جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های مقاوم به نیکل و کادمیوم از پساب‌های صنعتی استان گیلان

فروغ سیمیاری[۱]، علی ناظمی*[۲]، آیت نصرالهی[۳]

۱- دانشگاه آزاد واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۵۵۹-۴۶۸۱۵

۲و۳-دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه بیولوژی، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۵۵۹-۴۶۸۱۵

(*عهده دار مکاتبات - a_nazemi@toniau.ac.ir)

چکیده

نیکل و کادمیوم از جمله فلزات سنگین و سمی هستند که استفاده‌های صنعتی از آن‌ها سبب آلودگی گسترده محیط زیست شده است. یکی از بهترین راهکارها جهت حذف این فلزات سمی، استفاده از باکتری‌های مقاوم به این فلزات می‌باشد. بنابراین تشخیص باکتری‌های مقاوم به فلزات سمی، اولین گام در فرآیند پاک سازی زیستی است. بنابراین تصفیه بیولوژیکی پساب‌های صنعتی،به عنوان گزینه‌ای اقتصادی و سازگار با محیط زیست بسیار مورد توجه است. به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به نیکل و کادمیوم نمونه‌گیری از پساب هشت کارخانه در شمال کشور انجام شد. چندین جدایه‌های باکتریایی در محیط LB agar حاوی حداقل غلظت فلزات سنگین نیکل(gr/plate ۰/۰۰۲) و کادمیوم به میزان (۲/۵µg/plate) جدا شدند. جدایه‌های مقاوم اولیه که به حداکثر غلظت نیکل (gr/plate ۰/۲) و کادمیوم (۲۰µg/plate) نیز مقاومت بودند مجدداً جدا شدند. پس از بررسی‌های میکروسکوپی، شناسایی مولکولی باکتری‌ها از طریق 16s rDNA PCR Sequencing انجام شد. در مجموع هفده گونه یا سویه مختلف از جمله *Staphylococcus epidermidis* ، *Staphylococcus pasteuri* ، *Planococcus sp* ، *Brevundimonas diminuta* ، *Bacillus licheniformis* ، *Pseudomonas sp* ، *Exiguobacterium sp* ، *Micrococcus sp* ، *Comamonas sp* ، *Delftia sp* ، *Chryseobacterium sp* ، *Serratia sp* ، *Acinetobacter sp* شناسایی شدند که بیشترین مقاومت به این دو فلز را نشان می‌دادند.

کلمات کلیدی: شناسایی مولکولی، باکتری‌های مقاوم به نیکل وکادمیوم، پساب صنعتی.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در دنیای صنعتی امروز کارخانه‌ها و صنایع بزرگ و کوچک فراوانی در شهرها و حاشیه آن‌ها احداث شده‌اند که تولید محصول تنها خروجی آن‌ها نمی‌باشد. اکنون پساب‌ها را نیز می‌توان جز فراورده‌های آن‌ها به شمار آورد که بسیاری از آن‌ها ناسازگار با محیط زیست می‌باشند (۲). از میان ۱۰۵ عنصر جدول تناوبی حدود ۸۰ عنصر به دلایل خصوصیات ویژه از جمله چگالی بالا در گروه فلزات واقع شده‌اند. به طور کلی فلزات سنگین دسته‌ای از فلزات هستند که چگالی سطحی آن‌ها بیش از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب باشد که از جمله آن‌ها می‌توانیم به سرب، روی، کادمیوم، جیوه و نیکل اشاره کنیم (۲). عمده‌ترین تاثیر فلزات سنگین روی انسان، بروز اختلالات عصبی است. در این رابطه عمده‌ترین صنایع آلاینده کارخانه‌هایی از قبیل آبکاری، باطری‌سازی و تولید قطعات الکترونیک، ذوب فلزات و شابلون سازی می‌باشند (۱۰و۱۱). کادمیوم عنصری فلزی نرم به رنگ سفید مایل به آبی است. این عنصر به عنوان محصول فرعی از تصفیه روی حاصل می‌شود. کادمیوم و ترکیبات آن بسیار سمی است. به طورکلی سالانه حدود ۲۵۰۰۰ تن کادمیوم وارد محیط زیست می‌شود. این فلز از سمیت و ثبات بالایی برخوردار است به طوری که در طبیعت تجزیه نمی‌شود و در گردش خون باقی می‌ماند و به آنزیم‌های ضروری تنفسی متصل می‌شود و باعث استرس اکسیداتیو (خاصیت اکسیداتیو قوی) و سرطان می‌شود. کادمیوم برمتابولیسم سلولی اثر تخریبی داشته و باعث مهار همانندسازی و ترمیم DNA می‌شود (۲و۸). نیکل به طور گسترده در تمام نقاط مختلف زمین وجود دارد و از نظر فراوانی در پوسته زمین بیست و چهارمین عنصر می‌باشد. دارای خواص فلزی نرم و سخت است و می‌تواند به سولفور، نیتروژن و گروه‌های اکسیژن متصل شود. نیکل ماده مغذی ضروری برای میکروارگانیسم‌های شرکت کننده در فرایندهای سلولی است و به عنوان کوفاکتور ضروری برای چندین آنزیم باکتریایی که در عملکردهای متابولیکی نقش دارند، نیاز است (۵). شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین اولین مرحله در مسیر فرایند حذف زیستی فلزات سنگین از پساب می‌باشد. فلزات به دلیل ماهیت سمی همانند مواد آلی در محیط پاکسازی نمی‌شوند و خصلت عنصری خود را حفظ کرده، در محیط باقی می‌مانند و جایگزین فلزات ضروری موجود در جایگاه‌های اتصال می‌شوند. اغلب مقاومت به فلزات سنگین به حضور پلاسمید مربوط می‌شود که ژن‌های مربوط به مقاومت را حمل می‌کند به طوری‌که قادرند با انتقال این عناصر ژنتیکی به سویه‌های دیگر سبب گسترش مقاومت شوند (مثلاً حضور ژنcad A بر روی پلاسمید برخی از باکتری‌های مقاوم به کادمیوم). امّا گاهی اوقات این مقاومت‌ها منشا کروموزومی دارند. روش‌های معمول برای حذف فلزات از پساب‌های صنعتی شامل رسوب دادن، اکسیداسیون احیا، تعویض یونی، فیلتراسیون، تصفیه الکتروشیمیایی، اسمز معکوس، تکنیک غشایی (حضور پمپ‌های کاتیونی در باکتری‌های گرم مثبت که مقاوم به کادمیوم هستند) می‌باشد. میکروارگانیسم‌ها به این فلزات سنگین به وسیله چندین فرایند پاسخ می‌دهند که شامل نقل و انتقال از غشاءسلولی یا جریان مستقیم فلز به درون سلول (اکثر فلزات در داخل سلول بر روی گرانول‌های پلی فسفات قرار گرفته و یا با پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم به نام متالوتیونئین و فیتوژلاتین باند می‌شوند)،

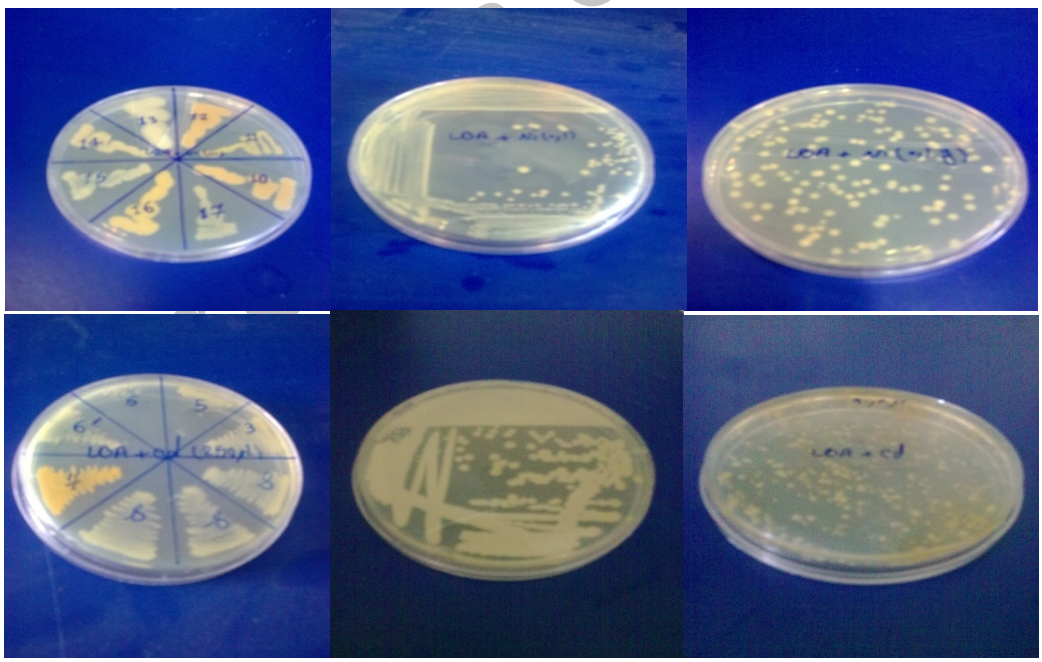
Archive of SID

www.SID.ir

جذب توسط دیواره سلولی و کپسول خارج سلولی، رسوب دهی، تشکیل کمپلکس و واکنش‌های اکسید-اسیون احیاء است. باکتری‌هایی که مقاوم به فلزات سنگین هستند و در حضور آن‌ها رشد می‌کنند در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. جذب زیستی فلزات سنگین به منزله روشی بالقوه برای بازیابی فلزات سنگین از پساب‌های صنعتی معرفی شده است (۱۳و۱۴).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه نمونه‌گیری از پساب (به صورت مایع و لجن) هشت کارخانه صنعتی گیلان انجام شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، سریال رقت تهیه شده از سوسپانسیون هر نمونه در محیط LB آگار حاوی نیکل با غلظت ۰/۰۰۲گرم در هر پلیت و کادمیوم با غلظت ۲/۵ میکروگرم در هر پلیت به صورت سفره‌ای در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس باکتری‌های رشد یافته بر روی حداقل غلظت فلزات نیکل (۰/۰۰۲ gr/plate) و کادمیوم (۲/۵µg/plate) به پلیت‌های حاوی غلظت فلزات نیکل (۰/۲ gr/plate) و کادمیوم(۲۰µg/plate) و در مرحله بعد به غلظت حداکثری فلزات نیکل (۲ gr/plate) و کادمیوم (۸۰µg/plate) انتقال داده شدند.



شکل ۱: خالص‌سازی در محیط با حداقل غلظت نیکل و کادمیوم

رنگ آمیزی گرم روی ایزوله‌های باکتریایی که غلظت‌های بالا نیکل و کادمیوم را تحمل می‌کردند، انجام شد. به منظور شناسایی مولکولی، DNA همه ایزوله‌ها با استفاده از کیت (Roche) استخراج گردید و پس از انجام آزمون کیفی و کمی برای استفاده در بررسی‌های مولکولی ذخیره شد. واکنش PCR شامل

www.SID.ir

حدود ۱۰۰ng DNA از هر نمونه با 5µl 10X buffer، 1.5mM $MgCl_2$، 0.2 mM dNTPs، 10 pmol از هر پرایمر، 2.5 U Taq (Fermentas) در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر اجراء شد. پرایمرهای مورد استفاده 16S rDNA (۱۲) 8F (5'-AGGAGGTGATCCAACCGGA-3') و 1390R (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGGT-3') بودند.

شرایط واکنش PCR شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵°C به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل ۹۵°C به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۹°C به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. همچنین ۵ میکرولیتر از محصول PCR در حضورنشانگر اندازه 1kb (Fermentas) روی ژل آگارز ۱٪ (w/v) منتقل شده (Fermentas) و با انجام الکتروفورز و مشاهده باندهای bp ۱۴۰۰ صحت انجام PCR تایید شد.

برای انجام sequencing و شناسایی مولکولی ایزوله‌ها محصول PCR پس از تایید کیفی امپلیکون‌ها تعیین توالی شد (Macrogen, Korea). سپس تشابه توالی‌های به دست آمده از امپلیکون‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژنی National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) با استفاده از نرم افزار BLAST بررسی شده و ایزوله‌ها شناسایی شدند.

نتایج

جداسازی باکتری‌های مقاوم به نیکل و کادمیوم

از میان هشت نمونه پساب کارخانجات صنعتی، در غلظت اولیه نیکل (۰/۰۰۲ gr/plate) ۵۲ گونه باکتریایی با مورفولوژی متفاوت شناسایی شدند که در مرحله دوم با افزایش غلظت فلز (۰/۲ gr/plate) به ۱۳ گونه کاهش یافت. همچنین برای فلز کادمیوم در غلظت اولیه (۲/۵µg/plate) ۲۰ گونه متفاوت از نظر مورفولوژی شناسایی شدند که با افزایش غلظت کادمیوم (۲۰µg/plate) تعداد آن‌ها به ۴ گونه متفاوت کاهش یافت (جدول ۲). این ۱۳ گونه مقاوم به نیکل قادر به تحمل غلظت نیکل gr/plate ۲، همچنین ۴ گونه مقاوم به کادمیوم قادر به تحمل غلظت کادمیوم۸۰ µg/plate نبودند.

جدول ۲: غلظت نیکل و کادمیوم و تعداد ایزوله‌ها جدا شده از هشت پساب کارخانه

حداکثر غلظت نیکل	میانگین غلظت نیکل	حداقل غلظت نیکل	
2 gr/plate	0.2 gr/plate	0.002 gr/plate	غلظت و میزان نیکل
-	+	+	رشد
۰	۱۳	۵۲	تعداد کلونی باکتریها
حداکثر غلظت کادمیوم	میانگین غلظت کادمیوم	حداقل غلظت کادمیوم	
80 µg/plate	20 µg/plate	2.5 µg/plate	غلظت و میزان کادمیوم
-	+	+	رشد
۰	۴	۲۰	تعداد کلونی باکتریها

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی باکتری‌های مقاوم به نیکل و کادمیوم

پس از رنگ آمیزی گرم ۹ ایزوله‌ها گرم منفی و ۸ ایزوله گرم مثبت شناسایی گردید. همچنین نتیجه ردیف سازی توالی نوکلئوتیدی این ۱۷ ایزوله در نرم افزار Blast در سایت ncbi ۱۲ جنس باکتریایی مختلف را نشان داد. نتایج در جدول ۳ ارایه گردیده است.

جدول ۳: نتایج مورفولوژی و شناسایی مولکولی ایزوله‌ها مقاوم به نیکل و کادمیوم

نوع باکتری	مقاومت به فلز سنگین	نوع گرم	شکل باکتری
Staphylococcus epidermidis	نیکل	گرم مثبت	کوکسی
Staphylococcus pasteuri	نیکل	گرم مثبت	کوکسی
Brevundimonas diminuta	نیکل	گرم منفی	باسیل
Planococcus sp.	نیکل	گرم مثبت	کوکسی
Serratia sp.	نیکل	گرم منفی	باسیل
Serratia sp.	نیکل	گرم منفی	باسیل
Bacillus licheniformis	نیکل	گرم مثبت	باسیل
Pseudomonas sp.	نیکل	گرم منفی	باسیل
Exiguobacterium sp.	نیکل	گرم مثبت	باسیل
Micrococcus sp.	نیکل	گرم مثبت	کوکسی
Exiguobacterium sp.	نیکل	گرم مثبت	باسیل
Comamonas sp.	نیکل	گرم منفی	باسیل
Exiguobacterium sp.	نیکل	گرم مثبت	باسیل
Delftia sp.	کادمیوم	گرم منفی	باسیل
Chryseobacterium sp.	کادمیوم	گرم منفی	باسیل
Acinetobacter sp.	کادمیوم	گرم منفی	باسیل
Pseudomonas sp.	کادمیوم	گرم منفی	باسیل

بحث

در سراسر جهان آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین و سمی با پیشرفت‌های صنعتی در حال گسترش است که این مساله برای کشورهای درحال توسعه مانند چین و هند صادق است (۵ و۸). آلودگی پساب‌ها با فلزات سنگین یکی از مشکلات قابل توجه در محیط زیست است. بسیاری از محققان آثار شدید آلودگی فلزات سنگین بر جمعیت میکروبی را اثبات کرده‌اند. میکروارگانیسم‌ها ازجمله باکتری‌ها برای رشد به برخی از فلزات احتیاج دارند، اگرچه اغلب این فلزات سمی‌اند ولی در مقادیر کم برای حیات لازم و ضروری محسوب می‌شوند. فلزات به دلیل ماهیت سمی، مثل مواد آلی در محیط پاکسازی نمی‌شوند و خصلت عنصری خود را حفظ کرده، در محیط باقی می‌مانند. میکروارگانیسم‌های مقاوم به این آلاینده‌ها، سازوکار-های را ایجاد می‌کنند که منجر به ایجاد گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی می‌گردند. در واقع در غلظت‌های بالا فلزات سنگین در محیط، مکانیسم‌های

Archive of SID

www.SID.ir

مقاومتی در ژنوم باکتری‌ها یافت می‌شود که این مکانیسم‌های مقاومت شامل سم‌زدایی آنزیمی و یاپمپ‌های جریان به خارج است که این پمپ‌ها شایع‌ترین مکانیسم مقاومتی در باکتری‌هاست.

یکی از روش‌های مؤثر برای تصفیه پساب‌ها از فلزات سنگین استفاده از باکتری‌ها است. بسیاری باکتری‌ها به فلزات سنگین مقاومت پیدا کرده‌اند و قادر به جذب درون، یا برون سلولی آن‌ها هستند و هرچند تأثیر این فلزات و آلاینده‌ها بر میکروارگانیسم‌ها، تابع غلظت آن‌ها در محیط است (۱، ۴و ۶). تصفیه بیولوژیکی فلزات، می تواند به پاکسازی موفق تر فلزات سنگین از محیط منجر شده و این مساله به منظور دستیابی به بازده بالاتر و توجیه اقتصادی بیشتر، دارای اهمیت باشد. به طور کلی باکتری‌های گرم مثبت به دلیل ساختار دیواره سلولی ساده‌تر، کنترل کمتری نسبت به ورود مواد خارجی نشان می‌دهند، در صورتی که باکتری‌های گرم منفی دیواره سلولی، ساختار پروتئینی پیچیده‌تری داشته و ورود و جذب آلاینده‌های معدنی موجود در محیط بیرونی این باکتری‌ها، از جمله فلزات سنگین، باکنترل بیشتر و به میزان کمتری صورت می‌گیرد. غشای سلولی در سلول‌های گرم مثبت نسبتاً ساده و از دو تاسه لایه تشکیل شده است، در حالی که در باکتری‌های گرم منفی، این پوشش بسیار پیچیده و چند لایه است. غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی ماهیت لیپیدی داشته که باعث می‌شود مولکول‌های آبدوست از آن دور نگه داشته شوند. البته مولکول‌های با وزن مولکولی کم در این نوع از باکتری‌ها باپروتئین‌های منافذ به داخل سلول وارد می‌شوند ولی مولکول‌های بزرگ به آهستگی و کمتر به آن‌ها نفوذ کرده و بنابراین مقاومت بالایی به آن‌ها نشان می‌دهند.

به طورکلی میکروارگانیسم‌ها به واسطه واکنش‌های بین یون‌های فلزی و سطوح باردار منفی میکروبی، به فلزات اتصال می‌یابند و در این میان، باکتری‌های گرم مثبت تمایل بیشتری برای اتصال به این یون‌ها دارند. بنابراین در تصفیه بیولوژیک، میکروارگانیسم‌های مناسب‌تر هستند که غشاء آن‌ها بتوانند به فلزات متصل شده و همانند یک فیلتر عمل نمایند. با توجه به این مطالب می‌توان باکتری‌های گرم مثبت را کاندید بهتری در مسیر تصفیه بیولوژیک فلزات سنگین دانست (۹و۱۵). ایزوله‌های مقاوم به نیکل به دست آمده در این مطالعه را می‌توان به دو دسته تقسیم نمود.

۱- کوکسی‌های گرم مثبت که عبارت بودند از:

Staphylococcus Staphylococcus *epidermidis* ، *pasteuri* ، *Planococcus* spp. و *Micrococcus spp.*

۲- باسیل‌های گرو مثبت که عبارت بودند از:

Bacillus licheniformis و *Exiguobacterium* spp.

تمامی چهار ایزوله مقاوم به کادمیوم جدا شده، باسیل‌های گرم منفی بودند (جدول ۳). که احتمالاً به واسطه مکانیسم‌های غیر جذبی سبب مقاومت شده‌اند. در حالی که ایزوله‌های مقاوم به نیکل جدا شده دارای پتانسیل بالایی در تهیه فیلترهای زیستی و جذب نیکل دارند و می‌توان در پساب‌های آلوده به نیکل از آن‌ها بهره جست.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی در آزمایشگاه تحقیقاتی

Archive of SID

www.SID.ir

دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن اجراء گردید و بدین وسیله از کلیه کسانی که در اجراء این پروژه ما را یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Ansari, M. I., Malik, A., 2007. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. Bioresour Technol. 98(16), 3149-53.
2. Bermond, W., 1998. The heavy metals in the hydrological cycle. Stepper publishing house, londen.
3. Chovanova, K., et al., 2004. Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge. Biologia, Bratislava, 59(6), 817-82.
4. Congeevaram, S., et al., 2007. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. Journal of Hazardous Materials, 146:270–277.
5. Raja, C. E., et al. Identification and Characterization of heavy metals resistance bacteria from sewage. International Joint Symposium on Geoenviroment in Asia.
6. Gaballa, A., et al., 2003. Heavy metals resistance pattern of moderately halophytic bacteria. Arab J. Biotech, 6(2), 267-278.
7. Hassan, S. H., Abskharon, R. N., Gad El-Rab, S. M., Shoreit, A. A., 2008. Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of Pseudomonas aeruginosa isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. Journal of Basic Microbiology, 48(3), 168-76.
8. Jabbari Nezhad Kermani, A., et al., 2010. Cadmium Bioremediation by metal-resistant mutated bacteria isolate from active sludge of industrial effluent. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 7(4), 279-286.
9. Narasimhulu, K., Rao, S., Venu Vinod, A., 2010. Isolation and Identification of Bacterial Strains and Study of their Resistance to Heavy Metals and Antibiotics. Journal of Microbial & Biochemical Technology, 2(3), 074-076.
10. Patel, J. S., et al., 2006. Isolation and Characterization Nickel Uptake by Nickel Resistant Bacterial Isolate (NiRB). Biomedical and Environmental Science, 19(4), 297-301.
11. Shirdam, R., Khanafari, A., Tabatabaee, A., 2006. Cadmium, nickel and vanadium accumulation by three strains of marine bacteria. Iranian Journal of Biotechnology, 4(3), 180-187.
12. Siala, M., et al., 2008. Analysis of bacterial DNA in synovial tissue of Tunisian patients with reactive and undifferentiated arthritis by broad-range PCR, cloning and sequencing. Arthritis Research & Therapy, 10(2), R40.
13. Silver, S., Phung, L. T., 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annu Rev Microbiol. 50:753-89.
14. Singh, V., et al., 2010. Isolation and Antibiogram pattern of E.coli isolates heavy matals tolerance. International Journal of Pharma and BioSciences, 1(3).
15. Zolgharnein, H., et al., 2007. Detection of plasmids in heavy metal resistance bacteria isolated from the Persian Gulf and enclosed industrial. Iranian Journal of Biotechnology areas, 5(4), 232-239.

Archive of SID

www.SID.ir