جداسازی وغربالگری میکروارگانیسم‌های مقاوم به غلظت‌های مختلف ارسنیک سه ($HAso_4.7H_2O$) (Na_2

لیلا حیدرپور [۱]، علی اشرف سلطانی طولارود [۲]، اسماعیل گلی کلانپا [۳]
۱ - دانشجوی کارشناسی ارشدبیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه محقق اردبیلی، ۲- استادیار دانشگاه محقق اردبیلی،۳ -استادیار دانشگاه محقق اردبیلی

چکیده
در این تحقیق، ۱۹ سویه مقاوم به فلز سنگین آرسنیک سه از ۴ نمونه خاک آلوده اطراف معدن زرشوران شهرستان تکاب به این فلز سنگین جداسازی گردید و به ترتیب در غلظت‌های ۵۰۰،۷۵۰، ۱۰۰۰،۱۲۵۰،، ۱۵۰۰،۱۷۵۰و ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر آرسنیک سه رشد داده شدند. بررسی جذب سویه‌ها در هفت غلظت ۵۰۰،۷۵۰، ۱۰۰۰،۱۲۵۰،۱۵۰۰، ۱۷۵۰و ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر نشان داد که سویه‌های AHG۱۵،AHG-۷،AHG-۶، AHG-۵ ، AHG-۴ ، AHG-۲ ، AHG-۱ بالاترین میزان جذب را داشته است. از این‌رو سویه‌های AHG۱۵ ،AHG-۷،AHG-۶، AHG-۵ ، AHG-۴ ، AHG-۲ ، AHG-۱ با بالاترین میزان مقاومت و راندمان حذف به عنوان سویه مقاوم به فلز سنگین آرسنیک سه انتخاب گردید.

واژه‌های کلیدی: غربالگری، سویه مقاوم به فلز سنگین آرسنیک سه، نمونه خاک آلوده به آرسنیک ،معدن زرشوران تکاب

مقدمه
فلزات سنگین از مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی هستند که طی عملکردهایی نظیر استخراج معادن، ورود پساب‌های کارخانه‌های صنعتی از جمله کارخانه‌های رنگ و رزین، نساجی،صمغ و دباغی به محیط زیست وارد می‌گردند و باعث آلودگی اکوسیستم‌های طبیعی می‌شوند. به دلیل گسترش روزافزون صنایع و توسعه شهرها، ورود این فلزات به محیط زیست نیز افزایش یافته است و به همین جهت روز به روز بر اهمیت کنترل آلودگی محیط زیست افزوده می‌گردد. به دلیل عدم کارآیی و صرفه اقتصادی، روش‌های فیزیکی و شیمیایی که برای حذف یون‌های فلزی از خاک‌های آلوده طراحی شده‌اند عملا هزینه بر هستند (اسپین و همکاران، ۲۰۰۳). آرسنیک یک شبه فلز سمی است که به طور طبیعی و بر اثر فرآیندهایی مانند هوادیدگی، فعالیتهای آتشفشانی و انسانی در مقادیر مختلف در محیط زیست وجود دارد. از نظر مقدار بیستمین عنصر پوسته جامد زمین بوده و در بیش از ۲۴۵کانی و در گسترهای وسیع و غلظتهای مختلف در سنگ‌های معدنی از جمله سولفیدها و همراه با مس، نیکل، سرب، کبالت و سایر فلزات مشاهده شده است (ماهیمایراجا، ۲۰۰۵).

شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات نقش مهمی را در رابطه با آلودگی محیط و نهایتا تیمار این محیطها ایفا می‌کنند. با توجه به سطوح غلظت بسیار بالای برخی از فلزات در خاک‌ها و به طور کلی در محیط‌های آلوده به فلز،میکروارگانیسم‌ها مکانیسم‌های مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی می‌شوند. معمولا این میکروارگانیسم‌ها در نتیجه تماس با محیط‌های آلوده به فلز ظاهر می‌شوند که محیط‌های آلوده به طور اتفاقی می‌توانند باعث انتخاب همزمان فاکتورهای مقاومت با تحول و دگرگونی در ساختار ژنتیکی میکروارگانیسم با تغییر در عملکرد آن‌ها شوند. برحسب میزان آلودگی ممکن است ظرفیت پلاسمیدی یا ساختار سلولی آن‌ها تغییر یابد تا آنجا که قدرت تحمل غلظت‌های بالاتر ترکیبات سمی را نیز داشته باشند و به عبارت دیگر با غلظت‌های بالاتر نیز سازگاری پیدا کنند. از طرف دیگر میکروارگانیسم‌های مقاوم قادرند با انتقال ژنتیکی به سویه‌های دیگر سبب گسترش مقاومت گردند(ورما و همکاران، ۲۰۰۱).

هدف از این تحقیق جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک سه و تعیین درصد مقاومت آن‌ها به این فلزسمی بوده است.

به طور کلی سازگاری، تغییر در یک ارگانیسم یا جمعیتی از ارگانیسم‌هاست که به واسطه آن با شرایط محیطی موجود سازگارتر می‌شود. سازگاری ژنتیکی معمولا شامل جهش و انتخاب است. جهش یافته‌هایی که از لحاظ ژنتیکی با شرایط موجود سازگارتر باشند باقی مانده و تکثیر می‌شوند.

۲- مواد و روش‌ها
۲-۱- نمونه برداری
۴ نمونه خاک از خاک‌های آلوده اطراف معدن زرشوران شهرستان تکاب تهیه شده و در یک فلاسک یخ به آزمایشگاه منتقل شد، غلظت فلز سنگین آرسنیک با دستگاه ICP قرائت شد، غلظت آرسنیک کل در نمونه‌ها بین ۱۶.۱۲۰تا ۸۹۷.۵۸ میلی‌گرم در کیلوگرم بود.

۲-۲- جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک سه

یک گرم خاک مرطوب در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک(Nacl۰.۹%)حل و به مدت ۳۰ دقیقه شیک شد. ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسون خاک حاصل به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت BSMY باترکیب زیر: ۱گرم عصاره مخمر، ۰.۳گرم. ۰.۱۴ ، $(NH_4)_2SO_4$ گرم $MgSO_4.7H_2O$ گرم ۰.۲ ، $CaCl_2.2H_2O$ گرم ۰.۱ ، Nacl ۰.۵ گرم K_2HPO_4 ،KH_2PO_4 ۰.۵ گرم ۰.۰۶ میلی گرم H_3BO_3 ، ۰.۱۷ میلی گرم $CoCl_2.6H_2O$ ، ۰.۰۹ گرم $CuCl_2.2H_2O$ ، ۰.۱ میلی گرم $Cl_2.4H_2O$ ، Mn ۰.۲۲ میلی گرم $ZnCl_2$ ، ۰.۱۰ گرم گلوکز با pH=۷، حاوی ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آرسنیک پنج و در ۳۰°C با دور ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت دو روز انکوبه گردید. سپس ۵ میلی لیتر از این سوسپانسون به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت BSMY جدید حاوی ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آرسنیک پنج انتقال داده شده و مجددا انکوبه گردید. عمل انتقال از این محیط کشت به محیط کشت جدید BSMY حاوی ۵۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر آرسنیک پنج دو بار به منظور غنی سازی انتقال داده شد. به منظور جداسازی کلونی‌های مقاوم به آرسنیک سه، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت غنی شده برروی پلیت‌های حاوی محیط کشت BSMY آگار با ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آرسنیک پنج پخش شد و پلیت‌هادر دمای °C ۳۰به مدت دو روز انکوبه گردید. جدایه‌های دارای مقاومت بالا در پلیت ظاهر شده که برای استفاده‌های بعدی ذخیره شد (آپاراجیتا و همکاران،۲۰۱۳).

۲-۳- تعیین مقاومت سویه‌های جداسازی شده

به منظور تعیین مقاومت سویه‌های جداسازی شده نسبت به آرسنیک سه،سویه‌ها در ۱۵ میلی لیتر محیط کشت BSMY حاوی ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰، ۲۰۰۰میلی گرم در لیتر آرسنیک سه در دمای °C ۳۰به مدت ۳ روز رشد داده شد. میزان رشد با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ظاهر شدن رشد با علامت+و در غیر این‌صورت با علامت ـ مشخص شد.

۳-نتایج و بحث

نتایج حاصل از تعیین مقاومت سویه‌ها به غلظت‌های مختلف آرسنیک سه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱-توانایی مقاومت سویه‌های جداسازی شده به آرسنیک سه بعد از۳ روز انکوباسیون

سویه		$mg.l^{-1}$	سه	آرسنیک	غلظت		
	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۲۵۰	۱۵۰۰	۱۷۵۰	۲۰۰۰
AHG-۱	+	+	+	+	+	+	+
AHG-۲	+	+	+	+	+	+	+
AHG-۳	+	-	-	-	-	-	-
AHG-۴	+	+	+	+	+	+	+
AHG-۵	+	+	+	+	+	+	+
AHG-۶	+	+	+	+	+	+	+
AHG-۷	+	+	+	+	+	+	+
AHG-۸	+	+	-	-	-	-	-
AHG-۹	+	+	-	-	-	-	-
AHG-۱۰	+	+	-	-	-	-	-
AHG-۱۱	+	+	+	+	+	-	-

AHG-۱۲	+	+	+	+	-	-	-
AHG-۱۳	+	+	+	+	-	-	-
AHG-۱۴	+	+	+	-	-	-	-
AHG-۱۵	+	+	+	+	+	+	+
AHG-۱۶	+	+	-	-	-	-	-
AHG-۱۷	+	-	-	-	-	-	-
AHG-۱۸	+	+	+	+	-	-	-
AHG-۱۹	+	+	+	+	-	-	-

*علامت + برای سویه‌های رشد کرده و علامت – برای سویه‌های رشد نیافته

بررسی جذب سویه‌ها در هفت غلظت ۲۰۰۰،۱۷۵۰،۱۵۰۰،۱۲۵۰،۱۰۰۰،۷۵۰،۵۰۰میلی گرم در لیتر نشان داد که سویه‌های AHG۱۵،AHG-۷،AHG-۶، AHG-۵ ، AHG-۴ ، AHG-۲ ، AHG-۱ ،بالاترین میزان جذب را داشته است.از این‌رو سویه‌های ، AHG-۲ ، AHG-۱ AHG۱۵، AHG-۷، AHG-۶، AHG-۵ ، AHG-۴ با بالاترین میزان مقاومت و راندمان حذف به عنوان سویه مقاوم به فلز آرسنیک سه انتخاب گردید .در تحقیقی که آپاراجیتا و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند ،نتایج مشابهی بدست آمد.

این پژوهش به منظور ارزیابی توان میکروارگانیسم‌ها در جذب فلزات سنگین و سمی انجام شد. افزایش بازده کاربرد میکروارگانیسمها در حذف فلزات سنگین مخصوصا فلز سنگین آرسنیک سه از محیط‌های طبیعی با تعیین میانگین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد بسیار راه‌گشا بوده و امکان مدیریت بهتر و کارایی بالاتری را در این زمینه فراهم می‌سازد(هودچی و همکاران، ۲۰۱۰).

منابع

Aparajita M.,Sagarmoy G.,Niharendu S.,S.C.kole and suparadip S.(۲۰۱۳).Arsenic accumulating bacteria bacteria isolated from tannery effluent." Bioresource Tech., ۷۸, ۳۱-۳۵.

Fillali, B.K., Taoufik, J., Dzairi, F.Z., Talbi, M., and Blaghen, M. (۲۰۰۰). "Wastewater bacterial isolated from soil for possible application in bioremediation.Journal of environmental biology.۳۴,۸۴۱-۸۴۶

Hoodchi M, Tahmourespour A, Azadani N A. Determine the threshold of bacteria, lead, zinc, cadmium in industrial wastewater. Ecology ۲۰۱۰; ۵۶(۳۶): ۷۵-۸۶.[In Persian].

Mahimairaja S, Bolan NS, Adriano DC and Robinson B, ۲۰۰۵. Arsenic contamination and Its risk management. Adv Agron ۸۶:۱-۸۲.

Richards BK and Steenhuis TS, ۱۹۹۸. Metal mobility at an old heavy metal loaded sluge application site. Environ poll۹۹:۳۶۵-۳۷۷.

Spain, A., and Alm, E. (۲۰۰۳). "Implication of microbial heavy metal tolerance in the environment." Reviews in Undergraduate Research, ۲,۱-۶.

Verma, T., Srinath, T., Gadpayle, R.U., Ramteke, P.W., and Hans, R.K. (۲۰۰۱). "Chromate tolerant isolates resistant to heavy metals and antibiotics." Curr. Microbio., ۴۱, ۱۵۱-۱۵۶.

Abstract

In this study, ۱۹ strains resistant to heavy metal arsenic contaminated soils around mine Zarshuran three of the four city Takab to heavy metal concentrations were isolated and ۵۰۰,۷۵۰, respectively, ۱۰۰۰.۱۲۵۰ ۱۵۰۰.۱۷۵۰ and ۲۰۰۰ mg per liter of arsenic,, Tuesday were grown. Check absorb strains in seven of ۵۰۰,۷۵۰, ۱۰۰۰,۱۲۵۰ , ۱۵۰۰, ۱۷۵۰ and ۲۰۰۰ mg per liter, showed that strains AHG-۱, AHG-۲, AHG-۴, AHG-۵, AHG-۶, AHG-۷, AHG۱۵ had the highest absorption rate. Thus strains AHG-۱, AHG-۲, AHG-۴, AHG-۵, AHG-۶, AHG-۷, AHG۱۵ maximum strength and removal of the heavy metal arsenic resistant strains were three options.

Key words: screening of strains resistant to heavy metal arsenic (III) , soil samples contaminated with arsenic, mining Zarshuran Takab