



غربال سازی و انتخاب بهترین سویه باکتری جاذب سرب

غلامحسین ابراهیمی پور

دکترای میکروبیولوژی، استادیار دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

جمشید فولادی

دکترای میکروبیولوژی، استادیار دانشکده علوم، دانشگاه الزهراء

سارا تلی دلیر

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهراء

ویدا تفکری

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

فلزات سنگین در بیشتر نقاط دنیا در فرم‌های فیزیکی و شیمیایی گوناگون به عنوان آلوده کننده محیط زیست، وارد محیط می گردند. ارایه راه حلی جهت تصفیه زیست شناختی پساب‌های صنعتی حاوی سرب از جمله اهداف این پژوهش بوده است که با غربال سازی (screening) باکتری‌های جاذب فلز سرب از میان دیگر میکروارگانیسم‌ها آغاز گردید و از این میان نهایتاً یکی از سویه‌های باکتریایی که ماکزیمم توان جذب فلزی را از خود نشان می داد، انتخاب شد. از ابتدا گزینش و جمع آوری اکثر نمونه‌ها تا حد امکان از مراکز و کارخانه‌هایی صورت گرفت که قسمت عمده پساب آن‌ها را فلز سرب تشکیل می داد. این پژوهش در مجموع دارای دو مرحله مشخص غربال سازی بوده که به ترتیب عبارتند از: انتخاب سویه‌های مقاوم به تراکم‌های بالای سرب و جدا سازی سویه‌های انتخابی برحسب قابلیت جذب فلز. با اجرای مرحله اول غربال سازی، در حدود ۳۵ سویه باکتریایی مقاوم به فلز سرب به دست آمد که شامل طیفی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بودند. لازم به ذکر است که تمامی این سویه‌ها قادر به تحمل غلظت ۵mM از فلز سرب در محیط کشت اختصاصی حاوی این فلز بودند. جهت دستیابی به هدف مرحله دوم غربال سازی از روش Pümpel و همکاران (1995) استفاده شد که با فراهم آوردن امکان مجاور سازی کلنی‌های آغشته به سرب با گاز سولفید هیدروژن (H_2S)، به جهت عدم تشکیل رسوب سیاه سولفید سرب (PbS) در اطراف آن دسته از کلنی‌هایی که قادر به جذب فلز بودند، هاله‌هایی باریک و شفاف در اطراف این دسته از کلنی‌ها ظاهر می گشت. بدین ترتیب از این میان، ۸ سویه که دارای هاله‌های تئبیک جذب فلز بودند جدا سازی شده و بیومس حاصل از آن‌ها با محلول فلزی مجاور سازی شد و نهایتاً میزان محتوی فلزی در فاز رویی حاصل از سانتریفوژ هر یک از این نمونه‌ها به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتری جذب اتمی مورد سنجش قرار گرفت. بدین ترتیب نمونه‌ای که ماکزیمم کاهش درصد فلزی را در فاز رویی نشان می داد، معرف ماکزیمم جذب فلز توسط سویه مربوطه بود. در آزمایش تعیین نوع فرایند جذب سرب، نتایج نشان داد که میزان جذب در نمونه فعال از نظر متابولیسمی بیشتر از نمونه‌های غیر فعال است

کلیدواژه‌ها: غربال سازی، میکروارگانیسم، سرب، سولفید هیدروژن، جذب.

Screening and selecting a lead absorbing bacterium

Gholamhossein Ebrahimipour, Ph.D.

Assistant Professor, Faculty of science, Shahid Beheshti University

Jamshid Fooladi, Ph.D.

Assistant Professor, Faculty of science, Shahid Beheshti University

Sara Telly Dalir, M.Sc.

Faculty of Science, Alzahra university

Vida Tafakori, M.Sc.

Faculty of science Shahid Beheshti University

Abstract

In most places heavy metals exits to environment as environmental pollutants in different physical and chemical forms. One of the objectives of this research has been finding a solution to purify this kind of industrial run-offs. The research was initiated by screening lead-absorbing bacterium from among other microorganisms, and, finally, a particular bacterial strain, which demonstrated a maximum capacity for absorbing lead was chosen, identified, and enhancing the conditions of its absorption was carried out. From the outset, selection and collection of samples were made from the industrial and manufacturing centers the major part of whose wastes consisted of lead. Altogether, this research has two phases of screening selecting strains resistant to high lead density and screening selected strains, based on absorption capability. After the initial stage of screening, about 35 different bacterial strains resistant to lead were identified, which consisted of a particular strain of gram-positive and gram-negative bacteria. It should be mentioned that all these strains were capable of resisting a 5mM concentration of lead in a cultural environment, containing this metal. For achieving the goal in the second phase, a particular method (Pümpel et al., 1995) was employed. By proximating H_2S to the colony, it became evident that in lead-contaminated regions, the interaction between H_2S and lead would create the black sediment of PbS and consequently, a thin and transparent layer occurs around those colonies capable of absorbing lead. The 8 strains with typical metal absorption haloes were selected and their biomasses were proximated with the metal solution. At last, the amount of the metal in the supernatant measured with the help of atomic absorption spectrophotometer. Thus, the sample that shows the maximum reduction in percentage of lead concentration in supernatant represents the maximum absorption of the metal by the related bacterium. In this strain, bioaccumulation was more than biosorption.

Keywords: Screening, Microorganism, Lead, H_2S , Absorption.

مقدمه

همگام با پیشرفت‌های سریع و چشمگیر کنونی در فناوری و در کنار آن، رشد رو به افزایش جمعیت جهانی و در برخی از موارد، به واسطه عدم توجه برخی کارگزاران، فشار روز افزونی بر منابع طبیعی موجود در محیط زیست وارد آمده و به دنبال آن، منجر به زیان‌های جانی و مالی فراوان گشته و حتی در بعضی موارد، جامعه و بلکه کره زمین را با خطر مواجه می‌سازد (جعفری نژاد، ۱۳۷۱؛ سریری پروانی، ۱۳۷۱).

فلزات سنگین در بیشتر نقاط دنیا در فرم‌های فیزیکی و شیمیایی گوناگون و در غلظت‌های متفاوت به عنوان آلاینده محیط زیست، از طریق تخلیه پساب‌های متعدد از جمله پساب‌های صنعتی، وارد محیط می‌گردند (فخری هروی، ۱۳۷۶؛ Varnam et al., 2000). در میان فلزات سنگین سمی، جیوه، سرب و کادمیوم، که Big three نامیده می‌شوند، به دلیل اثرهای مضر بر محیط، قابل توجه هستند (Al-Garni, 2005).

در این میان فلز سرب، به طور عمده از طریق پساب حاصل از فعالیت صنایع متعدد، به ویژه باتری‌سازی، آبکاری، ذوب و تصفیه فلزات، رنگ و رزین، لاستیک‌سازی، شیشه، کریستال و سوخت بنزین وارد محیط شده و به دلیل قابلیت تجمع در بدن انسان و دیگر موجودات زنده و تغلیظ به وسیله زنجیره غذایی، به طور مشخص خطرناک محسوب شده، منجر به ایجاد عوارض و مسمومیت‌های متعدد می‌گردد (جعفری نژاد، ۱۳۷۱؛ Li et al., 1998؛ Jung et al., 1998b؛ Puranik et al., 1996؛ Levinson et al., 1997).

وجود تمام این مشکلات، لزوم هر چه بیشتر تصفیه پساب‌های آلوده را محرز می‌کند.

روش‌های مختلف تصفیه فیزیکوشیمیایی، از نظر ساخت، نگهداری، راهبری، تهیه مواد شیمیایی و یا دستگاه‌های مورد نیاز، گران و پرهزینه هستند (سریری

پروانی، ۱۳۷۱ و Puranik & Paknikar, 1997). همچنین، مشکل عمده روش‌های فیزیکوشیمیایی، در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ ppm فلز آلاینده ظاهر می‌شود. در این شرایط، روش‌های مذکور، کارایی لازم را جهت کاهش غلظت فلز به سطح ۱ ppm نشان نمی‌دهند. این مشکل در رابطه با تصفیه زیستی مطرح نیست و به این ترتیب به نظر می‌رسد، تصفیه زیستی جانشین و یا دست کم مکمل مناسبی برای دیگر روش‌ها باشد. بنابراین، در استفاده از روش‌های مؤثر، کارآمد و اقتصادی برای تصفیه پساب‌های حاوی فلزات سنگین تمایل زیادی وجود دارد.

(امین، ۱۳۸۰؛ Puranik & Paknikar, 1997). در پژوهش حاضر، سعی بر این بوده است تا میکروارگانیزم مناسب جهت یک تصفیه زیستی موفق جداسازی شود تا در آینده بتوان از آن در جهت پاکسازی پساب‌های حاوی سرب بهره گرفته و به این ترتیب، در جهت کاربردی نمودن هر چه بیشتر روش‌های تصفیه زیستی پساب‌های آلوده به این فلز، گامی دیگر برداشته شود.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت مورد استفاده:

محیط m LBA: حاوی ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۱ درصد باکتوتریپتون و ۱/۵ درصد آگار بوده (امین، ۱۳۸۰؛ Levinson et al., 1998؛ Levinson et al., 1996؛ Othmer et al., 1981) که غلظت نمک نیترات سرب (II) در آن معادل ۵ mM در نظر گرفته شد. در دمای آزمایشگاه، PH محلول نیترات سرب (II) با غلظت ۵ mM در حدود ۴/۲۰ به دست آمد و در این شرایط این میزان نمک در آب مقطر به خوبی حل گردید. PH نهایی این محیط به کمک محلول‌های ۰/۱ مولار NaOH بر روی ۷ تنظیم شد.

محیط MYX: محیط پایه ملاس چغندر قند ۳ درصد که به آن ۰/۱ درصد عصاره مخمر صنعتی تلقیح شده بود. نمونه ملاس مورد استفاده در این پژوهش، مربوط به تولید سال ۱۳۸۰ کارخانه قند و نیشکر دزفول بود.

نمونه برداری

از ابتدا سعی بر آن شد تا انتخاب و جمع‌آوری نمونه‌ها تا حد امکان از مراکزی صورت گیرد که قسمت عمدهٔ پساب آنها حاوی سرب بوده و به عبارتی آلوده به این فلز باشند. تعدادی از نمونه‌ها از تصفیه‌خانه، پساب کارخانه باتری سازی نیرو و یکی از آنها از لجن جوی یکی از میادین جنوب تهران جمع‌آوری شد. به منظور جمع‌آوری نمونه‌های پساب و لجن، از ظروف پلاستیکی نمونه‌برداری یک بار مصرف از نوع درپنج‌دار، استفاده شد. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافته و کشت داده شدند. در رابطه با نمونهٔ پساب کارخانهٔ رنگ و رزین که از شهرستان تبریز فراهم گردید، نمونه با ۲۴ ساعت تاخیر به آزمایشگاه منتقل شد. شایان به ذکر است که در طول این مدت، نمونه در دمای 4°C نگهداری شد.

غربال‌سازی

در این پژوهش، مرحلهٔ غربال‌سازی (Screening)، از دو بخش کاملاً مشخص و متمایز تشکیل یافته است که به ترتیب عبارتند از انتخاب سویه‌های باکتریایی مقاوم به تراکم‌های بالای سرب و گزینش سویه‌های دارای قابلیت جذب فلز. انتخاب سویه‌های باکتریایی مقاوم به تراکم بالای سرب به روش کلاسیک بروی محیط mLBA انجام شد. جهت گزینش سویه‌های باکتریایی جداسازی شده از بخش اول غربال‌سازی، بر اساس قابلیت آنها در جذب فلز سرب، از روش به کار گرفته شده توسط Pümpel و همکاران (1995) استفاده شد. برطبق این روش، باکتری‌های جداسازی شده از بخش قبل، بر روی محیط LBA فاقد سرب، توسط آنس و به صورت نقطه‌ای (punctual inoculation) کشت داده شدند. این محیط بر روی ۷ تنظیم گردید. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط هوازوی و در انکوباتور 30°C گرماگذاری شدند. سپس در شرایط استریل، مخلوطی از

آگار (15 g/l) و نیترات سرب (II) با غلظت‌های متفاوت ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ میلی‌مولار به طور جداگانه و به میزان ۱۰ میلی‌لیتر بر روی کلتی‌های رشد یافته اضافه گردید و در شرایطی مشابه، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گرماگذاری شد. شایان به ذکر است که پس از اضافه کردن این مخلوط و سفت شدن آگار موجود در آن، پلیت‌ها در انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان گرماگذاری، در زیر هود شیمیایی، پلیت‌ها به صورت عمودی و سرباز در درون دسیکاتور حاوی HCl (۱۰ درصد) چیده شدند. سپس با اضافه نمودن ۳g سولفید سدیم امکان مجاورسازی کلتی‌های باکتریایی با گاز سولفید هیدروژن (H_2S) حاصله فراهم می‌گردید. پس از اضافه نمودن سولفید سدیم، درب دسیکاتور قبل از بستن به پارافین آغشته می‌شد. بدین ترتیب از هدر رفتن و خروج گاز H_2S به محیط جلوگیری گردید. بدیهی است در نواحی از محیط کشت که سرب وجود داشت، واکنش میان H_2S و فلز سبب تشکیل رسوب سیاه سولفید سرب (PbS) شده و با استناد به این موضوع، در اطراف آن دسته از کلتی‌هایی که قادر به جذب سرب بودند، به دلیل عدم تشکیل رسوب سیاه PbS ، هاله‌ای شفاف و باریک ظاهر گردید. آن دسته از کلتی‌هایی که ویژگی یاد شده را از خود نشان دادند، برای ادامهٔ کار انتخاب گردیدند.

روش به‌دست آوردن میزان کمی جذب فلز

جهت به‌دست آوردن میزان کمی جذب فلز توسط هر یک از سویه‌های باکتریایی غربال شده و در نهایت انتخاب یکی از آنها به عنوان سویهٔ برتر در جذب فلز سرب، لازم بود تا از طریق متفاوت عمل نمود و میزان دقیق جذب فلز سرب را در هر یک از این سویه‌ها به طور کمی و مشخص به دست آورد.

جهت دستیابی به این مهم، بیومس هر یک از سویه‌های باقیمانده، در محیط کشت نوترینت برات که به آن ۰/۳ درصد عصارهٔ مخمر اضافه شده بود، تهیه شد. بدین معنی

منحنی استاندارد غلظت سرب

به کمک محلول‌های فلزی واجد غلظت‌های متفاوت کاتیون سرب که در حکم محلول‌های استاندارد می‌باشند (ppm ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۵) و اندازه‌گیری میزان جذب اتمی هر یک از آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی در طول موج ۲۸۳/۳ نانومتر، منحنی استاندارد جذب فلز سرب رسم شد. دقت دستگاه در حد ppm ۱ و نوع سوخت آن air/acetylene بوده است (Jung et al., 1998a; Engl et al., 1995; Li et al., 1998; Jung et al., 1998b; WA et al., 2001).

شایان به ذکر است که قبل از خواندن میزان جذب فلز توسط هر یک از نمونه‌ها، در کلیه آزمایش‌های انجام شده در این پژوهش، ابتدا به کمک محلول‌های استاندارد، منحنی استاندارد جذب فلز سرب رسم شد (منحنی ۱-۳). میزان جذب اتمی هر یک از محلول‌های استاندارد با ۳ تکرار توسط دستگاه A.A.S خوانده شد و نتیجه به صورت میانگین گزارش گردید.

محاسبه میزان جذب فلز

لازم به ذکر است که در تمام مراحل کار با دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی، چه در مرحله تهیه منحنی استاندارد جذب فلز و چه در مراحل مربوط به خواندن میزان جذب نمونه‌های مختلف، سه تکرار از خواندن میزان جذب انجام شد و در نهایت میانگین آنها به صورت عدد جذب نهایی گزارش گردید. پس از رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت فلز در فاز رویی هر یک از نمونه‌ها، جهت محاسبه میزان جذب فلز توسط بیومس‌های موجود، از فرمول $q = V(C_i - C_f) / S$ استفاده شد. پارامتر q معرف میزان جذب فلز توسط بیومس است که با واحد میلی گرم فلز جذب شده در هر گرم وزن خشک باکتری (mg/gdw) گزارش می‌گردد. پارامتر V معرف حجم محلول مجاورسازی بر حسب لیتر، C_i غلظت اولیه محلول فلزی بر حسب

که پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در 30°C و rpm ۱۵۰، سوسپانسیون‌های باکتریایی در شرایط $9000 \times \text{g}$ و دمای 4°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل از هر یک از سویه‌های موجود، مجدداً در شرایط $9000 \times \text{g}$ و دمای 4°C به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر دو بار تقطیر شستشو داده شده و سانتریفیوژ گردیدند (WA et al., 2001).

محیط کشت نوترینت برات یک محیط کشت مناسب و مغذی جهت به دست آوردن بیومس باکتری‌های میله‌ای یا باسیلوس‌ها می‌باشد (Sneath et al., 1986). با توجه به اینکه از ۸ سویه موجود، ۷ سویه به صورت باسیل و تنها یکی از آنها به صورت کوکوس بود، جهت تهیه بیومس آنها از محیط کشت نوترینت برات استفاده شد که به آن میزان مشخصی عصاره مخمر با کیفیت Drug (جهت غنی‌تر نمودن هر چه بیشتر محیط و تولید بیومس بیشتر) اضافه شده بود.

در حدود یک گرم از هر یک از توده‌های باکتریایی (وزن تر) به طور جداگانه با محلول نترات سرب (II) محتوی ppm ۱۲۵ سرب با $\text{PH}=5$ در دمای 25°C و rpm ۲۰۰ به مدت ۳ ساعت مجاور گردید. پس از گذشت مدت زمان مجاورسازی هر یک از بیومس‌های باکتریایی با محلول فلزی، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در $9000 \times \text{g}$ و دمای 4°C سانتریفیوژ شد (WA et al., 2001). تنظیم PH کلیه محلول‌های فلزی که جهت مجاورسازی با بیومس تهیه شده بودند، به کمک محلول‌های ۰/۱ مولار سود و اسید کلریدریک صورت گرفت. (Engl et al., 1995; Puranik et al., 1997; Othmer et al., 1981; Varnam et al., 2000)

میزان محتوی فلزی در فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ، به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (Atomic (A.A.S) absorption spectrophotometer) مورد سنجش قرار گرفت.

Cf, mg/l غلظت فلز پس از مجاورسازی بر حسب mg/l و پارامتر S وزن خشک بیومس با واحد گرم می باشد (غفوریان و همکاران، ۱۳۷۷؛ Jung et al., 1998b; Jung et al., 1998a; Li et al., 1998).

وزن های خشک بیومس های باکتریایی با قرار دادن آنها به مدت یک شب در فور 100°C محاسبه گردید (غفوریان و همکاران، ۱۳۷۶؛ غفوریان و همکاران، ۱۳۷۷؛ Engl et al., 1995؛ Othmer et al., 1998b; Jung et al., 1998b; (1981) Volesky). بر حسب پژوهش های (2004) برای تفسیرهای علمی، وزن خشک ماده جاذب، ترجیح داده می شود.

بدین ترتیب، نمونه ای که ماکزیمم کاهش درصد غلظت فلزی را در محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ نشان داد، معرف حداکثر میزان جذب فلز توسط باکتری مربوطه بوده و در نهایت با مقایسه نتایج موجود، از این میان یکی از سویه ها به عنوان سویه برتر از لحاظ جذب فلز سرب جداسازی شد (امین، ۱۳۸۰).

بررسی چگونگی جذب سرب توسط باکتری

به منظور تعیین نوع فرایند جذب توسط باکتری (جذب وابسته و یا مستقل از متابولیسم) جهت غیر فعال نمودن باکتری از سه روش استفاده شد (امین، ۱۳۸۰؛ جلالی راد، ۱۳۷۸؛ غفوریان و همکاران، ۱۳۷۶؛ Jung Ho et al., 1998) و همزمان میان میزان جذب سرب توسط آنها با نمونه فعال از نظر متابولیسمی (شاهد) مقایسه ای به عمل آمد.

۱ ml از سوسپانسیون باکتریایی در ارلن ۵۰۰ ml حاوی ۱۰۰ ml محیط MYX و پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در 30°C و ۱۵۰ rpm، سانتریفیوژ در شرایطی شامل $9000 \times g$ ، ۲۰ دقیقه و 4°C صورت گرفت. پلیت باکتریایی با آب مقطر دو بار تقطیر شستشو داده شده و مجدداً در شرایط یاد شده به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

سه روشی که از آنها به منظور غیر فعال کردن باکتری استفاده شد، به قرار زیر می باشد:

سلول ها به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱ اتمسفر و دمای 121°C قرار داده شدند.

بیومس باکتری به مدت یک شب در فور 100°C قرار گرفت.

بیومس باکتری به مدت ۲ ساعت، با محلول سدیم آزید ۱ mM مجاور شد.

بیومس های غیر فعال حاصل از این سه روش، بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند تا از کشته شدن آنها به طور کامل اطمینان حاصل شود. از هر یک از نمونه ها به میزان مشخصی (۰/۴۵ گرم وزن تر) برداشت شد و مجاورسازی آنها با ۱۰۰ ml محلول فلزی با غلظت سربی معادل ۵۰۰ ppm در دمای 30°C و ۱۵۰ rpm صورت گرفت. هم زمان از یک نمونه شاهد و فعال متابولیسمی نیز استفاده شد. پس از گذشت ۱۸ ساعت از آغاز مجاورسازی، نمونه ها در شرایط $g \times 9000$ و دمای 4°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز رویی آنها جهت تعیین غلظت فلز، مورد آنالیز قرار گرفت.

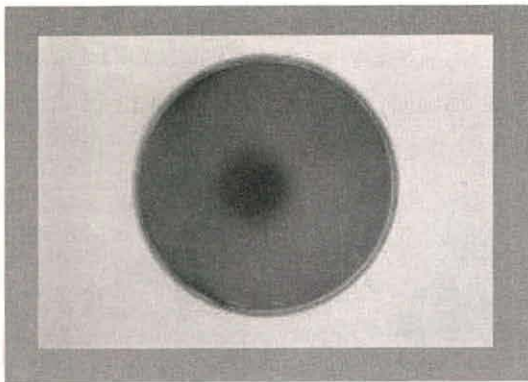
نتایج

نتایج مرحله غربال سازی

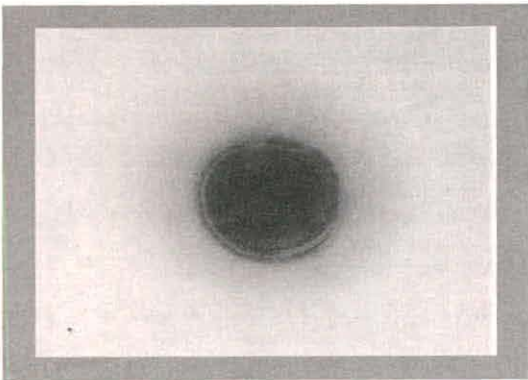
پس از جداسازی بر روی محیط LBA حاوی غلظت ۵ mM از نمک نترات سرب (II)، با گذشت ۷۲ ساعت از زمان گرماگذاری، کلنی های مختلفی اعم از کپک، مخمر و باکتری بر روی محیط ظاهر گردید که همانا نشان دهنده آن است که طیف گسترده ای از انواع میکروارگانیسم ها نسبت به این فلز مقاومت دارند. از این میان، کلنی های باکتریایی ایزوله شده و مراحل خلص سازی تا دو مرحله دیگر بر روی محیط اختصاصی حاوی سرب و تا بدست آوردن تک کلنی های باکتریایی بر روی محیط نوترینت آگار ادامه یافت. در این مرحله،

در نهایت ۳۵ سویه باکتریایی مقاوم به فلز جدا شد که شامل طیفی از باکتری‌های گرم منفی (G^-) و گرم مثبت (G^+) بودند.

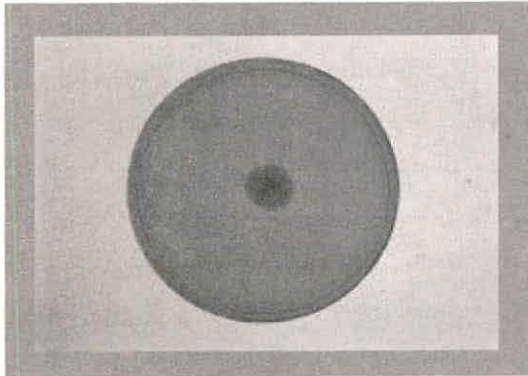
در مرحله دوم غربال سازی، جهت گزینش سویه‌های باکتریایی جداسازی شده از بخش قبل، براساس قابلیت آنها در جذب فلز سرب، از روش به کار گرفته شده توسط پومیل و همکاران (۱۹۹۵) استفاده شد (شکل‌های ۱ و ۲). با به کارگیری این فن، از میان سویه‌های باکتریایی بخش اول مرحله غربال‌سازی، در نهایت ۸ سویه که همه آنها قادر به جذب فلز نیز بودند، مورد جداسازی قرار گرفتند. از این ۸ سویه، ۶ سویه به صورت باسیل G^- بوده و بقیه به صورت باسیل G^+ و یک کوکوس G^+ بودند. هاله‌های ناشی از جذب فلز سرب که در اطراف کلنی‌ها ظاهر می‌گردند، فوق‌العاده باریک بوده و با چشم غیر مسلح به سختی قابل رویت هستند (شکل‌های ۳ تا ۵).



شکل ۳- کشت باکتری به صورت نقطه ای بروی محیط LBA و تشکیل هاله باریک و شفاف ناشی از جذب فلز سرب توسط باکتری (نمونه مجاور شده با گاز سولفید هیدروژن)

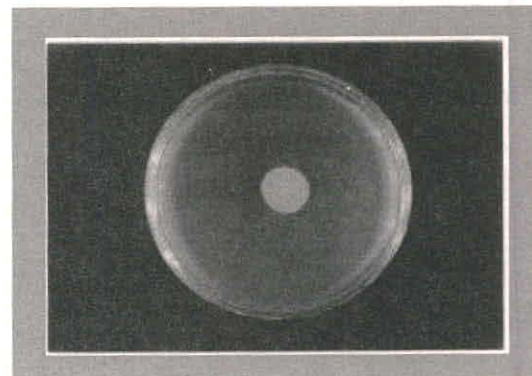


شکل ۴- بزرگنمایی از کلنی باکتری و هاله جذبی اطراف آن

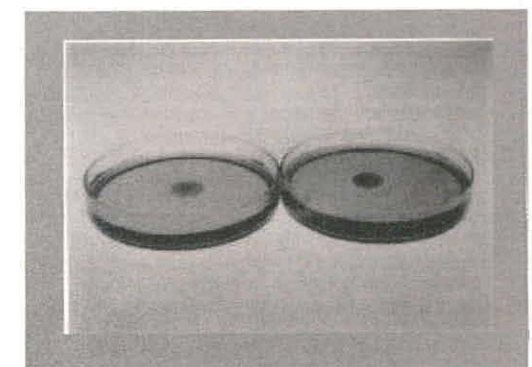


شکل ۵- کشت باکتری بروی محیط LBA (نمونه شاهد پوشانده شده با سرب و مجاور نشده با گاز سولفید هیدروژن)

در پژوهش حاضر، به مرور و با بالا بردن غلظت سرب در محیط، در اثر مجاورسازی گاز سولفید هیدروژن (H_2S) با کلنی‌ها، بر میزان رسوب سیاه سولفید سرب (PbS) در محیط افزوده شده، به طوری که دامنه رنگ محیط از رنگی مطابق با رنگ محیط شاهد (زرد قهوه ای بسیار روشن) تا کاملاً سیاه متغیر است (جدول ۱).



شکل ۱- کشت نقطه‌ای باکتری مقاوم به سرب بروی محیط LBA



شکل ۲- کلنی باکتری کشت داده شده به روش نقطه‌ای بروی محیط LBA و مجاور نشده با گاز سولفید هیدروژن (پلیت سمت راست حاوی سرب و پلیت سمت چپ فاقد سرب)

جدول ۱- غلظت‌های مختلف سرب و دامنه تغییر رنگ محیط پس از مجاورسازی گاز H₂S با کلنی‌ها

غلظت سرب (mM)	رنگ محیط پس از مجاورسازی
۰/۱	مطابق رنگ محیط شاهد
۰/۵	زرد تا قهوه‌ای بسیار روشن
۱	قهوه‌ای روشن
۲	قهوه‌ای روشن
۴	قهوه‌ای نسبتاً تیره
۶	قهوه‌ای تیره
۸	قهوه‌ای تیره
۱۰	قهوه‌ای بسیار تیره
۱۲	سیاه
۱۵	سیاه

با افزایش غلظت سرب در محیط، علاوه بر ایجاد واکنش رسوبی شدیدتر و به عبارتی تیره‌تر شدن رنگ محیط، مدت زمان لازم برای مجاورسازی گاز H₂S با کلنی‌ها جهت رؤیت مناسب هاله‌های اطراف آنها نیز، کاهش یافت. این در حالی بود که در پلیت‌های حاوی غلظت‌های پایین‌تر از فلز، به ترتیب مدت زمان مجاورسازی گاز H₂S با کلنی‌ها جهت ایجاد واکنش رسوبی افزایش می‌یافت (جدول ۲).

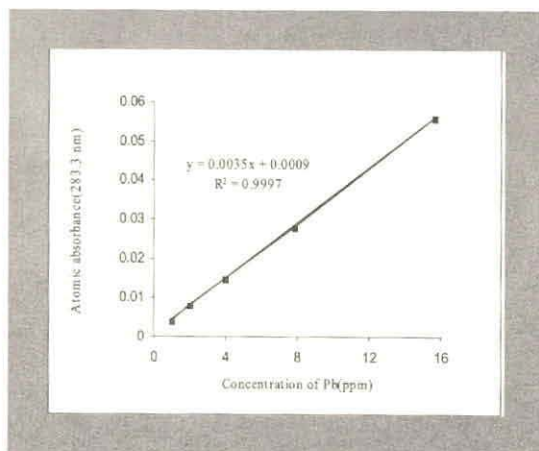
جدول ۲- مدت زمان لازم برای مجاورسازی گاز H₂S با کلنی‌های باکتریایی پوشیده شده از فلز سرب جهت رؤیت مناسب هاله‌های جذبی اطراف هر یک از آنها

غلظت سرب (mM)	مدت زمان لازم برای مجاورسازی
۰/۱	۲۰ دقیقه
۰/۵	۲۰ دقیقه
۱	۲۰ دقیقه
۲	۴ دقیقه
۴	۱ دقیقه
۶	۳۰ ثانیه
۸	۱۵ ثانیه
۱۰	۱۰ ثانیه
۱۲	کمتر از ۵ ثانیه
۱۵	کمتر از ۵ ثانیه

در این روش، دامنه غلظت سرب جهت مشاهده هاله‌های شفاف و باریک اطراف کلنی‌ها، بین ۲ تا ۶ میلی مولار به دست آمد. شایان به ذکر است که در اطراف هر یک از ۸ سویه موجود، هاله‌هایی که تشکیل می‌گردید، همگی تقریباً در یک حد باریک و شفاف بوده و از این نظر، با یکدیگر تفاوت چشمگیری نداشتند.

نتایج حاصل از بدست آوردن میزان کمی جذب فلز

در این مرحله، توان جذب سرب در هر یک از این ۸ سویه، به طور کمی مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور پس از رسم منحنی استاندارد جذب فلز سرب و محاسبه معادله خط (منحنی ۱)، غلظت هر یک از نمونه‌های مجهول (C_i) به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی تعیین شده و سپس میزان جذب سرب (q) توسط هر یک از این باکتری‌ها محاسبه گردید (منحنی ۱).



منحنی ۱: منحنی و معادله خط استاندارد غلظت سرب

پس از محاسبات انجام شده و مقایسه میزان جذب سرب توسط هر یک از سویه‌های موجود، در نهایت، یکی از آنها انتخاب گردید که باکتری "DEFS" نامگذاری شد و نسبت به بقیه، قدرت جذب بالاتری نشان می‌داد. این باکتری از نمونه پساب آبکاری متعلق به یکی از مراکز آبکاری فلزات در تهران مورد جداسازی قرار گرفته بود و قادر به جذب فلز سرب بود.

نتایج حاصل از بررسی چگونگی جذب سرب توسط باکتری

و فعال از نظر متابولیسمی، از نمونه‌های غیرفعال بیشتر است. جدول ۳ بیان دارنده این موضوع است.

نتایج حاکی از آن است که میزان جذب در نمونه شاهد

جدول ۳- میزان جذب سرب در نمونه‌های فعال و غیرفعال متابولیسمی

نوع فعالیت متابولیسمی	فعال از نظر متابولیسم	از نظر متابولیک غیر فعال		
		تیمار شده با آزید سدیم	اتوکلاو شده	خشک شده در فور ۱۰۰°C
نمونه‌ها	شاهد			
میزان جذب سرب (mg/gdw)	۱۶۷/۹۰۹	۱۴۰/۱۳۵	۹۶/۱۹۲	۸۷/۵۱۶

بحث

لویسون و همکاران (۱۹۹۶)، بیان داشتند که به جهت تشکیل نمک‌های سرب در محیط‌های جامد، جداسازی اولیه اگر در محیط مایع صورت گیرد، از تشکیل نمک‌های سربی کاسته می‌شود، ولی حتی در این حالت نیز نمک‌های سرب تشکیل می‌گردند. در این پژوهش، از محیط جامد استفاده شد تا امکان جداسازی راحت‌تر انواع کلنی‌های باکتریایی وجود داشته باشد.

در مقاله ارائه شده توسط پومپل و همکاران (Pümpel et al., 1995)، هاله‌های ناشی از جذب فلز توسط باکتری که در اطراف کلنی‌ها ظاهر می‌گردند، فوق العاده باریک بوده و با چشم غیر مسلح به سختی قابل رویت‌اند. این مسئله با نتایج حاصل از این پژوهش نیز مطابقت دارد. جهت رویت هاله‌ها، وجود نور کافی و استفاده از ذره‌بین و یا میکروسکوپ استریو تا حد زیادی کمک کننده است. به این مسئله نیز در مقاله مذکور اشاره شده است.

با افزایش غلظت سرب در محیط، میزان واکنش میان گاز سولفید هیدروژن و سرب موجود در محیط افزایش یافته و در پی آن رسوب سولفید سرب (سیاه رنگ) بیشتری، محیط را فرا می‌گیرد. به همین علت است که به مرور و با افزایش غلظت سرب در محیط، دامنه رنگ محیط از زرد قهوه‌ای بسیار روشن تا کاملاً سیاه متغیر است.

با افزایش غلظت سرب در محیط، علاوه بر ایجاد واکنش رسوبی شدیدتر و به عبارتی تیره‌تر شدن رنگ محیط، مدت زمان لازم برای مجاورسازی گاز سولفید هیدروژن با کلنی‌ها جهت رویت مناسب هاله‌های اطراف کلنی‌ها نیز، کاهش می‌یابد. این در حالی است که در پلیت‌های حاوی غلظت‌های پایین‌تر از فلز، به ترتیب مدت زمان مجاورسازی گاز سولفید هیدروژن با کلنی‌ها جهت ایجاد واکنش رسوبی افزایش می‌یابد (جدول ۲). علت آن است که با افزایش غلظت سرب در محیط، مدت زمان لازم جهت انجام واکنش میان مولکول‌های گاز سولفید هیدروژن و سرب موجود در محیط کاهش می‌یابد و بالعکس.

در روش به کار گرفته شده توسط پومپل و همکاران، به مرور و با بالا بردن غلظت سرب محیط، در اثر مجاورسازی گاز H_2S با کلنی‌ها، بر میزان رسوب سیاه PbS در محیط افزوده شده و ایجاد رنگ سیاه در غلظت‌های بالاتر از ۶ mM سرب، مانع از دیدن هاله‌های بسیار باریک اطراف کلنی‌ها می‌گشت. در غلظت‌های پایین‌تر از ۲ mM سرب نیز، به طور عملی، کنتراست فازی لازم (Phase contrast) جهت تفکیک هاله شفاف و باریک اطراف کلنی و محیط اطراف آن ایجاد نمی‌شد و عملاً این دو بخش از یکدیگر قابل تشخیص نمی‌باشند. نتایج این پژوهش با نتایج حاصل از پژوهش جاری

مطابقت دارد.

از میان ۳۵ سویه باکتریایی، هشت باکتری که در این قسمت گزینش شدند، همگی پس از مجاورسازی با گاز H_2S رنگ محیط را سیاه کرده و در اطرافشان هاله‌ای باریک و شفاف مشهود بود.

محلول نترات سرب که برای مجاورسازی با بیومس‌ها تهیه می‌شد، دارای غلظت سربی معادل ۱۲۵ ppm بود. بررسی‌ها نشان داد که در دمای آزمایشگاه و با اضافه نمودن محلول هیدروکسید سدیم و قلیایی شدن محیط، به مرور محلول کدر شده و رسوب کاملاً سفیدی (هیدروکسید سرب (II)) محیط واکنش را فرا می‌گرفت. با توجه به این موضوع، PH این محلول بر روی ۵ تنظیم گردید تا از ایجاد هر گونه رسوب در محیط جلوگیری به عمل آید (WA et al., 2001).

اساساً جذب فلزات سنگین توسط بیومس غیر زنده میکروارگانیسم، به روش Biosorptive صورت می‌گیرد. در عوض همان بیومس، در شرایط فعال متابولیسمی، علاوه بر جذب مذکور، ممکن است بتواند فلزات را به روش Bioaccumulative نیز در ساختار خود ذخیره سازد. نتایج این پژوهش حاکی از آن است که میزان جذب در نمونه شاهد و فعال از نظر متابولیسمی، از نمونه‌های غیر فعال بیشتر است (جدول ۳). این مطلب حکایت از آن دارد که نمونه فعال متابولیسمی، علاوه بر اینکه از مکانیسم جذب Biosorptive در نمونه‌های غیر فعال برخوردار است، از روش Bioaccumulation نیز به منظور ذخیره فلز در درون خود استفاده می‌کند. بیومس فعال، هر دو نوع جذب را انجام می‌دهد و دارای دو ویژگی عمده می‌باشد: ۱- بیومس زنده دارای پتانسیل جذب فلز به درون خود می‌باشد. ۲- جذب درون سلولی سبب بهینه کردن ظرفیت کل و پایداری فلز جذب شده می‌شود. به این موضوع در مقاله پورائیک و همکاران (۱۹۹۷) به نقل از ماکاسکی و دین (۱۹۸۹) اشاره شده است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که میزان جذب سرب توسط سلول‌های

زنده ساکارومیسس سرویزیه، ده برابر بیشتر از سلول‌های مرده است (Jung Ho et al., 1998a). علاوه بر این بزرگ‌ترین مزیت استفاده از کشت زنده میکروبی، جهت تولید بیومس عدم نیاز به مراحل جداگانه‌ای مثل کشت، جمع آوری، خشک کردن، آماده سازی و ذخیره، است (Ray et al., 2005).

جانگ هو و همکاران (۱۹۹۸) بیان داشتند که علت کاهش جذب سرب در حالت اتوکلاو کردن بیومس، احتمالاً به دو دلیل زیر است: ۱) در این حالت جذب سرب فقط به صورت سطحی خواهد بود و جذب درونی وجود نخواهد داشت. ۲) در حین اتوکلاو، برخی از سایت‌های اتصال Pb^{2+} در اثر شوک ناشی از دمای بالا، دنا توره می‌شوند.

شایان به ذکر است که سدیم آزید در حکم مهار کننده فسفوریلاسیون اکسیداتیو است. بررسی جذب غیر فعال سرب توسط ساکارومیسس سرویزیه نشان داد، در حضور دی نیترو فیل (DNP) مقدار جذب $0.2 \pm \mu M/gdw$ بوده و طی زمان، ثابت باقی می‌ماند. الگوی جذب در شرایط فاقد DNP لگاریتمی بوده و حداکثر جذب در ۶۰ دقیقه گرماگذاری، معادل $9 \pm 99.3 \mu M/gdw$ می‌باشد. این مقدار جذب، نسبت به جذب سرب توسط باکتری به‌دست آمده در این پژوهش، بسیار کمتر می‌باشد. منحنی جذب روی (Zn) توسط ساکارومیسس سرویزیه نیز لگاریتمی بوده و حداکثر جذب معادل $11 \pm 196.8 \mu M/gdw$ می‌باشد. در حضور DNP نیز مقدار جذب $0.2 \pm 4 \mu M/gdw$ بوده و ثابت باقی مانده است. در تحقیق انجام شده توسط این افراد بخش اعظم جذب فلز توسط ساکارومیسس سرویزیه به طور فعال و در درون سلول صورت گرفته است (قوانینی، ۱۳۷۹).

در پژوهش انجام شده توسط این افراد، میزان جذب سرب توسط سلول‌های زنده آرئوبازیدیوم پولولانس (Aureobasidium pullulans)، سه برابر بیشتر از سلول‌های مرده بوده است. میزان ظرفیت جذبی باکتری

MGF-48 در مورد فلز سرب، برای سلول‌های زنده 0.02 ± 0.087 (میلی اکی والان بر گرم وزن خشک سلول) و برای سلول‌های غیر زنده 0.047 ± 0.020 meq/gdw است (غفوریان و همکاران، ۱۳۷۷). می‌توان نتیجه گرفت که در بعضی موارد، با از بین رفتن فعالیت متابولیکی در اثر تیمارهای گوناگون، ظرفیت جذب فلز افزایش می‌یابد.

به نقل از ساگ و همکاران (۱۹۹۵) در مقاله پورانیگ و همکاران (۱۹۹۷)، ماکزیمم جداسازی سرب توسط *Zoogloea ramigera* و *Rhizopus arrhizus* به ترتیب معادل ۱۴/۵ و ۸/۳۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش شده است.

در مقام مقایسه، میزان جذب سرب در باکتری به دست آمده در این پژوهش، بیشتر بوده که معادل mg/gdw ۱۶۷/۹۰۹ بود. در نتیجه این باکتری می‌تواند یک باکتری بسیار مفید در جهت تولید Biosorbent ها باشد و در تصفیه پساب‌های صنعتی آلوده به فلزات سنگین مورد استفاده قرار گیرد.

پی‌نوشت

1- Modified Luria -Bertani Agar

منابع

امین، پرنیا (۱۳۸۰). جذب و ذخیره‌سازی میکروبی کادمیوم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. دانشگاه الزهراء (س).

جعفری نژاد، عباس (۱۳۷۱). چهره زیبای میکروب‌ها. تهران: نشر دانش امروز (وابسته به مؤسسه انتشارات امیرکبیر).

جلالی‌راد، رضا (۱۳۷۸). بررسی توان باکتری *Chryseomonas luteola* برای جذب رادیوایزوتوپ‌های پسمان‌های رادیواکتیو و بهینه‌سازی شرایط جذب. پایان

نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. دانشکده علوم پایه دانشگاه تهران.

سریری پروانی، محسن (۱۳۷۱). بهینه‌سازی حذف سرب از پساب صنایع باتری‌سازی و بررسی روش بازیابی آن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط. دانشگاه تربیت مدرس.

غفوریان، حسین (۱۳۷۶). جداسازی اورانیوم و فلزات سمی به وسیله باکتری جدید MGF-48. نشریه علمی سازمان انرژی اتمی ایران، (شماره ۱۳): ۵۳-۶۷.

غفوریان، حسین (۱۳۷۶). روش جدید جداسازی رادیوم از آب‌های چشمه‌های منطقه رامسر با استفاده از باکتری سودوموناس MGF-48. نشریه علمی سازمان انرژی اتمی ایران، (شماره ۱۴): ۷۳-۸۸.

غفوریان، حسین (۱۳۷۷). بررسی ساز و کارها و بهینه‌سازی جذب اورانیوم توسط باکتری MGF-48. نشریه علمی سازمان انرژی اتمی ایران، (شماره ۱۷): ۴۴-۵۶.

فخری هروی، محمدرضا (۱۳۷۶). حذف فلزات سنگین از پساب‌های صنعتی توسط باکتری‌های احیا کننده سولفات. پایان‌نامه کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط. دانشگاه تربیت مدرس.

قوانینی، محمدحسین (۱۳۷۹). بررسی جذب فلزات سرب و روی توسط سویه‌های مخمیری. نشریه دومین همایش ملی بیوتکنولوژی، ۱۶۱۲-۱۶۱۷.

Al-Garni, S. (2005). Biosorption of lead by gram-ve capsulated and non-capsulated bacteria. *Water SA*. 31:3: 345-349.

Engl, A. and K. Benno (1995). Biosorption of Heavy Metals by *Saccharomyces cerevisiae*: Effectss of Nutrient conditions. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 63: 257-261.

Jung Ho, S. Dong Seog, K. Jong Won, and Y. Song Seung (1998b). Process of Pb^{2+} accumulation in



- Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnology Letters*, 20: 2: 153-156.
- Jung Ho, S. Jong Won, Y. and D. K. Seog (1998a). Comparison of Pb²⁺ accumulation characteristics between live and dead cells of Saccharomyces cerevisiae and Aureobasidium pullulans. *Biotechnology Letters*, 20: 3: 247-251.
- Levinson, H. S. and I. Mahler (1998). Phosphatase activity and lead resistance in Citrobacter freundii and Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiology Letters* 161: 135-138.
- Levinson, H., S. Mahler, I. Blackwelder, and T. Hood (1996). Lead resistance and sensitivity in Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiology Letters* 145: 421-425.
- Li, Z., L. Zhao, Y. YU, and C. Changzhi (1998). Removal of lead from aqueous solution by non-living Rhizopus nigricans. *Wat. Res.*, 32: 5: 1437-1444.
- Othmer, K. (1981). *Encyclopedia of Chemical Technology*. Volume 14. Third Edition, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., New York Chichester Brisbane Toronto.
- Pümpel, T., B. Pernfuß, B. Pigher, L. Diels, and F. Schinner (1995). A rapid screening method for the isolation of metal - accumulating microorganisms. *Journal of industrial Microbiology*, 14: 213-217.
- Puranik, P. R., and K. M Paknikar (1997). Biosorption of lead and zinc from solutions using Streptovercillium cinnamomeum waste biomass. *Journal of Biotechnology*, 55: 113-124.
- Ray, L. S. Paul, D. Bera, and P. Chattopadhyay (2005). Bioaccumulation of Pb(II) from aqueous solution by Bacillus cereus M¹⁶. *Journal for Hazardous Substance Research*, 5: 1- 21.
- Sneath, P., H. A. Mair, S. Nicholas, M. Sharpe, and G. Holt (1986). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD 21202, USA.
- Varnam, A. H., and G. E. Malcolm (2000). *Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Vollesky, B. (2004) *Sorption and biosorption*. (Chapter 6), 103-128. BV Sorbex, Inc., St. Lambert, Quebec.
- WA, C. L., C. Hong, and Lo Waihung (2001). Biosorption of Heavy Metals by Bacteria Isolated from Activated Sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Humana Press, Inc., 91-93: 171-184.