علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره شش، شهریور ماه ۹۹

جداسازی و شناسایی *Proteus* sp. مقاوم به کادمیوم و بررسی پتانسیل آن در حذف بیولوژیکی کادمیوم

مرجان میر حسینی نیا[۱]

مریم قانع[۲*]

ghane@iiau.ac.ir

پریسا نجات خواه[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: آلودگی اکوسیستم‌ها با فلزات سنگین مبحث مهمی در دنیای امروز است. حذف فلزات سنگین از مکان‌های آلوده با استفاده از میکروارگانیسم‌ها، در مقایسه با روش‌های شیمیایی مقرون به صرفه‌تر است. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به کادمیوم، تعیین کم‌ترین غلظت مهاری کادمیوم (MIC) و بررسی توانایی حذف کادمیوم توسط سویه‌ها بود.

روش بررسی: جداسازی باکتری‌های مقاوم با روش غنی‌سازی در محیط کشت حاوی فلز کادمیوم صورت گرفت. MIC کادمیوم با روش رقیق‌سازی در آگار و میزان حذف کادمیوم با استفاده از دستگاه جذب اتمی بررسی شد. شناسایی با روش برگی (Bergey) و مطالعات فیلوژنتیک بر مبنای توالی ژن 16S rRNA انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه ۴۰ سویهٔ مقاوم به کادمیوم از رودخانه سالور در شهرستان اسلامشهر جدا شدند. نتایج نشان داد سویهٔ ST1 که از رسوبات جدا شده بود، مقاومت بالایی به کادمیوم داشته و MIC کادمیوم برای این سویه ۶ mM بود. این سویه توانایی حذف ۶۵/۲ ٪ کادمیوم را از محلول ۱ mM کادمیوم داشت. مطالعات مولکولی نشان داد که سویهٔ جدا شده به جنس *Proteus* تعلق داشته و ۹۹ ٪ با *Proteus mirabilis* مشابهت دارد. سویه جدا شده *Proteus* sp. HM_AF12 نامیده شد و توالی نوکلئوتیدی آن در GenBank ثبت شد. این سویه توانایی تحمل محدوده وسیعی از pH (۹-۵/۵) را داشته و در ۷/۵ ٪ نمک نیز رشد می‌کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که *Proteus* sp. HM_AF12 می‌تواند یک جاذب زیستی کم هزینه و دوست‌دار محیط زیست باشد و کاربردهای مهمی در حذف کادمیوم از محیط‌های آلوده داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *Proteus* sp. HM_AF12، حذف زیستی، کادمیوم، رودخانه سالور

۱- کارشناس ارشد آلودگی و حفاظت محیط زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران *(مسئول مکاتبات).

۳-دانشیار، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

J. Env. Sci. Tech., Vol 22, No.6, August, 2020

Isolation and Identification of Cadmium Resistant *Proteus* sp. and Its Potential in Cadmium Bio Removal

Marjan Mirhosseininia[1]

Maryam Ghane[2*]

ghane@iiau.ac.ir

Parisa Nejatkhah[3]

Accepted: 2017.06.07 Received: 2016.06.05

Abstract

Background: The contamination of ecosystems with heavy metals is an important issue in current world. Removal of heavy metals from contaminated sites using microorganisms is a cheaper alternative to chemical technologies. The aim of present study was isolation and characterization of Cadmium resistant bacteria, determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and bio removal potential of the isolates.

Materials and Methods: Isolation of Cadmium resistant bacteria was carried out by enrichment method by medium supplemented with Cadmium chloride. The minimum inhibitory concentration of Cd^{2+} was determined by the agar plate dilution method and the Cadmium removal evaluated by atomic absorption spectroscopy. Identification was carried out in accordance with Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and phylogenetic analysis was performed based on 16S rRNA gene sequences.

Results: A total of 40 Cadmium resistant strains were isolated from Salour River in Islamshahr. The results showed that bacterial strain ST1 isolated from sediments was highly resistant to Cadmium. The MIC of Cd^{2+} for selected isolate was 6 mM. The isolate was able to remove 65.2% of Cadmium at Cadmium concentration of 1 mM. Phylogenetic analysis showed that ST1 belongs to the genus *Proteus* with 99% similarity to *Proteus mirabilis* then designated as *Proteus* sp. HM_AF12. The strain had a wide pH tolerance of 5.5–9.0, and salt tolerance was up to 7.5% NaCl.

Conclusion: The results implied that *Proteus* sp. HM_AF12 can be a low cost and environmental friendly bio sorbent that may have important application in Cd^{2+}removal from polluted environment.

Key words: *Proteus* Sp. HM_AF12, Bio removal, Cadmium, Salour River.

1 - M. Sc., Marine Pollution Control and Environment Protection, Faculty of Marine Science & Technology, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran

2 - *Assistant Professor, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran *(Corresponding Author)*

3- Associate Professor, *Department of Marine Biology*, Faculty of Marine Science & Technology, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran

مقدمه

فلزات سنگین از طریق پساب‌های صنعتی، کشاورزی و خانگی به محیط آزاد می‌شوند و مشکلاتی را برای سلامت انسان و نیز موجودات آبزی به وجود می‌آورند(۱). آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین یک معضل جهانی است که این امر به دلیل تجمع فلزات در زنجیرهٔ غذایی و تداوم پایداری آن‌ها در اکوسیستم است(۲). تخلیه‌ی کنترل نشدهٔ زباله‌های دارای فلزات سنگین، هزینه‌های عظیم اقتصادی و مراقبت‌های سلامت را به خصوص برای افرادی که در نزدیکی این نواحی زندگی می‌کنند، تحمیل می‌کند(۳). در میان فلزات سنگین کادمیوم به شدت سمی است و به میزان زیادی در باطری‌های قابل شارژ نیکل- کادمیوم، کودها، حشره کش‌ها، رنگ‌ها، تصفیه خانه‌های فلزات، آبکاری، و استخراج معادن استفاده می‌شود(۵، ۴). کادمیم به طور انتخابی در ریه‌ها، کلیه‌ها، کبد، لوزالمعده و استخوان‌ها ذخیره و آن‌ها را تخریب می‌کند(۶). ترکیب کادمیوم با رادیکال‌های هیدروکسیل، آنیون‌های سوپر اکسید، اکسید نیتریک و پراکسیدها در اندام‌های مختلف می‌تواند موجب ایجاد سرطان ریه، کلیه، پانکراس، پروستات و کبد شود. علاوه بر این کادمیوم در کلیه تجمع یافته و سبب ایجاد اختلال در عملکرد کلیه شده و موجب دفع پروتئین در ادرار و اختلال در متابولیسم پروتئین می‌شود(۱). با توجه به سمیت کادمیوم و اثرات مخرب آن در بهداشت و سلامت، حذف آن از محیط زیست ضروری است. روش‌های مرسوم برای حذف کادمیوم شامل رسوب شیمیایی، فیلتراسیون، روش‌های الکتروشیمیایی، تعویض یونی، اسمز معکوس و جذب در دسترس هستند(۹-۷)؛ با این وجود در سال‌های اخیر روش‌های جذب زیستی(biosorption) برای حذف فلزات سنگین بسیار مورد توجه قرار گرفته است چرا که بسیار موثر، مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست می‌باشند(۸، ۱۰).

جذب زیستی یک تکنولوژی بدیع با استفاده از زیست توده‌های زنده یا مرده است که در آن فلزات از محلول‌های آبی حذف می‌شوند. اخیرا زیست توده‌های میکروبی نظیر باکتری‌ها(۱۱)، قارچ‌ها(۱۲)، جلبک‌ها(۲) و مخمرها(۱۳) به عنوان جاذب‌های زیستی فلزات سنگین به طور موفقیت آمیزی به کار گرفته شده‌اند. در بین میکرواوگانیسم‌ها، باکتری‌ها مکانیسم‌های مقاومتی مختلفی را برای خنثی نمودن استرس‌های فلزی به کار می‌برند(۱۴).

گزارشات زیادی در مورد کاربرد باکتری‌ها در حذف کادمیوم وجود دارد(۶، ۹). Arivalagan و همکاران (۲۰۱۴) ، *Bacillus cereus* مقاوم به کادمیوم را از خاک‌های آلوده به صنایع آبکاری جدا کردند که توانایی حذف کادمیوم را داشت (۱۴). قانع و همکاران (۲۰۱۳) باکتری *Comamonas* sp. مقاوم به فلزات سنگین را از پساب‌های صنعتی جدا کردند که توانایی حذف ۸۰ ٪ کروم از محلول mg/L ۵ کروم را داشت(۱۵). گزارشات نشان داده که *Acinetobacter* sp. جدا شده از پساب‌های صنعتی، توانایی حذف ۶۵ ٪ نیکل را از محلول mM ۱ روی دارد(۱۶). جذب زیستی کادمیوم و نیکل توسط باکتری‌های غیر فعال جدا شده از خاک‌های کشاورزی که با لجن فاضلاب آبیاری شده بودند، توسط محمدزاده و همکاران (۲۰۱۲) مورد آزمایش قرار گرفت؛ آن‌ها دریافتند که *Actinomycete* sp. مقاوم‌ترین سویه نسبت به کادمیوم و نیکل بود(۱۷).

رودخانه شاطره در شهرستان اسلامشهر در جنوب غربی تهران قرار دارد. فعالیت‌های انسان‌زاد (Anthropogenic)، صنعتی شدن، فعالیت‌های کشاورزی، شهر سازی و غیره باعث آلوده شدن آب و رسوبات این رودخانه با فلزات سنگین شده است. گزارشات نشان داده که میزان کادمیوم در این رودخانه بالاست است(۱۸) که این امر می‌تواند سبب توسعه مقاومت در میکروارگانیسم‌های بومی این منطقه شود. مطالعه میکروارگانیسم‌های مقاوم که از مناطق آلوده به دست می آید بسیار قابل توجه می‌باشد چرا که منجر به جدا شدن سویه‌های جدید و احتمالا اطلاعات ژنتیکی جدید خواهد شد که در آینده برای پاک‌سازی محیط‌های آلوده به کار می‌رود. نظر به اهمیت میکروارگانیسم‌ها در پاک‌سازی زیستی

محیط‌های آلوده به فلزات سنگین، هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی سویه‌های مقاوم به کادمیوم با توانایی حذف مقادیر قابل ملاحظه‌ای از کادمیوم بود. تحقیق حاضر، اولین مطالعه در مورد بررسی باکتری‌های بومی مقاوم به کادمیوم از آب و رسوبات رودخانهٔ سالور است.

روش بررسی

جدا سازی باکتری‌ها

سویه‌های جدا شده در این تحقیق از آب و رسوبات رودخانه سالور در شهرستان اسلامشهر(عرض جغرافیایی ۳۵/۴۶۰۶۷۰ و طول جغرافیایی ۵۱/۲۵۶۷۱۴) واقع در جنوب غربی تهران جدا شدند. محلول ذخیرهٔ M ۱ (مولار) کادمیوم با حل نمودن $CdCl_2$ در آب مقطر تهیه شده و با استفاده از صافی‌های میلی پور ۰/ ۲۲ استریل شد. برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به کادمیوم ۱ گرم از رسوب یا ۱ میلی لیتر از نمونهٔ آب رودخانه به mL ۹ محیط کشت Luria Bertani broth (LB) (Merk, Germany) با غلظت نهایی mM ۱ کلرید کادمیوم اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ℃ ۳۰ گرما گذاری شدند. سپس µL ۲۰۰ از کشت‌های فوق در محیط کشت LB آگار با غلظت نهایی mM ۱ کلرید کادمیوم کشت داده شده و مجدداً گرما گذاری شدند. ۴۰ سویه مقاوم که از لحاظ مورفولوژی متفاوت بودند انتخاب شده و از آنها در محیط کشت LB آگار با غلظت نهایی mM ۱ کلرید کادمیوم کشت خالص تهیه شد.

تعیین میزان مقاومت به کادمیوم

برای تعیین میزان مقاومت به کادمیوم، باکتری‌های جدا شده در محیط کشت LB آگار با غلظت‌های mM ۶-۱ کلرید کادمیوم کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ℃ ۳۰ گرما گذاری شدند. کم‌ترین غلظتی که مانع رشد باکتری‌ها شود به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود. سویه‌هایی که بالاترین MIC را نسبت به کادمیوم نشان دادند برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

شناسایی باکتری های مقاوم به کادمیوم

شناسایی سویه‌ها با استفاده از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مطابق با روش برگی صورت گرفت(۱۹). ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله محدودهٔ pH و دمای بهینه رشد و تحمل غلظت‌های مختلف نمک و مصرف منابع کربن مختلف و نیز آزمایشات کاتالاز، اکسیداز، ژلاتیناز و آمیلاز برای سویهٔ منتخب مورد آزمایش قرار گرفت.

برای شناسایی مولکولی سویهٔ جدا شده از روش تکثیر ژن 16S rRNA استفاده شد. برای این کار از پرایمرهای یونیورسال F1 و R1 (F1: agagtttgatcatggctc , R1: aaggaggtgatccaacc) استفاده شد. برای تهیه DNA الگو یک کلنی منفرد از سویه جدا شده در ml ۵ محیط کشت LB broth در دمای $^{\circ}C$ ۳۰ به صورت شبانه کشت داده شد (۲۰) ، سپس استخراج DNA بر اساس دستور کار شرکت سازندهٔ کیت (شرکت Promega) صورت گرفت. واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction) مطابق با روش‌های استاندارد و برنامه زمانی ^{o}C۹۵ به مدت ۵ دقیقه(۱ سیکل) ، ^{o}C ۹۰ به مدت ۳۰ ثانیه، ^{o}C ۴۵ به مدت ۶۰ ثانیه، ^{o}C ۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه (۳۰ سیکل)، ^{o}C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل) انجام شد(۲۰). سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ ٪ (Merk, Germany) الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Sigma- Aldrich) با استفاده از دستگاه Geldoc (Uvitec England) مورد بررسی قرار گرفت(۲۰). محصول PCR پس از خالص سازی، از روی ژل با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (Fermantas) ، توسط شرکت Microgene (کره جنوبی) توالی یابی شد. توالی‌های ژن 16S rRNA با استفاده از Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) با اطلاعات موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) مقایسه شد.

رسم منحنی رشد باکتری‌های جدا شده

محیط کشت LB broth با غلظت‌های ۱-۴ mM کلرید کادمیوم و نیز محیط کشت بدون فلز(کنترل) در فلاسک تهیه شد. از کشت باکتری‌ها در مرحله لگاریتمی با نسبت ۱:۲۰ به هریک از فلاسک‌ها تلقیح شده و به مدت ۷۲ ساعت در ۳۰ °C در شیکر انکوباتور(۱۸۰ rpm) گرماگذاری شدند. رشد باکتری‌ها در ۶۰۰ nm هر ۲ ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Beckman) اندازه‌گیری شد. تمام آزمایشات با ۳ بار تکرار انجام شد.

بررسی توانایی حذف کادمیوم

برای مطالعه حذف کادمیوم توسط سلول‌های زنده، از باکتری کشت شبانه در محیط LB broth تهیه گردید. سپس کشت شبانه به نسبت ۱:۱۰ برای رسیدن به حجم نهایی ۲۰۰ mL به محیط کشت LB broth با غلظت ۱ mM کلرید کادمیوم اضافه گردید. در هر بررسی ۲۰۰mL محیط کشت LB broth با غلظت ۱ mM کلرید کادمیوم نیز به عنوان محیط کشت کنترل تهیه شد. محیط‌ها در ۱۸۰ rpm به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ °C گرما گذاری شدند سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند تا توده سلولی کاملاً از مایع رویی جدا گردد. مایع رویی جهت اندازه گیری میزان کادمیوم به ظرف دیگری منتقل شد. برای اندازه گیری میزان کادمیوم در توده سلولی، ابتدا توده سلولی یک بار با آب مقطر شستشو گردید و به مدت یک شب در ۱۰۵ °C قرار داده شد تا به صورت توده خشک درآید. سپس با اسید نیتریک غلیظ مخلوط و حجم آن با آب مقطر استریل به ۵ mL رسانده شد. میزان کادمیوم در نمونه‌ها به وسیلهٔ دستگاه جذب اتمی (Philips, PU 9100X) اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس(ANOVA) و آزمون دانکن به وسیلهٔ نرم افزار SPSS Ver. 20 صورت گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی سویه‌های مقاوم به کادمیوم

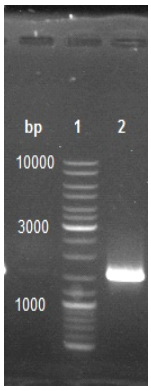
در این مطالعه ۴۰ سویه مقاوم به کادمیوم از آب و رسوبات رودخانه سالور به دست آمد. تمام سویه‌ها به غلظت ۱ mM کادمیوم مقاوم بودند. نتایج آزمایشات مقاومت به کادمیوم نشان داد که ۱۲/۵ ٪ از این سویه‌ها به غلظت بیش از ۳ mM کادمیوم مقاوم بودند. در بین سویه‌های جدا شده سویه ST1 که مقاومت بالاتری نسبت به کادمیوم داشت، برای مطالعات بعدی انتخاب شد. کم‌ترین غلظت مهاری کادمیوم برای این سویه ۶ mM بود. شناسایی سویه جدا شده با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و نیز با استفاده از مطالعات مولکولی صورت گرفت. خواص بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سویهٔ منتخب در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سویهٔ ST1.

Table 1- Physiological and biochemical characteristics of ST1 strain.

ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک	نتایج
رنگ آمیزی گرم	-
مورفولوژی	باسیل
تولید اسپور	-
حرکت	+
کاتالاز	+
اکسیداز	-
ایندول	-
تولید پیگمان	-
هیدرولیز نشاسته	+
اوره	+
ژلاتین	+
مصرف سیترات	+
متیل رد	+
VP	-
تولید اسید از:	
گلوکز	+
سوکروز	-
لاکتوز	-
مالتوز	-
رشد در غلظت‌های NaCl (mM) :	
۷/۵	+
۱۰	-
۱۵	-
رشد در pH :	
۵/۵	+
۸	+
۹	+

نتایج حاصل از PCR ژن 16S rRNA سویه جدا شده در شکل ۱ نشان داده شده است. تعداد ۱۲۵۰ نوکلئوتید از توالی ژن 16S rRNA سویه جدا شده توالی یابی شد. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در GenBank نشان داد که سویه ST1 متعلق به جنس *Proteus* است. سویه فوق *Proteus* sp. HM_AF12 نامیده شد و توالی نوکلئوتیدی به دست آمده در GenBank ثبت شد (Accession number: KF590024). مقایسه توالی به دست آمده با سایر توالی‌های موجود با استفاده از نرم افزار Blast نشان داد که سویهٔ جدا شده ۹۹ ٪ با *Proteus mirabilis* مشابهت دارد.



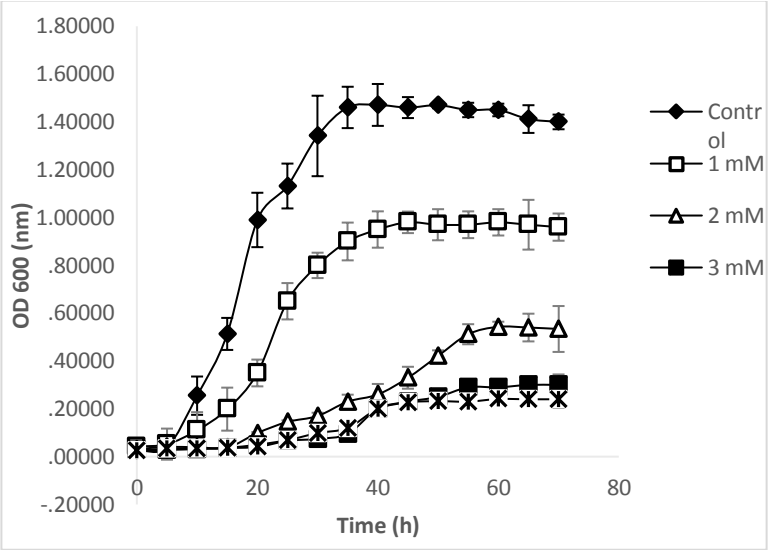
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rRNA بر روی ژل آگارز یک درصد. ستون شماره ۱ مارکر وزن مولکولی 10 Kb، ستون شمارهٔ ۲ محصول PCR ژن 16 S rRNA.

Figure 1- Gel electrophoresis of PCR amplified 16S rRNA gene product on 1% agarose. Lane 1, 10 kb ladder; Lane 2, PCR product of 16SrRNA gene.

بررسی رشد در غلظت‌های مختلف کادمیوم

منحنی رشد سویه ST1 در غلظت‌های ۱-۴ mM کلرید کادمیوم در شکل ۲ نشان داده شده است. تاثیر کادمیوم بر روی رشد این سویه به طور معنی داری بسته به غلظت کادمیوم متفاوت بود. منحنی رشد این سویه در محیط LB حاوی ۱ mM کادمیوم و محیط LB فاقد کادمیوم دارای یک فاز تاخیری و نمایی مشابه بودند. رشد این سویه در غلظت‌های بالاتر کادمیوم (۲-۴ mM)، به طور معنی داری ($p < 0.001$) کاهش می‌یافت که نشان دهندهٔ سمیت کادمیوم در غلظت‌های بالاتر برای سویهٔ مورد مطالعه است.

در غلظت ۲ mM کادمیوم، فاز لگاریتمی طولانی‌تر بوده و ۱۵ ساعت به طول می‌انجامید و بعد از آن رشد به آهستگی صورت می‌گرفت. منحنی رشد برای این سویه در LB حاوی ۳ یا ۴ میلی مولار کادمیوم مشابه بود؛ در حضور غلظت‌های ۳ و ۴ میلی مولار کادمیوم، فاز لگاریتمی ۲۰ ساعت طول می‌کشید و بعد از ۲۰ ساعت رشد به آهستگی صورت می گرفت و بعد از ۷۲ ساعت هیچ اختلاف معنی داری بین رشد این سویه در غلظت‌های فوق وجود نداشت. میزان حذف کادمیوم توسط سویه جدا شده ۶۵/۲ ٪ بود. این میزان برای فلاسک کنترل تا انتهای آزمایش فقط ۵/۱ ٪ بود.



شکل ۲- منحنی‌های رشد سویه ST1 در حضور غلظت‌های مختلف کادمیوم. مقادیر نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار ۳ آزمایش مستقل است.

Figure 2- Growth curves of ST1 strain in the presence of different concentrations of cadmium. Values indicate the mean ± standard deviation of 3 independent experiments.

بحث

محیط‌های آلوده به فلزات سنگین خطر جدی برای سلامت انسان و سایر موجودات محسوب می‌شوند. توانایی جذب فلزات سنگین و سمی توسط میکروارگانیسم‌ها، منجر به توجه خاص پژوهش‌گران به مطالعه توانایی انواع میکروارگانیسم‌ها در حذف این فلزات از محیط زیست گردیده است. باکتری‌ها با داشتن ویژگی‌های آنیونی در سطح ، تولید پلیمرخارج سلولی و جذب آنزیمی دارای توانایی‌های بالقوه جهت تغلیظ زیستی و بازیافت فلزات هستند. کادمیوم یکی از سمی‌ترین فلزات سنگین است که به روش‌های گوناگون وارد محیط زیست شده و برای موجودات زنده بسیار زیان آور است به همین دلیل حذف آن از محیط زیست ضروی است. در این مطالعه برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به کادمیوم، از نمونه‌های آب و رسوبات رودخانه سالور استفاده شد و ۴۰ سویه مقاوم به کادمیوم جدا شد. گزارشات نشان داده آب و رسوبات این رودخانه به دلیل ریختن پساب‌های صنعتی، کشاورزی و شهری، بسیار آلوده بوده و میزان کادمیوم در آن بالاتر از حد استاندارد است (۱۸). حضور مقادیر بالای کادمیوم می‌تواند منجر به ایجاد سویه‌های مقاوم شود. نتایج اولیه نشان داد که همهٔ سویه‌های جدا شده در این تحقیق به کادمیوم مقاوم بودند. جمعیت میکروبی در محیط‌های آلوده به فلزات، با غلظت‌های سمی فلزات سازگار شده و دارای تحمل یا مقاومت نسبت به آن‌ها می‌شوند(۲۱). در حقیقت میکروارگانیسم‌های این رودخانه به دلیل حضور مقادیر بالای کادمیوم در آب و رسوبات، متحمل فشار انتخابی شده و این امر در نهایت منجر به مقاوم شدن آن‌ها شده است. سویه جدا شده توانایی رشد در غلظت‌های بالای کادمیوم را داشت. MIC به دست آمده در این تحقیق قابل مقایسه با سایر نتایج می‌باشد. جباری و همکاران(۲۰۱۰)، *P.aeroginosa* مقاوم به کادمیوم را از لجن فعال یک کارخانه مواد غذایی در کرمان جدا کردند که MIC کادمیوم برای سویه فوق ۶ بود (۳). همچنین کم‌ترین غلظت ممانعت کننده از رشد برای *Klebsiella* sp. جدا شده از پساب نیز ۶ mM بود (۲۲).

این در حالی است که در اغلب مطالعات MIC بسیار پایین‌تر از مقادیر به دست آمده در این تحقیق می‌باشد(۲۳، ۲۴).

اندازه‌گیری سرعت رشد سویه‌ی انتخاب شده در حضور کادمیوم، اختلاف در میزان سمیت کادمیوم در غلظت‌های مختلف را برای سویهٔ جدا شده نشان داد. غلظت‌های پایین (۱ mM)، تاثیر کمی روی رشد سویه داشت، اما غلظت‌های بالاتر(۴-۲ mM) باعث طولانی‌تر شدن فاز تاخیری و کاهش بیومس می‌شد(شکل ۲). این مشاهدات موافق با مشاهدات قبلی است(۲۵). در این مطالعه زمانی که باکتری در مجاورت غلظت‌های بالاتر (۴-۳ mM) کادمیوم قرار می‌گرفت، رشد به طور معنی‌داری کاهش می‌یافت. این مشاهدات مؤید این مطلب است که میکروارگانیسم‌ها زمانی که در معرض استرس فلزی قرار می‌گیرند، انرژی را به جای رشد، برای نگهداری و بقاء سایر عملکردهای سلول منحرف می‌کنند به همین دلیل است که برای مقاومت نسبت به سمیت فلز، به انرژی بیش‌تری نیاز دارند(۲۶).

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک و نیز مطالعات مولکولی نشان داد که سویهٔ جدا شده به خانواده انتروباکتریاسه تعلق داشته و در جنس پروتئوس قرار دارد. گزارشات اخیر نشان داده که برخی از اعضای خانوادهٔ انتروباکتریاسه نسبت به فلزات سنگین مقاوم بوده و توانایی حذف فلزات سنگین را دارند. گزارشات نشان داده که *Enterobacter cloacae* جدا شده از معدن روی به میزان بالایی به کادمیوم مقاوم است(۲۷). سویهٔ *Klebsiella* sp. که از پساب‌های صنعتی چین جدا شده است به میزان زیادی به فلزات سنگین مقاوم بوده و توانایی جذب مقادیر بالایی از کادمیوم و منگنز را دارد(۲۲).

سویهٔ جدا شده دراین تحقیق نه تنها به کادمیوم مقاوم بود بلکه توانایی تجمع مقادیر قابل ملاحظه‌ای از کادمیوم(۶۵/۲ ٪) را داشت. نظر به این که سطح باکتری‌ها به دلیل گروه‌های کربوکسیل، آمین، هیدروکسیل، فسفات و سولفیدریل دارای بار منفی است، می‌تواند مقادیری از یون‌های فلزی دارای بار مثبت را جذب کند(۲۸). در مطالعه‌ای که بر روی باکتری‌های مقاوم به کادمیوم از مناطق صنعتی آلوده به فلزات سنگین در هند انجام شد، میزان جذب فلز توسط *Pseudomonas* sp. حدود ۴۰ ٪ گزارش شد(۲۹). *Stenotrophomonas maltophilia* جدا شده از رودخانه Mogpog در فیلیپین توانایی حذف ۲۴ ٪ کادمیوم را داشت(۳۰) و سلول‌های زنده *Pseudomonas aeruginosa* strain E1 که از خاک‌های آلوده به کادمیوم از چین جدا شده بود نیز توانایی حذف ۴۳/۳ ٪ کادمیوم را داشت(۶). میزان حذف کادمیوم توسط *Vibrio harveyi* جدا شده از بندر الکساندریا در مصر ۸۴ ٪ و بالاتر از مقدار به دست آمده در این تحقیق می‌باشد که البته این میزان جذب با استفاده از سلول‌های تثبیت شده و پس از بهینه کردن شرایط جذب به دست آمده بود(۳۱).

نتیجه گیری

در این تحقیق باکتری‌های مقاوم به کادمیوم از رودخانه سالور جدا شدند. نتایج نشان می‌دهد که درصد حذف کادمیوم توسط سویهٔ *Proteus* sp. HM_AF12 بالا است. مطالعات ابتدایی نشان می‌دهد که سویهٔ جدا شده دارای توانایی قابل ملاحظه‌ای برای حذف کادمیوم از آب‌های آلوده است؛ به علاوه توانایی رشد سویه‌های جدا شده در حضور نمک و در محدوده وسیع pH (۹-۵) بیان‌گر کار آمد بودن این سویه برای حذف این فلز از پساب‌های آلوده که بعضا این شرایط رادارند، می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که سویهٔ جدا می‌تواند نامزد مناسبی برای حذف کادمیوم از پساب‌های آلوده باشد.

منابع

1. Torab-Mostaedi, M., Asadollahzadeh, M., Alireza Hemmati, A., Khosravi, A., 2013. Equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies for biosorption of Cadmium and nickel on grapefruit peel. Journal of the Taiwan Institute of

Chemical Engineers, Vol. 44, pp. 295–302.

2. Ghoneim, M., El-Desoky, H., El-Moselhy, K, M., Amer, A., Abou El-Naga, E., Mohamedein, L., Al-Prol, A., 2014. Removal of Cadmium from aqueous solution using marine green algae, *Ulva lactuca*. Egyptian Journal of Aquatic Research, Vol. 40, pp. 235–242.
3. Jabbari Nezhad Kermani, A., Faezi Ghasemi , M., Khosravan, A., Farahmand, A., Shakibaie, M.R., 2010. Cadmium bioremediation by metal resistant mutated bacteria isolated from active sludge of industrial effluent. Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng, Vol. 7, pp. 279-286.
4. Pérez-Marín, A B., Ballester, A., González, F., Blázquez, M.L., Mu˜noz, J.A., Sáez,J., Zapata, V.M., 2008. Study of Cadmium, Zinc and Lead biosorption by orange wastes using the subsequent addition method. Bioresour. Technol, Vol. 99, pp. 8101–8106.
5. Hossain, A., Aditya, G., 2013. Cadmium biosorption potential of shell dust of the fresh water invasive snail Physa acuta. J. Environ. Chem. Eng, Vol. 1, pp. 574–580.
6. Zeng , Xi., Tang, X., Liu, X., Jiang, P., 2009. Isolation identification and characterization of Cadmium-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain E1. j.Cent.South Univ.Technol, Vol. 16, pp. 416-421.
7. Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. J.Environ. Manage, Vol. 92, pp. 407–418.
8. Xiao, X., Luo, S., Zeng, G., Wei, W., Wan, Y., Chen, L., Guo, H., Cao, Z., Yang, L., Chen, J., Xi,Q., 2010. Biosorption of Cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from Cadmium hyper accumulator Solanum nigrum L. Bioresour.Technol, Vol. 101, pp. 1668–1674.
9. Rathinam, A., Maharshi, B., Janardhanan, S.K., Jonnalagadda, R.R., Nair, B.U., 2010. Biosorption of Cadmium metal ion from simulated wastewaters using *Hypnea valentiae* biomass: a kinetic and thermodynamic study. Bioresour. Technol, Vol. 101, pp. 1466–1470.
10. Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. Environ. Int, Vol. 30, pp. 261–278.
11. Carpio, I.E., Machado-Santelli, G., Sakata, S.K, Ferreira Filho, S.S., Rodrigues, DF., 2014. Copper removal using a heavy-metal resistant microbial consortium in a fixed-bed reactor. Water Res. Vol. 1, no. 62, pp. 156-66.
12. Mishra, A., Malik, A., 2014. Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. Bioresour. Technol, Vol. 171, pp. 217-26.
13. Machado, M.D., Soares, E.V., Soares, H.M., 2010. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: Chemical speciation as a tool in the prediction and improving of treatment efficiency of real electroplating effluents Journal of Hazardous Materials, Vol. 180, pp. 347–353.

14. Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., Kaliannan, T., 2014. Removal of Cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. Ecological Engineering, Vol. 71, pp. 728–735.
15. Ghane, M., Tabandeh, F., Bandehpour, M., Ghane, M., 2013. Isolation and characterization of a heavy metal resistant *Comamonas* sp. from industrial effluents. Iranian Journal of Science & Technology, Vol. 37A2, pp. 173-179.
16. Bagheri Bejestani ,F., Ghane, M., Mirhosseininia, M., Bagheri Bejestani, O., 2013. Isolation and phylogenetic analysis of zinc resistant *Acinetobacter* sp. and its potential for bioremediation. African journal of biotechnology, Vol. 12, no. 26, pp. 4123-28.
17. Mohammadzadeh Karakagh, R., Chorom, M., Motamedi, H., Kianpoor, K.Y., Oustan, S., 2012. Biosorption of Cd and Ni by inactivated bacteria isolated from agricultural soil treated with sewage sludge. Ecohydrology & Hydrobiology, Vol. 12, no. 3, pp. 191-198.
18. Yazdi, M., Behzad, N., 2009. Geochemical Contamination in Seyab River. Islamshahr, Iran. Environmental Sciences, Vol. 6, no. 4, pp. 55-64.
19. Holt, G.J., Krieg, R.N., Sneath A.H.P., Staley, T., Williams, T.S., 1993. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9nd Edition. London: Williams and Willkins.
20. Sambrok, J., Russell D.W., Maniatis, T., 2001. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
21. Johncy, M., Hemambika, B., Hemapriya, J., Ajesh Kannan, V., 2010. Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: A biosorption approach. Afr. J. Environ. Sci. Technol, vol. 4, no. 2, pp. 77-83.
22. Hou, Y., Cheng, K., Li, Z., Ma, X., Wei, Y., Zhang, L., Wang, Y., 2015. Biosorption of Cadmium and Manganese Using Free Cells of *Klebsiella* sp. Isolated from Waste Water PLoS One, Vol. 10, no. 10 e0140962.
23. Harrison, J.J., Ceri, H., Stremick, C.A., Turner, R.J., 2004. Biofilm susceptibility to metal toxicity, Environmental Microbiology, Vol. 6, no. 12, pp. 1220-1227.
24. Raja, C.E., Anbazhagan, K. and Selvam, G.S., 2006. Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, World Journal of Microbiology and Technology, Vol. 22, pp. 577-585.
25. Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., Tang, M., 2009. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWRS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. Hazardous Materials, Vol. 162, pp. 50–56.
26. Roane, T.M., Rensing C., Pepper, I.L., Maier, R.M., 2008. Microorganisms and Metal Pollutants. Environmental Microbiology, 2nd Edition. Elsevier Science, San Diego, CA.

27. Qing, H., Min-na, D., Hong-yan, Q., Xiang-ming X., Guo-qiang, Z., Min, Y., 2007. Detection, isolation, and identification of Cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE. Journal of Environmental Sciences, Vol. 19, pp. 1114–1119.
28. Tortora, G.J., Funke, D.R., Case, C.L., 2005. Microbiology: An Introduction, 8th ed. San Fransisco, CA: Pearson Education Inc., publishing as Benjamin Cummings.
29. Krishna, M.P., Varghese, R., Babu, A.V., Mohamed Hatha, A.A., 2012. Bioaccumulation of Cadmium by *Pseudomonas* sp. isolated from metal polluted industrial region. Environmental Research Engineering and Management, Vol. 3, no. 61, pp. 58-64.
30. Parungao1, M.M., Tacata1, P.S., Tanayan, C.R.G., and Lorele C. Trinidad L.C., 2007. Biosorption of copper, Cadmium and lead by copper-resistant bacteria isolated from Mogpog River, Marinduque. Philippine Journal of Science, Vol. 136, no. 2, pp. 155-165.
31. Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G.M., El-Sersy, N.A., 2011. Cadmium resisting bacteria in Alexandria Eastern Harbor (Egypt) and optimization of Cadmium bioaccumulation by Vibrio harveyi. African Journal of Biotechnology, Vol. 10, no.17, pp. 3412-3423.