مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی ام - بهار۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های مقاوم به سرب از خاک های آلوده به نفت منطقه سی _ برنج شهرستان مسجدسلیمان استان خوزستان

مائده سجادیان [۱]، منیر دودی *[۱]، عباس شیرمردی [۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد مسجدسلیمان، خوزستان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: به‌دلیل شیوع به‌نسبت بالای بیماری‌های ناشی از حضور فلز سرب در خاک‌های آلوده به نفت مراکز صنعتی، سپس انتقال این فلز به گیاهان و جانوران و در نهایت به انسان و خطرات بالایی برای سلامتی انسان و سایر موجودات زنده ، چنین به نظر می‌رسد که شناسایی و جداسازی میکروارگانیسم‌های با مقاومت بالای فلزی و در نهایت حذف زیستی می‌تواند گام مهمی در روند تکاملی سیستم‌های پاک‌سازی خاک‌های آلوده به سرب مراکز صنعتی محسوب گردد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری از ۳ ناحیه از خاک آلوده به نفت منطقه سی برنج مسجدسلیمان انجام شد. برای جداسازی باکتری-های مقاوم به سرب از روش رقت در آگار و محیط کشت PHG II حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴ میلی‌مول بر لیتر سرب استفاده شد. برای شناسایی باکتری‌های جذب کننده سرب ابتدا از تست‌های بیوشیمیایی و سپس روش مولکولی کلنی- PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه ۵ ایزوله باکتریایی مقاوم به سرب جداسازی و شناسایی شد، که در بین آن‌ها باکتری *Proteus mirablis strain AOUC-001* بالاترین میزان مقاومت به سرب (MIC=۴) را نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که باکتری های مورد بررسی در این پژوهش قادر به جذب سرب در شرایط آزمایشگاهی بودند و رشد به‌نسبت مناسبی را در حضور این فلز از خود نشان دادند، بنابراین به نظر می رسد گزینه مناسبی برای حذف زیستی سرب از خاک‌های آلوده به نفت در آینده باشند. به‌شرطی که این خاک‌های آلوده جهت جداسازی این باکتری‌ها با فیلتره کردن تیمار شوند.

واژه‌های کلیدی : باکتری‌های مقاوم به فلز، سرب، خاک‌های نفتی، شناسایی مولکولی، حداقل غلظت بازدارنده (MIC)

مقدمه

فاضلاب‌ها و پساب‌های خروجی از صنایع ، ممکن است حاوی مواد سمی و مقادیر بالایی از فلزات سنگین باشند که با تخلیه در خاک‌ها و روان آب‌های سطحی، مقادیر زیادی از آلاینده‌ها وارد محیط زیست می‌شوند (۵ ، ۱۴). آلودگی محیط با این آلاینده‌های خطرناک در نهایت منجر به غیر بهداشتی شدن منابع آب آشامیدنی و خاک شده (۱۴) و در طولانی مدت، خطرات سلامتی برای انسان و سایر موجودات زنده به‌همراه خواهد داشت. انسان به‌طور دائم و موقت در معرض ۳۵ فلز سمی قرار دارد، از این تعداد ۲۳ فلز جزء عناصر سنگین هستند. این فلزات در مقادیر کم به‌طور طبیعی در محیط و رژیم غذایی وجود دارند و برای سلامتی بدن لازم می‌باشند. اما در اثر آلودگی‌های ناشی از فعالیت انسانی غلظت آن‌ها در محیط زیاد شده و در نتیجه پس از وارد شدن به زنجیره غذایی انسان اثرهای سمی حاد و مزمنی برای بدن ایجاد می‌کنند

نویسنده مسئول :
دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان ، اصفهان ، ایران.
پست الکترونیکی : Monirdoudi@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.30.8.3]

(۱۵). فلزات سنگین به‌طور عمده به گروهی از عناصر اطلاق می‌گردد که چگالی بیش‌تر از gr/cm^3 ۵ دارند، در واقع چگالی فلزات سنگین پنج برابر آب است. مهم‌ترین این عناصر سرب، کادمیوم، کروم، مس، جیوه، نیکل، روی، وانادیوم و فلزات سمی دیگر هستند (۱۷). سرب در بدن انسان اثرهای ناخواسته فراوانی را به دنبال دارد که عبارتند از : آسیب کلیه، اختلال سیستم عصبی ، آسیب مغز ، ناباروری مردان و آسیب‌های جبران ناپذیر اسپرم، کاهش قدرت یادگیری و اختلال‌های رفتاری مانند پرخاشگری در بچه‌ها، همچنین سرب از راه جفت وارد بدن جنین شده، به‌همین علت باعث آسیب جدی به سیستم عصبی و مغز جنین و در نهایت تولد نوزادان ناقص الخلقه می‌گردد (۱۱). از دیگر آثار سرب در بدن ایجاد سلول-های آسیب دیده در هیپوکامپوس (بخشی در مغز که در حافظه نقش دارد) است. تحقیق‌های محققان نشان داده است که، هیپوکامپی که در معرض سرب قرار داشته آسیب های ساختاری مانند هسته ی غیرمعمول و دناتوره شدن میلین را در مقایسه با کنترل نشان داده است (۱۹). حضور غلظت‌های سمی فلزات در محیط، اثرهای زیانباری بر سلامت انسان و حیوانات داشته و موجب برهم خوردن تعادل و نظم اکوسیستم می‌شود. بنابراین مطالعه راه های حذف این آلاینده‌ها به-خصوص از راه بیولوژیکی بسیار ضروری است (۱۳). آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین در امتداد با پیشرفت صنعتی شدن جهان در حال گسترش و بدتر شدن است. فلزات سنگین غیرقابل تجزیه زیستی می‌باشند و تمایل دارند که در ارگانیسم‌های زنده در کل زنجیره‌های غذایی انباشته شوند که مشکلات قابل توجهی را برای سلامت انسان و اکوسیستم‌ها ایجاد کنند. هزینه پایین، بازده حذف بالا و کارایی خوب زیست پالایی در غلظت‌های پایینی از فلزات سنگین بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ریزجلبک‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های دیگر نقش مهمی را در ترانسفورماسیون (تغییر و تبدیل) یون‌های فلزات سنگین در محیط زیست بر عهده دارند (۳).

لکه‌های نفتی (نشت نفت) تصادفی یا عمدی یک اثر عمیق بر روی آلودگی زیست محیطی دارند. لکه‌های نفتی از کشتی های نفت‌کش و از نشت‌های دور دست نفت به‌عنوان یک خطر عمده زیست محیطی شناسایی شده‌اند. اعتقاد بر این است که نشت نفت زیست‌گاه پرندگان و پستانداران دریایی و ماهی‌ها را تخریب می‌کند. نشت نفت خام غلیظ و چسبناک می‌تواند به سرعت به ماهی و حیات وحش آسیب برساند (۱۶).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و ایزوله‌های مورد بررسی

در این مطالعه جمع آوری نمونه‌ها به‌صورت میدانی انجام شد، به این صورت‌که نمونه برداری از خاک‌های آلوده به نفت سه ناحیه از منطقه سی – برنج مسجد سلیمان انجام شد. نمونه-برداری در ظرف‌های استریل درپوش‌دار انجام گرفت. دما، pH، EC، TOC و میزان فلز سنگین سرب (بر حسب ppm) از نمونه‌های خاک جمع آوری شده اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان pH، EC و غلظت فلز سرب به‌ترتیب از دستگاه‌های pH متر (Zeg Chemi)، EC متر(Jenewey, England) و ICP (Varian710 ES) استفاده گردید.

برای اندازه‌گیری میزان سرب در نمونه‌های خاک، ابتدا یک گرم از نمونه خاک به بشر ۲۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. مقدار ۵ سی‌سی اسید نیتریک غلیظ، ۲ سی‌سی اسیدکلریدریک و قطره قطره اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه گردید و بر روی هیتر قرار داده شد تا به آرامی تبخیر و به‌طور کامل خشک شود. سپس ۱۰۰ میلی لیتر EDTA ۰/۰۱ ٪ به آن اضافه شد و از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول باقی مانده حاوی یون های فلزی بود. سپس با کمک دستگاه ICP میزان فلز سنگین سرب قرائت شد.

جداسازی باکتری‌های مقاوم به سرب از خاک-های مورد بررسی

در این تحقیق از روش انتشار در آگار برای بررسی میکروب‌های مقاوم به سرب استفاده شد. در این روش پس از تهیه محیط کشت PHG II (شامل: ۴ گرم پپتون، ۱ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار) استریل هنگامی که دمای محیط کشت در حد ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید، محلول فلزی به محیط کشت افزوده شد. هر پلیت حاوی فلز سرب با غلظت نیم میلی‌مول بود. سپس pH محیط کشت برابر با ۷ تنظیم گردید. بعد از آن پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا سطح پلیت عاری از هر گونه رطوبت شود. در این مرحله ml ۱/۵-۱ از رقت‌های مختلف سوسپانسیون خاک از 10^{-1} تا 10^{-6} را با پی‌پت استریل در سطح محیط کشت فلزدار PHG II تلقیح شد و با میله شیشه‌ای سرکج استریل در سطح پلیت پخش شد و سپس پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.30.8.3]

۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. از دو پلیت نیز به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

رشد کلنی‌های باکتریایی پس از ۵ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت (۲). پس از رشد کلنی‌های مقاوم و شمارش، آن‌هایی که از نظر شکل ظاهری (رنگ، قوام، سطح) با هم تفاوت داشتند انتخاب شده و به منظور غنی سازی در لوله‌های حاوی محیط کشت PHG II مایع با همان غلظت محیط اولیه منتقل شد.. این لوله‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد، سپس به‌منظور خالص سازی باکتری‌ها آن‌ها را به روش کشت خطی بر محیط کشت PHG II آگار با همان غلظت فلزی کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون از کلنی‌های تک، گسترش میکروبی تهیه و رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و به این ترتیب مورفولوژی و آرایش باکتری‌ها مشخص شد. پس از این مرحله به‌منظور نگه‌داری باکتری‌ها، از محیط PHG II حاوی فلز به‌صورت شیب‌دار استفاده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و رشد باکتری‌ها، آن‌ها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ذخیره‌سازی باکتری‌ها یک لوپ از هر باکتری در ۱ میلی‌لیتر محیط PHG II براث حاوی ۴۰٪ گلیسیرول در اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال و ابتدا به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال و سپس ۲۴ ساعت بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد و در نهایت در فریزری با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جهت جلوگیری از شوک سرما برای باکتری ها). در این تحقیق از نمک فلزی نیترات سرب با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار استفاده شد. نمک فلزی مورد استفاده در این پژوهش و غلظت به کار رفته در این مطالعه در اکثر تحقیق‌های مشابه نیز به‌کار رفته است (۶ ، ۹).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)

در این مطالعه برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری‌ها توسط فلز سنگین سرب از روش Agar dilution استفاده شد، به این صورت که پلیت‌های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت‌های مختلف فلز ((mM) ۱، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴ تهیه گردید، به‌طوری‌که هر پلیت حاوی یک غلظت از فلز بود و غلظت‌های مابین نیز انتخاب شدند (۲). در واقع محلول فلزی با غلظت مناسب به محیط کشت اضافه شد، سپس کلنی‌های مقاوم به صورت شعاعی بر سطح پلیت کشت داده شد (۱۰). پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، پس از طی مدت زمان لازم پلیت‌ها بررسی گردید و بر اساس حداقل غلظتی که از رشد باکتری ممانعت کرده بود، MIC تعیین شد و در نهایت حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) نیز برای این فلز تعیین گردید (۸).

شناسایی مولکولی نمونه‌ها

شناسایی مولکولی نمونه‌ها به کمک تکنیک Colony-PCR و ترتیب ژنی ۱۶S rDNA انجام گرفت (۷). در این مطالعه از پرایم‌های عمومی طراحی شده برای ژن ۱٦S rDNA استفاده شد که توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای عمومی تکثیر ژن ۱۶ S rDNA

پرایمر	توالی	طول پرایمر
$B_1(FD_1)$	۵'-AGAGTTTGATCCTGGCTTAG-۳'	۲۰ نوکلئوتید
$B_2(RD_1)$	۵' - TAAGGAGGTGATCCAGC - ۳'	۱۷ نوکلئوتید

جهت انجام این تکنیک ابتدا مقداری از کلنی خالص‌سازی شده باکتری‌ها با استفاده از لوپ استریل در ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شده و به‌عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام PCR از ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر نمونه باکتری محلول در آب مقطر تزریقی به‌عنوان الگو، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای راهبر و پیش‌رو (۲۰ میکرومولار) ، ۲ میکرولیتر Taq پلی‌مراز ۵U، ۳/۲ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۳۶/۳ میکرولیتر آب مقطر تزریقی استفاده شد. سیکل حرارتی استفاده شده جهت انجام PCR در جدول ۲ ارائه داده شده است. محصول PCR به‌وسیله الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه تعیین توالی گردید. توالی‌های به‌دست آمده در پایگاه داده NCBI با استفاده از جستجوگر BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مقایسه و سپس توالی‌های جدید ۱۶srDNA با استفاده از سرویس BankIt به بانک جهانی ژن ارائه شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.30.8.3]

جدول ۲- سیکل حرارتی تنظیم شده جهت انجام PCR نمونه ها

فاز	دما (^{O}C)	زمان(s)
دناتوراسیون اولیه	۹۴	۳۰۰
دناتوراسیون	۹۴	۴۵
اتصال	۵۲	۳۰
تکثیر	۷۲	۶۰
تکثیر نهایی	۷۲	۴۵
نگهداری	۴	_

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی خاک‌های مورد مطالعه و هم‌چنین غلظت فلز سنگین سرب در هر یک از خاک‌های مورد مطالعه، در جدول۳ ارائه شده است.

جدول ۳- خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی نمونه‌های خاک مورد آزمایش

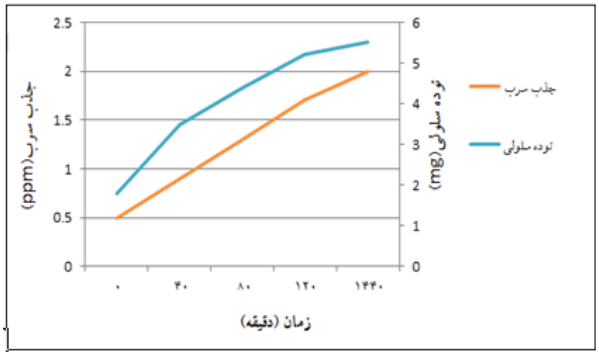
خاک ها	دما(°c)	pH	EC(ds/m)	TOC(gr/l)	Pb(ppm)
۱	۳۰	۸/۴	۰/۵	۰/۰۲۸	۰/۶۳۰۹۹۰
۲	۳۰	**۵/۸**	۱/۹	۰/۰۵۵	۰/۷۸۱۲۹۰
۳	۳۰	۶/۰۳	۱/۵	۰/۱۳۳	۰/۹۳۷۷۹۳

تمام سویه‌های جداسازی شده در این مطالعه از نظر میزان MIC و MBC به فلز سرب مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج مربوط به سویه‌های مختلف در جدول ۴ ارائه شده است.
در بین ایزوله‌های مقاوم به سرب در این مطالعه ایزوله MS3 بیش‌ترین مقاومت (MIC=4mM) را در برابر سرب نشان داد.

در جدول ۵ تست‌های بیوشیمیایی مربوط به گونه پروتئوس، در جدول ۶ تست‌های بیوشیمیایی مربوط به گونه باسیلوس و در جدول ۷ تست‌های بیوشیمیایی مربوط به گونه گزنورهابدوس آورده شده است.

بررسی میزان جذب سرب توسط باکتری‌های مقاوم

در این مطالعه، از بین باکتری‌های مقاوم به سرب جداسازی شده، باکتری MS3 که بالاترین میزان MIC را داشت انتخاب و میزان جذب سرب و زیست توده آن در زمان‌های مختلف بررسی شد. که نتایج آن در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل(۱)- میزان زیست توده خشک و جذب سرب توسط جدایه ***Proteus*** *miralis strain AOUC-001* در زمان‌های مختلف

در سایت NCBI پس از بلاست ترادف مورد نظر، امکان یافتن جایگاه فیلوژنی وجود دارد که جایگاه فیلوژنی جدایه MS3 نیز در شکل ۲ ارائه شده است.

جدول۴- نتایج MIC و MBC برحسب میلی‌مولار باکتری‌های مقاوم به سرب در این پژوهش

کد	نام ایزوله	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۳	۳/۵	۴	MIC	MBC
MS3	*Proteus mirabilis strain AOUC-001*	+	+	+	+	+	+	+	+	4	4
MS1	*Xenorhabdus Sp. TX26*	+	+	+	+	-	-	-	-	2	2
MS2	*Bacillus cereus strain MG303*	+	+	+	+	-	-	-	-	2	2
MS21	*Xenorhabdus hominickii strain ANU1*	+	+	+	+	-	-	-	-	2	2
MS23	*Bacillus funiculus strain GS4*	+	+	+	+	-	-	-	-	2	2

توضیح علائم جدول : + رشد ، - عدم رشد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.30.8.3]

جدول ۵ - نتایج تست‌های بیوشیمیایی باکتری پروتئوسsp

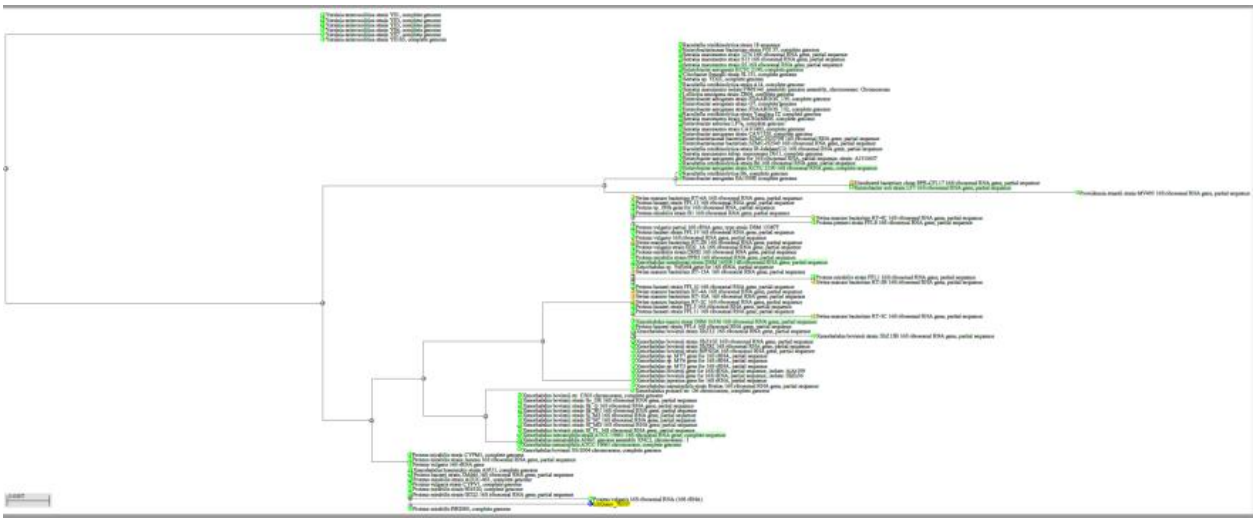
نام ایزوله	اندول	MR	VP	H_2S	اوره	حرکت	هیدرولیز ژلاتین
Proteus mirablis strain AOUC-001	-	+	-	+	+	+	+

جدول ۶- نتایج تست های بیوشیمیایی باسیلوس ها

نام ایزوله	حرکت	لسیتیناز	بتا همولیز	احیا نیترات	اسپور	VP
Bacillus cereus strain MG303	+	+	+	+	-	+
Bacillus funiculus strain GS4	+	-	-	+	-	-

جدول ۷- نتایج تست های بیوشیمیایی گزنورابدوس ها

نام ایزوله	مصرف سیترات	DNAase	Urease	هیدرولیز اسکولین	کاتالاز	تخمیر ریبوز
Xenorhabdus Sp. TX26	+	+	+	+	-	+
Xenorhabdus hominickii strain ANU1	+	+	-	-	-	+



شکل (۲) درخت فیلوژنی جدایه‌ی MS3 استخراج شده از سرور BLAST

مطالعه‌های محققین نشان داده که حضور فلزات سنگین در محیط با ایجاد مقاومت در برابر آن‌ها ارتباط مستقیم دارد یعنی میکروارگانیسم‌ها در حضور فلزات، مکانیسم‌های مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با قابلیت تحمل سمیّت فلزی می‌گردد (۹).

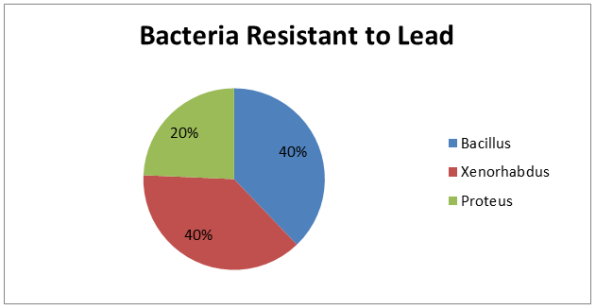
بررسی میزان مقاومت به فلز سرب در باکتری‌های جدا شده دراین تحقیق و مقایسه آن با غلظت‌های فلز سرب موجود در خاک‌های مورد مطالعه هم‌بستگی مثبت معنی‌داری را بین غلظت فلز سرب و مقاومت فلزی در باکتری‌ها نشان داد. به علاوه باید این نکته را متذکر شد که در این بررسی نیز ایزوله MS3 بیش‌ترین مقاومت به سرب را نشان داد که این ایزوله از نمونه خاک شماره ۳ که دارای بیش‌ترین میزان غلظت سرب در بین خاک‌های مورد مطالعه بود، جداسازی گردید. هم‌چنین در مطالعه‌های مختلفی که توسط محققان انجام شده تأثیر غلظت فلزات بر حد مقاومت میکروبی و افزایش آن با افزایش غلظت در محیط ثابت شده است.

میانگین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد به‌عنوان حداقل غلظتی از ماده ضد میکروبی است، که توانایی مهار رشد باکتری‌ها را پس از یک شب انکوباسیون دارد (۴). در بین باکتری‌های مقاوم به فلز سرب جدا شده از خاک‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ۲۰٪ ایزوله‌ها دارای MIC برابر ۴ میلی‌مولار بودند ۸۰٪ ایزوله‌ها ۲ =MIC میلی‌مولار را به خود اختصاص دادند. بر اساس نمودار ۱ باکتری‌های مقاوم به سرب۴۰٪ مربوط به جنس *Bacillus*، ۴۰ ٪ مربوط به

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.30.8.3]

Xenorhabdus و ۲۰٪ مربوط به *Proteus* بودند، همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین درصد باکتری‌های مقاوم به سرب مربوط به دو جنس *باسیلوس sp* و *گزنورابدوس sp* بوده است.



نمودار ۱- تعیین درصد جنس باکتری های مقاوم به سرب در خاک‌های مورد مطالعه

بحث

در این مطالعه، هیچ‌یک از ایزوله‌های مقاوم به سرب نسبت به غلظت‌های بالاتر از MIC یعنی ۴ میلی‌مولار سازگاری نشان ندادند و بعد از مدت زمان طولانی انکوباسیون هیچ رشدی از آن‌ها مشاهده نشد. در مطالعه طهمورث‌پور و کرمانشاهی (۱۳۸۶) از بین باکتری‌های جداسازی شده از چندین پساب صنعتی، بالاترین درصد سازگاری در بین باکتری های مقاوم به روی در غلظت‌های ۱۶ و ۲۴ میلی‌مول بر لیتر (۸۰٪) و پس از آن به‌ترتیب مس در غلظت ۴ میلی‌مول بر لیتر (۴۰٪)، کادمیوم در غلظت‌های ۱۲ و ۱۶ میلی‌مول بر لیتر (۳۰٪) و سرب (۰٪) مشاهده شد. همان‌طورکه در تحقیق طهمورث پور نیز مشاهده می‌گردد در فلزاتی با درجه سمیّت بیش‌تر میزان سازگاری باکتری‌ها نیز نسبت به آن پایین‌تر است. درسال ۲۰۰۱، سلطان مقاومت ۲۴۰ ایزوله از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* را به شش فلز سنگین سرب، کادمیوم، جیوه، روی، نقره و مولیبدن، مورد بررسی قرار داد و بر اساس نتایج منتشر شده از بین ۲۴۰ ایزوله تعدادی جذب بالایی را نسبت به این فلزات از خود نشان دادند.

حسین و همکاران در سال ۲۰۰۴ سویه هایی را که از رشد آن‌ها با غلظت ۱ میلی‌مول از کادمیوم، سرب، روی و مس ممانعت نشده بود به‌عنوان مقاوم در نظر گرفته شدند. ادوارد راجا و همکاران در سال ۲۰۰۹ سویه‌هایی را که از رشد آن‌ها با غلظت ۰/۱ mM برای Ni، Pb و Cd ممانعت نشده بود به عنوان مقاوم در نظر گرفتند. آلبوغبیش و همکاران در سال ۲۰۱۴ سویه‌هایی را که از رشد آن‌ها با غلظت ۰/۵ mM از فلزات نیکل، سرب و کادمیوم ممانعت نشده بود به‌عنوان مقاوم در نظر گرفتند این محقق در پژوهش خود اشاره نمود که از این سویه‌ها می‌توان در آینده جهت حذف زیستی فلزات نامبرده پس از حذف ژن مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این سویه‌ها استفاده نمود.

در این پژوهش، باکتری *Proteus mirabilis* سویه *AOUC-001* در برابر فلز سرب MIC ایی معادل با ۴ میلی‌مولار از خود نشان داد که به‌نسبت رشد مناسبی را در حضور فلز سنگین سرب نسبت به دو مطالعه فوق‌الذکر از خود نشان داد و این نتیجه مؤید مقاومت بیش‌تر این باکتری در برابر این فلز بود. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق و سایر مطالعه‌هایی مانند سلطان و همکاران، حسین و همکاران، ادوارد راجا و همکاران، آلبوغبیش و همکاران در سال‌های ۲۰۰۱ ، ۲۰۰۴ ، ۲۰۰۹ و ۲۰۱۴ که نشان دهنده ظرفیت به‌نسبت بالای این باکتری‌ها در برابر جذب سرب و قدرت تحمل آن‌ها نسبت به این فلز بود امید است که بتوان از این باکتری‌ها در آینده نزدیک جهت پاک‌سازی زیستی سرب از مناطق آلوده کشور کمک گرفت و سپس اقدام به حذف آن نه تنها از پساب‌های آلوده صنایع مختلف و خاک‌های نفتی بلکه حتی از خاک‌های پمپ بنزین‌ها و گاراژها در سطح شهرها با استفاده از فیلتره کردن مجدد پساب‌ها یا خاک‌های آلوده جهت جمع‌آوری باکتری‌های مقاوم به سرب و سپس اتوکلاو کردن آن‌ها استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که فقط یک جنس و گونه خاص از بین باکتری-های مقاوم به سرب جداسازی شده از خاک‌های نفتی منطقه سی – برنج مسجد سلیمان در طی این مطالعه قادر به تحمل غلظت ۴ mM از نیترات سرب بود لذا، چنین به‌نظر می‌رسد که این باکتری به‌دلیل این که مقاومتی در برابر هیچ‌یک از آنتی‌بیوتیک‌های رایج از خود نشان نداده بود، بتواند کاندید مناسبی برای حذف زیستی این فلز از خاک‌های نفتی منطقه سی- برنج مسجد سلیمان و سایر خاک‌ها و پساب‌های آلوده به سرب در آینده باشد. ولی به شرطی که این خاک‌های آلوده جهت جداسازی این باکتری‌ها با فیلتره کردن تیمار شوند. زیرا جذب فلزات سنگین از پسماندهای صنعتی توسط باکتری‌های مقاوم به فلزات می‌تواند راه حل مفیدی برای رفع معضل

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.30.8.3]

آلودگی‌های زیست محیطی ایجاد شده توسط پالایشگاه‌ها و کارخانجات صنعتی باشد.

سپاسگزاری

از تمامی کارکنان و اساتید دانشگاه آزاد اسلامی واحد مسجدسلیمان و واحد شوشتر و شرکت بهره برداری نفت و گاز شهرستان مسجدسلیمان به‌دلیل همکاری‌های لازم جهت انجام این پروژه و از جناب آقای دکتر محمد سجادیان استاد دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل مشاوره‌های ارزشمندشان کمال تشکر و امتنان را داریم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.30.8.3]

منابع

۱ - طهمورث‌پور آ، کرمانشاهی ر.ک. ۱۳۸۶. تعیین سازگاری نسبت به فلزات سنگین در باکتری ها مقاوم شده از پساب صنعتی. مجله آب و فاضلاب، ۶۱: ۵۹-۵۳.

2- 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.

3- Alsherif EA, Elhameed MS, Mahmood MA, Ahmed HS. 2015. Use of cyanobacteria and organic fertilizer mixture as soil bioremediation. American Eurasian J. Agric & Environ, 15(5): 794-799.

4- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentration. J. Antimicrobial Chemotherapy, 2001;48: 5-16.

5- Ansari MI, Malik A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. Bioresource Technology, 2006;98:3149-3153.

6- Chatterjee S, Mukherjee A, Sarkar A, Roy P. Bioremediation of lead by lead-resistant microorganisms, isolated from industrial sample. Advances in Bioscience and Biotechnology; 2012;3: 290-295.

7- Chen WP, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Res, 1993;21(9): 2260.

8- Coral MN, Korkmaz H, Arikan B. Plasmid heavy metal mediated resistances in *Enterobacter* spp. Isolated from sofulu landfill. Ann Microbiol. 2005; 55(3): 175-179.

9- Edward raja C, Selvam GS, Omine K. Isolation identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. International Joint Sysposium on Geodisaster Preventation and Geo Environment in Asia, 2009; 205-211.

10- Hassen A, Saidi N, Cherif M. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. Bioresource Technology, 1998;64(1): 7-15.

11- Huang Q, Chen W, Xu L. Adsorption of copper and cadmium by Cu and Cd resistant bacteria and their composites with soil colloids and kaolinite. Geomicrobiology J. 2005;22(5): 227–236.

12- Hussein H, Ibrahim SF, Kandeel K, Moawad H. 2004. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. Electronic J. Biotechnology, 7(1): 38-46.

13- Krishna MP, Varghese R, Babu AV, Mohamedhatha AA. Bioaccumulation of Cadmium by *Pseudomonas sp*. Isolated from Metal Polluted Industrial Region. Environmental Research, Engineering and Management. 2012;3(61): 58-64.

14- Malik A. Metal bioremediation through growing cells. Enviromental International, 2004;30(2): 261-278.

15- Rehman A, Ali A, Muneer B, Shahir AR. Resistance and Biosorption of mercury by bacteria isolated from industrial effluents. Pakistan Journal of zoology. 2007; 39(3): 139-146.

16- Safiyanu I, Abdulwahid IA, Abubakar US, Ritasingh M. Review on comparative study on bioremediation for oil spills using microbes. Research J. Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences, 2015; 6(6): 783-790.

17- Samanta A, Pera P, Khatoon M, Sinha C, Pal P, Lalee A, Mandal A. 2012. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus sp*. isolated from municipal waste. J. Microbiology and Biotechnology Research. 1(2): 178-189.

18- Soltan ESIsolation and charaterization of antibiotic and heavy metal resistance *P. Stutzeri*. Biometals, . 2001; 7: 30-40.

19- Xu J, Yan HC, Yang B, Tong LS, Zou YX, Tian Y. Effects of lead exposure on hippocampal metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 7 in developmental rats. J of neg results in biomed, 2009;8: 5-11.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.30.8.3]