متوفر على الموقع ttp://www.basra-science-journal.org

ISSN –1817 –2695

الاستلام 5-10- 2015، القبول 7-12-2015

# المعالجة الإحيائية لبعض العناصر الثقيلة باستخدام بعض مواد النشاط السطحي Biosurfactant المعزولة من بكتريا *Bacillus cereus*

إيمان عبعوب مخيفي

*قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة البصرة*

Emanaboob @yahoo.com

**ملخص**

إن استخدام الإحياء المهجرية أو نواتجها الايضية الثانوية مثل مادة النشاط السطحي Biosurfactant من بكتريا *Bacillus cereus* كان له الاثر الكبير في عملية الإزالة للعناصر الثقيلة . إن بكتريا *Bacillus cereus* لها القابلية على تحلل الدم ومن ثم قابليتها على إنتاج مستحلب اليبوبتايد . ان الحد الادنى المثبط للنمو للزئبق هو 250ملي غرام /لتر بينما الحد الادنى المثبط للنمو بالنسبة للكروم هو 300 ملي غرام /لتر .إن وجود مستحلب اليبوبيبتايد مع بكتريا *Bacillus cereus* في الوسط الزرعي أدى إلى اختزال في النسبة المئويه لعملية الإزالة إذ كانت النسبة المئوية لازالة عنصر الزئبق بتركيز 10 ملي غرام /لتر بوجود البكتريا فقط 90% اما بوجود وبوجود المستحلب والبكتريا فكانت 96% في حين بلغت 61% بوجود المستحلب فقط اما عند إزالة 10 ملي غرام /لترمن الكروم فبينت نسبة الازالة بوجود البكتريا فقط 93% بوجود المستحلب والبكتريا بلغت نسبة الإزالة للكروم 99% في حين بلغت نسبة الإزالة بوجود المستحلب فقط 76% ومن الملاحظ انخفاض النسبة المئوية بزيادة تركيز عنصر الزئبق والكروم في الوسط الزرعي.

**الكلمات المفتاحية :** *Bacillus cereus* ، النشاط السطحي ، الامتزاز الحيوي بوساطة مادة النشاط السطحي

## 1 – المقدمة

تعد المعادن الثقيلة مثل الرصاص والكاديوم ،الزئبق ، الحديد ، الكروم ، والنحاس من العناصر الكيمائية التي تصل للبيئة عن طريق مداخن المصانع على شكل اكاسيد تلوث الهواء وتنقل هذا التلوث إلى الإنسان والحيوان والنبات أو عن طريق الماء إذ تصب مخلفات بعض المصانع المجاورة للبحر في المياه فتؤدي إلى تلوث الكائنات البحرية بالمعادن وانتقالها عن طريق الصيد البحري إلى الإنسان والحيوان اوعن طريق التربة إذ تصدأ المعادن المرمية على الأرض بفعل الرطوبة فتذوب مع المياه والأمطار وتنزل في طبقات التربة مؤدية إلى تلوث مصادر مياه الشرب الجوفية والنباتات بالمعادن [1] . اخطار هذه المعادن كثيرة تتراوح بين التسمم الغذائي والتسمم المعدني وبين العاهات المستديمة مروراً بالسرطانات والطفرات الجينية وانتهاء بالوفاة الفورية [2] . فيما يخص الزئبق فهو يدخل في تصنيع بعض الاجهزة الالكترونية وفي بعض موازين الحرارة والضغط ويمكن ان يصل الى الهواء اوالى مصادر المياه عن طريق التخلص غيرالصحي من بعض الاجهزة المستعملة

ويسبب دخول كميات قليلة من الزئبق الى الجسم وتركمها مما يسبب حالات من عدم التوازن العصبي وضعف النظر واذا زادت الجرعة عن الحد الخطر يمكن ان تنتهي بفقدان الانسان حياته [3] . اما الكروم يستعمل بكثرة في عمليات طلاء المعادن وفي دباغة الجلود وفي صباغة الاقمشه والمنسوجات يدخل الكروم الى الجسم عن طريق استنشاق الابخرة المحتوية على مركبات الكروم فيما تقل امكانية دخولة عبر الجلد ويسبب تقرحات في المجرى التنفسي والتهابات شديدة في الرئتين كما انه مادة مسرطنة [4].

إن مشكلة التلوث البيئي بالمعادن الثقيلة واحدة من المشاكلات الخطرة التي تقتضي عملية المعالجة الحيوية إذ إن اغلب المستحلبات المستخدمة هي مستحلبات من مواد كيمائية لهذا اتجهت الدراسة الحالية إلى استخدام إحياء مجهرية في انتاج مركبات ايضية ثانوية تكون اكثر فعالية سطحية مثل مادة Biosurfactantوالتي تتميز عن المستحلبات الكيمائية بفعاليتها العالية وسميتها القليلة فهي سهلة التكسير من الإحياء المجهرية وليس لها أي إضرار جانبية على البيئة مما يجعلها أكثر ملائمة في إزالة الملوثات الكيمائية من البيئة وذلك لصعوبة إزالة الملوثات الكيمائية من البيئة وخاصة بعد ارتباطها مع مكونات البيئة وتشكل معقدات ثابته مستقرة غير قابلة للتحلل[5] . تتكون مادة النشاط السطحي من جزئين احدهما كاره للماء وآخر محب له مما يجعلها تمتلك خصائص مميزة مثل قابليتها على ادمصاص المعادن الثقيلة .تم إنتاج مادة النشاط السطحي Biosurfactantمن العديد من الاحياء المجهرية مثل بكتريا *Bacillus,Pseudomonas* وخميرة Candida [6]. تعد بكتريا *Bacillus* مميزة في انتاج مادة النشاط السطحيBiosurfactant والذي يعرف بليبوبتايد الذي يعد من اهم المستحلبات الحيوية في معالجة المعادن الثقيلة [5] .

تهدف الدراسة الحالية الى استخدام مادة النشاط السطحي Biosurfactant المعزول من بكتريا *Bacillus cereus*في ادمصاص عنصري الزئبق والكروم مختبريا

## 2 – المواد وطرائق العمل

### 1 – إنتاج المستحلب الحيوي

استخدمت في هذه الدراسة بكتريا *Bacillus cereus* المعزولة محليا من تربة مصنع البتروكيماويات في البصرة والتي تتميز بقدرتها على ادمصاص المعادن الثقيلة وانتاج مادة النشاط السطحي المشخصة كيميائيا والمعزولة في دراسة سابقة[ 7] حفظت العزلات لفترة قصيرة على مائل الاكار كما حفظت لمدة طويلة في الكليسرول بدرجة حرارة ($-20C^{\circ}$) .

### 2 – الحد الادنى من تركيز المعدن المثبط للنمو *Bacillus cereus*

حضر وسط النمو Nutrient brooth واضيفت له تراكيز مختلفة (50,100,150,200,250,300) من كبريتات الزئبق ($Hg_2So_4$) ونترات الكروم $Cr\ (NO_3)_2$ بتركيز ملغم/لتر ثم لقح الوسط ب 1 مل من *B.cereus* وبعمر 24 ساعة وحضنت الفلاسكات في حاضنة هزازة بسرعة150 دورة/ دقيقة بدرجة حرارة 37م$^{\circ}$ لمدة 24ساعة . تم قيس النمو بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 660 nm [3,4].

### 3 – وسط الانتاج

استخدم وسط Mineral salt medium(MSM) يعد وسطا انتاجيا ابتدائيا لمادة النشاط السطحي اليبوبيتايد ويتكون من(غرام/لتر) KCl , $MgSO_4$ $0.1,FeSO_4$ 0.01, $CaCl_2$ 0.01 , $NH_4NO_3$ 0.39 $Na_2HPO_4$ 5.67,Glucose 30 ,$KH_2PO_4$ 0.5, $NaNO_3$ 2.5 , $K_2HPO_4$ 1.0, 0.5 تم تعديل الاس الهايدروجيني الى7 [6] .

**4 – غربلة مستحلب اليبوبيتايد**

يتوقف انتاج المستحلب على قابلية البكتريا على تحلل كريات الدم الحمراء .تلقح الاطباق المحتوية على وسط Blood agar ببكتريا *Bacillus cereus* المراد تشخيص قابليتها على تحلل الدم ومن ثم قابليتها على انتاج مادة النشاط السطحي .وحضنت الاطباق في درجة 30م° لمدة 24ساعة .بعد اختبار قابليتها على تحلل الدم ينقل جزء منها بوساطة الشراج الناقل الى وسط المغذي وحضنت بدرجة 30 م° لمدة 24h. بعد انتهاء فترة الحضن لقح وسط الإنتاج ب5ml من مزرعة البكتريا المراد معرفة قابليتها على انتاج المستحلب وحضنت بحاضنة هزازة بسرعة160 دورة/ دقيقة وبعد انتهاء فترة الحضن لمدة 72تم نبذ 10ml من الوسط الزرعي بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة 20دقيقة ثم عدل الاس الهايدروجيني الى 2 لغرض ترسيب الدهون والبروتينات وحضنت بدرجة 4 م° ولمدة 24 ساعة. نبذت مركزيا بسرعة 10000 دورة /دقيقة لمدة 20 دقيقة للحصول على راسب رصاصي ولغرض تنقية المركب أكثراستخلص ب 10ml من الكلوروفورم – ميثانول (2:1حجم/حجم) وجفف الناتج بالهواء [5].

**4 – المعالجة الحيوية باستخدام مستحلب اليبوبيتايد**

اختبرت قابلية المستحلب المستخلص من بكتريا *Bacillus cereus* على ازالة المعادن الثقيلة مثل الزئبق والكروم .من خلال تلقيحها ب 100من وسط المغذي Nutrient broth الحاوي على تراكيز مختلفة( 40,30,20,10 ملغم /50 مل) من كبريتات الزئبق وكبريتات النحاس ب 50 مايكروليتر /مل من مادة النشاط السطحي كما لقحت فلاسكات اخرى محتوية على نفس الوسط الزرعي بالكتلة الحيوية لبكتريا *Bacillus cereus*بمقدار 0.5 غم و ب 50 مايكروليتر /مل من مادة النشاط السطحي وفلاسكات اخرى ببكتريا *Bacillus cereus* فقط وعدل الاس الهايدروجيني لجميع الفلاسكات الى 7 وحضنت بدرجة 30C° لمدة 24h.بعد الحضن نبذ 10 مل من الوسط بسرعة 10000دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق وقيس المتبقي من الراشح بجهاز المطياف الذري وقورن مع فلاسكات السيطرة المحتوية على الوسط الزرعي الحاوي على تراكيز مختلفة من المعادن الثقيلة فقط [8].

$$E\% = (Cf - Ci) / Ci \times 100$$

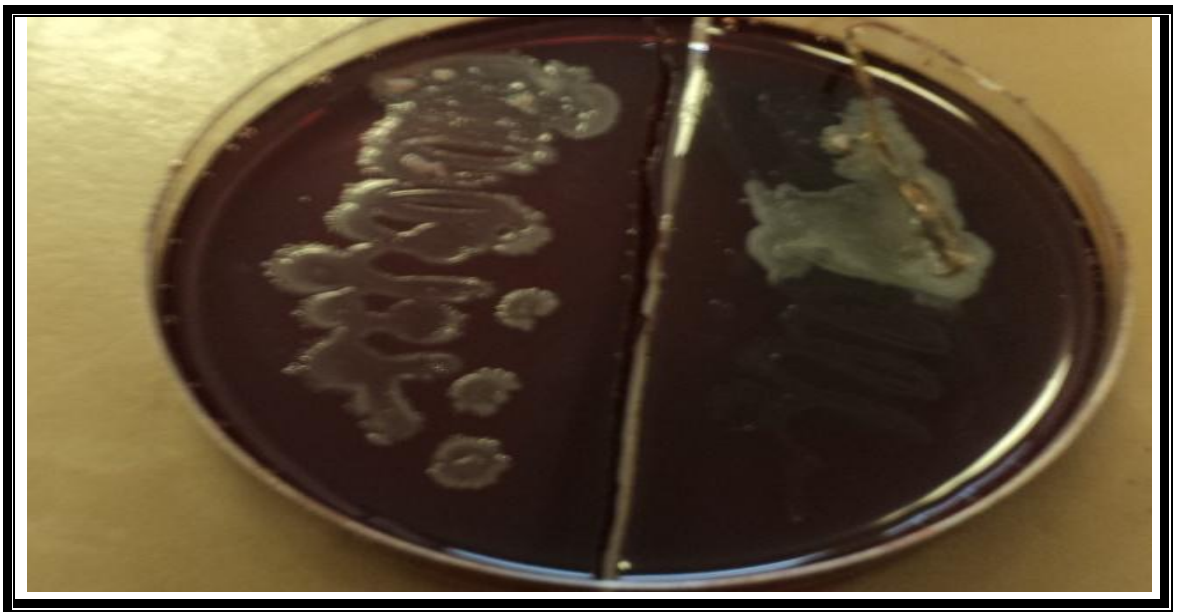
E = النسبة المئوية للعنصر التي أزيلت

Ci = التركيز الابتدائي للعنصر

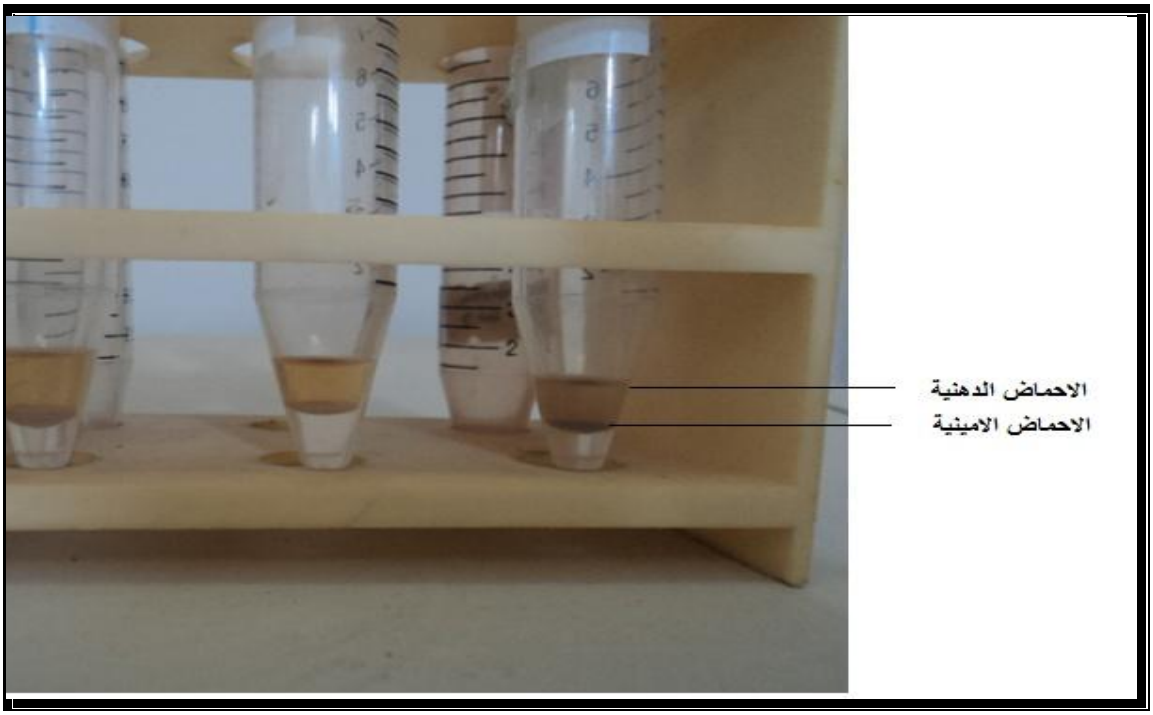
Cf = التركيز النهائي للعنصر

**3– النتائج**

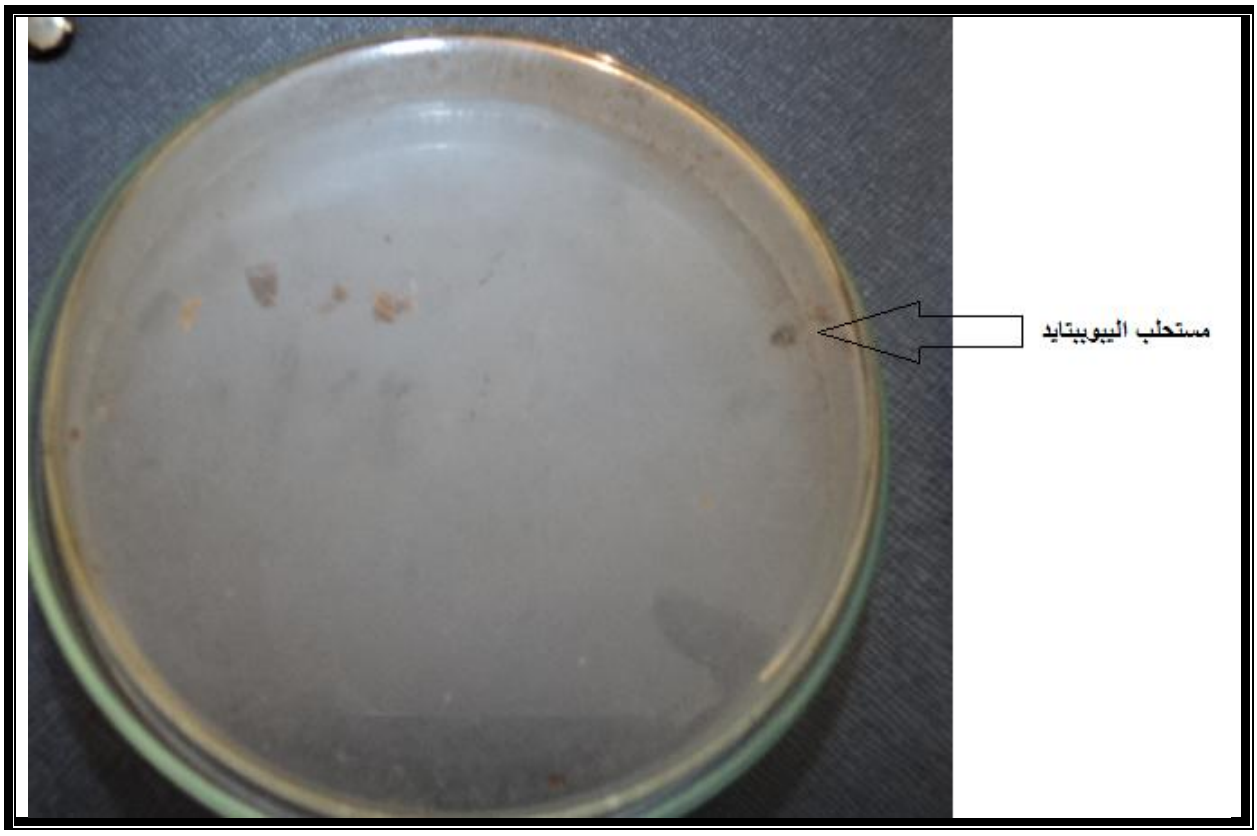
يوضح الشكل (1 ) قابلية بكتريا *Bacillus cereus* بعد زرعها على وسط blood agarعلى تحلل الدم ومن ثم قابليتها على انتاج مستحلب اليبوبيتايد شكل (2)ويوضح شكل (3 ) تجفيف مستحلب اليبوبيتايد في درجة حرارة غرفة المختبر .



شكل (1):تحلل الدم بواسطة بكتريا *Bacillus cereus*



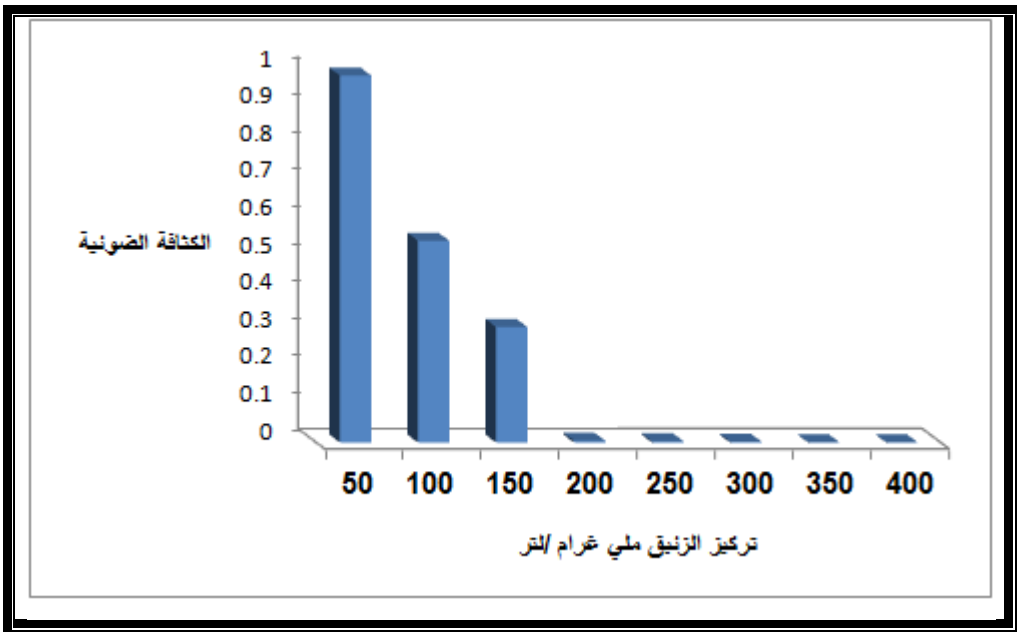

شكل (2) : استخلاص مادة النشاط السطحي البيوبتايد من بكتريا *Bacillus cereus*



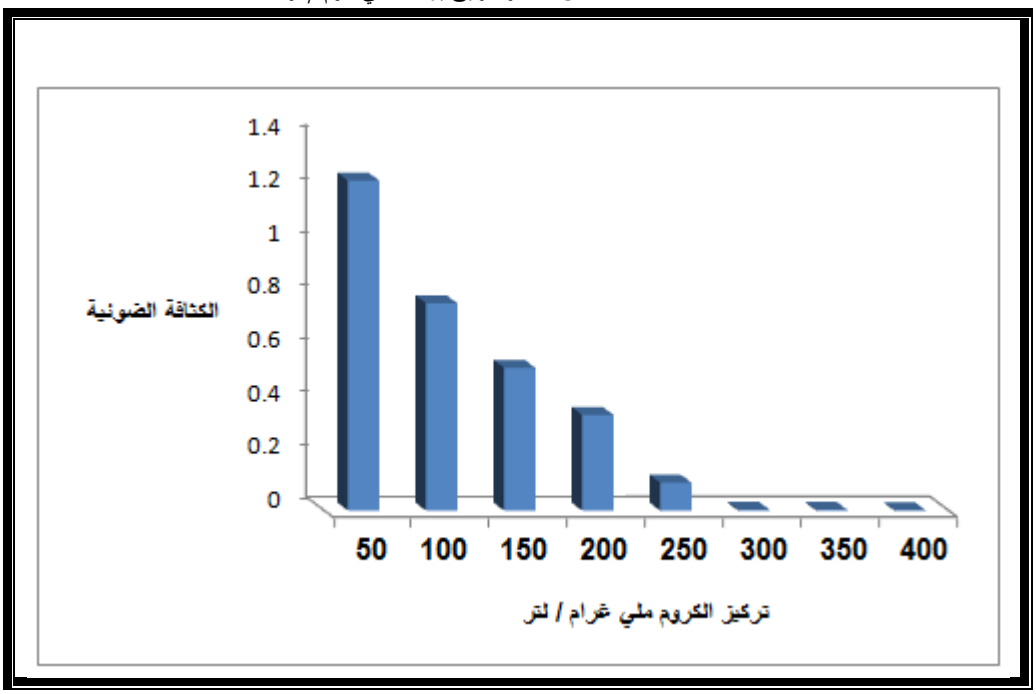

**شكل (3) : مادة النشاط السطحي البيوبيتايد بعد تجفيفها بالهواء**

**1 – الحد الادنى المثبط للنمو**

اظهرت *Bacillus cereus* المعزولة من اماكن ملوثة بالمعادن الثقيلة من معمل البتروكيمياويات فرق معنوي عال لتحمل الزئبق والكروم إذ كان الحد الادنى المثبط للنمو للزئبق هو 250 mg/L بينما الحد الادنى المثبط للنمو بالنسبة للكروم هو 300mg/L . = LSD 0.05300 و $p < 0.01$ شكل (5 و4 ).




شكل (4): الحد الادنى المثبط للنمو لبكتريا *Bacillus cereus* بوجود تراكيز مختلفة من عنصر الزئبق بوحدة ملي غرام /لتر




شكل (5) : الحد الادنى المثبط للنمو لبكتريا *Bacillus cereus* بوجود تراكيز مختلفة من عنصر الكروم بوحدة ملي غرام /لتر

### 3 – المعالجة الحيوية باستخدام مستحلب اليبوبتايد وبكتريا *Bacillus cereus*

اظهرت النتائج الموضحة في جدول (1 ) و (2 ) فرق معنوي عال في ازالة عنصري الزئبق والكروم بوجود مستحلب اليبوبتايد بمفرده فقط اوبوجود بكتريا *Bacillus cereus* اوبكتريا *Bacillus cereus* فقط إذ كانت النسبة المئوية لازالة عنصر الزئبق بتركيز 10ملغم /لتر بوجود البكتريا فقط 90% و96% بوجود المستحلب والبكتريا معا و 61% بوجود المستحلب فقط بينما بلغت النسبة المئوية لازالة الكروم بتركيز 10ملغم / لتر بوجود البكتريا فقط 93% بوجود المستحلب والبكتريا معا بلغت 99% في حين كانت النسبة المئوية

بوجود المستحلب فقط 76% وتقل النسبة المئوية بزيادة تركيز عنصر الزئبق والكروم في الوسط الزرعي إذ كان معامل الارتباط R= 0.991 و LSD = 0.06300 و P<0.01

جدول (1): ازالة الزئبق من وسط النمو Nutrient broth بوجود 0.5غم وزن رطب من بكتريا *Bacillus cereus* و 50 مايكروليتر من المستحلب المجفف بالهواء والمستخلص من بكتريا *Bacillus cereus*

| التركيز الاولي للزئبق ( ملي غرام/ لتر) | التركيز النهائي للزئبق والنسبة المئوية لإزالته بوجود بكتريا *Bacillus cereus* | التركيز النهائي للزئبق والنسبة المئوية لإزالته بوجود المستحلب و بكتريا *Bacillus cereus* | التركيز النهائي للزئبق والنسبة المئوية لإزالته بوجود مستحلب اليبوبيتايد |
|---|---|---|---|
| 10 | 1<br>90% | 0.4<br>96% | 3.9<br>61% |
| 20 | 3.5<br>83% | 2<br>90% | 10.5<br>48% |
| 30 | 8.9<br>70% | 5.5<br>82% | 18.5<br>38% |
| 40 | 15.6<br>61% | 10<br>75% | 28<br>30% |

جدول (1): ازالة كروم من وسط النمو Nutrient broth بوجود 0.5غم وزن رطب من بكتريا *Bacillus cereus* و 50مايكروليتر من المستحلب المجفف بالهواء والمستخلص من بكتريا *Bacillus cereus*

| التركيزالاولي الكروم (ملي غرام/ لتر) | التركيز النهائي للكروم والنسبة المئوية لإزالته بوجود بكتريا *Bacillus cereus* | التركيز النهائي للكروم والنسبة المئوية لإزالته بوجود المستحلب و بكتريا *Bacillus cereus* | التركيز النهائي الكروم والنسبة المئوية لإزالته بوجود مستحلب اليبوبيتايد |
|---|---|---|---|
| 10 | 0.7<br>93% | 0.1<br>99% | 2.4<br>76% |
| 20 | 3<br>85% | 1.5<br>93% | 9<br>55% |
| 30 | 8<br>73% | 4.2<br>86% | 16<br>47% |
| 40 | 14.8<br>63% | 8.8<br>78% | 20.3<br>38% |

## 4 – المناقشة

لقد اثبتت نتائج هذه الدراسه قابلية البكتريا على تحلل الدم ومن ثم قابليتها على انتاج مستحلب اليبوبيتايد نتيجة فعالية سطحها المحفزة لإنتاج أنزيمات مهمه في أنتاج مادة النشاط السطحي ومن ثم قابليتها على ادمصاص المعادن الثقيلة [5].

كما أظهرت نتائج شكل (3) ان البكتريا يثبط نموها عند معاملتها ب 250ملي غرام /لتر من الزئبق و 300

ملي غرام / لتر من الكروم . التراكيز العالية من المعادن تؤدي الى تأثيرات سامه ينتج عن العديد
من الآليات منها إعاقة المجموعات للجزيئات المهمة الحيويه، مثل الانزيمات وانظمة النقل للمغذيات الاساسيه والايونات و ازاحة و/او استبدال ايونات المعادن الاساسيه من الجزيئات الحيويه ووحدات العمل الخلويه هذا قد يؤدي الى تحوير وتعطيل للانزيمات، وتعطل (تمزق) الاغشيه الخلويه واغشية للاعضاء وسلامتها. ومن ثم المعادن السامة لديها القدره على التداخل مع مجموعه كبيره من الانشطه في الكائنات الحيه كما ان بعض البكتريا قد طورت وسائل لجعل تحويل المعادن الثقيلة الى اشكال غير ضاره [8].
وهي تمتلك عدد من الآليات للحفاظ على توازن المعادن ومنع التسمم بالمعادن .مقاومة المعادن الثقيله في البكتريا قد تحدث من القدره على منع الامتصاص. ويتحقق ذلك عن طريق ادمصاص ايونات المعادن السامه الى المواد المرتبطه بالخليه و/او مكونات جدار الخليه، او افراز المركبات العضويه التي تربط المعدن في البيئه المحيطه بها. خصوصية كلتا الحالتين هي منخفضه واي كاتيون معدن قد يتفاعل مع بقايا
الشحنة السالبة للمركبات العضوية [9] .

مقاومة المعدن قد تنتج من ألقدره على التعامل مع كميات كبيره من المعادن الثقيله داخل الأنسجه التحمل Tolerance التي تشمل الامتصاص لآيونات المعادن الثقيله تدخل خلايا البكتريا عن طريق ناقلات المغذيات الصغرى. لمره واحده في العمليات الخليه، إزالة سمية المعادن الثقيله يمكن إن يتحقق عن طريق الربط مع مركبات داخل خلويه محدده و/او نقل المعادن إلى أماكن خلوية محدده. هناك آليه عامه لإزالة السموم المعدنيه داخل الخلايا في البكتريا هي تشكيل ببتيدات وبروتينات ربط المعادن مثل
Phytochelatins, Metallothioneins [10] .

الادمصاص الحيوي للمعادن الثقيله بوساطة البكتريا عموماً هي عمليه ثنائية المرحلة. المرحلة الأولى هي الادمصاص خارج الخلايا بوساطة المواد المرتبطة بالخلايا مثل السكريات المتعددة والصمغ . هذه الطريقة غير ايضيه وتعد ملية سريعة وتعتمد على العديد من العوامل: الرقم الهيدروجيني، تركيز الكتلة الحيوية ، نوع البكتريا ونوع المعادن الثقيلة .المرحلة الثانية هي الامتصاص وهي عملية بطيئة تشمل النقل النشط عبر غشاء الخلية في الدخول والربط مع البروتينات وغيرها من المواقع داخل الخلية[11].

اكدت دراسة [3] ان الحد الادنى لنمو بكتريا
Bacillus cereus هو100ملي غرام / لتر بوجود تراكيز مختلفة من كبريتات الزئبق.

أوضحت النتائج المبينة في جدول(1,2) إن الإزالة لعنصري الزئبق والكروم بوجود مستحلب اليبوبتايد مع البكتريا أفضل من وجود البكتريا لوحدها أو وجود مستحلب اليبوبتايد فقط اذ كانت النسبة المئوية لازالة عنصر الزئبق بتركيز 10 ملي غرام /لترهي 96% بوجود المستحلب بينما النسبة المئوية لازالة الكروم بتركيز 10 ملي غرام /لترهي 99% بوجود المستحلب والبكتريا لأن مستحلب اليبوبتايد عبارة عن مادة حيوية تتنتج من البكتريا لها القابلية على خفض الشد السطحي للوسط الزرعي بسبب احتوائها على جزئين احدهما كارهه للماء والاخر محب للماء. الجزء الكارهه للماء عبارة عن سلسلة طويلة من الاحماض الدهنية والجزء المحب اما يكون كاربوهيدرات ،احماض امينية ،فوسفات أويكون كحولا .معظم الاحماض الدهنية المكونة للمستحلب تكون مشبعة مثل بالمتيك والستريك [12].

أوضحت الدراسة السابقة ان الحامض الدهني الموجود في البكتريا من نوع بالمتيك ذو وزن جزيئ
256,4 دالتون[7]. إن مستحلب اليبوبتايد يحتوي على جزيئات مهمة تدعى بالخلايا [13] أكدت الدراسات السابقة الصغيرة وإنتاجها مؤشر على وجود البكتريا بتراكيز عالية من المعادن الثقيلة تساعد هذه الجزيئات على ادمصاص المعادن الثقيلة وذلك عن طريق ربطها بالشحنة السالبة الموجودة على سطحها ومستحلب

البيوبتايد يمتلك طبيعة قطبية يربط المعادن الثقيلة بالآصرة الهايدروجينية الداخلة في تركيب المستحلب

**المصادر**


1-Nies, D.H. (1999). Microbial heavy metal resistance. Appl. Micr. Biotechnol. 51: 730–750.

2-Nies, D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 27:313-39.

3- Giri , S;Dash , H and Das , S .(2014).Mercury resistant bacterial population and characterization of *Bacillus* sp isolated from sediment of solid waste discharged point of Steel industry .Nat.Aca.Sci.lett.Vol 37,pp237-243

4- Minyan ,H;Xiangyang ,l;Guo, L;Miller,S ;Rensing , C and Wang , G.(2010).Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1.BMC Microbiology .VOI 19,PP 10-22

5-Kosaric, N.(2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation**.** London. Food Technol. Biotechnol. 39 : 295–304

6-Garg,I .(2011).Bioremediation of heavy metal contaminated soil using biosurfactant . Dissertation, Department of Biotechnology & Environmental Sciences.1-54

7- Mukhaifi,E.(2014). Physiological study of some *Bacillus* spp. resistant to heavy metals and improving their ability of bioremediation. Basrah. Dissertion

8-Jayabarath, J.; Shyam, S.; Arulmurugan, R. and Giridhar, R.(2009). Bioremediation of heavy metals using biosurfactants. Int. J. of Biotechn.Appl.1 : 50-54

9-Khan ,M.S.; Zaidi, A.; Wani, P.A. and Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ. Chem. 7: 1–19.

10- Issazadeh ,K.; Jahanpour,N.; Pourghorbanali,F.; Raeisi,G. and Faekhondeh, J.(2013). Heavy metals resistance by bacterial strains. Annals of bio. Vol 4:60-63.

11-Kalantari, N.(2008). Evaluation of toxicity of Iron, chromium and cadmium on *Bacillus cereus* growth. Iran.J. of Basic Medic.Sci.10 :222-228

12-Ewa, H. and Bogdan ,B.(2006). Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans.* Org. and Poly. Techn. l 61: 727-733

13-Bayoumi, R.A.; Atta, H.A.; El-Sehrawey, M.A. and Selim,S.M.(2011). Microbial production of biosurfactants from some El-Korma governorate microbial isolates for bioremediation of crude oil spills in the different environments . J. of Basic and Appl. Sci. 1 :1541-1555

# Bioremediation of some heavy metals by using the biosurfactant isolated from *Bacillus cereus*

**Abstract:**

Using of microbiology or biosurfactant was important in removal of heavy metals. In this study *Bacillus cereu*s had ability of hemolysis of blood and production of biosurfactant .The minimal inhibition concentration of mercury and chromium were 250mg/L and300 respectively Presence of lipopeptide with *Bacillus cereus* in the medium reduced the removal of heavy metals. 90% of mercury was removed by *Bacillus cereus* cells , 96% was removed by biosurfactant and uptake by *Bacillus cereus* whereas 61% by *Bacillus cereus* only during 24h. 93% of chromium was removed by *Bacillus cereus* cells , 99% was removed by biosurfactant and uptake by *Bacillus cereus* whereas 76% of mercury by *Bacillus cereus* during 24h . Removal of heavy metals was decreased with increasing of mercury and chromium concentration in the medium .

**Keywords**: *Bacillus cereus* , bioserfactant ,bioremediation of heavy metals by bioserfactant