فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۴- شماره ۴ -زمستان ۱۳۹۸

مقاله تحقیقی

شناسایی سویه‌های باکتریایی مقاوم به کروم از فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه با استفاده از توالی یابی واکنش زنجیره‌ی پلیمراز 16S rDNA و بررسی رشد باکتری‌های مقاوم در غلظت‌های مختلف کروم

سپیده خدامرادی [۱،*]، رامین عبیری [۲]

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران
۲. دانشیار میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران

مسئول مکاتبات: Sepideh.khodamoradi2020@Gmail.Com

محل انجام تحقیق: گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت:۹۹/۷/۲۲ تاریخ پذیرش:۹۹/۱۰/۵

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی شناسایی سویه‌های مقاوم باکتریایی جدا شده از فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه با استفاده از توالی‌یابی واکنش زنجیره‌ی پلیمراز 16S rDNA از جهت شناسایی بهترین سویه با بزرگترین میزان حذف کروم از طریق زیست-پالایی و بررسی رشد باکتری‌های مقاوم در غلظت‌های مختلف کروم بود. در این مطالعه ۹۴ نمونه از فاضلاب پالایشگاه جمع‌آوری شد. باکتری‌ها با استفاده از مورفولوژی، رنگ آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های میکروبیولوژی استاندارد تشخیص داده شدند، جداسازی شدند و با کروم شش ظرفیتی در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برای ۹۶ ساعت در یک شیکر اوربیتال انکوبه شدند. بزرگترین پالایش زیستی (۰/۳۵ میلیون در قسمت) در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد و pH در محدوده‌ی ۸/۰۰-۷/۵۰ مشاهده شد. نیاز زیستی اکسیژن در محدوده‌ی ۱۲۶ تا ۵۳۰ بود. بیشترین ایزوله‌ها دارای نیاز شیمیایی اکسیژن در محدوده‌ی ۷/۲۰ تا ۷/۹۰ بودند. بیشتر ایزوله‌ها (۵۳/۳۰٪) دارای نیاز اکسیژنی بین ۷/۸۰ تا ۷/۹۰ بودند. بر اساس نتایج این مطالعه، سویه‌های *Bacillus aerius*، *Klebsiella variicola*، *Lysinibacillus fusiformis* و *Bacillus stratosphericus* گونه‌های مقاومی بودند. رشد باکتری‌های به‌ترتیب در تیمارهای کنترل، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بزرگتر بود. تمام باکتری‌ها از ۷۲ ساعت به بعد روال ثابتی از رشد را نشان دادند. با در نظر گرفتن مقاومت زیاد سویه‌های *Klebsiella variicola*، *Bacillus aerius*، *Bacillus stratosphericus* و *Lysinibacillus fusiformis* این سویه‌ها می‌توانند برای زیست پالایی کروم و کاهش آلودگی‌ها در محیط‌های آلوده به کروم، خصوصا پالایشگاه‌های نفت استفاده شوند.

واژه های کلیدی: کروم، زیست پالایی، پالایشگاه نفت، کرمانشاه، نیاز زیستی اکسیژن

مقدمه

فاضلاب‌های صنعتی بخش قابل توجهی از منابع آبی را آلوده می‌کنند و همواره حذف مواد شیمیایی سمی از ساختار آن‌ها مورد توصیه بوده است (۱). تصفیه خانه‌ها همواره منبع عظیمی از آلودگی‌ها بوده‌اند و حاوی مقادیر عظیمی از مواد شیمیایی و فلزات سنگین همانند عنصر کروم می‌باشند (۲). کروم یکی از مهم‌ترین و بزرگترین منابع

معدنی در سطح جهان می‌باشد و در صنایع مختلف همانند رنگ آمیزی بافت، محافظت از چوب، تولید کاغذ و تفاله و .... مورد استفاده می‌باشد (۳). با این‌حال، کروم یکی از بزرگترین منابع آلوده کننده برای آب‌ها در کشورهای در حال توسعه به‌علت تخلیه‌ی کنترل نشده و تیمار نشده می-باشد (۴،۵). بر طبق برآوردها، سالیانه بیش از ۱۷۰ تن ضایعات کروم بداخل محیط تخلیه می‌شود و باعث مشکلات جدی برای سلامتی می‌گردد (۳). در محیط‌های آبی، همانند فاضلاب پالایشگاه‌های نفت، کروم در هردو شکل سه ظرفیتی و ۶ ظرفیتی (کرومات) یافت می‌شود (۶). کروم سه ظرفیتی از سمیت کمتری برخودار می‌باشد، در حالی‌که کروم شش ظرفیتی از سمیت بیشتری برخوردار می‌باشد، زیرا دارای قابلیت اکسید کنندگی قوی می‌باشد و می‌تواند از غشای سلولی عبور نماید (۷). کرومات یا کروم شش ظرفیتی به‌شکل فعالی از غشای سلولی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها عبور می‌کند (۸). کروم شش ظرفیتی باعث ایجاد آسم، سرطان، واکنش‌های آلرژیک، اختلالات قلبی-عروقی و عصبی و حتی نقص عضو می‌شود (۹). مطالعات گزارش کرده‌اند که مسیرهایی که به گرفتن سولفات در باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیای کولای*، *سودوموناس فلورسنس* و *آلکالیژنس یوتوروفوس* نقش دارند، در انتقال کرومات به‌داخل غشای زیستی این باکتری‌ها نیز مداخله می‌نماید (۸). این بعلت این حقیقت است که کروم عمدتا در شکل اکسیانیون (CrO_2^{2-}) یافت می‌شود و نمی-تواند توسط اجزای آنیونی غشاء محبوس شود (۷). بر اساس نظرات آژانس‌های محافظت محیطی مختلف در سطح جهان، حذف کروم از خروجی‌های مختلف کارخانه قبل از رسیدن به آب‌های صنعتی یک پیش نیاز می‌باشد که باید انجام شود (۷). در کشورهای توسعه یافته، فرآیندهای فیزیک و شیمیایی مختلف همانند فیلتراسیون، بکارگیری مواد الکتروشیمیایی معاوضه یون، تبخیر، رسوب شیمیایی، اکسیداسیون، کاهش و اسمز معکوس برای حذف فلزات سمی از محیط استفاده می‌شوند (۱۰). این روش‌ها نه تنها گران هستند ولی همچنین باعث رهاسازی دیگر ضایعات مضر به محیط می‌شوند که منجر به آلودگی محیط می‌شود (۱۱). با این‌حال، زیست پالایی به‌عنوان یک تکنیک پالایش توجه زیادی را به‌خود جلب نموده است، که این به‌علت ارزان قیمت بودن و ماهیت طبیعت دوست آن می‌باشد و همچنین به‌علت کاهش هزینه برای حذف آلودگی‌های ثانویه می‌باشد (۱۲).

زیست پالایی فاضلاب با استفاده از باکتری‌های مقاوم به فلزات به‌عنوان یک روش کم هزینه و طبیعت دوست شناخته شده است، که به‌علت تماس مداوم باکتری‌ها با فاضلاب‌های حاوی فلزات سمی از گذشته می‌باشد و بنابراین این باکتری‌ها با این شرایط سازش پیدا کرده‌اند. همچنین، این محیط‌ها باعث می‌شوند باکتری‌هایی ایجاد شوند که به افزایش غلظت عناصر سمی مقاوم باشند. این باکتری‌ها می-توانند برای زیست پالایی فاضلاب‌های آلوده استفاده شوند. ایران جزء کشورهای در حال توسعه می‌باشد و معمولا فاضلاب‌های صنعتی وارد محیط می‌شوند و حتی ممکن است وارد آب‌های سطحی شوند. با توجه به شرایط اقتصادی کشور و عدم استفاده از روش‌های هزینه بر، نیاز است که از روش‌های ارزان قیمت برای پالایش فاضلاب‌های صنعتی خصوصا فاضلاب پالایشگاه‌های نفت استفاده شود. با توجه به اینکه برخی از باکتری‌ها فرآیند زیست پالایی را به-آسانی انجام می‌دهند، نیاز است که این باکتری‌ها شناسایی شوند تا بتوان شرایطی را برای رشد و تکثیر بیشتر آن‌ها فراهم آورد که بتوانند عناصر معدنی سمی خصوصا کروم را از محیط فاضلاب پاکسازی نمایند، بنابراین ضروری بود که تحقیقی در این زمینه انجام شود تا به بررسی این امر بپردازد. هدف از این مطالعه بررسی شناسایی سویه‌های مقاوم باکتریایی جدا شده از فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه با استفاده از توالی یابی واکنش زنجیره‌ی پلیمراز 16S rDNA و بررسی رشد باکتری‌های مقاوم در غلظت-های مختلف کروم بود.

مواد و روش ها

مکان انجام تحقیق

مطالعه‌ی حاضر در پالایشگاه نفت کرمانشاه انجام شد که سال تأسیس آن ۱۳۴۸ بود و در بخش شمالی شهر کرمانشاه قرار دارد که ظرفیت روزانه‌ی آن ۴۲۰۰ بشکه می-

باشد. نفت خام این پالایشگاه از نفت شهر و افرینه تأمین و تولید روزانه آن در حال حاضر، ۳۰۰۰ بشکه در روز می‌باشد.

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه ۹۴ نمونه از فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه (۱۰۰ میلی‌لیتر) در ظرف‌های شیشه‌ای استریل جمع‌آوری شد و در کنار یخ سریعا به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها در طول مهر ماه تا دی ماه سال ۱۳۹۵ جمع-آوری شدند. نمونه‌ها از خروجی‌های نقاط مختلف پالایشگاه جمع‌آوری شدند. در این مطالعه، هنگام نمونه برداری، دما، pH، تاریخ و مکان نمونه برداری ثبت شدند.

کشت باکتری‌ها

تمام کلنی‌های با استفاده از کشت‌های متوالی توسط روش کشت خطی بررسی شدند (محیط کشت PYG). کشت‌های اولیه برای رنگ آمیزی گرم استفاده شدند (۱۳). متغیرهایی همانند تحمل نمک در حضور دانسیته‌ی ۰ تا ۶ درصد، رشد در ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد و در pH معادل ۵ تا ۱۱ بررسی شدند. آزمایش‌های تحمل نمک و رشد در محیط براث (مرک-آلمان) بررسی شدند (۱۴). محتویات کروم و همچنین نیاز شیمیایی اکسیژن و نیاز زیستی اکسیژن برای هر نمونه بررسی شدند. برای بررسی محتوای کروم، نمونه‌ها در اسید نیتریک هضم شدند و با استفاده از روش کالریمتری و اسپکتروفوتومتری جذب اتمی (Jenway, USA)، محتویات کروم در نمونه‌های فاضلاب بررسی شد.

باکتری‌های مقاوم به کروم جدا شدند. نیاز شیمیایی اکسیژن و نیاز زیستی اکسیژن با استفاده از روش استاندارد بررسی شدند (۱۵). میزان اکسیژن مصرف شده توسط دستگاه طیف سنج نوری (اسپکتروفتومتر) و از طریق تهیه منحنی کالیبراسیون محلول های استاندارد در طول موج ۶۰۰ نانومترتعیین شد. محلول هاضم را در لوله ریخته شد و با دقت به اسید سولفوریک اضافه گردید، سپس نمونه را به آن افزوده شد، به‌طوری که لایه اسید زیر محلول هاضم و نمونه تشکیل شد. در پوش لوله‌ها را بسته و با چند بار وارونه کردن آن‌ها به خوبی محتویات مخلوط گردید. لوله ها در محفظه هضم و یا کوره ای که از پیش تا ۱۵۰ درجه سانتیگراد گرم شد، به مدت ۲ ساعت قرار داده شد تا فرایند هضم انجام گیرد. پس از خارج کردن لوله ها از کوره مخلوط تا دمای اتاق سرد گردید.سپس در محفظه دستگاه طیف سنج و مقابل مسیر نور قرار داده شده و میزان جذب در در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. به کمک منحنی کالیبراسیون، میزان COD نمونه ها قابل محاسبه بود. برای بررسی نیاز زیستی اکسیژن، نمونه‌ها مورد آزمایش را در بطری با در سمباده ای به حجم۲۵۰ یا ۳۰۰ میلی لیتری ریخته شد و طوری عمل شد که هنگام پر شدن بطری، اکسیژن هوا درون آب حل نشود. پس از پر نمودن مقدار ۲ میلی لیتر از سولفات منگنز ساخته شده و ۲ میلی لیتر از دور قلیایی را به وسیله پیپت در زیر سطح آب مورد آزمایش تخلیه شد و سپس در سمباده ای شیشه را گذاشته، طوری که حباب وارد هوا نشود. سپس شیشه چندین بار وارونه شدو به هم زده شد تا رسوب هیدروکسید منگنز ظاهر شود و اجازه داده شد تا رسوب ته نشین شود. سپس مقدار ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ از طریق تماس با جدار ظرف نمونه وارد شد. پس از به هم زدن کلیه رسوبات حل شد. مقدار ۱ الی ۲ میلی لیتر از محلول نشاسته را به نمونه اضافه شد و با تیو سولفات سدیم ۰/۰۲۵ نرمال تا ظهور رنگ آبی تیتر شد. مقدار تیو سولفات مصرف شده یادداشت شد و مقدار اکسیژن محلول در نمونه بر حسب میلی گرم در لیتر از روابط زیر بدست آمد:

$$DO\left(\frac{mlgr}{lit}\right)=\frac{N_1*V_1*8000}{V_2}$$

برای استفاده از رابطه بالا بایستی میزان نرمالیته ماده تیتر شونده و میزان حجمی از آن که استفاده شده مورد نیاز است. در نهایت میزان اکسیژن محلول در ابتدای کار و میزان اکسیژن بعد از پنج روز را در رابطه بالا قرار داده و BOD محاسبه شد.

$$BOD = \frac{DO - DO_5}{\frac{V_S}{V_R}}$$

حداقل غلظت مهارکنندگی تمام ایزوله‌های مقاوم کروم توسط روش ترقیق کردن در براث و با استفاده از محیط کشت PYG با استفاده از غلظت‌های ۲۰۰ تا ۸۰۰ میلی-گرم/لیتر از کروم بررسی شدند (۱۶). پایین‌ترین غلظتی که مانع رشد باکتری‌ها شد را به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد.

واکنش زنجیره‌ی پلیمراز

توالی یابی 16S rDNA برای شناسایی بهترین سویه با بزرگترین میزان حذف کروم از طریق زیست پالایی استفاده شد. برای این منظور، DNA ژنومی توسط جوشاندن استخراج شد. باکتری‌ها در آب مقطر حل شدند، در ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد برای ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و فورا به دمای منفی ۷۰ درجه‌ی سانتیگراد انتقال یافتند. برای حذف بقایای سلولی، نمونه‌ها در درجه حرارت اتاق ذوب شدند و سانتریفیوژ شدند. بسط ژن‌های کد کننده توسط پرایمرهای طراحی شده در یک ترموسایکلر انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای اکتنشن شامل 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' برای پرایمر فوروارد و Rev5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' برای پرایمر معکوس بودند. پرایمرها از شرکت سینا کلون تهران تهیه شدند. واکنش زنجیره‌ی پلیمراز با ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش حاوی ۱ میکرولیتر (۱۰ نانوگرم) DNA به-عنوان الگو، یک میکرولیتر از هر پرایمر (در غلظتی از ۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵۰ میکرولیتر مستر میکس با غلظت ۲ ایکس و ۹/۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. تغییرات دمایی واکنش پلیمرازاسیون توسط واکنش زنجیره‌ی پلیمراز (Bio-Rad, USA) استفاده شد و به این صورت بود: دناتوراسیون DNA در ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد برای ۵ دقیقه و جمعا ۳۰ چرخه، دناتوراسیون در ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به توالی DNA در ۵۷ درجه‌ی سانتیگراد برای ۵ دقیقه، اکستنشن برای رشته‌های DNA در ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد برای ۱ دقیقه و اکستنشن نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه. محصولات توسط اتیدیوم بروماید (سیناکلون) بررسی شدند و با استفاده از آگارز ژل یک درصد محصول شرکت سیناکلون ایران رنگ آمیزی شدند.

شناسایی باکتری‌ها

باکتری‌ها با استفاده از مورفولوژی، رنگ آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های میکروبیولوژی استاندارد تشخیص داده شدند و جداسازی شدند (۱۷).

باکتری‌های شناخته شده در این مطالعه به‌عنوان باکتری‌های مقاوم بداخل ویال‌های استریل ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۸۵ میلی‌لیتر محیط براث تلقیح شدند و با کروم شش ظرفیتی در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی-گرم/میلی‌لیتر برای ۹۶ ساعت در یک شیکر اوربیتال انکوبه شدند. تلقیح ۲٪ از حجم کل محیط را تشکیل داد. نمونه‌ها در فواصل زمانی ۱۲ ساعته بررسی شدند. تراکم سلول‌های باکتریایی (رقیق شده با ۱۰ برابر آب) توسط اندازه‌گیری تراکم بینایی در ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر بررسی شدند. محیط‌های فاقد کروم نیز به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

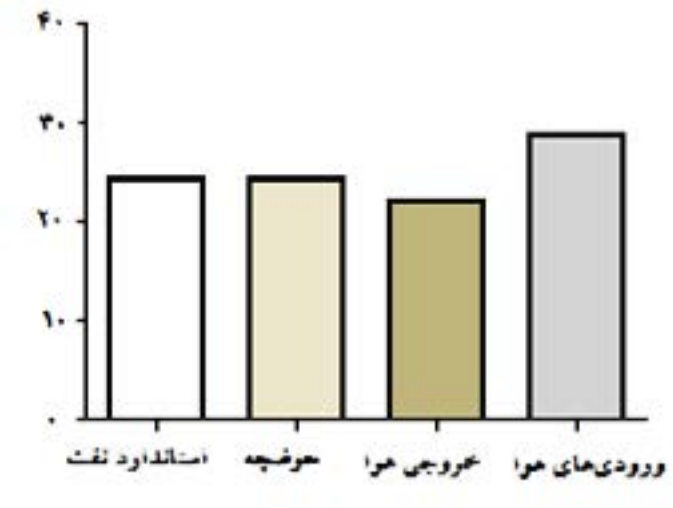
آنالیزهای آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و ارزش معنی‌داری کمتر از ۵ درصد به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. توزیع نمونه‌ها در گروه‌های مختلف توسط کای اسکوار انجام شد. آزمون کروسکال-والیس برای پالایش زیستی کروم، دما، pH، نیاز شیمیایی و زیستی اکسیژن و حداقل غلظت مهار کنندگی نمونه‌های مختلف استفاده شد. همچنین، آزمون من-ویتنی برای آنالیز اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد. با در نظر گرفتن توزیع غیر نرمال داده‌ها، همبستگی بین متغیرها توسط آزمون اسپیرمن بررسی شد.

نتایج

مکان جمع‌آوری نمونه ها

در مجموع از ۹۴ نمونه‌ی مورد بررسی، ۲۳ نمونه (۲۴/۴۰٪) از نمونه‌ها از استاندارد نفت آمریکا، ۲۳ نمونه (۲۴/۴۰٪) از حوضچه‌های ته نشینی (کلاریفار)، ۲۱ نمونه (۲۲/۳۰٪) از خروجی هوا و ۲۷ نمونه (۲۸/۷۰٪) از ورودی-های هوا جمع‌آوری شدند. لازم به ذکر است که استاندارد نفت آمریکا بخشی از پالایشگاه‌ها می‌باشد که آب از روغن و دیگر مشتقات نفتی جدا می‌شود.



شکل ۱ - محل اخذ نمونه‌ها و درصد جمع‌آوری شده.

نیاز شیمیایی اکسیژن و جذب کروم

درجه حرارت‌های گزارش شده در محدوده‌ی ۲۴ تا ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد بودند. نیاز زیستی اکسیژن در محدوده‌ی ۱۲۶ تا ۵۳۰ بود. بیشترین ایزوله‌ها دارای نیاز شیمیایی اکسیژن در محدوده‌ی ۷/۲۰ تا ۷/۹۰ بودند. بیشتر ایزوله‌ها (۵۳/۳۰٪) دارای نیاز اکسیژنی بین ۷/۸۰ تا ۷/۹۰ بودند (جداول ۱ و ۲). بر اساس نتایج به‌دست آمده در جدول ۲، بیشترین میزان کروم در ورودی هوا با ۰/۲۸۸ می‌باشد و کمترین مقدار مربوط به خروجی هوا با ۰/۱۰۳ می‌باشد. اگرچه این دو بخش تفاوت زیادی برای دما نشان نمی‌دهند، ولی تفاوت قابل توجهی برای pH (۷/۶۱ در مقابل ۸/۵۱) داشتند. نیاز شیمیایی به اکسیژن بین ورودی و خروجی هوا نیز تفاوت معنی‌داری را نشان داد (۷/۶۱ در مقابل ۸/۵۱). جذب کروم همچنین تفاوت معنی‌داری در کلاریفار (۰/۱۶۵) با ورودی هوا نشان داد (۰/۲۸۸) و اختلاف قابل توجهی را برای نیاز شیمیایی اکسیژن نشان دادند.

نتایج بخش مولکولی

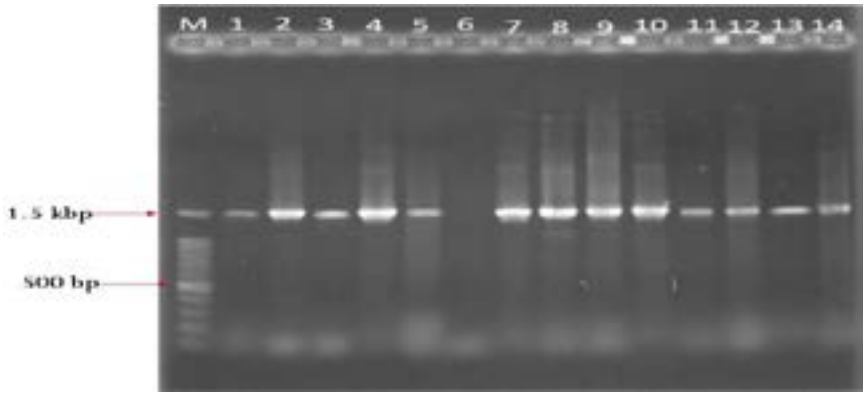
نتایج نشان داد که از ۹۴ نمونه‌ی جدا شده از فاضلاب پالایشگاه کرمانشاه، ۴۳/۶۰ درصد باکتری‌های مقاوم در طیف ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی مولار و ۵۶/۳۰ درصد در محدوده‌ی ۶۲/۵۰ تا ۲۵۰ میلی مولار پتاسیم کرومات بودند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، ۱۱/۷۰ درصد از نمونه‌ها بیشترین مقاومت را نشان دادند (جدول ۳). شکل یک باند استخراج DNA و همچنین اکستنشن ژن 16S rDNA را نشان می‌دهد. محصول مناسب PCR در ۱/۵۰ کیلو جفت باز مشخص است، که این نشان دهنده‌ی خلوص نمونه‌ی DNA مورد استفاده برای توالی یابی می‌باشد. نمونه‌های توالی یابی شده توسط نرم افزار BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) تحلیل شدند. با استفاده از وب سایت NCBI باکتری‌های *Klebsiella varicola*, *Bacillus aerius*, *Bacillus stratospheric* و *Lysinibacillus fusiformis* شناسایی شدند. جدول ۳ اطلاعات این سویه‌ها را نشان می-دهد.

جدول ۱ تعداد ایزوله‌ها در متغیرهای مختلف.

تعداد ایزوله‌ها	متغیرهای مختلف		
	نیاز شیمیایی اکسیژن	نیاز زیستی اکسیژن	کروم (میلیون در قسمت)
۴ (٪۴/۲۰)	–	۱۲۶	۰/۱۱
۵ (٪۵/۳۰)	۷/۲۰	۵۳۰	۰/۰۳
۶ (٪۶/۳۰)	–	۵۲۰	۰/۱۳
۷ (٪۷/۴۰)	۷/۶۰	۱۵۶، ۲۶۳ و ۵۲۷	۰/۱۲
۹ (٪۹/۵۰)	۷/۵۰	۱۳۴	–
۱۰ (٪۱۰/۶۰)	–	۲۷۳	۰/۳۵
۱۳ (٪۱۳/۸۰)	–	–	۰/۱۵
۱۴ (٪۱۴/۸۰)	–	۱۷۱	۰/۲۸
۱۵ (٪۱۵/۹۰)	–	–	۰/۰۷
۲۰ (٪۲۱/۲۰)	–	–	۰/۲۶
۲۱ (۲۲/۳۰)	۷/۴۰	–	–
۲۲ (٪۲۳/۴۰)	۷/۸۰	–	–
۲۵ (٪۲۶/۵۰)	–	۲۰۲	–
۳۰ (٪۳۱/۹۰)	۷/۹۰	–	–

جدول ۲ میانگین متغیرهای مختلف بین ایزوله‌ها از نقاط مختلف پالایشگاه کرمانشاه

مکان	تعداد ایزوله	جذب کروم	دما	pH	نیاز زیستی	نیاز شیمیایی	حداقل کشندگی
استاندارد نفت	۲۳ (٪۲۴/۴۰)	۰/۲۱۰	۳۵	۸/۶۴	۷/۳۸	۲/۰۹	۶۱/۹۲
کلاریفار	۲۳ (٪۲۴/۴۰)	۰/۱۶۵	۲۶	۷/۹۹	۷/۵۳	۱/۱۴	۷۹/۶۸
خروجی هوا	۲۱ (٪۲۲/۳۰)	۰/۱۰۳	۲۵	۷/۶۱	۷/۷۴	۷/۶۱	۷۹/۷۶
ورودی هوا	۲۷ (٪۲۸/۷۰)	۰/۲۸۸	۲۶	۸/۵۱	۷/۸۶	۸/۵۱	۷۲/۸۲
ارزش معنی داری	۰/۸۵۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۵۳۹



شکل ۱ یافته‌های واکنش زنجیره‌ی پلیمراز برای تشخیص مولکولی. *M*= مارکر، ۱=کنترل مثبت، ۵-۲ و ۱۴-۷= نمونه‌ها و ۶=کنترل منفی.

جدول ۳ ویژگی‌های سویه‌های بدست آمده توسط توالی یابی

سویه‌ها	نقاط	نیاز زیستی	نیاز شیمیایی	pH	دما	جذب کروم	حداقل غلظت مهار
Klebsiella variicola	خروجی هوا	۷/۹۰	۵۲۷	۷-۷/۵۰	۲۵-۲۶	۰/۰۳	۵۰۰
Klebsiella variicola	استاندارد نفت	۷/۲۰	۱۳۴	۸/۴-۸/۸	۳۵-۳۶	۰/۲۶	۱۰۰۰
Staphylococcus epidermidis	استاندارد نفت	۷/۴۰	۱۷۱	۸/۸-۹	۳۴/۴۰	۰/۱۵	۵۰۰
Pseudomonas aeruginosa	استاندارد نفت	۷/۴۰	۱۷۱	۸-۸/۵۰	۳۸	۰/۲۶	۵۰۰
Citrobacter freundii	کلاریفار	۷/۵۰	۱۳۴	۷/۵۰-۸/۰۰	۲۵-۲۶	۰/۰۷	۵۰۰
Enterobacter asburiae	کلاریفار	۷/۵۰	۱۳۴	۷/۵-۸	۲۵-۲۶	۰/۰۷	۵۰۰
Bacillus and *Bacillus aerius stratosphericus*	استاندارد نفت	۷/۹۰	۲۰۲	۸/۸۰-۸/۹۰	۳۶-۳۷	۰/۲۶	۱۰۰۰
Lysinibacillus fusiformis	ورودی هوا	۷/۹۰	۲۰۲	۷/۸۰-۸/۰۰	۲۷-۲۸	۰/۲۸	۱۰۰۰
Lysinibacillus fusiformis	استاندارد نفت	۷/۲۰	۱۳۴	۸/۴-۸/۸	۳۵-۳۶	۰/۲۶	۱۰۰۰
Klebsiella pneumoniae	کلاریفار	۷/۶۰	۱۵۶	۷/۸۰	۲۲-۲۳	۰/۱۲	۱۰۰۰

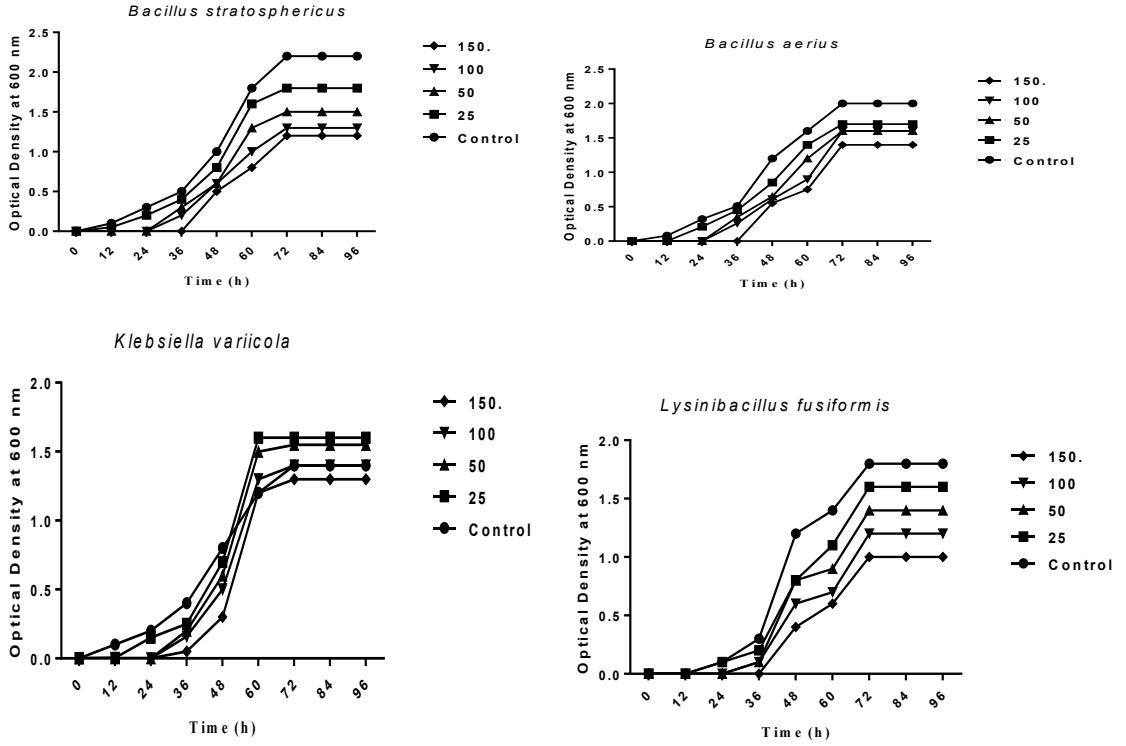
نیاز شیمیایی اکسیژن بر حسب مکان جمع‌آوری

توزیع نمونه‌ها در گروه‌های مختلف بر اساس مناطق توسط آزمون کای-اسکوار اختلاف معنی‌داری را برای توزیع در نواحی مطالعه شده بین گروه‌ها نشان نداد، که این مطلب نمونه‌گیری صحیح را نشان می‌دهد. آنالیزهای بعدی اختلافات معنی‌داری را برای مقایسات نشان نداد. اختلاف معنی‌داری برای میانگین نیاز شیمیایی اکسیژن ایزوله‌ها از خروجی‌های کلاریفار و استاندارد در مقایسه با استاندارد نفت را نشان داد. همچنین اختلاف معنی‌داری در میانگین نیاز بیولوژیکی اکسیژن ایزوله‌ها از ورودی هوا با استاندارد نفت مشاهده شد. دیگر مقایسات اختلافات معنی‌داری را بین گروه‌ها و بر اساس مقادیر برای به‌استثنا برای حداقل غلظت کشندگی نشان داد. اختلاف معنی‌داری برای زیست پالایی کروم نمونه‌های جدا شده از جریان هوا در مقایسه با نمونه‌های دیگر نقاط مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری برای میانگین مقادیر ایزوله‌های خروجی هوا و شرایط استاندارد مشاهده شد. همبستگی معنی‌داری بین متغیرها وجود داشت که این نشان دهنده‌ی رابطه‌ی معنی‌دار بین زیست پالایی کروم و نقاط نمونه گیری می‌باشد. همبستگی منفی بین درجه حرارت و pH نقطه‌ی نمونه‌گیری وجود داشت، ولی همبستگی مثبتی بین نیاز شیمیایی و زیستی اکسیژن مشاهده شد. یک همبستگی بین حداقل غلظت مهارکنندگی و دیگر متغیرها وجود داشت ولی معنی‌دار نبود. اختلافات معنی‌داری در نیاز بیولوژیکی اکسیژن ایزوله‌ها از کلاریفار، خروجی و ورودی هوا در مقایسه با استاندارد نفت مشاهده شد. دیگر مقایسات اختلافات معنی‌داری بین گروه‌ها نشان داد.

تعیین گونه‌های مقاوم

بر اساس نتایج این مطالعه، سویه‌های *Klebsiella variicola, Bacillus aerius, Bacillus stratosphericus* و *Lysinibacillus fusiformis* گونه‌های مقاومی بودند و در غلظت‌های مختلف کروم کشت داده شدند و رشد آن‌ها بررسی شد و نتایج در نمودار ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست آمده تقریبا تمام باکتری‌ها از الگوی مشابهی پیروی کردند. نتایج نشان داد که باکتری‌های کشت داده شده در غلظت بزرگتری از کروم، دیرتر شروع به رشد کردند و رشد این باکتری‌ها معمولا ۴۸ ساعت پس از کشت شروع شد. رشد باکتری‌های به‌ترتیب در تیمارهای کنترل، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی-

گرم بزرگتر بود. تمام باکتری‌هـا از ۷۲ سـاعت بـه بعـد روال ثابتی از رشد را نشان دادند.



نمودار ۲ - رشد باکتری‌های منتخب مقاوم در غلظت‌های مختلف کروم در زمان‌های مختلف.

بحث

نتایج نشان داد که باکتری‌های مقاوم به کروم می‌توانند از نقاط آلوده‌ی پالایشگاه نفت کرمانشاه جدا شوند. مشابه به نتایج این مطالعه، چندین مطالعه نشان دادند که باکتری-های مقاوم به فلزات می‌توانند از نقاط آلوده جدا شوند (۲۰،۱۹،۱۸،۵). مشابه به یافته‌های این مطالعه، Mustapha & Halimoon (۲۱) ۲۱ باکتری را جدا کرد و نشان داد که ۵ باکتری از آن‌ها به کروم مقاوم بودند. جذب کروم توسط باکتری‌ها بعلت حضور گروه‌های عاملی مختلف روی دیواره‌ی سلولی و نفوذ اولیه می‌باشد (۲۳،۲۲،۵). به‌نظر می‌رسد که سلول‌های باکتریایی اکسیداسیون را در طول زیست پالایی تحمل می‌کنند و باعث می‌شود که بتوانند به کروم شش ظرفیتی مقاومت نشان دهند و آن‌را جذب نمایند (۲۳). قبلا گزارش شده است که گروه‌های عاملی باکتریایی با یون‌های فلزی تعامل می‌کنند و از این طریق به جذب کروم کمک می‌کنند (۲۴). در واقع یون‌های فلزی توانستند پیوندهایی با پپتیدها تشکیل دهند و از این راه به جذب و پالایش کمک می‌کنند (۲۵). نتایج این مطالعه در دو بخش مختلف نشان داد که میکروارگانیسم‌های مختلف توانایی‌های مختلفی برای باند شدن به عنصر کروم را دارند، که این ممکن است به ساختار میکروارگانیسم‌ها مربوط شود.

این مطالعه نشان داد که بزرگترین غلظت کروم (۱۰۰۰ میلی مولار) در چندین ایزوله مشاهده شد. نتایج بدست آمده برای این غلظت کروم ۴۵/۵۰ برابر بزرگتر از نتایج گزارش شده توسط Viti و همکاران (۷) و ۱/۶۰ برابر بزرگتر از نتایج گزارش شده توسط Amoozegar و همکاران (۲۶) و حدود ۱/۳ برابر بزرگتر از نتایج گزارش شده توسط Zolfaghary و همکاران (۲۷) می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که میکروارگانیسم‌های مقاوم قادر به تحمل ۱۵۰-۱۰ میلی‌گرم/لیتر کرومات بودند که تقریبا همسو با نتایج بخش آزمایشگاهی می‌باشد (۲۸).

یافته‌های این مطالعه نشان داد که ایزوله‌های *Bacillus* ،*Klebsiella variicola*, *Bacillus aerius*

stratosphericus، *Lysinibacillus fusiformis*، *Klebsiella pneumoniae* بزرگترین مقدار عددی را برای حداقل مقدار مهارکنندگی نشان دادند. ایزوله‌های جدا شده از *Lysinibacillus fusiformis*، *Lysinibacillus fusiformis*، *Bacillus stratosphericus*، *Bacillus aerius* *Klebsiella variicola* و *Pseudomonas aeruginosa* بزرگترین پالایش زیستی را داشتند (۰/۲۶ تا ۰/۲۸ قسمت در میلیون). نتایج همچنین نشان داد که باکتری‌های *Staphylococcus epidermidis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Citrobacter freundii*، *Enterobacter asburiae* حداقل غلظت کشندگی را در مقایسه با دیگر سویه‌ها بود.

بر اساس نتایج به‌دست آمده، دو سویه‌ی *Klebsiella varicola* جدا شده از خروجی هوا و دیگری از استاندارد نفت، مقادیر مختلیف را برای پالایش زیستی، نیاز شیمیایی و زیستی اکسیژن، دما و حداقل غلظت کشندگی نشان دادند، به‌طوری که *Klebsiella varicola* جدا شده دارای پالایش زیستی بزرگ و بزرگترین مقدار برای حداقل غلظت مهارکنندگی بود، با این‌حال، *Klebsiella varicola* جدا شده از خروجی هوا دارای پالایش زیستی پایین‌تر بود. نتایج نشان داد که بیشترین زیست پالایی کروم در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد و pH ۸ می‌باشد. حذف کروم به رشد بهینه‌ی سلولی بستگی دارد که بتواند در آن pH رشد نماید. براساس مطالعات، پالایش کروم یک فرآیند وابسته به آنزیم است و تغییرات در pH روی یونیزاسیون تأثیر می‌گذارد، و باعث تشکیل پروتئین‌ها و نهایتا فعالیت آنزیم‌ها می‌شود (۲۹).

نتایج بخش آزمایشگاهی در این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت کروم، رشد باکتری‌ها نیز کاهش یافت. مشابه به نتایج این مطالعه، چندین مطالعه نشان دادند که نرخ رشد ایزوله‌های باکتریایی در حضور عناصر فلزی کند بود (۳۰،۲۸،۲۰). محققین کاهش رشد را به افزایش غلظت کروم نسبت داده‌اند و بیان کردند که در شرایط کنترل شده، تنها غلظت کروم است که مانع رشد بیشتر باکتری‌ها می‌شود (۲۰). این محققین همچنین بیان کردند که استفاده از مواد مغذی در محیط کشت باکتری‌ها می‌توانند اثرات منفی کروم روی رشد را کاهش دهد. کاهش رشد باکتری‌ها در محیط‌های حاوی کروم بعلت محرومیت یونی، تجمع زیستی فلزات توسط میکروب‌ها و تولید پروتئین‌های با وزن مولکلی کم می‌باشد (۳۱).

در مجموع یافته‌های این مطالعه نشان داد که بزرگترین زیست پالایی در ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد و pH برابر با ۸ بود. با در نظر گرفتن مقاومت زیاد سویه‌های *Klebsiella variicola*، *Bacillus aerius*، *Bacillus stratosphericus* و *Lysinibacillus fusiformis* این سویه‌ها می‌توانند برای زیست پالایی کروم و کاهش آلودگی‌ها در محیط‌های آلوده به کروم، خصوصا پالایشگاه‌های نفت استفاده شوند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدین وسیله از جناب آقای دکتر علی الفتی (A.olfati65@gmail.com) به لحاظ مساعدت‌ها و راهنمایی‌های فراوان در انجام این تحقیق و تدوین مقاله، کمال تشکر و قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

1. Aljuboury, D. A., Palaniandy, P., Abdul Aziz, H. B., Feroz, S., 2014. Organic pollutants removal from petroleum refinery wastewater with nanotitania photo-catalyst and solar irradiation in soar oil refinery. J Innov Eng 2(3): 5.
2. Sazegar, M. R., Khojasteh, F., 2009. Using of the friendly environmental chemical compounds in order to increase the rate of the sludge settling in the petroleum refineries API wastewater pounds. 1st International Conference on Advances in Wastewater Treatment and Reuse 1-5.
3. Tariq, M., Waseem, M., Rasool, M. H., Zahoor, M. A., Hussain, I., 2019. Isolation and molecular characterization of the indigenous *Staphylococcus aureus* strain K1 with the ability to reduce hexavalent chromium for its application in bioremediation of metal contaminated sites. Peer J 7: e7726.
4. Fatima, H. E., Ahmed, A., 2018. Micro-remediation of chromium contaminated soils. Peer J 6: e6076.
5. Khan, Z., Nisar, M. A., Hussain, S. Z., Arshad, M. N., Rehman, A., 2015. Cadmium resistance mechanism in Escherichia coli P4 and its potential use to bioremediation environmental cadmium. Appl Microbiol Biotechnol 99: 10745-10757.
6. Kaur, H., Kumar, A., Kaur, H., 2014. Bioremediation of hexavalent chromium in wastewater effluent by

Pseudomonas putida (MTCC 102). Int J Res 1: 2311-2484.
7. Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2014. Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. FEMS Microbiol Rev 38: 633-659.
8. Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C., Moreno-Sànchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol Rev 25: 335-347.
9. Gupta, N., Kumar, V., 2012. Identification and isolation of heavy metal (copper) resistant bacteria. Arch Appl Sci Res 4: 577-583.
10. Hassan, Z., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Nafees, M., Waseem, M., 2017. Role of bioremediation agents (bacteria, fungi, and algae) in alleviating heavy metal toxicity. In: Kumar V, Kumar M, Sharma S, Prasad R, eds. Probiotics in agro ecosystem. Singapore: Springer Singapore: 517-537.
11. Ahluwalia, S. S., Goyal, D., 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. Bioresource Technol 98: 2243-2257.
12. Kothe, E., Bergmann, H., Büchel, G., 2005. Molecular mechanisms in bio-geo-interactions: from a case study to general mechanisms. Chemie der Erde-Geochemistry 65: 7-27.
13. Min, D., Xianglin, S., 2002. Molecular mechanisms of Cr (VI)-induced carcinogenesis. Mol Cell Biochem 234/235: 293-300.
14. Watts, R. J., 2004. Hazardous wastes, sources, pathway, receptor. Hohn Wiley and sons: 14-18.
15. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2012, 22th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
16. Pal, A., Paul, A. K., 2004. Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. Microbiol Res 159: 347-354.
17. Holt, G.J., Krieg, R.N., Sneath, A. H. P., Staley, T. J., Williams, T. S., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology; 9th ed. Baltimore, USA: Williams and Wilkins Co.
18. Alam, M. Z., Ahmad, S., 2011. Chromium removal through biosorption and bioaccumulation by bacteria from tannery effluents contaminated soil. Clean Soil, Air, Water 39: 226-237.
19. Oaikhena, E. E., Makaije, D. B., Denwe, S. D., Namadi, M. M., Haroun, A. A., 2016. Bioremediation potentials of heavy metal tolerant bacteria isolated from petroleum refinery effluent. Am J Environ Protect 5(2): 29-34.
20. Zhang, X., Krumholz, L. R., Yu, Z., Chen, Y., Liu, P., Li, X., 2013. A novel subspecies of Staphylococcus aureus from sediments of Lanzhou reach of the Yellow River aerobically reduces hexavalent chromium. J Bioremediat Biodegrad 4(4): 188.
21. Mustapha, M. U., Halimoon, N., 2015. Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent. Procedia Environ Sci 30: 33-37.
22. Zhenggang, X., Yi, D., Huimin, H., Liang, W., Yunlin, Z., Guiyan, Y., 2018. Biosorption characteristics of Mn (II) by Bacillus cereus Strain HM-5 isolated from soil contaminated by manganese Ore. Pol J Environ Stud 28: 463-472.
23. Long, J., Chen, D., Xia, J., Luo, D., Zheng, B., Chen, Y., 2017. Equilibrium and kinetics studies on biosorption of thallium (I) by dead biomass of pseudomonas fluorescents. Pol J Environ Stud 26: 1591-1598.
24. Bueno, B. Y. M., Torem, M. L., Molina, F., De Mesquita, L. M. S., 2008. Biosorption of lead (II), chromium (III) and copper (II) by R. opacus: equilibrium and kinetic studies. Miner Engin 21: 65-75.
25. Pandi, M., Shashirekha, V., Swamy, M., 2009. Bioabsorption of chromium from retain chrome liquor by cyanobacteria. Microbiol Res 164: 420-428.
26. Amoozegar, M., Ghasemi, A., Razavi, M. R., Naddaf, S., 2007. Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, Nesterenkonia sp. Strain MF2. Process Biochem 42: 1475-1479.
27. Zolfaghary, M., Malekzadeh, F., Amoozegar, M., Razavii, M., 2006. Isolation of chromium and teluritedouble resistance bacteria from industrial wastewater with effect on bioremediation. Technol Sci 10: 279-293.
28. Shakoori, A. R., Makhdoom, M., Haq, R. U., 2000. Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. Appl Microbiol Biotechnol 53: 348-351.
29. Mishra, R., Sinha, V., Kannan, A., Upreti, R. K., 2012. Reduction of chromium-VI by chromium resistant Lactobacilli: A prospective bacterium for bioremediation. Toxicol Int 19: 25-30.
30. Ahemad, M., 2014. Bacterial mechanisms for Cr (VI) resistance and reduction: an overview and recent advances. Folia Microbiologica 59: 321-332.
31. Das, S., Dash, H. R., Chakraborty, J., 2016. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. Appl Microbiol Biotechnol 100: 2967-2984.