وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة بابل

كلية العلوم للبنات

قسم علوم الحياة

بروتكول عزل بكتريا مقاومة للكادميوم

بحث مقدم إلى مجلس كلية العلوم للبنات جامعة بابل كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

اعداد الطالبات:

زينب حيدر محمد

زينب صلاح حسن

اشراف الاستاذ المساعد الدكتورة :

ناديه محمود توفيق

1444هـ 2023م

بسم الله الرحمن الرحيم

قال تعالى: ﴿تِلْكَ الْأَمْثَالُ نَضْرِبُهَا لِلنَّاسِ وَمَا يَعْقِلُهَا إِلَّا الْعَالِمُونَ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة العنكبوت- الآية 43

الشكر والتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

الشكر و الثناء لله عز و جل أولا على نعمة الصبر و القدرة على إنجاز العمل ، فالله الحمد على هذه و أتقدم بالشكر و التقدير إلى استاذتي الفاضلة الاستاذ المساعد الدكتورة ناديه محمود توفيق التي تفضلت بإشرافها على هذا البحث ، و لكل ما قدمته لي من دعم و توجيه و إرشاد لإتمام هذا العمل على ما هو عليه فلها أسمى عبارات الثناء و التقدير .

الإهداء

إلى جميع أساتذتي الكرام؛ اصدقائي

أُهدي إليكم بحثي.....

الخلاصة :-

لتطبيق عملية المعالجة الحيوية باستخدام البكتيريا يتطلب الحصول على بكتيريا مقاومه لملوث ما. عزل البكتيريا المقاومة لملوث ما عاده يتم عزلها من البيئة لذلك هدفت هذه الدراسة الى عزل بكتيريا مقاومة للكادميوم من تربة ملوثة بمشتقات النفط والديزل تضمنت الدراسة اخذ تربه ملوثة بالنفط والديزل (موقع مولده المنطقة), ومن ثم عزل بكتيريا مقاومه للكادميوم اعتمادًا على طريقة MIC . تم اعتماد التشخيص المظهري للمستعمرات النامية للعزلة والتشخيص المظهري للعزلة بعد التصبيغ بصبغة غرام ومشاهدتها تحت المجهر الضوئي . الفحوصات الكيميائية IMVIC استخدمت لمعرفه فيما قابليه هذه العزلة على تخمر الجلوكوز ومصدر استخدام الستريت كمصدر للطاقة. في هذه الدراسة تمكنا من عزل بكتريا سالبة لصبغة كرام, خيطية الشكل سالبة , مخمرة لماء الببتون ,لفحص المثيل الاحمر و موجبة لفحص فوكس بروكس و مستخدمة السترات كمصدر للطاقة. هذه العزلة مقومة للكادميوم عند تركيز 30 ملي مولر.

1- المقدمة

الكادميوم متواجد في البيئة بشكل طبيعي او من تدخل الانسان مما ادى الحاجة إلى إيجاد تقنيات لمعالجة وازالة الكادميوم من البيئة (1) . ان الطرق المتوفرة لمعالجة الكادميوم من البيئة هي طرق فيزيائية وكيميائية والمعالجة الحيوية . المعالجة الحيوية عادة ما تتم بعدة طرق وتتضمن استخدام الأحياء مثل النباتات , الفطريات , الخمائر , البكتيريا . البكتيريا تستخدم بشكل واسع في المعالجات الحيوية وذلك بسبب (اولا) قصر دورة حياتها (ثانيا) امكانيتها على المعالجة الحيوية . والمعالجة الحيوية تتم بعدة طرق (2).

لذلك هدفت الدراسة لعزل البكتيريا مقاومة للكادميوم . تضمنت مواضيع البحث (اولا) أخذ تربة ملوثة بمشتقات النفط والديزل (على افتراض أن مشتقات النفط تحتوي على المعادن الثقيلة ومن ضمنها الكادميوم , مما يتيح إمكانية عزل بكتيريا مقاومة للكادميوم منها) . (ثانيا) تم اعتماد طريقة التركيز الاعلى للتحمل MIC في عزل هذه البكتيريا ضمن وسط يحتوي على الكادميوم . (ثالثا) تم اعتماد التشخيص المظهري والفحوصات الكيميائية لمشاهدة والتعرف على نوع هذه البكتيريا المعزولة.

2- طريقة العمل

تتضمن الدراسة عزل بكتيريا من تربة ملوثة مقاومة للكادميوم بالاعتماد على التركيز الاعلى للتحمل MIC وتم التشخيص المظهري المستعمرات النامية للعزلة على طبق الوسط المغذي الصلب من حيث شكل ولون وحجم وحافة المستعمرة كما تم اعتماد صبغة غرام ومشاهدتها تحت المجهر الضوئي للتشخيص المظهري للعزلة , بالإضافة الى الفحوصات الكيميائية IMVIC .

1-3 النتائج

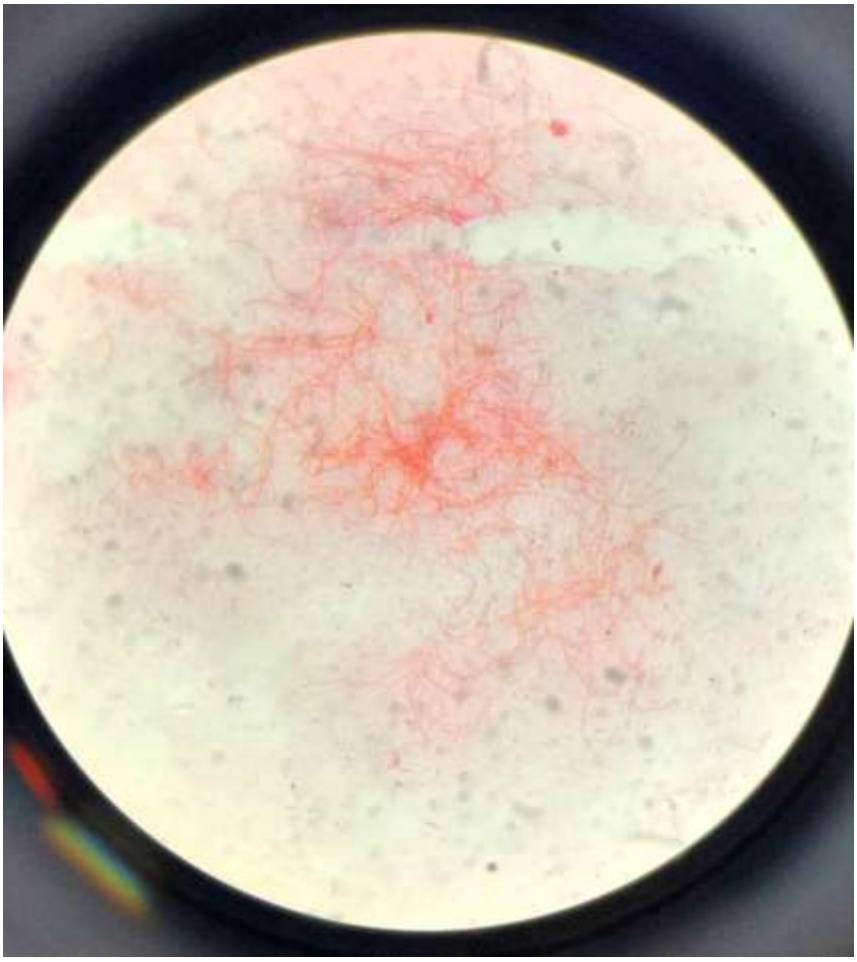
اعتمادا على نتائج التحري عن البكتيريا المعزولة ومقاومتها للكادميوم , تم عزل عزلة واحدة وقد تم تسميتها RCd30 على طبق الوسط المغذي الصلب المحتوي على الكادميوم حيث ان R تدل على المقاومة Cd رمز عنصر الكادميوم 30 هو درجة المقاومة لتركيز الكادميوم . كانت العزلة المعزولة لها قابلية النمو والمقاومة للكادميوم بتركيز 30Mm

2-3 التشخيص المظهري للعزلة المعزولة

تم التشخيص المظهري اعتمادا على تشخيص شكل و لون و حجم المستعمرات النامية للعزلة RCd30 . وقد ظهرت المستعمرات بيضاء , دائرية الشكل, قطرها6mm , كما في الشكل (1) .

الشكل 1. طبق المستعمرة

اما التشخيص المظهري للعزلة RCd30 تحت المجهر الضوئي بعد التصبيغ بصبغة غرام , فقد وجد أن العزلة سالبة لصبغة غرام , خيطيه كما في الشكل (2) .



الشكل 2.العزلة RCd30 السالبة لصبغة غرام .

3-3 الفحوصات الكيميائية IMVIC

مخمرة لماء الببتون ,لفحص المثيل الاحمر و موجبة لفحص فوكس بروكس و مستخدمة السترات كمصدر للطاقة.

4- المناقشة :-

كما ذكرنا سابقًا ، فإن إحدى العقبات الرئيسية التي تحول دون حل وجود الكادميوم في الزراعة والسلسلة الغذائية هي استخدام "البكتيريا الممرضة للأمعاء" أو مسببات الأمراض النباتية ذات الصلة. على الرغم من أنه من الممكن استخدام سلالات PGPB غير الممرضة غير الممرضة المعزولة من نباتات Cd hyperaccumulator التي تستعمر مواقع التعدين الملوثة بالمعادن في التربة شبه القاحلة ، (أي استخدام Methylobacterium sp. cp3 - mCherry ، المعزولة من بذور Crotalaria pumila ، التي تحتوي على جينات مقاومة الكادميوم ، بما في ذلك مشغل czc وبروتينات تدفق الكادميوم (3) ، قد تؤدي التحديات التكيفية والتنافسية التي يواجهها هؤلاء السكان ، في بيئة غير ملوثة ، إلى تقليل قدرتها على إزالة الكادميوم في أماكن متخصصة عالية مثل التربة الزراعية (4), (5). ومن المثير للاهتمام ، أن أكثر أنواع CdtB المتخصصة التي تم الإبلاغ عنها من المزارع ، مع نسب عالية من تجميد الكادميوم ، يبدو أنها من الأنواع القريبة من المجموعات المسببة للأمراض المعوية ، أي في Helianthus tuberosus ، أو في تربة الأرز القريبة من مصانع التصنيع مع Burkholderia cepacia GYP1 (5)6 ، أو في مزارع تربة الكاكاو مع Enterobacter sp. CdtB41 (6). هذا لأن الجينات التي ترمز لمقاومة المضادات الحيوية مرتبطة بالأوبراونات المتورطة في مسارات التخليق الحيوي التي تتعامل مع المعادن الثقيلة ، خاصةً عوامل cad و czc المرتبطة بتنظيم الكادميوم والنحاس والزنك في فضاءات البنية فوق البلازمية والخلوية. ومع ذلك ، حتى إذا لم تكن هذه الأنواع من CdtB مفيدة في تطوير المنتجات الحيوية ، يمكن الاقتراب من هذه المجموعة من زاوية أخرى.

5- المصادر :-

(1) van Beelen, P. and Doelman, P. (1997) Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. Chemosphere 34, 455–499. [Google Scholar[

(2) Belimov, A.A. , Hontzeas, N. , Safronova, V.I. , Demchinskaya, S.V. , Piluzza, G. , Bullitta, S. and Glick, B.R. (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (Brassica juncea L. Czern.). Soil Biol Biochem 37, 241–250. [Google Scholar[

(3) Beveridge, T.J. (1989) Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. Annu Rev Microbiol 43, 147–171. [PubMed] [Google Scholar[

(4) Bhayani, A. , Mehta, K. , Bhattacharya, S. , Mishra, S. and Dineshkumar, R. (2020) 14 - Microbial-assisted heavy metal remediation: bottlenecks and prospects. In Removal of Toxic Pollutants through Microbiological and Tertiary Treatment ed. Shah, M.P. pp. 349–372. Bharuch, India: Elsevier. [Google Scholar[

(5) Bolan, N. , Kunhikrishnan, A. , Thangarajan, R. , Kumpiene, J. , Park, J. , Makino, T. , Kirkham, M.B. and Scheckel, K. (2014) Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – to mobilize or to immobilize? J Hazard 266, 141–166. [PubMed] [Google Scholar[

(6) Braissant, O. , Astasov-Frauenhoffer, M. , Waltimo, T. and Bonkat, G. (2020) A review of methods to determine viability, vitality, and metabolic rates in microbiology. Front Microbiol 11, 1–25. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar[

(7) Braissant, O. , Cailleau, G. , Aragno, M. and Verrecchia, E.P. (2004) Biologically induced mineralization in the tree Milicia excelsa (Moraceae): its causes and consequences to the environment. Geobiology 2, 59–66. [Google Scholar[

(8) Bravo, D. and Benavides-Erazo, J. (2020) The use of a two-dimensional electrical resistivity tomography (2D-ERT) as a technique for cadmium determination in cacao crop soils. Appl Sci 10, 1–17. [Google Scholar[

(9) Bravo, D. , Braissant, O. , Solokhina, A. , Clerc, M. , Daniels, A.U. , Verrecchia, E. and Junier, P. (2011) Use of an isothermal microcalorimetry assay to characterize microbial oxalotrophic activity. FEMS Microbiol Ecol 78, 266–274. [PubMed] [Google Scholar[

(10) Bravo, D.L.-M.C. , Quiroga, R. , Moreno, E. , Duarte, D. , Zamora, A. , Gutiérrez, E. , Aristizábal, A. , Arroyave, C. et al. (2021) Cartilla 3. Recomendaciones mínimas para la mitigación de cadmio ed. PuntoYAparte. p. 24. Bogotá D.C., Colombia: AGROSAVIA. [Google Scholar[

(11) Bravo, D. , Leon-Moreno, C. , Martínez, C.A. , Varón-Ramírez, V.M. , Araujo-Carrillo, G.A. , Vargas, R. , Quiroga-Mateus, R. , Zamora, A. et al. (2021) The first national survey of cadmium in cacao farm soil in Colombia. Agronomy 11, 1–18. [Google Scholar[

(12) Bravo, D. , Pardo-Díaz, S. , Benavides-Erazo, J. , Rengifo-Estrada, G. , Braissant, O. and Leon-Moreno, C. (2018) Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. J Appl Microbiol 124, 1175–1194. [PubMed] [Google Scholar[

(13) BRENDA . (2021). Available at: https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.1.5&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=&show_tm=0#GENERAL%20INFORMATION. Last accessed 28.09.2021.