P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2014 ,(8), (2) :40-44

دراسة بايو – تكنولوجية لأزاله النترات والنتريت وبعض العناصر الثقيلة باستخدام سلالات بكتريا*Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مياه الصرف الصحي لمدينة بغداد.

علي حسون حمادي* سفيان محمد شرتوح** امل ياسين علي**

*الجامعة العراقية – كلية التربية /الطارمية

** وزارة العلوم والتكنولوجيا

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: 2013/00/00
تاريخ القبول: 2014/5/6
تاريخ النشر: / / 2022
DOI: 10.37652/juaps.2014.123976

الكلمات المفتاحية:
بايو – تكنولوجية ،
أزاله النترات والنتريت ،
العناصر الثقيلة ،
Pseudomonas aeruginosa .

الخلاصة:

يعتبر هذا الجنس المشخص ذو قيمة هامة في التطبيقات والمصادر البيو تكنولوجية فتستخدم هذه البكتريا وبفعالية كبيرة المواد العضوية ذات الوحدات الجزيئية الصغيرة مثل النترات والنتريت وغيرها من المركبات منها ايونات المعادن الثقيلة Zn^{+2}، $Cu^{+2}Pb^{+2}$، Cd^{+2} في عمليات الامتزاز الحيوي .يمثل هذا العمل دراسة بحثية للتفكك الحيوي لملوثات الوسط وخاصة النترات والنتريت من قبل بكتريا تفكيك النترات مثل النوع (Pseudomonas aeruginosa) والتي تم اختبارها على العديد من الأوساط المخبرية والطبيعية من مياه الصرف من محطة مجاري الرستمية لمدينة بغداد فوجد أن السلالات التي تنتمي للجنس (Pseudomonas)مثل (Pseudomonas aeruginosa) وبدالة حامضية متعادلة تخفض من21–35% من النترات، و31–47% من النتريت الموجودة في الأوساط المستخدمة خلال فترة حضانة 24 ساعة وتحولها إلى بعض المركبات الآزوتية الأخرى باستخدام أنزيم النترات ريدوكتاز وأنزيم النتريت ريدوكتاز. في حين بلغ التخفيض لأيونات المعادن الثقيلة وعلى التوالي 82.3%، 85.6%،48.4% ،33%.

المقدمة:

الماء سلعة نادرة في هذه البقعة من العالم اذ يمثل الحصول على المياه العذبة احد التحديات الكبرى التي تواجهها شعوب العالم المتزايدة اعدادها يوما بعد يوم، في حين تتناقص موارد المياه العذبة في جميع انحاء العالم، لهذا يغدو تطوير التقانات الفعالة لسد الحاجة الى المياه(1). تحتوي المياه على المواد العضوية من مصادر نباتية وحيوانية والذي اخذ بالحسبان التلوث بالنترات والنتريت (Ratledge,2001)، وكذلك تحتوي العناصر النزرة التي تختلف في مستوى جاهزيتها وسميتها اذ تكون اما بشكل ايونات ذائبة او معقدة او بشكل جزيئات عالقة (Tokalioglu, 2000).

* Corresponding author at: Iraqi University - College of Education – Tarmiyah
E-mail address: ali662006@yahoo.com

تحتوي مياه المجاري الثقيلة في بغداد(الرستمية) بتراكيز مختلفة من المعادن الثقيلة والملوثات الصناعية الاخرى (2)،حيث تؤدي هذه الملوثات الى المسطحات المائية فتؤدي الى تلوث مصادر المياه الصالحة للاستخدام والشرب(3). لقد اشارت العديد من الدراسات في العراق وخارجه الى ان المرشحات النشطة بيولوجيا اسلوب حديث يستخدم الاحياء لتنقية مياه الصرف الصحي او الصناعي كمرحلة ثالثية من مراحل المعاملة حيث يستخدم احد هذه الاحياء لغرض ازالة الملوثات البكتيرية والعناصر الثقيلة من المياه ضمن وحدات معالجة وخفض تراكيزها في المياه المطلقة الى البيئة وذلك كنتيجة لنمو وسحب هذه الملوثات من محيطها دون استخدام اية عوامل كيميائية اخرى(4)(23)، كالطرق البيوتكنولوجية (Biotechnological methods) لمعالجة مياه الصرف الصحي، والذي أخذ بالحسبان التلوث بالنترات والنتريت كمؤشر تحذيري للانتباه وتفادي التلوث بهذه المواد(5).

تميزت ايضا عملية الامتزاز من خلال المجاميع الفعالة المتواجدة على سطح الخلية البكتيرية من احماض امينية واحماض كاربوكسيلية كذلك ترتبط ايونات المعادن الموجبة الشحنة مع الشحنات السالبة النتواجدة على سطح الخلية ، اذ تعمل كمواقع ارتباط فعالة(6). نظرا للانتشار الواسع للاحياء المجهرية في البيئات المختلفة ومنها البيئة المائية مما جعلها من اكثر الكائنات الحية مقاومة للعناصر الثقيلة لما تملكه من خصائص بايوكيميائية. اذ تعمل على حماية نفسها من التاثيرات السمية للمعادن الثقيلة(7). اما عملية تفكيك النترات والنتريت(Denitrification) عبارة عن عملية بيولوجية منجزة لدى البكتريا حصراً، حيث تخفض مركبات النترات أو النتريت أو كلاهما بعد امتصاصها إلى أكاسيد غازية مثل أكسيد الآزوت NO أو ثاني أكسيد الآزوت N_2O والذي يرجع إلى الآزوت الجزيئي N_2 (8).

المواد وطرائق العمل

1-جمع العينات:

جمعت العينات من مياه المرحلة الاخيرة لمحطة الصرف الصحي في الرستمية المجاورة لمصب نهر ديالى في نهر دجلة جنوب شرق بغداد بواسطة قناني زجاجية معقمة سعة 100مل ، حيث اخذت عينات المياه بعمق 10سم. وضعت العينات داخل صندوق يحتوي على الثلج لغرض حفظ العينات لحين الوصول الى المختبر لغرض عزل البكتريا ، استخدمت حاويات بوليثينية 5لتر محكمة السداد في جمع المياه المتعلقة باستخلاص العناصر النزرة والنترات والنتريت (9).

2-تشخيص العزلات البكتيرية:

عزلت البكتريا من عينات المياه وذلك باخذ 0.1 مل من كل عينة باستخدام تقنية النشر على اطباق بتري معقمة تحتوي على وسط Nutrient agar وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 درجة مئوية 24 ساعة واجريت عليها الفحوصات التشخيصية للعزلات النامية على كل طبق بعد انتهاء مدة الحضن حسب طريقة Harley لعام 2002.

3- حفظ العزلات:

تم حفظ العزلات البكتيرية في انبوبة محكمة الغلق Scrow-tube اذ تحتوي على الوسط الخاص بالبكتريا المشخصة مضاف لكل وسط 20% من glycerol كي لاتتعرض الخلايا البكتيرية لصدمة في حالة تكون بلورات ثلجية بعدها تم حفظ العزلات بواسطة التجميد(10).

4-تحضير العالق البكتيري وتراكيز المخلفات:

تم التلقيح بواسطة العالق البكتيري المعزول *Pseudomonas aeruginosa* والمشخصة مختبريا في دوارق سعة 250 مل يحتوي على Macconkey broth بعد مدة حضن 24-48 ساعة في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية . اخذ 0.1 ملم من العالق البكتيري الملقح وحقن في دوارق يحتوي على 100مل من محاليل المعادن الثقيلة Zn^{+2}، Cu^{+2} ، pb^{+2}، Cd^{+2} وبتركيز 20ملغم/لتر ودورق اخر يحتوي على 100مل من المخلفات الحاوية على النتريت والنترات وبتراكيز ايضا 20ملغم/لتر مع ضبط الدالة الحامضية عند 7 تحت درجة حرارة 37 درجة مئوية حيث قسمت الدوارق وحسب التراكيز المضافة من المعادن الثقيلة وضعت الدوارق في حاضنة هزازة بعد مدة حضن 24-48 ساعة وملاحظة التغيرات (11). وبالوقت نفسه اضيفت تراكيز المعادن اعلاه للوسط الزرعي الصلب مع ضبط الدالة الحامضية للوسط لقحت الاوساط الزرعية بالعزلات البكتيرية وبعد مدة حضانة 24و48 ساعة وملاحظة التغيرات الحاصلة عليها.

النتائج والمناقشة

يضم هذا الجنس أكثر من 950 نوعاً والكثير من الأنواع التابعة له قادرة على النمو في أوساط تحوي ملوثات ومركبات تعتبر سامة عند وجودها بتراكيز أكثر من الحد المسموح به مثل الكادميوم والفضة والرصاص والزئبق والكروم(12)، ومركبات عضوية أخرى حيث تستخدمها كمصدر للكربون أو للآزوت(13)أن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* له القدرة على افراز عدد من الانزيمات المزيلة للسموم ومن هذه الانزيمات Superoxide dismutase الذي عزل من الترب الحاوية على البترول والترب الملوثة بالمعادن الثقيلة لانه يتميز بإنتاجه مواد حيوية ذات نشاط سطحي والتي تعتمد على قوة التماسك بين جزيات السائل(14). في حين بين عدد من الباحثين ان الجينات المقاومة للمضادات الحياتية هي نفس الجينات المقاومة للمعادن الثقيلة والتي تقع على نفس البلازميد مما يعطيها صفة المقاومة لتراكيز المعادن الثقيلة(15)(22) . تبين من خلال النتائج المتعلقة بالعزلات ان حركة ايونات المعادن الى داخل الخلية البكتيرية في الاوساط السائلة تسير بحرية كاملة لحركة ايونات المعادن الى داخل الخلايا البكتيرية في عملية الامتزاز فضلا عن ذلك فهي تحاكي البيئة المائية التي تتواجد فيها

المعادن(16) .ان اخذ المعادن من قبل الجراثيم التي تعرف بحساسيتها تجاه المعادن ذات السمية العالية في الواقع يعتمد على الخصائص الفيزياوية والكيمياوية للمعادن ولسطوح خلايا الجراثيم كالشحنة او الروابط التناسقية او الى البلازميدات المسؤولة عن اخذ المعادن على اساس ارتباطها ببلازميد الخلية (17).

اظهرت نتائج البكتريا عند الدالة الحامضية (7) ودرجة حرارة 37 درجة مئوية الى ان نسبة ازالة المعادن الثقيلة (Zn^{+2} ، Cu^{+2} ، pb^{+2} ، Cd^{+2}) باستخدام الكتلة الحيوية للبكتريا التي تضمنت نسبة الازالة لتراكيز 20 ملغم/لتر ان عنصري الخارصين والنحاس هما الافضل في الازالة عن بقية المعادن الثقيلة اذ تبين ان نسبة المعادن المزالة لتراكيز 20ملغم/لتر ولنفس المعادن 82.3% ، 85.6% ،48.4% ،33% وعلى التوالي(جدول 1). اذ بينت الدراسة ان البكتريا قدرتها على امتزاز المعادن الثقيلة باستخدام كتلتها الحية بالنسب والتركيز اعلاه ذلك ان البكتريا تمتلك الية تعرف بانظمة التدفق التي تعمل على ازالة المعادن الثقيلة الى الخلية ومن ثم تنقل المعادن المتبقية عبر جدار الخلية باستخدام تقنية P.type ATPase مستخدمة طاقة ATP كمضخة لدفع ايونات المعادن المتبقية(17). ان القدرة العالية لهذا النوع على الامتزاز الحيوي للمعادن الثقيلة بالاضافة الى قدرته على تحليل اكثر من 3000 مادة عضوية في البيئة يعود الى امتلاكه نظام انزيمي معقد كذلك ان البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لها القدرة على انتاج مادة DMDS (Dimethyl dissulfide) التي تعمل على ترسيب العناصر النزرة بشكل كفوء(18).في حين اظهرت النتائج كما في جدول (2) تراكيز النترات والنتريت بلغ نسبة الانخفاض في تركيز النترات 35% والنتريت بلغ 47% . ويعتبر الجنس Pseudomonas الذي يضم الكثير من الأنواع الهامة بيوتكنولوجياً باحتوائه على العديد من الأنزيمات المفككة للسكريات ولمركبات الكلوريدات وللنترات والنتريت التي تستخدم في نقل مختلف الوظائف الحيوية وراثياً (19). عملية تفكيك النترات والنتريت Denitrification عبارة عن عملية بيولوجية منجزة لدى البكتريا حصراً، حيث تخفض مركبات النترات أو النتريت أو كلاهما بعد امتصاصها إلى أكاسيد غازية مثل أكسيد الآزوت NO أو ثاني أكسيد الآزوت N2O والذي يرجع إلى الآزوت الجزيئي N2 ففي هذه العملية النترات أو منتجات إرجاعه تستخدم كمستقبل للإلكترونات من أجل أكسدة بعض المركبات العضوية واللاعضوية (المغذيات) مثل المواد السكرية والبروتينية والمركبات الكبريتية ....الخ التي تستخدمها لنموها ولإنتاج الطاقة فالمنتج النهائي لعملية الإرجاع يكون بأغلبه N2 في الشروط الهوائية وأحياناً يترافق بمنتج الإرجاع الجزيئي N2O في الشروط اللاهوائية لعملية تفكيك النترات (20) بلغ متوسط الحموضة في مياه الصرف الصحي في الرستمية لمدينة بغداد 7.3 والاوكسجين المذاب 5.1 ملغم /لتر .بلغ متوسط الحموضة في مياه الصرف الصحي في الرستمية لمدينة بغداد 7.3 والاوكسجين المذاب 5.1 ملغم /لتر مقارنة بمحددات محددات نظام صيانة الانهار والمياه العمومية من التلوث رقم 25 لسنة 1967 جدول 3.

جدول رقم (1) تغير تراكيز ايونات المعادن الثقيلة لفترة استبقاء 24 ساعة

درجة الحرارة م0	درجة الحموضة (pH)	تركيز الخارصين %	تركيز النحاس %	تركيز الرصاص %	تركيز الكادميوم %
37	7	%82.3	%85.6	%48.4	%33

جدول رقم (2) تغير تراكيز النترات والنتريت لفترة استبقاء 24 ساعة

درجة الحرارة م0	درجة الحموضة(pH)	تركيز النترات %	تركيز النتريت%
37	7	65	53

جدول رقم (3) محددات نظام صيانة الانهار والمياه العمومية من التلوث رقم 25 لسنة 1967

الخاصية	المواصفة العراقية
BOD5	5 > ملغم / لتر
DO	5<ملغم / لتر
النترات	15-50 ملغم / لتر
النتريت	3
اللون	طبيعي
العكورة	5 وحدة
الطعم	مقبول
الرائحة	مقبول
الاس الهيدروجيني pH	6.5 -8.5
درجة الحرارة	اقل من 35 درجة مئوية

المصادر:

1. Ackerley,D.F.,et.al.(2004). Chromate reducing properties of soluble flavoproteins from

12. LittLittle, B. Wagner, P. Lewandowski. Z .(1997) .Spatial relaation ships between bacteria and mineral surface. Rev Mineral. 35:123-159.
13. Michael,J.,et.al..(2002)." Microbiology" TAT Mc Graw-Hill, New Delhi. India.
14. Ratledge, R.et.al. (2001) Basic Biotechnology. Cambridge University Press. UK.
15. Schmid.R.D.(2003).Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering,1. Edi. John Wiley & Sons, Inc.,Publication; USA. Book.Edi. McGraw-Hill .U.S.A.
16. Silver, S. and Phung, L. (1996). Bacterial heavy metals resistance: New surprises. Annu Rer Microbial. 42:717-743
17. Tokalioglu,S.Kartal,S. and Elci,L.(2000).Speciation and determination of heavy metals in take water by atomic absoption spectrometry actor sorption on amber lite.Xad-16 Resin. Analytical Sciences.16:1169-1174.
18. Yoon, K. P. ; Silver, S. (1991). A second gene in the Staphylococcus aureus "cad A" cadmium resistance determinant of plasmid p1258. J. Bacteriology. 173: 7636-7642
19. WHO, World Health Organization. (1996). Guideline for Drinking Water Quality. Health Criteria & Other Supporting information. Vol. (2). 2nd. Ed. Geneva.
20. الغزاوي، غيداء جاسم.(2014). قابلية بعض انواع البكتريا المعزولة من شط العرب والمياه البحرية على الامتزاز الحيوي لبعض المعادن الثقيلة. مجلة ابحاث البصرة. العدد 40.الجزء 3.
21. القانون رقم 25 لسنة 1967 ، محددات نظام صيانة الانهار والمياه العمومية من التلوث . وزارة الصحة.
22. حمادي، علي حسون (2005). التلوث البكتيري في نهر الزاب الاسفل وأثره على نوعية مياه نهر دجلة .رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.
23. حمادي، علي حسون.(2012).استخدام المرشح الاحيائي كمرحلة ثالثة لمعالجة مياه الصرف الصحي. المؤتمر الدولي السادس للتنمية والبيئة في الوطن العربي .مركز الدراسات والبحوث البيئية. جامعة اسيوط.

Pseudomonas putida and Escherichia coli.Applied &Environmental Microbiology .70(2):873-882.
2. Ahalya,N.Ramachandra,T.and Kanamadi,R.(2003).Biosorption of heavy metals .Res.J. chem. Environ.7(4):71-78.
3. Ahmed , N. Nawaz, A. and Badar , U. (2005). Screening of copper tolerant bacterial species and their potential to remove copper the environment. Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology 47:19-226-13.
4. Aneez,P.Y.A.&Kunhi.A.A.M.(1996)."Degradation of phenol through ortho-cleavage pathway by Pseudomonas StutzeriStrain SPC2." Letters in Applied Microbiology. 22:26-29.
5. Baker, J., Sengupta, M., Jayaswal, R., Morrissey, J. (2011). The Staphylococcus aureus CsoR regulates both chromosomal and plasmid encoded copper resistance mechanisms Enviromental Microbiology., 13. :2495-2507.
6. Beard, S . Hashim, R. Hernandez, J. Huyhers,M. and pool, R.(1997).Zinc tolerance E. coli K-12:Evi-dence that the Znta gene (0732)encodes acation transport AT-Pase.Moleclar Microbiology. 25(5):883-891.
7. Cameotra, S. and Makkar , S. (1998). Synthesis of biosurfactants in exreme condition. Applied microbiology. bio . tech . 50(5):520-529.
8. David, J. G. , Frank, E. Y. (1975). Epidemiology of Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria: Resistance patternsin Staphylococci isolated from populations Not known to be Exposed to Heavy metals. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 17: 614-621.
9. Grigg,N.S.(1996).Water Resources Management, Principles ,Regulations and Cases. McGraw- Hill, Inc. U.S.A.
10. Harley, J.P. and Prescott, L.M. (2002) . Laboratory Exercises in Microbiology. 5th.ed. The McGraw- Hill Companies, Inc., New York. Pp: 43-46.
11. Kristensen,G.H.,et.al (1992). Characterization of functional microorganisms groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. Water Sci. Technol..25 (6): 43-57.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2014 ,(8), (2) :40-44

BIOTECHNOLOGY STUDY TO REMOVE NITRATE AND NATRATE BY USING PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS ISOLATED FROM WEST WATER IN BAGHDAD CITY.

ALI. H HAMMADI SUFYAN M. SHARTOH AMAL Y. ALI

E.mail : ali662006@yahoo.com

ABSTRACT

This isolated genus has a considerable and important value in biotechnological resources and applications,. These bacteria use much more efficiently the organic substances small molecules units such nitrate, nitrite and used in biosorption for heavy metals ions like Zn^{+2},Cu^{+2}, Pb^{+2}. Cd^{+2} This work belongs to a research study on biodegradation of environmental pollutants with nitrate and nitrite, which studies denitrifying bacteria such *Pseudomonas aeruginosa.* They were tested in labs and naturally in waste water of deferent areas at Baghdad.It was found that strains of *Pseudomonas* were reduced of 21-35 % from NO_3^- and 31-47% from NO_2^- during 24 hours incubation ,checking pH7, contained in used medium to some other nitrogenous compounds using the enzyme nitrate reductase and enzyme nitrite reductase. In the process of bio sorption showed the removal that the concentration of heavy metals(Zn,Cu,Cd,Pb) above from the type of bacteria. The ratio of removal for *Pseudomonas aeruginosa* in concentration above %48.4 ،%85.6 ،%82.3،%33.3.