

# شناسایی مولکولی باکتری گزنورهابدوس هومونیکسی سویه ANU1 جداسازی شده از خاک های آلوده به نفت منطقه سی - برنج مسجدسلیمان

مأده سجادیان<sup>۱</sup>، منیر دودی\*<sup>۲</sup>، عباس شیرمردی<sup>۳</sup><sup>۱</sup> کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران.<sup>۲</sup> استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران.<sup>۳</sup> استادیار گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مسجد سلیمان، مسجدسلیمان، خوزستان، ایران.

چکیده

جذب زیستی فلزات سنگین یکی از مؤثرترین فناوریها در انتقال فلزات سنگین از مکان های آلوده بوده که برای اجرای آن نیاز به جداسازی و شناسایی مولکولی میکروارگانیسم است. جمعیت و فعالیت میکروبی در آبهای آلوده با فلزات سنگین تغییر یافته و کاهش می یابد. از طرف دیگر میکروارگانیسم های مقاوم به این آلاینده ها، سازوکارهای مقاومتی را ایجاد می کنند که منجر به ایجاد گونه های مقاوم با توانایی تحمل انواع فلزات می شود. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های مقاوم به فلز سرب و سنگین سرب و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنها (MIC) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نمونه گیری از خاکهای آلوده به نفت سه ناحیه منطقه سی - برنج در مسجدسلیمان انجام شد. برای جداسازی باکتریهای مقاوم به فلز سرب و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) آنها از روش انتشار در آگار و محیط کشت PHG II آگار حاوی غلظت های 0.5، 1، 2.5، 3، 3.5 و 4 میلی مول بر لیتر از نیترات سرب  $Pb(NO_3)_2$  استفاده شد. سپس شناسایی مولکولی سویه های مقاوم به فلز سرب به روش کلنی - PCR انجام شد. در این مطالعه 6 جدایه باکتریایی مقاوم به فلز سرب جداسازی و شناسایی شدند که در بین آنها جدایه *Xenorhabdus hominickii strain ANU1* بیشترین میزان مقاومت را نسبت به سرب (MIC= 4 mM) نشان داد. بر اساس بررسی مولکولی این جدایه دارای توالی جدیدی بود و به عنوان *Xenorhabdus hominickii* سویه ANU1 در بانک جهانی ژن (NCBI) به ثبت رسید. با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می رسد که سویه جداسازی شده پس از بررسی مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها گزینه مناسبی برای جذب زیستی سرب از خاک های نفتی و همچنین پساب های صنعتی در آینده می تواند باشد.

کلمات کلیدی: باکتریهای مقاوم به سرب، خاکهای نفتی، کلنی - MIC، PCR

\* نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران. آدرس ایمیل: [Monirdoudi@yahoo.com](mailto:Monirdoudi@yahoo.com) OR [Doudi@iaufala.ac.ir](mailto:Doudi@iaufala.ac.ir)

## بحث و نتیجه گیری

مشاهده های کاهش کل جمعیت باکتری های هتروتروف نسبت به جمعیت باکتری های مقاوم به سرب در خاک ها و همچنین کاهش رشد باکتری های مقاوم به سرب در حضور سرب، اثر سمی ترکیبات فلزی بر باکتری ها را اثبات می کند. باکتری های مورد بررسی در این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی قادر به جذب سرب بودند و رشد مناسبی را در حضور این فلز از خود نشان دادند و بر همین اساس به نظر می رسد کاندید مناسبی برای حذف زیستی سرب از خاک های نفتی و همچنین پساب های صنعتی در آینده باشند.

### نتیجه گیری کلی

در دهه های اخیر، انواع مختلف موجودات زنده نظیر باکتری ها، قارچ ها و جلبک ها با هدف شناسایی جذب کننده های زیستی کارآمد دفع فلز به طور گسترده مشاهده و مورد مطالعه قرار گرفته اند. این موجودات به طور گسترده ای در اکوسیستم های آبی و خاکی پراکنده اند. بررسی ها نشان داده است که در اکثر پژوهش ها از خاک و آب مناطق آلوده استفاده شده است، زیرا امکان وجود میکروارگانیسمی با توان تجزیه کنندگی بالا در این مناطق بیشتر از مناطق غیر آلوده به فلزات سنگین می باشد.

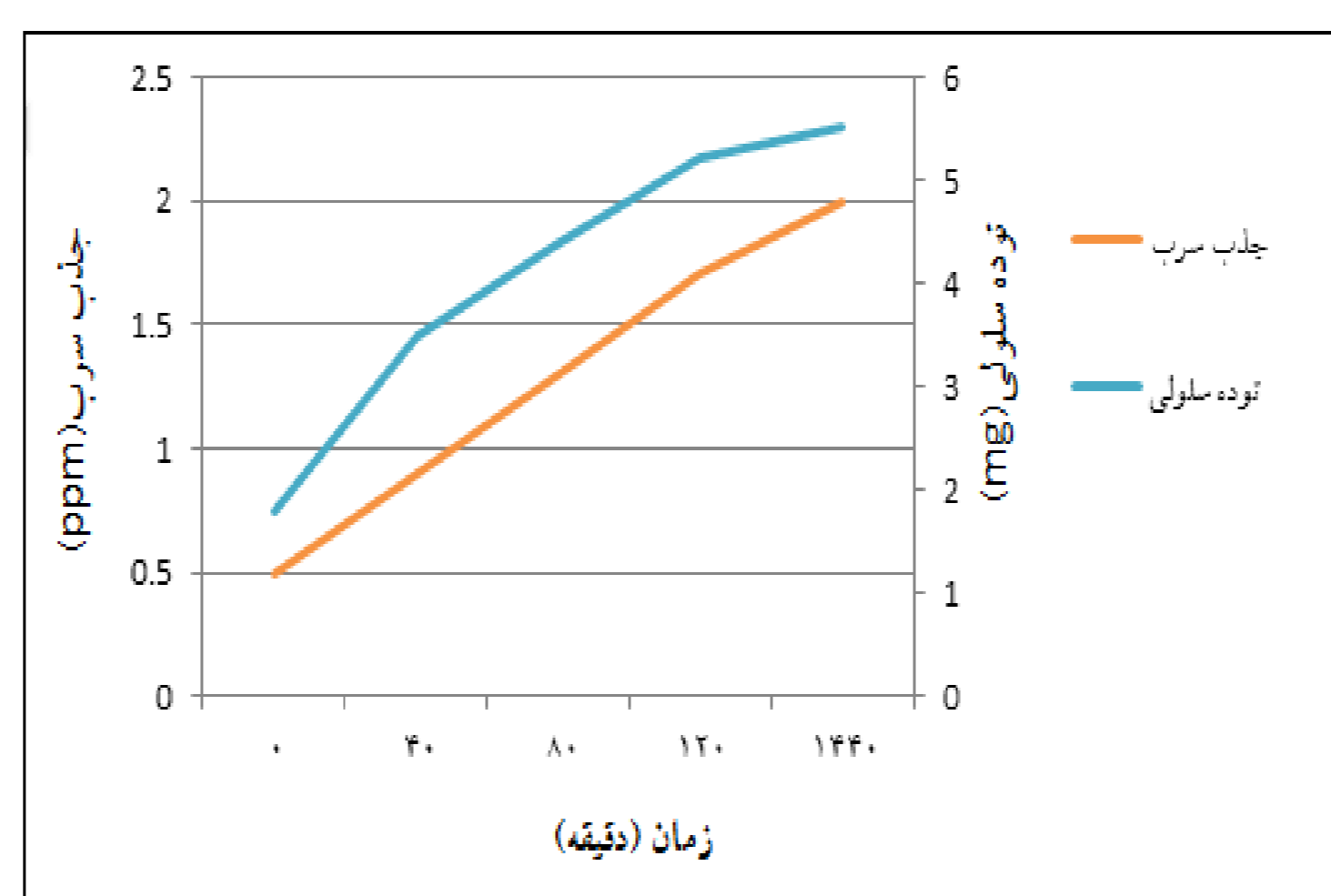


## مباحث

1. Alsherif EA, Elhameed MS, Mahmood MA, Ahmed HS. 2015. Use of cyanobacteria and organic fertilizer mixture as soil bioremediation. American Eurasian Journal Agric & Environ, 15(5): 794-799.
2. Safiyani I, Abdulwahid IA, Abubakar US, Ritasingh M. 2015. Review on comparative study on bioremediation for oil spills using microbes. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences, 6(6): 783-790.
3. Alboghobeish H, Tahmourespour A, Doudi M. The study of nickel resistant bacteria (NiRB) isolated from wastewaters polluted with different industrial sources. IJEHSE. 2014; 12: 1-7.
4. Nasrazadani A, Tahmourespour A, Hoodaji M. Determination of bacteria resistance threshold to lead, zinc and cadmium in three industrial wastewater samples. J Environ Studies. 2011; 36(56): 75-86. [In Persian]
5. Hussein H, Ibrahim SF, Kandeel K, Moawad H. 2004. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. Electronic Journal of Biotechnology, 7(1): 38-46.

## نتایج

در این مطالعه، از بین باکتری های مقاوم به سرب جداسازی شده، باکتری باسیلوس فانیکولوس سویه GS4، MIC = 4 را داشت او میزان جذب سرب و زیست توده آن در زمان های مختلف بررسی شد. که نتایج آن در شکل زیر ارائه شده است. آلبوغیبیش (Alboghobeish) و همکاران، نصرآزادانی (Nasrazadani) و همکاران به منظور جداسازی باکتری های مقاوم به فلزات از محیط کشت PHG II آگار و دمای 30 °C استفاده کردند که مشابه پژوهش حاضر می باشد. به عنوان مثال حسین و همکاران در سال 2004 سویه هایی را که از رشد آن ها با غلظت یک میلی مول از کادمیوم، سرب، روی و مس ممانعت نشده بود به عنوان مقاوم در نظر گرفتند. ادوارد راجا و همکاران در سال 2009 سویه هایی را که از رشد آن ها با غلظت 0.1 mM برای Ni، Pb و Cd ممانعت نشده بود به عنوان مقاوم در نظر گرفتند. آلبوغیبیش و همکاران در سال 1391 سویه هایی که از رشد آن ها با غلظت 0.5 Mm از فلزات نیکل، سرب و کادمیوم ممانعت نشده بود به عنوان مقاوم در نظر گرفتند.



میزان زیست توده خشک و جذب سرب توسط جدایه *Xenorhabdus hominickii strain ANU1* در زمان های مختلف

در این پژوهش، باکتری *Xenorhabdus hominickii* سویه ANU1 به فلز سرب میزان MIC ایی معادل با 4 میلی مولار را از خود نشان داد که نسبتا رشد مناسبی در حضور سرب داشت. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق و سایر مطالعات مانند حسین و همکاران، ادوارد راجا و همکاران، آلبوغیبیش و همکاران در سال های 2004 و 2009 و 1391 که نشان دهنده ظرفیت باکتری ها در جذب سرب و قدرت تحمل آنها نسبت به این فلز است امید است که بتوان از این باکتری ها در آینده نزدیک جهت پاکسازی زیستی سرب از مناطق آلوده کشور و سپس اقدام به حذف آن نه تنها از پساب های آلوده صنایع مختلف و خاک های نفتی بلکه حتی از خاک های پمپ بنزین ها و گاراژها در سطح شهر ها استفاده نمود.

## مقدمه

آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین در امتداد با پیشرفت صنعتی در سرتاسر جهان در حال گسترش و بدتر شدن است. فلزات سنگین غیرقابل تجزیه زیستی می باشند و تمایل دارند که در ارگانیسم های زنده در کل زنجیره های غذایی انباشته شوند که مشکلات قابل توجهی را برای سلامت انسان و اکوسیستم ها ایجاد کنند. هزینه ی پایین، بازده ی حذف بالا و کارایی خوب زیست پالایی در غلظت های پایینی از فلزات سنگین بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ریزجلبک ها و میکروارگانیسم های دیگر نقش مهمی را در ترانسفورماسیون (تغییر و تبدیل) یون های فلزات سنگین در محیط زیست بر عهده دارند. لکه های نفتی (نشت نفت) تصادفی یا عمدی یک اثر عمیق بر روی آلودگی زیست محیطی دارند.

## مواد و روش ها

در این مطالعه جمع آوری نمونه ها به صورت میدانی انجام شد، به این صورت که نمونه برداری از چند قسمت از منطقه سی برنج شهرستان مسجدسلیمان انجام گردید. در این پژوهش از روش Agar dilution استفاده شد، به این صورت که پلیت های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت های مختلف فلز تهیه شد. پس از طی مدت زمان لازم پلیت ها بررسی گردید و براساس حداقل غلظتی که از رشد باکتری ممانعت کرده بود، MIC تعیین شد. غلظت فلز مورد استفاده در این تحقیق برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) به ترتیب: 0.5، 1، 2، 3، 4، 5، 6 میلی مول بود.

