی سویه‌ها برای حذف سرب

سویه	*Mso1*	شاهد
درصد حذف	۳۸/۴۵	۱۴/۶۷
میزان فلز باقیمانده (ppm)	(۶۱/۵۴)	(۸۵/۳۳)

سویه *Mso1* با حذف ۳۸/۴۵ درصد از سرب موجود در محیط، نتیجه خوبی را نشان داد. به‌منظور مقایسه دو نمونه آزمون و شاهد، برای حذف فلز سرب از محیط کشت واجد ۱۰۰ ppm از این فلز، آزمون T نمونه‌های مستقل انجام شد که در p<۰/۰۵ معنی‌دار بود.

در مطالعه انجام شده توسط ادوارد راجا و همکاران، حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد برای سرب، ppm ۸۰۰ بود، در صورتی که در پژوهش حاضر سویه مربوطه تا ppm ۲۰۰۰ سرب را تحمل کرد و MIC آن برابر با ppm ۲۱۰۰ بود. این امر نشان می‌دهد که سویه *Mso1* مقاومت بیشتری نسبت به سویه *BC15* دارد. *سودوموناس BC15* مورد مطالعه راجا و همکاران، قادر به جذب ۶۵ درصد سرب شد. همچنین در مطالعه البسطاوی، کشت مخلوط سه سویه *سودوموناس* و در مطالعه کومار، *استافیلوکوک* مورد آزمایش توانایی حذف سرب را به‌ترتیب به‌میزان ۹۰/۹۷ و ۹۳ درصد داشت، درحالی که در پژوهش حاضر، سویه *Mso1* جذب ۳۸/۴۵ درصدی را نشان داد.

لیونگ و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند، سویه‌های مقاوم به فلز، الزاماً فلزات را بهتر از سویه های غیرمقاوم حذف نمی‌کنند و حذف فلز به‌طور اساسی نمی‌تواند منسوب به مکانیسم مقاومت باشد[۲۴-۲۱]. سویه *Mso1* در یک محیط با میزان سرب بالا (۱۰۰ppm) عمل خود را انجام داد، درحالی که در پژوهش البسطاوی، میزان سرب محلول ۵۰ppm بود؛ از طرفی زمان حذف در پژوهش حاضر ۲۴ ساعت بود، درحالی که البسطاوی پس از هفت روز به نتیجه یاد شده رسید؛ بنابراین می‌توان دریافت که *Mso1* شاید کارایی بالاتر و بهتری نسبت به پژوهش یادشده داشته باشد. سویه مورد مطالعه، در pH برابر با ۶ بهترین رشد خود را در حضور سرب انجام داد که در فرایند بهینه‌سازی مربوط به شرایط مختلف حاکم بر کشت به‌دست آمد و با مطالعه ادوارد راجا انطباق دارد[۱۳].

طبق مطالعه جانسی رانی و همکاران، در pH اسیدی به‌علت وجود میزان بالای پروتون در محیط و واکنش این یون با سطح سلول باکتری که بار منفی دارد، ظرفیت جذب کاتیون‌ها به‌شدت کاهش می‌یابد و در نتیجه بر روی حذف زیستی فلز اثر منفی می‌گذارد. در مقابل با افزایش میزان pH، لیگاندهای با شارژ منفی افزایش می‌یابد که نتیجه آن افزایش اتصال کاتیون‌ها خواهد بود[۱۹]. در پژوهش دیگری که توسط خراسانی و همکاران انجام شد، سویه *Mzap* در pH برابر با ۹، جذب بهتری برای فلز سرب نشان داد[۲۰]. لایه لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌های گرم منفی، مسئول ظرفیت جذب سطحی کارآمد برای فلزات است. همچنین تأیید شده که باکتری‌ها، طیف متنوعی از مواد اختصاصی و غیراختصاصی جاذب فلز را در پاسخ به‌میزان بالای فلزات سمّی آزاد می‌کنند. ساختمان‌های خارج سلولی، مانند کپسول و لایه لزج نیز از بخش‌های جاذب فلز هستند. مکان‌های اتصال در میکروارگانیسم‌ها معمولاً شامل گروه‌های فسفات، سولفید و هیدروکسیل است. یکی از سلول‌های باکتریایی که توانایی ایجاد پلی‌ساکاریدهای پوششی خارج سلولی را داشته و از این طریق فلزات را جذب می‌کند، جنس *سودوموناس* است[۲۵، ۲۶ و ۲۷].

بهترین دمای رشد باکتری در حضور سرب در مطالعه حاضر، ۴۰ درجه سلسیوس بود که با آزمون دانکن به اثبات رسید و با مطالعه کومار که در دمای ۳۹ درجه سلسیوس توسط گونه‌ای از *استافیلوکوکوس* صورت می‌گرفت، همخوانی داشت. با توجه به اینکه افزایش دما می‌تواند باعث افزایش فعالیت متابولیکی سلول باکتری شود، اگر کاهش میزان سرب، وابسته به متابولیسم باکتری باشد، این مسئله قابل توجیه است. سویه مورد بررسی در پژوهش حاضر، مانند مطالعه ژنگ ژیائو ژی و کومار، به اریتروماییسین و کلرامفنیکل مقاومت نشان داد[۲۴، ۲۸ و ۲۹]. با توجه به این که ژن‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین می‌توانند بر روی یک پلاسمید قرار گرفته باشند، می‌توان انطباق این دو نوع مقاومت را در نتیجه پژوهش حاضر دید.

۴- نتیجه‌گیری

جذب زیستی، توانایی توده میکربی در حذف فلز از محیط‌های آلوده از طریق فعالیت‌های متابولیکی یا راه‌های فیزیکی و شیمیایی است که فرایندی برگشت‌پذیر و سریع است. این روش ساده و کم‌هزینه دارای کارایی بالایی است. بهترین سویه جدا شده در این پژوهش که از پساب نفتی مسجد سلیمان جدا شد، با حذف ۳۸/۴۵ درصدی سرب از کشت آلوده به فلز می‌تواند برای پژوهش‌های اصلاح زیستی محیط‌های خاص استفاده شود. لازم به‌ذکر است که بهبود بازده این سویه به‌منظور حذف می‌تواند در مطالعات بعدی مد نظر قرار گیرد.

۵- قدردانی

به این وسیله از اساتید و کارکنان گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، واحد مطالعات مهندسی بهره‌برداری نفت خوزستان و پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

۶- مراجع

1. Trivedi, R.K. (1989). *Pollution management in industries*, Environmental Pub., Karad.
2. Ahalya, N., Ramachandra, T., and Kanamadi, R.D. (2003). "Biosorption of heavy metal." *J. of Chemistry and* Environment, 7(4), 71-79.

3. Maier, R.M., Papper L.L., and Gebra, C.P. (2000). *Environmental microbiology*, Academic Press, 17, 403-423.
4. 4- Nasr Azani, A., Tahmores pour, A., and Hodaji, M. (2010). "Determination of tolerance threshold of bacteria to lead, zinc and cadmium in three types of industrial wastewater." *J. of Ecol*., 56, 75-86.
5. Hurst, R.W. (1923-1990). "Lead isotopes as age sensitive, genetic markers in hydrocarbons: 3. leaded gasoline." Ph.D. Thesis, Dept. of Geological Sciences California State University, Los Angeles.
6. Amouzegar, M.A., and Ghazanfari, N. (2009). "Survey of biosorption of lead and cadmium by moderate halophilic bacterium Halomonas eutihalina strain D." *J. of Environmental Sciences and Technology*, 11(4),
7. Hilburn, M. (1979). "Environmental leads in perspective." *Chemistry Society Review*, 8, 63-84.
8. El Bestawy, E., Abu Rass, M., and Abdel-Kawi, M.A. (2013). "Removal of Lead and Oil Hydrocarbon from Oil Refining-Contaminated Wastewater Using *Pseudomonas* spp." *J. of Natural Sciences Research*, 3(11), 112-124.
9. Chojnacka, K., Chojnacki, A., and Gorecka, H. (2005). "Biosorption of Cr^{2+}, Cr^{3+} and Cu^{2+} ions by blue green algae *Spirulina sp*: kinetics equilibrium and the mechanism of the process." *J. of Chemosphere*, 59, 75-84.
10. Huang, Q., Chen, W., and Theng, B.K.G. (2008). "Role of bacteria and bacteria-soil composites in metal biosorption and remediating toxic metal-contaminated soil systems." In: *Soil mineral microbe-organic interaction*, Springer Berlin Heidelberg, Pub., Berlin.
11. Abyar, H., Safahieh, A., Zolgharnian, H., and Zamani, A. (2012). "Survey of cadmium ions biosorption by *Achromobacter piechaudii* isolated from Persian Gulf sediments." *J. of Oceanography*, 10, 19-25.
12. Perez, R.M., Albus, A., Gomez, J.M., and Cantero, D. (2007). "Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleum contaminated site." *J. of Advanced Materials Research*, 20, 615-618.
13. Edward raja, C., Anbazhagan, A., and Sadasivam selvam, G. (2006). "Isolation and characterization of a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain." *World J. of Microbiology and Biotechnology*, 22, 577-585.
14. Volesky, B., and Holan, Z.R. (1995). "Biosorption of heavy metals." *J. of Biotechnology Progress*, 11, 235-250.
15. Zolfaghari, M., Soleymani, D.M., Masodikhah, M., Motlagh, M., and Heydarpoor, A. (2012). "Prevalence and antimicrobial resistance of chromium-bearing microorganisms in industrial wastewaters of Qom." *Medical Sciences of Qom University*, 6, 15-23. (In Persian)
16. Morello, J.A., Granato, P.A., and Mizer, H.E. (2002). *Laboratory manual and workbook in microbiology*, 7th Ed., McGraw Hill, N.Y.
17. Barati, B. (2005). *Microbiology laboratory*, Tehran University, Tehran. (In Persian)
18. Mohamadi, M. (2001). *Notes on microbiology laboratory*, Tehran University, Tehran. (In Persian)
19. Johncy Rani, M., Hemambika, B., Hemapriya, J., and Rajesh Kannan, V. (2010). "Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: A biosorption approach." *African J. of Environmental Science and Technology*, 4(2), 77-83.
20. Khorasani, H. (2013). "Biosorption of chromium and lead by *Pseudomonas* spp related to Khuzestan oil contaminated soils." M.Sc. Thesis, I.A.U., Tonekabon Branch. (In Persian)
21. Fotoohi, S.H. (2011). "Evaluation of cadmium removal from waste of Angouran's lead and zinc by native isolated bacterial strains." M.Sc. Thesis, I.A.U., Tonekabon Branch. (In Persian)
22. Leung, W.C., Wong, M-F., Chua, H., Lo, W., Yu, P.H.F., and Leung, C.K. (2000). "Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater." *J. of Water Science and Technology*, 41(12), 233-240.

23. El Bestawy, E., Abu Rass, M., and Abdel-Kawi, M.A. (2013). "Removal of lead and oil hydrocarbon from oil refining-contaminated wastewater using *Pseudomonas* spp." *J. of Natural Sciences Research*, 3(11), 112-124.
24. Kumar, A., Singh, B., and Datt, V. (2010). "Biosorption of heavy metals by four acclimated microbial species, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. and *Aspergillus niger*." *J. of Biol. Environ. Sci*., 4(12), 97-108.
25. Durga Devi, B., Thatheyus, A.J., and Ramya, D. (2012). "Bioremeoval of hexavalent chromium, using *Pseudomonas Fluorescens*." *J. of Microbiol. Biotech. Res*., 2(5), 727-735.
26. Srivastava, J., Chandra, H., Tripathi, K., Naraian, R., and Sahu, R.K. (2008). "Removal of chromium (VI) through biosorption by the *Pseudomonas spp*. isolated from tannery effluent." *J. of Basic Microbiol*., 48, 135-139.
27. Sadeeshkumar, R., Saranraj, P., and Annadurai, D. (2012). "Bioadsorption of the toxic heavy metal chromium by using *Pseudomonas putida*." *Int. J. of Res. in Pure and Applied Microbiol*., 2(4), 32-36.
28. Xiao-xi, Z., Jian-xin, T., Xue-duan, L., and Pei, J. (2009). "Isolation, identification and characterization of cadmium-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain E1." *J. of Central South University*, 16, 416-426.
29. Heshmatipour, Z. (2008). *Practical Microbiology*, Ketab Mir Pub., Tehran. (In Persian)