Use of (*Saccharomyces cerevisiae*) Mutant in Bioremediation of Some Heavy Metals

2nd Conference on Environment and Sustainable Development 28-29-Oct-2015

Adil T. Al-Musawi
Market Research and Consumer Protection Center, University of Baghdad, Baghdad, Iraq
Email: adilalmusawi80@gmail.com
Mohammed O. Muhyaddin
Food Science and Biotechnology, College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq
Mohammed A. Al-Soufi
Market Research and Consumer Protection Center, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Abstract
The study aimed to use of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in Bioremediation of some heavy metals and improving its capability by mutation. The dried baker's yeast from Aldnaamaya China Company used in this study. The yeast subjected to serial diagnostic tests to ensure its belongings to *S. cerevisiae*. To improve the ability of the yeast to remove the metals, it was mutated by Nitrosoguanidine, and among different mutants, it was found that three of them designated as Sc_{6-1}, Sc_{6-2} and Sc_{6-3}, were more resistant to the antifungal cycloheximide in a concentration of 5 and 10 µg/ ml. These mutants were selected to study their efficiency to remove metals under the specific circumstances of attachment 10 minutes, pH 6, temperature 25°C, the stirring speed 150 rpm/ min, by using an inoculums size 1×10^6 cells/ ml in a solution containing 1mg/L of from each metal. it was found that the mutant Sc_{6-2} has gain an excellent efficiency to remove of chromium, nickel, cobalt, cadmium, lead, iron and copper in combined at a rate 72.23%, while the removal efficiency of these elements by the other mutants Sc_{6-1} and Sc_{6-3} were 64.67% and 65.37% respectively.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Baker's yeast, Heavy metals, Nitrosoguanidine, cycloheximide, Bioremediation

استعمال خميرة (Saccharomyces *cerevisiae*) المطفرة في المعالجة الحيوية لبعض المعادن الثقيلة

الخلاصة
استهدفت هذه الدراسة إمكانية استعمال خميرة الخبز (*Saccharomyces cerevisiae*) في المعالجة الحيوية لبعض العناصر الثقيلة وتحسين قابليتها بالتطفير. استعملت خميرة الخبز (*S. cerevisiae*) الجاهزة الجافة ذات ماركة تجارية مجهزه من شركة (Aldnaamaya, China)، وأخضعت للفحوصات التشخيصية للتأكد من عائديتها الى (*S. cerevisiae*) تحديداً، وبغية تحسين قابلية العزلة المنتخبة في الدراسة على إزالة هذه العناصر، أخضعت للتطفير بمادة نتيروزوكواندين وعزلت منها

https://doi.org/10.30684/etj.34.3B.16
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

عدد من العزلات المطفرة، تبين أن ثلاثة منها رمز لها Sc_{6-1} وSc_{6-2} وSc_{6-3}، كانت أكثر مقاومة للمضاد الفطري سايكلوهكسمايد وبتركيز 5 و 10 مايكروغرام/ مليلتر، ثم درست كفاءة العزلات المطفرة في إزالة العناصر المعدنية تحت ظروف محددة من مدة تماس مقدارها 10 دقيقة واس هيدروجيني 6 ودرجة حرارة 25°C وسرعة التحريك 150 دورة/ دقيقة وباستعمال لقاح حجمه 1× 10^6 خلية/ مليلتر في محلول يحتوي على 1 ملغرام/ لتر من كل عنصر بشكل مجتمع، وأظهرت العزلة المطفرة Sc_{6-2} تفوقا على بقية العزلات في معدل كفاءة إزالة كل من الكروم والنيكل والكوبلت والكادميوم والرصاص والحديد والنحاس مجتمعة فكانت 72.23 %، في حين ان معدل كفاءة ازالة هذه العناصر مجتمعة من قبل العزلتين المطفرتين Sc_{6-1} وSc_{6-3} بلغ64.67 % و65.37 % على التوالي.

الكلمات المرشدة: خميرة *Saccharomyces cerevisiae*، المعادن الثقيلة، النيتروزوكوانيدين، السايكلوهكسمايد، المعالجة الحيوية.

المقدمة

يعد تلوث البيئة في وقتنا الحاضر من أخطر المشكلات التي تلاقي اهتماما كبيراً على مستوى العالم أجمع نتيجة النمو السكاني المتزايد والتضخم الصناعي والزراعي [1]، ويعرف التلوث وفقاً لقانون وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) لسنة 1986م بأنه الإخلال بالتوازن الطبيعي وتأثيره نتيجة التغير في الخصائص الفيزيائية والكيميائية الحيوية للمكونات البيئية الحية أو غير الحية والتي لا تستطيع الأنظمة البيئية من استيعابه وتأثيره في حياة الكائنات الحية، أما الملوثات فتعرف على أنها تلك المواد أو التأثيرات غير المادية التي تؤدي إلى تغير صفات البيئة بشكل سلبي مما يعرض حياة الكائنات الحية بشكل عام للخطر وتهدد سلامتها بطريقة مباشرة أو غير مباشر [2]، وتشكل زيادة التلوث بالعناصر الثقيلة مثل الزئبق والرصاص والكادميوم والكروم والنحاس والزنك وغيرها في الوقت الحاضر مشكلة بيئية مقلقة للنظام البيئي وللإنسان وصحته وللكائنات الحية جميعها، إذ تكمن خطورتها في تضاعف تركيزها خلال السلاسل الغذائية نتيجة عملية التركيز الحيوي فضلاً عن تأثيراتها الأخرى في صحة الإنسان [3]، لذا أصبحت عملية البحث عن تقنيات حديثة لإزالة الملوثات البيئية ومنها العناصر المعدنية الثقيلة من المهام الحيوية نتيجة تطور خطر هذه العناصر مع التطور التقني الكبير وزيادة الحاجة إليها وتنوع استعمالها في الصناعات الحديثة [4]، وقد وجد أن الطرائق الحيوية هي البدائل الناجحة والملائمة لما تتمتع به من مزايا إيجابية في إزالة العناصر الثقيلة [5]، وتُعرف المعالجة الحيوية (Bioremediation) بأنها استعمال النباتات أو الكائنات الحية المجهرية والمتمثلة بالبكتريا والطحالب والفطريات والخمائر منها الحية أو المقتولة، المهندسة وراثياً أو غير المهندسة (البرية) في خفض مستويات التلوث وإزالته من الأنظمة البيئية [6]، وتعد تقنيات الهندسة الوراثية وتقنيات التطفير من الوسائل المتبعة للتغيير على المستوى الجزيئي للأحياء المجهرية لتحسين خواصها في إزالة العناصر المعدنية من خلال ايجاد عزلات ذات حساسية وسعة عالية لإمتزاز العناصر الثقيلة وإزالتها من المواقع الملوثة، فضلاً عن زيادة قدرتها في تراكم العناصر داخل خلاياها [7]، واستعملت خميرة الخبز (*S. cerevisiae*) كأحد البدائل في المعالجة الحيوية للمعادن الثقيلة [8]، وذلك لقابليتها على إزالة المعادن الثقيلة وكلفتها الاقتصادية المنخفضة وتوافرها بشكل كبير وسهولة التعامل معها على المستوى الجيني فضلاً عن إمكانية استرجاع بعض المعادن والاستفادة منها في الاغراض التصنيعية [9]، إذ بينت العديد من الدراسات حصول زيادة في القابلية التراكمية للخميرة المطفرة مما يؤدي الى زيادة كفاءتها في سحب الملوثات المعدنية [10]. لذا هدفت الدراسة الى إمكانية استعمال خميرة الخبز المطفرة (Mutant) (*S. cerevisiae*) في المعالجة الحيوية لبعض العناصر المعدنية الثقيلة.

المواد وطرائق العمل

عـزلة الخـميرة

استعملت في الدراسة خميرة الخبز (*S. cerevisiae*) الجافة المستوردة ذات ماركة تجارية معروفة مجهزة من شركة (Aldnaamaya) الصينية المنشأ.

تنشيط وتنـقية عزلة الخميرة

نشطت الخميرة الجافة وفقاً للطريقة التي وصفها [11] وذلك بتعليق 0.5 غم من مسحوق الخميرة وتلقيحها في انابيب حاوية على 10 مليلتر من وسط (Yeast extract glucose peptone broth) (YEGPb) السائل لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 30°C تحت ظروف هوائية ونقلت منها ملئ عروة الناقل المعقم وزرعت على وسط اكار (Yeast extract glucose peptone Agar) (YEPGA) بطريقة التخطيط، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 30°C لمدة 48 الى 72 ساعة، بعدها أخذ عدد من المستعمرات النقية منها بطريقة مستقلة بوساطة الناقل ونشر بطريقة التخطيط على الوسط نفسه، وكررت هذه العملية أكثر من مرة إمعاناً في التنقية، جرى بعدها دراسة الصفات الزرعية المجهرية لمستعمرات الخميرة من حيث شكل المستعمرة وتجمعاتها وطريقة التبرعم وقطرها ولونها وارتفاعها ورائحتها وغيرها من الصفات الأخرى بحسب ما ورد في [12].

محلول مادة النيتروزوكوانيدين Nitrosoguanidie (NTG)

حُضر آنياً محلول خزين بتركيز (1 ملغرام/ مليلتر) وفقاً لما وصفه [13] وذلك بإذابة 0.01غم في 10 مليلتر من الماء المقطر ليصبح التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر، ثم خفف المحلول لتحضير محاليل بتراكيز نهائية هي 5و10 و15 و20 و25 و30 مايكروغرام/ مليلتر، ووضعت المحاليل في قنينة زجاجية محكمة الغلق ومغلفة بورق الألمنيوم لتجنب تأثرها بالضوء واستعملت لإجراء عملية التطفير.

محلول المضاد الفطري السايكلوهكسمايد cycloheximide (cyh)

استعملت الطريقة الواردة في [14] لتحضير محلول خزين من المضاد الفطري بتركيز 10 ملغرام/ مليلتر، وذلك بإذابة 0.1 غم من المضاد في 10 مليلتر من الماء المقطر ليصبح التركيز 10000 مايكروغرام/ مليلتر ثم نقل 0.1 مليلتر من المحلول الخزين الى 100 مليلتر من الماء المقطر ليصبح التركيز 10 مايكروغرام/ مليلتر، بعدها نقل 0.05 مليلتر من المحلول الخزين أيضاً في 100 مليلتر من الماء المقطر ليصبح التركيز 5 مايكروغرام/ مليلتر،ثم غمرت أقراص بقطر6 مليمتر تم تهيئتها من ورق ترشيح من نوع (Whatman No.1) معقمة بالمؤصدة في محاليل المضاد المذكورة لغاية التشبع، بعدها جففت بالنفض واستعملت في إجراء اختبار الحساسية للعزلات المطفرة للخميرة.

تحضير محاليل العناصر المعدنية القياسية

جرى تحضير محاليل العناصر المعدنية القياسية وفقاً لما ورد في [15] على هيئة أملاح تضمنت كلاً من $Pb(NO_3)_2$ و$Cu(NO_3)_2$ و$Co(NO_3)_2$ و$Cd(NO_3)_2$ و$Fe(NO_3)_2$ و$NiCl_2$ وK_2CrO_4 بنقاوة 99.99 % واستعملت بوصفها محاليل عناصر خزينة، وذلك بتركيز1000 ملغرام/ لتر، ومن خزين هذه المحاليل حُضرت المحاليل التي يتطلبها العمل بأسلوب التخفيف المتعاقب المجتمع وبتركيز 1 ملغرام/ لتر وعقمت بطريقة الترشيح بوساطة مرشحات غشائية دقيقة بفتحات قطرها 0.45 مايكرومتر، ويذكر أن جميع الأدوات الزجاجية المستعملة في تحضير المحاليل المائية للعناصر المعدنية قد عقمت وفقاً لما أشار إليه [16].

تعيين كفاءة عزلة الخميرة قيد الدراسةفي إزالة العناصر المعدنية قبل التطفير

أتبعت طريقة الورادة في [17] لدراسة كفاءة العزلة قيد الدراسة في إزالة العناصر المعدنية، وذلك بإضافة كمية من اللقاح بتركيز 1×10^6 خلية / مليلتر من محلول المعاملة وبتركيز 1 ملغرام/ لتر لكل عنصر بشكل مجتمع التي استعمل خلالها لقاح خلايا حية، وأجريت عملية الإزالة بدرجة حرارة 25°C في حاضنة هزازة بسرعة تحريك مقدارها 150 دورة / دقيقة ومدة تماس 60 دقيقة وباس هيدروجيني 6 (باستعمال كل من هيدروكسيد الصوديوم ذي تركيز 0.1 عياري أو حامض الهيدروكلوريك ذي تركيز 0.1 عياري لمعادلة الأس الهيدروجيني) في دوارق حجمية ذات سعة 250 مليلتر وبواقع 100 مليلتر في كل دورق وبواقع مكررين، ثم جمعت الخلايا بوساطة النبذ المركزي بسرعة مقدارها 5000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة، بعدها امرر الرائق على مرشحات غشائية بفتحات

قطرها 0.45 مايكرومتر، ثم نقل الى أنابيب اختبار لغرض تقدير المعادن بوساطة جهاز المطياف الذري اللهبي (Atomic Absorption Spectrophotometer, Shimadzu, AA 700)، ومنها قدرت النسبة المئوية للعناصر المعدنية المزالة وفقا للمعادلة الآتية:

النسبة المئوية للإزالة (%) = {(تركيز العنصر قبل الازالة-تركيز العنصر بعد الازالة) / (تركيز العنصر قبل الازالة)} × 100

تحسين قابلية الخميرة على إزالة العناصر المعدنية بالتطفير

استعملت الطريقة الموصوفة من قبل [18] مع إجراء بعض التعديلات عليها، والمتمثلة بتغيير درجات حرارة الحضن وكما يلي: نميت خلايا عزلة الخميرة الأكفأ في دوراق حجمية ذات حجم 500 مليلتر تحوي على100 مليلتر من الوسط (YEGPb)، وذلك بحضنها بدرجة حرارة 30°C مدة 16 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة تحريك 100 دورة / دقيقة، ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي المبرد وبسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة، بعدها غسلت الخلايا مرتين بمحلول دارئ الفوسفات الملحي ونبذت بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة، تلاها تعليق الخلايا بمحلول الملح الفسلجي، وضبط عدد الخلايا بمقدار5×10^7 خلية / مليلتر، وقد نفذت التجربة باستعمال 9 مليلتر من العالق المذكور أعلاه. أضيفت له 1 مليلتر من المادة المطفرة (NTG) بتراكيز5 و10 و15 و20 و25 و30 مايكروغرام/ مليلتر ليصبح الحجم النهائي للعالق 10 مليلتر، وضع عالق الخلايا في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 30°C بسرعة تحريك مقدارها 200 دورة / دقيقة ولمدة ساعة وبمكررين، ثم نبذت النماذج مركزيا بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة لترسيب الخلايا والتخلص من الرائق، علقت الخلايا في 10 مليلتر بمحلول دارىء الفوسفات الملحي، ونبذت مركزياً تحت الظروف المذكورة لغسل الخلايا من المادة المطفرة (NTG) وأخيرا علقت الخلايا في 10 مليلتر من محلول الملح الفسلجي، وأجريت منها سلسلة تخافيف تراوحت من 10^1 الى10^7، واحتسبت النسبة المئوية للخلايا الحية المتبقية بعد التطفير مع عالق الخلايا قبل التطفير على وسط آكار (YEPGA)، وحضنت بدرجة حرارة 25°C و 30°C لمدة 72ساعة، وحسبت النسبة المئوية للخلايا الحية وفق للمعادلة التي اشار اليها [19] وكما يأتي:

نسبة الخلايا الحية (%) = {(عدد الخلايا قبل التطفير - عدد الخلايا بعد التطفير) / (عدد الخلايا قبل التطفير)} × 100

كررت الخطوات السابقة باستعمال المادة المطفرة المذكورة في أعلاه بتركيز 30 مايكروغرام/ مليلتر والذي حقق أفضل تطفير وبأعلى نسبة في درجات الحرارة المذكورة، وعزلت من هذه المعاملة عدد من المستعمرات على وسط أكار (YEPGA) بطريقة التخطيط.

حساسية العزلات المطفرة للمضاد الفطري سايكلوهكسمايد

درست حساسية العزلات المعاملة بالتطفير للكشف عن النسبة المئوية للعزلات الفاقدة أو المكتسبة للمقاومة تجاه المضاد الحيوي السايكلوهكسمايد دليلاً على التطفير، ثم نقلت منها وبملئ عروة الناقل المعقم الى أنابيب إختبار حاوية على 10 مليلتر من الوسط السائل (YEGPb)، ونشرت على وسط آكار (YEPGA)، وثبت في منتصف الوسط الغذائي قرص مشبع بالمضاد الحيوي سايكلوهكسمايد، وبثلاث مكررات ثم تركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، بعدها حضنت بدرجة حرارة 30°C لمدة 48 الى 72 ساعة، وتم قياس أقطار التثبيط ومقارنتها مع طبق المعايرة للعزلة قبل التطفير وفقا لما وصفه [20]، فوجد بأن ثلاث عزلات ذات مقاومة للمضاد الفطري المذكور تم انتقائها بالتخطيط على وسط أكار (YEPGA) ورمز لها بـ Sc_{6-1} وSc_{6-2} و Sc_{6-3}.

دراسة كفاءة العزلات المطفرة في إزالة العناصر المعدنية

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [17] لدراسة كفاءة العزلات المطفرة Sc_{6-1} وSc_{6-2} و Sc_{6-3} في إزالة العناصر الثقيلة بحجم لقاح حي بحيث يصبح تركيزه 1×10^6خلية/ مليلتر من محلول المعاملة

وبتركيز1 ملغرام/ لتر لكل عنصر بشكل مجتمع في حاضنة هزازة بسرعة تحريك 150 دورة / دقيقة بدرجة حرارة 25°C وباس هيدروجيني 6 ومدة تماس 10 دقيقة وبواقع مكررين باستثناء مدة التماس والتي كانت 60 دقيقة (قبل التطفير)، وجرى تقدير العناصر المعدنية المتبقية بجهاز المطياف الذري.

التحليل الإحصائي

استعمل البرنامج الإحصائي (2010)، (Statistical Analysis System) (SAS)، في تحليل النتائج التي تم الحصول عليها، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي (LSD) باحتمالية ($P < 0.05$) وفقا لما اشار اليه [21].

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص

تميزت عزلة الخميرة المنماة على وسط أكار (YEPGA) بتكوينها مستعمرات أتسمت بشكلها الدائري ذات اللون الأبيض أو المائل الى ألكريمي الشاحب، بحافات منتظمة، ملساء، مرتفعة ومحدبة فوق سطح الوسط ألزرعي الصلب وذات قوام لزج، فيما أظهرت الفحوصات المجهرية للخلايا الخضرية بتصبغها بالمثيلين الأزرق وصبغة كرام بأنها كروية البيضوية الشكل منفردة أو متجمعة مصطفة بشكل يشبه خلايا النحل عند وجودها بكثافة عالية، كما لوحظ وجود نواة واضحة وفجوة واحدة كبيرة تشغل معظم أجزاء الخلية، ووجود البراعم في أكثر من طرف من إطراف الخلية تراوح عددها من 2 الى 6، وهذه الخواص مطابقة لخواص عزلات الخمائر التي تعود الى (*S. cerevisiae*) [12].

تحسين قابلية العزلة على إزالة العناصر المعدنية

لتحسين قابلية العزلة قيد الدراسة على إزالة العناصر المعدنية وزيادة كفاءتها، تم التطفير باستعمال (NTG) ويوضح الجدول 1 النسبة المئوية للخلايا الحية المتبقية بعد عملية التطفير بالمادة المذكورة، ويلاحظ انخفاض واضح في عدد الخلايا المتبقية حيةً بزيادة تركيز المادة المطفرة من 5 الى 30 مايكروغرام/ مليلتر، إذ بلغت نسبة الخلايا الحية 20 % عند تنميتها بدرجة حرارة 25°C و27 % عند تنميتها بدرجة حرارة 30°C مما يشير الى أن التطفير يسبب انحرافاً في درجة الحرارة المثلى للنمو، وبالتالي الحصول على عزلات لها قابلية تحمل لدرجات حرارة عالية [18]، في حين تم اختيار المدة الزمنية لتعرض الخلايا للمادة المطفرة ساعة واحدة يؤدي الى انخفاض عدد الخلايا الحية ومن ثم حدوث الطفرة [22] أعيدت هذه التجربة باستعمال المادة المطفرة بتركيز 30 مايكروغرام / مليلتر.

جدول (1). النسبة المئوية لخلايا (*S. cerevisiae*) المتبقية بعد المعاملة من المادة المطفرة

المعاملة بمادة (NTG) مايكروغرام/ مليلتر	النسبة المئوية للبقاء (%)	
	درجة حرارة 25°C	درجة حرارة 30°C
0	100	100
5	92	96
10	80	88
15	65	77
20	54	65
25	34	45
30	20	27

وتم انتقاء 15 عزلة للتحقق من حدوث الطفرة فيها خلال اختبار حساسيتها / مقاومتها تجاه المضاد الفطري سايكلوهكسمايد فوجد أن ثلاث عزلات تكتسب مقاومة تجاه هذا المضاد، وعدُّت هذه الخلايا المختارة خلايا طافرة للعزلة Sc_6 لغرض إجراء التجارب اللاحقة، ورمز لهذه العزلات Sc_{6-1} وSc_{6-2} وSc_{6-3}، درست حساسية هذه العزلات المعاملة بالتطفير تجاه المضاد الحيوي سايكلوهكسمايد، ويلاحظ من الجدول 2 أن نسبة حساسية العزلات الثلاثة المذكورة تجاه هذا المضاد بتركيز 5 مايكروغرام/

مليلتر بلغت 83.33 % و25.00% و77.08 % على التوالي، وبينما بلغت بتركيز 10 مايكروغرام/ مليلتر 84.00 % و60.00 % و80% على التوالي مقارنةً مع العزلة غير المطفرة باعتبارها حساسة 100%، وقد أشار [23] الى أن التطفير باستعمال (NTG) يحث العزلات على مقاومة سايكلوهكسمايد، وبين [24] ان حساسية خميرة (*S. cerevisiae*) العالية تجاه هذا المضاد باعتباره مادة كيميائية مثبطة قوية للتخليق الحيوي للبروتين في خلايا حقيقية النواة من خلال ارتباطه في موقع E-site من الوحدة الرايبوزومية الكبرى 60S مما يؤدي الى تثبيط الاستطالة خلال تخليق البروتين.

جدول (2). قابلية عزلات (*S. cerevisiae*) المطفرة Sc_{6-1} وSc_{6-2} و Sc_{6-3} بعد المعاملة من المادة المطفرة بالمادة الكيميائية (NTG) على مقاومة سايكلوهكسمايد

نوع العزلة	قطر التثبيط (ملم) بفعل المضاد الفطري سايكلوهكسمايد			
	قطر التثبيط (ملم) بتركيز 5 مايكروغرام/ مليلتر	النسبة المئوية للحساسية	قطر التثبيط (ملم) بتركيز 10 مايكروغرام/ مليلتر	النسبة المئوية للحساسية
غير المطفرة	48	100.00	50	100.00
المطفرة Sc_{6-}	40	83.33	42	84.00
المطفرة Sc_{6-}	12	25.00	30	60
المطفرة Sc_{6-}	37	77.08	40	80

وبين الجدول 3 كفاءة هذه العزلات في إزالة العناصر المعدنية مجتمعة، إذ جرى مقارنتها مع كفاءة العزلة قبل التطفير فوجد أن العزلات المطفرة تميزت في معدلات إزالة العناصر وبفارق معنوي إحصائياً، إذ كانت 51.12 % في حالة العزلة غير المطفرة ارتفعت الى 64.67% و72.23% و65.37% بالنسبة للعزلات المطفرة Sc_{6-1} وSc_{6-2} وSc_{6-3} على التوالي. كما لوحظ أن العزلات المطفرة تكتسب خاصية إزالة عنصر الكروم وبنسب متفاوتة اعتماداً على العزلة المطفرة، إلاّ أن كفاءة العزلات المطفرة زادت في إزالة العناصر وعلى مستوى كل عنصر على حدة من العناصر الأخرى وهي الكروم والنيكل والكوبلت والكادميوم والنحاس لاسيما بالنسبة للعزلة المطفرة Sc_{6-2}، مما يثبت قدره وكفاءة التطفير بالمطفر الكيميائي النايتروزوكوانيدين في زيادة إزالة العناصر [25] وبالعودة الى الجدول 3 يلاحظ أن هذه العزلة كانت اقل حساسية للمضاد الفطري سايكلوهكسمايد، مما يعني أن مقدار التطفير الحاصل فيها كانت اكثر من العزلات المطفرة الأخرى.

جدول (3). كفاءة إزالة العناصر المعدنية بإستعمال العزلة Sc_6 والعزلات المشتقة منها بالتطفير

رمز العزلة	كفاءة الإزالة (%)							
	Cr	Ni	Co	Cd	Pb	Fe	Cu	المعدل
Sc_6 غيرالمطفرة	0.00	50.26 ±2.71	15.15 ±0.76	9.00 ±0.54	92.9 0±6.43	95.86 ±5.38	42.70 ±2.17	51.12 ±2.66
Sc_{6-1} مطفرة	28.35 ±2.17	71.65 ±3.64	35.61 ±1.83	30.51 ±2.83	98.55 ±6.32	98.99 ±4.68	88.55 ±4.72	64.67 ±2.59
Sc_{6-2} مطفرة	40.00 ±2.85	85.23 ±5.73	44.45 ±2.08	42.12 ±2.71	98.98 ±5.49	99.11 ±6.44	96.12 ±6.38	72.23 ±3.04
Sc_{6-3} مطفرة	34.33 ±1.91	69.27 ±3.27	36.55 ±1.20	31.66 ±1.48	98.11 ±6.02	98.80 ±6.34	88.65 ±5.91	65.37 ±2.79
LSD Value	5.38*	7.90*	5.33*	4.89*	5.049NS	4.782 NS	4.12*	6.843*

* أقل فرق معنوي على مستوى ($P < 0.05$)، NS لايوجد فرق معنوي.

وقد استعمل مجموعة من الباحثين [26] الأشعة فوق البنفسجية في تطفير خميرة (*S. cerevisiae*) فلاحظوا أن كفاءة العزلة في إزالة الكروم السداسي تصل الى 98.7%، وفسروا ذلك بحصول زيادة كبيرة في عدد طبقات الأغشية المحيطة بالفجوات وتوسع سطح الخلية وبالتالي زيادة عدد المواقع الفعالة لربط أيونات العناصر المعدنية، وجدير بالذكر ان تأثير المطفر الكيميائي النايتروزوكوانيدين يكون بشكل مباشر في المادة الوراثية للخلية (DNA) (Deoxyribonucleic acidعن طريق حدوث طفرة تحول (انقلاب) (Transition Mutation) للقواعد النايتروجينية من النوع GC الى AT ، وكذلك AT الى GC في شريط الـ DNA ومن ثم حدوث الطفرة [27].

الاستنتاجات

من خلال استعراض نتائج الدراسة يمكن استعمال خميرة (*S. cerevisiae*) كأحد الكائنات المجهرية الكفوءة في المعالجة الحيوية للعناصر المعدنية الثقيلة ولاسيما بعد تطفير العزلة Sc_6 بالنيتروزوكواندين الذي أتاح إمكانية الحصول على عدد من العزلات كانت بينها العزلات Sc_{6-1} وSc_{6-2} وSc_{6-3} أكثر مقاومة للسايكلوهكسمايد وقد ثبت أن هذه العزلات ذات كفاءة تفوق العزلة غير المطفرة في إزالة سبعة عناصر معدنية من المحاليل المائية بكفاءة عالية بصورة مجتمعة عند ضبط الظروف الملائمة مندرجة الحرارة والاس الهيدروجيني ومدة التماس (الحضن) وسرعة التحريك وحجم اللقاح للوصول إلى مستوى جيد من إزالة هذه العناصر المعدنية، وبالتالي إنشاء وحدة علمية متخصصة في تطوير وإنتاج المواد المازة الحيوية، المنخفضة الكلفة والآمنة لغرض معالجة المياه الملوثة التي أصبحت ظاهرة ملفتة للنظر في العراق.

المصادر

[**1**] Cvijovic, M., Djurdjevic, P., Cvetkovic, S. and Cretescu, I. "A case study of industrial water polluted with chromium (VI) and its impact to river recipient in western Serbia", *Environmental Engineering and Management Journal*, 9(1), 45-49, 2010.

[**2**] Abaspour, M., Javid, A.H., Moghimi, P. and Kayhan, A., "Modeling of thermal pollution in coastal area and its economical and environmental assessment", *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2, 13-26, 2005.

[**3**] Gradinaru A.C., Popescu, O., and Solcan, G., "Variation analysis of heavy metal residues in milk and their incidence in milk products from Moldavia, Romania", *Environmental Engineering and Management Journal*, 10(10), 1445-1450, 2011.

[**4**] Volesky, B. and Naja, G., "Biosorption Application stratigies", http:// www.biosorption. Mcgill.Ca/ Publication/ gn6.Ibs.Pdf, 2005.

[**5**] Ahluwalia, S.S., and Goyal, D., "Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater", *Bioresource Technology*, 98(12), 2243-2257, 2007.

[**6**] Bhatnagar, S. and Kumari, R., "Bioremediation A sustainable tool for environmental management: A review", *Annual Review and Research in Biology*, 3(4), 974-993, 2013.

[**7**] Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M. and Peijnenburg, W., "Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance", *Environmental Science and Technology*, 38, 4705-4712, 2004.

[**8**] Zhang, I., Dai, Y., Liu, B., Ma, F., Zheng, R. and Dong, L."Biosorption of lead from aqueous solution by using chemically treated *Saccharomyces cerevisiae"*, *Environmental Engineering and Management Journal*, 10(6), 729-732, 2011.

[**9**] Wang, J., and Chen, C. "Biosorbents for heavy metals removal and their future", *Biotechnology Advances*, 27(2), 195-226, 2009.
[**10**] Ileana, C.F., Codruţa, P., Lavinia, R., Eliza, O., and Sorin, A., "Manipulation of Ni^{+2} tolerances of *Sacchromy cescerevisiae* cells: a primary step to bioremediation by removal and recovery of $Ni^{+2}$from contaminated waters", *Revue Roumaine de Chimie*, 53(8), 647-651, 2008.
[**11**] Herrero, M.B., de Lamirande, E. and Gagnon, C., "Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro", *Biology of Reproduction*, 61(3), 575-581, 1999.
[**12**] Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D., "YEASTS: CHARACTERISTICS AND IDENTIFICATION, 3rd ed., Cambridge, University Press, England, 2000.
[**13**] Guyot, M. and Fawaz, F., "Nifedipine loaded-polymeric microspheres: preparation and physical characteristics", *Int. J. Pharm*, 175:61-74, 1998.
[**14**] McGinnis, M.R., "Laboratory Hand Book of Medical Mycology", *Academic Press*, New York, 356, 1980.
[**15**] American Public Health Association (APHA), Standard Methods for Examination of Water and Waste Water, 20th ed., 1998.
[**16**] Quintelas, C., Fernandes, B., Castro, J., Figueiredo, H., Tavares, T., "Biosorption of Cr (VI) by three different bacterial species supported on granular activated carbon-A comparative study", *Journal of Hazardous Materials*., 153, 799-809, 2008.
[**17**] Voleskey, B., Sorption and Biosorption, Sorbex, INC, St. Lambert, Quebec, 36-103, 2004.
[**18**] Tork, S., Hegazy, W.K., El-kawokgy, T.M.A. and El-Gebaly, O.G., "Induction of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* Strain(s) using different mutation methods", *Asian Journal of Biotechnology*, 1, 29-36, 2009.
[**19**] Damini, D., Sukriti, P., Devi, C.S., Selvarajan, E., Suganthi, V. and Mohanasrinivasan, V., "Removal of heavy metals from leather industry effluent using *Saccharomyces sp*. in a packed bed reactor", *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 4(2), 53-56, 2013.
[**20**] Meyer, R., "Alternate forms of the resistance factor R1 in P. mirabilis", *Journal of Bacteriology*, 118, 1010-1019, 1974.
[**21**] Statistical Analysis System (SAS). User's Guide. Statistical. Version 9.1st ed., SAS. Inst, Inc, Cary, N.C. USA, 2010.
[**22**] Gardner, J.E., Simmons, J.E. and Snustad, D.P., Principal of Genetic, 8th ed., John Wiley and Sons, Inc., 304-305, 1991.
[23] Brusick, D.J., "Induction of Cycloheximide-Resistant Mutants in Saccharomyces cerevisiae with N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine and ICR-170", *Journal of Bacteriology*, 109(3), 1134-1138, 1972.
[24] Lesage, L. and Bussey, H., "Cell Wall Assembly in Saccharomyces cerevisiae" *Microbiology and Molecular Biology Reviews. Rev.*, 70(2), 317 -343, 2006.
[25]. Pandey, A., Nigma, P., Soccal, C. R., Soccal, V.T., Singh, D. and Mohan, R. "Advances in Microbial amylase", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135-152, 2000.
[26] Selvam, K., Arungandhi, B., Vishnupriya, B., Shanmugapriya, T. and Yamuna, M., "Biosorption of chromium (VI) from industrial effluent by wild and mutant type strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its immobilized form", *Bioscience Discovery*, 4(1), 72-77, 2013.
[27] Carlton, B.C. and Brown, B.J., "Gene Mutation, In: Manual of Methods for General Bacteriology. Gerhardt, P., Murray, R. G.E., Costihow, R.N., Nester, E.W.,

Wood, W.A. Krieng, N.P. and Philips, G.B. (eds.). American Society for Microbiology, Washington, 222-242, 1981.