معرفی باکتری های کاهنده آلاینده های فلزی (آهن ، نیکل) در خور موسی

محمود رامین[۱]*، مسطوره دوستدار[۱]

* ifro-mrifro@yahoo.com

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۳

چکیده

به منظور جداسازی سویه های باکتریایی مقاوم به فلز آهن و نیکل، نمونه رسوبات از پنج ایستگاه در خور موسی بر روی محیط کشت BHI agar واجد ۱۰۰۰ ppm آهن و ۵۰ ppm نیکل کشت داده شد .توانایی تحمل پذیری سویه‌های جدا شده به فلز آهن در محیط BHI با توالی غلظت ۱۵۰۰۰ ppm-۱۰۰۰ وفلز نیکل با توالی غلظت ۲۵۰۰۰ppm-۱۰۰ ارزیابی گردید و مقاومترین سویه ها گزینش و حداقل غلظت فلزی مهارکننده رشد(MIC) و حداقل غلظت فلزی کشنده (MBC) سویه‌های منتخب بررسی گردیدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از میان ۱۶ سویه جدا شده مقاوم به نیکل و ۱۲ سویه مقاوم به آهن، ۲ سویه منتخب۱۶، باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis*) وسویه منتخب ۷ میکروکوکوس (*Micrococcus* sp.) به ترتیب دارای حداقل غلظت فلزی مهار کننده رشد (MIC) وحداقل غلظت فلزی کشنده (MBC) با مقادیر (۲۹۸۰۰ppm، ۲۹۷۰۰) و (۲۶۵۰۰ppm، ۲۶۳۰۰) به نیکل ارزیابی شد. حداقل غلظت فلزی مهار کننده رشد (MIC) آهن قابل بررسی نبود. نتایج نشان داد که بیشترین میزان کاهش نیکل توسط سلول زنده باسیلوس سابتیلیس در محیط دارای ۱۹۴ ppm و ۷۱ppm نیکل پس از۷۲ ساعت به ترتیب ۱۶/۷ و ۶۳ درصد و در مورد میکروکوکوس (*Micrococcus* sp.) در محیط دارای ppm ۱۵۸ پس از ۵۰ ساعت ۸/۴ درصد است و بیومس مرده با سیلوس سابتیلیس پس از ۲ ساعت در محلول حاوی ۵۹ ppm نیکل قادر به کاهش ۴۰/۶ درصد نیکل و در محلول حاوی ۴۶ppm و ۷۹۲ppm آهن به ترتیب قادر به کاهش۲۱ درصد و ۴ ۴ درصد آهن است. نتایج آنالیز مولکولی نشان داد، باکتری باسیلوس سابتیلیس جدا شده در این تحقیق با توانایی حذف نیکل و آهن کاندیدای مناسبی جهت استفاده در محیط های آبی می باشد.

لغات کلیدی: باسیلوس سابتیلیس، میکرو کوکوس ، آهن، نیکل، خور موسی.

*نویسنده‌مسئول

مقدمه

در چند دهه گذشته ورود آلاینده های فلزی با منشاء انسانی به محیطهای دریایی، به مقدار زیادی افزایش یافته است که خطری جدی برای حیات محیط های آبی بشمار می آیند (Hussein *et al*., 2005).

میزان ورودین فلزات به محیط زیست، متجاوز از میزانی است که بوسیله فرایندهای طبیعی برداشت می شوند. بنابراین تجمع فلزات سنگین در محیط زیست مورد توجه می باشد (Matagi *et al*., 1998).

مهمترین مشکل زیست محیطی حاصل از این ترکیبات، انباشته شدن آنها در زنجیره غذایی است (Malekzadeh *et al*., 1999). نیکل از فلزات سنگین سمی و تجزیه ناپذیر است. نیکل ۲ ظرفیتی به طور عمده ازصنعت رنگ، فرآوری مواد معدنی، صنعت هیدرمتالوژیکی، چرم و باطری سازی به محیط زیست آزاد می شود. تجمع نیکل ۲ در سلول های زنده به علت تجزیه ناپذیری طبیعی آن است (Lata & Garg, 2008).

نیکل می‌تواند باعث سرطان ریه و استخوان، سرگیجه و بیماری‌های مختلف در انسان شود (Padiyan & Daharmedrikumer, 2011).

آهن برای تمامی اشکال حیات مورد نیاز است.اهمیت آهن بویژه در رابطه با فرآیند های بیوشیمیایی است. به دلیل توانایی آهن به عنوان گیرنده و دهنده نقش مهمی را در فرآیندهای متابولیکی بسیاری از موجودات دارد.

آهن در غلطت های بسیار بالاسمی است.اگر آهن آزاد داخل سلول قرار گیرد تبدیل پراکسید هیدروژن به رادیکال آزاد را کاتالیز می‌کند. رادیکال های آزاد می‌توانند باعث آسیب به طیف گسترده ای از ساختار سلولی و در نهایت مرگ سلول شوند (Phippen *et al*., 2008).

در سال‌های اخیر دستاوردهای بیوتکنولوژی به عنوان یک ابزار متفاوت، به مقدار زیادی مورد توجه قرارگرفته است که در این بین، استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای حذف فلزات از پساب‌ها و رسوبات توجه زیادی را به خود اختصاص داده است(Lyer *et al*., 2005).

میکروارگانیسم‌های مختلفی ازقبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌های مقاوم به فلزات سنگین می‌توانند فلزات را از محلول‌های آبی حذف کنند (Salinas & Melorza, 2000).

سلول‌های میکروبی بصورت زنده و یا مرده و یا تولیدات آن‌ها می‌توانند بصورت محلول و یا غیرمحلول (ذره ای) جاذب‌های زیستی موثری برای فلزات سنگین و مشتقات آنها باشند. سطوح تمام سلولهای میکروبی در pH حدود خنثی دارای شارژ منفی است و ساختارهای آنیونیک تولید می کند این امر به باکتریها توانایی اتصال به کاتیونهای فلزی را می دهد.

با توجه به اهمیت استفاده از میکروارگانیسم‌ها در کاهش و حذف فلزات از محیط های آبی، تحقیق حاضر با اهداف زیر انجام پذیرفت:

جداسازی و شناسایی باکتری مقاوم به غلظت های مختلف فلزات آهن و نیکل از رسوبات بندر ماهشهر

تعیین سویه منتخب باکتریایی مقاوم به فلزات آهن و نیکل

بررسی توانایی حذف آهن و نیکل در محیط های مایع توسط سلول های زنده و بیومس مرده باکتری منتخب به روش جذب اتمی

مواد و روش کار

نمونه‌برداری از پنج ایستگاه شامل خور غنام، خور زنگی، خور جعفری، ایستگاه بنادر کشتیرانی و ایستگاه پتروشیمی در منطقه انجام شد. ایستگاه خور غنام در ۴۹ درجه و ۲ دقیقه طول شرقی ،۳۰ درجه و ۲۳ دقیقه عرض شمالی، ایستگاه خور زنگی در ۴۹ درجه و ۴ دقیقه طول شرقی، ۳۰ درجه و ۲۸ دقیقه عرض شمالی، ایستگاه خور جعفری در ۴۹ درجه و ۶ دقیقه طول شرقی، ۳۰ درجه و ۲۹ دقیقه عرض شمالی،ایستگاه بنادر کشتیرانی در ۴۹ درجه و ۲ دقیقه طول شرقی و ۳۰ درجه و ۲۶ دقیقه عرض شمالی و ایستگاه پتروشیمی در ۴۹ درجه و ۵

دقیقه طول شرقی، ۳۰ درجه و ۲۵ دقیقه عرض شمالی از مختصات جغرافیایی واقع شده است (شکل۱). نمونه برداری از رسوبات ۵ ایستگاه با استفاده از نمونه بردار گرب انجام شد سپس این نمونه ها در ظروف پلاستیکی درپوش دار سترون جمع آوری شده به آزمایشگاه انتقال داده شد و میزان غلظت فلزات آهن و نیکل موجود در نمونه های جمع آوری شده توسط آنالیز جذب اتمی مورد بررسی قرار گرفت (Hussein *et al*., 2005).

شکل ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری شده ۱: خور غنام، ۲: خورزنگی، ۳:خور جعفری، ۴: بنادر کشتیرانی، ۵: پتروشیمی

مراحل کار به صورت زیر دنبال شدند.

جداسازی و خالص سازی باکتری مقاوم به آهن و نیکل از رسوبات بندر امام خمینی بوسیله روش کشت در محیط BHI agar حاوی ۵۰ ppm نیکل و ۱۰۰۰ ppm آهن انجام شد.

نمونه‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی خالص شده بررسی و به مدت طولانی نگهداری شدند.

برای خالص سازی از محیط کشت BHI agar و برای نگهداری از باکتری، محیط کشت Skim Milk ۱۰درصد استفاده گردید.

مقاومت نمونه های خالص شده به غلظت‌های مختلف آهن و نیکل، تعیین شدند. برای این منظور نمونه‌های خالص شده که دارای مقاومت به ۱۰۰۰ppm آهن وppm ۵۰ نیکل بودند در معرض غلظتهای بیشتر آهن و نیکل در محیط BHI agar قرار داده و نتایج بررسی شدند.

تعیین حداقل غلظت فلزی مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت فلزی کشنده (MBC) سویه های منتخب به نمک نیترات و نمک سولفات انجام شد که برای این منظور غلظتهای مختلف نیترات نیکل و نمک سولفات آهن به محیط مایع BHI اضافه گردید.

به منظور شناسایی سویه باکتری از روشهای تشخیص بیوشیمیایی نظیر اوره، آرژینین، اورینتین، سیمون سیترات، کاتالاز، نشاسته و... استفاده شد.

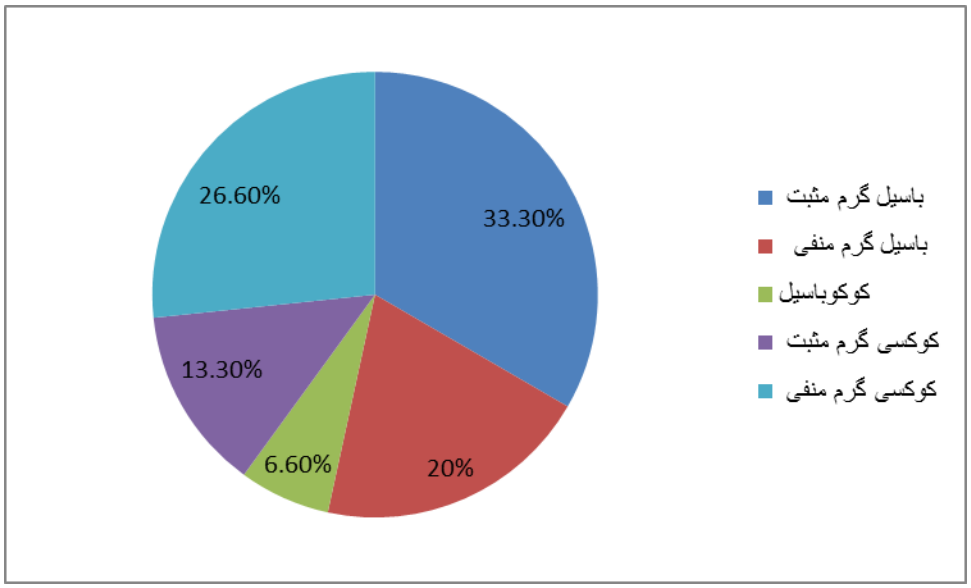
توانایی کاهش آهن و نیکل توسط سلول‌های زنده باکتری و بیومس مرده مورد بررسی قرار گرفت.

توانایی کاهش آهن و نیکل درمحلول حاوی آهن و نیکل و شناسایی مولکولی سویه منتخب، استخراج ژنوم ، PCR و الکتروفورز انجام گرفت (Azza, 2009) و (Qingbio, 2004).

نتایج

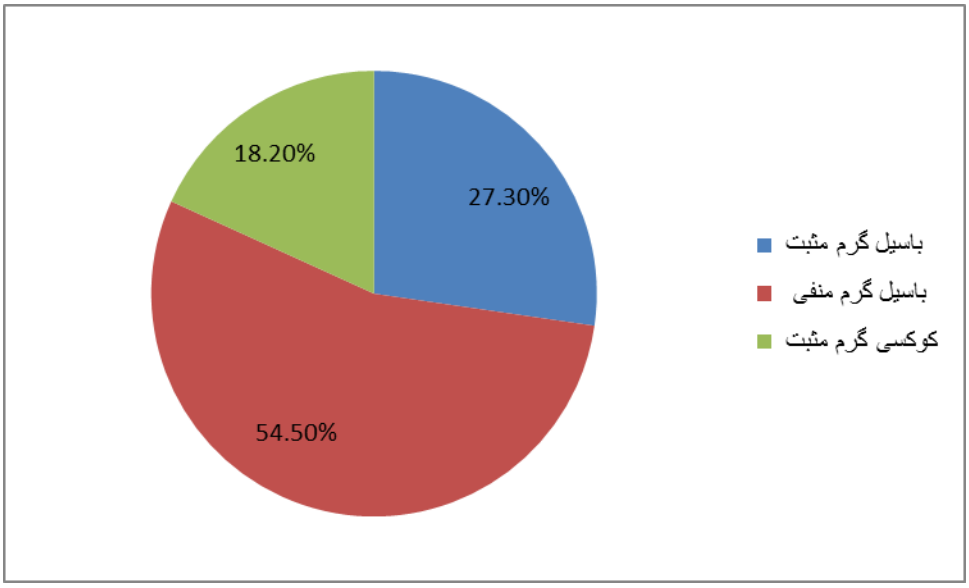
تعداد ۱۶ سویه باکتری مقاوم به ppm ۵۰ نیکل و ۱۲ سویه مقاوم بهppm ۱۰۰۰ آهن در محیط مایع BHI خالص سازی گردید.

درمشاهدات میکروسکوپی، سویه‌های مقاوم به نیکل شامل اشکال باسیل، کوکوباسیل و کوکسی مشاهده شد. در میان این سویه ها ۳۳/۳ درصد باسیل گرم مثبت، ۲۰درصد باسیل گرم منفی، ۶/۶ درصد کوکوباسیل گرم منفی ، ۱۳/۳ درصد کوکسی گرم مثبت و۲۶/۶ درصد کوکسی گرم منفی مشاهده گردید(نمودار ۱).



نمودار۱: درصد فراوانی انواع باکتری های خالص شده مقاوم به ۵۰ppm نیکل در محیط BHI agar

در میان سویه های مقاوم به ppm ۱۰۰۰ آهن، اشکال باسیل وکوکسی یافت شد. مقدار ۵۴/۵ درصد باسیل گرم منفی، ۱۸/۲ درصد کوکسی گرم مثبت و۲۷/۳ درصد باسیل گرم مثبت مشاهده گردید (نمودار۲).



نمودار۲: درصد فراوانی انواع باکتری های خالص شده مقاوم به ppm ۱۰۰۰آهن در محیط BHI agar

نتایج نشان داد در بین ۱۶ سویه ایزوله شده مقاوم به ppm ۵۰ نیکل ، سویه میکروکوکوس (*Micrococcus* sp.) و باسیلوس سابتیلیس (*B.subtilis*) به علت داشتن مقاومت زیاد و رشد بیشتر در ppm ۲۵۰۰۰ نیکل به عنوان ۲ سویه منتخب به منظور بررسی کاهش نیکل انتخاب شدند.

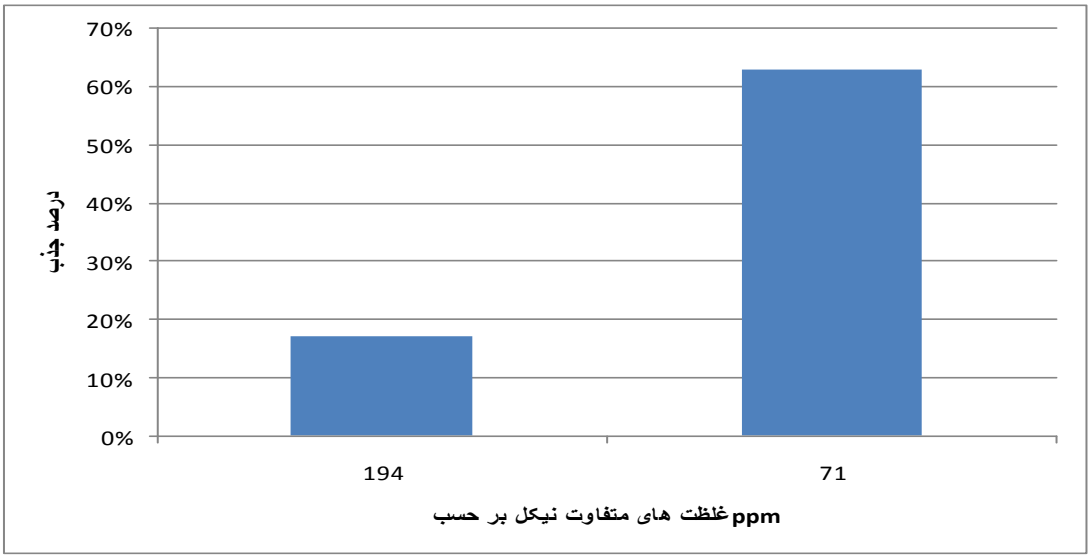
نتایج بررسی ماکروسکوپی سویه باسیلوس سابتیلیس نشان داد که این سویه، باسیلی شکل، دارای اسپور و گرم مثبت است.

نتایج بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویه میکروکوکوس نیز نشان داد که این سویه کوکسی شکل وگرم مثبت و دارای کلنی ها یی با قوام کره ایی، حاشیه صاف، سطح محدب و رنگدانه زرد می باشد.

در بررسی و مقایسه منحنی رشد سویه باسیلوس سابتیلیس در محیط واجد نیکل و فاقد نیکل مشخص شد رشد باکتری در حضور فلز نیکل کمتر از رشد سویه منتخب در محیط فاقد نیکل است. نتایج رشد سویه میکروکوکوس در حضور وعدم حضور نیکل نیزنشان داد رشد باکتری در حضور فلز نیکل کمتراز رشد سویه در محیط فاقد نیکل است.

درصد جذب نیکل در غلظت‌های ppm ۷۱ و ppm ۱۹۴ توسط سویه باسیلوس سابتیلیس با هم مقایسه گردید.

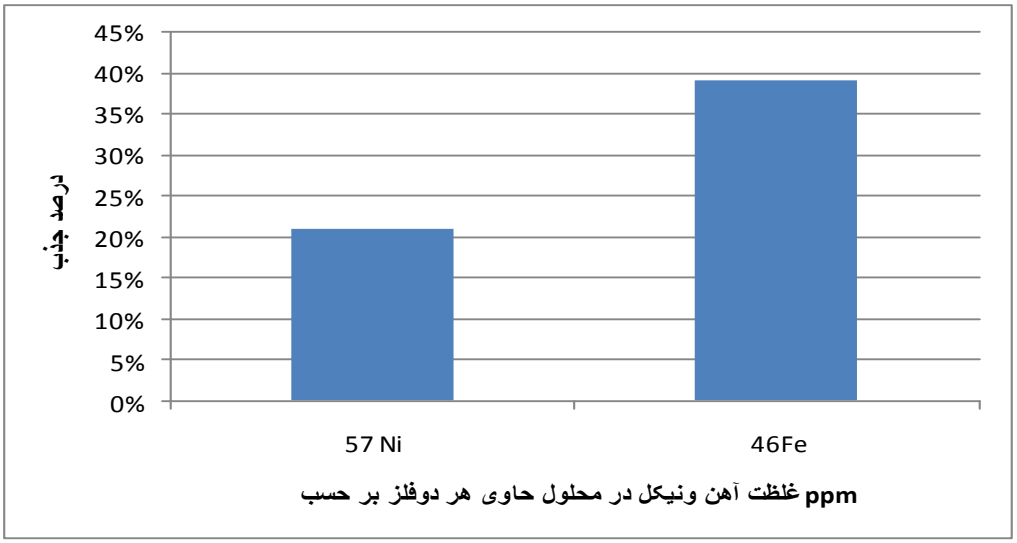
در محیط کشت با غلظت ۷۱ppm نیکل، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، باسیلوس سابتیلیس غلظت نیکل را به ppm ۲۶ رساند که درصد کاهش نیکل ۶۳ درصد محاسبه گردید. این نتایج نشان داد با کاهش غلظت اولیه فلز نیکل درصد کاهش فلز افزایش می‌یابد (نمودار۳) .



نمودار۳: نمودار مقایسه درصد جذب نیکل در غلظت ۷۱ ppm و۱۹۴ ppm توسط باسیلوس سابتیلیس

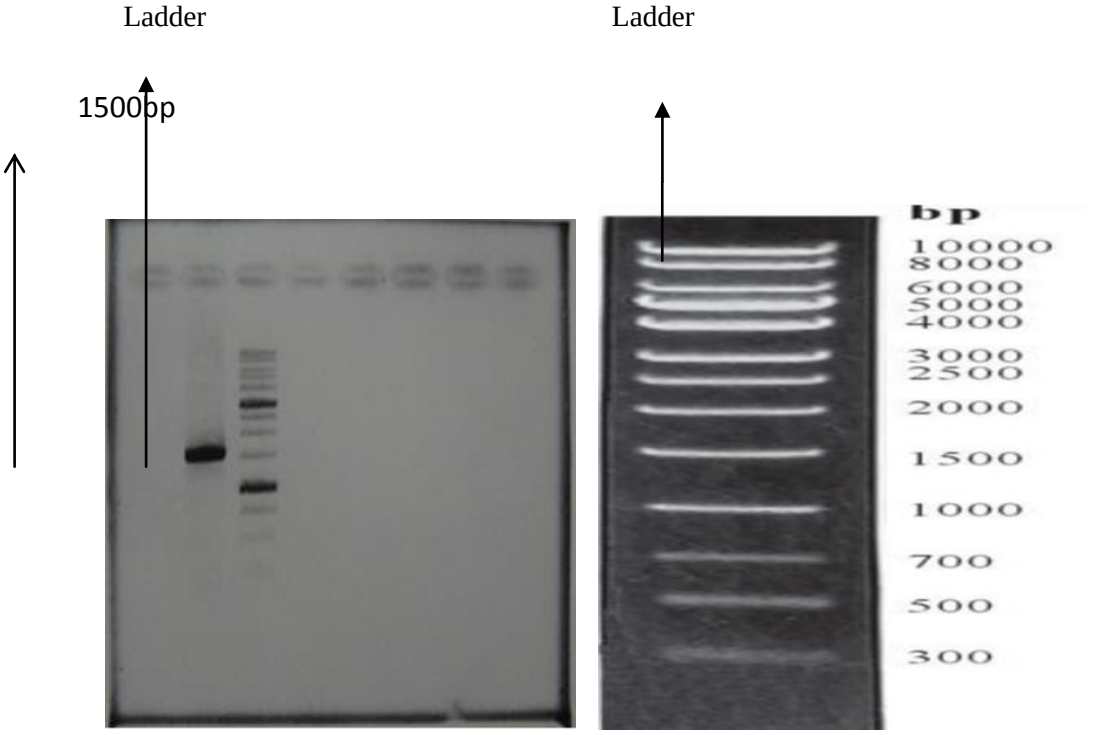
با توجه به اینکه بررسی کاهش فلز نیکل توسط سلول های زنده سویه میکروکوکوس و باسیلوس سابتیلیس انجام شد مشخص شد که باسیلوس سابتیلیس توانایی درصد جذب بالاتری از فلز را دارد.

نتایج به دست آمده از آنالیز جذب اتمی کاهش مخلوط آهن و نیکل توسط بیومس مرده باسیلوس سابتیلیس نشان داد، غلظت نیکل از ۵۷ ppm به ۴۵ ppm و غلظت آهن از۴۶ ppm به۲۸ ppm رسید و مشخص شد، ۲۱ درصد نیکل و۳۹/۱ درصد آهن را پس از ۲ ساعت کاهش داده است (نمودار۴).



نمودار۴: تاثیر کاهندگی باکتری باسیلوس سابتیلیس بر کاهش مخلوط آهن و نیکل

باند گرفته شده در مقایسه با ladder این موضوع را نشان می دهد که نمونه مورد آزمایش در جنس باسیلوس قرار می گیرد و این نمونه بر اساس بلاست در بانک بین المللی NCBI به میزان ۹۹ درصد با گونه باسیلوس سابتیلیس تشابه دارد.



شکل ۲: عکس ژل محصول PCR *B.subtilis*

بحث

درسال های اخیر ورود آلاینده های فلزی به محیطهای دریایی، افزایش چشمگیری داشته است که خطری جدی برای حیات محیط های آبی به شمار می آیند. حذف بیولوژیکی این ترکیبات از منابع آبی به روش تجمع زیستی توسط تعدادی از محققین به کار گرفته شده است. جذب و یا ترسیب بیولوژیکی این فلزات توسط سلولهای میکروبی و یا فرآورده ها و اجزا مشتق شده از سلولهای فوق می تواند جایگزین و یا افزایش دهنده اثر روشهای فیزیکی و شیمیایی باشد (Lyer *et al*., 2005).

نتایج حاصل نشان دهنده جمعیت غالب سویه های گرم منفی شامل انواع اشکال باسیلی، کوکوباسیل و کوکسی مقاوم به غلظت ۵۰ ppm فلز نیکل بود. در میان سویه-های ایزوله شده مقاوم به غلظت ۱۰۰۰ppmآهن، بیشترین فراوانی را نیز سویه‌های گرم منفی(باسیل و کوکسی) نشان دادند. طبق تحقیقات انجام شده باکتری-های گرم مثبت به دلیل ساختار دیواره سلولی ساده‌تر، کنترل کمتری نسبت به ورود مواد خارجی نشان می

دهند، در صورتی که باکتری های گرم منفی دارای دیواره سلولی با ساختار لیپیدی و پروتینی پیچیده تری هستند، در نتیجه ورود و جذب آلاینده های معدنی موجود در محیط بیرونی این باکتری ها، از جمله فلزات سنگین با کنترل بیشتر و به میزان کمتری صورت می گیرد. غشای سلولی در سلول های گرم مثبت نسبتاً ساده و از دو تا سه لایه تشکیل شده است، در حالی که در باکتری گرم منفی، این پوشش بسیار پیچیده است. بر این اساس در این تحقیق فراوانی بیشتر سویه های گرم منفی ایزوله شده می تواند به علت مقاومت بیشترباکتری های گرم منفی به فلزات می باشد.

همچنین تحقیقات دیگری مبنی بر جداسازی باکتریهای مقاوم به نیکل و کبالت از خاک و پساب صنعتی نشان داد که تمامی سویه‌های ایزوله شده مقاوم به این فلزات کوکسی یا باسیل گرم منفی می باشند (Schmidt & Schlegl, 1998).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از میان ۱۶ سویه جدا شده مقاوم به نیکل، سویه باسیلوس سابتیلیس با حداقل غلظت فلزی مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت فلزی کشنده (MBC) به ترتیب ppm ۲۹۷۰۰ و ppm۲۹۸۰۰ و سویه میکروکوکوس با MIC و MBC به ترتیب ppm ۲۶۳۰۰ و ppm ۲۶۵۰۰ بعنوان مقاومترین سویه ها ارزیابی شدند.

میزان حداقل غلظت فلزی کشنده سویه میکروکوکوس به آهن ppm ۱۷۸۰۰ و سویه باسیلوس سابتیلیس تا غلظتppm ۴۰۰۰۰ توانایی رشد نشان داد.

تحقیقات متعددی بر روی تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد یا حداقل غلظت کشنده توسط محقیق مختلف در طی سالهای گذشته انجام گرفته است در این راستادر سال ۲۰۰۴ در بررسی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد در بین باکتری های جدا شده از خاک ، مقدار ۸۰۰ میکرو گرم بر لیتر را برای نیکل گزارش کردند (Lyer *et al.*, 2005) .

Kalantari در سال ۲۰۰۸ اعلام کرد رشد باکتری باسیلوس سرئوس (*B.cereus*) در حضور ۰/۵ میلی مولار در لیتر آهن در مقایسه با نمونه کنترل، کاهش می یابد و رشد باکتری در حضور ۱میلی مولار در لیتر آهن متوقف می شود. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق بنظر می رسد که باکتری ها، با گذشت زمان با ایجاد جهش و یا دریافت ژن های مقاومت پلاسمیدی، در برابر غلظت های بالایی از این فلزات می توانند سازگاری حاصل نمایند.

با توجه به غلظت بسیار بالای برخی فلزات در محیط-های آلوده به فلز، باکتری ها، مکانیسم های مقاومتی را ایجاد می کنند که منجر به انتخاب گونه های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی می شوند که می تواند باعث انتخاب همزمان فاکتور های مقاومت با تحول و دگرگونی در ساختار ژنتیکی باکتری و یا تغییر در عملکرد باکتری شود تا آنجا که قدرت تحمل غلظت های بالاتر از فلزات و ترکیبات سمی را داشته باشد (Lyer *et al.*, 2005).

در این تحقیق ، بررسی انجام شده بر روی کاهش نیکل توسط سلول های زنده میکروارگانیسم نشان داد که سلول های زنده هر ۲ سویه مورد بررسی توانایی کاهش نیکل را دارند. سلول های زنده سویه باسیلوس سابتیلیس درمقایسه با سویه میکروکوکوس درصد جذب بالاتری از نیکل را نشان می دهد. با توجه به اینکه باسیلوس سابتیلیس غلظت ppm ۱۹۴نیکل دارای درصد جذب ۱۶درصد و در غلظت ppm ۷۱ دارای درصد جذب۶۳ درصد است در غلظت پایین درصد جذب فلز بیشتر است. بیشترین میزان حذف نیکل توسط سلول زنده باسیلوس سابتیلیس در ۷۲ ساعت بعد از تلقیح باکتری ۶۳ درصد محاسبه گردید.

تحقیقات Parameswari و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی جذب نیکل وکرم توسط سلول های زنده باسیلوس *Bacillus* sp از توباکتر کروکوم (*Azetobacter chroococcum*) و سودوموناس فلورسنس (*Pseudomonas fluorescence*) نشان داد که به ترتیب

دارای درصد جذب ۸۴/۳۳، ۸۶/۱۶ و۹۰/۹۸ درصد نیکل می‌باشند. طبق این تحقیقات جذب فلز توسط باکتری تحت تاثیر غلظت فلز می باشد. با افزایش غلظت فلز تولید بیومس میکروبی کاهش می یابد و درصد جذب فلز نیز کاهش می یابد .

تحقیقات Chen و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان داد که تماس سلول های زنده یا مرده میکروبی و محصولاتشان می تواند جذب کننده و مجتمع کننده مناسب برای هر دو شکل محلول و ذره ای فلز باشد. سطح سلول میکروارگانیسم ها به علت وجود شاخص های مختلف آنیونی و کاتیونی سبب اتصال کاتیون های فلزی و ترکیبات آنیونی به سطح سلول میکروارگانیسم می گردد که در تحقیقات جدید از این ویژگی جهت حذف آلاینده های فلزی استفاده می گردد. درحقیقت سلول میکروبی به صورت یک آهن ربا عمل می کند و باعث جذب ذرات فلز موجود در محیط می گردد. در کاهش فلزات سنگین، سطح سلولی میکروارگانیسم و دیواره سلولی بیشترین نقش را در جذب فلزات دارند.

در تحقیقات انجام شده توسط Sivaprakash و همکارانش در سال ۲۰۰۹ مشخص شد که باکتری های گرم مثبت به علت دیواره سلولی قطور، پپتیدوگلیکان چند لایه و داشتن تیکوئیک اسید در جذب فلزات سنگین کاملا" کارآمدتر عمل می کنند. سلول های باکتری در سطح خود دارای گیرنده هایی هستند که هر کدام با تعداد مشخصی از فلزات بسته به نوع باکتری ترکیبات و قطر دیواره سلولی واکنش می دهد و با پر شدن جایگاه اتصال ظرفیت باکتری مشخص در کاهش فلز سنگین پر می شود و دیگر باکتری قادر به جذب فلز بیشتر نمی باشد.

طبق تحقیقات Allievi و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد که باکتری باسیلوس سابتیلیس دارای پروتئین سطحی S (S layer protein) در دیواره خود می باشد که این پروتئین حدود ۲۰٪ از کل پروتئین های باکتری را که مقدار قابل توجهی است تشکیل می دهد. طبق تحقیقات انجام شده توسط این محقق در باسیلوس سابتیلیس بیشترین میزان جذب فلزات سنگین توسط این پروتئین انجام می گیرد.

پس از افزودن نمک سولفات آهن به محیط های کشت BHI broth، broth Nutrient، محیط کشت حاوی آب مقطر، پپتون و ۱٪ قند گلوکز و محیط کشت حاوی آب مقطر و ۱٪ قند گلوکز در محیط کشت رسوب تشکیل گردید. در این شرایط امکان خواندن کدورت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر وآنالیز اتمی امکان پذیر نبود. محیط کشت حاوی آب مقطر و ۱٪ قند گلوکز در pH، ۳ و کمتر از ۳ فاقد رسوب بود. با توجه به این که سویه منتخب در این pH رشد ندارد بررسی کاهش آهن توسط سلول های زنده سویه منتخب انجام نگرفت.

بررسی کاهش نیکل و آهن توسط بیومس مرده باسیلوس سابتیلیس نشان داد که این باکتری قادر به کاهش نیکل وآهن است و در مدت ۲ ساعت قادر به حذف ۴۰/۶ درصد نیکل و ۵۸/۶ درصد آهن می باشد و در مخلوط ۲ فلز قادر به حذف ۲۱ درصد نیکل و ۳۹ درصد آهن است. با توجه به درصد جذب بالاتر آهن، توانایی سویه منتخب در حذف آهن بیشتر از نیکل می باشد و در مخلوط ۲ فلز، توانایی سویه منتخب در حذف آهن و نیکل کاهش می یابد.

تحقیقات Mulaba و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که بیومس مرده باسیلوس سابتیلیس توانایی جذب آهن، کلسیم و منیزیم را دارد. نتایج این بررسی نشان داد که درصد حذف فلز کلسیم توسط باسیلوس سابتیلیس بیشتر از ۲ فلز دیگر است و میزان توانایی باسیلوس سابتیلیس در حذف یون های فلزی به نوع فلز بستگی دارد.

در این راستا تحقیقات نشان داد بیومس مرده و زنده باسیلوس اسفریکوس(*B.sphaericus*) و باسیلوس پامیلوس (*B. pumiluss*) قادر به جذب نیکل می‌باشند. همچنین اعلام کردند باسیلوس اسفریکوس توسط لایه کریستالی بسیار منظم که به طور کلی از واحدهای پروتئینی یکسان تشکیل شده احاطه شده است . در واقع

پرو تئین سطحی S که دارای منافذی است که به دام انداختن یون های فلزی را تسهیل می‌نماید. گروه‌های آنیونی نظیر کربوکسیلات و فسفات پپتیدوگلیکان وتیکوئیک اسید را مکان های اتصال فلزات در نظر گرفته-اند. همچنین اعلام کردند جذب فلزات توسط بیومس مرده به روش غیرفعال و مستقل از انرژی است وعمدتا" از طریق اتصال گروه های شیمیایی صورت می گیرد (Daghistani., 2012).

میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی ذاتی برای حذف فلزات هستند با این حال همیشه چالش‌هایی برای استفاده از این توانایی وجود دارد. غلظت بالای فلزات می تواند برای میکروارگانیسم سمی باشد و شرایط اسیدی نامطلوب برای رشد میکروارگانیسم‌ها را فراهم آورد. برای غلبه بر این چالش‌ها نیاز به استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی سازگار به شرایط یا استفاده از میکروارگانیسم‌های دست-ورزی شده ژنتیکی و یا بیومس مرده میکروارگانیسم که با شرایط موجود مقابله نماید، می باشد (Mulaba *et al*., 2009). در مورد استفاده از بیومس مرده سلول های باکتری به دلیل اینکه دیگر نیازی به شرایط مورد نیاز رشد باکتری نمی باشد استفاده از بیومس مرده باکتری در گستره ی بیشتری از شرایط محیطی نظیر دما pH نمک و... قابل استفاده می باشد (Wasielsky, 2006) .

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد غلظت نیکل از ۵۷ به ppm ۴۵ و غلظت آهن از ppm ۴۶ بهppm ۲۸ رسید. بیومس مرده با سیلوس سابتیلیس ۲۱ درصد نیکل و ۳۹/۱ درصد آهن را پس از ۲ ساعت کاهش داد.

منابع

Allievi M., Sabbione F., Prado-Acosta M., Palamino M., Ruzal S. and Sanchez-Rivas C., 2011. Metal Biosorption by Surface-Layer Proteins from Bacillus species. Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(2),147-153.

Azza A., 2009. Biossorption of Some Heavy Metal Ions Using Bacterial Species Isolated from Agriculture Water Drains in Egypt. Journal of Applied Science Research, 5(4), 372-383

Chen X., Hu S., Shen C., Mingduo C., Shi J. and Chen Y., 2008.Interaction of *Pseudomonas putida* CZ1 with clays and ability of the composite to immobilize Copper and Zink from solution. Bioresource Technology Journal, 23,151-153.

Daghistani H., 2012. Bio-Remidation of Ca, Ni and Cr from rotogravure wastewater, Internet Journal of Microbiology, 25P.

Hussein H., Farag S., Kandil K. and Moawad H., 2005.Tolerance and uptake of heavy metals by pseudomonads. Process Biochemistry Journal, 40, 955-961.

Kalantari N., 2008. Evaluation of toxicity of Iron, *Chromium* and *Cadmium* on *Bacillus cereus* growth. Iranian Journal of Basic Medical Science, 10, 222-228.

Lata H . and Garg R., 2008. Sequestration of nickel from aqueous solution on to activated carbon prepared from parthenium hysterophorus. Journal of Hazardous Material, 157, 2-3.

Lyer A., Kalpana M. and Bhavanath J., 2005. Biosorption of heavy metals by a

guidelines for Iron. Overview Report. Ministry of Environment, British Columbia, Canada, 46P.

Qingbio L., Qingbiao L., Songtao W., Gang Xinkai L., Daohua S. and Yuelin H., 2004. Simultaneous of biosorption of cadmium and lead ions by pretreated biomass of Phanerochaete chrysosporium. Separation and purification Technology Journal, 34, 135-142.

Salinas E. and Melorza D. O., 2000. Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solution by Rhodotorularuba. Bioresouces Technology Journal, 72, 107-112.

Schmidt T. and Schlegl G., 1998. Nickle and Cobalt resistance of various bacteria isolated from soil. FEMS Microbiology Letters, 62, 315-328.

Sivaprakash A., Aravindhan R., Raghavarao J. and Unninair B., 2009. Kinetics and equilibrium studies on the biosorption of hexavalent Chromium from aqueous solutions using *Bacillus subtilis* biomass. Chemical Laboratory Central Leather Research Institute, Adyar, Chennai, 7(1), 45-57.

Verma T., Srinath T., Gadpyle R., Rateke P., Hans R. and Gary S., 2001. Chromate tolerant bacteria isolated from tannery marine bacterium. Marine Pollution Bulletin, 50, 340-343.

Malekzadeh F., Farazmand A., Ghafourian H., Shahamat M., Levin M., Grim C. and Colwell R. R., 1999. Accumulation of heavy metals by a bacterium isolated from electroplating effluent. World Journal Microbiology Biotechnology, 18, 295-302.

Matagi S. V., Swai D. and Mugabe R. 1998. A review of heavy metal removal mechanisms in wetlands.African Journal of Tropical Hydrobiology and Fisheries, 8, 23-35.

Mulaba A. F., Fosso-Kankeu E . and Mamba B. 2009. Indigenous microorganism strains as bio-extractants of Ca,Fe and Mg from metallurgical and mine draingaes. Hydrometallurgy Conference, 216, 93-99.

Padiyan S. and Daharmedrikumer M., 2011. Application of bacteria to remove Ni ions from aqueous solution. European Journal of Scientific Research, 52, 345-358.

Parameswari E., Lakshmanan A. and Thilagavathi, T., 2009. Biosorption of Chromium and Nickel by bacterial isolates from an aqueous solution. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 8(3), 150-156.

Phippen B., Horvarth C., Nordin R . and Nagpal N., 2008. Ambient aquatic life

effluent. Bioresource Technology Journal, 78, 31-35.

Wasielsky W., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 258, 396-403.

Introduction of metallic pollutant (Fi , Ni) reducing bacteria in Musa Bay

Ramin, M.[(1) *]; Doustdar, M.[(1)*]

* ifro-mrifro@yahoo.com

1-Iran Fisheries Research Organization, Tehran, Iran.

Key words: *Bacillus subtilis, Micrococcus* sp., Fe, Ni, Musa Bay

Abstract

In order to isolate bacterial strains resistant to iron and nickel, deposit samples were collected from five stations in Musa Bay and cultured on BHI agar medium containing 1000 ppm of iron and 50 ppm of nickel. Endurance threshold of strains isolated to different concentrations of iron (1000- 15000 ppm) and nickel (100- 25000 ppm) in BHI broth medium were evaluated, the most resistant strains were selected and MIC and MBC were determined. Results of the current study demonstrated that among 16 and 12 resistant strains to nickel and iron, two selected strains (*Bacillus subtilis and Micrococcus* sp.) as the most resistant strains had MIC and MBC (29700 and 29800 ppm) and (26300 and 26500 ppm), respectively, Iron's MIC was not assessed. Results of atomic absorption analysis demonstrated that the highest amount of nickel reduction in a medium with concentration of 194 ppm and 71 ppm were 16.7% and 63% after 72 hours by selected strain of *Bacillus subtilis* respectively, and in a medium containing 158 ppm iron, after 50 hours 8.4% by selected strain 7, while dead biomass of strain 16 reduced nickel to the amount of 40.6% and it reduced 21% and 4% of iron in solutions with 46 ppm and 792 ppm of iron. Results of molecular analysis demonstrated that strain 16 was *Bacillus subtilis*. In addition, *Bacillus subtilis* being isolated in this study with ability of nickel and iron removal is an appropriate candidate to be used in aquatic environments.

*Corresponding author