مجله سلامت و بهداشت

دوره چهارم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲، صفحات ۱۱۰ تا ۱۲۱

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به سرب از خاک‌های مناطق نزدیک به جایگاه‌های بنزین در شهرستان جهرم

فرشید کفیل زاده[1*]، راضیه افروغ[2]، نیلوفر موجودی[3]

۱. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران ۲. کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران ۳. کارشناس ارشد، گروه منابع طبیعی، دانشگاه تکنولوژی اصفهان، اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۷۱۱٤۰۷۹۹ فاکس: ۰۷۱۱۶۲۶۲۱۰۲ ایمیل: Kafilzadeh@jia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سرب گسترده‌ترین عنصر سنگین در محیط زیست می‌باشد. تشخیص سویه‌های مقاوم به این فلز سمی، اولین گام در به کارگیری آن‌ها در فرایند پاکسازی زیستی است. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به سرب از خاک‌های نزدیک جایگاه‌های بنزین در شهرستان جهرم و بررسی حذف زیستی سرب به وسیله این باکتری‌ها می باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، ۹ نمونه از خاک‌های اطراف سه جایگاه پمپ بنزین در شهرستان جهرم برداشت گردید. جداسازی باکتری‌های مقاوم از طریق غنی سازی اولیه و سپس کشت بر روی محیط جامد LB broth حاوی استات سرب صورت گرفت. باکتری‌ها بوسیله تست‌های متداول بیوشیمیایی شناسایی گردیدند. تست MIC جهت بدست آوردن حداقل غلظتی از سرب که مانع از رشد باکتری‌ها می‌گردد، صورت گرفت. میزان رشد باکتری‌های مقاوم با کشت باکتری‌ها در غلظت‌های متفاوت از استات سرب در محیط LB broth و استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام گردید.

یافته‌ها: باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس، کورینه باکتریم، استافیلوکوکوس و اشریشیاکولی به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به سرب، به ترتیب ۸۹/۶۶، ۸۷/۹۷، ۸۷/۶٤، ۷۰/۸۲ و ۶۰/۳۵ درصد از سرب را حذف کردند. باسیلوس، سودوموناس و کورینه باکتریم دارای MIC، ۱۲/۵ میلی مول بر لیتر و استافیلوکوکوس و اشریشیا کولی دارای MIC، ۶/۲۵ میلی مول بر لیتر بودند. بیشترین رشد باکتری‌های باسیلوس و کورینه باکتریم در غلظت ۰/۷ گرم بر لیتر استات سرب بود، در صورتی‌که بیشترین رشد باکتری سودوموناس در غلظت ۰/٤ گرم بر لیتر استات سرب صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس و کورینه باکتریم مقاومت بالایی به سرب داشته و گزینه‌های مناسبی در جهت حذف زیستی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: حذف زیستی،آلودگی خاک، فلز سنگین، باسیلوس، سودوموناس، کورینه باکتریم

دریافت: ۹۱/۱۰/۱۸ **پذیرش:** ۹۲/۱/۲۶

مقدمه

فلزات سنگین به عنوان آلاینده‌های مضر در خاک شناخته شده‌اند که بر روی موجودات خاک از جمله میکروارگانیسم‌ها اثر منفی دارند (۱). آلودگی اکوسیستم به‌وسیله فلزات سنگین برای محیط زیست تهدیدی جدی است, زیرا فلزات سنگین مانند آلاینده‌های آلی قابل تجزیه نیستند و در بخش‌های مختلف زنجیره غذایی تجمع می‌یابند (۲). بعضی از فلزات سنگین برای ارگانیسم‌ها به‌عنوان میکرونوترینت (کبالت، کرم، نیکل، آهن، منگنز، روی

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

و غیره) ضروری و مورد نیاز هستند و به عنوان عناصر کمیاب شناخته شده‌اند. از طرف دیگر بعضی از فلـــزات ســـنگین نقـــش بیـــولوژیک ندارند و برای ارگانیســـم‌ها حتـــی در غلظت بســـیار پایین (سرب، کادمیم و جیوه) سمی‌اند. به هر حال در سطوح بالا، هر دو فلزات ضروری و غیر ضروری برای ارگانیسم‌ها سمی می‌باشند. این فلزات سنگین بر روی رشد، مرفولوژی و فعالیت‌های بیوشیمیایی میکروبها تاثیر گذاشته و سرانجام منجر به کاهش بیوماس و تنوع آن‌ها می‌شوند (۳).

باکتری‌ها از جمله فراوانترین ارگانیسم‌هایی هستند که بر روی زمین وجود دارند. در میکروب‌ها مکانیسم‌هایی وجود دارند که فلزات سنگین را به دو روش تحمل می‌کنند. یکی به‌وسیله خارج کردن فلز سنگین از سلول و دیگری استفاده از آن‌ها به عنوان گیرندگان نهایی الکترونی در تنفس بی‌هوازی. بیشترین مکانیسم مطالعه شده شامل جریان یون‌های فلزی به خارج از سلول است و ژن‌های مربوط به مکانیسم‌های تحمل، هم بر روی کروموزوم‌ها و هم بر روی پلاسمیدها یافت شده‌اند. باکتری‌هایی از قبیل باسیلوس‌ها و سودوموناس‌ها از این مکانیسم‌ها بهره می‌گیرند (٤).

سرب به عنوان یکی از مضرترین فلزات سنگین در میان آلاینده‌های محیطی شناخته شده است. سرب در بدن انسان اثرات ناخواسته ای را به دنبال دارد که عبارتند از: اختلال بیوسنتز هموگلوبین و کم خونی، افزایش فشارخون، آسیب کلیه، سقط جنین و نارسی نوزاد، اختلال سیستم عصبی، آسیب مغز، ناباروری مرد و آسیب اسپرم، کاهش قدرت یادگیری و اختلالات رفتاری مانند پرخاشگری در بچه‌ها. سرب از راه جفت وارد بدن جنین شده، به همین علت باعث آسیب جدی به سیستم عصبی و مغز جنین می‌شود. منابع اولیه آلودگی سرب عبارتند از: فعالیت معادن سرب، سوزاندن زباله‌های حاوی این فلز سنگین، باطری‌های مصرفی که سرب یکی از مواد اصلی سازنده آن‌ها می‌باشد و همچنین فرآورده‌های تولید کننده سرب. سمیت و دسترسی زیستی سرب به pH خاک، پتانسیل اکسید- احیا و ترکیبات سرب وابسته است. ترکیبات سرب در خاک به‌طور عمده به شکل ترکیب با کربن، پیوند اکسیدی با mn/Fe و فازهای رسوبی و محلول یافت می‌شوند. مطالعات مربوط به حذف بیولوژیکی این فلز سنگین از دهه ۱۹۲۰ یعنی زمان بکارگیری این فلز در بنزین آغاز شد. در سال ۱۹۷۰ دفع سرب از وسایل نقلیه حدود ۸۰ درصد از کل سرب دفع شده، گزارش گردید. از آن پس تاکنون تحقیقات گسترده‌ای بر روی مقاومت به سرب در باکتری‌های جدا شده از محیط‌های طبیعی صورت گرفت (۵). در تحقیق اسمجکاوولا[1] و همکاران و اشرف[2] و همکاران، حذف زیستی سرب توسط باکتری‌های مقاوم بررسی شد (۲،۶). آفان[3] و همکاران، باکتری‌های مقاومی را در برابر غلظت‌های بالای سرب شناسایی کردند (٤). شروتی[4] و همکاران ۶۰ باکتری مقاوم به سرب را جداسازی و شناسایی کردند و بر اساس آزمون کمترین غلظت بازدارنده رشد یا MIC، ۶ ایزوله را به عنوان توانمندترین گونه‌ها در برابر سرب معرفی کردند (۷). تاکنون جذب سرب در گونه‌های بسیاری گزارش شده است از جمله باسیلوس سابتیلیس (۸)، ساکرومیسس سرویسیا (۹)، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس پومالیس (۱۰)، باسیلوس سرئوس (۱۱) و کلبسیلا پنومونیا (۱۲). از بین منابع مختلف آلاینده خاک، ذرات سرب خارج شده از اگزوز وسایل نقلیه بنزین سوز اهمیت ویژه‌ای دارند. بسیاری از مطالعات به اثبات رسانده‌اند که غلظت سرب در هوا، خاک و گیاهان موجود در اطراف خیابان‌ها و بزرگراه‌ها افزایش می‌یابد و در مقابل، غلظت سرب با فاصله گرفتن از خیابان‌ها و بزرگراه‌ها سریعاً کاهش یافته و

[1] Smejkalova
[2] Ashraf
[3] Affan
[4] Shruti

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

همچنین در خاک‌ها با افزایش عمق، مقدار این فلز نیز کاهش می‌یابد (۱۳). با توجه به سمی بودن سرب و تاثیر بر روی سلامتی انسان شناسایی باکتری‌های مقاوم و حذف کننده این فلز دارای اهمیت می‌باشد. در این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلز سمی سرب و بررسی امکان استفاده از این سویه‌های مقاوم در حذف زیستی این آلاینده در خاک‌های اطراف مناطق پمپ بنزین در شهرستان جهرم صورت گرفت.

روش کار

نمونه‌برداری

در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، نمونه‌های خاک از عمق ۱۰-۰ سانتی‌متری از سطح زمین، از ۳ جایگاه متفاوت (از هر جایگاه ۳ تکرار، در مجموع ۹ نمونه) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها جهت کشت میکروبی در ظروف پلاستیکی استریل و در مجاورت یخ قرار گرفت و حداکثر ۲ ساعت پس از نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل شدند (۱٤).

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به سرب

جداسازی باکتری‌های مقاوم به سرب از طریق غنی‌سازی اولیه و کشت در محیط جامد صورت گرفت. در غنی‌سازی اولیه، ابتدا ۵ گرم از هر نمونه به ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت Luria-Bertani broth (ساخت شرکت Merck آلمان) واجد ۰/٤ گرم بر لیتر استات سرب اضافه گردید و محیط‌های کشت به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط حاوی باکتری‌های رشد کرده، در محیط کشت LB agar به‌صورت سطحی کشت و گرمخانه‌گذاری گردید. سپس از کلنی‌های تشکیل شده کشت خالص تهیه گردید (٤).

شناسایی باکتری‌های خالص شده با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های معمول بیوشیمیایی (واکنش کاتالاز و اکسیداز، تولید اسید از گلوکز، OF و غیره) مطابق با کتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology صورت گرفت (۳).

تست MIC

این تست جهت به‌دست‌آوردن حداقل غلظتی از فلز سرب که مانع از رشد باکتری‌ها می‌گردد، انجام شد. بدین منظور، سوسپانسیون باکتریایی معادل با استاندارد نیم مک فارلند تهیه و مقدار ml ۰/۱ از آن به محیط LB broth حاوی غلظت‌های مختلف فلز (۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۶/۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مول بر لیتر استات سرب) تلقیح شد. پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، آخرین غلظتی از فلز که مانع رشد میکروبی گردیده بود، به‌عنوان کمترین غلظت بازدارنده رشد یا MIC محسوب گردید (۱۵).

ارزیابی میزان رشد باکتری‌های مقاوم جدا شده

ابتدا غلظتی معادل استاندارد نیم مک فارلند از رشد باکتری‌ها در محیط LB broth تهیه و ml ۱ از این غلظت به محیط‌های مربوطه اضافه گردید. منحنی رشد این باکتری‌ها در سه حالت مورد بررسی قرار گرفت: حالت اول: کشت باکتری‌ها در محیط LB broth فاقد استات سرب (کنترل)، حالت دوم: کشت باکتری‌ها در محیط LB broth حاوی غلظت‌های متفاوت از استات سرب (۰/۲، ۰/٤ و ۰/۷ گرم بر لیتر) و حالت سوم: اضافه کردن استات سرب از نیمه فاز رشد لگاریتمی باکتری‌ها. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نوری این باکتری‌ها در فواصل زمانی معین به مدت ۱۲ ساعت در سه حالت ذکرشده ثبت شد و منحنی رشد باکتری‌ها ترسیم گردید (۱۶).

اندازه گیری میزان حذف زیستی سرب

پیش از اندازه‌گیری میزان حذف سرب توسط باکتری‌های مقاوم، نمونه‌های باکتریایی آماده‌سازی گردیدند. باکتری‌ها در محیط LB broth حاوی ۰/٤g.lit^{-1} استات سرب، کشت داده شدند و به مدت

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

۲٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از گرمخانه‌گذاری، محیط‌های حاوی باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و توده سلولی کاملاً از مایع رویی[1] جدا گردید. توده سلولی به‌دست آمده با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس توده خشک بدست آمده با ۰/۵ ml اسید نیتریک هضم گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس حجم آن با آب مقطر به ۵ ml رسانده شد. مایع شفاف نیز با فیلتر واتمن ٤۲ میکرومتری صاف گردید (۱۶). در پایان میزان حذف سرب به وسیله دستگاه طیف‌سنجی جذب اتمی[2] و با روش نشر شعله‌ای اندازه‌گیری گردید (۱۷).

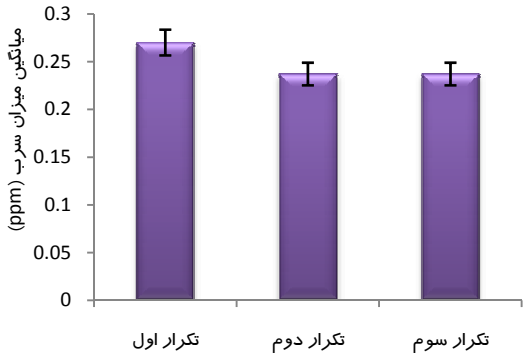
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج آماری بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس[3] و دانکن[4] صورت گرفت و مرز معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته ها

شمارش باکتری‌ها

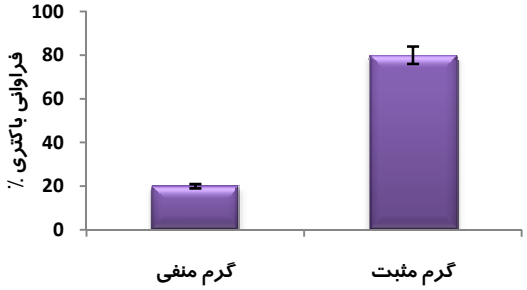
میانگین لگاریتمی تعداد باکتری‌ها (CFU/ml) در محیط کشت حاوی سرب، ۲/۸٤٤ در مقایسه با میانگین لگاریتمی تعداد باکتری‌ها در محیط کشت کنترل ۶/۶۰۵، کمتر بود. بین میانگین لگاریتمی تعداد باکتری‌ها در محیط بدون سرب و محیط حاوی سرب، در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < ۰/۰۵$) (نمودار۱).



نمودار ۱. مقایسه نمونه‌ها از نظر میزان آلودگی به سرب

باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس، کورینه باکتریم، استافیلوکوکوس و اشریشیا کولی به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به سرب، جدا سازی و شناسایی گردیدند.

درصد فراوانی باکتری‌های گرم مثبت شناسایی شده بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود و تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد داشتند ($p<۰/۰۵$). بر این اساس ۸۰ درصد باکتری‌های مقاوم جداشده گرم مثبت و ۲۰ درصد باکتری‌ها گرم منفی بودند (نمودار۲).

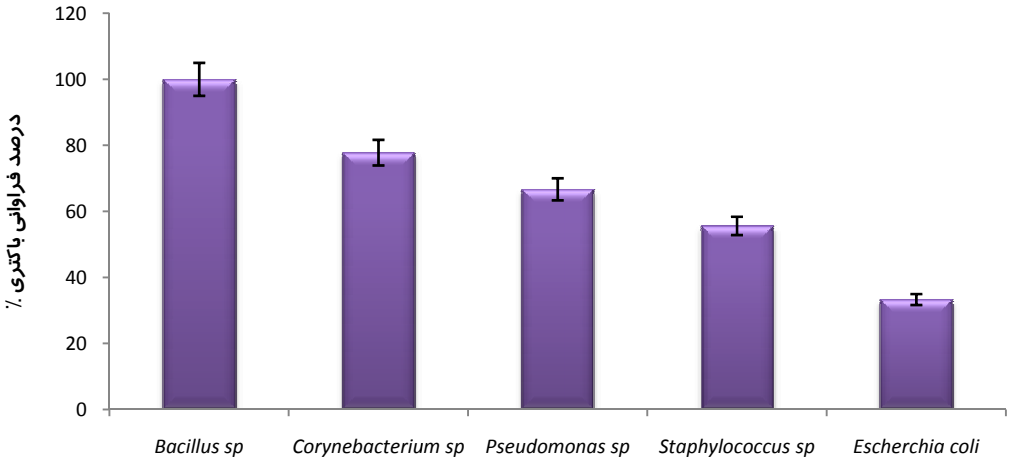


نمودار۲. درصد فراوانی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موجود در ایستگاه‌های مورد بررسی

بیشترین درصد فراوانی مربوط به باسیلوس (۱۰۰٪) و کمترین درصد فراوانی مربوط به اشریشیا کولی (۳۳٪) به دست آمد (نمودار۳).

[1] Supernatant
[2] Atomic Absorption Spectroscopy
[3] ANOVA
[4] DUNCAN

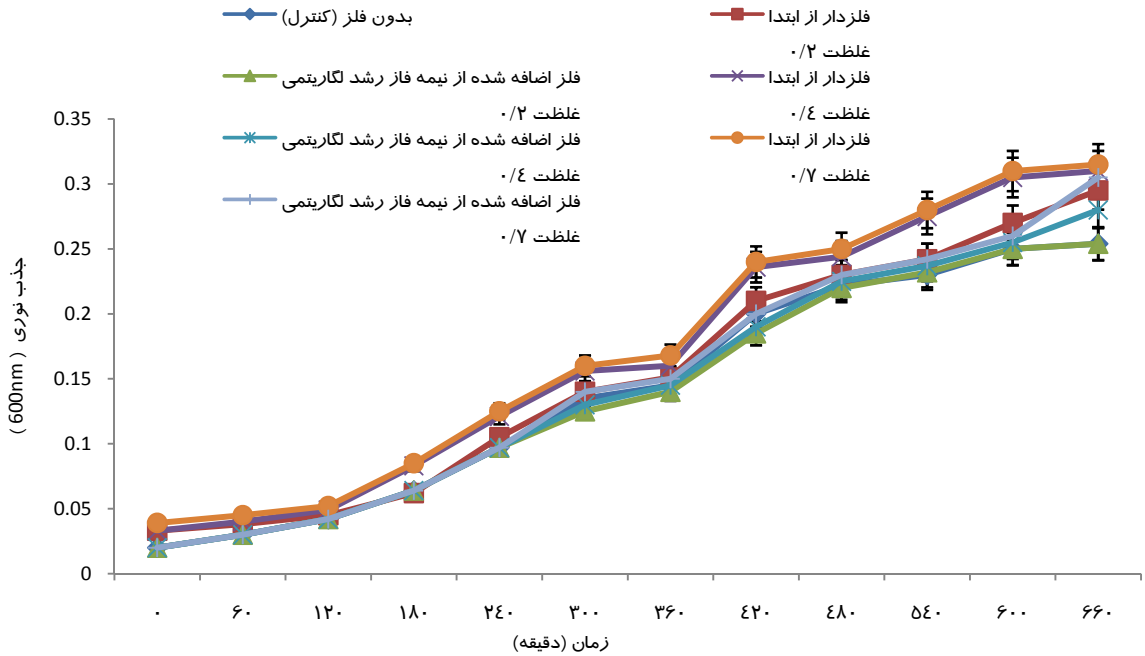
[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]



نمودار ۳. درصد فراوانی جنس‌های باکتریایی جدا شده از ایستگاه‌های مختلف

باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس و کورینه باکتریم دارای MIC برابر با ۱۲/۵ $mmol.lit^{-1}$ از استات سرب و دو باکتری اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس دارای MIC برابر با ۶/۲۵ $mmol.lit^{-1}$ از استات سرب بودند.

منحنی رشد این باکتری‌ها نشان داد که باکتری‌های باسیلوس و کورینه باکتریوم در غلظت ۰/۷ $g.lit^{-1}$ استات سرب حداکثر رشد را نسبت به غلظت‌های ۰/۲ و ۰/٤ گرم بر لیتر داشتند (نمودار٤ و ۶).



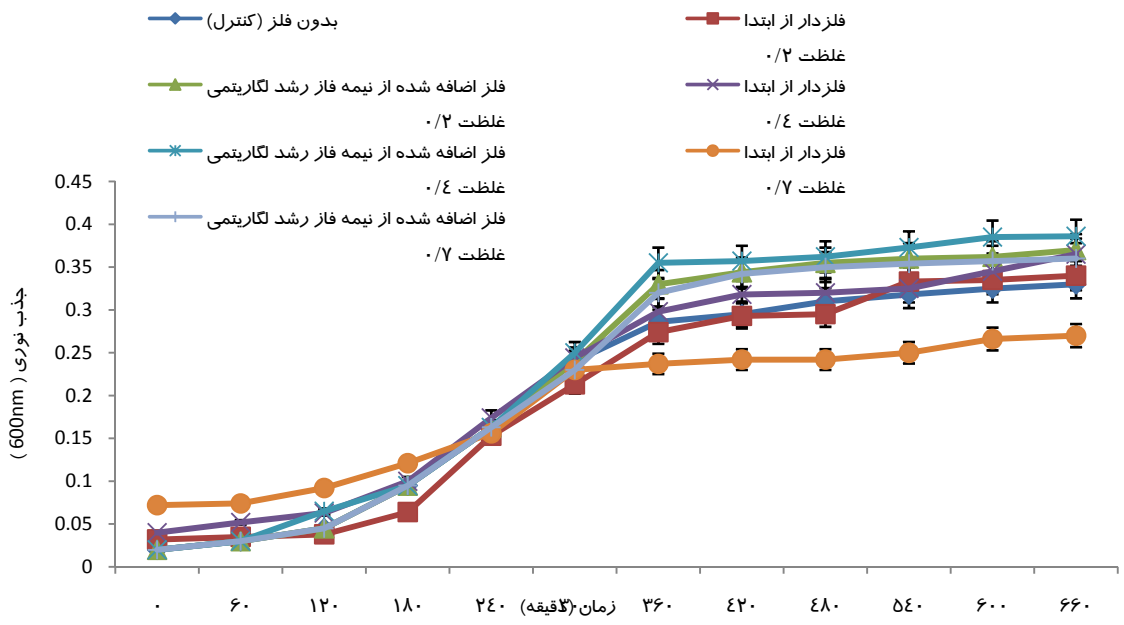
***Bacillus* sp نمودار ٤. منحنی رشد باکتری**

باکتری سودوموناس در غلظت ۰/٤ $g.lit^{-1}$ نسبت به دو غلظت دیگر رشد بهتری از خود نشان داد (نمودار ۵).

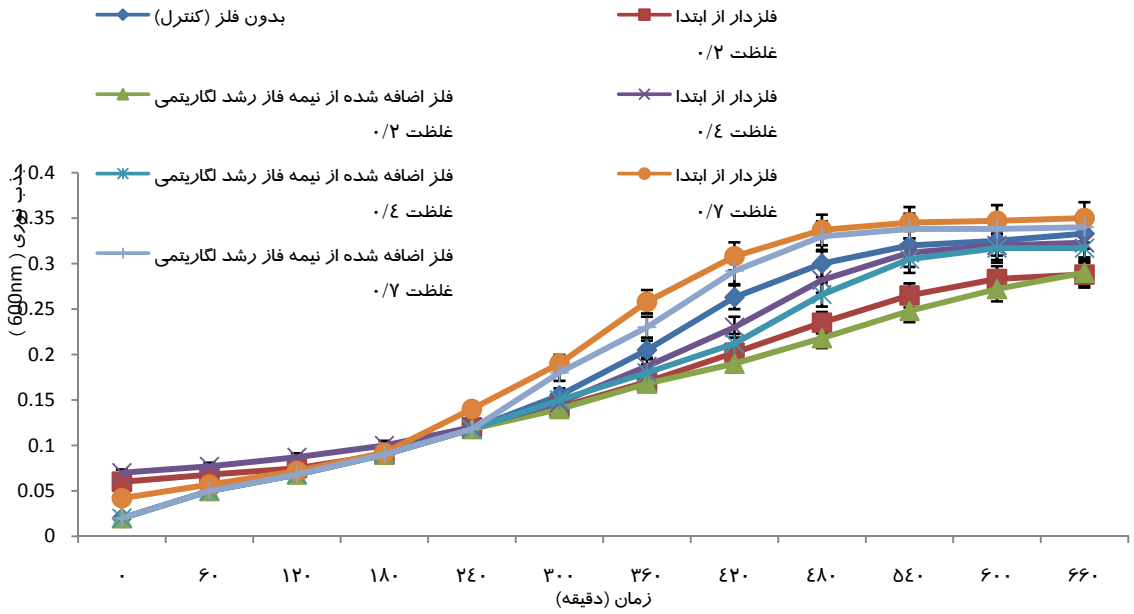
باکتری‌های استافیلوکوکوس و اشرشیا کولی نسبت به باکتری‌های ذکر شده در حضور غلظت ۰/٤ $g.lit^{-1}$ استات سرب رشد کمتری را نشان دادند

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

(نمودار۷و۸). نتایج حاصل از آنالیز طیف سنجی جذب اتمی نشان داد که درصد حذف فلز سرب در باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس، کورینه باکتریم، استافیلوکوکوس و اشریشیا کولی به ترتیب ۸۹/۶۶ ٪، ۸۷/۹۷٪، ۸۷/۶۴ ٪، ۷۰/۸۲ ٪ و ۶۲/۳۵ ٪ می‌باشد (جدول۱).

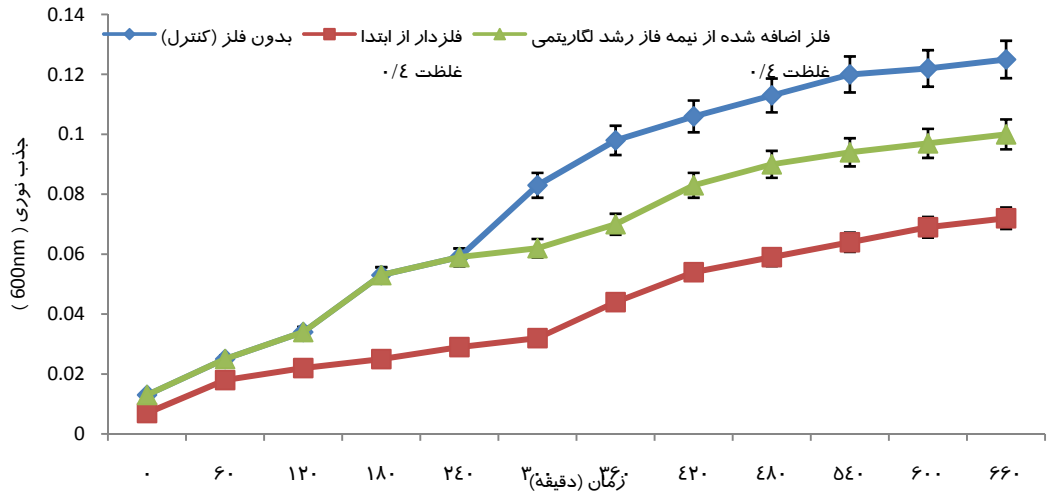


نمودار ۵. منحنی رشد باکتری *Pseudomonas* sp

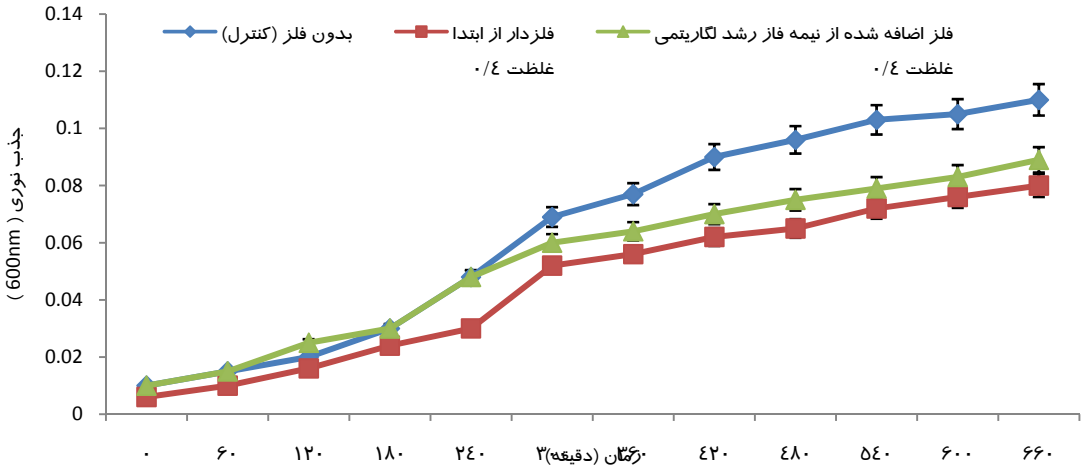


نمودار ۶. منحنی رشد باکتری *Corynebacterium* sp

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]



نمودار ۷. منحنی رشد باکتری *Staphylococcus* sp



نمودار ۸. منحنی رشد باکتری *Escherchia coli*

جدول۱. توانایی حذف سرب توسط باکتری‌های مقاوم جدا شده

باکتری	مقدار سرب اضافه شده g/lit ازابتدا	توده سلول g	کل سرب متصل به توده سلولی g/lit	مقدار سرب باقیمانده g/lit	میزان حذف g/lit	درصد حذف ٪
باسیلوس	۰/٤	۹۹۰/۲	۰/۰۱۶	۰/۰۲٤٤	۰/۳۵۸	۸۹/۶۶
سودوموناس	۰/٤	۹۳۰/۲	۰/۰۲۳۷	۰/۰۲٤۳	۰/۳۵۱	۸۷/۹۷
کورینه باکتریوم	۰/٤	۹۰۰/۲	۰/۰۲٤۸	۰/۰۲٤۵	۰/۳۵۰	۸۷/۶٤
استافیلوکوکوس	۰/٤	٤۳۰/۲	۰/۰۵۳۵	۰/۰۶۳۲	۰/۲۸۳	۷۰/۸۲
اشرشیا کلی	۰/٤	۱۶۰/۲	۰/۰۷۸۱	۰/۰۷۲۵	۰/۲٤۹	۶۲/۳۵
کنترل	۰/٤	-	-	۰/۳۷	۰/۰۳	۷/۵۰

بحث

راتنایاک[1] و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر غلظت‌های متفاوت از فلز سنگین سرب را بر روی رشد دو باکتری باسیلوس ترینجینسیس[2] و پنی باسیلوس[3] مورد بررسی قرار دادند. باکتری‌های ذکر شده در

[1] Rathnayak

[2] *Bacillus thuringeinsis*
[3] *Paenibacillus*

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

غلظت‌های بالاتر سرب نسبت به غلظت‌های پایین‌تر رشد بهتری از خود نشان دادند (۳). در بررسی حاضر نیز باکتری مقاوم باسیلوس در غلظت‌های بالاتر از استات سرب رشد بهتری را نشان داد. رشد این باکتری با افزودن سرب به محیط کشت از نیمه فاز رشد لگاریتمی، پس از یک وقفه کوتاه به طور ناگهانی افزایش می‌یابد که این امر نشان‌دهنده توانایی این باکتری در حذف سرب موجود در محیط کشت می‌باشد. به‌نظر می‌رسد تماس مداوم با سرب در محیط و بکارگیری روش غنی‌سازی، این باکتری را با شرایط استرس‌زایی ناشی از وجود ماده سمی، سازگار و آن را به باکتری فلزدوست تبدیل کرده است، به نحوی که حضور سرب موجب افزایش بیان ژن‌های مقاومت به سرب و تحریک رشد این باکتری می‌گردد (۱۸). یک استرس ناگهانی (افزوده شدن سرب در نیمه فاز رشد لگاریتمی) منجر به ایجاد یک وقفه کوتاه در رشد کلیه باکتری‌ها گردید و سپس به سرعت باکتری‌ها خود را با شرایط جدید وفق دادند. زی[1] و همکاران نیز اثر غلظت‌های متفاوت از سرب را بر روی رشد سویه‌های مقاوم باکتری‌ها مورد بررسی قرار دادند که نشان داد غلظت‌های سمی سرب تاثیر کمی بر منحنی رشد باکتری‌های مقاوم به سرب دارد و این تاثیر بیشتر در باکتری‌های حساس به سرب نمود پیدا می‌کند (۱۹). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان داد که باکتری‌هایی که رشد بالایی در حضور این فلز ندارند، مقاوم به سرب نمی‌باشند و تنها اثرات سمی سرب را تحمل می‌کنند. در تحقیق حاضر تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی سرب کمتر از تعداد باکتری‌ها در محیط کشت کنترل (بدون سرب) بود. در تحقیق اسمجکاوولا[2] و همکاران نیز تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی سرب بسیار کمتر از تعداد باکتری در محیط کشت کنترل بدست آمد (۶). وجود سرب در محیط کشت سبب توقف رشد و مرگ باکتری‌ها می‌شود. به همین دلیل تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی سرب کمتر از محیط کشت کنترل می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط ژانگ[3] و همکاران صورت گرفت، مشاهده شد که سوش‌های تحمل‌کننده سرب در خاک‌های حاوی این فلز نسبت به خاک‌های بدون سرب افزایش یافته است (۱۸). فاکتورهای محیطی بسیاری می‌تواند بر فراوانی و در دسترس بودن خیلی از فلزات اثر بگذارد و غلظت‌های موثر آن‌ها را در مکان‌های متفاوت تغییر دهد. برای زنده ماندن، میکروارگانیسم‌ها باید به‌گونه‌ای ثابت محیط خود را کنترل کرده و اثر فلزات را در داخل سیتوپلاسم خود کنترل کنند. بنابراین آن‌ها می‌توانند مقادیر کافی از فلزات ضروری را کسب نمایند و از تجمع مقادیر سمی اجتناب کنند. این واکنش خود شامل بروز سیستم‌های جذب با همبستگی بالا، بروز ژن‌هایی که فلزات اضافی را خارج می‌کنند و همچنین پروتئین‌های جذب کننده فلز می‌باشند (۲۰).

در تحقیق حاضر باکتری‌های مقاوم با روش غنی‌سازی اولیه در حضور ۰/٤ گرم بر لیتر استات سرب جداسازی گردیدند. باکتری‌های جداسازی شده با روش غنی‌سازی، در مراحل بعد در حضور سرب، رشد بهتر، مقاومت بیشتر و توانایی بالاتری در حذف سرب از محیط کشت نشان دادند. آفان و همکاران با غنی‌سازی اولیه باکتری‌ها در محیط LB broth حاوی سرب، باکتری‌های مقاومی را جداسازی کردند که توانایی مقاومت در برابر غلظت‌های بالای سرب را داشتند (٤).

در مطالعه جاری باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مختلفی به عنوان باکتری‌های مقاوم به سرب شناسایی شدند. درصد فراوانی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود. اشرف و همکاران مقاومت به فلز سنگین سرب را در جنس‌های باسیلوس، سودوموناس، کورینه‌باکتریوم و

[1] Xie
[2] Smejkalova
[3] Zhang

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

استافیلوکوکوس گزارش کردند (۲). در مطالعه حاضر نیز تمام جنس‌های باکتریایی ذکر شده به عنوان باکتری‌های مقاوم به سرب شناسایی شدند.

ویزکوفسکا[1] و همکاران نیز جنس‌های سودوموناس و آرتروباکتر مقاوم به سرب را جداسازی و شناسایی کردند (۲۱).

در تحقیقی که توسط لوگاسکاس[2] و همکاران انجام شد، باسیلوس‌ها به‌عنوان فراوان‌ترین باکتری‌های گرم مثبت در خاک شناسایی شدند و به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به سرب معرفی گردیدند (۱). در تحقیق جاری جنس باسیلوس نه تنها از تمامی ایستگاه‌ها جدا شد، بلکه به عنوان یکی از مقاوم‌ترین باکتری‌ها به سرب شناسایی شد. باکتری‌های مقاوم به سرب با مشارکت یک پروتئین انتقال دهنده و یک فسفاتاز می‌توانند در مناطق آلوده به این فلز سنگین بقا یابند. باسیلوس‌ها یون‌های سرب را به‌وسیله رسوب این فلز سنگین به‌عنوان یک نمک فسفات، تحمل می‌کنند. جنس سودوموناس نیز سمیت سرب را به‌وسیله تولید پلیمر خارج سلولی از این فلز خنثی می‌کند (۲۰).

در مطالعه آموزگار و همکاران، از میان ۲٤ سویه جداشده از مناطق نمکی ایران، ۳ سویه پس از آزمایش‌های MIC مقاومت چشمگیرتری را به سرب نشان دادند. به طوری که این سویه‌ها قادر به رشد تا غلظت ۵ میلی مولار سرب بودند. همچنین یکی از این سویه‌ها توانست پس از ٤۸ ساعت حدود ۹۱ درصد از سرب را حذف کند (۱۵). در مطالعه حاضر مقاوم‌ترین باکتری‌ها دارای MIC برابر با ۱۲/۵ میلی‌مولار از استات سرب بودند.

لوگاسکاس و همکاران درصد حذف فلز سنگین سرب را توسط باکتری‌های مقاوم جدا شده مورد بررسی قرار دادند که نشان‌دهنده رابطه مستقیم میان افزایش آلودگی سرب در محیط و افزایش درصد حذف سرب توسط باکتری‌های مقاوم جدا شده است (۱). در تحقیق اسمجکاوولا و همکاران (۶) و احمد و همکاران (۲۲) نیز میزان حذف سرب توسط باکتری‌های مقاوم به این فلز اندازه‌گیری شد و مشخص گردید که باکتری‌های مقاوم توانایی بالایی در حذف این فلز سمی از محیط کشت دارند. در مطالعه‌ای دیگر جایسانکار[3] و همکاران، باکتری‌های آلکالیجنز، باسیلوس، سودوموناس و برووباکتریوم را جهت حذف تعدادی فلز سنگین از جمله سرب مورد مطالعه قرار دادند. این باکتری‌ها ۹۸ درصد سرب را طی ۹۶ ساعت جذب کردند. این مطالعه، پتانسیل بالای این باکتری‌ها را جهت جذب زیستی سرب نشان داد (۲۳). آموزگار و همکاران میزان حذف سرب توسط سویه مقاوم جدا شده را ۹۰/۷۱٪ گزارش کردند (۱۵). در تحقیق حاضر نیز میزان حذف سرب توسط باکتری‌های مقاوم حدود ۹۰٪ به دست آمد.

میکروارگانیسم‌ها برای زنده ماندن، باید به‌گونه‌ای ثابت محیط خود را کنترل کرده و اثر فلزات را در داخل سیتوپلاسم خود کنترل کنند. بنابراین آن‌ها می‌توانند مقادیر کافی از فلزات ضروری را کسب نمایند و از تجمع مقادیر سمی اجتناب کنند. این واکنش خود شامل بروز سیستم‌های جذب با همبستگی بالا، بروز ژن‌هایی که فلزات اضافی را خارج می‌کنند و پروتئین‌های جذب‌کننده فلز می‌باشند (۲۰).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری‌های جداشده از خاک‌های نزدیک به پمپ بنزین‌ها، از پتانسیل بالایی در حذف این فلز سنگین برخوردار می‌باشند. باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس و کورینه باکتریم به عنوان مستعدترین باکتری‌ها و بعد از آن‌ها باکتری‌های استافیلوکوکوس و اشریشیا کولی

[1] Wyszkowska
[2] Lugauskas
[3] Jaysankar

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

در درجه دوم از نظر اهمیت حذف سرب جداسازی و شناسایی شدند. بنابراین می‌توان با فراهم نمودن شرایط و بستر مناسب جهت رشد باکتری‌های مذکور، از آنها برای سمیت‌زدایی و حذف این فلز سنگین از محیط زیست استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به‌دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می‌دارند .

References

1- Lugaskas A, Levinskaite L, Peeiulyte D, Repeekiene J, Motuzas A, Vaisvalavieius R, Prosyeevas I. Effect of copper, zinc and lead acetates on microorganisms in soil. Ekologija. 2005; 1: 61-69.
2- Ashraf R, Ali TA. Effect of heavy metals on soil microbial community and mung beans seed germination. Pak J Bot. 2007; 39(2): 629-36.
3- Rathnayak IVN , Megharaj M , Bolan N, Naidu R. Tolerence of heavy metals by gram positive soil bacteria. World Acad Sci Eng Technol. 2009; 29: 1179--1183.
4- Affan Q, Shoeb E , Badar U, Akhtar J. Isolation and characterization of bacterial isolates having heavy metal tolerance. J Basic Appl Sci. 2009; 5(2): 55-60.
5- Huang DL, Zeng GM, Jiang XY, Feng CL,Yu HY, Huang GH, Liu HL. Bioremediation of Pb-contaminated soil by incubating with Phanerochaete chrysosporium and straw. J Hazard Mater. 2006; 134(1-3): 268-276.
6- Smejkalova M, Mikanova O, Boruvka L. Effects of heavy metal concentration on biological activity of soil micro-organisms. Plant Soil Environ. 2003; 49(7): 321-326.
7- Shruti M, Geetha B, Sarangi SK. Lead biosorption by a bacterium isolated from industrial effluents. Int J Microbiol Res. 2012; 4(3) :196-200.
8-Malik A. Metal bioremediation through gowing cells. Environ Int. 2004; 30(2): 261-278.
9-Strandberg GW, Shumate SE, Parrot JR. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by Saccharomyces cerevisiae and Pseudomonas aeruginosa. appl Environ Microbiol. 1981; 41(1): 237-245.
10- Chang JS, Law R, Chang CC. Biosorption of lead,Copper and Cadmium by biomass of Pseudomonas aeruginosa PU21.Water Res.1997. 31(7) :1651-1658.
11-Selenska-Pobell S, Panak P, Miteva V, Boudakov I, Bernhard, G, Nitsche H. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous Bacillus strains, B.cereus, B.megaterium and B.sphaericus, from drain waters of a uranium waste pile, FEMS Microbial Ecol.1999; 29(1): 59-67.
12- Garni SMA. Biosorption of lead by gram-ve capsulated and noncapsulated bacteria. Water SA. 2005. 31:345-350.
13- Juracek KE, Ziegler AC. The legacy of leaded gasoline in bottom sediment of small rural reservoirs. J Environ Qual. 2006; 35: 2092-2102.
14- Aksornchu P, Prasertsan P, Sobhon V. Isolation of arsenic- tolerant bacteria from arsenic-contaminated soil. Songklanakarin J Sci Technol. 2008; 30(1): 95-102.
15- Amoozegar MA, Ghazanfari N, Didari M. Lead and cadmium bioremoval by moderately halophlic bacterium. J Environ Sci Technol. 2009; 11(4): 479-491. (In Persian).
16- Nies DH. Microbial heavy metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol. 1999; 51(6): 730-750.
17- Lovely DR, Coates JD. Bioremediation of metal contamination. Curr Opin Biotechnol. 1997; 8(3): 285-289.
18- Zhang HB, Yang MX, Shi W, Zheng Y, Sha T, Zhao ZW. Bacterial diversity in mine tailings compared by cultivation and cultivation-independent methods and their resistance to lead and cadmium. Microb Ecol. 2007; 54(4): 705-712.
19- Xie X, Fu J,Wang H, Liu J. Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China. Afr J Biotechnol. 2010; 9(26): 4056-4066.

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

20- Hynninen A, Touze T, Pitkanen L, Mengin-Lecreulx D, Virta M. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. Mol Microbiol. 2009; 74(2): 384-394.
21- Wyszkowska J, Kucharski J, Borowik A, Boros E. Response of bacteria to soil contamination with heavy metals. J. Elementol. 2008; 13(3): 443-453.
22- Ahmad I, Hayat S. Ahmad A, Inam A. Samiul LAH. Effect of heavy meal on survival of certain groups of indigenous soil microbial population. J. Appl. Sci. Environ. Mgt. 2005; 9 (1): 115-121.
23- Jaysankar D, Ramaiah N. Vardanyan L. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. Mar Biotechnol. 2008; 10(4): 471-477.

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]

Isolation and Identification of Lead Resistant Bacteria from Contaminated Soils Near Gas Stations in Jahrom City

Kafilzadeh F *[1], Afrough R[2], Mojoodi N[3]

1. Associate professor, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
2. MSc, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
3. MSc, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

**** Corresponding Author.*** Tel: +989171140799 Fax: +987116262102 E-mail: Kafilzadeh@jia.ac.ir

Received: 7 Jan 2013 Accepted: 14 Apr 2013

ABSTRACT

Background & Objectives: Lead is one of the most widespread heavy metals in the environment. Identifying resistant strains to this toxic is the first step for their application in bioremediation process. The aims of this study were to isolate and identify lead resistant bacteria from contaminated soils near gas stations in Jahrom city and to evaluate lead bioremoval by these bacteria.

Methods: In this experimental study, 9 samples were taken from soils around 3 gas stations in Jahrom city. Isolation of resistant bacteria was performed through primary enrichment and then cultivation on LB broth solid medium containing lead acetate. Bacteria were identified by usual biochemical tests. MIC test was done to obtain the minimum concentration of lead that prevents bacterial growth. Growth rate of resistant bacteria at different concentrations of lead acetate in LB broth was evaluated using spectrophotometer at 600 nm.

Results: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebactereium*, *Staphylococcu*s, and *Escherichiacoli* as lead resistant bacteria eliminated 89.66, 87.97, 87.64, 70.82, and 60.35% of lead, respectively. MIC was 12.5 mmol per liter for *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Corynebactereium*and6.25 mmol per liter for *Staphylococcusand Escherichia coli*. The highest growth of *Bacillus* and *Corynobacterium* was observedat 0.7 g lead acetate per liter while for *Pseudomonas* it was occurredat 0.4 g lead acetate per liter.

Conclusion: Results of current study showed that *Bacillus*, *Pseudomonas,* and *Corynebacterium*have high resistance to lead and they are appropriate options for lead bioremediation.

Keywords: Bioremediation; Soil Contamination; Heavy Metal, *Bacillus, Pseudomonas, Corynebacterium.*

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2024-12-29]