



# جداسازی و شناسایی مولکولی باسیلوس سوبتی لیس سویه ی *H1F* مقاوم به کروم از پساب یک کارخانه چرم سازی

هدی یکتامنش<sup>۱</sup>، منیر دودی<sup>۲\*</sup>، زرین دخت امامی<sup>۳</sup>

- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران



## چکیده

آلودگی با فلزات سنگین یک مشکل جهانی است، میزان فلزات سنگین در هوا، آب و خاک، 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. حذف فلزات سنگین نیاز به فناوری پیشرفته و پرهزینه ای دارد بنابر این پاکسازی زیستی با استفاده از میکروارگانیسم های مقاوم به فلزات سنگین می تواند راهکاری ارزان باشد. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های مقاوم به کروم و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنها (MIC) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. جهت انجام این پژوهش نمونه گیری از پساب یک کارخانه چرم سازی در خوزستان انجام شد. برای جداسازی باکتری های مقاوم به کروم از روش رقت در آگار و محیط کشت PHG II آگار حاوی کروم استفاده گردید. سپس مراحل خالص سازی باکتری ها انجام گرفت و میزان حداقل غلظت ممانعت کننده رشد باکتری ها برای فلز با غلظت های ۷، ۵/۷ و ۸ میلی مول بر لیتر تعیین گردید. سپس شناسایی مولکولی سویه های مقاوم به کروم از طریق تعیین توالی ژن 16S rDNA انجام شد. در این مطالعه سه سویه مقاوم به فلز کروم جداسازی و شناسایی شدند که در بین آنها *Bacillus subtilis* سویه *H1F* بیشترین میزان مقاومت را نسبت به کروم (MIC=6mM) نشان داد. بر اساس آنالیز مولکولی این جدایه دارای توالی نسبتاً جدیدی بود و به عنوان *Bacillus subtilis* سویه *H1F* در بانک جهانی ژن (NCBI) به ثبت رسید. با توجه به نتایج این پژوهش به نظر می رسد که سویه جداسازی شده پس از آنتی بیوگرام و حذف ژنهای مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند انتخاب مناسبی برای حذف زیستی کروم از پساب های آلوده در آینده باشد.

واژگان کلیدی: پاک سازی زیستی، باکتری های مقاوم به کروم، پساب چرم سازی، MIC، 16S rDNA، PCR

\* نویسنده مسئول: آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران؛ آدرس ایمیل: [monirdoudi@yahoo.com](mailto:monirdoudi@yahoo.com)

## بحث و نتیجه گیری

ویتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در پژوهش خود کورینه باکتریوم هوآگی را از چندین پساب صنعتی جداسازی نمودند که بالاترین مقاومت به فلز کروم در آن (MIC= 35 mM) گزارش شده بود (ویتلی و همکاران، ۲۰۱۵). این در حالی است که در پژوهش حاضر بالاترین مقاومت به فلز کروم (MIC= 6 mM) بود. متفاوت بودن این درصد مقاومت در دو پژوهش فوق الذکر می تواند مربوط به مختلف بودن شرایط فیزیکی و شیمیایی دو پژوهش حاضر و متفاوت بودن جنس و گونه باکتری های مقاوم به فلز کروم باشد.

زنگ و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پژوهش خود نشان دادند که، باکتری منتخب *Staphylococcus arlettae* مقاوم به کروم نسبت به آنتی بیوتیک های کانامایسین، اریترومایسین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین هم مقاومت نشان داده بود. نتایج این محققین با پژوهش حاضر در مورد سویه های *H1F* مطابقت داشت.

در مطالعه چاترجی و همکاران سودوموناس آئروجینوزای استفاده شده پس از سه روز بیش ترین میزان حذف کروم را به میزان ۷۲/۵۶ درصد از محلول ساختگی ۳۰ قسمت در میلیون و ۲۶/۵۲ درصد از پساب یک کارخانه دباغی نشان داده بود (چاترجی و همکاران، ۲۰۱۱) که نتایج این محقق تا حدودی با پژوهش حاضر هم خوانی داشت.

## نتیجه گیری کلی

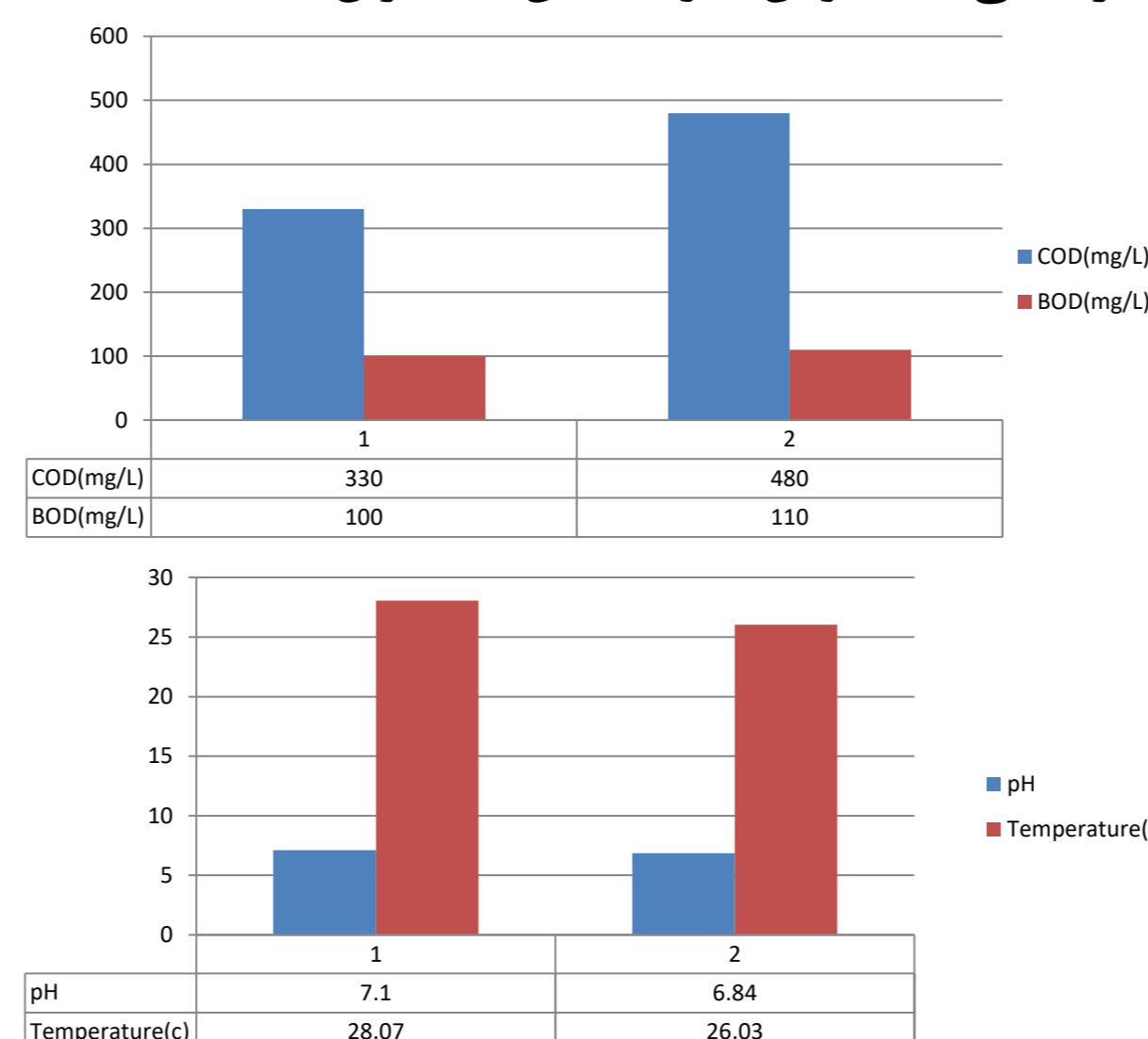
باکتری مورد بررسی در این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی قادر به جذب فلز کروم و رشد مناسبی در حضور این فلز از خود بود به نظر می رسد که در آینده بتواند انتخاب مناسبی برای حذف زیستی این فلز از پساب ها و خاک های آلوده پس از حذف ژنهای مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی باشد. بنابراین با توجه به روند رو به رشد استفاده از فلز کروم در صنایع مختلف و همچنین جایگزینی موجودات زنده به ویژه باکتری ها برای جذب و حذف فلزات نسبت به روش های شیمیایی به علت هزینه پایین و آلودگی کم آن، لذا امید است بتوان از این باکتری ها جهت جذب و حذف بسیاری از فلزات مانند کروم موجود در فاضلاب های آلوده صنایع مختلف استفاده کرد.

## منابع

- Chatterjee S, Ghosh I, Mukherjea KKU. 2011. Ptake and removal of toxic Cr(VI) by *Pseudomonas aeruginosa*: physico-chemical and biological evaluation. Current Science, 101 (5): 645- 52.
- Viti C. 2015. Response of microbial communities to different doses of chromate in soil microorganism. Applied Soil Ecology, 34: 125-139.
- Viti P, Peace A and Giovanetti L. 2003. Characterization of chromium resistant bacteria isolated from chromium contaminated soil by tannery activity. Current Microbiology, 46: 1-6.
- Zeng X-X, Tang J-X, Liu X-D, Jiang P. 2009. Isolation, identification and characterization of cadmium-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain E1. Journal Central South University, 16: 416- 26

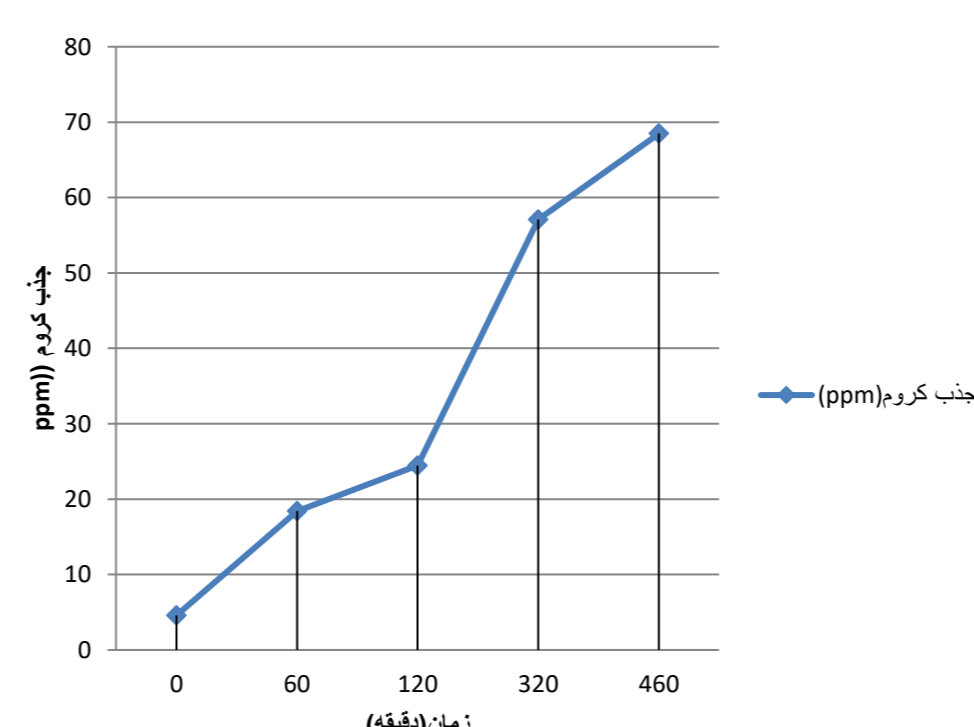
## نتایج

در این مطالعه، از بین سویه های جداسازی شده، مقاوم ترین سویه به فلز کروم سویه *H1F* بود که بعد از انجام تکنیک مولکولی PCR باسیلوس سوبتی لیس گزارش شد. این سویه دارای بالاترین میزان MIC=6 بود و بالاترین مقاومت را به آنتی بیوتیک های وانکومایسین، سفالوتین، ریفامپسین و نسبت به آنتی بیوتیک های سیلین، اریترومایسین، تتراساکلین، کلرام فنیکل، استرپتومایسین و سولفومتوکسازول تری متوپریم حساسیت نشان داد. همچنین بیشترین جذب زیستی باسیلوس سوبتیلیس به میزان ppm=68/5 نشان داد.



نام آیزوله	S	P	E	V	TE	C	CF	RA	FOX	SXT
H <sub>1</sub> F	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S

زمان (دقیقه)	میزان جذب (ppm)	میزان بیومس (mg)	تعداد کلنی
0	55/4	9/4	101
60	40/18	9/6	80
120	45/24	9/7	56
320	1/57	7/9	28
460	50/68	1/13	19



نمودار ۱- جذب و بیومس *H1F* باسیلوس سوبتی لیس سویه

## مقدمه

آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین سمی در سراسر جهان همراه با پیشرفت صنایع گسترش می یابد. مس، کروم، کادمیوم و نیکل بیشترین فلزات سنگینی هستند که استفاده می شوند و آلودگی های گسترده تری در محیط زیست ایجاد می کنند (گانگولی و همکاران، ۲۰۰۹). فلزات پس از تخریب در فرآیندهای صنعتی مختلف، به صورت پساب وارد محیط زیست می شوند. یکی از این فلزات که به میزان زیادی در خاک و آب وجود دارد، کروم است. چند روش فیزیکی شیمیایی برای حذف فلزات سنگین مانند کروم از محیط وجود دارد. با این حال، این روش ها به دلیل هزینه های عملیاتی بالا و تولید ضایعات جامد غیر عملی هستند. تحقیقات در سال های اخیر نشان می دهد که بسیاری از میکروارگانیسم ها غلظت زیادی از فلزات را انباشته می کنند (رامتک، ۲۰۱۴). کاهش میکروبی کروم شش ظرفیتی دارای اهمیت عملی است، زیرا استراتژی های حذف زیستی سنجش فلزات سنگین از دستاوردهای تکنولوژی سبز است که مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست می باشد (گانگلیا و همکاران، ۲۰۰۹). از این رو هدف از مطالعه ی حاضر جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری مقاوم به فلز سنگین کروم از پساب یک کارخانه چرم سازی و بررسی حذف زیستی کروم توسط سویه مورد نظر است.

## مواد و روش ها

در این پژوهش نمونه برداری به صورت میدانی انجام گرفت به این صورت که نمونه برداری از خروجی پساب یک کارخانه چرم سازی در خوزستان انجام گرفت. در این پژوهش برای بررسی باکتری های مقاوم به فلز کروم از روش تهیه رقت در آگار (Agar dilution) استفاده شد. در این روش پلیت های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت های مختلف فلز تهیه و از نمونه بر روی آنها کشت داده شد و گرمخانه گزاری گردید که پس از طی مدت زمان تعیین شده پلیت ها را مورد بررسی قرار داده و سویه های مقاوم را جداسازی نمودیم. سپس بر اساس تکنیک مولکولی PCR جنس و گونه سویه را تعیین نمودیم. در مرحله بعد حداقل غلظتی که از رشد باکتری ممانعت کرده بود میزان MIC به طریق روش مایکرودایلوشن تعیین گردید که از غلظتهای ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶ در این پژوهش بررسی تست حساسیت سویه به دیسکهای آنتی بیوگرام به روش کربی بائر صورت گرفت که از دیسکهای متعددی از قبیل: اریترومایسین، تتراساکلین، کلرام فنیکل، ونکومایسین، ریفامپسین، سولفامتوکسازول تری متوپریم و پنی سیلین استفاده گردید. در مرحله آخر جهت بررسی میزان جذب فلز سنگین کروم توسط باکتری های مقاوم جدا شده در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از دستگاه ICP انجام گرفت و گزارش گردید.

