

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

مأنده سجادیان^۱، منیر دودی^{*}، عباس شیرمردی^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مسجدسلیمان، خوزستان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل شیوع به نسبت بالای بیماری های ناشی از حضور فلز سرب در خاک های 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 می رسد که شناسایی و جداسازی میکروارگانیسم های با مقاومت بالای فلزی و در نهایت حذف زیستی می تواند گام مهمی در روند تکاملی سیستم های پاک سازی خاک های آلوده به سرب مراکز صنعتی محسوب گردد.

مواد و روش ها: نمونه گیری 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 غلظت های ۰/۵، ۱، ۲، ۲/۵، ۳، ۴/۵، ۴ میلی مول بر لیتر سرب استفاده شد. برای شناسایی باکتری های جذب کننده سرب ابتدا از تست های بیوشیمیایی و سپس روش مولکولی کلنی- PCR استفاده گردید.

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

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

واژه های کلیدی: باکتری های مقاوم به فلز، سرب، خاک های نفتی، شناسایی مولکولی، حداقل غلظت بازدارنده (MIC)

مقدمه

وارد محیط زیست می شوند (۵، ۱۴). آلودگی محیط با این آلاینده های 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 به همراه خواهد داشت. انسان به طور دائم و موقت در معرض ۳۵ فلز سمی قرار دارد، از این تعداد ۲۳ فلز جزء عناصر سنگین هستند. این فلزات در مقادیر کم به طور طبیعی در محیط و رژیم غذایی وجود دارند و برای سلامتی بدن لازم می باشند. اما در اثر آلودگی های ناشی از فعالیت انسانی غلظت آن ها در محیط زیاد شده و در نتیجه پس از وارد شدن به زنجیره غذایی انسان اثرهای سمی حاد و مزمنی برای بدن ایجاد می کنند

فاضلاب ها و پساب های خروجی از صنایع، ممکن است حاوی مواد سمی و مقادیر بالایی از فلزات سنگین باشند که با تخلیه در خاک ها و روان آب های سطحی، مقادیر زیادی از آلاینده ها

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

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و ایزوله‌های مورد بررسی

در این مطالعه جمع‌آوری نمونه‌ها به صورت میدانی انجام شد، به این صورت که 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 جمع‌آوری شده اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری میزان pH، EC و غلظت فلز سرب به ترتیب 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 اسید کلریدریک و قطره قطره اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه گردید و بر روی هیتر قرار داده شد تا به آرامی تبخیر و به طور کامل خشک شود. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر EDTA ۰/۰۱٪ به آن اضافه شد و از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول باقی مانده حاوی یون‌های 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 ۱/۵-۱ ml 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 سرکچ استریل در سطح پلیت پخش شد و سپس پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز در

(۱۵). فلزات سنگین به‌طور عمده به گروهی از عناصر اطلاق می‌گردد که چگالی بیش‌تر از 5 gr/cm^3 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 جبران‌ناپذیر 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 آسیب‌های ساختاری مانند هسته‌ی غیرمعمول و دنا توره 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 راه‌های 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 زیست‌پالایی 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 کشتی‌های 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).

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 rDNA ۱۶S انجام گرفت (۷). در این مطالعه از پرایم‌های عمومی طراحی شده برای ژن rDNA ۱۶S استفاده شد که توالی پرایم‌های مورد استفاده برای شناسایی آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- توالی پرایم‌های عمومی تکثیر ژن rDNA ۱۶S

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 MgCl₂ ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر پرایم‌های 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 rDNA ۱۶S با استفاده از سرویس BankIt به بانک جهانی ژن ارائه شد.

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 غنی‌سازی 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 به منظور خالص‌سازی 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 به صورت 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٪ گلیسرول در اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال و ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در یخچال و سپس ۲۴ ساعت بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در نهایت در فریزری با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جهت جلوگیری از شوک سرما برای باکتری‌ها). 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 به کار رفته است (۶، ۹).

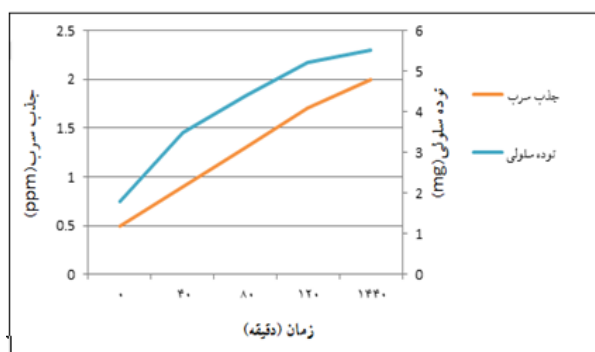
تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)

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، ۳، ۴، ۳/۵، ۲/۵، ۱، 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

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 mirabilis 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.

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

فاز	دما (°C)	زمان (s)
دنا تورا سیون اولیه	۹۴	۳۰۰
دنا تورا سیون	۹۴	۴۵
اتصال	۵۲	۳۰
تکثیر	۷۲	۶۰
تکثیر نهایی	۷۲	۴۵
نگهداری	۴	-

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیت‌های فیزیوشیمیایی و بیولوژیکی خاک‌های مورد مطالعه و همچنین غلظت فلز سنگین سرب در هر یک از خاک‌های مورد مطالعه، در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳- خصوصیت‌های فیزیوشیمیایی 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.

جدول ۴- نتایج MIC و MBC بر حسب میلی‌مولار باکتری‌های مقاوم به سرب در این پژوهش

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

توضیح علائم جدول : + رشد ، - عدم رشد

جدول ۵ - نتایج تست‌های بیوشیمیایی باکتری پروتئوس SP

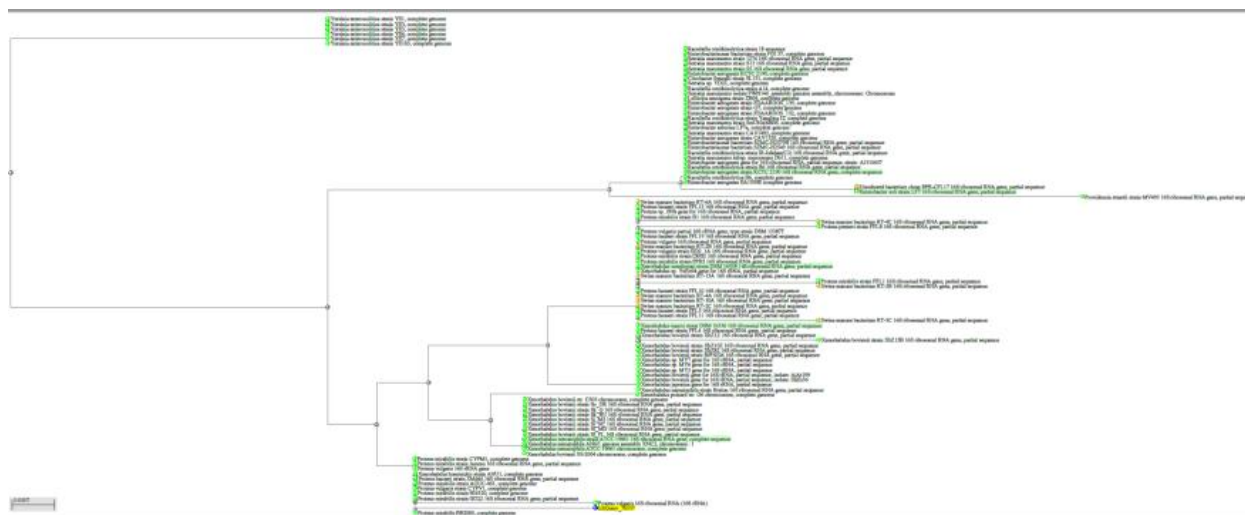
نام ایزوله	اندول	MR	VP	H ₂ S	اوره	حرکت	هیدرولیز ژلاتین
<i>Proteus mirabilis</i> strain AOUC-001	-	+	-	+	+	+	+

جدول ۶- نتایج تست های بیوشیمیایی باسیلوس ها

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

جدول ۷- نتایج تست های بیوشیمیایی گزنورابدوس ها

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



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

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 MIC=۲ میلی‌مولار را به خود اختصاص دادند. بر اساس نمودار ۱ باکتری‌های مقاوم به سرب ۴۰٪ مربوط به جنس *Bacillus*، ۴۰٪ مربوط به

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

بررسی میزان مقاومت به فلز سرب در باکتری‌های جدا شده در این 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

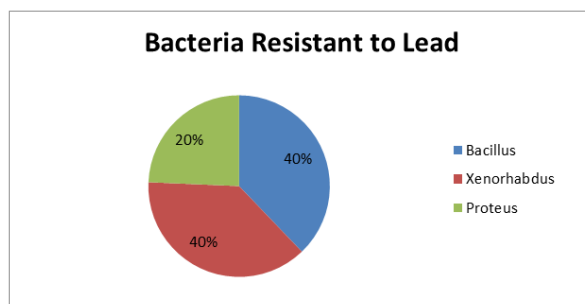
عنوان مقاوم در نظر گرفتند. آلبوغییش و همکاران در سال ۲۰۱۴ سویه‌هایی را که از رشد آن‌ها با غلظت ۰/۵ mM از فلزات نیکل، سرب و کادمیوم ممانعت نشده بود به‌عنوان مقاوم در نظر گرفتند این محقق در پژوهش خود اشاره نمود که از این سویه‌ها می‌توان در آینده جهت حذف زیستی فلزات نامبرده پس از حذف ژن مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی 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، آلبوغییش 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 باکتری‌های 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

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 *گزنورا/بدوس sp* بوده است.



نمودار ۱- تعیین درصد جنس باکتری‌های 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 باکتری‌های 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. همان‌طور که در تحقیق طهمورث‌پور نیز مشاهده می‌گردد در فلزاتی با درجه سمیت بیش‌تر میزان سازگاری باکتری‌ها نیز نسبت به آن پایین‌تر است. در سال 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 سویه‌هایی 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

آلودگی های زیست محیطی ایجاد شده توسط پالایشگاه ها و کارخانجات صنعتی باشد.

سپاسگزاری

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

منابع

- ۱ - طهمورث پور 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, Douidi M. The study of nickel resistant bacteria (NiRB) isolated from wastewaters polluted with different industrial sources. IJEHSE. 2014; 12: 1-7.
- 3- Alsharif 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 Prevention 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 ES Isolation 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.