

بررسی رفتار فیزیولوژیک سیانوباکتری کلوتریکس (*Calothrix sp.*) در معرض فلز سنگین نیکل

ندا سلطانی^۱، لادن بافته‌چی^۱، مریم عامری^{۲*}، مهدی بلفیون^۱، سیده مهری جوادی^۱، بهناز باقری^۱

^۱پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی، گروه میکروبیولوژی نفت، تهران، ایران

^۲پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی جهاددانشگاهی، گروه بیوتکنولوژی صنعتی میکروارگانیسم‌ها، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۳۰

چکیده

آلودگی فلزات سنگین خصوصاً فلزات سنگین همراه با نفت از معضلات عمده زیست محیطی به شمار می‌رود. این آلاینده‌ها خاک، آب و اکوسیستم‌های مرتبط را درگیر ساخته و مشکلاتی را برای فلور و حتی انسان‌ها ایجاد می‌کنند. با توجه به پتانسیل‌های بالقوه ریز جلبک‌ها در زمینه حذف و کاهش انواع آلودگی‌ها اعم از نفتی و غیر نفتی (فلزات سنگین)، این پژوهش با استفاده از ریزجلبک *Calothrix.sp.* جدا شده از مناطق آلوده نفتی با هدف بررسی کاهش فلز سنگین نیکل شکل گرفت که طی آن برخی رفتارهای فیزیولوژیک ریزجلبک نیز مطالعه گردید. طراحی آزمایشات با کمک نرم افزار Design expert و با در نظر گرفتن فاکتورهای pH ۴-۹، غلظت ۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل در زمان ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه اجرا شد. نتایج نشان داد در pH ۸ با میزان ۸۰/۷۴ میلی‌گرم بر لیتر نیکل و زمان ۴۸/۲۴ دقیقه بیشترین میزان جذب نیکل (۶۹ درصد) بود. نتایج این تحقیق نشان داد تیماردهی بیومس با عوامل شیمیایی و فیزیکی مختلف در قالب‌های مختلفی نظیر تثبیت و یا استفاده از متابولیت‌های آن، روند جذب را تسریع و تسهیل نموده و پتانسیل استفاده از این ریزجلبک را در سیستم‌های پالایش بعدی هموار می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: آلودگی زیست محیطی، جلبک پالایی، کاتالاز، کلوتریکس، نیکل

مقدمه

خسارات جبران ناپذیری بر جوامع گیاهی، جانوری و انسانی خواهد داشت. نیکل و روی دو فلز عمده هستند که در ترکیب نفت خام دیده می‌شوند. همچنین آهن، کروم، مس، منگنز و کبالت نیز تقریباً همیشه در نفت وجود دارند. آلودگی اکوسیستم‌های آبی به فلزات سنگین یکی از مهمترین مباحثی است که در سالهای اخیر به آن توجه ویژه‌ای شده است. به دلیل اینکه، این اکوسیستم‌ها به‌طور طبیعی دریافت کننده نهایی فلزات سنگین هستند، مطالعات متعددی در این زمینه صورت گرفته است. بنابراین، آلودگی فلزات سنگین از جمله آلاینده‌هایی هستند که به دلیل

توسعه روزافزون صنعت اگرچه، دارای مزایای بی‌شماری است، ولی متأسفانه مشکلات خاصی همچون آلودگی محیط زیست را نیز به دنبال دارد. این آلودگی‌ها خصوصاً در مناطق نفت خیز آسیب‌های جدی بر پیکره اکوسیستم‌ها وارد نموده است. در این مناطق و همچنین در برخی از فرایندهای صنعتی رها سازی فلزات سنگین و ایجاد آلودگی‌های محیطی را داریم که در صورت ورود به چرخه غذایی موجب

*نویسنده مسئول: ma.ameri65@gmail.com

قیمت و سیستم‌های پایشی، مصرف زیاد انرژی و بر جای گذاشتن باقیمانده‌های آلوده کننده، که باید حذف گردند، اشاره نمود (Peña-Castro et al., 2006; de-Bashan and Bashan, 2010; Dwivedi, 2012). از طرف دیگر، روش‌های فوق هنگامی که غلظت یون‌های فلزی در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باشند به اندازه کافی توانایی حذف فلزات سنگین را ندارند (Yilleng, 2013). استفاده از روش‌های زیستی در حذف فلزات از پساب‌ها می‌تواند برخی از محدودیت‌ها و مشکلات مربوط به روش‌های فیزیکی و شیمیایی را برطرف نماید و راه حل اقتصادی‌تری محسوب می‌شود (Wong et al., 2007). در سال‌های اخیر، استفاده از توده‌های زیستی مختلف برای حذف فلزات سنگین از پساب‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Wong et al., 2007). در این میان، استفاده از میکروارگانیسم‌هایی مانند سیانوباکتری‌ها که توانایی بالقوه ای جهت حذف فلزات سنگین دارند جایگاه ویژه ای پیدا کرده است (Ammar et al., 2013). در این پژوهش با کمک ریزجلبک جداشده از منطقه آلوده نفتی، نسبت به بررسی رفتارهای فیزیولوژیک و توانایی زیست پالایی یا جلبک پالایی آن پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

از مناطق آلوده نفتی با کمک محیط کشت جامد BGO جداسازی سیانوباکتری انجام شد و بعد از خالص سازی و کشت مایع آن، به منظور شناسایی مولکولی، پرایمر S16 استفاده گردید (جدول ۱). جهت استخراج DNA از کیت مخصوص استخراج DNA ژنوم باکتریایی (Fermentase K۰۵۱۲) استفاده شد.

سمیت، عدم تجزیه و توان تجمع زیستی^۱ در موجودات زنده و وارد شدن در زنجیره غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Peng et al., 2009). سطح جهانی آلودگی محیطی به فلزات در ۱۵۰ سال گذشته بیش از ۴۰۰۰ برابر شده است. تماس با فلزات سنگین می‌تواند سبب اختلالات عصبی، پیری سلولی، نارسایی کبدی و کلیوی و سرطانزایی شود. بر این اساس فلزات سنگین شامل کادمیوم، مس، جیوه، سرب، نیکل و روی در لیست اولویت‌دار آلاینده‌های خطرناک می‌باشند. مقادیر جزئی از فلزات سنگین نظیر کادمیوم، سرب، مس و کروم که بطور معمول در خاکهای آلوده وجود دارند، در میکروبها و گیاهان نیز مضر باشند. به طوری که می‌توانند علائم کمبود آهن را تشدید و در نتیجه باعث افت رشد آنها گردند (Idris et al., 2007). علاوه بر این فلزات سنگین می‌توانند با گروههای سولفوهیدریل پروتئین‌ها ترکیب شوند و باعث کاهش فعالیت آنزیمی نیز گردند. حضور دائمی فلزات سنگین در اکوسیستم‌های آبی، تهدیدی همیشگی برای سلامت جوامع بشری می‌شوند (Kar et al., 2008).

آلودگی منابع آب با فلزات سنگین در نتیجه فعالیت‌های صنعتی، حیات تمامی موجودات زنده را تهدید می‌کند؛ بنابراین حذف آنها از پساب‌ها قبل از ورود به محیط زیست امری ضروری می‌نماید. روش‌های مختلف شیمیایی و فیزیکی مانند جذب سطحی، رسوب‌دهی شیمیایی، استخراج با حلال، استفاده از روش‌های تعویض یونی و غیره ممکن است در جداسازی فلزات سنگین استفاده شوند، اما هر کدام دارای معایبی هستند که از آن جمله می‌توان به جداسازی ناکامل فلزات، نیاز به تجهیزات گران

جدول ۱: توالی پرایمر S16 جهت شناسایی و بررسی مولکولی

Primer type and target locus	Nucleotide sequence
27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1490R	5' TACGGYTACCTTGTACGACTT 3'

سنجش میزان رشد: سنجش میزان رشد سیانوباکتر با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر و طی ۲۰ روز انجام گرفت.

سنجش پروتئین: جهت استخراج پروتئین از بافر MOPS (۳۰ میلی مولار، ۳، pH) و به همراه فرایند انجماد و ذوب در ازت مایع و سابش درهاون چینی در چندین مرحله استفاده گردید. به منظور سنجش کمی پروتئین از معرف برادفورد و برای تهیه منحنی استاندارد پروتئین از BSA (پروتئین سرم گاوی) در غلظت‌های ۰ تا ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد و جذب کمپلکس رنگی حاصله در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد (Kruger, 2009).

به منظور بررسی پروفایل پروتئینی و سنجش کیفی پروتئین‌ها از ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد استفاده گردید. بدین منظور با توجه به میزان پروتئین بدست آمده از سنجش کمی، میزان یکسانی از پروتئین در نظر گرفته و در چاهک‌های ژل بارگذاری شد. رنگ آمیزی ژل توسط محلول کوماسی بلو و آشکار سازی باندها نیز توسط محلول رنگ زدا (حاوی استیک اسید ۱۰ درصد، اتانول ۴۰ درصد) انجام شد.

سنجش کاتالاز: به منظور سنجش کمی فعالیت کاتالاز طبق روش Dazy و همکاران (۲۰۰۸) و در طول موج ۲۴۰ نانومتر به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای میزان پروتئین گزارش گردید.

به منظور بررسی کیفی فعالیت آنزیم کاتالاز، انجام کلیه مراحل آزمایش از جمله استخراج پروتئین کل، نگهداری، تهیه و بارگذاری و رانش بر روی ژل‌ها تا قبل از رنگ آمیزی ژل می بایست به دور از هرگونه

تیماردهی سیانوباکتر با نیکل: به منظور دست یابی به شرایط بهینه جذب نیکل، بازه گسترده ای از pH (۹-۴)، غلظت نیکل (۵-۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) و نیز مدت زمان تیمار (۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه) در نظر گرفته شد. طراحی آزمایشات با استفاده از نرم افزار Design expert 7.0 انجام شد. این نرم افزار با در نظر گرفتن سه فاکتور pH، غلظت و زمان تیمار، ۲۰ سری آزمایش را طراحی کرد. استوک نیکل با استفاده از نمک NiSO₄.6H₂O در غلظت ۱ گرم بر لیتر تهیه و عوامل مذکور در محیط کشت مایع BG0 و در شرایط استریل اعمال گردید. آزمایش در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در شرایط نوردهی کامل (۵۰۰۰ لوکس) و بر روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm و در ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری انجام گردید.

پس از پایان زمان آزمایش، محیط‌ها سانتریفیوژ و محلول رویی جهت خوانش میزان نیکل باقی مانده با دستگاه جذب اتمی استفاده گردید. بدین منظور درصد جذب نیکل با استفاد از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد جذب نیکل} = ((C_1 - C_2) / C_1) * 100$$

که در آن C₁، غلظت اولیه نیکل در محیط و C₂ و غلظت نهایی نیکل در محلول می باشد.

بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک سیانوباکتری: در شرایط طبیعی (محیط کشت BG0) و شرایط بیشینه جذب نیکل در آزمایش قبل، پاسخ‌های فیزیولوژیک شامل پروفایل رنگدانه‌ای، پروتئین و کربوهیدرات ریزجلبک بررسی شد. همچنین میزان رشد و فعالیت آنزیم کاتالاز نیز مطابق روش‌های زیر مطالعه گردید.

عامل دنا توره کننده پروتئین‌ها باشد. لذا نمونه‌ها با بافر بارگذاری ژل نیترو مخلوط شده و بر روی ژل فاقد SDS بارگذاری انجام شد و در بافر فاقد SDS رانش انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل در محلول ۱:۱ پتاسیم فری سیانید ۱درصد و فریک کلرید ۱درصد انتقال داده شد. پس از ظاهر شدن باندهای مربوطه، ژل در آب مقطر غوطه‌ور شد تا شستشو نهایی انجام گیرد. حضور باندهای روشن در زمینه تاریک معرف حضور ایزومرهای کاتالاز می باشد.

سنجش رنگیزه‌ها

کلروفیل: برای سنجش کلروفیل از روش Marker (۱۹۷۲) استفاده می‌شود. به منظور استخراج کلروفیل از متانول خالص استفاده شد و برای جدا سازی عصاره‌های متانولی از سانتریفیوژ استفاده گردید. سپس جذب نوری این عصاره‌ها در طول موج ۶۶۵ نانومتر اندازه گیری شد که با استفاده از رابطه زیر مقدار کلروفیل بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید (Marker, 1972).

$13.14 \times OD_{665}$ = کلروفیل (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
کاروتنوئیدها: برای اندازه گیری میزان کاروتنوئیدها از روش Chamovitz و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد. برای استخراج کاروتنوئیدها، استن ۸۰ درصد به پلت حاصل از سوسپانسیون جلبکی اضافه و طیف جذبی بخش رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۵ و ۴۶۱ نانومتر در مقابل شاهد استن ثبت شد. غلظت کاروتنوئیدها با استفاده از فرمول زیر بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه می‌شود.

$$[OD_{461} - (0.046 \times OD_{665})] \times 4$$

فیکوبیلی پروتئین‌ها: برای اندازه‌گیری میزان فیکوبیلی پروتئین‌های مختلف از روش Bermejo و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. به‌منظور استخراج فیکوبیلی

پروتئین‌ها ۱۰۰ میکرولیتر گلیسرول به یک میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی اضافه، پس از یک شبانه روز استقرار در یخچال، به آن یک میلی‌لیتر سدیم استات (غلظت نهایی ۰/۳ نرمال) به آن اضافه و پس از ۴ ساعت با استفاده از سانتریفیوژ ۷۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه محلول رویی جدا شد و جذب نوری آن در طول موج‌های ۶۱۵، ۵۶۲، ۶۵۲ و ۷۵۰ نانومتر مشخص شد. با استفاده از روابط زیر میزان فیکواریترین، فیکوسیائین، آلفوکیوسیائین و فیکوبیلی پروتئین بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید (Bermejo et al., 2002).

$$5.09 / [1000(A_{652}-A_{750})-208(A_{615}-A_{750})]$$

$$5.34 / [1000(A_{615}-A_{750})-474(A_{652}-A_{750})]$$

$$9.62 / [1000(A_{562}-A_{750})-2.41(PC)-0.948(AP)]$$

سنجش قندها: برای سنجش قندهای محلول، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد بر روی ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی افزوده به این ترتیب قندهای محلول در اتانول حل شدند. محلول حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد تا نشاسته بر روی کاغذ صافی باقی بماند و قندهای محلول از آن عبور کنند.

برای جداسازی قندهای نامحلول (نشاسته)، کاغذ صافی حاوی نشاسته در اون خشک گردید. سپس با افزودن آب مقطر جوشانده شده تا نشاسته درون آب حل شود. محلول بدست آمده از کاغذ صافی عبور داده شده و در بشر نگهداری گردید.

در پایان مقدار ۲ میلی‌لیتر از محتویات هر یک از بشرهای محتوی قندهای محلول و نشاسته را درون لوله‌های آزمایش جداگانه ریخته و به هر یک ۱ میلی‌لیتر فنل ۵درصد و اسیدسولفوریک غلیظ (همراه با فشار) افزوده گردید. پس از گذشت نیم ساعت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر در مقابل شاهد آب (به همراه فنل و اسید سولفوریک) خوانده شد (Le and Stuckey, 2016). برای تهیه منحنی

در خصوص برهم کنش سه فاکتور pH، غلظت فلز سنگین نیکل و زمان انجام داد، تعداد ۲۰ آزمایش در نظر گرفته شد که نتایج حاصل از جذب زیستی در جدول ۲ برای هر آزمایش گزارش شده است.

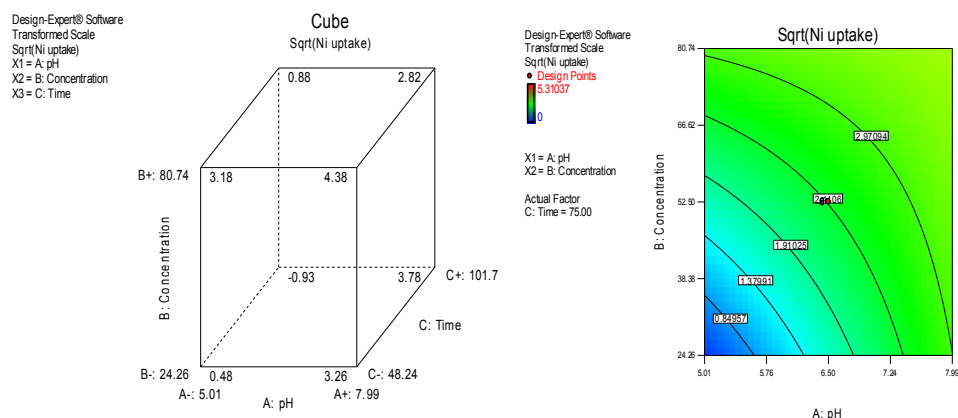
استاندارد از گلوکز (غلظت‌های صفر تا ۳۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده و منحنی استاندارد ترسیم شد.

نتایج

با توجه به طراحی که نرم افزار Design expert

جدول ۲: نتایج حاصل از طراحی آزمایشات با نرم افزار Design expert

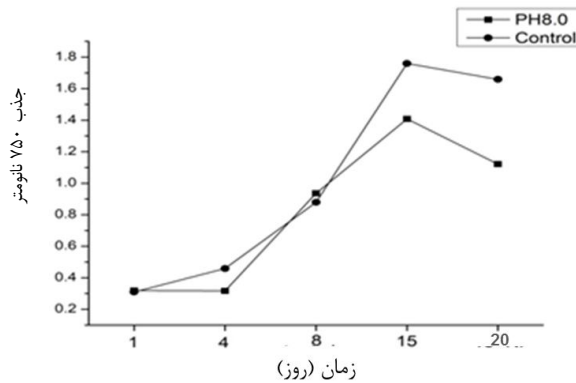
Std	ران ها	بلوک ها	فاکتور اول pH	فاکتور دوم غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)	فاکتور سوم زمان (دقیقه)	درصد جذب
۶/۸۴	۱۰۱/۷۶	۲۴/۲۶	۵/۰۱	۱ بلوک	۱	۵
۲۶/۲۸	۷۵/۰۰	۵۲/۵۰	۶/۵۰	۱ بلوک	۲	۱۶
۱۸/۲۸	۷۵/۰۰	۵۲/۵۰	۶/۵۰	۱ بلوک	۳	۱۹
۱۷/۷۱	۷۵/۰۰	۵۲/۵۰	۶/۵۰	۱ بلوک	۴	۲۰
۱۹/۶۲	۱۰۱/۷۶	۲۴/۲۶	۷/۹۹	۱ بلوک	۵	۶
۱۹/۶۲	۱۰۱/۷۶	۲۴/۲۶	۷/۹۹	۱ بلوک	۵	۶
۱۲/۷۶	۱۲۰/۰۰	۵۲/۵۰	۶/۵۰	۱ بلوک	۶	۱۴
۱۹/۶۲	۱۰۱/۷۶	۲۴/۲۶	۷/۹۹	۱ بلوک	۵	۶
۱۲/۷۶	۱۲۰/۰۰	۵۲/۵۰	۶/۵۰	۱ بلوک	۶	۱۴
۳۳/۱۱	۴۸/۲۴	۸۰/۷۴	۷/۹۹	۱ بلوک	۷	۴
۶۹/۵۲	۷۵/۰۰	۵۲/۵۰	۹/۰۰	۱ بلوک	۸	۱۰
۳۹/۳۱	۱۰۱/۷۶	۸۰/۷۴	۷/۹۹	۱ بلوک	۹	۸
۰/۰۰	۷۵/۰۰	۵/۰۰	۶/۵۰	۱ بلوک	۱۰	۱۱
۳۰/۶۴	۴۸/۲۴	۸۰/۷۴	۵/۰۱	۱ بلوک	۱۱	۳
۲۴/۱۵	۴۸/۲۴	۲۴/۲۶	۵/۰۱	۱ بلوک	۱۲	۱



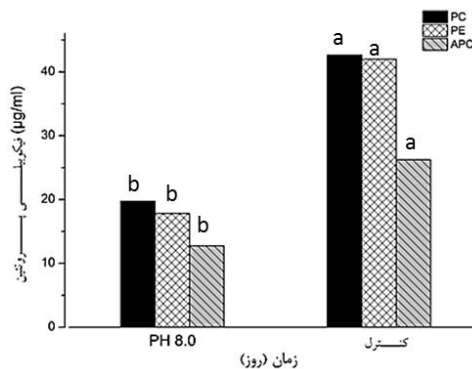
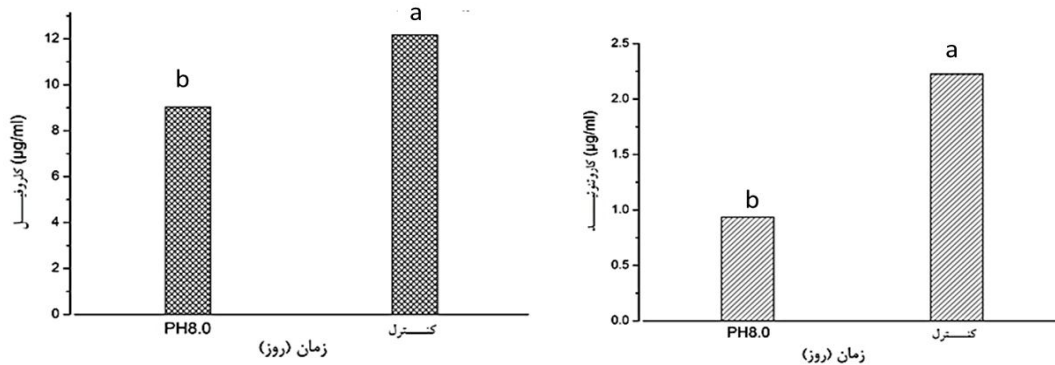
شکل ۱: بررسی تاثیر هم زمان pH و غلظت‌های مختلف بر میزان جذب نیکل (راست)، نمودار مکعبی و بررسی تاثیر سه فاکتور در میزان کاهش نیکل (چپ)

میلی لیتر نیکل و زمان ۴۸ دقیقه صورت گرفته، لذا این شرایط بعنوان نقطه بیشینه جذب در نظر گرفته شد. پس از اعمال نتایج فوق بر روی سیانوباکتری موجود در فاز لگاریتمی، نتایج مربوط به منحنی رشد به صورت شکل ۲ نمودار شد که طی آن مهار چشمگیری بر رشد ریز جلبک مشاهده شد.

بررسی نمودار مکعبی تغییرات نیکل (شکل ۱) نشان می‌دهد که بیشترین مقدار جذب طبق نمودار و محاسبات نرم افزاری انجام شده در pH های بالا، غلظت‌های بالا و در زمان‌های ابتدایی صورت می‌گیرد. با توجه به نتایج حاصله بیشترین میزان جذب نیکل در شرایط pH ۸، غلظت ۸۰ میلی گرم بر



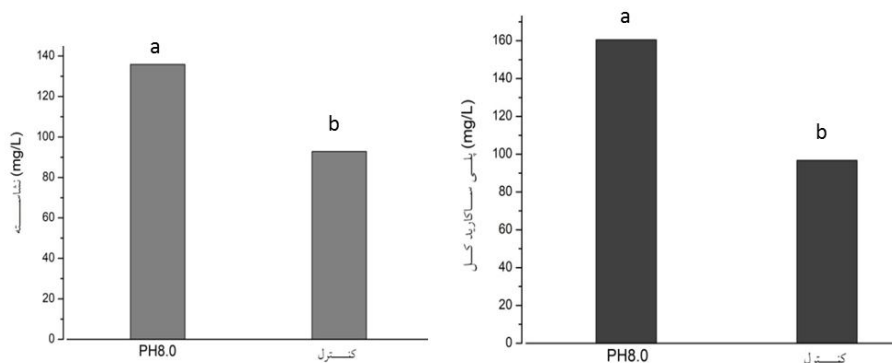
شکل ۱: مقایسه منحنی رشد نمونه در شرایط بهینه جذب نیکل (pH ۸) با کنترل (pH ۷ و بدون تیمار نیکل)، پس از ۱۵ روز نیکل به محیط در pH ۸ اضافه گردید.



شکل ۳: بررسی تغییرات کلروفیل و کاروتنوئید کلوتریکس در pH ۸ با حضور نیکل و کنترل (بالا)، بررسی تغییرات فیکوبیلی پروتئین کلوتریکس در pH ۸ با حضور نیکل و کنترل (پایین).

سنجش رنگدانه‌ها: نتایج مربوط به سنجش میزان کلروفیل، کاروتنوئیدها و فیکوبیلی پروتئین‌های کلوتریکس در شرایط بهینه جذب نیکل در شکل ۳ آمده است. نتایج نشان داد که میزان کلروفیل و کاروتنوئید کلوتریکس در pH ۸ با حضور نیکل نسبت به نمونه شاهد کاهش چشمگیری می‌یافت. میزان فیکوبیلی پروتئین کلوتریکس مانند سایر رنگیزه‌ها (کلروفیل و کاروتنوئیدها) در شرایط تیمار

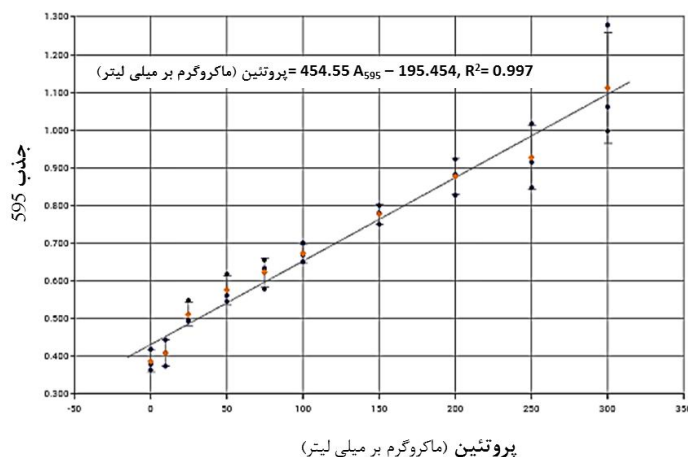
(pH ۸ به همراه نیکل) نسبت به شاهد کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. سنجش قند: نتایج مربوط به سنجش قندهای نامحلول (نشاسته) و پلی‌ساکاریدهای کل کلوتریکس در شرایط بهینه جذب نیکل در شکل ۴ آمده است. میزان قندهای نامحلول کلوتریکس در شرایط تیمار نسبت به شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت.



شکل ۴: بررسی تغییرات قندهای نامحلول (نشاسته) و پلی‌ساکاریدهای کل کلوتریکس در pH ۸ با حضور نیکل و کنترل.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان

سنجش پروتئین نمونه‌ها: در شرایط pH ۸ دارای نیکل و فاقد آن طی ۱ تا ۲۴ ساعت سنجش پروتئین و فعالیت آنزیم کاتالاز انجام گرفت. پس از کسب منحنی استاندارد (شکل ۵) غلظت پروتئین‌ها محاسبه و در جدول ۳ گزارش شده است.



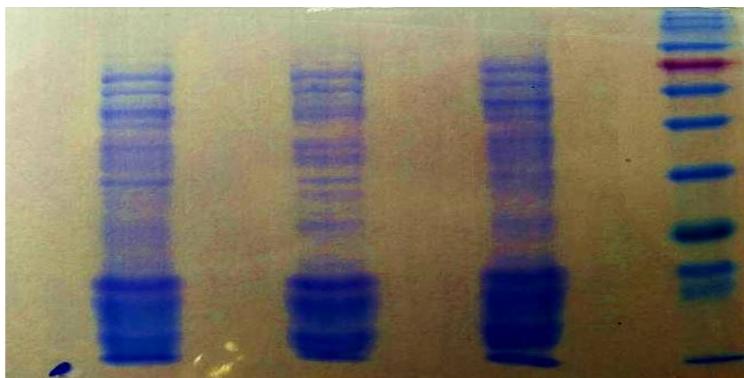
شکل ۵: منحنی استاندارد پروتئین

جدول ۳: سنجش کمی پروتئین تیمارها

تکرار	شرح تیمار	Std Dev	Cv(درصد)	پروتئین (ماکروگرم بر لیتر)
۱	pH ۸	۰,۰۲۹	۲,۴۴	۱۷۹۴,۸۱۲
۲	فاقد نیکل	۰,۰۱۹	۱,۶۲	۱۲۴۶,۱۷۳
۳	زمان ۱ ساعت	۰,۰۶۶	۵,۴۱	۱۳۱۳,۷۷
۱	pH ۸	۰,۰۴۶	۵,۹۸	۴۲۵,۵۷۱۱
۲	دارای نیکل	۰,۰۱۱	۱,۱	۱۰۷۴,۸۲۱
۳	زمان ۱ ساعت	۰,۰۳۶	۳,۸۱	۶۸۸,۱۰۰۷
۱	pH ۸	۰,۱۲۹	۱۰,۵	۲۳۶۸,۶۰۴
۲	فاقد نیکل	۰,۰۷۴	۶,۲۵	۲۱۴۰,۶۵۹
۳	زمان ۲۴ ساعت	۰,۰۷۴	۷,۹۳	۲۱۶۲,۶۶۸
۱	pH ۸	۰,۰۳	۳,۶۵	۱۱۸۶,۴۳۵
۲	دارای نیکل	۰,۰۲۳	۲,۵۹	۹۸۰,۴۹۸۹
۳	زمان ۲۴ ساعت	۰,۱۰۵	۱۳,۳	۱۲۲۵,۷۳۶

حضور پروتئین‌ها با وزن مولکولی کم در این سیانوباکتری و یا امکان شکسته شدن زنجیره‌های پروتئینی به علت فشار زیاد بر آنها حین استخراج را می‌داد.

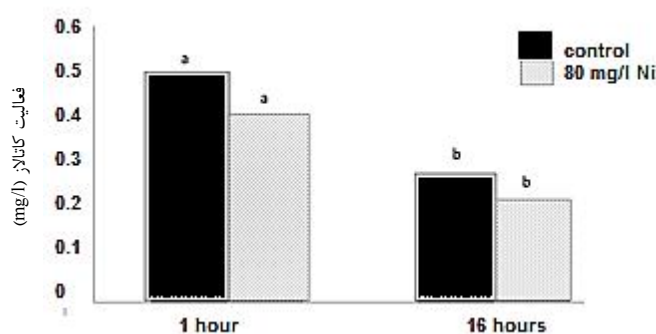
نتایج نشان داد میانگین سنجش کمی نمونه‌ها در حضور نیکل در زمان یکسان نسبه به شاهد کاهش یافته و به مرور زمان میزان پروتئین روند صعودی را طی نمود. نتایج SDS-PAGE نیز از حضور باندهای فراوان در انتهای ژل را می‌داد که می‌توانست احتمال



شکل ۶: پروفایل پروتئین کلوتریکس با ۲۰ ماکروگرم پروتئین به ترتیب از راست به چپ (لدر، شرایط فاقد نیکل و pH ۷، فاقد نیکل و pH ۸ و دارای نیکل و pH ۸).

در واکنش در نمودار زیر آمده است. کاهش فعالیت این آنزیم ۱۶ ساعت پس از آغاز آزمایش خصوصا در حضور نیکل مشاهده گردید. که نتایج بر روی ژل نیترو نیز قابل مشاهده است.

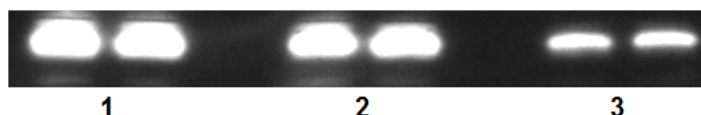
سنجش فعالیت کاتالاز: بررسی کمی سنجش آنزیم کاتالاز نشان داد حضور نیکل در pH ۸ سبب کاهش فعالیت این آنزیم نسبت به نمونه کنترل شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس حضور میزان یکسان پروتئین



شکل ۷: فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش نیکل در pH ۸

شده با نیکل) ظهور پیدا کرد. ۳ ایزوفرم مختلف از این آنزیم بر روی ژل نیترو با فواصل کمی از هم ظاهر شده بودند. لذا کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز طی تنش نیکل در ژل نیترو مشاهده شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر روی ژل با تزریق ۱۰ ماکروگرم پروتئین در هر چاهک و بر روی ژل نیترو و در شرایط ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از رنگ آمیزی و تیره شدن ژل، باندهای روشنی در نمونه‌های کنترل (و کم رنگ تر در نمونه‌های تیمار



شکل ۲: فعالیت کاتالاز در کنترل (شماره ۱)، pH ۸ فاقد نیکل (شماره ۲) و pH ۸ دارای نیکل (شماره ۳)

است. تغییر pH محیط علاوه بر تغییر دسترسی گروه‌های عاملی، در تغییر گونه‌های فلزی محیط نیز اثر دارند. نیکل در آب‌های طبیعی با pH ۵-۹ به صورت یونی $Ni(H_2O)_6^{2+}$ یافت می‌شود. در این محدوده از اسیدپتیه کمپلکس‌های آن با لیگاندهایی نظیر NH_3 , Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , OH^- مشاهده می‌شود (Peng et al., 2009). بیشتر گزارشات از جذب نیکل در اسیدپتیه‌های بالاتر به علت حضور یون‌های هیدروکسید گفته‌اند. همچنانکه در *Cladophora glomerata* در pH ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ بیشینه جذب نیکل در محدوده pH ۷-۸ نشان داده شده است (Senobari et al., 2014). پروتونه شدن گروه‌های عاملی در اسیدپتیه‌های پایین سبب شده جذب کاتیون‌های فلزی کاهش یافته و با شیفت pH به سمت pH ۷ این اثر

بحث

آلاینده‌های فلزی حاصل از فعالیت‌های صنعتی نظیر حفر معدن، ذوب فلزات سنگ معدن، آبکاری الکتریکی، استخراج گاز، تولید سوخت و انرژی، کود دهی، آفت کش‌ها و تولید ضایعات شهری وارد محیط زیست می‌شوند. برخی موجودات قادرند تا بطور بالقوه آلاینده‌های محیطی را حذف، تجزیه، متابولیزه و یا حرکت دهند. استفاده از موجوداتی که در این مناطق یافت می‌شوند می‌تواند مکانیسم‌های جذب و قابلیت استفاده در فرایندهای زیست پالایی بعدی را به ما پیشنهاد دهد (Abdel-Raouf et al., 2012; Mambo, 2011). شاید بتوان عنوان کرد در بین عوامل محیطی اسیدپتیه مهم ترین فاکتور اثرگذار در جذب فلزات و خصوصا واکنش جاذب و میکروارگانیسم

۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نیکل، جذب نیکل توسط کلوتریکس افزایش یافت و در ۸۰ میلی گرم بر لیتر (۸ pH) به حداکثر جذب توسط کلوتریکس رسید. نتایج پژوهشگران دیگر همانگونه که بیان شد در این رابطه متفاوت بوده است (Gürel et al., 2017).

جذب نیکل در مجموعه ای از جلبک‌های قهوه‌ای *Cystoseria indica*, *Nizmuddinia glaucescens* (Sargassum zanardini, Padina australis) در ۲۰ دقیقه نخست با شیب تندی دنبال شده که پس از ۱۲۰ دقیقه متوقف گردیده است (Azhari, 2012). جلبک قرمز گراسیلاریا گذر زمان بر میزان جذب اثر مثبت داشته اما ۱۵ دقیقه ابتدایی بیشینه جذب را نشان داد (Teimouri et al., 2016). بیشینه جذب نیکل در دو گونه *Sporosarcina pasteurii* و *Bacillus megaterium* نیز ۲ ساعت اول ثبت شده است و پس از آن تغییرات معناداری مشاهده نشد (Gheethi et al., 2017). جذب نیکل توسط *Cladophora glomerata* در ۱۲۰ دقیقه اولیه و با یک شیب تند بصورت جذب سطحی بوده و در ۳۶۰ دقیقه به اشباع رسیده و پس از آن هیچ گونه جذبی صورت نگرفته است (Senobari et al., 2014). در آزمایشات ما، بازه زمانی ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه توسط Experimental design طراحی شد که طی آن بیشینه جذب در ۴۸ دقیقه، غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر و ۸ pH، بدست آمد. در طراحی جذب نیکل توسط بتونیت با همین نرم افزار گزارش شده است که با افزایش اسیدیته از ۲ pH به ۷ pH و طی ۲ ساعت بیشینه جذب در ۷ pH طی ۳۰ دقیقه در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نیکل انجام شد (Sadeghalvad et al., 2017).

حضور فلزات سنگین در محیط و ایجاد تنش اکسیداتیو منجر به تولید گونه‌های واکنشگر یا رادیکال‌های آزاد می‌شود. یکی از راه‌های مهم به منظور مقابله با این رادیکال‌ها، برقراری تعادل در

ممانعتی پروتونه کمتر شده و امکان اتصال به گروه‌های عاملی آمینو، فسفات، کربوکسیل بیشتر خواهد شد. Senobari و همکاران (۲۰۱۴) عنوان کرده اند در pHهای بالایی امکان حضور گونه‌های هیدروکسید نیز بیشتر بوده و بنابراین رسوب دهی نیکل نیز رخ خواهد داد. بنابراین کاهش جذب زیستی در این شرایط ممکن است ناشی از رسوب دهی شیمیایی نیکل بوده باشد (Senobari et al., 2014). در pHهای بالا علی‌رغم حضور پروتون‌های کمتر و تشکیل یون‌های هیدروکسید که به جذب سطحی نیکل کمک می‌کنند اما امکان رسوب دهی نیکل و همچنین عدم دسترسی آن برای جذب توسط ریزجلبک وجود دارد. در اسیدیته‌های بالاتر از ۸/۳ pH امکان تشکیل رسوب $Ni(OH)_2$ می‌باشد (Azhari, 2012). نتایج ما نیز بهینه شدن شرایط جذب نیکل در اسیدیته‌های بالا و خصوصا در ۸ pH را نشان داد. آنالیز experimental design نشان داد در بازه ۵-۹ pH، با بالا رفتن مقدار اسیدیته میزان کاهش نیکل در محیط کشت کلوتریکس نیز روند سریعتری داشته و بیشینه جذب در ۸ pH بوده است. غلظت نیکل در پساب صنایع مختلف متغیر است؛ در آبکاری‌ها ۲۰۰-۲ میلی گرم بر لیتر، رنگ کاری ۴۰-۰ میلی گرم بر لیتر، صنایع چینی سازی ۶۷-۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر و در تولید سولفات مس، ۲۲ میلی گرم بر لیتر گزارش شده است (Gürel et al., 2017). در مطالعه‌ای که بر روی یوس مرده *Mucor hiemalis* صورت گرفت، دیده شد در ۸ pH با افزایش غلظت نیکل، از ۵۰ تا ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر، طی ۶۰ دقیقه میزان جذب افزایش یافت. علت افزایش میزان جذب همزمان با افزایش غلظت نیکل اولیه را وجود نیروهای رانشی در حذف مقاومت بین جاذب زیستی و محیط جذب دانسته اند. نتایج آزمایشات ما نیز نشان داد با افزایش غلظت از ۲۴ به

P. coronaries افزایش فعالیت کاتالاز را گزارش داده‌اند. Lin و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که *V. faba* تحت تیمار ۵ ماکروگرم در میلی‌لیتر کادمیوم فعالیت CAT و SOD بطور معناداری کاهش داشته و منجر به تجمع ROS شده است (Nadgórska-Socha et al., 2013).

در آزمایشات ما نیز کلوتریکس در مواجهه با ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل، pH ۸، طی ۲۴ ساعت در برابر شرایط کنترل فعالیت کاتالازی کمتری را نشان داده بود. این نتایج هم بر روی ژل کاتالاز و هم توسط سنجش کمی آن تایید شد. در بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز سه ناحیه باندی مختلف در نمونه شاهد بر روی ژل مشاهده گردید که نشان دهنده سه ایزومر مختلف از این آنزیم در کلوتریکس می‌باشد و هر سه آنزیم در مواجهه با نیکل فعالیت کاهش یافته‌ای را بروز دادند.

نتیجه‌گیری نهایی

میکروارگانیسم‌ها قادرند با مکانیسم‌های مختلفی در محیط‌های آلوده به رشد و بقای خود ادامه دهند. این تکنیک‌ها می‌تواند از رسوب دهی فلزات در محیط اطراف تا انباشتگی در دیواره سلول و در نهایت تجمع دادن فلزات در بخش‌های مختلف سلول انجام پذیرد. میکروارگانیسم‌های بومی مناطق آلوده از جمله سیانوباکترها این قابلیت را دارند تا نسبت به تولید بیومس و یا تصفیه محیط‌ها به خوبی استفاده شوند. همانگونه که در این طرح نشان داده شد، سیانوباکتر بومی جدا شده از مناطق آلوده نفتی بعد از خالص سازی، کلوتریکس شناسایی شد که توانسته بود در حضور نیکل نسبت به کاهش آن در محیط آبی عملکرد قابل قبولی را ارائه دهد. هرچند مکانیسم جذب نیکل، اینکه تجمع در دیواره سلول انجام شده و یا در اجزای سلولی کلوتریکس در این رابطه مشخص نگردیده است اما پتانسیل خوبی از این سیانوباکتر جهت جذب نیکل و

میزان این رادیکال‌ها با کمک سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و دیگر ترکیبات است. در این میان آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که سبب مهار فرایند اکسیداسیون می‌شوند و حتی در غلظت‌های پایین در فرایندهای فیزیولوژیکی سیستم‌های زیستی نقش مهمی دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان جاروب‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد بوده و باعث کمک به تغییر ماهیت رادیکال‌ها به گونه‌های غیر فعال می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها از نظر وزن مولکولی و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و هم‌چنین مکانیسم و جایگاه عمل آنها با یکدیگر تفاوت دارند. آنزیم‌ها (سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) یکی از انواع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و به عنوان اولین سدهای دفاعی هستند که سبب کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و هم‌چنین تبدیل آنها به ترکیبات نسبتاً پایدار می‌شوند. این آنتی‌اکسیدان‌ها باعث مهار یا تاخیر آسیب سلولی ایجاد شده توسط رادیکال آزاد می‌شوند (Mittler 2002, Gill and Tuteja 2010) .. (Gupta, Gaurav et al. 2013).

Wang و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که کارایی گیاکول پراکسیداز در حذف آب اکسیژنه بیشتر از کاتالاز می‌باشد. افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نتیجه فراتنظیمی بیان ژن صورت می‌گیرد. آنزیم‌هایی نظیر SOD, CAT و APX در کاهش اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از استرس زیستی و غیر زیستی دخیل هستند. پاسخ‌های فراتنظیمی این آنزیم‌ها می‌تواند در کنترل غلظت فلز باشد همچنان که در تحقیق این محققان حضور ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب تنش کم و ملایمی القا شده درحالی‌که غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن سبب افزایش بیان CAT و APX شده است. فعالیت آنزیم CAT در *V. faba* تیمار شده با روی و نیکل افزایش داشته است. Kafel و همکاران (۲۰۱۰) نیز در

یا حذف فلز سنگین نیکل، آلاینده همراه با نفت با استفاده از ریزجلبک *Calothrix* sp. جدا شده از مناطق آلوده نفتی" با کد: ۱۱ - ۲۴۷۹ مصوب جهاد انشگاہی می‌باشد.

زیست پالایی کسب شده است که امید است در تحقیقات میدانی مورد استفاده قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاصل مستخرج از پروژه "بررسی امکان کاهش

References

- Abdel-Aty, A.M., Ammar, N.S., Abdel Ghafar, H.H. and Ali, R.K. (2013).** Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass. Journal of Advanced Research, 4(4): 367-374.
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A. and Ibraheem, I.B.M. (2012).** Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences, 19(3): 257-275.
- Azhari, A. (2012).** Investigation of ability of *Anabaena* Microalgae Strains Isolated from Southern Iran in Removal of Heavy Metals, Master's Thesis, Islamic Azad University, Karaj Branch.
- Bermejo Román, R., Álvarez-Pez, J.M., Acien Fernández, F.G. and Molina Grima, E. (2002).** Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. Journal of Biotechnology, 93:73-85.
- Chamovitz, D. (1993).** Molecular analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: phytoene synthase and phytoene desaturase. Ph.D.thesis, the Hebrew University of Jerusalem.
- Dazy, M., Béraud, E., Cotelte, S., Meux, E., Masfarau, J.F. and Féraud, J.F. (2008).** Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. Chemosphere, 73(3): 281-290.
- de-Bashan, L.E. and Bashan, Y. (2010).** Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. Bioresource Technology, 101(6): 1611-1627.
- Dwivedi, S. (2012).** Bioremediation of heavy metal by algae: current and future perspective. Journal of Advance Laboratory Research in Biology, 3(3): 229-233.
- Gheethi, A. A., Efaq, A. N., Mohamed, R. M., Abdel-Monem, M.O., Abdullah, A.H. and Hashim, M.A. (2017).** Bio-removal of nickel ions by *Sporosarcina pasteurii* and *Bacillus megaterium*, A comparative study. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 226 (1): 012044.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology and biochemistry, 48(12): 909-930.
- Gupta, N., Gaurav, S.S. and Kumar, A. (2013).** Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. American Journal of Plant Sciences, 4(12): 21.
- Gürel, L. (2017).** Applications of the biosorption process for nickel removal from aqueous solutions—A review. Chemical Engineering Communications, 204(6): 711-722.
- Han, X., Wong, Y.S., Wong, N.F. and Tam, Y. (2007).** Biosorption and bioreduction of Cr (VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. Journal of Hazardous Materials, 146(1-2): 65-72.
- Idris, A.M., Eltayeb, M.A.H., Potgieter-Vermaak, S.S., Van Grieken, R. and Potgieter, J.H. (2007).** Assessment of heavy metals pollution in Sudanese harbours along the Red Sea Coast. Microchemical Journal, 87(2): 104-112.
- Kafel, A., Nadgórska-Socha, A., Gospodarek, J., Babczyńska, A., Skowronek, M., Kandziora, M. and Rozpędek, K. (2010).** The effects of *Aphis fabae* infestation on the antioxidant response and heavy metal content in field grown *Philadelphus coronarius* plants. Science of the Total Environment, 408(5): 1111-1119.
- Kar, D., Sur, P., Mandai, S. K., Saha, T. and Kole, R.K. (2008).** Assessment of heavy metal pollution in surface water. International Journal of Environmental Science & Technology, 5(1): 119-124.
- Kruger, N.J. (2009).** The Bradford method for protein quantitation. In the protein protocols handbook (pp. 17-24). Humana Press, Totowa, NJ.
- Le, C. and Stuckey, D.C. (2016).** Colorimetric measurement of carbohydrates in biological wastewater treatment systems: A critical evaluation. Water Research, 94: 280-287.

- Lin, A.J., Zhang, X.H., Chen, M.M. and Qing, C.A.O. (2007).** Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences*, 19(5): 596-602.
- Mambo, P.M. (2011).** Towards a sustainable bioprocess for the remediation of acid mine drainage. Institute for Environmental Biotechnology Rhodes University.
- Marker, A.F.H. (1972).** The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*, 2: 361-385.
- Mittler, R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9): 405-410.
- Nadgórska-Socha, A., Kafel, A., Kandziora-Ciupa, M., Gospodarek, J. and Zawisza-Raszka, A. (2013).** Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2): 1124-1134.
- Peng, J. F., Song, Y. H., Yuan, P., Cui, X. Y. and Qiu, G.L. (2009).** The remediation of heavy metals contaminated sediment. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2-3): 633-640.
- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M. and Cañizares-Villanueva, R.O.(2006).** Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1): 1-10.
- Richmond, A. (1986).** Hand book of microalgal mass culture, CRC Press, Inc. Florida.
- Sadeghalvad, B., Azadmehr, A.R. and Motevalian, H. (2017).** Statistical design and kinetic and thermodynamic studies of Ni (II) adsorption on bentonite. *Journal of Central South University*, 24(7): 1529-1536.
- Senobari, Z., Jafari, N. and Ebrahimzadeh, M.A. (2014).** Biosorption of Ni (II) from aqueous solutions by marine algae *Cladophora glomerata* (L.) Kutz. (Chlorophyta). *International Journal on Algae*, 16(2):181-192.
- Teimouri, A., Eslamian, S. and Shabankare, A. (2016).** Removal of heavy metals from aqueous solution by red alga *Gracilaria Corticata* as a new biosorbent. *Trends in Life Science*, 5(1): 236-243.
- Wang, Y., Li, J., Wang, J. and Li, Z. (2010).** Exogenous H₂O₂ improves the chilling tolerance of manilagrass and mascarenegrass by activating the antioxidative system. *Plant Growth Regulation*, 61(2): 195-204.
- Yilleng, M.T., Ndukwe, I.G. and Nwankwere, E.T. (2013).** Adsorption of hexavalent chromium from aqueous solution by granulated activated carbon from *Canarium schweinfurthii* seed shell. *Advances in Applied Science Research*, 4(3): 6-12.