محور مقاله: آلودگی زیست بوم، سلامت انسان و زیست پالایی

جداسازی باکتری‌های مقاوم و جاذب روی از پساب آلوده در شهرستان زنجان

محمدعلی حسنلوئی[۱]، فروزان قاسمیان رودسری[*۲]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم محیط‌زیست دانشگاه زنجان

[*۲] استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه زنجان

چکیده

فلزات سنگین با تجمع در زنجیره غذایی مشکلات عدیده‌ای را برای موجودات زنده به وجود می‌آورندو هنگامی‌که غلظت این فلزات در محیط پایین باشد، از روش‌های بیولوژیکی برای پاک‌سازی استفاده می‌شود. هدف این پژوهش شناسایی گونه‌های باکتریایی جاذب روی از پساب-های آلوده جنوب شهر زنجان است. برای این منظور ۲۰ نمونه پساب آلوده جمع‌آوری و حداقل غلظت مهارکننده رشد در باکتری‌های جداشده بر روی محیط کشت شامل غلظت‌های ۲۰۰ تا ۳۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات روی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج سویه‌های جداشده باکتریایی مقاومت بالای ۱۸ ایزوله را نشان داد. ایزوله‌های Z1، Z8، Z10، Z13 و Z25 در محیط کشت حاوی سولفات روی تا غلظت ۳۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد کردند. ایزوله‌های Z1 و Z13 تا ۱۵۰۰، Z25 تا ۲۰۰۰ و Z8 و Z10 تا ۳۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد را نشان دادند. ایزوله Z13 با جذب معادل ۱۸۶/۰۸ بیشترین مقدار جذب روی را در بین پنج ایزوله دیگر داشت. مطالعات فیلوژنتیکی نشان داد که این ایزوله متعلق به جنس *Sphingomonas sp.* است، که با سویه‌های گزارش‌شده تابه‌حال تفاوت دارد. با توجه به آستانه تحمل بالای سویه Z13 می‌توان از آن به‌عنوان جاذب زیستی مناسب در حذف آلاینده روی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: پاک‌سازی زیستی، باکتری‌های مقاوم، روی، زنجان

مقدمه

امروزه در نتیجه فعالیت‌های انسان از قبیل استخراج معادن، فعالیت‌های ذوب فلزات، صنایع خودروسازی، صنایع باطری‌سازی، تولید انرژی، سوخت، کودها، فاضلاب شهری و صنعتی و کاربرد علف‌کش‌ها، مشکلات بسیار زیاد زیست‌محیطی ایجادشده است (). آلودگی فلزات سنگین ناشی از منابع شهری، صنعتی و کشاورزی به‌عنوان یک مشکل عمده زیست‌محیطی در حواشی شهرها محسوب می‌گردد و تجمعشان در زنجیره غذایی منجر به مشکلات جدی برای سلامت موجودات زنده می‌شود (Kabata-Pendias, 2000)؛ این فلزات از نظر بیولوژیکی سمّی بوده و به‌صورت پایدار در محیط باقی می‌مانند. فلزات سنگین جذب خاک و رسوبات شده و به‌تدریج میکروارگانیسم‌هایی که در معرض این فلزات قرار دارند نسبت به آن‌ها مقاوم می‌شوند (کرمانشاهی و همکاران، ۱۳۷۷). فلزات سنگین در غلظت کم برای رشد سلولی و فعالیت‌ها متابولیکی ضروری هستند اما در غلظت‌های بالا و بیشتر از حد مجاز سبب جلوگیری از واکنش‌های بیولوژیکی می‌شوند (Hughes and Poole, 1989). فلز روی یک عنصر اساسی برای موجودات زنده است و باعث افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌ها می‌شود و روزانه از طریق مواد غذایی مختلف تقریباً ۱۰ تا ۱۵ میلی‌گرم به بدن انسان وارد می‌شود. مقدار کل روی در بدن انسان بالغ، در حدود ۲ گرم تخمین زده‌شده است و معمولاً در هیچ عضوی به‌طور اختصاصی تجمع نمی‌یابد. روی در گستره زیادی از پردازش‌های سلولی نقش دارد و به ثبات ساختار مولکولی کمک کرده و در بیش از ۳۰۰ آنزیم به‌عنوان کوفاکتور عمل می‌کند (McCall et al.,2000). عنصر روی نقش مهمی در بیان ژن‌های که به روی وابسته هستند، دارد. عنصر روی اگرچه بیشتر در زنجیره تنفسی هوازی وجود دارد، ولی دارای اثرات سمی نیز بوده و به‌عنوان مختل‌کننده سیستم بیولوژیکی نیز عمل می‌کند (Hynninen.,2010). در پروکاریوت‌ها مکانیسم‌های اصلی برای مقابله با افزایش عنصر روی شامل روش‌های تنظیم‌شده‌ای هستند که این عنصر را وارد سلول کرده و یون‌های فلز را با روشی به نام متالوچاپرون[1] تجزیه و از غشای سیتوپلاسمی خارج می‌کند (Blencowe and Morby, 2003). بررسی‌ها نشان داده است که روش‌های شیمیایی و فیزیکی حذف این آلاینده‌ها مانند اکسیداسیون، احیاء، رسوب دادن شیمیایی، فیلتراسیون، تیمار الکتروشیمیایی، تبخیر، تبادل یونی و فرایندهای اسمز معکوس محدودیت‌هایی دارند و ازنظر اقتصادی نیز مقرون‌به‌صرفه نیستند. زیرا این روش‌ها برای تصفیه پساب‌های حاوی مواد آلی پیچیده مناسب نیست و زمانی که غلظت فلزات سنگین در حد خیلی کم باشد این روش‌ها کارایی چندانی ندارند (کریم سلطانی و همکاران،۱۳۸۷). از طرفی دیگر حذف این فلزات سنگین از محیط بسیار ضروری است. پاک‌سازی زیستی یک راه کار جهت رفع آلودگی‌های زیست‌محیطی به‌وسیله فرایندهای بیولوژیکی است و شامل هر نوع عملکردی است که در آن از میکروارگانیسم‌ها و موجودات مختلف مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، کرم‌ها، مخمرها، آنزیم‌ها و گیاهان سبز جهت بازگرداندن محیط طبیعی تغییریافته توسط آلاینده‌ها به

*ایمیل نویسنده مسئول:f-ghasemian@znu.ac.ir

[1] Metallochaperron

شرایط اولیه آن استفاده می‌گردد (Kabata-Pendias, 2000). پاک‌سازی فلزات سنگین از پسابهای زائد از اهداف مهم مهندسی زیست‌محیطی است. برخی از میکروارگانیسم‌ها زمانی که می‌که در معرض غلظت بالای فلزات سنگین نظیر مس، روی و کلسیم قرار می‌گیرند، در پاسخ مولکول‌های پروتئینی کوچک غنی از سیستئین به نام متالوتیونیین‌ها[1] تولید می‌کنند. متالوتیونیین‌ها تمایل و ظرفیت بالایی برای اتصال به یون‌های فلزات سنگین دارا هستند. Liu و همکاران (2003) انواع متالوتیونئین‌ها را در اشرشیا کلی کلون و بیان نموده‌اند که رابطه مستقیمی بین میزان متالوتیونیین بیان‌شده و تجمع عناصر مس، کادمیم و روی در درون سلول باکتری مشاهده‌شده است. مطالعه انتقال، ژنتیک و مکانیسم‌های متفاوت به فلزات سنگین در باکتری‌ها ممکن است در درک عملکرد فیزیولوژی سلول‌ها و افزایش دادن توانایی میکروارگانیسم‌ها برای خارج کردن یون‌های فلزی زیان‌آور مفید باشد. ازاین‌رو امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای پاک‌سازی محیط از فلزات سنگین یک راه حل طبیعی، پایدار و اقتصادی است. در شرایط وجود غلظت‌های بالای آلاینده‌های فلزی در محیط‌های طبیعی باکتری‌ها خود را با آلاینده‌های فلزی تطبیق می‌دهند. میکروارگانیسم‌ها فلزات سنگین محیط را جذب کرده و در سلول‌های خود نگه می‌دارند. میکروارگانیسم‌ها از روش‌های مختلف و مکانیسم‌های متفاوت به حضور آلاینده‌ها مقاومت نشان می‌دهند (Nies, 2003). سطح مقاومت باکتری‌ها بسته به نوع باکتری و حتی جنس‌های مختلف یک‌گونه متفاوت است، بنابراین می‌توان با شناسایی نوع باکتری مقاوم به فلز سنگین، به بالاترین راندمان جذب این فلزات از محیط‌های آلوده دست یافت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های پساب از ۲۰ ایستگاه شامل کارخانه‌های تولید، ذوب، فراوری و تغلیظ روی در مناطق مختلف شهرستان زنجان در ظرف‌های پلاستیکی درب‌دار استریل جمع‌آوری و بلافاصله با حفظ شرایط به آزمایشگاه منتقل گردیدند. غلظت روی در نمونه‌ها با دستگاه ICP-AES قرائت و مناطق آلوده شناسایی گردید. از نمک سولفات روی محلول مادر با غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه و سپس از محلول مادر غلظت‌های ۲۰۰ تا ۳۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای شناسایی باکتری‌های مقاوم به روی تهیه و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری و سترون گردید. کشت سطحی با اضافه نمودن ۸۰۰ میکرومول از رقت ۰/۰۱ نمونه در محیط کشت شامل ۰/۵ در صد عصاره مخمر، ۱ در صد تریپتون و ۱/۵ در صد آگار در محیط با پ‌هاش معادل هفت، با سطح آلودگی مختلف نمک‌های سولفات روی انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۱ درجه سلسیوس قرار داده شدند. کلنی‌های به‌دست‌آمده در مرحله بعد به‌صورت کشت خطی در محیط کشت با سطوح آلودگی از ۲۰۰ تا ۳۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات روی به صورتی که کلنی‌های رشد یافته در هر مرحله به مرحله بعد با سطح آلودگی بالاتر انتقال و کشت داده می‌شد. درنهایت حداقل غلظت مهارکننده رشد[2] و حداقل غلظت نابودکننده باکتری[3] تعیین گردید. شناسایی ایزوله‌های باکتریایی که بالاترین جذب فلز روی را داشتند بر اساس مشخصات مورفولوژیکی کلنی و رنگ‌آمیزی گرم انتخاب گردید. برای محاسبه میزان کمّی جذب فلز توسط هر یک از سویه‌های مقاوم غربال‌شده و در نهایت انتخاب بهترین باکتری‌های جاذب روی ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر محلول سولفات روی تهیه و ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول با بیوماس‌های باکتریایی به مدت پنج ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۹۰ دور در دقیقه مجاور سازی شد. پس از گذشت زمان موردنظر با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. غلظت محلول رویی با دستگاه آی سی پی با دو بار تکرار قرائت و میانگین آن‌ها به‌صورت عدد نهایی جذب، گزارش گردید. برای ارزیابی داده‌ها از معادله ۱ استفاده گردید.

$$Q=V(C_i - C_f)/M$$ معادله ۱

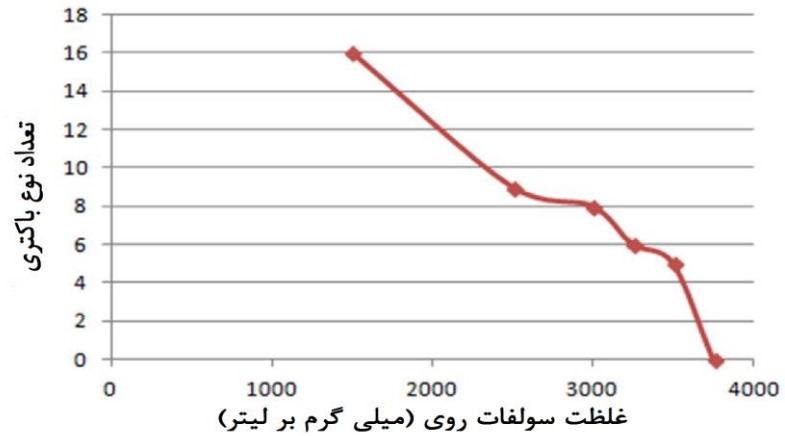
در این معادله Q معرف میزان جذب فلز توسط بیوماس است که برحسب میلی‌گرم فلز جذب‌شده در هر گرم وزن خشک باکتری گزارش می‌گردد، پارامتر V معرف حجم محلول مجاورسازی برحسب لیتر، C_i غلظت اولیه محلول فلزی برحسب میلی‌گرم بر لیتر، C_f غلظت فلز پس از مجاور سازی برحسب میلی‌گرم بر لیتر و M وزن خشک بیوماس برحسب گرم است. استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها با استفاده از روش اختصاصی Corbin و همکاران ۱۹۹۴ انجام گردید. نتایج توالی یابی پس از بررسی و مطابقت آن‌ها با کروماتوگراف‌های مربوطه از لحاظ صحت نوکلئوتیدهای توالی یابی شده، به کمک نرم‌افزارهای dnadist، negbor، Drawgram و توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی جهانی ژن[4] موردبررسی قرار گرفتند و درخت فیلوژنیتیکی سویه‌های جدید رسم گردید.

[1] Metallothioneins
[2] Minimum Inhibitory Concentration, MIC
[3] Minimum Bactericidal Concentration, MBC
[4] National Center for Biotechnology Information

نتایج و بحث

نتایج مرحله غربال‌سازی

از کشت نمونه‌ها بر روی محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف سولفات روی، ۱۸ ایزوله باکتریایی به دست آمد، که با بالا بردن مقدار سولفات روی تعداد ایزوله کاهش پیدا کردند. درنهایت پنج ایزوله که بیشترین غلظت مهارکننده رشد را داشتند انتخاب شدند. ایزوله‌های Z1، Z8، Z10، Z13 و Z25 در محیط کشت حاوی سولفات روی تا غلظت ۳۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد کردند. ایزوله‌های Z1 و Z13 تا ۱۵۰۰، Z25 تا ۲۰۰۰ و Z8 و Z10 تا ۳۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد را نشان دادند.



شکل ۱- تعداد کلنی‌های متفاوت رشد کرده در غلظت‌های مختلف سولفات روی

نتایج میزان جذب کمّی فلز روی

نتایج به‌دست‌آمده طبق جدول ۱ نشان می‌دهد که ایزوله‌های Z13 و Z8 به ترتیب با جذب معادل ۱۸۶/۰۸ و ۱۵۶/۲۲ بیشترین مقدار جذب سولفات را داشتند.

جدول ۱- میزان جذب سولفات روی توسط سویه‌های باکتریایی

باکتری	مورفولوژی	جذب خوانده‌شده (mg/l)	غلظت محلول اولیه (mg/l)	حجم محلول مجاورسازی (l)	وزن خشک بیوماس (g)	میزان جذب (Mg/g.dw)
Z1	باسیل گرم منفی	۲۸۰/۱۱۶	۳۱۰/۲۵۲	۰/۰۰۸	۰/۰۰۴	۶۰/۲۷۲
Z8	باسیل گرم منفی	۲۹۰/۷۲۴	۳۱۰/۲۵۲	۰/۰۰۸	۰/۰۰۱	۱۵۶/۲۲۴
Z10	باسیل گرم منفی	-	۳۱۰/۲۵۲	۰/۰۰۸	ناچیز	ناچیز
Z13	باسیل گرم منفی	۲۴۰/۴۷۱	۳۱۰/۲۵۲	۰/۰۰۸	۰/۰۰۳	۱۸۶/۰۸۲
Z25	کوکسی گرم مثبت	۲۹۰/۹۵۹	۳۱۰/۲۵۲	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	۳۰/۸۷۳

مطالعه داده‌های ژن *16SrRNA* ایزوله Z13 نشان می‌دهد این ایزوله بالاترین شباهت را با ۹۹ درصد و با سه تفاوت بارز نوکلئوتیدی با باکتری *Sphingomonas sp. AC83* دارد؛ و با توجه به این‌که اختلاف معنی‌داری در تفاوت نوکلئوتیدی این دو باکتری دیده نمی‌شود به نظر می‌رسد که این دو باکتری به یک‌گونه تعلق دارند. در نتیجه پیشنهاد می‌شود که ایزوله Z13 به‌عنوان سویه جدیدی از باکتری جنس *Sphingomonas sp*در نظر گرفته می‌شود. Mergeay (۱۹۹۵) بیان نمود حداقل غلظت مهارکننده فلز روی برای *E.coli* به ترتیب برابر ۱ میلی مول است. Bautista-Hernández و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نموده‌اند که سویه باکتری *Delftia tsuruhatensis* مقاوم به فلز روی غلظت مهارکننده رشد معادل ۲۵ میلی مول داشتند. خدابخشی و همکاران (۱۳۸۹) گزارش نمودند که باکتری *Salinivibrio costicola* از خانواده *Vibrionaceae* توانسته غلظت ۲ میلی مول روی محیط را تحمل کرده و زنده بماند. متشرع زاده و همکاران (۱۳۸۷) نتایج تجزیه خاک کشاورزی اطراف معدن شازند اراک را بررسی و نشان دادند که میزان فلزات سنگین بیشتر از حد متوسط خاک‌ها است و این امر موجب نگرانی

است. همچنین با جداسازی باکتری‌های خاک از محیط ریزوسفر و خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، هفت جدایه مقاوم به فلزات سنگین شناسایی و گزارش گردید که می‌توان از زاد مایه آن‌ها برای آزمایش‌های گیاه‌پالایی استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج غربال‌گری، کشت نمونه‌ها و سنجش مقاومت آن‌ها نشان داد که پنج باکتری مقاوم به سولفات روی ایزوله‌های Z1، Z8، Z10، Z13 و Z25 هستند. ایزوله‌های Z8 و Z13 به ترتیب با ۱۵۶/۲۲ و ۱۸۶/۰۸ میلی‌گرم فلز جذب‌شده در هر گرم وزن خشک باکتری جذب بالای از فلز روی را نشان دادند. مطالعات بیوشیمیایی و ژنوتیپی ایزوله Z13 با سه تفاوت بارز نوکلئوتیدی و شباهت ژن 16srRNA، ۹۹ درصدی از سویه Sphingomonas sp. AC83 متمایز و گزارش گردید. ایزوله Z13 غلظت ۱۸ میلی مول روی را در محیط تحمل کرده و زنده مانده است. به علت مقاومت و جذب بالای فلز روی توسط این ایزوله نسبت به گزارش‌های نتایج مطالعات قبلی از این ایزوله می‌توان جهت تولید بیوجاذب‌ها و تصفیه پساب‌های آلوده به فلزات سنگین روی استفاده کرد.

منابع

خدابخش، ف، ناظری، س، آموزگار، م.ح، خداکرمیان، غ. ۱۳۸۹. جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل، یک باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به برخی فلزات سمی *Salinivibrio sp.* اولین همایش ملی کشاورزی پایدار و تولید محصول سالم.

سلطانی، ک، آموزگار، م. حامدی، ج. ۱۳۸۷. جذب زیستی سرب توسط باکتری‌های جداشده از پساب‌های صنایع پتروشیمی. مجله علوم و تکنولوژی محیط‌زیست، دوره سیزدهم، شماره ۲.

کرمانشاهی، ک، قاضی فرد، ا. توکلی، آ. ۱۳۷۷، جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین در رسوبات حاشیه زاینده‌رود، مجله آب و فاضلاب، شماره ۲۷.

متشرع زاده، ب. ثواقبی فیروزآبادی، غ. علیخانی، ح. میر سید حسینی، ح. ۱۳۸۷، شناسایی گیاهان بومی و باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین در اراضی اطراف معدن سرب و روی عمارت شازند اراک. مجله تحقیقات آب‌وخاک ایران، دوره ۳۹، شماره ۱، ص ۱۷۴-۱۶۳.

Bautista-Hernández, D.A., Ramírez-Burgos, L.I., Duran-Páramo, E. and Fernández-Linares, L., 2012. Zinc and lead biosorption by Delftia tsuruhatensis: a bacterial strain resistant to metals isolated from mine tailings. Journal of Water Resource and Protection, 4(04), p.207.

Blencowe, D.K. and Morby, A.P., 2003. Zn (II) metabolism in prokaryotes. FEMS microbiology reviews, 27(2-3), pp.291-311.

Choudhury,R and S.Srivastava. 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. Current Science, 81(7). pp: 768-775.

Corbin, D.R., Greenplate, J.T., Wong, E.Y. and Purcell, J.P., 1994. Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts. Appl. Environ. Microbiol. 60(12), pp.4239-4244.

Kabata-Pendias, A., 2000. Trace elements in soils and plants. CRC press.

Hynninen, A., 2010. Zinc, cadmium and lead resistance mechanisms in bacteria and their contribution to biosensing.

Hughes, M.N. and Poole, R.K., 1989. Metals and Micro-organisms. Chapman and Hall.

Liu, Y., Xu, H., Yang, S.F. and Tay, J.H., 2003. A general model for biosorption of Cd^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} by aerobic granules. Journal of biotechnology, 102(3), pp.233-239.

McCall, K.A., Huang, C.C. and Fierke, C.A., 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. The Journal of nutrition, 130(5), pp.1437S-1446S.

Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS microbiology reviews, 27(2-3), pp.313-339.Mergeay, M., 1995. Heavy metal resistances in microbial ecosystems. In Molecular microbial ecology manual (pp. 439-455). Springer, Dordrecht.

Topic for submission: Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation

Isolation of zinc absorption and resistance bacteria of sludge in Zanjan city

Mohammadali Hassanloei [1], Forouzan Ghasemian Roodsary[2]

[1] MSc of the Environmental Science Department, Faculty of Science, University of Zanjan, Iran

[2] Assistant Prof., Bioloy Department, Faculty of Science, University of Zanjan, Iran

Abstract

Heavy metals accumulate in the food chain, causing numerous problems for living organisms. When these metals are concentrated in the environment, biological methods are used for purification. The purpose of this study was to identify resistant bacterial species of zinc absorbent from contaminated wastewater in the south of Zanjan. For this purpose, 20 samples of contaminated wastewater were collected and the minimum concentration of growth inhibitor in isolated bacteria was investigated on medium containing concentrations of 200 to 3750 mg / L zinc sulfate. The results of isolated bacterial strains revealed a high resistance of 18 isolates. Z1, Z8, Z10, Z13, and Z25 isolates were grown in zinc sulfate-containing media to a concentration of 3750 mg / L. Z1 and Z13 to 1500, Z25 to 2000, Z8 and Z10 to 3500 mg / L isolates showed growth. The Z13 isolate with the absorption of 186.08 was the highest zinc absorption in five other isolates. Phylogenetic studies showed that this isolate belongs to sp. *Sphingomonas sp*, which is different from the reported strains. Due to the high tolerance threshold for the Z13 strain, it can be used as an appropriate adsorbent in the removal of zinc contaminants.

Keywords: Bioremedation Resistant bacteria,Zinc, Zanjan