مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره ششم ـ شماره دوم ـ تابستان ۹۱
صفحات ۱۵ الی ۲۳

مقاله پژوهشی
(Original Article)

فراوانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌های تحمل‌کننده کروم در پساب صنایع استان قم

محمدرضا ذوالفقاری[۱]، محمد سلیمانی درجاق[۱]، معصومه مسعودیخواه[۲]، محمد خداداد مطلق[۳]، اعظم حیدرپور[۴]

[۱]استادیار میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
[۲]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
[۳]دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
[۴]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: کروم به‌عنوان یکی از منابع مهم آلودگی محیطی و سرطان‌زایی در بین کارگران صنایع شناخته شده است. ترکیبات Cr(VI) بسیار سمی‌تر از Cr(III) هستند. مطالعات اخیر نشان داده است احیای Cr(VI) به حالت‌های اکسیداسیونی پایین‌تر و رادیکال‌های آزاد در ایجاد اثرات کارسینوژنیک، ایمونوتوکسیک و ژنوتوکسیک در انسان و حیوانات نقش مهمی ایفا می‌کند. در این مطالعه حضور ارگانیسم‌های تحمل‌کننده کروم و مقاوم به آنتی‌بیوتیک از پساب چهار صنعت گالوانیزه، آبکاری، نساجی و رنگرزی استان قم بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه ۲۴۱ جدایه شامل: ۲۳ کوکسی گرم مثبت، ۳ باسیل گرم منفی و ۲۱۵ باسیل گرم مثبت با استفاده از محیط Agar LB حاوی غلظت‌های مشخص کرومات پتاسیم جدا شدند، که همگی قادر به رشد در غلظت ۵mM از کرومات پتاسیم بودند.

یافته‌ها: در این بررسی یکی از کوکسی‌های گرم مثبت و احیاکننده کرومات جداشده از پساب آبکاری کروم توانست تا سقف ۷۶۰mM غلظت کرومات پتاسیم را تحمل کرده و در دمای ۳۴°c و pH=۷ در طول ۲۴ساعت گرماگذاری در این غلظت رشد کند. همچنین این سویه به چندین آنتی‌بیوتیک نیز مقاومت نشان داد. با تست‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیک، مورفولوژیک و 16SrRNA مشخص گردید این باکتری متعلق به جنس استافیلوکوک گونه *arlettae* و سویه *R1-7A* می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد باکتری *Staphylococcus arlettae* سویه *R1-7A* می‌تواند ضمن مقاومت بسیار بالا به کروم از طریق مکانیسم احیا برای سمیت‌زدایی و پاکسازی Cr(VI) از محیط‌های آلوده، به‌ویژه مناطق بومی و در نتیجه کاهش اثرات شدید بیماری‌زایی و سرطانزایی آن مفید باشد. از طرفی، کنترل چنین باکتری‌هایی با مقاومت توأم به فلزات و آنتی‌بیوتیک از نظر پزشکی بسیار حایز اهمیت است.

کلید واژه‌ها: کروم؛ پساب‌های صنعتی؛ سرطانزایی؛ سمیت‌زدایی؛ ایمونوتوکسیژنیسیتی؛ مقاومت باکتری به دارو.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛
آدرس پست الکترونیکی: mreza.zolfaghary@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۳

مقدمه

امروزه صنعتی‌سازی جهان و شهرسازی جوامع منجر به آلودگی محیط‌زیست شده است، که از نتایج این آلودگی، ورود فلزات سمی سنگین به محیط می‌باشد. آلاینده‌های فلزی منابع طبیعی و غیرطبیعی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های محیطی هستند، که یکی از این آلاینده‌های وافر در زمین، کروم می‌باشد (۲،۱). براساس گزارش آژانس حمایت محیط EPA (Environmental Protectio Agancy)، کروم بعد از سرب دومین فلز یافت‌شده در مناطق آلوده است و سالانه حدود ۱۷۰۰۰۰ تن از پساب‌های کرومی به محیط سرازیر می‌شود (۴،۳). این فلز در پساب صنایع مرتبط با کروم مانند تهیه آلیاژهای کرومی، آبکاری کروم، ترکیبات بازدارنده خوردگی، شیشه‌سازی، تهیه پیگمان، صنعت نساجی، صنایع چوب، عکاسی، دباغی، تولید

سیمان، فرش، نوارهای مغناطیسی و ساخت اجزای ماشین و هواپیما وجود داشته و در یک محدوده ۹ ظرفیتی (۲- تا ۶+) که فقط فرم ۳ و ۶ ظرفیتی آن اهمیت زیادی دارند بررسی شده است (۵،۳،۲). نظر به اینکه محدودیت Cr(VI) در آبهای آشامیدنی متجاوز از ۰/۰۵/۱mg و دوز کشنده خوراکی آن ۷۱mg/kg وزن بدن می‌باشد، و بنابر نظر انجمن سلامت و امنیت شغلی OSHA (Occupational Safe and Health Administration)، میانگین تماس با Cr(VI) در محیط بین ۰/۰۰۵ و ۱/۰mg/m^3 برای ۸ ساعت کار روزانه و ۴۰ ساعت کار هفتگی است و با توجه به اینکه آژانس بین‌المللی تحقیق بر روی سرطان IARC (International Agency for Research on Cance) و برنامه سم‌شناسی ملی آمریکا NTP (National Toxicology Program of U.S)، کروم را به‌عنوان یکی از علل سرطان‌های انسانی معرفی کرده است، می‌توان به سمی بودن آن برای موجودات زنده پی برد (۴). دلیل این محدودیت این است که کروم به‌شدت موتاژن، کارسینوژن و تراتوژنیک بوده و فاکتورهای متعددی در سمی بودن آن دخیل هستند، همچنین به‌علت شباهت ساختمانی کرومات به SO4-2، به آسانی از طریق سیستم انتقال سولفات در یوکاریوت‌ها و باکتری‌ها قابل برداشت است و داخل سلول به روش آنزیماتیک و غیرآنزیماتیک احیا شده و با ایجاد رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، اثرات مخربی روی DNA می‌گذارد، و با گروه‌های کربوکسیل و سولفیدریل آنزیم‌ها ترکیب و سبب تغییر ساختار یا نحوه فعالیت آنها می‌شود (۶). سیستم‌های بیولوژیک به‌طور نرمال در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو ایجادشده توسط رادیکال‌های آزاد به‌وسیله آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیماتیک و غیرآنزیماتیک حفاظت می‌شوند. ولی زمانی که تعادل آنتی‌اکسیدانت‌ها و پراکسیدانت‌ها به نفع پراکسیدانت‌ها به‌هم بخورد؛ آسیب‌های اکسیداتیو القایی با Cr(VI) اتفاق می‌افتد که ROS القاشده در اثر Cr(VI) عامل تخریب DNA و پروتئین‌ها، پراکسیداسیون افزایش‌یافته لیپیدها، نوسان حالت‌های اکسیداسیون داخل سلولی، فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی هسته‌ای (P53, AP-1, NF-κB)، القای آپوپتوزیس، فعال‌سازی آنزیم‌های مشخص درگیر در مسیر سیگنال MAPK، تحریک آنزیم‌های درگیر در کنترل سیکل سلولی، مکانیسم‌های Check-point، فعال‌سازی آنزیم‌های مسئول برای احیای Cr(VI) مانند دی هیدرو لیپوآمید دهیدروژناز وابسته به NADH می‌شود (۷). استنشاق ترکیبات ۶ ظرفیتی کروم در درازمدت باعث سرطان ریه و تماس مداوم آن با پوست موجب درماتیت و زخم‌های پوستی و تخریب رنگدانه‌های پوستی می‌گردد و درصورتی‌که این فلز به میزان ۱۰mg/kg وزن بدن برسد، منجر به زخم معده، التهاب مخاط دستگاه گوارشی، آسیب‌های کلیوی، نکروز کبدی و در نهایت مرگ می‌شود (۷،۴). مورد نگران‌کننده دیگر در این روزها ارتباط میان مقاومت به فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها است. هنگامی‌که چندین عامل ضد میکروبی به یک هدف مشترک حمله می‌کنند، پاسخ به این عوامل می‌تواند به‌طور همزمان صورت گیرد که این واکنش تحت عنوان Co-resistant نامگذاری می‌شود. برای مثال با بررسی پلازمیدهایی که منشأ آنها از تأسیسات تیمار فاضلاب بود مشخص گردید این پلازمیدها دارای ژن‌های مقاومت به جیوه، کرومات، تلوریت و چندین ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هستند. آنالیز توالی نوکلئوتیدی نیز نشان داد عناصر ژنتیکی عامل مقاومت، یا در ناحیه ورود و یا در ناحیه ترنسپوزون قرار گرفته‌اند، که احتمالاً به این پلازمیدها، ضمن حوادث نوترکیبی چندگانه این مقاومت‌ها افزوده شده است، و این مسئله از لحاظ پزشکی بسیار حایز اهمیت است؛ چه را که گسترش این مورد در محیط می‌تواند تهدید جدی برای درمان موفقیت‌آمیز بیماری‌ها باشد (۸). با توجه به مضرات فلزات سنگین که بدان اشاره شد و اینکه این روزها به دلیل صنعتی شدن جهان، ورود پساب‌های آلوده به محیط اجتناب‌ناپذیر است، همچنین به دلیل مشکلات ناشی حذف آلودگی از پساب‌ها به روش‌های فیزیکی و شیمیایی، دانشمندان رو به‌سوی روش‌های پاکسازی زیستی(Bioremediation) آورده‌اند. زیست‌پالایی یک اصطلاح کلی در جهت رفع آلودگی‌های زیست‌محیطی به‌وسیله فرآیندهای بیولوژیکی و توسط میکروارگانیسم‌ها خصوصاً باکتری، مخمر و قارچ در خاک‌ها و آبهای آلوده است. اولین باکتری مقاوم به کروم، *سودوموناس فلورسنس سویه LB300* با مقاومت ناشی از احیای کروم می‌باشد، که این مکانیسم سمیت‌زدایی اخیراً توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۱۲-۹). شمار زیادی از میکروارگانیسم‌های مقاوم به کروم شامل: گونه‌های *سودوموناس*، *میکروباکتریوم*، *دسولفوویبریو*، *انتروباکتر*، *اشرشیا*، *شیوانلا*،

باسیلوس، اسینتوباکتر و قارچ‌های *آسپرژیلوس، گانودرما لوسیدوم و تریکودرما* گزارش شده است که اغلب از پساب صنایع مرتبط با کروم جدا شده‌اند. این ارگانیسم‌ها با تغییر فرم محلول به نامحلول این فلزات، این عمل را انجام می‌دهند. در واقع، وقتی فلزی به پتانسیل رداکس پایین‌تری می‌رسد تحرک و سمی بودن آن کاهش می‌یابد (۹) (۱۵-۱۳).

این مطالعه با هدف تعیین فراوانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌های تحمل‌کننده کروم در پساب صنایع گالوانیزه، آبکاری، نساجی و رنگرزی استان قم صورت گرفت.

روش بررسی

نمونه‌گیری از پساب‌های آلوده توسط ظروف نمونه‌برداری مخصوص (طوری‌که سر ظروف نمونه‌گیری به جهت همگن ساختن نمونه و برداشت آن تا۳cm خالی بماند) انجام شد. بعد از نمونه‌گیری و یادداشت دما، pH، تاریخ نمونه‌گیری و محل نمونه‌برداری، نمونه‌ها سریعاً به فلاسک یخ منتقل شدند تا در کمترین زمان ممکن، آزمایشهای لازم روی آنها انجام شود. برای جداسازی باکتری‌ها از ظروف حاوی نمونه‌های پساب، بعد از هموژن کردن کامل آنها در شرایط کاملاً استریل، ۱ml برداشته و طی تکنیک غنی‌سازی به ۹ml محیط لوریا برتانی براث (Broth Luria Bertani) حاوی ۱۰g تریپتون، ۵g عصاره مخمر، ۱۰g کلرید سدیم و یک لیتر آب مقطر) افزوده شد (۱۶). نمونه‌ها در دور شیکر ۱۴۰، دمای ۳۴°c، به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند، سپس از نمونه‌های غنی‌شده ۱ml برداشته و با ۹ml سرم فیزیولوژی، رقت‌های 10^{-1}-10^{-7} تهیه گردید. در نهایت، از رقت‌های 10^{-5}-10^{-7}، ۱۰۰µl برداشته و در محیط لوریا برتانی آگار (Luria Bertani Agar) حاوی ۵mM کرومات پتاسیم به‌صورت سطحی کشت داده شد و در دمای ۳۴°c به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند. کلنی‌هایی که توانستند تا این سقف از غلظت کرومات پتاسیم را تحمل کنند و در این غلظت رشد کردند، خالص‌سازی شده و با کمک محیط لوریا برتانی آگار به اضافه مقادیر مختلف غلظت کرومات پتاسیم، MIC (Minimum Inhibitory Concentration) آنها تعیین گردید. شناسایی باکتری‌های خالص‌شده طبق کتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology و با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفت.

مورفولوژی کلنی بر روی محیط نوترینت آگار (Nutrient Agar)، در دمای ۳۴°c و بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده گردید. واکنش گرم، حرکت، شکل و رنگ کلنی، کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، احیای نیترات، متیل‌رد، وژرپرسکوئر و تولید اندول براساس روش‌های Smibert و Krieg انجام شد (۱۷). تولید اسید از کربوهیدرات‌ها، بررسی مصرف منابع کربنی و نیتروژنی براساس روش و محیط توصیه‌شده Ventosa و همکارانش تعیین گردید (۱۸). تحمل نمک سدیم کلراید در حضور تراکم ۳۰-۰٪ و در دمای ۳۴°c، pH=۷ و rpm=۱۴۰ در محیط نوترینت براث مورد سنجش قرار گرفت و رشد در دماهای ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰°c در محیط نوترینت براث با pH=۷ بررسی شد. محدوده pH برای رشد با تنظیم pH نهایی بین ۱۱-۵ در دمای ۳۴°c و rpm=۱۴۰ تعیین گردید و برای تنظیم pH از محیط بافر mixed استفاده شد (۱۹).

جهت شناسایی مولکولی سویه مورد نظر، بعد از کشت ۲۴ ساعته در محیط لوریا برتانی آگار (LBA)، DNA ژنومیک با استفاده از کیت DNP^{Tm} Kit (DNA Purification Kit) محصول شرکت سیناژن برطبق پروتکل شرکت، استخراج شد، و به‌منظور مشاهده DNA ژنومیک، الکتروفورز صورت گرفت. سپس ژن 16SrDNA سویه *QWCP1*، با کمک پرایمرهای یونیورسال باکتریایی (5'AGAGTTTGATYMTGGCTCAG- 3') 8 Forwar و (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 1541 Rev، تکثیر شد. در مرحله بعد، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مدنظر با اندازه‌ای حدود ۱/۵Kb، ۵µl از محصول PCR الکتروفورز گردید و پس از استخراج باند هدف از ژل، با استفاده از کیت Gel Extraction Kit شرکت Core-One TM (Cat.No.GE-100) با ارسال به آزمایشگاه seq lab آلمان، تعیین توالی شد. برای سنجش مقاومت سویه‌های باکتریایی جداشده از پساب‌های صنعتی، الگوی مقاومت براساس MIC در غلظت‌های ۷۷۰mM-۵ کرومات پتاسیم با روش رقت در آگار (Agar Dilution Method) در دمای ۳۴°c و به مدت ۱۰ روز در محیط لوریا برتانی آگار گرماگذاری شدند. (پایین‌ترین تراکم از اکسی‌آنیون که کاملاً مانع رشد باکتری می‌گردد MIC نامیده می‌شود) (۱۹). برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل: پنی‌سیلین G (P_{10})، آمپی‌سیلین (Am_{10})، سیپروفلوکسازین (CP_5)، اریترومایسین (E_{15})، کلرامفنیکل (C_{30})،

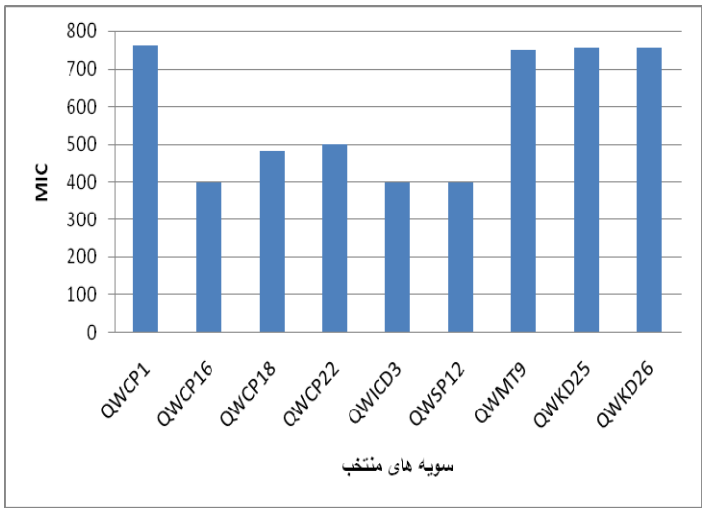
تتراسیکلین (TE_{30})، نئومایسین (N_{30})، جنتامایسین (GM_{10})، نورفلوکسازین (NOR_{10})، ریفامپیسین (RA_5)، استرپتومایسین (S_{10})، سفیکسیم (CFM_5)، کانامایسین (K_{30})، تهیه‌شده از شرکت پادتن طب (Biomerieux (PT و Himedia، جهت آنتی‌بیوگرام استفاده شد. برای آنتی‌بیوگرام در محیط (Trypticase Soy Broth) TSB از کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر سوسپانسیون ۰/۵مک فارلند تهیه گردید و توسط سواب استریل از هر نمونه برداشته و در محیط MHA (Muller Hinton Agar) به‌طور انبوه کشت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فواصل مشخص؛ یعنی ۲/۵cm از مرکز دیسک کناری و ۱/۵cm از لبه پلیت قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به‌صورت وارونه در دمای ۳۴ °c و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند (۲۰).

برای تعیین حساسیت جنس استافیلوکوک مورد نظر، از تست آنتی‌بیوگرام استفاده گردید. در نهایت، قطر هاله عدم رشد با خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد و با عناوین مقاوم، حساس و حدواسط گزارش گردید.

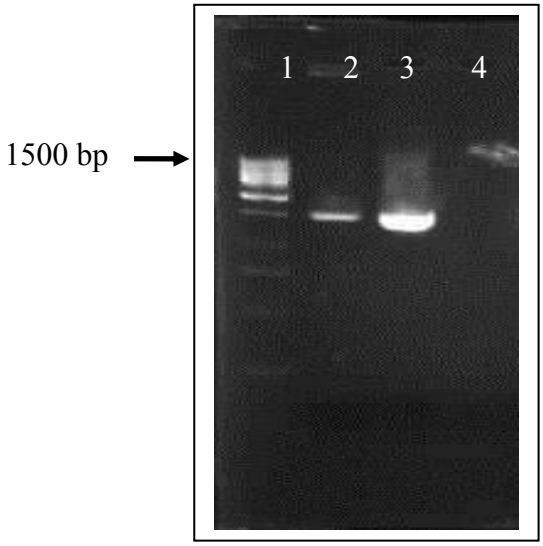
یافته‌ها

از ۲۴۱ باکتری جداشده از پساب صنایع گالوانیزه، آبکاری، نساجی و رنگرزی، نزدیک به ۳۴/۳٪ از باکتری‌های مقاوم در محدوده ۵-۵۰mM، ۲۳/۲٪ در محدوده ۵۱-۱۰۰mM، ۳۳/۱٪ در محدوده ۱۰۱-۲۵۰mM، ۷/۰۵٪ در محدوده ۲۵۱-۴۰۰mM، ۰/۸۲٪ در محدوده ۴۰۱-۶۰۰mM و ۲/۰۷٪ در محدوده ۶۰۱-۸۰۰mM کرومات پتاسیم قرار داشتند.

از مجموع باکتری‌های جداشده، تعداد ۹ سویه بالاترین مقاومت را نشان دادند که میزان مقاومت آنها در نمودار ارائه شده است. طبق نمودار در بین آنها جدایه $QWCP_1$ به دست آمده از پساب آبکاری کروم، بیشترین مقاومت را داشته و تا سقف ۷۶۰mM کرومات پتاسیم را تحمل کرده است که براساس مطالعات 16SrRNA انجام‌شده، *R1-7A Staphylococcus arlettae strain* نام گرفته است. در شکل شماره ۱ نتایج ظهور باند الکتروفورز در منطقه ۱/۵kb، تأییدکننده خلوص محصولات PCR نمونه ژنوم مورد نظر برای تعیین توالی است. در ادامه، نمونه تعیین توالی‌شده توسط سرویس BLAST آنالیز گردید و با کمک سایت اینترنتی NCBI، باکتری تعیین هویت شد که نقشه فیلوژنتیک آن در شکل شماره ۲ قابل مشاهده است. سویه‌های $QWCP_{16}$، $QWCP_{18}$، $QWCP_{22}$ که از آبکاری کروم جدا شده بودند به ترتیب تا سقف ۴۰۰، ۴۸۳ و ۵۰۰mM، سویه $QWICD_3$ جداشده از پساب رنگرزی پارچه ایران مرینوس تا سقف ۴۰۰mM، سویه $QWSP_{12}$ جداشده از پساب آبکاری فولاد تا سقف ۴۰۰mM، سویه $QWMT_9$ جداشده از پساب نساجی مهرگان تا سقف ۷۵۰mM و سویه‌های $QWKD_{25}$ و $QWKD_{26}$ جداشده از پساب رنگرزی خوشرنگ هر دو تا سقف ۷۵۵mM کرومات پتاسیم را تحمل کردند.

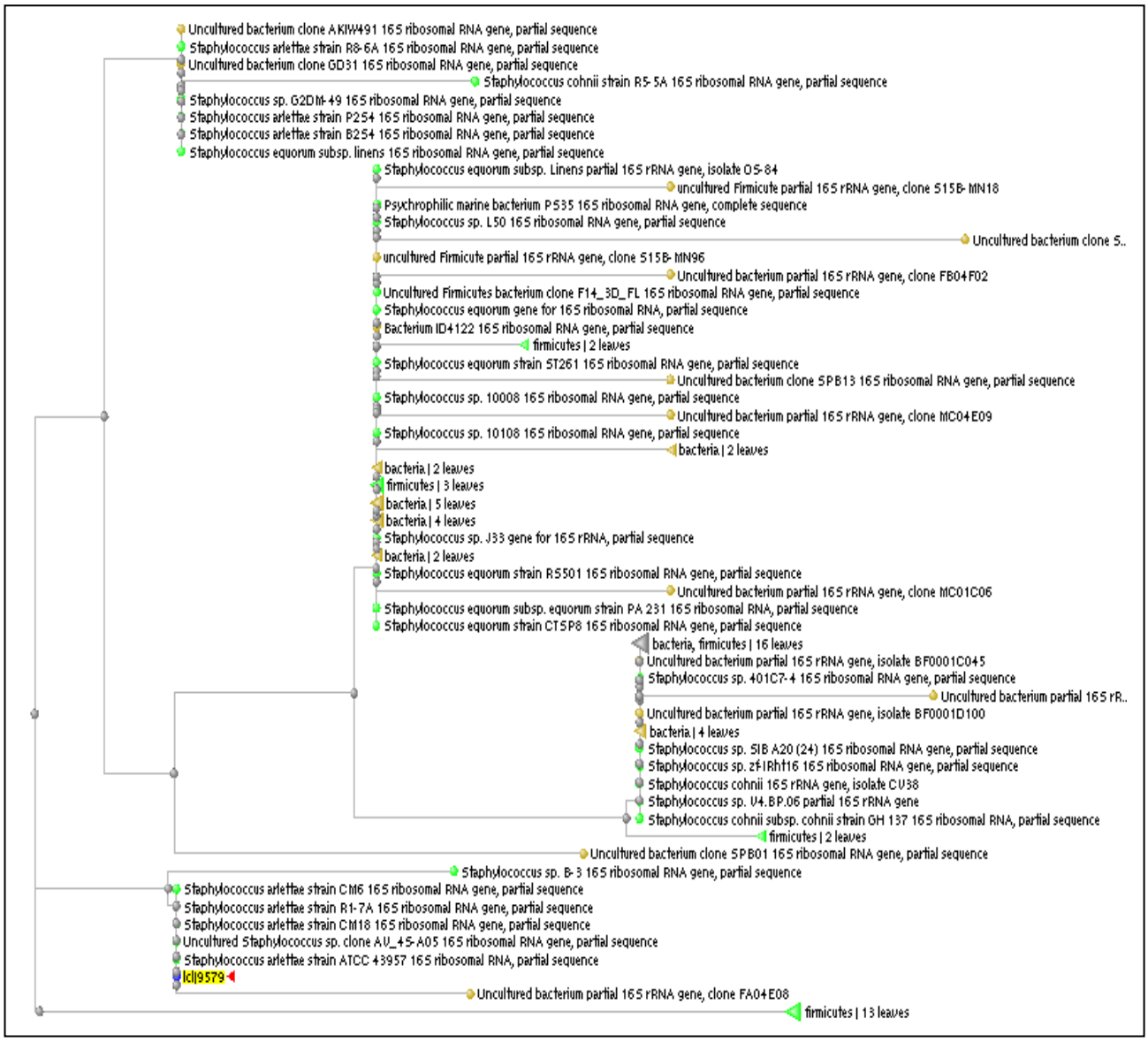


نمودار: مقاومت سویه‌های برتر به کرومات پتاسیم در محیط پایه لوریا برتانی آگار (LBA)



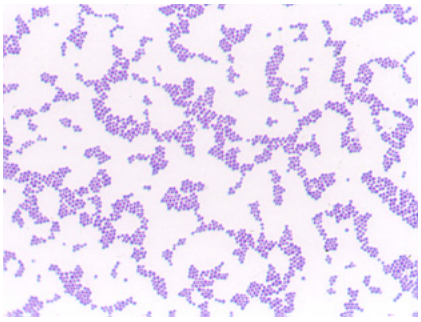
شکل شماره ۱: ظهور باند منفرد در منطقه bp۱۵۰۰

1-Ladder 1 Kb (fermentas)
2-Sample $QWCP_1$ with 8Forward and 1541 Rev Primers
3-Sample $QWCP_1$ with 8Forward and 1492 Rev Primers
4-Negative Control

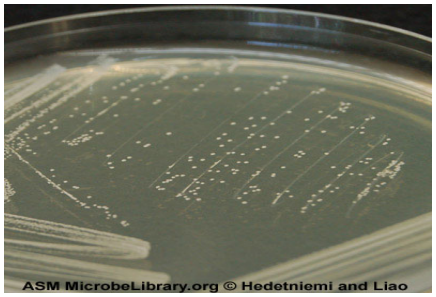


شکل شماره ۲: درخت فیلوژنتیک سویه $QWCP_1$

شکل شماره ۳ و ۴، تصویر ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک سویه $QWCP_1$ را نشان می‌دهد. همچنین این سویه به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، سیپروفلوکسازین، اریترومایسین، سفیکسیم و تتراسیکلین مقاومت نشان داد که این موضوع می‌تواند بیانگر مقاومت همراه در این باکتری باشد؛ به‌نحوی که ژن‌های مقاومت به فلز و آنتی‌بیوتیک احتمالاً بر روی یک کروموزوم یا پلاسمید واقع شده‌اند. از این‌رو استفاده از *R1-7A* می‌تواند به‌عنوان یک سویه برتر در پیشگیری از بسیاری سرطان‌ها مفید باشد. در ادامه، صفات فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک بررسی گردید که نتایج آن در جدول ارائه شده است. نتایج نشانگر توانایی احیای نیترات و تولید آنزیم‌های DNase، فنیل‌آلانین دی آمیناز و لیزین دکربوکسیلاز، و مصرف رِنج وسیعی از اسیدهای آمینه و قندها توسط این سویه است. در بررسی شرایط بهینه رشد، دمای ۳۵–۴۰ °c، pH=۶/۵–۷/۵ و نمک سدیم کلراید ۱٪ برای رشد بهینه سویه مورد نیاز بود.



شکل شماره ٤: رنگ‌آمیزی گرم از سویه $QWCP_1$



شکل شماره ۳: نمونه ماکروسکوپیک از سویه $QWCP_1$

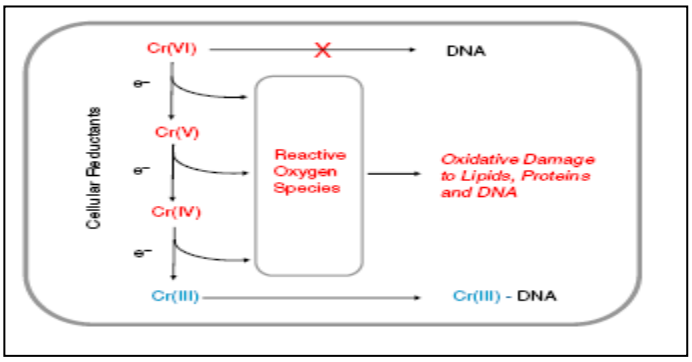
جدول: ویژگی‌های بیولوژیک، فیزیولوژیک و مورفولوژیک سویه $QWCP_1$

تست		تست		تست		تست	
احیای نیترات	+	اینولین	-	گالاکتوز	+	بهینه	۳۵-۴۰
تولید گوگرد	-	مالتوز	+	گزیلوز	+	**نمک سدیم کلرید برای رشد (٪)**	
متیل رد	-	آرابینوز	+	آرابینوز	+	محدوده	۰-٪۳۰
وژرپرسکوئر	-	اینوزیتول	-	رافینوز	-	بهینه	٪۱
سیترات	-	تره هالوز	+	تره هالوز	-	**اسیدیته برای رشد**	
حرکت	-	ریبوز	-	لاکتوز	+	محدوده	۵-۱۱
اندول	-	ساکاروز	+	**مصرف اسیدآمینه**		بهینه	۶/۵-۷/۵
هیدرولیز		گلوکز	+	تریپتوفان	+	**ویژگی‌های فنوتیپیک**	
کازئین	-	رافینوز	+	آسپاراژین	+	شکل سلول	کوکسی
اسکولین	-	لاکتوز	+	لوسین	+	واکنش گرم	+
ژلاتین	-	گالاکتوز	+	گلیسین	+	قطر <۵mm	–
نشاسته	-	رامنوز	-	گلوتامیک اسید	-	تست KOH	–
فعالیت آنزیماتیک		**مصرف کربوهیدرات**		فنیل آلانین	+	فرم	حلقوی
DNase	+	گلوکز	+	لیزین	+	حاشیه	کامل
فنیل آلانین د آمیناز	+	ساکاروز	+	متیونین	+	برآمدگی	محدب
لیزین د کربوکسیلاز	+	ریبوز	+	آرژینین	+	قوام	کره‌ای
اوره‌آز	-	اینوزیتول	-	والین	+	کدورت	شفاف
لسیتیناز	-	اینولین	+	آلانین	+	پیگمان	سفید
تولید اسید از قند		مانیتول	+	هیستیدین	+	کاتالاز	+
گزیلوز	-	سوربیتول	-	تیروزین	-	اکسیداز	–
مانیتول	+	مالتوز	+	**دمای رشد(درجه سانتی‌گراد)**		آرایش	خوشه‌ای
سوربیتول	+	رامنوز	+	محدوده	۱۰-۵۰		

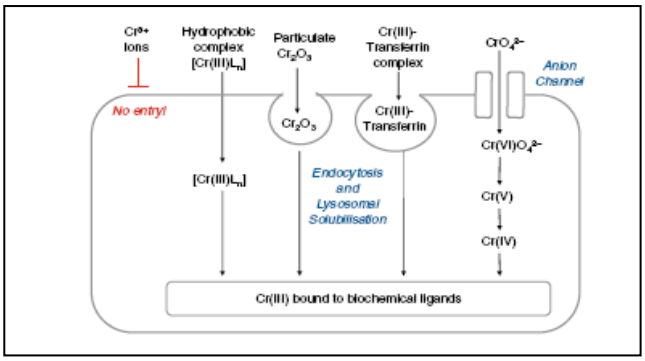
بحث

طی پروسه‌های صنعتی و دریایی، پساب‌های آلوده به محیط زیست سرازیر می‌شود که موجبات آلودگی زیست‌محیطی را فراهم می‌سازد و انباشت این عناصر در خاک و نفوذ آنها به آبهای زیرزمینی می‌تواند مقدمه شروع جریانی مرگبار به سمت انسانها باشد. از طرفی، با کاربرد این عنصر در صنایع مختلف ذکرشده، ایجاد پساب‌های سمی اجتناب‌ناپذیر است. لذا لزوم حذف این سموم بالقوه از محیط زیست نمایان می‌شود (۲). روش‌های متعارف برای حذف اکسی‌آنیون‌های سمی کرومات از محیط شامل: احیای شیمیایی، تعویض یونی، جذب با ذغال فعال، زاج، خاکستر و کائولینیت فعال، متیلاسیون و اسمز معکوس می‌باشد، که اغلب این روش‌ها نیازمند انرژی بالا، مواد و تجهیزات گران‌قیمت هستند، لذا بسیار هزینه‌بر بوده و تولید لجن‌های سمی می‌کنند که در نتیجه نیازمند روش‌های مؤثرتر و تکنیک‌های کارآمدتر به جهت حذف Cr(VI) از پساب‌های صنعتی است. از این‌رو پژوهشگران رو به‌سوی فرآیندهای پاکسازی زیستی یا

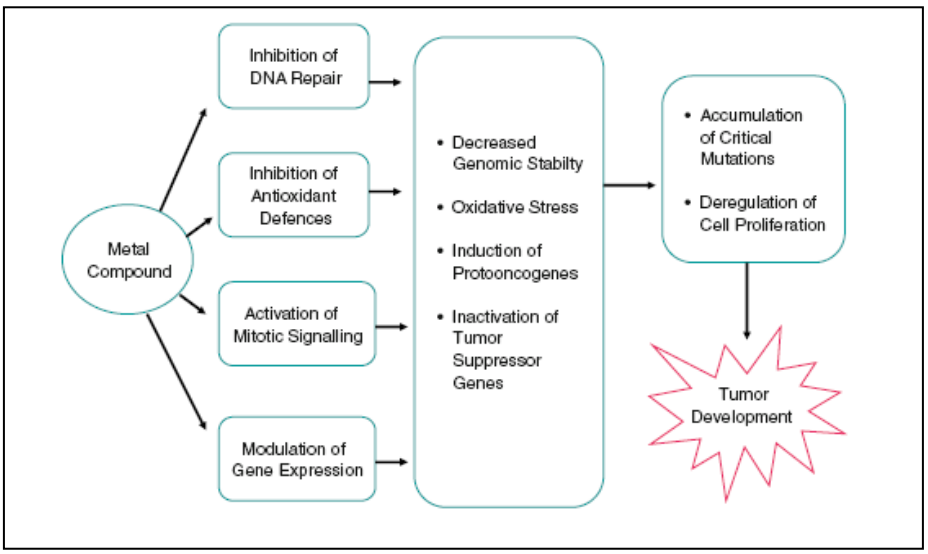
Bioremediation آورده‌انـد و امیدوارنـد بتـوان بـا جداسـازی و شناسایی این باکتری‌های مقاوم و استفاده از آنها به‌صورت بیـوفیلم در مسیرهای فاضلاب، میزان سمی‌بودن پسـاب‌هـای صـنعتی را بـه میزان بسیار زیاد و با صرف هزینه‌های پایین، کـاهش داد (۲۱). در مطالعه حاضر برای اولین بار مقاومت بسیار بـالای ۷۶۰mM نسـبت به کرومات در سویه $QWCP_1$ جداشده از پسـاب آبکـاری کـروم گزارش شده است که بنابر تست‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیک و 16SrRNA، جـنس *Staphylococcus* گونـه *arlettae* سـویه *R1-7A* شناسایی شـد. ایـن بـاکتری قـادر بـه احیـای Cr(VI) و در نهایت، کاهش اثرات سرطان‌زایی آن است که در شکل‌هـای ۵، ۶ و ۷ مسیر ورود کروم به سلول، واکنش‌های آن با اجـزای سـلولی، تخریب DNA و بروز سرطان آورده شده است.



شکل شماره ۵: متابولیسم داخل سلولی کروم، ایجاد استرس اکسیداتیو و اثر بر DNA



شکل شماره ٦: برداشت سلولی و احیای ترکیبات کروم



شکل شماره ۷: مسیر بروز سرطان توسط فلزات سمی

Ug و همکارانش در سال ۲۰۰۳ موفق شدند گونه‌های مختلفی از استافیلوکوکوس مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک و فلز مقاوم را جداسازی کنند، که کروم، سرب و پنی‌سیلین G از مهم‌ترین آنها بود (۲۲). در همین سال Loo و همکارانش نیز موفق به شناسایی چندین باکتری بیمارستانی شامل: *Pseudomonas aeroginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، *Staphylococcus epidermidis* شدند که با تشکیل بیوفیلم نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک و فلز سنگین مقاومت نشان دادند (۲۳). همچنین Shakoori و همکارانش در سال ۲۰۰۰، یک باسیل گرم مثبت را از پساب دباغی جدا کردند که در ۲۵۰۰mg/l کرومات پتاسیم مقاومت نشان می‌داد و می‌توانست در محیط حاوی دی‌کرومات پتاسیم نیز تا سقف ۸۰mg/l رشد کند (۲۴). در سال ۲۰۰۳ ایزوله‌های مقاوم به کرومات مربوط به جنس باسیلوس از خاک‌های آلوده جدا شد که مقاوم‌ترین آنها *Bacillus sp.Es29* با توان تحمل ۱۵۰۰mg/l اکسی‌آنیون سمی کرومات بود که این میزان خیلی کمتر از میزان گزارش‌شده در این بررسی است (۲۵).

مقاومت ۷۶۰mM به کرومات تقریباً ۳۵ برابر MIC گزارش‌شده توسط Viti و همکارانش می‌باشد که مقاومت ۲۲mM درمورد *Corynebacterium hoagie* را گزارش کردند (۲۳)، و ۱/۲۶ برابر MIC گزارش‌شده توسط آموزگار (۶۰۰mM) در مورد کوکوس گرم مثبت MF2 بوده است (۲۶). بنابراین می‌توان ادعا نمود MIC ۷۶۰mM به کرومات، از بالاترین MICهایی است که تا به حال گزارش شده است. به‌همین جهت در مطالعه حاضر نظر به ظرفیت بسیار بالایی که سویه $QWCP_1$ در مقاومت و احیای کرومات نشان داد به‌عنوان سویه برتر انتخاب شد و به‌منظور تعیین هویت دقیق روش تعیین توالی 16SrRNA در مورد آن اجرا گردید.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از پاکسازی به روش زیستی نسبت به سایر روش‌های فیزیکوشیمیایی بسیار کارآمد و کم‌هزینه‌تر است و سویه $QWCP_1$ که با مطالعات مولکولی به جنس *Staphylococcus*، گونه *arlettae* و سویه *R1-7A* تعلق دارد، نظر به توانایی بالایی که در مقاومت و احیای Cr(VI) و لذا کاهش سمیت و سرطان‌زایی آن گزارش شده است، می‌تواند در بُعد صنعتی و پزشکی به جهت حذف اثرات بیماریزایی این فلز مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی، مقاومت توأم و بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها و کروم در این باکتری از لحاظ پزشکی بسیار مهم بوده و می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با مکانیسم مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژنتیک پلاسمید، اکولوژی و فیزیولوژی سویه مدنظر و حتی سایر میکروارگانیسم‌های مقاوم در محیط‌های آلوده، در اختیار ما قرار دهد.

References:

1. Bitton G, Wiley J. Waste Water Microbiology, 2nd ed. Sons INC Publication; 2005. p. 387-413.

2. Adeniji A. Bioremediation of Arsenic, Chromium, Lead, and Mercury. U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office Washington, DC. 2004; ECB/32/02 Add;14. Available From: http://www.clu-in.org. Accessed April, 2004.

3. Kamaludeen SP, Arunkumar KR, Avudainayagam S, Ramasamy K. Bioremediation of Chromium Contaminated Environments. Indian J Exp Biol 2003;41(9):972.

4. Cole P, Brad R. Epidemiological Studies of Chrome and Cancer Mortality: A Series of Meta-Analyses. Regul Toxicolo Pharmacol 2005;43(3):225-231.

5. Ameri A, Gholami M, Vaezi F, Rahimi M, Mahmodi M, Moosavi B. Application and Optimization in Chromium-Contaminated Wastewater Treatment of the Reverse Osmosis Technology. Iranian J Publ Health 2008;37(3):77-84.

6. Shrivastava R, Upreti RK, Seth PK, Chaturvedi UC. Effects of Chromium on the Immune System. FEMS Immunol Med Microbiol 2002;34(1):1-7.

7. Ding M, Shi X. Molecular Mechanisms of Cr(VI)-Induced Carcinogenesis. Mol Cell Biochem 2002;234-235(1-2):293-300.

8. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of Antibiotic and Metal Resistance. Trends Microbiol 2006;14(4):176-82.

9. Morales LM, Cristiani U. Hexavalent Chromium Removal by a Trichoderma Inhamatum Fungal Strain Isolated from Tannery Effluent. Water Air Soil Pollut 2008;187(1-4):327-336.

10. Krishna KR, Ligy P. Bioremediation of Cr(VI) in Contaminated Soils. J Hazardous Materials 2005;121(1-3):109-117.

11. Assfalg M, Bertini I, Bruschi M, Caroline Michel, Turano P. The Metal Reductase Activity of some Multiheme Cytochromes C: NMR Structural Characterization of the Reduction of Chromium (VI) to Chromium (III) by Cytochrome C7. PNAS 2002 May 14;99(15):9750-9754.

12. Faryal R, Yusuf M, Munir K, Faheem T, Abdul hameed. Enhancement of Cr^{6+} Removal by Aspergillus Niger RH19 Using a Biofermenter. Pak J Bot 2007;39(5):1873-1881.

13. Camargo F, Bento FM, Okeke BC, Frankenberger WT. Chromate Reduction by Chromium-Resistant Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Dichromate. J Environ Qual 2003;32(4):1228-1233.

14. Zakaria ZA, Surif S, Wanazlina A. Bioremediation of Cr(VI)-containing Electroplating Wastewater Using Acinetobacter sp. International Conference on Environment 13-15 Nov, Penang, Malaysia 2006;1(3):13-15.

15. Faryal R, Yusuf M, Kiran M, Tahir Fand A. Enhancement of Cr6+Removal by Aspergillus Niger RH19 Using a Biofermenter. Pak J Bot 2007;39(5):1873-1881.

16. Thacker U, Parikh R, Shouche Y, Madamwar D. Hexavalent Chromium Reduction by Providensia sp. Process Biochem 2006;41(6):1332-1337.

17. Gerhardt P, Murray RGE, Wood W, Krieg NR. Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994. p. 607-654.

18. Ventosa A, Quesada E, Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. J Gen Microbiol 1982;128:1959-1968.

19. Zolfaghary M, Malekzadeh F, Amoozegar M, Razavii M. Isolation of Chromium and Telurite Double Resistance Bacteria from Industrial Wastewater with Effect on Bioremediation. Technology and Sience 2006;10:279-293.

20. Baure AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disc Method. Am J Clin Pathol 1966;45(4):403-406.

21. Parameswari E, Lakshmanan A, Thilagavathi T. Chromate Resistance and Reduction by Bacterial Isolates. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2009;3(2):1363-1368.

22. Ug A, Ceylan O. Occurrence of Resistance to Antibiotics Metals and Plasmids in Clinical Strains of Staphylococcus Spp. Arch Med Res 2003;34:130-136.

23. Loo CY, Mitrakul K, Voss IB, Hughes CV, Ganeshkumar N. Involvement of the Adc Operon and Manganese Homeostasis in Streptococcus Gordonii Biofilm Formation. J Bacteriol 2003;185(9):2887-2900.

24. Shakoori A, Maakhdoom M, Hag RU. Hexavalent Chromium Reduction by a Dichromate Resistant Gram-positive Bacterium Isolate from Effluents of Tanneries. Appl Microbiol Biotechnol 2000;53(3):348.

25. Camargo FA, Bento FM, Okeke BC, Frankenberger WT. Chromate Reduction by Rhromium-Resistant Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Dichromate. J Environ Qual 2003;32(4):1228-1233.

26. Amoozegar MA, Hamedi J, Dadashipour M, Shariatpanahi S. Effect of Salinity on the Tolerance to Toxic Matals and Oxyanions in Native Moderately Halophilic Spor-forming Bacilli. World J Microbial Biotechnol 2005;21:1237-1243.