**فصلنامه علمی پژوهشی زمین شناسی محیط زیست**
**سال ششم، شماره ۱۹، تابستان ۱۳۹۱**

# جدا سازی و شناسایی باکتری های مقاوم به کروم به منظور پاکسازی فاضلاب های آلوده

مریم قانع

استادیارگروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر Ghaneh@iiau.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۷/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۳/۱۶

## چکیده

آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین همگام با پیشرفت صنعت رو به افزایش است. حذف فلزات سنگین با استفاده از روش های شیمیایی بسیار پر هزینه بوده و نیاز به فناوری پیشرفته ای دارد. راه ارزان تر، پاکسازی زیستی (bioremediation) با استفاده از میکرو ارگانیسم های مقاوم به فلزات می باشد. در این تحقیق ۵ باکتری مقاوم به کروم از فاضلاب کارخانه جات آب کاری فلزات واقع در شهرستان اسلامشهر جداسازی شدند. باکتری های جدا شده بر روی محیط کشت nutrient agar (NA) با غلظت ۱mM کروم (Cr VI) به خوبی رشد می کردند. شناسایی باکتری های فوق از روی صفات ریخت شناسی، بیوشیمیایی فیزیولوژی و در نهایت مطالعات مولکولی از طریق تعیین توالی ژن 16S rRNA صورت گرفت. مطالعات نشان داد که باکتری های فوق متعلق به جنس های *Comamonas* ، *Acinetobacter* و *Acidovorax* می باشند. حداقل غلظت مهاری (MIC) کروم برای باکتری های جدا شده تعیین شد. مطالعات نشان داد که همه باکتری های فوق به غلظت های بالای کروم مقاوم بوده و حداقل غلظت مهاری کروم در سویه های مختلف ٦-٤ mM بود. نتایج حاصل پیشنهاد می کند سویه های جدا شده به دلیل مقاومت بالا به کروم، دارای پتانسیل بالایی برای پاکسازی فاضلاب های آلوده به کروم می باشند.

**واژگان کلیدی**: پاک سازی زیستی، باکتری های مقاوم به کروم، فلزات سنگین

## مقدمه

آلودگی فلزی یک مشکل جهانی است، میزان فلزات در کلیه محیط ها از قبیل هوا، آب و خاک، رو به افزایش است و در برخی موارد به حد سمی می رسد که علت آن انتشار آلودگی از منابع صنعتی به محیط زیست است. مطابق گزارش سازمان جهانی بهداشت فلزاتی که از لحاظ آلودگی زیستی از اهمیت بالاتری برخوردارند شامل کادمیوم، کروم، کبالت، مس سرب نیکل، جیوه و روی می باشند [4]. حضور این فلزات در آب های سطحی و خاک ها برای اکوسیستم و سلامت انسان تهدید جدی محسوب می شود. تجمع فلزات سنگین در انسان باعث کاهش رشد عوارضی از قبیل کمبود فسفر خون، آسیب های مغزی و کلیوی، سرطان، بیماری های قلبی عروقی و آسیب به سیستم اعصاب مرکزی خواهد شد [5]. روش های شیمیایی و فیزیکی برای پاکسازی این آلاینده ها به دلیل پرهزینه بودن و ایجاد آلودگی ثانویه مناسب

نیستند [6]. پاکسازی زیستی راه حل مناسب برای پاکسازی محیط های آلوده می باشد [7]. اخیراً استفاده از میکرو ارگانیسم های مقاوم به فلزات سنگین به منظور پاکسازی زیستی توجه زیادی را به خود معطوف داشته است. میکرو ارگانیسم ها مکانیسم های متنوعی را برای سازگاری و پاسخ به فلزات سنگین به کار می گیرند. این مکانیسم ها شامل تراوش تشکیل کمپلکس و ساخت پروتئین های اتصالی مانند متالوتیونین ها می باشند [8]. میکرو ارگانیسم هایی که می توانند در غلظت های بالای فلزات رشد کنند برای پاکسازی بسیار مناسب اند چرا که این میکرو ارگانیسم ها باعث تغییر حالت اکسیداسیون و احیا و یا تثبیت فلز می شوند [9]. کروم یکی از منابع مهم آلوده کننده محیط زیست می باشد. کروم از طریق صنایع دباغی، پارچه بافی رنگ سازی، آبکاری فلزات و نیز کشاورزی به محیط زیست وارد می شود [10]. کروم از لحاظ اکسیداسیون به چندین شکل وجود دارد ولی پایدارترین آن ها کروم سه ظرفیتی (Cr (III)) و کروم شش ظرفیتی ( Cr (VI)) است. این دو حالت از لحاظ ویژگی های فیزیکی و تاثیرات بیولوژیکی متفاوت اند [11,12]. Cr (VI) به میزان زیادی محلول بوده و ماده خطرناکی محسوب می شود که می تواند آب و خاک را آلوده کند[13]. این حالت از کروم برای میکرو ارگانیسم ها نیز سمی است. فعالیت آنزیمی آن ها را کاهش می دهد و حتی در غلظت های پایین باعث ایجاد جهش می شود؛ با این وجود باکتری هایی که به مدت طولانی در معرض فلزات سنگین قرار می گیرند تحت تاثیر فشار گزینشی قرار گرفته و این امر باعث تکثیر میکروب هایی می شود که به فلزات مقاوم می باشند [14]. مطالعات زیادی در زمینه جداسازی باکتری های مقاوم به کروم از مناطق آلوده انجام شده است. برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ جنس باسیلوس در خاک های آلوده به Cr (VI) گزارش شد [15,16]. در سال ۱۹۹۷ ثابت شد که آنزیم کرومات ردوکتاز در باسیلوس وجود دارد [17]. مطالعات نشان داده برخی باکتری ها مانند *Pseudomonas aeruginosa* [18]، *Arthrobacter* sp [19] و *Bacillus* sp [20] به کروم مقاوم هستند. ذوالفقاری و همکاران میکروارگانیسم های تحمل کننده کروم و مقاوم آنتی بیوتیک را از پساب نساجی، آبکاری و رنگرزی قم بررسی کردند. آنان در تحقیقات خود سویه هایی را جدا نمودند که قادر به رشد در غلظت ۵mM کرومات پتاسیم بودند[۲،۱]. قاسمی و همکاران مقاومت به کرومات را در باکتری های نمک دوست نسبی بومی ایران بررسی کردند و نشان دادند که یکی از سویه های جدا شده در غلظت های mM ۱-۰/۱ قادر به حذف کروم بود [۳]. وجود کارخانجات مختلف در شهرستان اسلامشهر این شهرستان را در معرض آلودگی با انواع آلاینده ها از جمله فلزات سنگین قرار داده است. صنایع آبکاری فلزات مقدار زیادی فلز را وارد آب و خاک های مجاور این صنایع می کند. فاضلاب این کارخانه ها میکرو ارگانیسم هایی را با خود حمل می کند که به غلظت های بالای فلزات مقاوم بوده و می توانند در پاکسازی زیستی فاضلاب این کارخانجات مورد استفاده قرار گیرند. هدف از انجام این تحقیق، جدا سازی و شناسایی باکتری های مقاوم به کروم از فاضلاب های آلوده بود تا بتوان سویه هایی را یافت که در آینده از آن ها برای پاکسازی زیستی فاضلاب های آلوده به کروم استفاده شود.

## مواد و روش کار

انواع محیط های کشت و مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merk (کشور آلمان) و کیت استخراج DNA از شرکت Promega (کشور آمریکا) و کیت خالص سازی محصول PCR از شرکت Fermantas ( کشور لیتوانی) تهیه شدند.

## جداسازی باکتری های مقاوم به فلزات سنگین

نمونه گیری از فاضلاب کارخانجات آبکاری فلزات موجود در شهرستان اسلامشهر انجام شد. نمونه ها برای کشت میکروبی در ظروف شیشه ای استریل جمع آوری شدند. نمونه ها در فلاسک، در مجاورت یخ قرار داده شده و حداکثر پس از ٤ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند.

محلول ۱mM از دی کرومات پتاسیم ($K_2Cr_2O_7$) در آب مقطر تهیه شد و با استفاده از صافی میلی پور ۰/۲۲ µm، استریل شد. برای جدا سازی باکتری های مقاوم از محیط کشت Nutrient Agar (NA) استفاده شد. محلول استریل دی کرومات پتاسیم با غلظت نهایی ۱mM ، به محیط کشت NA افزوده شد. جدا سازی باکتری های مقاوم کروم از طریق کشت مستقیم در محیط جامد صورت گرفت. در روش کشت مستقیم میزان ۰/۱ml از نمونه فاضلاب در محیط NA حاوی غلظت ۱ mM دی کرومات پتاسیم پخش شد. محیط ها در دمای ۳۰°C به مدت ٤٨ ساعت گرماگذاری شدند. پس از گرماگذاری، کلنی هایی که از لحاظ ریخت شناسی با هم تفاوت داشتند، انتخاب شده و به طور جداگانه بر روی پلیت های NA، به صورت خطی کشت داده شدند و از آن ها کشت خالص تهیه شد.

## بررسی میزان مقاومت باکتری ها در برابر کروم

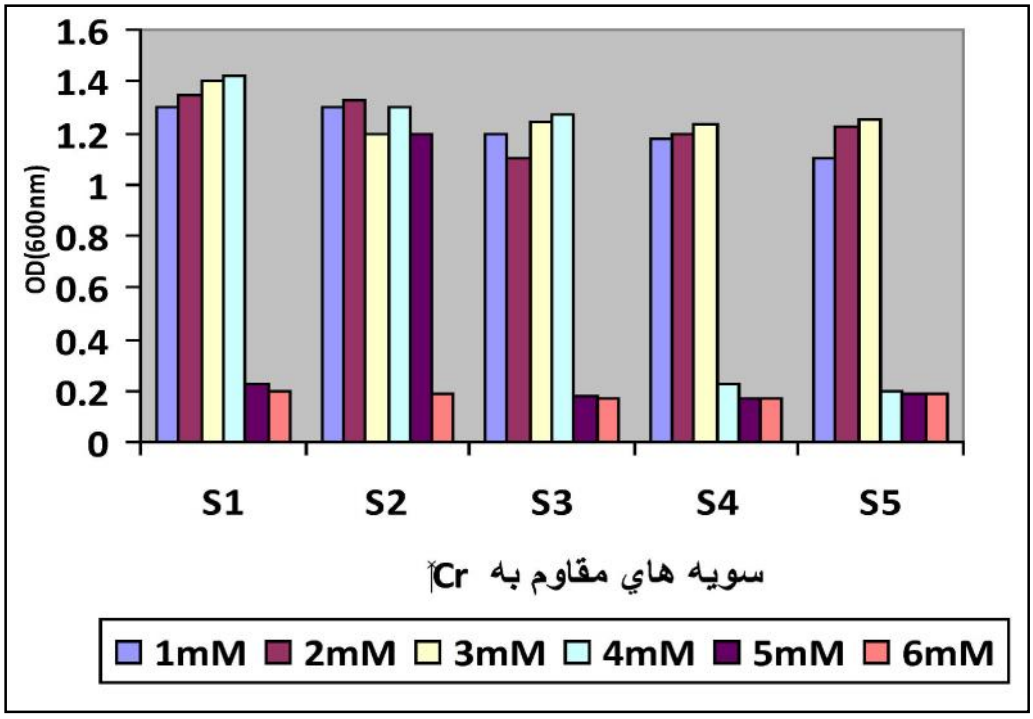
حداقل غلظت مهاری (MIC) کروم بر روی باکتری های جدا شده با استفاده از محیط کشت مایع مورد آزمایش قرار گرفت [18] .MIC فلز پایین ترین غلظت فلز است که باکتری پس از مدت زمان گرماگذاری در آن رشد قابل مشاهده ای ندارد. پس از تهیه کشت خالص باکتری ها، برای تعیین MIC کروم ، مقاومت باکتری در محیط کشت مایع حاوی غلظت های مختلف کروم مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور محیط کشت های Nutrient Broth (NB) با غلظت های ۱ ، ۲ ، ۳ ، ٤ ۵ و ٦ میلی مولار از محلول دی کرومات پتاسیم تهیه شد. باکتری های جدا شده پس از تهیه کشت شبانه در محیط های ساخته شده کشت داده شدند و به مدت ٤٨-٢٤ ساعت در دمای ۳۰°C گرما گذاری شدند و دانسیته نوری (OD) هر یک با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد.

## بررسی ویژگی های ریخت شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سویه های جدا شده

بعد از تهیه کشت خالص، باکتری ها ی جدا شده مطابق با روش برگی (Bergey) مورد شناسایی قرار گرفتند [22]. برای بررسی منحنی رشد باکتری ها در حضور کروم، محیط کشت NB با غلظت ۱ mM دی کرومات پتاسیم تهیه شد و از هر یک از باکتری ها در آن ها تلقیح گردید. میزان دانسیته نوری (OD) در ساعت های مختلف پس از تلقیح اندازه گیری شد و منحنی رشد رسم گردید.

## روش های مولکولی برای شناسایی باکتری ها

برای شناسایی مولکولی سویه های جدا شده از روش تکثیر ژن 16S rRNA استفاده شد. برای این کار از پرایمر های یونیورسال F1 و R1 (F1: agagtttgatcatggctc , R1: aaggaggtgatccaacc) استفاده شد. برای تهیه DNA الگو یک کلنی منفرد از هر یک از سویه های جدا شده در ۵ ml محیط کشت Luria Bertani (LB ) در دمای ۳۰°C به صورت شبانه کشت داده شدند [23]، سپس استخراج DNA بر اساس دستورعمل شرکت سازنده کیت صورت گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) مطابق با روش های استاندارد [23] و برنامه زمانی ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل) ، ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه ٤٥°C به مدت ٦٠ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ٦٠ ثانیه (۳۰ سیکل)، ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل) انجام شد [23]. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه Geldoc (Uvitec England) مورد بررسی قرار گرفت [23]. محصول PCR پس از خالص سازی از روی ژل با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR ، توسط شرکت Microgene (کره جنوبی) توالی یابی شد. توالی های ژن 16S rRNA با استفاده از Blast با اطلاعات موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) مقایسه شد. پس از نامگذاری، ژن های مربوطه در GenBank ثبت شدند.




شکل ۱- اثر غلظت های مختلف کروم (MIC) بر رشد سویه های جدا شده

## نتایج

### تعیین MIC کروم بر روی باکتری ها

در جستجوی باکتری های مقاوم بـه کـروم، ۵ بـاکتری مقاوم به کروم از فاضلاب کارخانجات آبکاری فلـزات در شهرستان اسلامشهر به دست آمد. نتـایج حاصـل از تعیین MIC کروم در شکل ۱ آمده است. همـان گونـه که در شکل ۱ مشاهده می شود، بیشترین کاهش رشـد پس از افزودن غلظت ٤ mM کروم در سویه های $S_4$ و $S_5$ مشاهده شد. اگرچه سویه های $S_1$ و $S_3$ نسبت به سویه های $S_4$ و $S_5$ مقاومـت بیشـتری نسـبت بـه کروم نشان دادند، ولی بیشترین مقاومت در سویـه $S_2$ مشاهده شد. این سویه در غلظـت ۵ mM کـروم نیـز به خوبی رشد می کرد.

### بررسـی و ویژگـی هـای ریخـت شـناختی بیوشیمیایی و فیزیولوژی

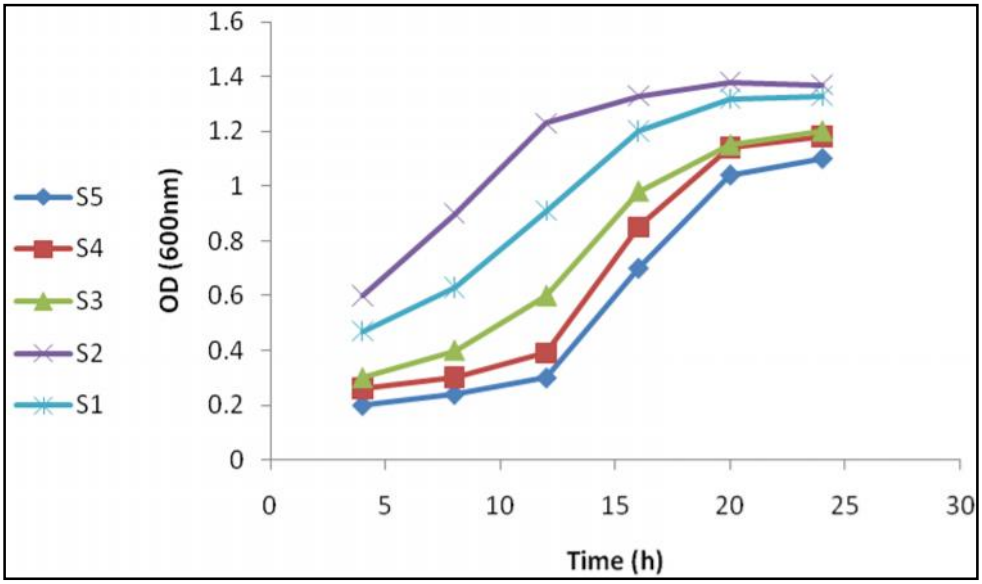
نتایج حاصل از مطالعات ویژگی های ریخت شناسـی بیوشیمیـایی و فیزیـولوژی سویـه های جـدا شـده در جدول ۱ آمده است. منحنی رشد سویه های جدا شـده در حضـور فلـز کـروم نیـز در شـکل ۲ آمـده اسـت. همانگونه که در شکل مشاهده می شود سویه های $S_1$ و $S_2$ نسـبت بـه سـویه هـای $S_3$ ، $S_4$ و $S_5$ رشـد سریع تری داشتند.

جدول ۱- مشخصات بیوشیمیایی سویه های جدا شده

| مشخصات | سویه های مقاوم به کروم | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $S_1$ | $S_2$ | $S_3$ | $S_4$ | $S_5$ |
| رنگ آمیزی گرم | - | - | - | - | - |
| مورفولوژی | میله ای | کوکوباسیل | کوکوباسیل | کوکوباسیل | میله ای |
| اسپور | - | - | - | - | - |
| حرکت | + | - | - | - | + |
| کاتالاز | + | - | + | + | + |
| اکسیداز | - | - | - | - | + |
| تولید رنگدانه | - | - | - | - | - |
| تولید اسید از گلوکز | - | - | - | - | - |
| هیدرولیز | - | - | - | - | - |
| نشاسته | - | - | - | - | + |
| ژلاتین | - | - | - | - | - |
| مصرف سیترات | + | + | - | + | - |

## مطالعات فیلوژنتیک

ژن 16S rRNA سویه های جدا شده توالی یابی شدند. نتایج حاصل از توالی یابی با اطلاعات موجود در GenBank مقایسه شد. مطالعات فیلوژنتیک نشان داد که باکتری های فوق متعلق به جنس های *Comamonas* ، *Acinetobacter* و *Acidovorax* می باشند. توالی های نوکلئوتیدی به دست آمده در این تحقیق در GenBank ثبت شد (جدول ۲).




شکل ۲- منحنی رشد سویه های جدا شده در حضور کروم

جدول ۲- نام و کد های پذیرش سویه های جدا شده مقاوم به کروم

| سویه های جدا شده | کد پذیرش (Accession Number) | نام برگزیده شده |
|---|---|---|
| $S_1$ | JN573358 | Comamonas sp. HM_AF12 |
| $S_2$ | JN573359 | Acinetobacter sp. HM_AF14 |
| $S_3$ | JN600958 | Acinetobacter sp. HM_AF8 |
| $S_4$ | JN600959 | Acinetobacter sp. HM_AF13 |
| $S_5$ | JN676128 | Acidovorax sp. HM_AH3 |

**بحث**

پاکسازی زیستی آلودگی های فلزی از فاضلاب های صنعتی با استفاده از باکتری های مقاوم به فلزات، جنبه مهمی از بیوتکنولوژی محیطی است. وجود کارخانجات مختلف در شهرستان اسلامشهر، این شهرستان را در معرض آلودگی با انواع آلاینده ها از جمله فلزات سنگین قرار داده است. در این تحقیق به منظور یافتن باکتری های مقاوم به کروم از کارخانجات آبکاری فلزات شهرستان اسلامشهر نمونه برداری صورت گرفت و باکتری های مقاوم به فلز کروم جدا شدند. MIC کروم برای هر یک از سویه ها ی جدا شده مورد آزمایش قرار گرفت. مطابق گزارش Neito باکتری هایی که توانایی رشد در غلظت mM ۱ فلزات را داشته باشند، باکتری های مقاوم نامیده می شوند [21]. نتایج این تحقیق نشان داد که همه سویه ها ی جدا شده به کروم مقاوم بوده و در حضور کروم به خوبی رشد می کردند.

مطالعات فیلوژنتیک بر پایه 16S rRNA نشان داد که باکتری های فوق متعلق به جنس های *Comamonas*، *Acinetobacter* و *Acidovorax* می باشد. خواص فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سویه های جدا شده در این مطالعه نیز با خواص فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جنس های فوق مطابقت دارد [22]. گزارش های قبلی توسط محققان نشان داده بود اعضای جنس های *Comamonas* *Acinetobacter* و *Acidovorax* اغلب در محیط هایی نظیر لجن فعال ، مرداب و زیست گاه های دریایی و بافت های حیوانات و گیاهان یافت می شوند [24,25,26,27]. این باکتری ها، ژن هایی دارند که آن ها را قادر می سازد به تغییرات محیط پاسخ دهند. نیچ های اکولوژیکی متنوع این باکتری ها پیشنهاد می کند که این باکتری ها نماینده گروهی از باکتری ها هستند که می توانند از لحاظ فیزیولوژیکی و اکولوژیکی به محیط سازگار شوند. مطالعات نشان داده که باکتری های متعلق به جنس های فوق توانایی مقاومت در برابر فلزات سنگین را دارند [28,29]. Roy و همکاران باسیلوس مقاوم به فلزات سنگین را از آب های سطحی جدا کردند. حداقل غلظت مهاری کروم برای سویه جدا شده ۲mM بود [30]. Hussein و همکاران سویه های *Pseudomonas* مقاوم به فلزات سنگین را از حوضچه های تصفیه فاضلاب جدا کردند. حداقل غلظت مهاری کروم برای سویه های جدا شده ٤mM بود [31]. سویه های $S_4$ و$S_5$ جدا شده در این تحقیق مقاومتی مشابه سویه های *Pseudomonas* داشتند در حالی که سویه های $S_1$ ، $S_2$ و $S_3$ مقاومت بالاتری را نسبت به کروم نشان دادند به طوری که حداقل غلظت مهاری برای سویه های فوق به ترتیب ٥، ٦ و٥ میلی مولار بود. در این تحقیق مقاومت بالای باکتری های جدا شده نسبت به کروم نمایانگر سازگاری باکتری ها به غلظت های بالای کروم موجود در فاضلاب آبکاری کروم و انتخاب طبیعی آن ها می باشد. این مشاهدات با گزارشات Losi و همکاران مطابقت دارد [32]. آنان گزارش نمودند که سویه های جدا شده از رسوبات آلوده نسبت به سویه هایی که از مناطق غیر آلوده به دست آمده بودند مقاوم تر بودند. همچنین Camargo و همکاران نشان دادند که خاک آلوده با کروم باعث انتخاب طبیعی و ایجاد تنوع در باکتری های مقاوم به کروم می شود [20].

## نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که سویه های جدا شده به دلیل مقاومت بالا به کروم و توانایی رشد در حضور غلظت های بالای این فلز پتانسیل بالقوه ای جهت پاکسازی محیطی و کنترل آلودگی فلز سمی کروم دارند.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با استفاده از حمایت های مالی حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر به انجام رسیده است و از همکاری و مساعدت آنها صمیمانه قدردانی می شود.

## منابع

۱- ذوالفقاری، م، ملک زاده، ف، آموزگار،م ، رضوی، م (۱۳۸۷). جداسازی یک باکتری با مقاومت دو جانبه بسیار بالا نسبت به اکسی آنیون های سمی تلوریت و کرومات از پساب صنایع دارای کاربرد ویژه در پاک سازی زیستی، سویهKWT2 علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره دهم، شماره ۱ ص ۷۳- ۵۹.

۲- ذوالفقاری، م، سلیمانی درچاق، م، مسعودیخواه، م، خداداد مطلق، م، حیدرپور، ا، (۱۳۹۱). فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم های تحمل کننده کروم در پساب صنایع استان قم، مجله دانشگاه علوم پزشکی قم، دوره ششم، شماره دوم ص ۲۳-۱۵.

۳- قاسمی، ع، (۱۳۸۵)، بررسی مقاومت به کرومات و حذف آن در باکتری های نمک دوست نسبی بومی ایران، پایان نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه تهران، ۱۱۵ص.

4-WHO, (2010). Guideline for drinking water Quality recommendation, (vol. 1) ,World Health Organization, Geneva, 154 p.

5-Mahvi, A.H., (2008). Application of agricultural fibers in pollution removal from aqueous solution. Int. J. Environ. Sci. Tech, 5 (2), pp 275-285.

6-Okafor, E.C., Opuene, H., (2007). Preliminary assessment of trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments. Int. J. Environ. Sci. Tech, 4 (2), pp 233-240.

7-Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., Thamaraiselvi, K., (2007). Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. J. Hazard. Mater, 146, pp 270-277.

8-Adamis, P.D., Gomes, D. S., Preira, M. D., Freire de Mesquita, J., Pinto, M.L., Panek, A.D., Eleutherio, E. C., (2004). The effect of superoxide dismutase deficiency on cadmium stress. J. Biochem. Mol. Toxicol, 18, pp 12-17.

9-Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S., (2008). Bacterial biosorption. *Biotechnol*. Adv, 26, pp 266-291.

10-Gunguli, A., Tripathi, A.K., (2002) Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2C HR in two bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol, 58, pp 416-420.

11-Ceverantes, C., Garcia, J.C., Devars, S., Corona, T.F.G., Tavera, H.L., Guzman, J.C., Sanchez, R.M., (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS. Microbiol. Rev, 25., pp 335-347.

12-Fendorf, S.E., Wielenga, B.W., Hansel, C.M., (2000). Chromium transformations in natural environments: The role of biological processes in chromium (VI) reduction. Int. Geol. Rev, 42, pp 691-701.

13-Sultan, S., Hasnain, S., (2003). *Pseudomonas* strains exhibiting high level Cr (VI) resistance and Cr (VI) detoxification potential. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 71, pp 473-480.

14-Viti, C., Giovannetti, L., (2001). The impact of chromium contamination on soil heterotrophic microorganisms. Ann. Microbial, 51, pp 201-213.

15-Wang,Y.T., Xiao, C., (1995). Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure culture of bacteria. Water Res, 29, pp 2467-2474.

16-Campos, J., Martinez- Pacheco, M., Cervantes, C., (1995). Hexavalent chromium reduction by chromate- resistant *Bacillus* sp. Antonie van leeuwenhoke, 68, pp 203-206.

17-Campos-Garcia, J., Martinez- Cadena, G., Alvarez, R., (1997). Purification and partial characterization of chromate reductase from

*Bacillus* sp. Rev. Lat. AM. Microbiol, 39, pp 73-81.
18-Cervantes, C., Ohtake, H., (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *pseudomonas aeruginosa*. FEMS. Microbiol. Let, 56, pp 173-176.
19-Megharaj, M., Avudainayagam, S., Naidu, R., (2003). Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. Curr. Microbiol, 47, pp 51-54.
20-Camargo, F.A.O., Okeke, C.B., Bento, M.F., Frankenberger, T.W., (2005). Diversity of chromium-resistant bacteria isolated from soil contaminated with dichromate. App. Soil. Ecol, 29, pp 193-202.
21-Nieto, J. J., Fernandes-Castillo, R., Marquez, M. C., Ventoza, A., Quesada, E., Ruiz- Berraquero, F., (1989). Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Appl. Environ. Microbiol, 55, pp 2385-2390.
22-Holt, G. J., Krieg, R. N., Sneath, A. H. P., Staley, T., Williams, T.S., (1993). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9rd. Ed. London: Williams and Willkins, 787 p.
23-Sambrok, J., Russell, D, W., Maniatis, T., (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL Press), 954 p.
24-Chou, J. H., Sheu, S.Y., Lin, K.Y., Chen, W.M., Arun, A.B., Young. C.C.**,** **(**2007). *Comamonas odontotermitis* sp. nov., isolated from the gut of the termite *Odontotermes formosanus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 57, pp 887-891.
25-Gumaelius, L., Magnusson, G., Pettersson, B., Dalhammar, G., (2001). *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 51, pp 999-1006.
26-Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F., Fani, R., (1997). Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of anew species, *Acinetobacter venetianus*. Research Microbiol, 148, pp 237-49.
27-Tohmy, E.y., Abu Zeid, A.A, Hazaa, M.M., Hassan, R., (2006). Heavy metal biosorption by some bacterial species isolated from drinking water at different sites in Sharqia Govenorate. J. Agric. Sci. Ain shams univ, 14(1), pp 147-172.
28-Siunova, T. V.,Siunov, A.V., Kochetkov, V.V., Boronin, A.M., (2009). The *cnr* -like operon in strain *Comamonas* sp. encoding resistance to cobalt and nickel. Russian. J. Genetics, 45 (3), pp 336-341.
29-Dhakephalkar, P.K., Chopade, B.A., (1994). High levels of multiple metal resistances and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. Bio. Metals, 7 (1), pp 67-74.
30-Roy, S., Mishra, K., Chowdhury, S., Raychaudhuri, S., (2008). Isolation and characterization of novel metal accumulating extracellular protease secreting bacteria from marine coastal regin of Digha in West Bengal, India. J. Biol. Sci, 8(1), pp 25-311.
31-Hussein, H., Moawad,H., Farag, S., (2004). Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metal contaminants. Arab J. Biotechnol, 7 (1), pp 13-22.
32-Losi, M. E., Amrhin, C., Frankenberg, W.T., (1994). Bioremediation of chromate-contaminated ground water by reduction and precipitation in surface soils. J. Environ. Qual, 23, pp 1141-1150.