جداسازی، خالص سازی و بررسی خصوصیات باکتریهای مقاوم به سرب بعضی مناطق آلوده طبیعی و صنعتی استان خراسان رضوی

عاطفه سفیدیان [۱]، **منصور مشرقی** [۲]، **علی مخدومی کاخکی** [۳]، **محمدحسین محمودی قرائی** [٤]

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد زمینشناسی زیستمحیطی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

۲ - دانشیار، عضو هیئت علمی، گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳ - استادیار، عضو هیئت علمی، گروه زیستشناسی، دانشگاه فردوسی مشهد

٤ - استادیار، عضو هیئت علمی، گروه زمینشناسی، دانشگاه فردوسی مشهد

A.Cephidian@yahoo.com; at.cephidian@stu.um.ac.ir

چکیده

سرب از جمله فلزات سنگین و سمی میباشد که بهطور عمده از منابع انسانزاد و از طریق پساب حاصل از فعالیت صنایعی مانند باتریسازی وارد محیط میشود. ارائهی راهحلی جهت تصفیه زیستشناختی پسابهای صنعتی و آب و خاک آلوده ازجمله اهداف این تحقیق بودهاست که با جداسازی و خالصسازی باکتریهای مقاوم به فلز سرب از میان دیگر میکروارگانیسمها آغاز گردید و از میان آنها نهایتاً باکتریهایی که به بالاترین غلظت فلز سرب مقاومت داشتند انتخاب شدند. جمعآوری نمونهها در دو قسمت انسان زاد و زمین زاد از مناطق خاکی و آبی بسیار آلوده به سرب صورت گرفت. از محیط کشت آگار مغذی حاوی ۵۰ میلیگرم از نمک نیتراتسرب(II) برای جداسازی نمونه ها در طی ۹٦ ساعت گرماگذاری استفاده گردید. کلنیهای مختلفی اعم از کپک، مخمر و باکتری بر روی محیط ظاهر شدند که نشاندهندهی آن است که طیف گستردهای از انواع میکروارگانیسمها نسبت به این فلز مقاومت دارند. در نهایت ۳٦۰ جدایه باکتری خالص گردید. حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری در غلظتهای مختلف سرب از ۰ تا ۳۵۰۰ ppm تعیین شد که اکثر ایزولهها به غلظت ppm ۲۰۰۰ مقاوم بودند و تعدادی نیز به غلظت ppm ۳۲۵۰ مقاومت نشان دادند. تست های میکروبیولوژی نشان داد که اکثر ایزولهها گرم مثبت و KOH منفی بوده و تنوع مورفولوژیکی به اشکال باسیلی ،کوکسی، کوکوباسیل و رشته ای مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: باکتریهای مقاوم به سرب، حداقل غلظت بازدارنده، منابع انسان زاد و زمین زاد

مقدمه

توسعهی تکنولوژی و رشد روزافزون فعالیتهای صنعتی از یک سو و رعایت نکردن الزامات زیستمحیطی از سوی دیگر، سبب شده است تا طی چند دههی اخیر مقادیر هنگفتی از آلایندهها وارد محیط زیست شوند. یکی از مهمترین آلایندههای پایدار و غیرقابل تجزیه بیولوژیکی فلزات سنگین هستند که از سمیترین آلایندهها در محیط زیست به شمار میروند. آلودگی بوسیلهی فلزات یک مشکل مداوم در مناطق بسیار زیادی میباشد، وجود فلزات در آبزیرزمینی وخاکها یک تهدید جدی و قابلتوجه برای سلامتی انسان و سیستمهای اکولوژیکی است. آلودگی فلزات به فرمهای شیمیایی مختلفی بصورت محلول و متحرک و سمی در سیستمهای آبزیرزمینی نفوذ میکند. فرمهای شیمیایی فلزات وابسته به منبع مواد زائد و شیمی خاک و آبزیرزمینی است (۱). آلودگی خاک باسرب درمقیاس جهانی رخ دادهاست وسطح بالای سرب در مناطق شهری، کشاورزی، صنعتی، معدنکاری وجود دارد (٦). غلظت فلزات سنگین در آب هم به منابع بشرزاد (معدنکاری و فعالیتهای صنعتی و کشاورزی) و هم زمین زاد (هوازدگی و فرسایش سنگها) بستگی دارد. فلزات سنگین همچون سرب (Pb)، کادمیوم (Cd)،

جیوه(Hg)، نیکل (Ni)، کروم (Cr) و آرسنیک (As) بسیار سمی هستند. اثرات سمی آنها شامل سردرد، فشارخون بالا، بیماریهای کلیوی، عصبی، قلب و عروق، کمخونی و حتی در مواردی میتواند کشنده باشد (٤). در این میان فلز سرب، به طور عمده ناشی از منابع انسانزاد که از طریق پساب حاصل از فعالیت صنایع متعدد، بویژه باتریسازی، آبکاری، ذوب و تصفیهی فلزات، رنگ و رزین، لاستیکسازی، شیشه و کریستال و سوخت بنزین وارد محیط میشود (٥). حداکثر غلظت مجاز[1] برای سرب در آبآشامیدنی بر اساس دادههای آژانس حفاظت محیط زیست (۲) ۰/۰۱۵ میلیگرم بر لیتر و بر اساس دادههای سازمان جهانی بهداشت (۸) ۰/۰۱میلیگرم بر لیتر و بر اساس دادههای مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (استاندارد ملی ایران ۱۰۵۳تجدید نظر پنجم) ۰/۰۱ میلیگرم بر لیتر است. تکنولوژیهای موجود برای اصلاح خاک و آب زیرزمینی آلوده شده با فلزات بسیار مختلف میباشد، کاربرد هر یک از این تکنولوژیها برای پاکسازی منطقه به نوع فلزات و خصوصیات شیمیایی و فیزیکی سایت آلودهشده و ارزیابی هزینهها برای عملکرد بهینه ضروری میباشد. از جمله روشهای پاکسازی روش بیولوژیکی میباشد که جهت تسریع فرآیندهایی است که بطورطبیعی در منطقه جهت کاهش آلودگی فعال هستند. تصفیهی بیولوژیکی[2] روشی است برای افزایش فعالیت فرآیندهای طبیعی و بیولوژیکی که باعث کاهش آلودگی در خاک ، رسوبات و آبهای زیرزمینی می شود (۷). در این تحقیق سعی بر این بوده است تا میکروارگانیسمهای مناسب جهت تصفیهی زیستی موفق جداسازی شود تا در آینده بتوان از آن در جهت پاکسازی آب و خاک و پساب آلوده به سرب بهره گرفته شود.

مواد و روشها

نمونه برداری: جهت جمعآوری نمونهها از ابتدا سعی شد تا انتخاب و جمعآوری نمونهها تا حد امکان از مکانهایی صورت گیرد که در معرض غلظت بالای سرب باشند. نمونهها به دو قسمت زمینزاد و انسانزاد تقسیم میشوند نمونههای انسانزاد از مراکز رنگ و لعابسازی و کارخانهی باتریسازی اتومبیل واقع در استان خراسان رضوی که قسمت عمده پساب آنها حاوی سرب بوده و به عبارتی آلوده به این فلز بودند تهیه شد. نمونههای زمینزاد، از رگههای معدنی سرب در روستای کاهو(شمال غرب مشهد) در طول جغرافیایی "۱۲/۵ '۱۰°۵۹ تا " ٦ '١٤°٥٩ و عرض "٤٢' ٢٣°٣٦ تا"٤٢/٧٧' ٢٦°٣٦ شمالی و روستای فریزی (شمالغرب مشهد) در طول جغرافیایی "٥٩/٨' ٥٨ °٥٨ و عرض "١٧/٧ '٢٩ °٣٦ شمالی و روستای تاریکدره واقع در تربت جام در طول جغرافیایی "٥٩/١ '٤٧ °٦٠ و عرض "٠/٤ '٢٨ °٣٥ شمالی برداشت شد. نمونهها شامل خاک و آب در محل معدن سرب و پساب آلوده به سرب بود. بعد از برداشت نمونهها در داخل یخ در دمای ٤ درجهسانتیگراد گذاشتهشدند و به آزمایشگاه جهت کشت و مطالعات دیگر انتقال دادهشدند.

جداسازی و خالصسازی میکروارگانیسمهای مقاوم به سرب: محیط کشت اولیه حاوی نوترینبراث، آگار، استوک نیترات سرب با غلظت ppm ٥٠ که به مقدار ۱۰۰میکرولیتر به محیط کشت اولیه اضافهشد . pH محیط کشت قبل از اتوکلاو کردن تنظیم گردید (pH =٦). لازم به توضیح است که pH ، جذب یونهای فلزی را تغییر میدهد و این ممکن است با نوع جذب کننده (بیوماس) و جذبشونده (یونهای فلزی) تغییر کند. در مقادیر pH بالا (pH>٦) یونهای Pb^{2+} به علت افزایش غلظت یونهای OH^- موجود در محلول و ترکیب این یونها با سرب به شکل $Pb(OH)_2$ رسوب میکنند و در نتیجه میزان سرب در دسترس باکتریها کاهش مییابد. از نمونههای پساب کارخانه، آب و رسوب بعد از چند دقیقه بهم زدن شدید ، مقدار ۱ میلی

[1] Maximum allowable concentration
[2] Bioremediation

لیتر داخل سرم فیزیولوژی تلقیح گردید. نمونهی موردنظر در رقتهای مختلف از ۱ تا ٤ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بوسیلهی سمپلر به محیط کشت تلقیح و به مدت ۹٦ ساعت در شرایط هوازی و در انکوباتور ۳۰درجه سانتیگراد گرماگذاری گردید. برای کشت نمونههای خاک ابتدا محلول بافر[3] با pH ۷ تهیه شد ، (تنظیم pH بوسیلهی NaOH 1Mصورت گرفت) ، سپس ۱ گرم از نمونهی خاک به محلول بافر اضافه گردید و در شیکر با دور rpm ۱۰۰ –۹۰ و دمای ۳۰ درجهسانتیگراد به مدت یک ساعت قرار دادهشدند تا باکتریهای موجود در خاک کاملاً آزاد شوند . سپس محلول رویی آن جهت تلقیح به سرم فیزیولوژی استفاده گردید که و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت اضافه شد و در دمای ۳۰ درجه گرماگذاری گردید. در این تحقیق چون هدف اصلی جداسازی باکتریهای مقاوم به سرب میباشد از اینرو برای جلوگیری از رشد قارچ و کپک در محیط کشت از آنتیبیوتیک سیکلوهگزامايد استفاده شد این آنتیبیوتیک در محلول استوکی با غلظت mg/ml ۲۵ تهیه می شود. ابتدائا آنتی بیوتیک در اتانول ۱۰۰ درصد حل گردید و با فیلتر سرسرنگی استریل شد و در دمای ٤ درجهسانتیگراد نگهداری گردید. آنتیبیوتیک به غلظت ۱۲/۵میکروگرم به محیط کشت اضافه گردید.

سنجش مقاومت به سرب ایزولهها : بعد از خالص سازی نمونه ها قدرت جدایهها برای تحمل سرب در محیط کشت آگار مغذی (نوترینت) حاوی غلظتهای صفر (شاهد) و ۵۰۰ و ۱۰۰۰و ۱۵۰۰ و۲۰۰۰ و۲۲۵۰ و ۲۵۰۰و ۳۰۰۰ و۳۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سرب، بررسی گردید. حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری [4] هر یک از جدایهها با غلظتهای متفاوت تعیین شد.

تعیین هویت ایزولهها: شناسایی اولیه با استفاده از بعضی از روشهای کلاسیک میکروبیولوژی مانند کلنی مورفولوژی و رنگ آمیزی گرم و تست KOH انجام پذیرفت و روشهای تکمیلیتر در حال انجاماست.

نتایج و بحث

پس از کشت نمونه های طبیعی برروی محیط آگار مغذی حاوی غلظت ۵۰ میلیگرم از نمک نیتراتسرب(II)، با گذشت ۹٦ ساعت گرماگذاری ، کلنیهای مختلفی اعم از کپک، مخمر و باکتری بر روی محیط ظاهر شدند که نشاندهندهی آن است که طیفگستردهای از انواع میکروارگانیسمها نسبت به این فلز مقاومت دارند. از بین کلنیهای بدست آمده، مراحل خالصسازی باکتری ها تا بدستآوردن تککلنی برروی محیط آگار مغذی ادامه پیداکرد. در نهایت ۳٦۰ جدایه باکتریایی بدستآمد. حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری در بین غلظتهای متفاوتی ازنیتراتسرب (شاهد (۰)، ۵۰۰ ، ۱۰۰۰ ، ۱۵۰۰ ، ۲۰۰۰ ،۲۲۵۰ ، ۲۵۰۰ ، ۳۰۰۰ ، ۳۲۵۰ و ۳۵۰۰ ppm) مورد بررسی قرارگرفت و مشخص شد که از بین ۳٦۰ جدایه، اگرچه اکثرا به ppm ۲۰۰۰ مقاوم بودند اما تعدادی از باکتریها تا ppm ۳۲۵۰ مقاومت نشاندادند. طیف گستردهای از جدایهها گرممثبت و KOH منفی بودند. انواع مختلف باکتریهای به اشکال باسیلی، باسیلی رشته ای، کوکوباسیلی و کوکسی در زیر میکروسکوپ مشاهدهشدند. در پژوهشهای انجام شده در این زمینه در ایران و سایر کشورها بالاترین غلظت بازدارنده ای که گزارش شده است تا ppm۳۰۰۰ بوده است (۳). در این تحقیق سعی بر این بودهاست تا میکروارگانیسمهای مناسب جهت تصفیهی زیستی موثر جداسازی شود تا در آینده بتوان از آن در جهت پاکسازی هر چه بهتر آب، خاک و پساب آلوده به سرب بهره گرفتهشود.

[3] PBS(phosphate buffered saline)
[4] Minimum Inhibitory Concentration(MIC)

منابع و مراجع مورد استفاده

1) **Adebowale ,A., 2004**.Bioremediation of Arsenic ,Chromium ,Lead and Mercury ,National Network of Environmental management studies felow.p.43.
2) **Environmental Protection Agency., 2009.** National Primary Drinking Water Regulations,EPA 816-F-09-004.
3) **Karimkhani,B.,Amuzegar,M.,Hamedi,J.,1390.** Biosorption of lead by bacteria isolated from petrochemical sweage, Environmental Science and Technology, Volume XIII, Number Two, Summer, page41-54.
4) **Khan, S.,Shahnaz, M.,Jehan ,N.,Rehman ,S., Tahir Shah, M., Din I.,2012.** Drinking Water quality and human health riskin Chasadda district,Pakistan,Jornal of Cleaner Production xxx(2012)1-9
5) **Li, Z., L. Zhao, Y. YU, and C.Changzhi., 1998.**Removal of lead from aqueous solution by nonliving Rhizopus nigricans. Wat. Res., 32: 5: 1437-1444.
6) **Park, JH., Bolan ,N., Megharaj, M., Naidu ,R., 2011.**Comparative value of phosphate sources on the immobilization of lead, and leaching of lead and phosphorus in lead contaminated soils, Pages 853–860, Volume 409.
7) **U.S.EPA., 2010.**Green Remediation Best Management Practices:Bioremediation *Sites;* EPA 542-F-10-006.
8) **World Health Organization., 2011.**Guidelines for drinking-water quality,page564.

Isolation, purification and characterization of lead-resistant bacteria in natural and industrial contaminated areas of Khorasan Razavi

Atefeh Cephidian[1], Mansour Mashreghi[2], Ali Makhdoomi kakhki[3], Mohamad Hosein Mahmudy Gharaie[4]

Abstract:
Lead is a toxic heavy metal that is largely of anthropogenic resources through releasing of industrial waste water such as battery factory sewage into the environment. Providing a biological solution for the treatment of industrial waste water and contaminated soil and water, have been the purposes of this study. Therefore isolation and purification of bacteria resistant to lead among other indigenous microorganisms became started in which selection of bacteria resistant to high lead concentration ultimately achieved. Collection of samples was performed in both anthropogenic and geogenic zones of soil and water highly contaminated with lead. For isolation, samples were added into nutrient agar medium containing 50 mM sodium nitrate of lead (II) incubated for 96 h. Different colony morphology resembling mold, yeast and bacteria appeared indicating that a wide range of microorganisms resistant to lead are present. Finally, 360 bacterial isolates were purified .MIC of isolates in the range of 0 to 3500 ppm Pb was determined showing that the majority of isolates were resistant to concentrations of 2000 ppm while a few of them grew at the presence of 3250 ppm of lead. Microbiological tests showed that the majority of isolates were gram positive and KOH negative with various morphological forms such as cocobacilli, bacilli, cocci and filamentous.

Keywords: Lead resistant bacteria, Minimum Inhibitory Concentration, Anthropogenic, geogenic resources