

Isolation, Molecular Identification, and Bioremediation Activity of Chromium-Resistant Bacteria Collected from Waste Waters in Leather Tanning Plants of Khuzestan, Iran

Hoda Yektamanesh

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, hodim84@gmail.com

Monir Doudi*

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, monirdoudi@yahoo.com

Zarrindokht Emami

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, zarrindokht20@gmail.com

Abstract

Introduction: Environmental pollution with heavy metals is increasing with the development of the industry. The aim of the present study was to examine the isolation and molecular identification of chromium-resistant bacteria from contaminated wastewaters to investigate the bioremediation of chromium by them.

Materials and Methods: Chromium-resistant bacteria were isolated from tannery and leather factory effluents. The temperature, pH, BOD, COD, and the amount of heavy metals in each sample were determined. Bacterial isolation was performed by the agar dilution method in the presence of different concentrations of chromium from 1 to 128 mmolL⁻¹. Then, the MIC and MBC for the selected strains were determined. The molecular identification of the resistant strains was done by colony PCR. The biological removal of chromium was evaluated by the selected strains under *in vitro* conditions.

Results: The results of the study showed that the temperature, pH, BOD, and COD in the leather factory effluent were 28.7 °C, 7.10, 100, and 330 mgL⁻¹ and in the tannery effluent were 26.03 °C, 6.84, 110, and 480 mgL⁻¹, respectively. In this study, *Bacillus subtilis* H₁F and *Bacillus* sp. H₁D were isolated from leather wastewaters and *Bacillus cereus* H₂C was the selected strain from tannery effluents. Among them, *B. subtilis* H₁F showed the highest chromium resistance with an MIC value of 64 mM. Chromium removal of this strain was 68.5 ppm and it had the highest capacity among the three selected isolates.

Discussion and conclusion: Considering that *B. subtilis* H₁F had the highest resistance and adsorption of chromium compared to other two bacteria, it is a suitable candidate for the biological removal of chromium from polluted effluents.

Key words: Bioremediation, Chromium-Resistant Bacteria, Industrial Wastewater

* Corresponding author

Received: September 18, 2020/ **Accepted:** March 13, 2021

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم، شماره ۳۸، تابستان ۱۴۰۰، صفحه ۷۱ - ۸۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳

جداسازی، شناسایی مولکولی و پاکسازی زیستی باکتری‌های مقاوم به کروم از پساب‌های دباغی و چرم‌سازی خوزستان، ایران

هدی یکتامش: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، hodim84@gmail.com
منیـــــر دودی *: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، monirdoudi@yahoo.com
زرین‌دخت امامی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، zarrindokht20@gmail.com

چکیده

مقدمه: آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین با پیشرفت صنعت رو به افزایش است. هدف این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های مقاوم به کروم از پساب‌های آلوده و بررسی زیست‌پالایی کروم توسط آنها بود.

مواد و روش‌ها: به‌منظور جداسازی باکتری‌های مقاوم به کروم، نمونه‌گیری از پساب کارگاه دباغی و کارخانه چرم‌سازی انجام شد. سپس دما، pH، COD، BOD و میزان فلزات سنگین در نمونه‌ها تعیین شدند. جداسازی باکتری‌های مقاوم به کروم به روش رقت در آگار انجام و میزان رشد باکتری‌ها در غلظت‌های ۱ تا ۱۲۸ میلی‌مولار کروم بررسی شد. شناسایی مولکولی باکتری‌های مقاوم با روش کلنی - واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام و جذب زیستی باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی با جدایه‌هایی ارزیابی شد که بیشترین مقاومت را نسبت به کروم نشان دادند.

نتایج: میزان دما، pH، COD، BOD اندازه‌گیری شده در پساب کارخانه چرم‌سازی به ترتیب برابر ۲۸/۰۷ درجه سانتی‌گراد، ۷/۱۰، ۱۰۰ و ۳۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و در پساب کارگاه دباغی به ترتیب برابر ۲۶/۰۳ درجه سانتی‌گراد، ۶/۸۴، ۱۱۰ و ۴۸۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. براساس نتایج، سه سویه مقاوم به کروم جداسازی و شناسایی مولکولی شدند که شامل جنس‌های *Bacillus subtilis* H₁F و *Bacillus sp.* H₁D از پساب کارخانه چرم‌سازی و *Bacillus cereus* H₂C از پساب کارگاه دباغی بودند. بین آنها *B. subtilis* H₁F بالاترین میزان مقاومت به کروم با حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برابر با ۶۴ mM را نشان داد و بیشترین توان جذب کروم این سویه ۶۸/۵ ppm بود.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه باکتری *B. subtilis* H₁F بالاترین مقاومت و جذب کروم را در مقایسه با دو باکتری دیگر دارد، کاندید مناسبی برای حذف زیستی کروم از پساب‌های آلوده است.

واژه‌های کلیدی: حذف زیستی، باکتری‌های مقاوم به کروم، پساب‌های صنعتی

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین سمی در سراسر جهان همراه با پیشرفت صنایع گوناگون روزبه‌روز گسترش می‌یابد. براساس گزارشات منتشرشده از سازمان جهانی بهداشت مس، کروم، کادمیوم و نیکل مهم‌ترین فلزات سنگینی‌اند که به آلودگی محیط زیست منجر می‌شوند (۱). فلزات سنگین در غلظت پایین برای رشد گیاهان نیازند؛ اما در غلظت بالا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های آلاینده محیط زیست محسوب می‌شوند. بیشتر فلزات سنگین از لحاظ زیستی فعال‌اند و قادر به ایجاد واکنش در سطح مولکولی، سلولی و اکوسیستم‌اند (۲).

کروم یکی از فلزات سنگین است که به میزان زیادی در خاک و آب وجود دارد که به سختی دچار خوردگی می‌شود و در برابر زنگ‌زدگی و سیاه‌شدن مقاوم است. معمولی‌ترین حالت‌های اکسایش کروم یون‌های دو، سه و شش ظرفیتی آن است که یون سه ظرفیتی پایدارترین آنها و حالت‌های چهار و پنج ظرفیتی آن کم و بیش کمیاب است. کروم از طریق منابع انسانی مانند کارخانه‌های آبکاری، دباغ‌خانه‌های چرم، پردازش فلز، آبکاری کروم، تهیه آلیاژ، پالایش نفت و تولید قطعات خودرو وارد آب‌های محیطی می‌شود (۳). منابع دیگر انتشار کروم شامل احتراق نفت و زغال سنگ، جوشکاری فولاد ضدزنگ، تولید فولاد، کارخانه سیمان، صنایع رنگ و برج‌های خنک‌کننده‌اند که از کروم شش ظرفیتی به‌عنوان مهارکننده رنگ برای بخش‌های مختلف غوطه‌ور استفاده می‌کنند. مواجهه شغلی با ترکیبات کروم شش ظرفیتی می‌تواند بسیار حاد

و خطرناک باشد (۴). همچنین، آبشویه، کروم را وارد خاک و آب‌های زیرزمینی می‌کند؛ با این حال در محیط‌های آبی، کروم عمدتاً در دو حالت اکسیداسیون مانند کروم سه و شش ظرفیتی وجود دارد که کروم شش ظرفیتی سرطان‌زا است و آلاینده بالقوه برای خاک و آب‌های سطحی و زیرزمینی محسوب می‌شود (۲). یک افزایش جزئی در سطح کروم شش ظرفیتی به دلیل سمیت بالای آن، جهش‌زایی (۵) و سرطان‌زایی (۶) موجب بروز مشکلات زیست‌محیطی و سلامت می‌شود. چندین روش فیزیکوشیمیایی برای حذف فلزات سنگینی مانند کروم از محیط وجود دارد؛ با این حال، این روش‌ها به دلیل هزینه‌های عملیاتی بالا و تولید ضایعات جامد غیرعملی‌اند. تحقیقات انجام‌شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهند زیست‌پالایی با استفاده از میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات سمی روشی کارآمد برای حذف این قبیل از آلودگی‌ها است (۷). میکروارگانیسم‌ها مکانیسم‌های گوناگونی را برای سازگاری و پاسخ به فلزات سنگین به کار می‌گیرند که به تشکیل کمپلکس و ساخت پروتئین‌های اتصال‌ی نظیر متالونین‌ها می‌توان اشاره کرد. میکروارگانیسم‌هایی که توانایی جذب فلزات را در غلظت بالا دارند، گزینه مناسبی برای زیست‌پالایی‌اند (۸).

براساس نتایج ارائه‌شده از تحقیقات پیشین، کاهش میکروبی کروم شش ظرفیتی دارای اهمیت عملی است؛ زیرا استراتژی‌های حذف زیستی سنجش فلزات سنگین از دستاوردهای تکنولوژی سبز است که مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط زیست است (۹)؛ از این رو هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های مقاوم به فلز سنگین کروم از چند پساب صنعتی در استان خوزستان و سپس یافتن بهترین جدایه

باکتریایی برای حذف این فلز در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در پژوهش حاضر، نمونه‌برداری از پساب یک کارخانه چرم‌سازی (پساب ۱) و یک کارگاه دباغی (پساب ۲) در استان خوزستان با استفاده از ظروف شیشه‌ای استریل انجام شد. کلیه ظروف حاوی نمونه‌های جمع‌آوری شده روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس دما، pH، نیاز بیوشیمیایی به اکسیژن (BOD^1)، نیاز شیمیایی به اکسیژن (COD^2) و غلظت فلز کروم (برحسب یک در میلیون در لیتر، ppm) با استفاده از دماسنج جیوه‌ای، پی‌اچ متر (Metrohm 827, Swiss)، سنج BOD ، سنج COD دستگاه جذب اتمی (Nikon, Japan) ICP اندازه‌گیری شد و نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۰). به منظور اندازه‌گیری کروم موجود در نمونه‌ها، ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر پساب به صورت جداگانه به بالن ژوژه ۲۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد، مقدار ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به آن اضافه و روی حمام بخار قرار داده شد تا به آرامی تبخیر شود و به حجم ۲۰ میلی‌لیتر برسد. سپس محلول فوق با استفاده از آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در پایان، با استفاده از دستگاه جذب اتمی، غلظت کروم موجود در نمونه‌ها قرائت شد (۱۱).

جداسازی و غنی‌سازی باکتری‌های مقاوم به فلز کروم: برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به کروم از روش تهیه رقت در آگار استفاده شد. بدین منظور ابتدا محیط کشت PHGII آگار حاوی ۴ گرم پتون، ۱ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تهیه و استریل شد. پس از رسیدن دمای

محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی‌گراد، محلول حاوی فلز کروم تهیه‌شده از نمک نترات کروم با غلظت ۸ میلی‌مولار به آن افزوده شد و پس از اختلاط کامل، pH آن روی ۷ تنظیم و درون پلیت‌های استریل توزین شد (۱۰). در مرحله بعد، ۱-۰/۵ میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه‌شده از نمونه‌های پساب روی محیط‌های کشت PHGII آگار حاوی کروم، تلقیح و با استفاده از میله شیشه‌ای سرکج استریل در سطح پلیت‌ها پخش شد. سپس کلیه پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در این مرحله یک پلیت به عنوان کنترل منفی و پلیت دیگر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پس از اتمام دوره انکوباسیون، کلنی‌هایی با مورفولوژی متفاوت برای فرایند غنی‌سازی انتخاب شدند (۱۱). به منظور غنی‌سازی، کلنی‌های انتخاب‌شده درون محیط کشت نوترینت براث حاوی کروم با غلظت اولیه کشت داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس با استفاده از کشت خطی روی محیط PHGII آگار با غلظت نمک اولیه خالص‌سازی شدند. در نهایت، رنگ آمیزی گرم برای کلنی‌های خالص‌شده انجام شد (۱۱).

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های جداشده:

شناسایی ۸ سویه جداسازی‌شده مطابق راهنمای سیستماتیک برگگی و طبقه‌بندی باسیلوس‌ها براساس شکل، رنگ آمیزی گرم، تشکیل اسپور، تحرک، تست کاتالاز، لسیتیناز، سترات، احیای نترات، هیدرولیز ژلاتین، تخمیر قندهای گلوکز، گزیلوز و آرابینوز، ایندول، تولید H_2S و اکسیداز انجام شد (۱۲).

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC^2) و حداقل غلظت کشنده (MBC^3) فلز کروم

روی باکتری‌ها: به‌منظور تعیین MIC کروم روی باکتری‌های مقاوم جداسازی‌شده از روش انتشار در آگار استفاده شد. برای این هدف پلیت‌های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت‌های مختلف فلز (۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌مولار) و غلظت‌های بین آنها تهیه شدند؛ به‌طوری‌که هر پلیت حاوی یک غلظت معین از فلز بود. سپس کلنی‌های مقاوم به‌صورت شعاعی بر سطح پلیت کشت داده و در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲ روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از طی مدت زمان لازم پلیت‌ها بررسی شدند و براساس حداقل غلظتی از فلز که از رشد باکتری ممانعت کرده بود، MIC و یک غلظت بعد از آن MBC تعیین شد (۱۳).

بررسی میزان جذب کروم توسط باکتری‌های مقاوم جداسازی‌شده در شرایط آزمایشگاهی: میزان جذب این فلز توسط باکتری‌هایی با بیشترین MIC سنجش شد. ابتدا باکتری‌های مدنظر در محیط کشت مولر هینتون براث در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰ rpm تا زمان رسیدن به کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند ($10^6 \times 1/5$ cfu/ml) رشد داده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از کشت هر باکتری به پلیت نوترینت آگار (Scharlu, Spain) به‌عنوان شاهد و ۱۰ میکرولیتر به پلیت حاوی بالاترین غلظتی از کروم منتقل شد که باکتری مورد آزمایش در آن رشد کرده بود و پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان تشکیل کلنی انکوبه شدند. سپس چند کلنی از هر باکتری به محیط

کشت مولر هینتون براث (Merck, Germany) بدون فلز، منتقل و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰rpm تا زمان رسیدن به کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند انکوبه شد. در مرحله بعد، نمک نترات کروم در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار به کشت هر باکتری اضافه شد. پس از اضافه کردن محلول آرسنیک، در زمان‌های مختلف (۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰ و ۴۸۰ دقیقه) مقدار ۱ میلی‌لیتر از این کشت به مدت ۸ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس رسوب باکتری جداسازی و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی و سانتریفیوژ مجدد برای محاسبه وزن بیومس باکتری نگه داشته شد. در مرحله بعد، باکتری‌های رسوب کرده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت در فور خشک شدند و وزن خشک به‌عنوان بیومس باکتری در نظر گرفته شد (۱۵ و ۱۴). همچنین، مقدار کروم ذخیره‌شده در بیومس باکتری با دستگاه جذب ICP سنجش شد (۱۶) و با استفاده از نرم‌افزار اکسل^۵، نمودارهای مربوط به نمونه‌های باکتری، رسم و نتایج به‌دست آمده مقایسه و تحلیل شدند.

شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی مقاوم به کروم: شناسایی مولکولی باکتری‌های منتخب در مراحل قبلی آزمایش به‌منظور تعیین جنس و گونه آنها با استفاده از تکنیک کلنی - واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و تعیین توالی ژن 16S rDNA انجام شد. برای این منظور از پرایمرهای عمومی ارائه‌شده در جدول ۱ متعلق به شرکت فرمنتاز استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای عمومی انتخاب‌شده در این مطالعه (۱۷)

توالی	نام پرایمر	طول پرایمر
5'- AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'	OF BUN	۱۹ نوکلئوتید
5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	OR BUN	۱۹ نوکلئوتید

نتایج

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و زیستی پساب‌ها: در پژوهش حاضر فاکتورهای فیزیکوشیمیایی و زیستی و نیز غلظت فلزات سنگین پساب‌های مورد مطالعه بررسی شدند. نتایج به‌دست آمده به‌ترتیب در جدول ۲ و اشکال ۱ و ۲ ارائه شده‌اند.

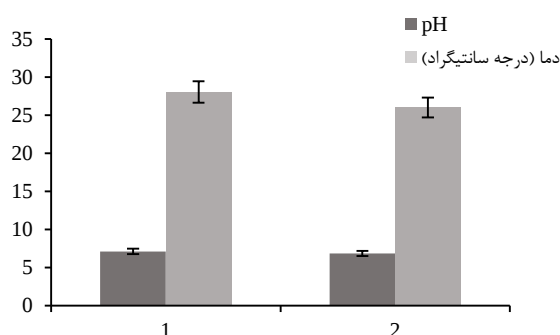
باکتری‌های مقاوم به کروم جداسازی‌شده: به‌منظور جداسازی، غنی‌سازی و غربال‌گری باکتری‌های مقاوم به فلز کروم از محیط کشت PHG II آگار حاوی نمک نیترات کروم استفاده شد. براساس نتایج به‌دست آمده ۸ سویه باکتریایی H_1A , H_1B , H_1D , H_1F , H_1G , H_1J , H_1K و H_1O از پساب کارخانه چرم‌سازی و ۳ سویه باکتریایی H_2A , H_2B و H_2C از پساب کارگاه دباغی جداسازی و خالص‌سازی شدند. در ادامه، آزمون‌های بیوشیمیایی برای سه جدایه H_1F , H_2C و H_1D انجام شدند که از نظر مورفولوژی و ویژگی‌های میکروسکوپی تفاوت بیشتری با سایر سویه‌های جداسازی‌شده داشتند و سه جدایه نام‌برده به‌عنوان سویه‌های منتخب برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شدند. نتایج حاصل از بررسی خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، در جدول ۳ و نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشیمیایی این سه جدایه در جدول ۴ ارائه شده‌اند.

مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حاوی ۱/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ Mμ)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ mM)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۱۰ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ x)، ۲/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ u/μl) و ۱۹/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، تهیه و یک کلنی از باکتری به آن اضافه شد. سپس سیکل‌های حرارتی واکنش به‌صورت دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه انجام شدند. محصول تولیدشده پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و خالص‌سازی، تعیین توالی شد. سپس توالی به‌دست‌آمده با استفاده از الگوریتم بلاست با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم ژن بانک مقایسه شد و رابطه فیلوژنیک سویه‌های جداسازی‌شده، بررسی و درخت فیلوژنی سویه‌های مدنظر با استفاده از توالی‌های حاصل از جست‌وجو در پایگاه اطلاعاتی NCBI با نرم‌افزار مگا^۶ نسخه ۶ ترسیم شد (۱۴).

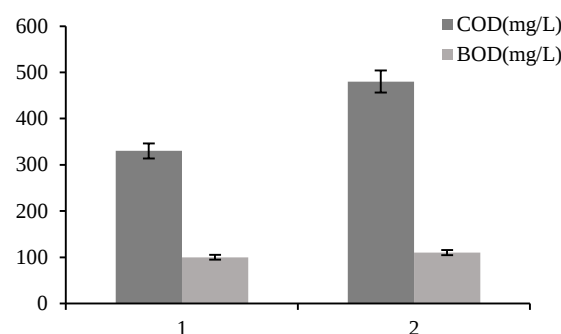
جدول ۲- میزان فلزات و شبه‌فلزات موجود در پساب‌های مطالعه‌شده

فلز	Mg (ppm)	Ca (ppm)	Bi (ppm)	Be (ppm)	Ba (ppm)	B (ppm)	As (ppm)	Al (ppm)	Ag (ppm)
پساب ۱	۵۸	۵۹	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۱	۰/۰۲	۰/۱۳	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۱
پساب ۲	۷۷	۳۸	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۱۲	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۱
فلز	Mn (ppm)	Li (ppm)	K (ppm)	Hg (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Cr (ppm)	Co (ppm)	Cd (ppm)
پساب ۱	<۰/۰۰۸	۰/۰۰۷	۲/۹۵	<۰/۰۰۱	۰/۰۱	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۱
پساب ۲	<۰/۰۰۵	۰/۰۱۲	۳/۳۹	<۰/۰۰۱	۰/۰۱	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۱
فلز	Sc (ppm)	Sb (ppm)	Pb (ppm)	P (ppm)	Ni (ppm)	Na (ppm)	Mo (ppm)		
پساب ۱	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۵	۱۴۱	<۰/۰۰۵		

پساب ۲	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۰۰۵	<۰/۱	<۰/۵	۱۵۵	<۰/۰۰۵		
--------	--------	--------	--------	------	------	-----	--------	--	--



شکل ۲- مقایسهٔ پساب‌های مطالعه‌شده از نظر pH و دما. (۱) پساب کارخانهٔ چرم‌سازی، (۲) پساب کارگاه دباغی



شکل ۱- مقایسهٔ پساب‌های مطالعه‌شده از نظر BOD و COD. (۱) پساب کارخانهٔ چرم‌سازی، (۲) پساب کارگاه دباغی

جدول ۳- نتایج مربوط به صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی باکتری‌های مقاوم به کروم جداسازی‌شده از پساب‌ها

کد جدایه	خصوصیات ماکروسکوپی	خصوصیات میکروسکوپی
H ₁ D	رنگ کلنی: سفید، اندازه: کوچک، مقطع طولی: محدب، شکل کلنی: گرد، حالت: لزج	باسیل نسبتاً بلند، گرم مثبت با آرایش زنجیره‌ای کوتاه
H ₁ F	رنگ کلنی: سفید، اندازه: بزرگ، مقطع طولی: محدب، حالت: لزج، شکل کلنی: گرد	باسیل کوتاه، گرم مثبت با آرایش منفرد
H ₂ C	رنگ کلنی: سفید، مقطع طولی: محدب، اندازه: کوچک، حالت: نرم، شکل کلنی: گرد	باسیل کوتاه، گرم مثبت شبیه موی معجد

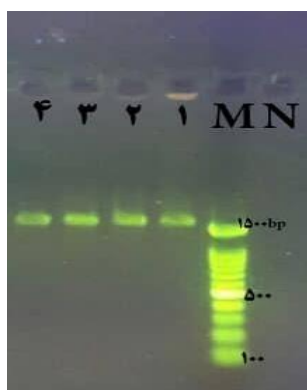
جدول ۴- نتایج مربوط به شناسایی جدایه‌ها به کمک تست‌های بیوشیمیایی

کد جدایه	سیترات	گزیلوز	احیای نیتрат و کاتالاز	ژلاتیناز	حرکت	آرابینوز	SH ₂
H ₁ D	-	-	+	+ نسبتاً کند	-	-	-
H ₁ F	+	+	+	+ خیلی کند	+	+	-
H ₂ C	+	-	+	+ خیلی سریع	+	-	-

باکتریایی مقاوم به کروم بررسی شده، سویهٔ H₁F بیشترین میزان مقاومت به کروم را نشان داد.

شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی منتخب:
محصول PCR قطعی به اندازهٔ ۱۵۰۰ جفت‌باز را روی ژل آگارز نشان داد (شکل ۳). پس از تعیین توالی قطعه ژن *16S rDNA* و بررسی توالی‌های به‌دست‌آمده در مقایسه با توالی‌های ثبت‌شده در بانک جهانی اطلاعات ژنوم (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار بلاست^۷ و نرم‌افزار مگا نسخه ۶ مشخص شد سویه‌های H₁D، H₁F و H₂D

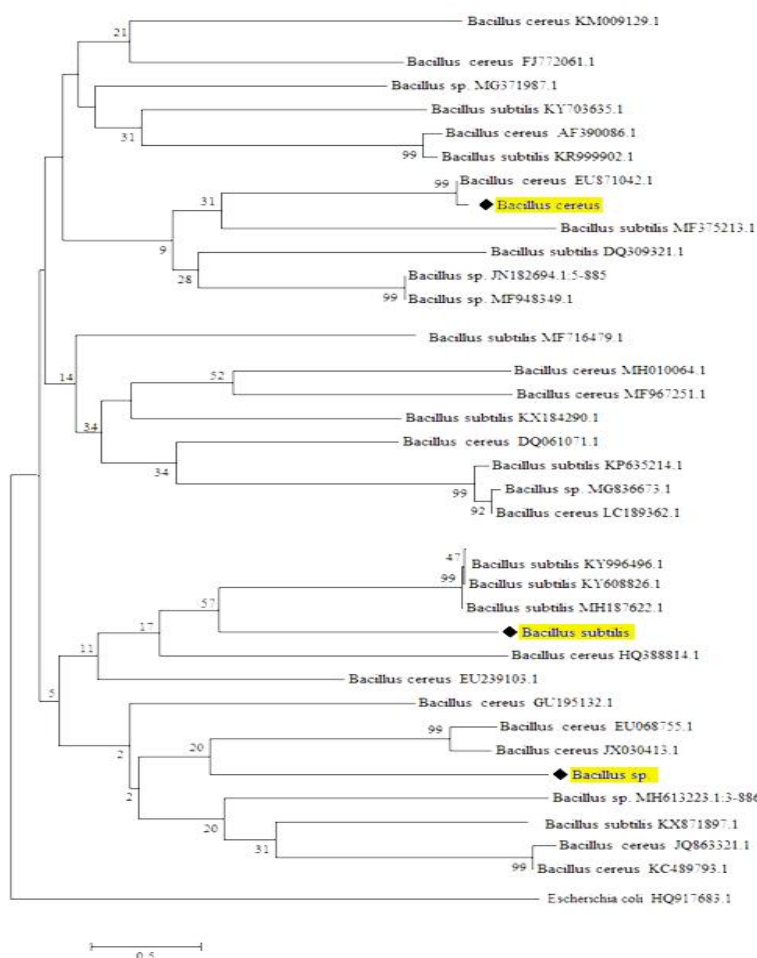
میزان مقاومت جدایه‌های میکروبی منتخب در برابر فلز کروم: حداقل غلظت ممانعت‌کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) نیترات کروم روی باکتری‌ها با روش ماکرودایلوشن برات اندازه‌گیری شدند. مقادیر MIC و MBC برای جدایهٔ H₁F به ترتیب برابر با ۶۴ و ۷۰ میلی‌مولار، برای جدایهٔ H₂C به ترتیب ۵۰ و ۶۰ میلی‌مولار و برای جدایهٔ H₁D به ترتیب برابر با ۷ و ۷/۵ میلی‌مولار به دست آمد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، از بین سویه‌های



شکل ۳- الکتروفورز محصولات کلنی PCR جدایه‌های مقاوم به فلز سنگین کروم در ژل آگارز ۱٪. ستون M: مربوط به نشانگر مولکولی (100 bp) و ستون ۱ تا ۳ به ترتیب مربوط به جدایه‌های *Bacillus* sp. است. ستون ۴: محصول PCR یک *Bacillus* sp. (کنترل مثبت) و ستون N: کنترل منفی است.

به ترتیب دارای ۹۸٪ شباهت با توالی باکتری‌های *B. cereus* LB17 بودند. درخت فیلوژنی این سه سویه در شکل ۴ ارائه شده است.

جذب زیستی کروم به وسیله سویه‌های منتخب:
به منظور ارزیابی میزان فلز کروم جذب شده توسط سه سویه باکتریایی منتخب، از تکنیک جذب اتمی (ICP) استفاده شد. میزان جذب فلز کروم توسط سویه‌های H_1D و H_2C ، H_1F و میزان زیست‌توده آنها در زمان‌های مختلف بررسی شد. نتایج مربوط به میزان جذب کروم توسط زیست‌توده‌ها در جدول ۵ ارائه شده‌اند. براساس نتایج به دست آمده سویه H_1F بیشترین میزان جذب کروم را در زمان ۴۸۰ دقیقه در غلظت ۶۸/۵ ppm کروم و میزان ۱۳/۱ میلی گرم زیست‌توده سلولی داشته است.



شکل ۴- درخت فیلوژنی مربوط به جدایه‌های H_2C ، H_1F و H_1D به ترتیب متعلق به *باسیلوس سرئوس* (۹۸٪ تشابه)، *باسیلوس سوبتیلیس* (۹۸٪).

تشابه) و *باسیلوس sp* (۹۸٪ تشابه)، با استفاده از نرم‌افزار مگا نسخه ۶ ترسیم شده است.

جدول ۵- میزان جذب (ppm)، زیست‌توده (mg) و تعداد کلنی باکتری‌های مطالعه‌شده

<i>B. cereus</i> H2C					<i>Bacillus sp.</i> H1D					<i>B. subtilis</i> H1F					نام باکتری
۴۸۰	۲۴۰	۱۲۰	۶۰	۰	۴۸۰	۲۴۰	۱۲۰	۶۰	۰	۴۸۰	۲۴۰	۱۲۰	۶۰	۰	زمان (دقیقه)
۲۲/۰۹	۲۱/۳۰	۴/۲۴	۲۱/۱۲	۱۹/۸۰	۵۵/۵	۵/۱۰	۴/۲۴	۴/۲۱	۳/۸۵	۶۸/۵۰	۵۷/۱	۲۴/۴۵	۱۸/۴۰	۴/۵۵	میزان جذب (ppm)
۴/۷	۵/۳	۳/۸	۴/۸	۴/۳	۸/۹	۶/۶	۳/۸	۲/۹	۱/۲	۱۳/۱	۹/۷	۷/۹	۶/۹	۴/۹	زیست‌توده (mg)
۲۶	۶۰	۴۸	۵۲	۷۳	۱۹	۲۴	۴۸	۵۲	۹۲	۱۹	۲۸	۵۶	۸۰	۱۰۱	تعداد کلنی cfu/ml

تحقیقات انجام‌شده در سال‌های اخیر نشان داده‌اند

بحث و نتیجه‌گیری

زیست‌پالایی با استفاده از میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات سمی روشی کارآمد برای حذف این قبیل از آلودگی‌ها هستند (۱۸). یکی از روش‌های یافتن سویه‌های میکروبی با ارزش صنعتی، جستجو در زیستگاه‌های طبیعی آنها مانند پساب‌های صنعتی است. در بسیاری از موارد، فعالیت بیوکاتالیست‌های میکروبی بومی بیشتر از سویه‌های تهیه‌شده از کلکسیون بوده است. هرچه محیط‌های جستجو وسیع‌تر باشد، امکان دستیابی به سویه‌های طبیعی بیشتر خواهد بود (۱۹)؛ ازاین‌رو در پژوهش حاضر جداسازی سویه‌های باکتریایی مقاوم به کروم از پساب یک کارگاه دباغی با pH اسیدی در دمای ۲۶/۰۳ و یک کارخانه چرم‌سازی با pH خنثی در دمای ۲۸/۰۷ به دست آمد. براساس نتایج به‌دست‌آمده ۳ سویه باکتریایی از پساب کارگاه دباغی و ۸ سویه باکتریایی از پساب کارخانه چرم‌سازی رشد داده و جداسازی شدند که علت آن را می‌توان به شرایط خنثی تا کمی اسیدی محیط‌های مذکور مرتبط دانست. براساس گزارشات ارائه‌شده، رشد میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات سنگین در شرایط خنثی بیشتر از اسیدی بوده است. ذوالفقاری و همکاران^۸ (۲۰۱۲) در تحقیقی مشابه، باکتری‌های مقاوم به کروم را از پساب‌های صنایع مختلف در استان قم جداسازی کردند. براساس نتایج آنها رشد سویه‌های باکتریایی مقاوم در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و در pH خنثی بیشتر بوده است (۲۰) که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. از دیگر فاکتورهای مؤثر در جداسازی و رشد سویه‌های میکروبی مقاوم به فلزات سنگین می‌توان به BOD و COD پساب‌ها اشاره کرد. میزان استاندارد COD برای پساب‌های صنعتی mg/L ۱۲۰ و حداکثر آن ۴۰۰ mg/L گزارش شده است (۲۱).

وقتی BOD به ۵ mg/L برسد در خلوص آب تردید ایجاد می‌شود و وقتی از ۲۰ mg/L تجاوز کند، هشداردهنده در نظر گرفته می‌شود. طبق استانداردهای ارائه‌شده برای پساب‌های صنعتی، استاندارد BOD برابر با ۲۰ mg/L و حداکثر آن با توجه به نوع صنعت و شرایط فیزیکوشیمیایی برابر ۱۰۰ mg/L است. با توجه به طبقه‌بندی فاضلاب‌ها از لحاظ درجه آلودگی، میزان BOD برای پساب‌هایی با آلودگی بسیار شدید برابر ۶۰۰ mg/L گزارش شده است (۲۲). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، COD پساب کارخانه چرم‌سازی با COD استاندارد محیط زیست برای پساب‌های صنعتی مطابقت دارد؛ در صورتی که در مورد پساب کارگاه دباغی بالاتر از استانداردهای گزارش‌شده است. ازاین‌رو BOD و COD پساب کارگاه دباغی نسبت به کارخانه چرم‌سازی افزایش چشمگیری داشته است؛ در نتیجه، رشد باکتری‌های مقاوم به کروم در این پساب کمتر بوده است. در مطالعه کریشنا و همکاران^۹ (۲۰۱۲) درصد باکتری‌های مقاوم به مس و کروم با میزان BOD و COD از رابطه مثبتی برخوردار بوده است؛ به‌طوری‌که با افزایش میزان BOD و COD درصد باکتری‌های مقاوم افزایش یافته‌اند (۱۹). نتایج پژوهش حاضر با مطالعه طهمورث‌پور و همکاران در قسمت درصد باکتری‌های مقاوم به کروم با میزان COD مغایرت نشان داد که دلیل آن را می‌توان به تفاوت در پساب‌ها و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مختلف آنها نسبت داد (۲۲). به‌منظور افزایش بازده کاربرد میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌ها برای حذف فلزات سنگین از محیط‌های طبیعی، تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد بسیار مؤثر است و امکان مدیریت بهتر و کارایی بیشتری را برای کاهش و

حذف آلاینده‌هایی همچون فلزات سنگین فراهم می‌کند (۲۳). حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد برای سویه‌های منتخب جداشده در پژوهش حاضر، طیف متفاوتی از ۷/۵ تا ۶۰ میلی‌مولار گزارش شده است. براساس این نتایج از بین سویه‌های مقاوم به کروم جداشده از پساب کارخانه چرم‌سازی، H_1F بیشترین مقاومت را با $MIC = 65 \text{ mM}$ و $MBC = 70 \text{ mM}$ و بعد از آن، جدایه H_1D بیشترین مقاومت را با $MIC = 7/5 \text{ mM}$ و $MBC = 7/5 \text{ mM}$ نشان داد. بین سویه‌های پساب کارگاه دباغی، جدایه H_2C بیشترین مقاومت را با $MIC = 50 \text{ mM}$ و $MBC = 60 \text{ mM}$ نشان داد. زانگ و همکاران^{۱۱} در سال ۲۰۱۵ جدایه *پسودوموناس پوتیدا*^{۱۱} را از دریا جداسازی کردند و رشد باکتری‌ها را در غلظت ۲۸۰ میکرومولار کروم گزارش دادند. در این پژوهش اشاره شده است که این مقاومت احتمالاً می‌تواند به دلیل مقاومت بالای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن لیپید فراوان در لایه‌های مختلف لیپولی ساکارید، فسفولیپید و لیوپروتئین باشد. این محقق و همکارانش این جدایه را انتخاب مناسبی برای پالایش زیستی کروم از دریاها و دریاچه‌ها معرفی کردند (۲۴). ویتی و همکاران^{۱۲} در سال ۲۰۱۵ در پژوهش خود کورینه باکتریوم اس پی^{۱۳} را از چندین پساب صنعتی جداسازی کردند و بیشترین مقاومت به فلز کروم در آن را $MIC = 35 \text{ mM}$ = گزارش دادند (۲۵). این در حالی است که در پژوهش حاضر، بیشترین مقاومت به فلز کروم mM $MIC = 65$ به دست آمد. متفاوت بودن این درصد مقاومت در دو پژوهش فوق‌الذکر می‌تواند تا حدودی مربوط به تفاوت در شرایط فیزیوشیمیایی دو پژوهش با یکدیگر و تفاوت جنس و گونه باکتری‌های مقاوم به

فلز کروم در دو مطالعه باشد. مطابق گزارش نیتو^{۱۴} در سال ۱۹۸۵، باکتری‌هایی که توانایی رشد در غلظت ۱ میلی‌مولار فلزات را در چندین پساب صنعتی داشته باشند، جزء باکتری‌های مقاوم به آن فلز محسوب می‌شوند. نتایج این محقق نشان دادند جدایه‌های *باسیلوس اس پی*^{۱۵} S29 و *استافیلوکوکوس اس پی*^{۱۶} به کروم مقاوم بوده‌اند و در حضور کروم به خوبی رشد می‌کردند (۲۶). نتایج این محقق با یافته‌های پژوهش حاضر در معرفی باکتری مقاوم به کروم در چندین پساب صنعتی تا حدودی مطابقت داشت. دلیل این هم‌خوانی را می‌توان به عوامل متعددی نظیر ساختارهای یکسان پساب‌های بررسی‌شده از نظر موقعیت‌های فیزیوشیمیایی، موقعیت‌های یکسان باکتری‌های جداسازی‌شده و همچنین عوامل محیطی نزدیک به هم نسبت داد. براساس نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر، بیشترین میزان جذب کروم در هر سه جدایه H_1F ، H_1D و H_2C به ترتیب برابر ۶۸/۵، ۵۵/۵ و ۲۲/۰۹ ppm برآورد شد که نشان‌دهنده کاهش میزان جذب فلز کروم و نتایج زیست‌توده در سه جدایه در برابر فلز کروم است. بین باکتری‌های مقاوم به فلز کروم باکتری *باسیلوس سوبتی‌لیس*^{۱۷} H_1F بیشترین میزان مقاومت به کروم را از خود نشان داد و برای بررسی جذب فلز مذکور در شرایط آزمایشگاهی مطالعه شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده شد میزان جذب کروم در این سویه در دقایق ابتدایی سریع‌تر بوده است؛ اما در زمان‌های ۶۰ تا ۱۲۰ دقیقه این روند با سرعت بسیار کمتری دنبال شده است. سپس در فاصله زمانی ۱۲۰ تا ۲۴۰ دقیقه روند جذب با شیب تندتری ادامه یافته و بعد از آن، در زمان ۴۸۰ دقیقه تقریباً به تعادل رسیده است؛ به‌طوری‌که در فاصله زمانی ۲۴۰ تا ۴۸۰

روند جذب به حالت تعادل رسید و هرچه میزان غلظت محلول کروم افزایش یافته، مدت زمان رسیدن به حالت تعادل کوتاه‌تر شده بود (۲۸). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج این پژوهش در قسمت جذب بالای کروم و نیز در مقاومت بالای باکتری‌ها در برابر این فلز مطابقت داشت؛ اما جنس و گونه باکتری‌های جداسازی و شناسایی مولکولی شده متفاوت بودند.

شناسایی جدایه‌های منتخب در این پژوهش ابتدا با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و سپس آنالیز مولکولی ژن *16S rDNA* صورت گرفت. براساس نتایج به‌دست‌آمده سویه H_1F دارای همولوژی ۹۸٪ با *باسیلوس سوبتیلیس* و H_1D دارای ۹۸٪ همولوژی با جنس *باسیلوس اس/پی* و سویه H_2C دارای همولوژی ۹۸٪ با *باسیلوس سرئوس* بودند. هر سه باکتری بررسی‌شده در این پژوهش باسیل گرم مثبت بودند. این سه جدایه، اسپورهای بیضوی شکل در موقعیت مرکزی یا نزدیک مرکزی بدون تورم داشته‌اند و دارای آرایش‌های متفاوت منفرد، زنجیره‌ای و آرایشی از زنجیره‌های درهم شبیه موی مجعد بودند. این گروه از باکتری‌ها به دلیل داشتن اسپور در برابر بسیاری از مواد ضدباکتریایی، حرارت، خشکی، یخ‌زدگی، سموم شیمیایی، فلزات سنگین و دیگر فاکتورهای مضر محیطی مقاومت نشان می‌دهند (۲۹). ویتی و همکاران در پژوهش خود، شش جنس از باکتری‌های گرم منفی و سه جنس از باکتری‌های گرم مثبت ساکن خاک را شناسایی کردند که قادر به مقاومت بالایی در برابر فلز کروم و انواعی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج بودند. در این پژوهش اشاره شده بود باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن غشای خارجی و بار منفی سطحی LPS در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت با وجود کروی بودن و

دقیقه افزایش ناچیزی در میزان جذب مشاهده شده است. همچنین، میزان زیست‌توده این باکتری در دقایق ابتدایی آزمایش، افزایش سریع‌تری نسبت به زمان ۲۴۰ تا ۴۸۰ دقیقه نشان داده است و می‌توان چنین استنباط کرد که رشد باکتری در حضور فلز کروم کاهش یافته است. اسپاتل و همکاران^{۱۸} (۲۰۱۰) جدایه‌ای به نام *پسودوموناس فراگی*^۹ را از پسماندهای کارخانه‌های نساجی جداسازی کردند. بیشترین میزان کروم جذب‌شده از محیط حاوی ۲ میلی‌مولار کروم در این باکتری برابر ۰/۵۹ میلی‌گرم از فلز کروم به‌ازای هر گرم از وزن باکتری بود. یکی از دلایل میزان جذب کم در این باکتری در این تحقیق می‌توانست مربوط به تعداد مکان‌های کم برای اتصال فلز به سطح باکتری باشد و در نتیجه، پس از اشباع و پرشدن آن مکان‌ها باکتری مدنظر قادر به جذب بیشتری از فلز کروم نبوده باشد (۲۷). نتایج این پژوهش با یافته‌های پژوهش حاضر مغایرت نشان دادند دلیل این تفاوت را می‌توان تا حدودی به نوع باکتری و تنوع زیستی میکروارگانیسم‌ها و متفاوت بودن نوع پساب بررسی‌شده با صفات متفاوت فیزیکی و شیمیایی مربوط دانست. جعفری صالح و همکاران^{۲۰} در سال ۲۰۱۸ با بررسی باکتری‌های مقاوم به کروم از رودخانه سلطان‌آباد شیراز نشان دادند چندین گونه از باکتری *سودوموناس* قادر به مقاومت بسیار بالایی در برابر فلز کروم بودند و به‌عنوان گزینه مناسب برای انجام آزمایشات جذب فلز کروم از محیط زیست در این پژوهش استفاده شدند. میزان فلز کروم استفاده‌شده در این تحقیق حدود ۳۰ میلی‌مولار بود. میزان سرعت جذب در ۲۰ دقیقه نخست بیشترین مقدار و بسیار سریع بود. پس از مدت زمان ۴۰ دقیقه از ابتدای آزمایش،

سموم دفع آفات نباتی از پساب‌های آلوده باشد.

سپاسگزاری

این مقاله براساس نتایج به‌دست آمده از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی با کد 17230554962001 دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تدوین شد. نویسندگان این مقاله از مسئولان محترم دانشکده علوم زیستی و آزمایشگاه تحقیقاتی این دانشگاه به‌منظور حمایت‌های اجرایی کمال تشکر و امتنان را دارند.

References

- (1) Ganguli A, Tripathi AK. Bioremediation of toxic chromium electroplating effluent by chromate reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2 in two bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009; 58: 416-417.
- (2) Srivastava S, Thakur IS. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil Microcosm. *Soil Biology and Biochemistry*. 2016; 38 (7): 1904-11.
- (3) Kinamari M, Chirayu D, Drishna P. Chromate reduction by *Vogococcus* sp. isolated from Cr (VI) contaminated industrial effluent. *Electronic Journal of Biology*. 2010; 6: 6-12.
- (4) Viamajala S, Peyton BM, Sani RK, Apel WA, Peterson JN. Toxic effects of chromium (vi) on anaerobic and aerobic growth of *Shewanella oneidensis* MR. *Biotechnology Progress*. 2014; 20: 87-95.
- (5) Nishioka H. Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutation Research*. 2015; 3: 185-189.
- (6) Venitt S, Levy LS. Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature*. 2016; 250: 493-495.
- (7) Ramteke PW. Biosorption of nickel (ii) by *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Environmental Biology*. 2000; 21: 219-231.
- (8) Ghane M. Isolation and identification of chromium-resistant bacteria in order to clean contaminated wastewater. *Iran Journal of Environmental Geology*. 2012; 6 (19): 31-39
- (9) Kinamari M., Chirayu D., Drishna P. Chromate reduction by *Vogococcus* sp. isolated from Cr (VI) contaminated industrial effluent. *Electronic Journal of Biology*. 2010; 6: 6-12.
- (10) Apha, American public Health Association: *Standard methods for the examination for water and wastewater*. 20th ed. Washington: AWWA, WPCF; 1998.
- (11) Salehi M, Akhtari M, Akhavan Sepahi A. داشتن پیتیدوگلیکان چندین لایه در دیواره سلولی و حتی حضور تیکوئیک‌اسید در دیواره سلولی مقاومت کمتری در برابر فلز کروم نشان دادند (۲۵). در پژوهش حاضر نیز تمامی جنس‌های شناسایی شده مقاوم به فلز کروم متعلق به جنس‌های متفاوت باسیلوس‌ها بودند که مقاومت بیشتری را در برابر فلز سنگین کروم نشان دادند. از دیدگاه ریخت‌شناسی بیشتر باکتری‌های جداسازی شده مقاوم به کروم از دو پساب بررسی شده در این پژوهش، باکتری‌های میله‌ای شکل و گرم مثبت بودند که مانند پژوهش ویتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ به دلیل گرم مثبت بودن و بالابودن نسبت سطح به حجم در باکتری‌های میله‌ای نسبت به کروم از مقاومت بیشتری برخوردارند. درنهایت با توجه به اینکه باکتری باسیلوس سوبیتی‌لیس (H_2F) بیشترین مقاومت و بیشترین میزان جذب کروم را در مقایسه با دو باکتری دیگر از خود نشان داده است، این باکتری می‌تواند کاندید مناسبی برای حذف زیستی کروم پس از ارزیابی سایر ژن‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، حشره‌کش‌ها و

- Evaluation of resistance to heavy metals of zinc sulfate and cadmium sulphate in *Escherichia coli* strain isolated from surface waters of Tehran city using seial dilution method in pipe. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2017; 20 (7): 85-89
- (12) Ghandehari F, Ghiasian M. *Atlas of medical bacteriology and diagnostic tables of bacteria*. 2nd ed. Isfahan: Kankash Publications; 112 pages; 2007.
- (13) Tsai PJ, Tsai TH, Ho SC. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemistry*. 2007; 105 (1): 311-6.
- (14) Sajadian M, Doudi M, Shirmardi M. Isolation and molecular identification of lead (pb) resistant bacteria from oil-contaminated soils area c-branch masjedsoleyman. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2018; 30 (8): 71-78.
- (15) Cappuccino JG, Sherman N. 1996. *Microbiology, A Laboratory Manual*. 4th Ed. California: The Benjamin-Cumming Publishing Company, Menlopark, 186 p.
- (16) Anyanwu CU, Nwachukwu ON. Heavy metal resistance in bacteria isolated from contaminated and uncontaminated soils. *International Journal of Research in Chemistry and Environment* 2011; 1: 171-173
- (17) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriolgy*. 1991; 173 (2): 697-703.
- (18) Kepahi M, Sachdeva A. Bioremediation options for heavy metal pollution. *Journal of Health and Pollution*. 2019; 9(24): 1-20.
- (19) Kinamari M, Chirayu D, Drishna P. Chromate reduction by *Vogococcus* sp. isolated from Cr (VI) contaminated industrial effluent. *Electronic Journal of Biology*. 2010; 6: 6-12.
- (20) Zolfaghari M, Soleymani Darjagh M, Masodikhah M, Motlagh M, Heydarpoor A. Prevalence and antimicrobial resistance of chromium-bearing microorganisms in industrial wastewaters of Qom. *Medical Science of Qom University*. 2012; 6: 15- 23.
- (21) Krishna MP, Varghese R, Babu AV, Mohamedhatha AA. Bioaccumulation of Cr and Cu by *Pseudomonas* sp. Isolated from Metal Polluted Industrial Region. *Environmental Research Engineering and Management*. 2012; 3 (61): 58-64.
- (22) Tahmors Pour A, Kasra Kermanshahi R. Determination of adaptation to heavy metals in bacteria resistant to industrial effluents. *Water and Wastewater Journal*. 2005: 61: 53-59.
- (23) Meybodi SM, Khorasani H. Bioremediation of chromium by *Pseudomonas* strain isolated from oil contaminated soils of Khuzestan. *Journal of Microbiological Biology*. 2014; 4 (14): 101-110.
- (24) Zhang K, Li F. Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015; 90 (3): 1163-9.
- (25) Viti C. Response of Microbial communities to different doses of chromate in soil Microorganism. *Applied Soil Ecology*. 2015; 34: 125-139.
- (26) Nieto JJ, Fernandes-Castillo R, Marquez MC, Ventoza A, Quesada E, Ruiz-Berraquero F. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989; 55: 2385-2390.
- (27) Spatel J, Cpatel P, Kalia K. Isolation and characterization of nickel uptak by nickel resistant bacterial isolate. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2010; 19: 297-301.
- (28) Jafari Saleh A, Shahnani A, Bagherizadeh A, Arzani Birgani P, Shirali M, Abdoli Sanjani M. Isolation and

Chromium-Strong Bacteria from Soltan Abad River Shiraz. Hozan Journal Scientific Environment. 2018; 3 (2): 20-1.

- (29) Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J. The hidden life styles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology.* 2003; 5 (8): 631-640.

¹- Biochemical oxygen demand

²- Chemical oxygen demand

³- Minimum inhibitory concentration

⁴- Minimum bactericidal concentration

⁵- Excel

⁶- Mega

⁷- BLAST

⁸- Zolfaghari et al

⁹- Krishna et al

¹⁰- Zhang et al

¹¹- *Pseudomonas putida*

¹²- Viti et al

¹³- *Corynebacterium* sp.

¹⁴- Nieto

¹⁵- *Bacillus* sp.S29

¹⁶- *Staphylococcus* sp.

¹⁷- *B. subtilis*

¹⁸- Spatel et al

¹⁹- *Pseudomonas fragi*.

²⁰- Jafari Saleh et al.