مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره دوم (پیاپی ۲۳) تابستان ۱۳۹۴
صفحات ۱۶۷-۱۵۸

Original Article

جذب زیستی فلز نقره توسط باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه MS8 جدا شده از پساب کارگاه نقره کاری در اصفهان

مائده شاه سنایی گنیرانی[۱]، علی محمد احدی*[۲]، منیر دودی[۳]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی، فلاورجان، اصفهان، [۲]استادیار، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه ژنتیک، شهرکرد، [۳]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان،گروه میکروب شناسی، فلاورجان، اصفهان.

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص میکروارگانیسم های مقاوم به فلزات سمی اولین گام در فرآیند پاکسازی زیستی است. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری های مقاوم به فلز نقره و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنها (MIC) و سپس بررسی جذب زیستی فلز نقره در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها: نمونه گیری از پساب دو کارگاه نقره کاری در اصفهان و ورودی فاز ۲ تصفیه خانه شاهین شهر اصفهان انجام شد. برای جداسازی باکتری های مقاوم به فلز و تعیین حداقل میزان غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) آن ها از روش رقت در آگار و محیط کشت PHG II آگار حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸، ١٦ و ۳۲ میلی مول بر لیتر از نیترات نقره ($AgNO_3$) استفاده شد. شناسایی مولکولی سویه های مقاوم با استفاده از روش ریبوتایپینگ انجام شد.

یافته ها: در این مطالعه ۷ جدایه باکتریایی مقاوم به نقره جداسازی شدند که در بین آن ها جدایه Ag5 بیشترین میزان مقاومت را نسبت به نقره (MIC=٦ میلی مولار) نشان داد. بر اساس بررسی مولکولی جدایه Ag5 دارای توالی جدیدی بود و به عنوان *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه MS8 با شماره دسترسی KP742984 در بانک جهانی ژن (NCBI) به ثبت رسید. این سویه پس از زمان ۱۲۰ دقیقه قادر به جذب ۱۱/۳۹ درصد نقره از محیط در شرایط آزمایشگاهی بود و رشد مناسبی را در حضور فلز از خود نشان داد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد که سویه جداسازی شده گزینه مناسبی برای جذب زیستی نقره از پساب های آلوده در آینده باشد.

واژگان کلیدی: باکتری مقاوم به نقره، پساب، حداقل غلظت ممانعت کننده رشد، جذب زیستی.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ٩٤

مقدمه

امروزه در اثر توسعه صنایع و ورود پساب کارخانجات صنعتی به محیط زیست، اکوسیستم اطراف کارخانه ها و آب های سطحی و زیرزمینی در خطر آلودگی می باشند. این امر در کوتاه مدت و هم در دراز مدت اثرات زیانباری بر روی موجودات زنده، خاک، گیاهان و جانوران موجود در این مناطق برجای می گذارد (۱ و ۲). در دهه اخیر آلودگی و حضور بیش از حد فلزات سنگین خطر جدی را در زیستگاه های طبیعی به وجود آورده است (۳). تکنولوژی های صنعتی مانند تعویض یون، رسوب دهی شیمیایی، اسمز معکوس، فرآیند تبخیر و غیره اغلب نامناسب و بسیار پر هزینه می باشند. به همین دلیل نیاز به توسعه روش های جدید و ارزان، مانند جذب زیستی فلزات سنگین احساس می گردد (٤).

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، کیلومتر ۲ جاده سامان، دانشگاه شهرکرد،گروه ژنتیک.
تلفن: ۰۹۱۲۲۰۹٤۰٤۷ پست الکترونیک: ahadi52@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

وجود فلزات سنگین در پساب کارخانه های صنعتی باعث آسیب جدی به محیط زیست می‌شود. حضور غلظت بالای فلزات سمی سنگین در فاضلاب می تواند موجب مشکلات شدید برای سلامت انسان گردد (۵). این فلزات سمی می توانند با ایجاد اختلال در عملکرد عصبی از طریق تأثیر بر تولید و آزادسازی انتقال دهنده های عصبی بر روی رفتار تأثیر گذار باشند. دیگر دستگاه هایی که تحت تأثیر فلزات سنگین قرار می گیرند شامل خون و رگ ها، دستگاه های دفعی مثل روده، کبد و کلیه، غدد درون ریز، مسیرهای تولید انرژی و دستگاه تناسلی می‌باشند (٦). بنابراین ضرورت حذف فلزات سنگین موجود در پساب ها قبل از تخلیه به سیستم های آبی محیط و به خطر انداختن سلامت انسان ها وجود دارد (۷).

میکروارگانیسم ها دارای مکانیسم های تنظیمی تجمع یون های فلزی برای جلوگیری از سمیت فلزات سنگین می باشند. گزارش های بسیاری در مورد مقاومت میکروبی به فلزات سنگین وجود دارد (۷ و ۸). میکروارگانیسم های مقاوم در برابر فلز را می توان به عنوان عوامل زیست پالایی استفاده نمود (۹ و ۱۰). جذب زیستی فلزات سنگین یکی از تکنیک های مؤثر و با اهمیت به کار برده شده در انتقال فلزات سنگین از پساب های صنعتی و آب های طبیعی است (۱۱). با وجود این که نقره از جمله فلزات سنگین و سمی می باشد، اما برای مدت طولانی به عنوان یک عامل درمانی در پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است.

در بسیاری از کشورها، به منظور جلوگیری از عفونت چشمان کودکان تازه متولد شده با سویه های *نایسریا* از قطره نیترات نقره استفاده می گردد. در نتیجه باکتری‌های مقاوم در برابر نقره تکامل یافته اند. مقاومت به نقره بر اساس ناقل غشاگذر RND (resistance-nodulation-cell division) در باکتری های گرم منفی، ناقل ATPase نوع P (P-type ATPase) در باکتری های گرم مثبت و ایجاد کمپلکس اضافی با ترکیبات داخل سلولی ممکن می گردد (۱۲).

هافلی (HaeFeli) و همکاران در سال ۱۹۸٤ سویه هایی از باکتری *سودوموناس استوتزری* (*Pseudomonas stutzeri*) مقاوم به نقره را از خاک معدن نقره در یوتا جداسازی نمودند. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC=Minimum Inhibitory Concentration) در این مطالعه مربوط به *سودوموناس استیدزری* سویه AG256 و معادل ۰/۲۵ mM بود. از طرفی بالاترین MIC مربوط به سویه AG259 و برابر با ۲۵ mM گزارش شد (۱۳).

شکیبایی (Shakibaie) و همکاران در سال ۱۹۹۹ به کمک باکتری های مهندسی ژنتیک شده *آسینتوباکتر بامانی* (*Acinetobacter baumnannii*) BL54 توانستند نقره (۲/۸۵ mg/g biomass) را از پساب صنایع فیلم جذب نمایند (۱٤). بنابراین می توان نتیجه گرفت که میکروارگانیسم ها می توانند به عنوان ابزاری در تصفیه و تیمار فاضلاب ها مورد استفاده قرار گیرند.

فرآیندهای زیستی نسبت به فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی مزایای بیشتری از خود نشان داده اند (۱۵). در حقیقت چندین میکروارگانیسم برای فرآیند سم زدایی از سیستم های فاضلاب شناخته و بررسی شده اند که موفقیت بالایی در بهبود کیفیت پساب ها از خود نشان داده اند (۱٦). هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری های مقاوم به فلز نقره، تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنها (MIC) و نیز بررسی جذب زیستی فلز نقره در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی پساب دو کارگاه نقره کاری و ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین شهر اصفهان انجام شد. نمونه برداری در بطری های دهان گشاد پلاستیکی استریل انجام گرفت. دما، pH و میزان فلزات سنگین در نمونه های پساب جمع آوری شده اندازه گیری شدند. به منظور اندازه گیری میزان pH و غلظت فلز نقره موجود در پساب ها از دستگاه pH متر (Metrohm 827, Swiss) و دستگاه جذب اتمی

Archive of SID

www.SID.ir

(Perkin elmer-800, American) استفاده گردید. برای اندازه گیری میزان فلز موجود در نمونه های پساب، ابتدا ۵۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه پساب به بالن ۲۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد. مقدار ۵ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ به آن اضافه گردید و بر روی حمام بخار به آرامی تبخیر شد. عمل هضم تا رسیدن به محلول شفاف ادامه یافت و از خشک شدن نمونه ها در طول مرحله هضم جلوگیری گردید. هنگامی که میزان نمونه به ۱۰ تا ۲۰ میلی لیتر کاهش یافت، جدار بالن با آب مقطر شستشو و نمونه به حجم رسانده شد. سپس به کمک دستگاه جذب اتمی میزان فلزات سنگین قرائت گردید (۱۷).

ب) جداسازی باکتری های مقاوم به نقره از پساب های مورد بررسی: برای این منظور از روش انتشار بر پلیت (Spread Plate Method) استفاده شد. ابتدا نمونه های پساب در محیط کشت PHGII آگار با غلظت ۰/۵ میلی مولار از فلز نقره پخش شدند. برای تهیه ۱۰۰۰ میلی لیتر از محیط PHG Ii آگار، ٤ گرم پپتون، ۱ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار استفاده شد. تمام مواد لازم برای تهیه محیط PHG Ii آگار از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. رشد کلنی های باکتریایی پس از ۵ روز گرماگذاری، در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). در این مطالعه از نمک فلزی نیترات نقره (Scharlau، کشور اسپانیا) استفاده شد. کلنی های رشد یافته در محیط کشت PHGII آگار حاوی غلظت ۰/۵ میلی مولار از نقره، که از نظر ظاهر به هم شباهت داشتند، انتخاب و برای غنی سازی در لوله های حاوی محیط مایع PHGII با غلظت ۰/۵ میلی مولار از فلز نقره، کشت داده شدند. این لوله ها به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از ایجاد کدورت به منظور خالص سازی باکتری ها از روش کشت خطی (Streak Plate Method) بر محیط کشت PHGII آگار با همان غلظت فلزی، استفاده گردید. از کلنی خالص تهیه شده، گسترش میکربی تهیه و رنگ آمیزی گرم انجام شد (۳).

ج) تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) : برای این منظور از روش رقت در آگار (Agar dilution) استفاده شد. به این صورت که پلیت های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت های مختلف نیترات نقره تهیه گردید. به طوری که هر پلیت حاوی یک غلظت مشخص از نیترات نقره بود. سپس کلنی های مقاوم به صورت شعاعی بر سطح پلیت کشت داده شدند (۱۹). پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس قرار گرفتند. پس از طی مدت زمان لازم پلیت ها بررسی گردیدند و بر اساس حداقل غلظتی که از رشد باکتری ممانعت کرده بود، MIC تعیین شد (۲۰).

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، از غلظت های (mM) ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸، ۱٦ و ۳۲ محلول نیترات نقره استفاده شد (۱۸). پس از رشد میکروارگانیسم ها بر اساس میزان رشد و یا عدم رشد، غلظت های بینابینی نیز انتخاب و رشد مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC=Minimum Bactericidal Concentration) تعیین گردید (۳).

د) شناسایی مولکولی: در این مطالعه شناسایی مولکولی جدایه ای که بیشترین MIC را نسبت به فلز نقره از خود نشان داد با استفاده از تکنیک Colony PCR انجام شد. به منظور تکثیر ژن *16S rDNA* از پرایمرهای عمومی طراحی شده شامل F: 5'-ACACACGTGCTACAATGG-3' و R: 5'-TAAACCACATGCTCCACC-3' (شرکت دانش بنیان تالی ژن پارس) استفاده گردید. پرایمرهای عمومی به کار رفته در این مطالعه با استفاده از بررسی های دقیق همولوژی توسط سرورهای BLAST و ClustalW و مشخص کردن نواحی حفاظت شده در بین سویه های مختلف باکتریایی، طراحی شدند.

واکنش Colony PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ Mm)، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ dNTPs mM)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ میکرومولار)، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA

Archive of SID
www.SID.ir

polymerase و ۱۸/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی انجام شد (۹). در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل Kyratec، ساخت کشور سنگاپور) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند.

توالی حاصل از PCR پس از بررسی و تصحیح کروماتوگرام با BLAST در پایگاه NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) از نظر همولوژی بررسی و گونه مورد نظر شناسایی گردید.

ه) بررسی میزان جذب فلز سنگین نقره در شرایط آزمایشگاهی: به منظور مطالعه میزان جذب فلز سنگین نقره، باکتری که بیشترین MIC را نسبت به فلز نقره از خود نشان داد انتخاب و از آن کشت مجدد تهیه گردید. ابتدا باکتری مورد نظر به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مولر هینتون براث (Scharlau، کشور اسپانیا) تلقیح شد. ارلن به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰°C و دور ۲۰۰ g قرار گرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر از این محیط حاوی باکتری به پلیت نوترینت آگار (Scharlau، کشور اسپانیا) به عنوان شاهد و ۱۰ میکرولیتر به پلیت حاوی بالاترین غلظت از فلز مورد نظر (بیشترین MIC که باکتری مورد آزمایش در آن رشد کرده بود) منتقل گردید. پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ °C قرار گرفتند.

پس از رشد باکتری بر روی محیط حاوی فلز، چند لوپ از آن ها در ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مولر هینتون براث بدون فلز تلقیح گردید. ارلن برای مدت ٤۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ °C و دور ۲۰۰ g قرار گرفت.

مقدار ۲/۱۲۳ گرم از نیترات نقره ($AgNO_3$) در ۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر استریل حل گردید و غلظت ۲۵۰ میلی مولار از نیترات نقره به دست آمد. مقدار یک میلی لیتر از این محلول به ارلن حاوی باکتری منتقل گردید. بدین ترتیب محیط، حاوی غلظت ۲/۵ میلی مولار از نقره گردید.

بلافاصله پس از افزودن محلول نقره در زمان های مختلف (۰، ۱۲۰، ۸۰، ٤۰ دقیقه)، مقدار ۱ میلی لیتر از این محلول برداشته و پس از انتقال به لوله های اپندورف به مدت ۸ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سپس روماند جدا سازی گردید. شایان یادآوری است که در هنگام آزمون، ارلن حاوی باکتری و نقره در فواصل زمانی بین برداشت ها باید دائماً تکان داده شود. بنابراین بلافاصله پس از برداشت نمونه، ارلن در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. به منظور شستشوی مقدار اضافی روماند از روی رسوب باکتری مقدار یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۰/٦ درصد استریل به رسوب حاصله اضافه گردید و پس از به هم زدن مجدداً سانتریفیوژ شد. روماند دور ریخته شد و رسوب به دست آمده برای محاسبه وزن بیومس باکتری نگهداری گردید. در ادامه باکتری های رسوب کرده در دمای ٦۰ °C به مدت ٦ ساعت خشک گردیدند و به عنوان بیومس (وزن خشک) باکتری مورد استفاده قرار گرفتند و مقدار فلز سنگین ذخیره شده در آن ها توسط جذب اتمی محاسبه گردید.

برای این منظور یک میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ (Scharlau، کشور اسپانیا) به لوله های اپندورف حاوی رسوب اضافه و حرارت داده شدند. در نهایت ۵ نمونه به دست آمده با مقدار مناسب آب دو بار تقطیر به حجم مناسب ۵ میلی لیتر رسانده شدند و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوط به استانداردهای نقره و تعیین مقدار جذب نقره در هر یک از نمونه ها میزان فلز سنگین نقره در همه نمونه ها محاسبه گردید. در انجام این مرحله از محاسبات غلظت های ۱، ۲، ٤، ٦ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر از نقره به عنوان استاندارد به دستگاه تزریق شد (۲). با استفاده از نرم افزار *Excel* نمودارهای مربوط به نمونه های باکتری رسم گردید و نتایج به دست آمده مقایسه و تحلیل شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها

عوامل دما، اسیدیته و نیز غلظت فلز نقره در پساب های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. تمام باکتری های جداسازی شده در این مطالعه از نظر میزان MIC و MBC به فلز نقره مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج مربوط به سویه های مختلف در جدول ۲ مشاهده می گردد.

در این بررسی، از میان جدایه های مقاوم به فلز نقره، جدایه Ag5 که بیشترین مقاومت را نسبت به فلز مورد نظر نشان داد انتخاب و مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت. همچنین این جدایه از نظر میزان جذب نقره بررسی شد. این جدایه از پساب کارگاه نقره کاری ۱ دارای بیشترین میزان غلظت نقره، جداسازی گردید. بر اساس بررسی مولکولی، جدایه Ag5 سویه جدیدی از باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* (*Stenotrophomonas maltophilia*) بود که به عنوان *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه MS8 با شماره دسترسی KP742984 در بانک جهانی ژن به ثبت رسید (شکل ۱).

همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود میزان جذب نقره توسط باکتری مورد بررسی در بازه زمانی ۰-۸۰ دقیقه با شیبی ملایم در حال افزایش بود. سپس در بازه زمانی ۸۰ تا ۱۲۰ دقیقه با شیب تندی میزان جذب افزایش یافت. همچنین میزان بیومس باکتری نیز در حضور نقره در بازه زمانی ۰ تا ۱۲۰ دقیقه، با افزایش همراه بود (نمودار ۲).

جدول ۱: عوامل اندازه گیری شده در پساب های مورد مطالعه.

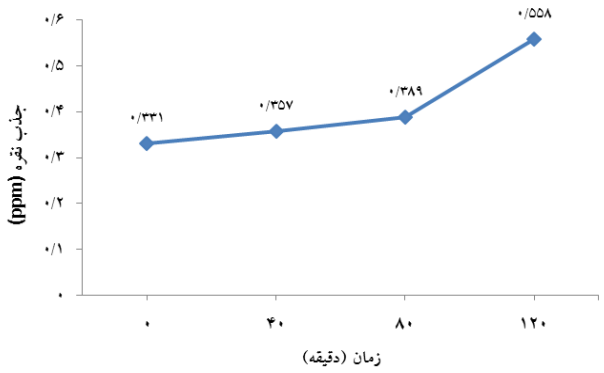
پساب ها	pH	دما (°C)	میزان نقره (ppm)
ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین شهر اصفهان	۷/۳۳	۱۷/۹	۰/۰۷۵
کارگاه نقره کاری ۱	٦/۷۹	۱۷/۲	۰/۸۹۳
کارگاه نقره کاری ۲	٦/٤۸	۱۵/۷	۰/٦٤۸

جدول ۲: نتایج MIC و MBC جدایه های باکتریایی مقاوم به فلز نقره (بر حسب میلی مولار).

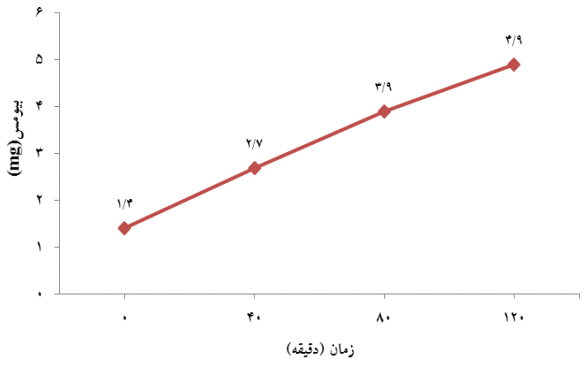
غلظت نقره (mM)	شماره جدایه						
	Ag1	Ag2	Ag3	Ag4	Ag5	Ag6	Ag7
MIC	۵	۵	۵	۱/۲۵	٦	٤	۳
MBC	٦	٦	٦	۱/۵	۷	۵	۳/۵

بحث

در سال های اخیر، انواع مختلف موجودات زنده مانند باکتری ها، قارچ ها و جلبک ها با هدف شناسایی جذب کننده های زیستی کارآمد دفع فلز به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته اند. این ارگانیسم ها به طور گسترده ای در اکوسیستم های آبی و خاکی پراکنده اند. بررسی ها نشان داده است که در اکثر پژوهش ها از خاک و آب مناطق آلوده استفاده شده است. زیرا امکان وجود میکروارگانیسمی با توان تجزیه کنندگی بالا در این مناطق بیشتر از مناطق غیرآلوده به فلزات سنگین می باشد (۲۱).



نمودار ۱: میزان جذب نقره توسط باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه MS8 در زمان های مختلف.



نمودار ۲: میزان بیومس باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه MS8 در زمان های مختلف.

Archive of SID

www.SID.ir

البوغبیش (Alboghobeish) و همکاران در سال ۲۰۱٤ (۱۸) و نصرآزادانی (Nasrazadani) و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۳) به منظور جداسازی باکتری های مقاوم به فلز از محیط کشت PHG II آگار و دمای ۳۰ °C استفاده کردند که مشابه روش به کار رفته در مطالعه حاضر می باشد. در این پژوهش، ۷ باکتری مقاوم به نقره جداسازی شده از نظر میزان MIC مورد بررسی قرار گرفتند. از این میان جدایه Ag5 که به عنوان *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه MS8 شناسایی شد، بیشترین

شکل ۱: تصویر درخت فیلوژنی جدایه Ag5، استخراج شده از پایگاه BLAST.

www.SID.ir

مقاومت به نقره (MIC=٦ میلی مولار) را از خود نشان داد. همچنین این جدایه برای بررسی جذب فلز نقره در شرایط آزمایشگاهی نیز مورد مطالعه قرار گرفت. این باکتری از پساب کارگاه نقره کاری ۱ که دارای بیشترین میزان غلظت نقره در بین پساب های مورد مطالعه بود، جداسازی گردید.

در این مطالعه از نمک فلزی نیترات نقره استفاده گردید. همچنین لیما دی سیلوا (Lima de Silva) و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۲۲) و ریچاردز (Richards) و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۲۳) نیز برای مطالعه باکتری های مقاوم به نقره از نمک فلزی نیترات نقره استفاده نمودند. با توجه به نمودار ۱ مشاهده گردید که میزان جذب نقره توسط باکتری مورد بررسی در بازه زمانی ۰ تا ۸۰ دقیقه با شیبی ملایم در حال افزایش بود. سپس در بازه زمانی ۸۰ تا ۱۲۰ دقیقه با شیب تندی میزان جذب افزایش یافت. بر اساس نمودار ۲ میزان بیومس باکتری در حضور نقره در بازه زمانی ۰ تا ۱۲۰ دقیقه آزمایش افزایش داشت. غلظت مورد استفاده در این مطالعه برای سنجش جذب فلز توسط باکتری جداسازی شده ۲/۵ میلی مولار بود و باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه MS8 قادر به جذب نقره بود و رشد مناسبی را در حضور نقره از خود نشان داد. این سویه پس از زمان ۱۲۰ دقیقه قادر به جذب ۱۱/۳۹ درصد نقره از محیط در شرایط آزمایشگاهی بود. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج به دست آمده از مطالعات هو (Hu) و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۲٤)، شکیبایی (Shakibaie) و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۲) و جباری نژاد کرمانی (Jabbari Nezhad Kermani) و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۱) مشابهت داشت. به طوری که در این مطالعات نیز باکتری های به کار رفته قادر به جذب فلز سنگین مورد بررسی در شرایط آزمایشگاهی بودند.

پژوهش های متعددی در ارتباط با پاکسازی فلزات سنگین از پساب کارخانجات صنعتی در کشورهای مختلف انجام شده است. سلطان (Soltan) در سال ۲۰۰۱ در کشور مصر مقاومت ۲٤۰ جدایه باکتری *سودوموناس* را نسبت به فلزات سرب، کادمیوم، جیوه، روی، نقره و مس مورد مطالعه قرار داد. بر اساس نتایج منتشر شده از این میان برخی از جدایه ها جذب بالایی را نسبت به این فلزات از خود نشان دادند (۲۵). شکیبایی (Shakibaie) و همکاران در سال ۱۹۹۹ به کمک باکتری های مهندسی ژنتیک شده *آسینتوباکتر بامانی* BL54 (*Acinetobacter baumnannii* BL54) توانستند نقره (۲/۸۵ mg/g biomass) را از پساب صنایع فیلم جذب کنند (۱٤). هافلی(HaeFeli) و همکاران در سال ۱۹۸٤ سویه هایی از باکتری *سودوموناس استوتزری* (*Pseudomonas stutzeri*) را از معادن نقره به دست آوردند که به نقره مقاوم بوده و می توانستند ۲ mg/biomass نقره را جذب کنند (۱۳).

گلاگوتاشویلی (Gelagutashvili) و همکاران در سال ۲۰۱۳ جذب زیستی Ag(I)، Cd(II) و Au(III) به وسیله سیانوباکتری *اسپیرولینا پلاتنسیس* (*Spirulina platensis*) را با استفاده از دیالیز و تجزیه و تحلیل جذب اتمی تحت شرایط مختلف مورد مطالعه قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که بازده جذب برای یون های Ag(I)، Cd(II) و Au(III) به احتمال زیاد به نوع باکتری، شرایط استفاده و به فرآیندهای جذب بستگی دارد و حذف فلز توسط میکروارگانیسم ها وابسته به پارامترهای شیمیایی- فیزیکی می باشد. مقدار pH بهینه برای حذف Ag(I) و Cd (II) توسط *اسپیرولینا پلاتنسیس* ۷ pH بود. ثابت جذب زیستی (K) برای نقره در ۷ pH برابر ۱۳×۱۰^{-٤} و ظرفیت جذب زیستی (n) ۵/۲۷ بود (۲٦).

در این مطالعه نیز باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه MS8 نسبت به فلز نقره میزان MIC برابر با ٦ میلی مولار از خود نشان داد و پس از زمان ۱۲۰ دقیقه قادر به جذب ۱۱/۳۹ درصد نقره از محیط در شرایط آزمایشگاهی بود و در حضور نقره رشد مناسبی داشت و بیومس باکتری افزایش یافت. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق و سایر مطالعات که نشان دهنده ظرفیت باکتری ها در جذب نقره و قدرت تحمل آن ها نسبت به این فلز است، امید است که بتوان از این باکتری ها جهت تصفیه و حذف نقره موجود در فاضلاب های آلوده صنایع مختلف استفاده نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد که سویه مقاوم به نقره جدا شده در مطالعه حاضر، گزینه مناسبی برای حذف زیستی این فلز از پساب های آلوده در آینده باشد و بتوان از آن نه تنها برای بازیافت نقره از بقایای معادن و یا پساب کارگاه های نقره کاری و یا صنایع مربوطه بلکه برای جداسازی و حذف این فلز سمی از پساب ها استفاده نمود. از طرفی با توجه به مشکلات زیست محیطی پساب های صنعتی حاوی فلزات برای اکوسیستم ها و زنجیره غذایی، امکان دست یابی به راهی کم هزینه برای حذف زیستی فلزات سنگین و سمی از پساب ها و محیط زیست به وجود خواهد آمد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، به ویژه پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی واحد و همچنین از مسئولین و پرسنل شرکت دانش بنیان تالی ژن پارس واقع در شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Jabbari Nezhad Kermani A, Faezi Ghasemi M, Shakibaie MR, Khosravan A, Farahmand A. Screening sludge and soil of different plants to find resistant bacteria to cadmium and determine the kinetics of absorption of the metal. Journal of biotechnology environmental microorganisms. 2012; 1: 11-21. [In Persian]
2. Shakibaie MR, Khosravan A, Frahmand A, Zareh S. Elimination of copper and zinc from industrial wastes by mutated bacteria. J Kerman Univ Med Sci. 2009; 16(1): 13-24. [In Persian]
3. Nasrazadani A, Tahmourespour A, Hoodaji M. Determination of bacteria resistance threshold to lead, zinc and cadmium in three industrial wastewater samples. J Environ Studies. 2011; 36(56): 75-86. [In Persian]
4. Gavrilescu M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. Eng Life Sci. 2004; 4(3): 219-232.
5. Keramati P, Hoodaji M, Tahmourespour A. Multimetal resistance study of bacteria highly resistant to Mercury isolated from dental clinic effluent. Afr J Microbiol Res. 2011; 5(7): 831-837.
6. Ragan HA, Mast TJ. Cadmium inhalation and male reproductive toxicity. Rev Environ Contam Toxicol. 1990; 114: 1-22.
7. Fillali Bk, Taoufik J, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Current Microbiol. 2000; 41(3): 151-156.
8. Narasimhulu K, Rao PS, Vinod AV. Isolation and identification of bacterial strains and study of their resistance to heavy metals and antibiotics. J Microbial Biochem Technol. 2010; 2(3): 74-76.
9. Brierly CL. Bioremediation of metal contaminated surface and ground water. J Geomicrobial. 1990; 8: 201-233.
10. Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ Chem Lett. 2009; 7: 1-19.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Veglio F, Esposito A, Reverberi AP. Standardization of heavy metal biosorption test: equilibrium and modeling study. Process Biochem. 2003; 38: 953-961.

12. Nies DH. Microbial heavy metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol. 1999; 51: 730-750.

13. HaeFeli C, Franklin C, Hardy K. Plasmid-determined silver resistance in *P. Stutzeri* isolated from a Silver mine. J bacterial. 1984; 158(1): 384-392.

14. Shakibaie MR, Kapadnis BP, Dhakep Hallker PK, Chopade BA. Removal of silver from phothographic waste water effluent using *Acinetobacter baumnannii* BL54. Can J Microbiol. 1999; 45(12): 995-1000.

15. Kamika L, Momba MNB. Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial. BMC Microbiol. 2013; 13: 28-41.

16. Madoni P, Davoli D, Gorbi G, Vescovi L. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. Water Res. 1996; 30(1): 135-141.

17. Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. 1998. American Public Health Association (APHA), Standard methods for the examination for water and wastewater. 20th ed. American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF), Washington, DC. 1325p.

18. Alboghobeish H, Tahmourespour A, Doudi M. The study of nickel resistant bacteria (NiRB) isolated from wastewaters polluted with different industrial sources. IJEHSE. 2014; 12: 1-7.

19. Hassen A, Saidi N, Cherif M. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. Bio Resou Technol. 1998; 64: 7-15.

20. Coral MN, Korkmaz H, Arikan B. Plasmid heavy metal mediated resistances in *Enterobacter* spp. Isolated from sofulu landfill. Ann Microbiol. 2005; 55(3): 175-179.

21. Sinha S, Kumar Mukherjee S. *Pseudomonas aeruginosa* KUCD1 a possible candidate for cadmium bioremediation. Braz. J. Microbiol. 2009; 40: 655-662.

22. Lima de Silva AA, Riberio de Carvalho MA, de Souza SA, Teixerira Dias PM, da Silva Filho RG, de Meirelles Saramago CS, de Melo Bento CA, Hofer E. Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. Braz J Microbiol. 2012; 43(4): 1620-1631.

23. Richards JW, Krumholz G, Chval MS, Tisa LS. Heavy metal resistance patterns of Frankia strains. Appl Enrivon Microbiol. 2002; 68(2): 923-927.

24. Hu Q, Qi H, Bai Z, Dou M, Zeng J, Zhang F, Zhang H. Biosorption of cadmium by a Cd2+ - hyper resistant *Bacillus cereus* strain HQ-1 newly isolated from a Lead and Zinc mine. World J Microbiol Biotechnol. 2007; 23: 971-976.

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

26. Gelagutashvili E. Comparative study on heavy metals biosorption by different types of bacteria. OJ Metal. 2013; 3: 62-67.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 2, June 2015

Original Article

Biosorption of silver by *Stenotrophomonas maltophilia* strain MS8 isolated from wastewater of Silversmith's workshop in Isfahan

Maedeh Shahsanaei Goneirani[1], Ali Mohammad Ahadi[2], Monir Doudi[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Falavarjan branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Detection of the microorganisms resistant to toxic metals is the first step in the process of bioremediation. The purpose of this study was isolation of silver-resistant bacteria, determination of their minimum inhibitory concentration (MIC) and investigation on the biosorption in vitro.

Materials & Methods: Sampling was carried out from the wastewater of two Silversmith's workshop in Isfahan and effluent of the wastewater treatment plant phase 2 input in Shahinshahr. The agar dilution method and PHG II culture medium containing concentrations of 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mM of Ag (NO3)was used to separate the metal-resistant bacteria and determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Finally, the ribotyping method was used to identify the silver-resistant bacteria.

Results: In this study seven silver-resistant bacteria were isolated, among them Ag5 showed the highest resistance to silver (MIC = 6mM). Based on the molecular analysis, this isolate belonged to a new strain, called as *Stenotrophomonas maltophilia* strain MS8, and its formation was deposited as KP742984 in Gene Bank (NCBI). This strain was able to absorb 11.39% of silver from medium in vitro after 120 minute and could growth well in the presence of silver.

Conclusion: According to the results of this study, it seems that this isolate is a good candidate for biological removal of silver from contaminated wastewater in the future.

Keywords: Silver-resistant bacteria, Wastewater, Minimum inhibitory concentration, Biosorption.

Archive of SID

Correspondence to: Ali Mohammad Ahadi

Tel: +989122094047

E-mail: ahadi52@gmail.com

Journal of Microbial World 2015, 8(2): 158-167.

www.SID.ir