



Heavy Metal Removal by Phosphate Solubilizing Extraced from Metal Waste and Phosphatase Enzyme Role in the Removal

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Ghoreishi F.S.¹ MSc,
Etemadifar Z.* PhD

How to cite this article

Ghoreishi F S, Etemadifar Z. Heavy Metal Removal by Phosphate Solubilizing Extraced from Metal Waste and Phosphatase Enzyme Role in the Removal. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1): 9-16.

*Biology Department, Science Faculty, University of Isfahan, Isfahan, Iran

¹Biology Department, Science Faculty, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Correspondence

Address: Biology Department, Science Faculty, University of Isfahan, Hezar Jarib Sreet, Isfahan, Iran. Postal Code: 8174673441
Phone: +98 (31) 37932367
Fax: +98 (31) 37932456
zetemedifar@gmail.com

Article History

Received: April 11, 2016
Accepted: October 10, 2017
ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims Heavy metals are one of the most important pollutants in earth and water environments due to long-term durability. The aim of this study was to isolate phosphate solubilizing bacteria from metal waste, investigate the amount of resistance, remove the metal by it and the effect of phosphatase on removal of metals.

Materials & Methods In this experimental study, the isolation of phosphate solubilizing bacteria and detection of isolates were carried out, using biochemical and molecular tests. The phosphatase was measured by colorimetric method, the resistance of the separated to the metals with the minimum inhibitory concentration (MIC_{50}), minimum bactericidal concentration (MBC) and the rate of removal of metals by atomic absorption was measured. The surface changes of the exposed metal cells were investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and the effect of phosphatase on metal removal. Data analysis was done with Duncan's test, using Excel 2013 and SPSS 20 software.

Findings *Serratia proteamaculans* was identified as producer of the acid phosphatase. The highest MIC and MBC were obtained for Nickel (Ni) and Lead (Pb), respectively. The most metal removal was for Pb. MIC_{50} of Chrome and Cadmium were obtained less than 0.1mM and 1mM, and their removal percentage by the isolate were 18% and 48%, respectively. According to the FTIR, $988.339cm^{-1}$ wavelength was observed in the cells treated by 5mM Pb that is related to the $Pb_3(PO_4)_2$. The isolate showed the highest resistance and removal of Pb. The mechanism of Ni removal was associated to the cell surface, while Pb was removed by both of the cells and supernatant containing phosphatase.

Conclusion *Serratia proteamaculans* is the phosphate solubilizing bacterium in metal waste. This bacterium produces an enzyme called phosphatase, which is a cause of lead removal.

Keywords Phosphate Solubilizing Bacteria; Phosphatase Enzyme; Heavy Metals; Bioremediation

CITATION LINKS

[1] Phosphate-mediated remediation of metals and ... [2] The toxicity of cadmium and resulting hazards for ... [3] Hazards of heavy metal ... [4] Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational ... [5] Reflections on hexavalent chromium: Health hazards of an industrial heavyweight. Environ Health ... [6] Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing ... [7] Bioremediation of uranium contamination with enzymatic uranium ... [8] Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide-and metal-contaminated subsurface ... [9] Engineering of deinococcus radiodurans R1 for bioprecipitation of uranium from dilute nuclear ... [10] Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural ... [11] An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing ... [12] Cowan and Steel's manual for the identification of medical ... [13] A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic ... [14] Resolution and purification of three periplasmic phosphatases of Salmonella ... [15] Legionella pneumophila major acid phosphatase and its role in intracellular ... [16] Atomic absorption ... [17] FTIR-spectroscopy in microbial and material ... [18] Infrared spectra and characteristic frequencies of inorganic ... [19] Heavy metal response behaviors of sulfur-oxidizing Pseudomonas ... [20] The amino acid sequence around the reactive serine residue in alkaline phosphatase of serratia ... [21] Hexavalent chromium removal by a novel Serratia proteamaculans isolated from the bank of ... [22] Purification of Serratia sp. phosphatase, identification/localisation of the two phosphatase isoenzymes and large scale production of the ... [23] Microbes in heavy metal ... [24] Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms ...

حذف فلزات سنگین توسط جدایه حل‌کننده فسفات استخراج‌شده از پساب فلزی و نقش آنزیم فسفاتاز در فرآیند حذف

فاطمه‌السادات قریشی MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

زهرا اعتمادی‌فر PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

اهداف: فلزات سنگین به دلیل ماندگاری طولانی‌مدت، از مهم‌ترین آلاینده‌ها در محیط‌های خاکی و آبی هستند. هدف مطالعه حاضر، جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات از پساب فلزی، بررسی میزان مقاومت، حذف فلز توسط آن و تاثیر فسفاتاز در حذف فلزات بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات و شناسایی جدایه با آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی صورت گرفت. فسفاتاز به روش رنگ‌سنجی، میزان مقاومت جدایه به فلزات با کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) و میزان حذف فلزات با جذب اتمی اندازه‌گیری شد. تغییرات سطح سلول‌های در معرض فلز با طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز و اثر فسفاتاز در حذف فلزات بررسی شد. داده‌ها توسط آزمون دانکن به کمک نرم‌افزارهای Excel 2013 و SPSS 20 تحلیل شدند.

یافته‌ها: جدایه *سراشیا پروتئوماکولانس* شناسایی شد که اسیدفسفاتاز تولید می‌کرد. بیشترین MIC₅₀ و MBC به ترتیب مربوط به نیکل و سرب و بیشترین میزان حذف مربوط به سرب بود. میزان مقاومت جدایه به دو فلز کروم و کادمیوم اندک و MIC آنها به ترتیب کمتر از ۰/۱ و کمتر از ۱ میلی‌مولار، و میزان حذف کروم و کادمیم به ترتیب حدود ۱۸٪ و ۴۸٪ به دست آمد. طول موج $988/339\text{cm}^{-1}$ مربوط به $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$ در سلول‌های تیمار شده با ۵ میلی‌مولار سرب مشاهده شد. سوبه جدا شده در مورد سرب بیشترین مقاومت و حذف را نشان داد. مکانیزم حذف نیکل تنها مربوط به عوامل سطح سلولی بود، در حالی که سرب علاوه بر سلول، توسط فسفاتاز نیز حذف شد.

نتیجه‌گیری: *سراشیا پروتئوماکولانس* باکتری حل‌کننده فسفات پساب فلزی است. این باکتری آنزیم فسفاتاز تولید می‌کند که عامل حذف فلز سرب است.

کلیدواژه‌ها: باکتری‌های حل‌کننده فسفات، آنزیم فسفاتاز، فلزات سنگین، تصفیه زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۵

*نویسنده مسئول: zetemedifar@gmail.com

مقدمه

فعالیت‌های صنعتی‌سازی جهانی زباله‌های آلی و غیرآلی زیادی تولید می‌کند. فلزات و هسته‌های رادیواکتیو به دلیل حرکت و ماندگاری طولانی‌مدت در محیط‌های خاکی و آبی مهم‌ترین نگرانی در میان آلاینده‌ها هستند [1].

کادمیوم یک فلز سنگین سمی با خطر بالا برای سلامتی انسان است که می‌تواند برای کلیه، استخوان و ریه سمیت ایجاد کند و همچنین موجب بروز سرطان شود [2]. در طول یک قرن اخیر، انتشار سرب در هوای محبوس شده، موجب آلودگی محیط شده که در حدود ۵۰٪ انتشار آن مربوط به بنزین است. علائم مسمومیت حاد با این فلز شامل سردرد، کج خلقی، شکم‌درد و سایر علائم مربوط به سیستم عصبی است [3]. مطالعات ایمنی‌شناسی، اثرات سرکوب‌کننده فلز نیکل را بر فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و تولید اینترفرون‌ها، به عنوان مکانیزم احتمالی سرطان‌زایی این فلز پیشنهاد کرده است [4]. کروم شش‌ظرفیتی، مهم‌ترین نگرانی را در حیطه آلودگی محیطی دارد که همراه با تنفس، خوردن و آشامیدن مواد حاوی آن وارد بدن انسان می‌شود و با ایجاد سرطان‌های ریه و سینوس‌ها در ارتباط است [5].

علاوه بر روش‌های شیمیایی، پاک‌سازی زیستی روشی نویدبخش برای تجزیه آلاینده‌ها با تحت کنترل درآوردن متابولیسم گیاهان و میکروارگانیسم‌ها است [1]. باکتری‌های حل‌کننده فسفات از مکانیزم‌های مختلفی از قبیل تولید کربنیک‌اسید (H_2CO_3) طی تنفس، تجزیه غیرمستقیم، تولید اسیدهای آلی و غیرآلی، آزادسازی یون هیدروژن، تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، تولید سولفید هیدروژن و تولید یون آمونیوم متصل به نیتروژن ($\text{NH}_4^{++}\text{-N}$) یا آنزیم فسفاتاز برای حل‌کردن فسفر استفاده می‌کنند [6]. فسفاتازها بر اساس pH بهینه، وزن مولکولی و هیدرولیز واحدهای سربین یا تره‌اونین فسفریله به دو دسته اسید و آلکالین فسفاتازها طبقه‌بندی می‌شوند [1]. یک مکانیزم آنزیمی زدودن اورانیوم، افزودن گلیسرول -۲- فسفات به آب حاوی اورانیوم و سپس درمان آب با یک سوبه سیتروباکتر حاوی آنزیم فسفاتاز است. این آنزیم، فسفات را از سوبسترای مذکور آزاد کرده و موجب رسوب کمپلکس فسفات- اورانیوم نامحلول در سطح سلول می‌شود [7]. در مطالعه‌ای بررسی جنس‌های آرتروباکتر، باسیلوس و رانلا جداسازی شده از خاک سطحی دیپارتمان انرژی ایالات متحده صورت گرفت. گونه‌های باسیلوس و رانلا که آنزیم فسفاتاز دارند، اورانیل‌استات را رسوب می‌دهند، در حالی که آرتروباکتر با فنوتیپ فسفاتاز منفی، رسوب فلز را انجام نمی‌دهد [8]. کلون کردن ژن *phoN* به دست آمده از یک جدایه محیطی *سالمونلا انتریکا* سرووار تیپ‌ی و بیان آن در *داینوکوکوس رادیودورانس* سوبه R_1 موجب کسب فعالیت فسفاتاز و رسوب فلزات سنگین توسط این سوبه شد. این مشاهده مدرکی بر اثبات اثر فسفاتاز در رسوب فلزات است [9].

با توجه به زمان‌بر و هزینه‌بر بودن بررسی اثر فسفاتاز در حذف فلزات با روش‌های ژنتیک مانند کلونینگ، مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات از پساب فلزی، بررسی میزان مقاومت و حذف فلز توسط آن و تاثیر فسفاتاز در حذف فلزات انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر کلیه مواد شیمیایی با درصد خلوص بالا (سیگما؛ ایالات متحده، مرک؛ آلمان) در درجه آزمایشگاهی بودند. **جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات:** باکتری حل‌کننده فسفات از پساب کارخانه آبکاری شهرک صنعتی محمودآباد اصفهان، با تهیه سری رقت و کشت روی محیط PVK (پیکوسکایا)، براساس تولید هاله شفاف در اثر حل‌کردن تری‌کلسیم‌فسفات موجود جداسازی شد [10]. محتویات محیط پیکوسکایا شامل گلوکز ۱۰ گرم بر لیتر، منیزیم‌سولفات ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ۰/۱ گرم بر لیتر، پتاسیم‌کلرید ۰/۲ گرم بر لیتر، سولفات فرو ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ۰/۰۰۲ گرم بر لیتر، تری‌کلسیم‌فسفات ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ۵ گرم بر لیتر، آمونیوم‌سولفات ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ۰/۵ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۰/۵ گرم بر لیتر، سدیم‌کلرید ۰/۲ گرم بر لیتر و سولفات‌منگنز ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ۰/۰۰۲ گرم بر لیتر بود [11].

شناسایی سوبه با آزمون‌های بیوشیمیایی: برای شناسایی ابتدایی جدایه در حد جنس، آزمون‌های بیوشیمیایی به کاررفته شامل رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، مصرف گلوکز، TSI، احیای نیترات، اندول و رشد در محیط تیوگلیکولات بودند [12].

شناسایی مولکولی: پس از استخراج ژنوم باکتری با روش CTAB [13]، سوبه به روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) ژن 16S

۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی فلز سنگین با غلظت معین و ۱۰۰ میکرولیتر محیط لوریا برتانی استریل ریخته شد. برای هر نمونه شاهد بدون باکتری به‌عنوان بلانک و محیط بدون فلز برای بررسی حداکثری رشد باکتری در نظر گرفته شد. به‌منظور بررسی اثر فلز نیکل، از نمک نیکل کلراید (NiCl_2) در غلظت‌های نهایی ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار، فلز کروم از نمک دی‌کرومات پتاسیم ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) در غلظت‌های نهایی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار، فلز کادمیوم از نمک کادمیوم کلراید (CdCl_2) در غلظت‌های نهایی ۰/۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار و فلز سرب از نمک نیترات سرب (PbNO_3) در غلظت‌های نهایی ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. لازم به ذکر است محلول‌های فلزی طوری تهیه شدند که غلظت‌های نهایی آنها در چاهک‌ها مطابق با غلظت‌های مذکور بود. محلول‌های فلزی با استفاده از آب دی‌یونیزه تهیه و توسط فیلتر سرنگی با منافذ ۰/۴۵ میکرون، فیلتر شدند. در نهایت برای هر نمونه سه تکرار قرار داده شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۵ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفت و به مدت ۴۸ ساعت در 30°C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس میزان جذب نوری هر نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه خواننده الیزا مدل 2100 (شرکت Stat Fax؛ ایالات متحده) خوانده شد. اعداد به‌دست‌آمده وارد نرم‌افزار Excel 2013 شده، میانگین تکرارها و انحراف‌معیار اعداد توسط این نرم‌افزار محاسبه و در پایان، نمودار میزان مقاومت هر سویه به غلظت‌های مختلف هر کدام از نمک‌های فلزی رسم شد.

محاسبه کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC_{50}) و کمترین غلظت کشنده (MBC) سویه با استفاده از سری رقت: با توجه به نتایج آزمون میکروتیتور و جذب نوری کمترین غلظت فلز که موجب کاهش ۵۰٪ میزان جذب نوری حاصل از رشد باکتری‌ها بود، به‌عنوان MIC_{50} در نظر گرفته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌هایی با رشد نزدیک به صفر، روی محیط جامد لوریا برتانی برده و پس از انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت در 30°C ، کمترین غلظتی از فلز که موجب کشته‌شدن کامل باکتری و مهار رشد آن روی محیط جامد بود، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

بررسی میزان حذف فلزات (Biosorption) توسط سلول‌های شسته‌شده سویه جداشده با استفاده از طیف‌سنجی جذب اتمی: یکی از روش‌های محاسبه میزان فلزات در محلول‌ها استفاده از دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی است. اساس کار این دستگاه به این صورت است که اتم‌های فلزی در طول موج‌هایی خاص و منحصر‌به‌فرد به‌صورت قوی جذب شده و به‌طور همزمان خطوط طیفی خاص خود را ساطع می‌کنند. در ابتدا پرتوی نور ساطع‌شده توسط لامپ دستگاه به‌وسیله یک لامپ کاندی توخالی، تک‌رنگ می‌شود. از طرفی نمونه مورد نظر که به حالت محلول در آمده به داخل شعله پاشیده و به‌صورت اتم آزاد در می‌آید. پس از عبور پرتوی تک‌رنگ مقداری از این پرتو توسط اتم‌های آزاد مذکور جذب شده و از شدت آن کاسته می‌شود. سپس با محاسبه مقدار پرتوی جذب‌شده توسط آشکارساز و به‌وسیله منحنی‌های کالیبراسیون می‌توان غلظت عنصر مجهول را در محلول محاسبه کرد [16]. به‌منظور بررسی میزان حذف فلزات توسط سلول‌های سویه جداشده محلولی حاوی گلوکز با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات با غلظت ۲ میلی‌مولار، بافر تریس-اسید هیدروکلریدریک با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار و $\text{pH}=7$ تهیه شد. سپس غلظت MIC هر نمک فلزی به محلول مذکور افزوده شد. علت انتخاب غلظت MIC فلزات برای

rDNA، با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F (پرایمر رفت) و 1492R (پرایمر برگشت) با محصول ۱۵۰۰ جفت باز و دستگاه سایکلر حرارتی مدل 5331 (اپندورف؛ آلمان) شناسایی شد. مخلوط PCR شامل بافر ۲/۵ میکرولیتر، dNTP ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام یک میکرولیتر، مننیزیم کلراید ۱/۲ میکرولیتر، آنزیم Smart taq ۰/۵ میکرولیتر، DNA الگو ۳ میکرولیتر، آب دوبار تقطیر استریل ۳/۱۵ میکرولیتر بود.

برنامه دمایی PCR با دمای واسرشتی اولیه 95°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشتی 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال 64°C به مدت ۴۵ ثانیه، طول‌سازی 72°C به مدت ۷۰ ثانیه و طی ۳۰ سیکل، طول‌سازی نهایی 72°C به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت و سپس نمونه در دمای 4°C نگهداری شد. محصول واکنش برای اطمینان از صحت تولید با استفاده از بافر TBE1x (تریس/بورات/EDTA) و ولتاژ ۹۰ ولت روی ژل آگارز ۱/۵٪ ران و در انتها توسط شرکت رنا توالی‌یابی شد. برای شناسایی نهایی سویه، نتیجه توالی‌یابی در مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) مورد بررسی قرار گرفت.

رسم درخت فیلوژنی: به‌منظور بررسی نیای سویه جداسازی‌شده و تعیین جایگاه قرارگرفتن آن در سیستم طبقه‌بندی، درخت فیلوژنی سویه براساس توالی‌های به‌دست‌آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 16S rDNA ، توسط نرم‌افزار Mega 6 و با استفاده از neighbor-joining method رسم شد.

رسم منحنی رشد: به‌منظور بررسی مراحل و سرعت رشد سویه در محیط مایع LB (لوریا برتانی)، منحنی رشد آن رسم شد. در ابتدا یک میلی‌لیتر از سوسپانسون کشت شبانه باکتری با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند به ۹۹ میلی‌لیتر از محیط کشت لوریا برتانی استریل افزوده شده و ارلن در دمای 30°C به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار گرفت. برای آزمایش دو تکرار و هر دو ساعت یک‌بار جذب نوری محیط در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس منحنی رشد با استفاده از اعداد به‌دست‌آمده در نرم‌افزار Excel 2013 رسم شد.

بررسی تولید آنزیم فسفاتاز، نوع و القایی یا بالقوه‌بودن تولید آن: برای بررسی تولید آنزیم فسفاتاز و القایی یا بالقوه‌بودن آن، سویه در دو محیط پیکوسکایا و پیکوسکایا همراه با ۲ گرم بر لیتر نمک فسفات محلول دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. سپس مقداری از هر محیط به مدت ۲۰ دقیقه در 6000 دور در دقیقه سانتریفوژ شده [14] و محلول رویی حاوی مواد سلولی برداشته شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۱۰۰ میکرولیتر از معرف آنزیم اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز مخلوط و سپس به مدت یک ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری شد. بررسی p-نیتروفنل آزادشده توسط آنزیم فسفاتاز در صورت حضور به این صورت بود که در اثر مصرف سوبسترای p-نیتروفنیل فسفات محلول‌های حاصل با آب مقطر رقیق‌سازی و جذب نوری در ۴۱۰ نانومتر خوانده می‌شد. به‌دلیل اینکه p-نیتروفنل آزادشده در pH اسیدی، رنگ زرد قابل ردیابی را تولید نمی‌کند، به محلول حاصل از معرف اسید فسفاتاز در پایان گرمخانه‌گذاری مقداری محلول سدیم هیدروکسید (NaOH) غلیظ افزوده و سپس جذب نوری خوانده شد [15]. همچنین برای هر نمونه یک شاهد بدون باکتری تهیه و پس از انجام تمام مراحل مذکور، جذب نوری آن به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

تعیین میزان مقاومت جدایه‌ها به فلزات سنگین مختلف توسط پلیت میکروتیتور: در هر چاهک ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون کشت شبانه باکتری با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند در محیط لوریا برتانی،

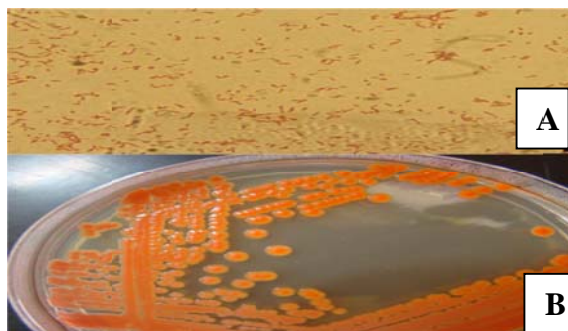
ناشناس بسیار کمک‌کننده است [17]. به منظور بررسی تغییرات سطح سویه جدا شده پس از در معرض گذاری با فلزات و اطلاع از مکان رسوب فلزات، از FTIR سطح سلول‌های جدایه استفاده شد. سلول‌های جدایه رسوب‌یافته در نمونه‌های آزمایش جذب اتمی، پس از سانتریفوژ دو بار با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ شسته، سپس در دمای ۵۰°C خشک و پودر حاصل برای بررسی با دستگاه FT/IR- (400-4000 cm⁻¹) (JASCO؛ ژاپن) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون دانکن با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ با کمک نرم‌افزارهای Excel 2013 و SPSS 20 صورت گرفت.

یافته‌ها

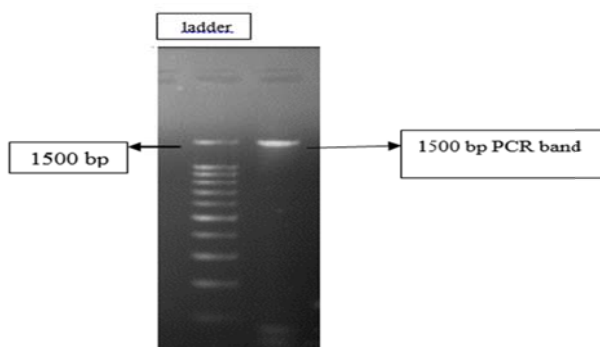
سویه جدا شده در مورد آزمون احیای نیترات در مرحله اول و قبل از افزودن پودر روی، رنگ قرمز تولید کرد که به معنای تنها احیای نیترات به نیتريت بود. همچنین کل محیط TSI را زرد رنگ کرده و تولید گاز نیز مشاهده شد (جدول ۱).

| جدول ۱) نتایج آزمایشات بیوشیمیایی سویه جدا شده | |
|--|------------------|
| آزمون مورفولوژی و بیوشیمیایی | نتایج |
| مورفولوژی و واکنش گرم | باسیل / گرم منفی |
| کاتالاز | + |
| اکسیداز | - |
| مصرف قند گلوکز | + |
| احیای نیترات | + |
| رشد در محیط تیوگلیکولات | + |
| آزادسازی ایندول از تریپتوفان | - |
| TSI (تریپتیک سوی آگار) | |
| گلوکز | + |
| لاکتوز | + |
| سوکروز | + |
| گاز | + |

سویه جدا شده باسیل گرم منفی بود (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱) مشاهدات مربوط به مورفولوژی و شکل کلنی سویه جدا شده: (A) مورفولوژی سویه؛ باسیل گرم منفی (B) شکل کلنی در محیط TSI



شکل ۲) تصویر ژل الکتروفورز تکثیر ژن 16S rDNA سویه جدا شده

حذف، زنده ماندن سلول‌های جدایه در این غلظت در عین ایجاد سمیت برای آن بود. میزان pH نهایی محلول در حدود ۷ تنظیم شد. زیست‌توده کشت سویه جدا شده در انتهای فاز نمایی رشد با سانتریفوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه [14] جداسازی و پس از دوبار شست‌وشو با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ مقدار معینی از آن به محلول فوق افزوده شد، طوری که جذب نوری نهایی باکتری در حجم ۱۰ میلی‌لیتری آزمایش به ۰/۷ رسید. نمونه‌ها در فالکن با گنجایش ۲۵ میلی‌لیتر ریخته و به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۳۰°C روی شیکر قرار گرفتند. پس از طی این مدت زمان، محلول‌ها ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ [14] و محلول رویی به ظرفی دیگر منتقل شد، به منظور هضم اسیدی به ازای هر ۵ میلی‌لیتر از محلول رویی ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتريك غلیظ افزوده و برای هر نمونه، شاهد بدون باکتری نیز تهیه شد. میزان فلز موجود در هر نمونه با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی جذب اتمی A Analys300 (PerkinElmer؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد.

تجمع سرب و نیکل توسط مواد مترشحه خارج سلولی جدایه و بررسی نقش آنزیم فسفاتاز در آن: به علت محدودیت در زمان و هزینه از ۴ فلز مورد آزمایش، دو فلز سرب و نیکل به دلیل مقاومت (MIC) بیشتر جدایه به آنها برای آزمایش حذف فلز توسط مواد ترشحه انتخاب شدند. برای حذف تقریبی اثر جسم سلول جدایه و بررسی تأثیر مواد مترشحه آن از جمله آنزیم فسفاتاز در حذف فلزات، کشت ۲۲ ساعته جدایه در محیط پیکوسکایا به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ [14] و سوپرناتانت حاصل که حاوی آنزیم فسفاتاز بود مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از سوپرناتانت حاصل، دو محیط حذف فلز برای مواد خارج سلولی سویه تهیه شد؛ یکی بدون سوپسترای فسفاتاز و دیگری به همراه غلظت ۵ گرم بر لیتر تری‌کلسیم فسفات. همچنین به عنوان سوپسترای آنزیم به هر دو محیط فوق غلظت ۲ میلی‌مولار از دو فلز سرب و نیکل افزوده، سپس pH همه محیط‌ها برای حذف عامل تولید اسید آلی یا معدنی در حذف فلز حدود ۷ تنظیم شد. حجم نهایی هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر تعیین و در فالکن با گنجایش ۲۵ میلی‌لیتر تهیه شد. محیط‌ها به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۳۰°C در ۱۷۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. در نهایت پس از هضم اسیدی نمونه‌ها با اسید نیتريك غلیظ، میزان فلز باقی‌مانده توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری و برای هر نمونه شاهد بدون مواد خارجی سلولی جدایه نیز تهیه شد.

بررسی تغییرات ناشی از جذب فلزات در سطح باکتری توسط طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) سطح سلول‌ها: براساس مطالعات شیمیایی، طول موج بین ۲/۵ تا ۲۰ میکرومتر مربوط به اواسط امواج مادون قرمز است. طبق مکانیک کوانتوم، یک مولکول می‌تواند با جذب مقداری انرژی به حالتی برانگیخته و لرزشی برسد. مولکول برانگیخته با یک طیف مداوم مادون سرخ امکان جذب ذرات سبک با این انرژی را دارد. طیف تابشی باقی‌مانده، باند جذبی در فرکانسی مشخص را از حرکات لرزشی و چرخشی پیچیده مولکول نشان می‌دهد. این حرکات مولکولی با علایمی مخصوص از یکدیگر مشخص شده که از نیروهای اتصالی مختلف و زوایای اتصالی اتم‌ها در یک مولکول منشا می‌گیرند. بنابراین مولکول‌های پیچیده خصوصیات بسیاری از لرزش‌های درونی را نشان می‌دهند. به طور عمومی، فرکانس یک باند جذبی با نیروی پایدار اتصال رابطه مستقیم و با میزان جرم اتمی رابطه عکس دارد. لرزش و حرکت این باندها که با اتصالات تکی یا گروه‌های عملکردی یک مولکول مرتبط است در تشخیص ترکیبات

حذف فازات سنگین توسط جدایه حل‌کننده فسفات استخراج‌شده از پساب فلزی و نقش آنزیم فسفاتاز در فرآیند حذف سویه مورد نظر با ۹۸٪ شباهت، سراسیا پروتئوماکولانس (*Serratia proteamaculans*) تشخیص داده شد (جدول ۲).

جدول ۲) نتایج بلاست توالی سویه جداشده در NCBI

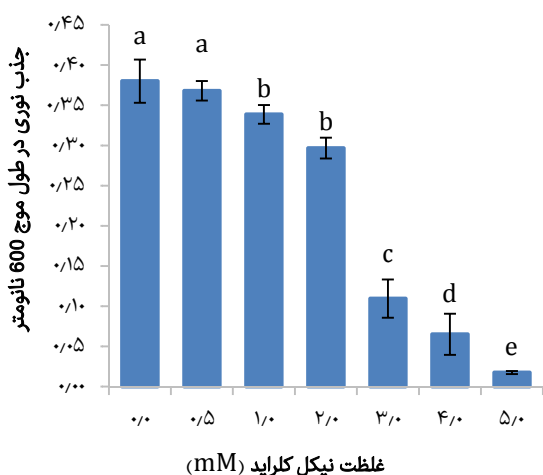
| شماره دسترسی | انطباق | E value | Query cover | کل | بیشترین | توصیف |
|--------------|--------|---------|-------------|------|---------|--|
| NR 074820.1 | %۹۸ | ۰/۰ | %۱۰۰ | ۱۸۳۸ | ۱۸۳۸ | سراسیا پروتئوماکولانس سویه ۵۶۸، RNA ریبوزومی ۱۶S، توالی کامل |
| NR 037112.1 | %۹۸ | ۰/۰ | %۱۰۰ | ۱۸۳۸ | ۱۸۳۸ | سراسیا <i>quinivorans</i> سویه ۴۳۶۴ ژن rna زیبوزومی، توالی جزئی |
| NR 025340.1 | %۹۷ | ۰/۰ | %۱۰۰ | ۱۸۳۱ | ۱۸۳۱ | سراسیا <i>grimesii</i> سویه 30063 dsM ژن RNA ریبوزومی ۱۶S توالی جزئی |
| NR 113616.1 | %۹۷ | ۰/۰ | %۱۰۰ | ۱۸۲۹ | ۱۸۲۹ | سراسیا <i>grimesii</i> سویه NBRC 13637 ژن RNA ریبوزومی، توالی جزئی |



0.002

شکل ۳) درخت فیلوژنی سویه جداشده (سویه جداسازی شده با دایره توپر نشان داده شده است)

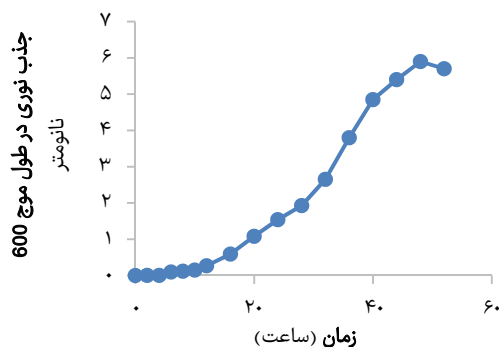
نداشت و غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار نیز اثرات یکسانی بر رشد سویه داشتند. میزان MBC نیکل، ۱۰ میلی‌مولار به دست آمد. تنها نمونه کشت‌داده شده از غلظت ۵ میلی‌مولار روی محیط جامد لوریا برتانی کلنی تشکیل داد، غلظت‌های بعدی همگی موجب مرگ کامل سراسیا شد.



نمودار ۲) مقاومت سراسیا به نمک نیکل کلراید در محیط لوریا برتانی برات (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در یک متغیر است.)

میزان MIC₅₀ کروم در محدوده غلظت‌های مورد استفاده به‌طور دقیق تعیین نشد و در حدود کمتر از ۰/۱ میلی‌مولار بود. نمونه‌های

براساس درخت فیلوژنی نزدیک‌ترین سویه به توالی به‌دست‌آمده برای باکتری جداشده، سراسیا پروتئوماکولانس بود (شکل ۳). سراسیا پس از حدود ۶ ساعت فاز تاخیری را طی کرد و وارد فاز نمایی رشد شد. در ساعت ۴۸ به نهایت رشد و انتهای فاز نمایی رسید و در ساعت ۵۰ وارد فاز سکون شد (نمودار ۱).



نمودار ۱) رشد سراسیا در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط لوریا برتانی برات، در ارن با گنجایش ۲۵۰ میلی‌لیتر با دمای انکوباسیون ۳۰°C و شیکر ۱۷۰ دور در دقیقه

تولید آنزیم فسفاتاز در هر دو محیط پیکوسکایا با محدودیت فسفات و پیکوسکایا همراه منبع محلول فسفات مشاهده شد و در هر دو محیط به یک میزان بود. سنجش آنزیم اسیدفسفاتاز، تولید این آنزیم را در هر دو محیط مذکور آن هم به میزان مشابه نشان داد.

برای نیکل MIC₅₀ برابر با ۳ میلی‌مولار به دست آمد (نمودار ۲). غلظت ۰/۵ میلی‌مولار این نمک فلزی اثر محسوسی بر رشد سویه

کشت داده شده از غلظت های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ و ۱ میلی مولار روی محیط جامد لوریا برتانی کلنی تشکیل دادند و غلظت های بعدی همگی موجب مرگ کامل سراسیا شد. بنابراین MBC کروم ۲ میلی مولار به دست آمد.

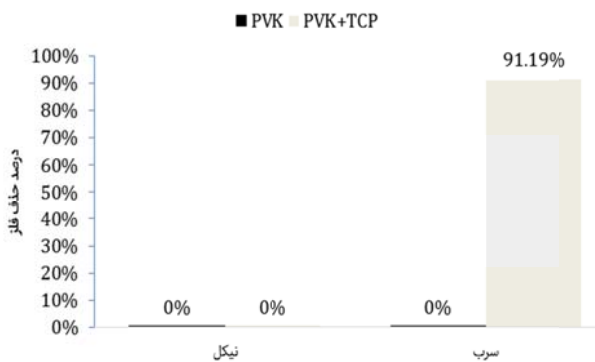
میزان MIC₅₀ سرب ۲/۵ میلی مولار بود. افزایش کم رشد باکتری در حضور غلظت امیلی مولار نمک سرب در مقایسه با شاهد بدون فلز آن احتمالاً ناشی از خطای آزمایش بوده است (نمودار ۳).



فلزات سنگین

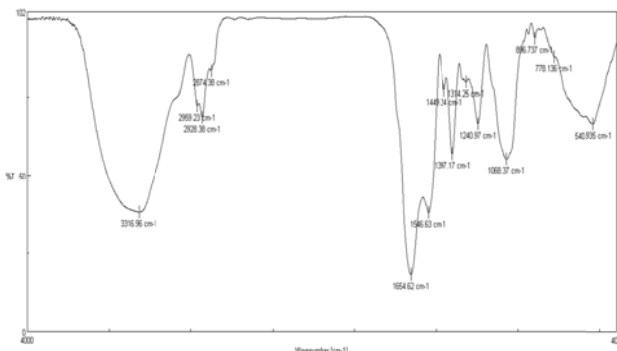
نمودار ۵) درصد حذف نمک فلزات مختلف توسط سلول های سراسیا با جذب نوری ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر در حجم ۱۰ میلی لیتر از محلول طی ۱۰ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۰°C و شیکر ۱۷۰ دور در دقیقه (حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در میزان حذف فلز است).

میزان حذف فلز نیکل در هر دو محیط مورد استفاده، توسط مواد خارج سلولی سراسیا صفر بود. در مورد فلز سرب میزان حذف فلز در محیط حاوی مواد خارج سلولی و فاقد سوبسترای آنزیم فسفاتاز (تری کلسیم فسفات) صفر، اما در محیط دارای سوبسترای این آنزیم بسیار بالا و در حدود ۹۱% گزارش شد (نمودار ۶).

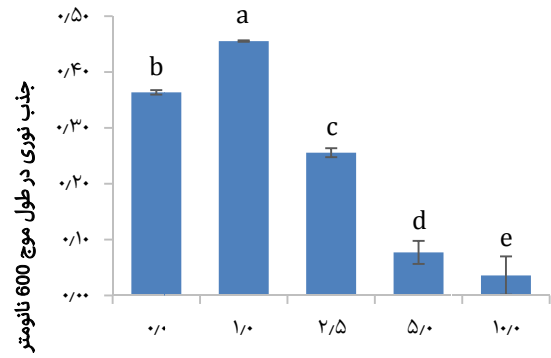


نمودار ۶) درصد حذف فلزات مختلف توسط مواد خارج سلولی سراسیا در ۱۰ میلی لیتر محیط طی ۱۰ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۰°C و شیکر ۱۷۰ دور در دقیقه

با توجه به قله های مشاهده شده در FTIR سطح سلول های کنترل سراسیا (نمودار ۷) و سلول های تیمار شده با غلظت ۵ میلی مولار سرب، به مدت ۱۰ ساعت (نمودار ۸) قله ظاهر شده در سلول های تیمار که در کنترل نبود طول موج ۹۸۸/۳۳۹ cm⁻¹ داشت که این طول موج مربوط به ترکیب Pb₃(PO₄)₂ (فسفات سرب) بود. سایر طول موج های مشاهده شده در کنترل و تیمار یکسان بود.



نمودار ۷) آنالیز FTIR کنترل سوبیه جدا شده

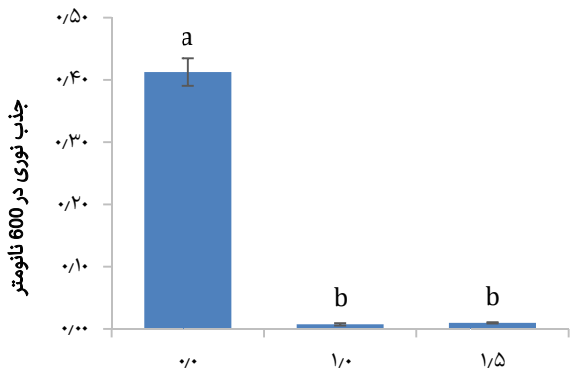


غلظت نیترات سرب (mM)

نمودار ۳) مقاومت سراسیا به نمک نیترات سرب در محیط لوریا برتانی برات (حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در یک متغیر است).

به دلیل اینکه بیشترین غلظت مورد استفاده برای نمک سرب ۱۰ میلی مولار بود، MBC برای این فلز تعیین نشد و سراسیا حتی در غلظت ۱۰ میلی مولار نیز زنده ماند و نمونه حاصل از کشت آن روی محیط جامد لوریا برتانی کلنی تشکیل داد.

میزان MIC₅₀ کادمیم کمتر از ۱ میلی مولار بود. در واقع می توان مقاومت اندک جداییه را در برابر این نمک فلزی مشاهده کرد (نمودار ۴).



غلظت کادمیم کلراید (mM)

نمودار ۴) مقاومت سراسیا به نمک کادمیم کلراید در محیط لوریا برتانی برات (حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در یک متغیر است).

فقط کشت از نمونه هایی با غلظت امیلی مولار تا ۶۰ میلی مولار روی محیط جامد لوریا برتانی، کلنی تشکیل داده و بقیه غلظت ها همگی موجب مرگ کامل سوبیه شدند. بنابراین میزان MBC این فلز برای سراسیا ۸۰ میلی مولار بود.

سراسیا بیشترین درصد حذف را در مورد نمک فلز سرب نشان داد. پس از آن نمک فلزات کادمیم، نیکل و کروم به ترتیب بیشترین تا کمترین درصد حذف را به خود اختصاص دادند (نمودار ۵).

پروتئوماکولانس تنها توسط عوامل مربوط به سطح سلول از جمله مواد پلیمری سطح سلولی [21] و گروه‌های عملکردی موجود در آن و موثر در اتصال به فلز مانند کربوکسیل، ایمیدازول، سولفیدریل، آمینو، فسفات، سولفات، تیواتر، فنل، کربونیل، آمید و هیدروکسیل [22] در حذف نیکل عمل کرده است. در مورد حذف فلز سرب توسط مواد خارج سلولی این سویه می‌توان گفت که عامل حذف فلز سرب در مورد این سویه به احتمال بسیار بالا آنزیم فسفاتاز بود؛ اگرچه حذف توسط سلول‌های این باکتری نیز صورت گرفته و حضور ترکیبات مربوط به فلز سرب در سطح باکتری مشاهده شد. در مطالعه حاضر با توجه به قله‌های مشاهده‌شده در FTIR سطح سلول‌های کنترل سریشیا و سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵ میلی‌مولار سرب، به مدت ۱۰ ساعت قله ظاهر شده در سلول‌های تیمار که در کنترل نبود، طول موج $988/339\text{cm}^{-1}$ داشت که این طول موج مربوط به ترکیب $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$ (فسفات سرب) بود [23]. سایر طول موج‌های مشاهده‌شده در کنترل و تیمار یکسان بود [24].

پیشنهاد می‌شود با بررسی فاکتورهای محیطی مختلف مانند pH، دما، زمان انکوباسیون، منابع مختلف محیط کشت و ایجاد محدودیت در آنها، بررسی حذف در سلول‌های در حال استراحت و تثبیت‌شده و سایر شرایط، میزان حذف فلزات را توسط سویه بهینه و افزایش داد. همچنین می‌توان با کلون کردن ژن مسئول آنزیم فسفاتاز این سویه در باکتری فاقد آن کسب توانایی حذف فلزات را در باکتری نوترکیب بررسی و با افزایش بیان آنزیم فسفاتاز در آن، میزان حذف فلز را افزایش داد. با توجه به توانایی بالای سویه در حذف سرب می‌توان این خصوصیت را در حذف سرب از دود حاصل از احتراق بنزین کاربردی کرد.

از جمله محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به وجود خطاهای احتمالی در نوع محیط کشت مورد استفاده و تاثیر آن در جذب فلز توسط باکتری اشاره نمود.

نتیجه‌گیری

سریشیا پروتئوماکولانس باکتری حل‌کننده فسفات پساب فلزی است. این باکتری آنزیم فسفاتاز تولید می‌کند که عامل حذف سرب است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان بابت انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: در این تحقیق هیچ استفاده‌ای از نمونه‌های جانوری یا انسانی نشده است.

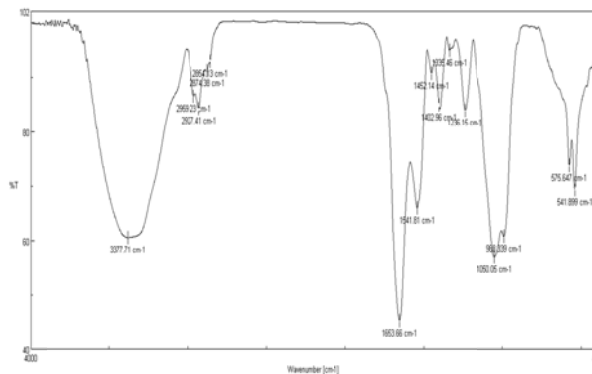
تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاطمه‌السادات قریشی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ زهرا اعتمادی‌فر (نویسنده دوم)، روش‌شناس پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪).

منابع مالی: این پژوهش به وسیله پژوهانه کارشناسی ارشد پرداخت‌شده توسط دانشگاه اصفهان انجام شده است.

منابع

1- Martinez RJ, Beazley MJ, Sobecky PA. Phosphate-mediated remediation of metals and radionuclides. Adv Ecol. 2014;2014:786929.



نمودار ۸) آنالیز FTIR تیمار، مجاورشده با ۵ میلی‌مولار سرب به مدت ۱۰ ساعت

بحث

مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات از پساب فلزی و بررسی میزان مقاومت و حذف فلز توسط آن و تاثیر فسفاتاز در حذف فلزات انجام شد.

جنس سریشیا برای اولین بار توسط بارتولومئو بیژیرو در سال ۱۸۱۹ میلادی شناسایی و در خانواده انتروباکتریاسه طبقه‌بندی شده است. اگرچه مطالعات قبلی آنزیم آلکالین فسفاتاز را در باکتری سریشیا مارشبیسنس گزارش کرده‌اند [18]، اما تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر نوع آنزیم فسفاتاز در سریشیا پروتئوماکولانس گزارش نشده است. در مطالعه حاضر آنزیم سریشیای جدا شده از نوع اسیدفسفاتاز شناسایی شد. تاکنون اثر آنزیم فسفاتاز این سویه بر حذف فلزات سنگین بررسی نشده است. اگرچه در مطالعه‌ای توسط جوتی و همکاران مقاومت این سویه به ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از کروم ۶ ظرفیتی مشاهده و عامل حذف این فلز را آنزیمی شناسایی کردند، اما مکانیزم دقیق آن بررسی نشده [19]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که فلز کروم برای سریشیا پروتئوماکولانس بیشترین سمیت را داشته، به طوری که غلظت ۲ میلی‌مولار آن که حاوی ۳۶/۷ ppm از فلز کروم بود موجب مرگ کامل سلول‌ها شد. احتمالاً دلیل این مقاومت بالاتر در مطالعه جوتی و همکاران بهینه‌سازی شرایط بوده است. همچنین در پژوهش فلیک، دو ایزوآنزیم برای فسفاتاز این باکتری مشاهده و تفاوت محسوس فعالیت آنها در دو نوع کشت بسته و مداوم و در مراحل مختلف رشد تعیین شد، به طوری که ایزوآنزیم GPI در طول مراحل اولیه رشد، اما CPHI در مرحله سکون بیشترین تولید را داشت [20]. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر از مواد خارج سلولی کشت ۷۲ ساعته جدایه برای حذف فلزات استفاده شد می‌توان به نقش بیشتر ایزوآنزیم CPHI در حذف فلز پی برد. با توجه به MBC بالای دو فلز کادمیوم (۸۰ میلی‌مولار حاوی ۵۵۱۲ ppm فلز کادمیوم) و سرب (بیش از ۱۰۰ میلی‌مولار حاوی بیش از ۱۲۹۵۰ ppm فلز سرب) می‌توان سازگاری بالای سریشیا پروتئوماکولانس جدا شده را در مقابل دو فلز مذکور در طول زمان نتیجه گرفت. با توجه به داده‌های مربوط به بررسی القایی یا بالقوه بودن تولید آنزیم می‌توان نتیجه گرفت که تولید آنزیم فسفاتاز در این باکتری به صورت خودبه‌خودی و بالقوه بوده و در هر شرایطی تولید شده است. نتایج مربوط به حذف فلز توسط سلول‌های سویه کاملاً مطابق با میزان مقاومت این سویه در برابر مرگ سلولی توسط فلزات مذکور بود. از بین ۴ فلز مورد بررسی سریشیا نسبت به دو فلز سرب و نیکل مقاومت (MIC) بیشتر داشته و برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. با توجه به نتایج حذف فلز توسط مواد خارج سلولی سویه می‌توان نتیجه گرفت که سریشیا

- 13- Chen Wp, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(9):2260.
- 14- Kier LD, Weppelman R, Ames BN. Resolution and purification of three periplasmic phosphatases of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1977;130(1):399-410.
- 15- Aragon V, Kurtz S, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection. *Infect Immun.* 2001;69(1):177-85.
- 16- Robinson JW. Atomic absorption spectroscopy. *Anal Chem.* 1960;32(8):17A-29.
- 17- Schmitt J, Flemming HC. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Int Biodeter Biodegr.* 1998;41(1):1-11.
- 18- Miller FA, Wilkins CH. Infrared spectra and characteristic frequencies of inorganic ions. *Anal Chem.* 1952;24(8):1253-94.
- 19- Rameshkumar P, Pothana Sh, Manivannan G, Murali M. Heavy metal response behaviors of sulfur-oxidizing *Pseudomonas* sp. PRK786. *Int J Adv Biotechnol Res.* 2014;15(2):106-16.
- 20- Zwaig N, Milstein C. The amino acid sequence around the reactive serine residue in alkaline phosphatase of *Serratia marcescens*. *Biochem J.* 1964;92(2):421-2.
- 21- Tahri Joutey N, Bahafid W, Sayel H, Ananou S, El Ghachtouli N. Hexavalent chromium removal by a novel *Serratia proteamaculans* isolated from the bank of Sebou River (Morocco). *Environ Sci Pollut Res.* 2014;21(4):3060-72.
- 22- Pflücke H. Purification of *Serratia* sp. phosphatase, identification/localisation of the two phosphatase isoenzymes and large scale production of the enzyme [Internet]. Munich: Grin Verlag; 2003 [cited 2017 May 10]. Available from: <https://www.grin.com/document/18268>.
- 23- Rajendran P, Muthukrishnan J, Gunasekaran P. Microbes in heavy metal remediation. *Indian J Exp Biol.* 2003;41(9):935-44.
- 24- Javanbakht V, Alavi SA, Zilouei H. Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. *Water Sci Technol.* 2014;69(9):1775-87.
- 2- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol.* 2006;1:22.
- 3- Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.* 2003;68:167-82.
- 4- Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect.* 1994;102(Suppl 1):275-82.
- 5- Pellerin C, Booker SM. Reflections on hexavalent chromium: Health hazards of an industrial heavyweight. *Environ Health Perspect.* 2000;108(9):A402-7.
- 6- Zaidi A, Saghir Khan M, Ahemad M, Oves M, Wani PA. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Saghir Khan M, Zaidi A, Musarrat J, editors. *Microbial strategies for crop improvement*. Berlin: Springer Science & Business Media; 2009. pp. 23-50.
- 7- Lovley DR, Phillips EJP. Bioremediation of uranium contamination with enzymatic uranium reduction. *Environ Sci Technol.* 1992;26(11):2228-34.
- 8- Martinez RJ, Beazley MJ, Taillefert M, Arakaki AK, Skolnick J, Sobecky PA. Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide-and metal-contaminated subsurface soils. *Environ Microbiol.* 2007;9(12):3122-33.
- 9- Appukuttan D, Rao AS, Kumar Apte Sh. Engineering of *deinococcus radiodurans* R1 for bioprecipitation of uranium from dilute nuclear waste. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(12):7873-8.
- 10- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus.* 2013;2:587.
- 11- Nautial CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;170(1):265-70.
- 12- Cowan ST, Steel KJ. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Barrow GI, Feltham RKA, editors. Cambridge: Cambridge university press; 2004.