



Chromium bioremediation by *Pseudomonas plecoglossicida* and mesoporous silica nanoparticles from oil contaminated soils

Mahdi Shahriarinoor¹, Faten Divsar², Shaghayegh Taleb Sarbazi³

¹Assistant Professor, Department of Microbiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

²Assistant Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran.

³M. Sc, Department of Microbiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The presence of cytotoxic and carcinogenic heavy metals such as Chromium in industrial wastewater is an important pollution for agricultural soils and natural water sources. The aim of study was to evaluate chromium removal with a bacterium isolate from contaminated soil compared to mesoporous silica nanoparticles.

Materials and methods: In this study, for isolate chromium decomposing bacteria, soil were sampled from different of contaminated beach of Kiashahr. Preliminary identification of the isolated strains was done based on biochemical tests and then molecular identification of bacteria by 16SrRNA sequencing. Cr removal was evaluated with resistant strain and nanoparticles by Atomic absorption spectrometry (AAS), individually.

Results: Chromium-degrading bacteria were identified based on 16SrRNA analysis and 99% homology of *Pseudomonas pelicoglucida*. Removal of chromium by mesoporous silica nanoparticles at a concentration of 300 µg / ml was higher than the isolated strain of *Pseudomonas pelicoglucida* and showed a removal rate of up to 75%. However, by increasing the concentration of chromium by more than 600 micrograms per milliliter, the ability of bacteria to remove chromium from mesoporous silica nanoparticles showed better results by 80% to 72% chromium removal.

Conclusion: Results indicated *Pseudomonas pelicoglucida* and nanoparticles can be used to remove chromium from contaminated soils and waters. It is also recommended to use chromium-removing bacteria and nano-adsorbents to remove chromium at the same time to increase the efficiency of chromium removal.

Keywords: Biodegradation, Chromium, *Pseudomonas plecoglossicida*, Mesoporous silica nanoparticles, Oil contamination.

Correspondence to: Mahdi Shahriarinoor

Tel: +98 9359310560

E-mail: Mahdi.shahriari@iaurasht.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(3): 253-263.

DOI:



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



حذف زیستی کروم توسط سودوموناس پلکوگلووسی سیدا و نانوذرات سیلیسی مزوپور از خاک های آلوده به نفت

مهدی شهریاری نور^{۱*}، فتن دیوسر^۲، شقایق طالب سربازی^۳

^۱استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت. ^۲استادیار، گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
^۳کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت.

چکیده

سابقه و هدف: حضور فلزات سنگین سمی و سرطان زا همچون کروم در فاضلاب صنعتی، یک آلودگی مهم برای خاک های کشاورزی و منابع طبیعی آب محسوب می شود. هدف از این مطالعه ارزیابی حذف کروم با یک جدایه باکتریایی از خاک آلوده در مقایسه با نانوذرات سیلیسی مزوپوری می باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش به منظور جداسازی باکتری تجزیه کننده کروم، نمونه برداری از خاک های مناطق مختلف نفتی ساحل کیشهر صورت گرفت. شناسایی مقدماتی سویه های جدا شده بر اساس آزمون های بیوشیمیایی و سپس شناسایی مولکولی باکتری با توالی یابی 16S rRNA انجام شد. حذف کروم در شرایط آزمایشگاه با سویه باکتریایی و نانوذرات بطور جداگانه با اسپکترومتر جذب اتمی (AAS) بررسی شد.

یافته ها: باکتری تجزیه کننده کروم براساس تجزیه و تحلیل 16S rRNA و همولوژی ۹۹٪، سودوموناس پلکوگلووسی سیدا شناسایی شد. حذف کروم توسط نانو ذرات سیلیسی مزوپور در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بیشتر از سویه جدا شده باکتری بوده و میزان حذف را تا ۷۵ درصد نشان داد. اما با افزایش غلظت کروم در محیط به میزان بیش از ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، توانایی حذف کروم توسط باکتری نسبت به نانو ذرات سیلیسی مزوپور، به میزان ۸۰ درصد به ۷۲ درصد عملکرد بهتری نشان داد. **نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که جدایه سودوموناس پلکوگلووسی سیدا و نانوذرات می توانند برای حذف کروم از خاک ها و آب های آلوده استفاده شوند. همچنین به منظور افزایش کارایی حذف کروم، استفاده هم زمان از باکتری حذف کننده کروم و نانو جاذب استفاده پیشنهاد می شود.

واژگان کلیدی: حذف زیستی، کروم، سودوموناس پلکوگلووسی سیدا، نانوذرات سیلیسی مزوپور، آلودگی نفتی.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۹ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۹

مقدمه

آب آلوده و یا تنفس آلاینده ها در موقعیت های کاری آلوده به این فلز رخ داده و کروم (VI) در مقادیر بالا، باعث آسیب بویایی و سرطان می شود. مصرف خوراکی آن از طریق آب یا غذا نیز باعث آنمی (کم خونی) و یا آسیب به معده و روده می گردد. در حالیکه کروم (III) یک ترکیب ضروری در مواد

کروم شش ظرفیتی (VI) به عنوان یک کارسینوژن انسانی شناخته شده که خطر ابتلا به سرطان ریه را در کارگران صنایع خاص افزایش می دهد (۱). مواجهه با کروم از طریق غذا یا

* آدرس برای مکاتبه: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۹۳۵۹۳۱۰۵۶۰ پست الکترونیک: mahdi.shahriari@iaurasht.ac.ir



Bacillus cereus) (۹) اشاره نمود. همچنین استفاده از روش های شیمیایی از جمله استفاده از نانوذرات نیز در جهت حذف بهتر و بیشتر آلاینده های زیست محیطی امروزه مورد تحقیق و بررسی می باشد. از جمله می توان به نانوذرات آهن صفر ظرفیتی (Zero-valent iron nanoparticles)، نانوذرات اکسید روی، نانوذرات اکسید تیتانیوم و نانوذرات اکسید سیلیکون اشاره نمود که اثرات حذف فلزات سنگین چون کروم VI را دارند (۴). توانایی سودوموناس ها در زمینه فعالیت های زیست پالایی به ویژه در زمینه تجزیه زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته و مشخص شده که، آن ها توانایی بسیار بالایی در استفاده از ترکیبات آروماتیک دارند. از این رو این باکتری ها به دفعات از انواع اکوسیستم های آلوده به ترکیبات نفتی جدا شده اند. بر این اساس می توان به حذف زیستی کروم توسط گونه سودوموناس جداسازی شده از خاک های آلوده به نفت خوزستان و حذف فلزات سنگین نیکل، کروم و کادمیوم از خاک آلوده به نفت خام با استفاده از بیوسورفکتنت رامنولپید حاصل از باکتری سودوموناس آئروچینوسا اشاره نمود (۱۰) و (۱۱). با توجه به وجود آلاینده های مختلف از جمله کروم در پساب کارخانجات صنعتی در کشور و انتقال آن به فاضلاب عمومی شهرها لازم است تدابیری جهت حذف آن ها در محل خروج پساب از کارخانجات و یا فاضلاب های عمومی اندیشیده شود. هدف از این مطالعه بررسی میزان حذف کروم VI بواسطه روش بیولوژیکی با باکتری جدا شده از خاک و مقایسه حذف آن توسط نانوذرات سیلیکونی بود.

روش کار

الف) جمع آوری نمونه و شناسایی اولیه: نمونه برداری از چند نقطه از خاک آلوده اطراف کارخانجات شهرک صنعتی و چندین نقطه از ساحل کیشهر در شرایط استریل و در ظروف در پیچ دار مخصوص صورت گرفت و به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت انتقال یافت (۱۲).

ب) جداسازی، تخلیص و غربالگری سوبه های باکتریایی:

غذایی مانند گوشت، غلات، میوه ها و مخمر یافت می باشد (۲). کروم VI به عنوان یک کارسینوژن انسانی در گروه I کارسینوژن ها توسط موسسه بین المللی تحقیقات سرطان (International Agency for Research on Cancer) در نظر گرفته شده است. مشخص شده که مواجهه با کروم VI باعث سرطانهای ریه، معده و روده، و سیستم اعصاب مرکزی می گردد (۳). کروم شش ظرفیتی درون سلول به واسطه های احیاء شامل کروم V، کروم IV و کروم III احیاء می شوند. این واسطه ها قادر به ایجاد اکسیژن واکنش پذیر (Reactive Oxygen Species) بوده که تولید زیاد اکسیژن واکنش پذیر باعث آسیب به پروتین ها، لیپیدها و DNA می باشد (۴). یکی از مهمترین مسایل زیست محیطی، تصفیه فاضلاب های صنعتی می باشد که آلودگی به فلزات سنگین از جمله کروم، سرب، مس، کادمیوم، نیکل، آهن، روی، آرسنیک، منگنز و جیوه در فاضلاب صنایع آبکاری، چرم سازی، دباغی، ریخته گری، عکاسی، الکترونیک، کاغذسازی، معدن، پلاستیک، تولید کود و مواد شیمیایی گزارش شده است. برای حذف فلزات سنگین از روشهای مختلفی می توان استفاده نمود. به طوری که به منظور حذف کروم VI از روش های بیولوژیک و شیمیایی بهره برده می شود. نتایج تحقیقات به منظور حذف کروم با استفاده از ضایعات کشاورزی به ویژه پوست گردو، پوست فندق، بیومس جو صحرایی، پوست انار با توجه به شرایط حذف رضایت بخشی متفاوتی نشان داد. اما، مشکلاتی مانند محدودیت pH و کاهش حذف با افزایش میزان کروم نیز در این تحقیقات مشاهده گردید (۵). از دیگر روش های بیولوژیک حذف فلزات سنگین به ویژه کروم می توان به استفاده از میکروارگانیسم ها اشاره نمود. مکانیسم عمل باکتری ها در حذف کروم شامل (۱) رانش فعال ترکیبات کرومی، (۲) احیای متابولیکی کروم VI به کروم III و (۳) یا رسوب دهی داخل یا خارج سلولی است (۶). از باکتری های حذف کننده کروم VI می توان به استافیلوکوکوس سیوری (*Staphylococcus sciuri*) (۷)، اسپوروسارسینا سارومنسسیس (*Sporosarcina saromensis*) (۸)، باسیلوس سرئوس

نیم مک فارلند به میزان ۰/۱ میلی لیتر استفاده شد (۱۳).

ه) سنتز نانو ذرات سیلیس مزوپور:

نانو ذرات سیلیس مزوپور مطابق روش ارائه شده در مراجع تهیه شد (۱۵). در این روش ۹/۲ گرم اتیل امین (۳۳/۳ میلی گرم) به ۴۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. سپس ۱/۴۸ گرم سورفاکتانت کاتیونی (CTMABr) به تدریج و همراه با هم زدن به محلول اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد تا محلول شفاف گردد. سپس ۴/۵۷ میلی گرم تترا اتیل اورتوسیلیکات (TEOS) منبع سیسیم به صورت قطره قطره به محلول اضافه شد. نسبت مولی نهایی در مخلوط واکنش به این صورت بود: $1.0 \text{ SiO}_2 : 1.66 \text{ EA} : 0.215 \text{ CTMABr} : 125 \text{ H}_2\text{O}$ جهت رسیدن به pH حدود ۸/۵ از هیدروکلریک اسید یک مولار استفاده شد. سوسپانسیون حاصل در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت هم زده شد تا تشکیل رسوب کامل گردد. سپس رسوب با سانتریفیوژ جدا و با آب گرم شستشو داده شد و در دمای ۴۵ °C به مدت ۱۲ ساعت خشک گردید. این محصول با نماد (MCM-41) نشان داده می شود. به منظور تعیین ویژگی های نانوذرات سنتز شده از اندازه نانو ذرات میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و همچنین آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) استفاده شد (۱۵).

و) بررسی میزان حذف کروم توسط سویه جدا شده باکتری:

محیط LB استریل حاوی غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (ppm) دی کرومات پتاسیم ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) تهیه گردید. برای هر غلظت دو فلاکس تهیه شد: یکی بعنوان کنترل و دیگری به منظور فرآیند حذف کروم. یک فلاسک حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط LB استریل فاقد کروم نیز بعنوان کنترل میزان رشد در نظر گرفته شد. به هر غلظت کروم، ۱ میلی لیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه و به مدت ۸ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دور ۱۵۰ rpm در دمای ۳۷ °C انکوبه شد و میزان رشد باکتری با اسپکترومتر اندازه گیری شد. همچنین باکتری های کشت داده شده در غلظت های مختلف کروم بعد از ۲۴ ساعت، با دور

جهت جداسازی سویه های مقاوم به کروم، از محیط کشت لوریا برتانی استفاده شد (Sigma Aldrich، آلمان). به این منظور، ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به فلاسک های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه و جهت همگن شدن به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۵۰ دور در دقیقه تکان داده شد. پس از ۱۰ دقیقه سکون، رفتهای متوالی 10^{-1} تا 10^{-2} از این نمونه ها به کمک سرم فیزیولوژیک استریل ساخته شد و از هر رقت، ۱ میلی لیتر به محیط کشت لوریا برتانی آگار (حاوی $300 \mu\text{g/ml}$ کروم) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ °C جهت ریخت شناسی کلنی ها کشت داده شد. کشت خطی در صورت رشد باکتری ها در محیط حاوی دی کرومات پتاسیم در پلیت جدید صورت گرفت و رنگ آمیزی گرم جهت بررسی مورفولوژی باکتری ها انجام شد (۱۳).

ج) شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی:

جهت شناسایی بیوشیمیایی از آزمون های کاتالاز، اکسیداز، متیل رد، وژرپر سکوتر، آزمون اکسیداسیون/احیای قند های گلوکز، لاکتوز، فروکتوز، لیزین دکربوکسیلاز، احیای نیتترات، حرکت، تجزیه نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، اوره آز و آزمون های مربوط به مصرف قند و تولید سولفید هیدروژن در محیط تریپل شوگر آیرون آگار صورت گرفت. به منظور شناسایی مولکولی باکتری، توالی یابی 16SrRNA صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده شامل 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 3'-GGTTACCTTGTACGACTT-5' : 1492R بود که توسط شرکت Bioneer کره سنتز شد. آنالیز بیوانفورماتیکی با نرم افزار Mega6 و بانک های اطلاعاتی NCBI و EzBioCloud انجام شد (۱۴).

د) تعیین غلظت مهارکنندگی باکتری:

پس از جداسازی سویه ی تخلیص شده مقاوم به کروم، حداقل غلظت مهار کنندگی رشد در غلظت های مختلف کروم VI با استفاده از ترازوی مدل Sartorius MSE224S-000DU با دقت: ۰/۰۰۰۱ گرم (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) بعد از کشت شبانه در ۳۷ °C در طول موج ۶۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون از باکتری ها با غلظت

آزمایش ارائه شده است و آنالیز آماری شده به کمک نرم افزار Mega6 و با تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) انجام شد. معنی دار بودن نتایج در سطح $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

الف) جداسازی و تعیین هویت سویه حذف کننده کروم: با کشت نمونه های مختلف در محیط حاوی کروم VI، تنها رشد یک سویه از باکتری بر روی این محیط کشت تایید شد. بررسی بیشتر فیزیولوژیکی و خصوصیات بیوشیمیایی، آزمایش های واکنش اکسیداز، کاتالاز، ال-لازین، تشکیل اسپور، حرکت، نیترات، سیترات، اوره از، تولید H_2S ، تولید اندول مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج همدیف سازی توالی مشخص گردید که سویه جدا شده به کمک نرم افزار Mega6 با احتمال ۹۹٪ از خانواده سودوموناس پلکوجلوسیسیدا (*Pseudomonas plecoglossicida*) می باشد (شکل ۱).

ب) حذف کروم توسط سویه جدا شده باکتری: اثر نسبی رشد باکتری در حضور فلز سنگین کروم در غلظت های مختلف (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) پس از ۸ ساعت نشان داد که رشد باکتری وابسته به غلظت می باشد و افزایش غلظت کروم باعث کاهش رشد باکتری گردید (شکل ۲). با این حال نتایج حاصل از جذب اتمی نشان داد که با افزایش غلظت کروم، باکتری ها قادر به حذف مقدار بیشتری از آن طی ۲۴ ساعت بودند (شکل ۳).

ج) تغییرات غلظت کروم در حضور نانوذرات سیلیسی مزوپور: نتایج حاصل از عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی

rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده، رسوب خارج و محلول رویی از نظر مقدار کروم باقی مانده در محیط با استفاده از اسپکترومتر جذب اتمی (Atomic Absorption Spectrometer) اندازه گیری شد (۱۵).
(ز) بررسی میزان حذف کروم توسط نانوذرات سیلیکا مزوپور (نانوجاذب):

برای ارزیابی توانایی نانوذرات در حذف کروم محیط های LB استریل حاوی غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (ppm) کروم شش ظرفیتی، مقدار ۰/۰۱ g از نانوذرات سیلیس مزوپور به هر فلاسک اضافه گردید. پس از تنظیم pH محلول به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۰rpm بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس محلول با سانتریفیوژ از جاذب جدا شد و مقدار کروم باقی مانده با استفاده از اسپکترومتر جذب اتمی اندازه گیری شد.

ح) بهینه سازی آماری حذف کروم به روش Response Surface Methodology:

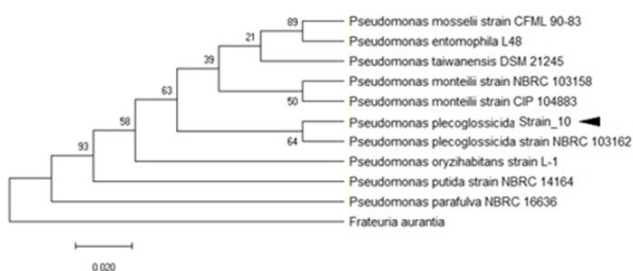
در طراحی مرکب مرکزی از سه متغیر مستقل شامل دما (C_1)، pH (C_2) و غلظت اولیه کروم (C_3) جهت محاسبه ی حذف کروم استفاده شد. با استفاده از سه فاکتور و پنج سطح کد شده ۲۰ آزمایش طراحی گردید. داده های حاصل از آزمایش در معادله ذیل با بررسی اثرات هر فاکتور به تنهایی و اثرات متقابل هر متغیر پیشگویی گردید (۱۶).

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i C_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} C_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \alpha_{ij} C_i C_j$$

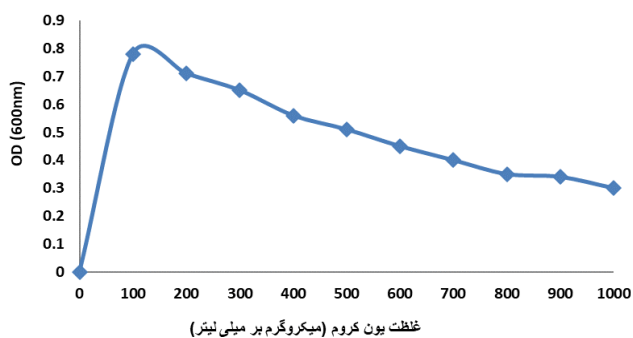
میزان حذف کروم در دماهای (۲۶، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۳ درجه سلیسیوس) و pH (۵/۵، ۶، ۷، ۸، ۸/۵) و غلظت اولیه کروم (۳۵۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین آنالیز رگرسیون چندگانه و ترسیم پلات های سطح پاسخ و انجام آنالیز واریانس از نرم افزار minitab استفاده شد (۱۶).

ط) آنالیز آماری:

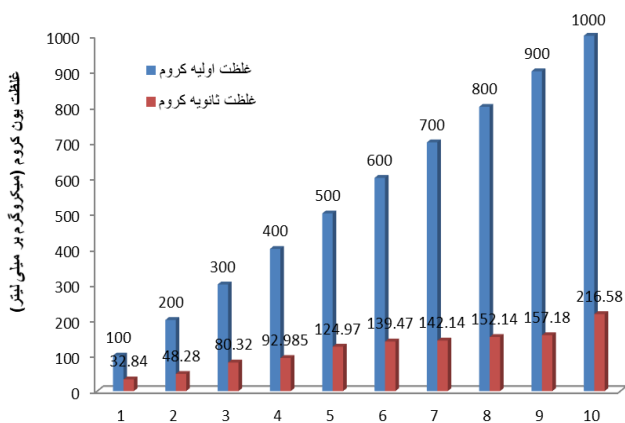
نتایج بصورت میانگین \pm انحراف معیار با حداقل طی سه تکرار



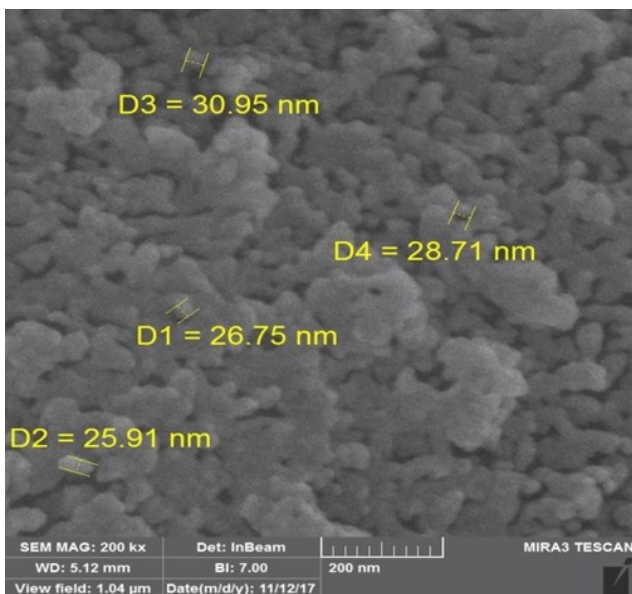
شکل ۱: درخت فیلوژنتیک توالی های ژن 16S rRNA سویه های جدا شده با استفاده از روش Neighbor joining و ضرب Boot Strap صد.



شکل ۲: رشد باکتری سودوموناس پلکوجلوسوسیدا در غلظت های مختلف کروم.



شکل ۳: میزان حذف کروم IV توسط سویه جدا شده سودوموناس پلکوجلوسوسیدا.

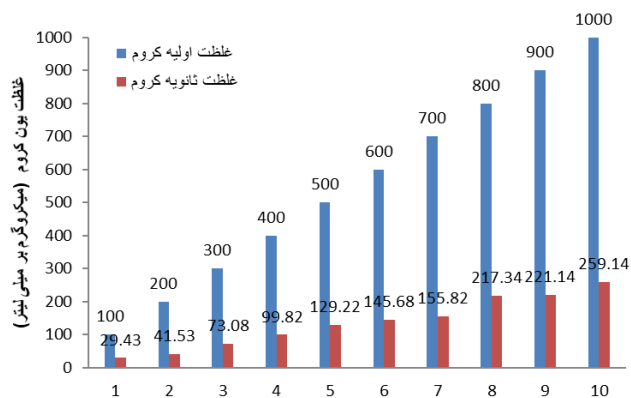
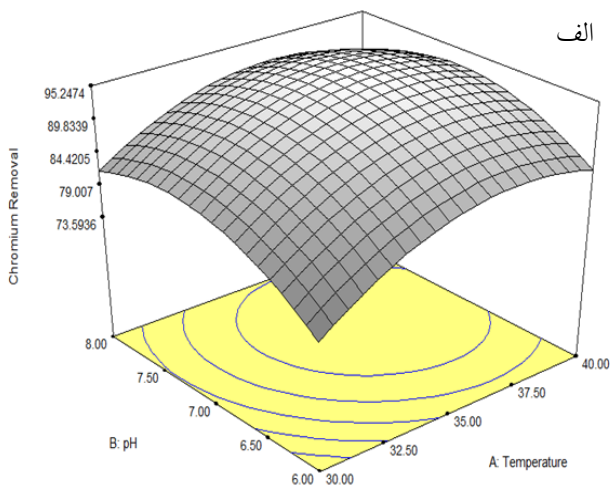


شکل ۴: تصویر حاصل از بررسی نانوذره سیلیسی مزوپور با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، مقیاس تصویر ۲۰۰ نانومتر می باشد.

(SEM) نشان داد که نانوذرات سیلیسی مزوپور دارای اندازه تقریبی بین ۲۵ تا ۳۱ نانومتر می باشند (شکل ۴). آنالیز نتایج با اسپکترومتر جذب اتمی نشان داد که اضافه کردن نانوجاذب سیلیسی مزوپور به مقدار ۱۰ میلی گرم به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت لوریبرتانی (LB) باعث جذب کروم گردید. منحنی تغییرات غلظت کروم در حضور نانوجاذب نشان داد که توان جذب کروم توسط نانو ذرات سیلیسی مزوپور تا غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (ppm) از کروم در محیط در pH ۷/۲ تا حدودی بیشتر از سویه جدا شده باکتری سودوموناس پلکوجلوسوسیدا بوده و میزان حذف کروم را تا ۷۵ درصد نشان میدهد. اما با افزایش غلظت کروم بیش از ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، توانایی حذف کروم توسط باکتری به میزان ۸۰ درصد بدست آمد. در حالی که نانو ذرات سیلیسی مزوپور ۷۲ درصد حذف را نشان داد (شکل ۵).
(د) طراحی آزمون و بهینه سازی فرایند به روش سطح پاسخ: بر اساس ۲۰ آزمون طراحی شده با استفاده از نرم افزار Minitab 16 به روش RSM سه فاکتور بهینه سازی در پنج سطح مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). معادله ی چند جمله ای ضریب رگرسیون به طور تجربی نشان میدهد که بین درصد حذف ماده کروم و سه متغیر دما، pH و غلظت اولیه کروم ارتباط معنا دار وجود دارد. آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد که دما، pH و غلظت اولیه کروم بصورت منفرد و همچنین دما، pH و غلظت اولیه بصورت مربع تاثیر معناداری در درصد حذف کروم دارد. حداکثر میزان حذف ماده کروم در دمای ۳۵ °C و pH ۷ و غلظت اولیه کروم ۷۰۰ ppm پس از بهینه سازی به میزان ۹۶/۳۹ درصد میزان حذف ماده کروم می باشد.

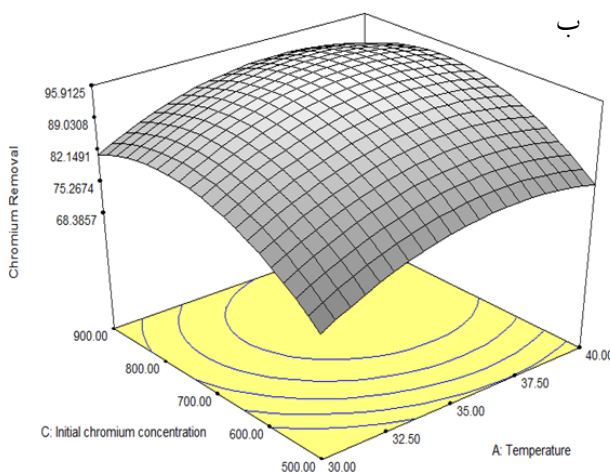
ه) ارزیابی حذف کروم در محیط کشت لوریبرتانی: پاسخ سطوح در نمودارهای سه بعدی مطابق شکل ۶- الف مشخص شد که اگر غلظت اولیه کروم ۷۰۰ ppm باشد، درصد حذف ماده کروم در طراحی سطح پاسخ با افزایش دما در مقابل افزایش pH ابتدا افزایش و پس از رسیدن به نقطه حداکثری کاهش می یابد و این افزایش و کاهش برای تمام گام های

دنیای میکروپها، سال سیزدهم شماره سوم پاییز ۱۳۹۹. حذف زیستی کروم توسط سودوموناس پلکونگوسا سبدا و نانوذرات سیلیسی مزوپور از خاک های آلوده به نفت. مهدی شهریاری نور و همکاران

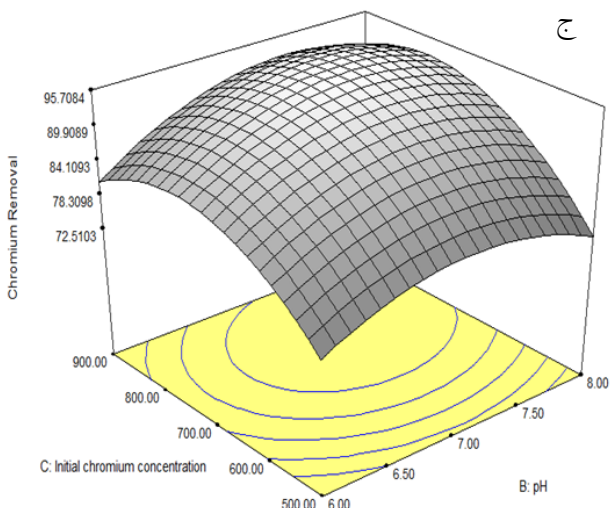


شکل ۵: میزان حذف کروم VI توسط نانو ذرات سیلیسی مزوپور.

جدول ۱: مقادیر تجربی ماده کروم حذف شده توسط باکتری با استفاده از روش RSM.



| آزمایه | دما | pH | غلظت اولیه کروم (%) | درصد حذف |
|--------|-----|-----|---------------------|----------|
| ۱ | ۳۵ | ۷ | ۷۰۰ | ۹۶/۳۹ |
| ۲ | ۳۰ | ۶ | ۵۰۰ | ۶۷/۵۹ |
| ۳ | ۳۰ | ۸ | ۵۰۰ | ۶۱/۴۹ |
| ۴ | ۴۳ | ۷ | ۷۰۰ | ۸۷/۵۳ |
| ۵ | ۴۰ | ۶ | ۵۰۰ | ۴۲/۶۹ |
| ۶ | ۳۵ | ۷ | ۷۰۰ | ۹۵/۱۶ |
| ۷ | ۴۰ | ۸ | ۹۰۰ | ۸۷/۸۲ |
| ۸ | ۳۵ | ۷ | ۱۰۰۰ | ۸۷/۸۲ |
| ۹ | ۳۵ | ۷ | ۷۰۰ | ۹۳/۸۶ |
| ۱۰ | ۴۰ | ۸ | ۵۰۰ | ۶۹/۷۴ |
| ۱۱ | ۴۰ | ۶ | ۹۰۰ | ۲۸/۷۷ |
| ۱۲ | ۳۰ | ۶ | ۹۰۰ | ۶۷/۳۴ |
| ۱۳ | ۲۶ | ۷ | ۷۰۰ | ۲۴/۷۱ |
| ۱۴ | ۳۵ | ۵ | ۷۰۰ | ۲۹/۷۴ |
| ۱۵ | ۳۰ | ۸ | ۹۰۰ | ۳/۷۹ |
| ۱۶ | ۳۵ | ۷ | ۷۰۰ | ۱۲/۹۴ |
| ۱۷ | ۳۵ | ۵/۸ | ۷۰۰ | ۸۵/۸۶ |
| ۱۸ | ۳۵ | ۷ | ۷۰۰ | ۸۹/۹۶ |
| ۱۹ | ۳۵ | ۷ | ۷۰۰ | ۹۴/۶۴ |
| ۲۰ | ۳۵ | ۷ | ۳۵۰ | ۶۲/۵۹ |



شکل ۶: الف) طراحی سطح پاسخ تاثیر متقابل میزان دما، pH در میزان حذف کروم، ب) طراحی سطح پاسخ تاثیر متقابل دما و غلظت اولیه کروم در میزان حذف کروم، ج) طراحی سطح پاسخ تاثیر متقابل pH و غلظت اولیه کروم در میزان حذف کروم.

محور X و Y بطور متناسب بود. مطابق شکل ۶-ب مشخص شد که اگر که pH ۷ باشد، درصد میزان حذف کروم در طراحی سطح پاسخ با افزایش دما در مقابل افزایش غلظت اولیه کروم ابتدا افزایش و پس از رسیدن به نقطه حداکثری با افزایش میزان اولیه غلظت کروم کاهش می یابد. مطابق شکل ۶-ج مشخص شد که اگر دما ۳۵ °C باشد، میزان حذف ماده کروم در طراحی سطح پاسخ با افزایش pH در مقابل افزایش میزان اولیه کروم، افزایش و پس از رسیدن به نقطه حداکثری کاهش می یابد و این افزایش و کاهش برای تمام گام های محور X و Y بطور متناسب می باشد (۱۶).

بحث

عبارتی به انطباق پذیری باکتری مرتبط باشد. در مطالعه پورنیم (Poornima) و همکاران بر روی خاک های جنگلی دو سویه مقاوم به کروم از خانواده سودوموناس پوتیدا (*Pseudomonas putida*) و سودوموناس پلکوجلوسوس سیلدا (*Pseudomonas plecoglossicida*) مشخص شد که سویه SP8 متعلق به خانواده سودوموناس پوتیدا بیشترین احیاء کنندگی کروم را در ۱۲ ساعت در pH ۷ و در ۲۴ ساعت در pH ۹ نشان داد. در این مطالعه رشد سویه SP8 در حضور کروم بیشتر از سویه SP2 (هر دو به خانواده سودوموناس پلکوجلوسوس سیلدا) مشاهده شد. همچنین میزان احیاء کنندگی کروم توسط SP8 بیشتر از SP2 بود؛ بطوریکه ۹۰٪ کروم VI در pH ۷ توسط SP8 حذف گردید (۲۱). در مطالعه بالامورگان (*Balamurugan*) و همکاران دو سویه متعلق به سودوموناس پوتیدا و باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) از چندین نقطه از آب آلوده به ضایعات دباغی چرم در رود Paral هند بدست آمد. این دو سویه توان حذف حدود ۹۵ درصدی کروم VI را در pH ۶/۵ و pH ۷ به ترتیب داشتند (۲۲). سویه جدا شده سودوموناس پلکوجلوسوس سیلدا در مطالعه حاضر، از هر دو سویه جدا شده در مطالعه پورنیم (Poornima) و همکاران بهتر عمل کرده و در pH ۷ قدرت احیاء کنندگی ۳۹/۹۶ درصدی کروم VI را داشت؛ همچنین نسبت به دو سویه سودوموناس پوتیدا و باسیلوس سوبتیلیس اشاره شده در مطالعه بالامورگان (*Balamurugan*) و همکاران، در شرایط مشابه از نظر زمان و pH به میزان کمی عملکرد بهتری را نشان داد. در مطالعه چوی (Choi) و همکاران در حذف کروم VI با نانوذرات PEI-سیلیکا مشخص شد این نانوذرات با اندازه تقریبی ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر توان حذف غیر خطی و وابسته به pH را داشتند. بطوریکه در گستره های pH ۲، ۳، ۴ بیشترین توان حذف کروم به ترتیب ۱۲۰/۷، ۱۳۸/۲ و ۱۸۳/۷ میلی گرم در لیتر را نشان دادند و بیشترین حذف در pH ۴ گزارش شد (۲۳ و ۲۴). در مطالعه ای لیو (Liu) و همکاران نشان دادند که بیشترین توان کامپوزیت تشکیل شده از اکسید آهن، منگنز، گرافن و پلی پیرول در حذف کروم VI برای غلظت

زیست پالایی میکروبی به فن آوری استفاده از میکروارگانیسم ها در حذف، تغییر و رفع اثرات سمی انواع ضایعات فیزیکی و شیمیایی از محیط گفتم می شود که میکروارگانیسم ها از طریق مسیرهای آنزیمی خود به عنوان بیوکاتالیست عمل می کنند (۱۸). در این مطالعه از بین سویه های جدا شده از خاک اطراف کارخانجات شهرک صنعتی رشت و ساحل کیشهر، یک سویه باکتری مقاوم به کروم VI از خانواده سودوموناس پلکوجلوسوس سیلدا جداسازی شد که با بررسی اثر آن بر غلظت های مختلف کروم در محیط کشت لوریا برتانی مشخص شد که این سویه جدا شده توان حذف درصد بالایی از کروم از محیط را در مقایسه با نانوذرات سیلیسی مزوپور داشت. در مطالعه راغورامان (*Raghuraman*) و همکاران بر روی سویه های سودوموناس جدا شده از ضایعات دباغی چرم مشخص شد سودوموناس آئروژینوسا و سودوموناس فلئوئورسنس توانستند غلظت اولیه کروم ppm ۱۰۰۰ را بعد از ۴۰ روز به ترتیب به غلظت ۲۰/۲۰۵، ۸۰/۲۴۳ و ۲۴۱ (ppm) برسانند (۱۹). در حالی که در مطالعه حاضر سویه جدا شده توانست در مدت زمان کم و تنها بعد از ۲۴ ساعت با حذف کروم، غلظت آن را از ۱۰۰۰ به ۵۸/۲۱۶ (ppm) برساند. در مطالعه کائور (Kaur) و همکاران بر روی سودوموناس پوتیدا (MTCC 102) مشخص شد که این سویه قادر به حذف ۹۰ درصدی ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ کروم بعد از ۹۶ ساعت بود (۲۰). در حالی که سویه جدا شده در این مطالعه طی ۲۴ ساعت توانست درصد بالایی از کروم را در محیط حذف نماید. اثر نسبی رشد باکتری در حضور فلز سنگین کروم در غلظت های مختلف (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) نشان دهنده وابستگی رشد باکتری به غلظت بوده و با افزایش غلظت کروم باعث کاهش رشد باکتری مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از جذب اتمی نشان داد که با افزایش غلظت کروم، باکتری ها قادر به حذف مقدار بیشتری از کروم طی ۲۴ ساعت بوده و این امر ممکن است در نتیجه افزایش بیان ژن های مقاومت به فلزات سنگین در شرایط سخت تر و به

طریق مصرف خوراکی جانداران آلوده از جمله آلوده به فلزات سنگین می باشد، یکی از مهم ترین مقوله ها در حذف این نوع آلودگی ها استفاده از ابزاری قدرتمند جهت پاکسازی بهینه محیط و طبیعت می باشد. لذا در این مطالعه مشخص شد که سویه جدا شده سودوموناس پلکوجلوسا سیدا و هم نانو جاذب سیلیسی مزوپور توان حذف و احیای بالا و مشابهی برای فلز سنگین و آسیب رسان کروم VI داشته و استفاده از آن ها برای حذف زیستی نقاطی با آلودگی به کروم پیشنهاد می گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروب شناسی می باشد. نویسندگان این مقاله از معاون محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت کمال امتنان رادارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

۳۷۴/۵۳ میلی گرم در گرم در pH ۲ بود (۲۳). در مطالعه حاضر، نانوجاذب سیلیسی مزوپور با اندازه تقریبی ۲۵ تا ۳۱ نانومتر، در دمای بهینه ۳۵ °C و pH ۷ قادر به حذف غلظت ۷۰۰ میلی گرم بر لیتر کروم VI به میزان ۷۲٪ بود که عملکرد بهتری (حدود ۱۰ درصد بیشتر) نسبت به دو مطالعه قبلی نشان داد. از مزایای این نانوذره کوچکی ابعاد، میزان جذب بالای کروم و فعالیت در pH طبیعی (۷/۲) بود. همچنین این نانوذرات توان مشابهی با سویه جدا شده باکتری در این مطالعه برای جذب کروم VI نشان داد. و به نظر می رسد با حذف بیولوژیکی این فلز سنگین بتواند برابری کند (۲۴ و ۲۵) جدایه سودوموناس پلکوجلوسا سیدا و نانوذرات می توانند برای حذف کروم از خاک ها و آب های آلوده استفاده شوند. همچنین پیشنهاد می شود جهت حذف کروم به طور هم زمان از باکتری حذف کننده کروم و نانوذرات سیلیسی مزوپور به منظور افزایش کارایی حذف کروم استفاده شود. زیرا نانو حاذب ها می توانند سبب انباشت کروم در خود شده و باکتری حذف کننده کروم به تدریج اقدام به حذف کروم انباشته در نانو جاذب ها می کند.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه آلودگی های زیست محیطی به غیر از آسیب به طبیعت و موجودات زنده، قادر به آسیب مستقیم به انسان از

References

1. Proctor DM, Suh M, Mittal L, Hirsch S, Valdes Salgado R, Bartlett C, Landingham CV, Rohr A, Crump K. Inhalation cancer risk assessment of hexavalent chromium based on updated mortality for Painesville chromate production workers. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2016; 26(2):224-231.
2. Farokhnes F, Mahvi AH, Jamali Y. Carcinogenic and Non-Carcinogenic Risk Assessment of Chromium in Drinking Water Sources: Birjand, Iran. *Research Journal of Environmental Toxicology*. 2016; 10(3):166-171.
3. Wang X, Mandal AK, Saito H, Pulliam JF, Lee EY, Ke ZJ, Lu J, Ding S, Li L, Shelton BJ, Tucker T, Evers BM, Zhang Z, Shi X. Arsenic and chromium in drinking water promote tumorigenesis in a mouse colitis-associated colorectal cancer model and the potential

- mechanism is ROS-mediated Wnt/beta-catenin signaling pathway. Toxicology and applied pharmacology. 2012; 262(1):11-21.
- Mitra S, Sarkar A, Sen S. Removal of chromium from industrial effluents using nanotechnology: a review. Nanotechnology for Environmental Engineering. 2017; 2(11): 1-14.
 - Taieban SMR, Torabi E, Najafpoor AA, Alidadi H, Zezoli MA. Survey of Biosorption Chromium and Cadmium from industrial effluent, by using agricultural waste material. Navid No. 2012; 16(58): 1-14.
 - Joutey NT, Sayel H, Bahafid W, El Ghachtouli N. Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. Reviews of environmental contamination and toxicology. 2015; 233: 45-69.
 - Elahi A, Rehman A. Multiple metal resistance and Cr 6+ reduction by bacterium, *Staphylococcus sciuri* A-HS1, isolated from untreated tannery effluent. Journal of King Saud University - Science. 2018; 31(4): 1005-1013.
 - Zhao R, Wang B, Cai QT, Li XX, Liu M, Hu D, Beiguo D, Wang J, Fan C. Bioremediation of Hexavalent Chromium Pollution by *Sporosarcina saromensis* M52 Isolated from Offshore Sediments in Xiamen, China. Biomedical and environmental sciences. 2016; 29(2):127-136.
 - Tamindzija D, Chromikova Z, Spaic A, Barak I, Bernier-Latmani R, Radnovic D. Chromate tolerance and removal of bacterial strains isolated from uncontaminated and chromium-polluted environments. World journal of microbiology and biotechnology. 2019; 35(4):55-72.
 - Kholghi N, Amani H, Malek Mahmoodi S, Alireza Amiri A. The removal of heavy metals (Ni, Cr, Cd) from soil contamination with crude oil using rhamanolipid biosurfactant. Journal of Microbial World. 2019; 12(1): 62-72.
 - Meybodi SM, Khorasani H. Biosorption of chromium by *Pseudomonas* sp. isolated from oil contaminated soils of Khuzestan. Biological Journal of Microorganism. 2015; 4(14): 101-110
 - Raja CE, Anbazhagan A, Sadasivam selvam G. Isolation and characterization of a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. World Journal Microbiology and Biotechnology. 2006; 2(2): 577- 585.
 - Meybodi SM, Khorasani H. Biosorption of chromium by *Pseudomonas* sp. isolated from oil contaminated soils of Khuzestan. Biological Journal of Microorganism. 2014; 4(14): 101-110.
 - Wa Gao, Dongyang Li, Hong You. Functional Characterization and genomic analysis of the Chlorantraniliprole-Degrading Strain *Pseudomonas* sp. GW13. 2019; 6(4): 106-118.
 - Ariapad A, Zanjanchi MA, Arvand M. Efficient removal of anionic surfactant using partial template-containing MCM-41. Desalination. 2012; 284: 142-149.
 - Venil CK, Mohan V, Lakshmanaperumalsamy P, Yerima MB. Optimization of Chromium Removal by the Indigenous Bacterium *Bacillus* spp. REP02 Using the Response Surface Methodology. International Scholarly Research Network. 2011.
 - Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 2018; 35:

1547-1549.

18. Abatenh E GB, Tsegaye Z, Wassie M. Application of microorganisms in bioremediation. *Journal of Environmental Microbiology*. 2017; 1(1):2-9.
19. Raghuraman T, Jerome Geoffrey C, Suriyanarayanan S, Thatheyus J. Chromium Removal by Using Chosen Pseudomonads. *American Journal of Environmental Protection*. 2013; 1(1): 14-6.
20. Kaur H, Kumar A. Bioremediation of hexavalent chromium in wastewater effluent by *Pseudomonas putida* (MTCC 102). *International Journal of Research In Earth & Environmental Sciences* 2014; 1(4):18-24.
21. Poornima K, karthik L, Swadhini SP, Mythili S, Sathiavelu A. Degradation of Chromium by Using a Novel Strains of *Pseudomonas* Species. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 2010; 2(4): 95-99.
22. Balamurugan D, Udayasooriyan C, Kamaladevi B. Chromium (VI) reduction by *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soils. *International journal of environmental sciences*. 2014; 5(3):522-529.
23. Choi K, Lee S, Park JO, Park J-A, Cho S-H, Lee SY, et al. Chromium removal from aqueous solution by a PEI-silica nanocomposite. *Scientific Reports*. 2018; 8(1):1438-1448.
24. Liu W, Yang L, Xu S, Chen Y, Liu B, Li Z, Jiang C. Efficient removal of hexavalent chromium from water by an adsorption reduction mechanism with sandwiched nanocomposites. *RSC Advances*. 2018; 8:15087-15093.
25. Magner E. Immobilization of enzymes on mesoporous silicate materials. *Chemical society review* 2013; 42(15): 6213-6222.