

فراوانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌های تحمل‌کننده کروم در پساب صنایع استان قم

محمد رضا ذوالفقاری^۱، محمد سلیمانی در جاق^۱، معصومه مسعودیخواه^۲، محمد خداداد مطلق^۳، اعظم حیدرپور^۴

^۱ استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

^۲ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

^۳ دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

^۴ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، قم، قم، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: کروم به عنوان یکی از منابع مهم آلودگی محیطی و سرطان‌زایی در بین کارگران صنایع شناخته شده است. ترکیبات Cr(VI) بسیار سمی‌تر از Cr(III) هستند. مطالعات اخیر نشان داده است احیای Cr(VI) به حالت‌های اکسیداسیونی پایین‌تر و رادیکال‌های آزاد در ایجاد اثرات کارسینوژنیک، ایمنوتوکسیک و ژنوتوکسیک در انسان و حیوانات نقش مهمی ایفا می‌کند. در این مطالعه حضور ارگانیسم‌های تحمل‌کننده کروم و مقاوم به آنتی‌بیوتیک از پساب چهار صنعت گالوانیزه، آبکاری، نساجی و رنگرزی استان قم بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه ۲۴۱ جدایه شامل: ۲۳ کوکسی گرم مثبت، ۳ باسیل گرم منفی و ۲۱۵ باسیل گرم مثبت با استفاده از محیط Agar LB حاوی غلظت‌های مشخص کرومات پتاسیم جدا شدند، که همگی قادر به رشد در غلظت ۵mM از کرومات پتاسیم بودند.

یافته‌ها: در این بررسی یکی از کوکسی‌های گرم مثبت و احیاکننده کرومات جداشده از پساب آبکاری کروم توانست تا سقف ۷۶۰mM غلظت کرومات پتاسیم را تحمل کرده و در دمای ۳۴°C و pH=۷ در طول ۲۴ ساعت گرماگذاری در این غلظت رشد کند. همچنین این سویه به چندین آنتی‌بیوتیک نیز مقاومت نشان داد. با تست‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیک، مورفولوژیک و 16SrRNA مشخص گردید این باکتری متعلق به جنس استافیلوکوک گونه *arlettae* و سویه *RI-7A* می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد باکتری *Staphylococcus arlettae* سویه *RI-7A* می‌تواند ضمن مقاومت بسیار بالا به کروم از طریق مکانیسم احیا برای سمیت‌زدایی و پاکسازی Cr(VI) از محیط‌های آلوده، به‌ویژه مناطق بومی و در نتیجه کاهش اثرات شدید بیماری‌زایی و سرطان‌زایی آن مفید باشد. از طرفی، کنترل چنین باکتری‌هایی با مقاومت توأم به فلزات و آنتی‌بیوتیک از نظر پزشکی بسیار حایز اهمیت است.

کلید واژه‌ها: کروم؛ پساب‌های صنعتی؛ سرطان‌زایی؛ سمیت‌زدایی؛ ایمنوتوکسیک‌نسیستی؛ مقاومت باکتری به دارو.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: mreza.zolfaghary@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۳

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۶

مقدمه

آژانس حمایت محیط (EPA (Environmental Protection Agency)، کروم بعد از سرب دومین فلز یافت‌شده در مناطق آلوده است و سالانه حدود ۱۷۰۰۰۰ تن از پساب‌های کرومی به محیط سرازیر می‌شود (۳، ۴). این فلز در پساب صنایع مرتبط با کروم مانند تهیه آلیاژهای کرومی، آبکاری کروم، ترکیبات بازدارنده خوردگی، شیشه‌سازی، تهیه پیگمان، صنعت نساجی، صنایع چوب، عکاسی، دباغی، تولید

امروزه صنعتی‌سازی جهان و شهرسازی جوامع منجر به آلودگی محیط‌زیست شده است، که از نتایج این آلودگی، ورود فلزات سمی سنگین به محیط می‌باشد. آلاینده‌های فلزی منابع طبیعی و غیرطبیعی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های محیطی هستند، که یکی از این آلاینده‌های وافر در زمین، کروم می‌باشد (۱، ۲). براساس گزارش

برای احیای Cr(VI) مانند دی هیدرو لیپوآمید دهیدروژناز وابسته به NADH می شود (۷). استنشاق ترکیبات ۶ ظرفیتی کروم در درازمدت باعث سرطان ریه و تماس مداوم آن با پوست موجب درماتیت و زخم های پوستی و تخریب رنگدانه های پوستی می گردد و در صورتی که این فلز به میزان 10 mg/kg وزن بدن برسد، منجر به زخم معده، التهاب مخاط دستگاه گوارشی، آسیب های کلیوی، نکرور کبدی و در نهایت مرگ می شود (۷،۴). مورد نگران کننده دیگر در این روزها ارتباط میان مقاومت به فلزات سنگین و آنتی بیوتیک در باکتری ها است. هنگامی که چندین عامل ضد میکروبی به یک هدف مشترک حمله می کنند، پاسخ به این عوامل می تواند به طور همزمان صورت گیرد که این واکنش تحت عنوان Co-resistant نامگذاری می شود. برای مثال با بررسی پلازمیدهایی که منشأ آنها از تأسیسات تیمار فاضلاب بود مشخص گردید این پلازمیدها دارای ژن های مقاومت به جیوه، کرومات، تلوریت و چندین ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هستند. آنالیز توالی نوکلئوتیدی نیز نشان داد عناصر ژنتیکی عامل مقاومت، یا در ناحیه ورود و یا در ناحیه ترنسپوزون قرار گرفته اند، که احتمالاً به این پلازمیدها، ضمن حوادث نو ترکیبی چندگانه این مقاومت ها افزوده شده است، و این مسئله از لحاظ پزشکی بسیار حایز اهمیت است؛ چه را که گسترش این مورد در محیط می تواند تهدید جدی برای درمان موفقیت آمیز بیماری ها باشد (۸). با توجه به مضرات فلزات سنگین که بدان اشاره شد و اینکه این روزها به دلیل صنعتی شدن جهان، ورود پساب های آلوده به محیط اجتناب ناپذیر است، همچنین به دلیل مشکلات ناشی حذف آلودگی از پساب ها به روش های فیزیکی و شیمیایی، دانشمندان رو به سوی روش های پاکسازی زیستی (Bioremediation) آورده اند. زیست پالایی یک اصطلاح کلی در جهت رفع آلودگی های زیست محیطی به وسیله فرآیندهای بیولوژیکی و توسط میکروارگانیسم ها خصوصاً باکتری، مخمر و قارچ در خاک ها و آب های آلوده است. اولین باکتری مقاوم به کروم، سودوموناس فلورسنس سویه LB300 با مقاومت ناشی از احیای کروم می باشد، که این مکانیسم سمیت زدایی اخیراً توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۹-۱۲). شمار زیادی از میکروارگانیسم های مقاوم به کروم شامل: گونه های سودوموناس، میکروباکتریوم، دسولفوویبریو، ایتروباکتر، اشرشیا، شیوانالا،

سیمان، فرش، نوارهای مغناطیسی و ساخت اجزای ماشین و هواپیما وجود داشته و در یک محدوده ۹ ظرفیتی (۲- تا ۶+) که فقط فرم ۳ و ۶ ظرفیتی آن اهمیت زیادی دارند بررسی شده است (۲،۳،۵). نظر به اینکه محدودیت Cr(VI) در آب های آشامیدنی متجاوز از $1 \text{ mg/}0.05$ و دوز کشنده خوراکی آن 71 mg/kg وزن بدن می باشد، و بنا بر نظر انجمن سلامت و امنیت شغلی (Occupational Safe and Health Administration, OSHA)، میانگین تماس با Cr(VI) در محیط بین 0.05 و 1 mg/m^3 برای ۸ ساعت کار روزانه و ۴۰ ساعت کار هفتگی است و با توجه به اینکه آژانس بین المللی تحقیق بر روی سرطان (International Agency for Research on Cancer, IARC) و برنامه سم شناسی ملی آمریکا (National Toxicology Program of U.S, NTP)، کروم را به عنوان یکی از علل سرطان های انسانی معرفی کرده است، می توان به سمی بودن آن برای موجودات زنده پی برد (۴). دلیل این محدودیت این است که کروم به شدت موتاژن، کارسینوژن و تراوتوژنیک بوده و فاکتورهای متعددی در سمی بودن آن دخیل هستند، همچنین به علت شباهت ساختمانی کرومات به SO₄-2، به آسانی از طریق سیستم انتقال سولفات در یوکاریوت ها و باکتری ها قابل برداشت است و داخل سلول به روش آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک احیا شده و با ایجاد رادیکال های آزاد و گونه های اکسیژن فعال (ROS)، اثرات مخربی روی DNA می گذارد، و با گروه های کربوکسیل و سولفیدریل آنزیم ها ترکیب و سبب تغییر ساختار یا نحوه فعالیت آنها می شود (۶). سیستم های بیولوژیک به طور نرمال در مقابل آسیب های اکسیداتیو ایجاد شده توسط رادیکال های آزاد به وسیله آنتی اکسیدانت های آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک حفاظت می شوند. ولی زمانی که تعادل آنتی اکسیدانت ها و پراکسیدانت ها به نفع پراکسیدانت ها به هم بخورد؛ آسیب های اکسیداتیو القایی با Cr(VI) اتفاق می افتد که ROS القاشده در اثر Cr(VI) عامل تخریب DNA و پروتئین ها، پراکسیداسیون افزایش یافته لیبیدها، نوسان حالت های اکسیداسیون داخل سلولی، فعال سازی فاکتورهای رونویسی هسته ای (P53, AP-1, NF-κB)، القای آپوپتوزیس، فعال سازی آنزیم های مشخص درگیر در مسیر سیگنال MAPK، تحریر آنزیم های درگیر در کنترل سیکل سلولی، مکانیسم های Check-point، فعال سازی آنزیم های مسئول

مورفولوژی کلنی بر روی محیط نوترینت آگار (Nutrient Agar)، در دمای ۳۴°C و بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده گردید. واکنش گرم، حرکت، شکل و رنگ کلنی، کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، احیای نیترات، متیل‌رد، وژرپرسکوئر و تولید اندول براساس روش‌های Smibert و Krieger انجام شد (۱۷). تولید اسید از کربوهیدرات‌ها، بررسی مصرف منابع کربنی و نیتروژنی براساس روش و محیط توصیه‌شده Ventosa و همکارانش تعیین گردید (۱۸). تحمل نمک سدیم کلراید در حضور تراکم ۳۰-٪ و در دمای ۳۴°C، pH=۷ و rpm=۱۴۰ در محیط نوترینت برات مورد سنجش قرار گرفت و رشد در دماهای ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰°C در محیط نوترینت برات با pH=۷ بررسی شد. محدوده pH برای رشد با تنظیم pH نهایی بین ۵-۱۱ در دمای ۳۴°C و rpm=۱۴۰ تعیین گردید و برای تنظیم pH از محیط بافر mixed استفاده شد (۱۹).

جهت شناسایی مولکولی سویه مورد نظر، بعد از کشت ۲۴ ساعته در محیط لوریا برتانی آگار (LBA)، DNA ژنومیک با استفاده از کیت DNA Purification Kit (DNP™ Kit) محصول شرکت سیناژن برطبق پروتکل شرکت، استخراج شد، و به‌منظور مشاهده DNA ژنومیک، الکتروفورز صورت گرفت. سپس ژن 16SrDNA سویه $QWCP_1$ با کمک پرایمرهای یونیورسال باکتریایی (5'AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') و (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') Rev 1541، تکثیر شد. در مرحله بعد، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مدنظر با اندازه‌ای حدود ۱/۵Kb، ۵μl از محصول PCR الکتروفورز گردید و پس از استخراج باند هدف از ژل، با استفاده از کیت Gel Extraction Kit شرکت Core-One™ (Cat.No.GE-100) با ارسال به آزمایشگاه seq lab آلمان، تعیین توالی شد. برای سنجش مقاومت سویه‌های باکتریایی جداشده از پساب‌های صنعتی، الگوی مقاومت براساس MIC در غلظت‌های ۵-۷۷۰mM کرومات پتاسیم با روش رقت در آگار (Agar Dilution Method) در دمای ۳۴°C و به مدت ۱۰ روز در محیط لوریا برتانی آگار گرماگذاری شدند. (پایین‌ترین تراکم از اکسی‌آنیون که کاملاً مانع رشد باکتری می‌گردد MIC نامیده می‌شود) (۱۹). برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل: پنی‌سیلین (P₁₀)، آمپی‌سیلین (Am₁₀)، سیپروفلوکسازین (CP₅)، اریترومایسین (E₁₅)، کلرامفنیکل (C₃₀)،

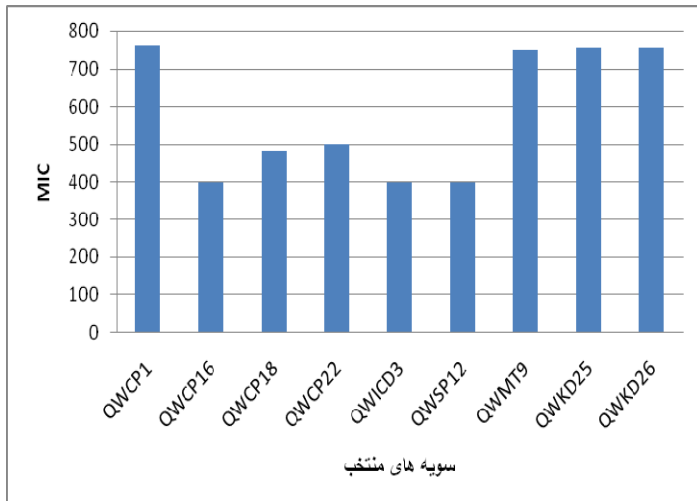
باسیلوس، استتوباکتر و قارچ‌های آسپرژیلوس، گانودرما لوسیدوم و تریکودرما گزارش شده است که اغلب از پساب صنایع مرتبط با کروم جدا شده‌اند. این ارگانیزم‌ها با تغییر فرم محلول به نامحلول این فلزات، این عمل را انجام می‌دهند. در واقع، وقتی فلزی به پتانسیل رداکس پایین‌تری می‌رسد تحرک و سمی بودن آن کاهش می‌یابد (۹) (۱۵-۱۳).

این مطالعه با هدف تعیین فراوانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیزم‌های تحمل‌کننده کروم در پساب صنایع گالوانیزه، آبکاری، نساجی و رنگرزی استان قم صورت گرفت.

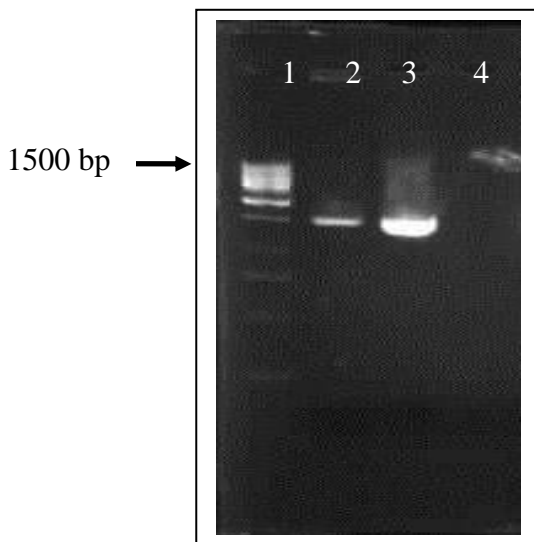
روش بررسی

نمونه‌گیری از پساب‌های آلوده توسط ظروف نمونه‌برداری مخصوص (طوری که سر ظروف نمونه‌گیری به جهت همگن ساختن نمونه و برداشت آن ۳cm³ خالی بماند) انجام شد. بعد از نمونه‌گیری و یادداشت دما، pH، تاریخ نمونه‌گیری و محل نمونه‌برداری، نمونه‌ها سریعاً به فلاسک یخ منتقل شدند تا در کمترین زمان ممکن، آزمایش‌های لازم روی آنها انجام شود. برای جداسازی باکتری‌ها از ظروف حاوی نمونه‌های پساب، بعد از هموژن کردن کامل آنها در شرایط کاملاً استریل، ۱ml برداشته و طی تکنیک غنی‌سازی به ۹ml محیط لوریا برتانی برات (Broth Luria Bertani) حاوی ۱۰g تریپتون، ۵g عصاره مخمر، ۱۰g کلرید سدیم و یک لیتر آب مقطر) افزوده شد (۱۶). نمونه‌ها در دور شیکر ۱۴۰، دمای ۳۴°C به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند، سپس از نمونه‌های غنی‌شده ۱ml برداشته و با ۹ml سرم فیزیولوژی، رقت‌های ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۷} تهیه گردید. در نهایت، از رقت‌های ۱۰^{-۵} تا ۱۰^{-۷}، ۱۰۰μl برداشته و در محیط لوریا برتانی آگار (Luria Bertani Agar) حاوی ۵mM کرومات پتاسیم به‌صورت سطحی کشت داده شد و در دمای ۳۴°C به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند. کلنی‌هایی که توانستند تا این سقف از غلظت کرومات پتاسیم را تحمل کنند و در این غلظت رشد کردند، خالص‌سازی شده و با کمک محیط لوریا برتانی آگار به اضافه مقادیر مختلف غلظت کرومات پتاسیم، MIC (Minimum Inhibitory Concentration) آنها تعیین گردید. شناسایی باکتری‌های خالص‌شده طبق کتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology و با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفت.

بودند به ترتیب تا سقف ۴۰۰، ۴۸۳ و ۵۰۰ mM، سویه $QWCD_3$ جدا شده از پساب رنگریزی پارچه ایران مریوس تا سقف ۴۰۰ mM، سویه $QWSP_{12}$ جدا شده از پساب آبکاری فولاد تا سقف ۴۰۰ mM، سویه $QWMT_9$ جدا شده از پساب نساجی مهرگان تا سقف ۷۵۰ mM و سویه‌های $QWKD_{25}$ و $QWKD_{26}$ جدا شده از پساب رنگریزی خوشرنگ هر دو تا سقف ۷۵۵ mM کرومات پتاسیم را تحمل کردند.



نمودار: مقاومت سویه‌های برتر به کرومات پتاسیم در محیط پایه لوریا بر تانی آگار (LBA)



شکل شماره ۱: ظهور باند منفرد در منطقه ۱۵۰۰ bp

- 1-Ladder 1 Kb (fermentas)
- 2-Sample $QWCP_1$ with 8Forward and 1541 Rev Primers
- 3-Sample $QWCP_1$ with 8Forward and 1492 Rev Primers
- 4-Negative Control

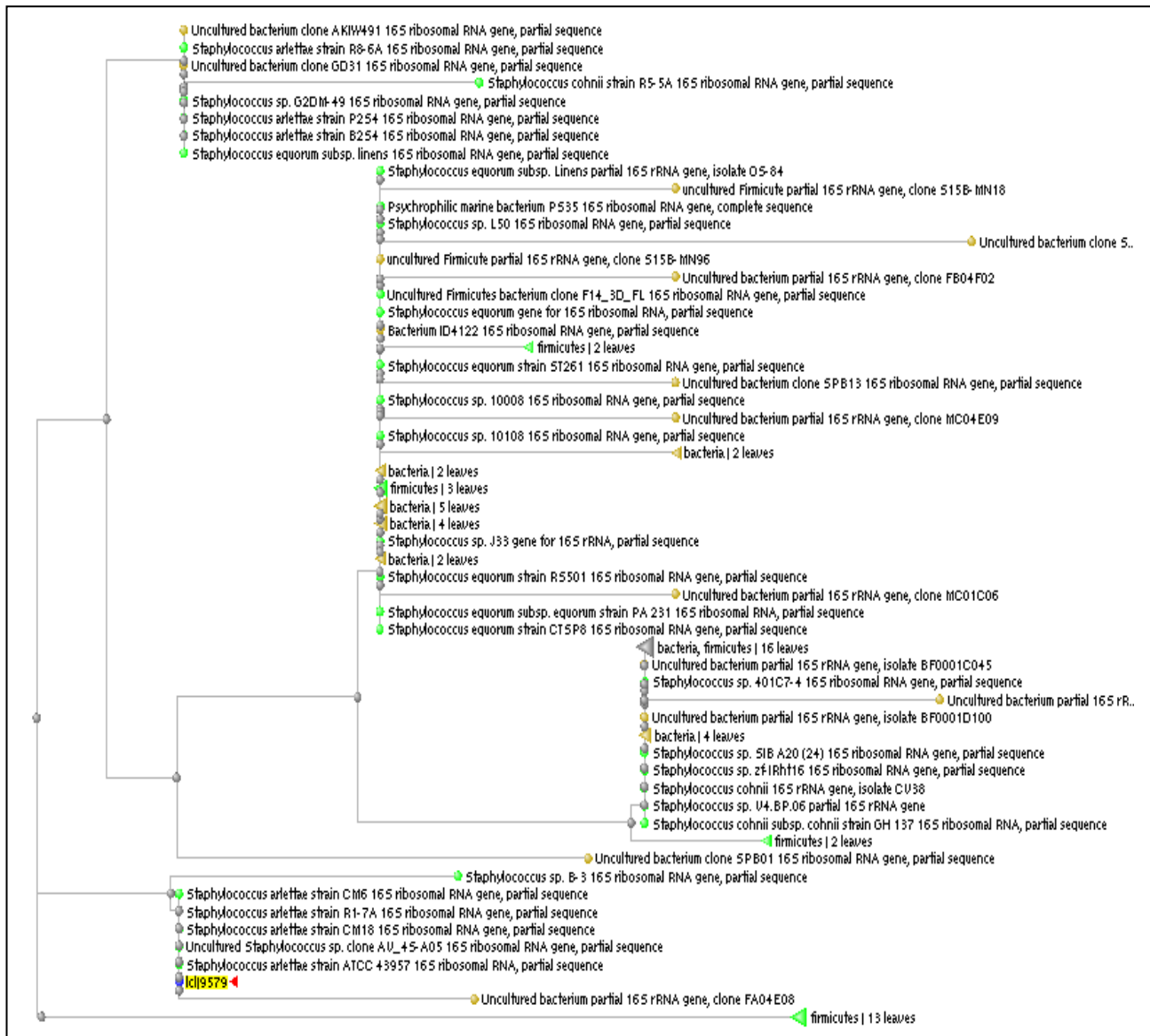
تتراسیکلین (TE_{30})، نئومایسین (N_{30})، جنتامایسین (GM_{10})، نورفلوکسازین (NOR_{10})، ریفامپیسین (RA_5)، استرپتومایسین (S_{10})، سفیکسیم (CFM_5)، کانامایسین (K_{30})، تهیه شده از شرکت پادتن طب (PT) Biomerieux و Himedia، جهت آنتی‌بیوگرام استفاده شد. برای آنتی‌بیوگرام در محیط (Trypticase Soy Broth) TSB از کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید و توسط سواب استریل از هر نمونه برداشته و در محیط MHA (Muller Hinton Agar) به‌طور انبوه کشت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فواصل مشخص؛ یعنی ۲/۵cm از مرکز دیسک کناری و ۱/۵cm از لبه پلیت قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به‌صورت وارونه در دمای $34^{\circ}C$ و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند (۲۰).

برای تعیین حساسیت جنس استافیلوکوک مورد نظر، از تست آنتی‌بیوگرام استفاده گردید. در نهایت، قطر هاله عدم رشد با خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد و با عنوان مقاوم، حساس و حدواسط گزارش گردید.

یافته‌ها

از ۲۴۱ باکتری جدا شده از پساب صنایع گالوانیزه، آبکاری، نساجی و رنگریزی، نزدیک به ۳۳/۳٪ از باکتری‌های مقاوم در محدوده ۵-۵۰ mM، ۲۳/۲٪ در محدوده ۵۱-۱۰۰ mM، ۳۳/۱٪ در محدوده ۱۰۱-۲۵۰ mM، ۷/۰۵٪ در محدوده ۲۵۱-۴۰۰ mM، ۰/۸۲٪ در محدوده ۴۰۱-۶۰۰ mM و ۲/۰۷٪ در محدوده ۶۰۱-۸۰۰ mM کرومات پتاسیم قرار داشتند.

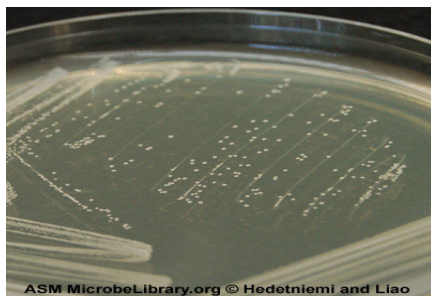
از مجموع باکتری‌های جدا شده، تعداد ۹ سویه بالاترین مقاومت را نشان دادند که میزان مقاومت آنها در نمودار ارائه شده است. طبق نمودار در بین آنها جدایه $QWCP_1$ به دست آمده از پساب آبکاری کروم، بیشترین مقاومت را داشته و تا سقف ۷۶۰ mM کرومات پتاسیم را تحمل کرده است که براساس مطالعات 16SrRNA انجام شده، $RI-7A$ *Staphylococcus arlettae strain* نام گرفته است. در شکل شماره ۱ نتایج ظهور باند الکتروفورز در منطقه ۱/۵kb، تأییدکننده خلوص محصولات PCR نمونه ژنوم مورد نظر برای تعیین توالی است. در ادامه، نمونه تعیین توالی شده توسط سرویس BLAST آنالیز گردید و با کمک سایت اینترنتی NCBI، باکتری تعیین هویت شد که نقشه فیلوژنتیک آن در شکل شماره ۲ قابل مشاهده است. سویه‌های $QWCP_{16}$ ، $QWCP_{18}$ ، $QWCP_{22}$ که از آبکاری کروم جدا شده



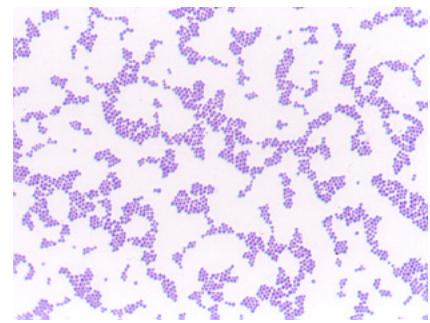
شکل شماره ۲: درخت فیلوژنتیک سویه $QWCP_1$

مفید باشد. در ادامه، صفات فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک بررسی گردید که نتایج آن در جدول ارائه شده است. نتایج نشانگر توانایی احیای نیتрат و تولید آنزیم‌های DNase، فنیل آلانین دی آمیناز و لیزین دکربوکسیلاز، و مصرف رنج وسیعی از اسیدهای آمینه و قندها توسط این سویه است. در بررسی شرایط بهینه رشد، دمای $35-40^{\circ}\text{C}$ و $\text{pH}=6/5-7/5$ و نمک سدیم کلراید ۱٪ برای رشد بهینه سویه مورد نیاز بود.

شکل شماره ۳ و ۴، تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویه $QWCP_1$ را نشان می‌دهد. همچنین این سویه به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، سیپروفلوکسازین، اریترومايسين، سفیکسیم و تتراسیکلین مقاومت نشان داد که این موضوع می‌تواند بیانگر مقاومت همراه در این باکتری باشد؛ به نحوی که ژن‌های مقاومت به فلز و آنتی‌بیوتیک احتمالاً بر روی یک کروموزوم یا پلاسمید واقع شده‌اند. از این رو استفاده از $RI-7A$ می‌تواند به‌عنوان یک سویه برتر در پیشگیری از بسیاری سرطان‌ها



ASM MicrobeLibrary.org © Hedetniemi and Liao

شکل شماره ۳: نمونه ماکروسکوپی از سویه QWCP₁شکل شماره ۴: رنگ آمیزی گرم از سویه QWCP₁جدول: ویژگی‌های بیولوژیک، فیزیولوژیک و مورفولوژیک سویه QWCP₁

تست	تست	تست	تست	تست	تست		
۳۵-۴۰	بهینه	+	گالاکتوز	-	اینولین	+	احیای نیترات
نمک سدیم کلرید برای رشد (%)		+	گزیلوز	+	مالتوز	-	تولید گوگرد
۰-۳۰	محدوده	+	آرابینوز	+	آرابینوز	-	متیل رد
٪	بهینه	-	رافینوز	-	اینوزیتول	-	وزرپرسکوئر
اسیدیته برای رشد		-	تره هالوز	+	تره هالوز	-	سیترات
۵-۱۱	محدوده	+	لاکتوز	-	ریبوز	-	حرکت
۶/۵-۷/۵	بهینه	مصرف اسید آمینه		+	ساکاروز	-	اندول
ویژگی‌های فنوتیپیک		+	تریپتوفان	+	گلوکز	هیدرولیز	
کوکسی	شکل سلول	+	آسپاراژین	+	رافینوز	-	کازئین
+	واکنش گرم	+	لوسین	+	لاکتوز	-	اسکولین
-	<۵mm قطر	+	گلیسین	+	گالاکتوز	-	ژلاتین
-	KOH تست	-	گلو تامیک اسید	-	رامنوز	-	نشاسته
حلقوی	فرم	+	فنیل آلانین	مصرف کربوهیدرات		فعالیت آنزیماتیک	
کامل	حاشیه	+	لیزین	+	گلوکز	+	DNase
محدب	برآمدگی	+	متیونین	+	ساکاروز	+	فنیل آلانین د آمیناز
کره‌ای	قوام	+	آرژینین	+	ریبوز	+	لیزین د کربوکسیلاز
شفاف	کدورت	+	والین	-	اینوزیتول	-	اوره‌آز
سفید	پیگمان	+	آلانین	+	اینولین	-	لسیتیناز
+	کاتالاز	+	هیستیدین	+	مانیتول	تولید اسید از قند	
-	اکسیداز	-	تیروزین	-	سوربیتول	-	گزیلوز
خوشه‌ای	آرایش	دمای رشد (درجه سانتی‌گراد)		+	مالتوز	+	مانیتول
		۱۰-۵۰	محدوده	+	رامنوز	+	سوربیتول

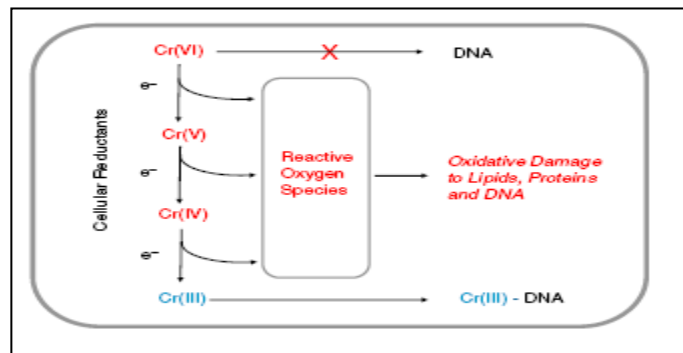
بحث

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 می‌باشد، که اغلب این روش‌ها نیازمند انرژی بالا، مواد و تجهیزات گران قیمت هستند، لذا بسیار هزینه‌بر بوده و تولید لجن‌های سمی می‌کنند که در نتیجه نیازمند روش‌های مؤثرتر و تکنیک‌های کارآمدتر به جهت حذف Cr(VI) از پساب‌های صنعتی است. از این رو پژوهشگران رو به سوی فرآیندهای پاکسازی زیستی یا

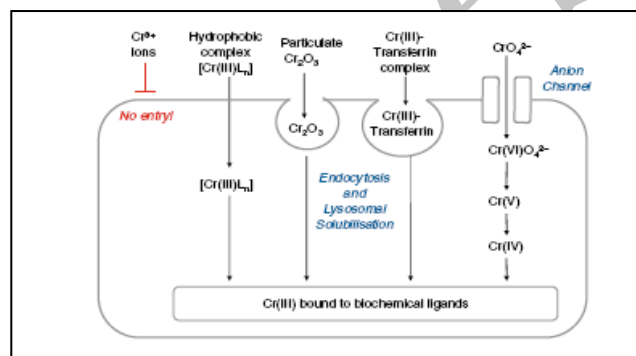
طی پروسه‌های صنعتی و دریایی، پساب‌های آلوده به محیط زیست سرازیر می‌شود که موجبات آلودگی زیست‌محیطی را فراهم می‌سازد و انباشت این عناصر در خاک و نفوذ آنها به آبهای زیرزمینی می‌تواند مقدمه شروع جریان‌های مریخوار به سمت انسانها باشد. از طرفی، با کاربرد این عنصر در صنایع مختلف ذکر شده، ایجاد پساب‌های سمی اجتناب‌ناپذیر است. لذا لزوم حذف این سموم بالقوه از محیط زیست نمایان می‌شود (۲). روش‌های

گزارش شده است که بنابر تست‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیک و 16S rRNA، جنس *Staphylococcus* گونه *arlettae* سویه *RI-7A* شناسایی شد. این باکتری قادر به احیای $Cr(VI)$ و در نهایت، کاهش اثرات سرطان‌زایی آن است که در شکل‌های ۵، ۶ و ۷ مسیر ورود کروم به سلول، واکنش‌های آن با اجزای سلولی، تخریب DNA و بروز سرطان آورده شده است.

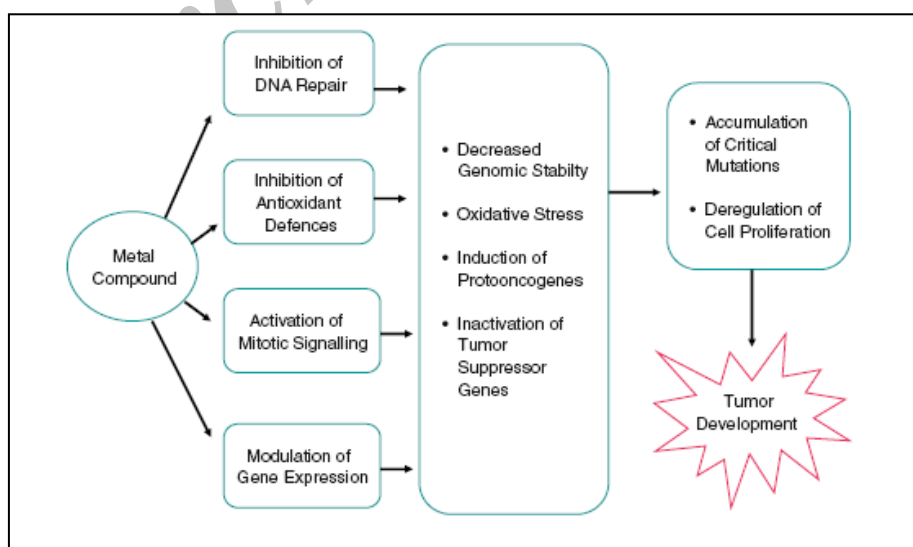
Bioremediation آورده‌اند و امیدوارند بتوان با جداسازی و شناسایی این باکتری‌های مقاوم و استفاده از آنها به صورت بیوفیلم در مسیرهای فاضلاب، میزان سمی بودن پساب‌های صنعتی را به میزان بسیار زیاد و با صرف هزینه‌های پایین، کاهش داد (۲۱). در مطالعه حاضر برای اولین بار مقاومت بسیار بالای 760 mM نسبت به کرومات در سویه *QWCP1* جداشده از پساب آبکاری کروم



شکل شماره ۵: متابولیسم داخل سلولی کروم، ایجاد استرس اکسیداتیو و اثر بر DNA



شکل شماره ۶: برداشت سلولی و احیای ترکیبات کروم



شکل شماره ۷: مسیر بروز سرطان توسط فلزات سمی

ادعا نمود MIC ۷۶۰ mM به کرومات، از بالاترین MICهایی است که تا به حال گزارش شده است. به همین جهت در مطالعه حاضر نظر به ظرفیت بسیار بالایی که سویه $QWCP_1$ در مقاومت و احیای کرومات نشان داد به عنوان سویه برتر انتخاب شد و به منظور تعیین هویت دقیق روش تعیین توالی 16S rRNA در مورد آن اجرا گردید.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از پاکسازی به روش زیستی نسبت به سایر روش‌های فیزیکیوشیمیایی بسیار کارآمد و کم هزینه تر است و سویه $QWCP_1$ که با مطالعات مولکولی به جنس *Staphylococcus*، گونه *arlettae* و سویه RI-7A تعلق دارد، نظر به توانایی بالایی که در مقاومت و احیای Cr(VI) و لذا کاهش سمیت و سرطان‌زایی آن گزارش شده است، می‌تواند در بُعد صنعتی و پزشکی به جهت حذف اثرات بیماری‌زایی این فلز مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی، مقاومت توأم و بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها و کروم در این باکتری از لحاظ پزشکی بسیار مهم بوده و می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با مکانیسم مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژنتیک پلاسمید، اکولوژی و فیزیولوژی سویه مدنظر و حتی سایر میکروارگانیسم‌های مقاوم در محیط‌های آلوده، در اختیار ما قرار دهد.

Ug و همکارانش در سال ۲۰۰۳ موفق شدند گونه‌های مختلفی از استافیلوکوکوس مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک و فلز مقاوم را جداسازی کنند، که کروم، سرب و پنی‌سیلین G از مهم‌ترین آنها بود (۲۲). در همین سال Loo و همکارانش نیز موفق به شناسایی چندین باکتری بیمارستانی شامل: *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus epidermidis*، *Klebsiella pneumoniae* شدند که با تشکیل بیوفیلم نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک و فلز سنگین مقاومت نشان دادند (۲۳). همچنین Shakoobi و همکارانش در سال ۲۰۰۰، یک باسیل گرم مثبت را از پساب دباغی جدا کردند که در ۲۵۰۰ mg/l کرومات پتاسیم مقاومت نشان می‌داد و می‌توانست در محیط حاوی دی کرومات پتاسیم نیز تا سقف ۸۰ mg/l رشد کند (۲۴). در سال ۲۰۰۳ ایزوله‌های مقاوم به کرومات مربوط به جنس باسیلوس از خاک‌های آلوده جدا شد که مقاوم‌ترین آنها *Bacillus sp. Es29* با توان تحمل ۱۵۰۰ mg/l اکسی‌آیون سمی کرومات بود که این میزان خیلی کمتر از میزان گزارش شده در این بررسی است (۲۵).

مقاومت ۷۶۰ mM به کرومات تقریباً ۳۵ برابر MIC گزارش شده توسط Viti و همکارانش می‌باشد که مقاومت ۲۲ mM در مورد *Corynebacterium hoagie* را گزارش کردند (۲۳)، و ۱/۲۶ برابر MIC گزارش شده توسط آموزگار (۶۰ mM) در مورد کوکوس گرم مثبت MF2 بوده است (۲۶). بنابراین می‌توان

References:

1. Bitton G, Wiley J. Waste Water Microbiology, 2nd ed. Sons INC Publication; 2005. p. 387-413.
2. Adeniji 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. 2004; ECB/32/02 Add;14. Available From: <http://www.clu-in.org>. Accessed April, 2004.
3. Kamaludeen SP, Arunkumar KR, Avudainayagam S, Ramasamy K. Bioremediation of Chromium Contaminated Environments. Indian J Exp Biol 2003;41(9):972.
4. Cole P, Brad R. Epidemiological Studies of Chrome and Cancer Mortality: A Series of Meta-Analyses. Regul Toxicol Pharmacol 2005;43(3):225-231.
5. 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.
6. Shrivastava R, Upreti RK, Seth PK, Chaturvedi UC. Effects of Chromium on the Immune System. FEMS Immunol Med Microbiol 2002;34(1):1-7.
7. Ding M, Shi X. Molecular Mechanisms of Cr(VI)-Induced Carcinogenesis. Mol Cell Biochem 2002;234-235(1-2):293-300.
8. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of Antibiotic and Metal Resistance. Trends Microbiol 2006;14(4):176-82.

9. Morales LM, Cristiani U. Hexavalent Chromium Removal by a *Trichoderma Inhamatum* Fungal Strain Isolated from Tannery Effluent. *Water Air Soil Pollut* 2008;187(1-4):327-336.
10. Krishna KR, Ligy P. Bioremediation of Cr(VI) in Contaminated Soils. *J Hazardous Materials* 2005;121(1-3):109-117.
11. Assfalg M, Bertini I, Bruschi M, Caroline Michel, Turano P. The Metal Reductase Activity of some Multiheme Cytochromes C: NMR Structural Characterization of the Reduction of Chromium (VI) to Chromium (III) by Cytochrome C7. *PNAS* 2002 May 14;99(15):9750-9754.
12. Faryal R, Yusuf M, Munir K, Faheem T, Abdul hameed. Enhancement of Cr⁶⁺ Removal by *Aspergillus Niger* RH19 Using a Biofermenter. *Pak J Bot* 2007;39(5):1873-1881.
13. Camargo F, Bento FM, Okeke BC, Frankenberger WT. Chromate Reduction by Chromium-Resistant Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Dichromate. *J Environ Qual* 2003;32(4):1228-1233.
14. Zakaria ZA, Surif S, Wanazlina A. Bioremediation of Cr(VI)-containing Electroplating Wastewater Using *Acinetobacter* sp. International Conference on Environment 13-15 Nov, Penang, Malaysia 2006;1(3):13-15.
15. Faryal R, Yusuf M, Kiran M, Tahir Fand A. Enhancement of Cr⁶⁺ Removal by *Aspergillus Niger* RH19 Using a Biofermenter. *Pak J Bot* 2007;39(5):1873-1881.
16. Thacker U, Parikh R, Shouche Y, Madamwar D. Hexavalent Chromium Reduction by *Providencia* sp. *Process Biochem* 2006;41(6):1332-1337.
17. Gerhardt P, Murray RGE, Wood W, Krieg NR. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994. p. 607-654.
18. Ventosa A, Quesada E, Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *J Gen Microbiol* 1982;128:1959-1968.
19. Zolfaghary M, Malekzadeh F, Amoozegar M, Razavii M. Isolation of Chromium and Tellurite Double Resistance Bacteria from Industrial Wastewater with Effect on Bioremediation. *Technology and Science* 2006;10:279-293.
20. Baure AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disc Method. *Am J Clin Pathol* 1966;45(4):403-406.
21. 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.
22. Ug A, Ceylan O. Occurrence of Resistance to Antibiotics Metals and Plasmids in Clinical Strains of *Staphylococcus* Spp. *Arch Med Res* 2003;34:130-136.
23. Loo CY, Mitrakul K, Voss IB, Hughes CV, Ganeshkumar N. Involvement of the *Adc* Operon and Manganese Homeostasis in *Streptococcus Gordonii* Biofilm Formation. *J Bacteriol* 2003;185(9):2887-2900.
24. Shakoory A, Maakhdoom M, Hag RU. Hexavalent Chromium Reduction by a Dichromate Resistant Gram-positive Bacterium Isolate from Effluents of Tanneries. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53(3):348.
25. Camargo FA, Bento FM, Okeke BC, Frankenberger WT. Chromate Reduction by Chromium-Resistant Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Dichromate. *J Environ Qual* 2003;32(4):1228-1233.
26. Amoozegar MA, Hamed J, Dadashpour M, Shariatpanahi S. Effect of Salinity on the Tolerance to Toxic Metals and Oxyanions in Native Moderately Halophilic Spor-forming Bacilli. *World J Microbial Biotechnol* 2005;21:1237-1243.