تأثير معادن الزئبق والنحاس والنيكل في تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* وقدرة العزلة في إزالة التراكيز العالية للعناصر الثقيلة

أحمد محمد تركي[1]   إدهام علي عبد[2]   علي عدنان عبد[3]

[1]جامعة الأنبار، كلية العلوم، قسم علوم الحياة

[2]جامعة الأنبار، كلية الزراعة، قسم علوم التربة

[3]مديرية تربية الأنبار

الإستلام 2011/7/19   القبول 2012/1/23

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة للتحري عن قدرة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في مقاومة العزلات المنتخبة منها للمعادن الثقيلة (النحاس و الزئبق و النيكل) وتأثيرها في نمو العزلات وتكوين الغشاء الحيوي إضافة إلى قابلية هذه العزلات في إزالة المعادن الثقيلة من البيئة. أظهرت نتائج اختبار المعادن الثقيلة أن عنصر الزئبق كان أكثرها تأثيرا حيث ثبط نمو جميع العزلات المحلية عند تركيز 12.5 ملغم. لتر$^{-1}$ بالمقارنة مع عنصرا النيكل والنحاس اللذين ثبطا نمو جميع العزلات عند تركيز 300 ملغم. لتر$^{-1}$. بينما نجد أن عنصر النيكل أثر بشكل كبير على تكوين الغشاء الحيوي لجميع العزلات حيث نجد أن تكوين الغشاء قد توقف لدى جميع العزلات عند تركيز 200 ملغم. لتر$^{-1}$. فيما نجد أن الغشاء الحيوي قد تكون عند التركيز مابين (0.25 – 10 ملغم. لتر$^{-1}$ تحت تأثير الزئبق وتوقف بشكل نهائي عند التركيز 250 ملغم. لتر$^{-1}$. أما بالنسبة لعنصر النحاس فنجد أن تكوين الغشاء الحيوي قد إستمر وصولا إلى تركيز 250 ملغم. لتر$^{-1}$ وقد توقف تكوينه بشكل نهائي عند التركيز 300 ملغم. لتر$^{-1}$. وتباينت كفاءة العزلات المحلية المستعملة في إزالة معادن النيكل و النحاس من الوسط الزرعي، إذ أزيلت هذه المعادن بكفاءة عالية من تركيز 5 – 250 ملغم. لتر$^{-1}$، بعد ذلك انخفضت الكفاءه في إزالة هذه المعادن مع زيادة تركيز المعدن في الوسط الزرعي، وكانت كفاءة الإزالة لعنصر الزئبق(0.25 – 12.5) ملغم. لتر$^{-1}$.

EFFECT OF HG, CU, NI MINERALS' ON BIOFILM FORMATION FOR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND THE ABILITY TO REMOVAL HIGH CONCENTRATION OF MINERALS

Ahmad M. Turky[1] Idham A. Abed[2] Ali. A. Abed[3]

[1]College of Science, Biology Dept., Alanbar University
[2]College of Agriculture, Soil Dept., Alanbar University
[3]Alanbar husbandry Directorate

Received 19/7/2011 Accepted 23/1/2012

ABSTRACT

The present study is conducted to in restigate the bacteria *Pseudomonas* to the heavy metals. The isolates themselves are submitted to a test to examine their resistance to three types of minerals (cooper, mercury and nickel) and their impact on the growth of the isolates and the formation of biofilms. Besides, the ability of these isolates in the treatment of heavy metals and removing them from the environment. The results of using the heavy materials indicate that mercury is most effective when it is inhabited for the purpose of the growth of local isolates at a concentration 12.5 mg.l^{-1}compared to nickel and copper which inhibit the growth of all isolates at concentration 300 mg.l^{-1}. While it is found that nickel has a vitas effect on the formation of biofilms of all the isolates where one can find that the formation of membrance is stopped to all isolates at concentration 200 mg.l^{-1}. Actually, the biofilms is formed at a concentration between (0.25–10)mg.l^{-1}under the effect of mercury and then it is stopped. At all at concentration 250 mg/l. In relation to the copper one can find that the formation of biofilms is continued until it reaches to the concentration 250 mg.l^{-1} and its formation is stopped at all at concentration 300 mg.l^{-1} The effeciency of the five local isolates is varied in removing the heavy minerals(nickel, copper, mercury) from the cultural media .The results show the ability of these isolates in removing these minerals with a high efficiency of concentration (5–250) mg.l^{-1}after that the efficiency of these isolates is decreased in removing these minerals with the increase of concentration of the mineral in cultural media.

Key Words: Biofilms, Minerals, *Pseudomonas Aeruginosa.*

المقدمة

إن تراكم المعادن وخاصة الثقيلة منها تعد ذات مؤشرات سلبية على البيئة، ولكنها في أغلب الاحيان توجد بتراكيز قليلة، كما أن العديد منها لا يستعمل في العمليات الحيوية الأساسية وإنما تستعمل لأغراض خاصة، وليست كل المعادن الثقيلة مضرة للأحياء إضافة إلى أنه ليست كل المعادن الثقيلة متوفرة في الأنظمة البيئية، ولغرض أن تكون متوفرة في الأنظمة الحيوية دون أحداث أضرار يجب أن تكون متوفرة في البيئة بمستوى نانومول وعند وجود تركيز نانومول واحد للمعدن في بيئة مزارع خلايا بكتيرية تعدادها 10^9 خلية.مل$^{-1}$ فهذا يعني أن الخلية الواحدة يمكن أن تستلم حوالي 600 ايون، وتبعاً لذلك عند وجود تراكيز واطئة لا يشجع الخلايا عامة على تطوير أنظمة حيوية لإزالة سميتها والتخلص منها(1). وقد وجد(2) إن بكتريا *Pseudomonas* مقاومة لعنصر الزئبق وأستعملت لإزالة الزئبق من مياه الصرف الصحي، وقامت بخفض 97% من الزئبق في غضون 10 ساعات من الحضن وبتركيز يصل إلى 0.05 ملغم زئبق/لتر دون خسارة في عدد الخلايا. وهذه التكنولوجيا الحيوية بسيطة وفعالة وقوية لمعالجة مياه الصرف الصحي الملوثة بالزئبق. كما ذكر(3) أن للبكتريا آليات جزيئية لمقاومة المركبات السامة مثل النيكل، ووجد أن النيكل يعزز تشكيل الأغشية الحيوية في البكتريا وتطوير هياكل هذه الأغشية في بكتريا *E. coli*. وتتم عملية نقل النحاس والتخلص منه في *Pseudomonas aeruginosa* عن طريق إستعمال آلية الدفق إلى الخارج وهي صفة بلازميدية وتعمل هذه الآلية في مزارع الطور اللوغارتمي، أما في طور الاستقرار فتميل الخلايا إلى تكوين المعقدات التي توجد في الفسحة المحيطة وتتم عمليات التنظيم لهذه المقاومة بشكل مشترك بين مواقع بلازميدية وكروموسومية، ومقاومة النحاس قد تضفي بعض الصفات المظهرية فخلايا *pseudomonas* عند نموها على وسط يحوي النحاس تصبح زرقاء وذلك لتجمع النحاس كمركبات معقدة في الفسحة المحيطة والأغشية الخارجية للخلايا، إذ يقوم البروتين COPA بالإرتباط مع النحاس وعند الحاجة تقوم بروتينات COPD وCOPC بنقله إلى الداخل(5,4). وهناك الكثير من الكائنات الدقيقة المقاومة للمعادن في المياه والتربة والنفايات الصناعية إذ أن بعض هذه المعادن مثل النحاس والنيكل والزئبق تكون بمثابة مغذيات دقيقة وتُستعمل في عمليات الأكسدة والاختزال ولكن على العموم معظم المعادن تكون غير ضرورية وليس لها قيمة غذائية حادة إلا بمستويات ضئيلة جداً ويحتمل أن تكون سامة للكائنات الدقيقة وهذه المعادن السامة تتفاعل مع المكونات الخلوية الأساسية من خلال الآصرة التساهمية والأيونية عند مستويات مرتفعة من هذه المعادن سواء كانت المعادن أساسية أو غير أساسية. إذ يمكن أن تلحق الضرر في أغشية الخلية أو تغير خصوصية الأنزيم أو تعطل الوظائف الخلوية أو تدمر بنية الحامض النووي ومع هذا فقد تكيفت هذه الكائنات المجهرية مع وجود كل من المعادن والمواد الغذائية غير الأساسية من خلال تطوير مجموعة من آليات المقاومة (6). ولتحديد مستوى المقاومة للمعادن الثقيلة من قبل عزلات *Ps.aeruginosa* فقد أستعملت معادن الزئبق والنحاس والنيكل لدراسة تأثيرها على الخلايا أو الأنظمة الحيوية.

المواد وطرائق العمل

لتحديد تأثير المعادن الثقيلة في نمو وتكوين الغشاء الحيوي بإستعمال خمسة عزلات بكتيرية منتخبه *Pseudomonas aeruginosa* منتجة للغشاء الحيوي (7)، حضرت ثلاثة لهذا الغرض وهي (النحاس و الزئبق والنيكل) وتم إستعمال النحاس على هيئة نترات النحاس المائية $Cu(NO_3)_2 .3H_2O$ والنيكل على هيئة كلوريد النيكل $NiCl_2 .6H_2O$ و الزئبق على هيئة كلوريد الزئبق$HgCl_2$ إذ وحضر محلول stook بتركيز 1000 ملغم/لتر ومن خلاله حضرت سلسلة محاليل بالتراكيز (5 و50 و100 و150 و200 و250 و300 و350 و400 و 450 و500) ملغم نحاس أو نيكل/ لتر والزئبق حضر بتراكيز(0.25 و 2.5 و 5 و7.5 و 10 و 12.5 و 15 و 17.5 و 20 و22.5 و25) ملغم/ لتر. حضر وسط المرق المغذي والاكار المغذي وجُهز بسلسلة محاليل العناصر وبالتراكيز المذكورة حيث أُحتسب حجم الوسط المُستعمل مع حجم محلول التخفيف لتركيز العنصر، ثم عُقمت الأوساط و لُقحت بالعزلات البكتيرية *P.aeruginosa* التي تحمل الأرقام المحلية (6 و49 و69 و 81 و94) كل على حده وحضنت بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة. ثم حُسب عدد الخلايا البكتيرية المتبقية في الوسط بتل من خلال زراعتها في وسط الاكار المغذي وحسب سُمك الغشاء المتكون وأقطار المُستعمرات النامية على الوسط الصلب (7). ولمعرفة قدرة العزلات البكتيرية في إستهلاك العناصر الثقيلة (النحاس والنيكل والزئبق) أُستعمل جهاز الإمتصاص الذري اللهبي لتقدير التراكيز المتبقية من هذه العناصر في الوسط (8).

النتائج والمناقشة

1- تأثير عنصر النحاس في نمو العزلات وتكوين الغشاء الحيوي

أظهرت النتائج إنخفاض أعداد الخلايا البكتيرية مع زيادة تركيز النحاس في الوسط وكما ظهر في جدول (1)، وحققت العزلة *P.aeruginosa49* أفضل نمو بكثافة عددية بلغت 7.182 $Log.cfu.ml^{-1}$. في حين كان أقل نمو للعزلة المحلية *P.aeruginosa6* وبكثافة عددية بلغت 6.66 $Log.cfu.ml^{-1}$ عند وجود تركيز 50 ملغم Cu.لتر$^{-1}$ ومع زيادة تركيز النحاس إنخفض نمو هذه العزلات وبلغت الكثافة العددية عند 500 ملغمCu لتر$^{-1}$ 1.81 $Log.cfu.ml^{-1}$.

جدول(1): تأثير تراكيز النحاس المختلفة على الكثافة العددية للعزلات($Log.cfu.ml^{-1}$)

تركيز Cu ملغمCu.لتر$^{-1}$	الكثافة العددية لنمو العزلات ($Log.cfu.ml^{-1}$) *P. aeruginosa*					معدل
	49	6	81	69	94	
5	11.42	10.30	10.39	10.45	10.42	10.60
50	11.45	11.12	10.31	10.96	10.93	10.95
100	10.39	9.67	10.16	10.22	10.28	10.14
150	10.33	9.20	9.27	9.16	9.20	9.43
200	8.44	7.86	8.44	8.27	7.88	8.18
250	7.40	6.81	7.24	7.01	6.93	7.08
300	5.81	5.64	5.97	5.72	5.63	5.77
350	5.06	4.64	4.87	4.67	4.81	1 4.8
400	3.69	3.51	3.73	3.53	3.72	3.64
450	2.88	2.61	2.64	2.72	2.62	2.69
500	2.03	1.89	1.73	1.73	1.64	1.80
المعدل	7.18	6.66	6.80	6.77	6.73	
LSD0.05	**ISO = 0.040 , CON = 0.059 Iso-con =0.133**					

كذلك أظهرت النتائج الموضحة في جدول (2) إن أقطار المُستعمرات قلت أيضاً مع زيادة تركيز النحاس وتراوح قطر النحاس من 4 ملم عند التراكيز البدائية المنخفضة إلى 1 ملم عند تركيز 500 ملغم/ لتر ويعد هذا نوعاً من مقاومة المُستعمرات لتراكيز النحاس المختلفة. من جانب آخر وجد أن أفضل قطر للمُستعمرات حققته العزلة المحلية *P.aeruginosa6* عند التراكيز (5 و50 و100 و150) ملغمCu .لتر$^{-1}$، إذ كان معدل قطر المُستعمرات لهذه العزلة 2.63 ملم. بينما نجد أن أفضل تركيزيين إستطاعت العزلات البكتيرية خلالهما من تكوين أفضل أقطار للمُستعمرات (5 و 50 ملغمCu . لتر$^{-1}$).

جدول(2): تأثير تراكيز النحاس المختلفة في أقطار المُستعمرات وسُمك الغشاء الحيوي(ملم)

تركيز Cu ملغم \ لتر	أقطار المُستعمرات (ملم)*P. aeruginosa*					المعدل	الغشاء الحيوي (ملم)*P. aeruginosa*					المعدل
	49	6	81	69	94		49	6	81	69	94	
5	2	4	3	3	4	3.2	0.5	0.5	4	2	5	2.4
50	2	4	3	3	4	3.2	3.5	4	3	3.5	4.5	3.7
100	2	4	2	3	4	3	2.5	2.5	5	4	4	3.6
150	2	4	2	3	4	3	4.5	2.5	5.5	5.5	5	4.6
200	2	3	1	2	3	2.2	3	2	5	5	3	3.6
250	2	3	1	2	2	2	0.5	0	0	3	0.5	1.6
300	1	2	1	1	2	1.4	0	0	0	0.5	0	0.1
350	1	2	1	1	1	1.2	0	0	0	0	0	0
400	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
450	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
المعدل	1.54	2.63	1.54	1.90	2.45		1.31	1.04	2.40	2.13	2.0	
LSD0.05	**ISO = 0.349,CON = 0.5186 Iso- con=1.1597**						**ISO = 0.29 ,CON = 0.43 Iso-con= 0.96**					

أما فيما يخص تكون الغشاء الحيوي فقد أثر تركيز النحاس على الأغشية الحيوية المتكونة من قبل العزلات البكتيرية كما موضح في جدول (2) ومع زيادة تركيز النحاس قل سُمك الغشاء وصولاً إلى حد تركيز 300 ملغم. لتر$^{-1}$ الذي اختفى معه تكون الغشاء، وهذا متأتي من أن كثافة الأعداد البكتيرية في جدول (1) عند هذا التركيز لم تصل إلى مستوى النصاب للخلايا، إذ أن جميع العزلات عند التركيز 300 ملغم. لتر$^{-1}$ لم تتجاوز بكثافتهاعن كثافة حجم اللقاح المضاف وأن أفضل سُمك غشاء سجل مع العزلة *P.aeruginosa81* والذي بلغ 2.41 ملم. بينما كان أقل سُمك مسجل مع العزلة المحلية *P.aeruginosa6* والذي بلغ 1.04 ملم. وسجل التركيز 150 ملغم. لتر$^{-1}$ أعلى سُمك غشاء للعزلات بلغ 4.6 ملم. وقد وجد أن علاقات الإرتباط المحسوبة بين سُمك الغشاء ولوغاريتم الكثافة العددية كانت علاقة خطية موجبة حسب المعادلة ($y = 1.148x + 4.785$) بمعامل تحديد $R^2 = 0.561$ وهذا يدلل أن 56.1% من الغشاء المتكون كان بفعل الكثافة الميكروبية المتحققة بتغاير تراكيز النحاس في الوسط وبمعامل ارتباط معنوي ($r=0.748$). ووجد كذلك أن علاقة الإرتباط بين الكثافة العددية وقطر المُستعمرات كانت علاقة خطية موجبة حسب المعادلة ($y = 0.268x + 0.186$) بمعامل تحديد $R^2 = 0.469$ أي أن 46.9% من قطر المُستعمرات المتكون هو بفعل زيادة الكثافة العددية تحت تراكيز النحاس وبمعامل إرتباط ($r = 0.684$).

2- عنصر الزئبق

أظهرت النتائج أن العزلات البكتيرية الُمستعملة قاومت تراكيز الزئبق المختلفة ولحد20ملغم. لتر$^{-1}$، إذ أن الأعداد البكتيرية لم تتأثر بهذا المعدن عند إستعمال التراكيز المنخفضة منه، بل كان النمو لها مرتفع عند التراكيز (0.25 – 10) ملغم. لتر$^{-1}$ وكما موضح في جدول(3) إذ حققت العزلة *P.aeruginosa49* أفضل نمو بكثافة عددية بلغت 6.24 Log.cfu.ml^{-1}، فيما سجل أقل نمو للعزلة *P.aeruginosa6* وبكثافة عددية بلغت 5.47 Log.cfu.ml^{-1}. بينما سجل أفضل نمو لهذه العزلات عند التركيزيين (0.25 و 2.5) ملغم. لتر$^{-1}$، وإنخفضت أقطار المُستعمرات مع زيادة التركيز جدول(2) إذ نجد أن أفضل قطر مُستعمرات تحقق للعزلة ***P.aeruginosa6*** عند التركيزيين (0.25 و2.5) ملغم. لتر$^{-1}$، وأعطت العزلات البكتيرية الأخرى أفضل قطر للمُستعمرات مع التركيزيين(0.25 و 2.5) ملغم. لتر$^{-1}$ والذي بلغ 3.2 ملم. وتكون أفضل غشاء حيوي للعزلة***P.aeruginosa94*** وبسُمك بلغ 1.81 ملم، بينما سجل أقل سُمك للغشاء مع العزلة *P.aeruginosa6* والذي بلغ 1.13 ملم. ولم تكون جميع العزلات أي غشاء حيوي عند التراكيز بين (12.5–25) ملغم. لتر$^{-1}$. بينت علاقات الإرتباط المحسوبة بين سُمك الغشاء المتكون ولوغاريتم الكثافة العددية أنها علاقة خطية موجبة ($y = 1.81x + 3.39$) بمعامل تحديد $R^2 = 0.638$ وهذا يدل أن 63.8 % من الغشاء المتكون كان بفعل الكثافة الميكروبية المتحققة بتغاير تراكيز الزئبق في الوسط وبمعامل إرتباط معنوي ($r = 0.798$). وأظهرت العلاقة المحتسبة بين قطر المُستعمرات وسُمك الغشاء المتكون أنها علاقة خطية موجبة ($y = 1.107x – 0.381$) وبمعامل تحديد قدره $R^2 = 0.579$ ومعامل ارتباط معنوي ($r = 0.760$). وهذا يؤكد أن قطر المُستعمرات هو العامل المؤثر في زيادة سُمك الغشاء المتكون.

وهذا ما أكدته العلاقة المحتسبة بين الكثافة وقطر المُستعمرات حسب المعادلة ($y = 0.255x + 0.089$) بمعامل تحديد$R^2 = 0.713$ أي 71.3% من قطر المُستعمرات المتكون كان بفعل زيادة الكثافة العددية تحت تراكيز الزئبق وبمعامل إرتباط معنوي ($r = 0.844$).

جدول(3): تأثير تراكيز الزئبق المختلفة على الكثافة العددية للعزلات($Log.cfu.ml^{-1}$)

معدل	الكثافة العددية لنمو العزلات ($Log.cfu.ml^{-1}$) *P. aeruginosa*					تركيز Hg ملغم\لتر
	94	*69*	*81*	*6*	*49*	
11.17	11.01	11.11	11.22	11.07	11.45	0.25
10.59	10.33	10.40	10.42	10.40	11.38	2.5
10.28	10.16	10.26	10.32	10.26	10.37	5.0
9.28	9.21	9.21	9.34	9.22	9.40	7.5
8.00	7.92	7.82	8.45	7.55	8.28	10.0
6.02	5.99	5.94	6.12	5.81	6.22	12.5
4.58	4.62	4.74	4.61	3.78	5.15	15.5
3.48	3.73	3.58	3.88	2.07	4.15	17.5
1.71	2.08	2.15	2.08	0	2.22	20.0
0	0	0	0	0	0	22.5
0	0	0	0	0	0	25.0
	5.91	5.93	6.04	5.47	6.24	المعدل
ISO = 0.024 , CON = 0.036 Iso- con =0.080						**LSD0**.05

جدول (4): تأثير تراكيز الزئبق المختلفة في أقطار المُستعمرات وسُمك الغشاء الحيوي (ملم)

المعدل	الغشاء الحيوي (ملم)*P. aeruginosa*					المعدل	أقطار المُستعمرات (ملم)*P. aeruginosa*					تركيز Hg ملغم \ لتر
	94	*69*	*81*	*6*	49		*94*	*69*	*81*	*6*	49	
3.7	5	3	2	4	4.5	3.2	3	3	3	4	3	0.25
3.4	5	2	2	3.5	4.5	3.2	3	3	3	4	3	2.5
3.5	4	2	4.5	3	4	2.2	2	2	2	2	3	5.0
2.4	3	2	3	1	3	2.2	2	2	2	2	3	7.5
2.3	3	4	2.5	1	1	2	2	2	2	2	2	10.0
0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	12.5
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	15.5
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	17.5
0	0	0	0	0	0	0.8	1	1	1	0	1	20.0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.5
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25.0
	1.81	1.18	1.27	1.13	1.54		1.54	1.54	1.54	1.63	1.72	المعدل
ISO = 0.269 , CON = 0.399 ,Iso=0.89						**ISO = 0.317, CON = 0.470, Iso-con1**.052						LSD0.05

عنصر النيكل

أظهرت النتائج في جدول(5) أن أعداد الخلايا للعزلات إنخفض مع زيادة تركيز النيكل. وأتضح أن أفضل نمو حققته العزلة *P.aeruginosa69* بكثافة عددية بلغت 7.00 $Log.cfu.ml^{-1}$. وسُجل أقل نمو للعزلة المحلية*P.aeruginosa49* بكثافة عددية بلغت 6.76 $Log.cfu.ml^{-1}$

جدول(5): تأثير تراكيز النيكل المختلفة على الكثافة العددية للعزلات ($Log.cfu.ml^{-1}$)

معدل	الكثافة العددية لنمو العزلات($Log.cfu.ml^{-1}$) *P. aeruginosa*					تركيز Ni ملغم\ لتر
	94	*69*	*81*	*6*	*49*	
10.57	10.40	10.45	10.42	11.13	10.45	5
10.35	10.31	10.33	10.29	10.45	10.37	50
10.18	10.22	10.12	10.01	10.37	10.20	100
9.019	9.13	9.07	8.90	8.920	9.06	150
8.22	8.227	8.45	7.73	8.26	8.42	200
7.05	7.121	7.23	6.88	7.05	6.92	250
5.93	6.19	6.13	5.98	5.80	5.57	300
4.97	5.29	5.08	4.96	4.73	4.81	350
4.10	4.16	4.40	4.22	3.76	3.96	400
3.10	2.98	3.33	3.33	3.13	2.71	450
2.09	2.12	2.45	2.21	1.87	1.78	500
	6.92	7.00	6.81	6.86	6.76	المعدل
ISO = 0.027 , CON = 0.040 Isi-con=0.089						LSD0.05

جدول(6):تأثير تراكيز النيكل المختلفة في أقطار المُستعمرات وسُمك الغشاء الحيوي(ملم)

المعدل	الغشـاء الحيـوي (ملـم) *P. aeruginosa*					المعدل	أقطار المُستعمرات (ملم) *P. aeruginosa*					تركيز Ni ملغم \ لتر
	94	*69*	*81*	*6*	49		*94*	*69*	*81*	*6*	*49*	
3.1	2	4	4	3.5	2	3.4	4	3	3	3	4	5
2.6	2	3.5	3.5	2	2	3.4	4	3	3	3	4	50
1.5	1	2	1.5	2	1	2.8	4	2	3	2	3	100
0.5	0	1	1	0	0.5	2.8	4	2	3	2	3	150
0	0	0	0	0	0	2	3	1	2	2	2	200
0	0	0	0	0	0	2	3	1	2	2	2	250
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	300
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	350
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	400
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	450
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	500
	0.45	0.95	0.91	0.68	0.5		2.45	1.54	1.91	1.72	2.09	**المعدل**
ISO= 0.208 , CON = 0.30 ISO –CON=0.69						**ISO= 0.313, CON = 0.464** ISO-CON=1.04						LSD0.05

كذلك لوحظ أن لزيادة تركيز النيكل في الوسط أثر على أقطار المُستعمرات إذ بزيادة التركيز قل قطر المُستعمرات جدول(5) وحققت العزلة *P. aeruginosa94* أعلى قطر بلغ 2.45 ملم. بينما أعطت العزلة *P.aeruginosa69* أقل قطر مُستعمرات بلغ 1.54 ملم. وقد وُجد أن التركيزين (5 و 50) ملغم.لتر$^{-1}$ هما الأفضل في تكوين أقطار المُستعمرات والذي بلغ معدله 3.4 ملم للعزلات المستعملة. وأظهر جدول (6) تأثير تركيز النيكل في تكوين الغشاء الحيوي إذ استمر تكوين العزلات المستعملة للغشاء الحيوي مع التراكيز (5 و50 و100) ملغم.لتر$^{-1}$ وبمعدل تراوح بين 3.1 و0.5 ملم، و لم تستطع جميع العزلات من تكوين الغشاء عند التركيز (200 – 500) ملغم.لتر$^{-1}$، وظهر أن أفضل سُمك غشاء كونته العزلة *P.aeruginosa69* وبلغ 0.95 ملم، بينما سُجل أقل سُمك للعزلة *Ps. aeruginosa94* إذ بلغ 0.45 ملم. في حين نجد أن التركيز 5 ملغم.لتر$^{-1}$ كان هو الأفضل لتكوين الغشاء الحيوي من قبل العزلات المستعملة، إذ بلغ معدل سُمك الغشاء عنده 3.1 ملم. وأظهرت علاقة الإرتباط المحسوبة بين سُمك الغشاء والكثافة الميكروبية أنها علاقة خطية موجبة $y = 1.60x$ (5.75 +) بمعامل تحديد $R^2 = 0.458$ أي أن 45.8 % من الغشاء المتكون بفعل الكثافة الميكروبية النامية تحت تراكيز النيكل وبمعامل ارتباط معنوي ($r= 0.67$). كما وجد أن علاقة الإرتباط المحتسبة بين سُمك الغشاء وقطر المُستعمرات كانت خطية موجبة ($y = 0.63x – 0.53$) وبمعامل تحديد $R^2 = 0.377$ أي أن 37.7% من سُمك الغشاء بفعل أقطار المُستعمرات تحت تراكيز النيكل المختلفة في الوسط وبمعامل إرتباط ($r = 0.614$).

وهذا ما أكدته العلاقة المحسوبة بين قطر المُستعمرات والكثافة الميكروبية تحت تراكيز النيكل المختلفة والتي كانت خطية موجبة ($y=0.307x–0.165$) وبمعامل تحديد $R^2 =0.561$ وهذا يعني أن 56.1 % من قطر المُستعمرات تكون بفعل الكثافة العددية المتحققة وبمعامل ارتباط معنوي ($r = 0.748$). من خلال ما تبين نجد أن معادن النحاس و الزئبق و النيكل قد أثرت في نمو أعداد الخلايا البكتيرية وعلى أقطار المُستعمرات، إذ حصل بزيادة تركيز هذه المعادن انخفاض في قطر المُستعمرات وهذا ناتج من مقاومة هذه البكتريا للمعادن وحماية نفسها من التراكيز العالية. بينما أظهرت النتائج تأثير هذه المعادن على الغشاء الحيوي المتكون ، إذ كلما زاد التركيز تكون الغشاء الحيوي معه إلى حد معين، فخلايا *P.aeruginosa* المقاومة للنحاس عند نموها على وسط يحتوي هذا المعدن تصبح زرقاء اللون وذلك لتجمع النحاس كمركبات معقدة في الفسحة المحيطة والأغشية الخارجية للخلايا. أما عنصر الزئبق فقد ينقل للتخلص من سميته بعملية الاختزال ثم نقله إلى داخل الخلايا حتى لا يسمم البروتينات في الفسحة المحيطة (1)، وتتوافق النتائج مع ما وجده (9) من أن بكتريا *P.aeruginosa* لها الإمكانية لمقاومة النحاس والنيكل وإزالته ولحد 137.6 ملغم.لتر$^{-1}$ و 250 ملغم.لتر$^{-1}$. كذلك أكد(10) على المعادن الثقيلة ومنها النحاس والآثار الناجمة عنها في الغشاء الحيوي في بكتريا *P.aeruginosa* و أثبت أن الأغشية الحيوية لها إمكانية مقاومة الإجهاد للمعادن الثقيلة لحد 600 ضعف مما هو عليه في الخلايا الأخرى. كما تتفق النتائج مع ما وجده (11) من أن بكتريا *P.aeruginosa* لها القابلية على مقاومة النحاس لحد 470 ملغم.لتر$^{-1}$. وذكر(12) أن زيادة مستويات النحاس سامة لذلك يجب ضمان وجود البكتريا بحدود كافية لإستعمال النحاس ولمنع خلاياها من التسمم.

كما أن بكتريا *P.aeruginosa* المكونة للأغشية الحيوية لها القابلية على إستهلاك المعادن الثقيلة وتمثيلها في تراكيز معينة ويمكن إستعمال هذه البكتريا في معالجة البيئة والتخلص من تركيز هذه المعادن في البيئة سواء في المياه أو التربة وبالأخص في المياه لمعالجتها من تأثير المعادن وبالأخص عنصر الزئبق إذ تُستعمل بكتريا *P.aeruginosa* لإزالة الزئبق من مياه الصرف الصحي (2 ,14,13).

تأثير بعض المعادن في استهلاك العزلات المحلية

بينت النتائج المبينة في جدول(7) تباين في تركيز النحاس المزال بالعزلات وأن العزلة *P.aeruginosa49* أزالت نسبة عالية من النحاس عند التراكيز (5 و50 و100) ملغم.لتر$^{-1}$، ولكن عند التراكيز (150 – 350) ملغم.لتر$^{-1}$ كانت كمية المزال أقل من المتبقي، في حين عند التراكيز (350 و 400 و 450) ملغم.لتر$^{-1}$ تساوت كمية المزال والمتبقي من العنصر في الوسط، ولكن مع تركيز 500 ملغم.لتر$^{-1}$ كانت كمية المزال أقل من كمية المتبقي، ونجد أن العزلة *P. aeruginosa6* أزالت أكثر من المتبقي وبنسبة أعلى مما كانت عليه عند العزلة *P .aeruginosa49* ولحد تركيز 150 ملغم/ لتر وكانت عند التركيز (200– 500) ملغم.لتر$^{-1}$ كمية المُزال أقل من المتبقي. ظهر أن العزلة 81 *P. aeruginosa81* إتخذت نفس منحى العزلة *P.aeruginosa6* من حيث كمية المزال من النحاس.

بينما نجد أن العزلة *P.aeruginosa69* قد أزالت كمية من النحاس أكثر مما أزالته العزلات الثلاثة (49 و6 و81)، إذ لوحظ أن كمية النحاس المزال مع تركيز 200 ملغم.لتر$^{-1}$ كانت أكثر من المتبقي. أما عند التراكيز (250 – 500) ملغم.لتر$^{-1}$ كانت كمية المزال أقل من المتبقي. في حين وجد أن العزلة *P.aeruginosa94* إستطاعت إزالة كمية أكبر من النحاس مما أزالته العزلات (49 و6 و81 و69) ولحد 300 ملغم.لتر$^{-1}$ وبعدها بدأت كمية النحاس المزال تنخفض عن المتبقي.

جدول رقم (7): المزال من عنصر النحاس والنيكل تحت تأثير عزلات *P. aeruginosa*

Ni%					Cu%					تركيز Cu ملغم/لتر
94	69	81	6	49	94	69	81	6	49	
4.04	3.98	3.04	4.1	3.89	4.43	4.29	3.99	4.78	4.15	**5**
40.4	37.4	28.1	93	30	43.3	46.3	33.3	42.94	38.4	**50**
73	72	71.5	65	52	89	91	71	75.1	63.97	**100**
65	104	103.4	82	56.6	119	138	124	84.3	55.38	**150**
88	132	64	79	72	131	138	62	92	63	**200**
118	96	88	78	81	166	106	184.4	80	75	**250**
132	99	99	90	90	178	120	140	108	104	**300**
167	127	132	120	114	147	156	165.5	149	171	**350**
172	156	139	130	154	197	183	217	185	199	**400**
210	182	153	209	174	226	224	215	210	228	**450**
268	215	179	242	246	237	233	206	221	299	**500**

عنصر النيكل

يُبين جدول (7) تباين العزلات في إزالة عنصر النيكل وتميزت العزلتين *P.aeruginosa49* و *P.aeruginosa94* بإزالة النيكل بكمية أكبر من المتبقي في الوسط ولحد تركيز 100 ملغم.لتر $^{-1}$ ، أما عند التراكيز (150– 500) ملغم.لتر $^{-1}$ فقد كانت الكمية المزالة أقل من المتبقية، وكانت العزلتان *P.aeruginosa6* و *P.aeruginosa81* لهما القدرة على إزالة النيكل لحد تركيز 150 ملغم/لتر وبكفاءة عالية و قلت كفاءتهما في إستهلاك النيكل عند زيادة التركيز من 200 الى500 ملغم.لتر $^{-1}$. في حين كانت كفاءة العزلة *P.aeruginosa69* في إزالة النيكل لحد تركيز 200 ملغم.لتر $^{-1}$ بمستوى أعلى مما كان في العزلات الأخرى، أما عند تراكيز النيكل بين (250 – 500) ملغم.لتر $^{-1}$ فقد بدأت العزلة تفقد قدرتها على إزالة هذا المعدن.

عنصر الزئبق

بين جدول(8) أن العزلة *P.aeruginosa49* إستطاعت إزالة عنصر الزئبق بكمية كبيرة ولحد تركيز 7.5 ملغم.لتر $^{-1}$ إذ كانت كمية المزال منه أكثر من المتبقي، ثم تباينت في مدى إزالتها لهذا العنصر مع زيادة تركيزه في الوسط.

جدول(8) :المزال من عنصر الزئبق تحت تأثير عزلات *P. aeruginosa* (%)

تركيز Hg ملغم/لتر	Hg %				
	49	6	81	69	94
0.25	0.17	0.224	0.191	0.20	0.19
2.5	1.65	1.4	2.2	2.15	2.13
5.0	2.65	1.65	2.25	4.2	4.2
7.5	5.45	2.85	2.9	3.85	3.35
10.0	3.45	4.6	4.4	3.95	4.2
12.5	6.35	6.05	4.85	4.6	4.9
15.0	5.8	4.6	4.6	5.7	5.8
17.5	9.55	8.55	8.9	9.55	8.3
20.0	10.4	9.4	7.3	8.15	9.35
22.5	12.05	11.08	7.95	8.9	9.6
25.0	11.4	11.3	8.8	8.35	9.1

بينما كانت نسبة الإزالة العزلة *P.aeruginosa6* للزئبق لحد تركيز 2.5 ملغم.لتر $^{-1}$ أما بقية التراكيز ولحد 25 ملغم/لتر كانت نسبة المزال من الزئبق أقل من المتبقي. في حين أظهرت العزلتان *P.aeruginosa81* و*P.aeruginosa94* أمكانية أكبر في إزالة الزئبق وإلى حد تركيز 5 ملغم.لتر $^{-1}$ فيما نجد أنه عند التراكيز بين(7.5 – 25) ملغم.لتر $^{-1}$ كانت نسبة المزال أقل من المتبقي. بينما كانت العزلة *P.aeruginosa69* ذات قدرة أعلى من بقية العزلات إذ استطاعت إزالة العنصر بكمية أكبر من باقي العزلات ولحد تركيز 7.5 ملغم.لتر $^{-1}$ وبعد ذلك تأثرت بالتراكيز (10– 25) ملغم.لتر $^{-1}$ كما في العزلات الأخرى.

من خلال هذه النتائج نجد أن العزلات المستعملة قاومت تراكيز المعادن الثقيلة وإزالة نسب كبيرة منها على الرغم من وجودها بتراكيز عالية، وهذا يعود لامتلاك هذه العزلات آليات متنوعة لإزالة المعادن ومنها إستعمالها آلية عزل هذه المعادن وجعلها عديمة السمية. أما عند وجود هذه المعادن في الوسط الغذائي فأن البكتريا تكون ملزمة بالتخلص منها رغم أنها تكون سامة لها. وان بكتريا *P.aeruginosa* يمكن أن تحتوي على آليات مقاومة كثيرة(15)، و ذكر (10) أن وجود المعادن الثقيلة بكميات كبيرة تفوق طاقة الخلية البكتيرية للتخلص منها خاصة عند دخولها ضمن مكونات الوسط الغذائي عند ذلك تصبح البكتريا ملزمة على مقاومة أو إزالة هذا المعدن، وتعمل على تكوين آليات مقاومة مختلفة وتمتلك بكتريا *P.aeruginosa* أحد عشر حاجزاً دفاعياً لمقاومة المعادن بحيث لا تستطيع المعادن أن تدخل الخلايا إلا بعد اختراقها إلى هذه الحواجز.

ويمكن أن تربط المعادن بالأغشية الحيوية التي تكون مشحونة بشحنة سالبة، وبذلك تعمل على تقييد هذه المعادن وتمنعها من دخول الخلية (16)، وممكن أن تنتج البكتريا أنواع من البروتينات تعمل على الإرتباط مع المعادن (17) ويعتبر هذا العمل خط دفاعي أول لتخليص البكتريا من المعادن الثقيلة، ولكن مع وجود المعادن بتراكيز عالية لا تستطيع البكتريا التخلص منها بالطرائق الخارجية إذ تدخل هذه المعادن إلى داخل الخلية ويكون هذا الدخول إجبارياً بالنسبة للبكتريا، وتفرز البكتريا نوعين من المركبات البروتينية الداخلية (الكلوتوثايون و ميثالوثايون) تحتوي على أحماض أمينيه كبريتية تمسك بالعناصر الثقيلة وتراكمها داخل الخلية من خلال عمل معقدات معها وبالتالي تتخلص من التأثيرات السمية لها و تعمل الخلايا البكتريا على طرحها خلال العمليات الأيضية. ومع وجود المعادن في الوسط بكمية تفوق طاقة البكتريا عندها تظهر التأثيرات السمية على البكتريا (18). كما وجد (19) أن للكتلة الحيوية دور مهم في إزالة تأثير المعادن الثقيلة من خلال الأمتزاز الحيوي لهذه المعادن على سطوح الكتلة الحيوية للبكتريا والذي وجد أن إستعمال (4– 6.1) ملغم.لتر$^{-1}$ من الكتلة الحيوية يمكن أن تزيل 1 غم أو أكثر من عنصر النيكل. وتسبب المعادن إعاقة النمو بشكل يتناسب مع زيادة تركيز المعدن أي كلما زاد تركيز المعدن كلما قل النمو(20) ولاحظ أن بكتريا *P.aeruginosa* لها أمكانية على إمتصاص النيكل والنحاس بكميات كبيرة أكثر من المعادن الأخرى التي تمتص بواسطة هذه البكتريا.

المصادر

1- الخفاجي، زهرة محمود (2008). التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزئية)، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، بغداد.

2- Irene, W.; D. H. V. Castein.; Y. L.; Kenneth, N. Timmis and W. D. Kwer (2000). Removeval of mercury from chemical waste water by microorganisms in technical scale. *Environ. Sci . Technol.*, 34 (21): 4628 – 4634.

3- Claire, P.; R, B.; G. Jubelin.; P. Lejeune.; M. Berthelot.; A. Rodigue and C. Dorel (2009). Nickel promotes Biofilm formation by *Escherichia coli* K–12 strains that produce curli – *Applied and Environmenral Microbiology*,75(6): 1723 – 1733.

4- Olivier, C.; C. Rossier and K. Perron (2007). A copper–Activated Tow– component system Interacts with zinc and lmipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*,189(13): 4561- 4568.

5- Claudio, A. N.; L. H. Orellana.; C. Mauriaca and C. A. Jerez (2009). Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Genes Related to survival in the presence of copper. *Applied and Environ. Micro*.,75(19): 6102 – 6109.

6- Mark, R. B.; S. Kapil and F. W. Ochme (1999). Microbial resistance to metals in the Environmemtal . *J. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3): 198- 207.

7- العيثاوي، علي عدنان عبد منديل (2010) العوامل المؤثرة في قدرة عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من مصادر بيئية مختلفة في تكوين الغشاء الحيوي. رسالة ماجستير، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الانبار.

8- Philips (1988) Scientific Books, Atomic Absorbtion Data Book, 5th Ed. England.

9- Sar, P.; S. K. Kazy, R.; K. Asthana, and S.P. Sing. (1999). Metal adsorption and desorption by Lyophilized *Pseudomonas aeruginosa*. *J. International Bioderterioration and Biodegradation*, 44(2-3): 101 -110.

10- Gail, M. T. and M. R. Parsek (2002). Heavy metal Resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and green microbiology*, 69(4): 2313 – 2320.

11- Muayad, M. A., H. A. Saeed, K. A.Tarawenh, K. M. K. and Tarawenh (2009) Copper uptake by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected burn patients. 59 (3): 282 – 287.

12- Jonathan, B.; S. Sitthisak; M. Sengupta; M. Johnson.; R.K.Jayaswal and J. A. Morrissey.(2010).Copper stress induces a Global stress Response in *Staphylococcus aureus* and Represses sae and agr Expression and biofilm formation Applied and Environmental Microbiology. 76(1): 150 – 160.

13- Harald V. C.; S. Kelly.; Y. Li and W. D. Irene (2002). Species diversity improves the efficiency of mercury–reducing biofilm under changing Environmemtal conditions. APPL. *Environ Microbiol*. 68 (6): 2829 – 2837.

14- Wagner-Dobler, I.; H. Lunsdorf,; T.Lubbehusen; H. F. Canstein and Y. Li (2000). Structure and species composition of mercury – reducing biofilms Applied and Environ. Micro., 66(10): 4559 – 4563.

15- Outten, F.W.; C. E. Outten and T. Ohalloran (2000). *Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance*, 145 – 157.

16- Templeton, A. S.; T. P. Trainor; S. J. Traina.; A. M. Spormann and G. E. Brown. (2001). Pb (II) Distributions at biofilm– metal oxide interfaces. Proc. Natl. Acad. SCI . USA(98): 11897 – 11901.

17- Barkay, T. and R. Turner(1992). Biological removal of Hg (II) from A contaminated Fresh – Water Pond. Abstr. pap. Am. chem. SOC. 203, 166.

18- Geoffrey, M. Gadd (2001). Microbial metal Transformation. *J. Microbiology*, 39(2): 83 -88.

19- Carlos, E. R.; A. Quesada and E. Rodriguez. (2006). Nickel biosorption by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from industrial waste water. *J . Microbiology*, 37(4): 1590 –1600.
20- Hassen .; N. Saidi.; M. Cherif .A. and Boudabous (1998). Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Bioresource Technology*. 65(1-2): 73- 82.