

Isolation of Heavy Metal Resistant Bacteria from Industrial Effluents and Molecular Ribotyping

Mahta Majdnia¹, Maryam Sadrnia^{* 2}, Fatemeh Shahbazi³, Nooshin Sohrabi⁴

1. Master of Sciences, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Associated Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Associated Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: 2023/09/23

Accepted: 2024/02/10

Abstract

Introduction: One of the best ways to remove toxic metals is to use bacteria resistant to these metals with a biological purification process. This research aims to isolate bacteria resistant to tin, copper, chromium, and nickel from industrial wastewater and their molecular identification.

Materials and Methods: wastewater contaminated with heavy metals was collected from electroplating factories located in Tehran province. The wastewater sample was cultured on LB Agar containing certain concentrations of heavy metals and the grown bacteria were isolated. In the grown bacteria, the minimum growth inhibitory concentration (MIC) of heavy metals was determined by the microbroth dilution method. The genomic DNA of two strains with the highest level of resistance, purity, and polymerase chain reaction was performed with the help of specific primers. The PCR product was sequenced and ribotyping was done.

Results: 9 gram-positive and negative bacilli and gram-negative coccobacilli were isolated from wastewater containing heavy metals. Two Gram-negative bacillus strains showed the highest resistance to heavy metals in the MIC test. Based on the sequencing results, these two strains were identified as *Enterobacter* and *Pseudomonas*.

Conclusion: Two strains with the highest resistance to four metals were isolated from the effluent of electroplating factories and phylogenetic evaluation was performed. These bacteria can be used in the biological treatment of wastewater containing heavy metals.

***Corresponding Author:** Maryam Sadmia

Address: Associated Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Tel: +989188608302

E-mail: msadrnia@pnu.ac.ir and msadrnia@yahoo.com

Keywords: heavy metals, bacteria, metal resistance, molecular identification

How to cite this article: Majdnia M., Sadrnia M., Shahbazi F., Sohrabi N. Isolation of Heavy Metal Resistant Bacteria from Industrial Effluents and Molecular Ribotyping, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2024; 31(2):170-183.

Introduction

In the last few decades, the use of biological agents to remove and recycle toxic metals from water contaminated with heavy metals has been investigated. One of the advantages of using microorganisms is their high efficiency and efficiency and the recyclability of metals. Therefore, the identification of metal-resistant microorganisms plays an important role concerning environmental pollution and ultimately the treatment of these environments. In this way, due to the high levels of some metals in wastewater and in general in metal-contaminated environments, microorganisms create a resistance mechanism that leads to the selection of resistant species with the ability to tolerate metal toxicity. Therefore, the purpose of this research is to isolate and identify bacteria resistant to heavy metals tin, copper, chromium, and nickel from industrial effluents.

Methodology

This study was carried out under number 47382 in Payam Noor University as follows:

Sampling

By referring to industrial electroplating factories located in Tehran, sampling of the factory effluent was carried out by observing all the principles of sampling, and the safety of sampling was done in closed and sterile containers. The samples were immediately transferred to the laboratory for further tests.

Isolation of bacteria from collected samples

To isolate bacteria resistant to heavy metals from the wastewater of the electroplating plant, in the first step, 100 microliters of the collected samples were cultured on LB Agar medium with a concentration of 50 ppm of each of the metal's chromium, nickel, tin, and copper. The plates were kept at 37°C for 24 hours. Then, the plates were examined in terms of growth and non-growth of bacteria. In terms of morphology, different colonies of bacteria grew on the surface of the LB Agar plate. To purify the colonies, each colony was cultured separately on an LB Agar plate and kept at 37°C for 24 hours. Grown colonies were examined for gram staining and morphology.

Preparation of primary solution of heavy metals

To check the resistance of bacteria isolated from electroplating factory effluent to heavy metals such as copper, tin, chromium, and nickel, a high-concentration solution of each of the metals was first prepared.

Investigating the resistance of isolated bacteria to heavy metals

To check the resistance of the isolated bacteria to the heavy metals tin, copper, chromium, and nickel, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the studied metals was determined on these bacteria. First, a fresh culture of the desired bacteria was prepared on LB agar medium and heated at 37°C for 18 hours. Then, a concentration equivalent to half McFarland's concentration was prepared from each of the freshly cultured bacteria according to the standard method. Microplates of 96 houses were used. 50 microliters of each bacterial sample, which was prepared by half of McFarland, was added to each vial of the microplate column. Then, each vial was brought to a final volume of 300 microliters using LB medium. Wells 11 and 12 were used as positive and negative controls, respectively. The microplates were kept in a 37°C incubator for 24 hours. After 24 hours, the microplates were examined for bacterial growth in different concentrations of metals by comparing the turbidity of the wells with the positive and negative controls.

Identification and ribotyping of strains with the highest resistance to heavy metals

From the information obtained from the bacterial culture stage in the environment containing different concentrations of heavy metals in microplates, two bacteria that have the highest MIC and showed the greatest resistance to all the studied metals, including tin, copper, chromium, and nickel were selected and, to identify the type of bacterial strain, genomic DNA extraction and ribotyping were performed.

Genomic DNA extraction was performed using a Poyagen Azma DNA purification kit (Catalog No. PD115-050) and according to the protocol included in the kit. Ribotyping was done using specialized 16srRNA primers in Table 2. After bioinformatics

and Blast checks, the primers were sent to Macrogen Korea for synthesis.

Polymerase chain reaction (PCR) to identify the studied bacteria, by adding 12.5 microliters of X2 master mix amplicon, 1 microliter of forward primer, 1 microliter of reverse primer, 1 microliter of genomic DNA, and 9.5 microliters of distilled water, and final volume was 25 microliters. The temperature program used includes initial denaturation at 94°C for 5 minutes, 35 cycles of 94°C for 30 seconds, annealing at 54°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 90 seconds. Finally, the final extension was done at 72°C for 5 minutes and one cycle. To ensure the existence of the reaction product, 5 microliters of the PCR product were run on 1% agarose gel. The rest of the polymerase chain reaction product was sent to Macrogen Korea for sequencing. The PCR product was purified by Macrogen Korea.

After determining the sequence, the sequence was examined using the blast program in the NCBI gene bank, and the type of the studied strains was determined.

Results

Isolation of bacteria

After the initial culture of electroplating factory effluent on LB Agar medium containing 50 ppm concentration of the studied heavy metals, the plates were examined. It was observed that the surface of the plates was filled with different colonies. 9 different colonies were observed. Morphological analysis of purified bacteria showed that among the purified bacteria colonies, there is a variety of appearances from convex and dry, cream-colored and slimy or needle-shaped colonies.

Gram staining of colonies showed different types of bacilli, gram-negative coccobacilli, and gram-positive bacilli.

Determining the minimum inhibitory concentration

The results of investigating the minimum inhibitory concentration of each of the heavy metals including tin, copper, chromium, and nickel, separately on the isolated bacteria are collected in Table 3. According to the results obtained from this research, it was found that two types of bacteria among the studied bacteria had the highest

resistance to the studied heavy metals. These two bacteria were: bacteria isolated from wastewater sample No. 3 (Table 3), which was identified as gram-negative bacteria with double cells, and the other bacteria isolated from wastewater sample No. 4, which was identified as gram-negative bacillus Negative with needle-shaped colony morphology on the plate. The first well in which the bacteria did not grow compared to the positive and negative controls contains the minimum concentration of the heavy metal at which the bacteria would not grow (MIC). The positive control only includes LB broth medium and bacteria, and the negative control includes LB broth medium and the desired heavy metal.

Molecular identification of strains and ribotyping

Genomic DNA extraction from these two bacteria is without protein and RNA contamination and is suitable for polymerase chain reaction. Examining the product resulting from the polymerase chain reaction on genomic DNA samples showed that the reaction was performed correctly and a product with a size of 1500 bp was created. Then the PCR product was sent to Macrogen Korea to determine the sequence and identify the bacteria. The result of their gene sequence and blast sequence in the NCBI gene bank showed that gram-negative double bacillus resistant to all four studied metals, with an identity equal to 99% and E.value equal to zero in the NCBI gene bank, was shown to be similar to *Enterobacter* species. Also, the negative worm bacillus with a needle-shaped colony with an identity of 99% and an E value of zero was shown to be similar to the *Pseudomonas aeruginosa* strain.

Discussion

In the study of KIM et al., the isolated endophytic bacteria showed a high ability to adapt to several metals. At a concentration of 10 mg/liter of heavy metals, this bacterium was able to specifically remove cadmium, lead, and copper metals by 78.75, 80.48, and 21.25% respectively during 24-hour incubation. In the present study, two types of bacteria, *Enterobacter* and *Pseudomonas*, showed the highest resistance to heavy metals nickel, chromium, copper, and tin compared to other bacteria isolated from the effluent and soil of the electroplating factory. In this research, it was found

that the isolated *Enterobacter* can grow in the presence of concentrations of 743 mM nickel, 24 mM chromium, 157.38 mM copper, and 400 mM tin. Also, the isolated *Pseudomonas* can grow in the presence of concentrations of 743 mM nickel, 24 mM chromium, 78.69 mM copper, and 400 mM tin.

Conclusion

The purpose of this study was to isolate a native bacterial species that is resistant to nickel, chromium, tin, and copper metals so that they can be used in the future to remove heavy metals from the environment. In this regard, 9 different bacterial strains were identified and investigated, among

which *Enterobacter* and *Pseudomonas* showed the most resistance. By investigating and studying metal-resistant bacteria, these bacteria can be used in the biological treatment of wastewater containing heavy metals.

Acknowledgment

This study was carried out in the form of a master's thesis with the same title at Payam Noor University under number 47382, and the relevant officials are hereby thanked.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

جداسازی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین از پساب‌های صنعتی و شناسایی مولکولی آنها به روش ریبوتا پینگ

مهتا مجدنی^۱، مریم صدرنیا^{۲*}، فاطمه شهبازی^۳، نوشین سهرابی^۴

۱. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: یکی از بهترین راهکارها برای حذف فلزات سمی، استفاده از باکتری‌های مقاوم به این فلزات با فرایند پاک‌سازی زیستی می‌باشد. هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های مقاوم به قلع، مس، کروم و نیکل از پساب‌های صنعتی و شناسایی مولکولی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا از کارخانه‌های آبکاری واقع در استان تهران، پساب آلوده به فلزات سنگین جمع‌آوری گردید. نمونه پساب بر روی محیط LB Agar حاوی غلظت‌های مشخص از فلزات سنگین کشت داده و باکتری‌های رشد یافته جداسازی گردید. بر روی باکتری‌های رشد یافته، حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) فلزات سنگین با روش میکروبراث دایلوژن انجام شد. DNA ژنومی دوسویه با بالاترین میزان مقاومت، تخلیص و PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی انجام شد. محصول PCR تعیین سکانس شد و ریبوتا پینگ انجام گردید.

یافته‌ها: از پساب حاوی فلزات سنگین، تعداد ۹ باسیل گرم مثبت و منفی و کوکوباسیل گرم منفی جداسازی گردیدند. دوسویه باسیل گرم منفی، بیشترین مقاومت نسبت به فلزات سنگین را در آزمایش MIC از خود نشان دادند. این دوسویه بر اساس نتایج تعیین توالی، تحت عناوین انتروباکتر و سودوموناس شناسایی گردیدند.

نتیجه‌گیری: دوسویه با بالاترین مقاومت به چهار فلز از پساب کارخانجات آبکاری جدا شدند و به روش ارزیابی فیلوژنتیک مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. می‌توان از این باکتری‌ها در تصفیه زیستی پساب‌های حاوی فلزات سنگین استفاده کرد.

* نویسنده مسئول: مریم

صدرنیا

نشانی: دانشیار گروه

زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور،

تهران، ایران

تلفن: ۰۹۱۸۸۶۰۸۳۰۲

رایانامه:

msadrnia@pnu.ac.ir

and

msadrnia@yahoo.com

شناسه ORCID: 0000-

0003-2030-3343

شناسه ORCID نویسنده اول:

0000-0003-2030-3343

کلیدواژه‌ها:

فلزات سنگین، باکتری، مقاومت به فلز، شناسایی مولکولی

مقدمه

فاضلاب‌های شهری، یکی از این روش‌ها می‌تواند باشد (۱). از طرفی افزایش یون‌های فلزی سمی در فاضلاب‌های شهری و صنعتی، مسئله نگران‌کننده زیست‌محیطی می‌باشد (۲). در برخی شهرها صنایع کوچک و بزرگ بسیاری وجود دارند که فاضلاب خود را وارد شبکه جمع‌آوری فاضلاب شهری می‌کنند.

امروزه به دلایل مختلفی نظیر افزایش جمعیت، بالابودن مصرف سرانه آب در شهرها و به تبع آن ایجاد پساب قابل توجه، محدودیت منابع آب در دسترس، انسان مجبور به تأمین آب موردنیاز خود از منابع آبی غیرمعارف است که مصرف پساب

پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین قلع، مس، کروم و نیکل از پساب‌های صنعتی می‌باشد.

۲. مواد و روش

این مطالعه تجربی تحت شماره ۴۷۳۸۲ در دانشگاه پیام نور به شرح زیر اجرا گردید:

نمونه‌گیری از پساب و خاک صنایع آبکاری: با مراجعه به کارخانه‌های صنعتی آبکاری واقع در تهران، نمونه‌گیری از پساب کارخانه با رعایت تمامی اصول نمونه‌گیری و ایمنی، نمونه‌گیری در ظروف دربسته و استریل انجام شد. جمعاً ۴ نمونه پساب سه نمونه خاک از کارخانجات آبکاری، جمع‌آوری و برای انجام آزمایش‌های بعدی سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شدند (۱۱).
جداسازی باکتری از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده: به‌منظور جداسازی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین از پساب کارخانه آبکاری، در مرحله اول، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به روی محیط LB Agar دارای غلظت ۵۰ ppm از هریک از فلزهای کروم، نیکل، قلع و مس کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس پلیت‌ها از لحاظ رشد کردن یا رشد نکردن باکتری، بررسی شدند. از نظر مورفولوژی، کلنی‌های مختلفی از باکتری بر روی سطح پلیت LB Agar رشد کرد. به‌منظور خالص‌سازی کلنی‌ها، هر کلنی به‌طور جداگانه بر روی پلیت LB Agar به‌صورت خالص کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.
کلنی‌های رشد یافته از نظر رنگ‌آمیزی گرم و مورفولوژی بررسی شد.

تهیه محلول اولیه از فلزات سنگین: به‌منظور بررسی میزان مقاومت باکتری‌های جدا شده از پساب کارخانه آبکاری، به فلزات سنگین مس، قلع، کروم و نیکل، ابتدا یک محلول اولیه با غلظت بالا از هریک از فلزات طبق جدول ۱ تهیه گردید.

این موضوع باعث بالارفتن مقادیر فلزات سنگین در فاضلاب شهری و در نهایت پساب خروجی از تصفیه‌خانه می‌شود (۳). فلزات سنگین گروهی از فلزات با تراکم بیش از 5 g/cm^3 است (۴). این فلزات در طبیعت باقی می‌مانند و در نتیجه تمایل به تجمع در زنجیره غذایی دارند. اگرچه مقادیری از این فلزات به‌صورت طبیعی در محیط وجود دارد اما حضور بیش از اندازه آن به‌عنوان آلودگی در اکوسیستم، عمدتاً از فعالیت‌های انسانی نشأت می‌گیرد. سطح جهانی آلودگی به فلزات در ۱۵۰ سال گذشته بیش از ۴۰۰۰ برابر شده است (۵). تماس با فلزات سنگین می‌تواند سبب اختلالات عصبی، پیری سلولی، نارسایی کبدی و کلیوی و سرطان‌زایی شود (۶). بر این اساس فلزاتی چون کروم، نیکل، قلع و مس در لیست آلاینده‌های خطرناک قرار دارند. مشکل اساسی زمانی ایجاد می‌گردد که روش‌های فیزیکی- شیمیایی توانایی حذف فلزات سنگین از پساب را نداشته باشند، زیرا بیشتر روش‌های فیزیکی- شیمیایی زمانی که غلظت فلزات سنگین و سمی در محیط‌های آلوده در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باشد، غیرمؤثر هستند و اقتصادی نیستند (۷). پژوهش‌های مختلف نشان داده است که روش‌های بیولوژیکی می‌توانند شرایط اقتصادی بهینه و کارآمدی را در مقایسه با سایر روش‌های فیزیکی- شیمیایی فراهم کنند. در چند دهه اخیر، استفاده از عوامل بیولوژیکی برای حذف و بازیافت فلزات سمی از آب‌های آلوده به فلزات سنگین بررسی شده است (۸). از مزایای استفاده از میکروارگانیسم‌ها، بازدهی و کارایی بالای آنها و قابل بازیافت بودن فلزات می‌باشد (۹). بنابراین شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات نقش مهمی را در رابطه با آلودگی محیط و نهایتاً تیمار این محیط‌ها ایفا می‌کند. به این صورت که با توجه به سطوح بالای برخی از فلزات در پساب‌ها و به‌طور کلی در محیط‌های آلوده به فلز، میکروارگانیسم‌ها، مکانیسم مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی می‌شود (۱۰). بنابراین هدف از انجام این

جدول ۱. تهیه استوک کار از فلزات سنگین موردبررسی

غلظت اولیه	غلظت نهایی به ppm یا mg/Litre	فلز
۱۰۰۰	۵۰۰۰۰	کروم
۸۵۰	۵۰۰۰۰	نیکل
۴۲۰	۵۰۰۰۰	قلع
۷۸۷	۵۰۰۰۰	مس

بررسی مقاومت باکتری‌های جداسازی‌شده به فلزات

سنگین: به‌منظور بررسی مقاومت باکتری‌های جداسازی‌شده نسبت به فلزات سنگین قلع، مس، کروم و نیکل، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) فلزات مورد مطالعه روی این باکتری‌ها صورت گرفت. ابتدا از باکتری مورد نظر کشت تازه بر روی محیط LB آگار تهیه شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمادهی گردید. سپس از هریک از باکتری‌های تازه کشت داده شده طبق روش استاندارد، غلظتی معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه گردید (۱۲). غلظت‌های مختلف از هریک از فلزات مورد مطالعه طبق فرمول $N1 V1 = N2 V2$ از استوک اصلی محاسبه و به هر ویال از ستون میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. بدین منظور از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استفاده گردید. از هر نمونه باکتری که نیم مک فارلند آن تهیه گردید، ۵۰ میکرولیتر به هر ویال از ستون میکروپلیت اضافه گردید. سپس هر ویال با استفاده از محیط LB به حجم نهایی ۳۰۰ ماکرولیتر رسانده شد. چاهک‌های ۱۱ و ۱۲ به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بعد از گذشت

۲۴ ساعت، میکروپلیت‌ها از نظر رشد باکتری در غلظت‌های مختلف از فلزات با مقایسه کدورت هر چاهک، با چاهک کنترل مثبت و چاهک کنترل منفی، مقایسه شدند (۱۳).

شناسایی و ریبوتا‌پینگ سویه‌های با بیشترین مقاومت به فلزات سنگین: از اطلاعات حاصل از مرحله کشت باکتری در محیط حاوی غلظت‌های مختلف از فلزات سنگین در میکروپلیت‌ها، دو باکتری که بالاترین MIC را داشتند و بیشترین مقاومت را نسبت به تمامی فلزات قلع، مس، کروم و نیکل مورد مطالعه نشان دادند، انتخاب شدند و به‌منظور شناسایی نوع سویه باکتریایی، استخراج DNA ژنومی و ریبوتا‌پینگ انجام گردید.

استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA شرکت پویژن آزما (Catalog No. PD115-050) و طبق پروتکل موجود در کیت انجام شد. ریبوتا‌پینگ با استفاده از پرایمرهای تخصصی 16srRNA موجود در جدول ۲ انجام گردید. پرایمرها بعد از بررسی‌های بیوانفورماتیک و Blast آن در سایت NCBI، برای سنتز به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید (جدول ۲).

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ریبوتا‌پینگ

اندازه باند (bp)	نقطه ذوب	ترادف پرایمر
۱۵۰۰	۵۴	F: AGA GTT T GAT CCT GGC TCA G R: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T

پس از تعیین سکانس، سکانس با استفاده از برنامه blast در بانک ژنی NCBI، مورد بررسی شد و نوع سویه‌های مورد مطالعه مشخص گردید.

۳. یافته‌ها**جداسازی باکتری‌ها**

پس از کشت اولیه پساب کارخانجات آبکاری بر روی محیط LB Agar حاوی غلظت ۵۰ ppm از فلزات سنگین مورد مطالعه، پلیت‌ها بررسی شدند. مشاهده شد که سطح پلیت‌ها از کلنی‌های مختلف، پر شده است. ۹ کلنی متفاوت مشاهده گردید. بررسی مورفولوژی باکتری‌های خالص‌شده نشان داد که در بین کلنی باکتری‌های خالص‌شده تنوعی از شکل ظاهری از کلنی‌های محدب کنگره‌دار و خشک، کرم‌رنگ و لزج یا سوزنی‌شکل وجود دارد. کلنی‌های مربوط به پساب شماره ۳ و پساب شماره ۴ در شکل مشخص شده‌اند (شکل ۱).

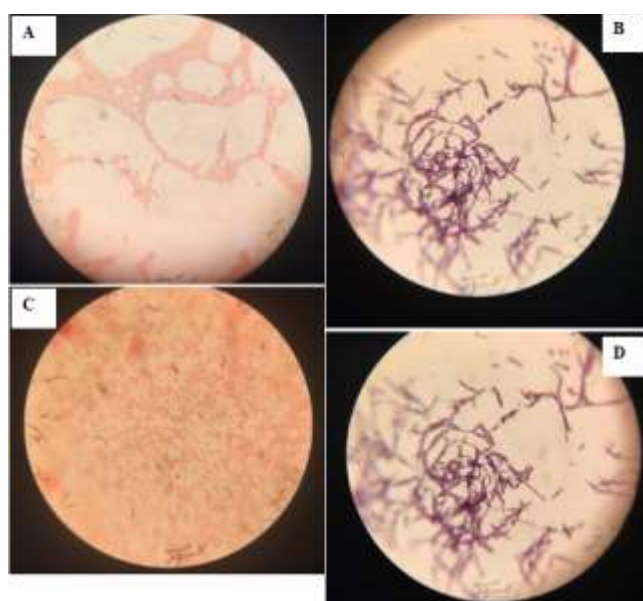
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای شناسایی باکتری‌های مورد مطالعه، با اضافه کردن ۱۲/۵ میکرولیتر ۲X مستر میکس امپلیکون، ۱ میکرولیتر از پرایمر فرورارد، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. برنامه دمایی مورد استفاده شامل دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، برای ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، دمای آنلینگ ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و Extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت Extension انتهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و برای یک سیکل انجام گردید. به‌منظور اطمینان از وجود محصول واکنش، ۵ ماکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد ران گردید. بقیه محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌منظور انجام تعیین سکانس به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. خالص‌سازی محصول PCR توسط شرکت ماکروژن کره صورت گرفت.



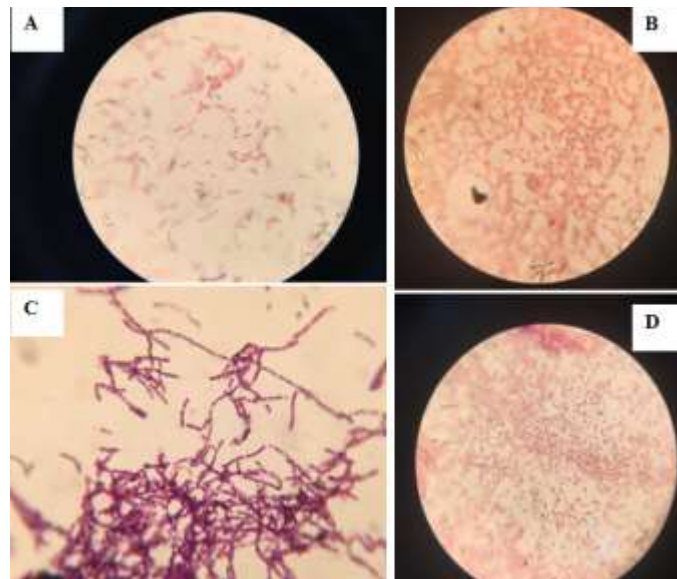
شکل ۱. کلنی‌های حاصل از کشت: تصاویر اول و دوم در ردیف بالا از سمت راست، به ترتیب مربوط به پساب شماره ۳ و پساب شماره ۴ هستند

مورفولوژی باکتری‌های جدا شده از پساب شماره ۳ و پساب شماره ۴ در شکل نشان داده شده‌اند (شکل ۲ و ۳).

رنگ‌آمیزی گرم کلنی‌ها، تنوع مختلفی از باسیل‌ها و کوکوباسیل‌های گرم منفی و باسیل‌های گرم مثبت را نشان داد.



شکل ۲. رنگ‌آمیزی گرم از کلنی‌های ۱ تا ۴: A: باسیل ریز گرم منفی. B: باسیل بزرگ کشیده گرم مثبت و دارای اسپور. C: کوکوباسیل گرم منفی. D: باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار



شکل ۳. رنگ آمیزی سلول های ۵ تا ۹ جدا شده از پساب و خاک. A: باسیل گرم منفی (جدا شده از نمونه پساب شماره ۳). B: باسیل گرم منفی (جدا سازی شده از نمونه پساب شماره ۴). C: باسیل های گرم مثبت اسپوردار با زنجیره کوتاه. D: باسیل های ریز گرم منفی.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی

نتایج بررسی حداقل غلظت ممانعت کنندگی هریک از فلزات سنگین قلع، مس، کروم و نیکل به صورت جداگانه بر روی

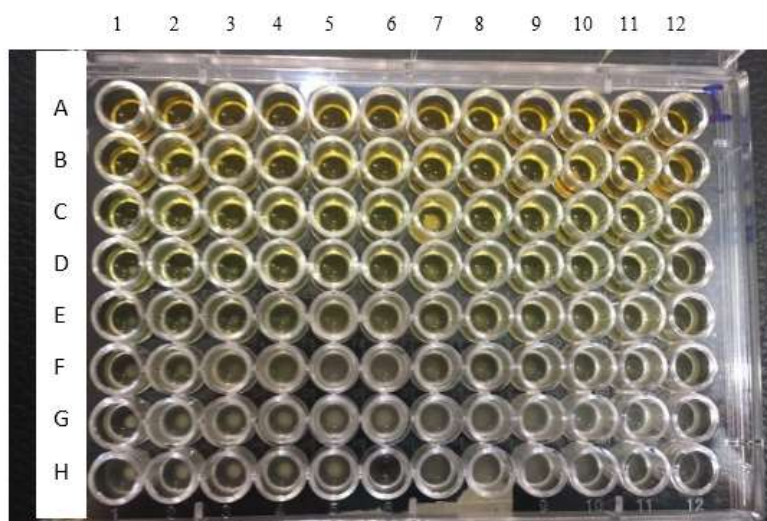
باکتری های جدا سازی شده در جدول ۳ جمع آوری گردیده است (جدول ۳).

جدول ۳. اطلاعات مربوط به باکتری های جدا سازی شده از پساب و خاک کارخانجات و میزان مقاومت آن ها به فلزات سنگین

۲۰۰۰۰	۵۰۰۰	۱۵۶	۳۱۲/۵	باسیل گرم منفی	پساب ۱
۲۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۲۵۰	۳۱۲/۵	باسیل گرم منفی - باسیل های تک	پساب ۲
۲۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۲۵۰۰	۱۲۵۰	باسیل گرم منفی - دیپیلوباسیل	پساب ۳
۲۰۰۰۰	۵۰۰۰	۳۱۲/۵	۳۱۲/۵	کلنی خشک کنگره دار - باسیل گرم مثبت با زنجیره بلند	پساب ۴
۲۰۰۰۰	۵۰۰۰	۱۲۵۶	۶۲۵	کوکوباسیل گرم منفی - کلنی به صورت محدب ریز	پساب ۴
۲۰۰۰۰	۵۰۰۰	۲۵۰۰	۱۲۵۰	باسیل گرم منفی - کلنی سوزنی شکل	پساب ۴
۲۰۰۰۰	۵۰۰۰	۳۱۲/۵	۶۲۵	باسیل اسپوردار گرم مثبت با زنجیره کوتاه	خاک ۱
۲۰۰۰۰	۵۰۰۰	۶۲۵	۳۱۲/۵	باسیل اسپوردار گرم مثبت	خاک ۲
۲۰۰۰۰	۵۰۰۰	۲۵۰۰	۱۵۶	باسیل گرم منفی - کلنی سوزنی شکل	خاک ۳

شماره ۳ (جدول ۳) که به صورت باکتری گرم منفی با سلول های دوتایی مشخص گردید و دیگری باکتری جدا سازی شده از نمونه پساب شماره ۴ (جدول ۳) که به صورت باسیل گرم منفی با مورفولوژی کلنی سوزنی شکل بر روی پلیت قرار دارند.

با توجه به نتایج حاصل شده از این پژوهش مشخص گردید دو نوع باکتری از بین باکتری های مورد مطالعه، بیشترین مقاومت را نسبت به فلزات سنگین مورد مطالعه داشته اند. این دو باکتری عبارت بودند از: باکتری جدا سازی شده از نمونه پساب

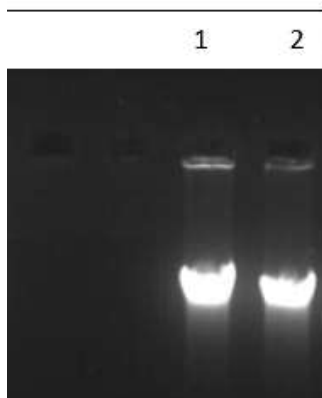


شکل ۴. بررسی مقاومت به غلظت‌های مختلف کروم در تعدادی از باکتری‌های جداسازی شده A-H: ۱: غلظت ۲۰۰۰۰ ppm از کروم. ۲: غلظت ۱۵۰۰۰ ppm از کروم. ۳: غلظت ۱۰۰۰۰ ppm از کروم. ۴: غلظت ۵۰۰۰ ppm از کروم. ۵: غلظت ۲۰۰۰ ppm از کروم. ۶: غلظت ۱۵۰۰ ppm از کروم. ۷: غلظت ۱۰۰۰ ppm از کروم. ۸: غلظت ۷۵۰ ppm از کروم. ۹: غلظت ۵۰۰ ppm از کروم. ۱۰: غلظت ۲۵۰ ppm از کروم. ۱۱: کنترل مثبت. ۱۲: کنترل منفی

محیط LB broth و باکتری و کنترل منفی شامل محیط LB broth و فلز سنگین موردنظر می‌باشد.

شناسایی مولکولی سویه‌ها و ریبوتا پینگ: استخراج DNA ژنومی بر روی این دو باکتری بدون آلودگی پروتئینی و RNA است و برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مناسب می‌باشد (شکل ۵).

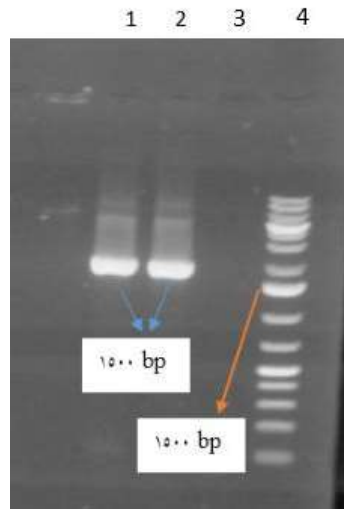
با توجه به شکل ۴ مشاهده می‌گردد که هرچه از غلظت ppm ۲۵۰ به سمت غلظت ۲۰۰۰۰ ppm می‌رویم، میزان کدورت باکتری کاهش می‌یابد. اولین چاهکی که باکتری در آن در مقایسه با کنترل‌های مثبت و منفی، رشدی نشان نداده است، حاوی حداقل غلظتی از فلز سنگین می‌باشد که در آن غلظت باکتری رشد نخواهد داشت (MIC). کنترل مثبت فقط شامل



شکل ۵. نتیجه استخراج DNA از دو نوع باکتری انتخاب شده. ۱ و ۲ باند DNA ژنومی با کیفیت و خلوص بالا و بدون آلودگی.

و محصول با اندازه ۱۵۰۰ bp ایجاد گردیده است (شکل ۶).

بررسی محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی نمونه‌های DNA ژنومی نشان داد واکنش به‌درستی انجام شده



شکل ۶. الکتروفورز محصول PCR ژن 16S باکتری‌های مورد بررسی، چاهک‌های شماره ۱ و ۲ محصول واکنش PCR بر روی DNA استخراج شده، چاهک شماره ۳ کنترل منفی، چاهک شماره ۴ لدر ۱ Kb

در پژوهش حاضر، دو نوع باکتری از گونه انتروباکتر و سودوموناس بیشترین مقاومت را نسبت به فلزات سنگین نیکل، کروم، مس و قلع نسبت به دیگر باکتری‌های جدا شده از پساب و خاک کارخانه آبکاری از خود نشان دادند. در این پژوهش مشخص گردید که انتروباکتر جداسازی شده، توانایی رشد در حضور غلظت‌های ۷۴۳ میلی‌مولار نیکل، ۲۴ میلی‌مولار کروم، ۱۵۷/۳۸ میلی‌مولار مس و ۴۰۰ میلی‌مولار قلع را دارد. همچنین سودوموناس جداسازی شده، توانایی رشد در حضور غلظت‌های ۷۴۳ میلی‌مولار نیکل، ۲۴ میلی‌مولار کروم، ۷۸/۶۹ میلی‌مولار مس و ۴۰۰ میلی‌مولار قلع را دارد. Guo در سال ۲۰۱۰ از باکتری اندوفیت به‌منظور تصفیه و حذف فلزات سنگین کادمیوم، سرب، روی، مس و کروم از محیط استفاده کرد. گو بیان کرد از بین ۹۶ نوع اندوفیت جدا شده، نوع EBL14 راندمان بالاتری در حذف فلزات سنگین از خود نشان داد. غلظت حداقلی ممانعت‌کننده فلزات سنگین کادمیوم، سرب، روی، مس و کروم برای رشد این باکتری در محیط مایع به ترتیب ۲، ۴، ۵، ۱۰ و ۱۲ میلی‌مول گزارش گردید. طی ۲۴ ساعت این باکتری سرب، کادمیوم، مس و کروم را به ترتیب حدود ۸۴، ۷۶، ۲۱ و ۳ درصد حذف کرد (۱۶).

در همین زمینه Zaidi در سال ۲۰۰۴ سویه باکتریایی باسیلوس SJ-101 را از خاک‌های آلوده به فلزات سنگین جداسازی کرد. نتایج نشان داد که این باکتری به فلز نیکل و کروم مقاوم است (زیدی و همکاران، ۲۰۰۴). Abd- (۱۷).

بررسی باکتری‌های جداسازی شده در غلظت‌های مختلف از فلزات سنگین مورد مطالعه در این پژوهش نشان داد که با

سپس محصول PCR برای تعیین سکانس و شناسایی باکتری به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. نتیجه سکانس توالی ژنی blast آنها در بانک ژنی NCBI نشان داد که باسیل دوتایی گرم منفی مقاومت نسبت به هر چهار فلز مورد مطالعه، با ident برابر ۹۹ درصد و E.value برابر صفر در بانک ژنی NCBI، با گونه انتروباکتر شباهت نشان داده شد. همچنین باسیل گرم منفی با کلنی سوزنی شکل با ident برابر ۹۹ درصد و E.value برابر صفر، با سویه سودوموناس آئروژینوزا شباهت نشان داده شد. کد ثبت توالی‌ها: Gene Bank MH127458 ، MH150811.1 بودند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

آلودگی فلزات سنگین توسط فعالیت‌های صنعتی و توسعه تکنولوژیکی به علت سمیت این آلاینده‌ها، غیرقابل تجزیه بیولوژیکی بودن آنها و تجمع زیستی تهدیدهای جدی برای محیط زیست و بهداشت عمومی ایجاد کرده است. هنگامی که فلزات سنگین در حالت عنصر یا مواد آلی فلزی درمی‌آیند، می‌توانند تأثیرات قابل توجهی بر سلامت جوامع بشری داشته باشند. پیشرفت روزافزون صنایع در دهه اخیر، مهم‌ترین عامل آلودگی محیط زیست است و پساب‌های آلوده صنایع مختلف مانند چرم‌سازی، استخراج معادن و پتروشیمی باعث ورود مقدار زیادی فلزات سنگین مانند کروم، کادمیوم، نیکل، کبالت، روی و سرب به محیط زیست می‌گردد (۱۴). حضور تراکم‌های سمی فلزات در محیط، آثار زیانباری در سلامت انسان و حیوانات دارد و موجب برهم خوردن تعادل و نظم اکوسیستم می‌شود (۱۵).

وسیله از مسئولین مربوطه قدردانی می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

موضوع تحقیق روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان نبود بنابراین طبق قوانین دانشگاه، نیازی به اخذ کد اخلاق نبوده است. شماره پایان نامه، ۴۷۳۸۲ می‌باشد.

سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان امور مربوط به مقاله و پیگیری‌های آن را بر عهده داشته‌اند.

حمایت مالی

این طرح با حمایت معاونت تحقیقات دانشگاه پیام نور با کد طرح ۴۷۳۸۲ انجام پذیرفت.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

افزایش غلظت فلز در محیط باکتری رشد خود را با تأخیر ۱۲ ساعته آغاز می‌کند، علت وجود تأخیر در ابتدای رشد باکتری و کاهش رشد آن با افزایش غلظت فلز، احتمالاً به دلیل افزایش سمیت فلز و اثر بازدارندگی آن بر رشد باکتری است.

در این مطالعه گونه‌های باکتریایی بومی از پساب کارخانجات آبکاری جداسازی گردیدند. این باکتری‌ها به فلزات نیکل، کروم، قلع و مس مقاوم هستند. در مطالعات آتی می‌توان از آن‌ها برای حذف فلزات سنگین از محیط استفاده کرد. در این راستا ۹ سویه مختلف باکتریایی شناسایی و بررسی شد که در این بین انتروباکتر و سودوموناس بیشترین مقاومت را از خود نشان دادند. با بررسی و مطالعه باکتری‌های مقاوم به فلز می‌توان از این باکتری‌ها در تصفیه زیستی پساب‌های حاوی فلزات سنگین استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه، به‌صورت پایان‌نامه کارشناسی ارشد با همین عنوان در دانشگاه پیام نور تحت شماره ۴۷۳۸۲ اجرا شده که بدین

References

- [1]. Paknia S, Sharif MAS, Heidarianpour A. The Effect of Resistance Training Along with Hawthorn Supplementation on Some Indices of Oxidative Stress in Alzheimer's Male Rats. male rats. Journal of Sport Biosciences. 2022; 14 (3): 81-94. <https://doi.org/10.22059/jsb.2022.347813.1550>
- [2]. Azevedo CV, Hashiguchi D, Campos HC, Figueiredo EV, Otaviano SFS, Penitente AR, et al. The effects of resistance exercise on cognitive function, amyloidogenesis, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. Frontiers in Neuroscience. 2023;17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1131214>
- [3]. Xue B, Waseem SMA, Zhu Z, Alshahrani MA, Nazam N, Anjum F, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Connecting Link Between Nutrition, Lifestyle, and Alzheimer's Disease. Frontiers in Neuroscience. 2022;16:925991. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.925991>
- [4]. Chortane OG, Hammami R, Amara S, Chortane SG, Suzuki K, Oliveira R, et al. Effects of multicomponent exercise training program on biochemical and motor functions in patients with Alzheimer's dementia. Sustainability. 2022;14(7):4112. <https://doi.org/10.3390/su14074112>
- [5]. Zieneldien T, Kim J, Cao C. The multifaceted role of neuroprotective plants in Alzheimer's Disease treatment. Geriatrics. 2022;7(2):24. <https://doi.org/10.3390/geriatrics7020024>
- [6]. Li D, Ma J, Wei B, Gao S, Lang Y, Wan X. Effectiveness and safety of ginkgo biloba preparations in the treatment of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. Frontiers in Aging Neuroscience. 2023. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1124710>
- [7]. Palimariciuc M, Balmus I-M, Gireadă B, Ciobica A, Chiriță R, Iordache A-C, et al. The Quest for Neurodegenerative Disease Treatment—Focusing on Alzheimer's Disease Personalised Diets. Current Issues in Molecular Biology. 2023;45(2):1519-35 <https://doi.org/10.3390/cimb45020098>
- [8]. Nasrolahi A, Javaherforooshzadeh F, Jafarzadeh-Gharehzaadine M, Mahmoudi J, Asl KD, Shabani Z. Therapeutic potential of neurotrophic factors in Alzheimer's Disease. Molecular Biology Reports. 2022;1-13. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06968-9>
- [9]. Gliwirska A, Czubilińska-Lada J, Więckiewicz G, Świętochowska E, Badeński A, Dworak M, et al. The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Diagnosis and Treatment of Epilepsy, Depression, Schizophrenia, Anorexia Nervosa and Alzheimer's Disease as Highly Drug-Resistant Diseases: A Narrative Review. Brain Sciences. 2023;13(2):163. <https://doi.org/10.3390/brainsci13020163>
- [10]. Sadeghinejad M, Soltani Z, Afzalpour ME, Khaksari M, Pourranjbar M. What is the combined effect of intense intermittent exercise and Ginkgo biloba plant on the brain neurotrophic factors levels, and learning and memory in young rats? Pharmacological Reports. 2019;71(3):503-8 <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.02.006>
- [11]. Eslimi Esfahani, D., Oryan, S., Hatami, M. Effect of Marshmallow extract on improving passive avoidance memory disorders in male Wistar rats. Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology), 2018; 31(1): 14-24. (Persian). DOI: 20.1001.1.23832614.1397.31.1.2.8
- [12]. Yaghoubi A. The Effects of Aerobic Training and Omega-3 Intake on Aβ42, Neprilysin, and γ-Secretase in the Hippocampus of Male Rats Alzheimer's model. Tehran, Iran: Islamic Azad University. 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-427829/v1>
- [13]. Medhat E, Rashed L, Abdelgwad M, Aboulhoda BE, Khalifa MM, El-Din SS. Exercise enhances the effectiveness of vitamin D therapy in rats with Alzheimer's disease: emphasis on oxidative stress and inflammation. Metabolic brain disease. 2020;35:111-20. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00504-2>
- [14]. Hasanvand B, Farhadi A. Effect of combined exercise and Ginkgo biloba supplementation for 8 weeks on brain-

- derived neurotrophic factor level in depressed older men. *Iranian Journal of Ageing*. 2021;16(2):234-47. (Persian) 10.32598/sija.16.2.2805.1
- [15]. Bakir F, ÇEVİK ÖS, KELOĞLAN SM, Şahin L. Effect of caffeine supplementation during treadmill exercise on hippocampal genes expression levels in adolescent rats. *The European Research Journal*. 2023;9(2):348-58 <https://doi.org/10.18621/eurj.1241667>.
- [16]. Afshani M, Nasiri E, Khalili M. The effect of sprint interval training with short repetitions on hippocampal Brain-derived neurotrophic factor levels, learning and spatial memory in adult Wistar rats. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2023;27(1):761-9. (Persian) DOI:10.48307/FMSJ.2023.27.1.12
- [17]. Shahidi S, Ghahremanitamadon F, Asl S S, Komaki A, Afshar S, Hashemi-Firouzi N. Electrophysiological, behavioral and molecular study of vitamin E and Ginkgo biloba in a rat model of Alzheimer's disease. *Res J Pharmacogn*. 2021;8(1):39-51 DOI: 10.22127/RJP.2020.250269.1630
- [18]. Mai G, Fan X. The Preventive and Therapeutic Prospects of Physical Activity on Alzheimer's Disease and the Potential Underlying Mechanisms. 2023;5(2):1055
- [19]. Shamsipour S, Sharifi G, Taghian F. Impact of interval training with probiotic (*L. plantarum*/Bifidobacterium bifidum) on passive avoidance test, ChAT and BDNF in the hippocampus of rats with Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 2021;756:135949. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135949>
- [20]. Campbell TS, Donoghue KM, Ghosh U, Nelson CM, Roth TL. Early life stress affects Bdnf regulation: a role for exercise interventions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(19):11729. <https://doi.org/10.3390/ijms231911729>
- [21]. Vasconcelos-Filho FS, da Rocha-E-Silva RC, Martins JE, Godinho WD, da Costa VV, Ribeiro JK, et al. Neuroprotector effect of daily 8-minutes of high-intensity interval training in rat Aβ1-42 Alzheimer disease model. *Current Alzheimer Research*. 2020;17(14):1320-33. <https://doi.org/10.2174/1567205018666210218161856>