جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



# جداسازی و تشخیص باکتریهای دنیتریفایر به منظور حذف نیترات از پساب کارخانه فرآوری اورانیوم

**عباس رضائی*[۱]، افشین نیلی احمد آبادی[۲] ، مجید انصاری[۱]**

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بهداشت محیط

۲- سازمان انرژی اتمی، شرکت فرآوری اورانیوم و تولید سوخت هسته ای ایران

**چکیده:**

نیترات با غلظت بالا از جمله آلاینده های مطرح در پساب کارخانجات غنی سازی اورانیوممی باشد. یکی از فرآیندهای مطرح درحذف نیترات،استفاده از روش دنیتریفیکاسیون بیولوژیکی با استفاده از سویه های دنیتریفایر مناسب است. هدف از انجام این تحقیق جداسازی وشناسائی باکتریهای احیاء کننده نیترات با توان دنیتریفایری مطلوب به منظور حذف بیولوژیکینیترات از پساب کارخانه فرآوری اورانیوم اصفهان می باشد. در این تحقیق، متعاقب نمونه برداری از نواحی آلوده مختلف، شش سویه دنیتریفایر جداسازی گردید. سویه های جداسازی شده از نظر توان حذف نیترات مورد ارزیابی قرار گرفتند ویکی از سویه های با توان مطلوب انتخاب شد. سویه مورد نظر ابتدا با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی و به شکل تکمیلی با استفاده از روشهای مولکولی بررسی گردید. نتایج حاصله نشان می داد که سویه جداسازی شده، *سودوموناس استوتزری* و متعلق به گروه پرتو باکترها می باشد. حذف نیترات به میزان ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر با راندمان ۹۹ درصد از ویژگیهای این باکتری است. سویه *سودوموناس استوتزری* جداسازی شده با توجه به تحمل شرائط سخت محیطیو توان مطلوب دنیتریفیکاسیون می تواند در فرآیندهای دنیتریفیکاسیون بیولوژیکی پساب کارخانه غنی سازی اورانیوم استفاده نمود.

**مقدمه:**

**مقادیر زیاد نیترات در آب، سلامتی انسان را با ایجاد بیماری متهموگلوبینما و سرطان به مخاطره می اندازد. غلظت زیاد نیترات در آب می تواند برای حیوانات نیز مخاطره آمیز بوده و همچنین می تواند در منابع آب باعث پدیده اتروفیکاسیون گردد. بدین منظور حداکثر غلظت مجاز نیترات توسط مراجع ذیصلاح تدوین و تاکید بر حذف نیترات از آب و فاضلاب شده است[۱].استاندارد سازمان حفاظت**

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد


**محیط زیست آمریکا برای نیترات ۱۰ میلی گرم بر لیتر برحسب نیتروژن مطرح شده است[۲]. اتحادیه اروپا حداکثر میزان را ۵۰ میلی گرم بر لیتر بر حسب نیترات اعلام نموده است[۳].نیترات در غلظت های بالا در پساب های صنعتی، شستشوی مخازن در صنایع لبنی، دارو سازی، صنایع نظامی، کودها، صنایع فلزی و صنایع فرآوری سوخت هسته ایدیده می شود[٤].** در سال های اخیر به منظور حذف نیترات از منابع آب، فاضلاب ها و آبهای زیر زمینی روش های متعددی مانند سیستم های الکتروشیمیایی، راکتورهای غشایی ، راکتور پلیتی سرامیکی متخلخل،تماس دهنده بیولوژیکی دوار و باکتری تثبیت شده بر روی ژل ارائه شده است[ ۴]. به طور کلی روش های موجود در حذف نیترات را می توان به دو دسته طبقه بندی نمود:I) روش های فیزیکی و شیمیایی نظیر کانی زدایی، استفاده از فلزات احیاء کننده، تبادل یون، اسمز معکوس، جذب و مخلوط کردII;) روش های بیولوژیکی: در این روش از میکروارگانیسم ها و یا مستقیماً از آنزیم های تولیدی توسط میکروارگانیسم ها برای حذف نیترات استفاده می کنند.دنیتریفیکاسیون بیولوژیکی فرآیندی است که توسط باکتریهای مختلفی انجام می شود. در این فرآیند، نیترات موجود درمحیط بعنوان گیرنده نهائی الکترون عمل نموده و نیترات به گاز ازت تبدیل می شود. باکتریهای هتروتروف از جمله باکتریهای موثر در این فرآیند می باشند. این دسته از باکتریها از محیطهای مختلفی نظیر خاکهای کشاورزی،رسوبات رودخانه ها وتصفیه خانه های فاضلاب جداسازی شده اند.باکتریهای سودوموناس یکی از دنیتریفایرهای با راندمان دنیتریفیکاسیون بیولوژیکی می باشند.با این وجود باکتریهای آکروموباکتر،آگروباکتریوم،آلکالیژنز،باسیلوس،کروموباکتریوم،فلاوباکتریوم و هیپومیکروبیوم نیز با توان دنیتریفیکاسیون متفاوت گزارش شده اند. جنس سودوموناس متعلق به گروه گاما پروتوباکترها می باشد. بر مبنای گزارشات ارائه شده توالیهای DNA(nifH , nosZ , nirS) بعنوان ژنوم هدف در شناسائی این دسته از باکتریها مطرح شده اند[۵].در این تحقیق سویه باکتری *سودوموناس استوتزری* با توان دنیتریفیکاسیون مطلوب از محیطهای آلوده به نیترات جداسازی و با روشهای ملکولی تشخیص داده شد. سویه مذکور بعنوان باکتری دنیتریفایر در حذف بیولوژیکی نیترات قابل استفاده خواهد بود.

روش کار

نمونه برداری از نواحی آلوده به نیترات با غلظت بالا نظیر پتروشیمی، خاکهای کشاورزی و تصفیه خانه های فاضلاب صورت گرفت. نمونه ها داخل محیط کشت جداسازی باکتریهای دنیتریفایر(جدول ۱)تلقیح گردید.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد


جدول ۱- محیط کشت باکتری های دنیتریفایر

| نام ماده | فرمول شیمیایی | مقدار |
|---|---|---|
| دی سدیم ساکسینات شش آبه | C4H4Na2o4 | ۱۰ g |
| پتاسیم هیدروژن فسفات | K2HPO4,2H2o | ۱g |
| نیترات سدیم | NaNo3 | ۱ g |
| کلرید پتاسیم | KCL | ./۲ g |
| سولفات منیزیم هفت آبه | MgSo4,7H2o | ./۲g |
| سولفات آهن | FeSo4 | ۱ mg |

تریس المنتهای مورد استفاده

| ماده | ZnSo4 | CaCl2 | MgCl2 | (NH4)6mo7O24 | CuSo4 | CoCl2 | EDTA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| مقدار | ۲/ ۲g | ۵/۵ g | ۵/۰۶ g | ۱/۱ g | ۱/۵۱ g | ۱/۶۱ g | ۵۰ g |

مواد تشکیل دهنده محیط کشت را در یک لیتر آب مقطر حل نموده و به آن ۲ میلی لیتر تریس المنت افزودهوسپس pH را به ۷/۲ می رساندیم و محیطهای تهیه شده را اتوکلاو می‌نمودیم.

نمونه های تلقیح شده بمدت ۲۴ ساعت در دورrpm ۱۲۰ شیک می گردید و محیطهای کشت کدر شده بر روی محیط حاوی آگار برده می شد. کلنی های رشد نموده جهت بررسیهای توان دنیتریفیکاسیون ،صفات بیوشیمیایی و تشخیص مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. از میان باکتریهای جدا شده یک باکتری با توان حذف نیترات در غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر انتخاب گردید. در گام اول صفحات بیوشیمیایی وفیزیولوژیکی نظیر رنگ آمیزی گرم،شکل کلنی،آنزیم کاتالاز،حرکت،اکسیداز،تست OF و تست مالتوز و بصورت تکمیلی بررسی توالی $16_s$ RNAبعنوان روش تشخیص مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق پرایمرهای

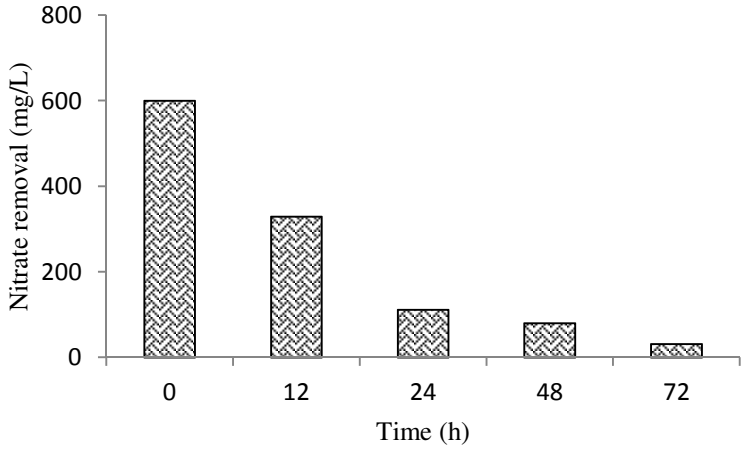
(5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (5´AAGGAGGTGATCCAGCCGCA)
(5´ -GCGAGGAAATGAAGCTG )(5´ -AAGGTGATCGACGAGGTC)

مورد استفاده قرار گرفتند. DNAباکتری با استفاده از کیتهای تجارتی شرکت سیناژن استخراج وجهت انجام تکثیر DNAبا روش PCRمورداستفاده قرار گرفت.

نتایج

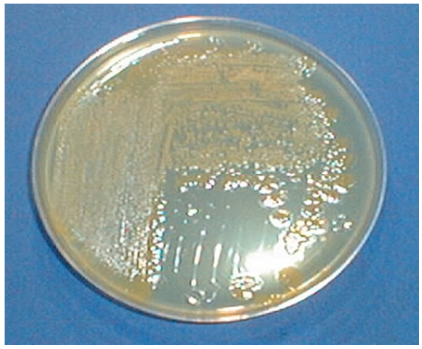
جهت تعیین میزان احیاء نیترات توسط جمعیت میکروبی موجود در نمونه های مختلف، میزان تغییرات غلظت نیترات در پنج غلظت اولیه نیترات (۸۰۰-۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) و در زمانهای مختلف ( ۲۴۰-۲۴

ساعت) مورد بررسی قرار گرفت. بررسیها نشان می داد که بعد از ۴۸ ساعت شرایط انوکسیک حاصل می شود که مبنای اندازه گیری میزان احیاء نیترات می باشد. (نمودار۱)



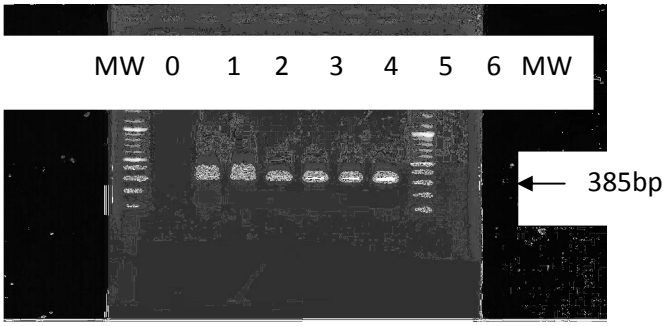

نمودار ۱: حذف نیترات توسط سویه *سودوموناس استوتزری جدا سازی شده*

کلنیهای باکتری جدا سازی شده در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱- باکتری *سودوموناس* استوتزری کشت داده شده بر روی محیط کشت

محصول تکثیر شده ژن nosZحاصل از PCR در تصویر ژل الکتروفوروز زیر ارائه شده است.




شکل ۴-۴- تصویر ژل الکتروفروز مربوط به تکثیر ژن nosZ دنیتریفایرها حاصل از PCR

بحث و نتیجه گیری

امروزه با استفاده از تکنیک های مولکولی مانند PCR و پروب های فلورسانس می توان به راحتی از کمیت و ویژگی های فیلوژنیک میکروارگانیسمها آگاهی پیدا کرد بدون اینکه نیاز به روش کشت داشته باشیم. در مطالعه مشابه ای که در این خصوص صورت گرفته، ۱۹۹ باکتری دنیتریفایر لجن فعال مختلف از تصفیه خانه فاضلاب شهری جدا سازی شد. توسط روش مولکولی نشان داده شده که بیشترین تعداد این باکتری ها به گروه بتا پروتوباکترها تعلق دارند (۵۰/۴٪)، آلفا پروتوباکتر ها(۳۶/۸ ٪)، گاما پروتوباکترها (۵/۶ ٪)، اپسیلون پروتوباکترها(۲ ٪) و فرمیکوتس (۴ ٪). Heylenو همکاران ردیابی باکتری در یک محیط مخلوط بسیار مشکل است، اما توسط تکنیک PCR شناسایی ردیابی $۱۰^{۶}$ عدد سلول به سادگی امکان پذیر است[۷]. روش های مختلف PCRدر سال های اخیر استفاده شده است[۸].PCR انواع مختلفی دارد، برای مثال RT-PCR یکی از مهمترین آنهاست که در زمینه محیطی اولین بار جهت شناسایی ویروس های موجود در آب از آن استفاده شد. باکتری های د نیتریفایر دارای انواع مختلفی از ژنها می باشند که این ژنها مسئول تولید آنزیمهای ویژه برای انجام فرآیند دنیتریفیکاسیون هستند، مانند ژنهای nirK، nirS،nor ، nosو... . دراین مطالعه از ژن nosZ به عنوان ژن کاندید جهت طراحی پرایمرها استفاده شد. این پرایمرجهت شناسایی سودوموناس هایی که خاصیت دنیتریفیکاسیون دارند به کار می رود. جهت تشخیص انواع سودوموناس ها از تستهای بیوشیمیایی مختلفی استفاده شد، برای مثال برای تفکیک سودوموناس آئروژنز و سودوموناس استوتزری از تست هیدرولیزنشاسته استفاده شد که این تست برای آئروژنز منفی، و برای استوتزری مثبت می باشد. محققین مختلف به منظور جداسازی دنیتریفایرها عملیات نمونه برداری را از نواحی مختلفی مانند، تصفیه خانه های فاضلاب های شهری، (لجن و پساب ). آب دریاها، شیرابه زباله ها و . . . انجام داده اند. در این تحقیق به منظور کشت باکتری های دنیتریفایر ، منبع ازت نیترات سدیم و منبع کربن، دی سدیم ساکسینات بود.در این مطالعه تحقیقاتی از رزازورین به عنوان معرف استفاده شده است به این صورت که به ازای هر ۲۵ml از محیط کشت، ۱ ml رزازورین افزوده شده است. این معرف در حالت عادی پس از حل شدن در آب مقطر آبی رنگ می باشد بعد افزودن به محیط کشت صورتی رنگ می شود، در نهایت با بی هوازی شدن سیستم بیرنگ خواهد شد. از آنجائیکه هنگام تلقیح نمونه ها جمعیت میکروبی، مخلوطی از باکتری های هوازی و انوکسیک می باشد، ابتدا اکسیژن محلول توسط باکتری های هوازی مصرف شده و پس از آن شرایط انوکسیک به وجود می آید که در این زمان معرف رزازورین بی رنگ می شود و رنگ محیط کشت از صورتی به بی رنگ تغییر می نماید. در این تحقیق میزان حذف نیترات توسط جمعیت میکروبی وسویه های جدا شده بررسی شد، باکتری های جداشده از تصفیه خانه فاضلاب راندمان کمتری داشتند اما باکتری های موجود در فاضلاب پتروشیمی به دلیل اینکه پدیده تطابق از راندمان بالاتری در حذف نیترات برخوردارند و به راحتی می توانند نیترات را حتی در غلظت های بسیار بالا احیاء نمایند.

سپاسگذاری

نویسندگان مقاله از شرکت فاتسا بدلیل حمایتهای مالی و فراهم نمودن امکانات لازم جهت انجام تحقیق، تشکر و قدردانی می نمایند.

مراجع

1-Foglar, L., Briski, F., Sipos, L., Vukovic, M., High nitrate removal from synthetic wastewater with the mixed bacterial culture.Bioresource Technol., 96: 879-888. (2005)

2- Rajakumar, S., Ayyasamy, P.M., Shanthi, K., Thavamani, P., Velmurugan, p., Song, Y.C., Lakshmanaperumalsamy, P., Nitrate removal efficiency of bacterial consortium (pseudomonas sp. KW1 and bacillus sp. YW4) in synthetic nitrate-rich water. J. Hazard.Mater., 157: 553-563. (2008)

3-Saliling, W. J. B., Westerman, P.W., Losordo, T.M, Wood chips and wheat straw as alternative biofilter media for denitrification reactors treating aquaculture and other wastewaters with high nitrate concentrations. Aquacultur Eng., 37: 222-233. (2007).

4-Shrimali, M., Singh, K.P., New methods of nitrate removal from water. Environ.Pollut, 112: 351-359. (2001).

5- Karin, E., Asa, G., Sara, H. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE, FEMS Microbiol. 49: 401- 417, (2004).

6- Falk, S., Hannig, M., Braker, G., Wardenga, R., Koster, M., Jurgens, K.,Gliesche, C. NirS- containing denitrifier communities in the water column and sediment of the Baltic sea.Biogeo sciences discussions.3:697-727. (2006).

7- Heylen, K., Vanparys, B., Wittebolle, L., Verstrate, W.,and Boon, N. Cultivation of Denitrifying Bacteria, Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study.49(2):249-256. (2003)

8- Hayashi, N.R., Arai, H., Kodama, T., Igarashi, Y. The nirQ gene, which is required for denitrification of Pseudomonas aeruginosa, can activate the RubisCO from Pseudomonas hydrogenothermophila.,BiochemBiophy Acta.1381:347-350.(1998)