



## حذف فلزات سنگین توسط سویه حل کننده فسفات انتروباکتر زیانگ فانجنسیس جداسازی شده از رایزوسفر

فاطمه السادات قریشی<sup>۱</sup>، زهرا اعتمادی فر<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، آدانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان.

### چکیده

**سابقه و هدف:** فعالیت های صنعتی در جهان موجب رهاسازی فلزات سنگین آلاینده شده است. این مطالعه با هدف ارزیابی حذف فلزات سنگین توسط باکتری حل کننده فسفات و نیز تاثیر عوامل خارج سلولی شامل فسفاتاز بر حذف فلز انجام شده است. **مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، باکتری حل کننده فسفات از رایزوسفر گل تاج خروس توسط محیط پیکوسکایا جداسازی گردید و به کمک روش مولکولی شناسایی شد. فسفاتاز به روش رنگ سنجی، MIC50 و MBC نیکل، کادمیوم، کروم و سرب به وسیله روش میکروپلیت تعیین شدند. حذف فلزات به وسیله سلول ها یا روماندا کشت با روش جذب اتمی اندازه گیری گردید. تغییرات سطح سلول های در معرض فلز نیز با روش FTIR بررسی شد. **یافته ها:** در این مطالعه سویه مولد اسید فسفاتاز به عنوان *انتروباکتر زیانگ فانجنسیس* شناخته شد. بیشترین MIC50 (۳ میلی مولار) و MBC (۱۰۰ میلی مولار) مربوط به نیکل و بیشترین درصد حذف مربوط به سرب (۷۵/۸۹ درصد) گزارش گردید. هر دو فلز نیکل و سرب به وسیله سلول ها و مواد ترشگی از محیط زدوده شدند. نتایج FTIR، طول موج  $915/058 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به  $\text{Ni}_3(\text{PO}_4)_2$  در سطح سلول های تیمار شده با ۳ میلی مولار نیکل را نشان داد. **نتیجه گیری:** با توجه به توانایی بالای سویه جداسازی شده در حذف نیکل و سرب توسط عوامل سطحی و ترشگی، می توان از آن به منظور تصفیه زیستی استفاده نمود. با این که آنزیم فسفاتاز جدا شده از *انتروباکتر* تاثیر قابل توجهی در حذف سرب نداشت، اما توانایی حذف نیکل را داشت. بنابراین می توان با خالص سازی آنزیم، حذف فلزات را بهینه سازی نمود. **واژگان کلیدی:** باکتری های حل کننده فسفات، *انتروباکتر زیانگ فانجنسیس*، آنزیم فسفاتاز، فلزات سنگین.

پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۵

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۵

### مقدمه

سرب منتشر شده از سوخت بنزین در طول یک قرن اخیر، موجب آسیب به مغز شده و مسمومیت با این فلز در کودکان موجب اختلال رفتاری و مشکل در یادگیری می شود (۳). فلز نیکل نیز می تواند در هر دو شرایط طبیعی و آزمایشگاهی به کروموزوم آسیب برساند (۴). کروم شش ظرفیتی مهمترین نگرانی را در مورد آلودگی محیطی به وجود آورده و با ایجاد سرطان های ریه و سینوس ها در ارتباط می باشد (۵). پاکسازی زیستی روشی نویدبخش برای تجزیه آلاینده ها به ویژه توسط میکروارگانیسم ها می باشد (۱). یکی از مکانیسم های

امروزه فعالیت های صنعتی در جهان موجب تولید مقادیر متنابهی از آلاینده ها شده است. در این میان فلزات به دلیل نیمه عمر بالا در محیط، بیشترین نگرانی را به وجود آورده اند و نیاز به ایمن سازی محیط زیست را افزایش داده اند (۱). کادمیوم یکی از فلزات سنگین سمی، با میزان خطر بالا برای سلامتی انسان است که می تواند برای کلیه، استخوان و ریه ایجاد سمیت و در نهایت سرطان کند (۲).

\* آدرس برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.

پست الکترونیک: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۳۳۷

سولفات فرو ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ۰/۰۰۲، تری‌کلسیم فسفات ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ۰/۵، آمونیوم سولفات ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) ۰/۵، عصاره مخمر ۰/۵، سدیم کلرید ( $\text{NaCl}$ ) ۰/۲ و سولفات منگنز ( $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ۰/۰۰۲ کشت داده شد (۱۱). این محیط به دلیل داشتن تری‌کلسیم‌فسفات نامحلول، کدر می‌باشد. باکتری‌های حل‌کننده فسفات به دلیل محلول کردن این ماده هاله شفاف تولید می‌کنند (۱۰).

(ب) شناسایی اولیه جدا/یه‌ها: در این مطالعه به منظور شناسایی ابتدایی باکتری‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، مصرف گلوکز، رشد بر روی محیط TSI، احیای نیترات، اندول و رشد در محیط تیوگلیکولات استفاده گردید (۱۲).

(ج) شناسایی مولکولی سویه: پس از استخراج ژنوم باکتری توسط روش CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) (۱۳) شناسایی سویه توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) انجام شد. به منظور تکثیر ژن *16S rRNA*، از پرایمرهای عمومی F27 با توالی '5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و R1492 با توالی '5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' استفاده گردید (۱۴). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs mixed، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۱/۲ میکرولیتر از  $\text{MgCl}_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Smart Taq (سیناژن، ایران)، ۳ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۵/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Thermal cycler Eppendorf 5331 (ساخت کشور آلمان) با شرایط واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل به ترتیب شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، تولید سازی ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷۰ ثانیه و در نهایت تولید سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت (۱۵). سپس محصول PCR با طول ۱۵۰۰ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و توسط دستگاه

باکتری‌های حل‌کننده فسفات برای حل کردن فسفر، تولید آنزیم فسفاتاز می‌باشد (۶). آنزیم‌های فسفاتاز بر اساس pH بهینه به دو گروه فسفاتازهای اسیدی و قلیایی طبقه‌بندی شده‌اند (۱). در بررسی که مارتینز (Martinez) و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی باکتری‌های جدا شده از خاک‌های آلوده به رادیونوکلید و فلز انجام دادند مشخص گردید که باکتری‌های باسیلوس (*Bacillus*) و رانلا (*Rhanelia*) با فنوتیپ فسفاتاز مثبت، توانایی رسوب اورانیل استات را داشتند، اما باکتری آرتروباکتر (*Arthrobacter*) فسفاتاز منفی این توانایی را نداشتند (۷). در مطالعه لیم (Lima) و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص گردید که پس از در معرض قرار دادن قارچ کائینگاملا الگانس (*Cunninghamella elegans*) با فلز کادمیوم، جذب فسفات از محیط کشت با افزایش همراه بوده است. این یافته نشان‌دهنده رابطه بین متابولیسم فسفات و حذف فلزات سنگین می‌باشد (۸). همچنین در مطالعه‌ای که توسط کارپیو (Carpio) و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد، نقش گروه عاملی فسفات در جذب فلز توسط باکتری‌های جداسازی شده از آب آلوده به اثبات رسید (۹).

هدف از این پژوهش جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات، اندازه‌گیری میزان مقاومت آن به نیکل، سرب، کروم و کادمیوم، حذف فلزات و مطالعه اثر فسفاتاز و عوامل خارج سلولی و ترشحی در این فرآیند توسط روش‌های ساده و کم‌هزینه بود.

## مواد و روش‌ها

(الف) جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات: در این مطالعه تجربی، از ریشه گل تاج خروس رشد یافته در شهرضا استفاده گردید. خاک چسبیده به رایزوسفر گیاه به آرامی جدا شد. پس از الک کردن، ۰/۱ گرم از آن به ۵ میلی‌لیتر محلول  $\text{NaCl}$  ۰/۹ درصد استریل اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵۰ دور در دقیقه شیک گردید. پس از ته نشینی از مایع روماندر رقت متوالی تهیه گردید و بر روی محیط پیکووسکایا (*Pikovskaya*) یا PVK واجد ترکیبات (برحسب گرم بر لیتر): گلوکز ۱۰، منیزیم سولفات ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ۰/۱، پتاسیم‌کلرید ( $\text{KCl}$ ) ۰/۲،

اینکه p نیتروفنل آزاد شده در pH اسیدی رنگ زرد قابل تشخیص تولید نمی‌کند، به محلول حاصل از معرف اسید فسفاتاز در پایان گرمخانه‌گذاری، مقداری محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) غلیظ افزوده و سپس جذب نوری خوانده شد (۱۸). همچنین برای هر نمونه یک شاهد بدون باکتری تهیه گردید و پس از انجام تمام مراحل یاد شده، جذب نوری آن به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

(ز) تعیین میزان مقاومت جدایه به فلزات سنگین مختلف: برای این منظور از روش میکروپلیت استفاده گردید. محتویات هر چاهک شامل ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت شبانه باکتری با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند در محیط لوریبرتانی، ۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی فلز سنگین با غلظت معین و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط لوریبرتانی استریل در نظر گرفته شد. برای هر نمونه شاهد بدون باکتری به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. به منظور بررسی حداکثری رشد باکتری، محیط بدون فلز تهیه گردید. برای بررسی اثر فلز نیکل، از نمک نیکل کلراید ( $\text{NiCl}_2$ ) در غلظت‌های نهایی ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی مولار، فلز کروم از نمک دی کرومات پتاسیم ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) در غلظت‌های نهایی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار، فلز کادمیوم از نمک کادمیوم کلراید ( $\text{CdCl}_2$ ) در غلظت‌های نهایی ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی مولار و فلز سرب از نمک نترات سرب ( $\text{PbNO}_3$ ) در غلظت‌های نهایی ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی مولار استفاده گردید. شایان یادآوری است که محلول‌های فلزی به گونه ای تهیه شدند که غلظت نهایی آن‌ها در چاهک‌ها مطابق با غلظت‌های یاد شده بود. محلول‌های فلزی با استفاده از آب دیونیزه تهیه و توسط فیلتر سرنگی با منافذ ۰/۴۵ میکرون فیلتر گردیدند. در نهایت برای هر نمونه سه تکرار قرار داده و پلیت به مدت نیم ساعت در ۱۰۵ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفت و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شد. سپس غلظت هر نمونه توسط دستگاه خوانش الیزا (شرکت Stat Fax مدل ۲۱۰۰) خوانده شد (۱۹).

UV-ترانس لومیناتور (Uvitech, UK) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت محصول PCR توسط شرکت رنا توالی‌یابی گردید. به منظور شناسایی نهایی سویه، نتیجه توالی‌یابی در مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (National Center for Biotechnology Information=NCBI) بررسی شد.

(د) رسم درخت فیلوژنی: به منظور بررسی نیای جدایه و تعیین جایگاه قرار گرفتن آن در سیستم طبقه‌بندی، درخت فیلوژنی آن بر اساس توالی‌های به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، توسط نرم‌افزار Mega6 و با استفاده از روش neighbor-joining رسم گردید.

(ه) رسم منحنی رشد: به منظور بررسی سرعت رشد سویه در محیط مایع لوریبرتانی (مرک، آلمان)، منحنی رشد آن رسم شد. در ابتدا میزان ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت شبانه باکتری با غلظت نیم مک‌فارلند به ۹۹ میلی‌لیتر از محیط کشت لوریبرتانی استریل افزوده شد. ارلن حاوی مخلوط یاد شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس، گرماگذاری شد و همزمان بر روی شیکر قرار گرفت. برای آزمون دو تکرار در نظر گرفته شد و هر دو ساعت یک بار جذب نوری محیط در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس منحنی رشد با استفاده از اعداد به دست آمده در نرم‌افزار Excel 2013 رسم گردید (۱۶).

(و) تولید آنزیم فسفاتاز و نوع آن: به منظور بررسی تولید آنزیم فسفاتاز و القایی یا بالقوه بودن آن، جدایه در دو محیط پیکوسکایا بدون نمک فسفات محلول و پیکوسکایا به همراه میزان ۲ گرم برلیتر نمک فسفات محلول دی‌پتاسیم هیدروژن‌فسفات ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. مقداری از هر محیط به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ شد (۱۷). ۱۰ میکرولیتر از رومانند با ۱۰۰ میکرولیتر از معرف آنزیم اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز مخلوط و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری گردید. به منظور بررسی p نیتروفنل آزاد شده توسط آنزیم فسفاتاز، در اثر مصرف سوبسترای p نیتروفنیل فسفات، محلول‌های حاصل توسط آب مقطر رقیق سازی و جذب نوری در ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. به دلیل

در پایان نمودار میزان مقاومت هر سویه به غلظت‌های مختلف هر کدام از نمک‌های فلزی رسم گردید. (ح) محاسبه کمترین غلظت مهارکننده رشد ( $MIC_{50}$ ) و کمترین غلظت کشنده ( $MBC$ ) جدایه‌ها: با توجه به نتایج حاصل از جذب نوری به دست آمده از آزمون میکروتیتر، کمترین غلظت فلز که موجب کاهش ۵۰ درصدی میزان کدورت حاصل از رشد باکتری‌ها شد، به عنوان  $MIC_{50}$  در نظر گرفته شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های با رشد نامحسوس بر روی محیط جامد لوریابرتانی منتقل گردید و پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در ۳۰ درجه سلیسیوس، کمترین غلظتی که موجب کشتن کامل باکتری می‌گردید، به عنوان  $MBC$  در نظر گرفته شد (۱۹).

ط) بررسی حذف فلزات به کمک طیف‌سنجی جذب اتمی: دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی یکی از بهترین روش‌های محاسبه میزان فلزات در محلول‌ها می‌باشد. اساس کار این دستگاه بر مبنای جذب طول موج‌هایی خاص و منحصر به فرد توسط اتم‌های فلزی و ساطع کردن همزمان خطوط طیفی خاص خود می‌باشد. در ابتدا پرتوی نور ساطع شده توسط لامپ دستگاه، به وسیله‌ی یک لامپ کاتدی توخالی تک‌رنگ گردید. از طرفی نمونه مورد نظر تهیه شده به صورت محلول، با پاشیدن به درون شعله به صورت اتم آزاد در می‌آید. پس از عبور پرتوی تک‌رنگ، مقداری از این پرتو توسط اتم‌های آزاد مذکور جذب شده و از شدت آن کاسته می‌شود. در نهایت با محاسبه مقدار پرتوی جذب شده توسط آشکارساز و به وسیله منحنی‌های کالیبراسیون، می‌توان غلظت عنصر مجهول را در محلول محاسبه نمود (۲۰). به منظور بررسی میزان حذف فلزات توسط سلول‌های سویه جدا شده در این مطالعه، محلولی با غلظت ۵۰ میلی‌مولار گلوکز، ۲ میلی‌مولار دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات و ۱۰۰ میلی‌مولار بافر تریس-HCl با pH 7 تهیه گردید. سپس غلظت  $MIC$  هر نمک فلزی به محلول یاد شده اضافه شد. دلیل انتخاب غلظت  $MIC$  فلزات برای حذف، زنده ماندن سلول‌های جدایه در این غلظت و همچنین ایجاد سمیت برای آن می‌باشد. pH نهایی محلول در حدود ۷ تنظیم شد. زیست توده کشت

سویه در انتهای فاز نمایی رشد توسط سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی و پس از دوبار شستشو با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد، مقدار معینی از آن به محلول یاد شده افزوده شد؛ طوری‌که جذب نوری نهایی باکتری در حجم ۱۰ میلی‌لیتری، به ۰/۷ رسید (۱۷). نمونه‌ها به مدت ۱۰ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. سپس محلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ و محلول رومانند به ظرف دیگر منتقل شد (۱۷). به منظور هضم اسیدی به ازای هر ۵ میلی‌لیتر از رومانند، ۱۰ میکرولیتر اسیدنیتریک غلیظ اضافه گردید. برای هر نمونه، شاهد بدون باکتری نیز تهیه گردید. میزان فلز موجود در هر نمونه با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی جذب اتمی (شرکت PerKinElmer-USA مدل A Analys300) اندازه‌گیری شد.

ی) تجمع ( $Bioaccumulation$ ) سرب و نیکل و بررسی نقش آنزیم فسفاتاز: به منظور ارزیابی حذف فلز توسط مواد ترشحی باکتری، به دلیل محدودیت در زمان و هزینه، از بین ۴ فلز مورد بررسی، دو فلز سرب و نیکل به دلیل مقاومت ( $MIC$ ) بیشتر جدایه به آن‌ها انتخاب گردیدند. به منظور حذف تقریبی اثر جسم سلول جدایه و بررسی اثر مواد مترشحه آن از جمله آنزیم فسفاتاز در حذف فلزات، کشت ۷۲ ساعته جدایه در محیط پیکووسکایا به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید (۱۷). بدین ترتیب رومانند حاوی آنزیم فسفاتاز تهیه گردید. سپس دو محیط حذف فلز برای مواد خارج سلولی سویه با استفاده از رومانند حاصل یکی بدون سوبسترای فسفاتاز و دیگری به همراه غلظت ۵ گرم بر لیتر از تری‌کلسیم‌فسفات، به عنوان سوبسترای آنزیم تهیه گردید. به هر دو محیط یاد شده غلظت ۲ میلی‌مولار از دو فلز سرب و نیکل افزوده شد. سپس pH همه محیط‌ها، به منظور حذف عامل تولید اسید آلی یا معدنی در حذف فلز، در حدود ۷ تنظیم گردید. حجم نهایی هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر تعیین شد. محیط‌ها به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند و با ۱۷۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. در نهایت پس از هضم اسیدی نمونه‌ها با اسیدنیتریک غلیظ، میزان فلز باقی‌مانده توسط دستگاه

اختلاف میان تکرارها در یک نمونه با ترسیم Error bars و بر اساس انحراف معیار یا  $\pm 1$  Standard Deviation مشخص گردید.

#### یافته ها

جدایه مورد نظر بر روی محیط پیکووسکایا هاله شفاف ایجاد نمود که به علت قابلیت حل کنندگی فسفات توسط آن بود. این باکتری میله‌ای، گرم منفی، بی هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بود و توانایی مصرف گلوکز، احیای نترات، رشد در محیط تیوگلیکولات و تولید ایندول از تریپتوفان را داشت. از طرفی در محیط TSI هر سه قند گلوکز، لاکتوز و سوکروز را مصرف و تولید گاز نمود. در این مطالعه مشاهده قطعه ۱۵۰۰ بانندی نشان دهنده تکثیر ژن *I6S rdNA* سویه بود.

بر اساس نتایج حاصل از بلاست توالی، سویه مورد نظر با ۹۸ درصد شباهت، انتروباکتر زیانگ فانجنسیس (*Enterobacter xiangfangensis*) تشخیص داده شد. از طرفی با ترسیم درخت فیلوژنی نیز نزدیکترین سویه به توالی به دست آمده برای باکتری جدا شده، انتروباکتر زیانگ فانجنسیس بود (شکل ۱). با ترسیم منحنی رشد انتروباکتر مشخص شد که پس از گذشت حدود ۲ ساعت با عبور از فاز تاخیری، باکتری وارد فاز نمایی رشد می‌گردد. سپس باکتری در ساعت ۳۲ وارد انتهای فاز نمایی و وارد فاز ایستا گردید (نمودار ۱).

پس از گرمخانه‌گذاری انتروباکتر به مدت ۷۲ ساعت در دو محیط پیکووسکایا با محدودیت فسفات و پیکووسکایا همراه منبع محلول فسفات  $K_2HPO_4$ ، سنجش آنزیم اسید فسفاتاز نشان داد که تولید آنزیم در هر دو محیط یاد شده مشابه است. نتایج مربوط به تعیین MIC50 و MBC فلزات سنگین مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. MIC50 نیکل بین ۲ و ۳ میلی‌مولار بود. همچنین با مقایسه میانگین نتایج مشخص گردید که غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میلی‌مولار نیکل اثرات یکسانی بر روی رشد سویه دارند. نتایج حاصل از کشت سویه بر روی محیط لوربیرتانی حاوی نیکل نشان داد که MBC نیکل معادل ۱۰۰ میلی‌مولار می‌باشد.

جذب اتمی اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه شاهد بدون مواد خارجی سلولی جدایه نیز تهیه گردید (۲۱).

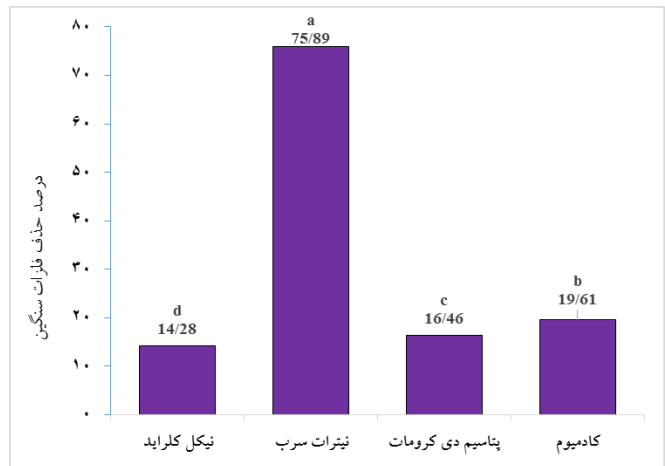
ک) بررسی تغییرات ناشی از جذب فلزات در سطح باکتری توسط طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy=FTIR*)

بر اساس مطالعات شیمیایی، طول موج بین ۲/۵ تا ۲۰ میکرومتر مربوط به اواسط امواج مادون قرمز می‌باشد. طبق مکانیک کوانتوم، یک مولکول می‌تواند با جذب مقداری انرژی، به حالتی برانگیخته و لرزشی رسیده و با یک طیف مداوم مادون قرمز، امکان جذب ذرات سبک با این انرژی را دارد. طیف تابشی باقی‌مانده، باند جذبی در فرکانسی مشخص را از حرکات لرزشی و چرخشی پیچیده مولکول نشان می‌دهد. این حرکات مولکولی با علایمی مخصوص از یکدیگر مشخص شده که نیروهای اتصال مختلف و زوایای اتصالی آنها را در یک مولکول نشان می‌دهند. بنابراین مولکول‌های پیچیده خصوصیات بسیاری از لرزش‌های درونی را نشان می‌دهند. به‌طور عمومی، فرکانس یک باند جذبی با نیروی پایدار اتصال رابطه مستقیم و با میزان جرم اتمی رابطه عکس دارد. لرزش و حرکت این باندها که با اتصالات تکی یا گروه‌های عملکردی یک مولکول مرتبط می‌باشد، در تشخیص ترکیبات ناشناس، بسیار حائز اهمیت است (۲۲). به منظور بررسی تغییرات سطح سویه جدا شده پس از در معرض‌گذاری با فلزات و اطلاع از مکان رسوب فلزات، از FTIR سطح سلول‌های جدایه استفاده شد. سلول‌های جدایه رسوب یافته در نمونه‌های مورد بررسی جذب اتمی پس از سانتریفیوژ و دو بار شست و شو با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد، در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس خشک شدند. پودر حاصله برای بررسی با دستگاه JASCO, FT/IR-6300 ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) Japan مورد استفاده قرار گرفت (۲۳).

ل) آنالیز آماری: رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نسخه بیستم نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. همچنین مقایسه میانگین نمونه‌های مختلف توسط آزمون دانکن با سطح معنی‌دار ۰/۰۵ و

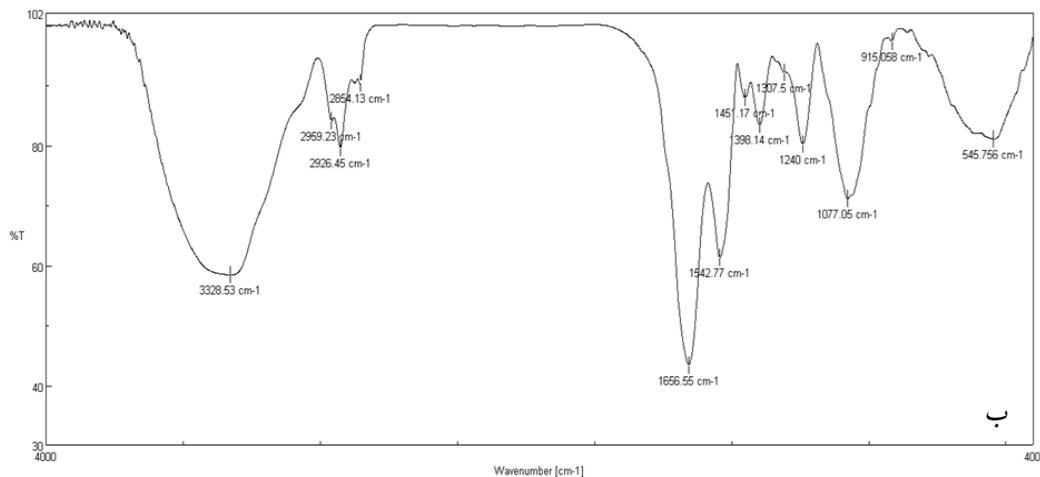
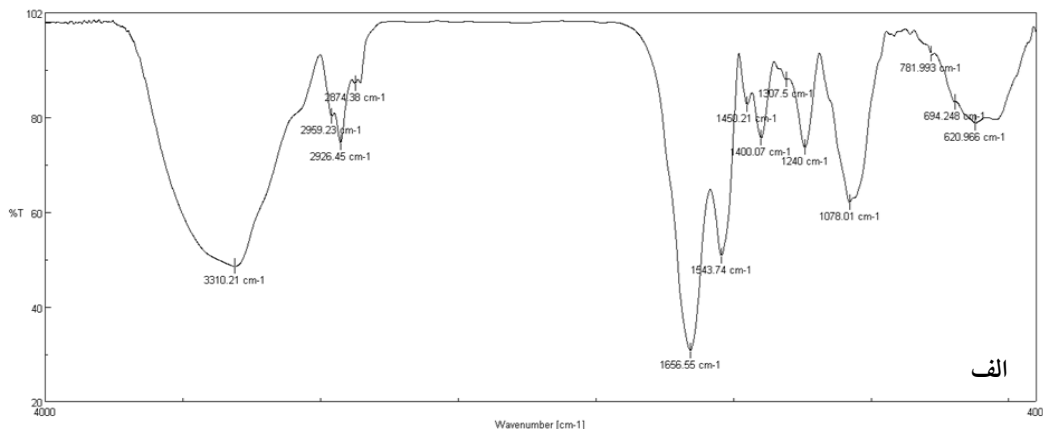


سویسترای آنزیم فسفاتاز (تری کلسیم فسفات) به ترتیب ۱۶ و ۹/۴۳ درصد و در مورد فلز سرب به ترتیب ۹۸/۹۵ و ۹۷/۷۴ درصد بود. میزان حذف در دو محیط فاقد و دارای سویسترای فسفاتاز برای فلز سرب تفاوت چندانی نداشت. اما در مورد فلز نیکل تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان حذف دیده شد. با توجه به پیک‌های مشاهده شده در FTIR سطح سلول‌های کنترل/انتروباکتر (شکل-۲، الف) و سلول‌های تیمار مجاور شده با غلظت ۳ میلی مولار نیکل، به مدت ۱۰ ساعت (شکل-۲، ب)، پیک ظاهر شده در سلول‌های تیمار که در کنترل وجود ندارد، طول موج  $915/058 \text{ cm}^{-1}$  را داشت. این طول موج مربوط به ترکیب  $\text{Ni}_3(\text{PO}_4)_2$  می‌باشد (۲۴). سایر طول موج‌های مشاهده شده در کنترل و تیمار یکسان بود. در جدول ۲ پیوندهای مربوط به هر یک آورده شده است (۲۵).



نمودار ۲: درصد حذف نمک فلزات مختلف توسط سلول‌های انتروباکتر. حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در یک متغیر است.

وجود دارد. در مورد بررسی مواد مترشحه خارج سلولی شامل فسفاتاز به عنوان عامل احتمالی حذف فلزات در این جدایه، میزان حذف فلز نیکل در دو محیط فاقد و دارای



شکل ۲: الف) آنالیز FTIR کنترل سویه جدا شده. ب) پیک‌های به دست آمده از آنالیز FTIR تیمار سویه، مجاور شده با ۳ میلی مولار نیکل به مدت ۱۰ ساعت.

جدول ۲. مشخصات و ویژگی‌های طول موج‌های یکسان مشاهده شده در FTIR سطح کنترل و تیمار/انتروباکتر.

دامنه (cm <sup>-1</sup> )	طول موج	ویژگی
۳۱۰۰-۳۵۰۰ و ۲۵۰۰-۳۴۰۰	۳۳۲۸ و ۳۳۱۰	پیوند OH و NH
۳۲۰۰-۳۵۰۰		حرکات کششی باند OH-
۲۵۰۰-۳۴۰۰ و ۲۷۰۰-۲۹۵۰	۲۹۲۶	پیوند CH اسید چرب غشایی
۲۵۰۰-۳۴۰۰ و ۲۷۰۰-۲۹۵۰	۲۹۵۹ و ۲۸۵۴ و ۲۸۷۴	پیوند OH و CH اسید چرب غشایی
۱۴۰۰-۱۶۶۰	۱۴۵۰ و ۱۴۵۱ و ۱۶۵۶ و ۱۵۴۲ و ۱۵۴۳	باند NH- باند آمیدی پروتئین و پپتید
۱۲۸۰-۱۴۳۰ و ۱۱۶۰-۱۴۲۰		OH- و CH- پروتئین و اسید چرب
۱۴۰۰-۱۶۶۰	۱۳۹۶ و ۱۴۰۰	NH- باند آمیدی پروتئین و پپتید
۱۴۰۰		لرزش C=O در یون‌های کربوکسیل
۱۰۰۰-۱۳۵۰ و ۹۰۰-۱۳۸۰	۱۳۰۷ و ۱۲۴۰ و ۱۰۷۸ و ۱۰۷۷	پیوند کششی C=O و NH پلی ساکارید دیواره ای

## بحث

فانجنسیس نسبت به انتروباکتر کلواکه کارایی بیشتری آن را نشان می‌دهد (۳۱). با توجه به نتایج به دست آمده در مورد القایی یا بالقوه بودن تولید آنزیم، می‌توان نتیجه گرفت که تولید آنزیم فسفاتاز در باکتری مورد مطالعه به صورت خودبخودی و بالقوه است و در هر دو محیط دارای سوسترای فسفاتاز و فاقد آن تولید می‌شود. اگرچه حذف فلزات سنگین توسط انتروباکتریاسه به اثبات رسیده است، اما تاکنون گزارشی مبنی بر توانایی حذف فلز توسط انتروباکتر زیانگ فانجنسیس وجود ندارد. یکی از مطالعات انجام شده در مورد MIC و MBC فلز کروم بر انتروباکتریاسه در سال ۲۰۱۳ توسط کفیل زاده (Kafilzadeh) و همکاران انجام شد که در آن بیشترین MIC (۹ میلی‌مولار) و بیشترین MBC (۱۰ میلی‌مولار) مربوط به سویه کلبسیلا نمونیه (*Klebsiella pneumoniae*) و کمترین MIC (۲ میلی‌مولار) و کمترین MBC (۳ میلی‌مولار) مربوط به اسیتوباکتر (*Acinetobacter*) بود (۳۲). سویه انتروباکتر زیانگ فانجنسیس جدا شده در مطالعه حاضر، در مقایسه با نتایج مطالعه یاد شده قابل رقابت با سویه باسیلوس تورنجینسیس (*Bacillus thuringiensis*) بود. همچنین در بررسی دیگری بر روی گونه‌های انتروباکتر، میزان MIC به دست آمده برای فلز کادمیوم و سرب به ترتیب ۰/۴ و ۳ میلی‌مولار و برای سویه جدا شده در مطالعه حاضر به ترتیب ۱ و ۲/۵ میلی‌مولار بود. این یافته نشان دهنده مقاومت بیشتر انتروباکتر زیانگ فانجنسیس نسبت به فلز کادمیوم می‌باشد (۳۳). با توجه به اینکه میزان حذف فلز سرب در هر دو محیط

در مطالعه حاضر، سویه جدا شده به کمک تقوایی یابی ژن *16S rRNA* و بلاست در سایت NCBI، به عنوان انتروباکتر زیانگ فانجنسیس تشخیص داده شد. این باکتری برای اولین بار در سال ۲۰۱۴ در کشور چین، از خمیر ترش جداسازی گردید (۲۶). به دلیل جدید بودن این باکتری، تاکنون مطالعاتی در مورد مقاومت این باکتری به فلزات سنگین و توانایی آن در حذف فلزات صورت نگرفته است.

اما مطالعه‌ای در مورد گونه دیگر این جنس به نام انتروباکتر کلواکه (*Enterobacter cloacae*) توانایی این سویه را در حذف فلز سرب نشان داده است (۲۷). در مطالعه بنرجی (Banerjee) و همکاران در سال ۲۰۱۵ حذف سه فلز سرب، کادمیوم و نیکل توسط انتروباکتر کلواکه به ترتیب معادل ۹۵٪، ۶۴٪ و ۳۶٪ بود (۲۸). ترتیب بیشترین تا کمترین درصد حذف فلز در این باکتری با جدایه مورد بررسی در مطالعه حاضر یکسان می‌باشد. همچنین در بررسی دیگر بر روی انتروباکتر کلواکه، توانایی حذف فلز کروم بین ۱۴ تا ۱۶ درصد و فلز سرب ۷۲ درصد مشاهده شد (۲۹). در هر دو مورد جدایه مورد مطالعه ما (انتروباکتر زیانگ فانجنسیس) عملکرد بهتری را از خود نشان داد.

در مطالعه سینگ (Singh) و همکاران انتروباکتر کلواکه میزان ۱۹/۹ درصد از فلز کادمیوم را در pH خنثی حذف نمود که با درصد حذف این فلز در مطالعه حاضر یکسان بود (۳۰). ۱۰ درصد حذف بیشتر فلز سرب توسط انتروباکتر زیانگ



کمتری دارند. این سمیت افتراقی بین فلزات، ممکن است به دلیل رفتار هیدروکسیلاسیون کاتیون‌های فلزی باشد (۳۴).

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت نسبتاً بالای باکتری *انتروباکتر زیانگ فانجنسیس* به فلزات نیکل، سرب، کروم و کادمیوم می‌باشد. با توجه به مشاهدات می‌توان گفت آنزیم فسفاتاز این سویه در حذف فلز نیکل موثر است. از این رو پیشنهاد می‌شود که با بررسی عوامل محیطی مختلف مانند: pH، دما، زمان گرماگذاری، منابع مختلف محیط کشت و ایجاد محدودیت در آن‌ها، بررسی حذف در سلوهای در حال استراحت و تثبیت‌شده و سایر شرایط، میزان حذف فلزات توسط باکتری جداشده بهینه‌سازی گردد. با توجه به توانایی بالای سویه در حذف سرب، می‌توان این ویژگی را در حذف سرب از دود حاصل از احتراق بنزین کاربردی کرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه اصفهان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

دارا و فاقد سوبسترای آنزیم فسفاتاز در این سویه تقریباً یکسان بود، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عامل حذف فلز سرب در رومانند این سویه، عاملی غیر از آنزیم فسفاتاز می‌باشد. در مورد نیکل تفاوت میزان حذف در این دو محیط کشت محسوس می‌باشد و احتمالاً وجود فسفاتاز در حذف نیکل تاثیر داشته است. نتایج FTIR نیز تایید کننده رسوب کمپلکس فلز نیکل بر سطح سلول‌های این باکتری می‌باشد. در واقع هر دو عوامل خارج و داخل سلولی این باکتری در حذف فلزات یاد شده نقش دارند. مشاهده ناحیه جذب مربوط به رسوب ترکیب  $\text{Ni}_3(\text{PO}_4)_2$  تاثیر فسفات آزاد شده توسط آنزیم فسفاتاز *انتروباکتر* در رسوب فلز نیکل را تایید می‌نماید.

با توجه به درصد بسیار بالاتر حذف سرب نسبت به نیکل در جدایه مورد بررسی، می‌توان نتیجه گرفت که عامل حذف کننده فلز در رومانند کشت *انتروباکتر زیانگ فانجنسیس* برای سرب عملکرد بهتری دارد و این سویه را برای حذف این فلز بسیار مناسب می‌کند. اما برای حذف سایر فلزات چندان موثر نبوده است. همچنین جیونگ (Jeong) و ماکاسکی (Macaskie) در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که آنزیم‌های فسفاتاز دارای مقاومت زیادتر نسبت به فلز کادمیوم، نسبت به سرب و روی مقاومت

## References

1. Martinez RJ, Beazley MJ, Sobecky PA. Phosphate-mediated remediation of metals and radionuclides. *Adv Ecol*. 2014; 2014: 1-14.
2. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol*. 2006; 1 (1): 1-6.
3. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*. 2003; 68(1): 167-182.
4. Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect*. 1994; 102(1): 275.
5. Pellerin C, Booker SM. Reflections on hexavalent chromium: health hazards of an industrial heavyweight. *Environ Health Perspect*. 2000; 108(9): A402.
6. Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, Wani PA. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. *Microbial Strategies for Crop Improvement*, Springer Berlin Heidelberg. 2009; pp: 23-50.

7. Martinez RJ, Beazley MJ, Tallefert M, Arakaki KA, Skolnick J, Sobecky PA. Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal resistant bacteria isolated from radionuclide and metal contaminated subsurface soils. *Environ Microbiol.* 2007; 9(3): 3122-3133.
8. De Lima MA, Franco LDO, de Souza PM, do Nascimento AE, da Silva CA, Maia RDC, Hercília MLR, Galba MCT. Cadmium tolerance and removal from *Cunninghamella elegans* related to the polyphosphate metabolism. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(4): 7180-7192.
9. Carpio IEM, Franco DC, Sato MIZ, Sakata S, Pellizari VH, Ferreira Filho SS, Rodrigues DF. Biostimulation of metal-resistance microbial consortium to remove zinc from contaminated environments. *Sci Total Environ.* 2016; 550: 670-675.
10. Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus.* 2013; 2(1): 587.
11. Nautial C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 170(1): 265-270.
12. Barrow GI, Feltham RKA. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. *Camb Univ Press, Netw Sci.* 2003; pp: 42-46.
13. Chen Wp, Kuo T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(9): 2260.
14. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial *16S rRNA* genes. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(8): 2461-2470.
15. Dees PM, Ghiorse WC. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001; 35(2): 207-216.
16. Chudobova D, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, Guran R, Rodrigo MAM, Tmejova K, Krizkova S, Zitka O, Adam V, Kizek R. The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. *Microbiol Res.* 2015; 170: 147-156.
17. Kier LD, Weppelman R, Ames BN. Resolution and purification of three periplasmic phosphatases of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1977; 130(1): 399-410.
18. Aragon V, Kurts Sh, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection. *Infect Immun.* 2001; 69(1): 177-185.
19. Mah TF. Establishing the minimal bactericidal concentration of an antimicrobial agent for planktonic cells (MBC-P) and biofilm cells (MBC-B). *J Vis Exp.* 2014; 2:(83):e50854.
20. Robinson JW. atomic absorption spectroscopy. *Analytica Chimica Acta.* 1960; 23: 479-487.
21. Pan JH, Liu RX, Tang HX. Surface reaction of *Bacillus cereus* biomass and its biosorption for lead and copper ions. *J Environ Sci.* 2007; 19(4): 403-408.
22. Schmitt J, Flemming HC. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Int Biodeterior Biodegradation.* 1998; 41(1): 1-11.

23. Galichet A, Sockalingum GD, Belarbi A, Manfait M. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. FEMS Microbiol Lett. 2001; 197(2): 179-186.
24. Miller FA, Wilkins CH. Infrared spectra and characteristic frequencies of inorganic ions. Anal Chem. 1952; 24(8): 1253-1294.
25. Rameshkumar P, Pothana SH, Manivannan G. Heavy metal response behaviours of sulfur-oxidizing *Pseudomonas* sp. PRK786. Int J Adv Biotechnol Res. 2014; 15: 106-116.
26. Chun TG, Chun YL, Li JY, Huo G. *Enterobacter xiaqngfangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of *Enterobacter sacchari* Zhu et al. 2013 as *Kosakonia sacchari* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2014; 64(8): 2650-2656.
27. Ebrahimi M, Ahani Azari A. Study on lead absorption by lead resistant bacteria isolated from industrial wastewater of plants in AqQala Industrial Park. J Microb World. 2016; 9(3): 257-267. [In Persian]
28. Banerjee G, Pandey S, Ray AK, Kumar R. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloacae* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production, and protein expression in presence of lead, cadmium, and nickel. Water Air Soil Pollut. 2015; 226(4): 91.
29. Bojórquez C, Espericueta MGF, Voltolina D. Removal of cadmium and lead by adapted strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. Rev Int Contam Ambie. 2016; 32(4): 407-412.
30. Singh RR, Tipre DR, Dave SR. Optimization of Cu, Hg and Cd removal by *Enterobacter cloacae* by ferric ammonium citrate precipitation. Adv Environ Res. 2014; 3(4): 283-292.
31. Suriya J, Bharathiraja S, Rajasekaran R. Biosorption of heavy metals by biomass of *Enterobacter cloacae* isolated from metal-polluted soils. Int J Chemtech Res. 2013; 5(3): 1329-1338.
32. Kafilzadeh F, Moghtaderi Y, Jahromi AR. Isolation and identification of cadmium-resistant bacteria in Soltan Abad river sediments and determination of tolerance of bacteria through MIC and MBC. Eur J Exp Biol. 2013; 3(5): 268-273.
33. El-Shanshoury AERR, Elsilk SE, Ateya PS. Uptake of some heavy metals by metal resistant *Enterobacter* sp. isolate from Egypt. Afr J Microbiol Res. 2013; 7(23): 2875-2884.
34. Jeong B, Macaskie L. PhoN-type acid phosphatases of a heavy metal-accumulating *Citrobacter* sp.: resistance to heavy metals and affinity towards phosphomonoester substrates. FEMS Microbiol Lett. 1995; 130(2-3): 211-214.



## Heavy metal removal by phosphate-solubilizing *Enterobacter xiangfangensis* isolated from rhizosphere

Fatemeh Sadat Ghoreishi<sup>1</sup>, Zahra Etemadifar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.Sc., Biology Department, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor, Biology Department, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Industrial activities in the world release large amounts of pollutants including heavy metals. This study was aimed to assess heavy metal removal by phosphate-solubilizing bacteria and evaluation the effects of extracellular factors including phosphatase in removing the metal.

**Material & Methods:** In this experimental study, phosphate-solubilizing bacteria were isolated from *Amaranth* rhizosphere on Pikovskaya medium, and subsequently identified using molecular methods. Acid phosphatase level was measured by colorimetric method. MIC50 and MBC of nickel, cadmium, chromium, and lead were detected by microplate test. Heavy metal removal through cells or culture supernatant was assessed by atomic absorption spectroscopy. Changes in the level of bacterial cells exposed to heavy metals were evaluated by FTIR method.

**Results:** The acid phosphatase-producing strain was identified as *Enterobacter xiangfangensis*. The highest MIC50 (3mM) and MBC (100mM) were obtained for nickel, and the highest metal removal percentage (75.89%) was obtained for the lead. Both nickel and lead were removed by the cells and secreted products. FTIR results showed  $\text{Ni}_3(\text{PO}_4)_2$  wavelength of  $915.058\text{cm}^{-1}$  in cells treated with 3mM nickel.

**Conclusion:** Due to the high ability of the isolate in removing nickel and lead by cell surface and secreted materials, this isolate can be used in metal bioremediation. Though the phosphatase enzyme isolated from *Enterobacter* did not have any considerable effect on lead removal, it was able to remove nickel. Therefore, metal removal can be optimized by enzyme purification.

**Keywords:** Phosphate-solubilizing bacteria, *Enterobacter xiangfangensis*, Phosphatase enzyme, Heavy metals.

---

Correspondence to: Zahra Etemadifar

Tel: +98 3137932367

E-mail: [z.etemadifar@sci.ui.ac.ir](mailto:z.etemadifar@sci.ui.ac.ir)

Journal of Microbial World 2017, 10(2): 145-156.