بررسی برخی ویژگی‌های الکتروسینتیک باکتری‌های شاخص در پژوهش‌های آلودگی خاک و آب

نصراله سپهرنیا [۱]، محمدعلی حاج‌عباسی[۲]، مجید افیونی[۲] و یورگ باخمن [۳]
۱ و ۲- دانش‌آموخته دکترا و استاد دکترا گروه خاک‌شناسی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۳- استاد دکترا گروه خاک‌شناسی، دانشگاه لایبنیز هانوفر، آلمان

چکیده

شناخت ویژگی‌های الکتروسینتیک باکتری‌ها اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های کنترل آلودگی آب و خاک، و زیست‌پالایی محیط-های زیرسطحی دارد. از این‌رو در این پژوهش بار سطحی، آب‌گریزی و فاکتور شکل باکتری‌های *ایشریشاکولی* و *رودوکوکوس اریتروپولیس* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بار سطحی و آب‌گریزی باکتری *رودوکوکوس اریتروپولیس* بیشتر از باکتری *ایکولای* بود ($p<۰/۰۰۱$). همچنین بار هر دو باکتری در آب مقطر بیش از محلول ۱۰ میلی مولار برومید شد ($p<۰/۰۰۱$). بررسی شکل و اندازه باکتری‌ها ثابت کرد اندازه *ایکولای* به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) بزرگتر از *رودوکوکوس اریتروپولیس* بود. به طور کلی، تفاوت در ویژگی‌های بررسی شده می‌تواند نقش مهمی در چگونگی جذب و انتقال باکتری‌ها در محیط‌های متخلخل داشته باشند.

واژه های کلیدی: آب‌گریزی، پتانسیل زتا، فاکتور شکل، *ایشریشاکولی*، *رودوکوکوس اریتروپولیس*

مقدمه

آلودگی باکتریایی آب‌های آشامیدنی یکی از مهم‌ترین مشکلات در بیشتر کشورهای دنیا است. بر اساس سازمان جهانی بهداشت، بیماری‌های آب‌زاد سالانه باعث مرگ میلیون‌ها نفر در سرتاسر دنیا می‌شوند (Unc, 2002). افزایش فعالیت‌های کشاورزی و توسعه مناطق شهری سهم بسیار زیادی در تخریب کیفیت آب‌های سطحی و زیرسطحی داشته است. بنابراین شناخت و بررسی اقدام‌های مدیریتی و استراتژیک از فاکتورهای کلیدی در جلوگیری از تخریب کیفیت منابع آبی است (Schinner et al., 2010).

توسعه سیاست‌های حفاظت از آب‌های سطحی و زیرسطحی نیازمند ارتقاء دانش در مورد فرآیندهای اولیه کنترل کننده انتقال و سرنوشت آلاینده‌های بیولوژیکی و غیربیولوژیکی است (Schinner et al., 2010). به این منظور پژوهش‌ها در زمینه ویژگی‌های سطحی و فیزیکی ریزجاندران همیشه مورد توجه پژوهشگران بوده است. اما چنین اطلاعاتی با توجه به تنوع ریزجانداران آلاینده هنوز ناکافی است. در این راستا شناخت ویژگی‌های باکتری‌های غیرآلاینده نیز از اهمیت ویژه‌ای در موفقیت برنامه‌های زیست‌پالایی محیط‌های زیرسطحی دارد. به طوری‌که یکی از مهم‌ترین مسائل در موفقیت این پروژه‌ها، رسیدن باکتری‌های مورد نظر به ناحیه آلوده است (Dong et al., 2002). پژوهش‌های مختلف نشان داده است ویژگی‌های بیولوژیک نقش بسیار مهمی در جذب باکتری‌ها روی سطح ذرات دارند (Schinner et al., 2010). از این رو این پژوهش به بررسی و مقایسه اندازه، شکل، بار سطحی (پتانسیل زتا) و آب‌گریزی سلول باکتری‌های *ایشریشاکولی* (*ایکولای*) و *رودوکوکوس اریتروپولیس* به عنوان دو سویه شاخص در برنامه‌های کنترل آلودگی آب و خاک پرداخته است.

مواد و روش‌ها

برای تعیین بار سطحی، اندازه و شکل باکتری‌ها، سوسپانسیون‌هایی حاوی باکتری‌های *ایکولای* و *ردوکوکوس اریتروپولیس* آماده شد. به این ترتیب که سوسپانسیون‌هایی با غلظت باکتری ($CFU\ mL^{-1}$) $۱/۰۰\times۱۰^{۸}$ و ۱۰ میلی‌مول برومید (KBr) مخلوط شدند. همچنین به منظور بررسی اثر محیط محلول بر ویژگی‌های الکتروسینتیک باکتری‌ها، سوسپانسیون‌هایی بدون حضور برومید پتاسیم آماده و اندازه باکتری‌ها تعیین شد.

طول و عرض سلول باکتری‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (Axio Imager. M2, Carl Zeiss) اندازه‌گیری شده و با استفاده از نرم افزار (AxioVison, Carl Zeiss) و ارزیابی صد سلول، فاکتور شکل (قطر کروی معادل) باکتری تعیین شد (Schinner et al., 2010). بار سطحی (پتانسیل زتا) باکتری‌ها در سوسپانسیون‌های مورد نظر در دمای ثابت ۲۰ درجه سلسیوس با استفاده از ZetaSizer (ZetaPALS, Brookhaven Instruments Crop) تعیین شد. وضعیت آب‌گریزی سطح باکتری‌ها با استفاده از آزمایش چسبندگی میکروب (باکتری) به هیدروکربن‌ها تعیین شد (Park et al., 2010). در این آزمایش ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر در ۱۳ لوله آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر ان-هگزادیکان ریخته و به مدت دو دقیقه مخلوط شدند. به مدت ۳۰ دقیقه به فاز آب و هیدروکربن اجازه داده شد تا دو فاز از یکدیگر جدا شوند. سپس ۱ میلی‌لیتر از فاز آب هر لوله جهت تعیین غلظت باکتری‌ها برداشت شد و درصد آب‌گریزی باکتری‌ها با استفاده از فرمول ۱ زیر محاسبه شد (Park et al., 2010):

$$\text{Hydrophobicity} = \left(\frac{C_0 - C_{30}}{C_0}\right) \times 100 \qquad (۱)$$

که C_0: غلظت اولیه باکتری و C_{30}: غلظت باکتری در فاز آبی پس از ۳۰ دقیقه جدا شدن از هیدروکربن است.

مقایسه ویژگی‌های مورد مطالعه (بار سطحی، آب‌گریزی، طول، عرض و فاکتور شکل) دو باکتری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمون LSD (α=۰/۰۱) در نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های الکتروسینتیک دو باکتری مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. به طور متوسط *رودوکوکوس اریتروپولیس* سطوح بار منفی بیشتری (۴۴/۳۹- میلی ولت) در مقایسه با *ایکولای* (۳۳/۰۵- میلی ولت) در محلول ۱۰ میلی‌مولار برومید داشت. کاروالهو و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند بار سطحی *رودوکوکوس* با توجه به اجزای محلول محیط، می‌تواند از ۳۵/۸- تا ۴/۷+ میلی ولت تغییر کند. نتایج اندازه‌گیری پتانسیل زتا *ایکولای* هماهنگ با نتایج گزارش شده توسط پناگوندا (۲۰۰۸) بود. ژائو و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که پتانسیل زتا *ایکولای* در pH =۷ برابر ۶۷/۵۰- میلی‌ولت است.

جدول ۱- میانگین ویژگی‌های الکتروسینتیک باکتری *ایکولای* و *رودوکوکوس اریتروپولیس*

ویژگی باکتری	پتانسیل زتا ۱*** (میلی‌ولت)	پتانسیل زتا ۲*** (میلی‌ولت)	آب‌گریزی*** (٪)	طول سلول*** (میکرون)	عرض سلول*** (میکرون)	فاکتور شکل*** -
الف	۳۸/۲۳- (±۱/۸۰)	۳۳/۰۵- (±۰/۹۹)	۱۱/۰۰ (±۳/۳۰)	۲/۰۵(±۰/۲۳)	۱/۲۰ (±۰/۲۰)	۰/۵۹ (±۰/۱۳)
ب	۶۸/۳۳- (±۱/۲۳)	۴۴/۳۹- (±۱/۵۷)	۷۳/۰۰ (±۴/۸۰)	۱/۴۷ (±۰/۳۳)	۱/۱۰ (±۰/۲۰)	۰/۷۷ (±۰/۱۷)

الف و ب: به ترتیب باکتری *ایکولای* و *رودوکوکوس اریتروپولیس*، پتانسیل زتا ۱ و ۲ به ترتیب اندازه‌گیری شده در آب مقطر و محلول ۱۰ میلی مولار برومید، فاکتور شکل نسبت عرض به طول سلول، *** بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح آماری ۰/۱ درصد است.

بارهای هر دو باکتری *ایکولای* و *رودوکوکوس اریتروپولیس* در آب مقطر، به طور معنی داری ($p<$۰/۰۰۱) متفاوت از محلول ۱۰ میلی مولار برومید بود. این نتیجه نشان می‌دهد بخشی از یون‌های موجود در محلول توسط بارهای سطحی خنثی شده‌اند. لی و همکاران (۲۰۱۵) نتیجه گرفتند که در غلظت‌های بالای کاتیون‌ها و آنیون‌های دو ظرفیتی بخشی از بارهای

ایکولای توسط یون‌ها خنثی شده و پتانسیل زتای *ایکولای* را تغییر می‌دهند. *رودوکوکوس اریتروپولیس* میزان بارهای سطحی بیشتری در دو محیط آب مقطر و ۱۰ میلی مولار برومید داشت. اما بارهای سطحی آن در ۱۰ میلی مولار بیشتر از *ایکولای* تحت تأثیر قرار گرفت. نتایج مقایسه آب‌گریزی هر دو باکتری نشان داد به طور متوسط، سلول‌های *ایکولای* و *رودوکوکوس اریتروپولیس* به ترتیب ۱۱٪ و ۷۳٪ آب‌گریز هستند ($p<۰/۰۰۱$). این نتایج ثابت کرد بیشتر بارهای سطحی موجود بر *رودوکوکوس اریتروپولیس*، نسبت به بارهای کمتر موجود در سطح *ایکولای* آب‌گریزترند. در برخی مطالعات گزارش شده است در صورت چسبیدن ۷۰٪ سلول باکتری‌ها به هیدروکربن، سویه مورد نظر شدیداً آب‌گریز محسوب می‌شود (Park et al., 2010). حمدی و لاتراخه (۲۰۰۸) آب‌گریزی *ایکولای* را بین ۰ تا ۴/۵۶ درصد گزارش کردند. چانگ و همکاران (۲۰۰۹) آب-گریزی *رودوکوکوس* را ۶۸٪ گزارش کردند. بنابراین نتایج ثابت کرد که آب‌گریزی و پتانسیل زتا، می‌توانند رابطه نسبتاً مستقیمی داشته باشند.

بررسی شکل و اندازه باکتری‌ها ثابت کرد ابعاد *ایکولای* و *رودوکوکوس اریتروپولیس* متفاوت از یکدیگر بودند ($p<۰/۰۰۱$). میانگین اندازه *ایکولای* به طور معنی‌داری بزرگتر (۲/۱۷ میکرون) از *رودوکوکوس* (۱/۴۵ میکرون)، اما عرض باکتری‌ها تقریباً برابر بود (جدول ۱). فاکتور شکل سلول برای *ایکولای* انحراف بیشتری از حالت کروی در مقایسه با *رودوکوکوس اریتروپولیس* داشت. بنابراین اندازه‌گیری‌ها ثابت کرد *ایکولای* و *رودوکوکوس اریتروپولیس* به ترتیب میله‌ای و گرد هستند. برگ (۲۰۰۳) گزارش کرد طول و عرض *ایکولای* به ترتیب ۲/۵ و ۰/۸ میکرون است. چانگ و همکاران (۲۰۰۹) ابعاد *رودوکوکوس* را ۱/۵ تا ۳ میکرون گزارش کردند. بلاشتر و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که *ایکولای* میله‌ای شکل، و طول آن ۲/۲ میکرون است. در این آزمایش عرض دو باکتری برخلاف طول آن‌ها تحت تأثیر سوسپانسیون ۱۰ میلی مولار برومید قرار گرفت و دو برابر شد.

به طور خلاصه نتایج نشان داد ویژگی‌های الکتروسینتیک سویه‌های مورد بررسی متفاوت بوده و تحت تاثیر شیمی محیط محلول است. بنابراین اثر این ویژگی‌ها بر جذب و انتقال باکتری‌ها در محیط‌های متخلخل قابل توجه خواهد بود. از این‌رو پیشنهاد می‌شود در برنامه‌های زیست‌پالایی به منظور حذف آلاینده‌ها از آب و خاک، نقش ویژگی‌های الکتروسینتیک باکتری-ها مورد توجه قرار گیرد.

منابع

Berg H.C. 2003. *E. coli* in Motion. Library of Congress Cataloging in Publication Data. New York.147 pp.

Bolster C.H., Walker Sh.L., and Cook K.L. 2006. Comparison of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* transport in saturated porous media. Journal of Environmental Quality, 35: 1018–1025.

Carvalho C.C.C. R., Wick L.Z., and Heipieper H.j. 2009. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology, 82: 311–320.

Chang W.N., Liu Ch.W., and Liu H.Sh., 2009. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of Rhodococcus erythropolis. Process Biochemistry, 44: 955–962.

Dong H., Rothmel R., Onstott T.C., Fuller M.E., DeFlaun M.F., Streger Sh. H., Dunlap R., and Fletcher M.S. 2002. Simultaneous transport of two bacterial strains in intact cores from Oyster, Virginia: biological effects and numerical modeling. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2120–2132.

Hamadi F., and Latrache H. 2008. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor–electron acceptor (acid–base) properties of bacterial surface. Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 65: 134–139.

Li X., Xue X., and Pashley R.M. 2015. A study of the surface charging properties of a standard strain of *Escherichia coli* (ATCC 11775) in aqueous solutions. Colloids Surfaces B: Biointerfaces. 135: 811–816.

Park S.J., Kim S.B., and Kim K.W., 2010. Analysis of bacterial cell properties and transport in porous media. Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 45: 682–691.

Penagonda V., Hilton A.C., and Chen G., 2008. Impact of Lipopolysaccharide Extraction on Bacterial Adhesion and Transport. Journal of Adhesion Science and Technology. 22: 10–11.

Unc A. 2002. Importance of manure properties for the vadose zone transport and survival of manure bacteria. Ph.D. Thesis. Univ. Guelph, Guelph, Ont., Canada.

Zhao W., Liu X., Huang Q., Walker Sh.L., and Cai P. 2012. Interactions of pathogens *Escherichia coli* and *Streptococcus suis* with clay minerals. Applied Clay Science, 69: 37–42.

Investigation of some electrokinetics properties of the indicator bacteria in soil and water studies

N. Sepehrnia[1], M.A. Hajabbasi[2], M. Afyuni[2], M.R. Mosaddeghi[2] and J. Bachmann[3]
1and 2- Graduated PhD and Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, 3- Professor, Institute of Soil Science, Leibniz Universität Hannover, Germany

Abstract
Understanding the bacterial electrokinetics properties is of great importance for successful implementation in management practices of soil and water contaminations, i.e., bioremediation and bioaugmentation. In this regard, this study was conducted to assess the surface charges, hydrophobicity and shape factor of *Escherichia coli* and *Rhodococcus erythropolis*. The results showed that *Rhodococcus erythropolis* had higher surface charges and hydrophobicity than *Escherichia coli* ($p<0.001$). Both bacteria had higher negative surface charges in distilled water compared to the 10 mM Br^-($p<0.001$). Furthermore, the measurements proved that *Escherichia coli* was bigger in size if compared with *Rhodococcus erythropolis* ($p<0.001$). Overall the differences between the electrokinetic properties of bacteria can be important in transport and retention mechanisms through porous media.

Key words: Hydrophobicity, Zeta potential, Shape factor, *Escherichia coli*, *Rhodococcus erythropolis*