

دارای رتبه علمی - پژوهشی  
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

جذب زیستی سرب و مس توسط باکتری مقاوم به فلزات سنگین به کمک اسپکتروفتومتر تبدیل  
فوری مادون قرمز (FT-IR)

چکیده

**زمینه و هدف:** آلودگی محیط زیست به فلزات سنگین سرب و مس به واسطه فعالیت‌های بشر در حال افزایش است. از مناسب‌ترین روش‌ها برای حذف این فلزات از محیط زیست، حذف باکتریایی می‌باشد. هدف این پژوهش جداسازی باکتری‌ها و بررسی مکانیسم حذف زیستی سرب و مس بود.

**روش بررسی:** پس از جمع آوری پساب آلوده، باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین جداسازی شدند. جدایه‌ها با بیشترین مقاومت به سرب و مس برای ادامه کار انتخاب شدند. حذف زیستی فلزات توسط باکتری‌های جدا شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی بررسی شد. تعیین گروه‌های عاملی موثر در حذف زیستی فلزات سنگین با FT-IR انجام شد. همچنین از روش حذف پلاسمید برای تعیین جایگاه ژن‌های مقاوم به فلزات سنگین استفاده شد.

**یافته‌ها:** تعداد ده جدایه باکتریایی مقاوم به فلز سنگین جداسازی شد. از میان باکتری‌های جداسازده، جدایه MKH3 با بیشترین درصد حذف توانست به ترتیب ۹۰ و ۹۲ درصد سرب و مس را از محیط کشت حذف کند. بررسی مکانیسم جذب در MKH3 نشان داد که گروه‌های عاملی نظیر کربوکسیل، آمید، کربونیل و هیدروکسیل در حذف فلزات سنگین از محیط رشد موثر بود. نتایج نشان داد که ژن‌های مقاوم به فلزات سنگین ممکن است در DNA پلاسمیدی واقع شده باشد. همچنین شناسایی ملکولی نشان داد که MKH3 با ۹۸ درصد همولوژی مشابه با اتروباکتر هورمیچنی است.

**نتیجه گیری:** باکتری جداسازده از مناطق آلوده، توانایی حذف مقادیر زیاد سرب و مس را داشت. بنابراین MKH3 می‌تواند در تصفیه پساب صنایع و پاکسازی مناطق آلوده به فلزات سنگین به ویژه سرب و مس استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** جذب زیستی، باکتری، سرب، مس، FT-IR

مجتبی محسنی

استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران،  
بابلسر، ایران

فاطمه خسروی

کارشناس ارشد علوم سلولی و ملکولی، دانشگاه  
مازندران، بابلسر، ایران

مریم مهاجرانی

استادیار بیوشیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر،  
ایران

محمدجواد چایچی

دانشیار شیمی تجزیه، دانشگاه مازندران، بابلسر،  
ایران

نویسنده مسئول: مجتبی محسنی

پست الکترونیک: M.Mohseni@umz.ac.ir

تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۹۷

آدرس: گروه زیست شناسی سلولی و  
ملکولی، دانشگاه مازندران، بابلسر

دریافت: ۹۲/۱۰/۸

ویرایش پایانی: ۹۲/۱۱/۱۸

پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۰

آدرس مقاله:

محسنی م، خسروی ف، مهاجرانی م، چایچی م ج " جذب زیستی سرب و مس توسط باکتری مقاوم به فلزات سنگین به کمک اسپکتروفتومتر تبدیل فوری مادون قرمز (FT-IR) " مجله علوم آزمایشگاهی، پاییز ۱۳۹۳، دوره هشتم (شماره ۳): ۳۰-۳۹

فلزات سنگین به دلیل سمیت زیاد، آلاینده مهم محیط زیست به شمار می‌آیند (۱). رها شدن این آلاینده‌ها بدون تیمار مناسب در محیط به دلیل عدم تجزیه و نیز ماندگاری طولانی، تهدید مهمی برای محیط زیست و سلامت عمومی جامعه می‌باشد. از مهمترین فلزات سنگین می‌توان به کادمیوم، کروم، کبالت، نیکل، سرب، مس و جیوه اشاره کرد که حتی در مقادیر کم نیز خطرناک هستند (۲). فعالیت‌های انسانی مانند کار در معادن فلزات کشاورزی، حمل و نقل یا احتراق سوخت‌های فسیلی، صنایع چون دباغی، رنگ سازی، آبکاری فلزات، باطری‌سازی و نیز پتروشیمی، تخلیه پسماندها و فعالیت‌های صنعتی باعث ورود فلزات سنگین به محیط زیست می‌شوند (۳،۴). بنابراین توسعه روش‌های پاکسازی خاک، آب و پساب آلوده به فلزات سنگین، برای سلامت انسان و محیط زیست ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های مختلفی برای حذف فلزات سنگین از پساب صنعتی به کار گرفته می‌شود که از آن جمله می‌توان به اکسیداسیون، رسوب‌دهی شیمیایی، اسمز معکوس، فیلتراسیون غشاء، تبادل یون و جذب سطحی اشاره نمود. روش‌های فیزیکی و شیمیایی نیازمند سرمایه‌گذاری بالا و صرف هزینه زیاد هستند. عیب اصلی این روش‌ها تولید لجن زیاد و عدم کارایی در غلظت‌های کم فلزات سنگین می‌باشد (۵،۶). بنابراین همواره استفاده از روش‌های مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست برای حذف فلزات سنگین، مورد توجه بوده است. زیست‌پالایی (Bioremediation) روشی موثر نسبت به سایر روش‌های متداول فیزیکی و شیمیایی در حذف فلزات سنگین می‌باشد. زیست‌پالایی یک اصطلاح کلی برای رفع آلودگی‌های زیست‌محیطی بوده که توسط فرآیندهای زیستی و به خصوص میکروارگانیسم‌ها، در خاک و آب آلوده انجام می‌شود (۷،۸). در سال‌های اخیر توجه زیادی به باکتری‌ها برای کاهش آلودگی فلزات سنگین معطوف شده است و توانایی آن‌ها در حذف فلزات از محیط زیست مورد ارزیابی قرار گرفته است. محققان نشان داده‌اند که باکتری‌ها گزینه

مناسبی جهت پاکسازی مناطق آلوده به فلزات سنگین می‌باشد. حذف فلزات سنگین توسط میکروارگانیسم‌ها به روش‌های مختلف انجام می‌شود. در این فرآیند که به جذب زیستی (Biosorption) معروف است، از توده سلولی اعم از زنده و یا مرده در حذف فلزات از محلول آبی استفاده می‌شود. این روش با هدف حذف فلزات سمی و پاک‌سازی محیط زیست و نیز بازیافت فلزات با ارزش در سیستم تصفیه پساب‌های صنعتی بکار گرفته می‌شود. همچنین فلزات سنگین ممکن است در داخل سلول‌ها تجمع یابند. این فرآیند که تجمع زیستی (Bioaccumulation) نامیده می‌شود، فلزات سنگین وارد سیتوپلاسم سلول شده و به صورت فلزات غیر فعال انباشته می‌شود (۴،۹،۱۰). در این تحقیق برای مطالعه حذف فلزات سنگین، باکتری‌های مقاوم به سرب و مس از مناطق آلوده به فلزات سنگین جداسازی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی سرب و مس در رشد باکتری‌های جداشده سنجش شد. مطالعه حذف زیستی فلز سنگین توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب اتمی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین گروه‌های عاملی موثر در حذف فلزات سنگین از محیط به کمک طیف اسپکتروفوتومتر تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) بررسی شد.

### روش بررسی

محلول ذخیره فلزات در آب مقطر تهیه و با صافی با قطر منفذ ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردید. پساب مناطق آلوده به فلز سنگین در کارخانه‌های چرم‌سازی شهرستان ورامین، جمع‌آوری شد. برای جداسازی باکتری‌ها با پتانسیل حذف زیستی فلز سنگین، نمونه‌های پساب در محیط کشت مایع LB (Luria Bertani medium) حاوی ۰/۵ میلی مولار فلز سرب و مس به طور جداگانه، تلقیح شد. محیط کشت مایع LB با مخلوط کردن ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم سدیم کلرید، ۱ گرم گلوکز و ۱ لیتر آب مقطر، آماده شد (۱۱). ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

مس، با روش قرص KBr توسط دستگاه آنالیز FT-IR (Bruker Tensor 27) مطالعه شد. برای بررسی حضور و محل ژن‌های موثر در مقاومت به فلز سنگین در کروموزوم یا پلاسمید جدایه، از روش حذف پلاسمید (Plasmid curing) از سلول باکتری استفاده شد (۱۵). کشت باکتری به مدت طولانی در محیط رشد غنی از مواد غذایی، موجب از دست رفتن پلاسمیدهای سلول می‌شود. به این منظور کشت تازه جدایه MKH3 در محیط کشت مایع LB تلقیح شد و به مدت یک ماه در گرمخانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای بررسی حذف پلاسمید در جدایه، هر ۲۴ ساعت از کشت LB به محیط کشت تازه‌ترین آگار منتقل شد. برای بررسی حذف پلاسمید و عدم توانایی رشد در حضور سرب، کلنی‌های ظاهر شده، به طور مجزا به محیط کشت‌های آگار حاوی ۴ میلی‌مولار سرب، منتقل شد. عدم رشد کلنی‌ها در محیط کشت حاوی سرب، نشانه از دست رفتن پلاسمید حاوی ژن مقاومت به فلز سنگین است. هم‌چنین به منظور تأیید از دست رفتن پلاسمید، مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در جدایه قبل از آزمایش (Parent strain) و بعد از آزمایش (Cured strain) حذف پلاسمید، بررسی شد. محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف ۱-۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تهیه شد. کلنی‌های مجزا قبل و بعد از آزمایش حذف پلاسمید به محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک تلقیح شد و رشد آن‌ها پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی باکتری جدا شده، DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد بید بیتر (Bead Beater) استخراج شد (۱۶). در این روش از هگزادسیل‌تری‌متیل‌آمونیم بروماید (CTAB) جهت متلاشی کردن دیواره سلولی استفاده شد. هم‌چنین محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) برای حذف پروتئین‌ها و قندها و نیز محلول نمکی پلی‌اتیلن‌گلیکول برای رسوب نوکلئیک اسید، به کار گرفته شد. کیفیت DNA استخراج شده، با اسپکتروفوتومتر و نیز الکتروفورز ژل آگارز ۰.۸ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید،

شدند. سپس برای جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های مقاوم به سرب و مس، به محیط کشت تازه‌ترین آگار منتقل شد و در گرمخانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد، گرم‌گذاری شد. از کلنی‌های مجزا، رنگ آمیزی گرم به عمل آمد و مشخصات مرفولوژی جدایه‌ها بررسی شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری‌های جدا شده، از روش رقیق‌سازی یون فلز سنگین سرب و مس در آگار استفاده شد (۱۲، ۱۳). به این منظور فلزات سنگین به صورت نترات سرب و سولفات مس، به محیط کشت تازه‌ترین آگار اضافه شد به طوری که غلظت نهایی ۲ تا ۱۳ میلی‌مولار فلز سنگین تهیه شد. پس از تلقیح جدایه‌ها، پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، گرمخانه‌گذاری شد. رشد و یا عدم رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌ها با بیشترین مقاومت به هر دو فلز سنگین، برای مراحل بعدی گزینش شدند. سنجش کمی جذب سرب و مس توسط جدایه‌های باکتریایی با بیشترین مقاومت به سرب و مس، توسط اسپکتروفوتومتر جذب اتمی (Thermo Electron, USA) انجام شد. یک درصد کشت تازه باکتری به طور مجزا، به محیط کشت مایع LB حاوی ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب یا مس، تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه شیکردار با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، مجاورسازی شد. پس از مجاورت با فلزات سنگین، محیط رشد به مدت ۱۵ دقیقه و با ۶۵۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ گردید. محلول رویی جمع‌آوری و برای تعیین محتوای فلز سنگین، به کمک اسپکتروفوتومتر جذب اتمی استفاده شد. آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام گردید. جدایه با بیشترین توانایی در حذف فلز سنگین، MKH3 نامگذاری شد و برای مراحل بعدی انتخاب شد. به منظور تعیین گروه‌های عملکردی سلول‌های باکتری که در برهم‌کنش با یون‌های سرب و مس موثرند و مسئول جذب زیستی فلزات سنگین می‌باشند، از اسپکتروفوتومتر تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) استفاده شد (۱۴). طیف FT-IR از سلول‌های جدایه MKH3 در دو حالت قبل و بعد از مجاورسازی با سرب و

توالی نوکلئوتیدها به کمک نرم افزار Chromas Lite (2.01) مجددا بررسی شد و BLAST با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI و EzTaxon-e انجام شد (۱۸). تحلیل تکاملی جدایه MKH3 با باکتری‌های نزدیک به آن به کمک نرم‌افزار ClustalX (نسخه ۲) انجام شد. درخت تکاملی توالی ژن *16S rRNA* جدایه با توالی حاصل از جستجو در پایگاه اطلاعاتی GenBank و EzTaxon-e، به کمک نرم‌افزار MEGA5 و با الگوریتم Maximum likelihood و Neighbour joining، رسم گردید (۱۹). بررسی اعتبار شاخه با الگوریتم bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت. توالی ژن *16S rRNA* جدایه MKH3 بدست آمده در این پژوهش به بانک ژنی NCBI ارسال شد و به شماره ژنی KF984324 ثبت شد.

بررسی شد (۱۷). سپس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، ژن *16S rRNA* به کمک پرایمرهای عمومی PA و PH (جدول ۱) تکثیر شد. تنظیم دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن *16S rRNA* به ترتیب زیر انجام گرفت: واسرشت ابتدایی با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و مرحله دوم ۳۵ چرخه شامل واسرشت با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰/۵ دقیقه، سنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه و سنتز نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از کیت تخلیص GeneJetPCR (Thermo Scientific, Lithuania) خالص سازی شد. سپس توالی ژن *16S rRNA* (شرکت GATC Biotech آلمان) تعیین شد. نتایج

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای عمومی ژن *16S rRNA* استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (F، پرایمر رفت؛ R، پرایمر برگشت).

پرایمر	توالی (5'→3')	درصد GC	دمای اتصال پرایمر (درجه سانتی‌گراد)	محصول PCR (حفت نوکلئوتید)
PA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	۵۰	۵۶	۱۵۰۰
PH-R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	۶۰		

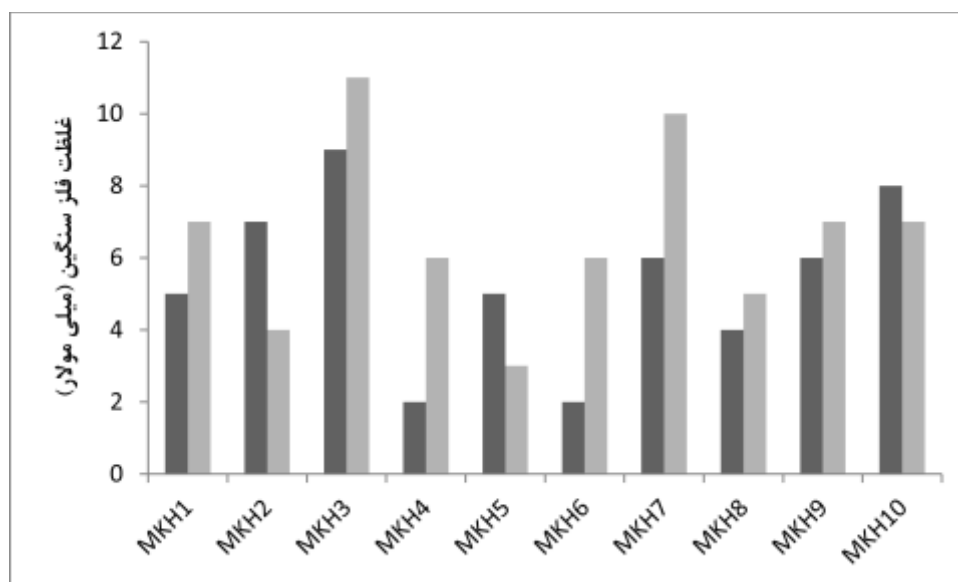
## یافته‌ها

لذا این سه جدایه برای ادامه کار انتخاب شدند. توانایی حذف فلز سنگین از محیط رشد توسط جدایه‌ها، به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی بررسی شد. پس از رشد باکتری در حضور فلز سنگین، محلول رویی محیط رشد جمع‌آوری شد و غلظت باقیمانده فلز سنگین اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد از میان سه جدایه انتخاب اولیه، جدایه MKH3 با حذف ۹۰ درصد سرب و ۹۲ درصد مس، بیشترین درصد حذف فلز سنگین را داشت و برای مطالعه بیشتر استفاده شد.

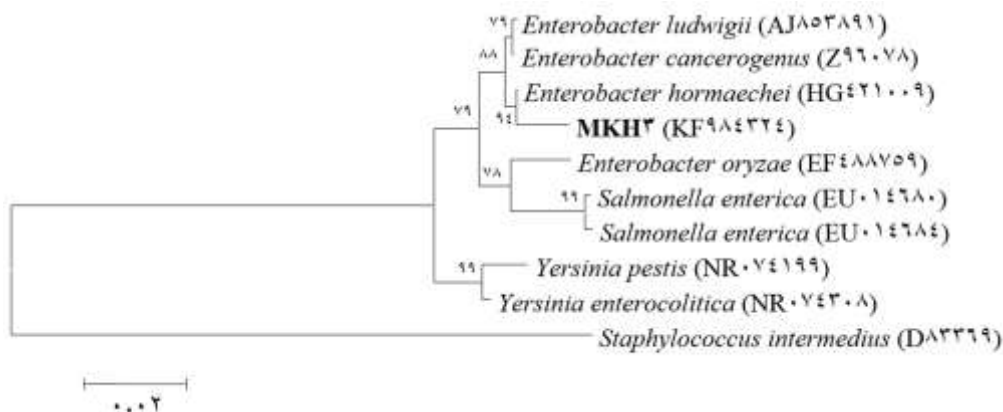
تعداد ده جدایه شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی با توانایی رشد در حضور فلزات سنگین سرب و مس، جداسازی شد. از میان باکتری‌های جدا شده، جدایه‌های MKH3، MKH7 و MKH10 بیشترین مقاومت نسبت به غلظت بالای هر دو فلز سنگین سرب و مس را دارند (نمودار ۱). توانایی رشد سه جدایه MKH3، MKH7 و MKH10 در محیط کشت حاوی فلز سنگین، به ترتیب ۹، ۶ و ۸ میلی‌مولار سرب و نیز ۱۱، ۱۰ و ۷ میلی‌مولار مس، بود.

جدول ۲- باندهای جذبی گروه‌های عاملی در جدایه MKH3: بدون مجاورت با فلز سنگین و پس از مجاورت با فلز سرب و مس توسط FT-IR.

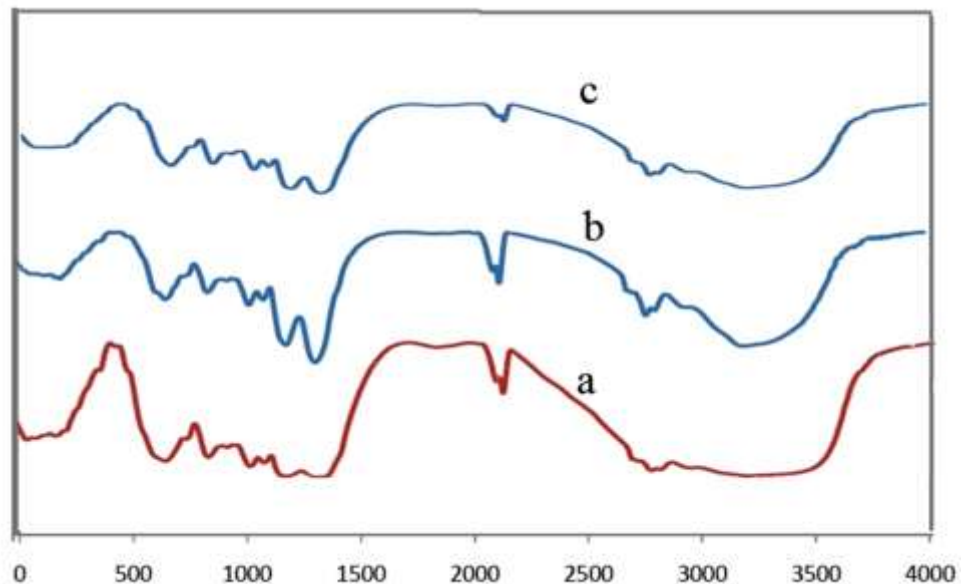
گروه‌های عاملی	بدون مجاورت با فلز	پس از مجاورت با سرب	پس از مجاورت با مس
ارتعاش کششی O-H پیوند هیدروژنی و ارتعاش کششی N-H پیوند دوگانه آمیدی	۳۳۰۲/۲۶	۳۲۹۷/۷۱	۳۳۸۱/۶۶
ارتعاش کششی C-H (گروه‌های متیلن، متیل و متین)	۲۹۲۷/۲۲	۲۹۲۷/۴۲	۲۹۲۷/۲۱
ارتعاش کششی نامتقارن C-H	۲۹۶۰/۹۹	۲۹۶۱/۱۵	۲۹۶۱/۱۳
ارتعاش کششی C=O در کربوکسیل یا آمید (پیوند آمید I)	۱۶۵۴/۲۷	۱۶۵۳/۱۶	۱۶۵۳/۳۶
ارتعاش خمشی N-H در آمید و ارتعاش کششی C-N در CO-NH	۱۵۴۱/۳۹	۱۵۴۰/۰۷	۱۵۴۰/۷۸
ارتعاش خمشی متقارن گروه CH <sub>2</sub> ارتعاش خمشی نامتقارن CH <sub>3</sub> و ارتعاش خمشی O-H	۱۴۵۲/۹۸	۱۴۵۱/۵۶	۱۴۵۳/۰۰
ارتعاش کششی C-N، ارتعاش خمشی درون صفحه O-H	۱۳۹۷/۷۸	۱۳۹۹/۲۲	۱۳۹۷/۲۶
C-O	۱۳۱۳/۷۶	۱۳۱۲/۱۵	۱۳۱۰/۹۵
ارتعاش کششی C-H و ارتعاش کششی C-O در آمید II	۱۲۳۷/۹۸	۱۲۳۸/۹۹	۱۲۳۸/۵۵
ارتعاش کششی C-OH	۱۰۷۵/۶۸	۱۰۷۵/۸۵	۱۰۷۷/۰۱
ارتعاش خمشی خارج صفحه‌ای N-H پیوند هیدروژنی در آمید	۶۱۲/۰۰	۵۴۷/۳۳	۵۴۵/۰۰



نمودار ۱- توانایی رشد باکتری‌های جداشده در محیط کشت حاوی غلظت مختلف فلز سنگین سرب (■) و مس (■).



شکل ۲- دندوگرام توالی ژن *16S rRNA* باکتری جذب کننده فلزات سنگین MKH3 که به جنس *اِتروباکتر* قرابت نشان داد. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. باکتری *Staphylococcus intermedius* به عنوان out group قرار داده شد.



شکل ۱- طیف اسپکتروفتومتر FT-IR باکتری MKH3: بدون مجاورت با فلز سنگین (a)، بعد از مجاورت با سرب (b) و مس (c).

با فلز سنگین سرب و مس تغییر کردند و نشان می‌دهد که گروه‌های کربونیل از کربوکسیل و گروه‌های آمیدی (شامل اشکال اکسیژنه و نیتروژنه کربن) در جذب زیستی سرب و مس دخالت دارند. بررسی جایگاه ژن‌های مقاومت به فلز سنگین در ژنوم (کروموزوم یا پلاسمید) جدایه MKH3، از روش حذف پلاسمید استفاده شد. نتایج بررسی از دست رفتن پلاسمید نشان داد که جدایه MKH3 پس از ۳۰ روز مقاومت خود را نسبت به سرب از دست داد و قادر به رشد در محیط کشت حاوی ۴ میلی مولار سرب نبود. نتایج بررسی از دست رفتن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نیز نشان داد که باکتری بعد از این دوره، مقاومت خود را به آنتی‌بیوتیک از دست داد. جدایه قبل از آزمایش حذف پلاسمید، توانایی رشد در حضور ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین را داشت اما پس از آزمایش و در نتیجه حذف پلاسمید، جدایه نتوانست در این غلظت آمپی‌سیلین رشد کند. نتایج این بررسی نشان می‌دهد ژن‌های مقاومت به فلزات سنگین و مقاومت به آمپی‌سیلین، کروموزومی نبوده و می‌تواند در پلاسمید واقع باشد. برای شناسایی ملکولی جدایه MKH3، ژن *16S rRNA* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد. پس از تعیین توالی، هومولوژی ژن *16S rRNA* باکتری جذب کننده فلز سنگین با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI و

گروه‌های عاملی موثر در جذب فلزات سنگین از محیط رشد باکتریایی، به کمک اسپکتروفتومتر تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) بررسی شد. به این منظور طیف FT-IR باکتری MKH3 قبل و بعد از مجاورت با سرب و مس، مقایسه شد (شکل ۱). نتایج طیف توده باکتری MKH3 نشان می‌دهد چندین باند جذبی مشخص در  $3387 \text{ cm}^{-1}$  (نشان‌دهنده گروه‌های -OH و -NH)، در  $2927 \text{ cm}^{-1}$  (نشان‌دهنده گروه -CH)، در  $1654 \text{ cm}^{-1}$  (نشان‌دهنده نوار جذبی آمید I پیوند آمیدی مربوط به اتصال پپتیدی پروتئین)، در  $1452 \text{ cm}^{-1}$  (نشان‌دهنده خمش گروه  $\text{CH}_3$ ) و در  $1075 \text{ cm}^{-1}$  (نشان‌دهنده ارتعاشات کششی -C-OH) است. باند جذبی در ناحیه  $3500-3000 \text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده گروه‌های -OH و -NH می‌باشد (جدول ۲). این باندها بعد از جذب فلزات سنگین تغییر کرد و افزایش یافت. تغییر و افزایش در باندهای جذبی (باندهای این ناحیه) بعد از جذب زیستی سرب یا مس در سلول‌های باکتریایی نشان دهنده دخالت این گروه‌های عاملی در جذب زیستی یون‌های فلزات سنگین سرب و مس می‌باشد. باندهای  $2927 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1654 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1452 \text{ cm}^{-1}$  و  $1075 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب نشان دهنده گروه -CH، نوار جذبی آمید I پیوند آمیدی مربوط به اتصال پپتیدی پروتئین، خمش گروه  $\text{CH}_3$  و ارتعاشات کششی -C-OH هستند (جدول ۲). این باندها بعد از

EzTaxon-e، تعیین شد. نتایج BLAST نشان داد که جدایه MKH3 دارای ۹۸ درصد هومولوژی با *انتروباکتر هورمیچنی* (*Enterobacter hormaechei*) بود. هم‌چنین توالی ژن *16S rRNA* باکتری‌های مشابه و جدایه MKH3 به کمک نرم افزار ClustalX، هم‌ردیف‌سازی شد و درخت تکاملی آن به روش Neighbor joining و به کمک نرم افزار Mega5 رسم شد. موقعیت تکاملی جدایه با سایر باکتری‌ها در شکل ۲ نشان داده شد.

## بحث

فعالیت بشر موجب افزایش تراکم فلزات سنگین در محیط زیست شده است. بر خلاف بسیاری از آلودگی‌های آلی، فلزات سنگین به دلیل تجزیه ناپذیری و ورود به زنجیره غذایی، امکان تجمع بیش از حد در برخی از بافت‌های بدن انسان و سایر موجودات، بسیار خطرناک هستند. زیست‌پالایی یک راه موثر در حذف فلزات سنگین می‌باشد. در این میان باکتری‌های مقاوم با توانایی حذف زیستی فلزات سنگین به عنوان گزینه‌های مناسب، در زیست‌پالایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. برای حذف و پاکسازی زیستی مناطق آلوده، جداسازی باکتری‌های مقاوم جهت حذف فلزات سنگین، از اهمیت زیادی برخوردار است. لذا محققان به جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین پرداخته‌اند (۱،۲۰،۲۱). Roane سودوموناس مارژینالیس (*Pseudomonas marginalis*) و باسیلوس مگاتریوم (*Bacillus megaterium*) را از خاک‌های آلوده به فلزات سنگین جدا کرد. او نشان داد که سودوموناس مارژینالیس با تولید مقدار زیادی پلی‌مر خارج سلولی، سرب را از محیط رشد حذف می‌کند درحالی‌که باسیلوس مگاتریوم سرب را داخل سیتوپلاسم سلول و در گرانول‌ها، انباشته کرد (۲۰). هم‌چنین آموزگار و همکاران باکتری‌های نمک دوست مقاوم به فلزات سنگین سرب و کادمیوم را از خاک و لجن مناطق شور ایران جداسازی نمودند و حذف زیستی سرب و کادمیوم را در آن‌ها بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که میزان جذب فلز سنگین در توده سلولی زنده بیشتر از مرده و به صورت

اگزوپلی‌ساکارید می‌باشد (۲۱). در این پژوهش باکتری MKH3 مقاوم به فلزات سنگین جداسازی شد. بررسی مولکولی نشان داد که جدایه MKH3، ۹۸ درصد هومولوژی با *انتروباکتر هورمیچنی* داشت. Hu و همکاران باکتری‌های مقاوم به کادمیوم را از پساب آلوده جدا کردند. بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی دو باکتری باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) و *انتروباکتر کوآسی* (*Enterobacter cloacae*) شناسایی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی فلزات سنگین برای *انتروباکتر کوآسی* بیشتر از جدایه باسیلوس سرئوس می‌باشد (۲۲). هم‌چنین Suriya و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی خود از بین هفت باکتری جدا شده از مناطق آلوده، باکتری *انتروباکتر کوآسی* با توانایی جذب زیستی برای فلزات سنگین سرب، کادمیوم، جیوه، کروم و مس را بررسی کردند (۲۳). مکانیسم جذب زیستی اغلب شامل برهمکنش‌های یونی و تشکیل کمپلکس میان فلزات سنگین و جایگاه‌های اسیدی در دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد. حضور این کمپلکس‌ها با کمک تجزیه و تحلیل FT-IR تایید می‌شود. آنالیز طیف FT-IR نشان می‌دهد که گروه‌های عاملی از قبیل کربوکسیل، آمید، کربونیل و هیدروکسیل میکروارگانیزم‌ها در حذف یون‌های فلزی از محیط رشد موثر هستند. در مطالعات Çabuk و همکاران (۲۰۰۶) به کمک تجزیه و تحلیل طیف FT-IR، دخالت گروه‌های عاملی در فرایند جذب زیستی باسیلوس تثبیت شده نشان داده شد. در این تحقیق طیف FT-IR باسیلوس تثبیت شده قبل و بعد از تماس با سرب مقایسه شد و گروه‌های عاملی -NH، -OH، -C=O، -COO، -C-N و -C=O در جذب سرب موثر بود (۱۴). در پژوهش حاضر تجزیه و تحلیل طیف FT-IR جدایه MKH3 با مجاورت هر دو فلز سنگین مس و سرب و نیز بدون مجاورت با فلز سنگین مقایسه شد. نتایج نشان داد که گروه‌های عاملی هیدروکسیل، کربوکسیل، آمین، کربونیل، متیل، متیلن و متین در حذف این فلزات از محیط رشد موثر هستند. اما در تحقیقات Shin و همکاران علاوه بر این که گروه‌های

مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که ژن مقاومت به سرب در جدایه MKH3 می‌تواند منشا پلاسمیدی داشته باشد. در پژوهش مشابه Coral و همکاران تعداد ۱۵ جدایه متعلق به جنس *انتروباکتر* را جداسازی کردند و مقاومت به فلزات سنگین این جدایه‌ها را بررسی کردند. نتایج حاصل از حذف پلاسمید نشان دادند که ژن مقاومت به مس، کروم، نیکل و کادمیوم نیز دارای منشا پلاسمیدی بود (۲۹).

### نتیجه گیری

در این تحقیق جدایه باکتریایی MKH3 با مقاومت زیاد نسبت به فلز سنگین سرب و مس جداسازی شد. همچنین این جدایه توانایی حذف بالای سرب و مس را نشان داد. بنابراین جدایه MKH3 می‌تواند گزینه مناسبی برای حذف زیستی فلزات سنگین بویژه سرب و مس به شمار آید. بررسی مکانیسم حذف زیستی نیز نقش گروه‌های سطحی باکتری در جذب فلز از محیط زیست را نشان داد. پیشنهاد می‌شود در تیمار پساب آلوده به فلزات سنگین سرب و مس، از مجاورسازی مستقیم توده سلولی زنده به عنوان جاذب زیستی، استفاده شود. بنابراین جدایه MKH3 می‌تواند به عنوان گزینه مناسب در پاکسازی مناطق آلوده معرفی شود.

### تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر احسان بیناییان استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر که در آنالیز دستگاهی همکاری داشتند، سپاسگزاری می‌کنیم.

### References

1. Wang J, Chen C. *Biosorbents for heavy metals removal and their future*. Biotechnology advances. 2009; 27(2): 195-226.
2. Cabuk A, Akar T, Tunali S, Gedikli S. *Biosorption of Pb (II) by industrial strain of Saccharomyces cerevisiae immobilized on the biomatrix of cone biomass of Pinus nigra: Equilibrium and mechanism analysis*. Chemical Engineering Journal. 2007; 131(1-3): 293-300.
3. Raja CE, Anbazhagan K, Selvam GS. *Isolation and characterization of a metal-resistant Pseudomonas aeruginosa strain*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006; 22(6): 577-585.
4. Wei G, Fan L, Zhu W, Fu Y, Yu J, Tang M. *Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of Lespedeza cuneata in gold mine tailings in China*. Journal of hazardous materials. 2009; 162(1): 50-56.

عاملی کربوکسیل، کربونیل، آمید، آمین، هیدروکسیل را در جدایه‌های MN3-4 مقاوم به فلز سنگین به عنوان عامل جذب سرب گزارش کردند، گروه های سولفیدریل، سولفونات و فسفات را نیز موثر معرفی کردند (۱۳). در تحقیق دیگر، جذب زیستی کروم و سرب با استفاده از طیف FT-IR بررسی شد و گروه‌های الکلی، کربوکسیلی، آمیدی و آمینی مسئول اتصال به یون‌های فلزی معرفی شد (۲۴). ژن مقاومت به فلزات سنگین می‌تواند هم روی کرموزوم باکتریایی و هم به صورت عناصر خارج کرموزومی از قبیل پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها حضور داشته باشد (۲۵، ۲۶). به این منظور می‌توان از روش حذف پلاسمید از باکتری استفاده کرد. Raja و همکاران جایگاه ژن مقاومت به فلزات سنگین مثل کادمیوم، نیکل و کروم را در *سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa)* بررسی کردند. با کمک روش حذف پلاسمید از باکتری نشان دادند که ژن مقاومت به نیکل و آمپی‌سیلین وابسته به پلاسمید است در حالیکه ژن مقاومت به کادمیوم و کروم روی کرموزوم باکتری قرار دارد (۲۷). Samanta و همکاران با استفاده از روش مشابه نشان دادند که ژن‌های مقاومت به فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک در *باسیلوس* روی پلاسمید قرار دارد (۲۸). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که جدایه MKH3 پس از حذف پلاسمید، مقاومتش را نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و سرب از دست داد و رشد جدایه در محیط کشت حاوی غلظت چهار میلی‌مولار سرب

5. Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, et al. *Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium Bacillus sp. L14*. Bioresource technology. 2010; 101(22): 8599-8605.
6. Vargas-García MDC, López MJ, Suárez-Estrella F, Moreno J. *Compost as a source of microbial isolates for the bioremediation of heavy metals*. In vitro selection. Science of the Total Environment. 2012; 431: 62-67.
7. Uslu G, Tanyol M. *Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto Pseudomonas putida. Effect of temperature*. Journal of hazardous materials. 2006; 135(1-3): 87-93.
8. Kavamura VN, Esposito E. *Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals*. Biotechnology Advances. 2010; 28(1): 61-69.



9. Zahoor A, Rehman A. *Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater*. Journal of Environmental Sciences. 2009; 21(6): 814-820.
10. Malik A. *Metal bioremediation through growing cells*. Environment International. 2004; 30(2): 261-278.
11. Ghaemy M, Aghakhani B, Taghavi M, Nasab SMA, Mohseni M. *Synthesis and characterization of new imidazole and fluorene-bisphenol based polyamides: Thermal, photophysical and antibacterial properties*. Reactive and Functional Polymers. 2013; 73(3): 555-563.
12. Abou-Shanab, RAI, Van Berkum P, & Angle, JS. *Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of Alyssum murale*. Chemosphere. 2007; 68(2): 360-367.
13. Shin MN, Shim J, You Y, Myung H, Bang KS, Cho M, et al. *Characterization of lead resistant endophytic Bacillus sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator Alnus firma*. Journal of hazardous materials. 2012; 199-200: 314-320.
14. Çabuk A, Akar T, Tunali S, Tabak Ö. *Biosorption characteristics of Bacillus sp. ATS-2 immobilized in silica gel for removal of Pb (II)*. Journal of hazardous materials. 2006; 136(2): 317-323.
15. Smejkal CW, Vallaeyts T, Seymour FA, Burton SK, Lappin-Scott HM. *Characterization of (R/S)-mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid]-degrading Alcaligenes sp. CS1 and Ralstonia sp. CS2 isolated from agricultural soils*. Environmental Microbiology. 2001; 3(4): 288-293.
16. Mohseni M, Ebrahimi H. *Isolation, identification and optimization of ethanol producing bacteria from Saccharomyces-based fermentation process of alcohol industries in Iran*. Biological Journal of Microorganism 2013; 2(7): 15-28. [Persian]
17. Mohseni M, Salehghamari M. *Molecular investigation of luxA gene to identify luminescent bacteria in Caspian Sea*. Taxonomy and Biosystematics. 2014; 5(17): 95-104. [Persian]
18. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. *Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2012; 62(Pt 3): 716-721.
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Molecular Biology and Evolution. 2011; 28(10): 2731-2739.
20. Roane TM. *Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metalcontaminated soils*. Microbial ecology. 1999; 37(3): 218-224.
21. Amoozegar MA, Ghazanfari N, Didari M. *Lead and cadmium bioremediation by Halomonas sp., an exopolysaccharide-producing Halophilic Bacterium*. Progress in Biological Sciences. 2012; 2(1): 1-11.
22. Hu Q, Dou MN, Qi HY, Xie XM, Zhuang GQ, Yang, M. *Detection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE*. Journal of Environmental Sciences. 2007; 19(9): 1114-1119.
23. Suriya J, Bharathiraja S, Rajasekaran R. *Biosorption of Heavy metals by biomass of Enterobacter Cloacae isolated from metal-polluted soils*. International Journal of ChemTech Research. 2013; 5(3): 1329-1338.
24. Shen L, Xia JL, He H, Nie ZY. *Comparative study on biosorption of Pb (II) and Cr (VI) by Synechococcus sp.* Transactions of Nonferrous Metals Society of China. 2008; 18(6): 1336-1342.
25. Cervantes C, Gutierrez-Corona F. *Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi*. FEMS Microbiology Reviews. 1994; 14(2): 121-137.
26. Wuertz S, Mergeay M, Elsas JV, Trevors JT, Wellington EMH. *The impact of heavy metals on soil microbial communities and their activities*. Modern soil microbiology. Chapter 20. Marcel Dekker, New York. 1997; 607-642.
27. Raja CE, Selvam GS, OMINE K. *Isolation, Identification and Characterization of heavy metals resistant bacteria from sewage*. In Proceeding s of International Joint Symposium. 2009; 205-211.
28. Samanta A, Bera P, Khatun M, Sinha C, Pal P, Lalee A, Mandal A. *An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain Bacillus sp. isolated from municipal waste*. J. Microbiol. Biotech. Res. 2012; 2 (1): 178-189
29. Coral MNU, Korkmaz H, Arıkan B, Coral G. *Plasmid mediated heavy metal resistances in Enterobacter spp. isolated from Sofulu landfill, in Adana, Turkey*. Annals of microbiology. 2005; 55(3), 175.

## Biosorption of Lead and Copper by Heavy Metal Resistance Bacterium using Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

**Mohseni, M. (PhD)**

Assistant Professor of Microbiology,  
University of Mazandaran, Babolsar, Iran

**Khosravi, F. (MSc)**

MSc of Molecular and Cellular Biology,  
University of Mazandaran, Babolsar, Iran

**Mohadjerani, M. (PhD)**

Assistant Professor of Biochemistry,  
University of Mazandaran, Babolsar, Iran

**Chaichi, M.J. (PhD)**

Associate Professor of Analytical  
Chemistry, University of Mazandaran,  
Babolsar, Iran

**Corresponding Author:** Mohseni, M.

**Email:** M.Mohseni@umz.ac.ir

Received: 29 Dec 2013

Revised: 7 Feb 2014

Accepted: 9 Feb 2014

### Abstract

**Background and Objectives:** Contamination of environment to lead and copper is rising due to human activities. One of the best methods to remove heavy metals from the environment is bacterial remediation. This study aimed to isolate bacteria and investigate the mechanism of lead and copper bioremediation.

**Material and Methods:** Heavy metal resistant bacteria were isolated from contaminated wastewater samples. The isolates with high resistance to lead and copper were selected for further studies and bioremediation was assessed by atomic absorption spectrophotometer. To determine the functional groups to remove metals, FT-IR was employed. In addition, plasmid curing was studied to determine the location of the genes that are resistance to heavy metals.

**Results:** Ten bacterial isolates that are resistance to heavy metals were isolated. Among these, MKH3 with the highest remediation activity removed %90 lead and %92 copper from the growth medium. The absorption mechanism of MKH3 indicated that the functional groups such as carboxyl, amide, carbonyl and hydroxyl were most effective for removal of heavy metals from the growth medium. The results revealed that heavy metal resistant genes may be located on plasmid DNA. Furthermore, molecular identification demonstrated that MKH3 was similar to *Enterobacterhormaechei* with 98% homology.

**Conclusion:** Bacterium isolated from a contaminated site showed the ability to remove a high amount of lead and copper. Thus, MKH3 could be useful for the bioremediation of heavy metals, particularly lead and copper, from industrial wastewater and contaminated sites.

**Keywords:** Biosorption, Bacteria, Lead, Copper, FT-IR