Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۱۰۱- ۱۱۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

حذف زیستی کروم توسط گونه *سودوموناس* جداسازی شده از خاک‌های آلوده به نفت خوزستان

سید منصور میبدی: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران، s.m.meybodi@gmail.com
هما خراسانی *: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران، homa_khorasani@yahoo.com

چکیده

مقدمه: در دهه اخیر روش‌های زیستی و میکروارگانیسم‌ها برای پاکسازی آلاینده‌های محیطی نظیر فلزات سنگین مورد توجه قرارگرفته‌اند. جداسازی سویه‌های مقاوم به فلز برای رسیدن به این هدف اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش جداسازی سویه‌های مقاوم به کروم مطالعه و بررسی شد.

مواد و روش‌ها: برای انجام این پژوهش، ۵ نمونه خاک‌های نفتی مناطق خوزستان تحت شرایط سترون جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌های همگن شده خاک تا 10^{-10} در سرم فیزیولوژی سترون رقیق، و بر روی محیط‌های لوریابرتانی‌آگار حاوی ۵ قسمت در میلیون دی کرومات پتاسیم کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، پرگنه‌های سویه‌های مقاوم جدا و روی محیط مکانکی‌آگار کشت شد تا سویه‌های مناسب جدا شود. باکتری‌های جداشده با آزمون‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم شناسایی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در محیط کشت لوریابرتانی‌آگار برای غربال‌گری و جداسازی سویه‌های مقاوم انجام شد. بعد از انجام آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، شرایط رشد بهینه باکتری در حضور کروم در دما، سرعت تکان و اسیدیته با روش اسپکتروفتومتری در ۶۰۰ نانومتر در کشت ۲۴ ساعته بررسی شد. آزمون حذف کروم در شرایط بهینه برای سویه برتر انجام شد.

نتایج: در مجموع ۲۴ سویه *سودوموناس* جدا شد که ۱۴ سویه مقاوم به کروم بودند. سویه برتر (*Mac-۲*) در این مطالعه توانست، در اسیدیته برابر با ۸، دمای ۴۰ درجه سلسیوس و سرعت تکان ۲۰۰ دور بر دقیقه، ۳۵/۶ درصد از کروم را از محیط حاوی ۱۰۰ قسمت در میلیون فلز حذف کند.

بحث و نتیجه‌گیری: از آنجا که فلزات سنگین در بیشتر نقاط دنیا در اشکال مختلف فیزیکی- شیمیایی به عنوان آلوده کننده محیط زیست تلقی می‌شوند باید از محیط حذف شوند. سویه جدا شده می‌تواند برای مطالعات زیست پالایی مکان‌های آلوده به کروم استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: حذف زیستی، کروم، *سودوموناس*، خاک‌های نفتی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه صنعتی شدن جهان به آلودگی محیط زیست منجر شده است که از نتایج این آلودگی، ورود فلزات سمی سنگین به محیط است (۱). فلزات با منبع طبیعی و غیرطبیعی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های محیطی هستند. یکی از این فلزات، که به میزان زیادی در زمین وجود دارد کروم است (۲ و ۳). کروم فلزی سخت و براق، با جلای فلزی خاکستری است که به سختی قابل جوش خوردن بوده و در برابر زنگ زدگی و سیاه شدن مقاوم است. معمولی‌ترین حالت‌های اکسایش کروم +۲، +۳ و +۶ است که یون سه ظرفیتی، پایدارترین آن‌ها و حالت‌های چهار و پنج ظرفیتی آن کمابیش کمیاب است. ترکیبات کروم در حالت اکسایش مثبت ۶، اکسایندههای قوی هستند. ترکیبات کروم سه ظرفیتی معمولاً برای سلامتی خطرناک نیستند، اما ترکیبات کروم ۶ ظرفیتی در صورت بلع سمی هستند (۴). براساس گزارش سازمان حفاظت از محیط، کروم بعد از سرب دومین فلز یافت شده در مناطق آلوده است و سالانه حدود ۱۷۰۰۰۰ تن از پساب‌های این فلز، به محیط سرازیر می شود. این فلز در پساب صنایع مرتبط با کروم مانند تهیه آلیاژهای کرومی، آب‌کاری کروم، ترکیبات بازدارنده خوردگی، شیشه‌سازی، تهیه رنگ، صنعت نساجی، صنایع چوب، عکاسی، دباغی، تولید سیمان، فرش، نوارهای مغناطیسی و ساخت اجزای ماشین و هواپیما وجود دارد. محدودیت کروم ۶ ظرفیتی در آب‌های آشامیدنی متجاوز از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و دوز کشنده خوراکی آن ۷۱ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن است (۵ و ۶). با توجه به مضرات فلزات سنگین که بدان اشاره شد و به علت صنعتی‌شدن جهان، ورود پساب‌های آلوده به محیط اجتناب‌ناپذیر است، همچنین به علت مشکلات ناشی از حذف آلودگی از پساب‌ها به روش های فیزیکی و شیمیایی، دانشمندان به استفاده از روش‌های زیست‌پالایی[1] رو آورده‌اند. زیست‌پالایی اصطلاحی کلی در جهت رفع آلودگی‌های زیست محیطی به وسیله فرآیندهای زیستی مانند حذف زیستی است و به ویژه توسط باکتری، مخمر و قارچ در خاک‌ها و آب‌های آلوده انجام می‌شود. بر خلاف روش‌های فیزیکی- شیمیایی، حذف زیستی به طور کلی هزینه‌های اجرایی بالایی ندارد و بسیاری از منابع بالقوه زیستی ارزان و مناسب به راحتی در دسترس هستند و فوایدی چون کارایی بالا، امکان بازیافت فلز، امکان احیای جاذب، به حداقل رساندن فاضلاب شیمیایی و زیستی را دارا هستند (۷ و ۸). شمار زیادی از میکروارگانیسم‌های مقاوم به کروم از جمله گونه‌های *سودوموناس* می‌توانند در این راه استفاده شوند. توانایی باکتری‌های گرم منفی مانند *سودوموناس* (باکتری همه‌جایی و جزو زیر رده گاماپروتئوباکترها[2]) در تجزیه زیستی آلاینده‌ها به دفعات توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است. *سودوموناس‌ها* در تجزیه آلاینده‌های ناشی از فعالیت‌های زیستی و غیر زیستی، مورد توجه قرارگرفته‌اند و مشخص شده که قادر به استفاده از ترکیبات آروماتیک هستند، از این رو این باکتری‌ها به دفعات از انواع اکوسیستم‌های آلوده به ترکیبات نفتی جدا شده‌اند (۴ و ۹). هدف از انجام مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی سویه‌های برتر *سودوموناس* بومی برای حذف فلز سنگین کروم از خاک‌های نفتی منطقه خوزستان است. استفاده از سویه‌های بومی با توجه به سازش محیطی به شرایط فیزیکی- شیمیایی می‌تواند در حل معضلات زیست محیطی ایران مفید باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده نفتی از ۵ منطقه خوزستان به نام‌های مارون، مسجد سلیمان، اهواز و ملاثانی (روستای زویرچری و صلیعه) تحت شرایط سترون و در ظروف درپیچ‌دار مخصوص انجام شد. نمونه‌ها در جعبه‌های حاوی یخ خشک طی ۲۴ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شد تا مراحل مختلف کار روی آنها انجام گیرد (۷ و ۱۰).

جداسازی، تخلیص و غربال‌گری سویه‌ها: برای جداسازی سویه‌های مناسب مقاوم به کروم که احتمال می‌رفت در خاک‌های نفتی وجود داشته باشند، از محیط‌های کشت میکروبیولوژیک نظیر لوریابرتانی و مک‌کانکی آگار استفاده شد (مرک آلمان). در این مرحله، ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون افزوده و برای یکنواختی به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۵۰ دور در دقیقه تکان داده شد. پس از ۱۰ دقیقه سکون، برای تهیه رقت‌های بعدی، ۱ میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ به لوله آزمایش محتوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون انتقال داده‌شد تا رقت‌های متوالی 10^{-2} تا 10^{-10} در لوله‌های آزمایش مشابه تهیه شود. سپس، ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های بالا برای کشت گسترده در محیط لوریابرتانی آگار (حاوی ۱۰۰ قسمت در میلیون فلز) تلقیح و با میله شیشه‌ای سترون کشت شد تا بعد از ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ریخت‌شناسی پرگنه‌ها مطالعه شود. پلیت‌هایی که میزان کافی و مناسبی پرگنه با اشکال ماکروسکپی مختلف داشتند (۵۰ پرگنه) انتخاب و برای غربال انواع گرم منفی روی محیط مک‌کانکی آگار به صورت خطی کشت داده شدند. همچنین، از سویه‌های جدا شده رنگ آمیزی گرم به عمل آمد تا شکل میکروسکوپی و واکنش گرم آن‌ها تعیین شود (۷ و ۱۰).

در این مرحله، محیط‌های کشت محتوی فلز (به میزان ۵ قسمت در میلیون فلز کروم) با استفاده از پتاسیم‌دی‌کرومات تهیه شد. بعد از کشت رقت‌های متوالی، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس، پرگنه‌های جداشده بر روی محیط مک‌مکانکی اگار کشت داده شد تا سویه‌های باکتریایی گرم منفی جدا و با آزمون‌های بیوشیمیایی *سودوموناس‌ها* شناسایی شود.

شناسایی بیوشیمیایی: برای شناسایی جنس *سودوموناس* جداشده آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، متیل رد، وژزپرسکوئر، احیای نیترات، آزمون اکسیداسیون/ احیای قند گلوکز، لاکتوز، فروکتوز، لیزین دکربوکسیلاز، حرکت، هیدرولیز ژلاتین، تجزیه نشاسته، اوره‌آز و آزمون‌های مربوط به مصرف قند و تولید سولفید هیدروژن در محیط تریپل شوگر آیرون آگار انجام شد (۱۱– ۱۵).

تعیین سویه‌های مقاوم به فلز از طریق انجام آزمون حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد[۳]: پس از کشت سویه تخلیص شده قبلی، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد سویه مورد نظر در قبال کروم سنجش شد. برای این منظور با کمک پلیت‌های لوریابرتانی آگار حاوی مقادیر مختلف دی‌کرومات‌پتاسیم (۱۰۰ قسمت در میلیون تا ۱۰۰۰ قسمت در میلیون)، حداقل غلظت مهار کننده رشد با بررسی رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط مربوطه تعیین و بهترین سویه مقاوم برای انجام آزمون‌های حذف

www.SID.ir

Archive of SID

فلز انتخاب شد. در این آزمون از باکتری معادل کدورت نیم مک فارلند به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر استفاده شد (۱۰). ساخت ۲۵۰ سی‌سی محیط کشت دارای ۱۰۰ قسمت در میلیون کروم بود به شکل زیر انجام شد:

$C_1V_1 = C_2V_2$ (1000ppm* V_1= 100 * 250) = 25 ml.

۲۵ cc ذخیره فلز ۱۰۰۰ppm+ ۲۲۵cc آب مقطر + ۸ گرم محیط کشت

سنجش حساسیت میکروارگانیسم به آنتی بیوتیک‌ها

انتشار در ژل[4](روش دیسک): برای این منظور باکتری مورد آزمایش مقاوم به فلز برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. از این رو سوسپانسیون استاندارد باکتری با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه و به صورت سفره‌ای با سواب سترون پخش شد. سپس، از دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیکی مربوط به کانامایسین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین (شرکت پادتن طب) بر روی محیط مربوطه قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از نظر قطر هاله عدم رشد ارزیابی شد (۱۶).

تعیین بهترین شرایط رشد باکتری در حضور فلز سنگین: تعیین بهترین شرایط رشد باکتری با عواملی مانند دما، سرعت‌تکان و اسیدیته بررسی شد. در این مرحله محیط کشت لوریابرتانی مایع حاوی فلز کروم ساخته و بعد از اضافه کردن سوسپانسیون استاندارد باکتری (به طوری که در نهایت پس از افزودن به محیط کشت برابر با کدورت نیم مک‌فارلند شود) ۲۴ ساعت در چهار سطح دمایی ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، پنج سطح اسیدیته شامل مقادیر ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ و سه سطح سرعت تکان ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور در دقیقه در گرمخانه همزن‌دار نگهداری شد. حجم نهایی محیط ۵۰ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. بالاترین چگالی نوری[5] در دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۶۰۰ نانومتر بهترین شرایط رشد را مشخص می‌کند (۱۰). شایان ذکر است همه آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام شد.

آزمون حذف زیستی فلز کروم: در این مرحله ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی مایع حاوی ۱۰۰ قسمت در میلیون فلز کروم در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری و با کدورت باکتریایی معادل نیم مک فارلند ساخته، و در دما، سرعت‌تکان و اسیدیته بهینه نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برای تحلیل اسپکتروسکوپی جذب اتمی[6] استفاده شد. آزمون‌ها همگی با سه بار تکرار انجام شد (۱۰)

نتایج

از کشت نمونه‌های خاک مربوط به ۵ منطقه نفتی خوزستان، بر روی محیط کشت حاوی ۵ قسمت در میلیون کروم، ۵۰ سویه میکروبی گرم منفی بر اساس شکل پرگنه جدا و تخلیص شد که با آزمون‌های بیوشیمیایی تعداد ۲۴ نوع شامل سویه‌های *سودوموناس* بودند که ۱۴ سویه مقاوم به کروم شناسایی شد. در جدول ۱ آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی سویه انتخابی مشاهده می‌شود.

برای غربال بهترین سویه مقاوم به فلز، آزمون تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد برای فلز کروم انجام شد که نتیجه بهترین سویه بنام *Mac-۲* در جدول ۲ مشخص شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

برای بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه مربوطه، آزمون تعیین حساسیت باکتری به دارو انجام شد. در جدول ۳ این آزمون در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل در سویه مقاوم به کروم مشاهده می‌شود.

برای تعیین بهترین شرایط رشد باکتری در حضور کروم، سویه مقاوم به فلز انتخاب و آزمون‌های متعددی با تغییر عوامل محیطی در سه تکرار انجام شد. نتایج آن در جدول ۴ مشاهده می‌شود. برای تحلیل آماری این آزمون‌ها از مدل خطی عمومی در نرم افزار اس‌پی‌اس‌اس ۱۶[۷] استفاده شد و نشان داد که عوامل اسیدیته و دما در سطوح مختلف و تأثیر آن‌ها بر یکدیگر به صورت معناداری در $P\ value<۰/۰۵$ بر حذف کروم از نمونه مؤثر هستند.

برای بررسی بهترین شرایط اسیدیته و دما با کمک آزمون دانکن در نرم افزار اس‌پی‌اس‌اس ۱۶ نتایج مربوطه تحلیل شد. نتایج در دو زیر مجموعه نشان داد که به جز سطح ۵ اسیدیته، که کم‌ترین تأثیر را بر رشد باکتری دارد، بقیه در یک زیر مجموعه قرار گرفته‌اند و بین آن‌ها اختلاف معناداری مشاهده نمی‌شود. در مورد عامل دما نیز به جز سطح ۴ (۴۰ درجه سلسیوس) که بیش‌ترین اثر را در رشد باکتری داشته است، بقیه سطوح در یک زیر مجموعه قرار گرفت و تفاوت معناداری با هم نداشتند (جدول ۵).

برای بررسی تأثیر سرعت تکان بر رشد باکتری، در دمای بهینه ۴۰ درجه سلسیوس و اسیدیته برابر با ۸ که بالاترین چگالی نوری را در ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر به میزان ۰/۹۰۳ نشان داده بود، ۳ سطح ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور بر دقیقه در نظر گرفته شد که نتایج آن در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیائی سویه انتخابی (*Mac*-۲)

ویژگی‌ها	نتیجه
کاتالاز	+
اکسیداز	+
احیاء نیترات	+
TSI	R/R
MRVP	−
لیزین دکربوکسیلاز	+
ژلاتیناز	+
اوره آز	+
تجزیه نشاسته	+
OF گلوکز بی هوازی/ هوازی	+/−
تولید H_2S	−
حرکت	+
واکنش گرم	−

TSI: Triple Sugar Iron Agar Medium, OF: Oxidation Fermentation
Reaction, MRVP: Methyl Red Vogesproskauer, R/R: Red/Red

جدول ۲- حداقل غلظت ممانعت کننده رشد برای سویه *Mac*-۲ در حضور کروم

حداقل غلظت ممانعت کننده رشد	۳۰۰-۱۰۰ قسمت در میلیون	۴۰۰ قسمت در میلیون و بالاتر
وضعیت	رشد	عدم رشد

جدول ۳- نتایج آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای سویه *Mac*-۲ در حضور کروم

آنتی بیوتیک	وضعیت
کانامایسین	مقاوم
تتراسایکلین	مقاوم
اریترومایسین	مقاوم
آمپی‌سیلین	مقاوم
کلرامفنیکل	مقاوم

جدول ۴- تعیین بهترین شرایط رشد باکتری در حضور فلز کروم در ۵ سطح اسیدیته و ۴ سطح دما

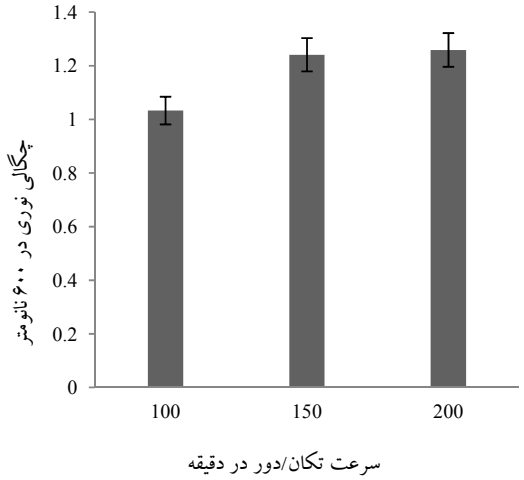
منبع	مجموع مربعات	df	میانگین مربعات	F	*P*
اسیدیته	۰/۰۹۶	۴	۰/۰۲۴	۲۴/۲۸۹	۰/۰۰۰
دما	۰/۵۰۲	۳	۰/۱۶۷	۱۶۸/۶۷۸	۰/۰۰۰
اسیدیته*دما	۰/۰۹۹	۱۲	۰/۰۰۸	۸/۳۰۰	۰/۰۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- آزمون دانکن برای بررسی بهترین شرایط اسیدیته و دما برای رشد باکتری در حضور کروم توسط *Mac*-۲

سطوح اسیدیته	تعداد آزمون	زیر مجموعه‌ها (چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر)	
		۱	۲
۵	۱۲	[b]۰/۵۷۴۰	
۴	۱۲		[a]۰/۶۵۷۸
۱	۱۲		[a]۰/۶۵۹۱
۳	۱۲		[a]۰/۶۸۲۵
۲	۱۲		[a]۰/۶۸۲۶
سطوح دما	تعداد آزمون	زیر مجموعه‌ها (چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر)	
		۱	۲
۳	۱۵	[b]۰/۵۹۵۰	
۲	۱۵	[b]۰/۵۹۷۱	
۱	۱۵	[b]۰/۶۰۳۲	
۴	۱۵		[a]۰/۸۰۹۵



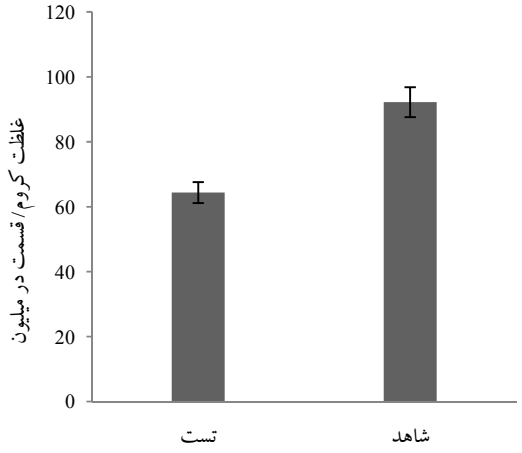
شکل ۱- تأثیر سرعت تکان بر رشد باکتری، در دمای بهینه ۴۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته برابر با ۸

برای بررسی معناداری سطوح مختلف سرعت تکان، آزمون آنووا یک طرفه در نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اس ۱۶ نشان داد در $P\ value<۰/۰۵$ نتایج معنادار نیست. یعنی تفاوتی بین ۳ سطح سرعت تکان در رشد باکتری وجود ندارد (جدول ۶).

در شکل ۲ نتایج مربوط به درصد حذف فلز کروم توسط سویه مورد آزمایش در مقابل شاهد مشاهده می‌شود. سویه *Mac*-۲ با حذف ۳۵/۶۰ درصد از کروم موجود در محیط، بهترین نتیجه را نسبت به سایر سویه‌ها نشان داد. میزان فلز باقیمانده در مایع رویی کشت ۶۴/۴۰ درصد بود.

جدول ۶-آزمون آنووا یک طرفه در بررسی تأثیر سرعت تکان بر رشد باکتری

بین گروه‌ها	مجموع مربعات	df	میانگین مربع	F	*P*
	۰/۰۹۴	۲	۰/۰۴۷	۲/۷۷۹	۰/۱۴
در گروه‌ها	۰/۱۰۲	۶	۰/۰۱۷		
کل	۰/۱۹۶	۸			



شکل ۲- نتایج جذب اتمی برای میزان فلز باقیمانده در مایع رویی کشت سویه *Mac*- ۲ در کنار شاهد

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

توانایی *سودوموناس‌ها* در زمینه فعالیت‌های زیست به ویژه در زمینه تجزیه زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته و مشخص شده که، آن‌ها توانایی بسیار بالایی در استفاده از ترکیبات آروماتیک دارند. از این رو این باکتری ها به دفعات از انواع اکوسیستم‌های آلوده به ترکیبات نفتی جدا شده‌اند (۴ و ۹). بر این اساس در پژوهش حاضر، خاک‌های نفتی ناحیه خوزستان برای جداسازی این باکتری انتخاب شد.

جداسازی سویه‌های مقاوم به فلز برای انجام حذف زیستی فلز از پساب ضروری است، زیرا بیشتر میکروارگانیسم‌های تصفیه کننده پساب به این فلزات حساس هستند. به منظور افزایش بازده کاربرد میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌ها برای حذف فلزات سنگین از محیط های طبیعی، تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد بسیار مؤثر است و امکان مدیریت بهتر و کارایی بالاتری را برای کاهش و حذف آلاینده‌هایی چون فلزات سنگین فراهم می‌سازد (۱۷). حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد برای سویه منتخب جدا شده در این پژوهش برابر با ۴۰۰ قسمت در میلیون شد که با مطالعه ادوارد راجا[۸] و همکاران برای سویه *BC-۵* *سودوموناس آئروجینوزا* مطابقت دارد. در پژوهش حاضر باکتری منتخب مقاوم به کروم نسبت به کانامایسین، اریترومایسین، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین مقاومت نشان داد که با پژوهش انجام شده توسط زنگ[۹] و همکاران مطابقت دارد. با توجه به این که ژن‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین می‌توانند بر روی یک پلاسمید باشند، انطباق این دو نوع مقاومت در نتیجه به دست آمده در این پژوهش کاملاً مشهود است (۱۶).

سویه *Mac-۲* ، در اسیدیته برابر با ۸ بهترین شرایط حذف کروم را داشت که به علت بهینه بودن شرایط رشد در اسیدیته نزدیک به خنثی است و با مطالعه چاترجی [۱۰] انطباق کامل دارد (۱۸). در شرایط اسیدی به علت وجود میزان بالای یون هیدروژن در محیط و واکنش این یون با سطح دارای بار منفی سلول باکتری، ظرفیت جذب کاتیون‌ها به شدت کاهش می‌یابد و در نتیجه بر روی حذف زیستی فلز اثر منفی می‌گذارد. از طرفی در این اسیدیته میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد که می‌تواند به کاهش میزان جذب فلز بیانجامد. در مقابل با افزایش میزان اسیدیته، لیگاندهای بار منفی افزایش پیدا می‌کند که نتیجه آن افزایش اتصال کاتیون‌ها خواهد بود (۱۶، ۱۸- ۲۰). چنین حالتی در مطالعه پیش رو به اثبات رسید. لایه لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی مسئول ظرفیت جذب سطحی کارامد برای فلزات است. همچنین، تأیید شده که باکتری‌ها طیف متنوعی از مواد اختصاصی و غیراختصاصی جاذب فلز را در پاسخ به میزان بالای فلزات سمی آزاد می‌کنند. ساختمان‌های خارج سلولی مانند کپسول و لایه لزج نیز از بخش‌های جاذب فلز هستند. مکان‌های اتصال در میکروارگانیسم‌ها معمولاً شامل گروه‌های فسفات، سولفید و هیدروکسیل است. یکی از سلول‌های باکتریایی که توانایی ایجاد پلی‌ساکاریدهای پوششی خارج سلولی را داشته و از این طریق فلزات را جذب می‌کند جنس *سودوموناس* است. علاوه بر این مشخص شده که *سودوموناس*‌ها می‌توانند در احیای کروم ۶ ظرفیتی محلول به شکل ۳ ظرفیتی نامحلول نقش داشته و با انباشت داخل سلولی، کروم را از محیط مربوطه حذف کنند (۱۹- ۲۲).

www.SID.ir

Archive of SID

بهترین دما برای رشد باکتری در حضور کروم در مطالعه حاضر، ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود که با آزمون دانکن ثابت شد. با توجه به اینکه افزایش دما می‌تواند باعث افزایش فعالیت متابولیکی سلول باکتری شود، شاید کاهش میزان کروم با متابولیسم *Mac-۲* مرتبط شود. شرایط بهینه رشد سویه مورد مطالعه راجا و همکاران، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. تأثیر سرعت تکان در رشد سویه مورد بررسی در پژوهش حاضر وضعیت معناداری را بین سطوح سه گانه نشان نداد و البته در ۲۰۰ دور بر دقیقه اندکی بیشتر از دو سطح دیگر بود که احتمالاً به خاطر هوادهی بهتر نمونه است. سویه *BC-۵* در مطالعه ادوارد راجا ۳۰ درصد کروم را جذب کرد این در حالی است که در این پژوهش، جذب ۳۵/۶۰ درصدی کروم مشاهده شد که کمابیش با مطالعه یاد شده انطباق دارد (۱۰). شایان ذکر است که در مطالعه موکرجی و همکاران *سودوموناس* آئروجینوزای استفاده شده پس از سه روز بیش‌ترین میزان حذف کروم را به میزان ۷۲/۵۶ درصد از محلول ساختگی ۳۰ قسمت در میلیون و ۵۲/۲۶ درصد از پساب یک کارخانه دباغی نشان داد (۱۸). در پژوهش حاضر زمان ۲۴ ساعته برای حذف کروم از محیط واجد ۱۰۰ قسمت در میلیون کروم استفاده شد. در مجموع این نشان می‌دهد که *Mac-۲* در مقایسه با سویه مورد استفاده توسط موکرجی کارامدتر بوده است و می‌تواند کاندیدای مناسبی برای مطالعات اصلاح زیستی محیط از فلز سمی کروم باشد.

تشکر و قدردانی

از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، واحد مطالعات مهندسی بهره‌برداری نفت استان خوزستان و پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Ozdemir G., Ceyhan N., Ozturk T., Akirmak F., Cosar T. Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. *Chemical Engineering Journal 2004*; 10 (2): 249- 53.

(2) Bitton G., Wiley J. *Waste Water Microbiology*. 2nd. ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2005.

(3) Adeniji A. Bioremediation of Arsenic, Chromium, Lead, and Mercury. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office, Washington, DC. NTIS: PB2005-101646, 48 pp, Aug 2004.

(4) Khorasani H. Biosorption of chromium and lead by *Pseudomonas* spp related to Khuzestan oil contaminated soils [Dissertation] Tonekabon: I.A.U. Tonekabon branch; 2012.

(5) Kamaludeen S.P., Arunkumar K.R., Avudainayagam S., Ramasamy K. Bioremediation of Chromium Contaminated Environments. *Indian Journal Experimental Biology* 2003; 41 (9): 972- 85.

(6) Cole P., Brad R. Epidemiological Studies of Chrome and Cancer Mortality: A Series of Meta-Analyses. *Regul Toxicopharmacol* 2005; 43 (3): 225- 31.

(7) Zolfaghari M., Soleymani Darjagh M., Masodikhah M., Motlagh M., Heydarpoor A. Prevalence and antimicrobial resistance of chromium-bearing microorganisms in industrial wastewaters of Qom. *Med Science of Qom University* 2012; 6: 15- 23.

(8) Ahalya N., Ramachandra T., Kanamadi Rd. Biosorption of heavy metal. *Journal Chemistry and Environment* 2003; 7 (4): 71- 9.

(9) Perez R.M., Albus A., Gomez J.M., Cantero D. Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleum contaminated site. *Advanced Materials Research* 2007; 2 (12): 615- 18.

www.SID.ir

Archive of SID

(10) Raja C.E., Anbazhagan A., Sadasivam selvam G. Isolation and characterization of a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *World Journal Microbiology Biotechnology* 2006; 2 (2): 577- 85.

(11) Barati B. *Microbiology Laboratory*. Tehran: Imam Hossein Uni; 2005.

(12) Mohamadi M. *Notes on Microbiology Laboratory*. Tehran: Tehran Uniersity; 1380.

(13) Heshmatipour Z. *Practical Microbiology*. Tehran: Ketab Mir; 2008.

(14) Claus D., Berkeley R.C.W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.

(15) Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Michigan: Springer Science, 2005.

(16) Zeng X-X., Tang J-X., Liu X-D., Jiang P. Isolation, identification and characterization of cadmium-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain E1. *Journal Central South University* 2009; 16: 416- 26.

(17) Nasr Azani A., Tahmors pour A., Hodji M. Determination of tolerance threshold of bacteria to lead, zinc and cadmium in three types of industrial wastewater. *Journal Ecology* 2010; 56: 75- 86.

(18) Chatterjee S., Ghosh I., Mukherjea K.K. Uptake and removal of toxic Cr (VI) by *Pseudomonas aeruginosa*: physico-chemical and biological evaluation. *Current Science* 2011; 101 (5): 645- 52.

(19) Durga Devi B., Thatheyus A.J., Ramya D. Bioremeoval of hexavalent chromium, using *Pseudomonas Fluorescens*. *Journal Microbiology Biotechnology Research* 2012; 2(5): 727-35.

(20) Srivastava J., Chandra H., Tripathi K., Naraian R., Sahu RK. Removal of chromium (VI) through biosorption by the *Pseudomonas* spp.isolated from tannery effluent. *Journal of Basic Microbiology* 2008; 48: 135- 9.

(21) Ahmady-Asbchin S., Jafari N. Evaluation of parameters effective in nickel uptake by *Pseudomonas* and *Bacillus*. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (1): 47- 56.

(22) Sadeeshkumar R., Saranraj P., Annadurai D. Bioadsorption of the toxic heavy metal chromium by using *Pseudomonas putida*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology* 2012; 2 (4): 32- 6.

[1]- Bioremediation
[2]- γ Proteobacteria
[3]- Minimum inhibitory concentration
[4]- Gel diffusion
[5]- Optical Density
[6]- Atomic Absorption Spectroscopy
[7]- SPSS16
[8]- Raja C.E.
[9]- Zeng
[10]- Chatterjee

www.SID.ir

Archive of SID

Biosorption of chromium by *Pseudomonas* sp. isolated from oil contaminated soils of Khuzestan

Seyed Mansour Meybodi
Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran, s.m.meybodi@gmail.com
Homa Khorasani *
M.Sc. of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran, homa_khorasani@yahoo.com

Abstract

Introduction: In the last decade, biology and microorganisms is built to clean up environmental pollutants such as heavy metals. Isolation of metal resistant strains to achieve the goal is very important and the aim of this study was isolate the chrome resistant strains.

Materials and methods: Five samples of oil contaminated soils of Khuzestan zones were collected under sterile conditions and transferred to laboratory immediately. The soil samples were homogenized and diluted by sterile saline up to 10^{-10} and cultured on Luria Bertani agar containing 5ppm potassium dichromate. Resistant strains were isolated after 24 hours of incubation, and then for isolation of appropriate strains, cultured on Macconkey agar. Isolated bacteria were identified by biochemical tests. Then, Luria Bertani agar was used for screening of resistant strains in form of MIC test. The best conditions for bacterial growth were found in the presence of chromium in various temperatures, rate of shaking and pH values by spectrophotometry at 600 nm in the overnight of cultivation. Absorption tests of metal were started under optimal conditions.

Results: From total of 24 strains of isolated *Pseudomonads*, 14 strains were resistant to chromium. The best strain (*Mac-2*) had removed 35.60 % of chromium from aqueous culture mediums under optimal conditions (pH: 8, Temp: 40°C and Shaking rate: 200rpm).

Discussion and conclusion: Since heavy metals in various physicochemical forms are considered as environmental pollutants in most parts of the world, thus, the contaminated regions must be detoxified. The isolated strain can be used for studies of bioremediation of chromium contaminated sites.

Key words: Biosorption, Chromium, *Pseudomonas*, Oil contaminated soil

* Corresponding author
Received: March 12, 2014 / **Accepted:** June 25, 2014

www.SID.ir