● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ شانزدهم، شمارهٔ ۱، ص ۲۴-۱۳، ۱۳۸۷

مقالهٔ پژوهشی

حذف فلزات سنگین مس و روی از پسمان‌های صنعتی یکی از کارخانجات صنعتی کرمان توسط باکتری‌های مقاوم جهش‌یافته جذب‌کننده فلز

دکتر محمدرضا شکیبایی*[۱]، آزیتا خسروان[۲]، آرمیتا فرهمند[۳]، سعید زارع[۴]

خلاصه

مقدمه: امروزه پساب فلزات سنگین تولید شده توسط کارخانجات صنعتی معضل زیست محیطی مهمی را در اطراف شهرک‌های صنعتی به‌وجود آورده است و تخلیه این پسمان‌ها سبب مرگ‌ومیر موجودات زنده در اطراف این شهرک‌ها می‌شود. در این تحقیق به وسیله ترکیبات جهش‌زای آکری‌فلاوین، آکریدین اورنج و اتیدیم بروماید با القای موتاسیون افزایش‌دهنده سعی در افزایش جذب فلزات مس و روی از یکی از کارخانجات صنعتی کرمان و کاهش پساب خروجی آن شده است.

روش: برای این منظور تعداد ۲۰ سویه باکتری *Pseudomonas* از خاک و آب اطراف کارخانه جدا گردید و مورد شناسایی میکروبی قرار گرفتند. سپس حداقل غلظت مهارکننده از رشد (MIC) سویه‌های ایزوله شده نسبت به فلزات فوق به کمک رقت‌سازی در آگار تعیین شد. سویه‌هایی که بالاترین MIC را نشان دادند جدا شده و در معرض ۴۰۰ تا ۳۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از مواد جهش‌زا قرار گرفتند. سپس کلنی‌هایی که در بالاترین غلظت رشد نمودند برای بررسی MIC در غلظت‌های بالاتر مس و روی (۲۰mM) و جذب اتمی به کمک اسپکتروفتومتر اتمی استفاده شدند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به دست آمده ایزوله‌های ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۳ و ۱۶ پس از القای جهش بیشترین MIC را نسبت به فلزات فوق از خود نشان دادند (۱۰ mM برای فلز مس و ۲۰ mM برای فلز روی). آزمایشات جذب اتمی توسط این سویه‌ها نشان داد که ایزوله شماره ۱۳ بیشترین مقدار جذب مس به میزان ۰/۳۵٪ در هر میلی‌گرم وزن خشک باکتری را داشت در حالی که ایزوله ۱۰ میزان جذب ۰/۳۳٪ روی در هر میلی‌گرم وزن خشک باکتری را داشت.

نتیجه‌گیری: جذب فلزات سنگین از پسمان‌های صنعتی توسط میکروب‌های جهش یافته می‌تواند راه‌حل جدیدی برای رفع معضل زیست محیطی ایجاد شده توسط کارخانجات صنعتی باشد.

واژه‌های کلیدی: جذب فلزات، جهش، پساب صنعتی، باکتری *Pseudomonas*

۱- دانشیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- مربی، پژوهشکده مواد و متالوژی، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان ۳- کارشناس میکروب‌شناسی، پژوهشکده علوم محیطی، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم و محیطی کرمان ۴- دانشجوی دکترای بیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** بخش میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ● **آدرس پست الکترونیک:** mr_shakibaei@kmu ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸٦/۱۲/۱ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۷/٤/۱۹ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۷/۵/۳

مقدمه

امروزه در اثر توسعه صنایع و ورود پساب‌های کارخانجات صنعتی به محیط، اکوسیستم اطراف کارخانه‌ها و آب‌های سطحی و زیرزمینی در خطر آلودگی می‌باشند که این امر هم در کوتاه مدت و هم در دراز مدت اثرات زیان باری بر روی موجودات زنده خاک و همچنین گیاهان و جانوران در این مناطق از خود به جای می‌گذارد (۱). تخلیه پساب‌های این کارخانه‌ها به داخل رودخانه‌ها سالیانه باعث مرگ‌ومیر هزاران آبزی می‌شود و خطرات مهم زیست محیطی را به‌وجود می‌آورد. به عنوان مثال پساب کارخانجات ریسندگی با دارا بودن مواد سمی اثرات زیستی محیطی شدیدی دارند. یکی از مهم‌ترین مواد آلاینده موجود، املاح فلزات سنگینی مثل روی و مس، کادمیم، کبالت، جیوه، نقره و غیره می‌باشد که در مجاورت کارخانجاتی که با این فلزات سر و کار دارند به فراوانی یافت می‌شود (۲).

انسان در ۵۰ سال اخیر به‌طور فزاینده‌ای در معرض فلزات سنگین قرار گرفته است. این به دلیل افزایش کارخانجات مربوط به صنایع سنگین و صنایع پایین دستی آن‌ها می‌باشد. خیلی از مشاغل مربوط به تماس روزانه با فلزات سنگین می‌باشد. در جوامع صنعتی کنونی، راهی برای دوری از فلزات سنگین وجود ندارد. مثلاً در آمریکا هر ساله هزاران تن پساب کارخانجات حاوی فلزات سنگین باعث انتشار آرسنیک، روی، کادمیم، نیکل و غیره در خاک می‌شود و این خاک سپس وارد زنجیره غذایی انسان می‌گردند. به‌طور عام، فلزات سنگین سم‌های سیستمیک بوده و با اثر اختصاصی بر روی اعصاب، کلیه، جنین و سرطان‌زایی می‌توانند سبب مرگ‌ومیر شوند. فلزات سنگین با ایجاد اختلال در سیستم ذهنی و عصبی بدن و تحت تأثیر قرار دادن نوروترانس‌میتورها و همچنین اثرات قلبی و عروقی و اثر روی سیستم ایمنی و تولیدمثل رفتار انسان‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

پژوهش‌های متعددی در ارتباط با بررسی حذف و پاکسازی فلزات سنگین از پساب کارخانه‌های صنعتی انجام شده است. به عنوان مثال در سال ۲۰۰۱ میلادی Soltan، مقاومت ۲۴۰ ایزوله باکتری *P. aeruginosa* را به شش فلز سنگین سرب، کادمیم، جیوه، روی، نقره و مولیبدن مورد بررسی قرار داد و بر اساس نتایج منتشر شده از بین ۲۴۰ ایزوله، تعدادی جذب بالایی را نسبت به این فلزات از خود نشان دادند (۳). Hiefeli و همکاران سویه‌هایی از باکتری *P. stutzeri* را از معادن نقره به دست آوردند که به نقره مقاوم بوده و می‌توانستند ۲ mg/biomass نقره را جذب کنند (۴). همچنین Wood و همکاران سویه‌ای از *P. putida* را از پساب یک کارخانه صنعتی شناسایی کردند که قادر بود معادل ۶/۵٪ از وزن خشک فلز مس را جذب کند (۵). Cooksay و همکاران در بین سویه‌های مقاوم به مس، باکتری *P. syngeri* با مقاومت بالا را شناسایی کردند که قادر بود ۱۱۵ تا ۱۲۰ میلی‌گرم مس را به ازای هر گرم وزن خشک جذب کند (۶). شکیبایی و همکاران در سال ۱۹۹۹ به کمک میکروب‌های مهندسی ژنتیک شده Acinetobacter توانستند ۲/۵ میلی‌گرم نقره را از پساب صنایع فیلم جذب کند (۷). همچنین شکیبایی و همکاران به کمک میکروب *P. aeruginosa* که حاوی پلاسمید کانژوگه در درون خود بود و ژن مسئول مقاومت نسبت به فلز سرب را حمل می‌کرد توانستند با جذب سرب توسط این میکروب کمک به‌سزایی در کاهش آلاینده در پساب حاوی این فلز کنند (۸). شکیبایی و هراتی به کمک روش‌های بیوتکنولوژی توانستند با تصفیه کرومیم و مس توسط میکروب‌های مهندسی ژنتیک شده ثابت کنند که این فلزات به صورت نانوپارتیکل‌های کوچکی به شکل سولفید کرومیم و مس در سطح باکتری رسوب کرده و در جذب درون سلولی آن نیز شرکت می‌کنند (۹).

میکروب‌های مهندسی ژنتیک شده که توانایی جذب فلزات سنگین را دارند یا میکروب‌هایی که به صورت مصنوعی مقاوم شده‌اند، امروزه نقش مهمی را در حذف پساب‌های صنعتی ایفا می‌کنند. تحقیقات وسیعی در سطح دنیا بر روی این میکروارگانیزم‌ها برای حذف سریع و آسان پسمان‌های صنعتی صورت گرفته است، اما در ایران تحقیقات کمی در این مورد انجام شده است. امید است با تحقیق فوق بتوان راهی مؤثر برای جداسازی و حذف فلزات سنگین از پسمان‌های صنعتی با هزینه کم پیدا کرد.

روش بررسی

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری pH و غلظت عناصر سنگین مس و روی نمونه‌های پساب

نمونه پساب شامل دو نمونه پساب ورودی خنثی‌سازی از واحد Flocculation (اگزوژن) و پساب ورودی خنثی‌سازی از واحد نورد بود. از هر کدام از این نمونه‌ها ۲۰ لیتر تهیه و نمونه‌ها به مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی (High tech) انتقال یافتند. به منظور مشخص شدن pH نمونه‌های قسمت‌های مختلف فاضلاب کارخانه، حدود ۱۰۰ml از محلول رویی هر فاضلاب برداشته و صاف گردید. pH محلول توسط کاغذ صافی صاف و به کمک دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. به منظور مشخص شدن حضور و یا عدم حضور فلزات سنگین مورد نظر در نمونه فاضلاب‌های برداشته شده، حدود ۳۰۰ml از محلول رویی هر پساب از ورودی نورد و اگزوژن برداشته و به‌طور جداگانه صاف شد. از محلول صاف شده برای اندازه‌گیری غلظت عناصر سنگین مس و روی به روش جذب اتمی استفاده شد. لازم به ذکر است برای رفع مزاحمت احتمالی بافت نمونه‌ها، رسم منحنی کالیبراسیون اندازه‌گیری غلظت‌ها انجام و با استاندارد مقایسه شد.

جداسازی ایزوله‌های باکتری از آب و خاک آلوده به پساب

برای جداسازی باکتری‌ها از دو منبع پساب مورد استفاده در کشاورزی به عنوان آب آبیاری و خاک کشاورزی آلوده به پساب در منطقه کارخانه استفاده شد. پس از انجام یک سری آزمایشات ویژه نمونه‌های باکتری از این منابع آلوده جداسازی گردیدند. اساس کار در جداسازی باکتری از هر دو منبع آلودگی استفاده از روش رقت‌سازی (Serial dilution) بود.

جداسازی باکتری از خاک کشاورزی منطقه

برای این منظور یک گرم از خاک آلوده وزن شده و در لوله شماره A که حاوی ۱۰ml آب مقطر استریل بوده ریخته شد. سپس ۵ ml از لوله A به لوله B که حاوی ۱۰ml آب مقطر استریل بود انتقال یافت (رقت 10^{-2}) و رقت‌سازی تا رقت 10^{-6} ادامه یافت. در مرحله نهایی ۵ میلی‌لیتر از لوله C به لوله D حاوی ۱۰ml آب مقطر استریل اضافه و ۵ ml از لوله D نیز بیرون ریخته شد.

جداسازی باکتری‌ها از نمونه آب آلوده

ابتدا ۱۰ml از پساب کارخانه به عنوان استوک (Stock) مورد استفاده قرار گرفت. از این محلول اولیه مقدار۵ml در لوله A حاوی ۱۰ml آب مقطر استریل ریخته شده و مراحل کار رقت‌سازی مطابق با نمونه خاک انجام گرفت.

کشت میکروبی و شناسایی باکتری‌های مقاوم نسبت به فلزات سنگین مس و روی

برای تکثیر و جداسازی باکتری‌های مقاوم، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مایع حاوی باکتری (لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف تهیه شده از آب آلوده به پساب و سوسپانسیون خاک در مرحله قبل) برداشته شد و در سطح محیط کشت نوترینت آگار یا مولرهینتون آگار پخش شد. تعداد ۲۰ پلیت حاوی محیط‌های کشت بالا مورد

استفاده قرار گرفت. در این تحقیق به منظور ایجاد تک کلنی و تفکیک بهتر باکتری‌ها، از روش کشت سر شعله استفاده شد. در نهایت پلیت‌ها به انکوباتور با دمای ۳۰°C انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در آنجا نگهداری شدند و تشخیص میکروبی کلنی‌ها و میزان رشد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۸).

حداقل غلظت مهارکننده از رشد (MIC)

MIC، کمترین غلظتی از فلز سنگین است که رشد باکتری در آن غلظت مهار می‌شود. برای محاسبه میزان MIC برای فلزات مس و روی در ۲۰ باکتری جدا شده از روش رقت‌سازی یون در آگار استفاده شد. در ابتدا محیط کشت نوترینت آگار حاوی غلظت‌های مختلف از فلزات سنگین مس و روی تهیه گردید. سپس باکتری‌ها پس از تخلیص کامل به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط مایع مولر هینتون براث منتقل شدند. پس از اینکه باکتری‌ها به فاز لگاریتمی رشد رسیدند، سوسپانسیوهای میکروبی مطابق با ۰/۵ مک فارلند از آن‌ها تهیه شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون میکروبی در پلیت‌های حاوی رقت‌های مختلف فلزات مس و روی که از قبل آماده شده بودند، گسترش داده شد. برای فلز روی، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار و برای فلز مس، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، و ۲۰ میلی‌مولار تهیه گردید. همین کار نیز برای پلیت‌هایی که به جای نوترینت آگار حاوی مولر هینتون آگار بودند نیز انجام شد. در نهایت پلیت‌های حاوی باکتری به انکوباتور با دمای ۳۰°C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت منتقل شدند. پس از گذشت زمان مقرر، رشد باکتری‌ها و وضعیت کلی آنها مورد بررسی قرار گرفته و MIC برای هر باکتری جداگانه محاسبه گردید.

القای موتاسیون به منظور افزایش میزان مقاومت نسبت به فلزات مس و روی

در این مطالعه به منظور القای جهش در باکتری‌هایی که در مرحله قبل MIC بالاتری داشتند از یک سری مواد رنگی جهش‌زای Intercalating به نام‌های آکریدین اورنج، آکری فلاوین و اتیدیوم برومید استفاده شد. این ترکیبات توانایی اتصال به DNA باکتری‌ها را داشته و جهش‌هایی از نوع Frame Shift mutation را ایجاد می‌کنند. مواد فوق بسیار جهش‌زا بوده و قادرند با یک مقدار بسیار کم جهش‌های کارسازی را به‌وجود بیاورند. از آنجا که باکتری‌ها رشد بسیار سریعی دارند این جهش‌ها به سرعت در نسل‌های بعدی نمود پیدا کرده و اثرات خود را اعمال می‌کنند. در این قسمت از کار برای القای جهش از باکتری‌هایی که در بالاترین غلظت فلزات سنگین رشد مناسبی داشتند استفاده گردید. پس از استفاده از مواد جهش‌زا آنها را در ظرف پلاستیکی ریخته و سمیت آنها توسط ترکیبی از فنل و استیک اسید ۵٪ خنثی شد.

ایجاد جهش با روش شیب غلظتی (GPM)

اساس کار در این روش بر تغییر شیب غلظتی ماده جهش‌زا در محیط کشت داخل پتری می‌باشد. برای این منظور ابتدا ۴۰ میلی‌گرم از ترکیبات جهش‌زا (آکری‌فلاوین، آکریدین‌اورنج و اتیدیوم‌بروماید) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر آماده ریخته و به‌خوبی به‌هم زده شد. سپس ۲ml از این مخلوط استریل شده و در هر پتری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از این مخلوط ریخته شد. برای جامد شدن محیط پلیت به صورت کج قرار داده شد تا مخلوط محیط کشت و ماده جهش‌زا به صورت شیب‌دار در پلیت سفت شود. سپس ۱۰ml محیط کشت Soft Agar استریل روی این سطح شیب‌دار در هر پتری اضافه گردید و پلیت مجدداً به صورت صاف قرار داده شد تا محیط سفت شود. در اثر این عمل یک سطح شیب‌دار اولیه با محیط معمولی پوشانده

شده و یک شیب غلظتی از ترکیبات جهش‌زای فوق در هر پتری بوجود می‌آید. به دلیل تغییر شیب گرادیان این روش را Gradient Plate method می‌نامند. در مرحله بعد تمام باکتری‌های رشد نموده در بالاترین غلظت از فلزات سنگین مس و روی در مرحله قبل به این پلیت‌ها انتقال داده شدند و سپس پلیت‌های به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰°C نگهداری شدند. پس از گذشتن زمان مزبور میزان رشد و وضعیت کلنی‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

ایجاد جهش در باکتری‌ها با روش SIC (بیشترین غلظتی از ماده جهش‌زا که باکتری در آن رشد یافته است).

در این روش برای تعیین SIC، ابتدا ۴۰ میلی‌گرم از ترکیبات جهش زا به ارلن حاوی ۱۰۰ml آب مقطر استریل اضافه گردید. پس از مخلوط کردن کامل (Shaking) مقدار ۲۰۰ml از این استوک به لوله A حاوی 1ml نوترینت براث و ۱۰۰ میکرولیتر باکتری مورد نظر منتقل گردید و به خوبی تکان داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط لوله A به لوله B حاوی ۱۰۰ میکرولیتر باکتری و یک میلی‌لیتر محیط نوترینت برات انتقال داده شد. این کار مطابق با روش رقت‌سازی (Serial dilution) آنقدر ادامه یافت که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده جهش‌زا به‌دست آمد. در مورد آکری فلاوین تمام مراحل مانند آکری‌دین اورنج انجام شد ولی در مرحله آخر به جای برداشتن ۲۰۰ میکرولیتر از استوک اولیه مقدار ۴۰۰ میکرولیتر برداشته و به لوله‌ها اضافه شد. در مورد اتیدیوم بromید نیز مقدار ۴۰ میلی‌گرم از این ترکیب در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و مقدار یک میلی‌لیتر آن به لوله بعدی انتقال داده شد و به صورت سریال مانند گذشته رقت‌سازی از آن انجام گردید. سپس تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰°C قرار گرفتند. میزان رشد باکتری‌ها در هر لوله بررسی و بیشترین غلظتی از ماده جهش‌زا که باکتری در آن رشد یافته بود به عنوان SIC در نظر گرفته شده و برای استفاده در تحقیقات مرحله بعد انتخاب گردید. پس از تعیین SIC برای هر باکتری، رشد یافته مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن به محیط‌های کشت حاوی مقادیر بالاتری از فلزات سنگین مس و روی (شامل ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار برای مس و ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار برای روی) تلقیح شد. پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شد و رشد باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت.

بررسی میزان جذب فلز سنگین مس (CU) و روی (Zn) توسط باکتری‌های مقاوم

به منظور مطالعه میزان جذب مس، باکتری‌های ۲، ۸، ۱۳، ۱۴ و ۱۶ که بیشترین MIC را نسبت به فلز مس در مرحله قبل داشتند انتخاب شده و کشت مجدد شدند. ابتدا باکتری‌های مورد نظر به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ml محیط مولرهینتون برات تلقیح شده و ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰°C و دور ۲۰۰rpm قرار گرفتند. سپس ۱۰ میکرولیتر از این محیط مایع حاوی باکتری به پلیت‌های حاوی نوترینت آگار به عنوان شاهد و ۱۰ میکرولیتر به پلیت‌های حاوی بالاترین غلظت مس (۱۰mM) منتقل شده و پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۰°C قرار گرفتند. پس از رشد مناسب باکتری‌ها روی محیط ۱۰mM از مس، چند لوپ از آنها در ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مولرهینتون براث بدون فلز مس تلقیح گردید و ارلن‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰°C و دور ۲۰۰rpm قرار گرفتند. مقدار ۳/۱۲۵ گرم از سولفات مس آبدار ($CuSO_4.5H_2O$) در ml ۵۰ آب دوبار تقطیر حل گردید و غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار از مس به دست آمد. از این محلول مقدار یک میلی‌لیتر برداشته شد و به ارلن‌های حاوی باکتری منتقل گردید. بلافاصله پس از اضافه نمودن محلول مس در زمان‌های

مختلف (۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۶۴۰ دقیقه) مقدار ۱ میلی‌لیتر از این محلول برداشته و پس از انتقال به لوله‌های اپندرف به مدت ۸ دقیقه در دور ۱۰،۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع سوپرناتانت رویی توسط سمپلر جدا و در میکروتیوپ جداگانه در ۶۰°C خشک شدند. شایان ذکر است که در حین انجام آزمایش ارلن‌های حاوی باکتری و فلز سنگین مس در فواصل زمانی بین برداشت‌ها باید دائماً تکان داده شود. در مرحله بعد به منظور شستشوی مقدار اضافی سوپر ناتانت از روی رسوب باکتری مقدار ۱ml سرم فیزیولوژی ۰/۶٪ استریل بر روی رسوب حاصله اضافه و پس از به هم زدن دوباره سانتریفیوژ شدند. این بار محلول سوپر ناتانت روئی دور ریخته شده و رسوب بدست آمده برای محاسبه وزن بیوماس باکتری وزن میکروتیوپ به اضافه باکتری به دست آورده شد و از وزن اپندرف خالی کم و از این طریق وزن بیوماس خالص به دست آمد. در گام بعدی باکتری‌های رسوب کرده در دمای ۶۰°C به مدت ۶ ساعت خشک گردیدند و به عنوان بیوماس (وزن خشک) باکتری مورد استفاده قرار گرفت و مقدار فلز سنگین ذخیره شده در آنها توسط جذب اتمی محاسبه گردید. برای این منظور ۱ml اسیدنیتریک غلیظ به لوله‌های اپندرف اضافه و حرارت داده شدند. در نهایت تمامی نمونه‌های به دست آمده شامل سوپرناتانت‌ها و بیوماس باکتری با مقدار مناسب آب دوبار تقطیر به حجم مناسب رسانده شدند و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوط به استانداردهای مس و تعیین مقدار جذب مس در هر یک از نمونه‌ها میزان فلز سنگین مس در همه نمونه‌ها محاسبه گردید. در انجام این مرحله از محاسبات غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر (ppm) از مس به عنوان استاندارد به دستگاه تزریق شدند. با استفاده از نرم‌افزارExcel نمودارهای مربوط به نمونه‌های باکتری و سوپرناتانت رویی رسم گردید و نتایج به دست آمده برای هر باکتری مقایسه و تحلیل شد. همین مراحل برای فلز روی نیز انجام گردید.

نتایج

بر اساس آزمایش‌های انجام شده بر روی باکتری‌ها، اکثر باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های پساب و خاک منطقه از جنس پسودوموناس غیربیماری‌زا بودند و تنها یک مورد از آن‌ها زانتوموناس بود که این باکتری به دلیل عدم توانایی رشد در غلظت‌های بالای مس و روی از مطالعه حذف گردید. تعداد ۲۰ نمونه جدا شد که مربوط به ایزوله باکتری پسودوموناس بود. همگی آن‌ها گرم منفی، میله‌ای شکل، اکسیداز مثبت،کاتالاز مثبت و متحرک بودند. برخی توانایی تولید پیوسیانین و ایجاد رنگ سبز متمایل آبی و تقریباً همه قادر به رشد در محیط سیتریمید آگار بودند. این باکتری‌ها تولید سولفید هیدروژن (H_2S) نمی‌کردند و در محیط مک کانکی نیز توانایی تخمیر لاکتوز را نداشتند. کلنی آن‌ها در این محیط نیز بی‌رنگ بود. این باکتری‌ها در دمای ۴۲°C نیز قادر به رشد بودند. pH محلول ورودی خنثی‌سازی از واحد اگزوژن ۵/۵۳ و pH واحد نورد ۴/۸ بود. مقدار عناصر سنگین مس و روی در واحد اگزوژن به ترتیب ۲۰/۳۱pmm و ۲۵/۲۲۳۷pmm و ورودی خنثی‌سازی از واحد نورد ۵۶/۲۵۵pmm و ۱۴۵/۸۲۶۸pmm بود.

حساسیت باکتری‌های پسودوموناس بر اساس MIC نشان داد سویه‌های ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۶ و ۱۸ دارای بالاترین MIC معادل با ۲/۵ میلی‌مولار و ایزوله‌های، ۱۷ و ۱۹ دارای کمترین MIC معادل با ۰/۳ میلی‌مولار مس بودند. در مورد فلز سنگین روی از بین ۲۰ ایزوله جدا شده، ایزوله‌های ۱۲ و ۱۶ دارای بالاترین MIC معادل با ۱۰ میلی‌مولار روی و ایزوله‌های ۱ و ۲۰ دارای کمترین MIC نسبت به روی معادل با ۰/۳ میلی‌مولار بودند. نتایج حاصل از MIC با استفاده همزمان از دو فلز مس و روی نشان داد

که ایزوله‌های ۶، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۴ و ۱۶ دارای بالاترین MIC معادل با ۱/۲۵ میلی‌مولار از مس و روی بودند در حالی که ایزوله‌های ۱، ۴ و ۲۰ کمترین MIC معادل با ۰/۱ میلی‌مولار را به خود اختصاص داده‌اند.

پس از القای جهش در باکتری‌هایی که در بالاترین غلظت‌های فلزات سنگین رشد یافته بودند، میزان SIC برای هر باکتری محاسبه گردید. نتایج حاصل از بررسی SIC توسط ترکیبات جهش‌زا در باکتری‌ها در جدول ۱ آمده است. نتایج این تحقیق نشان داد، ترکیبات جهش‌زای آکریدین اورنج و آکری فلاوین اثرات مفیدی را در افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر فلزات سنگین داشتند ولی اتیدیوم بromید حتی در غلظت‌های بالا تأثیر چندانی در افزایش مقاومت باکتری‌ها نداشت. نتایج حاصل از تأثیر ترکیبات جهش‌زای آکریدین اورنج وآکری فلاوین بر ارتقای مقاومت نسبت به فلزات بالا در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان مقاومت باکتری‌ها در برابر فلز سنگین مس در اثر القای جهش توسط آکریدین اورنج و آکری فلاوین از ۲/۵ میلی‌مولار به ۱۰ میلی‌مولار افزایش یافت در حالی که میزان مقاومت باکتری ۱۰ در برابر فلز سنگین روی در اثر القای جهش توسط آکری فلاوین و آکریدین اورنج از ۵ میلی‌مولار به ۲۰ میلی‌مولار افزایش یافت. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است ایزوله شماره ۱۳ با جذب ۰/۳۵٪ فلز مس در میلی‌گرم بیوماس (وزن خشک) باکتری در زمان انتظار ۱۶۴۰ دقیقه بیشترین مقدار جذب فلز سنگین مس را از خود نشان داد در حالی که سایر ایزوله‌ها در زمان‌های بالا کاهش میزان جذب را نشان می‌دهند که این امر می‌تواند حاکی از خروج فلز مس از بیوماس باکتری باشد. نمودار ۲ میزان جذب فلز سنگین روی توسط ایزوله‌های باکتری در غلظت ۲۰mM را پس از بررسی نتایج حاصل از جذب اتمی نمونه‌های سانتریفوژ شده و خشک شده در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، ایزوله شماره ۱۰ قادر به جذب ۰/۳۳٪ روی در میلی‌گرم بیوماس باکتری در زمان ۱۶۴۰ ساعت بود در حالی که سایر ایزوله‌ها در زمان‌های بالا کاهش جذب را نشان دادند که این نشان‌دهنده خروج یون از بیوماس باکتری می‌باشد.

جدول ۱: *نتایج SIC ایزوله‌ها نسبت به ماده جهش‌زای آکریدین اورنج و آکری فلاوین*

ایزوله باکتری	غلظت‌های مختلف آکری‌فلاوین و آکریدین اورنج (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)				
	۴۰۰	۶۰۰	۸۰۰	۱۶۰۰	۳۲۰۰
۲	+	+	+	+	−
۶	+	+	+	+	−
۷	+	+	+	+	−
۸	+	+	+	+	−
۹	+	+	+	+	−
۱۰	+	+	+	+	−
۱۱	+	+	+	+	−
۱۲	+	+	+	+	−
۱۳	+	+	+	+	−
۱۴	+	+	+	+	−
۱۶	+	+	+	+	−
۱۸	+	+	+	+	−

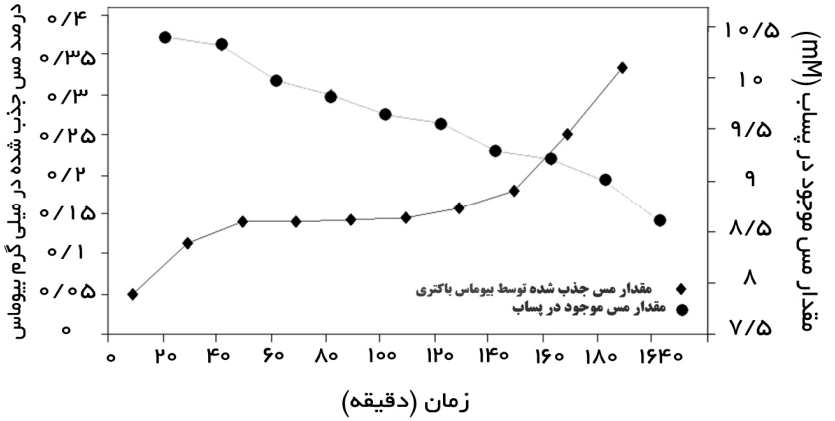
+=رشد −=عدم رشد

جدول ۲: *اثرات ترکیبات جهش‌زا اکریدین اورنج وآکری فلاوین بر افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر فلز سنگین مس*

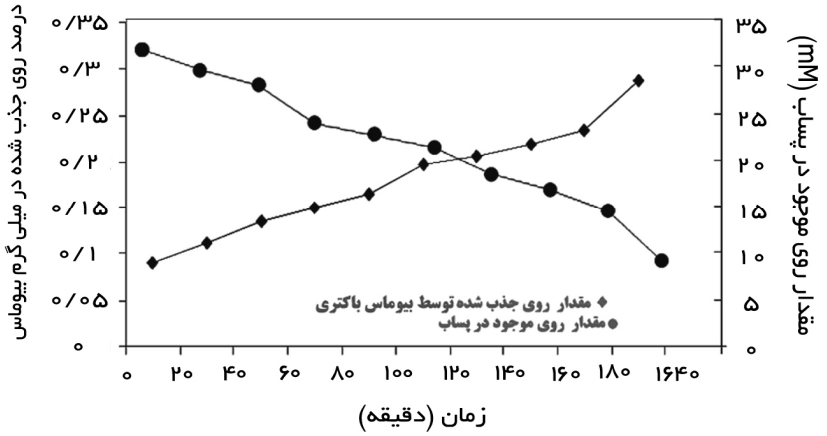
باکتری ایزوله شده	غلظت‌های مختلف فلز سنگین مس (میلی‌مولار)					
	پس از ایجاد جهش			پیش از ایجاد جهش		
	۱۰	۵	۲/۵	۱۰	۵	۲/۵
۲	+	+	+	−	−	+
۸	+	+	+	−	−	+
۱۳	+	+	+	−	−	+
۱۴	+	+	+	−	−	+
۱۶	+	+	+	−	−	+

باکتری ایزوله شده	غلظت‌های مختلف فلز سنگین روی (میلی‌مولار)					
	پس از ایجاد جهش			پیش از ایجاد جهش		
	۲۰	۱۵	۱۰		۱۵	۱۰
۶	+	+	+	−	−	−
۷	+	+	+	−	−	−
۸	+	+	+	−	−	−
۹	+	+	+	−	−	−
۱۰	+	+	+	−	−	−
۱۲	−	+	+	−	−	+
۱۳	−	−	+	−	−	−
۱۴	−	−	+	−	−	−
۱۶	−	+	+	−	−	+

نتایج معادل دوبار آزمایش در شرایط یکسان است.



نمودار ۱: *نتایج بررسی جذب اتمی باکتری لیزشده ایزوله ۱۳ پسودوموناس از محیط کشت مایع حاوی فلزات سنگین مس*



نمودار ۲: *نتایج بررسی جذب اتمی باکتری لیز شده ایزوله ۱۰، پسودوموناس از محیط کشت مایع حاوی فلزات سنگین مس*

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه که بر روی پساب خروجی یکی از کارخانجات کرمان که دارای فلزات سنگین روی و مس در خروجی خود بود انجام شد، از روش حذف بیولوژیکی برای حذف این فلزات از پساب خروجی استفاده شد. ابتدا نمونه پساب از قسمت نورد و اگزوژن کارخانه جمع‌آوری شد و مقدار فلزات روی و مس در پساب به کمک جذب اتمی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آزمایش انجام شده بر روی خاک و آب اطراف کارخانه، باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین روی و مس جدا شده و مورد شناسایی میکروبیولوژیک قرار گرفتند. مهم‌ترین باکتری جدا شده که می‌توانست در ۲/۵ میلی‌مولار مس و روی رشد کند، باکتری پسودوموناس بود. این باکتری، یک باکتری گرم منفی، اکسیداز مثبت است که به وفور در خاک اطراف کارخانه یافت می‌شد. پس از جداسازی اولیه باکتری‌ها، آن‌ها در معرض غلظت‌های مختلف روی و مس به تنهایی و با هم قرار داده شدند و با تعیین کمترین غلظت بازدارنده از رشد، بعضی از ایزوله‌ها قادر بودند تا غلظت ۲/۵ میلی‌مولار در محیط کشت حاوی مس رشد کنند. وقتی به‌طور همزمان هر دو فلز در محیط کشت ریخته شدند، MIC به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد و تنها ایزوله‌های ۶، ۷، ۱۰، ۱۳ و ۱۶ قادر بودند که در غلظت ۱/۲۵ میلی‌مولار رشد کنند. سپس برای افزایش توانایی و قابلیت جذب فلزات روی و مس توسط میکروب‌های ایزوله شده بالا تصمیم به ایجاد جهش در آن‌ها گرفته شد. تا ایزوله‌های باکتری بتوانند در غلظت‌های بالاتری از فلزات بالا رشد کنند. برای این کار از هر دو تکنیک پلیت با غلظت شیب‌دار و همچنین SIC استفاده شد. باکتری‌های جدا شده در معرض غلظت‌های مختلف از ترکیبات موتاژن اتیدیوم بروماید، اکریدین اورنج، و آکری فلاوین قرار داده شدند و بیشترین غلظتی از ترکیبات فوق که ایزوله‌ها قادر به رشد در آن بودند به عنوان SIC انتخاب شد. از بین ترکیبات فوق آکریدین اورنج و سپس آکری فلاوین اثرات شدید و مؤثرتری داشتند و اتیدیوم بروماید هیچ‌گونه اثر مثبتی در زمینه افزایش مقاومت باکتری نسبت به روی و مس به وجود نیاورد. پس از در معرض قرار دادن ایزوله‌های جدا شده از خاک و آب اطراف کارخانه به مواد موتاسیون‌زا، باکتری‌ها در معرض غلظت‌های بالاتری از روی و مس در محیط کشت مولرهیتنون آگار قرار گرفتند و میزان مقاومت ایزوله‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان مقاومت و MIC باکتری‌های جدا شده نسبت به فلز مس و روی در

اثر القای جهش توسط آکریدین اورنج و آکری فلاوین از ۲/۵ میلی‌مولار به ۱۰ میلی‌مولار افزایش یافت. پس از جداسازی باکتری‌های مقاوم جهش یافته، میزان حذف فلزات در محیط کشت مایع و همچنین در پساب توسط جذب اتمی مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نمودار ارائه شده، ایزوله شماره ۱۳ بیشترین مقدار جذب مس را هم از محیط کشت مایع حاوی غلظت ۱۰ میلی‌مولار مس و هم از پساب ورودی خنثی‌سازی از واحد نورد داشت و ۰/۳۵٪ مس در هر میلی‌گرم بیوماس باکتری از پساب جذب شد. همچنین نمودار ارائه شده مربوط به فلز روی نشان داد که ایزوله ۱۰ با جذب ۰/۳۳٪ روی در هر میلی‌گرم بیوماس باکتری بیشترین مقدار جذب را از پساب داشته و این در حالی بود که غلظت فلز سنگین در پساب نیز کاهش فاحشی پیدا نمود. پس می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های جهش یافته میزان جذب بالایی از فلزات سنگین روی و مس را دارند و همچنین میزان جذب در مورد روی بیشتر از مس است.

پژوهش‌های متعددی در ارتباط با پاکسازی فلزات سنگین از کارخانجات صنعتی در کشورهای مختلف انجام شده است (۹،۱۰). به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۱ میلادی Soltan در کشور مصر مقاومت ۲۴۰ ایزوله باکتری پسودوموناس را به فلزات سنگین سرب، کادمیوم، جیوه، روی، نقره و مس مورد مطالعه قرار داد و بر اساس نتایج منتشر شده از بین ۲۴۰ ایزوله، تعدادی جذب بالایی را نسبت به این فلزات از خود نشان دادند (۳). Geesey و همکاران سویه‌هایی از *P. putida* را از پساب یک کارخانه صنعتی در کانادا شناسایی کردند که قادر بودند معادل ۶/۵٪ از وزن خشک باکتری فلز مس را جذب کنند (۱۱). Mclean و همکاران یک باکتری *Pseudomonas* را جدا کردند که قادر بود فلز سنگین سمی کرومات (VI) محلول در آب را به کرومید (III) غیرحلال احیاء کند (۱۲). در ایران نوری سپهر و همکاران با مطالعه روی زدایش کروم از فاضلاب صنایع چرم‌سازی با استفاده از سلول‌های زنده قارچ آسپرژیلوس نیجر توانستند توده سلولی رشد یافته قارچ به غلظت به ترتیب ۰/۴۴ (وزن خشک) و کروم به دست آورند (۱۳). شکیبایی و همکاران به کمک میکروب مهندسی ژنتیک شده *Acinetobacter baumannii* توانستند ۲/۵ میلی‌گرم از پساب صنایع فیلم در کشور هند را جدا نمایند و کمک زیادی در کاهش این ماده سمی آلاینده در پساب خروجی صنایع فیلم کردند (۸). همچنین شکیبایی و همکاران به کمک ایزوله‌های باکتری *P. aeruginosa* که حاوی پلاسمید کانژوگاتیو در درون خود بود و ژن مسئول مقاومت به سرب را در درون خود حمل می‌کرد توانستند با جذب سرب توسط این میکروب کمک به‌سزایی در کاهش این آلاینده‌ها در پساب حاوی این فلز کنند (۹). شکیبایی و هراتی به کمک روش‌هایی بیوتکنولوژی توانستند با تصفیه کروم توسط باکتری پسودوموناس ثابت کنند که این فلزات می‌توانند به صورت نانوپارتیکل‌های کوچکی به اندازه ۲۰-۴۰ نانومتر به شکل سولفید کروم و سولفید مس در سطح باکتری رسوب کنند و جذب درون سلولی کمی را انجام دهند (۱۴).

میکروب‌های جهش یافته و مقاوم به فلزات سنگین که توانایی جذب درون سلولی فلزات را داشته باشند امروزه نقش مهمی را در حذف پسماندهای صنعتی در دنیا ایفاء می‌کنند و تحقیقات وسیعی در کشورهای صنعتی و در حال توسعه مانند هند و برزیل در این زمینه در حال انجام است (۱۵). این تحقیقات در ایران کمتر صورت گرفته است و پسماندهای صنعتی مشکلات بسیاری در محیط زیست و اکوسیستم زنجیره غذایی ما به وجود آورده‌اند. امید است به کمک این تحقیق راهی کم هزینه برای حذف بیولوژیک و طبیعی پسماندهای صنعتی از محیط زیست پیدا شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پشتیبانی، اقتصادی و برنامه‌ریزی استانداری کرمان که هزینه تحقیقاتی این طرح را (طرح‌های ۱۰۲ استانی) متقبل شده‌اند و همچنین ریاست محترم مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که در انجام این طرح همکاری لازم را نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

Elimination of Copper and Zinc from Industrial Wastes by Mutated Bacteria

Shakibaie M.R., Ph.D,[*1] Khosravan A., M.Sc.,[2] Frahmand A., B.Sc.[3], Zareh S. M.Sc.[4]

1. Associate Professor, Department of Microbiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
2. Instructor, High tech Research Center, Kerman, Iran
3. Research Assistant, High tech Research Center, Kerman, Iran
4. Ph.D. Candidate, Department of Biology, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

* Corresponding author, e-mail: mr_shakibaei@kmu ac.ir

(Received 19 Feb. 2008 Accepted 24 July 2008)

Abstract

Background & Aims: Today, toxic effluents have created ecological and health problems in and around the industrial cities resulting in death of nearby living organisms. The aim of this research was to increase the elimination of copper and zinc from copper factory effluents in Kerman/Iran through mutation inducing in metal-resistant bacteria by using Acriflavine, Acridine orange and Ethidium bromide.

Methods: A total of 20 strains of *Pseudomonas spp.* were isolated from water and soil of the factory and subjected to microbiological identification. Maximum Inhibitory Concentration (MIC) to Cu and Zn were determined by agar dilution method. Those strains with the highest MIC to these metals (5mM) were subjected to 400-3200mg/L of the above mutagenic agents. After determination of MIC those colonies which were capable to grow on 20mM copper were selected for atomic absorption spectroscopy.

Results: According to the atomic absorption spectroscopy of dried biomass obtained from resistant strains after exposure to mutagenic agents, strains 6,7,8,9,10,13 & 16 showed the highest accumulation of CU and Zn (10mM for Cu & 20mM for Zn). Strain 13 had the highest absorption of Cu (0. 35%/mg biomass) and strain 10 showed the highest accumulation of Zn (0.33%/mg biomass).

Conclusion: Elimination of heavy metals by artificially mutated bacteria can be suggested as a cost effective solution to this environmental health issue.

Keywords: Pollution, Industrial waste, Mutation, *P.seudomonas*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2009; 16(1): 13-24

References

1. Nies DH, Silver S. Microbial heavy Metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 6: 123-9.

2. Diels L., De Smet M, Hooyberghs L, Corbisier P. Heavy metal Bioremediation of soil. *Mol Biotechnol* 1999; 12(2): 149-58 .

3. Soltan ES. Isolation and Charaterization of antibiotic and heavy metal resistance *P. Stutzeri Biometals* 2001; 7: 30-40.

4. HaeFeli C, Franklin C, Hardy K. Plasmid-determined silver resistance in *P. Stutzeri* isolated from a Silver mine. *J bacteriol* 1984; 158(1): 384-92.

5. Wood JM, Wang HK. Microbial resistance to heavy metals, In: Ingrolic K. J., Martel A.E. (editors), Environmental inorganic chemistry. VCH publisher, Inc., Deer field Beach, FLA., 1985; PP487-512.

6. Cooksey D.A, Azad H.R. Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant pathogenic and Saprophytic pseudomonas. *Appl Enrivon Microbiol* 1992; 58(1): 274-8.

7. Shakibaie MR, Kapadnis BP, Dhakephallker PK, Chopade B.A. Removal of Silver from Phothographic waste water effluent using *Acinetobacter baumnannii* BL54. *Can J Microbiol* 1999; 45(12): 995-1000.

8. Shakibaie MR. Plasmid mediated metal and antibiotic resistance in *P. aeruginosa* strains isolated from burn patients. *MJIR Iran* 2002; 16: 59-63.

9. Shakibaie MR, Harati A. Metal accumulation in *P. aeruginosa* occur in the form of nanoparticles on the Cell surface. *IJB* 2004; 1: 55-60.

10. Lovely DR, Coates JD. Bioremediation of metal Contamination. *Curr Opinion Biotechnol* 1997; 8(3): 285-9.

11. Geesey G.G., Lang L. Interactions between metal ions and Capsular polymers. In: Beveridge T. J, Doyle R.J. (editors), Metal ions and bacteria. New York, John Wiley and sons, 1989; PP235-358.

12. MclLean J, Berevidge JT. Chromate reduction by a pseudomonad isolated From Site Contaminated with chromated copper arsenate. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(3): 1076-84 .

13. Noori Sepehr M, Naseri S, Yaghmaian K, Elimination of Cr from leather industry by Aspergillus live cells in laboratory scale. 2006; 5(1): 45-50.

14. Lovely DR. Dissimilatory metal reduction. *Annu Rev Microbiol* 1993; 47: 263-90.

15. Slawson RM. Trevors JT., Lee H. Silver accumulation and resistance in *P. Stutzeri Arch Microbiol* 1992; 158(6): 398-404 .