علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره نوزدهم، ویژه‌نامه شماره ۵، تابستان ۱۳۹۶

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های حذف‌کننده فسفات از پساب صنعتی

سید حسین حسینی [۱]
مریم طبیبی [۲]
حمیدرضا پردلی [۳]
رضا نجف‌پور [۴]
فاطمه کریمی [۴]
سجاد یزدان ستاد [۵*]
sajjad.yazdansetad@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۱۱ **تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۰۸/۲۶**

چکیده

زمینه و هدف: فسفات از مهم‌ترین آلاینده‌های وارد شونده به آب‌های پذیرنده (رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و دریاها) از طریق دفع پساب‌ها است که باعث غنی شدن پیکره آبی و پدیده یوتریفیکاسیون می‌گردد. میکروارگانیسم‌های حذف کننده فسفات در فرآیند زیست‌پالایی، فسفات موجود در پساپ را به صورت پلی‌فسفات داخل سلولی در خود ذخیره و از محیط حذف می‌کنند. این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های حذف کننده فسفات از پساب‌های صنعتی صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، باکتری‌های حذف کننده فسفات از نمونه‌های پساب شهرک صنعتی آق‌قلا استان گلستان جداسازی شدند. جدایه‌های باکتری با استفاده از محیط اختصاصی Seperb و بر اساس تشکیل هاله شفاف در محیط کشت غربال‌گری شده و با استفاده از روش‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی، بیوشیمیایی و نهایتاً مولکولی شناسایی گردیدند.

یافته‌ها: تعداد ۳ جدایه از بین جدایه‌های حذف کننده فسفات با توجه به ایجاد هاله وسیع‌تر در محیط کشت، توانایی قابل ملاحظه‌ای را در حذف فسفات داشتند. شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از روش تایپینگ مولکولی بر پایه تکثیر قطعه ژنی 16S rDNA نشان داد که این جدایه‌ها منسوب به سه جنس *Brevundimonas*، *Ochrobactrum* و *Exiguobacterium* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: آنالیز واریانس در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.2 تفاوت معنی‌داری را در حذف فسفات توسط جدایه‌ها نشان داد. جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش پتانسیل بالقوه‌ای را در فسفات‌زدایی از پساب دارند و کاندیدای مناسبی در زیست‌پالایی به همراه سایر روش‌ها هستند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های حذف‌کننده فسفات، زیست‌پالایی، پساب، آلاینده.

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب‌شناسی، سمنان، ایران.
۲- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
۳- دانشیار قارچ‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب‌شناسی، گلستان، ایران.
۴- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب‌شناسی، قم، ایران.
۵*- (مسوول مکاتبات): دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

J.Env. Sci. Tech., Vol 19, Special No.5, summer 2017

Isolation and molecular identification of the bacteria involved in removing phosphate from industrial wastewater

Seyed Hossein Hosseini [۱]

Maryam Tabibi [۲]

Hamidreza Pordeli [۳]

Reza Najafpour [۴]

Fatemeh Karimi [4]

Sajjad Yazdansetad [۵*]

sajjad.yazdansetad@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Phosphate is one of the most important contaminants entering recipient waters (rivers, lakes, and seas) by wastewater disposal and causative agent of eutrophication due to the enrichment of aquatic ecosystems. In bioremediation process, the phosphate-removing bacteria accumulate polyphosphate intracellularly and take it away from the environment. The objective of this study was to isolate and identify the bacteria which remove phosphate from industrial wastewater.

Method: In this study, phosphate-removing bacteria were isolated from wastewaters of Aq Qlala industrial park of Golestan province. The isolates were identified based on the creation of clear zone in the bacterial lawn, leading to phosphate removal on the specific agar plate Seperb. Finally, the isolates were identified by macroscopical, microscopical, biochemical, and molecular methods.

Findings: In total, 3 out of 30 isolates had high ability in phosphate removal regarding their large clear zone on agar. Molecular identification of isolates by 16S rDNA typing method indicated that the isolates belong to the genera *Brevundimonas*, *Ochrobactrum*, *Exiguobacterium.*

Conclusion: Variance analysis using SAS 9.2 software indicated a significant difference in phosphate removal by the isolates. The obtained results demonstrated that the isolates are highly efficient in phosphate removing from wastewater and they are suitable candidates for bioremediation along with other methods.

Keywords: Phosphate-removing bacteria, Bioremediation, Wastewater, Contaminant.

1-MSc of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran.

2-PhD Candidate of Microbiology, Cellular and Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

3-Associate Professor of Mycology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

4-PhD Candidate of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran.

5-PhD Candidate of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.* *(Corresponding Author)*

مقدمه

امروزه ورود آلاینده‌های شیمیایی ناشی از فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی از مهم‌ترین معضلات زیست‌محیطی است. آب‌های پذیرنده شامل رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و دریاها محل نهایی ورود این آلاینده‌ها از طریق دفع فاضلاب‌ها و پساب‌ها هستند. از مهم‌ترین آلاینده‌هایی که بدین شکل وارد آب‌های پذیرنده می‌شوند، ترکیبات مغذی خصوصاً نیترات‌ها و فسفات‌ها هستند. ترکیبات مغذی فسفاتی وارد پیکره آبی شده و باعث افزایش رشد و تکثیر گیاهان آبزی و به طور خاص جلبک‌ها و سیانوباکترها شده که به پدیده یوتریفیکاسیون[1] موسوم است (۱). یوتریفیکاسیون اثرات مخرب زیادی را روی اکوسیستم‌های آبی و در نهایت بر روی حیوانات و انسان می‌گذارد، به طوری که با رشد بیش از اندازه جلبک‌ها در سطح آب و ایجاد کف از نفوذ اکسیژن به آب ممانعت شده و باعث مرگ ماهی‌ها و دیگر آبزیان و تغییر چرخه تغذیه‌ای اعماق آب می‌گردد. از آن‌جایی که حذف هر آلاینده متناسب با اهمیت بهداشتی و زیست محیطی آن است، حذف عناصر مغذی نیز با پیدایش پدیده یوتریفیکاسیون در منابع آبی اهمیت ویژه پیدا کرده است (۲).

فسفات به دلایل مختلف از جمله اهمیت آن در سنتز اسیدهای نوکلییک، سنتز ATP، تولید مکمل‌های پر انرژی و ذخیره‌سازی انرژی، فرآیندهای غشای سلولی و عامل مهم کنترل کننده رشد سلولی در میکروارگانیسم‌ها حایز اهمیت است (۳). در نتیجه، تلاش‌هایی در جهت حذف فسفات توسط میکروارگانیسم‌ها با فرآیند افزایش زیستی حذف فسفات[2] (EBPR) صورت گرفته است. بدین ترتیب فسفات توسط میکروارگانیسم‌ها از توده پساب جذب و به عنوان پلی‌فسفات داخل سلولی ذخیره می‌شود. پلی فسفات یک ترکیب با انرژی بالاست و هیدرولیز آن انرژی واکنش‌های بیوشیمیایی سلول را تأمین می‌نماید (۴). در واقع، افزایش زیستی حذف فسفات در یک الگوی بی‌هوازی-هوازی تصفیه فاضلاب انجام می‌شود. در مرحله بی‌هوازی، فسفات در میکروارگانیسم‌های جمع کننده فسفات[3] (PAOs) تجمع می‌یابد و با زنجیره کوتاه اسیدهای آلی موجود در فاضلاب، آلکانوات پلی هیدروکسیل[4] (PHA) داخل سلولی را تشکیل می‌دهد که با هیدرولیز پلی فسفات داخل سلولی انرژی مورد نیاز برای جداسازی اسیدهای آلی تامین می‌شود. در مرحله هوازی، آلکانوات پلی هیدروکسیل صرف تولید انرژی برای رشد باکتری‌های جمع کننده فسفات می‌گردد. مقدار فسفات حذف شده از فاضلاب در مرحلهٔ هوازی بیشتر از مقدار حذف شده آن در مرحله بی‌هوازی است (۵). مهم‌ترین باکتری-های حذف کننده فسفات متعلق به جنس‌های *آسینتوباکتر*[5]، *سودوموناس*[6]، *بورخولدریا*[7]، *برونددیموناس*[8]، *فلاوباکتریوم*[9] و *کورینه‌باکتریوم*[10] هستند (۶). پاشایوا[11] و همکاران باکتری‌های حذف کننده فسفات *سودوموناس آئروژینوزا*[12] و *آسینتوباکتر بومانی*[13] را از پساب شهر ازمیر[14] در ترکیه جداسازی کردند (۷). لیلا بنامار[15] و همکاران باکتری-های حذف کننده فسفات *سودوموناس آئروژینوزا*، *آسینتوباکتر ژونی*[16]، *آلکالیژنز دنیتریفیکانس*[17] و *موراکسلا لاکوناتا*[18] را از لجن فعال جدا کردند (۸).

کنترل و برنامه‌ریزی در جهت حذف و یا به حداقل رساندن آلاینده‌های زیست‌محیطی یک امر ضروری است. حذف آلاینده-ها با روش‌های شیمیایی اغلب هزینه‌بر بوده و گاهی نیز به دلیل سمیت مواد اضافه شده، به محیط آسیب وارد می‌کند. امروزه حذف بیولوژیکی آلاینده‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها تحت عنوان زیست‌درمانی[19] به دلیل هزینه پایین، کم خطر بودن و توانایی حذف موثر آلاینده‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۲). مطالعه حاضر به منظور جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های

1- Eutrophication
2-Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR)
3- Polyphosphate-accumulating organisms (PAOs)
4- Poly hydroxyl alkanoates (PHA)
5- Acinetobacter
6- Pseudomonas
7- Burkholderia
8- Brevundimonas
9- Flavobacterium
10- Corynebacterium
11- Pasayeva
12- Pseudomonas aeruginosa
13- Acinetobacter baumannii
14- Izmir
15- Leyla Benammar
16- Acinetobacter junii
17- Alcaligenes denitrificans
18- Moraxella lacunata
19- Bioremediation

حذف کننده فسفات از پساب‌های صنعتی استان گلستان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری از پساب کارخانجات صنعتی و مراکز تولیدی فعال شهرک صنعتی آق قلا استان گلستان (واقع در کیلومتر ۱۲ جاده گرگان-آق قلا) در چندین بازه زمانی مختلف و با در نظر گرفتن پارامترهای اولیه شامل شرایط فیزیکی و شیمیایی، pH و درجه حرارت پساب انجام گرفت. نمونه در ظرف حاوی یخ به سرعت به آزمایشگاه منتقل گردید.

غنی‌سازی پساب

جهت غنی‌سازی پساب، ۹۰ میلی‌لیتر از نمونه پساب با ۱۰ میلی‌لیتر محلول پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) ۱ درصد، مخلوط شده و به مدت ۴۸ ساعت در ۲۵ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد، ۳۰ میلی‌لیتر از نمونه به ۷۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث غنی شده با فسفات انتقال یافت و به مدت ۵ روز در ۲۵ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور قرار داده شد (۹).

کشت نمونه پساب

از نمونه‌های غنی شده پساب با استفاده از نرمال سالین استریل ۰/۲ درصد، رقت‌های متوالی از 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت سریالی روی محیط اختصاصی Seperb (گلوکز ۱۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۰/۵ گرم بر لیتر، کلرید کلسیم ۰/۱ گرم بر لیتر، تری فسفات کلسیم ۲/۵ گرم بر لیتر، سولفات منیزیم ۰/۲۵ گرم بر لیتر، آگار ۱۵ گرم بر لیتر، و تنظیم شده در pH ۷/۲) کشت داده شد. هم چنین، برای انتخابی کردن محیط و جلوگیری از رشد قارچ‌ها، آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزامید با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت اضافه گردید. پلیت‌ها در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز در گرم‌خانه قرار داده شد. جهت غربال‌گری باکتری‌های حذف کننده فسفات، از روش لکه‌گذاری و ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری‌ها در محیط اختصاصی Seperb استفاده گردید(۱۰).

شناسایی جدایه‌ها

جدایه‌های حذف کننده فسفات از نظر مورفولوژیکی و واکنش گرم بررسی و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، اکسیداز، کاتالاز، تولید H_2S، بررسی حرکت، تولید اندول از تریپتوفان، MR-VP[1]، مصرف سیترات، تجزیه نشاسته، تجزیه ژلاتین، تجزیه کازیین، اکسیداسیون یا تخمیر قندها (OF[2])، مصرف اوره و احیای نیترات شناسایی شدند (۱۱).

استخراج DNA باکتری‌ها

استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA کیاژن (کیاژن، آلمان[3]) انجام گرفت.

تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر فوروارد و ریورس، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase انجام گردید. واکنش PCR با روش استاندارد (۱۳) و با استفاده از پرایمرهای عمومی (F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', R: 5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3') در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف، آلمان[4]) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (۱۲). در نهایت، قطعه تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی[5] ارسال گردید.

ارزیابی کمی حذف فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی

جهت بررسی توانایی حذف فسفات توسط جدایه‌ها از روش ایجاد چاهک در محیط اختصاصی Seperb استفاده شد. ابتدا از جدایه‌های باکتریایی سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سپس، سوسپانسیون با روش کشت متراکم روی محیط Seperb کشت داده شد. با انتهای پیپت پاستور شیشه‌ای

1- Methyl Red-Voges Proskauer
2- Oxidation-Fermentation
3- QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Germany
4- Mastercycler® nexus; Eppendorf, Germany
5- MacroGen, Korea- http://www.macrogen.com

استریل در محیط جامد چاهک‌هایی به قطر ۴ میلی‌متر ایجاد شد. سوسپانسیون باکتری‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و از مایع رویی به مقدار ۳۰ میکرولیتر در چاهک‌ها بارگذاری شد و به مدت ۱۰ روز در ۲۵ درجه سلسیوس به منظور اندازه‌گیری هاله ناشی از حذف فسفات قرار داده شد (۱۳). واریانس و تحلیل داده‌های کمی مربوط به حذف فسفات توسط باکتری‌ها با استفاده از سیستم آنالیز آماری (SAS 9.2) انجام گرفت.

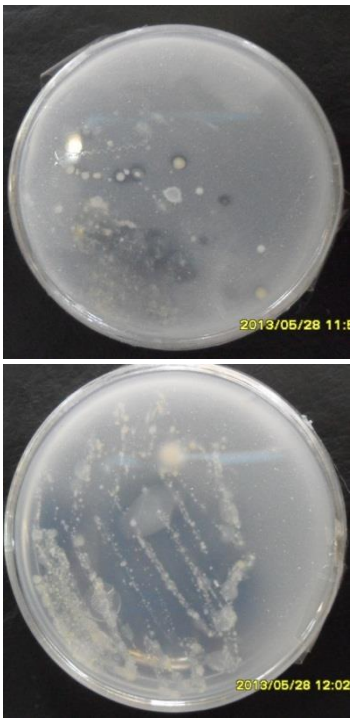
تعیین میزان جذب فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی

برای تعیین میزان جذب فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت اختصاصی Seperb مایع به عنوان نمونه شاهد به یک لوله آزمایش انتقال یافت و طول موج جذب نوری آن با اسپکتروفتومتر (Hach, USA) مدل DR 5000™ UV-Vis سنجیده شد. سپس، سوسپانسیون باکتری-ها با محلول نیم مک فارلند معادل سازی گردید و به مقدار ۲۰ میکرولیتر به محیط تهیه شده فوق اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری در ۳۵ درجه سلسیوس، مقدار جذب نوری دومرتبه سنجش گردید (۱۳).

نتایج

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های حذف‌کننده فسفات

جداسازی باکتری‌های حذف کننده فسفات با در نظر گرفتن شاخصه‌های محیطی نمونه‌های پساب جمع‌آوری شده از تصفیه خانه مرکزی شهرک صنعتی آق‌قلا انجام گرفت. درجه حرارت متوسط نمونه‌های پساب در زمان نمونه‌گیری ۲۷ درجه سلسیوس و pH متوسط نمونه‌های پساب ۶/۲ برآورد گردید. در مجموع از ۵۰ باکتری جدا شده از پساب، تعداد ۳۰ باکتری با توانایی حذف فسفات، جداسازی و خالص سازی شدند (شکل۱).



شکل۱- جداسازی باکتری‌های حذف‌کننده فسفات در محیط کشت Seperb (هاله شفاف اطراف کلنی باکتری، تجزیه فسفات را نشان می‌دهد.)

Figure 1- Phosphate-removing bacteria isolated in Seperb medium (Clear zone around the colonies indicated phosphate degradation.)

شناسایی باکتری‌های حذف کننده فسفات

همه باکتری‌های جدا شده بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی (جدول۱) و روش ملکولی بر پایه PCR تا سطح جنس و گونه شناسایی شدند.

جدول۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

Table1- Results of biochemical tests

جدایه	آزمون‌های بیوشیمیایی*														جنس و گونه احتمالی
	۱*	۲*	۳*	۴*	۵*	۶*	۷*	۸*	۹*	۱۰*	۱۱*	۱۲*	۱۳*	۱۴*	
PRB	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	*Bacillus safensis*
PRB	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	*Escherichia coli*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	*Bacillus cereus*
PRB	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	*Pseudomonas agarici*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	*flavobacterium*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	*Bacillus halodurans*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	*Bacillus firmus*
PRB	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	*Bacillus safensis*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	*Brevundimonas diminuta*
PRB	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	*Corynebacterium*
PRB	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	*Exiguobacterium sibiricum*
PRB	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	*Pseudomonas.umsongensis*
PRB	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	*Escherichia coli*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	*Brevundimonas diminuta*
PRB	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	*Ochrobactrum*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	*Athrobacter nicotianae*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	*Bacillus safensis*
PRB	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	*Exiguobacterium sibiricum*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	*acinetobacter baumannii*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	*Brevundimonas diminuta*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	*Athrobacter nicotianae*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	*acinetobacter baumannii*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	*Flavobacterium*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	*Corynebacterium*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	*Bacillus halodurans*
PRB	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	*acinetobacter baumannii*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	*Bacillus safensis*
PRB	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	*Bacillus cereus*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	*Bacillus safensis*
PRB	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	*Ochrobactrum*

* آزمون‌های بیوشیمیایی: *۱- اکسیداز، *۲- کاتالاز، *۳- تولید H_2S، *۴- بررسی حرکت، *۵- تولید ایندول از تریپتوفان، *۶- MR (Methyl Red)، *۷- VP (Voges Proskauer)، *۸- مصرف سیترات، *۹- تجزیهٔ نشاسته، *۱۰- تجزیه ژلاتین، *۱۱- تجزیه کازیین، *۱۲- OF (Oxidation-Fermentation)، *۱۳- مصرف اوره، *۱۴- احیای نیترات

ارزیابی کیفی و کمی حذف فسفات توسط جدایه‌ها

جدایه‌ها از نظر قطر هاله ناشی از حذف فسفات در اطراف چاهک موجود در محیط کشت انتخاب شدند (شکل۲). نتایج کمی مربوط به توانایی این جدایه‌ها در حذف فسفات به تفکیک در جدول(۲) آورده شده است. از بین ۳۰ جدایه حذف کننده فسفات، جدایه‌های PRB 9، PRB 15، PRB 11 و PRB 30 بیشترین توانایی را در حذف فسفات داشتند (نمودار۱).

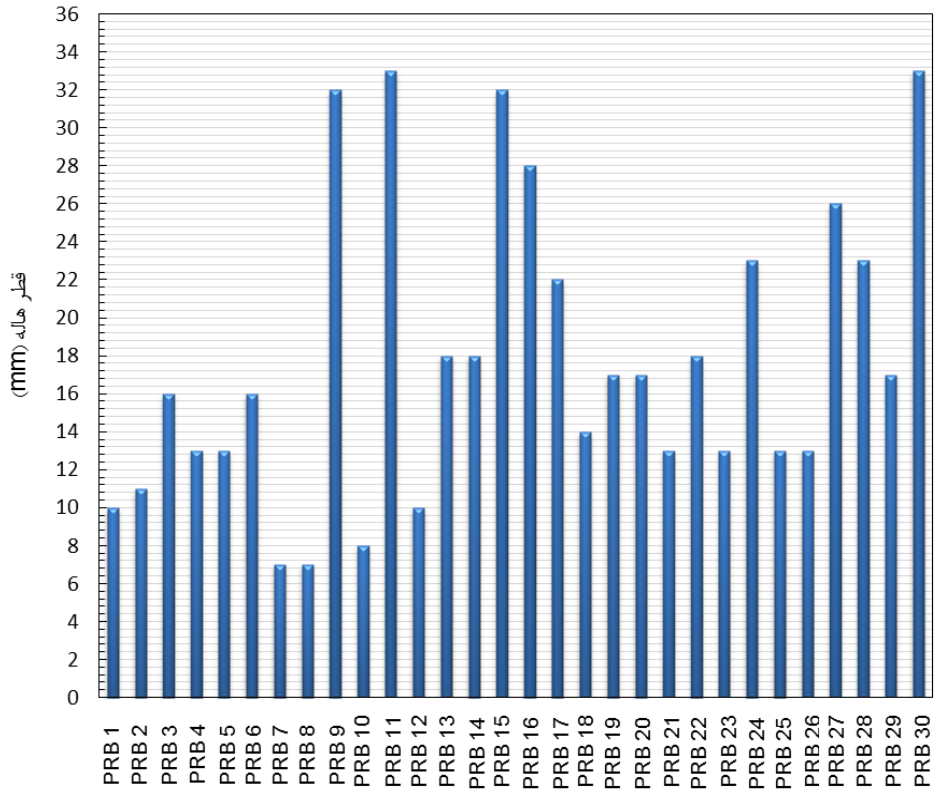
شکل۲- هاله ناشی از حذف فسفات در اطراف چاهک توسط جدایه‌ها در محیط Seperb

Figure2- Clear zone caused by phosphate-removing bacteria around the well in Seperb medium

جدول۲- قطر هاله ناشی از حذف فسفات توسط جدایه‌ها در مدت ۱۰ روز

Table2- Clear zone diameter created by phosphate-removing bacteria within 10 days

جدایه	قطر به میلی‌متر									
	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم	روز هشتم	روز نهم	روز دهم
PRB 1	۴	۴	۵	۶	۷	۷	۸	۹	۱۰	۱۰
PRB 2	۴	۵	۶	۷	۹	۹	۱۰	۱۱	۱۱	۱۱
PRB 3	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۶
PRB 4	۴	۶	۸	۱۰	۱۱	۱۲	۱۲	۱۳	۱۳	۱۳
PRB 5	۴	۶	۸	۱۰	۱۱	۱۲	۱۲	۱۳	۱۳	۱۳
PRB 6	۴	۶	۸	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۶
PRB 7	۴	۴	۴	۵	۶	۶	۶	۷	۷	۷
PRB 8	۴	۴	۵	۵	۶	۶	۶	۷	۷	۷
PRB 9	۴	۹	۱۳	۱۷	۲۱	۲۴	۲۷	۳۰	۳۲	۳۲
PRB	۴	۴	۴	۵	۶	۶	۷	۸	۸	۸
PRB	۴	۸	۱۴	۱۹	۲۲	۲۴	۲۶	۲۹	۳۱	۳۳
PRB	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۹	۱۰	۱۰	۱۰
PRB	۴	۷	۱۱	۱۳	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۸	۱۸
PRB	۴	۷	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶	۱۷	۱۸	۱۸	۱۸
PRB	۴	۹	۱۴	۲۰	۲۴	۲۶	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲
PRB	۴	۸	۱۴	۱۷	۲۰	۲۳	۲۵	۲۷	۲۸	۲۸
PRB	۴	۶	۷	۱۰	۱۳	۱۶	۱۹	۲۱	۲۲	۲۲
PRB	۴	۵	۶	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۳	۱۴	۱۴
PRB	۴	۶	۷	۹	۱۱	۱۳	۱۵	۱۶	۱۶	۱۷
PRB	۴	۶	۸	۸	۱۱	۱۳	۱۶	۱۷	۱۷	۱۷
PRB	۴	۶	۹	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۲	۱۳	۱۳
PRB	۴	۷	۹	۹	۱۲	۱۴	۱۶	۱۷	۱۸	۱۸
PRB	۴	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳
PRB	۴	۹	۱۰	۱۳	۱۵	۱۷	۲۰	۲۲	۲۳	۲۳
PRB	۴	۷	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۳
PRB	۴	۵	۶	۷	۹	۱۱	۱۲	۱۲	۱۳	۱۳
PRB	۴	۶	۹	۱۱	۱۴	۱۷	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶
PRB	۴	۱۲	۱۴	۱۶	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳
PRB	۴	۸	۱۰	۱۱	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۷
PRB	۴	۱۰	۱۵	۲۰	۲۴	۲۶	۲۹	۳۱	۳۳	۳۳



نمودار۱- مقایسه قطر هاله ناشی از حذف فسفات توسط جدایه‌ها

Chart 1- Comparison of clear zone diameter of phosphate removal in bacterial isolates

نتایج آنالیز واریانس در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.2 نشان داد که بیشترین هاله ایجاد شده در تیمارهای PRB9، PRB15، PRB11 و PRB30 مشاهده شد. بین این تیمارها تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری مشاهده نشد، در حالی که بین این تیمارها با دیگر تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد مشاهده شد.

تعیین میزان جذب فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی

میزان جذب فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی به تفکیک برای PRB9، PRB11، PRB15 و PRB30 در جدول(۳) آورده شده است.

تکثیر قطعه 16S rDNA جدایه‌های باکتری با استفاده از واکنش PCR

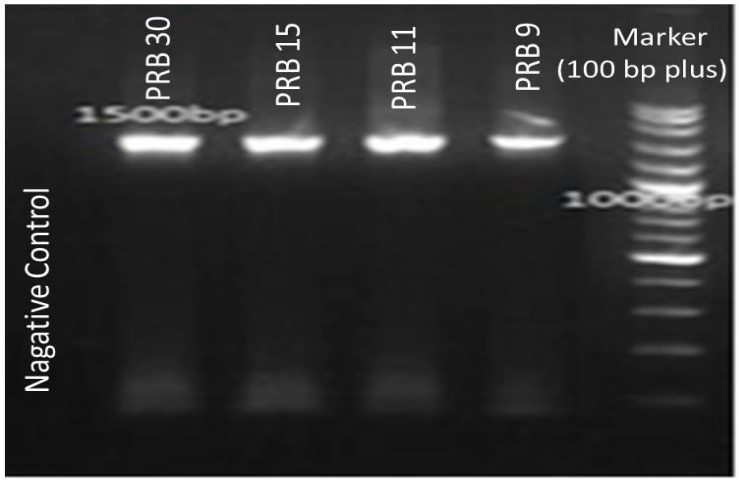
تکثیر قطعه ژنی 16S rDNA جدایه‌ها باند مناسب در اندازه حدوداً ۱۵۰۰ جفت باز را نشان داد (شکل۳). توالی تعیین شده قطعه ژنی با نرم‌افزار بلاست[1] موجود در وب سایت NCBI[2] بررسی شد و درصد شباهت جدایه‌ها با دیگر باکتری‌های موجود در بانک اطلاعاتی مقایسه گردید (جدول ۴).

1- Blast
2- http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

جدول۳- میزان جذب فسفات توسط جدایه‌های PRB

Table3- The phosphate absorption by PRB isolates

جذب	کنترل	PRB 9	PRB 11	PRB 15	PRB 30
عدد جذب اولیه	۰/۸۸	۰/۸۹	۰/۸۹	۰/۸۹	۰/۸۹
عدد جذب بعد از ۴۸ ساعت	۰/۸۹	۰/۵۳۰	۰/۵۲۱	۰/۵۱۰	۰/۵۰۹
میزان جذب فسفات	۰	۰/۳۶۰	۰/۳۶۹	۰/۳۸۰	۰/۳۸۱



شکل۳- تکثیر قطعه ژنی 16S rDNA جدایه‌ها

Figure3- Amplification of 16S rDNA of isolates

جدول۴- اطلاعات مقایسه توالی قطعه ژنی 16S rDNA جدایه‌ها با بانک اطلاعاتی NCBI

Table4- Comparison of 16S rDNA gene sequence of isolates with NCBI Database

Isolate	Species	Similarity	Accession number
PRB 9	*Brevundimonas diminuta*	98%	KC252887.1
PRB 11	*Exiguobacterium sibiricum*	99%	NR075006.1
PRB 15	*Ochrobactrum grignonense*	99%	FJ950547.1
PRB 30	*Ochrobactrum anthropi*	99%	AJ867295.1

بحث و نتیجه‌گیری

وجود مواد مغذی به ویژه فسفات در فاضلاب از مهم‌ترین آلاینده‌های منابع آبی و از نگرانی‌های عمده زیست‌محیطی است. تقریبا ۲۵ درصد مشکلات آلودگی آب‌ها مربوط به وجود دو ماده مغذی فسفات و نیترات است (۱). فسفات موجود در فاضلاب در مقادیر اندک، در حد میکروگرم بر لیتر باعث رشد بی‌رویه جلبک‌ها می‌شود که این پدیده پیامدهایی هم‌چون کاهش اکسیژن محلول، تلف شدن آبزیان، تیرگی و کاهش کیفیت آب را دارد. علاوه بر آن، رشد بی‌رویه جلبک‌ها باعث افزایش میزان کلریناسیون در آب شده که این امر به نوبه خود باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان می‌شود (۲). در نتیجه حذف فسفات از فاضلاب در پایین‌ترین سطح ممکن اهمیت خاصی پیدا می‌کند. حذف فسفات در روش‌های بیولوژیکی با استفاده از میکروارگانیسم‌های حذف کننده فسفات صورت می‌گیرد. (۱۴). در این مطالعه باکتری‌های حذف کننده فسفات از پساب واحدهای تولیدی شهرک صنعتی آق‌قلا استان گلستان جداسازی شد و در سه جنس *برونـدیموناس*، *اوکروبکتـرم* و *اگزیگوبکتریوم* شناسایی گردید. به طور مشابه، هاپفر[1] و گلوس[2] (۱۵) و تاهریون و همکاران (۴) باکتری‌های *برونـدیموناس* و

1- Hupfer
2- Gloss

اگزیگوبکتریوم را از پساب جدا کردند و به عنوان باکتری‌های حذف کنندهٔ فسفات معرفی نمودند.

بردجانویک[1] و همکاران نیز باکتری‌های حذف‌کننده فسفات متعلق به جنس‌های *آکروموباکتر*[2]، *آسینتوباکتر*، *آگروباکتریم*[3]، *آلکالیژنز*، *بروندیموناس* و *باسیلوس*[4] را از فاضلاب کارخانه لبنیات در کشور صربستان جدا کردند. در بین این جدایه‌ها، *بروندیموناس* به‌عنوان جدایه برتر در حذف فسفات معرفی شد (۱۶).

کریشناسوامی[5] و همکاران موفق به جداسازی باکتری‌های حذف کننده فسفات *باسیلوس*، *سودوموناس*، *انتروباکتر* و *اکروموباکترم* از پساب سنتتیک تهیه شده به روش آزمایشگاهی شدند (۱۳).

پارک[6] و همکاران باکتری‌هایی از جنس *پانتوآ*[7]، *اوکروباکترم* و *انتروباکتر*[8] را از پساب جدا کردند که *اوکروباکترم* توانایی بالایی را در حذف فسفات نشان داد (۱۷).

رودریگز[9] و همکاران باکتری *اکزیگوباکتریم سیبیریکوم*[10] را از فاضلاب صنعتی کارخانه فرآوری سیب‌زمینی جدا کردند (۱۸).

مطالعات اخیر با مطالعه ما مطابقت داشت، به طوری که در مطالعه ما سه جنس *بروندیموناس*، *اوکروبکترم* و *اگزیگوبکتریوم* در بین ۳۰ جدایه، جدایه‌های برتر بوده و توانایی قابل ملاحظه‌ای را در حذف فسفات نشان دادند. اغلب باکتری‌های حذف کننده فسفات بنا بر مطالعات محققین اشاره شده، رشد سریع دارند. به طوری که، میزان جذب و حذف فسفات از محیط توسط باکتری‌ها با بالا بودن سرعت رشد ارگانیسم در واحد زمان افزایش می‌یابد (۱۳).

آن چه مسلم است جمعیت باکتری‌ها در فاضلاب‌ها و پساب‌های مختلف، متفاوت است. این امر، وابسته به نوع پساب، درجه حرارت، اسیدیته، و محل دفع پساب می‌باشد (۹). مطالعات انجام گرفته مبنی بر جداسازی باکتری‌های حذف کننده فسفات نشان داده است که اغلب این باکتری‌ها مزوفیل و هوازی هستند (۱۱) که این مساله با جدایه‌های باکتریایی در مطالعه ما نیز مطابقت داشت. بیشترین کارایی جدایه‌های ما در حذف فسفات در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط هوازی بود.

فسفات در میکروارگانیسم‌ها به دلایلی هم‌چون سنتز نوکلییک اسیدها، فسفولیپیدهای غشایی، سنتز آدنوزین تری فسفات (ATP) و ذخیره‌سازی انرژی مورد توجه واقع است (۳). به طوری که اهتمام این پژوهش نیز مبنی بر جداسازی باکتری‌هایی با عملکرد افزایش بیولوژیکی حذف فسفات در راستای حذف فسفات بود. باکتری‌های حذف‌کننده فسفات در محیط اختصاصی Seperb جامد که حاوی تری فسفات کلسیم به عنوان منبع فسفات بود، کشت داده شدند و بر اساس توانایی حذف فسفات با ایجاد هاله شفاف در محیط در مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه قطر هاله ناشی از حذف فسفات توسط باکتری‌ها از روز اول تا دهم روند افزایشی داشت. به‌طوری که بیشترین فعالیت حذف فسفات در روز دهم مشاهده شد. مکانیسم احتمالی حذف فسفات توسط این باکتری‌ها، جذب فسفات در سلول ارگانیسم به صورت گرانول‌های پلی‌فسفات به عنوان منبع انرژی است که با افزایش زمان تیمار باکتری‌ها، جذب فسفات نیز همراه با افزایش تولید توده زیستی[11] افزایش می‌یافت (۱۹).

بررسی نتایج آنالیز واریانس در سطح ۰/۰۵ نشان داد که بیشترین هاله ایجاد شده در تیمارهای PRP9،PRP11، PRP15 و PRP30 وجود دارد و بین این تیمارها تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری مشاهده نشد، ولی با سایر تیمارها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده شد.

پیشنهادات

در این پژوهش، باکتری‌های حذف کننده فسفات از پساب‌های مختلف صنعتی جداسازی و با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی تا حد گونه شناسایی شدند. با بررسی‌های به عمل آمده، این باکتری‌ها توانایی بالایی را در حذف فسفات از پساب دارند. لذا جدایه‌های معرفی شده، کاندیدای مناسبی برای زیست‌پالایی و زدودن فسفات از پساب هستند. با توجه به وجود صنایع مختلف در کشور و پساب‌های دفعی ناشی از آن‌ها، جداسازی باکتری‌های بومی بیشتر از پساب‌های صنایع مختلف و مطالعه میزان حذف فسفات توصیه و پیشنهاد می گردد.

1- Brdjanovic
2- *Achromobacter*
3- *Agrobacterium*
4- *Bacillus*
5- Krishnaswamy
6- Park
7- *Pantoea*
8- *Enterobacter*
9- Rodrigues
10- *Exiguobacterium sibiricum*
11- Biomass

منابع

1- Usharani, K. and Lakshman aperumalsamy, P., 2010. Bio-treatment of phosphate from synthetic wastewater using Pseudomonas sp YLW-7. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, Vol. 14, No. 2, pp. 75-80.

2- DebRoy, S., S. Das., S. Ghosh., S. Banerjee and D. Chatterjee et al., 2012. Isolation of nitrate and phosphate removing bacteria from various environmental sites. OnLine Journal of Biological Sciences, Vol. 12, No. 2, pp. 62-71.

3- Van Loosdrecht, M.C.M., C.M. Hooijmans., D. Brdjanovic., J.J. Heijnen., 1997. Biological phosphate removal processes. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 48, No. 3, pp. 289-296.

4- Taheriyoun, M., Karamouz, M., and Baghvand, A., 2010. Development of an entropy based fuzzy eutrophication index for reservoir water quality evaluation. Journal of Environmental Health Science and Engineering., Vol. 7, No. 1, pp. 1-14.

5- Cech, J.S., Hartman, P., 1993. Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems. Water Research., Vol. 27, No. 7, pp. 1219-1225.

6- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovskaya, T.V., 2004. The biochemistry of inorganic polyphosphates. 2th ed., New York, John Wiley & Sons.

7- Pasayeva, P., Gezqin, Y., Pekin, G., Eltem, R., 2011. Phosphate uptake performance of bacteria isolated from a full-scale Izmir municipal wastewater treatment plant. Environmental Technology., Vol. 32, No. 5-6, pp. 543-549.

8- Benammar, L., Menasria, T., Ayachi, A., Benounis, M., 2015. Phosphate removal using aerobic bacterial consortium and pure cultures isolated from activated sludge. Process Safety and Environmental Protection., Vol. 95, No. 1, pp. 237-246.

9- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., editors., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA)-American Water Works Association (AWWA)-Water Environment Federation (WEF). 1368 p.

10- Teimouri, M., Korori, S.A.A., Matinizadeh, M., and Khoshnevis, M., 2005. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Vaz forest soil. Pajouhesh & Sazandegi., Vol. 17, No. 65, pp. 57-64. [In Persian].

11- John, G.H., Noel, R.K., Peter, H.S., James, T.S., Stanley, T.W., 1997. Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology (In Russian). 9th ed. Moscow: Mir Publishers 2.

12- Sambrook, J., Russell, D., and Irwa, et al., 2001. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

13- Krishnaswamy, U., Muthusamy, M., and Perumalsamy, L., 2009. Studies on the Efficiency of the Removal of Phosphate Using Bacterial Consortium for the Biotreatment of Phosphate Wastewater. European Journal of Applied Sciences., Vol. 1, No. 1, pp. 6-15.

14- Hupfer, M., Gloess, S., Grossart, HP., 2007. Polyphosphate-accumulating microorganisms in aquatic sediments. Aquatic Microbial Ecology., Vol. 47, No. 3, pp. 299-311.

15- Hupfer, M., Glöss, S., Schmieder, P and Grossart, HP., 2008. Methods for Detection and Quantification of Polyphosphate and Polyphosphate Accumulating Microorganisms in Aquatic Sediments. International Review of Hydrobiology., Vol. 93, No. 1, pp. 1-30.
16- Brdjanovic, D., Hooijmans C.M., Van Loosdrecht, M.C.M., Alaerts, G.J., and Heijnen, J.J., 1996. The dynamic effects of potassium limitation on biological phosphorus removal. Water Research., Vol. 30, No. 10, pp. 2323-2328.
17- Park, J., Bolan, N., Megharaj, M., Naidu, R., 2010. Isolation of Phosphate-Solubilizing Bacteria and Characterization of Their Effects on Lead Immobilization. Pedologist, Vol. 53, No. 1, pp: 67-75.
18- Rodrigues, D.F., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M.F., Tiedje, JM., 2006. Characterization of Exiguobacterium isolates from the Siberian permafrost. Description of Exiguobacterium sibiricum sp. nov. Extremophiles, Vol. 10, No. 4, pp. 286-294.
19- Sidat, M., Bux, F and Kasan, H.C., 1999. Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. Water SA., Vol. 25, No. 2, pp. 175-179.