مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار ۱۳۹۰، دوره سوم، شماره هشتم، صفحه ۲۲-۱۳

بررسی مقاومت به کرومات و احیای آن توسط باکتریهای جدا شده از پساب صنایع استان قم با پتانسیل بالقوه در پاکسازی سبز

محمدرضا ذوالفقاری[۱]، محمد سلیمانی[۱]، معصومه مسعودیخواه[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم ، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

نویسنده مسؤول: دکتر محمدرضا ذوالفقاری، استادیار گروه میکروبشناسی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
Mreza.Zolfaghary@gmail.com:

دریافت: ۹۰/۱/۱۵ پذیرش: ۹۰/۳/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: استفاده وسیع از کروم شش ظرفیتی در صنایع مختلف منجر به آلودگیهای محیطی شده است و سمیت آن برای انسان بواسطه‌ی آلودگیهای آبی و خاک و یا از طریق تماس شغلی اتفاق می‌افتد. لذا به دلیل این اثرات معکوس، EPA (Environmental Protection Agency) کروم را به عنوان یکی از هفده ماده‌ی شیمیایی تهدید کننده بزرگ سلامت موجودات زنده معرفی کرده است. باکتریها، قادر به احیای Cr(VI) به فرم غیر محلول و با سمیت کمتر Cr(III) هستند؛ لذا پاکسازی زیستی کرومات، با استفاده از میکروبهای احیا کننده Cr(VI) کارایی پروسه‌های سمیت زدایی کروم را افزایش داده واین روزها مورد توجه بسیاری قرار گرفته است.

روش بررسی: ۲٤۱ باکتری مقاوم به کروم جدا شده از پساب صنایع استان قم برای بررسی مقاومت به Cr(VI) و توانایی احیای آن، آزمایش شدند. اثر فاکتورهای متغیری چون pH ، زمان، دما، هوادهی و غلظت ابتدایی فلز بر میزان احیای Cr(VI) توسط سویه‌ی برتر مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: باکتری گرم مثبت احیا کننده کروم که از پساب نساجی جدا شده بود، بر اساس ویژگیهای بیوشیمیایی، فنوتیپی و آنالیز ۱٦S rRNA به عنوان *Staphylococcus arlettae* سویه‌ی *R۸-٦A* شناسایی گردید که می‌توانست Cr(VI) را تا سقف ۷۷۰ میلی‌مولار تحمل کند و قادر به احیای ۹٦/۳٪ فرم بسیار سمی ومحلول Cr(VI) به فرم غیر سمی و غیر محلول Cr(III) طی ٤۸ ساعت بود. ماکزیمم حذف کروم برای این سویه، در شرایط بهینه غلظت ابتدایی ۰/۳ mM، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ٦/۵ : pH و دور شیکر ۵۰ rpm اتفاق افتاد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که کنسرسیومهای میکروبی و کشتهای خالص ایزوله‌های معرفی شده برای سمیت زدایی محیطهای آلوده به کروم در بعد صنعتی می‌توانند مفید واقع گردند.

واژه‌های کلیدی: کروم، پسابهای صنعتی، پاکسازی زیستی، باکتریهای مقاوم، سمیت زدایی

www.SID.ir

مقدمه

افزایش سریع جمعیت و به دنبال آن صنعتی سازی که از نشانه‌های بارز تمدن در دنیاست در چند دهه اخیر، اثرات معکوسی بر محیط زیست به جای گذاشته‌است. استفاده وسیع از مواد شیمیایی و آزاد سازی آنها در محیط، عامل تخریب زمینهای کشاورزی، آبهای سطحی و زیر زمینی گشته و نهایتا می‌توان گفت که زندگی موجودات زنده را به مخاطره انداخته است، لذا یکی از نگرانی های عمده بشر در دنیای کنونی اثرات مخرب پسماندهای این صنایع در محیط می‌باشد که از مهمترین آنها فلزات سنگین است(۱).کروم یکی از این ترکیبات فلزی است که به دلیل اهمیت اقتصادی بالا بطور گسترده در صنایع مختلف از جمله تهیه آلیاژهای کرومی، آبکاری کروم، ترکیبات بازدارنده‌ی خوردگی، شیشه‌سازی، تهیه پیگمان، صنعت نساجی، صنایع چوب، عکاسی، دباغی، تولید سیمان، فرش، نوارهای مغناطیسی و ساخت اجزای ماشین و هواپیما بکار رفته و ورود آن به محیط زیست از طریق پساب این صنایع اجتناب ناپذیر است و به دلیل حلالیت بالایی که دارد آلودگی توسط آن به سرعت به سایر مناطق منتقل می‌گردد و سالانه حدود ۱۷۰۰۰ تن از پسابهای کرومی به محیط سرازیر می‌گردد(۶-۲). بنابر نظر DOE (Department Of Energy) درمناطق آلوده، دومین آلاینده فلزی رایج در محیط کروم می‌باشد که در محدوده بین ۰/۰۰۸ تا ۱۷۳ µM در آبهای زیر زمینی، ۹۸ nM در خاک و ۷۶mM در رسوبات وجود دارد(۷). Cr(VI) ظرفیتی بین ۲- تا ۶+ داشته و فقط فرم ۳ و ۶ ظرفیتی آن اهمیت زیادی دارند. نظر به اینکه محدودیت Cr(VI) در آبهای آشامیدنی متجاوز از ۰/۰۵ mg/l و دوز کشنده‌ی خوراکی آن mg/kg ۷۱ وزن بدن است و بنابرنظر انجمن سلامت و امنیت شغلی (OSHA) که میانگین تماس با Cr(VI) را بین $0/0005\ mg/m^3$ و ۱/۰ برای ۸ ساعت کار روزانه و ۴۰ساعت کار هفتگی اعلام کرده است، می‌توان پی به سمیت آن برای موجودات زنده برد زیرا به شدت موتاژن، کارسینوژن و تراتوژنیک است و فاکتورهای متعددی در سمیت آن دخیل هستند(۸). به خاطر شباهت ساختمانی کرومات به SO_4^{-2} ، به آسانی از طریق سیستم انتقال سولفات در یوکاریوتها و باکتریها به سلول منتقل و داخل سلول به طرق آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک احیا شده و با ایجاد رادیکالهای آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال(ROS) ، اثرات مخربی روی DNA گذاشته با گروههای کربوکسیل و سولفیدریل آنزیمها ترکیب و سبب تغییر ساختار یا نحوه‌ی فعالیت آنها می‌شوند(۹). استنشاق ترکیبات شش ظرفیتی کروم، در دراز مدت باعث سرطان ریه و تماس مداوم با آن با پوست، عامل درماتیت و زخمهای پوستی، تخریب رنگدانه‌های پوستی ، ناراحتی‌های چشمی، بی‌نظمی در کار کلیه و سرطان پروستات می شود(۱۰). اگر این فلز به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن برسد، منجر به زخم معده، التهاب مخاط دستگاه گوارشی، آسیبهای کلیوی، نکروز کبدی و نهایتا مرگ می‌گردد. این اشکال همچنین عامل کاهش رشد در گیاهان و تغییر مورفولوژی در آنهاست و ضمن تجمع در جفت، رشد جنین در حیوانات را مختل می‌کند، در حالیکه Cr(III) یک ماده‌ی مغذی ضروری برای پیشبرد عملکرد انسولین، مصرف قند، پروتئین و چربیهاست (۱۱).

در نهایت با توجه به آنچه از مضرات کروم شش ظرفیتی برای محیط گفته شد، می‌توان دریافت که حذف آن از محیط موضوعی اساسی و قابل اهمیت است که این روزها، از چالشهای اصلی در زمینه آب و پساب می‌باشد. روشهای متعارف برای حذف اکسی آنیونهای سمی کرومات از محیط شامل احیای شیمیایی، تعویض یونی، جذب با ذغال فعال، زاج، خاکستر و کائولینیت فعال، متیلاسیون و اسمز معکوس است که اغلب این روشها نیازمند انرژی بالا ، مواد و تجهیزات گران قیمت بوده و لذا بسیار هزینه بر هستند و تولید لجن های سمی می‌کنند در نتیجه دسترسی به روشهای موثرتر و تکنیکهای کارامدتر به جهت حذف Cr(VI) از پسابهای صنعتی مورد نیاز است. از این رو پژوهشگران روی به سوی تکنولوژی سبز آورده اند که پاکسازی زیستی قسمتی از این تکنولوزی را دربر می‌گیرد و امیدوارند با جداسازی و شناسایی میکروارگانیسمهای مقاوم بتوانند میزان سمیت پسابهای صنعتی را به میزان بسیار زیاد و با صرف هزینه‌های پائین کم کنند وگام موثری در جهت پاکسازی محیط زندگی موجودات زنده بردارند(۶). محدوده وسیعی از میکروارگانیسمها شامل باکتریها، مخمرها، جلبکها، پروتوزوآها و قارچها در جریانات حاوی کروم یافت شده‌اند که به روشهای مختلفی شامل جذب زیستی، متیلاسیون، اکسیداسیون و احیا از خود در مقابل اثرات سمی کروم محافظت می‌کنند که موثرترین روش در این بین احیا می‌باشد (۱۲). از زمان اولین گزارش، مبنی بر احیای کاتالیز شده میکروبی Cr(VI) به Cr(III) توسط

www.SID.ir
Archive of SID

Romanenko and Koren'Ken، احیای زیستی کرومات(*bioreduction*) به منظور سمیت زدایی و پاکسازی زیستی آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است(1). احیاء، توسط میکروارگانیسمها می‌تواند در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی اتفاق بیفتد، باکتریهای هوازی مثل *Pseudomonas 1 ambigua G-*، *Pseudomonas putida* و *Streptomyces (sp)*. با کمک کرومات ردوکتاز وابسته به NAD(P)H می‌توانند کرومات را احیا کنند(1) گزارش شده است که در اکثر سیستمهای هوازی آنزیمهای کرومات ردوکتاز، محلول در سیتوزول هستند و Cr(VI) را داخل سلول و یا بیرون از غشای پلاسمایی به Cr(III) احیا می‌کنند(1). معمولا در شرایط بی‌هوازی احیا به کمک یک متابولیت باکتریایی مثل H_2S یا Fe^{+2} واسطه می‌گردد که توسط سایر باکتریها مانند احیا کنندگان سولفات تولید می‌شود (2). هدف این مقاله، جداسازی، شناسایی و ارزیابی احیای Cr(VI)، توسط باکتریهای جدا شده از پساب صنایع استان قم و بهینه سازی این باکتریها جهت بالا بردن توانایی حذف کروم برای استفاده در بعد صنعتی می‌باشد.

روش بررسی

نمونه گیری از پسابهای آلوده: نمونه گیری توسط ظروف نمونه‌برداری مخصوص(بطری شیشه‌ای استریل شده درب دار و از جنس شیشه مقاوم به حجم 250 میلی‌لیتر) صورت گرفت و دقت شد که سر ظروف نمونه گیری به جهت همگن ساختن نمونه و برداشت آن به میزان 3 سانتی‌متر خالی بماند. بعد از نمونه‌گیری و یادداشت دما توسط دماسنج در محل نمونه گیری، pH توسط pH متر، تاریخ نمونه‌گیری و محل نمونه‌برداری، نمونه‌ها سریعا به فلاسک یخ منتقل شدند تا در کمترین زمان ممکن، آزمایشات لازم روی آنها انجام بگیرد.

جداسازی باکتریهای مقاوم به اکسی‌آنیون سمی کرومات: از ظروف حاوی نمونه های پساب، بعد از هموژن کردن کامل آنها در شرایط کاملا استریل یک میلی لیتر برداشته و طی تکنیک غنی سازی به 9 میلی لیتر محیط لوریا برتانی براث (Lauria Bertani Broth) اضافه شد(13). نمونه ها را در دور شیکر 140و دمای 34 درجه سانتی‌گراد، به مدت 24 ساعت گرماگذاری کرده، سپس از نمونه های غنی شده یک میلی لیتر برداشته و با 9 میلی لیتر سرم فیزیولوژی، رقتهای 10^{-1} تا 10^{-7} را تهیه شد. نهایتا از رقتهای 10^{-5} تا 10^{-7}، 100 میکرولیتر برداشته و در محیط لوریا برتانی آگار حاوی 5 میلی مولار کرومات پتاسیم با کمک میله شیشه‌ای L شکل کاملا پخش شد. سپس پلیتها در 34 درجه سانتی‌گراد به مدت ده روز گرماگذاری شد. کلنی هایی که توانستند تا این سقف از غلظت کرومات پتاسیم را تحمل کرده و رشد کردند خالص سازی شدند و با کمک محیط لوریا برتانی آگار به اضافه مقادیر مختلف غلظت کرومات پتاسیم در محدوده‌ی 5 تا 770 میلی مولار (Minimum Inhibitory Concentration) MIC آنها تعیین گشت. شناسایی باکتریهای خالص شده مطابق با کتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology صورت گرفت.

شناسایی جدایه‌های میکروبی مقاوم به کرومات: مورفولوژی کلنی بر روی محیط نوترینت آگار(Nutrient Agar) در دمای 34 درجه سانتی‌گراد و بعد از 24 ساعت گرماگذاری مشاهده شد. واکنش گرم، حرکت، شکل و رنگ کلنی، کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، احیای نیترات، متیل رد، وژرپرسکوئر و تولید اندول بر اساس روشهای Smibert و Krieg انجام گرفت (14). تولید اسید از کربوهیدراتها، بررسی مصرف منابع کربنی و منابع نیتروژنی بر اساس روش و محیط توصیه شده Ventosa و همکاران تعیین گردید(15). تحمل نمک سدیم کلراید در حضور تراکم 0 تا 30 درصد ، رشد در دماهای 10، 15، 20، 25، 30، 35، 40، 45 و 50 و محدوده pH برای تنظیم نهایی بین 5 تا 11 بررسی شدند و در تمام ازمایشات به جز موارد متغیر، دما برابر 34 درجه سانتی‌گراد، pH: 7 ، 140 rpm و در محیط نوترینت براث طراحی شد (16). تعیین توالی 16S rRNAسویه برتر، جهت شناسایی مولکولی سویه مورد نظر، بعد از کشت 24 ساعته در محیط لوریابرتانی آگار(LBA)، DNA ژنومی با استفاده از کیت DNP محصول شرکت سیناژن بر طبق پروتکل شرکت، استخراج شد و به منظور مشاهده‌ی DNA ژنومی، الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1% صورت گرفت، سپس ژن 16S rDNA سویه، با کمک پرایمرهای یونیورسال باکتریایی تکثیر شد. توالی پرایمرها به قرار ذیل می باشد.

(*Forwar* 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG- 3')

(Rev5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')

برنامه حرارتی واکنش بصورت دناتوراسیون آغازی در دمای 94 درجه سانتی گراد، به مدت 5 دقیقه برای یک سیکل،

Archive of SID
www.SID.ir

دناتوراسیون در دمای ۹۴°C، مدت ۳۰ ثانیه ، اتصال پرایمرها در دمای ۵۷°C، مدت ۱ دقیقه، تکثیر در دمای ۷۲ °C، مدت ۱ دقیقه که این سه مرحله به تعداد ۳۰ سیکل تکرار شد درنهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C، به مدت ۱۰ دقیقه برای ۱ سیکل صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مدنظر که اندازه‌ای حدود ۱/۵Kb داشت ۵ µl از محصول PCR، الکتروفورز گردید و پس از استخراج باند هدف از ژل، با استفاده از کیت Gel Extraction Kit شرکت Core-OneTM (Cat.No. GE-100) با ارسال به آزمایشگاه seq lab آلمان تعیین توالی گشت.

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: دیسکهای آنتی‌بیوتیکی پنی سیلینG (P_{10}) (Pad Tan teb) ، آمپی‌سیلین (Am_{10}) (PT) ، سیپروفلوکسازین (CP_5) (Biomerieux) ، اریترومایسین (E_{15}) (PT) ، کلرامفنیکل (C_{30}) (PT) ، تتراسیکلین (TE_{30}) (PT) ، نئومایسین (N_{30}) (PT) ، جنتامایسین (GM_{10}) (PT) ، نورفلوکسازین (NOR_{10}) (PT) ، ریفامپیسین (RA_5) (PT) ، استرپتومایسین (S_{10}) (PT) ، سفیکسیم (CFM5) (PT) ، کانامایسین (K_{30}) (PT) برای آنتی بیوگرام استفاده گردید.

برای آنتی‌بیوگرام در محیط (Trypticase Soy Broth) TSB از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری مورد نظرسوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و توسط سواب استریل از هر نمونه برداشته و در محیط MHA(Muller Hinton Agar) به طور انبوه کشت داده شد و دیسکهای آنتی‌بیوتیک با فواصل مشخص، یعنی ۲/۵ سانتی‌متر از مرکزدیسک کناری و ۱/۵ سانتی‌متر از لبه‌ی پلیت قرار داده شدند. سپس پلیتها به صورت وارونه در ۳۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت۲۴ ساعت گرماگذاری شدند(۱۷). در نهایت قطر هاله ی عدم رشد با خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد و با عناوین مقاوم، حساس و حدواسط گزارش گردید.

بررسی مقاومت به اکسی آنیون سمی کرومات: برای سنجش مقاومت سویه های باکتریایی جدا شده از پسابهای صنعتی، الگوی مقاومت بر اساس MIC با غلظتهای ۵ تا ۷۷۰ میلی مولار کرومات پتاسیم با روش رقت در آگار (Agar Dilution Method) در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ روز گرماگذاری در محیط لوریا برتانی آگار صورت گرفت. پائین ترین تراکم از اکسی‌آنیون، که کاملا مانع رشد باکتری می‌گردد MIC نامیده شد(۱۶).

بررسی احیای کروم: از سوسپانسیون باکتری به میزان ۲۵۰ میکرولیتر با کدورت ۰/۵ مک فارلند، داخل ارلن ۱۰۰ میلی لیتر حاوی ۲۵ میلی لیتر نوترینت براث حاوی ۰/۳ میلی مولار کرومات پتاسیم تلقیح و در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ تا ۱۴۴ساعت در انکوباتور شیکردار با دور شیکر ۱۴۰ rpm گرماگذاری شد. سپس از طریق سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه، توده باکتریایی جمع آوری و سوپرناتانت از لحاظ میزان کروم باقی‌مانده بررسی شد. فعالیت احیای کروم از طریق کاهش میزان کروم سوپرناتانت و با استفاده از روش رنگ سنجی (Spectrophotometric measurements) و معرف DPC (1,5- Diphenyl carbazide) بررسی شد که برای جلوگیری از فساد، معرف مورد نظر با استون/ H_2SO_4 ترکیب شد. Cr(VI) موجود در سوپرناتانت با DPC در محلول اسیدی واکنش داده و بنفش رنگ می‌گردد که جذب آن در طول موج ۵۴۰ nm قابل اندازه‌گیری است(۱۸و۱۹). واکنش اکسیداسیونی، معرف دی‌فنیل کاربازید(DPC) را به دی‌فنیل کاربازون تبدیل نموده و احیای Cr(VI) به Cr(III) توسط این ترکیب مهار می‌گردد. محققینی چون Howick ثابت کردند که مخلوط Cr(III) و دی‌فنیل کاربازید منجر به ایجاد رنگ بنفش نمی‌شود و این واکنش برای Cr(VI) و دی فنیل کاربازید اختصاصی است(۱۶).

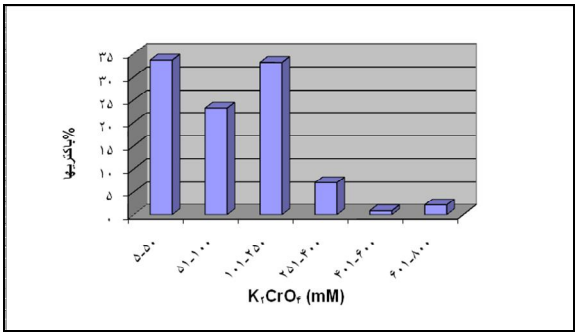
بررسی اثر فاکتورهای محیطی بر میزان احیا و حذف کرومات پتاسیم: میزان حذف کروم توسط سویه، در غلظتهای ابتدایی کرومات پتاسیم (۱-۰/۱mM) ، pH (۱۱-۵)، دمای (۴۰°C- ۲۵) و دور شیکر(۲۰۰rpm -۵۰) در محیط نوترینت براث بررسی شد(۱۹).

یافته‌ها

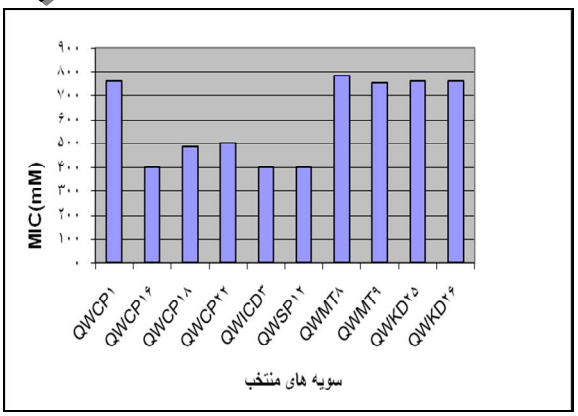
جداسازی باکتریهای مقاوم به کروم و تعیین MIC : از ۲۴۱ باکتری جدا شده از پساب صنایع گالوانیزه، آبکاری، نساجی و رنگرزی، درصد مقاومت به اکسی‌آنیون سمی کرومات پتاسیم در شکل ۱ نشان داده شده‌است. بر طبق شکل، ۳۴/۳٪ از باکتریهای مقاوم در محدوده‌ی ۵۰-۵ میلی‌مولار، ۲۳/۲٪ در محدوده‌ی ۱۰۰-۵۱ میلی‌مولار، ۳۳/۱٪ در محدوده‌ی ۲۵۰-۱۰۱ میلی‌مولار، ۷/۰۵٪ در محدوده‌ی ۴۰۰-۲۵۱ میلی‌مولار، ۰/۸۲٪ در محدوده‌ی ۶۰۰-۴۰۱ میلی‌مولار و

www.SID.ir
Archive of SID

2/07% در محدوده‌ی 800-601 میلی‌مولار کرومات پتاسیم قرار داشتند. از مجموع باکتریهای جدا شده، تعداد ده سویه بالاترین مقاومت را نشان دادند،که میزان مقاومت آنها در شکل 2 نشان داده شده است. در بین آنها جدایه‌ی $QWMT_8$ بدست آمده از پساب نساجی مهرگان توانست تا سقف 770 میلی مولار کرومات پتاسیم را تحمل کند و به آنتی بیوتیکهای پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین و سفیکسیم نیز مقاومت نشان دهد، نتایج آنتی‌بیوگرام در جدول 1 قابل مشاهده است. بررسی‌های فنوتیپیک و مورفولوژیک نشان داد سویه موردنظر یک کوکسی گرم مثبت فاقد اسپور، متیل رد مثبت و با توانایی تولید کاتالاز است و کلنی این سویه نرم و شیری رنگ می‌باشد. تستهای بیوشیمیایی بیانگر توانایی این سویه در مصرف قند گالاکتوز و رنج وسیعی از اسیدهای آمینه شامل تریپتوفان، آسپاراژین، لوسین، گلیسین، فنیل آلانین، متیونین، لیزین، آلانین، آرژینین، والین و هیستیدین و کربوهیدراتهای گلوکز، ساکاروز، ریبوز، مانیتول، مالتوز بود، همچنین این سویه قادر به هیدرولیز اسکولین و احیای نیترات نیز بود و توانست در حضور مانیتول، اسید تولید کند. از ویژگیهای دیگر این سویه فعالیت آنزیمهای لیزین دکربوکسیلاز و فنیل‌آلانین دآمیناز آن بود، در کنار این تستها برای شناسایی دقیق‌تر سویه مطالعات 16S rRNA نیز صورت گرفت که در شکل 3 نتایج ظهور باند الکتروفورز در منطقه‌ی 1/5 kb، تایید کننده‌ی خلوص محصولات PCR نمونه‌ی ژنوم مورد نظر برای تعیین توالی است. در ادامه، نمونه‌ی تعیین توالی شده توسط سرویس *BLAST* آنالیز شد و با کمک سایت اینترنتی *NCBI* باکتری تعیین هویت گردید و به عنوان *Staphylococcus arlettae R8-6A strain* شناسایی شد.



شکل1. محدوده‌ی مقاومت به کرومات پتاسیم در سویه‌های جدا شده از پساب صنایع استان قم



شکل2. محدوده‌ی مقاومت ده سویه‌ی برتر به کرومات پتاسیم

جدول1. حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ی QWMT8

دیسک آنتی بیوتیک	مقاومت	دیسک آنتی بیوتیک	مقاومت
کلرامفنیکل(C30)	S	جنتامایسین ($GM1_0$)	S
ریفامپیسین (RA5)	S	اریترومایسین (E15)	R
نئومایسین (30	S	نورفلوکسازین (NOR10)	S
استرپتومایسین(S10)	S	تتراسیکلین (TE30)	S
پنی سیلین (P10)	R	سفیکسیم (CFM5)	R
آمپیسیلین (Am10)	R	کانامایسین (K30)	S
سیپروفلوکسازین (CP5)	S	باسیتراسین (B10)	S

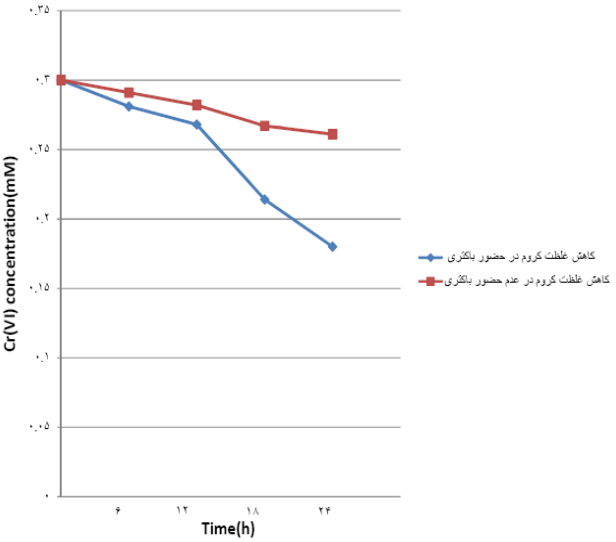
حدواسط: I مقاوم: R حساس :S

شکل3. نتایج PCR برای تشخیص مولکولی

1. Ladder 1 Kb (fermentas)
2. Sample QWMT ۸with ۸Forward and ۱۵۴۱ Rev Primers
3. Sample QWMT ۸with ۸Forward and ۱۴۹۲ Rev Primers
4. Negative control

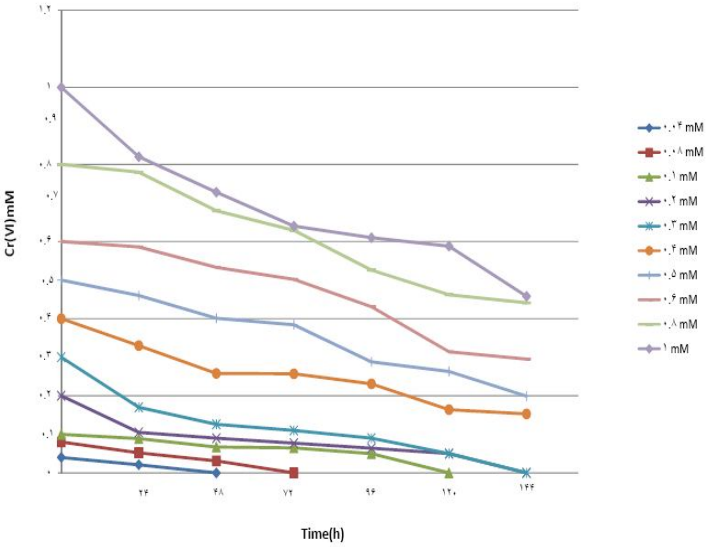
www.SID.ir
Archive of SID

اثر پارامترهای مختلف بر میزان حذف کرومات پتاسیم: برای بررسی میزان حذف کرومات پتاسیم و اثر پارامترهای مختلف بر آن توسط سویه‌ی $QWMT_8$ ، ابتدا منحنی استاندارد کرومات پتاسیم با استفاده از معرف DPC و به روش رنگ سنجی رسم شد. بعد از ۲۴ ساعت سویه‌ی $QWMT_8$ توانست به میزان ۵۸/۷۶ درصد کروم موجود در محیط را حذف کند و غلظت آنرا از ۰/۳ به ۰/۱۸ میلی‌مولار برساند، شکل۴ بیانگر این مطلب است.



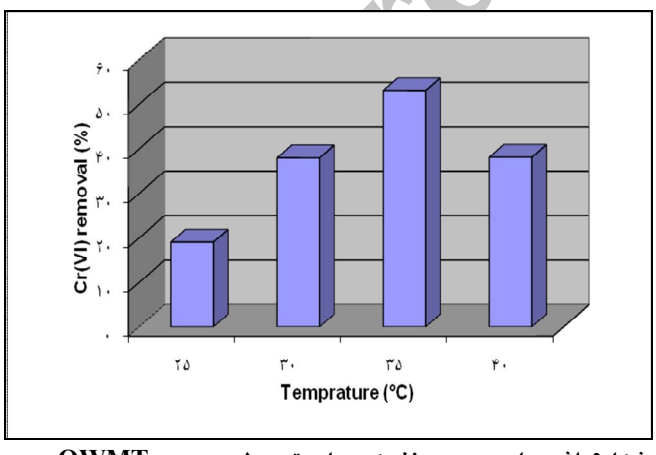
شکل۴. کاهش غلظت کروم در سوپرناتانت، در محیط پایه‌ی نوترینت براث حاوی ۰/۳ میلی‌مولار کرومات پتاسیم، در pH:6/5، دمای۳۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۵۰rpm

جهت بررسی اثر غلظتهای مختلف کرومات پتاسیم بر روی حذف، غلظتهای اولیه‌ی ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار تاثیر داده شدند نتایج بیان نشان می دهد که میزان حذف کرومات در غلظتهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌مولار کرومات پتاسیم، بعد از ۱۴۴ ساعت اتفاق می‌افتد(شکل ۵) لذا می‌توان نتیجه گرفت که میزان حذف، ارتباط مستقیمی به غلظت اولیه‌ی کرومات پتاسیم در محیط دارد. حذف کامل کروم در غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار طی ۴۸ ساعت، در غلظت ۰/۰۸ میلی‌مولار طی ۷۲ ساعت، در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار طی ۱۲۰ ساعت و در غلظت ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌مولار طی ۱۴۴ ساعت رخ داد.



شکل۵. حذف کرومات پتاسیم توسط سویه $QWMT_8$ در غلظتهای مختلف آن در محیط نوترینت براث، در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد، PH:7 و دور شیکر۵۰ rpm

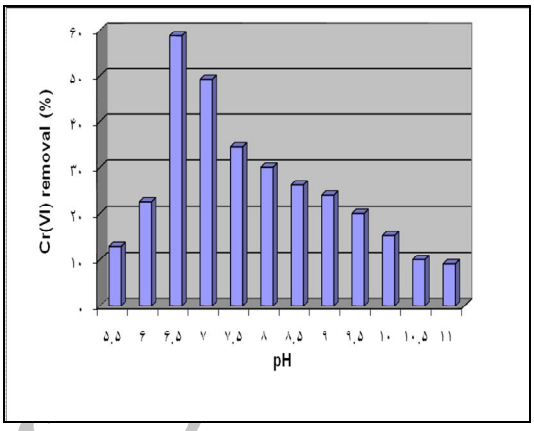
اثر دماهای متفاوت بر میزان حذف کروم توسط سویه‌ی مورد نظر در شکل ۶ قابل مشاهده است، نتایج نشان داد که دماهای مختلف بر میزان حذف کروم بسیار موثرند. میزان حذف، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۱۹/۰۷٪، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ۳۸٪، در ۳۵ درجه سانتی‌گراد ۵۳/۰۹٪ و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به ۳۸/۱۴٪ رسید، که نتایج بیانگر دمای بهینه‌ی ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای حذف کروم توسط سویه $QWMT_8$ بود.



شکل۶. اثر دما بر روی حذف کرومات توسط سویه‌ی $QWMT_8$ در محیط پایه‌ی نوترینت براث حاوی ۰.۳ میلی‌مولار کرومات پتاسیم در pH:7 و دور شیکر ۱۴۰rpm

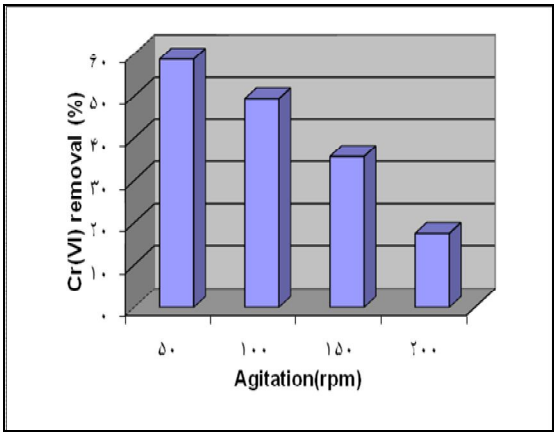
www.SID.ir

اثر pH بر حذف کرومات پتاسیم در شکل 7 نشان داده شده است، در محدوده‌ی 7/5-6/5 بیشترین میزان حذف قابل مشاهده است و در pH بهینه‌ی 6/5 سویه‌ی مورد نظر 58/76% از کروم موجود در محیط را حذف کرده است.



شکل7. اثر pH های مختلف در حذف کرومات پتاسیم توسط سویه‌ی $QWMT_8$ در محیط پایه‌ی نوترینت براث حاوی 0/3 میلی‌مولار کرومات پتاسیم، دمای 35 درجه سانتی‌گراد و دور شیکر 140 rpm

جهت بررسی اثر هوادهی، از دور شیکرهای 50، 100، 150 و 200 rpm استفاده شد و همانطور که در شکل 8 قابل مشاهده است بیشترین میزان حذف کروم برای $QWMT_8$ معادل 58/76 % و در دور شیکر 50 rpm صورت گرفت. نتایج مبین این موضوع است که آنزیم موثر در حذف کروم، در حضور میزان مشخصی از اکسیژن، بهینه‌ی فعالیت خود را نمایان می‌کند.



شکل8. اثر دور شیکرهای مختلف در حذف کرومات پتاسیم توسط سویه‌ی $QWMT_8$ در محیط پایه‌ی نوترینت براث حاوی 0.3 میلی‌مولار کرومات پتاسیم، دمای 35 درجه سانتی‌گراد و pH:6/5

بحث

علم و تکنولوژی علی رغم تمام مزایایی که برای بشر داشته به دلیل تولید پسماندهای صنعتی فراوان که نمونه‌ای از آن فلزات سمی سنگین است، پیامدهای مخرب ناخواسته‌ای نیز با خود به ارمغان آورده است(20و21). اکسی‌آنیون کرومات یکی از عناصر سمی است که به طرق مختلفی از جمله پسابهای صنعتی آلوده وارد محیط زیست شده و اثرات مخرب بسیاری بر حیات موجودات زنده ازجمله انسان، حیوان و گیاهان به جای می‌گذارد از این رو حذف آن از محیط زیست ضروری است، به این منظور در سالهای اخیر حذف کروم سمی به روش بیولوژیک بویژه مکانیسم احیا مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است(22). از این رو باکتریهای مقاوم جدا شده از پسابهای صنعتی آلوده می‌توانند راهکاری مفید و کم هزینه برای رفع این آلودگی ها باشند(3و8). به همین جهت این مطالعه بر روی باکتریهای بومی استان صورت گرفت و بر روی پساب چهار صنعت گالوانیزه، آبکاری، رنگرزی و نساجی استان قم انجام شد و بعد از تعیین MIC کلیه‌ی باکتریهای جدا شده و بررسی میزان حذف کرومات پتاسیم در باکتری منتخب $QWMT_8$ ، تاثیر فاکتورهای مختلف شامل دما، هوادهی، غلظتهای مختلف کرومات پتاسیم و pH در رشد و میزان حذف آن سنجیده شد. در این بررسی ما برای اولین بار، مقاومت بسیار بالای 770 میلی‌مولاری نسبت به کرومات، در سویه‌ی $QWMT_8$ ، جدا شده از پساب نساجی مهرگان در استان قم را گزارش کردیم که بنابرتستهای بیوشیمیایی، مورفولوژیک و 16SrRNA جنس*Staphylococcus* گونه‌ی *arlettae* سویه‌ی *R8-6A* شناسایی شد که این سویه قادر به احیا کرومات، نیز می‌باشد. سایر پژوهشگران در سالهای گذشته، جداسازی باکتریهایی با مقاومتهای مختلف به اکسی آنیون سمی کرومات از مناطق آلوده به این فلز سمی را مورد مطالعه قرار داده اند و تا سال 2000 در اکثر موارد میکروارگانیسمهای مقاوم به کروم شش ظرفیتی جدا شده قادر به تحمل غلظت 10-1500 mg/lکرومات بودند(23). در سال 2000 *Shakoori* و همکارانش یک سویه‌ی باکتریایی گرم مثبت را از پساب نساجی جدا کردند که می‌توانست مقاومت تا سقف 12/8 میلی‌مولار به کرومات را نشان دهد(23). Lean و همکارانش در سال 2001، مقاومت 10 میلی‌مولاری را نسبت به کرومات پتاسیم در سویه‌ی*Pseudomonas CRB5* گزارش دادند(24) ، در همین سال *Ventosa* و همکارانش در

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعه‌ای دیگر یک باکتری گرم منفی نمک دوست نسبی به نام Salinivibrio با مقاومت حداکثر۲۰ میلی‌مولاری به کرومات را شناسایی کردند(۲۵). *Corynebacterium hoagie* شناسایی شده توسط Viti و همکاران در سال ۲۰۰۳ مقاومت ۲۲ میلی‌مولاری نسبت به Cr(VI) نشان داد که مقاومت ۷۷۰ میلی‌مولاری سویه‌ی $QWMT_8$ ، ۳۵ برابر این مقدار و ۱/۲۸ برابر MIC گزارش شده در سال۲۰۰۷ توسط Amoozegar در مورد سویه‌ی۲ MF (600mM) و۱/۰۱ برابر MIC گزارش شده توسط ذوالفقاری و همکاران در مورد سویه‌یKWT_2 (760mM) در سال ۲۰۰۶ می باشد(۱۹-۱۶). بنابراین می‌توان ادعا کرد که MIC ۷۷۰ میلی‌مولاری به کرومات از بالاترین MIC هایی است که تا به حال گزارش شده است. به همین جهت نظر به ظرفیت بسیار بالایی که سویه‌ی $QWMT_8$ در مقاومت و احیای کرومات نشان داد به عنوان سویه‌ی برتر انتخاب گردیده و به منظور تعیین هویت دقیق روش تعیین توالی ۱۶SrRNA در مورد آن اجرا شد.

در ادامه حذف اکسی‌آنیون سمی کرومات توسط سویه‌ی مد نظر با استفاده از روش کالیمتریک و معرف DPC مورد بررسی قرار گرفت که نسبت به سایر روشها سریعتر و با دقت بالاتر بود(۱۵). برای بهینه‌سازی حذف موثر کرومات پتاسیم از محیط کشت باکتریایی، اثر پارامترهای مختلف مانند pH (۱۱-۵)، دما (۲۵-۳۰-۳۵-۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) و دور شیکر(۵۰-۱۰۰-۱۵۰-۲۰۰ rpm) که ممکن است در محیط و یا در شرایط آزمایشگاهی روی فرایند حذف باکتریها تاثیر بگذارد، نیز مورد بررسی قرار گرفت و هر سه فاکتور بر میزان حذف کروم توسط سویه برتر، بسیار موثر بود و بین شرایط بهینه‌ی حذف و رشد ارتباط بسیار نزدیک وجود داشت و حذف کروم به شرط رشد سلول در شرایط بهینه و آماده‌سازی آنزیمهای درگیر در این فرایند است در غیر اینصورت درجه‌ی یونیزاسیون و شکل فضایی آنزیمها نحت تاثیر قرار گرفته و حذف اتفاق نخواهد افتاد. همچنین طبق نظریه‌ی Farrell و همکارانش در سال ۲۰۰۰، نظر به اینکه احیای Cr(VI) وابسته به آنزیم است، تغیرات اسیدیته بر میزان یونیزاسیون آنزیم، شکل گیری پروتئین و نهایتا فعالیت آنزیم تاثیر می‌گذارد(۲۵). بیشترین میزان حذف کروم برای سویه‌ی $QWMT_8$ در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، pH برابر ۶/۵ و دور شیکر rpm ۵۰ بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به مقاومت بسیار بالای سویه‌ی $QWMT_8$ به کرومات پتاسیم و توانایی احیای آن، امید است که در آینده‌ای نه چندان دور، بتوان از کنسرسیومهای میکروبی و کشتهای خالص ایزوله‌های معرفی شده برای سمیت زدایی محیطهای آلوده به کروم در بعد صنعتی استفاده کرد. همچنین مطالعه بر روی مکانیسمهای مولکولی مقاومت و احیاء، بتوان با دستکاریهای ژنتیکی، سویه‌های برتر با توانایی بالاتر برای پاکسازی محیط ایجاد کرد و گامی موثر در جهت حفظ سلامت محیط زیست برداشت.

تشکر و قدر دانی

در نهایت از آقایان دکتر روشنایی، دکتر بهاری فر، دکتر حقیقی، دکتر دخیلی، سرکار خانم دکتر بردبار و تکنسین محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی و شیمی که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، صمیمانه ما را در پیشبرد اهدافمان همراهی نمودند کمال سپاسگزاری را داریم.

References

1. Ashwini C, Poopal R, Laxman S. *Studies on biological reduction of chromate by Streptomyces griseus*. Journal of Hazardous Materials. 2009; 169 :539–545
2. Adebowale A. *Bioremediation of Arsenic, Chromium, Lead, and Mercury*. U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office Washington, DC. serial on line August 2004; ECB/32/02 Add ;14 available from www.clu-in.org
3. U.S. Environmental Protection Agency. Technical resource guide for in situ treatment of soil and groundwater contaminated with chromium .EPA 2005; /825/R-00/005
4. Asha Lata Singh. *Removal of chromium from wastewater with the help of microbes:A review*. E-Journal of Science & Technology (e-JST) serial on line 2001.
5. Richa Shrivastava RK, Upreti PK, Seth UC. *Chaturvedi. Efects of chromium on the immune system*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2002; 34: 1-7
6. Parameswari E, Lakshmanan A, Thilagavathi T. *Chromate Resistance and Reduction by Bacterial Isolates*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences.2009; 3(2): 1363-1368
7. Ackerley DF, Gonzalez.CF, Park.C, Blake.R, Keyhan.M, Mathin.A. Chromate reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. Applied

Archive of SID
www.SID.ir

and Environmental Microbiology. 2004; 70(2): 873-882

8. Ameri A, Gholami M, Vaezi F, Rahimi M, Mahmodi M, Moosavi B. *Application and Optimization in Chromium contaminated Wastewater Treatment of the Reverse osmosis Technology.* Iranian J Publ health. 2008; 37(3) : 77-84
9. Min Ding, Xianglin Shi. *Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis*. Molecular and Cellular Biochemistry 2002; 234/235: 293–300.
10. Shailendra Mishra, Mukesh Doble. *Novel chromium tolerant microorganisms: Isolation, characterization and their biosorption capacity*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2008; 71: 874–879
11. Richa Shrivastava RK, Upreti PK, Seth UC, Chaturvedi. *Efects of chromium on the immune system*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2002; 34: 1-7
12. Zahoor.A, Rehman.A. *Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater*. Journal of Environmental Sciences. 2009; 21: 814–820
13. Thacker U, Parikh R, Shouche Y, Madamwar D. *Hexavalent Chromium Reduction By Providensia Sp.*Process Biochemistry. 2006; 41:1332-1337.
14. Smibert R, Krieg N. *Phenotypic characterization* in: Gerhardt. P, Murray RGE, Wood,W Krieg NR. (Eds.). Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. DC, 1994; pp:607 – 654
15. Ventosa A, Quesada E, Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. *Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods.* JGen Microbiol 1982; 128: 1959-1968.
16. Zolfaghary M, Malekzadeh F, Amoozegar M, Razavii M. *Isolation of chromium and telurite double resistance bacteria from industrial wastewater with effect on bioremediation.* Technology and Science.2006; 10:279-293
17. Baure A, Kirby W, Sherris J, Truck M. *Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single disc Method*. Am J. Clin. Pathol. 1966; 45:403-406.
18. Brown NL, Pattanapipitpaisal P, Macaskie LE. *Chromate reduction by Microbacterium liquefaciens immobilized in polyvinyl alcohol.* Biotechnology Letters. 2001; 23 : 61-65
19. Amoozegar M, Ghasemi A, Razavi MR, Naddaf S. *Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, Nesterenkonia sp. strain MF2.* Process Biochemistry.2007; 42 :1475–1479.
20. Adarsh, VK, Madhusmita M, Sanhita Chowdhury M, Sudarshan AR, Thakur S. *Studies on Metal Microbe Interaction of Three Bacterial Isolates From East Calcutta Wetland* .On Line Journal of Biological Sciences. 2007; 7 (2): 80-88.
21. Marc V, V|.ctor de Lorenzo. *Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution.* FEMS Microbiology Reviews. 2002; 26 : 327-338.
22. Malin Mejáre , Leif Bülow. *Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals*. Trends in Biotechnology. 2001; 19 (2) : 67-73.
23. Shakoori A, Maakhdoom M, Macaskie L. *Hexavalent chromium reduction by a dichromate resistant gram-positive bacterium isolate from effluents of tanneries*. Appl. Microbiology and Biotechnol. 2000; 53: 348.
24. Mc Lean, RJC, Beveridge TJ. *Metal -binding capacity of bacterial surfaces and theirability to form mineralized aggregates*, in Microbial Mineral Recovery, edited by HL. Ehrlich and CL Brierley. Mc Graw- Hill, New York. 1990; 3(2): pp: 185-222.
25. Farrell SO, Ranallo RT. *Experiments in biochemistry. A hands-on approach.* Orlando, FL: Saunders College Pub; serial online 2000.

Archive of SID

www.SID.ir