





دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

آنالیز ژنومی و سلولی بین سویه‌های بومی و سازگار شده به سرب

باکتری *Microbacterium oxydans*

نگارنده: زهرا اشرفی

استاد راهنما:

دکتر پرویز حیدری

استاد مشاور:

دکتر شیده موجرلو

مهر ۱۴۰۰

شماره: ۱۷۲

تاریخ: ۱۳۹۸/۷/۲۰

ویرایش:

باسمه تعالی

فرمهای ارزشیابی پایان نامه کارشناسی ارشد

مربوط به ورودی های ۹۴ به بعد



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم زهرا اشرفی با شماره دانشجویی ۹۷۰۲۵۵۴ رشته بیوتکنولوژی کشاورزی تحت عنوان آنالیز ژنومی و سلولی بین سویه های بومی و سازگار شده به سرب باکتری *Microbacterium oxydans* که در تاریخ ۱۴۰۰/۰۷/۱۲ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار شد به شرح ذیل اعلام می گردد:

الف) درجه عالی: نمره ۲۰-۱۹ ☐ ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸-۱۷/۹۹ ☒ ج) درجه خوب: نمره ۱۶-۱۷/۹۹ ☐ د) درجه متوسط: نمره ۱۴-۱۵/۹۹ ☐ ه) کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول و نیاز به دفاع مجدد دارد ☐ نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☒			
عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر پرویز حیدری	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	-	-	-
۳- استاد مشاور	دکتر شیده موجولو	استادیار	
۴- استاد داور اول	دکتر امین ابراهیمی	استادیار	
۵- استاد داور دوم	دکتر مهدیه پارسائیان	استادیار	
۶- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر حسن مکاریان	دانشیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر علی درخشان بنام مهری

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:



تقدیم به پدر مادر مهربانم که هر لحظه وجودم را از چشمه سار پر از عشق چشمانشان سیراب میکنند.....

تقدیم به همسرم به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و

امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است

مشکر و قدرانی:

اکنون که این تحقیق شمره ماه تلاش و کوشش بی وقفه اینجانب در عرصه علم و فن آوری در جهت رشد و بالندگی کشور عزیزم ایران است، مرمون زحمات خستگی ناپذیر اساتید محترم و همکمری و شراکت معنوی این عزیزان باین حقیر است.

لذا بر خود لازم می دانم از جناب آقای دکتر پرویز حدیری و دکتر شیده موبجری

که همواره باینش دقیق علمی خود و باروی گشاده بنده رایاری داده اند قدر دانی نمایم. بحق که بسیاری از دانسته های علمی خود را بدون لطف و عنایت این عزیزان می باشم.

الهی بر تمامی عزیزانی که از آثارشان استفاده نمودم و دوستانی که در تهیه این مختصر حقیر رایاری نمودند نظری خاص فرما که بکمی

سخت محتاج آن اکسیر نگاه و کیمیای عشق تو، مستیم. باشد که این تحقیق هر چند ناچیز، مورد استفاده دیگران که در این زمینه فعالیت

خواهند کرد قرار گیرد.

تعهد نامه

اینجانب زهرا اشرفی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **آنالیز ژنومی و سلولی بین سویه‌های بومی و سازگار شده به سرب باکتری *Microbacterium oxydans*** تحت راهنمایی دکتر پرویز حیدری متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
 - مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
 - کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .
 - حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
 - در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
 - در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .

فعالیت‌های انسانی و صنعتی شدن باعث افزایش غلظت عناصر مضر مانند فلزات سنگین در اکوسیستم شده و اثرات مخربی بر سلامت غذای موجودات زنده دارد. سرب (Pb (II)) یکی از عناصر فلزی سنگین است که اثرات مضر بر موجودات زنده دارد. باکتری‌ها به عنوان موجودات با تنوع بسیار بالا، به عنوان بخشی از میکروارگانیسم های دخیل در فرایند پالایش زیستی سرب استفاده می‌شوند. در مطالعه حاضر، اثرات طولانی مدت آلودگی سرب (LTC) تحت یک سیستم واکشت مداوم بر میزان رشد، پتانسیل زیست پالایی سرب، مکانیسم‌های بکار گرفته شده زیست پالایی سرب، تغییرات مورفولوژیکی دو سویه CM3 و CM7 باکتری *Microbacterium oxydans* مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های ما نشان می‌دهد که LTC می‌تواند pH و دما بهینه سویه‌ها را تحت تاثیر قرار دهد و همچنین قادر است نرخ رشد سویه‌های باکتریایی را در محیط دارای سرب در مقایسه با سویه‌های اولیه افزایش دهد. علاوه بر این، پتانسیل زیست پالایی سرب سویه‌های LTC به شدت در pH 6.5 افزایش یافت. زیست توده سویه‌ها از نظر توپوگرافی و درصد عناصر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مشاهدات ما نشان داد که LTC نمی‌تواند شکل سلول و ابعاد سلول سویه‌های مورد مطالعه را تغییر دهد، هر چند تغییراتی در ماده ژنتیکی ایجاد می‌کند. علاوه بر این، ما بین درصد فسفر و سرب در زیست توده سویه‌های LTC همبستگی یافتیم، که نشان می‌دهد این سویه‌ها سرب را به صورت‌هایی چون سولفات سرب و فسفات سرب برای کاهش سمیت بیشتر رسوب داده‌اند. علاوه بر این، LTC تجمع سرب را در دیواره سلولی سویه‌ها کاهش داده بود. همچنین، ناحیه اپرون Pbr در ژنوم سویه‌های مورد مطالعه تشخیص داده نشد که نشان می‌دهد آن‌ها احتمالاً از سایر انتقال دهنده‌های سرب برای خروج سرب از سیتوپلاسم استفاده کرده‌اند.

کلمات کلیدی: جهش، سویه‌های باکتری، واکشت‌های پیوسته، زیست پالایی، عناصر سنگین، مکانیسم‌های

مقاومت به سرب

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه	۱
مقدمه	۲
فصل دوم: کلیات و مرور منابع	۵
۲ کلیات	۶
۱-۲ فلزات سنگین	۶
۲-۲ عوارض و خطرات فلزات سنگین	۷
۳-۲ سرب	۷
۱-۳-۲ اثرات سرب	۸
۴-۲ راهکارهای اصلاح و پالایش فلزات سنگین	۹
۱-۴-۲ روش‌های فیزیکی و شیمیایی	۹
۲-۴-۲ زیست پالایی	۹
۵-۲ مکانیسم عمل باکتری‌ها در برابر فلزات سنگین	۱۲
۱-۵-۲ جذب به وسیله سلول‌های سطحی	۱۲
۲-۵-۲ جذب توسط EPS	۱۳
۳-۵-۲ تجمع زیستی درون سلولی	۱۴
۴-۵-۲ رسوب فلزات سنگین (سرب)	۱۶
۶-۲ مکانیسم عمل باکتری‌های مقاوم به سرب در مکان‌های آلوده به سرب	۱۶
۱-۶-۲ انتشار سرب به خارج	۱۷
۲-۶-۲ جذب سطحی بیولوژیکی	۱۷
۳-۶-۲ ایجاد فرم‌های غیر محلول سرب	۱۷
۴-۶-۲ تغییر در مورفولوژی سلول	۱۸
۵-۶-۲ نقش رنگدانه‌ها در سم زدایی فلزات	۱۸
۶-۶-۲ انتقال بیولوژیکی ارگانو سرب	۱۸

۷-۲	مکانیسم های انتخاب شده برای محافظت از سلول در برابر سمیت سرب	۱۹
۲-۷-۱	Pbr بعنوان یک ناحیه ژنومی درگیر در مقاومت به سرب	۱۹
۸-۲	دیواره سلولی و آگزوپلی ساکاریدها	۲۰
۹-۲	مکانیسم مقاومت ویژه	۲۱
۱۰-۲	برخی از باکتری های مقاوم به فلزات سنگین	۲۲
۲۵	فصل سوم: مواد و روشها	
۳-۱	باکتری های مورد مطالعه	۲۶
۳-۲	اجرای فرایند سازگار کردن باکتری ها	۲۶
۳-۳	تعیین الگوی رشد سویه های اولیه و رشد یافته در سرب	۲۶
۴-۳	تعیین میزان زیست پالایی سرب	۲۷
۵-۳	SEM آنالیز	۲۷
۶-۳	مقایسه شرایط بهینه رشد بین سویه ها با استفاده از RSM	۲۸
۳-۷	استخراج DNA از باکتری ها	۲۸
۳-۸	شناسایی ناحیه اپرون Pbr و طراحی پرایمر	۲۹
۳-۹	انجام واکنش PCR	۲۹
فصل چهارم: نتایج و بحث		۳۱
۱-۴	تغییر الگوی رشد سویه ها تحت کشت بلند مدت سرب	۳۲
۲-۴	میزان زیست پالایی سرب سویه ها	۳۵
۳-۴	مقایسه شرایط بهینه رشد بین سویه ها	۳۶
۴-۴	بررسی میکروسکوپی مورفولوژیک باکتری ها و آنالیز عنصری	۳۹
۵-۴	آنالیز سطح سلولی باکتری ها	۴۵
۶-۴	ردیابی اپرون Pbr در سویه ها	۴۶
۸-۴	نتیجه گیری کلی	۴۷
۹-۴	پیشنهادهای	۴۸
منابع		۴۹

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۲ مدل فعالیت اپرون Pbr در باکتریها. بر اساس این مدل ژنهای در اپرون وجود دارند که وظیفه خروج سرب از سیتوپلاسم را بر عهده دارند. ۲۰
- شکل ۱-۴ منحنی رشد سویه CM7 در دماها و pHهای مختلف. دادهها بر اساس میانگین و انحراف معیار ارائه شدهاند. CM7-a و CM7-b به ترتیب سویه اولیه و سویه رشد یافته در سرب میباشد. ۳۳
- شکل ۲-۴ منحنی رشد سویه CM3 در دماها و pHهای مختلف. دادهها بر اساس میانگین و انحراف معیار ارائه شده اند. CM3-a و CM3-b به ترتیب سویه اولیه و سویه رشد یافته در سرب میباشد. ۳۴
- شکل ۳-۴ میزان زیست پالایی سویه های CM7 و CM3. میزان زیست پالایی در غلظت ۱۰۰ میلیگرم بر لیتر ۳۶
- شکل ۴-۴ نمودار اثرات تغییر در دما و pH بر الگوی رشد سویه‌های مورد آزمایش پس از ۴۸ ساعت نگهداری در ۳۸
- شکل ۵-۴ شکل و ابعاد سلولی سویه‌های مورد مطالعه. الف: CM3-a، ب: CM3-b، ج: CM7-a و د: CM7-b. نتایج بر اساس آنالیز میکروسکوپ الکترونی SEM میباشد. ۴۰
- شکل ۶-۴ ترکیب عناصر موجود در نمونه شاهد که فاقد باکتری میباشد. نتایج بر اساس درصد کل عناصر موجود در محیط کشت که توسط آنالیز EDS تعیین شده است ارائه گردید. ۴۰
- شکل ۷-۴ نتایج آنالیز EDS برای سطح بیوماس حاصل از رشد سویه CM3. الف: CM3-a در pH 5.0، ب: CM3-b در pH 5.0، ج: CM3-a در pH 6.5، د: CM3-b در pH 6.5. نتایج بر اساس درصد کل عناصر موجود در محیط کشت که توسط آنالیز EDS تعیین شده است ارائه گردید. ۴۳
- شکل ۸-۴ نتایج آنالیز EDS برای سطح بیوماس حاصل از رشد سویه CM7. الف: CM7-a در pH 5.0، ب: CM7-b در pH 5.0، ج: CM7-a در pH 6.5، د: CM7-b در pH 6.5. نتایج بر اساس درصد کل عناصر موجود در محیط کشت که توسط آنالیز EDS تعیین شده است ارائه گردید. ۴۴
- شکل ۹-۴ آنالیز SEM برای تک سلول باکتریها (الف) و نتایج EDS سطح سلولی سویه‌های آزمایش شده (ب). * و ns به ترتیب معناداری در سطح احتمال ۵ درصد و عدم معناداری بر حسب نتایج آزمون t میباشد. ۴۵

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۳ دامنه متغیرهای غیر وابسته مورد آنالیز در مدل RSM	۲۸
جدول ۱-۴ نتایج سطح بهینه متغیرهای مستقل برای حداکثر رشد سویه ها در محیط دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات سرب	۳۸
جدول ۲-۴ لیست پرایمرهای استفاده شده جهت ردیابی اپرون Pbr در سویه های مورد مطالعه	۴۷

فصل اول: مقدمه

مقدمه

در اثر صنعتی شدن و فعالیت‌های انسان، غلظت عناصر سنگین همچون سرب (Pb)، کادمیوم (Cd)، مس (Cu) و نیکل (Ni) در کره زمین افزایش یافته است. ورود این عناصر به چرخه غذایی برای سلامتی انسان بسیار خطرناک می‌باشد. سرب از جمله عناصر سنگین با فراوانی بالا در خاک است که عملکرد بیولوژی ندارد و سبب اختلال در سیستم عصبی و گوارشی شده و بعنوان یکی از عوامل ایجاد کننده سرطان شناخته شده است (Bueno *et al.*, 2008). همچنین سرب با آسیب زدن به سلول باعث تنش اکسیداتیو در موجودات زنده می‌شود و در نتیجه آن، رشد و میزان متابولیسم‌های سلولی کاهش می‌یابد (Kushwaha *et al.*, 2018). جهت کاهش یا حذف این عناصر خطرناک از محیط، روش‌های مختلفی ارائه شده است که می‌توان به روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی اشاره کرد. روش‌های فیزیکی مانند جابجایی مواد آلوده، شستشو و تفکیک مواد آلوده از جمله روش‌هایی هستند که در مقیاس گسترده قابل استفاده نیستند و همچنین استفاده از روش‌های شیمیایی هزینه‌بر می‌باشد. روش‌های زیستی حذف یا کاهش سمیت عناصر سنگین را زیست پالایی می‌نامند که در این روش‌ها از گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها استفاده می‌شود (Heidari and Panico, 2020).

باکتری‌ها که از جمله موجودات با تنوع بسیار بالا هستند که در اکثر نقاط کره زمین یافت می‌شوند و در صنایع مختلف همچون پزشکی، کشاورزی، صنعت و محیط زیست استفاده می‌شوند. مطالعات نشان داده است که برخی از سویه‌های باکتریایی مقاومت بالایی به سمیت عناصر سنگینی همچون سرب دارند. همچنین از آن‌ها جهت استخراج عناصر با ارزشی همچون طلا و مس می‌توان استفاده کرد. باکتری‌های مقاوم به سرب از نمونه‌های مختلف آلوده فلزات سنگین جداسازی و شناسایی شده‌اند. باکتری‌های مقاوم از مکانیسم‌های مختلفی همچون تجمع عناصر سمی در غشای پری پلاسمی و یا در درون دیواره سلولی، تجمع در سطح سلول و تبادل یونی و تبدیل عناصر سمی به فرم‌های غیر محلول استفاده می‌کنند. در این مکانیسم‌ها عواملی همچون ساختار ژنتیکی باکتری، ترکیبات متصل به دیواره سلولی (مانند لیپیدها، پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها) نقش مهمی در میزان مقاومت باکتری و پتانسیل زیست‌پالایی آن دارد. از طرف

دیگر عوامل محیطی مانند دما، میزان pH، غلظت عناصر و میزان اکسیژن در برهمکنش بین عناصر و سلول باکتری موثر هستند و بر کارایی زیست پالایی تاثیر می گذارند. لذا در یک سیستم زیست پالا بایستی سطح بهینه این عناصر تعیین و اعمال گردد (Heidari and Sanaeizadeh, 2020).

ایجاد مقاومت در باکتری ها می تواند باعث وجود عناصر سمی در محیط رشد آن ها در بلند مدت باشد و این عناصر سبب تغییراتی در ماده ژنتیکی و مکانیسم های زیست پالایی شوند. در نتیجه این تغییرات (جهش)، سویه های جدیدتر با مقاومت بیشتر تولید و گسترش می یابند. این احتمال وجود دارد که هر دو ماده ژنتیکی باکتری (کروموزوم و پلاسمید) تحت تاثیر این جهش قرار گیرند. لذا این احتمال وجود دارد که تحت سمیت بلند مدت عناصر جهش هایی در باکتری ها رخ دهد که سبب تغییرات در ساختار دیواره سلولی شود و در نتیجه مقاومت به این عناصر افزایش یابد.

با توجه به مطالب ذکر شده بررسی این موضوع که آیا کشت بلند مدت یک باکتری در محیط آلوده به عناصر سمی می تواند سویه های مقاوم ایجاد کند؟ این تحقیق طرح گردید. در این پژوهش از دو سویه CM3 و CM7 باکتری *Microbacterium oxydans* بعنوان سویه های مقاوم به سرب استفاده شد و این سویه ها بصورت بلند مدت در محیط های دارای سرب واکشت شدند و در نهایت پتانسیل و مکانیسم های زیست پالایی و تغییرات در شکل و ماده ژنتیکی آنها با سویه های اولیه مورد مقایسه قرار گرفت.

در کل اهداف این تحقیق شامل موارد زیر بود:

- مطالعه تغییرات سلولی باکتری *M. oxydans* در محیط های آلوده به سرب
- بررسی میزان جهش زایی سرب بر باکتری ها
- تعیین تغییرات در پتانسیل سویه های مورد بررسی

فصل دوم: کلیات و مرور منابع

۲ کلیات

۲-۱ فلزات سنگین

آلودگی فلزات سنگین یک مشکل زیست محیطی جهانی می‌باشد که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برخلاف آلاینده‌های مرسوم، فلزات سنگین به طور کلی پایدار هستند و زیست تخریب‌پذیر نیستند، اگرچه غلظت آن‌ها بسیار کم است. با فعالیت‌های انسان و صنعتی شدن، میزان این آلاینده‌ها در محیط زیست هر روز در حال افزایش می‌باشد. آلودگی فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های زیست محیطی در سراسر جهان است. فلزات سنگین سمی با گذشت زمان در محیط جمع می‌شوند و حیات موجودات زنده را به شدت تهدید می‌کنند (Heidari and Panico, 2020).

فلزاتی که بیشترین پتانسیل سمی برای محیط زیست را دارند شامل، سرب، کادمیوم، آرسنیک، روی، کروم، جیوه و مس هستند (Dong et al., 2011; Nabulo et al., 2010). فلزات سنگین غیر ضروری مانند جیوه، سرب و کادمیوم در هر غلظتی برای محیط زیست سمی در نظر گرفته می‌شوند. بر این اساس به آنها فلزات سمی گفته می‌شود. شاید بزرگترین منابع طبیعی محیطی فلزات سنگین، انتشار آتشفشان، آتش سوزی جنگل‌ها، دریاچه‌ها در دریای عمیق و آبفشان‌ها باشد (Fergusson et al., 1990; Malik, 2004). از جمله فلزاتی که زندگی انسان را بیشتر تحت شعاع قرار می‌دهند شامل؛ سرب، کادمیوم، آرسنیک، آلومینیوم، جیوه و کروم می‌باشد. بر اساس تقسیم‌بندی نایبر و ریچاردسون عناصر سنگین به تعدادی از فلزات و یون‌های آن‌ها اطلاق می‌شود که عدد اتمی آن‌ها بیش‌تر از ۲۰ باشد (Nieboer and Richardson, 1980). از جمله عناصر سنگین می‌توان به کادمیوم، روی، سرب، مس، نیکل، جیوه و کروم اشاره کرد. در بین فلزات سنگین سرب، کادمیوم و جیوه از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌ها هستند که در اثر فعالیت‌های مدرن انسانی تولید می‌شوند (Bai et al., 2008). آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین سمی همراه با پیشرفت صنعتی در جهان در حال گسترش است. مشکل خاص مرتبط با فلزات سنگین در محیط، تجمع آن‌ها در زنجیره غذایی و ماندگاری آن‌ها در طبیعت می‌باشد (Pino et al., 2006). آلودگی زیستگاه‌های طبیعی توسط فلزات سنگین از طریق فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی به دلیل سمیت این مواد و

مشکل در اصلاح آن‌ها، می‌تواند بر سلامت موجودات و محیط زیست تاثیر منفی بگذارد (Bahadir et al., 2007).

۲-۲ عوارض و خطرات فلزات سنگین

فلزات سنگین علائم و خسارات متعددی دارند. در گیاهان، این عناصر قادر به جلوگیری از طویل شدن ریشه‌ها، کاهش فتوسنتز، کاهش فعالیت‌های آنزیمی و نیز باعث وارد شدن آسیب اکسیداتیو به غشاها می‌شوند (Shah and Klessig, 1999). تجمع فلزات سنگین در بدن انسان منجر به اختلال در تعادل، سرد شدن پاها، نقص ایمنی، تحریکات پوستی، مشکلات گوارشی، خستگی، ناراحتی‌های قلبی و افزایش فشارخون، تحریک‌پذیری، ایجاد حساسیت، فراموشی و گیجی می‌شود.

۲-۳ سرب

سرب یکی از مهم‌ترین فلزات سمی است و یک عنصر پایدار با عدد اتمی بالا است که در صنایعی از جمله باتری‌سازی، لحیم‌کاری و محافظت در برابر اشعه کاربردهای زیادی دارد (Tong et al., 2000). همچنین سرب از جمله فراوان‌ترین فلزات سنگین موجود در خاک است که عملکرد بیولوژی ندارد و سبب اختلال در سیستم عصبی و گوارشی شده و به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده سرطان شناخته شده است (B Y M Bueno et al., 2008). سرب یک عنصر غیر ضروری برای بدن انسان است و مصرف بیش از حد این فلز می‌تواند به سیستم عصبی، اسکلتی، گردش خون، آنزیمی، غدد درون ریز و سیستم ایمنی بدن افراد آسیب برساند (Ferraro et al., 2015). سرب به دلیل سمیت بالا و ماندگاری طولانی مدت آن در محیط یک سم تجمعی است (Lam et al., 2007). سرب از اهمیت بیولوژیکی برخوردار نیست و در غلظت‌های بسیار کم سمی است (Bruins et al., 2000).

سرب یک فلز فراگیر در محیط است که بر تمام موجودات زنده تاثیر منفی می‌گذارد. همچنین سرب (II) نسبت به فلزات اساسی مانند کلسیم و روی میل ترکیبی بیشتری را به گروه تیول و اکسیژن نشان می‌دهد (Bruins et al., 2000). بنابراین ۴۱۰ میلی‌گرم در لیتر سرب را به عنوان سطح مجاز بی خطر در آب

آشامیدنی توصیه کرده‌اند (Watt *et al.*, 2000). هرچند که توصیه شده‌است این مقدار کمتر از ۸۰ میلی گرم در لیتر باشد. سمیت سرب (II) در نتیجه تغییر در ترکیب اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها، مهار فعالیت آنزیم‌ها، اختلال در عملکرد غشا و فسفوریلاسیون، اکسیداتیو و همچنین تغییرات تعادل اسمزی رخ می‌دهد (Bruins *et al.*, 2000).

۲-۳-۱ اثرات سرب

اثرات سرب بر انسان شامل آسیب به سلول‌های عصبی، بیش‌فعالی، نقص در یادگیری، کاهش قدرت باروری و آسیب به سیستم کلیوی می‌باشد. همچنین از جمله اثرات سرب بر گیاهان می‌توان به تاثیر روی رشد و فتوسنتز آن‌ها، مهار فعالیت‌های آنزیمی و جوانه‌زنی بذر و ایجاد تنش اکسیداتیو اشاره کرد. سرب در میکروارگانیسم‌ها باعث دنا توره شدن اسید نوکلئیک و پروتئین شده و فعالیت آنزیم‌ها و رونویسی را مهار می‌کند (Heidari and Panico, 2020a; Malik, 2004).

سرب یک آلاینده پایدار محیطی است که به آرامی جمع می‌شود و منجر به بزرگ‌نمایی‌های زیستی در سطوح مختلف زنجیره‌های غذایی می‌شود و بنابراین به عنوان سم تجمعی شناخته شده است (Choińska-Pulit *et al.*, 2018; Flora *et al.*, 2008; Lombardi *et al.*, 2010). آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده (EPA) سرب را در لیست پسماندهای غیر آلی خطرناک قرار داده است. با این حال، سرب هیچ‌گونه عملکرد بیولوژیکی ندارد و اثرات سمی بر موجودات زنده دارد و در استخوان‌ها و بافت‌ها جمع می‌شود و همچنین سرب می‌تواند به سیستم عصبی و رشته‌های DNA آسیب برساند (Jaishankar, 2018; Tiquia-Arashiro, 2014; *et al.*). آلودگی فلزات به دلیل ماندگاری آن‌ها در محیط زیست بسیار نگران‌کننده است، زیرا نه تنها می‌تواند طیف وسیعی از عواقب زیان‌آور را بر اکوسیستم‌های تحت تأثیر و محیط زیست مرتبط ایجاد کند، بلکه از طریق اثرات جهش‌زایی و سرطان‌زایی به سلامت انسان آسیب می‌رساند (Dong *et al.*, 2011; Pérez-de-Mora *et al.*, 2006).

۲-۴ راهکارهای اصلاح و پالایش فلزات سنگین

جهت کاهش سمیت یا پالایش محیط‌های آلوده به سرب، روش‌های مختلفی بر حسب نوع ماده آلوده شده، سطح آلودگی و هدف از پالایش ارائه و توسعه یافته‌اند. به طور کلی سه روش برای اصلاح و پالایش فلزات سنگین در نظر گرفته شده است که شامل: ۱- روش اصلاح فیزیکی، ۲- روش اصلاح شیمیایی و ۳- زیست پالایی می‌باشد.

۲-۴-۱ روش‌های فیزیکی و شیمیایی

اغلب روش‌های فیزیکی و شیمیایی اصلاح مناطق آلوده به فلزات سنگین (نظیر خاک‌برداری، سخت و جامد کردن و دفن کردن در زیر خاک، آب شویی، تیمار گرمایی، استفاده از فیلترها و نانو غشاها و احیای الکتریکی) بسیار پرهزینه هستند و یا به‌طور ساده شامل ایزولاسیون منطقه‌ی آلوده می‌باشند. برخی از روش‌ها نظیر شستشوی خاک نیز اثرات مضر بر فعالیت زیستی، حاصلخیزی و ساختمان خاک می‌گذارند و از طرفی هزینه‌های مهندسی بسیار زیادی را هم در پی خواهند داشت و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند (Siegel, 2002; Spiro and Stigliani, 2003; Gadd, 2010).

در مقایسه با مواد آلی، فلزات در محیط پایدار هستند و به دلیل سمیت و آبریز بودن به راحتی از طریق روش‌های فیزیکی و شیمیایی تخریب نمی‌شوند (Guitttonny-Philippe et al., 2014). لذا روش‌های سازگار با محیط زیست و قابل استفاده در سطح گسترده همچون زیست پالایی گسترش یافت.

۲-۴-۲ زیست پالایی

زیست پالایی یکی از این روش‌های جایگزین است که به‌صورت عمل باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان در تجزیه یا دگرگون کردن آلاینده‌های محیط زیستی تحت شرایط کنترل‌شده تا یک سطح بی‌خطر و یا سطوح پایین‌تر از غلظت‌های مقرر شده توسط مراجع قانون‌گذاری تعریف می‌شود (Gadd, 2010; Nieboer and Richardson, 1980). زیست پالایی به عنوان یک فرآیند زیستی، پتانسیل زیادی برای کاهش سمیت فلزات سنگین مانند سرب از مکان‌های آلوده دارد. زیست پالایی به فرایندی گفته می‌شود که در آن از

گیاهان یا میکروارگانیسیم‌ها برای رفع یا کاهش آلاینده‌های محیطی یا تخریب مواد مضر سمی به محیط استفاده می‌شود (Gaylarde and Gaylarde, 2005). تصفیه زیست محیطی نسبت به استراتژی‌های فیزیکوشیمیایی هزینه کمتری دارد و کارآمدتر است و اخیراً این روش در تصفیه خاک‌های آلوده به فلزات سنگین گسترش بیشتری یافته است (Heidari et al., 2020a; Kalpana et al., 2018).

زیست پالایی کاربردهای متنوعی را ارائه می‌دهد و ابزاری ارزشمند برای مدیریت آلودگی محیط زیست به حساب می‌آید (Yakubu, 2007). مزایای اصلی زیست پالایی شامل: توانایی موجودات زنده بیولوژیکی که به جای انتقال مواد مضر از یک محیط به محیط دیگر تجزیه بیولوژیکی انجام می‌دهند، هزینه کم در مقایسه با سایر روش‌های اصلاح و تنوع زیاد مواد جایگزین است که بنابراین اجازه می‌دهد این نوع فرآیند برای از بین بردن انواع مواد آلاینده و آلودگی‌ها از جمله فلزات استفاده شود (Yakubu, 2007). در میان روش‌های اصلاح، زیست پالایی به عنوان یک روش عالی در نظر گرفته شده است که می‌تواند ساختار خاک و اکوسیستم‌ها را با حداقل انرژی مورد نیاز ترمیم کند (Bharali et al., 2018).

در بین سلول‌های زنده، باکتری‌ها به علت تنوع بالا و قدرت تطبیق پذیری گسترده‌ای که دارند بیشتر در زیست پالایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در مطالعات متعددی زیست پالایی باکتریایی برای کاهش و از بین بردن آلودگی‌های مربوط به آلاینده‌های آلی و فلزی استفاده شده است (Gupta and Diwan, 2017; Shin et al., 2012).

در کل می‌توان زیست پالایی را در دو بخش اصلی تقسیم بندی کرد:

۱- زیست پالایی توسط میکروب‌ها (باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و جلبک‌ها)

۲- گیاه پالایی (شامل استخراج گیاهی، تصفیه ریزوسفری، تثبیت گیاهی، دگرگونی گیاهی و تبخیر گیاهی) است.

از این میان میکروب‌ها، باکتری‌ها کاربرد بالایی در زیست پالایی دارند. زیست پالایی یک روش مقرون به صرفه با استفاده از ارگانیسیم‌های زنده شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و جلبک‌ها برای سم‌زدایی

از محیط‌های آلوده به فلزات سنگین است (Dabir *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2017). با این حال، فعالیت فشرده انسان و بهره‌برداری از ذخایر طبیعی منجر به گسترش میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر فلز گردید (Bruins *et al.*, 2000).

استفاده از میکروارگانیسم‌ها یک راه حل جایگزین را نشان می‌دهد، که به دلیل امکان بازسازی جاذب زیست محیطی، مقرون به صرفه بودن، افزایش حذف فلز و بازیابی آسان برخی از فلزات ارزشمند، سودمند است (Heidari and Sanaeizade, 2020). استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای کاهش سمیت فلزات سنگین که معمولاً با تکنیک گیاه درمانی همراه است، به عنوان یک روش دوستدار طبیعت شناخته می‌شود (Cui *et al.*, 2017; Kushwaha *et al.*, 2018). گونه‌های باکتریایی متحمل فلزات سنگین را می‌توان برای زیست پالایی فلزات سنگین مورد ارزیابی قرار داد و براساس پتانسیل‌های موجود از آن‌ها استفاده کرد. بیوتکنولوژی میکروبی به عنوان یک راه حل موثر و سازگار با محیط زیست در سال‌های اخیر برای تصفیه زیستی فلزات سنگین پدید آمده است. بنابراین، باکتری‌های جدا شده از مکان‌های آلوده به فلزات سنگین، مناسب‌ترین کاندیداها برای تصفیه زیستی فلزات سنگین هستند (Malik, 2004).

همچنین، سوبه‌های باکتریایی که از نمونه‌های آلوده خاک و آب جدا شده‌اند، از پتانسیل بالایی برای استفاده در فرایند تصفیه بیولوژیکی سرب برخوردار هستند (Dabir *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2015). باکتری‌ها از نظر متابولیسم و عملکرد از تنوع بالایی برخوردارند که می‌تواند بر تولید گیاه و سلامت خاک تأثیر بگذارد (Wu *et al.*, 2018). باکتری‌های گرم منفی در مطالعات صورت گرفته بیشترین استفاده را در پالایش زیستی فلزات داشتند. کاربرد پالایش زیستی فلزات با استفاده از باکتری‌های گرم منفی به این واقعیت مربوط می‌شود که این گروه باکتریایی دستگاه فیزیولوژیکی بهتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارند. به عنوان مثال، دیواره سلولی گونه‌های باکتریایی گرم منفی دارای محتوای بالایی از سایت های شیمیایی بالقوه فعال فلزات است (Puig and Thiele, 2002).

۲-۵ مکانیسم عمل باکتری‌ها در برابر فلزات سنگین

کاملاً مشهور است که فلزات به طور مستقیم یا غیرمستقیم در فرآیندهای متابولیکی مختلف باکتری‌ها نقش اصلی را بازی می‌کنند. این اجازه می‌دهد سلول‌های باکتری حتی در حضور برخی از فلزات سنگین سمی رشد کنند. دو مکانیسم متفاوت در باکتری‌ها وجود دارد که از طریق آن‌ها فلز سنگین می‌تواند وارد سلول باکتری شود. اولین مکانیسم غیراختصاصی است که در انتقال فعال ثانویه (ATP مستقل) کار می‌کند و از گرادیان شیمیوسموتیک در سراسر غشای سلول برای جذب فلزات سنگین استفاده می‌کند. این مکانیسم امکان انتقال سریع فلزات سنگین به داخل سلول‌ها را فراهم می‌کند. دوم، مکانیسم وابسته به ATP برای جذب فلزات سنگین توسط سلول‌های باکتریایی است. در مقایسه با مکانیسم مستقل (غیروابسته) ATP نسبتاً کندتر و بسیار خاص بستر می‌باشد (Spain and Alm, 2003). باکتری‌ها فرآیندهای زیادی را برای تحمل فلزات سنگین یعنی حمل و نقل از طریق غشای سلول، تجمع در دیواره سلول، به دام انداختن درون و همچنین خارج سلولی، تشکیل کمپلکس‌ها و واکنش‌های اکسیداسیون دارند که اساس استراتژی‌های مختلف زیست پالایی را ایجاد می‌کند. عوامل تعیین کننده ژنتیکی برای بسیاری از این مقاومت‌ها روی پلاسمیدها قرار دارد اما برخی از آنها ممکن است کروموزومی نیز باشند. سلول‌های باکتریایی می‌توانند توسط فرآیندهای وابسته به ATP و هم از طریق فرآیندهای مستقل ATP، مقدار زیادی فلزات سنگین را جذب کنند. دیواره سلول باکتری نیز نقش بسیار مهمی در تجمع فلزات سنگین توسط سلول‌های باکتری ایفا می‌کند. باکتری‌های گرم مثبت غلظت بسیار بیشتری از فلزات سنگین را در دیواره‌های سلولی خود نسبت به باکتری‌های گرم منفی تجمع می‌دهند. بنابراین، باکتری‌های مقاوم در برابر فلزات سنگین برای تصفیه بیولوژیکی آلاینده‌های فلزات سنگین از مناطقی که غلظت زیادی از فلزات سنگین خاص دارند، مهم هستند (Heidari and Panico, 2020).

۲-۵-۱ جذب به وسیله سلول‌های سطحی

دیواره سلولی مانعی طبیعی برای فلزات سمی است، زیرا گروه‌های عملکردی چندین ماکرومولکول موجود در دیواره سلول در اتصال فلزات نقش دارند (Fomina and Gadd, 2014). دیواره سلولی هر دو

باکتری گرم مثبت و گرم منفی به طور طبیعی یک بار منفی دارند، که به کاتیون‌های فلز متصل می‌شوند و حرکت فلزات را در سراسر غشا تنظیم می‌کنند. گروه‌های کربوکسیل در دیواره‌های سلول‌های باکتریایی گرم مثبت، مکان‌های اصلی اتصال برای کاتیون‌های فلزی هستند، در حالی که گروه‌های فسفات به طور چشمگیری به اتصال فلز در باکتری‌های گرم منفی کمک می‌کند (Gadd, 2009). گروه‌های کربوکسیل، فسفات، هیدروکسیل و آمینو در دیواره سلولی سودوموناس آئروژینوزا ASU6a برای اتصال به سرب شناخته می‌شوند (Gabr et al., 2008). در حالی که مولکول‌های دارای گروه‌های آمید، آمینو، هیدروکسیل یا کربوکسیل در دیواره سلول باکتری *Synecochoccus* sp. در اتصال به سرب شرکت می‌کنند (Shen and Yang, 2008). ظرفیت جذب سرب در سطح سلول به شدت تحت تأثیر میزان pH و غلظت اولیه سرب قرار دارد. مطالعه اثر pH بر حذف فلز (به عنوان مثال، سرب) توسط *Pseudomonas pseudoalcaligenes* و *Micrococcus luteus* نشان می‌دهد که جذب بیولوژیکی فلز با افزایش pH از ۲ به ۶ افزایش یافته است و حداکثر ظرفیت جذب در pH=5 و غلظت اولیه فلز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر (ppm) حاصل می‌شود (Leung et al., 2000).

۲-۵-۲ جذب توسط EPS¹

مکانیسم دیگری که بسیاری از باکتری‌های متحمل فلز دارند، شامل جذب فلزات با ترشح مواد پلیمری خارج سلول است (EPS). این EPS به دلیل درگیری در فرآیند لخته‌سازی و اتصال یون‌های فلزی از محلول‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برای فرآیند پالایش زیستی برخوردار است (Salehizadeh and Shojasadati, 2003). بیوپلیمرهای خارج سلولی با وزن مولکولی بالا که توسط سلول‌های باکتریایی ترشح می‌شوند، به عنوان اگزوپلی ساکاریدها (EPS) نامیده می‌شوند، از ماکرو مولکول‌هایی مانند پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، مواد هیومیک، لیپیدها و سایر ترکیبات غیر پلیمری با وزن مولکولی کم تشکیل شده است (Bramhachari et al., 2007). این اگزوپلی ساکاریدها از نظر شیمیایی متنوع هستند

¹ Extracellular polymeric substances

و اکثراً هتروپلی ساکاریدهای اسیدی با گروه‌های عملکردی مانند هیدروکسیل، کربوکسیل، آمیدها و فسفوریل هستند که میل ترکیبی زیادی به فلزات سنگین دارند (Bhaskar and Bhosle, 2006; Braissant *et al.*, 2007; Bramhachari *et al.*, 2007). EPS ترکیبی پیچیده از پلیمرهای پلی آنیونیک با وزن مولکولی بالا، مانند پروتئین‌ها، اسیدهای هیومیک، پلی ساکاریدها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند که فلزات کاتیونی را با درجات مختلف خاصیت و میل را متصل می‌کنند (Bhaskar and Bhosle, 2006; Gupta and Diwan, 2017). فرآیند اتصال منجر به بی حرکتی فلزات می‌شود و از ورود فلزات کاتیونی سمی به سلول جلوگیری می‌کند و یک مکانیسم کارا می‌باشد (Roane, 1999; Salehizadeh and Shojasodati, 2003; Kalita and Joshi, 2017).

ساختار و ترکیب EPS با توجه به فاز رشد باکتری متفاوت است و بنابراین حذف بیشتر سرب در مرحله ثابت (سکون) به دلیل ترکیب قند اسیدی خالص در EPS مشاهده می‌شود (Raungsomboon *et al.*, 2006). لجن فعال همیشه منبع غنی از چندین گونه باکتری مقاوم در برابر فلز بوده‌است. EPS حاصل از لجن، پیچیدگی فلزی بیشتری نسبت به کشت خالص باکتری‌ها از خود نشان می‌دهد. حالت فلزات سمی عامل مهمی در تنظیم سمیت فلزات است زیرا فلزات محلول می‌توانند با سرعت بیشتری به غشاهای سلولی نفوذ کنند (Roane, 1999).

۲-۵-۳ تجمع زیستی درون سلولی

تجمع زیستی یک فرآیند متابولیکی فعال است که به انرژی نیاز دارد (Velásquez and Dussan, 2009). بر خلاف فرآیند جذب زیستی که در بالا توضیح داده شد، تجمع زیستی درواقع اتصال به فلزات در داخل سلول است.

میکروارگانیسیم‌ها چندین مکانیسم مقاومت در برابر اثرات سمی فلزات سنگین و فلزات آلی تکامل داده‌اند. یکی از مکانیسم‌های رایج القا پروتئین‌های خاص متصل به فلز است که باعث تجمع زیستی فلزات سمی در داخل سلول می‌شود. این پروتئین‌های متصل شونده به فلز به عنوان متالوتیونین (MT) شناخته

می‌شوند. متالوتیونین‌ها نقش مهمی در بی‌حرکتی فلزات سنگین سمی دارند و از این طریق از فرآیندهای متابولیک باکتریایی کاتالیز شده توسط آنزیم‌ها محافظت می‌کنند. علاوه بر این، میکروب‌ها می‌توانند با ایجاد پروتئین‌های متصل به فلز (متالوتیونین (MT)) بی‌حرکتی فلزات سنگین را افزایش داده و سمیت فلزات سنگین را کاهش می‌دهند (Naik et al., 2013; Roane, 1999). این مکانیسم مقاومت اغلب از طریق پلاسمید منتقل می‌شود که باعث پراکندگی آن از یک سلول به سلول دیگر می‌شود (Singh et al., 2016). احتمالاً مشهورترین مکانیسم شامل اتصال فلز با متالوتیونین‌ها است. متالوتیونین‌ها دارای پروتئین غنی از سیستئین با وزن مولکولی کم هستند که جداسازی (یا تجزیه) یا تجمع زیستی فلزات سمی در داخل سلول را تسهیل می‌کند (Hamer, 1986).

این مکانیسم مقاومت اغلب از طریق پلاسمید منتقل می‌شود که باعث پراکندگی آن از یک سلول به سلول دیگر می‌شود (Singh et al., 2016). باکتری‌ها در پاسخ به افزایش قرارگرفتن در معرض فلز، متالوتیونین را سنتز می‌کنند (Bandowe et al., 2014; Blindauer et al., 2002). به طور مثال باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas putida* و *Synechococcus* PCC 7942 برای حفظ هموستاز فلز سیتوزولی، متالوتیونین را سنتز می‌کنند (Blindauer et al., 2002). آن‌ها در تمام یوکاریوت‌ها و باکتری‌های مختلف یافت می‌شوند. اولین MT باکتریایی شناخته شده SmtA ناشی از کادمیوم در سیانوباکتریوم دریایی *Synechococcus* sp. بود (Olafson et al., 1979). یکی دیگر از متالوتیونین‌های باکتریایی، پروتئین MymT (۴.۹ کیلو دالتون) در *Mycobacterium tuberculosis*، بیان *MymT* که مقاومت در برابر مس و کادمیوم را ایجاد می‌کند، یافت شد (Alvarez-Legorreta et al., 2008). وجود ژن‌های متالوتیونین باکتریایی منتقل‌شده توسط پلاسمیدها، *bmtA* و *smtAB* در سویه‌های مقاوم به سرب می‌تواند به جداسازی داخل سلولی سرب نسبت داده شود (Naik and Dubey, 2013).

چندین سویه باکتریایی گزارش شده که متالوتیونین‌ها را رمزگذاری می‌کنند شامل:

Synechococcus PCC 7942 (SmtA)-۱

Anabaena PCC7120 (SmtA)-۲

Oscillatoria brevis (BmtA)-۳

(Blindauer et al., 2002; Gupta and Diwan, 2017).

۲-۵-۴ رسوب فلزات سنگین (سرب)

در نتایج برخی محققان چندین گونه باکتری که باعث رسوب سرب به صورت سولفات سرب شده اند، گزارش شده است:

نایک و دیوبی (۲۰۱۳) در گزارشات خود از باکتری *Providencia alcalifaciens* 2EA در این زمینه نام بردند (Naik and Dubey, 2013). میره و همکاران (۲۰۰۴) باکتری *Vibrio harveyi* را در تحقیقات خود گزارش دادند که توانایی رسوب بالایی داشت (Mire et al., 2004). چن و همکاران (۲۰۱۵) نیز در بررسی خود از باکتری *Bacillus thuringiensis* 016 به عنوان باکتری که سرب را به سولفات سرب تبدیل می کند ذکر کرده اند (Chen et al., 2015). هرچند که سرب بصورت فسفات نیز می تواند در خارج سلول رسوب کند که در ادامه به آن خواهیم پرداخت.

۲-۶ مکانیسم عمل باکتری های مقاوم به سرب در مکان های آلوده به سرب

جالب توجه است که تعداد کمی از سویه های میکروبی طبیعی از جمله باکتری ها از مکانیسم های محافظتی متنوعی برای زنده ماندن در مقادیر بسیار بالای سرب بدون هیچ تاثیری در رشد و متابولیسم آن ها استفاده می کنند. استراتژی های مختلفی که باکتری ها از طریق آن ها در برابر غلظت های بالای سرب مقاومت می کنند، شامل مکانیسم های:

انتشار به خارج، تجمع زیستی درون سلول، جداسازی خارج سلولی، جذب سطحی بیولوژیکی، تغییر در مورفولوژی سلولی، نقش رنگدانه ها در سم زدایی فلزات و انتقال بیولوژیکی ارگانو سرب است (Blindauer et al., 2002; Borremans et al., 2001; B.Y.M. Bueno et al., 2008; Levinson et al., 1999). سویه های باکتریایی دارای این ویژگی های منحصر به فرد ابزاری ایده آل در تصفیه زیست محیطی مکان های محیطی آلوده به سرب هستند.

۲-۶-۱ انتشار سرب به خارج

گروهی از پروتئین‌ها هستند که در انتقال فلزات سنگین به خارج از غشای سلول و کنترل مقاومت در برابر فلزات سنگین باکتریایی نقش دارند. این پروتئین‌های حمل‌کننده از تجمع بیش از حد یون‌های فلزی بسیار سمی و واکنش‌پذیر مانند سرب، مس، نقره، روی و کادمیوم جلوگیری می‌کنند (Blindauer et al., 2002).

۲-۶-۲ جذب سطحی بیولوژیکی

جذب سطحی بیولوژیکی نیز مکانیسمی برای جداسازی خارج سلولی فلزات سنگین سمی است تا از ورود آن‌ها به داخل سلول‌های باکتری جلوگیری کند و در نتیجه هموستازی فلز سمی را حفظ می‌نمایند. جذب زیستی فلزات توسط چندین مکانیسم دیگر نیز مانند تبادل یونی، کلات شدن، جذب و انتشار از طریق دیواره و غشای سلول ایجاد می‌شود (Heidari and Panico, 2020a; Holan and Volesky, 1994).

۲-۶-۳ ایجاد فرم‌های غیر محلول سرب

ایجاد فرم‌های غیر محلول، مکانیسم دیگری است که توسط چندین باکتری برای کاهش غلظت فلزات آزاد در محلول‌ها و در نتیجه کاهش محلولیت و سمیت آن‌ها استفاده می‌شود. شناخته شده است که سرب با چندین آنیون مانند کلریدها، فسفات‌ها، سولفیدها، کربنات‌ها و یون‌های هیدروکسیل واکنش می‌دهد و رسوبات نامحلول ایجاد می‌کند. فرآیند رسوب می‌تواند در خارج (خارج سلولی) یا در داخل (درون سلولی) سلول رخ دهد (Levinson et al., 1996).

باکتری‌های گزارش شده برای رسوب سرب به فسفات سرب شامل:

Pseudomonas fluorescens ATCC13525 (Al-Aoukaty et al., 1991)

Staphylococcus aureus (Levinson et al., 1996)

Vibrio harveyi (Mire et al., 2004)

(Chen *et al.*, 2015) *Bacillus thuringiensis* 016 و (Heidari and Panico, 2020a) *Bacillus* sp. Q3 است.

۲-۶-۴ تغییر در مورفولوژی سلول

به منظور مقابله با مواجهه مکرر با فلزات سنگین سمی و ترکیبات آلی، باکتری‌ها نیز تغییرات قابل توجهی در مورفولوژی سلول نشان می‌دهند (Neumann *et al.*, 2005; Chakravarty *et al.*, 2007; Chakravarty and Banerjee, 2008). تغییر در مورفولوژی یکی از استراتژی‌هایی است که باکتری‌ها برای کنار آمدن با فشارهای محیطی اتخاذ می‌کنند. تغییر در مورفولوژی سبب کاهش اتصال عناصر سمی به سطح سلول باکتری می‌شود.

۲-۶-۵ نقش رنگدانه‌ها در سم‌زدایی فلزات

باکتری‌های رنگی در مناطق تحت تنش مانند غلظت زیاد آلاینده‌های آلی، فلزات سنگین، داروها و غلظت زیاد نمک غالب هستند (Hermansson *et al.*, 1987; Nair *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 2008). پیوردین سبز مایل به زرد جدا شده از باکتری *Pseudomonas chlororaphis* نقش مهمی در تخریب تری فنیل‌تین (TPT) دارد (Yamoka *et al.*, 2002). البته در باکتری‌های فتوسنتز کننده این مکانیسم بیشتر مشاهده شده است.

۲-۶-۶ انتقال بیولوژیکی ارگانو سرب

در میان ترکیبات ارگانو سرب، تترااتیل سرب (TEL) و تتراامتیل سرب (TML) به دلیل کاربرد گسترده به عنوان افزودنی ضد ضربه بنزین، پایدارترین و مهمترین آن‌ها هستند. به دلیل استفاده از بنزین، ذرات سرب از آگروز اتومبیل به عنوان هالیدهای سرب در جو اتمسفر منتشر می‌شوند. ارگانو سرب‌ها به دلیل ویژگی‌های جهش‌زایی و تراژونیک ماهیت آن‌ها بسیار سمی است (Jarvie, 1988). گزارش شده است که کنسرسیون میکروبی منجر به تخریب سرب تترااتیل در خاک می‌شود (Teeling and Cypionka, 1997).

۷-۲ مکانیسم‌های انتخاب شده برای محافظت از سلول در برابر سمیت سرب

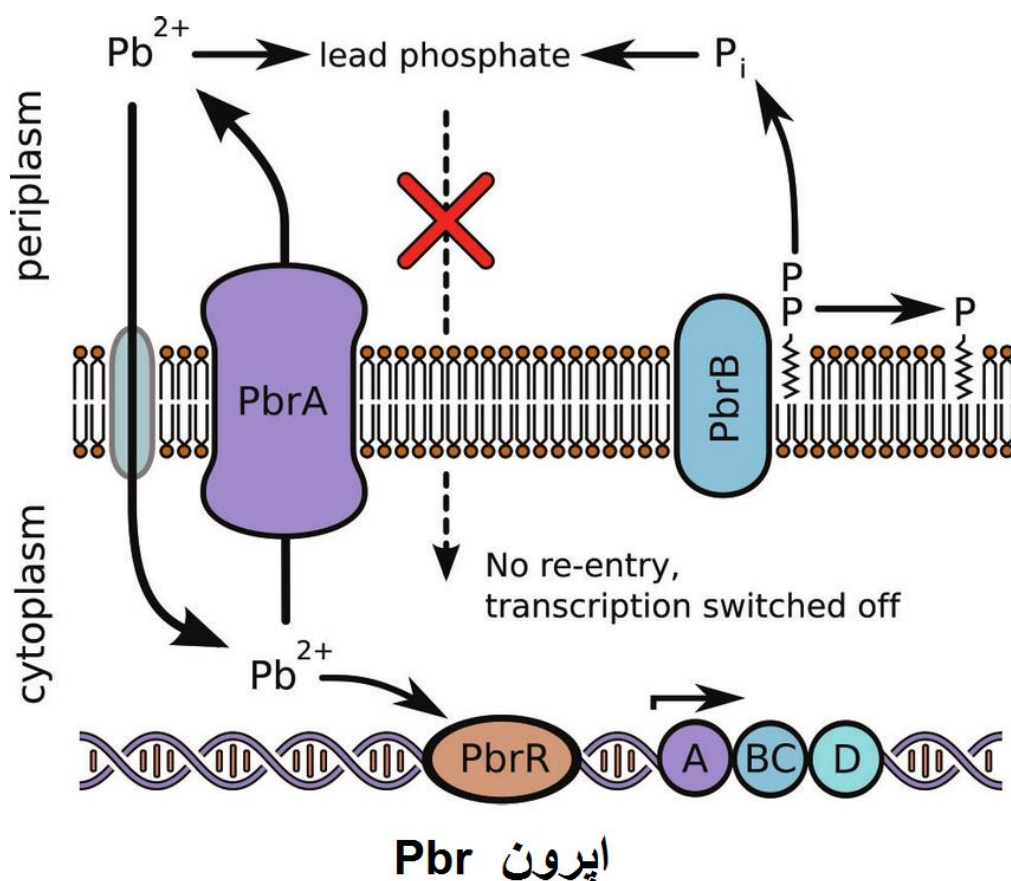
سرب می‌تواند به عنوان فسفات نامحلول در خارج سلول، جذب روی پلی ساکاریدهای خارج سلول یا توسط پلیمرهایی که به طور طبیعی در دیواره سلول وجود دارند، از میکروارگانیسم‌ها دور نگه داشته شود. پس از ورود به سلول از طریق ناقل‌های فلزی ضروری، سرب می‌تواند با اتصال به متالوتیونین (MT) غیرفعال شود و به عنوان فسفات نامحلول جدا شود و یا از طریق انتقال دهنده‌هایی مانند CadA, ZntA یا PbrA از سلول خارج گردد (Dopson et al., 2003).

۱-۷-۲ اپرون Pbr بعنوان یک ناحیه ژنومی درگیر در مقاومت به سرب

مقاومت سرب در هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت از خاک‌های آلوده به سرب گزارش شده است. هرچند که مکانیسم‌ها می‌تواند متفاوت باشد بعنوان مثال *Pseudomonas marginalis* باعث رسوب سرب خارج سلولی می‌شود و *Bacillus megaterium* تجمع سیتوپلاسمی سرب درون سلولی را نشان می‌دهد (Roane, 1999). سویه‌های مقاوم به سرب *Staphylococcus aureus* و *Citrobacter freundii* سرب را به عنوان سرب فسفات درون سلولی تجمع می‌کنند (Levinson et al., 1996). اگرچه هنوز مکانیسم مولکولی سم‌زدایی سرب بصورت کامل مشخص نشده است، اما گزارش‌ها حاکی از آنست که پمپ‌های CadA ATPase در این فرایند درگیر هستند (Rensing et al., 1998).

از جمله نواحی که در مقاومت باکتری‌ها به سرب درگیر است ناحیه‌ای از پلاسمید برخی باکتری‌ها است که تحت نام اپرون Pbr شناخته شده است (شکل ۱-۲). این اپرون در پلاسمید باکتری *Cupriavidus metallidurans* CH34 شناخته شده است (Borremans et al., 2001) که به عنوان یک ارگانیسم نمونه برای مکانیسم‌های مقاوم در برابر فلزات سنگین عمل کرده است. این اپرون دارای شش ژن است که پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که در خروج سرب وارد شده به سیتوپلاسم درگیر هستند. عمل این پروتئین‌ها سبب کاهش سمیت سرب می‌شود و در ایجاد فرم‌های غیر محلول سرب مانند فسفات سرب درگیر هستند. ژن‌های این اپرون شامل؛ *PbrR*، یک فاکتور رونویسی متعلق به خانواده MerR است، *PbrT*، یک پروتئین

احتمالی جذب سرب، *PbrA* یک پمپ ATPase از نوع P1B است. *PbrB/PbrC* یک پروتئین غشایی انتگرال پیش بینی شده و یک سیگنال پتیداز فرضی است و *PbrD* یک پروتئین احتمالی اتصال دهنده سرب درون سلولی می باشد (Borremans *et al.*, 2001).



شکل ۱-۲ مدل فعالیت اپرون Pbr در باکتری‌ها. بر اساس این مدل ژن‌های در اپرون وجود دارند که وظیفه خروج سرب از سیتوپلاسم را بر عهده دارند.

۸-۲ دیواره سلولی و آگزوپلی ساکاریدها

یکی از مکانیسم‌هایی که میکروارگانیسم‌ها برای جلوگیری از سمیت فلزات فاقد عملکرد بیولوژیکی استفاده می‌کنند، محدود کردن حرکت آن‌ها در سراسر سلول است (Bruins *et al.*, 2000). اولین بخش باکتری‌ها که با فلزات سنگین روبه‌رو می‌شود، دیواره سلول باکتریایی است. سپس فلزات سنگین در گروه‌های مختلف شیمیایی موجود در دیواره سلولی تجمع می‌یابند. لایه پتیدوگلیکان حاوی گروه‌های

مختلف در باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی، توانایی اتصال فلز را تعیین می‌کند. از بین این گروه‌ها، گروه‌های کربوکسیل به خاطر فراوانی زیاد و بار منفی به کاتیون‌های فلزی به طور فعال متصل می‌شوند (Heidari et al., 2020b; Heidari and Panico, 2020a).

دیواره سلولی مانعی طبیعی برای سرب است، زیرا گروه‌های عملکردی چندین ماکرومولکول در اتصال این فلز نقش دارند. در باکتری‌های گرم منفی، این نقش عمدتاً توسط لیپوپلی‌ساکارید، که یک بخش مهم از غشا خارجی است، انجام می‌شود. در باکتری‌های گرم مثبت، پپتیدوگلیکان همراه با تیکوئیک و تیکورونیک اسیدها مسئول اتصال سرب هستند (Beveridge and Fyfe, 1985). این مکانیسم محافظتی یک فرآیند کنترل نشده است و مکانیسم‌های مقاومت ویژه هنگامی که پوشش سلول به نقطه اشباع می‌رسد، عملیاتی می‌شوند (Beveridge and Fyfe, 1985).

۲-۹ مکانیسم مقاومت ویژه

قبلاً حذف یون‌های فلزی از محلول‌های آبی توسط بسیاری از ارگانیسم‌ها از جمله *Aspergillus niger*، *Chlorella vulgaris*، *Ecklonia radiata*، *Pseudomonas aeruginosa* PU21 و *Saccharomyces cerevisiae* گزارش شده است (Al-Rub et al., 2006; Kapoor and Viraraghavan, 1997; Kiran et al., 2005; Mapolelo and Torto, 2004).

لوینسون و همکاران (۱۹۹۶) فرآیند رسوب سرب درون سلولی را به سه مرحله: (۱) اتصال فلز به سطح سلول (۲) جذب داخل سلولی وابسته به متابولیسم و (۳) رسوب نهایی سرب (II) به عنوان بلورهای فسفات‌های سرب تقسیم کردند (Levinson et al., 1996).

به عنوان مثال، استافیلوکوکوس/اورئوس سرب را به عنوان سرب فسفات $Pb_3(PO_4)_2$ در داخل سلول رسوب می‌دهد. این نوع محافظت باعث می‌شود که این سویه در برابر دوزهای بالاتر سرب مقاومت بیشتری نسبت به گونه‌های حساس نشان دهد (دوز ۶۰۰ برابر سرب بالاتر در مقایسه با سویه حساس مقاومت کند) (Levinson et al., 1996; Levinson and Mahler, 1998).

یک سیستم انتشارخروجی که سرب را از سلول حذف می‌کند، اولین بار توسط بورمانز و همکاران در باکتری *Cupriavidus metallidurans* CH34 گزارش شد (Borremans et al., 2001). باکتری C. *metallidurans* در برابر ۲۰ فلز سنگین مقاوم است و به عنوان یک میکروارگانیسم مدل در مطالعات مقاومت فلز و تحمل فلز استفاده می‌شود (Borremans et al., 2001).

۲-۱۰ برخی از باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین

تصفیه بیولوژیکی خاک آلوده به سرب با استفاده از باکتری *Rhodobacter sphaeroides* انجام شده است. *Rhodobacter sphaeroides* یک باکتری گرم منفی، فوتوتروپیک بنفش غیر گوگردی است، که بسته به شرایط رشد چندین مسیر متابولیکی از خود نشان می‌دهد (Calvano et al., 2014). فلزات سنگین Pb، Cu، Zn و Cd را با استفاده از جذب بیولوژیکی و تجمع زیستی حذف می‌کند (Panwichian et al., 2010, 2012).

باکتری می‌تواند از طریق دسولفیداز در حین تصفیه فاضلاب، S₂ تولید کند و سپس سولفید فلز رسوب داده شود و از آب خارج شود. این روش حتی برای سنتز بیولوژیکی نانوذرات سولفید نیز مورد استفاده قرار گرفت (Bai et al., 2008). هنگامی که *R. sphaeroides* برای تصفیه فاضلاب آلوده به فلزات سنگین استفاده شد، نشان داده شد که سولفیدهای فلز رسوب کرده و از فاضلاب خارج می‌شوند (Bai et al., 2008).

Enterobacter cloacae نشان داده است که با آزاد کردن فسفر از فسفر نامحلول، محلول سازی فسفر را افزایش می‌دهد و بی حرکتی سرب را تسهیل می‌کند. در کل، این فرایند منجر به کاهش تحرک، و سمیت سرب می‌شود (Park and Bolan, 2013).

گزارش شده است که *Bacillus* sp. KK1 می‌تواند $Pb(NO_3)_2$ را به PbS و PbSiO₃ تبدیل کند و توزیع شکستگی کربنات در خاک را افزایش دهد. زیرا باکتری KK1 می‌تواند باعث رسوب کلسیت از سرب شود

(Govarthanan et al., 2013). ایزوله *Bacillus* sp. KK1 می‌تواند یون‌های فعال سرب را به صورت سرب

غیرفعال معدنی کند و سرب را به صورت PbS و $PbSiO_3$ رسوب دهد (Govarthanan et al., 2013).

Bacillus sp. به دلیل جداسازی خارج سلولی و تجمع درون سلولی سرب، باکتری بسیار مقاوم در برابر سرب است. باکتری‌ها می‌توانند از طریق تولید هورمون‌های گیاهی، مانند اسید ایندولاستیک و سیدروفورها، رشد گیاهانی مثل *Alnus firma* را تسهیل کنند. این موضوع حاکی از آن است که باکتری‌ها نقش بالقوه‌ای در کاهش سمیت گیاهی و افزایش تجمع سرب در گیاه *A. firma* دارند (Shin et al., 2012).

یک مکانیسم احتمالی مقاومت در برابر سرب در باکتری *Cupriavidus metallidurans* DN440 پیشنهاد شده است که در آن سرب توسط PbrA از سیتوپلاسم صادر می‌شود و احتمالاً سرب به عنوان یک نمک فسفات با فسفات معدنی تولید شده توسط PbrB جدا می‌شود (Hynninen et al., 2009).

وی و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از عناصر ژن اپرون pbr در *Cupriavidus metallidurans* CH34 یک سیستم انتخابی سنجش سرب و یک سیستم اصلاح را ایجاد کردند. عامل مقاومت به سرب در *Ralstonia metallidurans* CH34، اپرون pbr است. این یک اپرون بی نظیر است، زیرا ترکیبی از عملکردهای دخیل در جذب، انتشار به خارج و تجمع سرب است (Wei et al., 2014).

دینو و همکاران (۲۰۱۱) همچنین مقاومت *Pseudomonas* sp. را علیه فلزات سنگین Ni، Zn، Pb، Cd و گزارش کرده‌اند (Dinu et al., 2012). جاسمین و همکاران (۲۰۱۲) باکتری‌های مقاوم در برابر فلزات سنگین را از آب فاضلاب جمع شده در منطقه تریشی، جنوب هند استخراج کردند. نتایج نشان داد که باکتری *Pseudomonas* sp. در برابر فلزات Cu، Ag و Zn بسیار مقاوم می‌باشد (Jasmine et al., 2012). بنابراین، می‌توان از این باکتری‌ها برای سم زدایی و حذف فلزات سنگین از محیط آلوده استفاده کرد. هاکیم و باتناگار (۲۰۱۰) از پساب یک صنعت کاغذ، سه سویه بومی *Streptococcus* sp. و *Staphylococcus* sp. و *Pseudomonas* sp. را جدا کردند که در تصفیه زیستی فلزات سنگین استفاده می‌شوند (Hakeem and Smita, 2010). آن‌ها همچنین اظهار داشتند که باکتری *Pseudomonas* sp. برای

حذف کادمیوم، منگنز و جیوه موثر است. در حالی که باکتری‌های *Streptococcus* sp. و *Staphylococcus* sp. قادر به حذف موثرتر مس بودند.

سامانتا و همکاران (۲۰۱۲) یک باکتری گرم مثبت *Bacillus* sp. را از یک خاک آلوده به فلزات سنگین جدا کردند. سویه جدا شده سطح تحمل متفاوتی را نسبت به فلزات مورد بررسی نشان داد و همان طور که توسط مقادیر مختلف MTC نشان داده شده است، مشخص شد که از بین چهار فلز سنگین آزمایشی، سویه مقاومت بالایی در برابر کادمیوم نشان می‌دهد. درحالی که مقاومت کمتری را در برابر کبالت نشان داد. الگوی مقاومت به فلز در این باکتری بدین ترتیب $\text{Co}2 > \text{Ni}2 > \text{Cr}6 > \text{Cd}2$ + بود (Samanta et al., 2012).

کوماران و همکاران (۲۰۱۱) یک *Pseudomonas* sp. تحمل کننده فلزات سنگین را جدا کردند. که به ترتیب قادر به حذف ۴۱٪، ۶۲/۸٪، ۸۷/۹٪، ۵۳٪ و ۴۹/۸٪ از کادمیوم، آهن، سرب، نیکل و روی بود (Kumaran et al., 2011). لین و هاریچوند (۲۰۱۱) در مطالعه حذف فلزات سنگین از پساب صنایع شیمیایی دریافت که *Bacillus* sp. قادر به حذف ۲۰/۳٪ آرسنیک و ۱۶/۷٪ جیوه به طور موثر از پساب بود (Lin and Harichund, 2011).

در پژوهشی که مکانیسم سرب پالایی باکتری *Bacillus subtilis* X3 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ترکیبات دیواره سلولی باکتری‌ها نقش به‌سزایی در جذب و رسوب سرب دارد و گروه‌های فسفاتی و کربناتی سبب تولید کریستال‌های غیرمحلول سرب می‌شوند (Qiao et al., 2019).

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ باکتری‌های مورد مطالعه

در این تحقیق از دو سویه CM3 و CM7 باکتری *Microbacterium Oxydans* که قبلاً از نمونه خاک‌های معدن زغال سنگ (واقع در ده‌ملا) شهرستان شاهرود جداسازی و شناسایی شده بودند، استفاده گردید (Dabir et al, 2019). این سویه‌ها در محیط جامد LB و به فواصل یک ماه یکبار واکشت می‌شدند.

۳-۲ اجرای فرایند سازگار کردن باکتری‌ها

جهت بررسی اثرات بلند مدت سرب (Pb(II)) بر الگوی رشد، مکانیسم‌های زیست پالایی و میزان تغییرات در باکتری‌ها، ابتدا سویه‌های CM3 و CM7 در محیط مایع حاوی NaCl (۵ گرم در لیتر)، عصاره مخمر (۲/۵ گرم در لیتر)، تریپتون (۵ گرم در لیتر) و نیتрат سرب (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. ارلن‌های حاوی محیط‌های کشت شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ در دقیقه در درون دستگاه شیکر انکوباتور نگهداری شدند. پس از ده روز، ۴۰۰ میکرولیتر از محیط‌ها در محیط‌های جدید با همان ترکیب اولیه واکشت شدند و این فرایند تا ۲۰ ماه تکرار گردید و در مجموع ۶۰ واکشت صورت گرفت. سویه‌های اولیه CM3a و CM7a و نمونه‌های باکتریایی پس از آخرین واکشت CM3b و CM7b نامگذاری شدند. در نهایت سویه اولیه با سویه سازگار شده مورد مقایسه قرار گرفتند.

۳-۳ تعیین الگوی رشد سویه‌های اولیه و رشد یافته در سرب

جهت درک بهتر اثرات کشت بلند مدت در محیط آلوده به سرب بر رشد باکتری‌ها، الگوی رشد سویه‌های اولیه CM3-a و CM7-a به همراه سویه‌های CM3-b و CM7-b تحت محیط مایع (دارای ترکیباتی مشابه با محیط ارائه شده در بخش قبل) آلوده به سرب بررسی شد. محیط‌های کشت‌شده تحت سه عامل دما (۳۰، ۳۲/۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد)، میزان pH (۴، ۵/۵ و ۷) و زمان پس از کشت (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) مورد آنالیز قرار گرفتند. میزان رشد باکتری‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۳-۴ تعیین میزان زیست پالایی سرب

پتانسیل زیست پالایی سرب سویه‌های رشد یافته در سرب (CM3-b و CM7-b) و سویه اولیه (CM3-a و CM7-a) در دو غلظت مختلف سرب (۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر) و دو دامنه متفاوت pH (۵ و ۶/۵) مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا، ۵۰۰ میکرولیتر از محیط مایعی که حاوی هر کدام از سویه‌ها بود به محیط های مایعی که دارای ترکیبات مشابه با توضیحات قبلی بود، انتقال یافت و سپس pH و میزان سرب تنظیم گردید. نمونه‌های کشت شده در شیکر-انکوباتور در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ در دقیقه نگهداری شدند. پس از ۹۶ ساعت، میزان غلظت سرب در قسمت محلول محیط توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (Dabir et al, 2019). همچنین رسوب هر محیط کشت جداگانه توسط میکروسکوپ الکترونی مورد آنالیز قرار گرفت. در نهایت درصد حذف سرب توسط رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد حذف سرب} = [(Ca - Cb) / Ca] \times 100\%$$

که در این رابطه، Ca و Cb به ترتیب غلظت اولیه و نهایی سرب در محیط کشت می‌باشد (Dabir et al, 2019).

۳-۵ آنالیز SEM

رسوب حاصل از رشد باکتری‌ها در دو غلظت مختلف سرب (۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر) و دو دامنه متفاوت pH (۵ و ۶/۵) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این آنالیز، تعیین درصد عناصر در توده باکتری‌ها و بررسی شکل آن‌ها بود. در این مطالعه درصد عناصر هم در سطح سلولی و هم در کل توده باکتری مورد آنالیز قرار گرفت. جهت این آنالیز، ابتدا رسوب حاصل از رشد هر باکتری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در آون خشک شدند و سپس نمونه‌های خشک شده پوشش دار شدند (Heidari and Panico, 2020) و توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM ساخت شرکت Zeiss مورد آنالیز قرار گرفت

۳-۶ مقایسه شرایط بهینه رشد بین سویه‌ها با استفاده از RSM^۱

جهت مقایسه بین سویه‌های اولیه و سویه‌های رشد یافته در سرب از لحاظ شرایط بهینه رشد، روش CDD^۲ بر اساس مدل RSM توسط نرم افزار Design Expert version 10 انجام شد. در این آنالیز متغیرهای غیروابسته شامل دما، pH و مدت زمان پس از کشت بودند و متغیر پاسخ میزان رشد سویه‌ها بود. دامنه هر کدام از متغیرها در جدول ۳-۱ ارائه شده است.

جدول ۳-۱ دامنه متغیرهای غیر وابسته مورد آنالیز در مدل RSM

پارامترها	فاکتورها	دامنه و سطوح فاکتورها		
		-1	0	+1
pH	A	7	5.5	4
دما	B	40	32.5	30
زمان	C	72	48	24

۳-۷ استخراج DNA از باکتری‌ها

جهت بررسی تغییرات مولکولی در باکتری‌ها مورد مطالعه، DNA از سویه‌های اولیه و سویه‌های رشد یافته در سرب از طریق روش گرم و سرد استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. در این روش ابتدا ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط مایع کشت باکتری به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد. سپس نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰ در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب به یک میکروتیوپ جدید منتقل شد و به آن ۳۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده اضافه شد. چهار بار چرخه دمایی گرم (سه دقیقه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد درون بن‌ماری) و سرد (سه دقیقه در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد) تکرار شد (Dabir et al, 2019). در نهایت نمونه‌ها در دور ۸۰۰۰ در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی که

^۱ - Response Surface Methodology

^۲ - Central Composite Design

حاوی DNA است به یک میکروتیوپ جدید منتقل شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۸ شناسایی ناحیه اپرون Pbr و طراحی پرایمر

جهت بررسی جهش در ناحیه ژنومی باکتری‌های مورد مطالعه، اپرون Pbr بعنوان یک ناحیه شناخته شده که در مقاومت به سمیت سرب درگیر است، انتخاب گردید. با توجه به عدم گزارش این ناحیه در سویه مورد مطالعه، توالی ژنومی این اپرون در سایر باکتری‌ها از سایت NCBI دریافت گردید و سپس با همردیف کردن توالی‌ها از نواحی حفاظت شده مشترک جهت طراحی پرایمر استفاده شد. پرایمرها بدون استفاده از نرم افزار انتخاب شدند و کارایی آنها با استفاده از نرم افزار Oligo (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) مورد آنالیز قرار گرفت. در نهایت توالی پرایمرها جهت سنتز ارسال گردید.

۳-۹ انجام واکنش PCR

نمونه های DNA استخراج شده جهت تکثیر ناحیه Pbr با پرایمرهای طراحی شده مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت که در آن یک میکرولیتر DNA باکتریایی، دو میکرولیتر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس و ۷ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استفاده شد. چرخه‌های دمایی که در واکنش PCR انجام شد شامل: دمای ۹۵ درجه سانتیگراد بمدت ۴ دقیقه، و ۳۸ سیکل از چرخه ۹۵ درجه بمدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه بمدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه بمدت یک دقیقه بود. محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز با ژل آگاروز ۱/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

فصل چهارم: نتایج و بحث

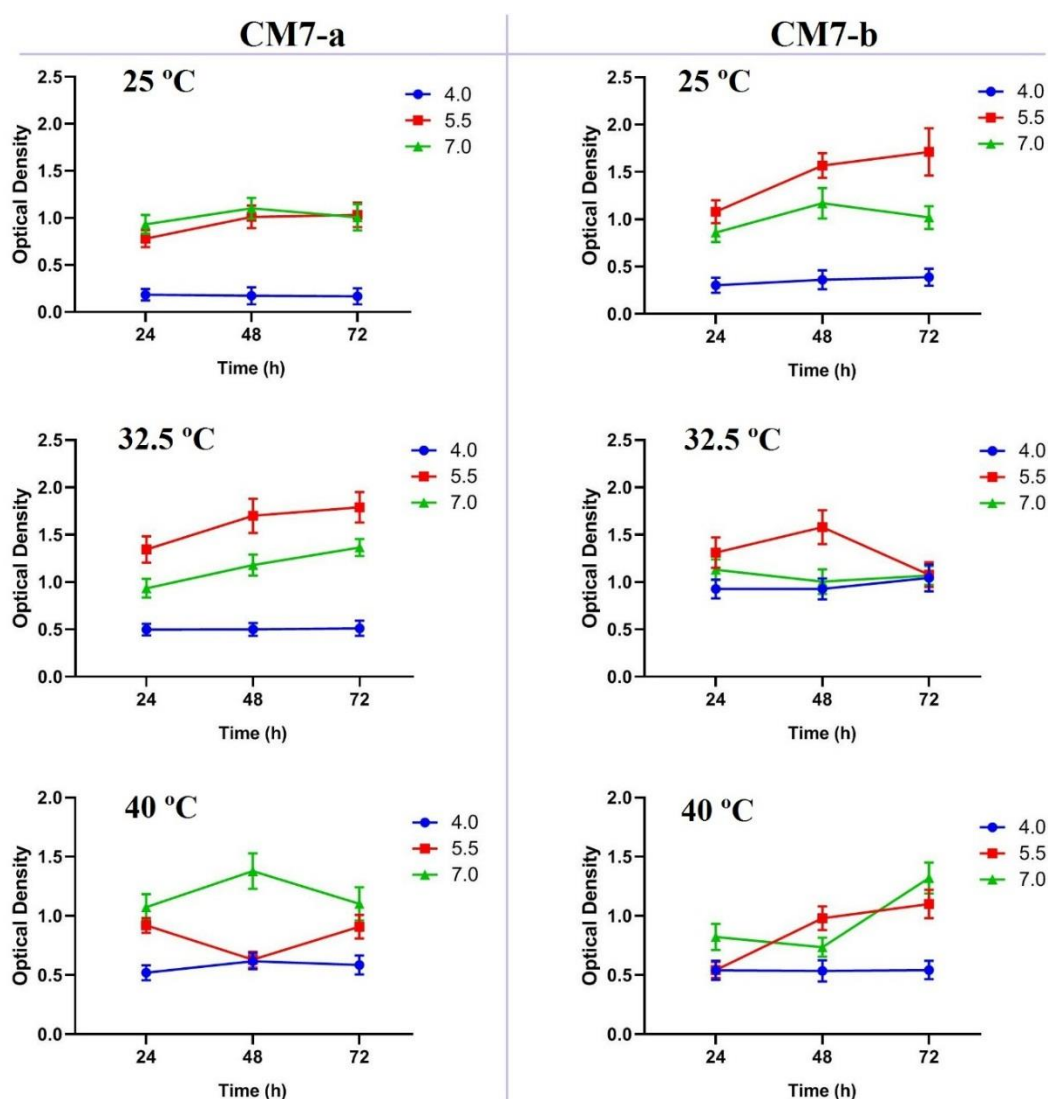
۴-۱ تغییر الگوی رشد سویه‌ها تحت کشت بلند مدت سرب

نمودار رشد سویه‌ها نشان داد که دما و pH اثرات متفاوتی بر میزان رشد می‌گذارند (شکل ۴-۱ و ۴-۲). در سویه CM7 اولیه (CM7-a) تفاوتی بین الگوی رشد در محیط دارای pH ۵/۵ و ۷ و دمای ۲۵ درجه مشاهده نشد. اما تحت همین شرایط سویه CM3-b (بصورت بلند مدت در محیط دارای سرب واکشت شده) دارای بیشترین رشد در pH ۵/۵ بود (شکل ۴-۱). در دمای ۳۲/۵ درجه، هر دو سویه رشد بیشتری در pH ۵/۵ داشتند. هرچند که با افزایش زمان رشد سویه CM7-b کاهش نشان داد (بعد از ۷۲ ساعت). الگوی رشد سویه CM7-b در دمای ۴۰ سانتی‌گراد با گذشت زمان روند افزایشی در pH ۵/۵ و ۷ نشان داد. در همه شرایط تحت آزمایش، pH در سطح ۴ یک اثر بازدارندگی بر رشد سویه‌های مورد آزمایش داشت. هرچند میزان رشد سویه رشد یافته در سرب، CM7-b، در دمای ۳۲/۵ سانتی‌گراد افزایش نشان داد.

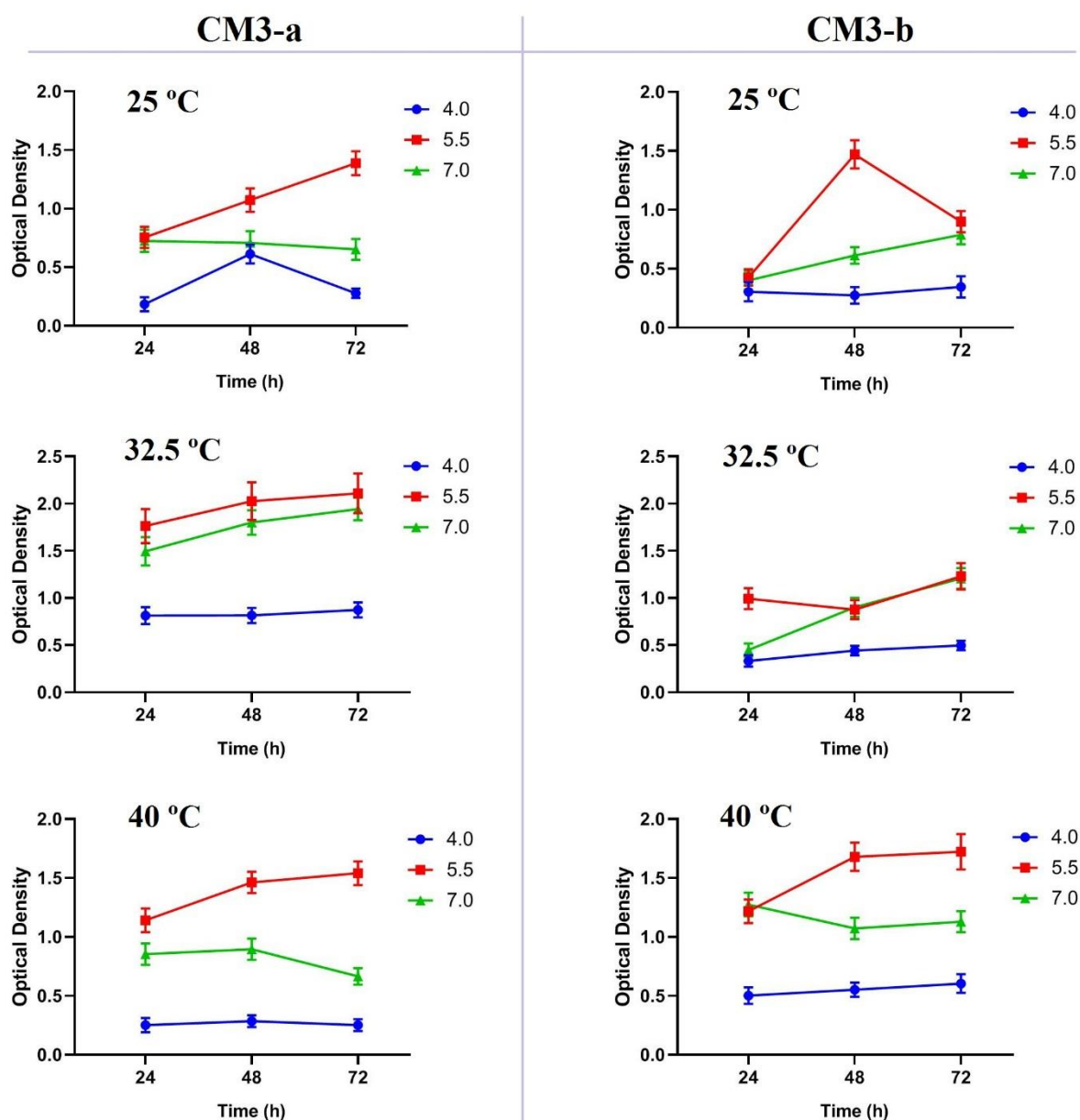
الگوی رشد سویه‌های CM3-a و CM3-b تحت شرایط مختلف آزمایش (درجه حرارت و pH) متفاوت بود، که نشان دهنده اثر واکشت‌های متعدد سرب بر رفتار این سویه‌ها بوده است (شکل ۴-۲). در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هر دو سویه بیشترین رشد را در pH ۵/۵ داشتند. هرچند که سویه CM3-b پس از ۴۸ ساعت به حداکثر رشد خود رسید، اما سویه CM3-a پس از ۷۲ ساعت حداکثر رشد را نشان داد. در دمای ۳۲/۵، میزان رشد سویه CM3-b نسبت به سویه اولیه کاهش نشان داد و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد هر دو سویه بیشترین رشد را در pH ۵/۵ داشتند و دارای الگوی تقریباً مشابهی بودند (شکل ۴-۲).

نتایج حاکی از آنست که pH نقش مهم در میزان رشد باکتری‌ها دارد. pH در برهمکنش بین ترکیبات شیمیایی و عناصر با سلول باکتری‌ها در محیط یک نقش کلیدی بازی می‌کند (B.Y.M. Bueno *et al.*, 2008). در محیط قلیایی سرب کمتر محلول است، در نتیجه اثرات مخرب کمتری می‌تواند بر سلول و رشد باکتری بگذارد (Heidari and Sanaeizade, 2020). در pH های بین ۵ تا ۶ حلالیت عناصر افزایش می‌یابد و در نتیجه جذب عناصر فلزی افزایش می‌یابد (Liu *et al.*, 2006). نتایج این تحقیق نیز تا حدودی

این مطلب را تایید کرد چرا که در pH پایین میزان رشد باکتری، کاهش زیادی نشان داد. از طرف دیگر نیز درجه حرارت محیط رشد در کنترل متابولیسم‌های باکتری و میزان رشد دخالت دارد و معمولاً در درجه حرارت بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد متابولیسم‌ها و فعالیت آنزیم‌های باکتریایی افزایش می‌یابد (Heidari and Panico, 2020b). علاوه بر این، میزان درجه حرارت محیط می‌تواند در اتصال سرب به سلول باکتری موثر باشد. معمولاً با افزایش درجه حرارت میزان حلالیت عناصر نیز افزایش می‌یابد (Bandowe et al., 2014).



شکل ۴-۱ منحنی رشد سویه CM7 در دماها و pHهای مختلف. داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیار ارائه شده‌اند. CM7-a و CM7-b به ترتیب سویه اولیه و سویه رشد یافته در سرب می‌باشد.

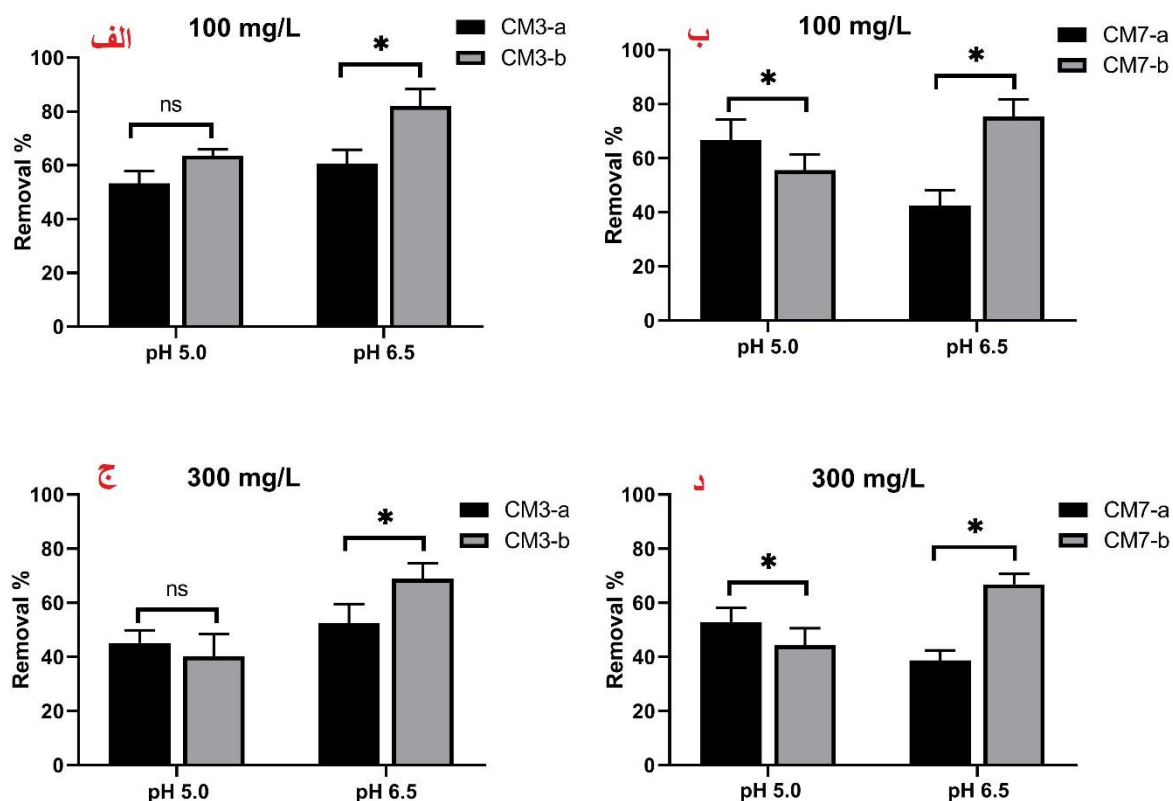


شکل ۲-۴ منحنی رشد سویه CM3 در دماها و pHهای مختلف. داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیار ارائه شده‌اند. CM3-a و CM3-b به ترتیب سویه اولیه و سویه رشد یافته در سرب می‌باشد.

۲-۴ میزان زیست پالایی سرب سویه‌ها

جهت مقایسه بین سویه‌های اولیه (CM3-a و CM7-a) و سویه‌های رشدیافته در سرب (CM3-b و CM7-b)، پتانسیل زیست پالایی این سویه‌ها در محیط‌های آلوده به سرب (۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) تحت دو pH مختلف (۵ و ۶/۵) مورد بررسی قرار گرفت. دامنه pHها بر اساس آزمایشات اولیه رشد سویه‌ها تعیین گردید. نتایج نشان داد که تغییرات pH اثرات بارزی بر میزان زیست پالایی سرب دارد بطوریکه سویه‌های رشد یافته در سرب (CM3-b و CM7-b) در pH ۶/۵ میزان زیست پالایی بیشتری نشان دادند (شکل ۳-۴).

در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سرب، تفاوت معناداری بین سویه‌های CM3-a و CM3-b مشاهده نشد. اما در pH ۶/۵ میزان زیست پالایی سرب سویه CM3-b بصورت معناداری بیشتر از سویه اولیه بود (شکل ۳-۴ الف). در محیط دارای pH ۵ میزان زیست پالایی سویه CM3-b کاهش یافت، اما افزایش pH به سطح ۶/۵، باعث گردید که پتانسیل این سویه در مقایسه با سویه اولیه بصورت معناداری افزایش یابد (شکل ۳-۴ ب). در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سرب، پاسخ سویه‌ها به تغییرات pH مشابه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سرب بود و میزان زیست پالایی در pH ۶/۵ در هر دو سویه سازگار شده (CM3-b و CM7-b) بیشتر از سویه‌های اولیه بود (شکل ۳-۴ ج و شکل ۳-۴ د). چندین گزارش از تاثیر مهم pH بر میزان زیست پالایی عناصر سنگین وجود دارد (Hadiani et al., 2018; Kang et al., 2016; Li et al., 2016). بعنوان مثال، لی و همکاران گزارش داده‌اند که باکتری *Rhodobacter sphaeroides* بیشترین زیست پالایی سرب را در دمای بین ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی گراد و pH ۷ دارد (Li et al., 2016). همچنین هادیانی و همکاران مشخص کردند که *Saccharomyces cerevisiae* بیشترین زیست پالایی سرب و کادمیوم را به ترتیب در pH ۶ و ۵/۵ دارد (Hadiani et al., 2018).



شکل ۳-۴ میزان زیست پالایی سویه‌های CM3 و CM7. میزان زیست پالایی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سرب توسط سویه‌های CM3 (الف) و سویه‌های CM7 (ب) و زیست پالایی در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سرب توسط سویه‌های CM3 (ج) و سویه‌های CM7 (د). * و ns بترتیب به معنای معناداری در سطح احتمال ۵ درصد و عدم معناداری بر حسب نتایج آزمون t می‌باشد.

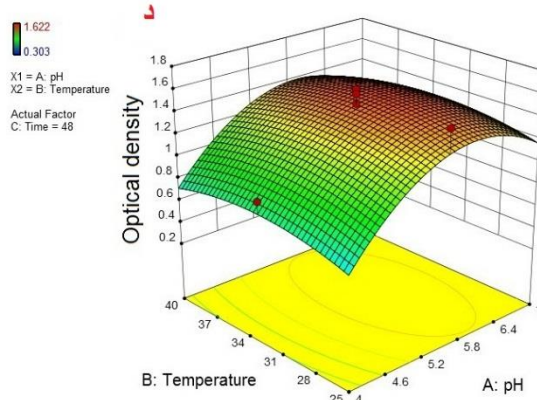
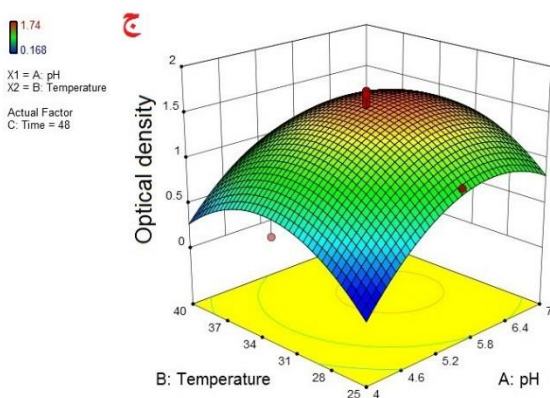
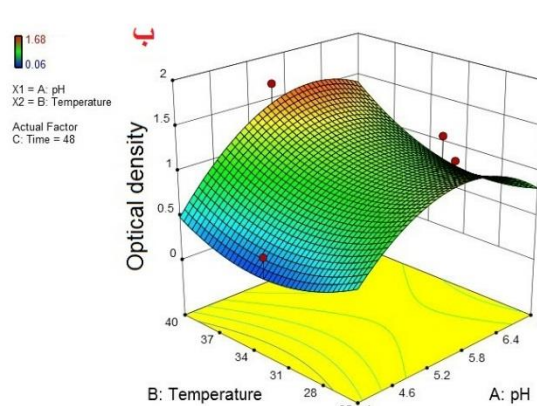
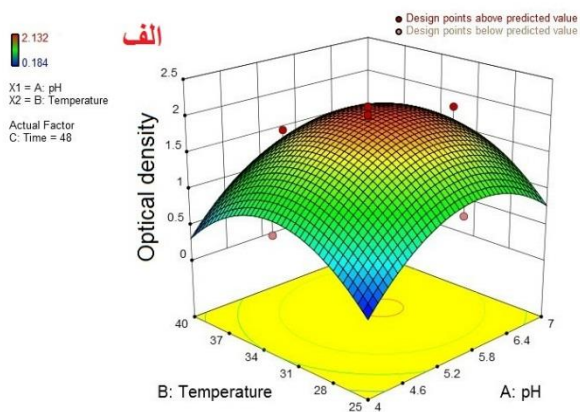
۳-۴ مقایسه شرایط بهینه رشد بین سویه‌ها

عوامل محیطی همچون دما، میزان اکسیژن، pH، غلظت عناصر و مدت زمان قرارگیری در محیط می‌تواند رشد و تکثیر باکتری‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. در این مطالعه دامنه‌های متفاوتی از دما، pH و مدت زمان قرارگیری در محیط‌های آلوده به سرب بر رشد سویه‌های سازگار شده (CM3-b, and CM7-b) و سویه‌های اولیه (CM3-a, and CM7-a) مورد بررسی قرار گرفت، تا بهترین سطح هر کدام از عوامل تعیین گردد. نتایج حاکی از آن بود که واکشت‌های متعدد در محیط آلوده به سرب توانسته میزان pH و دمای بهینه رشد سویه‌ها را تغییر دهد (شکل ۴-۴ و جدول ۴-۱). بعنوان مثال، سویه CM3-a بیشترین رشد را در دمای بین ۳۱ تا ۳۶ درجه سانتی‌گراد و pH بیشتر ۵/۵ داشت (شکل ۴-۴ الف)، ولی سویه

سازگار شده آن (CM3-b) بیشترین رشد را در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد (شکل ۴-۴ ب). سویه CM7-a در دمای ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۵/۵ تا ۶/۵ نشان داد (شکل ۴-۴ ج) و سویه CM7-b بیشترین رشد را در دمای بین ۳۰ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۶ و ۶/۵ داشت (شکل ۴-۴ د). نتایج بهینه سازی عوامل مستقل نشان داد که سویه CM3-a در pH ۵/۸۱، دمای ۳۲/۸ درجه سانتی-گراد پس از ۴۹/۴ ساعت از کشت و سویه CM3-b در pH ۶/۱۵، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد پس از ۴۱/۴۲ ساعت از کشت حداکثر رشد را دارد (جدول ۴-۱). نتایج حاکی از آن بود که کشت بلند مدت در سرب، مدت زمان رسیدن به حداکثر رشد را در سویه CM7-b کاهش داده است. بطوری‌که این سویه در pH ۵/۹۲ و دمای ۳۲/۷۱ پس از ۵۱/۶۸ ساعت به حداکثر رشد می‌رسد، اما سویه اولیه آن (CM7-a) پس از ۷۰/۵۲ ساعت در pH ۶/۴۸ و دمای ۳۱/۷۵ درجه سانتی‌گراد به حداکثر رشد می‌رسد.

همچنین مدل رگرسیون غیر خطی جهت برآورد میزان رشد سویه‌ها (متغیر پاسخ) بر اساس متغیرهای مستقل (pH، دما و مدت زمان قرارگیری در محیط آلوده) برای هر چهار سویه محاسبه گردید (روابط ۱ تا ۴). بر اساس این مدل‌ها می‌توان به تاثیر کشت بلند سرب بر تغییر رفتار سویه‌ها پی برد. بعنوان مثال ضریب متغیر دما بصورت مشخصی در سویه CM3-b نسبت به سویه CM3-a افزایش یافته است.

یافته‌های ما نشان داد که pH مطلوب، دما و سرعت رشد تحت تأثیر مدت زمان زیاد واکشت در محیط دارای سرب قرار می‌گیرد. هرچند پاسخ سویه‌های آزمایش شده، متفاوت بود. مشخص شده است که حلالیت سرب تحت تأثیر شرایط اسیدی محیط که بر سرعت رشد باکتری‌ها و جذب سرب تأثیر می‌گذارد، قرار می‌گیرد (Heidari et al., 2020b). از سوی دیگر، آنزیم‌ها و متابولیسم موجود در باکتری‌ها تحت تأثیر تغییرات دما قرار می‌گیرند (Heidari and Panico, 2020b; Kang et al., 2015). در کل واکشت بلند مدت در محیط آلوده به سرب می‌تواند نرخ رشد سویه‌های CM7 و CM3 را در زمان کوتاهی در مقایسه با سویه‌های بومی افزایش دهد. این نشان می‌دهد که واکشت بلند مدت در محیط آلوده به سرب باعث تغییر در سویه‌ها شده تا اثرات بازدارندگی سرب را کاهش دهد. از سوی دیگر، واکشت بلند مدت در محیط آلوده به سرب توانسته پتانسیل زیست‌پالایی سویه‌ها را در pH ۶/۵ تغییر ویژه‌ای دهد.



شکل ۴-۴ نمودار اثرات تغییر در دما و pH بر الگوی رشد سویه‌های مورد آزمایش پس از ۴۸ ساعت نگهداری در محیط دارای ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نیتрат سرب. الف: CM3-a، ب: CM3-b، ج: CM7-a و د: CM7-b. نتایج ارائه شده بر اساس خروجی مدل RSM انجام شده توسط نرم‌افزار Design Expert می‌باشد.

جدول ۴-۱ نتایج سطح بهینه متغیرهای مستقل برای حداکثر رشد سویه‌ها در محیط دارای ۱۰۰ میلی گرم بر

لیتر نیترات سرب

سویه	pH	دما (°C)	زمان (ساعت)	میزان کارایی
CM3-a	۵/۸۱	۳۲/۸۰	۴۹/۴۰	۰/۹۴
CM3-b	۶/۱۵	۴۰/۰۰	۴۱/۴۲	۰/۹۴
CM7-a	۶/۴۸	۳۱/۷۵	۷۰/۵۲	۱/۰۰
CM7-b	۵/۹۲	۳۲/۷۱	۵۱/۶۸	۰/۹۲

روابط بهینه شده:

$$(1): CM3a = 1.99 + 0.29A + 0.058B + 0.018C + 0.012AB - 0.044AC - 0.026BC - 0.7A^2 - 0.74B^2 - 0.07C^2$$

$$(2): CM3b = 1.01 + 0.3A + 1.3B + 0.0077C + 0.16AB + 0.081AC - 0.13BC - 0.51A^2 + 0.31B^2 - 0.15C^2$$

$$(3): CM7a = 1.55 + 0.34A + 0.062B + 0.056C - 0.063AB + 0.0092AC + 0.0072BC - 0.52A^2 - 0.54B^2 - 0.17C^2$$

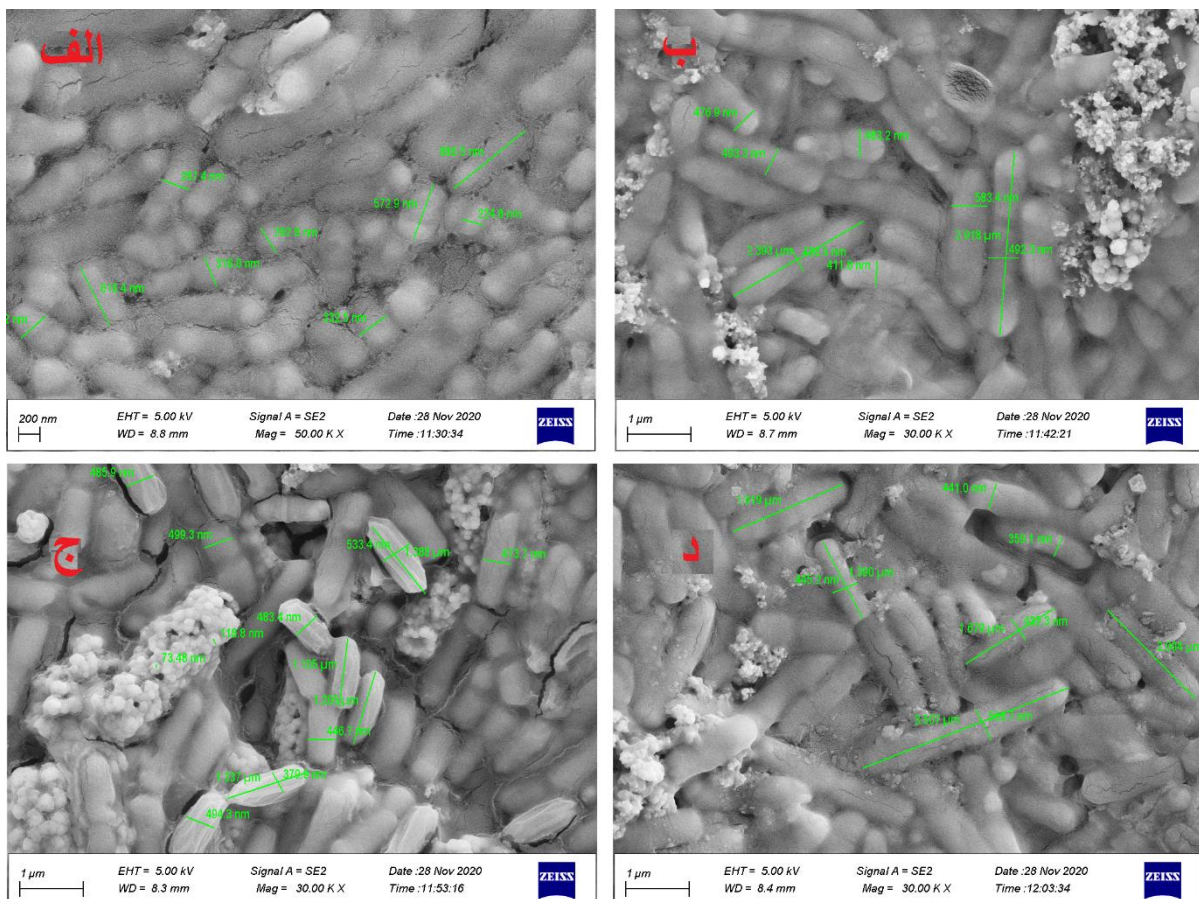
$$(4): CM7b = 1.49 + 0.23A + 0.0067B + 0.048C - 0.016AB + 0.071AC + 0.032BC - 0.43A^2 - 0.13B^2 - 0.22C^2$$

در این روابط A، B و C به ترتیب میزان pH، دما و مدت زمان قرارگیری در محیط آلوده است.

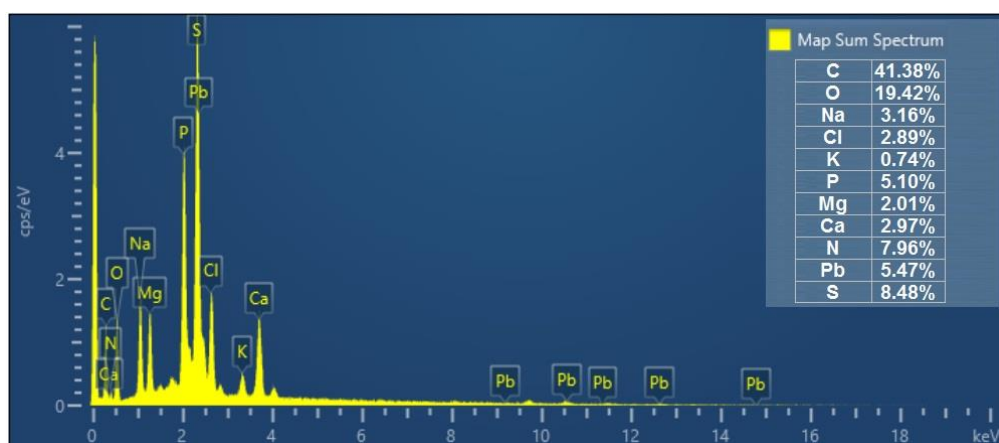
۴-۴ بررسی میکروسکوپی مورفولوژیک باکتری‌ها و آنالیز عنصری

نتایج بررسی توپوگرافی بیوماس سلول‌های باکتریایی توسط میکروسکوپ SEM نشان داد که شکل ظاهری و سطح سلولی سویه‌های مورد مطالعه کمتر تحت تاثیر واکنش‌های متعدد در محیط آلوده به سرب قرار می‌گیرد (شکل ۴-۵). جهت تعیین درصد عناصر موجود در بیوماس سویه‌ها، آنالیز EDS¹ انجام گرفت. همچنین جهت تعیین دقیق تغییرات عنصری، آنالیز EDS برای نمونه‌های شاهد (محیط بدون باکتری) نیز صورت گرفت که در شکل ۴-۶ ارائه شده است. نتایج SEM تعیین کرد که سویه‌ها سرب را بیشتر در سطح سلولی خود تجمع می‌دهند (شکل ۴-۵) و آنالیز EDS نشان داد که درصد عناصر در بیوماس حاصل از رشد سویه‌های سازگار شده (CM3-b و CM7-b) با سویه‌های اولیه متفاوت می‌باشد (شکل ۴-۷ و شکل ۴-۸).

¹ Energy Dispersive Spectrometer



شکل ۴-۵: ابعاد سلولی سویه‌های مورد مطالعه. الف: CM3-a، ب: CM3-b، ج: CM7-a و د: CM7-b. نتایج بر اساس آنالیز میکروسکوپ الکترونی SEM می‌باشد.



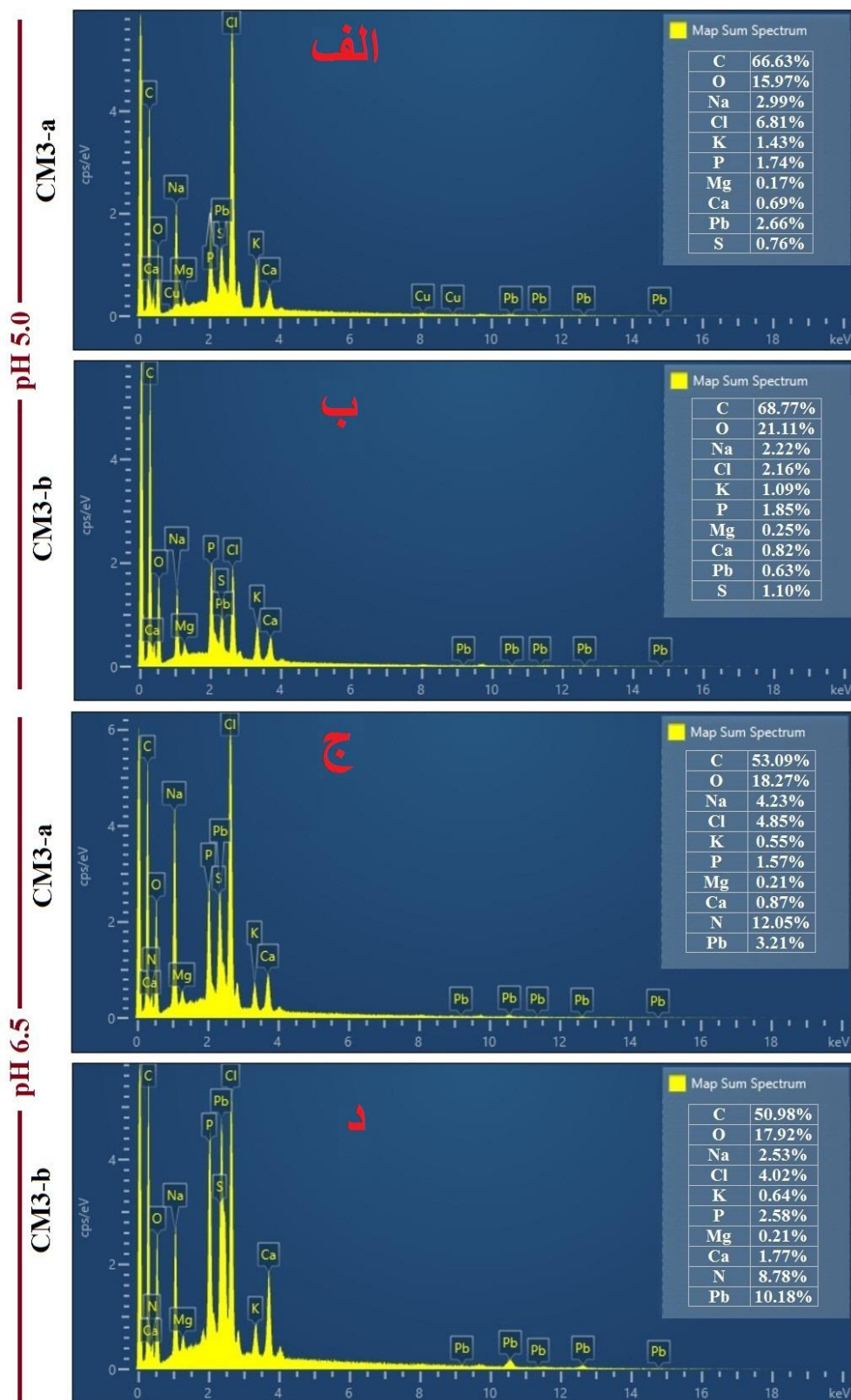
شکل ۴-۶: ترکیب عناصر موجود در نمونه شاهد که فاقد باکتری می‌باشد. نتایج بر اساس درصد کل عناصر موجود در محیط کشت که توسط آنالیز EDS تعیین شده است ارائه گردید.

عناصری همچون کربن (C)، کلسیم (Ca)، منیزیم (Mg)، فسفر (P)، پتاسیم (K) و سرب (Pb) تغییرات بیشتری بین سویه داشتند. نتایج EDS مشخص کرد که در pH ۵، درصد سرب در بیوماس حاصل از سویه CM3-a (شکل ۷-۴ الف) بیشتر از بیوماس حاصل از سویه CM3-b (شکل ۷-۴ ب) می‌باشد. همچنین میزان درصد سرب در بیوماس هر دو سویه CM3 در pH ۶/۵ افزایش می‌یابد و در بیشترین درصد سرب در بیوماس حاصل از رشد سویه CM3-b که در pH ۶/۵ رشد یافته بود، مشاهده گردید (شکل ۷-۴ د). در کنار این، درصد عناصری همچون فسفر و کلسیم در بیوماس حاصل از سویه CM3-b که در pH ۶/۵ رشد یافته بود، بیشتر از سویه‌های اولیه بود هرچند که درصد کربن کاهش یافته بود.

در سویه CM7 نتایج تا حدودی متفاوت بود (شکل ۸-۴). در pH ۵، درصد سرب در بیوماس سویه CM7-a بیشتر از سویه CM7-b بود (شکل ۸-۴ الف و شکل ۸-۴ ب) در حالیکه درصد سرب در بیوماس CM7-b بیشتر از CM7-a در pH ۶/۵ بود (شکل ۸-۴ ج و شکل ۸-۴ د). علاوه بر این در pH ۶/۵، درصد عناصر فسفر و کلسیم در بیوماس CM7-b بیشتر از CM7-a بود. همچنین درصد کربن، فسفر، منیزیم، کلسیم و گوگرد در همه نمونه‌های آزمایش شده، نسبت به شاهد کاهش نشان داد. این نتایج نشان دهنده اینست که سویه‌ها از مکانیسم‌های متفاوتی همچون تبادل یونی جهت کاهش سمیت سرب استفاده کرده‌اند.

باکتری‌ها از مکانیسم‌های مختلفی جهت کاهش سمیت عناصر سنگینی همچون سرب استفاده می‌کنند. نتایج حاصل از میکروسکوپ SEM تغییر در غلظت یون‌های همچون منیزیم و کلسیم به همراه سرب نشان داد و این دلیل را تقویت می‌کند که فرایند تبادل یونی در دیواره و غشای باکتری‌ها صورت گرفته است (Li et al., 2019). سیستم انتقال دهنده منیزیم از جمله انتقال دهنده‌های موجود در دیواره سلولی باکتری است که در تبادل یونی و رسوب سرب در سطح سلول دخالت دارد (Abbas et al., 2018). علاوه بر این، تغییر در ترکیبات دیواره سلولی همچون گروه‌های فسفات، سولفات و کربوکسیل نشان می‌دهد که سرب با ایجاد پیوندهایی مانند C=O به دیواره سلولی متصل شده است (Heidari and Panico, 2020b). تحقیق هوانگ و همکاران نیز این نتیجه را بیان داشت که سرب در کنار سلول‌های باکتری

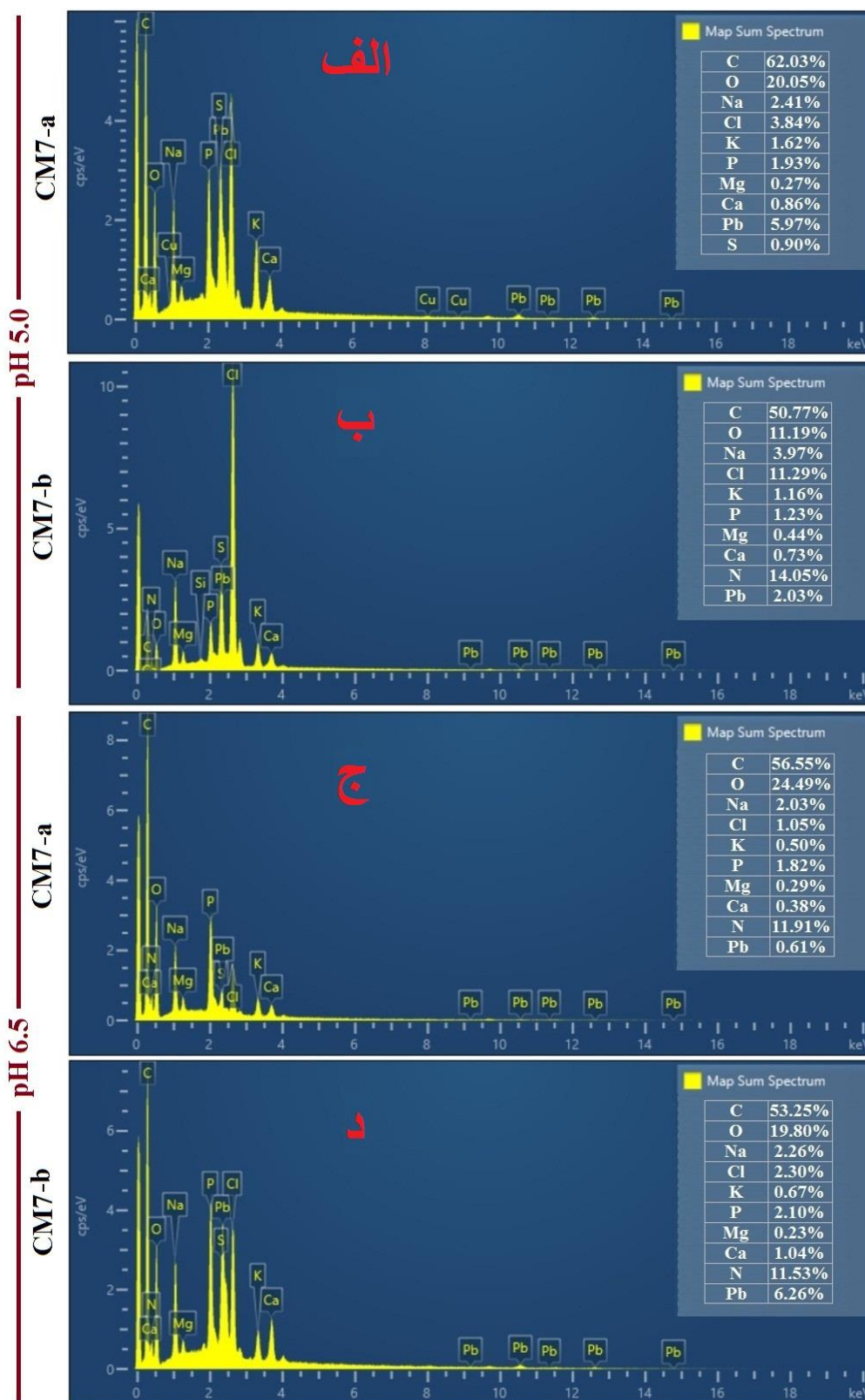
Bacillus cereus RC-1 جهت کاهش سمیت تجمع می‌یابد (Huang et al., 2018). رسوب سرب در فرم‌های کربنات، سولفات و فسفات از جمله مکانیسم‌های باکتری‌های مقاوم به سرب است که سبب کاهش حلالیت و سمیت سرب می‌شود (Bai et al., 2008; Jarosławiecka and Piotrowska-Seget, 2014;). هرچند نوع رسوب به سویه باکتری نیز بستگی دارد. بعنوان مثال در استفاده از باکتری *Providentia alcalifaciens* strain 2EA سرب در فرم فسفات رسوب داده می‌شود (Naik et al., 2013). در حالیکه در محیط آلوده به سرب و وجود باکتری *B.iodinium* GP13 و *B. pumilus* S3 فرم‌های سولفید سرب مشاهده شده است (De et al., 2008). بر اساس نتایج حاصل از ترکیب عناصر در بیوماس باکتری‌ها می‌توان بیان داشت کشت بلند مدت سبب تغییراتی در شرایط مطلوب رشد سویه‌ها شده که این تغییرات پتانسیل زیست‌پالایی آنها و مکانیسم‌های بکار رفته را تغییر داده است. هر چند نیاز است نوع تغییرات در ساختار ژنتیکی سویه‌ها تعیین شود تا اثرات آن بر رفتار آنها بطور دقیق‌تری تعیین شود.



شکل ۴-۷ نتایج آنالیز EDS برای سطح بیوماس حاصل از رشد سویه CM3. الف: CM3-a در pH 5.0، ب:

CM3-b در pH 5.0، ج: CM3-a در pH 6.5، د: CM3-b در pH 6.5. نتایج بر اساس درصد کل عناصر

موجود در محیط کشت که توسط آنالیز EDS تعیین شده است ارائه گردید.



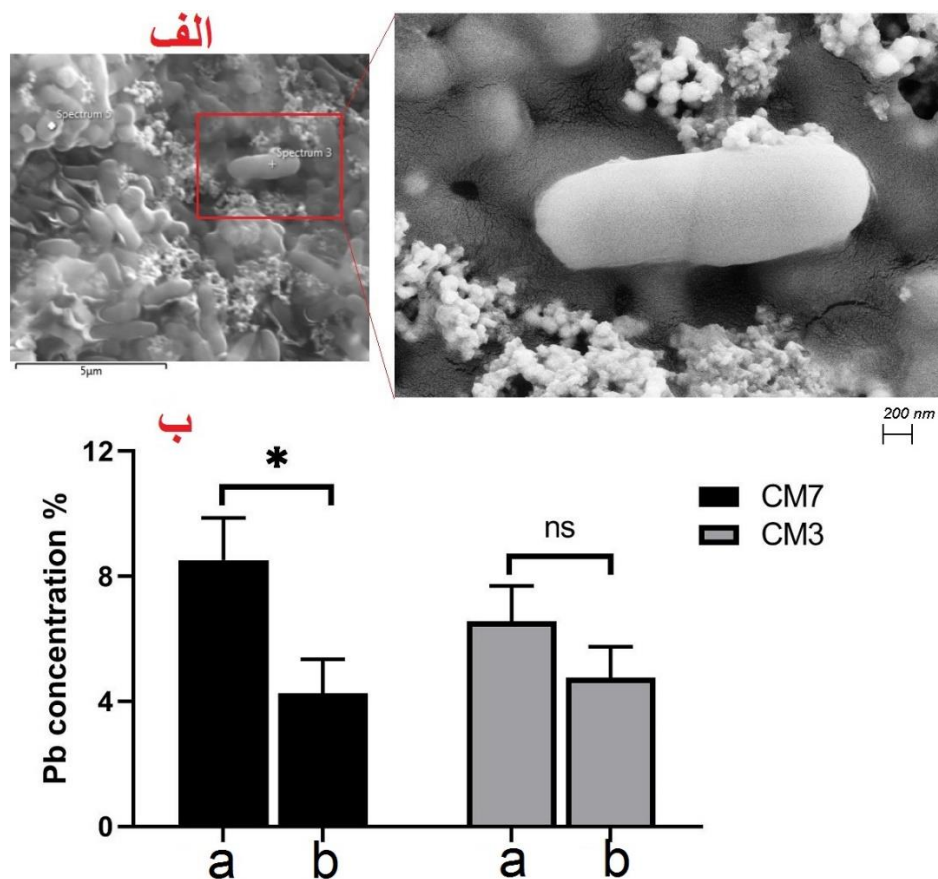
شکل ۴-۸ نتایج آنالیز EDS برای سطح بیوماس حاصل از رشد سویه CM7. الف: CM7-a در pH 5.0، ب:

CM7-b در pH 5.0، ج: CM7-a در pH 6.5، د: CM7-b در pH 6.5. نتایج بر اساس درصد کل عناصر

موجود در محیط کشت که توسط آنالیز EDS تعیین شده است ارائه گردید.

۵-۴ آنالیز سطح سلولی باکتری‌ها

در این مطالعه همچنین درصد عناصر موجود بر سطح سلولی باکتری‌های رشد یافته در محیط دارای ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب و pH ۶/۵ مورد مطالعه توسط میکروسکوپ الکترونی SEM قرار گرفت (شکل ۹-۴). نتایج نشان داد که سرب بصورت کریستال‌هایی به سطح سلولی باکتری‌ها متصل می‌شود (شکل ۹-۴ الف). نتایج EDS سطح سلولی مشخص کرد که درصد سرب در سویه‌های اولیه (CM3-a و CM7-a) بیشتر از سویه‌هایی است که بصورت بلند مدت در سرب واکشت شده بودند (شکل ۹-۴ ب). این نتایج حاکی از آنست که واکشت متعدد در محیط آلوده به سرب توانسته مکانیسم‌های زیست پالایی را تغییر دهد و در نتیجه سویه‌های سازگار شده تمایل کمتری در تجمع سرب در دیواره سلولی خود دارند که این عمل سبب کاهش سمیت سرب روی سلول می‌شود.



شکل ۹-۴ آنالیز SEM برای تک سلول باکتری‌ها (الف) و نتایج EDS سطح سلولی سویه‌های آزمایش شده (ب).

* و ns به ترتیب معناداری در سطح احتمال ۵ درصد و عدم معناداری بر حسب نتایج آزمون t می‌باشد.

تجزیه و تحلیل زیست توده باکتریایی با استفاده از SEM و EDS نشان داد که مکانیسم‌های زیست پالایی بین سویه‌های رشد یافته در سرب با سویه‌های بومی (اولیه) متفاوت است. درصد سرب در pH ۶/۵ در زیست توده سویه‌های رشد یافته در سرب افزایش یافت. این نشان می‌دهد که سویه‌های سازگار شده (CM3-b و CM7-b) عدم حلالیت سرب را افزایش می‌دهند، تا سمیت آن را کاهش دهند. باکتری‌های مقاوم به سرب از این مکانیسم جهت کاهش سمیت استفاده می‌کنند (Jarosławiecka and Piotrowska-Seget, 2014). در مطالعه حاضر، درصد فسفر و سرب در pH 6.5 در زیست توده سویه‌های سازگار شده در مقایسه با سویه‌های اولیه افزایش یافته است. به نظر می‌رسد که واکشت متعدد در محیط آلوده سبب شده تا سویه‌های جدید سرب را به شکل فسفات سرب بیشتر رسوب دهند و در نتیجه، سرعت رشد این سویه‌ها افزایش یافته است. از سوی دیگر، درصد سرب انباشته شده در غشای پلاسمایی سویه‌های جدید (CM3-b و CM7-b) کمتر از سویه‌های اولیه بود. تجمع سرب در فضای غشای پلاسمایی از جمله مکانیسم‌های مهم باکتری‌های مقاوم است. با این حال، سویه‌های سازگار شده بیشتر تمایل دارند که سرب را در خارج از سلول رسوب دهند تا اثرات منفی آن کاهش یابد و بنابراین سرعت رشد باکتری‌ها افزایش یابد.

۴-۶ ردیابی اپرون Pbr در سویه‌ها

اپرون Pbr شامل یک ناحیه خاص روی پلاسمید برخی سویه‌های مقاوم به سرب است که ژن‌های این اپرون در انتقال سرب به بیرون سلول و ایجاد فرم فسفات سرب دخالت دارند. تاکنون این ناحیه در باکتری مورد مطالعه گزارش نشده است، لذا بر اساس توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی، دو جفت پرایمر طراحی گردید که توالی پرایمرها در جدول ۴-۲ ارائه شده است. نتایج واکنش PCR مشخص کرد که این اپرون در پلاسمید باکتری‌های مورد مطالعه وجود ندارد. امکان دارد این سویه‌ها از سیستم‌های متفاوتی استفاده می‌کنند. لذا تهیه پروفایل کامل ژنومی سویه‌ها پیشنهاد می‌گردد تا درک بهتری از تغییرات صورت گرفته و ساختار ژنومی سویه‌ها ایجاد شود.

جدول ۴-۲ لیست پرایمرهای استفاده شده جهت ردیابی اپرون Pbr در سویه‌های مورد مطالعه

اسم پرایمر	نوع پرایمر	توالی	دمای اتصال	درصد GC	طول قطعه
۱	رفت	TCGCTGGCACGATCAACGA	۶۲	۵۸	۳۶۹
	برگشت	CTTCCAGATAGACGCCGCCT	۶۱	۶۰	
۲	رفت	CCTACCATCTGGGCAACCAC	۶۰	۶۰	۶۱۹
	برگشت	GCGAACACAGCCATCCACAT	۶۱	۵۵	

۴-۷ نتیجه گیری کلی

در این پژوهش اثرات واکشت‌های متعدد در محیط دارای سرب بر میزان توانایی زیست پالایی دو سویه CM3 و CM7 باکتری *Microbacterium oxydans* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد که قرار گیری بلند مدت در محیط آلوده باعث تغییرات و جهش‌هایی در باکتری می‌شود که در نتیجه آن میزان تحمل به سرب سویه‌های جدید تغییر پیدا می‌کند. این تغییرات سبب شده است که میزان دما و pH بهینه سویه تغییر کند و از مکانیسم‌های متفاوت‌تری نسبت به سویه‌های اولیه استفاده کنند. به نظر می‌رسد سویه‌های جهش یافته بیشتر تمایل دارند سرب را رسوب داده و از حالت محلول خارج کنند تا میزان سمیت آن کاهش یابد. در سویه‌های مورد مطالعه اپرون Pbr شناسایی نشد که حاکی از آنست که سویه‌ها از مسیرهای متفاوت‌تری جهت خارج کردن سرب از سیتوپلاسم استفاده می‌کنند. همچنین سرب کمتری در سطح سلولی رسوب کرده بود که این فرضیه را تقویت می‌کند که این سویه از طریق پمپ‌هایی که در غشا وجود دارد تبادل یونی انجام داده و در نتیجه سرب را به فرم غیر محلول رسوب می‌دهند. رسوب سرب باعث شده تا سویه‌های جدید سرعت رشد بیشتری نسبت به سویه‌های اولیه داشته باشند. نتایج این تحقیق یک دید اولیه از اثرات کشت پیوسته در محیط آلوده به سرب بر جهش در باکتری‌ها ارائه داد که می‌تواند در بیوتکنولوژی محیط زیست بیشتر مورد توجه قرار بگیرد.

۴-۸ پیشنهادات

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق و در راستای این کار، پیشنهاداتی ارائه می‌شود که انجام آن‌ها می‌تواند دید بهتری از نواحی جهش و اثر آن‌ها بر مکانیسم‌های بکار گرفته شده ارائه دهد که عبارتند از:

- توالی یابی کامل ژنوم سویه‌های سازگار شده و اولیه و تعیین نواحی تغییر یافته
 - ادامه روند واکشت در زمان بیشتر و تعیین بهترین زمان القای مقاومت
 - بررسی عملکردی ژن‌های درگیر در مقاومت به فلزات سنگین
 - تهیه کامل پروفایل پروتئینی باکتری‌های جهش یافته و اولیه در هنگام تنش سرب و شرایط نرمال
- جهت تعیین پروتئین‌های درگیر در فرایند زیست پالایی

- Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H.A., Khalil, H.P.S.A., 2018. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15, 243–262.
- Al-Aoukaty, A., Appanna, V.D., Huang, J., 1991. Exocellular and intracellular accumulation of lead in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 is mediated by the phosphate content of the growth medium. *FEMS Microbiol. Lett.* 83, 283–290.
- Al-Rub, F.A.A., El-Naas, M.H., Ashour, I., Al-Marzouqi, M., 2006. Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. *Process Biochem.* 41, 457–464.
- Alvarez-Legorreta, T., Mendoza-Cozatl, D., Moreno-Sanchez, R., Gold-Bouchot, G., 2008. Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in response to cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 86, 12–19.
- Bahadir, T., Bakan, G., Altas, L., Buyukgungor, H., 2007. The investigation of lead removal by biosorption: An application at storage battery industry wastewaters. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 98–102.
- Bai, H.-J., Zhang, Z.-M., Yang, G.-E., Li, B.-Z., 2008. Bioremediation of cadmium by growing *Rhodobacter sphaeroides*: kinetic characteristic and mechanism studies. *Bioresour. Technol.* 99, 7716–7722.
- Bandowe, B.A.M., Bigalke, M., Boamah, L., Nyarko, E., Saalia, F.K., Wilcke, W., 2014. Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and health risk assessment. *Environ. Int.* 65, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.018>
- Beveridge, T.J., Fyfe, W.S., 1985. Metal fixation by bacterial cell walls. *Can. J. Earth Sci.* 22, 1893–1898.
- Bharali, P., Das, S., Ray, A., Pradeep Singh, S., Bora, U., Kumar Konwar, B., Singh, C.B., Sahoo, D., 2018. Biocompatibility natural effect of rhamnolipids in bioremediation process on different biological systems at the site of contamination. *Bioremediat. J.* 22, 91–102.

- Bhaskar, P. V, Bhosle, N.B., 2006. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environ. Int.* 32, 191–198.
- Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Robinson, A.K., Parkinson, J.A., Bowness, P.W., Sadler, P.J., Robinson, N.J., 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* 45, 1421–1432.
- Borremans, B., Hobman, J.L., Provoost, A., Brown, N.L., van Der Lelie, D., 2001. Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J. Bacteriol.* 183, 5651–5658.
- Braissant, O., Decho, A.W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K.M., Visscher, P.T., 2007. Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5, 401–411.
- Bramhachari, P. V, Kishor, P.B.K., Ramadevi, R., Rao, B.R., Dubey, S.K., 2007. Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VB0S3.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 198–207.
- Bueno, B.Y.M., Torem, M.L., Molina, F., de Mesquita, L.M.S., 2008. Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. *Miner. Eng.* 21, 65–75. <https://doi.org/10.1016/J.MINENG.2007.08.013>
- Bueno, B Y M, Torem, M.L., Molina, F., De Mesquita, L.M.S., 2008. Biosorption of lead (II), chromium (III) and copper (II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. *Miner. Eng.* 21, 65–75.
- Calvano, C.D., Italiano, F., Catucci, L., Agostiano, A., Cataldi, T.R.I., Palmisano, F., Trotta, M., 2014. The lipidome of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* R26 is affected by cobalt and chromate ions stress. *Biometals* 27, 65–73.
- Chen, Z., Pan, X., Chen, H., Lin, Z., Guan, X., 2015. Investigation of lead (II) uptake by *Bacillus thuringiensis* 016. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1729–1736.
- Choińska-Pulit, A., Sobolczyk-Bednarek, J., Łaba, W., 2018. Optimization of copper, lead and cadmium biosorption onto newly isolated bacterium using a Box-Behnken design.

- Ecotoxicol. Environ. Saf. 149, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.008>
- Cui, Z., Zhang, X., Yang, H., Sun, L., 2017. Bioremediation of heavy metal pollution utilizing composite microbial agent of *Mucor circinelloides*, *Actinomucor* sp. and *Mortierella* sp. J. Environ. Chem. Eng. 5, 3616–3621. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.07.021>
- Dabir, A., Heidari, P., Ghorbani, H., Ebrahimi, A., 2019. Cadmium and lead removal by new bacterial isolates from coal and aluminum mines. Int. J. Environ. Sci. Technol. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02303-9>
- De, J., Ramaiah, N., Vardanyan, L., 2008. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. Mar. Biotechnol. 10, 471–477.
- Dinu, M.V., Comăniță, E.D., Drăgan, E.S., 2012. Kinetic study on heavy metals adsorption by iminodiacetate chelating resins. Environ. Eng. Manag. J. 11.
- Dong, J., Yu, M., Bian, Z., Wang, Y., Di, C., 2011. Geostatistical analyses of heavy metal distribution in reclaimed mine land in Xuzhou, China. Environ. Earth Sci. 62, 127–137.
- Fergusson, D.M., Horwood, L.J., Shannon, F.T., 1990. Early solid feeding and recurrent childhood eczema: a 10-year longitudinal study. Pediatrics 86, 541–546.
- Ferraro, A., van Hullebusch, E.D., Huguenot, D., Fabbicino, M., Esposito, G., 2015. Application of an electrochemical treatment for EDDS soil washing solution regeneration and reuse in a multi-step soil washing process: Case of a Cu contaminated soil. J. Environ. Manage. 163, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.08.004>
- Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A., 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. Indian J. Med. Res. 128, 501.
- Fomina, M., Gadd, G.M., 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. Bioresour. Technol. 160, 3–14.
- Gabr, R.M., Hassan, S.H.A., Shoreit, A.A.M., 2008. Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. Int. Biodeterior. Biodegradation 62, 195–203.
- Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 156, 609–643.

- Gadd, G.M., 2009. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol. Int. Res. Process. Environ. Clean Technol.* 84, 13–28.
- Gaylarde, C.C., Gaylarde, P.M., 2005. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 55, 131–139.
- Govarthanan, M., Lee, K.-J., Cho, M., Kim, J.S., Kamala-Kannan, S., Oh, B.-T., 2013. Significance of autochthonous *Bacillus* sp. KK1 on biomineralization of lead in mine tailings. *Chemosphere* 90, 2267–2272.
- Guitttonny-Philippe, A., Masotti, V., Höhener, P., Boudenne, J.-L., Viglione, J., Laffont-Schwob, I., 2014. Constructed wetlands to reduce metal pollution from industrial catchments in aquatic Mediterranean ecosystems: A review to overcome obstacles and suggest potential solutions. *Environ. Int.* 64, 1–16.
- Gupta, P., Diwan, B., 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Reports* 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Hadiani, M.R., Darani, K.K., Rahimifard, N., Younesi, H., 2018. Biosorption of low concentration levels of Lead (II) and Cadmium (II) from aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*: Response surface methodology. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 15, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.001>
- Hakeem, A.S., Smita, B., 2010. Heavy metal reduction of pulp and paper mill effluent by indigenous microbes. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 1, 201–203.
- Hamer, D.H., 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913–951.
- Heidari, P., Mazloomi, F., Sanaeizade, S., 2020a. Optimization Study of Nickel and Copper Bioremediation by *Microbacterium oxydans* Strain CM3 and CM7. *Soil Sediment Contam. An Int. J.* 29, 438–451. <https://doi.org/10.1080/15320383.2020.1738335>
- Heidari, P., Panico, A., 2020a. Sorption Mechanism and Optimization Study for the Bioremediation of Pb (II) and Cd (II) Contamination by Two Novel Isolated Strains Q3 and Q5 of *Bacillus* sp . *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 17, 4059.
- Heidari, P., Panico, A., 2020b. Sorption Mechanism and Optimization Study for the

- Bioremediation of Pb(II) and Cd(II) Contamination by Two Novel Isolated Strains Q3 and Q5 of *Bacillus* sp. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 4059. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114059>
- Heidari, P., Sanaeizade, S., 2020. Optimization and Characterization of Lead Bioremediation by Strains of *Microbacterium oxydans*. *Soil Sediment Contam.* 29, 901–913. <https://doi.org/10.1080/15320383.2020.1783508>
- Heidari, P., Sanaeizade, S., Mazloomi, F., 2020b. Removal of Nickel, Copper, Lead and Cadmium by New Strains of *Sphingomonas melonis* E8 and *Enterobacter hormaechei* WW28. *J. Appl. Biotechnol. Reports* 7, 208–214.
- Holan, Z.R., Volesky, B., 1994. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1001–1009.
- Huang, F., Wang, Z.-H., Cai, Y.-X., Chen, S.-H., Tian, J.-H., Cai, K.-Z., 2018. Heavy metal bioaccumulation and cation release by growing *Bacillus cereus* RC-1 under culture conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 157, 216–226.
- Hynninen, A., Touzé, T., Pitkänen, L., Mengin-Lecreulx, D., Virta, M., 2009. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. *Mol. Microbiol.* 74, 384–394.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60–72.
- Jarosławiecka, A., Piotrowska-Seget, Z., 2014. Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology* 160, 12–25.
- Jasmine, R., Selvakumar, B.N., Aishwarya, S., 2012. Role of a novel terpenoid as efflux inhibitor in targeting the efflux protein (mexA) of multidrug resistant, *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Pharm Sci Res* 3, 1647e-1651e.
- Kalita, D., Joshi, S.R., 2017. Study on bioremediation of Lead by exopolysaccharide producing metallophilic bacterium isolated from extreme habitat. *Biotechnol. Reports* 16, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.11.003>
- Kalpna, R., Angelaalincy, M.J., Kamatchirajan, B.V., Vasantha, V.S., Ashokkumar, B., Ganesh, V., Varalakshmi, P., 2018. Exopolysaccharide from *Bacillus cereus* VK1:

- Enhancement, characterization and its potential application in heavy metal removal. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 171, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.043>
- Kang, C.-H., Oh, S.J., Shin, Y., Han, S.-H., Nam, I.-H., So, J.-S., 2015. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. *Ecol. Eng.* 74, 402–407.
- Kang, C.H., Kwon, Y.J., So, J.S., 2016. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecol. Eng.* 89, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.023>
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1997. Nitrate removal from drinking water. *J. Environ. Eng.* 123, 371–380.
- Kiran, I., Akar, T., Tunali, S., 2005. Biosorption of Pb (II) and Cu (II) from aqueous solutions by pretreated biomass of *Neurospora crassa*. *Process Biochem.* 40, 3550–3558.
- Kumaran, N., Sundaramanickam, A., Bragadeeswaran, S., 2011. ABSORPTION STUDIES ON HEAVY METALS BY ISOLATED BACTERIAL STRAIN (*PSEUDOMONAS* Sp.) FROM UPPANAR ESTUARINE WATER, SOUTHEAST COAST OF INDIA. *J. Appl. Sci. Environ. Sanit.* 6.
- Kushwaha, A., Hans, N., Kumar, S., Rani, R., 2018. A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 1035–1045.
- Lam, T. V, Agovino, P., Niu, X., Roché, L., 2007. Linkage study of cancer risk among lead-exposed workers in New Jersey. *Sci. Total Environ.* 372, 455–462.
- Leung, W.C., Wong, M.-F., Chua, H., Lo, W., Yu, P.H.F., Leung, C.K., 2000. Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. *Water Sci. Technol.* 41, 233–240.
- Levinson, H.S., Mahler, I., 1998. Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 135–138.
- Levinson, H.S., Mahler, I., Blackwelder, P., Hood, T., 1996. Lead resistance and sensitivity in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 421–425.

- Li, J., Liu, Y.R., Zhang, L.M., He, J.Z., 2019. Sorption mechanism and distribution of cadmium by different microbial species. *J. Environ. Manage.* 237, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.057>
- Li, X., Peng, W., Jia, Y., Lu, L., Fan, W., 2016. Bioremediation of lead contaminated soil with *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere* 156, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.098>
- Lin, J., Harichund, C., 2011. Isolation and characterization of heavy metal removing bacterial bioflocculants. *African J. Microbiol. Res.* 5, 599–607.
- Liu, Y.-G., Ting, F.A.N., Zeng, G., Xin, L.I., Qing, T., Fei, Y.E., Ming, Z., Xu, W., Huang, Y., 2006. Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living *Aspergillus niger*. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 16, 681–686.
- Lombardi, P.E., Peri, S.I., Guerrero, N.R.V., 2010. Trace metal levels in *Prochilodus lineatus* collected from the La Plata River, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 160, 47–59.
- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30, 261–278.
- Mapolelo, M., Torto, N., 2004. Trace enrichment of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Talanta* 64, 39–47.
- Mire, C.E., Tourjee, J.A., O'Brien, W.F., Ramanujachary, K. V, Hecht, G.B., 2004. Lead precipitation by *Vibrio harveyi*: evidence for novel quorum-sensing interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 855–864.
- Nabulo, G., Young, S.D., Black, C.R., 2010. Assessing risk to human health from tropical leafy vegetables grown on contaminated urban soils. *Sci. Total Environ.* 408, 5338–5351.
- Naik, M.M., Dubey, S.K., 2013. Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 1–7.
- Naik, M.M., Khanolkar, D., Dubey, S.K., 2013. Lead-resistant *P. rovidencia alcalifaciens* strain 2 EA bioprecipitates Pb^{+2} as lead phosphate. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 99–104.
- Nieboer, E., Richardson, D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term 'heavy

- metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. Ser. B, Chem. Phys. 1, 3–26.
- Olafson, R.W., Abel, K., Sim, R.G., 1979. Prokaryotic metallothionein: preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 36–43.
- Özdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., Güven, K., 2009. Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub. sp. *decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* sub. sp. *stromboliensis*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. Chem. Eng. J. 152, 195–206.
- Panwichian, S., Kantachote, D., Wittayaweerasak, B., Mallavarapu, M., 2012. The use of selected purple nonsulfur bacteria to remove heavy metals and salts from sediment and water collected from contaminated areas to decrease their phytotoxicity. African J. Biotechnol. 11.
- Panwichian, S., Kantachote, D., Wittayaweerasak, B., Mallavarapu, M., 2010. Isolation of purple nonsulfur bacteria for the removal of heavy metals and sodium from contaminated shrimp ponds. Electron. J. Biotechnol. 13, 3–4.
- Park, J.H., Bolan, N., 2013. Lead immobilization and bioavailability in microbial and root interface. J. Hazard. Mater. 261, 777–783.
- Pérez-de-Mora, A., Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F., Jaekel, P., Schlöter, M., 2006. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. Soil Biol. Biochem. 38, 327–341.
- Pino, G.H., de Mesquita, L.M.S., Torem, M.L., Pinto, G.A.S., 2006. Biosorption of cadmium by green coconut shell powder. Miner. Eng. 19, 380–387.
- Puig, S., Thiele, D.J., 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. Curr. Opin. Chem. Biol. 6, 171–180.
- Qiao, W., Zhang, Y., Xia, H., Luo, Y., Liu, S., Wang, S., Wang, W., 2019. Bioimmobilization of lead by *Bacillus subtilis* X3 biomass isolated from lead mine soil under promotion of multiple adsorption mechanisms. R. Soc. open Sci. 6, 181701.
- Raungsomboon, S., Chidthaisong, A., Bunnag, B., Inthorn, D., Harvey, N.W., 2006. Production, composition and Pb²⁺ adsorption characteristics of capsular

- polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. *Water Res.* 40, 3759–3766.
- Rensing, C., Sun, Y., Mitra, B., Rosen, B.P., 1998. Pb (II)-translocating P-type ATPases. *J. Biol. Chem.* 273, 32614–32617.
- Roane, T.M., 1999. Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal–contaminated soils. *Microb. Ecol.* 37, 218–224.
- Salehizadeh, H., Shojaosadati, S.A., 2003. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Res.* 37, 4231–4235.
- Samanta, A., Bera, P., Khatun, M., Sinha, C., Pal, P., Lalee, A., Mandal, A., 2012. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 2, 178–189.
- Shah, J., Klessig, D.F., 1999. Salicylic acid: signal perception and transduction, in: *New Comprehensive Biochemistry*. Elsevier, pp. 513–541.
- Shen, W., Yang, H., 2008. Effects of earthworm and microbe on soil nutrients and heavy metals. *Agric. Sci. China* 7, 599–605.
- Shin, M.-N., Shim, J., You, Y., Myung, H., Bang, K.-S., Cho, M., Kamala-Kannan, S., Oh, B.-T., 2012. Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *J. Hazard. Mater.* 199–200, 314–320.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.010](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.010)
- Siegel, F.R., 2002. *Environmental geochemistry of potentially toxic metals*. Springer.
- Singh, V., Tiwari, A., Das, M., 2016. Phyco-remediation of industrial waste-water and flue gases with algal-diesel engenderment from micro-algae: a review. *Fuel* 173, 90–97.
- Spain, A., Alm, E., 2003. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment.
- Spiro, T.G., Stigliani, W.M., 2003. *Chemistry of the Environment*.
- Tiquia-Arashiro, S.M., 2018. Lead absorption mechanisms in bacteria as strategies for lead bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 5437–5444.

- Tong, S., Schirnding, Y.E. von, Prapamontol, T., 2000. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull. World Health Organ.* 78, 1068–1077.
- Velásquez, L., Dussan, J., 2009. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *J. Hazard. Mater.* 167, 713–716.
- Watt, G.R., Kinny, P.D., Friderichsen, J.D., 2000. U–Pb geochronology of Neoproterozoic and Caledonian tectonothermal events in the East Greenland Caledonides. *J. Geol. Soc. London.* 157, 1031–1048.
- Wei, W., Liu, X., Sun, P., Wang, X., Zhu, H., Hong, M., Mao, Z.-W., Zhao, J., 2014. Simple whole-cell biodegradation and bioremediation of heavy metals based on an engineered lead-specific operon. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3363–3371.
- Wu, Z., Liu, Q., Li, Z., Cheng, W., Sun, J., Guo, Z., Li, Y., Zhou, J., Meng, D., Li, H., 2018. Environmental factors shaping the diversity of bacterial communities that promote rice production. *BMC Microbiol.* 18, 51.
- Yadav, K.K., Gupta, N., Kumar, V., Singh, J.K., 2017. Bioremediation of heavy metals from contaminated sites using potential species. A review. *Indian J. Environ. Prot* 37, 65.
- Yakubu, M.B., 2007. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African J. Biotechnol.* 6.

Abstract

Human activities and industrialization have increased the concentration of harmful elements such as heavy metals in the ecosystem and have devastating effects on the food health of organisms. Lead (Pb(II)) is one of the heavy metal elements causing harmful effects on ecosystems and living organisms. Bacteria, as the divers organisms, are used as part of microorganisms involved in the process of Pb(II) bioremediation. In the present study, the effects of long-term Pb(II) contamination (LTC) under a continuous sub-culturing system were evaluated on the growth rate, Pb-remediation potential, Pb-remediation mechanisms, morphological and genetically modifications of two strains, CM3 and CM7, of *Microbacterium oxydans*. Our findings illustrated that LTC could affect the optimal pH and temperature, and LTC was able to increase the growth rate of bacterial strains in the Pb(II) environment comparing with native strains. Besides, the Pb-remediation potential of strains from LTC was sharply increased at pH 6.5. The biomass of strains was analyzed in terms of the topographical and elements percentage using SEM. Our observations resulted that LTC could not change the cell shape and cell dimensions of studied strains. Besides, we found a correlation between P and Pb(II) percentage in biomass of strains from LTC, indicating these strains more precipitated Pb(II) in forms such as lead sulfate, and lead phosphate to reduce toxicity. Furthermore, LTC had reduced the Pb(II) accumulation into the cell wall of strains. In addition, the Pbr operon was not detected in the genome of studied strains indicating that they used other lead transporters to exit lead from cytoplasm.

Keywords: Mutation, Lead remediation, Bacterial strains, Continues sub-culturing, Bioremediation, Heavy metals, Lead-resistance mechanisms.



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

Thesis Plant biotechnology M.Sc.

**Genomic and cellular analysis
between Pb(II)-adapted and native
strains of *Microbacterium oxydans***

By: Zahra Ashrafi

Supervisor:

Dr. Parviz Heidari

Advisor:

Dr. Shideh Mojerlou

October 2021