دراسة المقدرة على تكوين الأغشية الحيوية المقاومة للمعادن الثقيلة في بعض السلالات البكتيرية في المملكة العربية السعودية

زينة محمد ابراهيم المرحبي

المستخلص

اشراف
د. علا إبراهيم محمود الهمشري
د. رانية مروان مكي

توجد المعادن الثقيلة في الطبيعة ، ويؤدي التراكم المفرط للمعادن الثقيلة الى حدوث تأثيرات على البشر والحيوانات. يمكن لسمية المعادن الثقيلة أن تخفض مستويات الطاقة وتضر بعمل الدماغ والرئتين والكلى وتكوين الدم والأعضاء الهامة الاخرى والتي تعتبر سامة للكائنات الحية في تركيزات معينة .وقد وجد أن بعض المرضى يعانون من الفشل الكلوي نتيجة لتلوث مياه الشرب بعنصر الكادميوم والرصاص. وقد وجد ان استخدام الأغشية الحيوية التي تنتجها الميكروبات مناسبة لمعالجة الملوثات بسبب الكتلة الحيوية الميكروبية العالية.

هدفت الدراسة إلى عزل و دراسة مقدرة السلالات البكتيرية على إنتاج الأغشية الحيوية التي يمكن استخدامها لإزالة السموم من بعض المعادن الثقيلة. في هذه الدراسة تم عزل العزلات عن عينات تربة من أماكن مختلفة في المملكة العربية السعودية (مكة ، الطائف و جدة). تم اختبار خمسين عزلة لتشكيل الأغشية الحيوية بطريقتين : على طبق الاجار يحتوي على صبغة الكونغو الحمراء و Tissue Culture Plate . أوضحت النتائج أن ٣ من ٥٠ عزلة أظهرت القدرة على تكوين أغشية حيوية عالية. تم اختيار ثلاث سلالات بكتيرية باعتبارها الأكثر تشكيل للغشاء الحيوي واختبار قدرتها على مقاومة (الكادميوم والرصاص). تم بشكل أولي اختبار المقاومة على طبق أجار المغذي يحتوي على على تركيزppm ٧ من (الكادميوم والرصاص). أشارت النتائج إلى أن العزلات الثلاث (A2، ST و PS) كانت مقاومة.تم استزراع جميع العينات المعزولة على وسط أجار تحتوي على تركيزات مختلفة من المعادن الثقيلة (الكادميوم والرصاص) تتراوح من(ppm ٧-٥٠٠) تم دراسة أقصى تركيز تستطيع البكتيريا النمو فيه على طبق اجار مغذي بتركيزات مختلفة 300ppm, 250 ,200, 150, 120, 100,0 5 20, 10, 7) من الكادميوم وعلى
(7,20,50,100,150 ,200,250, 300, 350,400,450,500,550) الرصاص على التوالي. أشارت النتائج إلى أن قيم MTC Pb (No3) 2 كانت تصل إلى(٥٠٠ , ٤٥٠ , ٣٥٠) لعزلات ST,PS و A2 على التوالي. بينما في الكادميوم (٢٥٠ , ١٥٠ , ١٢٠) لعزلات ST,PS و A2 على التوالي. تمت دراسة تأثير الكادميوم والرصاص على النمو البكتيري للعزلات ST، A2 و PS باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند ٦٠٠ nm. أوضحت النتائج أن جميع العزلات الثلاث (A2، ST و PS) انخفاض في النمو مع زيادة التركيزات. تم تعريف العزلات باستخدام الاختبارات الكيميائية الحيوية ووراثيا باستخدام تقنية البلمرة المتسلسل باستخدام بادئ ١٦الرنا الريباسي ومقارنة نتائج تسلسل الجينات مع بنك الجينات السلالات عرفت على أنها:

Bacillus cereus A2 , *B. cereus* ST و *Pseudomonas aeruginosa* PS.

بالإضافة إلى اختبار فقد البلازميدات باستخدام طريقة درجة الحرارة العالية. وأظهرت النتائج أن كل المستعمرات الناتجة من السلالتين *P. aeruginos* و *B. cereus* A2 بعد التعرض لدرجة الحرارة العالية كانت مقامة لتركيز ppm٧ لكلا من الكاديم والرصاص بينما أظهرت السلالة *B. cereus* ST فقد المقاومة بالنسبة للكادميوم أما بالنسبة للرصاص أظهرت السلالة درجات مختلفة من المقاومة.وقد تم اختبار *B. cereus* ST على إزالة المعادن الثقيلة باستخدام جهاز الحث الكهربي الحراري المزدوج للبلازما بإستخدام الإنبعات الطيفيICP-OES . أثبتت النتائج أن لديها القدرة على إزالة الرصاص بنسبة تصل إلى ٩٣٪ بينما في الكادميوم إلى ٤٩٪. تم تحديد أنماط حساسية مضادات الميكروبات للبكتيريا وأظهرت جميع السلالات المعرفة وراثيا مقاومة ضد ثلاث أو أكثر من الحيوية.

تم عزل السلالات من عينات التربة والتي اثبتت قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية الذي يعتبر عاملا مهما لمقاومة المعادن الثقيلة. يمثل الغشاء الحيوي تقنية حيوية متجددة وواعدة وفعالة من حيث التكلفة وسهلة لمعالجة الملوثات الواسعة النطاق ليس في القطاع الصناعي فحسب بل أيضا في المياه المستعملة المنزلية والزراعية.

Study of biofilm formation and heavy metal resistance of some bacterial strains in Saudi Arabia

Zainah Mohammed Ibrahem Almarhabi
Supervised By
Dr. Ola Ibrahim El-Hamshary
Associated prof. of Molecular Genetics
Dr. Rania Marwan Makki
Assistant Prof. of Genomic and Biotechnology

ABSTRCT

Heavy metals found in nature and the excessive accumulations of heavy metals have an impact on humans and animals. Heavy metal toxicity can lower energy levels and damage the functioning of the brain, lungs, kidney and other essential organs. Cadmium and lead considered being toxic to organisms in a particular concentration. Patients with renal failure mainily due to drink contamination water with cadmium and lead. Biofilm has produced by microbes and have been found to be suitable for the remediation of pollutants. This study aimed to isolate and investigate the ability of bacterial isolates to produce a biofilm that can resist heavy metals (cadmium chloride ($CdCl_2$) and lead nitrate Pb $(NO_3)_2$. Bacterial isolates were obtained from soil sample located at different areas from Saudi Arabia (Makkah, Taif and Jeddah). Fifty isolates have been tested for formation of biofilm by two methods. First method using Congo Red Agar (CRA) and Second using Tissue Culture Plate (TCP) method .Results revealed that 3 out of 50 isolates showed high biofilm formation. The three isolates (A2, ST and PS) that form strong biofilm were screened primary on nutrient agar plate contain 7ppm concentration of $CdCl_2$ and Pb $(NO_3)_2$. Results indicated that all three (A2, ST and PS) isolates were resistance. The maximum tolerance concentration (MTC) of three isolates (A2, ST and PS) studied on nutrient agar plate supplemented with different concentrations ranged from (7, 10, 20, 50, 100, 120, 150, 200, 250 and 300 ppm) and (7, 20, 50,100, 150,200, 250,300,350,400,450,500 and 550) for $CdCl_2$ and Pb $(NO_3)_2$ respectively. Results indicated that MTC values of Pb $(NO_3)_2$ were up to (450, 350 and 500 ppm) for ST, A2 and PS isolates respectively. While in $CdCl_2$ the MTC were 150, 120 and 250 ppm) for ST, A2 and PS isolates respectively. The three isolates were studied the effect of $CdCl_2$ and Pb $(NO_3)_2$ on bacterial growth using spectrophotometer. Results indicated that all three isolates (A2, ST and PS) growth decreased with the increase in concentration of Pb $(NO_3)_2$ and $CdCl_2$. These isolates (A2, ST and PS) were identified by biochemical and 16S rRNA gene. The results indicated that isolates identified as *B. cereus* A2, *B. cereus* ST and *P.aeruginosa* PS. Plasmid curing was studied using elevated temperature method, results showed that all cured *B. cereus* A2 and *P. aeruginosa* PS colonies were resistance to 7ppm of $CdCl_2$ and Pb $(NO_3)_2$ while *B. cereus* ST showed different pattern of resistance after curing. *B. cereus* ST selected for test removal Pb $(NO_3)_2$ and $CdCl_2$ using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). Using ICP-OES showed removal lead up to 93% while in cadmium to 49 %. Antimicrobial susceptibilities patterns of identified bacteria were determined. All tested isolated strains showed resistance against to 3 or more antibiotics. In consolation *B. cereus* A2*, B. cereus* ST and *P. aeruginosa* PS strains were isolated from soil samples showed highest biofilm formation which considered important factor for heavy metals resistance. The biofilm

represent a very renewable, promising, cost-effective and easy biotechnology for treatment of wide range contaminated effluents.