شناسایی آلودگی آرسنیک از منطقه معدن زیرزمینی، سیرجان، و حذف آن‌ها با روش جذب بیولوژیکی

زهرا رنجبر[1]، سید منصور میبدی[2*]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران
۲. دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۵)

چکیده

سابقه و هدف: فلزات سنگین از طریق فعالیت‌های صنعتی به محیط زیست وارد می‌گردند. جهت حذف این عناصر سمی روش بیولوژیک نسبت به بقیه روش‌ها از راندمان بالاتر و هزینه پایین تری برخوردار می‌باشد. هدف از این پژوهش جداسازی سویه‌هایی با مقاومت بالا نسبت به ارسنیک از ۳ منطقه آب‌های زیرزمینی سیرجان است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌ها بر روی محیطهای LB آگار حاوی 5ppm ارسنیک کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، ۲۵ سویه مقاوم جدا شدند. DNA با روش فنل کلروفرم استخراج شد. در روش مولکولی PCR از پرایمرهای قسمت SrDNA ۱۶استفاده گردید. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ی منتخب با روش آنتی بیوگرام و میزان جذب زیستی آن با روش اسپکتروسکوپی جذب اتمی انجام شد. بهترین سویه با 16SrDNA PCR sequencing شناسایی شد.

نتایج: از ۱۰۰٪ *سویه‌های* جداشده در این پژوهش ۲۰٪ شامل باسیل‌های گرم مثبت، ۴۰٪ باسیل‌های گرم منفی، ۲۸٪ کوکسی‌های گرم مثبت و ۱۲٪ مارپیچی گرم منفی بودند. نتایج آنالیز ژنتیکی برای نمونه ی باسیلی نشان داد که سویه ی مربوطه ۱۰۰٪ همسانی با باسیلوس سرئوس سویه ی LS24 دارد.

بحث: سویه ی برتر در این مطالعه با حداقل غلظت مهارکنندگی ۱۰۰۰ppm در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، اسیدیته ۷ و سرعت تکان ۱۵۰، ۶۲/۸٪ ارسنیک را از محیط حذف کرد. نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی سویه ی LS24 باسیلوس سرئوس را نشان داد.

کلیدواژگان

ارسنیک، آب‌های زیرزمینی، جذب زیستی، میکروارگانیسم.

* نویسنده مسئول، رایانامه: s.m.meybodi@gmail.com

مقدمه

معدن گودال روباز بزرگ مثل معدن سنگ آهن گل گهر که به نظر می‌رسد فعالیت‌های معدنی می‌توانند فلزات سنگین آلوده را به دلیل کنترل ناکارامد نفوذ آب و آزادسازی باطله‌های مرطوب تولید کنند. فلزات سنگین به عنوان سمی ترین گروه از آلاینده‌های سمی شناخته شده اند که از طریق دفع ضایعات به گیرنده‌های آب و زمین وارد زنجیره غذایی می‌شوند. آلودگی محیط زیست بافلزات سنگین سمی و خطرناک نگرانی اصلی در جوامع مدرن است. بر اساس شاخص ارزیابی فلزات سنگین تقریبا همه نمونه‌های آب گرفته شده از معدن (۹۷٪) آلوده به فلزات سنگین هستند. چندین روش اصلاحی حذف یون‌های فلزی محلول‌های آبی در دسترس است که از روش فیزیکی و شیمیایی تا روش زیست پالایی در حال ظهور است. شایع ترین فرایندهای فیزیکی و شیمیایی شامل رسوب شیمیایی، اسمز معکوس، اکسایش/کاهش، درمان الکتروشیمیایی و تصفیه می‌باشد(۳-۱). روش‌های اصلاح زیستی شامل تجمع،جذب وگیاه پالایی است. از این رو فرایند جذب سطحی به علت قابلیت اجرا با هزینه و شرایط خوب و استفاده از مواد با توان بیولوژیک برای حذف فلزات سنگین از محلول‌های آبی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه بوده علاوه بر آن عدم تولید ترکیبات ثانویه احتمالاً سمی نیز در فرایند جذب سطحی دارای اهمیت قابل توجهی می‌باشد(۶-۴). حضور فلزات سنگین و ترکیبات آن در غلظت‌های بیش از حد مجاز عوارض متعددی هم برای انسان و هم برای دیگر جانداران ایجاد کرده و آلودگی زیست محیطی را به همراه دارد با توجه به موارد ذکر شده حذف این ترکیبات مطابق استانداردها از اهمیت بسیاری برخوردار است. بیشترین عواقب ناشی از آن عبارتند از: سرطان، اثرات آن بر سیستم عصبی مرکزی و محیطی، بیماری‌های پوستی، اختلالات خونی، بیماریهای قلبی و عروقی، آسیب کلیه و تجمع انبوه در بافت، بیشتر عوارض فلزات برسلامت انسان هنوز شناخته نشده است(۱۰-۷). یکی از روش‌هایی که برای حذف زیستی این ترکیبات در محیط زیست مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش تصفیه بیولوژیکی است. این روش به علت توانایی اثبات شده گروهی از میکروارگانیسم‌ها در تجزیه فلزات سنگین و ترکیبات آن، در بسیاری از موارد نسبت به سایر روش‌های تصفیه وحذف این ترکیبات برتر است(۱۳-۱۱). جذب زیستی روشی ساده و کم هزینه است که طی واکنش‌های تعادلی و از طریق باند کردن و جذب فلزات روی گروه‌های عاملی سطح سلول، فلزات را از محیط استخراج می‌کنند. جذب یکی از موثرترین فرایندها برای تیمار فاضلاب پیشرفته است. هر چند تکنولوژی‌های مرسوم فیزیکوشیمیایی مثل ته نشینی، فیلتراسیون، اسمز معکوس، اکسیداسیون احیاء و جداسازی توسط غشا، برای برداشت آلودگی‌های عمده فلزی از پساب‌های صنعتی مناسب بوده، اما به دلیل عدم کاهش غلظت‌های فلزات سنگین، به حد استانداردهای قانونی مورد قبول، هزینه زیاد تشکیل مواد حد واسط سمی، عدم استفاده دائمی و طولانی مدت، مشکلات در پساب‌های جامد تولید شده وایجاد اتصالات فلزی غیر اختصاصی نامناسب می‌باشد. تقریباً تمام فعالیت‌های معدن روی سیستم‌های آب منطقه ای طبیعی اثر می‌گذارد واثرات آن بعداز استخراج ازمعدن آشکارمی شود. این آب‌ها با مواد معدنی حاوی فلزات سنگین در تماس هستند و ممکن است که در آن‌ها حل شوند. کیفیت آب‌های زیر زمینی در این منطقه خیلی پایین است و آب‌های زیر زمینی برای تأمین آب مصرفی مناسب نیستند. اثرات مخربی روی محیط زیست و سلامتی انسان برجای می‌گذارند آسیب‌های جبران ناپذیری بر سیستم‌های حیاتی بدن وارد می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی آلودگی

فلزات سنگین آب‌های زیر زمینی منطقه ی معدنی سیرجان و ارزیابی حذف آن‌ها به روش جذب زیستی است(۱۴،۱۵).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این پژوهش نمونه‌های آب‌های زیرزمینی ناحیه ی معدنی سیرجان تحت شرایط سترون در فانل‌های استریل جمع آوری و در جعبه ی یخ ظرف مدت حداکثر ۲ ساعت به آزمایشگاه جهت بررسی سنجش غلظت فلزات سنگین (مس، منگنز و ارسنیک)منتقل شد. روش نمونه برداری، نگهداری نمونه‌ها و انجام آزمایشات طبق توصیه‌های کتاب روش‌های استاندارد آزمایشات آب و فاضلاب ویرایش ۲۲، سال ۲۰۱۲ صورت گرفت(۱۶).

آنالیز آب‌های مورد بررسی

آب‌های جمع آوری شده به طریقه‌ی اسپکتروسکوپی جذب اتمی (با دستگاه اسپکتروسکوپی جذب اتمی مدل 20AA شرکت واریان) برای بررسی وجود آلودگی‌های فلزی در آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد سیرجان آنالیز شد. پارامترهای دستگاهی شامل طول موج ۲۳۷/۸ نانومتر برای آرسنیک، پهنای دریچه ورودی نور ۰/۵ نانومتر و محدوده اندازه گیری بین ۰-۱۰ میکروگرم در لیتر با تعداد تکرارپذیری ۳ بار برای هر نمونه به طور دستی بر روی دستگاه طیف سنجی جذب اتمی تنظیم شدند. با انتخاب این پارامترها، دستگاه برای اندازه‌گیری جذب اتمی به روش نرمال استاندارد شد(۱۷).

جداسازی، تخلیص و غربالگری سویه‌ها

برای جداسازی سویه‌های مناسب موجود در نمونه مورد نظر، از محیط کشت میکروبیولوژیک LB آگار استفاده شد. پلیت‌هایی که میزان کافی و مناسبی پرگنه با اشکال ماکروسکپی مختلف داشتند انتخاب شدند. همچنین از سویه‌های جدا شده رنگ آمیزی گرم به عمل آمد تا شکل میکروسکوپی و واکنش گرم آن‌ها تعیین شود(۱۸).

محیط‌های کشت محتوی فلز با استفاده از ارسنیک اکساید تهیه شد. برای تهیه محیط‌های کشت میکروبی حاوی ارسنیک با علم به جرم ملکولی ارسنیک اکساید جرم ارسنیک لازم محاسبه می‌شود. برای تولید محلول ppm ۱۰۰۰ ارسنیک، با توجه به در نظر گرفتن جرم ملکولی ارسنیک و جرم ملکولی ارسنیک اکساید، لازم است به میزان ۲/۶۴ گرم از ماده یاد شده برداشت شود. این مقدار از ماده در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و به عنوان ذخیره تا پایان کار استفاده شد. سپس با استفاده از فرمول C1V1= C2V2 مقدار حجم لازم قابل برداشت از محلول ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر ارسنیک، جهت ساختن حجم مشخصی از محلول 5ppm فلز تعیین شد که برای ساخت محیط کشت LB آگار استفاده گردید. بعد از کشت نمونه‌ها پلیت‌های یاد شده در دمای ۳۰ سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و سویه‌های جداشده با رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیائی شناسائی اولیه شدند(۱۶).

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری برای آرسنیک

از نمونه‌های خالص در محیط لوریا برتانی آگار حاوی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر ارسنیک به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری، برای غربالگری سویه‌های مقاوم به ارسنیک استفاده و پس از کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد(۱۹).

شناسایی بیوشیمیایی

از آزمون‌هایی که برای بررسی سویه مقاوم به فلز استفاده شد آزمایش کاتالاز، اکسیداز، تریپل شوگر ایرون اگار (TSI)، کشت در محیط MR-VP، تجزیه نشاسته، آزمون OF، کشت در محیط SIM، احیای نیترات، ذوب ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، وژزپرسکوئر، حرکت، اندول زایی و متیل رد قابل ذکر است(۲۰).

تعیین بهترین شرایط رشد باکتری در حضور آرسنیک

تعیین بهترین شرایط رشد باکتری با عواملی مانند دما و اسیدیته و سرعت تکان بررسی شد. در این مرحله محیط کشت LB براث حاوی فلز آرسنیک ساخته و بعد از افزودن سوسپانسیون استاندارد باکتری(به طوری که نهایتاً برابر با کدورت نیم مک فارلند شود) ۲۴ ساعت در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس،pHهای ۵، ۶ و ۷ در گرم خانه همزن دار در ۱۰۰، ۱۵۰و۲۰۰ دور بر دقیقه نگهداری شد. حجم نهایی محیط ۵۰ میلی لیتر در نظر گرفته شد. بالاترین جذب در دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۶۰۰ نانومتر بهترین شرایط رشد را مشخص می‌کند(۱۶).

آزمون حذف زیستی فلز ارسنیک

در این مرحله محیط کشت LB براث حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر فلز ارسنیک ساخته، اتوکلاو و بعد از افزودن سوسپانسیون استاندارد باکتری، در دما و pH و سرعت تکان بهینه همزده و نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها سانتریفیوژ و محلول روئی برای آنالیز اسپکتروسکوپی جذب اتمی استفاده شد. آزمون‌ها همگی با سه بار تکرار انجام شد(۱۶).

رسوب‌گیری و استخراج DNA

استخراج ماده ژنتیکی با روش فنل کلروفرم انجام شد. ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی در میکروتیوپ ۱/۵ میکرولیتری به مدت ۸ دقیقه در ۳۵۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی را تخلیه کرده و به رسوب باقی مانده حدود ۲۰۰ میکرولیتر EDTA اضافه گردید و پس از ۳ دقیقه، ۱۰میکرولیتر لیزوزیم اضافه شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. به محلول فوق ۷۵ میکرولیتر SDS10 افزوده و با سمپلر به آرامی مخلوط و به آن ۱۰ مایکرولیتر پروتئاز K افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در۵۲ درجه سلسیوس در بن ماری نگهداری شد. بعد از این حدود ۲۵۰ میکرولیتر فنل اشباع شده به نمونه اضافه گردید و بعد ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. نمونه تشکیل دو فاز را داد به آرامی با سمپلر فاز رویی را کشیده و به تیوپ جدید انتقال داده شد و فاز زیری آن را به همراه تیوپ دور انداخته شد. هم حجم فاز رویی مخلوط فنل کلروفرم اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریوفیوژ شد. محلول رویی را با سمپلر کشیده و به تیوپ جدید منتقل گردید. و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس نمونه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. میکروتیوپ را تخلیه کرده ۴۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد به آن اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد سپس تیوپ را تخلیه کرده کاملا تکان داده و می‌گذاریم تاخشک شود. پس از خشک شدن ۳۰ میکرولیتر آب مقطر به نمونه اضافه گردید به این ترتیب ماده ژنتیکی استخراج شد.

PCR

جهت شناسایی حضور آرسنیک از منطقه معدن زیرزمینی سیرجان از روش PCR استفاده شد. دراین روش با استفاده از کیت Master mix از شرکت

سیناژن تهیه و PCR انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر گردیده است. جهت انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس، ۲ میکرولیتر از DNA باکتری، ۱ماکرولیتر از پرایمرها (۱۰۰ pmol) و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد و همچنین در جدول ۲ واکنش PCR طبق برنامه مربوطه انجام گردید.

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگر مورد استفاده در تشخیص حضور آرسنیک

ژن هدف	توالی نوکلوتیدی	اندازه
16S rRNA	F: 5/- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3/ R: 5/- GGTTACCTTGTTACGACTT-3/	1542bp

جدول ۲- برنامه درجه حرارت و زمان جهت PCR

نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
دناتوراسیون اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون ثانویه	۹۴°C	۳۰ دقیقه	۳۵
اتصال پرایمرها	۵۷/۵ °C	۱/۱۵ دقیقه	
گسترش اولیه	۷۲ °C	۱ دقیقه	
گسترش نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه	۱

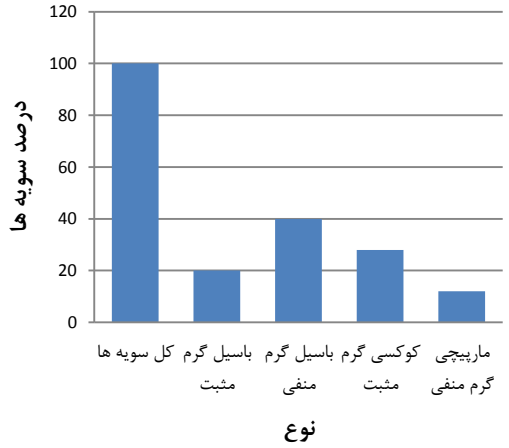
در نهایت نتایج بدست آمده بااستفاده از نرم افزار آماری ANOVA، GLM و t مستقل توسط نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

نمونه‌های آب از نظر آلودگی به سه فلز مس، منگنز و ارسنیک بررسی شد که بر طبق نتایج به مقدار مجاز در نمونه‌های آب وجود داشتند اما به دلیل وجود معضل ارسنیک در آب سیرجان، این فلز بررسی شد.

در مجموع از کشت نمونه‌های مربوط آب‌های زیر زمینی مربوط به ۳ منطقه بلورد، پاریز و معدن گل گهر سیرجان، در محیط کشت LB آگار حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر فلز ارسنیک، ۲۵ سویه ی میکروبی گرم منفی و گرم مثبت بر اساس صفات ریخت شناسی میکروسکوپی که از نظر شکل پرگنه متفاوت بودند جدا و تخلیص شد.

از ۱۰۰٪ سویه‌های جداشده در این پژوهش ۲۰٪ شامل باسیل‌های گرم مثبت، ۴۰٪ باسیل‌های گرم منفی، ۲۸٪ کوکسی‌های گرم مثبت و ۱۲٪ مارپیچی گرم منفی بودند (شکل ۱).



شکل ۱- درصد کلی سویه‌های جداشده

برای غربال سویه‌های مقاوم به آرسنات، آزمون تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد برای فلز ارسنیک انجام شد که نتایج آن در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

جدول ۳- حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد سویه‌های جداشده برای غربالگری مقاوم ترین سویه

میزان فلز(میلی گرم بر لیتر) / نام سویه‌ها	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰
P1, P3, P8, B2, G3, G6, G8, G11, G12	رشد	رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
P2, P7, B1, B3, B4, B5, G2, G4, G5, G10	رشد	رشد	رشد	عدم رشد	عدم رشد
P4, P5, P6, G7, G9	رشد	رشد	رشد	رشد	عدم رشد
G1	رشد	رشد	رشد	رشد	رشد

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

از آزمون‌هایی که برای بررسی سویه مقاوم به فلز استفاده شد آزمایش کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات، ذوب ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، وژزپرسکوئر، حرکت، اندول زایی و متیل رد قابل ذکر است. باکتری مربوطه اکسیداز منفی بود و در محیط TSI حالت A/A به وجود آورد که نشان از متابولیسم تخمیری آن دارد. آزمون‌های متیل رد و VP در این باکتری به ترتیب منفی و مثبت شد. واکنش احیاء نیترات در این باکتری مثبت بود. در جدول ۴-۳ نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی بکارگرفته شده برای سویه ی منتخب مشاهده می‌شود. در جدول ۴ برخی از آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط به تشخیص سویه منتخب مشاهده می‌شود.

جدول ٤- نتایج برخی از تست‌های بیوشیمیائی سویه‌های جدا شده

سویه	کاتالاز	اکسیداز	TSI	VP	MR	اندول	حرکت	نشاسته	ژلاتین	احیاء نیترات	واکنش گرم
سویه ی منتخب	+	-	A/A	+	-	-	+	+	+	+	+

برای تعیین بهترین شرایط رشد باکتری در حضور فلز ارسنیک، سویه مقاوم به فلز انتخاب و آزمون‌های متعددی با تغییر عوامل محیطی در سه سطح و در سه تکرار انجام شد. برای بررسی بهترین شرایط دمایی رشد حداکثری باکتری منتخب در حضور ارسنیک، یک آزمون دانکن انجام گرفت و نشان داد که دما در سطح سه یعنی ۴۰ درجه ی سلسیوس بیشترین اثر را در رشد باکتری منتخب داشته است.

جدول ۵- آزمون دانکن برای بررسی بهترین دمای رشد باکتری در حضور ارسنیک

دما(°C)	تعداد	زیر گروه		
		۱	۲	۳
۳۰	۹	۱/۳۹۲۷[c]		
۳۷	۹		۱/۵۸۷۲[b]	
۴۰	۹			۱/۹۲۳۴[a]

برای بررسی بهترین شرایط اسیدیته‌ی رشد حداکثری باکتری منتخب در حضور ارسنیک، یک آزمون دانکن انجام گرفت و نشان داد که اسیدیته در سطح دو یعنی معادل با ۷ بیشترین اثر را در رشد باکتری منتخب داشته است (جدول ۶).

جدول ۶- آزمون دانکن برای بررسی بهترین دمای رشد باکتری در حضور ارسنیک

اسیدیته	تعداد	زیر گروه		
		۱	۲	۳
۸	۹	۱/۲۴۲۳[c]		
۶	۹		۱/۳۹۱۶[b]	
۷	۹			۲/۲۶۹۴[a]

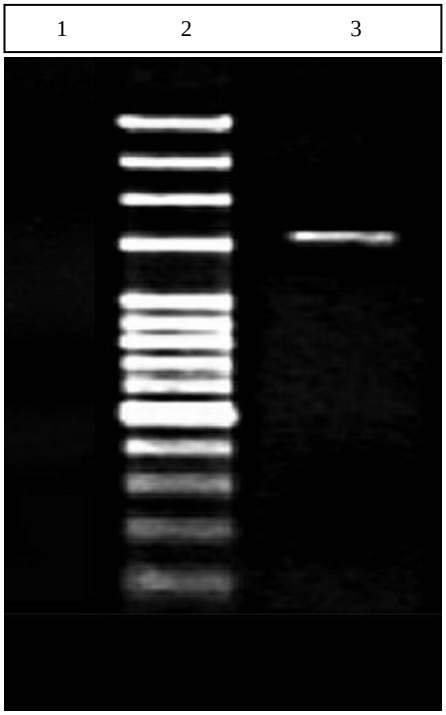
نتایج مربوط به درصد حذف فلز ارسنیک توسط سویه ی مورد آزمایش در مقابل شاهد مشاهده شد. این سویه ی با حذف ۶۲/۸٪ از ارسنیک موجود در محیط، نتیجه بسیار خوبی را نشان داد. این در حالی است که در نمونه‌ی شاهد یک کاهش ۰/۷۷٪ از ارسنیک وجود داشت.

برای بررسی نتایج حذف ارسنیک توسط نمونه ی باکتریایی منتخب در برابر شاهد منفی یک آزمون Independent Samples Test انجام شد که نشان داد در $p<0.05$ به صورت معنی داری باعث حذف ارسنیک از محیط نسبت به شاهد شده است (جدول ۷).

جدول ۷- آزمون t نمونه‌های مستقل برای بررسی معنی داری حذف ارسنیک توسط باکتری منتخب در برابر شاهد

	آزمون t برای برابری میانگین‌ها		
ارزیابی حذف ارسنیک	t	df	*p*
برابری واریانس‌های مفروض	۱۱۹/۰۲۳	۴	۰/۰۰۰
برابری واریانس‌های غیر مفروض	۱۱۹/۰۲۳	۳/۳۸۲	۰/۰۰۰

در آزمونPCR نتیجه‌ی الکتروفورز ماده‌ی ژنتیکی بسط یافته مربوط به ژن 16SrDNA در شکل ۲ گزارش شد. نتایج آنالیز ژنتیکی برای نمونه ی باسیلی نشان داد که سویه ی مربوطه ۱۰۰٪ همسانی با باسیلوس سرئوس سویه ی LS24 دارد.



شکل ۲- بررسی محصول PCR: ۱ کنترل منفی، ۲ سایز مارکر bp ۱۵۰۰، ۳ سویه انتخابی

بحث

در پژوهش حاضر از مجموع سویه‌های جدا شده، مقاوم ترین سویه به فلز ارسنیک با MIC در بهترین شرایط رشد جدا و سپس با آزمون‌های بیوشیمیایی و برای تایید با آزمایش‌های ژنتیکی مشخص شد که از جنس باسیلوس بود.

در شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که قادر به پاکسازی محیط زیست هستند، توانایی شناسایی انواع مقاوم و تحمل کننده ی غلظت بالای فلزات سنگین است که می‌تواند در انتخاب سویه‌های برتر برای حذف این ترکیبات سمی راه گشا باشد. توانایی جذب فلزات سنگین و سمی توسط میکروارگانیسم‌ها منجر به توجه خاص محققین به مطالعه ی انواع قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و باکتری‌های مختلف برای جذب و به دنبال آن حذف این فلزات از محیط زیست و به خصوص، پساب‌های کارخانه‌های صنعتی، رودخانه‌ها و فاضلاب‌های آلوده به این گونه فلزات شده است(۲۱).

در سال ۲۰۱۵ با بررسی آلودگی فلزات سنگین در آب‌های زیر زمینی منطقه معدنی سنگ آهن گل گهر سیرجان، ایران مشاهده کردند که غلظت منگنز، آلومینیوم و ارسنیک بالاتراز حداکثر غلظت مجاز برای آب قابل شرب است در حالی که مقدار فلز ارسنیک در تحقیق حاضر ناچیز می‌باشد(۷).

Anyakora وMomodu در سال ۲۰۱۰ با بررسی که روی آلودگی فلزات سنگین آب‌های زیر زمینی انجام دادند. خصوصاً در چاه که آب مصرفی انسان‌ها از آنجا تامین میشود متوجه شدند که میزان آلومینیوم که باعث آلزایمر می‌شود و سرب که سم سوخت و ساز بدن و کادمیوم که سرطان زاست زیاداست(۲۲).

Shruti و همکاران در سال۲۰۱۲ جذب سرب توسط باسیلوس سرئوس جدا شده از پساب‌های صنعتی را بررسی کردند. قابلیت جذب سرب از تمام شش جدایه در غلظت‌های مختلف سرب ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر مورد مطالعه قرار گرفت. ایزوله ی ۶ نشان داد بالاترین قابلیت جذب سرب و به عنوان باسیلوس سرئوس شناسایی شد. مطالعات بر روی کنترل عوامل محیطی نشان داد

که درجه حرارت مطلوب ۳۰ درجه سانتیگراد و pH ۵ و حداکثر جذب سرب از کشت‌های قدیمی ۲۴ ساعته ی باسیلوس سرئوس است(۲۳).

Giri و همکارانش هم در سال ۲۰۱۳ در تحقیقشان به توانایی باسیلوس سرئوس در حذف فلز ارسنیک پی بردند. ایلماز در تحقیقش به مطالعه ظرفیت جذب و تحمل فلزات باسیلوس سرئوسEB1 پرداخت و نتایج این چنین بودند: باسیلوس گونه‌ی EB1، از خاک سنگین فلزی آلوده در منطقه جنوب شرقی ترکیه جدا شد. بر اساس ژن تعیین توالیی16SrDNA، میکروارگانیسم نزدیک به باکتری باسیلوس سیرکولانس بود. غلظت ممانعت از رشد حداقل فلزات (MIC) برای باکتری مشخص شد. باسیلوس EB1 ارزش MIC بالا برای فلزات و طیف زیادی از مقاومت آنتی بیوتیکی داشت. سمیت فلزات به باکتری، کادمیم = کبالت> مس> نیکل> روی> منگنز در محیط‌های جامد بود. اثرات افزایش غلظت فلزات به میزان رشد در جهت به دست آوردن الگوهای دقیق مقاومت در کشت مایع مشخص شد. از نتایج مسمومیت با فلزات سنگین، غلظت مهار کننده در محیط‌های جامد بالاتر از آن در محیط‌های مایع بود. جذب فلز در طول دوره رشد مشخص شد. باسیلوس سیرکولانس گونه یEB1 قادر به حذف ۹۰٪ منگنز، ۶۸ ٪روی، ۶۵٪ مس، ۴۵٪ نیکل و ۴۰٪ کبالت در طول چرخه رشد فعال با ظرفیت خاص جذب ۲۵، ۲۲، ۲۰، ۱۳ و ۱۲ میلی گرم در لیتر بود. از آنجا که سلول‌های باسیلوس می‌تواند در حضور غلظت قابل توجهی از فلزات و با توجه به ظرفیت جذب فلزات در شرایط هوازی رشد می‌کنند، این باکتری ممکن است به طور بالقوه قابل اجرا در زیست پالایی درجا سیستم‌های آبی- آلوده فلزات سنگین است(۲۴).

Allievi و همکاران در سال ۲۰۱۱ جذب زیستی فلزات با پروتئین‌های سطحی گونه‌های باسیلوس از جمله اسفاریکوس و تورنجنسیس را بررسی کردند و S لایر خالص از دو سویه باسیلوس اسفاریکوس توانا برای جذب مس می‌باشند. پارامترهای جذب مس برای باسیلوس اسفریکوس ۲۳۶۲ تعیین شده و پس از تجزیه و تحلیل با استفاده از مدل لانگمیر، میل و ظرفیت آن‌ها نشان داده شد که قابل مقایسه با دیگر جاذب‌های باکتریایی است. اثر رقابتی Ca^{2+} وZn^{2+} ، اما نه Cd^{2+}، همچنین مشاهده شد و این نشان می‌دهد که کاتیون‌های دیگر ممکن است توسط این پروتئین جذب شوند. برای اولین بار، یک رابطه مستقیم بین پروتئینS لایر و ظرفیت جذب فلز نشان داده شده است. این ظرفیت به حفظ پروتئین S لایر متصل به اسپور باسیلوس و سلول‌های پیوند خورده است(۲۵).

Oves و همکاران در سال۲۰۱۳ توانایی جذب باسیلوس تورنجینسیس OSM29 در فلزات مس، نیکل،کادمیم، کروم و سرب متفاوت بود. گروه‌های عاملی شیمیایی سطح این باکتری در بیومس توسط FTIR مشخص شد که گروه‌های آمین، کربوکسیل، هیدروکسیل و کربونیل بودند، که ممکن است در جذب فلزات سنگین نقش دارند. جذب به pH و غلظت فلز وابسته بود که در تحقیق حاضر هم اسیدیته در جذب ارسنیک نقش داشت. جذب هر فلز نسبتا سریع است که می‌تواند یک مزیت برای تیمار در مقیاس بزرگ از سایت‌های آلوده باشد(۲۶).

Masood و Malik در سال۲۰۱۱ جذب کروم (VI) و مس (II) از محلول‌های آبی با استفاده از باسیلوس به عنوان تابعی از pH، غلظت اولیه یون فلزی و زمان تماس مورد بررسی قرار دادند. بهینه ارزش جذب و pH مشاهده شده برای کروم و یون‌های مس به ترتیب ۲ و ۵ بود. جذب یون فلزی با افزایش غلظت اولیه فلز افزایش یافت اما تفاوت معنی داری با افزایش زمان بعد از ۶۰ دقیقه مشاهده نشد. حداکثر ظرفیت جذب کروم $mg\ g^{-1}$ ۶۴. ۱۰۲ و مس به$mg\ g^{-1}$ ۷۸. ۱۲۵

برآورد شد. در حالی که تحقیق حاضر اسیدیته برابر با ۷، دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و سرعت تکان ۱۵۰ دور در دقیقه بر افزایش جذب زیستی(۶۲/۸ ٪) فلز ارسنیک تاثیر داشتند. تعادل داده‌ها توسط روابط جذب لانگمویر و فروندلیچ توصیف شده است. حضور گروه‌های عاملی در سطح دیواره سلولی از زیست توده که ممکن است با یون‌های فلزی در تعامل باشد با FTIR تایید شد. استفاده از باسیلوس به حذف کروم (VI) و مس (II) در پساب دباغی نشان داد که زیست توده قادر به حذف هر دو یونهای فلزی بود. با این حال، عملکرد جذب نسبت به محلول‌های فلزی مصنوعی کمی پایین تر بود. عوامل متعددی ممکن است مسئول این تفاوت باشند. با این حال، مهم ترین عامل به نظر می‌رسد حضور آلاینده‌های دیگر مانند آنیون‌ها، ترکیبات آلی و سایر فلزات نادر در پساب است(۲۷).

Bahremand و همکارانش در سال۹۴ میزان حذف آرسنیک در آبهای آلوده بوسیله بیوفیلتر تثبیت شده با باسیلوس تورینژینسیس بررسی کردند. هدف از انجام تحقیقشان جداسازی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک و استفاده از آن‌ها بصورت بیوفیلتر جهت حذف آرسنیک از آبهای آلوده می‌باشد. نتیجاً مقاوم ترین باکتری جدا شده به ۱۸ میلی مولار آرسنیک مقاوم و متعلق به گونه باسیلوس تورینژینسیس می‌باشد. بالاترین میزان حذف آرسنیک توسط این باکتری در مدت زمان ۱۸۰ دقیقه ۹۸ ٪ ارزیابی شد و روش بیوفیلتراسیون را به عنوان روشی کم هزینه و سریع و کارا و کم خطر برای حذف آرسنیک از آب و پساب‌های آلوده به این ماده معرفی کردند(۲۸).

نتیجه‌گیری

اساساً جذب زیستی فلزات سنگین یکی از بهترین فن آوری‌های امیدبخش برای حذف فلزات سمی از پساب است. در تحقیق حاضر سویه منتخب توانست ۶۲/۸ ٪ از فلز ارسنیک را حذف کند.

باکتری جدا شده در این تحقیق از مقاومت بالایی نسبت به فلز سنگین آرسنیک برخوردارند. چنین سازگاری و مقاومتی به دلیل زیست در محیط‌های دارای فلزات سنگین و آلایندههای معدنی می‌باشد، به طوری که حضور فلزات به عنوان یک عامل انتخابی عمل کرده و باعث حذف باکتری‌های حساس به فلز و رشد و افزایش باکتری‌های مقاوم شده است. با بررسی‌ها و مطالعه‌های بیشتر باکتری‌های مقاوم به فلز میتوان از چنین باکتری‌هایی در تصفیه زیستی پسآب‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از سرکار خانم زهرا معصومعلی نژاد کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد سیرجان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع و مآخذ

1. Mungasavalli D. P, Viraraghavan T, Jin Y. C. Biosorption of chromium from aqueous solutions by pretreated A. niger Batch and column studies, Colloids and Surfaces A. Physicochem and Eng Aspects 2007. 301(1-3):214-223.
2. Camargo F. A. O, Okeke B. C, Bento F, Mand Frankenberger W. T. Diversity of chromium resistant bacteria isolated from soilscontaminated with dichromate. Applied Soil Ecology. 2005. 29(2): 193-193–202.
3. Alluri H. K. Biosorption: An eco-friendlyalternative for heavy metal removal. Afr J Biotech. 2007. 6(25). 2924-2931.
4. Farooq U, Kozinski J. A, Khan M. A, Athar M.. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents, a review of the recent literature. Bioresour. Technol, 2010. 101(14). 5043–5053.
5. Volesky B, Schiewer S. Biosorption Metals. Encyclopedia Of Bioprocess Technology(Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation). 2000. 1. 433-453.
6. Volesky B. Biosorption and me. Water Res. 2007. 41(18), 4017-29.
7. Jahanshahi R, Zare M. Assessment of heavy metals pollution in groundwater of Golgohar iron ore mine area, Iran. Environ Earth Sci. 2015. 74(505). 4057-8.
8. Chong A. M. Y, Wong Y. S, Tam N. F Y. Performance of different microlgal speciesin removing nickel and zinc from industrialwastewater. Chemosphere. 2000. 41(1–2). 251–257.
9. Kleinmann RLP, Crerar DA, Pacelli RR. Biogeochemistry of acid mine drainage and a method to control acid formation. Min Eng (1981). 33(3):300-305.
10. Kurniawan T. A, Chan G. Y. S, Lo W. -H, Babel S. Physico-chemical techniques for wastewater laden with heavy metals. Chem. Eng. J. 2006. 118(1), 83-98.
11. Reddy D. H. K, Lee S. M. Water pollution and treatment technologies, J. Environ Anal. Toxicol. 2012. 2 (5). 1000-103.
12. Iddou A, Oualib M. S. Wasteactivatedsludge (WAS) as Cr (III) sorbent biosolid from wastewater effluent. Colloidsand Surfaces B: Biointerfaces. 2008. 66(2): 240–245.
13. Chojnacka K, Chojnacki A, Gorecka H. Biosorption of Cr2+, Cr3+ and Cu2+ions by blue2 green algae spirulinaspkinetics, equilibrium and the mechanism of theprocess. Chemosphere. 2005. 59(1): 75-84.
14. Paul D, Pandey G, Pandey J, Rakesh K. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmentalrestoration. Trends Biotechnol. 2005;23(3):135-42.
15. Zhaohui X. U, Weon B, Mulchandani A, Rajesh K, Chen W. Heavy metal removal by novel CBD-EC20 sorbentsimmobilized on cellulose. Biomacromolecules. 2002. 3(3) :462-5.
16. Clesceri H, Greenberge A, D. Eaton A. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 20th Edition, APHA, Washington DC. 1998 1998.
17. Rothery E. Operation Manual Spectra AA – 10/20, Australia Varian; January 2004, 8- 15.
18. Edward raja, C., Anbazhagan, A., Sadasivam selvam, G. 2006, Isolation and characterization of a metal resistant Pseudomonas aeruginosa strain. Word journal of microbiology &biotechnology, 22:577-585.

۱۹. ذوالفقاری، م، خلیلیان، م، (۱۳۹۲)، جداسازی و ارزیابی میکروارگانیسم‌های مقاوم به سلنیت از پساب‌های صنعتی، مجله ی علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره ۲۱، شماره ۷، صفحه ۱۴۳.

۲۰. میبدی، س م، فتوحی، ش، جلیل زاده، ا، (۱۳۹۲)، جذب زیستی کادمیوم توسط سویه‌های قارچی جدا شده از پساب کارخانه‌های سرب و روی زنجان، مجله ی علمی پژوهشی آب و فاضلاب، شماره ۳، صفحه۱۲۲-۱۲۷.

21. Meybodi S M, Jahan Fotouhi Sh, Jalilzadeh E, Fotouhi M, Jalili T, Shamloei Sh. Biosorption of Cadmium by Fungal Strains Isolated from Wastewater of Zanjan Leads and Zinc Plants. W. W. C. E. 2012. 3(24). 122-127.

22. Momodu M A, Anyakora C A. Heavy Metal Contamination of Ground Water: The Surulere Case Study. EESRJ. 2010. 2(1): 39-43.

23. Shruti M, Geetha B, Sarangi SK. Lead biosorption by a bacterium isolated from industrial effluents. Int J Microbiol Res. 2012. 4(3):196-200.

24. Giri AK, Patel RK, Mahapatra SS, Mishra PC. Biosorption of arsenic (III) from aqueous solution by living cells of Bacillus cereus. Environ Sci Pollut Res Int. 2013. 20(3):1281-91.

25. Allievi, Claudia M, Florencia S, Mariano P. A., María Mercedes P, Ruzal Sandra M., Carmen S. R. Metal Biosorption by Surface-Layer Proteins from Bacillus Species, J. Microbiol. Biotechnol., 2011. 21(2), 147–153.

26. Oves M, Saghir Khan M, Zaidi A. Biosorption of heavy metals by Bacillus thuringiensis strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. Saudi J Biol Sci. 2013; 20(2): 121–129.

27. Masood F, Malik, A. Hexavalent Chromium Reduction by Bacillus sp. Strain FM1 Isolated from Heavy-Metal Contaminated Soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology January. 2011, 86(1). 114–119.

28. Bahremand P, Moghbeli M, Bakhshi Gh. Survey amount of arsenic removal from contaminated water with biofilter stabilized by Bacillus thuringiensis. International conference on modern research in agricultural science and enviroment. 2015.