انجمن عناصر کمیاب ایران

ششمین کنگره سراسری عناصر کمیاب ایران
تهران، دانشگاه تهران، ۶ الی ۸ اسفند ۱۳۹۸

حذف زیستی آرسنیک به کمک سودوموناس آئروژینوزا IAUF-11ZBK از فاضلاب شهری در اصفهان

ندا حیدری خویی [۱] – منیر دودی [۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلارجان، اصفهان، ایران
۲. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلارجان، اصفهان، ایران

چکیده

میکروارگانیسم‌هایی که می‌توانند در غلظت‌های بالای فلزات سنگین رشد کنند برای پاکسازی زیستی از طریق اکسیداسیون و احیا و یا تثبیت مناسب هستند. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک از فاضلاب شهری و حذف این فلز در شرایط آزمایشگاهی به کمک این باکتری‌ها بود. نمونه‌گیری از پساب ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر و پساب شرکت پلی‌اکریل اصفهان انجام شد. باکتری‌های مقاوم به آرسنیک در محیط کشت PHGIIحاوی نمک سدیم دی هیدروژن آرسنات با غلظت ۰/۱ مولار جداسازی شدند. این باکتری‌ها از نظر میزان مقاومت به این فلز مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. جهت ارزیابی کمترین غلظت بازدارنده (MIC) و بیشترین غلظت کشنده (MBC) فلز آرسنیک بر روی باکتری‌های جداسازی شده از روش انتشار در آگار استفاده شد. جهت شناسایی مولکولی این باکتری‌ها از روش کلنی-PCR استفاده شد. جدایه های مقاوم به آرسنیک مربوط به باکتری‌های *باسیلوس سفنسیس* OPL، *سودوموناس آئروژینوزا* IAUF-11ZBK، *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* (IR-Isfahan (G و *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* 5633 بودند. بیشترین MIC (۱۴ میلی‌گرم بر لیتر) متعلق به باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه IR-Isfahan (G) و کمترین MIC (۷ میلی گرم بر لیتر) متعلق به باکتری‌های *باسیلوس سفنیس* OPLو *سودوموناس آئروژینوزا* IAUF-11ZBK بود. *سودوموناس آئروژینوزا* IAUF-11ZBK قادر به حذف زیستی آرسنیک از پساب‌ها تا حد ۴/۱ میلی گرم در لیتر در شرایط آزمایشگاهی و محیط کشت بود. در نهایت می توان پیشنهاد داد که، این سویه پس از حذف ژن‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، زنوبیوتیک ها و سموم دفع آفات نباتی می‌تواند به عنوان یک باکتری مناسب جهت حذف زیستی آرسنیک از پساب‌ها پیشنهاد شود.

کلمات کلیدی: باکتری‌های مقاوم به آرسنیک، حذف زیستی، کلنی- PCR، MIC، MBC

* نویسنده مسئول: واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی ، اصفهان ، ایران، آدرس ایمیل: monirdoudi@yahoo.com, doudi@iaufala.ac.ir

مقدمه

آلودگی فلزی یک مشکل جهانی است، میزان فلزات در کلیه محیط ها از قبیل هوا، خاک و آب رو به افزایش است و در برخی موارد به حد سمی می رسد که علت آن انتشار آلودگی از منابع صنعتی به محیط زیست است (۱). تجمع فلزات سنگین در انسان باعث کاهش رشد، عوارضی از قبیل کمبود فسفر خون، آسیب های مغزی و کلیوی، سرطان، بیماری های قلبی عروقی و آسیب به سیستم اعصاب مرکزی خواهد شد (۲). آرسنیک شبه فلزی سمی است که به دو فرم آلی و معدنی وجود دارد. این شبه فلز به طور گسترده ای در آب، خاک و هوا وجود دارد (۳، ۴). فرم سه ظرفیتی باعث اختلال در عملکرد بسیاری از پروتئین ها از طریق واکنش با گروه سولفیدریل آن‌ها می‌شود، در حالی که فرم پنج ظرفیتی آن آنالوگ مولکولی فسفات است که منجر به مهار فسفریلاسیون اکسیداتیو و نهایتاً آسیب به سیستم تولید انرژی می شود (۳). آرسنیک در گیاهان نیز اثر سمی دارد و به راحتی توسط سلول های ریشه گیاهان گرفته می شود و باعث تخریب متابولیسم گیاهان می گردد (۵). آژانس بین المللی سرطان نیز آرسنیک را به عنوان یک ماده سرطان زا معرفی نموده است بنابراین این عنصر به عنوان یک تهدید جدی برای بهداشت عمومی در سراسر جهان مورد توجه بسیار قرار گرفته است به طوری که در بالاترین رتبه در فهرست آژانس مواد سمی و ثبت بیماری های ایالات متحده آمریکا قرار گرفته است (۶). تصفیه پساب های حاوی فلزات سنگین با روش های فیزیکی و یا شیمیایی به علت گران بودن و یا عدم کارایی با مشکل همراه است. از این رو زیست پالایی به استفاده از میکروارگانیسم ها برای سم زدایی و یا کاهش آلاینده های زیست محیطی می گویند که در سال های اخیر برای پاکسازی محیط های آلوده مورد توجه قرار گرفته است (۷، ۸).میکروارگانیسم هایی که می توانند در غلظت های بالای فلزات رشد کنند برای پاکسازی بسیار مناسب هستند زیرا باعث تغییر حالت اکسیداسیون و احیا و یا تثبیت فلز می شوند (۹). آنتی بیوتیک ها ابزار قدرتمندی در کنترل باکتری های پاتوژن هستند، اما ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها مشکلات عمده ای ایجاد نموده و از قدرت این ابزار تا حد زیادی کاسته است (۱۰، ۱۱). شاخص های ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین و آنتی بیوتیک ها اغلب در کنار یکدیگر روی پلاسمیدها و ترانسپوزون ها قرار گرفته اند (۱۱). به همین علت حضور فلز سنگین در محیط به عنوان یک آلاینده نه تنها باعث افزایش باکتری های مقاوم به فلز بلکه باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی نیز می گردد (۱۲). هدف از مطالعه حاضر جداسازی باکتری های مقاوم به آرسنیک از نمونه های فاضلاب شهری، شناسایی مولکولی و ارزیابی قدرت جذب زیستی آرسنیک توسط جدایه های مقاوم در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری

نمونه برداری از پساب ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر و پساب شرکت پلی‌اکریل اصفهان انجام شد. نمونه برداری در بطری های دهان گشاد شیشه ای یا پلاستیکی انعطاف پذیر یک لیتری استریل انجام گردید. درب بطری تا زمان آزمایش بر روی نمونه ها باز نشد و حدود ۵/۲ سانتی متر از سر ظرف (به منظور قابلیت مخلوط کردن نمونه قبل از استفاده) خالی گذاشته شد. نمونه ها روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و در عرض ۵ الی ۶ ساعت آزمایش بر روی آن ها انجام گرفت و تا حرارت ۴°C سرد شد و حداکثر طی ۸ الی ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری استفاده شد (۱۳). ابتدا دما و pH نمونه ها اندازه گیری شد. سپس پارامترهای BOD و CODهر نمونه با روش‌های استاندارد سنجش شد (۱۴).

اندازه گیری میزان آرسنیک در نمونه های پساب

ابتدا نمونه ها کاملاً مخلوط شد و سپس ۵۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر از آن ها ا به یک بالن ۲۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد. مقدار ۵ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ به نمونه اضافه گردید و بر روی حمام به آرامی تبخیر شد. عمل هضم تا رسیدن به محلول شفاف ادامه داده شد و اجازه داده نشد که نمونه در طول مرحله هضم خشک گردد. هنگامی که میزان نمونه به ۱۰ الی ۲۰ میلی لیتر تقلیل یافت، جدار بالن با آب مقطر شستشو داده شد و نمونه به حجم رسانده شد. سپس میزان آرسنیک بر حسب میلی گرم بر لیتر (ppm) با روش جذب اتمی تعیین شد (۱۵).

آنالیز میکروبی و جداسازی باکتری های مقاوم به آرسنیک

شمارش تعداد باکتری های هتروتروف موجود در پساب ها به روش پورپلیت انجام گرفت. جهت جداسازی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک از روش انتشار در آگار استفاده شد. ترکیبات این محیط عبارتند از پیتون: ۴ گرم، عصاره مخمر: ۱ گرم، گلوکز: ۲ گرم، آگار: ۱۵ گرم. ترکیبات فوق را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C در اتوکلاو استریل شد. هنگامی که حرارت محیط کشت در حدود ۵۵°C رسید، محلول فلزی به محیط کشت افزوده شد. محیط کشت حاوی نمک سدیم دی هیدروژن آرسنات با غلظت ۰/۱ مولار بود. pH محیط کشت برابر با ۷ تنظیم شد. پس از رشد کلنی های مقاوم در دمای ۳۰°C به مدت ۲ تا ۵ روز ، کلنی ها در لوله های حاوی محیط کشت PHG II براث با همان غلظت فلز محیط اولیه (۰/۵ میلی مولار) غنی سازی و خالص سازی شد (۱۶).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد آرسنیک

به منظور تعیین MIC آرسنیک بر روی باکتری های مقاوم جداسازی شده از روش انتشار در آگار استفاده شد. برای این هدف پلیت های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت های مختلف فلز (۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی مولار و غلظت های مابین آنها) تهیه شد به طوری که هر پلیت حاوی یک غلظت معین از فلز بود. سپس کلنی های مقاوم به صورت شعاعی بر سطح پلیت کشت داده شد و نهایتاً پلیت ها به مدت ۲ روز در ۳۰°C قرار داده ۱۷شد. بر اساس حداقل غلظتی از فلز که از رشد باکتری ممانعت کرده بود، MIC تعیین گردید (۱۷).

شناسایی مولکولی باکتری های مقاوم به آرسنیک

به منظور شناسایی مولکولی باکتری ها توالی ژن 16S rRNA آنها با استفاده از پرایمرهای یونیورسال تکثیر گردید و توالی های تکثیر شده در سایت NCBI به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت بر اساس همولوژی ۹۵ تا ۹۹ درصد، گونه باکتری شناسایی شد (۱۸).

نتایج

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های پساب مورد مطالعه۲

نتایج اندازه گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی و همچنین غلظت آرسنیک در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: پارامترهای فیزیکو شیمیایی و میزان آرسنیک پساب ها

پساب ها	دما (°C)	pH	BOD5 (mg/l)	COD (mg/l)	مقدار آرسنیک (mg/L=ppm)
ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر	۱۶/۸	۷/۳۳	۸۷۰	٤٥٧٣	۰/۷۳۰
پساب شرکت پلی‌اکریل اصفهان	۱٤/۹	۷/۲٤	۳۷۵	۲۰۹۳	۱/۸۹۵

میانگین جمعیت باکتری های هتروتروف در پساب تصفیه خانه فاضلاب شاهین شهر و پساب کارخانه پلی اکریل اصفهان به ترتیب برابر با ۱۰۱۲×۵۰۱/۷ و ۱۰۱۲×۵/۴۵ cfu/ml بود وتفاوت معنی داری در میانگین جمعیت باکتری های دو پساب مشاهده نشد (P>۰/۰۵). به طور کلی ۴ جدایه باکتریایی (As, As2, As3, As4) مقاوم به آرسنیک از دو پساب جداسازی شدند، که مشخصات آنها همراه با نتایج حاصل از بررسی میزان مقاومت آنهابه آرسنیک بر اساس حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) در جدول ۲ ارائه شده است. بالاترین میزان MIC و MBC متعلق به جدایه As3 به ترتیب برابر با ۱۴ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج شناسایی مولکولی بامشاهده می شود.

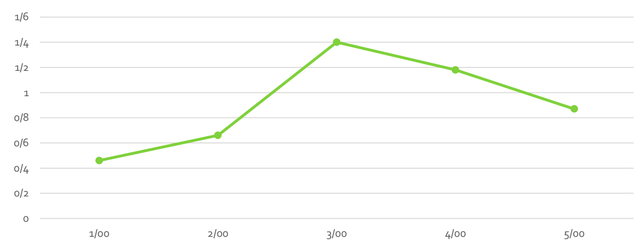
جدول ۲: خصوصیات باکتری ها و مقاومت آنها به آرسنیک

علامت اختصاری	مورفولوژی	واکنش گرم	MIC (میلی گرم بر میلی لیتر)	MBC (میلی گرم بر میلی لیتر)
As1	باسیل	گرم مثبت	۷	۸
As2	باسیل	گرم منفی	۷	۸
As3	باسیل	گرم منفی	۱٤	۱٦
As4	باسیل	گرم منفی	۸	۱۰

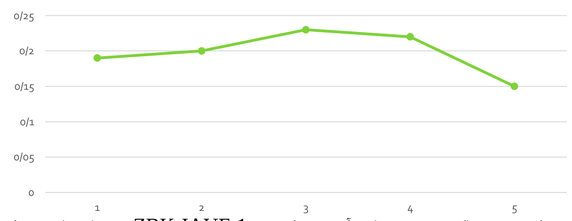
جدول ۳. شناسایی مولکولی جدایه ها

علامت اختصاری	نام جنس و گونه باکتری
As1	*باسیلوس سفنسیس* OPL
As2	*سودموناسآئروژینوزا* ZBK-IAUF-11
As3	*استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه IR Isfahan (G)
As4	*استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه 5633

نتایج نمودار ۱ نشان می دهد که، میزان جذب آرسنیک توسط سودموناس آئروژینوزا ZBK-IAUF-11در دقایق ابتدایی (۰ تا ۴۰ دقیقه) سریعتر بوده است ولی در زمان ۴۰ الی ۸۰ دقیقه این روند با سرعت خیلی پائینتری دنبال شده است. سپس در فاصله زمانی ۸۰ الی ۱۲۰ دقیقه روند جذب با شتاب تندتری ادامه یافته است و ۱۲۰ دقیقه بعد افت شدیدی در جذب ارسنیک نشان داده است. و در فاصله ۱۲۰ تا ۱۶۰ دقیقه نیز مجدداً افت شدید مشاهده می شود. با توجه به نمودار ۲ می توان چنین استنباط نمود که رشد باکتری در حضور فلز آرسنیک نیز با روند جذب آن هم خوانی داشته است. به طوری که تا ۸۰ دقیقه اول روند افزایشی با شیب ملایم نشان داده است و پس از آن با گذشت زمان کاهش چشمگیری بدنبال داشته است.



نمودار ۱. میزان جذب آرسنیک توسط باکتری *سودموناس آئروژینوزا* سویه ZBK-IAUF-1 در زمان های مختلف (۱: زمان صفر، ۲: ۴۰ دقیقه، ۳: ۸۰ دقیقه، ۴: ۱۲۰ دقیقه، ۵: ۱۶۰ دقیقه پس از شروع انکوباسیون).



نمودار ۲. میزان بیومس باکتری *سودموناس آئروژینوزا* سویه ZBK-IAUF-1 در زمان های مختلف (۱: زمان صفر، ۲: ۴۰ دقیقه، ۳: ۸۰ دقیقه، ۴: ۱۲۰ دقیقه، ۵: ۱۶۰ دقیقه پس از شروع انکوباسیون).

بحث و نتیجه گیری

در بررسی حاضر ابتدا برای غنی سازی وجداسازی باکتری های مقاوم به ارسنیک، از محیط کشتIIPHG حاوی مونو سدیم ارسنات ۰/۱ مولار استفاده شد. سپس باکتری هایی که بیشترین مقاومت را به آرسنیک نشان داده بودند، جهت ارزیابی مقاومت به غلظت‌های بالاتر آرسنیک مورد بررسی قرار گرفتند و از مقاوم ترین جدایه‌ها برای حذف زیستی آرسنیک در شرایط آزمایشگاهی *استفاده* شد. جدایه های مقاوم به آرسنیک مربوط به های *استنوتروفوموناس* مالتوفیلیا 5633، *استنوتروفوموناس مالتوفیلا* (IR-Isfahan (G، *سودوموناس ائروژینوزا* ZBK و *باسیلوس سفنسیس* OPL بودند که با روش کلنی- PCR شناسایی مولکولی شدند. گونه های متعلق به جنس های *استنوتروفوموناس* و *سودوموناس* در مطالعات قبلی هم به عنوان جدایه های مقاوم به آرسنیک شناسایی شده بودند، به عنوان مثال کای و همکاران (۲۰۰۹) از نمونه های مختلف خاک، باکتری های مقاوم به آرسنیک را جداسازی کردند. این باکتری ها شامل جدایه هایی از جنس های *اسینتوباکتر*، *آگروباکتریوم*، *آرتروباکتر*، *کوموموناس*، *رودوکوکوس*، *استنوتروفوموناس* و *سودوموناس* بودند که با MIC بالاتر از ۲ میلی گرم بر لیتر به آرسنیک مقاومت نشان داده بودند (۱۹). *استنوتروفوموناس* در سایر مطالعات نیز از جمله مقاوم ترین باکتری ها به آرسنیک گزارش شده است (۲۰). استنوتروفوموناس مالتوفیلا هم از جمله باکتری هایی است که در مطالعات قبلی بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی از آن گزارش شده است و ژن های مقاومت هم به کرات در آن مطالعه شده است (۲۱، ۲۲).

بیشتر مطالعات جذب و حذف زیستی آرسنیک با استفاده از گیاهان، طی پدیده جذب زیستی گیاهی (Phytoremediation) انجام شده است و گزارش های محدودتری در زمینه جذب و حذف زیستی با استفادهاز باکتری ها وجود دارد (۲۳). در مورد باکتری ها بیشتر تحقیقات نیز بر روی مقاومت نسبت به آرسنیک صورت پذیرفته است (۲۴) و در زمینه حذف و جذب زیستی به وسیله این میکروارگانیسم‌ها نیاز به تحقیقات بیشتری احساس می‌شود. میکروارگانیسم‌ها معمولاً سمیت آرسنیک را از طریق اکسیداسیون کاهش می‌دهند. در مطالعه حاضر مطابق با نمودارهای ۱ در قسمت یافته ها سودوموناس ائروژینوزای ZBK-IAUF-1 جداسازی شده نیز قادر به حذف زیستی آرسنیک با غلظت ۱/۴میلی گرم در لیتر در شرایط آزمایشگاهی و مطابق با نمودار ۲ قادر به ورود این فلز در بیوماس باکتریایی در سلول خود بود. البته در مطالعه حاضر مکانیسم سمیت زدایی مورد بررسی قرار نگرفت.

نتیجه گیری کلی

یافته های این تحقیق نشان داد که، سویه‌های توانمند باکتریایی تا حدودی مقاوم به آرسنیک از نمونه‌های پساب جداسازی شدند ولی نکته قابل توجه در این یافته‌ها این بود که مقاوم ترین جدایه به آرسنیک، مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه هم نشان داده بود که این نتیجه می تواند نشان دهنده‌ی قابلیت بالای این جدایه ها در انتقال افقی ژن‌های مقاومت به آرسنیک و آنتی بیوتیک‌ها باشد. *سودوموناس ائروژینوزا* سویه ZBK-IAUF-1 جداسازی شده در این تحقیق نه تنها تا حدودی حساسیت قابل توجهی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان داد. بلکه همچنین در شرایط آزمایشگاهی قادر به حذف زیستی تا مرز ۱/۴ میلی گرم در لیتر آرسنیک بود و به عنوان یک سویه برتر باکتریایی جهت حذف زیستی آرسنیک پس از مطالعات بیشتر بر روی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حذف کامل آنها پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. WHO. 2010. Guideline for drinking water quality recommendation, Vol. 1, Geneva: World Health Organization, 154 p.
2. Mahvi AH. 2008. Application of agricultural fibers in pollution removal from aqueous solution. International Journal of Environmental Science and Technology, 5(2): 275-285.
3. Shen Z, Han J, Wang Y. 2013. The contribution of ArsB to arsenic resistance to Campilobacterjejuni. PLOS ONE, 8(3): e58894.
4. Abbas SZ, Riaz M, Ramzan N, Zahid MT, Shakoori FR, Rafatullah M. 2014. Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. Brazilian Journal of Microbiology, 45(4): 1309-1315.
5.Finnegan PM Chen W. 2012. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. Front Physiol. 3: 182.
6. Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, Aposhian HV, Graziano JH, Thompson C, Suk WA. 2013. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. Environmental Health Perspectives, 121(3): 295-302.
7. Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, Zeng G, Liu C, Wan Y, Chen J, He Y. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaorendophytic bacterium Bacillus sp. L14.Bioresource Technology, 101(22): 8599-8605.
8. Dey U Chatterjee S Mondal NK. 2016. Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria and possible application in bioremediation. Biotechnology Report, 10: 1-7.
9. Vijayaraghavan K, Yun YS. 2008. Bacterial biosorption. Biotechnology, 26: 266-291.
10. Chattopadhayay MK, Grossart HP. 2010. Antibiotic resistance intractable, and here's why. British Medical Journal, 341: c6848.
11. Chattopadhayay MK, Grossart HP. 2011. Antibiotic and heavy metal resistance of bacterial isolates obtained from some lakes in northern Germany. NSHM Journal of Pharmacy and Healthcare Management, 2: 74-75.
12. Fillali BK, Taoufik J, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. 2000. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Current Microbiology, 41: 151-156.
13.Pumpel T, Perfub B, Pigher B, Diels L, Schinner F. 1995. A rapid screening method for the isolation of metal accumulating microorganism. Journal of Industrial Microbiology, 14: 213-217.
14. Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed., USA: American Public Health Association, 1496p.
15. Baghel A, Singh B, Pandey P, Sekhar K. A 2007.A rapid field detection method for arsenic in drinking water. Analytical Sciences, 23(2):135-7.
16. Cappuccino JG, Sherman N. 1996. Microbiology, A Laboratory Manual. 4th Ed. California: The Benjamin-Cumming Publishing Company, Menlopark, 186 p.
19. Mishra V, Sharma R. 2015. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using fresh peels extract of Punicagranatum and its antimicrobial activities. International Journal OfPharma Research and Health Sciences, 3(3): 694-699.
20. Cai L, Liu G, Rensing C, Wang G. 2009. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. BMC microbiology, 9(1):4.
21. Achour AR, Bauda P, Billard P. 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. Research in microbiology, 158(2): 128-137.
22. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebaihia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of Stenotrophomonasmaltophilia reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome biology. 2008 Apr;9(4):R74.
23 Finnegan PM Chen W. 2012. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. Front Physiol. 3: 182.
24. Zhang L, Liao Q, Shao S, et al. 2015. Heavy metal pollution fractionation and potential ecological risks in in sediments from Lake Chaohu (Estern China) and the surrounding rivers.Intternational Journal of Environmental Research and Public Health. 12(11): 14115-31.